

Aus der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Becker
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE BEDEUTUNG DES TOLL-LIKE REZEPTOR 3 UND
INTERLEUKIN-10 POLYMORPHISMUS
ALS PROGNOTISCHE MARKER
BEIM KOLOREKTALEN KARZINOM**

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

vorgelegt von
MAYA BAUER
aus Hamburg

Kiel 2011

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. Schafmayer

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Hampe

Tag der mündlichen Prüfung: 19.12.12

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 19.12.12

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis	II
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms	1
1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	2
1.2.1 Exogene Faktoren	2
1.2.2 Endogene Faktoren	2
1.3 Pathogenese	4
1.4 Klinik und Diagnostik	6
1.5 Therapie und Prognose	6
1.6 Genetische Marker	8
1.6.1 SNP	8
1.6.2 Haplotyp-Blockstruktur	9
1.7 Genomweite Analysen und molekulargenetische Vorbefunde zum KRK ...	10
1.8 Krebs im Zusammenhang mit Entzündungsmechanismen	12
1.8.1 Interleukin-10 und Prognose	14
1.8.2 Toll-Like Rezeptor 3 und Prognose	15
1.9 Zielsetzung	16
2 Material und Methoden	17
2.1 Patientenkollektiv und Rekrutierung	17
2.2 Rekrutierungsplattform Popgen	18
2.3 Follow-up	19
2.4 Ein- und Ausschlusskriterien	19
2.5 Datenschutz und Ethik	20
2.6 Genotypisierung	21
2.7 Datenanalyse	22

3	Ergebnisse	23
3.1	Gesamtkollektiv	23
3.2	Genetische Marker und Prognose des KRK.....	27
3.2.1	Stadienassoziation des Toll-Like Rezeptor 3	29
3.3	Faktoren im Zusammenhang mit Überleben	30
3.3.1	IL-10 Assoziation mit dem Überleben	32
3.3.2	Toll-Like Rezeptor 3 Assoziation mit der Überlebensrate	32
4	Diskussion	37
4.1	Kollektiv	38
4.2	Prognosefaktoren	39
4.3	TLR-3	40
4.4	IL-10	42
4.5	Resümee und Aussicht	43
5	Zusammenfassung	44
6	Literaturverzeichnis	45
7	Anhang	58
7.1	Patientenfragebogen	58
7.2	Ethikvotum	68
	Danksagung	69
	Lebenslauf	70

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Altersspezifische Erkrankungsraten in Deutschland.....	1
Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz.....	5
Abbildung 3: Einzelbasenpolymorphismus	9
Abbildung 4: Teilnehmende Kliniken	17
Abbildung 5: Kaplan-Meier Schätzung für das spezifische Überleben beim kolorektalen Karzinom in Zusammenhang mit dem Genotyp des Toll- Like Rezeptor 3	33
Abbildung 6: Kaplan-Meier Schätzung für Patienten im Stadium II des kolorektalen Karzinoms	34
Abbildung 7: Kaplan-Meier Schätzung für Patienten ohne adjuvante Therapie.....	35

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Stadieneinteilung (UICC)	7
Tabelle 2: Auflistung untersuchter Polymorphismen.....	21
Tabelle 3: Follow-up Übersicht	23
Tabelle 4: Eigenschaften der Patienten.....	24
Tabelle 5: Histopathologisches Grading und TNM-Klassifikation	25
Tabelle 6: Therapeutisches Vorgehen.....	26
Tabelle 7: Auflistung der untersuchten Gene mit rs-Nummer und Angabe des Chromosoms	27
Tabelle 8: Assoziation des Genotyps mit den Tumorstadien und Subanalyse für Tumorgröße (T), Lymphknoten (N), Metastasen (M)	28
Tabelle 9: Toll-Like Rezeptor 3 Assoziation mit Tumorstadien.....	29
Tabelle 10: Subanalyse der TNM-Komponenten für den Toll-Like Rezeptor 3.....	29
Tabelle 11: Prognostische Faktoren im Zusammenhang mit dem Überleben beim kolorektalen Karzinom	30
Tabelle 12: Tumorstadien als prognostische Faktoren für das Überleben beim kolorektalen Karzinom	31
Tabelle 13: Interleukin-10 Assoziation mit der Überlebensrate.....	32
Tabelle 14: Toll-Like Rezeptor 3 Assoziation mit der Überlebensrate	32
Tabelle 15: Multivariate Analyse der Toll-Like Rezeptor 3 spezifischen Überlebensrate beim kolorektalen Karzinom	36

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
<i>APC</i>	adenomatous-polyposis-coli
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
<i>BMP4</i>	bone morphogenetic protein 4
C	Cytosin
<i>CARD</i>	caspase-activating-recruitment-domain
<i>CARD15</i>	caspase-activating-recruitment-domain, member 15
<i>CDH1</i>	cadherin 1
CED	chronisch-entzündliche Darmerkrankung
Chr.	Chromosom
CI	Konfidenzintervall
DCC	deleted-in-colon-carcinoma, Tumorsuppressorgen
DNA/DNS	Desoxyribonucleid acid/ Desoxyribonukleinsäure
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
5FU/FA	5-Fluoruracil/Folinsäure
G	Guanin
GWAS	Genomweite Assoziationsstudie
GSTT	glutathione S-transferase theta 1
HapMap	Karte der häufigsten Haplotypen
HNPCC	hereditäres nicht polypöses Kolonkarzinom
HRSA -VNTR	PTS system 2-O-a-mannosyl-D-glycerate specific transporter subunit IIABC- variable number of tandem repeats
IFN	Interferon
IL	Interleukin

<i>KRAS</i>	Kirsten-rat-sarcoma-viral-oncogene, Protoonkogen
KRK	Kolorektales Karzinom
MAF	minor allele frequencies
MAPK	Mitogen-activated-protein-kinase
MLH1	mutL homolog 1
MMR	Mismatch-Repair (DNA-Reparatursystem)
MSH2	mutS homolog 2
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MTHFR	methylenetetrahydrofolate reductase
NAT	N-acetyltransferase
NCBI	National Center for Biotechnology Information der National Library of Medicine und des National Institute of Health
NF-κB	Nuclear-factor kappa-B
NGFN	Nationales Genomforschungsnetz
OR	Odds Ratio
<i>p53</i>	<i>p53</i> -Tumorsuppressorgen
PAMP	Pathogen Associated Molecular Patterns
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
Poly (A:D)	Polyadenylic-polyuridycil acid
Poly (I:C)	Polyinosinic-polycytidylic acid
PopGen	Arbeitsgruppe zur Populationsgenetik
<i>RHPN2</i>	Rho GTPase binding protein
<i>SMAD7</i>	SMAD family member 7
SNP	single nucleotide polymorphism
Strep-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
T	Thymin

TLR-3	Toll-Like-Rezeptor 3
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNM	Tumor, Nodes (Lymphknoten), Metastasen
Tp53	Tumor protein p53
UICC	Union internationale contre le cancer
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WGA	Whole-Genome-Amplification

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des kolorektalen Karzinoms

Das kolorektale Karzinom (KRK) steht durchschnittlich und weltweit gesehen an dritter Stelle aller malignen Tumore (Parkin et al. 2005). Weltweit sind 1,2 Millionen Fälle bekannt, wovon die höchsten Inzidenzraten in Australien/Neuseeland und Westeuropa anzutreffen sind und die niedrigsten in Afrika und Südzentral-Asien. Männer sind häufiger betroffen als Frauen. Die Anzahl der Todesfälle beträgt etwa die Hälfte der Inzidenz. Das KRK ist damit die viert-häufigste zum Tode führende Krebserkrankung (Ferlay et al. 2010). In Deutschland ist das KRK mit 16% aller Krebsneuerkrankungen nicht nur das zweithäufigste diagnostizierte Krebsleiden, sondern mit über 13.000 Todesfällen bei Männern und Frauen die zweithäufigste Krebstodesursache. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei ca. 60% (Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. www.gekid.de). Patienten, die das 50. Lebensjahr überschritten haben, zeigen eine deutlich ansteigende Wahrscheinlichkeit an einem KRK zu erkranken.

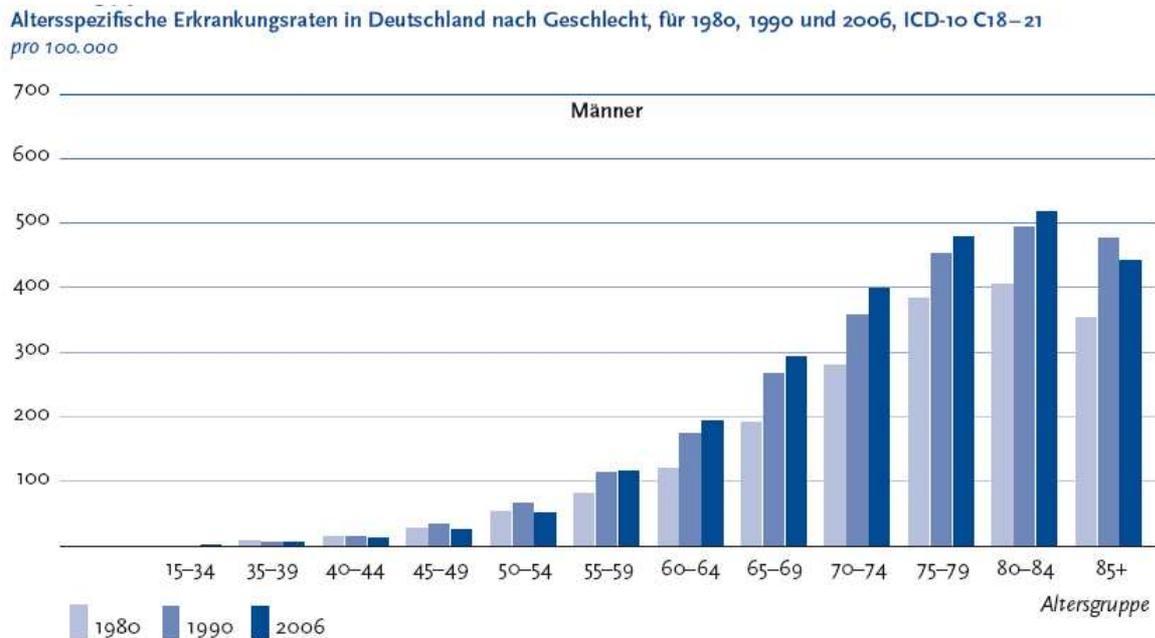


Abbildung 1: Altersspezifische Erkrankungsrate in Deutschland, Männer (aus Robert-Koch-Institut 2010, Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends)

Dies verdeutlicht, dass das KKR eine Erkrankung des höheren Alters ist (s. Abbildung 1). Aber auch der Anteil von Patienten, die vor dem 45. Lebensjahr erkranken, ist mit 10% nicht unwesentlich. Im Durchschnitt liegt das Erkrankungsalter bei Männern bei 69 Jahren und bei Frauen bei 75 Jahren (Robert-Koch-Institut 2006).

1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Ätiologie und Risikofaktoren, die die Entstehung des kolorektalen Karzinoms beeinflussen, sind vielschichtig. Dazu gehören erblich endogene, aber auch exogene Faktoren, wie zum Beispiel der Lebensstil.

1.2.1 Exogene Faktoren

Als Beispiel für exogene Einflussfaktoren gilt der Alkohol- und Tabakkonsum. So steigt die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms, mit einer Latenzzeit von 35 Jahren, dosisabhängig mit dem Konsum von Zigaretten (Giovannucci et al. 1994). Chao et al. wiesen 1997 in einer US-Studie nach, dass ca. 12% aller kolorektalen Karzinome dem Rauchen zugeschrieben werden können (Chao et al. 2000). Der Alkoholkonsum von 30g oder mehr pro Tag konnte als ein weiterer Risikofaktor für das KKR ausgemacht werden (Cho et al. 2004).

Ein entscheidender Einfluss auf die Entwicklung eines KKR wird auch der Ernährung zugeschrieben. Der Konsum von tierischen Fetten und „rotem“ Fleisch steht hierbei vor allem im Vordergrund, denn dessen vermehrter Verzehr steht in direktem Zusammenhang mit einer erhöhten Inzidenz des KKR (Franco et al. 2005). Der Verzehr von Obst und Gemüse hat einen positiven Effekt auf die Prävention des KKR. Insbesondere Menschen, die weniger als zwei Mahlzeiten Obst und Gemüse pro Tag zu sich nehmen, können durch eine gesteigerte Aufnahme dieser Nahrungsmittel ihr Risiko für ein KKR senken (Terry et al. 2001).

1.2.2 Endogene Faktoren

Abgesehen von den exogenen Einflüssen, sind auch genetische Faktoren für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms entscheidend. In Zwillingsstudien wurde festgestellt, dass ca. 30% der KKR-Fälle familiär bedingt sind (Lichtenstein et al. 2000; Kemp et al. 2004; Davidson 2007). Ein besonders hohes Risiko haben hierbei Personen, die mehrere betroffene oder besonders jung erkrankte Familienmitglieder

aufweisen (Johns und Houlston 2001). Die Erkrankung eines KRK in der Eigenanamnese ist ein weiterer endogener Risikofaktor. Das Risiko solcher Patienten für die Entwicklung eines Adenoms liegt bei 30-48% und für ein zweites KRK bei 0,6-9% (Balleste et al. 2007). Aber auch die Vorerkrankung an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED), wie Colitis ulcersosa oder Morbus Crohn, kann das Risiko steigern (Bernstein et al. 2001).

Ungefähr 5% der hereditären Form des KRK können penetrant vererbten und gut charakterisierten Mutationen zugeschrieben werden (Jasperson et al. 2010). Diese sogenannten syndromalen Erkrankungen stellen eine spezielle Untergruppe dar, da bei ihnen ein besonders erhöhtes Risikopotenzial besteht, an einem KRK zu erkranken. Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) und das hereditäre nicht-polypöse kolorektale Krebsyndrom (HNPCC) sind wohl die bekanntesten Vertreter dieser Art.

HNPCC oder auch Lynch-Syndrom, ist ein autosomal dominant vererbtes Syndrom, das 1-5% der kolorektalen Karzinome ausmacht und hierbei vor allem junge Menschen betrifft (Kemp et al. 2004). Dabei tritt es zumeist rechtsseitig mit wenigen großen Polypen auf und ist häufig mit Veränderungen im DNA-Reparatursystem, den Mismatch-repair Genen, wie beispielsweise *MLH1* und *MSH2*, verbunden (Davidson 2007). Es müssen bestimmte Kriterien erfüllt werden um die Diagnose eines HNPCC zu stellen, welche nach Amsterdam und Bethesda eingeteilt werden (Vasen et al. 1999; Rodriguez-Bigas et al. 1997).

Auch die familiäre adenomatöse Polyposis gehört zu den Erkrankungen mit autosomal dominantem Erbgang und bedingt etwa 1% der Karzinome. Charakteristischer Weise entstehen viele adenomatöse Polypen, die meist schon in jungen Lebensjahren der Patienten zum KRK entarten (Galiatsatos und Foulkes 2006). Eine Ursache auf DNA-Ebene ist auch hier zu finden. 1991 konnte das *APC*-Gen (adenomatöse polyposis Coli Gen) identifiziert werden, welches für die meisten Fälle des FAP verantwortlich ist (Varesco 2004).

Abgesehen von diesem kleinen Anteil bekannter syndromaler Erkrankungen sind Gene für die restlichen ca. 25% des familiär bedingten KRK nicht gänzlich identifiziert

und lassen auf eine polygene Vererbung schließen, welche im Kapitel 1.7, Genomweite Analysen und molekulargenetische Vorbefunde zum KRK, weiter ausgeführt werden.

1.3 Pathogenese

Das Adenokarzinom ist das häufigste Kolonkarzinom und seine Entstehung liegt hauptsächlich auf der Adenom-Karzinom-Sequenz begründet. Diese beschreibt die Abfolge der Entwicklung vom gesunden Kolonepithel über das benigne Adenom bis zum Karzinom (Fearon und Vogelstein 1990). In den letzten Jahren wurde diese These in zahlreichen Studien mit klinisch pathologischen und genetischen Belegen bestätigt (Michor et al. 2005). Verschiedene genetische Ereignisse führen dazu, dass es in mehreren Schritten zur Karzinogenese kommt. Dabei spielt vor allem der Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen, Gene, welche die unkontrollierte Teilung von Zellen verhindern und somit die Krebsentstehung hemmen, eine entscheidende Rolle. Ebenso ist die Aktivierung von Onkogenen, Gene, welche die Krebsentstehung fördern, ein wichtiger Schritt in der Karzinogenese. Diese beiden Veränderungen lassen ein normales Darmepithel zu einem hyperproliferativen Epithel und letztendlich zu einem metastasierenden Karzinom werden. Die chronologische Abfolge ist dabei weniger wichtig als das Zusammentreffen mehrerer genetischer Alterationen.

Wie in Abbildung 2 dargestellt, steht am Beginn der Kette der Veränderungen die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens *APC*, wodurch daraufhin die Tumorentstehung eingeleitet wird (Powell et al. 1992). Dieses Gen ist die ursächliche Alteration, die bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) zur Erkrankung führt und dessen Veränderung in ca. 85% der Fälle bei der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms auszumachen ist (Michor et al. 2004). Es konnte ein Zusammenhang von Adhäsionsproteinen wie beispielsweise Catenin mit dem *APC*-Gen nachgewiesen werden. Somit besteht die Funktion des *APC*-Genproduktes wahrscheinlich darin das Zytoskelett zu stabilisieren und die Zelladhäsion zu vermitteln (Cruz-Bustillo Clarens 2004; Su et al. 1993). In weiteren Schritten erfolgen Mutationen in Onkogenen, wie dem *KRAS*-Gen (Kirsten-rat-sarcoma-viral-oncogene). Dieses Protoonkogen ist in 70% der kolorektalen Karzinome verändert (Michor et al. 2005). Das *KRAS* Protein, als Produkt des mutierten *KRAS*-Gens, übermittelt der Zelle einen ungebremsten

Wachstumsreiz, wodurch nicht mehr kontrollierbar wachsende Tumorzellen entstehen. Des Weiteren kommt es durch den Verlust des *DCC*-Gens (Deleted in colon carcinoma) und dem *p53*-Gen, die normalerweise als Tumorsuppressorgene fungieren, zur Tumorprogression. Mutiert das *DCC*-Gen, was in 70% der KRK und 50% der fortgeschrittenen Adenome zu finden ist, verändert dies den Zellzusammenhalt und führt zu ausgeprägten Dysplasien (Calvert und Frucht 2002). Der Ausfall des *p53*-Gens führt letztendlich zur Entwicklung des Karzinoms. Das Protein p53, auch genant „der Wächter des Genoms“, hat die wichtige regulatorische Aufgabe, die Replikation geschädigter DNA zu verhindern und die Apoptose geschädigter Zellen zu fördern. Bleibt dieser programmierte Zelltod durch eine Inaktivierung des p53 aus, ist dies einer der entscheidendsten Faktoren, die zu einem ungebremsten Tumorzellwachstum führen (s. Abbildung 2). Die Bedeutsamkeit des *p53*-Gens zeigt sich darin, dass eine Mutation dieses Gens in 90% aller Malignome zu finden ist und somit eine der häufigsten krankhaften Veränderung bei Krebserkrankungen darstellt (Michor et al. 2005).

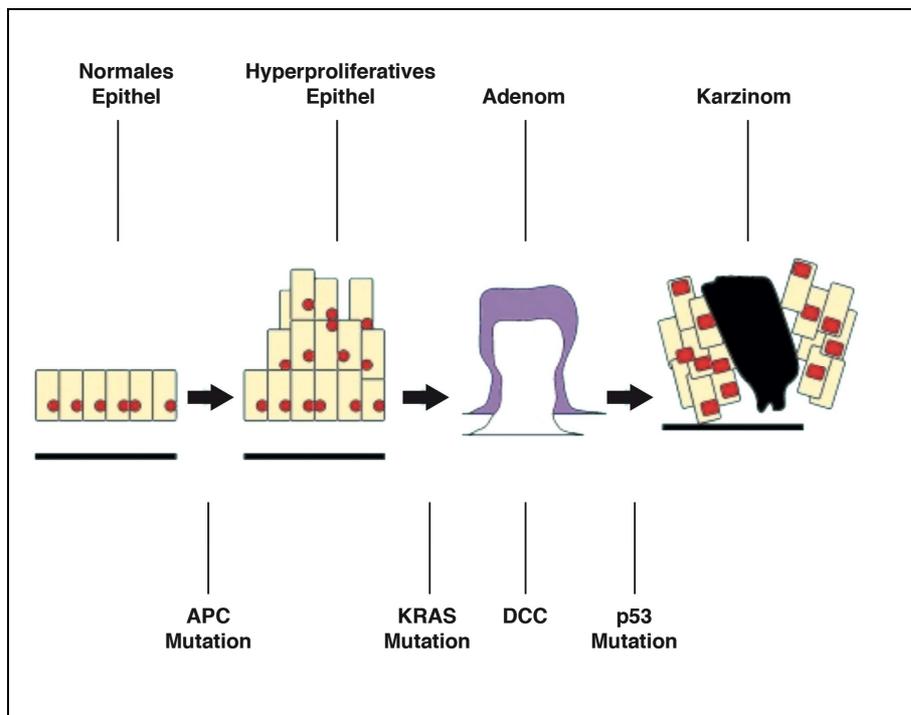


Abbildung 2: Adenom-Karzinom-Sequenz (Hardy et al. 2000)

Es ist allerdings noch nicht geklärt, welchen Einfluss Keimbahnmutationen auf die Adenom-Karzinom-Sequenz haben.

1.4 Klinik und Diagnostik

Das kolorektale Karzinom wächst häufig symptomlos und wird somit häufig zu spät entdeckt. Wenn es zu Symptomen kommt, sind diese eher unspezifisch und nicht eindeutig einzuordnen. Zu den möglichen Symptomen können Blutauflagerungen auf dem Stuhl sowie Stuhlveränderungen, wie Diarrhoen, gehören. Nicht zu vernachlässigen sind außerdem die häufiger vorkommenden B-Symptome, wie Abgeschlagenheit oder Gewichtsverlust, die auf ein eventuelles Tumorgeschehen aufmerksam machen können. Wenn der Verdacht eines kolorektalen Karzinoms besteht, sollte eine gründliche Untersuchung folgen, die unter anderem eine digitale rektale Untersuchung sowie apparative Diagnostik beinhalten sollte. Hierbei ist die wichtigste Untersuchungsmethode die Darmspiegelung. Durch die Koloskopie besteht nicht nur die Möglichkeit verdächtiges Gewebe zu biopsieren, sondern auch gleichzeitig Krebsvorstufen in Form von Polypen entfernen zu können, um ein Fortschreiten der Adenom-Karzinom Sequenz zu verhindern. Die Prävention des kolorektalen Karzinoms, im Sinne von Früherkennungsmaßnahmen, ist seit dem Jahr 2002 in das Früherkennungsprogramm gesetzlich aufgenommen. Dieses beinhaltet für die Altersgruppe von 50-54 Jahren einen Hämocculttest, der verstecktes Blut im Stuhl nachweist und ab einem Alter von 55 Jahren eine Darmspiegelung. Eine solche Koloskopie sollte nach 10 Jahren wiederholt werden.

1.5 Therapie und Prognose

Um die Prognose neudiagnostizierter Patienten abschätzen zu können, ist weiterhin das klinisch-pathologische Stadium der wichtigste Parameter und stellt damit die Basis der therapeutischen Entscheidungsfindung (Weitz et al. 2005).

Die Stadieneinteilung des KRK erfolgt nach der TNM-Klassifikation der UICC (Union internationale contre le cancer). Hierbei beschreibt T die Ausdehnung des Primärtumors, N die Lymphknotenmetastasierung und M die Fernmetastasierung. Die weitere Einteilung erfolgt dann folgendermaßen: Folgt der Grundkomponente ein X (Tx, Nx, Mx), ist diese Kategorie nicht beurteilbar. T0 bedeutet, dass es keinen Anhalt für einen Primärtumor gibt, Tis steht für Carcinoma in situ, hierbei ist der Tumor auf das Epithel beschränkt und wächst nicht invasiv. T1 besagt, dass der Tumor in die Submukosa eindringt, bei T2 wird die Muscularis propria, bei T3 die Subserosa und bei T4 werden Nachbarorgane oder das Peritoneum infiltriert. N0

bedeutet, dass es keine regionalen Lymphknotenmetastasen gibt, bei N1 sind bis zu drei regionale Lymphknotenmetastasen zu finden und bei N2 sind es vier oder mehr betroffene Lymphknoten. M0 steht für die Abwesenheit und M1 für das Vorhandensein von Fernmetastasen. Wie in der Tabelle 1 dargestellt, werden diesen Komponenten dann die entsprechenden Tumorstadien zugeteilt (Sobin und Wittekind 2002).

Tumorstadium	Tumorgroße (T)	Lymphknoten (N)	Metastasen (M)	5-Jahresüberleben (%)*
I	T1-T2	N0	M0	93,2
IIa	T3	N0	M0	84,7
IIb	T4	N0	M0	72,2
IIIa	T1-2	N1	M0	83,4
IIIb	T3-4	N1	M0	64,1
IIIc	Jedes T	N2	M0	44,3
IV	Jedes T	Jedes N	M1	8,1

Tabelle 1: Stadieneinteilung (UICC) (nach Sobin und Wittekind 2002)

* nach O'Connell et al. 2004

Patienten, bei denen ein Tumorstadium II oder III diagnostiziert wird, werden sofort chirurgisch behandelt und haben dann eine 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von ca. 75% (Nauta et al. 1989). Trotz allem erleiden 25% der Patienten einen Rückfall und sterben an ihrer Erkrankung. Auffällig ist, dass die Untergruppe der im Stadium IIb diagnostizierten Patienten eine geringere 5-Jahres-Überlebenschance hat als Patienten, die im Stadium IIIa diagnostiziert wurden (O'Connell et al. 2004). Die Risikobewertung des Stadium II bleibt daher schwierig.

Das allgemeine therapeutische Vorgehen beim kolorektalen Karzinom besteht vor allem in der großzügigen, radikalen operativen Entfernung des Tumorgewebes sowie der drainierenden Lymphwege, wodurch sich je nach Lage des Tumors unterschiedliche Bereiche einschließen. Patienten mit einem vollständig entfernten Kolonkarzinom im Stadium III erhalten eine adjuvante Chemotherapie. Im Gegensatz dazu besteht weiterhin Unschlüssigkeit darüber, ob eine postoperative, adjuvante Therapie auch beim Stadium II eingesetzt werden sollte. Für diese Patienten gibt es, die Nachsorge betreffend, keine wissenschaftlich belegte klinische Richtlinie und die therapeutische Entscheidungsfindung basiert auf einem eingeschränkten Angebot von klinischen und pathologischen Markern (Lavery und De Campos-Lobato 2010).

Eine neoadjuvante Therapie, also eine Therapie vor der geplanten Operation, ist vor allem beim Rektumkarzinom ab dem Stadium III indiziert. Hierbei wird vor der Operation eine Radiochemotherapie durchgeführt, die das Auftreten eines Lokalrezidivs senkt und eine bessere Operabilität durch das Schrumpfen des Tumors schafft (Schmiegel et al. 2010). Neuere Therapieansätze des KRK beinhalten den Gebrauch von monoklonalen Antikörpern. Cetuximab, als Antikörper gegen den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), kann bei Patienten in fortgeschrittenen Stadien, die schlecht auf eine Chemotherapie ansprechen, verlängern auf die Gesamtüberlebenszeit sowie progressionsfreie Überlebenszeit wirken und die Lebensqualität verbessern (Jonker et al. 2007).

Die in letzter Zeit zunehmende Entwicklung molekularer Marker hat in Bezug auf die Therapie des KRK vielversprechende Ergebnisse zeigen können. Es konnte zum Beispiel eine Mutation im *KRAS*-Gen als prädiktiver Marker für Patienten ausgemacht werden, die nicht auf eine Therapie mit EGFR-Antikörpern ansprechen (Karapetis et al. 2008). Auch einige andere vermutliche Marker wurden untersucht.

1.6 Genetische Marker

Die Sequenzierung des Genoms 2001 durch das Humane Genom Projekt stellt den Anfang einer neuen Ära der genetischen Ursachenforschung verschiedener Krankheiten dar (Lander et al. 2001). Auf dieser Grundlage haben sich eine große Gruppe von Forschern aus Großbritannien, Kanada, Japan, China und den Vereinigten Staaten von Amerika zusammen geschlossen und das Internationale HapMap Projekt gegründet (www.hapmap.org). Ihr Ziel ist es eine Karte zu erstellen, welche die Varianten der menschlichen DNA-Sequenz beschreibt. Das Verständnis über die Funktion von SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) und der Haplotyp-Blockstruktur ist die Basis für dieses Projekt.

1.6.1 SNP

Ein Polymorphismus ist eine Genvariante, welche mit einer Frequenz von über 1% in der Bevölkerung auftritt. Die häufigste Form genetischer Variabilität stellt dabei mit ca. 90% der Sequenzvarianten im menschlichen Genom der Einzelbasenpolymorphismen dar (Collins et al. 1998). Diese SNPs sind Mutationen eines einzelnen Basenpaares und finden sich auf kodierenden und nicht kodierenden Sequenzen der DNA. SNPs können in zwei verschiedenen Varianten, den so

genannten Allelen auftreten. Diese enthalten unterschiedliche Informationen, sodass zum Beispiel bei einem erkrankten Menschen anstatt der Base Guanin (G) die Base Adenin (A) in einem Teil der DNA-Sequenz auftritt (s. Abbildung 3). Als MAF (Minor Allele Frequency) wird hierbei die Frequenz des am wenigsten vorkommenden Allels eines SNP bezeichnet (Reid-Lombardo und Petersen 2010).

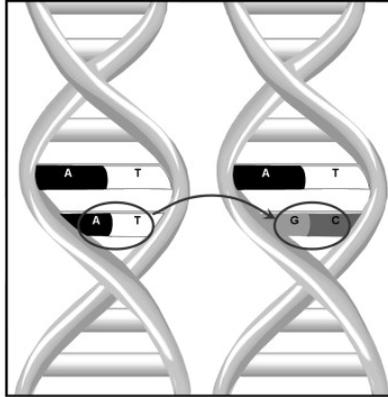


Abbildung 3: Einzelbasenpolymorphismus, A-T wird durch G-C ersetzt, woraus zwei potentielle Formen oder Allele an dieser Stelle entstehen (Reid-Lombardo und Petersen 2010).

1.6.2 Haplotyp-Blockstruktur

Die Anzahl der SNPs im menschlichen Genom ist sehr groß. Um Risikovarianten für bestimmte Krankheiten herauszufiltern wird das Prinzip der Haplotyp-Blockstruktur genutzt. Einzelne Allele eines SNPs kommen, soweit sie räumlich nah beieinander liegen, abhängig voneinander vor. Dies nennt man Kopplungsungleichgewicht. Aufgrund des Vorliegens der ersten Variante kann also auf das Vorliegen der zweiten Variante geschlossen werden. Zusätzlich ist die Zahl der unterschiedlichen Allelkombinationen, die auch als Haplotypen bezeichnet werden, durch die Abhängigkeit der Allele voneinander eingeschränkt. Dies bedeutet für die Suche genetischer Risikofaktoren einer Krankheit einen erheblich reduzierten Arbeitsaufwand (Freudenberg et al. 2002). Das internationale HapMap-Projekt hat diese Erkenntnisse genutzt und die Mitglieder haben DNA von 270 Menschen untersucht. Die Probanden kamen aus unterschiedlichen Ländern verschiedener Kontinente. Afrika war mit Teilnehmern aus Nigeria, Asien mit den Ländern China und Japan und Amerika mit Probanden aus den USA vertreten. Auch Europa wurde durch den Einfluss von Verwandtschaften zwischen US-amerikanischen Bürgern und Europäern mit abgebildet. Aufgrund dieser ethnischen Mischung verschiedener Menschen sollten die Ergebnisse weltweite Gültigkeit bekommen.

Die SNPs und dazugehörige Haplotypen stehen auf der Datenbank des NCBI (National Center for Biotechnology) für die Erforschung krankheitsbezogener, genetischer Risikofaktoren zur Verfügung (www.ncbi.nlm.nih.gov). Sie werden für genomweite Assoziationsstudien, bei denen das ganze Genom auf Risikogene untersucht wird und Kandidatengenstudien, bei denen vorher ausgewählte Gene untersucht werden, genutzt.

1.7 Genomweite Analysen und molekulargenetische Vorbefunde zum KRK

Es ist nicht bekannt, inwieweit das KRK-Risiko auf exogene oder genetische Faktoren zurückzuführen ist. Dennoch ist es wichtig, Gründe für die familiäre Häufung zu finden, um daraus die Mechanismen der Krebsentstehung besser verstehen und Prävention betreiben zu können (Hemminki und Chen 2004).

Da es keine eindeutige Lösung gibt, ist die Wahrscheinlichkeit groß, dass das Zusammenspiel aller Faktoren in Bezug auf die Karzinogenese eine wesentlich größere Rolle spielt, als der Einzelne. Es müssen dementsprechend mehrere geringfügig durchsetzbare Gene (low-penetrance genes) oder Genvarianten aufeinandertreffen, damit ein Prozess entsteht, der durch das Zusammenwirken von Genetik und Umwelt komplettiert wird und letztendlich zur Karzinogenese führt. Betreffende Gene könnten nicht nur Onkogene, Tumorsuppressorgene und Gene, welche die Mikroumgebung des Darms aufrecht erhalten, sein, sondern ebenso Gene, die am Stoffwechsel oder an der Methylierung der DNA beteiligt sind. Auch die Immunantwort beeinflussende Gene sind hier möglicherweise involviert. Studien bezüglich Genen, die an dem Schutz der DNA vor karzinogen bedingten Schäden beteiligt sind, waren nach ersten positiven Ergebnissen entdeckter Assoziationen eher enttäuschend, da sie in nachfolgenden Studien nicht bestätigt werden konnten (Tomlinson et al. 2010).

Mittels mehrerer Metaanalysen niedrigpenetranter Gene (low-penetrance genes) konnten einige Polymorphismen identifiziert werden. Houlston und Tomlinson veröffentlichten 2001 eine Studie zu Polymorphismen und dem Risiko des kolorektalen Tumors. Anhand der Metaanalyse von 50 Studien zeigten sie, dass ein erhöhtes Risiko des KRK vor allem mit den Polymorphismen *APC-I1307K*, *HRAS1-*

VNTR und *MTHFR* einhergeht (Houlston und Tomlinson 2001). Weitere „low penetrance genes“ wie *GSTT1*, *HRAS1-VNTR*, *ALDH2*, *NAT2* (Phänotyp), die das Risiko für einen Tumor erhöhen, konnten in der Metaanalyse von de Jong bestätigt werden. Im Zusammenhang von *MTHFR* und *Tp53* (Intron3) mit der Krebsentstehung wurde ein erniedrigtes Risiko festgestellt. Auch der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-alpha) konnte als risikoverstärkender Faktor (TNF-alpha (a2)), aber ebenso als risikoverringender Faktor (TNF-alpha a5, a13) des KHK identifiziert werden (de Jong et al. 2002).

Durch die Einführung genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) ist es möglich geworden, viele neue Informationen im Zusammenhang von genetischen Risikofaktoren und Krankheiten zu sammeln. Ein entscheidender Nachweis vieler Assoziationen von Genvarianten mit unterschiedlichsten und häufigen Volkskrankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis, der koronaren Herzkrankheit und dem Morbus Crohn, innerhalb einer Kohorte der britischen Bevölkerung, ist dem Wellcome Trust Case Control Consortium 2007 gelungen (Consortium 2007). Solche Studien, die das menschliche Genom scannen, wurden vor allem durch den Einsatz neuer besonderer Chips (500-1000K), zum Beispiel von der Firma Affymetrix, die auch in der oben beschriebenen Studie eingesetzt wurden, ermöglicht. So konnten mittels genomweiter Assoziationsstudien auch für das KHK relevante Risikofaktoren, beispielsweise auf dem Gen 8q24, gefunden werden, die vorher als solche nicht erkannt werden konnten (Tomlinson et al. 2007; Zanke et al. 2007). Es folgten weitere Veröffentlichungen, die Varianten auf den Genen 11q23, 15q13.3 sowie 8q23.3 und 10p14 finden konnten (Tenesa et al. 2008; Jaeger et al. 2008; Tomlinson et al. 2008). Ebenso wurde 2007 eine Studie auf der Grundlage genomweiter Assoziationsstudien veröffentlicht, die bestimmten Allelen auf dem *SMAD7*-Gen (18q21.1) ein erhöhtes Risiko an KHK zu erkranken zusprach (Broderick et al. 2007). Houlston et al. führten dann 2008 eine Metaanalyse von zwei GWAS durch und konnten dadurch vier zusätzliche Risikovarianten auf den Genen 14q22.2, 16q22.1, 19p13.1 und 20p12.3 finden (Houlston et al. 2008). Später folgte eine weitere Metaanalyse, die wiederum vier bis dahin unbekannte Assoziationen auf den Genen 1q41, 3q26.2, 12q13.13 und 20q13.3 aufdecken konnte (Houlston et al. 2010). Das Nationale Genomforschungsnetz (NGFN) führt auch in Deutschland genomweite Assoziationsstudien zu genetischen Ursachen von Volkskrankheiten

durch. Im Rahmen dessen ist zum Beispiel die Arbeit von Lascorz et al. zu nennen, die nicht nur die Risikoallele auf den Genen 8q24.21 und 11q23 bestätigen konnten, sondern auch einen Zusammenhang zwischen einer erhöhter MAPK-Signalwegaktivität und dem gesteigerten Risiko, an Darmkrebs zu erkranken, erbringen konnte (Lascorz et al. 2010).

1.8 Krebs im Zusammenhang mit Entzündungsmechanismen

Rudolf Virchow entdeckte nach intensiver Forschung an Tumorgewebe, dass in diesem Leukozyten nachzuweisen sind. Damit konnte er bereits 1863 einen Zusammenhang zwischen Entzündung und Krebs herstellen. Seine Vermutung war, dass der Ursprung des lymphozytären Infiltrates in einer chronischen Entzündung liegt, welche die Zellproliferation begünstigt. In den letzten Jahren konnte seine Annahme untermauert werden, denn es ist nun bekannt, dass ca. 15% aller Krebsarten durch eine Infektion verursacht werden, bei der chronische Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle spielen. Hierbei sind vor allem das Cervixkarzinom, das mit einer Infektion des humanen Papillomavirus in Verbindung steht, das Magenkarzinom im Zusammenhang mit einer Helicobacter pylori Infektion sowie das hepatozelluläre Karzinom, welches mit einer Hepatitis assoziiert werden kann, zu nennen (Balkwill und Mantovani 2001).

Das kolorektale Karzinom ist ebenfalls von großem Interesse, da es im Zusammenhang mit dem Vorkommen chronisch entzündlicher Darmerkrankungen steht und somit Anlass zur weiteren Erforschung der Krebs-Entzündung Verbindung gibt (Terzic et al. 2010; Westbrook et al. 2010). Dabei kann eine akute Entzündungsreaktion allein das Risiko der Karzinomentstehung noch nicht erhöhen. Erst im chronischen Stadium hat dies einen Einfluss auf das Karzinomrisiko, denn umso länger die Entzündung besteht, desto größer ist das Risiko, dass sich an dieser Stelle ein Karzinom entwickelt (Shacter und Weitzman 2002).

Für das Verständnis dieses Prozesses ist es zuerst einmal wichtig, die physiologischen Grundlagen der Entzündungsreaktion zu betrachten. Diese bestehen aus einem System, das durch unterschiedliche chemische Informationsvermittlungen Schäden infizierter Gewebe erkennen und die Reparatur der Zellen einleiten lässt. Zu den Aktivatoren zählen hierbei einwandernde Entzündungszellen,

wozu beispielsweise Leukozyten gehören, sowie Zytokine, die als chemotaktisch wirkende Modulatoren das Entzündungsgeschehen maßgeblich beeinflussen. Es gibt dabei inflammatorische und antiinflammatorische Zytokine, die normalerweise zu einer Selbstlimitierung der Entzündung führen. Sind diese Mechanismen defekt, kann es zu einer Verschiebung im System kommen, die dann in dem unbegrenzten Prozess einer chronischen Entzündung mündet. Die Entzündungszellen, die lange Zeit an einem Ort verbleiben, bilden reaktive Sauerstoff- und Stickstoffradikale, die normalerweise zur Abwehr gegen die Infektion genutzt werden, nun aber zu Schäden in der DNA der proliferierenden Zellen führen. Insbesondere der Schaden an Reparatur- und Apoptoseprogrammen sowie Tumorsuppressorgenen führt zu einer ungebremsten Replikation der DNA und letztendlich zu unkontrolliert proliferierenden Zellen. Der karzinogene Prozess wird so weiter vorangetrieben und lässt auf Grundlage der Entzündung sowohl eine hervorragende Basis für das Tumorwachstum, als auch für die Angiogenese und genomische Instabilität entstehen (Coussens und Werb 2002). Da der Darmtrakt von sehr vielen Bakterien besiedelt ist, muss die Darmschleimhaut erkennen, gegen welche Pathogene vorgegangen werden muss und welche Bakterien als Symbionten toleriert werden müssen, um das Gleichgewicht der natürlichen Darmflora aufrecht zu erhalten. Bakterien besitzen Verbindungen, die von vielen unterschiedlichen Rezeptoren, wie zum Beispiel Toll-Like Rezeptoren, erkannt werden und das angeborene Immunsystem aktivieren. Bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen scheint dieses Gleichgewicht der Darmflora zusammenzubrechen und die natürlichen Darmbakterien führen zu einer entzündlichen Immunantwort (Yamamoto-Furusho und Podolsky 2007). Dies ist allerdings nicht der einzige ursächliche Faktor für die Entstehung einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung (CED), denn auch Umweltfaktoren und eine genetische Prädisposition scheinen die Ätiologie mitzubestimmen (Hanauer und Hommes 2010). Nicht nur bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen spielen Entzündungsmechanismen eine entscheidende Rolle, welche das Risiko ein KRK zu entwickeln erhöhen können, sondern auch in anderen vererbaren genetischen Variationen verschiedener immunologischer Gene wird ein Zusammenhang mit dem erhöhten Darmkrebsrisiko vermutet.

Das in der angeborenen Immunantwort beteiligte Gen *CARD15* (caspase-activating-recruitment-domain) konnte bei früherkrankten Patienten als mitverursachender Faktor des kolorektalen Karzinoms entdeckt werden (Mockelmann et al. 2009). Die bereits erwähnten Zytokine, die als wichtige Vermittler der Entzündungsreaktion gelten, wurden ebenfalls in einen Zusammenhang mit Krebs gebracht. Dazu gehören beispielsweise Interleukine (IL), die proinflammatorisch und antientzündlich wirken können. Polymorphismen in dem Promotor dieser Interleukine führen zu einer besseren Prognose des KRK. So konnten Wilkening et al. in ihrer Studie zu SNPs in der Interleukinpromotorregion zeigen, dass bestimmte Allele im antiinflammatorischen IL-4 und im proinflammatorischen IL-6 mit einer erhöhten Überlebensrate des Darmkrebs assoziiert sind und somit die SNPs IL4-590 und IL-6-174 mögliche nützliche prognostische Marker darstellen können (Wilkening et al. 2008). Ein weiteres antiinflammatorisches Zytokin, welches in Zusammenhang mit der Prognose des KRK stehen könnte, ist das Interleukin-10.

1.8.1 Interleukin-10 und Prognose

Interleukin-10 wurde erstmals 1989 von Fiorentino et al. als ein Zytokinsynthese hemmender Faktor (cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF)) beschrieben, welcher von Typ2-T-Helfer-Zellen sezerniert wird und die Synthese von Zytokinen der Typ1-T-Helferzellen hemmt (Fiorentino et al. 1989). Weitere Studien haben ergeben, dass das Interleukin-10 nicht nur von T-Zellen, sondern auch von vielen weiteren Immunzellen gebildet wird. Hierbei sind vor allem die Monozyten zu erwähnen, die eine große Menge von Interleukin-10 bilden können (de Waal Malefyt et al. 1991). Zur Funktion des Interleukin-10 gehört in erster Linie die, durch die Hemmung der Entzündungsreaktion bedingte, immunsuppressive Wirkung. Kuhn et al. haben gezeigt, dass diese Funktion auch in der Entwicklung von Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Sie haben 1993 entdeckt, dass IL-10 defiziente Mäuse vermehrt chronische Enterocolitiden entwickelt haben (Kuhn et al. 1993). Besonders anzumerken ist hierbei, dass viele dieser Mäuse später ein kolorektales Karzinom entwickelt haben, ähnlich dem erhöhten Vorkommen des kolorektalen Karzinoms bei Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Berg et al. 1996). Huang et al. entdeckten 1999 in einer Studie an Melanomzellen, dass Interleukin-10 nicht nur eine antientzündliche, sondern auch eine antiangiogene Wirkung hat (Huang et al. 1999). Weitere Erkrankungen werden mit Interleukin-10 in Zusammenhang gebracht und führen dazu, dass auch auf genetischer Ebene nach Gründen für

vermehrte oder verminderte IL-10 Expression gesucht wird. Hierbei stehen vor allem die Polymorphismen in den Promotorregionen im Vordergrund, da die Regulation der IL-10 Expression hauptsächlich durch seinen Promotor erfolgt. Daraufhin wurde der Zusammenhang zwischen IL-10 Promotorpolymorphismen und einem erhöhten Krebsrisiko untersucht. Es konnten einige Krebserkrankungen gefunden werden, deren Risiko oder Progression entweder mit erhöhten oder verminderten IL-10 Expressionen einhergehen. Howell und Rose-Zerilli haben 2007 in einem Review 23 bekannte Studien zu IL-10 Polymorphismen und Krebs zusammengefasst. Sie sind zu dem Schluss gekommen, dass diese Studien die zweiseitige biologische Funktion des IL-10 als ein einerseits antientzündliches, potentiell Krebs unterstützendes und andererseits antiangiogenes, potentiell Krebs verhinderndes Zytokin widerspiegelt. Sie fordern aufgrund der teilweise geringen Populationsgrößen dieser Studien weitere und größere Untersuchungen, die den IL-10 Polymorphismus erforschen (Howell und Rose-Zerilli 2007).

Das kolorektale Karzinom und die Bedeutung des IL-10 Polymorphismus in Bezug auf dessen Prognose wurde zum ersten Mal von Wilkening et al. 2008 überprüft. In einer großen Kohorte von 308 schwedischen Inzidenzfällen des KRK, mit Daten zu Tumorstadien und Überlebensraten, konnte ein Zusammenhang zwischen Tumorstadium und IL-10 Polymorphismus gezeigt werden. Patienten, die ein G-Allel des Promotor SNPs IL-10-1082 trugen, befanden sich vermehrt in früheren Stadien des KRK als in späteren Stadien (Wilkening et al. 2008).

1.8.2 Toll-Like-Rezeptor 3 und Prognose

Ein besonderes Protein, welches ebenfalls bei der Entzündungsregulation und damit bei der Krebsentstehung eine Rolle spielt, ist der Toll-Like Rezeptor 3. TLR-3, auch CD283 genannt, ist ein endosomales Protein, das zu der Familie der Toll-Like Rezeptoren gehört. Sie spielen vor allem bei der Erkennung verschiedener Antigene eine Rolle, was eine Aktivierung der angeborenen Immunantwort bedeutet. Ihre Aufgabe ist es, Strukturen die auf Krankheitserregern vorkommen, so genannte PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), zu erkennen und daraufhin die Aktivierung bestimmter Gene einzuleiten. Diese Gene kodieren für Zytokine, über welche die erworbene Immunantwort vermittelt wird (Akira und Takeda 2004). Somit stellen die Toll-Like Rezeptoren eine wichtige Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Abwehr dar. Eines der Zytokine, deren Ausschüttung vom TLR-3

bedingt wird, ist das Interferon-beta (Oshiumi et al. 2003). Im Laufe der Replikation eines Virus kommt es meistens zur Produktion viraler doppelsträngiger RNA. Diese ds-RNA kann von dem TLR-3 erkannt werden und anschließend die Aktivität von NF- κ B und der MAPK (mitogen-activated-protein-kinase) verstärken, wodurch die dendritischen Zellen zur Reifung angeregt werden und die spezifische Immunantwort die Zellen vor dem Virus schützen kann. Die synthetische ds-RNA Polyinosinic-polycytidylic acid (Poly (I:C)) stellt hierbei einen Agonisten des TLR-3 dar (Alexopoulou et al. 2001). Aber nicht nur die antivirale Abwehr scheint eine Rolle zu spielen, sondern, wie Salaun et al. in einer Studie an Brustkrebszellen zeigen konnte, ist TLR-3 auch an dem Apoptoseweg einer Zelle beteiligt (Salaun et al. 2006).

TLR-3 ist nicht ausschließlich in Zellen des Immunsystems zu finden, sondern auch in Zellen, die nicht direkt an der Immunantwort teilhaben, wie zum Beispiel Keratinozyten oder Endothelzellen (Fujita et al. 2004; Kaiser et al. 2004). Die dadurch naheliegende Vermutung, dass auch in Tumorzellen eine erhöhte TLR-3 Expression zu finden sein könnte, konnten Jiang et al. 2008 bestätigen. Sie fanden heraus, dass der TLR-3 Rezeptor in vielen Tumorzellen, wie auch in kolorektalen Tumorzellen, exprimiert wird und die Blockade dieser Rezeptoren zu einem reduzierten proapoptotischen Effekt des Agonisten Poly (I:C) führt (Jiang et al. 2008). Schon 2005 wiesen Salem et al. nach, dass der TLR-3 Agonist Poly (I:C) nicht nur zu einer verstärkten CD8+- T-Zell Antwort führt, sondern auch eine erhöhte Immunität gegen den Tumor resultiert (Salem et al. 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass der TLR-3 einen großen Anteil an der auf verschiedene Tumoren bezogenen Immunantwort hat. Jedoch kann noch keine Aussage dazu getroffen werden, inwieweit genetische Polymorphismen die Prognose karzinombetroffener Patienten beeinflussen kann.

1.9 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es, den Polymorphismus des Toll-Like Rezeptor 3 und des Interleukin-10 in Hinblick auf die Entstehung und die Prognose des kolorektalen Karzinoms zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientenkollektiv und Rekrutierung

Das Patientenkollektiv besteht aus Patienten mit kolorektalem Karzinom, die zwischen 2002 und 2005 in norddeutschen Kliniken behandelt sowie dem Krebsregister Schleswig-Holstein gemeldet wurden. Über 10.000 Patienten wurden Anfang 2004 über die folgenden Kliniken angeschrieben:

Universitätsklinikum Kiel, das Städtische Krankenhaus Kiel, das Städtische Klinikum Lüneburg, das Klinikum Rotenburg/Wümme, das Elbe Klinikum Stade, das Allgemeine Krankenhaus Hamburg Altona, das Klinikum Hamburg Eilbek, das Allgemeine Krankenhaus Hamburg Barmbek, das Klinikum Hamburg Harburg, das Allgemeine Krankenhaus Bergedorf, das Krankenhaus Reinbek St. Adolf-Stift, das Klinikum Lippe Detmold, das Martin-Luther-Krankenhaus Schleswig, das Klinikum Nordfriesland mit den Kliniken in Niebüll und Husum, das Malteser sowie das Diakonissen Krankenhaus Flensburg, die Krankenhäuser Rendsburg-Eckernförde, das Friedrich-Ebert Krankenhaus Neumünster, das Klinikum Neustadt, das Klinikum Itzehoe, das Westküstenklinikum Heide, das Klinikum Bad Oldesloe und das Klinikum Bremen-Nord (s. Abbildung 4).



Abbildung 4: Teilnehmende Kliniken

Insgesamt konnten 2927 Patienten für die Studie gewonnen werden. In einem populationsbasiertem Gebiet nördlich des Nordostseekanals, welches Schleswig-Holstein bis zur Grenze Dänemarks beinhaltet, wurde keine Altersgrenze festgelegt. Um eine Hochrisikokohorte zu erstellen, wurde zusätzlich bei allen Patienten, die südlich des Nordostseekanals rekrutiert wurden, eine Altersgrenze von 65 Jahren beschlossen.

2.2 Rekrutierungsplattform Popgen

Popgen – kurz für Populationsgenetik - ist ein Forschungsprojekt des Nationalen Genomforschungsnetzes (NGFN) an der Universität Kiel, welches im Jahre 2003 initiiert wurde. Hierbei handelt es sich um den Aufbau einer Biobank, die genutzt wird, um die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp zu erforschen. Das Projekt wird durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) gefördert. Für die Patientenidentifikation, die Rekrutierung und letztendlich die Genotypisierung werden medizinische, bioinformatische, statistische und epidemiologische Bereiche genutzt. Das Forschungsprojekt Popgen hat bis heute über 150.000 Proben gesammelt. Es beinhaltet mehr als 30 verschiedene Projekte und ist dabei, sich stetig zu vergrößern. Das Einzugsgebiet erstreckt sich vom Nordostseekanal in Schleswig-Holstein, inklusive Kiel, Richtung Norden bis an die dänische Grenze (s. Abbildung 4). In diesem Gebiet mit über einer Million Einwohnern und 41 Krankenhäusern steht somit in seiner Größe und Zusammensetzung ein Patientenkollektiv zur Verfügung, welches zur Repräsentation der Bevölkerung im Stande ist. Aktuelle Projekte beinhalten verschiedenartige Fragestellungen, wie zum Beispiel die Langlebigkeit des Menschen oder genetische Ursachen der häufigsten Volkskrankheiten. Es werden Krankheiten aus unterschiedlichen Bereichen der Medizin untersucht, zu denen unter anderem das Gallensteinleiden, die koronare Herzkrankheit, die Psoriasis, die Parodontitis, der essentielle Tremor, das zerebrale Anfallsleiden bei Kindern, die chronisch entzündliche Darmerkrankungen sowie das kolorektale Karzinom gehören. So wurde Popgen auch für diese Studie als Rekrutierungsplattform genutzt, um ein bevölkerungsrepräsentatives Patientenkollektiv zu erstellen.

2.3 Follow-up

Es wurden 2264 Patienten von den zu Beginn des Projektes gewonnenen 2927 Patienten erneut angeschrieben. Der restliche Anteil der Patienten hatte in eine weitere Kontaktaufnahme oder in die Zusendung eines Studienberichts nicht eingewilligt und wurde somit nicht erneut kontaktiert. Jedem der 2264 Patienten wurde ein Brief zugesendet, der einen Follow-up Fragebogen, einen Fragebogen zur Lebensqualität und eine Aufforderung zur Teilnahme an einer Befragung zu Ernährungsgewohnheiten beinhaltete. Eine Einwilligung in die Zusendung allgemeiner Ergebnisse mit Informationen über die Entwicklung der Studie und ein freigemachter Rückumschlag für die Rücksendung der ausgefüllten Unterlagen wurden ebenfalls mitverschickt. Der in diese Studie eingeflossene Follow-up Fragebogen (Genetische Ursachen des Dickdarmkrebses, Folgebefragung 1, s. Anlage), beinhaltet unter anderem Fragen zu Geschlecht, Geburtsdatum, Körpergröße, Gewicht, Therapiemaßnahmen, Nebenwirkungen, Metastasenbildung und Operationen. Ebenso wurde das Datum der letzten Nachsorgeuntersuchung sowie der Name des durchführenden Haus-/Facharztes erfragt. Die Antworten der Patienten wurden anschließend digitalisiert. Patienten, die sich nach drei Monaten Wartezeit noch nicht zurückgemeldet hatten, wurde ein Erinnerungsschreiben gesendet, ein weiteres folgte nach erneuten vier Monaten Wartezeit. Sollte daraufhin keine Rücksendung eingegangen sein, erfolgte eine Abfrage des Melderegisters, um gegebenenfalls Adressänderungen der Patienten erfahren zu können.

Die Follow-up Zeit dieser Studie wurde vom Diagnosedatum bis zum KRK spezifischen Tod bemessen. Zudem wurde die Zeit durch das Ende der Nachverfolgung, welches durch das Datum des letzten Kontakts mit dem behandelnden Arzt festgelegt wurde, sowie durch den Tod aufgrund anderer Ursachen, zensiert.

2.4 Ein- und Ausschlusskriterien

Es wurden ausschließlich Patienten in die Studie eingeschlossen, die in der Poppdatenbank registriert waren. Von der gesamten Kohorte von 2264 Patienten konnte durch Aktenstudium, Patientenkontakt und Kontakt zum behandelnden Arzt für 614 Patienten folgende Daten vollständig erhoben und diese Patienten in die Studie eingeschlossen werden. Die restliche Anzahl der Patienten, von denen

Informationen zu einem dieser Punkte nicht erlangt werden konnte, wurden nicht in die Studie eingeschlossen.

- 1) Vollständige Information über das klinische Stadium, die über die intraoperative Dokumentation und die pathologische Einteilung erlangt wurde
- 2) Letzter Kontakt zu dem Patienten, gesetzt dem Fall, dass er noch lebte, nicht länger als ein Jahr, ausgehend von November 2009, zurückliegend
- 3) Durch den Hausarzt bestätigter Tod des Patienten
- 4) Deutsche Staatsangehörigkeit, die durch einen eindeutigen Geburtsort beider Elternteile und der selbstberichteten Ethnizität des Patienten bestätigt wurde
- 5) Verfügbarkeit von mindestens 5 µg DNA
- 6) Information über die Art der Operation (nur Patienten mit elektiven Eingriffen wurden eingeschlossen)

Ausschlusskriterien waren die Erfüllung der Amsterdam oder Bethesda Kriterien für HNPCC genauso wie eine Vorerkrankung maligner Genese oder der Erkrankung an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung.

2.5 Datenschutz und Ethik

Der Datenschutz wurde gesichert, indem die persönlichen Patientendaten unabhängig von den Fragebögen und Proben gespeichert wurden. Zuvor wurde jedem Fragebogen eine Studien-ID-Nummer zugeteilt und somit jeder Teilnehmer pseudonymisiert. Das unabhängige Landeszentrum für Datenschutz in Schleswig-Holstein hatte an dem Verfahren datenschutzrechtlich keine Beanstandungen. Da die Daten anonymisiert wurden und somit kein Rückschluss der Ergebnisse auf einzelne Patienten mehr möglich war, wurde den Patienten angeboten, allgemeine Informationen zum Fortgang des Projektes zu erhalten. Diese wurden ihnen, sofern sie sich einverstanden erklärten, zugeschickt.

Der Erstantrag vom 29.09.2003 über den Studienplan, Popgen-populations-repräsentative Stichprobe für die populationsgenetische Exploration im NGFN Phase 1 (Aktenzeichen A 156/03), wurde am 25.11.2003 von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel als berufsethisch und berufsrechtlich unbedenklich eingestuft. Der Erweiterungsantrag zur Folgebefragung, die Grundlage dieser Arbeit ist, wurde am 22.07.2009 eingereicht

und ebenfalls überprüft. Auch hier stimmte die Ethikkommission am 30.07.2009 damit überein, dass es keine berufsethischen und berufsrechtlichen Einwände gibt (s. Anlage).

2.6 Genotypisierung

Die SNPs die eine Gruppe von Kandidatengenomen enthalten (Tabelle 2), wurden aus der dbSNP Datenbank des National Center of Biotechnology herausgesucht (www.ncbi.nlm.nih.gov/snp).

Gene	rs-Nummer	Chr.	Allelnukleotid Major/Minor	Variation	Minimal Allel Frequenz (MAF)
CCR-2	rs1799864	3	G/A	V64I	0.11
CTLA-4	rs231775	2	A/G	T17A	0.40
CTLA-4	rs3087243	2	G/A	nearGene-3	0.40
EVER2	rs7208422	17	T/A	N306I	0.50
IL-10	rs1800896	1	A/G	Promoter	0.48
IL-10	rs1800872	1	G/T	Promoter	0.24
IL-1B	rs1143627	2	T/C	nearGene-5	0.32
IL4-R	rs1805010	16	A/G	I75V	0.47
IL4-R	rs1805015	16	A/G	S503P	0.16
IL4-R	rs1801275	16	A/G	Q576R	0.20
IL-6	rs1554606	7	G/T	intron 3	0.45
IL-6	rs1800797	7	G/A	Promoter	0.48
LTA	rs1041981	6	C/A	T60N	0.36
TIRAP	rs8177374	11	C/T	S180L	0.17
TLR-3	rs5743305	4	A/T	Promoter	0.38
TLR-3	rs3775291	4	C/T	L412F	0.29
TLR-8	rs3761623	X	G/A	Promoter	0.49*
TLR-9	rs5743836	3	T/C	Promoter	0.14
TLR-9	rs352140	3	A/G	P545P	0.42

Tabelle 2: Auflistung untersuchter Polymorphismen, Chr.= Chromosom

Selektionskriterien für die eingeschlossenen Marker waren eine bekannte intragenische Lokalisation und eine mindeste Allelfrequenz von > 10 % in der kaukasischen Bevölkerung. Außerdem musste für diese Marker schon zuvor eine mögliche Assoziation zwischen einem entzündlichen Mechanismus und einer vermehrten Krebsanfälligkeit beschrieben worden sein. Die Genotypisierung wurde mit der von Castro et al 2009 und Schmitt et al 2006 bereits beschriebenen, auf der

Luminex Technologie basierenden SNP Genotypisierungsprobe durchgeführt (Castro et al. 2009; Schmitt et al. 2006) .

Zusammengefasst bedeutet dies, dass eine multiplex PCR mit insgesamt 10ng humaner DNA mit dem multiplex PCR kit (Qiagen, Hilden, Germany) durchgeführt wurde. Die verwendeten Primer waren biotinyliert und es entstanden PCR Produkte mit einer Größe von 100 bis 200 bp. Bei der anschließenden Hybridisierung mit fluoreszenzmarkierten Polystyrolpartikeln (Beads) wurden diese PCR Produkte erfasst (Luminex Corp., Austin, TX). Für jedes der ausgesuchten SNP-Allele wurde eine 17-18 Nukleotid große spezifische Probe konstruiert. Nach der Hybridisierung wurden die Komplexe mit Strep-PE Konjugaten gelabelt, gewaschen und daraufhin mit dem Luminex 100 Analysator untersucht. Dieser arbeitet mit zwei Lasern, welche die beadeigene Farbe erkennen und die Reporterfluoreszenz quantifizieren. Die Probe wurde mit einem Referenzpanel aus 90 DNA Proben des internationalen HapMap Projektes kalibriert.

2.7 Datenanalyse

In allen Analysen wurde die SAS Software Version 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary, NC) benutzt. Die beobachteten Genotypfrequenzen wurden auf das Hardy-Weinberg Gleichgewicht getestet. Nicht bereinigte Zusammenhänge zwischen genetischen Markern und Patientenmerkmalen wurden mit dem X² Test berechnet. Odds Ratios (ORs) mit einem 95% Intervall wurden mit unbereinigten, polytomen, generalisierten, logistischen Regressionsmodellen berechnet. Auf das Überleben des KRK bezogene Effekte verschiedener Genotypen wurden mit der Kaplan-Meier-Überlebensschätzung berechnet. Die Analyse anderer prognostisch signifikanter Parameter wurde mit der univariaten und multivariaten proportionalen Hazard-Analyse nach Cox durchgeführt. P-Werte <0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet. In der proportionalen Hazard Analyse nach Cox wurden zeitabhängige Kovarianten als Interaktion der Prädiktoren mit der Zeit erhoben. Keine der Interaktionen war statistisch signifikant, was bedeutet, dass die Modelle die Cox- Regressionsmodell Annahme erfüllen. Eine Korrektur für multiple Vergleiche wurde nicht angewendet, um mögliche biologische Effekte der untersuchten Varianten in Verbindung mit Entzündungsprozessen in der Krebsentwicklung sowie eine mögliche Korrelation zwischen den beobachteten Variablen in Betracht zu ziehen.

3 Ergebnisse

3.1 Gesamtkollektiv

Am 24.08.2009 wurden 2264 Patienten, von denen Blutproben sowie die Einwilligung in eine erneute Kontaktaufnahme oder das Interesse an der Zusendung eines Studienberichts vorlagen, mit einem Follow-up Fragebogen angeschrieben. Eine direkte Absage erteilten 27 Patienten. 204 der Angeschriebenen konnten nicht erreicht werden, da bei 45 von ihnen keine aktuelle Adresse vorlag und von 159 kein Antwortbogen zurückgesendet wurde. Nach Aussendung eines ersten und zweiten Erinnerungsschreiben sowie einer Abfrage des Melderegisters, um neue Adressen verzogener Probanden zu erhalten, lagen am Ende 1676 ausgefüllte Fragebögen vor. Zusätzlich mussten 354 Patienten als verstorben registriert werden. Der Gesamtrücklauf betrug somit 90,86% (s. Tabelle 3).

Gesamtaussendung Follow-up (ab 24.08.09)	2264	100%
Eingegangene Fragebögen nach 1. Aussendung	1278	56,5%
Versendung 1. Erinnerungsbogen (09.11.09)	808	35,7%
Eingegangene Fragebögen nach 1. Erinnerungsbogen	270	11,9%
Versendung 2. Erinnerungsbogen (11.KW)	446	19,7%
Eingegangene Fragebögen nach 2. Erinnerungsbogen	54	2,4%
Melderegisterauskunft	113	5,0%
Eingegangene Fragebögen nach Melderegisterauskunft	57	2,5%
Versendung 1. Erinnerungsbogen nach Melderegisterauskunft (07.12.10)	56	2,5%
Eingegangene Fragebögen nach 1. Erinnerungsschreiben nach Melderegisterauskunft	17	0,75%
Absagen	27	1,2%
Verstorbene	354	15,6%
Verzogen, ohne aktuelle Adresse	45	2,0%
Keine Antwort erhalten	159	7,0%
Gesamtrücklauf	2057	90,86%

Tabelle 3: Follow-up Übersicht

Nach Auslese der Patienten, welche die Einschlusskriterien nicht vollständig zu erfüllen vermochten, konnten mit einer Kohorte von 614 Patienten 327 Männer und 287 Frauen in die Studie eingeschlossen werden. Dies bedeutet einen geschlechter-spezifischen Anteil von 53,3% Männer zu 46,7% Frauen. Zum Zeitpunkt der Diagnose waren mit 341 Patienten 55,5% jünger als 65 Jahre. Die restlichen 273 Patienten entsprechend einem Anteil von 44,5%, waren über oder genau 65 Jahre alt. Bei 328 Patienten lag das Karzinom im Rektum lokalisiert und bei 286 im Kolon, dieses bedeutet einen Anteil von 53,4% für das Rektum und 46,6% für das Kolon (s. Tabelle 4).

Parameter	Anzahl der Patienten	Anzahl der Patienten in %
Gesamtanzahl der Patienten	614	100
Geschlecht		
Männer	327	53,3
Frauen	287	46,7
Alter zum Diagnosezeitpunkt		
<65	341	55,5
≥65	273	44,5
Lokalisation		
Rektum	328	53,4
Kolon	286	46,6

Tabelle 4: Eigenschaften der Patienten

Wie in Tabelle 5 beschrieben, ergab die histopathologische Einteilung der Patienten spezifischen Tumoren, dass mit 479 Patienten der größte Teil ein mäßig differenziertes G2 Karzinom aufwies. 20 der Patienten hatten ein gut differenziertes (G1), 98 ein schlecht differenziertes (G3) und ein Patient ein undifferenziertes (G4) Karzinom. Bei 16 Patienten konnte der Differenzierungsgrad nicht bestimmt werden (Gx). Dem TNM-Stadium I, welches einen regionären Tumor T1-T2, keine regionale Lymphknotenmetastasierung und keine Fernmetastasen beinhaltet, konnten mit einem Anteil von 26,2% die meisten Karzinome zugeteilt werden. Darauf folgten in absteigender Reihenfolge das Stadium II (regionärer Tumor T3-T4, keine regionale Lymphknotenmetastasierung und keine Fernmetastasen) mit 25,6%, das Stadium III (jeglicher regionärer Tumor, Lymphknotenmetastasierung 1-3 und keine Metastasen) mit 24,3%, das Stadium IV (jeglicher regionärer Tumor, jegliche Lymphknotenmetastasierung und Fernmetastasen) mit 21,7% und 2,3%, die keinem Stadium

zugeteilt werden konnten. Bei sechs Patienten gab es keinen Anhalt für einen Primärtumor (T0), 76 wurden als T1, 138 als T2, 327 als T3, 58 als T4 und neun als nicht beurteilbar (Tx) oder Carcinoma in situ (Tis) klassifiziert. Bei 355 Patienten, welche einen Anteil von 57,8% ausmachen, konnte, im Gegensatz zu den restlichen 41,5%, keine regionäre Lymphknotenmetastasierung (N-) gefunden werden. Die regionären Lymphknoten von vier Patienten konnten nicht beurteilt werden (Nx). Es konnten außerdem bei den meisten Patienten (78%) keine Fernmetastasen gefunden werden (M-), diese fanden sich bei 21,9% (M+) (s. Tabelle 5).

Parameter	Anzahl der Patienten	Anzahl der Patienten in %
Histopathologisches Grading (G)		
G1	20	3,3
G2	479	78,0
G3	98	16,0
G4	1	0,2
Gx	16	2,6
Prätherapeutische Tumorstadien		
I	161	26,2
II	157	25,6
III	149	24,3
IV	133	21,7
Keine Zuordnung möglich	14	2,3
Primär Tumor (T)		
T0	6	1,0
T1	76	12,3
T2	138	22,5
T3	327	53,3
T4	58	9,4
Tis oder Tx	9	1,5
Regionäre Lymphknoten (N)		
N-	355	57,8
N+	255	41,5
Nx	4	0,6
Fernmetastasen (M)		
M-	479	78,0
M+	135	21,9

Tabelle 5: Histopathologisches Grading und TNM-Klassifikation

Zum therapeutischen Vorgehen konnten zwei Parameter erhoben werden. Es bestand die Information darüber, ob die Patienten neoadjuvant und adjuvant therapiert wurden. Neoadjuvant wurden 11% der Patienten behandelt, 83,7% wurden es nicht und bei 4,7% ist nicht bekannt, ob sie eine neoadjuvante Therapie erhalten haben. Die adjuvante Therapie haben 40,4% aller Patienten bekommen, 45,8% Patienten wurden nicht adjuvant therapiert und bei den restlichen 13,2% war dies nicht bekannt. Als neoadjuvante Therapie haben fünf Patienten eine Radiotherapie und 63 Patienten eine Radiochemotherapie bekommen. Als adjuvante Therapie haben 13 Patienten eine Radiotherapie und 86 eine Chemotherapie erhalten, davon wurden 68 Patienten mit 5-Fluoruracil/Folinsäure (5FU/FA) behandelt. 59 Patienten haben eine Radiochemotherapie erhalten, von diesen haben 18 eine Radiochemotherapie mit 5FU/FA bekommen. Bei drei Patienten wurde eine Immuntherapie angewendet und bei weiteren fünf Patienten eine nicht bekannte andere Therapie (s. Tabelle 6).

Parameter	Anzahl der Patienten	Anzahl der Patienten in %
Neoadjuvante Therapie*		
Erhalten	68	11,0
Keine	517	83,7
Unbekannt	29	4,7
Adjuvante Therapie**		
Erhalten	250	40,4
Keine	283	45,8
Unbekannt	81	13,2

Tabelle 6: Therapeutisches Vorgehen,

* Beinhaltet: Radiotherapie (5) und Radiochemotherapie (63)

** Beinhaltet: Radiotherapie (13), Chemotherapie (86), Radiochemotherapie (59), Immuntherapie (3), Chemotherapie mit 5-Fluoruracil/Folinsäure (68), Radiochemotherapie mit 5-Fluoruracil/Folinsäure (18) und Andere (3)

3.2 Genetische Marker und Prognose des KRK

Tabelle 7 zeigt die untersuchten Gene mit rs-Nummer und die Angabe auf welchem Chromosom das jeweilige Gen liegt. Alle veranschaulichten SNPs konnten mit einer mittleren Auftretenswahrscheinlichkeit von 99,4% in 600 Patienten erfolgreich genotypisiert werden und keiner von ihnen zeigte eine Abweichung vom Hardy-Weinberg Gleichgewicht.

Gene	rs-Nummer	Chr.	Gene	rs-Nummer	Chr.
CCR-2	rs1799864	3	IL-6	rs1554606	7
CTLA-4	rs231775	2	IL-6	rs1800797	7
CTLA-4	rs3087243	2	LTA	rs1041981	6
EVER2	rs7208422	17	TIRAP	rs8177374	11
IL-10	rs1800896	1	TLR-3	rs5743305	4
IL-10	rs1800872	1	TLR-3	rs3775291	4
IL-1B	rs1143627	2	TLR-8	rs3761623	X
IL4-R	rs1805010	16	TLR-9	rs5743836	3
IL4-R	rs1805015	16	TLR-9	rs352140	3
IL4-R	rs1801275	16			

Tabelle 7: Auflistung der untersuchten Gene mit rs-Nummer und Angabe des Chromosoms
Chr.= Chromosom

Wie in Tabelle 8 dargestellt, konnten 4 der 19 untersuchten SNPs als statistisch signifikant mit einem Stadium des KRK assoziiert werden. Hierzu gehören der SNP rs1800872 (IL-10) mit einer Odds Ratio (OR) von 2,6 und einem 95% Konfidenzintervall (CI) von 1,0-6,6, der SNP rs1805015 (IL4-R) mit einem OR von 0,1 und einem 95%CI von 0,01-0,8, der SNP rs1800797 (IL-6) mit einer OR von 2,0 und einem 95%CI von 1,0-3,2 sowie der SNP rs5743836 (TLR-9) mit einer OR von 0,5 und einem 95%CI von 0,3-0,9. Als Referenzgruppe wurden Patienten im Stadium I herangezogen. Die Anzahl der Fälle konnte sich in geringem Umfang ändern, da einige Parameter nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

Durch die ebenfalls in Tabelle 8 veranschaulichten Ergebnisse der Sub-Analyse jedes einzelnen der TNM-Klassifikation formenden Komponenten, Tumorgröße (T), Lymphknotenmetastasierung (N) und Fernmetastasierung (M), konnte der SNP rs1805010 (IL4-R) mit einer OR von 1,6 und einem 95%CI von 1,1-2,4 mit dem Tumor (T) assoziiert werden.

Risiko-Faktor	Genotyp	Fälle ¹	Modell	Tumorstadium ²			Modell	Tumor- ^{3*} größe(T)			Lymph ^{3**} -knoten (N)			Metastasen (M) ^{3***}		
				OR	95%CI			OR	95%CI		OR	95%CI		OR	95%CI	
IL-10 rs1800872	TT	36	TT/GG II	1,1	0,4	3,2	TT/GG	1,1	0,5	2,3	2,1	1,03	4,2	0,6	0,3	1,6
	GT	206	TT/GG III	2,6	1,0	6,6	GT/GG	1,0	0,7	1,4	0,7	0,5	1,0	0,7	0,5	1,1
	GG	336	TT/GG IV	1,0	0,3	3,0										
			GT/GG II	1,1	0,2	1,8										
			GT/GG III	0,9	0,6	1,5										
			GT/GG IV	0,5	0,5	1,3										
IL4-R rs1805010	GG	135	GG/AA II	1,0	0,5	1,8	GG/AA	1,0	0,6	1,5	1,2	0,7	1,9	0,5	0,3	1,0
	GA	271	GG/AA III	1,4	0,8	2,6	GA/AA	1,6	1,1	2,4	1,1	0,8	1,7	1,0	0,6	1,5
	AA	164	GG/AA IV	0,6	0,3	1,2										
			GA/AA II	1,5	0,9	2,5										
			GA/AA III	1,4	0,8	2,4										
			GA/AA IV	1,2	0,7	2,1										
IL4-R rs1805015	GG	21	GG/AA II	0,4	0,1	1,3	GG/AA	0,6	0,2	1,4	0,5	0,2	1,3	0,1	0,0	1,1
	AG	147	GG/AA III	0,5	0,2	1,6	AG/AA	0,9	0,6	1,4	0,9	0,6	1,3	0,8	0,5	1,3
	AA	414	GG/AA IV	0,1	0,01	0,8										
			AG/AA II	0,9	0,9	0,5										
			AG/AA III	0,4	0,4	0,4										
			AG/AA IV	0,2	0,2	0,4										
IL-6 rs1800797	AA	139	AA/GG II	2,0	1,0	3,2	AA/GG	1,5	0,9	2,4	0,9	0,6	1,5	1,2	0,7	2,0
	GA	279	AA/GG III	1,1	0,5	2,1	GA/GG	1,2	0,8	1,7	0,9	0,6	1,3	0,8	0,5	1,3
	GG	165	AA/GG IV	1,3	0,0	2,5										
			GA/GG II	1,6	0,9	2,8										
			GA/GG III	1,0	0,6	1,7										
			GA/GG IV	1,0	0,6	1,6										
TLR-9 rs5743836	CC	12	CC/TT II	0,6	0,1	2,4	CC/TT	0,7	0,2	2,3	0,3	0,1	1,2	1,9	0,6	6,3
	TC	144	CC/TT III	--	--	--	TC/TT	0,8	0,5	1,2	0,8	0,5	1,1	1,2	0,8	1,9
	TT	427	CC/TT IV	0,9	0,2	3,5										
			TC/TT II	0,0	0,4	1,1										
			TC/TT III	0,5	0,3	0,9										
			TC/TT IV	0,9	0,5	1,5										

Tabelle 8: Assoziation des Genotyps mit den Tumorstadien und Subanalyse für Tumorgröße (T), Lymphknoten (N) und Metastasen (M)

OR=Odds Ratio, CI= Konfidenzintervall,

¹ Die Anzahl der Fälle ändert sich in geringem Umfang aufgrund nicht eindeutig zuzuordnender Parameter

² Stadium I Patienten als Referenzgruppe

^{3*} Tumorgröße T1+T2 als Referenzgruppe, T0,Tx und Tis Fälle wurden von der Analyse ausgeschlossen,

^{3**} keine Lymphknotenmetastasierung als Referenzgruppe, Nx Fälle wurden von der Analyse ausgeschlossen,

^{3***}Keine Fernmetastasierung als Referenzgruppe

Der einzige Risikofaktor, der sowohl mit dem Stadium als auch mit einem der TNM Komponenten in Zusammenhang gebracht werden konnte, ist der rs1800872 im IL-10 Gen. Für Träger des TT-Genotyps konnte eine Assoziation mit dem Stadium III (jegliches T mit Lymphknotenmetastasierung) des KRK mit in der Subanalyse assoziierter Lymphknotenbeteiligung (N) bestätigt werden (OR=2,1; 95% CI=1,03-4,2). Als Referenzgruppe wurde für die Tumorgöße (T), das Tumorstadium T1 und T2 für die Lymphknotenmetastasierung (N) Patienten ohne pathologische Lymphknoten (N0) und für die Fernmetastasierung (M) Patienten, bei denen keine Metastasen gefunden wurden (M0), herangezogen. Patienten mit diagnostiziertem T0, Tx, Tis und Nx wurden nicht mit einbezogen.

3.2.1 Stadienassoziation des Toll-Like Rezeptor 3

Der SNP rs3775291 konnte bei der Untersuchung des TLR-3 **nicht** statistisch signifikant mit einem der Tumorstadien assoziiert werden (s. Tabelle 9).

Genetischer Risikofaktor	Genotyp	Fälle	Modell	Tumorstadien*	OR	95% CI		P-Wert	P-Trend
TLR-3 rs3775291	TT	42	TT/CT	II	1,1	0,4	2,6	0,9	0,8
	CT	256	TT/CC	III	0,6	0,2	1,8	0,4	
	CC	284	TT/CC	IV	1,5	0,6	3,5	0,4	
			CT/CC	II	1,1	0,7	1,7	0,8	
			CT/CC	III	0,9	0,6	1,5	0,8	
			CT/CC	IV	1,0	0,6	1,7	0,9	

Tabelle 9: Toll-Like Rezeptor 3 Assoziation mit Tumorstadien

OR= Odds Ratio, CI= Konfidenzintervall, Stadium I als Referenzgruppe

Auch nach der Subanalyse der einzelnen die TNM-Klassifikation formenden Komponenten konnte **keine** Assoziation des TLR-3 gefunden werden (s. Tabelle 10).

Modell	Tumorgöße (T)*			Lymphknoten (N)**			Metastasen (M)***		
	OR	95% CI	P-Wert	OR	95% CI	P-Wert	OR	95% CI	P-Wert
TT/CC	1,1	0,6 2,1	0,8,	1,0	0,5 1,9	1,0	1,6	0,8 3,3	0,2
CT/CC	1,2	0,8 1,7	0,3	0,9	0,7 1,3	0,6	1,0	0,7 1,5	1,0

Tabelle 10: Subanalyse der TNM-Komponenten für den Toll-Like Rezeptor 3

OR= Odds Ratio, CI= Konfidenzintervall

*Tumor T1+T2 als Referenzgruppe, T0, Tx und Tis wurden ausgeschlossen

**keine Lymphknotenmetastasierung (N0) als Referenzgruppe, Nx wurde ausgeschlossen

***Keine Fernmetastasen (M0) als Referenzgruppe

3.3 Faktoren im Zusammenhang mit Überleben

Auf Grundlage der aus bis zu 13 Jahren Follow-up bestehenden Daten unserer Kohorte haben wir den Einfluss der analysierten SNPs auf das spezifische Langzeitüberleben untersucht. Bei 582 Patienten, mit vollständig vorhandenen Genotyp und Follow-up Informationen, konnten wir eine durchschnittliche Follow-up Periode von 46,9 Monaten erreichen. Die 5-Jahres Überlebensrate lag bei 73% und die 10 Jahres Überlebensrate bei 65%.

In der univariaten Analyse konnte das Alter zum Diagnosezeitpunkt mit der Patientenüberlebensrate in Zusammenhang gebracht werden. Im Gegensatz dazu konnte keine Assoziation des Geschlechts und der Lokalisation des Karzinoms mit der Überlebensrate gefunden werden. Die Gesamtzahl der Patienten ändert sich in geringem Umfang, da einige Parameter nicht eindeutig zugeordnet werden konnten und aus diesem Grund aus der Analyse ausgeschlossen wurden (s. Tabelle 11).

Parameter	Fälle*	Verstorben	HR	95% CI		P-Wert
Alter zum Diagnosezeitpunkt						
≥65	256	77	1,53	1,11	2,11	0,009
<65	327	73	1,00	--	--	
Geschlecht						
Männer	308	79	1,02	0,74	1,42	0,9
Frauen	271	67	1,00	--	--	
Lokalisation						
Colon	275	72	0,98	0,73	1,38	1,0
Rektum	307	78	1,00	--	--	

Tabelle 11: Prognostische Faktoren im Zusammenhang mit dem Überleben beim kolorektalen Karzinom, HR= Hazard Ratio, CI= Konfidenzintervall,
*Anzahl der Fälle ändert sich in geringem Umfang aufgrund nicht eindeutig zuzuordnenden Parametern

Wie in Tabelle 12 abgebildet, konnten auch die Tumorstadien und TNM-Komponenten mit der Überlebensrate der KRK Patienten in Zusammenhang gebracht werden. Hierbei konnte vor allem eine Assoziation des Tumorstadium IV, mit einer Hazard Ratio von 27,98 und des Stadium III, mit einer Hazard Ratio von 3,39, gefunden werden. In der weiteren Analyse ergibt sich ein Zusammenhang der

Tumorgröße (T), der Lymphknotenmetastasierung (N) und der Fernmetastasierung (M) und somit aller drei die TNM-Klassifikation formenden Komponenten mit der Überlebensrate.

Parameter	Fälle*	Verstorben	HR	95% CI		P-Wert
Tumorstadium						
Stadium IV	125	92	27,98	14,40	54,37	<0,0001
Stadium III	140	27	3,39	1,64	7,00	0,001
Stadium II	149	19	1,87	0,87	4,03	0,1
Stadium I	154	10	1,00	--	--	
Tumorgröße (T)						
T4+T3	362	125	3,60	2,31	5,62	<0,0001
T1+T2	205	23	1,00	--	--	
Regionäre Lymphknoten (N)						
N+	239	103	4,37	3,07	6,21	<0,0001
N-	339	45	1,00	--	--	
Fernmetastasen (M)						
M+	126	92	13,73	9,66	19,51	<0.0001
M-	452	56	1,00	--	--	

Tabelle 12: Tumorstadien als prognostische Faktoren für das Überleben beim kolorektalen Karzinom, HR= Hazard Ratio, CI= Konfidenzintervall,
 *Anzahl der Fälle ändert sich in geringem Umfang aufgrund nicht eindeutig zuzuordnenden Parameter

3.3.1 IL-10 Assoziation mit dem Überleben

Keiner der fünf mit einem der Tumorstadien oder der TNM-Klassifikation assoziierten SNPs konnte statistisch signifikant mit der Überlebensrate beim kolorektalen Karzinom assoziiert werden. Insbesondere konnte kein Zusammenhang zwischen dem SNP rs1800872 im IL-10 Gen und der Überlebensrate gefunden werden (s. Tabelle 13).

Parameter	Fälle	Verstorben	HR	95% CI		P-Wert
Interleukin-10 rs1800872						
TT	36	10	1,29	0,67	2,49	0,45
GT	201	50	0,94	0,66	1,34	0,74
GG	324	83	1,00	--	--	

Tabelle 13: Interleukin-10 Assoziation mit der Überlebensrate
HR= Hazard Ratio, CI= Konfidenzintervall

3.3.2 Toll-Like Rezeptor 3 Assoziation mit der Überlebensrate

Bei dem SNP rs3775291 im TLR-3 Gen wurde eine statistisch signifikante Assoziation mit dem Überleben beim KRK gefunden. Patienten, die den TT Genotyp tragen, haben ein um 93% erhöhtes Sterberisiko verglichen mit Patienten des CC Genotyps (HR= 1,93; 95% CI 1,14-3,28) (s. Tabelle 14).

Parameter	Fälle	Verstorben	HR	95% CI		P-Wert
TLR-3 rs3775291						
TT	39	17	1,93	1,14	3,28	0,015
CT	246	62	1,01	0,72	1,43	0,94
CC	280	69	1,00	--	--	

Tabelle 14: Toll-Like Rezeptor 3 Assoziation mit der Überlebensrate
HR= Hazard Ratio, CI= Konfidenzintervall

Die folgenden Kaplan-Meier Überlebenskurven (Abbildung 5-7) repräsentieren das KRK spezifische Überleben in Bezug auf den TLR-3 Genotyp.

3.3.2.1 Kaplan-Meier Analyse für das Gesamtkollektiv

Unter allen Patienten hatten diejenigen, die den TT-Genotyp tragen, ein signifikant kürzeres Überleben als diejenigen mit dem CC oder dem CT Genotyp (Log-Rang-Test, $P = 0,03$).

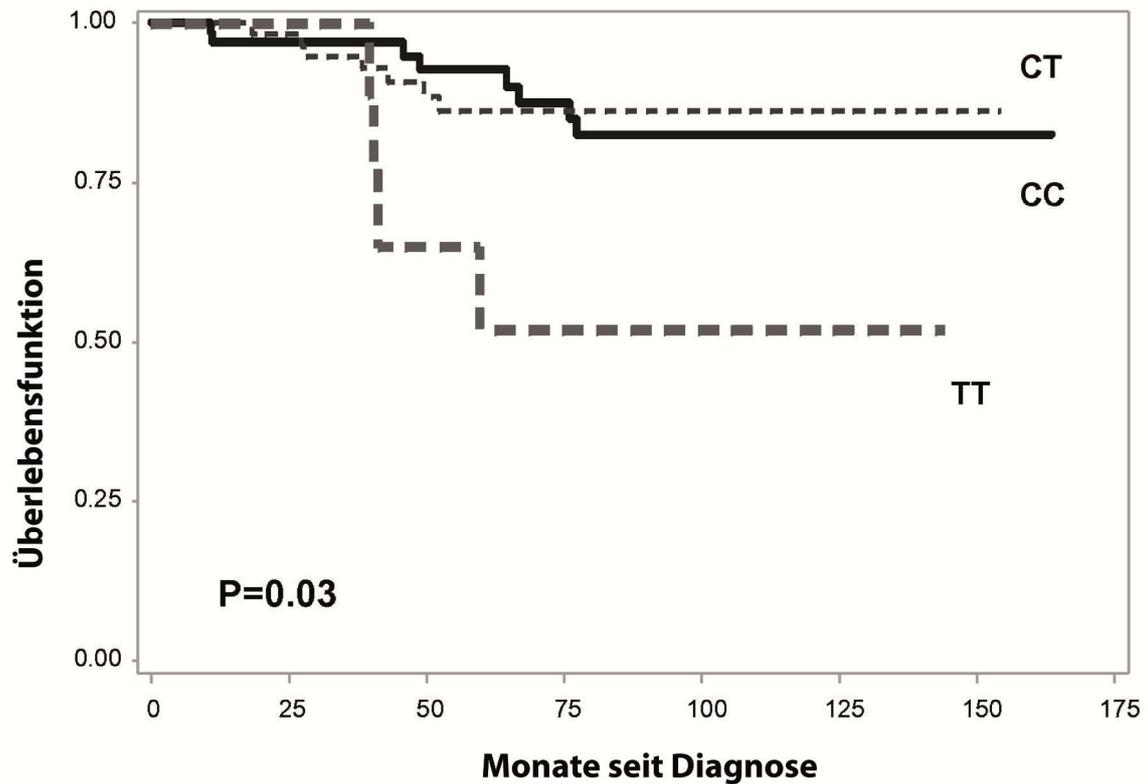


Abbildung 5: Kaplan-Meier Schätzung für das spezifische Überleben beim kolorektalen Karzinom in Zusammenhang mit dem Genotyp des Toll-Like Rezeptor 3, Gesamtzahl(n) = 582, P-Werte beziehen sich auf den Log-Rang-Test

3.3.2.2 Kaplan-Meier Analyse für die Stadienabhängigkeit

Kaplan-Meier Überlebensschätzungen des TLR-3 Genotyps wurden für alle unterschiedlichen TNM Stadien erstellt. Hierbei ergab sich, dass der Effekt der TLR-3 Variante auf die 157 Patienten mit einem im Stadium II diagnostizierten KRK begrenzt war (Log-Rang-Test, $P=0,03$, HR 4,14; 95% CI 1,24-13,84). Es gab keinen signifikanten Zusammenhang zwischen der TLR-3 Variante und dem KRK Überleben bei Patienten, die als Stadium I, III und IV diagnostiziert wurden ($P=0,73$, $P=0,61$ und $P=0,87$, für Log-Rang Test entsprechend).

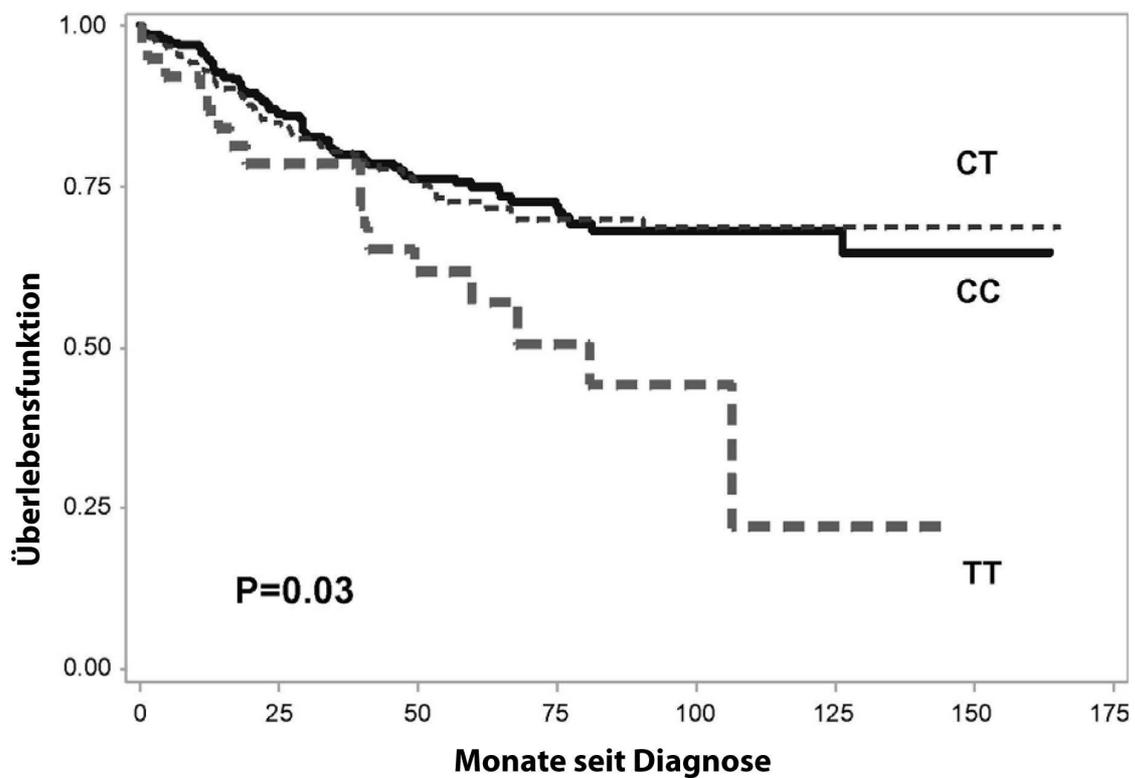


Abbildung 6: Kaplan-Meier Schätzung für Patienten im Stadium II des kolorektalen Karzinoms
Gesamtzahl(n) = 157, P-Werte beziehen sich auf den Log-Rang-Test

3.3.2.3 Kaplan-Meier Analyse mit dem Einfluss der Endtherapie

Analysen, die auf Patienten, die keine adjuvante Therapie erhalten haben, beschränkt waren, zeigten einen stärkeren Effekt der TLR-3 Variante auf das KRK Überleben (HR=3,2: 95% CI 1,4-7,7 für den homozygoten Genotyp TT) als der Effekt, der bei der gesamten Patientengruppe gefunden werden konnte (HR= 1,93; 95% CI 1,11-3,28).

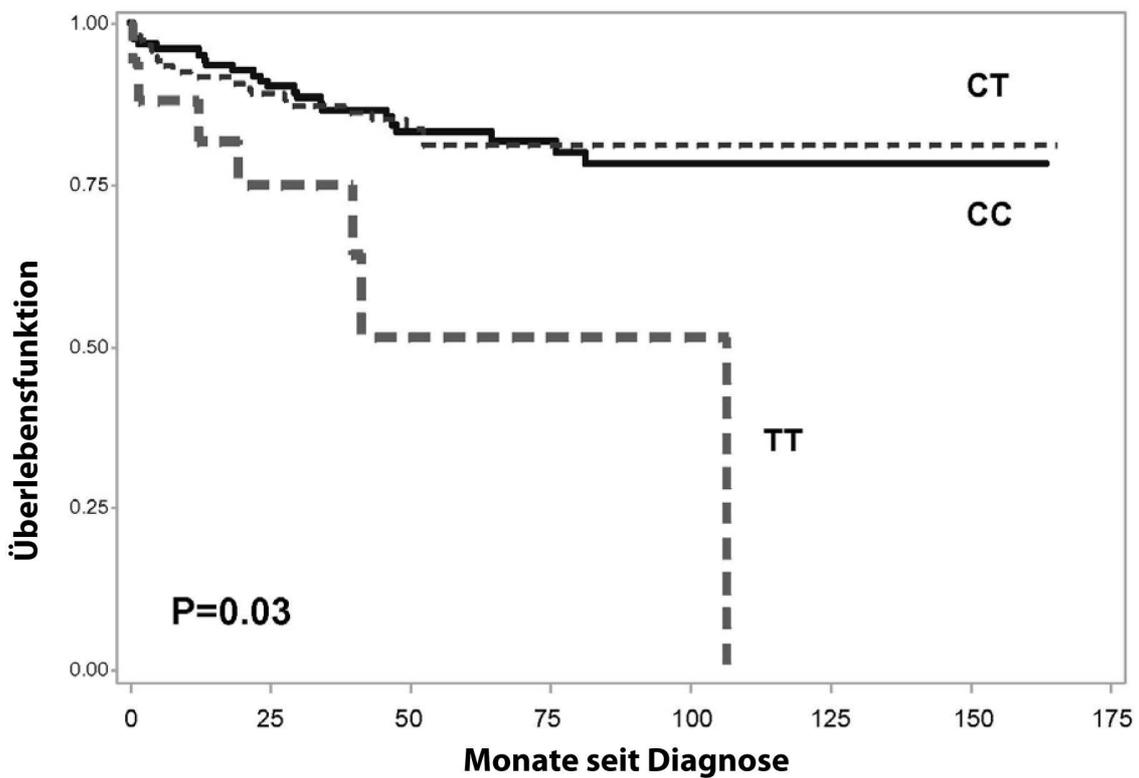


Abbildung 7: Kaplan-Meier Schätzung für Patienten ohne adjuvante Therapie
Gesamtzahl(n) = 283, P-Werte beziehen sich auf den Log-Rang-Test

3.3.2.4 Multivariate Analyse des KRK Überlebens und TLR-

Anschließend wurde multivariat untersucht, ob die Einbeziehung von anderen mit dem KRK Überleben assoziierten Variablen die Parameterschätzung für den TLR-3 Polymorphismus beeinflusst. Der TT Genotyp blieb auch nach der Adjustierung für das Diagnosealter, die pathologischen Tumorstadien und die Lymphknotenmetastasierung als Risikofaktor in der multivariaten Analyse bestehen (s. Tabelle 15).

Parameter	Anzahl der Risikofälle	HR	95% CI		P-Wert
Alter zum Diagnosezeitpunkt >65					
TT	39	1,91	1,12	3,25	0,02
CT	246	1,05	0,74	1,48	0,9
CC	280	1,00	--	--	
Tumorstadium					
TT	39	1,48	0,87	2,53	0,1
CT	241	1,11	0,79	1,56	0,5
CC	271	1,00	--	--	
Tumorgröße (T)					
TT	39	1,83	1,08	3,12	0,03
CT	242	1,02	0,72	1,43	0,9
CC	270	1,00	--	--	
Regionäre Lymphknoten (N)					
TT	39	1,99	1,17	3,39	0,01
CT	246	1,12	0,79	1,58	0,5
CC	277	1,00	--	--	
Fernmetastasen					
TT	39	1,34	0,78	2,28	0,2
CT	246	0,77	1,52	0,66	1,0
CC	280	1,00	--	--	
TLR-3 rs3775291					
TT	39	1,93	1,14	3,28	0,02
CT	246	1,01	0,72	1,43	0,9
CC	280	1,00	--	--	

Tabelle 15: Multivariate Analyse der Toll-Like Rezeptor 3 spezifischen Überlebensrate beim kolorektalen Karzinom, HR= Hazard Ratio, CI= Konfidenzintervall, *beinhaltet Alter zum Diagnosezeitpunkt, T und N

4 Diskussion

Mit der Entschlüsselung des Genoms wurde eine neue Grundlage geschaffen, auf der Ursachen- und Risikoforschung vor allem für das weit verbreitete KRK betrieben werden können. Erfolge in der Erforschung von Keimbahnmutationen konnten bereits mit der Entdeckung einiger Assoziationen zwischen veränderten Genloci und dem kolorektalen Karzinom, wie beispielsweise *APC-I1307K*, *HRAS1-VNTR* und *MTHFR*, erzielt werden (Houlston und Tomlinson 2001). Insbesondere aber durch die Einführung genomweiter Assoziationsstudien konnten einige relevante Risikogene wie das *BMP4* (bone morphogenetic protein 4), *CDH1* (cadherin 1), *RHPN2* (Rho GTPase binding protein 2) und vor allem *SMAD7* (SMAD family member 7) identifiziert werden (Broderick et al. 2007; Houlston et al. 2010). Bisher wurde allerdings keines dieser Risikogene zum Überleben korreliert und eine abschließende Entscheidung über die Bedeutung dieser Marker, in Bezug auf das therapeutische Management und die Risikobewertung für den Patienten, blieb bisher aus.

Die Entwicklung neuer molekularer Marker auf Basis somatischer Mutationen hat bereits in jüngster Vergangenheit begonnen und konnte vielversprechende Ergebnisse in Hinblick auf die Therapie des KRK zeigen. Besonders hervorzuheben ist hierbei der *KRAS* Mutationsstatus. Mit dem Nachweis eines *KRAS*-Wildtyps im Tumorgewebe ist eine Voraussetzung dafür erfüllt, dass der Patient von einer Behandlung mit anti-EGFR-Antikörpern profitieren kann (Allegra et al. 2009). Der *KRAS* Mutationsstatus ist allerdings bisher der einzige biologische Marker, der für das metastasierte KRK und das Ansprechen auf eine medikamentöse Therapie akzeptiert ist.

Zu den weiteren untersuchten Markern gehört unter anderem die Mikrosatelliteninstabilität. Popat et al. fassten 2005 in ihrem Review 32 Studien zusammen und zeigten, dass Patienten mit einer Mikrosatelliteninstabilität, verglichen mit Patienten mit stabilen Mikrosatelliten, nach Therapie mit Fluorouracil eine bessere Prognose haben (Popat et al. 2005). Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 18q, Thymidilat-Synthase, VEGF und IL-8 werden als weiter mögliche Marker diskutiert (Cunningham et al. 2010).

In der vorliegenden Studie konnte nun mit dem TLR-3 Polymorphismus zum ersten Mal ein multivariater Zusammenhang zwischen Genen und Überleben gezeigt werden (Castro et al. 2011). Zusätzlich konnte mit dem IL-10 Polymorphismus ein Zusammenhang mit der Lymphknotenmetastasierung hergestellt werden. Die ersten Schritte, die zur individuellen Risikobewertung des KRK Patienten beitragen, basierten bisher auf somatischen Mutationen. In dieser Studie konnten wir dies nun auch für Keimbahnmutationen erstmals darstellen.

4.1 Kollektiv

Die durchgeführte Studie beinhaltet Patienten, die von einer homogenen kaukasischen Population deutscher Vorfahren rekrutiert wurde, welche durch den Geburtsort beider Eltern festgelegt wurde. Dies ist wichtig, um ein Confounding durch ethnische Unterschiede zu verringern. Damit diese Stichprobe die Bevölkerung Deutschlands repräsentieren kann, bedarf es einer niedrigen Rate an Zu- und Abwanderung von Patienten. Dies kann durch eine geografische Begrenzung, wie sie im Poppen-Rekrutierungsgebiet mit den Grenzen zu Dänemark, dem Nord-Ostsee-Kanal und Nord- und Ostsee zu finden ist, gewährleistet werden (Krawczak et al. 2006). Dementsprechend stellt die Poppen-Region in Norddeutschland ein ideales Gebiet zur Erforschung genetischer Prognosemarker dar.

Obwohl die Teilnahmerate der initial angeschriebenen Patienten nur 29% betrug und lediglich elektiv operierte Patienten in die Studie einbezogen wurden, gibt es keinen Anhalt, dass die Studie hierdurch verzerrt wurde. Dies zeigt sich an der prozentualen Verteilung der UICC Stadien auf die Anzahl der KRK Fälle, welche in anderen westlichen Ländern, wie beispielsweise der Kohorte von Green et al. 2007 in Großbritannien oder der aus Nord-Kalifornien stammenden Studie von Doria-Rose et. al aus dem Jahr 2004, ähnlich ist (Green et al. 2007; Doria-Rose et al. 2004).

Die Gesamtzahl der in diese Studie zum Überleben eingeschlossenen Patienten war mit über 500 Fällen relativ groß. So konnte der Forderung nach Studien mit umfangreicheren Populationen, wie sie von Howell und Rose-Zerilli in ihrem 2007 verfassten Review zum IL-10 Polymorphismus und Krebsrisiko geäußert wurde, nachgegangen werden. Die durchschnittliche Fallzahl, der 23 von Howell und

Rose-Zerilli beschriebenen Studien betrug 293, somit stand bei unserer Studie mit fast doppelter Anzahl ein aussagekräftiges Patientengut zur Verfügung (Howell und Rose-Zerilli 2007).

Hinzu kommt, dass bei dieser Studie zusätzlich die Untersuchung der Patienten in Hinblick auf Prognosemarker, wie Alter, Geschlecht, Lokalisation und UICC Stadium, durchgeführt wurde. Auch hierbei war das untersuchte Patientenkollektiv repräsentativ, denn mit 53,3% Männer zu 46,7% Frauen, einer Lokalisation von 53,4% im Rektum zu 46,6% im Kolon und 55,5% Patienten mit einem Alter unter 65 Jahre war das Verhältnis nahezu ausgeglichen.

4.2 Prognosefaktoren

Das Alter zum Diagnosezeitpunkt konnte statistisch signifikant mit dem Überleben assoziiert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Heminki et. al 2010, die ein geringeres Überleben von Patienten älter als 80 Jahre verglichen mit Patienten, die jünger als 50 Jahre waren, zeigten, sowie den Ergebnisse von Angell-Andersen et al., die eine Gruppe von 75-79 Jährigen mit 60-64 Jährigen verglichen und ebenso ein höheres Sterberisiko für die ältere Gruppe belegen konnten (Hemminki et al. 2010; Angell-Andersen et al. 2004). In unserer Studie konnte das Alter über 65 Jahre mit der Überlebensrate assoziiert werden. Die Vermutung liegt nahe, dass Therapieart und Ansprechen sowie Komorbiditäten hierfür ursächlich sein könnten (Lemmens et al. 2005; Rutten et al. 2007).

Den zuvor berichteten geschlechterspezifischen Unterschied der Überlebensraten, mit einer besseren Überlebensrate für Frauen, konnten wir in unserer Studie im Gegensatz zu Fernandez et al. 2000 nicht bestätigen (Fernandez et al. 2000).

Die weitere Analyse hat außerdem keine Assoziation zwischen der Lokalisation und der Überlebensrate gezeigt. Dies bestätigt die Ergebnisse aus anderen europäischen Ländern. Während 1988-1990 die Überlebensrate für Patienten mit einem im Rektum lokalisierten Tumor noch schlechter war als für Patienten mit Kolonkarzinomen, zeigt die EURO CARE Studie von Brenner et al. einen Anstieg der Überlebensrate zwischen den Jahren 2000 und 2002, welcher dazu führt, dass, wie bei unseren

Ergebnissen, Patienten mit einem Rektumkarzinom keine schlechtere Prognose haben als Patienten, deren Tumor im Kolon lokalisiert ist (Brenner et al. 2011).

Es ist allgemein bekannt, dass die Stadieneinteilung des KRK die grundlegende Prognose bedingt (Labianca et al. 2010; O'Connell et al. 2004). Auch in unserer Studie konnten das Tumorstadium sowie die Unterteilung in Tumorgröße, Lymphknoten- und Fernmetastasen signifikant mit der Überlebensrate assoziiert werden. Die Stadieneinteilung stellt zwar die Basis der therapeutischen Entscheidung, sie erlaubt aber allein gesehen keine genaue Vorhersage der Prognose für den einzelnen individuellen Patienten (Weitz et al. 2005).

4.3 TLR-3

Es gibt einen großen Bedarf, neue prognostische Marker für KRK Patienten zu finden. Insbesondere um die Situation neu diagnostizierter, im Stadium II des KRK erkrankter Patienten zu verbessern, ist es erforderlich, solche Marker zu erforschen. Diese spezielle Patientengruppe hat mit einem erheblicher Anteil von etwa 25% ein erhöhtes Risiko, ein Rezidiv zu entwickeln (Sobrero 2006). Unsere Studie sollte die mögliche Rolle von 19 ausgesuchten Genvarianten, von in Immunsystem und Entzündungsgeschehen involvierten Genen, in Bezug auf die Prognose und Progression des KRK untersuchen und konnte den bereits von Rudolf Virchow erkannten Zusammenhang von Krebs und Entzündungsmechanismen weiter untermauern (Balkwill und Mantovani 2001). Es konnte gezeigt werden, dass ein Polymorphismus (Leu421Phe, rs3775291) im TLR-3 Gen ein unabhängiger prognostischer Marker für das krankheitsspezifische Überleben von Stadium II diagnostizierten KRK Patienten ist. Der am Immunsystem beteiligte TLR-3 gehört zu der Familie der Toll-Like Rezeptoren, die in die Erkennung von verschiedenen PAMPs involviert sind, welche zur Aktivierung der angeborenen Immunantwort führen und die anschließende adaptive Immunantwort mitbestimmen. Es wurde bereits beschrieben, dass der TLR-3 nicht nur eine antivirale IFN Antwort unterstützt (Oshiumi et al. 2003; Alexopoulou et al. 2001), sondern auch den proinflammatorischen Weg durch Aktivierung von NF-kappaB und MAPK einleiten und die Apoptose durch Caspase 8 beeinflussen kann (Salaun et al. 2006; Schroder und Bowie 2005). Dies sind Mechanismen des Immunsystems, die, wenn sie nicht richtig

funktionieren, zur Karzinogenese beitragen. Die Studie am TLR-3 zeigt, dass auch die Prognose von Krebspatienten von diesen Mechanismen abhängig zu sein scheint.

Dass Toll-Like Rezeptoren bei der Entwicklung des sporadischen KRK beteiligt sind, zeigen die Studien von Rakoff-Nahoum und Medzhitov sowie Rhee et al. (Rakoff-Nahoum und Medzhitov 2007; Rhee et al. 2008). Da bisher allerdings nur eine Studie Polymorphismen in TLR-Genen und hierbei ausschließlich in den Genen des TLR-2 und TLR-4 direkt mit dem KRK in Zusammenhang bringen konnte (Boraska Jelavic et al. 2006), war auch dies ein Anstoß in unserer Studie, einige TLRs, wie den TLR-3, TLR-8 und TLR-9 zusätzlich zu untersuchen. Zum TLR-3 konnte bereits gezeigt werden, dass er in anderen Tumoren, wie beispielsweise in der Entwicklung des Oesophagus Karzinoms, eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Lim et al. 2009).

Auch die von uns in Bezug auf das KRK untersuchte Korrelation zum Überleben konnten für den TLR-3 bereits in anderen Tumoren beobachtet werden. So wurde bei klinischen Studien an Brustkrebspatientinnen Frauen, die eine adjuvante Therapie mit dem TLR-3 Agonisten Poly (A:D) (Polyadenylic-polyuridylic acid) erhalten haben, eine bessere Überlebensrate zugeschrieben als denjenigen, die diese Therapie nicht bekommen haben (Lacour et al. 1980). Im Gegensatz zu dieser klinischen Fall-Kontroll-Studie konnte in unserer Studie auf genetischer Basis ein Zusammenhang zwischen dem TLR-3 und dem Überleben beim KRK gefunden werden.

Man kann vermuten, dass das schlechtere Überleben, welches bei Patienten, die den TT Genotyp tragen, beobachtet wurde, durch Veränderungen der TLR-3 Proteineigenschaften oder dessen Expressionsmuster verursacht werden könnte. Diese Variation kann die Rolle des TLR-3 als Antikrebs-Immunstimulator beeinflussen, ebenso den apoptotischen Prozess verändern und somit zu einem besseren Überleben der Tumorzellen führen. Eine strukturelle Analyse des TLR-3 Moleküls konnte zeigen, dass eine Glykosylierungsstelle (Asn413) innerhalb der Ligandenbindungsstelle der dsRNA für die Rezeptoraktivierung nötig ist (Sun et al. 2006). Da das Asn413 neben dem in unserer Studie mit dem Überleben assoziierten Leu412Phe Polymorphismus lokalisiert ist, scheint auch bei unserer Variante eine Änderung in der Ligandenbindung oder die Dimerisierung des Rezeptors als Ursache

für die veränderten Eigenschaften des TLR-3 wahrscheinlich, welche dann zu einer schlechteren Bekämpfung des Tumors und einer geringeren Überlebensrate der Patienten mit dem TT Genotyp führen könnten. Entscheidend ist, dass der beobachtete Effekt der TLR-3 abhängigen Prognose des KRK eine klinisch bedeutende Relevanz haben kann, da TLR-3 Agonisten als adjuvante Therapiemöglichkeit in anderen klinischen Studien verschiedener Karzinome bereits angewendet werden (Laplanche et al. 2000; Taura et al. 2010). Somit besteht die Hoffnung, dass durch unsere Ergebnisse diese Therapieoption in die spezifische Behandlung des KRK Patienten einbezogen werden kann.

4.4 IL-10

In einer weiteren Analyse wurden Assoziationen der untersuchten Varianten mit verschiedenen Progressionsstadien des kolorektalen Karzinoms untersucht. Die rs1800872 Variante, die in dem Promotor des IL-10 Gens liegt (auch IL-10-592 genannt), wurde statistisch signifikant mit der Lymphknotenbeteiligung im Stadium III bei KRK Patienten assoziiert. Der IL-10 Promotor, Haplotyp CGG (der Varianten an Position -1082, -819, -592), konnte bereits mit einer erhöhten IL-10 Produktion in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz dazu konnte der TAT-Haplotyp mit einer erniedrigten IL-10 Produktion assoziiert werden (Crawley et al. 1999; Suarez et al. 2003). Dies legt die Vermutung nahe, dass der Zusammenhang des in dieser Arbeit untersuchten IL-10 Polymorphismus mit dem Stadium III des KRK auf einer verminderten Produktion des antiinflammatorischen IL-10, bei Patienten, die den TT-Genotyp des SNP rs1800872 tragen, begründet ist. Diese Erkenntnisse stimmen mit der Beobachtung an der schwedischen Population von Wilkening et. al 2008 überein, in der gezeigt wurde, dass bei Patienten, die ein G Allel des IL-10-1082 Promotor SNPs, dem rs 1800896, tragen, signifikant mehr Tumore im Stadium I und II als im Stadium III und IV zu finden waren (Wilkening et al. 2008). Da der Lymphknotenstatus der wichtigste Indikator für die Notwendigkeit einer adjuvanten Therapie ist, ist das Vorhandensein eines IL-10 Polymorphismus ein Parameter, der für das Lymphknotenstaging bezogene Risikomanagement des KRK in Betracht gezogen werden sollte.

4.5 Resümee und Aussicht

Die intensive Forschung der letzten Jahre konnte zeigen, dass exogene sowie endogene Faktoren bei der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms eine Rolle spielen. Hierbei sind 30% der KRK Fälle familiär bedingt, wobei nur 5% auf eindeutige Syndrome zurückgeführt werden können. Die restlichen familiär bedingten Kolonkarzinome scheinen nicht durch eine einzelne Mutation erklärbar, sondern legen vielmehr eine polygene Vererbung zugrunde. Ebenso tragen Entzündungsmechanismen und Umwelteinflüsse, wie Ernährung, Rauchen oder Alkoholkonsum, ihren Teil zum individuellen Risiko des KRK bei. Durch die Interaktion von Umwelt und Genetik ist nicht nur ein einzelner Faktor, sondern das Zusammenspiel mehrerer Faktoren für das Risiko ausschlaggebend.

Für den Patienten stellt allerdings nicht die Frage der Ursache den primär wichtigsten Faktor dar, sondern vielmehr die Bewertung des persönlichen Risikos bezogen auf die Therapieplanung und Prognose. Erste Schritte für eine solche individuelle Risikobewertung auf genetischer Ebene wurden bereits mit der Entwicklung molekularer Marker auf wie dem *KRAS*-Status erbracht und in Zukunft können weitere Ergebnisse erhofft werden. Zusätzlich wurden durch die Einführung genomweiter Assoziationsstudien bereits einige Fortschritte in der Erforschung von Keimbahnmutationen erzielt, die in Zukunft auch in Hinblick auf die Prognoseeinschätzung der Patienten eingesetzt werden sollten.

Nimmt man die Umwelteinflüsse, die Tumorgegebenheiten und die Genetik des Patienten zusammen, so erkennt man, dass die Kombination dieser Komponenten für jeden Patienten unterschiedlich ausfällt und dementsprechend für jeden Patienten eigene Charakteristika entstehen, die mit in die Therapieplanung und Risikobewertung einbezogen werden sollten. Unsere Ergebnisse können dazu beitragen, auf der Basis einer individuellen Risikobewertung, in Zukunft einen auf jeden einzelnen Patienten abgestimmten individuellen Therapieplan zu entwickeln und somit dessen Prognose möglicherweise zu verbessern.

5 Zusammenfassung

Das klinisch-pathologische Stadium ist immer noch der wichtigste Parameter für die Prognoseerhebung von neu diagnostizierten KRK Patienten. Obwohl molekulare Marker für die Nachsorge behandelter Patienten vorgeschlagen wurden, befindet sich deren klinische Anwendbarkeit weiterhin in der Entwicklung. Insbesondere für KRK Patienten im Stadium II besteht ein Bedarf, da einige Patienten wahrscheinlich von einer postoperativen Chemotherapie profitieren würden.

Um unser Wissen über das genetische Profil von KRK Patienten zu verbessern, führten wir eine Fallstudie durch, die den Zusammenhang zwischen immunologischen Genen und der Prognose sowie dem Überleben des KRK untersucht. Hierzu wurden 19 SNPs in 12 Genen von 614 Patienten, der Kieler Kohorte (Popgen) genotypisiert.

Eine Promotorvariante (rs1800872) im IL-10 Gen wurde mit einer erhöhten Lymphknotenmetastasierung in Verbindung gebracht (OR=2.1, 95% KI=1.03-4.2 für Träger des TT Genotyps). Außerdem konnte zum ersten Mal nachgewiesen werden, dass es eine statistisch signifikante Assoziation zwischen dem SNP rs 377529 im TLR-3 Gen mit dem KRK Überleben von Patienten im Stadium II gibt. Patienten, die den TT Genotyp tragen, hatten ein um 93 % erhöhtes Risiko zu sterben, verglichen mit den CC Trägern (HR=3.2, 95% KI 1.4-7.7). Der beobachtete Effekt der TLR-3 Variante war in der Gruppe von Patienten, die keine adjuvante Therapie erhielten, größer (HR=3,2 95%KI 1,4-7,7).

Unsere Ergebnisse können zusätzliche Marker zur Risikobeurteilung von KRK Patienten im Stadium II und individuellen Behandlungsentscheidungen liefern. In Zukunft sind weitere Studien nötig, welche die Relevanz dieser Ergebnisse in der Klinik in Bezug auf die Risikobewertung und richtige therapeutische Entscheidungsfindung sichern.

6 Literaturverzeichnis

Akira, S., Takeda, K. (2004):

Toll-like receptor signalling. Nat Rev Immunol, 4, 499-511

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., Flavell, R. A. (2001):

Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. Nature, 413, 732-738

Allegra, C. J., Jessup, J. M., Somerfield, M. R., Hamilton, S. R., Hammond, E. H., Hayes, D. F., McAllister, P. K., Morton, R. F., Schilsky, R. L. (2009):

American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. J Clin Oncol, 27, 2091-2096

Angell-Andersen, E., Tretli, S., Coleman, M. P., Langmark, F., Grotmol, T. (2004):

Colorectal cancer survival trends in Norway 1958-1997. Eur J Cancer, 40, 734-742

Balkwill, F., Mantovani, A. (2001):

Inflammation and cancer: back to Virchow? Lancet, 357, 539-545

Balleste, B., Bessa, X., Pinol, V., Castellvi-Bel, S., Castells, A., Alenda, C., Paya, A., Jover, R., Xicola, R. M., Pons, E., Llor, X., Cordero, C., Fernandez-Banares, F., de Castro, L., Rene, J. M., Andreu, M. (2007):

Detection of metachronous neoplasms in colorectal cancer patients: identification of risk factors. Dis Colon Rectum, 50, 971-980

Berg, D. J., Davidson, N., Kuhn, R., Muller, W., Menon, S., Holland, G., Thompson-Snipes, L., Leach, M. W., Rennick, D. (1996):

Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. J Clin Invest, 98, 1010-1020

Bernstein, C. N., Blanchard, J. F., Kliewer, E., Wajda, A. (2001):

Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. Cancer, 91, 854-862

Boraska Jelavic, T., Barisic, M., Drmic Hofman, I., Boraska, V., Vrdoljak, E., Peruzovic, M., Hozo, I., Puljiz, Z. Terzic, J. (2006):

Microsatellite GT polymorphism in the toll-like receptor 2 is associated with colorectal cancer. Clin Genet, 70, 156-160

Brenner, H., Bouvier, A. M., Foschi, R., Hackl, M., Larsen, I. K., Lemmens, V., Mangone, L., Francisci, S. (2011):

Progress in colorectal cancer survival in Europe, from the late 1980s to the early 21st century: The EUROCARE study. Int J Cancer,

Broderick, P., Carvajal-Carmona, L., Pittman, A. M., Webb, E., Howarth, K., Rowan, A., Lubbe, S., Spain, S., Sullivan, K., Fielding, S., Jaeger, E., Vijayakrishnan, J., Kemp, Z., Gorman, M., Chandler, I., Papaemmanuil, E., Penegar, S., Wood, W., Sellick, G., Qureshi, M., Teixeira, A., Domingo, E., Barclay, E., Martin, L., Sieber, O., Kerr, D., Gray, R., Peto, J., Cazier, J. B., Tomlinson, I., Houlston, R. S. (2007):

A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. Nat Genet, 39, 1315-1317

Calvert, P. M., Frucht, H. (2002):

The genetics of colorectal cancer. Ann Intern Med, 137, 603-612

Castro, F. A., Forsti, A., Buch, S., Kalthoff, H., Krauss, C., Bauer, M., Egberts, J., Schniewind, B., Broering, D. C., Schreiber, S., Schmitt, M., Hampe, J., Hemminki, K., Schafmayer, C. (2011):

TLR-3 polymorphism is an independent prognostic marker for stage II colorectal cancer. Eur J Cancer, 47, 1203-1210

Castro, F. A., Haimila, K., Sareneva, I., Schmitt, M., Lorenzo, J., Kunkel, N., Kumar, R., Försti, A., Kjellberg, L., Hallmans, G., Lehtinen, M., Hemminki, K., Pawlita, M. (2009):

Association of HLA-DRB1, interleukin-6 and cyclin D1 polymorphisms with cervical cancer in the Swedish population—A candidate gene approach. International Journal of Cancer, 125, 1851-1858

Chao, A., Thun, M. J., Jacobs, E. J., Henley, S. J., Rodriguez, C., Calle, E. E. (2000):

Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the cancer prevention study II. J Natl Cancer Inst, 92, 1888-1896

Cho, E., Smith-Warner, S. A., Ritz, J., van den Brandt, P. A., Colditz, G. A., Folsom, A. R., Freudenheim, J. L., Giovannucci, E., Goldbohm, R. A., Graham, S., Holmberg, L., Kim, D. H., Malila, N., Miller, A. B., Pietinen, P., Rohan, T. E., Sellers, T. A., Speizer, F. E., Willett, W. C., Wolk, A., Hunter, D. J. (2004):

Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. Ann Intern Med, 140, 603-613

Collins, F. S., Brooks, L. D., Chakravarti, A. (1998):

A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. Genome Res, 8, 1229-1231

Consortium, W. T. C. C. (2007):

Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. Nature, 447, 661-678

- Coussens, L. M., Werb, Z. (2002):
Inflammation and cancer. Nature, 420, 860-867
- Crawley, E., Kay, R., Sillibourne, J., Patel, P., Hutchinson, I., Woo, P. (1999):
Polymorphic haplotypes of the interleukin-10 5' flanking region determine variable interleukin-10 transcription and are associated with particular phenotypes of juvenile rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, 42, 1101-1108
- Cruz-Bustillo Clarens, D. (2004):
Molecular genetics of colorectal cancer. Rev Esp Enferm Dig, 96, 48-59
- Cunningham, D., Atkin, W., Lenz, H. J., Lynch, H. T., Minsky, B., Nordlinger, B., Starling, N. (2010):
Colorectal cancer. Lancet, 375, 1030-1047
- Davidson, N. O. (2007):
Genetic testing in colorectal cancer: who, when, how and why. Keio J Med, 56, 14-20
- de Jong, M. M., Nolte, I. M., te Meerman, G. J., van der Graaf, W. T., de Vries, E. G., Sijmons, R. H., Hofstra, R. M., Kleibeuker, J. H. (2002):
Low-penetrance genes and their involvement in colorectal cancer susceptibility. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 11, 1332-1352
- de Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., de Vries, J. E. (1991):
Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. J Exp Med, 174, 1209-1220
- Doria-Rose, V. P., Levin, T. R., Selby, J. V., Newcomb, P. A., Richert-Boe, K. E., Weiss, N. S. (2004):
The incidence of colorectal cancer following a negative screening sigmoidoscopy: implications for screening interval. Gastroenterology, 127, 714-722
- Fearon, E. R., Vogelstein, B. (1990):
A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell, 61, 759-767
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., Parkin, D. M. (2010):
Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer, 127, 2893-2917
- Fernandez, E., Bosetti, C., La Vecchia, C., Levi, F., Fioretti, F., Negri, E. (2000):
Sex differences in colorectal cancer mortality in Europe, 1955-1996. Eur J Cancer Prev, 9, 99-104

- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., Mosmann, T. R. (1989):
Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. J Exp Med, 170, 2081-2095
- Franco, A., Sikalidis, A. K., Solis Herruzo, J. A. (2005):
Colorectal cancer: influence of diet and lifestyle factors. Rev Esp Enferm Dig, 97, 432-448
- Freudenberg, J., Cichon, S., Nöthen, M. M., Propping, P. (2002):
Blockstruktur des menschlichen Genoms: Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. Dtsch Arztebl 99, 3190-3195
- Fujita, H., Asahina, A., Mitsui, H., Tamaki, K. (2004):
Langerhans cells exhibit low responsiveness to double-stranded RNA. Biochem Biophys Res Commun, 319, 832-839
- Galiatsatos, P., Foulkes, W. D. (2006):
Familial adenomatous polyposis. Am J Gastroenterol, 101, 385-398
- Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A., Kearney, J., Willett, W. C. (1994):
A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. men. J Natl Cancer Inst, 86, 183-191
- Green, J., Watson, J., Roche, M., Beral, V., Patnick, J. (2007):
Stage, grade and morphology of tumours of the colon and rectum recorded in the Oxford Cancer Registry, 1995-2003. Br J Cancer, 96, 140-142
- Hanauer, S. B., Hommes, D. W. (2010):
Inflammatory bowel disease. Expert Rev Clin Immunol, 6, 499-500
- Hardy, R. G., Meltzer, S. J., Jankowski, J. A. (2000):
ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. BMJ, 321, 886-889
- Hemminki, K., Chen, B. (2004):
Familial risk for colorectal cancers are mainly due to heritable causes. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 13, 1253-1256
- Hemminki, K., Santi, I., Weires, M., Thomsen, H., Sundquist, J., Bermejo, J. L. (2010):
Tumor location and patient characteristics of colon and rectal adenocarcinomas in relation to survival and TNM classes. BMC Cancer, 10, 688

Houlston, R. S., Cheadle, J., Dobbins, S. E., Tenesa, A., Jones, A. M., Howarth, K., Spain, S. L., Broderick, P., Domingo, E., Farrington, S., Prendergast, J. G., Pittman, A. M., Theodoratou, E., Smith, C. G., Olver, B., Walther, A., Barnetson, R. A., Churchman, M., Jaeger, E. E., Penegar, S., Barclay, E., Martin, L., Gorman, M., Mager, R., Johnstone, E., Midgley, R., Niittymaki, I., Tuupanen, S., Colley, J., Idziaszczyk, S., Thomas, H. J., Lucassen, A. M., Evans, D. G., Maher, E. R., Maughan, T., Dimas, A., Dermitzakis, E., Cazier, J. B., Aaltonen, L. A., Pharoah, P., Kerr, D. J., Carvajal-Carmona, L. G., Campbell, H., Dunlop, M. G., Tomlinson, I. P. (2010):

Meta-analysis of three genome-wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33. Nat Genet, 42, 973-977

Houlston, R. S., Tomlinson, I. P. (2001):

Polymorphisms and colorectal tumor risk. Gastroenterology, 121, 282-301

Houlston, R. S., Webb, E., Broderick, P., Pittman, A. M., Di Bernardo, M. C., Lubbe, S., Chandler, I., Vijayakrishnan, J., Sullivan, K., Penegar, S., Carvajal-Carmona, L., Howarth, K., Jaeger, E., Spain, S. L., Walther, A., Barclay, E., Martin, L., Gorman, M., Domingo, E., Teixeira, A. S., Kerr, D., Cazier, J. B., Niittymaki, I., Tuupanen, S., Karhu, A., Aaltonen, L. A., Tomlinson, I. P., Farrington, S. M., Tenesa, A., Prendergast, J. G., Barnetson, R. A., Cetnarskyj, R., Porteous, M. E., Pharoah, P. D., Koessler, T., Hampe, J., Buch, S., Schafmayer, C., Tepel, J., Schreiber, S., Volzke, H., Chang-Claude, J., Hoffmeister, M., Brenner, H., Zanke, B. W., Montpetit, A., Hudson, T. J., Gallinger, S., Campbell, H., Dunlop, M. G. (2008):

Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. Nat Genet, 40, 1426-1435

Howell, W. M., Rose-Zerilli, M. J. (2007):

Cytokine gene polymorphisms, cancer susceptibility, and prognosis. J Nutr, 137, 194S-199S

Huang, S., Ullrich, S. E., Bar-Eli, M. (1999):

Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience. J Interferon Cytokine Res, 19, 697-703

Jaeger, E., Webb, E., Howarth, K., Carvajal-Carmona, L., Rowan, A., Broderick, P., Walther, A., Spain, S., Pittman, A., Kemp, Z., Sullivan, K., Heinimann, K., Lubbe, S., Domingo, E., Barclay, E., Martin, L., Gorman, M., Chandler, I., Vijayakrishnan, J., Wood, W., Papaemmanuil, E., Penegar, S., Qureshi, M., Farrington, S., Tenesa, A., Cazier, J. B., Kerr, D., Gray, R., Peto, J., Dunlop, M., Campbell, H., Thomas, H., Houlston, R., Tomlinson, I. (2008):

Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. Nat Genet, 40, 26-28

Jasperson, K. W., Tuohy, T. M., Neklason, D. W., Burt, R. W. (2010):

Hereditary and familial colon cancer. Gastroenterology, 138, 2044-2058

- Jiang, Q., Wei, H., Tian, Z. (2008):
Poly I:C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR3 pathway. BMC Cancer, 8, 12
- Johns, L. E., Houlston, R. S. (2001):
A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. Am J Gastroenterol, 96, 2992-3003
- Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Karapetis, C. S., Zalcborg, J. R., Tu, D., Au, H. J., Berry, S. R., Krahn, M., Price, T., Simes, R. J., Tebbutt, N. C., van Hazel, G., Wierzbicki, R., Langer, C., Moore, M. J. (2007):
Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. N Engl J Med, 357, 2040-2048
- Kaiser, W. J., Kaufman, J. L., Offermann, M. K. (2004):
IFN-alpha sensitizes human umbilical vein endothelial cells to apoptosis induced by double-stranded RNA. J Immunol, 172, 1699-1710
- Karapetis, C. S., Khambata-Ford, S., Jonker, D. J., O'Callaghan, C. J., Tu, D., Tebbutt, N. C., Simes, R. J., Chalchal, H., Shapiro, J. D., Robitaille, S., Price, T. J., Shepherd, L., Au, H. J., Langer, C., Moore, M. J., Zalcborg, J. R. (2008):
K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. N Engl J Med, 359, 1757-1765
- Kemp, Z., Thirlwell, C., Sieber, O., Silver, A., Tomlinson, I. (2004):
An update on the genetics of colorectal cancer. Hum Mol Genet, 13 Spec No 2, R177-185
- Krawczak, M., Nikolaus, S., von Eberstein, H., Croucher, P. J., El Mokhtari, N. E., Schreiber, S. (2006):
PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships. Community Genet, 9, 55-61
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K., Muller, W. (1993):
Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. Cell, 75, 263-274
- Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., Pessi, M. A., Prochilo, T., Quadri, A., Gatta, G., de Braud, F., Wils, J. (2010):
Colon cancer. Crit Rev Oncol Hematol, 74, 106-133
- Lacour, J., Lacour, F., Spira, A., Michelson, M., Petit, J. Y., Delage, G., Sarrazin, D., Contesso, G., Viguier, J. (1980):
Adjuvant treatment with polyadenylic-polyuridylic acid (Polya.Polyu) in operable breast cancer. Lancet, 2, 161-164

Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., Funke, R., Gage, D., Harris, K., Heaford, A., Howland, J., Kann, L., Lehoczky, J., LeVine, R., McEwan, P., McKernan, K., Meldrim, J., Mesirov, J. P., Miranda, C., Morris, W., Naylor, J., Raymond, C., Rosetti, M., Santos, R., Sheridan, A., Sougnez, C., Stange-Thomann, N., Stojanovic, N., Subramanian, A., Wyman, D., Rogers, J., Sulston, J., Ainscough, R., Beck, S., Bentley, D., Burton, J., Clee, C., Carter, N., Coulson, A., Deadman, R., Deloukas, P., Dunham, A., Dunham, I., Durbin, R., French, L., Grafham, D., Gregory, S., Hubbard, T., Humphray, S., Hunt, A., Jones, M., Lloyd, C., McMurray, A., Matthews, L., Mercer, S., Milne, S., Mullikin, J. C., Mungall, A., Plumb, R., Ross, M., Shownkeen, R., Sims, S., Waterston, R. H., Wilson, R. K., Hillier, L. W., McPherson, J. D., Marra, M. A., Mardis, E. R., Fulton, L. A., Chinwalla, A. T., Pepin, K. H., Gish, W. R., Chissole, S. L., Wendl, M. C., Delehaunty, K. D., Miner, T. L., Delehaunty, A., Kramer, J. B., Cook, L. L., Fulton, R. S., Johnson, D. L., Minx, P. J., Clifton, S. W., Hawkins, T., Branscomb, E., Predki, P., Richardson, P., Wenning, S., Slezak, T., Doggett, N., Cheng, J. F., Olsen, A., Lucas, S., Elkin, C., Uberbacher, E., Frazier, M., Gibbs, R. A., Muzny, D. M., Scherer, S. E., Bouck, J. B., Sodergren, E. J., Worley, K. C., Rives, C. M., Gorrell, J. H., Metzker, M. L., Naylor, S. L., Kucherlapati, R. S., Nelson, D. L., Weinstock, G. M., Sakaki, Y., Fujiyama, A., Hattori, M., Yada, T., Toyoda, A., Itoh, T., Kawagoe, C., Watanabe, H., Totoki, Y., Taylor, T., Weissenbach, J., Heilig, R., Saurin, W., Artiguenave, F., Brottier, P., Bruls, T., Pelletier, E., Robert, C., Wincker, P., Smith, D. R., Doucette-Stamm, L., Rubenfield, M., Weinstock, K., Lee, H. M., Dubois, J., Rosenthal, A., Platzer, M., Nyakatura, G., Taudien, S., Rump, A., Yang, H., Yu, J., Wang, J., Huang, G., Gu, J., Hood, L., Rowen, L., Madan, A., Qin, S., Davis, R. W., Federspiel, N. A., Abola, A. P., Proctor, M. J., Myers, R. M., Schmutz, J., Dickson, M., Grimwood, J., Cox, D. R., Olson, M. V., Kaul, R., Shimizu, N., Kawasaki, K., Minoshima, S., Evans, G. A., Athanasiou, M., Schultz, R., Roe, B. A., Chen, F., Pan, H., Ramser, J., Lehrach, H., Reinhardt, R., McCombie, W. R., de la Bastide, M., Dedhia, N., Blocker, H., Hornischer, K., Nordsiek, G., Agarwala, R., Aravind, L., Bailey, J. A., Bateman, A., Batzoglu, S., Birney, E., Bork, P., Brown, D. G., Burge, C. B., Cerutti, L., Chen, H. C., Church, D., Clamp, M., Copley, R. R., Doerks, T., Eddy, S. R., Eichler, E. E., Furey, T. S., Galagan, J., Gilbert, J. G., Harmon, C., Hayashizaki, Y., Haussler, D., Hermjakob, H., Hokamp, K., Jang, W., Johnson, L. S., Jones, T. A., Kasif, S., Kasprzyk, A., Kennedy, S., Kent, W. J., Kitts, P., Koonin, E. V., Korf, I., Kulp, D., Lancet, D., Lowe, T. M., McLysaght, A., Mikkelsen, T., Moran, J. V., Mulder, N., Pollara, V. J., Ponting, C. P., Schuler, G., Schultz, J., Slater, G., Smit, A. F., Stupka, E., Szustakowski, J., Thierry-Mieg, D., Thierry-Mieg, J., Wagner, L., Wallis, J., Wheeler, R., Williams, A., Wolf, Y. I., Wolfe, K. H., Yang, S. P., Yeh, R. F., Collins, F., Guyer, M. S., Peterson, J., Felsenfeld, A., Wetterstrand, K. A., Patrinos, A., Morgan, M. J., de Jong, P., Catanese, J. J., Osoegawa, K., Shizuya, H., Choi, S., Chen, Y. J. (2001):

Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 409, 860-921

Laplanche, A., Alzieu, L., Delozier, T., Berlie, J., Veyret, C., Fargeot, P., Luboinski, M., Lacour, J. (2000):

Polyadenylic-polyuridylic acid plus locoregional radiotherapy versus chemotherapy with CMF in operable breast cancer: a 14 year follow-up analysis of a randomized trial of the Federation Nationale des Centres de Lutte contre le Cancer (FNCLCC). Breast Cancer Res Treat, 64, 189-191

Lascorz, J., Forsti, A., Chen, B., Buch, S., Steinke, V., Rahner, N., Holinski-Feder, E., Morak, M., Schackert, H. K., Gorgens, H., Schulmann, K., Goecke, T., Kloor, M., Engel, C., Buttner, R., Kunkel, N., Weires, M., Hoffmeister, M., Pardini, B., Naccarati, A., Vodickova, L., Novotny, J., Schreiber, S., Krawczak, M., Broring, C. D., Volzke, H., Schafmayer, C., Vodicka, P., Chang-Claude, J., Brenner, H., Burwinkel, B., Propping, P., Hampe, J., Hemminki, K. (2010):

Genome-wide association study for colorectal cancer identifies risk polymorphisms in German familial cases and implicates MAPK signalling pathways in disease susceptibility. Carcinogenesis, 31, 1612-1619

Lavery, I. C., De Campos-Lobato, L. F. (2010):

How to evaluate risk and identify stage II patients requiring referral to a medical oncologist: a surgeon's perspective. Oncology (Williston Park), 24, 14-16

Lemmens, V. E., Janssen-Heijnen, M. L., Verheij, C. D., Houterman, S., Repelaer van Driel, O. J., Coebergh, J. W. (2005):

Co-morbidity leads to altered treatment and worse survival of elderly patients with colorectal cancer. Br J Surg, 92, 615-623

Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A., Hemminki, K. (2000):

Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. N Engl J Med, 343, 78-85

Lim, D. M., Narasimhan, S., Michaylira, C. Z., Wang, M. L. (2009):

TLR3-mediated NF- κ B signaling in human esophageal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 297, G1172-1180

Michor, F., Iwasa, Y., Lengauer, C., Nowak, M. A. (2005):

Dynamics of colorectal cancer. Semin Cancer Biol, 15, 484-493

Michor, F., Iwasa, Y., Rajagopalan, H., Lengauer, C., Nowak, M. A. (2004):

Linear model of colon cancer initiation. Cell Cycle, 3, 358-362

Mockelmann, N., von Schonfels, W., Buch, S., von Kampen, O., Sipos, B., Egberts, J. H., Rosenstiel, P., Franke, A., Brosch, M., Hinz, S., Roder, C., Kalthoff, H., Folsch, U. R., Krawczak, M., Schreiber, S., Broring, C. D., Tepel, J., Schafmayer, C., Hampe, J. (2009):

Investigation of innate immunity genes CARD4, CARD8 and CARD15 as germline susceptibility factors for colorectal cancer. BMC Gastroenterol, 9, 79

Nauta, R., Stablein, D. M., Holyoke, E. D. (1989):

Survival of patients with stage B2 colon carcinoma. The Gastrointestinal Tumor Study Group experience. Arch Surg, 124, 180-182

- O'Connell, J. B., Maggard, M. A., Ko, C. Y. (2004):
Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst, 96, 1420-1425
- Oshiumi, H., Matsumoto, M., Funami, K., Akazawa, T., Seya, T. (2003):
TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3-mediated interferon-beta induction. Nat Immunol, 4, 161-167
- Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., Pisani, P. (2005):
Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin, 55, 74-108
- Popat, S., Hubner, R., Houlston, R. S. (2005):
Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. J Clin Oncol, 23, 609-618
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1992):
APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. Nature, 359, 235-237
- Rakoff-Nahoum, S., Medzhitov, R. (2007):
Regulation of spontaneous intestinal tumorigenesis through the adaptor protein MyD88. Science, 317, 124-127
- Reid-Lombardo, K. M., Petersen, G. M. (2010):
Understanding genetic epidemiologic association studies Part 1: fundamentals. Surgery, 147, 469-474
- Rhee, S. H., Im, E., Pothoulakis, C. (2008):
Toll-like receptor 5 engagement modulates tumor development and growth in a mouse xenograft model of human colon cancer. Gastroenterology, 135, 518-528
- Robert-Koch-Institut. (2006):
Krebs in Deutschland. Häufigkeiten und Trends. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Saarbrücken
- Rodriguez-Bigas, M. A., Boland, C. R., Hamilton, S. R., Henson, D. E., Jass, J. R., Khan, P. M., Lynch, H., Perucho, M., Smyrk, T., Sobin, L., Srivastava, S. (1997):
A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. J Natl Cancer Inst, 89, 1758-1762

Rutten, H., den Dulk, M., Lemmens, V., Nieuwenhuijzen, G., Krijnen, P., Jansen-Landheer, M., van de Poll Franse, L., Coebergh, J. W., Martijn, H., Marijnen, C., van de Velde, C. (2007):

Survival of elderly rectal cancer patients not improved: analysis of population based data on the impact of TME surgery. Eur J Cancer, 43, 2295-2300

Salaun, B., Coste, I., Rissoan, M. C., Lebecque, S. J., Renno, T. (2006):

TLR3 can directly trigger apoptosis in human cancer cells. J Immunol, 176, 4894-4901

Salem, M. L., Kadima, A. N., Cole, D. J., Gillanders, W. E. (2005):

Defining the antigen-specific T-cell response to vaccination and poly(I:C)/TLR3 signaling: evidence of enhanced primary and memory CD8 T-cell responses and antitumor immunity. J Immunother, 28, 220-228

Schmiegel, W., Pox, C., Reinacher-Schick, A., Adler, G., Arnold, D., Fleig, W., Folsch, U. R., Fruhmorgen, P., Graeven, U., Heinemann, V., Hohenberger, W., Holstege, A., Junginger, T., Kopp, I., Kuhlbacher, T., Porschen, R., Propping, P., Riemann, J. F., Rodel, C., Sauer, R., Sauerbruch, T., Schmitt, W., Schmoll, H. J., Seufferlein, T., Zeitz, M., Selbmann, H. K. (2010):

S3 guidelines for colorectal carcinoma: results of an evidence-based consensus conference on February 6/7, 2004 and June 8/9, 2007 (for the topics IV, VI and VII). Z Gastroenterol, 48, 65-136

Schmitt, M., Bravo, I. G., Snijders, P. J., Gissmann, L., Pawlita, M., Waterboer, T. (2006):

Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. J Clin Microbiol, 44, 504-512

Schroder, M., Bowie, A. G. (2005):

TLR3 in antiviral immunity: key player or bystander? Trends Immunol, 26, 462-468

Shacter, E., Weitzman, S. A. (2002):

Chronic inflammation and cancer. Oncology (Williston Park), 16, 217-226, 229; discussion 230-212

Sobin, L. H., Wittekind, C. (2002):

UICC: TNM classification of malignant tumors.

Sobrero, A. (2006):

Should adjuvant chemotherapy become standard treatment for patients with stage II colon cancer? For the proposal. Lancet Oncol, 7, 515-516

Su, L. K., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1993):

Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. Science, 262, 1734-1737

Suarez, A., Castro, P., Alonso, R., Mozo, L., Gutierrez, C. (2003):

Interindividual variations in constitutive interleukin-10 messenger RNA and protein levels and their association with genetic polymorphisms. Transplantation, 75, 711-717

Sun, J., Duffy, K. E., Ranjith-Kumar, C. T., Xiong, J., Lamb, R. J., Santos, J., Masarapu, H., Cunningham, M., Holzenburg, A., Sarisky, R. T., Mbow, M. L., Kao, C. (2006):

Structural and functional analyses of the human Toll-like receptor 3. Role of glycosylation. J Biol Chem, 281, 11144-11151

Taura, M., Fukuda, R., Suico, M. A., Eguma, A., Koga, T., Shuto, T., Sato, T., Morino-Koga, S., Kai, H. (2010):

TLR3 induction by anticancer drugs potentiates poly I:C-induced tumor cell apoptosis. Cancer Sci, 101, 1610-1617

Tenesa, A., Farrington, S. M., Prendergast, J. G., Porteous, M. E., Walker, M., Haq, N., Barnetson, R. A., Theodoratou, E., Cetnarskyj, R., Cartwright, N., Semple, C., Clark, A. J., Reid, F. J., Smith, L. A., Kavoussanakis, K., Koessler, T., Pharoah, P. D., Buch, S., Schafmayer, C., Tepel, J., Schreiber, S., Volzke, H., Schmidt, C. O., Hampe, J., Chang-Claude, J., Hoffmeister, M., Brenner, H., Wilkening, S., Canzian, F., Capella, G., Moreno, V., Deary, I. J., Starr, J. M., Tomlinson, I. P., Kemp, Z., Howarth, K., Carvajal-Carmona, L., Webb, E., Broderick, P., Vijayakrishnan, J., Houlston, R. S., Rennert, G., Ballinger, D., Rozek, L., Gruber, S. B., Matsuda, K., Kidokoro, T., Nakamura, Y., Zanke, B. W., Greenwood, C. M., Rangrej, J., Kustra, R., Montpetit, A., Hudson, T. J., Gallinger, S., Campbell, H., Dunlop, M. G. (2008):

Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. Nat Genet, 40, 631-637

Terry, P., Giovannucci, E., Michels, K. B., Bergkvist, L., Hansen, H., Holmberg, L., Wolk, A. (2001):

Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. J Natl Cancer Inst, 93, 525-533

Terzic, J., Grivennikov, S., Karin, E., Karin, M. (2010):

Inflammation and colon cancer. Gastroenterology, 138, 2101-2114 e2105

Tomlinson, I., Webb, E., Carvajal-Carmona, L., Broderick, P., Kemp, Z., Spain, S., Penegar, S., Chandler, I., Gorman, M., Wood, W., Barclay, E., Lubbe, S., Martin, L., Sellick, G., Jaeger, E., Hubner, R., Wild, R., Rowan, A., Fielding, S., Howarth, K., Silver, A., Atkin, W., Muir, K., Logan, R., Kerr, D., Johnstone, E., Sieber, O., Gray, R., Thomas, H., Peto, J., Cazier, J. B., Houlston, R. (2007):

A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. Nat Genet, 39, 984-988

Tomlinson, I. P., Dunlop, M., Campbell, H., Zanke, B., Gallinger, S., Hudson, T., Koessler, T., Pharoah, P. D., Niittymaki, I., Tuupanen, S., Aaltonen, L. A., Hemminki, K., Lindblom, A., Forsti, A., Sieber, O., Lipton, L., van Wezel, T., Morreau, H., Wijnen, J. T., Devilee, P., Matsuda, K., Nakamura, Y., Castellvi-Bel, S., Ruiz-Ponte, C., Castells, A., Carracedo, A., Ho, J. W., Sham, P., Hofstra, R. M., Vodicka, P., Brenner, H., Hampe, J., Schafmayer, C., Tepel, J., Schreiber, S., Volzke, H., Lerch, M. M., Schmidt, C. A., Buch, S., Moreno, V., Villanueva, C. M., Peterlongo, P., Radice, P., Echeverry, M. M., Velez, A., Carvajal-Carmona, L., Scott, R., Penegar, S., Broderick, P., Tenesa, A., Houlston, R. S. (2010):

COGENT (COlorectal cancer GENEtics): an international consortium to study the role of polymorphic variation on the risk of colorectal cancer. Br J Cancer, 102, 447-454

Tomlinson, I. P., Webb, E., Carvajal-Carmona, L., Broderick, P., Howarth, K., Pittman, A. M., Spain, S., Lubbe, S., Walther, A., Sullivan, K., Jaeger, E., Fielding, S., Rowan, A., Vijaykrishnan, J., Domingo, E., Chandler, I., Kemp, Z., Qureshi, M., Farrington, S. M., Tenesa, A., Prendergast, J. G., Barnetson, R. A., Penegar, S., Barclay, E., Wood, W., Martin, L., Gorman, M., Thomas, H., Peto, J., Bishop, D. T., Gray, R., Maher, E. R., Lucassen, A., Kerr, D., Evans, D. G., Schafmayer, C., Buch, S., Volzke, H., Hampe, J., Schreiber, S., John, U., Koessler, T., Pharoah, P., van Wezel, T., Morreau, H., Wijnen, J. T., Hopper, J. L., Southey, M. C., Giles, G. G., Severi, G., Castellvi-Bel, S., Ruiz-Ponte, C., Carracedo, A., Castells, A., Forsti, A., Hemminki, K., Vodicka, P., Naccarati, A., Lipton, L., Ho, J. W., Cheng, K. K., Sham, P. C., Luk, J., Agundez, J. A., Ladero, J. M., de la Hoya, M., Caldes, T., Niittymaki, I., Tuupanen, S., Karhu, A., Aaltonen, L., Cazier, J. B., Campbell, H., Dunlop, M. G., Houlston, R. S. (2008):

A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. Nat Genet, 40, 623-630

Varesco, L. (2004):

Familial adenomatous polyposis: genetics and epidemiology. Tech Coloproctol, 8 Suppl 2, s305-308

Vasen, H. F., Watson, P., Mecklin, J. P., Lynch, H. T. (1999):

New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. Gastroenterology, 116, 1453-1456

Weitz, J., Koch, M., Debus, J., Hohler, T., Galle, P. R., Buchler, M. W. (2005):

Colorectal cancer. Lancet, 365, 153-165

Westbrook, A. M., Szakmary, A., Schiestl, R. H. (2010):

Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: lessons learned from mouse models. Mutat Res, 705, 40-59

Wilkening, S., Tavelin, B., Canzian, F., Enquist, K., Palmqvist, R., Altieri, A., Hallmans, G., Hemminki, K., Lenner, P., Forsti, A. (2008):

Interleukin promoter polymorphisms and prognosis in colorectal cancer. Carcinogenesis, 29, 1202-1206

Yamamoto-Furusho, J. K., Podolsky, D. K. (2007):
Innate immunity in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol, 13,
5577-5580

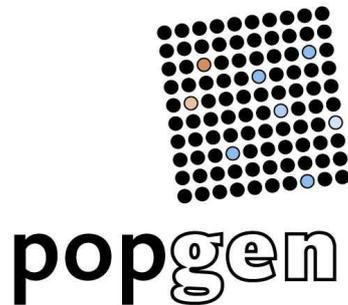
Zanke, B. W., Greenwood, C. M., Rangrej, J., Kustra, R., Tenesa, A., Farrington, S. M., Prendergast, J., Olschwang, S., Chiang, T., Crowdy, E., Ferretti, V., Laflamme, P., Sundararajan, S., Roumy, S., Olivier, J. F., Robidoux, F., Sladek, R., Montpetit, A., Campbell, P., Bezieau, S., O'Shea, A. M., Zogopoulos, G., Cotterchio, M., Newcomb, P., McLaughlin, J., Younghusband, B., Green, R., Green, J., Porteous, M. E., Campbell, H., Blanche, H., Sahbatou, M., Tubacher, E., Bonaiti-Pellie, C., Buecher, B., Riboli, E., Kury, S., Chanock, S. J., Potter, J., Thomas, G., Gallinger, S., Hudson, T. J., Dunlop, M. G. (2007):
Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. Nat Genet, 39, 989-994

7 Anhang

7.1 Patientenfragebogen

**Fragebogen zur
Studie
„Gesundheit für Generationen“**

**Genetische Ursachen des Dickdarmkrebses
Folgebefragung Nr.1**



«code»

Wir freuen uns darüber, dass Sie weiter unsere Studie unterstützen. Die Antworten zu folgenden Fragen werden von uns ohne Bezug zu Ihren persönlichen Daten ausgewertet. Alle Daten werden verschlüsselt gespeichert.

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"/> <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"/> <input type="text"/>
		Tag Monat Jahr
4)	Körpergröße (cm)	<input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>
5)	Gewicht (kg)	Aktuell: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> vor Eintritt der Darmkrebserkrankung (ca. 1 Jahr vorher): <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> im Alter von 30 Jahren: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/>

Sie waren an Dickdarmkrebs erkrankt und haben sich mit einer Blutspende an unserer Studie zu den Ursachen dieser Krebserkrankung beteiligt. Um unsere Forschungsergebnisse weiter vertiefen zu können, bitten wir um Antworten auf folgende Fragen zu dem Verlauf Ihrer Krankheit und zu Ihren Lebensumständen:

6)	Ist bei Ihnen eine Gallenblasenentfernung durchgeführt worden, bevor der Dickdarmkrebs bekannt wurde? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein nachdem der Dickdarmkrebs bekannt wurde? <input type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein Jahr: <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> oder damaliges Alter: <input type="text"/> <input type="text"/> Name und Ort des Krankenhauses, in dem der Eingriff vorgenommen wurde:
----	--

Name und Ort des Krankenhauses, in dem die Therapie vorgenommen wurde:

.....
.....
.....
.....

8) Sind bei Ihnen Nebenwirkungen während der Chemotherapie aufgetreten?

- ja
- nein

Wenn „ja“, welche?:

.....
.....
.....
.....

9) Wurden bei Ihnen **vor Therapiebeginn** (Chemotherapie/Operation) Metastasen (Tochtergeschwülste des Tumors) festgestellt?

- ja
- nein

Falls ja, wann traten diese auf? ..

Falls ja, wo sind Metastasen festgestellt worden?

- dort, wo der Darmkrebs war
- Leber
- Lunge
- Knochen

10) Traten **nach der Therapie** Metastasen auf?

- ja
- nein

Falls ja, wann traten diese auf?

..

Falls ja, wo sind Metastasen festgestellt worden?

- dort, wo der Darmkrebs war
- Leber
- Lunge
- Knochen

11) Sind Metastasen behandelt worden?

- mit Operation
- mit Chemotherapie
- mit Strahlentherapie
- keine Behandlung
- es sind keine Metastasen aufgetreten

12) Hatten Sie einen Narbenbruch nach der Operation?

- ja
- nein

Ist dieser operativ versorgt worden?

- ja
- nein

Falls ja, wann? ..

13) Gab es weitere Eingriffe aufgrund des Darmkrebses?

- ja
- nein

Wenn „ja“, wie oft?

Was waren es für Eingriffe und wann waren diese:
Tag.Monat.Jahr

..

.....
..

.....
..

.....
..

.....

14) Ist bei Ihnen nach dem «date_of_sampling» eine andere Krebserkrankung festgestellt worden?

- ja
- nein

Wenn ja, um welche handelt es sich:

- | | |
|--|--|
| <input type="checkbox"/> Brustkrebs | <input type="checkbox"/> Magenkrebs |
| <input type="checkbox"/> Lungenkrebs | <input type="checkbox"/> Hautkrebs |
| <input type="checkbox"/> Prostatakrebs | <input type="checkbox"/> Blutkrebs |
| <input type="checkbox"/> Leberkrebs | <input type="checkbox"/> sonstige, welche: _____ |

15) Sind Sie in regelmäßiger Nachsorge zum Beispiel beim Haus- oder Facharzt?

- ja
- nein

Falls ja, wann das letzte Mal? Jahr: oder damaliges Alter:

Wo findet die Nachsorge statt:

Hausarzt: Name/Adresse:

.....
.....

.....
.....

.....
.....

Facharzt: Name / Adresse:

.....
.....

.....
.....

.....
.....

16) Wo und wie leben Sie?

- In einem Wohnheim
- Bei Ihren Kindern
- In einer eigenen Wohnung

Leben Sie dort:

- Alleine
- mit einem/einer Ehe-Lebenspartner/in
- mit anderen Personen

17) Was trifft auf Sie zu?

- Ich habe nie geraucht.
- Ich habe weniger als 3 Monate geraucht.
- Ich rauche gegenwärtig nicht, habe aber früher geraucht.

Wann haben Sie das Rauchen aufgegeben?

Jahr: oder damaliges Alter:

- Ich rauche gegenwärtig.

Was rauchen Sie regelmäßig?

- Zigaretten
- Zigarren/Zigarillos
- Pfeife

Wieviel rauchen Sie pro Tag?

Seit wann rauchen Sie regelmäßig?

Jahr: oder damaliges Alter:

Herzlichen Dank für Ihre Mitwirkung!

Bitte beachten Sie auch die folgende Seite

Wir haben noch eine abschließende Frage an Sie:

Wir können Ihnen leider keine persönlichen Untersuchungsergebnisse mitteilen.

*Aufgrund vieler Rückfragen von Studienteilnehmern führen wir jedoch eine separate Adressendatei für die Zusendung **allgemeiner** Informationen zum Fortgang des Projektes.*

Möchten Sie weiterhin über die allgemeinen Ergebnisse und Entwicklungen der Studie informiert werden? Wenn ja, werden wir Ihren Namen und Ihre Adresse aufbewahren, um Sie über die neuesten Fortschritte zu informieren. Diese Daten werden selbstverständlich getrennt von Ihren persönlichen Untersuchungsdaten gespeichert.

- ja, ich möchte weiter informiert werden. Folgende Daten werden gespeichert:

«first_name» «last_name»
«street»
«postal_code» «city»

Meine Adresse hat sich geändert:

.....
.....

.....
.....

.....
.....

Wünschen Sie die Zusendung per E-Mail, geben Sie bitte Ihre E-Mail-Adresse an:

.....
.....

- nein, ich möchte nicht weiter informiert werden

Datenschutzhinweis: Nach Aufnahme der Daten in die Datenbank wird dieses Blatt vernichtet.

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

Nochmals vielen Dank! Und Alles Gute für Sie!


*Ihr **popgen** Forschungsteam*

7.2 Ethikvotum

MEDIZINISCHE FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHT'S-UNIVERSITÄT ZU KIEL



ETHIK-KOMMISSION

Universitäts-Kinderklinik · Schwanenweg 20 · 24105 Kiel

Schwanenweg 20
D-24105 Kiel

Telefon 0431 / 597-1809
Telefax 0431 / 597-1831

Datum: 30.07.2009

Herrn
PD Dr. C. Schafmeyer
Klinik für Allgemeine Chirurgie und
Thoraxchirurgie
Haus 18
Arnold-Heller-Straße 3
24105 Kiel

24105 Kiel

AZ: A 156/03
Studienplan: **Erweiterungsantrag**
POPGEN - populationsrepräsentative Stichprobe für die
populationsgenetische Exploration im NGFN
Neu: Genetische Ursachen des Dickdarmkrebses
Jetzt: Fragebogen-Aktion
Anschreiben, Patienteninformation, diverse Fragebögen
Projektleiter: **Prof. Dr. S. Schreiber, PD Dr. J. Hampe Klinik für**
Allgemeine Innere Medizin, Universitätsklinikum Schleswig-
Holstein, Campus Kiel
Antragsteller: **PD Dr. C. Schafmeyer**
Datum des
Antrages: **22.07.2009 (Eingang 30.07.2009)**

Sehr geehrter Herr Kollege Schafmeyer,
nach Durchsicht der Unterlagen durch mich als Vorsitzenden der Ethik-Kommission
nehmen wir den zu dem oben genannten Forschungsvorhaben nachgereichten Antrag
zur Kenntnis. Es bestehen weder berufsethische noch berufsrechtliche Bedenken.

Mit freundlichen kollegialen Grüßen

J. Schaub
Prof. Dr. med. Jürgen Schaub
Vorsitzender der Ethik-Kommission
der Medizinischen Fakultät der CAU zu Kiel

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Thomas Becker danke ich für die Möglichkeit der Durchführung der Doktorarbeit an der Klinik für Allgemeine Chirurgie und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Schleswig-Holstein, Campus Kiel an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Clemens Schafmayer für die Überlassung des Dissertationsthemas. Vielen Dank für all die kurzfristigen Treffen, die schnellen Problemlösungen und überaus motivierende Art. Einen besseren Doktorvater kann man sich nicht wünschen.

Dem Leiter der Forschungsgruppe Herrn Prof. Dr. med. Jochen Hampe danke ich für die freundliche Aufnahme in sein familiäres, nettes Team und hervorragende Leitung des Projektes.

Bei den Mitarbeitern des PopGen-Teams möchte ich mich besonders für die nette Zusammenarbeit und die immerwährende Hilfsbereitschaft bedanken, die sehr zur Freude an der Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Witigo von Schönfels für die große Unterstützung, insbesondere für die Hilfe beim Verfassen der Arbeit und bei jeglichen organisatorischen Problemen.

Ich danke Herrn Stefan Buch für die geduldige Beantwortung meiner Fragen bezüglich genetischer und statistischer Verfahren sowie die schnelle und immer sehr freundliche Antwort auf die vielen E-Mails.

Allen Patienten danke ich für die Teilnahme an dieser Studie.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung bei der Erstellung der Doktorarbeit bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Maya Bauer
Anschrift Gerhardstraße 64
24105 Kiel
Geburtsdatum,-ort 16.06.1987, Hamburg

Schulbildung

1993-1997 Grundschule, Gorch-Fock-Schule Schenefeld
1997–2006 Gymnasium Schenefeld, Abitur (Note:1,6)

Studium

10/2006 Beginn des Medizinstudiums in Kiel
08/2008 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note:1,5)
10/2008-07/2011 Klinischer Studienabschnitt
06/2009 Beginn der vorliegenden Dissertation
08/2011-07/2012 Praktisches Jahr in Flensburg (Innere Medizin),
Santiago/Chile (Chirurgie) und Kiel (Augenheilkunde)
07.11.2012 Approbation

Publikation

Castro, F. A., Forsti, A., Buch, S., Kalthoff, H., Krauss, C., **Bauer, M.**, Egberts, J., Schniewind, B., Broering, D. C., Schreiber, S., Schmitt, M., Hampe, J., Hemminki, K.Schafmayer, C. (2011): TLR-3 polymorphism is an independent prognostic marker for stage II colorectal cancer. Eur J Cancer, 47, 1203-1210