Aus der Pneumologischen Klinik
der Asklepios-Fachkliniken München-Gauting
Chefarzt: Prof. Dr. med. Karl Häußinger

Molekulargenetische Assoziationsstudie zur Identifizierung erblicher Risiken des Lungenkarzinoms

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Melanie Barbara Böttger
aus München

2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Karl Häußinger
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. T. M. Strom Priv. Doz. Dr. H.-J. Stemmler
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Peter Meyer
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	17.01.2008

INHALTSVERZEICHNIS

1	**EINLEITUNG**	**5**
1.1	Erbliche Aspekte des Lungenkarzinoms	5
1.1.1	Die Krebsentstehung nach der Knudson-Hypothese	5
1.1.2	Familiäres Lungenkarzinom	6
1.1.3	Sporadisches Lungenkarzinom	7
1.2	Molekulargenetische Assoziationsstudie	11
1.2.1	Allgemeines	11
1.2.2	SNPs	12
1.3	Fragestellung der Dissertation	12
2	**STUDIENDESIGN**	**13**
2.1	Teilnehmer	13
2.2	Material	16
2.3	Methodik	16
2.3.1	Auswahl der genomischen Polymorphismen	16
2.3.2	Präparation der DNA-Pools	16
2.3.3	Individuelle Genotypisierung	17
2.3.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.3.5	MassEXTEND-Reaktion	17
2.3.6	MALDI-TOF-Massenspektrometrie	18
2.3.7	Bestimmung der Allel- und Genotyphäufigkeiten	20
2.4	Statistik	21
2.4.1	Assoziationen	21
2.4.2	Auswertung der Fragebögen	22

3 ERGEBNISSE **24**

3.1 Assoziationsstudie 24

3.1.1 Der *rs1862214*-Polymorphismus 24

3.1.2 Kopplungsungleichgewicht in der *PDCD5*-Genregion 27

3.1.3 Einfluss des *rs1862214*-Polymorphismus auf die Prognose des Lungenkarzinoms 29

3.2 Komorbidität beim Lungenkarzinom 30

4 DISKUSSION **32**

4.1 Molekulargenetische Assoziationsstudie 32

4.1.1 Methodik und Teilnehmer 32

4.1.2 Validität der Assoziationen 34

4.1.3 Das *PDCD5*-Gen 35

4.1.4 Prognostischer Einfluss des *rs1862214*-Polymorphismus 36

4.2 Wertigkeit der Fragebogen-Auswertung 37

4.3 Bedeutung und Aussichten 38

5 ZUSAMMENFASSUNG **40**

6 ANHANG **41**

6.1 Literaturverzeichnis 41

6.2 Abkürzungsverzeichnis 45

6.3 Tabellenverzeichnis 46

6.4 Abbildungsverzeichnis 47

6.5 Danksagung 48

6.6 Lebenslauf 49

1 Einleitung

1.1 Erbliche Aspekte des Lungenkarzinoms

Das Lungenkarzinom ist die weltweit häufigste zum Tode führende Tumorerkrankung [57]. Fortschritte der letzten Jahre in der Erkennung und Behandlung dieser Erkrankung haben nur zu einer unwesentlichen Verbesserung der Mortalitätsrate geführt, die Gesamt-5-Jahres-Überlebensrate liegt nach wie vor bei 15 % [2]. In Europa werden jährlich mehr als 150.000 neue Fälle von Lungenkrebs diagnostiziert [20], wobei in vielen Ländern Lungenkrebs die häufigste Tumorerkrankung unter Männern darstellt [7, 57]. Dabei ist das Zigarettenrauchen der Hauptrisikofaktor für das Lungenkarzinom, es lassen sich mehr als 80 % aller Lungenkarzinome auf Rauchen zurückführen [39]. Zudem gibt es starke Hinweise darauf, dass auch Passivrauchen Lungenkrebs verursachen kann [5]. Desweiteren ist die Exposition gegenüber verschiedenen Arten von Strahlen sowie gegenüber Substanzen wie Asbest, Arsen, polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen, Chrom, Nickel, Chlormethylether und Senfgas als Risikofaktor anerkannt [7]. Nachweislich besteht in der Mehrzahl der Fälle ein Zusammenhang zwischen der Entstehung des Lungenkarzinoms und Zigarettenrauchen bzw. anderen Umweltfaktoren. Das Lungenkarzinom galt daher lange Zeit als eine maligne Erkrankung, deren Entstehung ausschließlich durch die Einwirkung von Umweltfaktoren erklärbar war [2]. Heute wird allerdings von einer Beteiligung erblicher Faktoren bei der Entstehung der allermeisten Lungentumoren ausgegangen. Üblicherweise unterscheidet man hierbei zwischen familiären und sporadischen Formen, da beiden unterschiedliche Entstehungsmechanismen zugrunde liegen [18].

1.1.1 Die Krebsentstehung nach der Knudson-Hypothese

Bei der Krebsentstehung spielen neben somatischen Mutationen auch Keimbahnmutationen eine Rolle, die eine Prädisposition für die Erkrankung verursachen können und die von einer Generation an die nächste weitervererbt werden [25]. Für diese erblichen Ursachen maligner Entartungen werden u. a. zwei Mechanismen diskutiert:

- Wachstumsstimulation durch mutative Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen
- Funktionsstörungen des Wachstumskontrollprozesses durch mutative Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens [6, 25].

Alfred Knudson konnte bei der Untersuchung der erblich bedingten Variante des Retinoblastoms dessen zugrunde liegendes Gen als erstes Tumorsuppressorgen identifizieren. Seine „Zwei-

Treffer-Hypothese“ besagt, dass als „erster Treffer“ eine Mutation in der Keimbahn oder in einer Vorläuferzelle der späteren Tumorzellen erfolgt, und so zunächst eine Prädisposition vorliegt. Der „zweite Treffer“ findet in der somatischen Zelle statt, die in Folge dessen maligne entartet und zur Tumorentstehung führt [24]. Auf diese Weise erklärte man sich zum Beispiel die hohe Inzidenz von Hautkrebserkrankungen bei Patienten mit der Erbkrankheit Xeroderma pigmentosa. Hier liegt ein genetisch bedingter Defekt im DNA-Reparaturmechanismus vor, so dass nach UV_B-induzierter DNA-Schädigung in Hautzellen diese nicht mehr repariert werden kann und zur Karzinogenese führt [25].

Bei der Entstehung des Lungenkarzinoms wäre es demnach ebenfalls denkbar, dass als „erster Treffer“ eine vererbte Keimbahnmutation in einem Allel eines Tumorsuppressorgens oder eines Protoonkogens vorliegt und als „zweiter Treffer“ eine somatische Mutation des zweiten Allels, z.B. aufgrund von Noxen im Zigarettenrauch, in einer Zelle der Lunge zur Tumorentstehung führt.

1.1.2 Familiäres Lungenkarzinom

Von einer familiären Tumorerkrankung spricht man, relativ weiche Kriterien vorausgesetzt, wenn mindestens zwei erstgradig Verwandte an dem gleichen Tumor bzw. an assoziierten Tumoren erkranken [31]. Beim Lungenkarzinom trifft dies für 6 bis 10 % der Patienten zu [19]. Zudem ergaben sich in einer Vielzahl von Studien zur familiären Häufung des Lungenkarzinoms unter Berücksichtigung von Rauchgewohnheiten, Familiengröße und Altersstruktur Hinweise auf eine genetische Prädisposition für das Lungenkarzinom [36].

Eine Segregationsanalyse, die von Sellers et al. an 337 Familien durchgeführt wurde, gelangte zu dem Ergebnis – und diese Hypothese konnte später von Yang et al. bekräftigt werden –, dass das Muster, nach dem das Lungenkarzinom in den betroffenen Familien auftritt, vereinbar ist mit einem monogenen Erbgang [38, 49], d. h. in einem ganz bestimmten Gen führen eine oder mehrere in Frage kommende Mutationen zu krankheitsrelevanten Veränderungen, ähnlich wie dies bei familiären Formen anderer Tumoren der Fall ist. Als Beispiele hierfür seien das Mammakarzinom und das hereditäre nicht-polypöse Kolonkarzinom (HNPCC) genannt, für deren familiäre bzw. erbliche Formen die Gene *BRCA1* und *2* bzw. *MSH2* und *MLH1* eine entscheidende Rolle spielen [23].

Um die entsprechenden mit dem Lungenkarzinom in Zusammenhang stehenden Gene zu identifizieren bzw. näher einzugrenzen, führten Bailey-Wilson et al. erstmals bei 52 Familien, in denen

eine Häufung des Lungenkarzinoms beobachtbar war, eine genomweite Kopplungsanlyse durch [2]. Es konnte dabei eine chromosomale Region mit Assoziation zum Lungenkarzinomrisiko identifiziert werden. Der verdächtige Bereich liegt auf Chromosom 6q23-25 und umfasst 11.99 Megabasen (Mb). In einer Vielzahl anderer Tumorarten waren in dieser Genregion Deletionen nachgewiesen worden, was auf das Vorhandensein eines Tumorsupressorgens hinweist [2]. Die besagte Genregion enthält 74 bekannte und 41 unbekannte Gene, darunter die vermeintlichen Tumorsupressorgene *SASH1*, *LATS1*, *IGF2R* und *PARK2*, sowie Gene, die an der Zellproliferation und der DNA-Reparatur beteiligt sind. Welches dieser Gene dem erhöhten Risiko für das familiäre Lungenkarzinom assoziiert ist, bleibt bisher ungeklärt.

1.1.3 Sporadisches Lungenkarzinom

Ein sporadischer Tumor wird im Allgemeinen dann als solcher diagnostiziert, wenn sich in der Stammbaumanalyse bzw. Familienanamnese keine Hinweise auf ein familiäres Vorkommen ergeben. Doch auch dem sporadischen Lungenkarzinom liegt eine genetische Komponente zugrunde. Es deutet vieles darauf hin, dass es individuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Karzinogenen der Umwelt gibt, und eben diese Unterschiede in der Empfänglichkeit für äußere Einflussfaktoren liegen im Individuum selbst, in seinen Genen begründet. So entwickelt zum Beispiel nur jeder zehnte Raucher im Laufe seines Lebens ein Lungenkarzinom [22]. Dies legt nahe, dass individuelle Faktoren die Empfindlichkeit gegenüber Tabakrauch und die durch ihn verursachten Schäden für den Organismus modifizieren. Zahlreiche Untersuchungen hatten zum Ziel, biologische Marker zu finden, die die Karzinogenese im Zusammenhang mit Tabakrauchen beeinflussen. Dabei richtete sich die Aufmerksamkeit besonders auf Gene, welche Enzyme kodieren, die mit dem Metabolismus der Karzinogene und der DNA-Reparatur oder apoptotischen Vorgängen in Zusammenhang stehen. Diese sogenannten Kandidatengene wurden auf die Assoziation von genetischen Polymorphismen mit dem Lungenkarzinom hin untersucht.

Die am ausführlichsten und in neuesten Studien untersuchten Gene für Phase I- und II- Enzyme kodieren für das Cytochrom P450 (CYP), die Glutathion-S-Transferase (GST), die Myeloperoxidase (MPO) und die NAD(P)H-Quinin-Oxireduktase 1 (NQO1). Die Ergebnisse der durchgeführten Untersuchungen sind uneinheitlich und es konnten, falls überhaupt signifikante, dann nur schwache Assoziationen gefunden werden [36] (TABELLE 1).

TABELLE 1: AUSGEWÄHLTE ASSOZIATIONSSTUDIEN ZU POLYMORPHISMEN IN KANDIDATENGENEN VON PHASE I UND II ENZYMEN FÜR DAS LUNGENKARZINOM

	Studie (Jahr)	*Studienpopulation*	*OR (95 % KI)*	*Bemerkung*
CYP1A1	Le Marchand et al (1998)	341 Patienten aus mehreren ethnischen Gruppen und 456 Kontrollpersonen	1.2 (0.6-2.2)	MspI Polymorphismus
			0.7 (0.2-2.3)	Exon 7-Polymorphismus
	Houlston (2000)	Metaanalyse, 15 Studien	1.27 (0.91-1.77)	MspI Polymorphismus
			1.62 (0.93-2.82)	Exon 7-Polymorphismus
	Vineas et al (2003)	gemischte Analyse, 22 Studien, Weiße	2.36 (1.16-4.81)	MspI Polymorphismus, nur 30 Patienten und 24 Kontrollpersonen mit Risiko-Genotyp
GSTM1	Benhamou et al (2002)	Metaanalyse, 43 Studien	1.17 (1.07-1.27)	> 18000 Personen
		gemischte Analyse, 21 Studien	1.08 (0.98-1.18)	keine Unterschiede in Raucher-Status, Geschlecht, Histologie und Ethnizität
	Ford et al (2000)	117 Patienten aus der afroamerikanischen Bevölkerung und 120 Kontrollpersonen	2.10 (1.07-4.11)	Risiko erhöht mit zunehmendem Rauchen
MPO	Feyler et al (2002)	Metaanalyse, 2686 Patienten und 3325 Kontrollpersonen	0.86 (0.67-1.1)	Genotyp A/A vs G/G
	Xu et al (2002)	Weiße, 988 Patienten und 1128 Kontrollpersonen	1.15 (0.7-1.9)	Genotyp A/A vs G/G
	Schabath et al (2002)	Weiße, 375 Patienten und 378 Kontrollpersonen	0.66 (0.49-0.90)	Genotyp A/A + A/G vs G/G, am meisten protektiv bei Männern und leichten Rauchern
NQO1	Wiencke et al (1997)	Amerikaner mexikanischer Herkunft, 61 Patienten und 161 Kontrollpersonen	1.90 (1.04-3.46)	C/C + C/T vs T/T
		Afroamerikaner, 116 Patienten und 136 Kontrollpersonen	1.26 (0.75-2.11)	C/C + C/T vs T/T
	Xu et al (2001)	Weiße, 814 Patienten und 1123 Kontrollpersonen	3.02 (0.74-12.23)	T/T vs C/C, frühere Raucher von 20 Zigaretten/d für 10 a
			0.57 (0.12-2.66)	frühere Raucher von 20 Zigaretten/d für 50 a
	Sunaga et al (2002)	198 Patienten mit Adenokarzinom und 152 Kontrollpersonen	2.15 (1.03-4.48)	C/C vs T/T
	Chen et al (1999)	Japanische Bevölkerung auf Hawaii	0.3 (0.1-0.7)	T/T vs C/C

Darüber hinaus gibt es Studien zum Einfluss von α1-Antitrypsinmangel und Polymorphismen der Matrix Metalloproteinasen (MMPs), der mikrosomalen Epoxidhydrolase (mEH) und von Zytokinvarianten (z.B. IL1β) auf die Entstehung von Lungentumoren (TABELLE 2).

Das Gen für α1-Antitrypsin (PI) ist auf Chromosom 14q32.1 lokalisiert und zwei häufige Allele (S und Z) sind mit einem Mangel von α1-Antitrypsin assoziiert. Die Träger beider Allele sind unter Patienten mit Lungenkarzinom häufiger anzutreffen als in der Normalbevölkerung [50].

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind eine Familie von mehr als 20 proteolytischen Enzymen, die extrazelluläre Membranen abbauen. Bestimmte Einzelbasenpolymorphismen (SNPs) in den Promotorregionen von MMP1, MMP2 und MMP3 erhöhen das Lungenkarzinomrisiko [53, 14, 51].

Ebenso sind SNPs in der Promotorregion von IL1β mit der Entwicklung nicht-kleinzelliger Lungenkarzinome assoziiert [55].

Mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) ist in Bronchialepithel lokalisiert und kann unter bestimmten Umständen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, die in Zigarettenrauch enthalten sind, durch Metabolisierung in reaktivere Formen umwandeln. Das Gen für die mEH liegt auf Chromosom 1q42.1 und enthält u. a. zwei Polymorphismen, von denen der eine mit erhöhter, der andere mit erniedrigter Aktivität des Enzyms assoziiert ist. Die Studien, die sich in diesem Zusammenhang mit dem Lungenkarzinom befassten, kamen zu dem Ergebnis, dass der Genotyp mit der erhöhten Enzymaktivität mit einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko assoziiert ist [37].

TABELLE 2: AUSGEWÄHLTE ASSOZIATIONSSTUDIEN IN KANDIDATENGENEN FÜR DAS LUNGENKARZINOM

	Studie (Jahr)	*Studienpopulation*	*Ergebnisse*
α1-Antitrypsinmangel	Yang P (1999)	260 Weiße mit LC (unselektiert), verglichen mit veröffentlichten Daten	α1-Antitrypsinmangel unter Patienten mit LC (12.3 %) häufiger als in der Normalbevölkerung (7 %) (p=0.002)
MMPs	Zhu Y (2001)	456 Fälle mit LC (unselektiert), 451 Kontrollen	2G/2G-Genotyp des MMP-1 Promotor-SNP G-1607GG assoziiert mit erhöhtem Lungenkarzinomrisiko (OR 1.8, 95 % KI 1.3-2.4), für Raucher noch höher (OR 3.2, 95 % KI 1.9-5.4)
	Yu C (2002)	781 Fälle mit LC (unselektiert), 852 Kontrollen, chinesische Population	CC-Genotyp des MMP-2 Promotor-SNP C-1306T assoziiert mit erhöhtem Lungenkarzinomrisiko (OR 2.2, 95 % KI 1.7-2.8); das Risiko erhöht sich mit steigendem Tabakkonsum
	Fang S (2005)	243 Fälle mit NSCLC, 350 Kontrollen, chinesische Population	5A Genotyp des MMP-3 Promotor SNP 6A-1171-5A für Raucher assoziiert mit einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko (OR 1.7, 95 % KI 1.0-2.7); kein erhöhtes Risiko beim MMP-1 Promotor SNP G-1607GG
Zytokinvarianten	Zienolddiny S (2004)	251 Fälle mit NSCLC und 272 Kontrollen (Raucher)	T-Allel im T-31C SNP des IL-1β assoziiert mit erhöhtem Lungenkarzinomrisiko (TT vs. CC; OR 2.4, 95 % KI 1.3-4.4), das C-Allel im C-511T SNP des IL-1β ebenso (CC vs. TT; OR 2.5, 95 % KI 1.5-4.6); beide Risikogenotypen mit höherer Häufigkeit von p53-Mutationen assoziiert
mEH	Benhamou S (1998)	150 Weiße mit LC, 172 Kontrollen	Erhöhte Aktivität der mEH assoziiert mit erhöhtem Lungenkarzinomrisiko (p<0.02)
	London SJ (2000)	337 Fälle mit LC, 700 Kontrollen, Weiße und Afroamerikaner	Erniedrigte Aktivität durch Exon 3 Varianten assoziiert mit erniedrigtem Risiko bei Afroamerikanern (OR 0.08, 95 % KI 0.01-0.6), erniedrigte Aktivität durch Exon 3- und Exon 4-Varianten mit erniedrigtem Risiko assoziiert bei Afroamerikanern (OR 0.1, 95 % KI 0.01-0.8); keine Assoziationen bei Weißen
	Zhou W (2001)	974 Fälle mit LC, 1142 Kontrollen, Weiße	Keine Assoziation von erniedrigter Aktivität infolge Exon 3- und Exon 4-Varianten (OR 1.0, 95 % KI 0.7-1.3), fast zweifach erhöhtes Risiko bei Nichtrauchern mit den Niedrigaktivität Genotypen (OR 1.9, 95 % KI 1.1-3.3)
	Wu X (2001)	138 Fälle mit LC, 148 Kontrollen, Amerikaner mexikanischer Herkunft und Afroamerikaner	Erhöhtes Risiko für Allele mit „schneller Aktivität" in Exon 4 bei Amerikanern mexikanischer Herkunft (OR 3.6, 95 % KI 1.3-10.4), keine Assoziationen mit Exon 3- oder Exon 4-Varianten bei Afroamerikanern
	Lee WJ (2002)	Metaanalyse: 2078 Fälle mit LC, 3081 Kontrollen	Keine Assoziationen zwischen Exon 3- bzw. Exon 4-Varianten und Lungenkarzinomrisiko
	Zhao H (2002)	181 Weiße mit LC, 163 Kontrollen	Grenzwertig erhöhtes Risiko für Träger von einem oder mehreren Allelen mit „schneller Aktivität" in Exon 4 (OR 1.6, 95 % KI 1.0-2.5); keine Assoziation mit Exon 3-Variante
	Cajas-Salazar N (2003)	110 Weiße mit LC, 119 Kontrollen	Hochaktivitätsgenotypen (Exon 3- und Exon 4-Varianten kombiniert) assoziiert mit erhöhtem Risiko (OR 2.5, 95 % KI 1.1-5.7)
	Gsur A (2003)	277 Weiße mit LC, 496 Kontrollen	Erniedrigtes Risiko für den homozygoten Genotypen der Exon 3-Variante (OR 0.4, 95 % KI 0.2-0.8); keine Assoziation mit dem Exon 4-SNP
	Park JY (2005)	182 Weiße mit LC, 365 Kontrollen	Erniedrigtes Risiko für den homozygoten Genotypen der Exon 3-Variante (OR 0.6, 95 % KI 0.3-1.0); kombinierte Genotypen mit erhöhter Enzymaktivität waren mit erhöhtem Risiko assoziiert (OR 2.3, 95 % KI 1.2-4.3)

Studien zu DNA-Reparatur-Genen wie *ERCC* und *XRCC* erbrachten uneinheitliche Ergebnisse bezüglich der Beeinflussung des Lungenkarzinomrisikos [26], für Träger des OGG1 (8-Oxyguanin DNA Glykosylase) Cys/Cys-Genotyps konnte ein erhöhtes Lungenkarzinomrisiko ermittelt werden [22].

Untersuchungen zum Tumorsupressorgen *p53* und dessen Rolle bei der Risikomodifizierung beim Lungenkarzinom erbrachten ebenfalls uneinheitliche Ergebnisse [26].

Es konnte also bisher für keines dieser Kandidatengene eine überzeugende, d.h. eindeutige und zahlenmäßig signifikante Assoziation zum Lungenkarzinom gefunden werden. Man weiß allerdings noch wenig über den Einfluss onkogener Mechanismen, die viele verschiedene Gene einbeziehen, auf die Entstehung von Tumoren. Vermutlich beeinflusst erst das Zusammenwirken mehrerer Mutationen in verschiedenen Genen, die für sich genommen nur einen geringen Effekt haben, entscheidend die individuelle Empfindlichkeit gegenüber Karzinogenen und damit das Risiko, an einem Lungenkarzinom zu erkranken. Man kann das sporadische Lungenkarzinom daher als eine multifaktorielle Erkrankung bezeichnen.

1.2 Molekulargenetische Assoziationsstudie

1.2.1 Allgemeines

Das Ziel molekulargenetischer Assoziationsstudien ist es, durch den Vergleich einer Patientenstichprobe mit einer altersgleichen Kontrollgruppe ein mit der Erkrankung verknüpftes genetisches Merkmal, z. B. einen DNA-Polymorphismus, zu finden. Untersucht werden diejenigen Gene, deren Produkte an der Entstehung der Krankheit beteiligt sein könnten, sogenannte Kandidatengene. In molekulargenetischen Assoziationsstudien werden polymorphe Marker verwendet, die entweder nahe am oder im Kandidatengen liegen. Diese Marker müssen selbst nicht krankheitsauslösend oder risikomodifizierend sein. Findet sich eine Assoziation zwischen Phänotyp und einem bestimmten Marker, deutet dies darauf hin, dass sich in der Nähe des Markers eine Sequenzveränderung im Genom befindet, die krankheitsursächlich ist und die mit dem Marker im Kopplungsungleichgewicht liegt, d. h. mit diesem überzufällig häufig verbunden ist. Falsch positive Assoziationen können u. a. dann entstehen, wenn die Patienten anderer ethnischer Herkunft als die Kontrollen sind oder ein anderes Alter bzw. Geschlecht aufweisen. Daher ist es wichtig, Patienten und Kontrollen aus gleichen genetischen Subpopulationen zu rekrutieren.

Als Marker können in diesen molekulargenetischen Assoziationsstudien z. B. ausgewählte Single Nucleotid Polymorphisms (Einzelbasenpolymorphismen, SNPs) verwendet werden.

1.2.2 SNPs

SNPs („single nucleotide polymorphisms“) sind Einzelnukleotidaustausche im menschlichen Genom, die mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % in der jeweils untersuchten Population anzutreffen sind. Sie sind folglich Positionen im Genom, für die mindestens zwei Varianten (Allele) existieren, z. B. C oder G an Position X im Genom. Ein Individuum kann dann homozygot für C, heterozygot CG oder homozygot für G sein. SNPs sind in kodierenden (Exons), nicht kodierenden (Introns) oder in regulatorischen Genabschnitten (z.B. Promotorbereiche) lokalisiert. Sie können z. B. durch Vergleich eines DNA-Abschnittes von mehreren Individuen in silico detektiert werden, d.h. ein Computerprogramm vergleicht DNA-Sequenzen aus verschiedenen Sequenz-Datenbanken und identifiziert die Unterschiede in der Nukleotidsequenz. Danach findet eine experimentelle Validierung des SNPs statt. Hierbei wird untersucht, ob der Polymorphismus in der zu untersuchenden Population tatsächlich mindestens zwei Allele aufweist [32]. In der SNP-Datenbank (dbSNP) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) waren Ende Januar 2007 11.961.761 SNPs, davon über 5,6 Millionen validierte SNPs für Homo sapiens gelistet.

Auf das NCBI geht auch die hier verwendete Nomenklatur der SNPs zurück. Jeder SNP, der in der Datenbank gelistet werden soll, bekommt initial eine sogenannte SNP-ID, also eine Nummer, anhand derer er im Weiteren immer genau identifiziert werden kann. Ein SNP, der bei seiner Registrierung in der Datenbank bisher noch nicht gelistet ist, hat dabei seiner Identifikationsnummer „rs“ vorangestellt, was für „reference SNP“ steht.

1.3 Fragestellung der Dissertation

Diese Arbeit beschreibt eine genomweite molekulargenetische Assoziationsstudie zur Identifizierung erblicher Risiken des Lungenkarzinoms. Das Ziel dieser Studie war, anhand genomweiter SNP-Analysen Genotypen zu identifizieren, die mit einem erhöhten Risiko für das Lungenkarzinom assoziiert sind. Desweiteren sollten die Ergebnisse in einem zweiten, unabhängigen Kollektiv repliziert werden.

Es wurde eine Fall-Kontroll-Studie mit 322 deutschen Lungenkarzinompatienten und 270 gesunden Kontrollpersonen durchgeführt. Dabei wurden 83.715 genomweit verteilte SNPs untersucht.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die anhand von Fragebögen ermittelten Daten der Studienteilnehmer zu untersuchen und auszuwerten. Von besonderem Interesse war hierbei die Komorbidität beim Lungenkarzinom.

2 Studiendesign

2.1 Teilnehmer

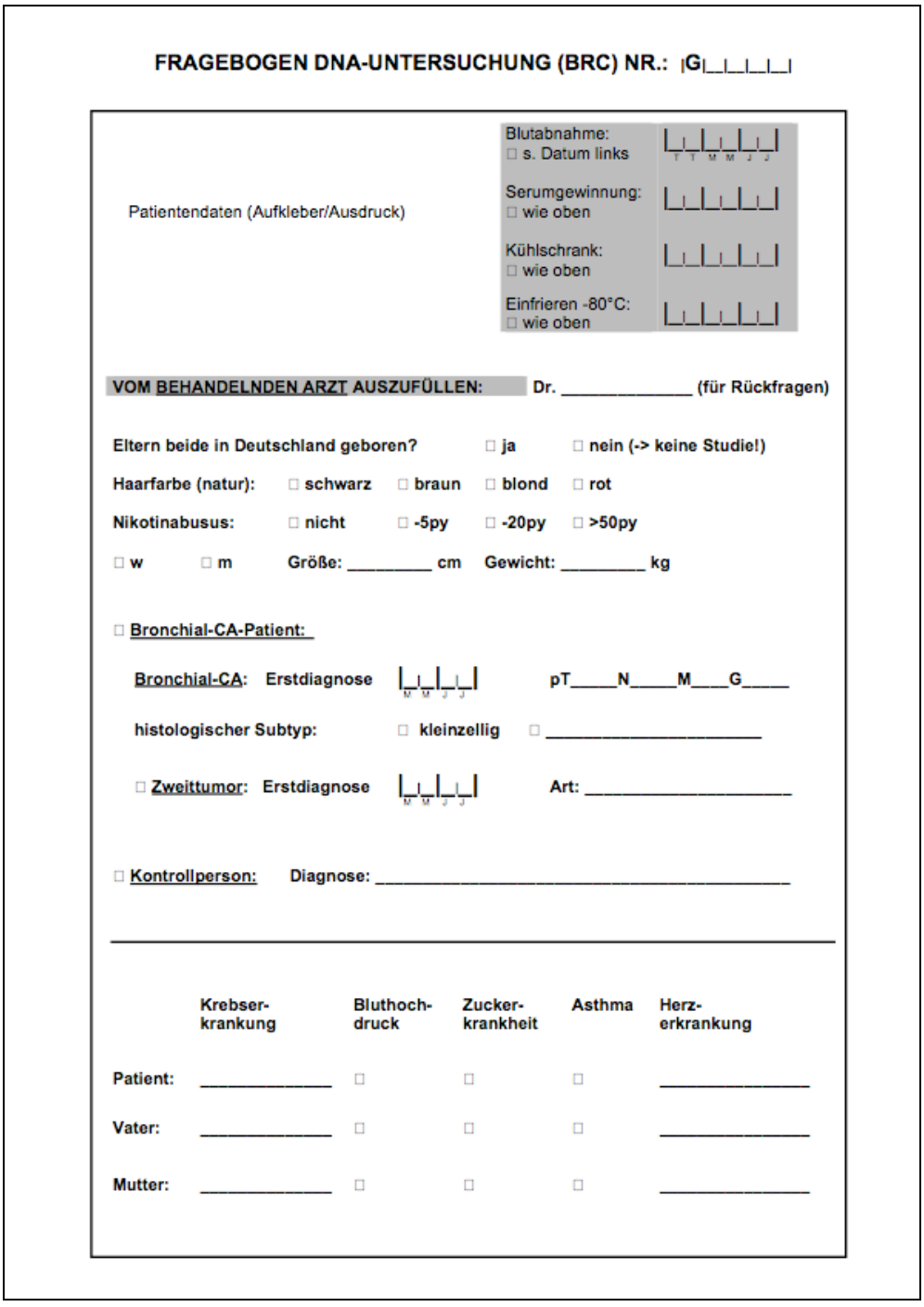
Die Initialstudie wurde nach positiver Begutachtung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Tübingen durchgeführt.

Alle Studienteilnehmer wurden zunächst in einem persönlichen Arzt-Patienten-Gespräch über Art, Ablauf und Sinn der Studie aufgeklärt. Die anschließend schriftlich gegebene Einverständniserklärung konnte während der gesamten Studie ohne Angabe von Gründen zurückgezogen werden. Es wurde eine Eigen- und Familien-Anamnese durchgeführt und zusammen mit krankheitsspezifischen Daten auf einem von mir speziell dafür erarbeiteten Fragebogen notiert. Der in dieser Studie verwendete Fragebogen ist nachfolgend dargestellt (ABBILDUNG 1).

Die Patienten mit Lungenkarzinom waren in der Pneumologischen und Thoraxchirurgischen Klinik in Stuttgart-Gerlingen und in der Pneumologischen Fachklinik München-Gauting in Behandlung und wurden dort um die Teilnahme an der Studie gebeten. Insgesamt wurden über 700 Patienten rekrutiert. Darunter befanden sich sowohl Frauen als auch Männer, Raucher wie Nichtraucher, und alle histologischen Tumortypen des Lungenkarzinoms waren vertreten. Alle Patienten wurden mit sämtlichen erhobenen Daten einer Datenbank zugeführt, aus der anschließend diejenigen ausgewählt wurden, deren Probenmaterial für die Initialstudie verwendet werden sollte. Auswahlkriterien waren Geschlecht, Herkunft, Raucherstatus und Verfügbarkeit von DNA-Material. Letztendlich wurden DNA-Proben von 322 männlichen kaukasischen Rauchern mit Lungenkarzinom jedweden Subtyps für die Initialstudie verwendet.

Die Kontrollgruppe wurde aus Patienten der Pneumologischen und Thoraxchirurgischen Klinik in Stuttgart-Gerlingen und der Pneumologischen Fachklinik München-Gauting sowie der Hautklinik der Universität Tübingen zusammengestellt. Bei allen Kontrollpersonen ergab sich nach Anamnese und klinischer Untersuchung kein Anhalt für das Vorhandensein eines Lungenkarzinoms oder anderer Krebserkrankungen. Für die Initialstudie wurden 270 Personen kaukasischer Herkunft ausgewählt, davon 183 Männer (68 %) und 87 Frauen (32 %). Alle Kontrollpersonen waren Raucher.

Für die Replikationsstudie wurden 250 Patienten mit histologisch gesichertem Adenokarzinom der Lunge ausgewählt, die am Istituto Nationale Tumori in Mailand, Italien, operiert worden waren. Am selben Institut wurden 233 gesunde Kontrollpersonen rekrutiert.



FRAGEBOGEN DNA-UNTERSUCHUNG (BRC) NR.: |G|_|_|_|_|

Patientendaten (Aufkleber/Ausdruck)

Blutabnahme: □ s. Datum links |_|_|_|_|_|_| T T M M J J

Serumgewinnung: □ wie oben |_|_|_|_|_|

Kühlschrank: □ wie oben |_|_|_|_|_|

Einfrieren -80°C: □ wie oben |_|_|_|_|_|

VOM BEHANDELNDEN ARZT AUSZUFÜLLEN: Dr. _____ (für Rückfragen)

Eltern beide in Deutschland geboren? □ ja □ nein (-> keine Studie!)

Haarfarbe (natur): □ schwarz □ braun □ blond □ rot

Nikotinabusus: □ nicht □ -5py □ -20py □ >50py

□ w □ m Größe: _____ cm Gewicht: _____ kg

□ Bronchial-CA-Patient:

Bronchial-CA: Erstdiagnose |_|_|_|_| M M J J pT_____N_____M____G_____

histologischer Subtyp: □ kleinzellig □ _____

□ Zweittumor: Erstdiagnose |_|_|_|_| M M J J Art: _____

□ Kontrollperson: Diagnose: _____

	Krebser-krankung	Bluthoch-druck	Zucker-krankheit	Asthma	Herz-erkrankung
Patient:	_____	□	□	□	_____
Vater:	_____	□	□	□	_____
Mutter:	_____	□	□	□	_____

ABBILDUNG 1: FRAGEBOGEN BRONCHIALKARZINOM

TABELLE 3: CHARAKTERISTIKA BEIDER STICHPROBEN

		Deutsche Kontrollen/Fälle	*Italienische Kontrollen/Fälle*
Anzahl n		270/322	233/250
Medianes Alter		63.0/65.3	49.6/61.6
Geschlecht	männlich	183/322	172/187
	weiblich	87/0	61/63
Raucher	nein	0/0	96/46
	ja	270/322	92/196

TABELLE 4: CHARAKTERISTIKA DER PATIENTEN BEIDER STICHPROBEN

		Deutsche Patienten	*Italienische Patienten*
Histologie	ADCA	78	250
	NSCLC	46	0
	SQCC	104	0
	SCLC	72	0
	andere	22	0
Lymphknotenstatus	N0	56	146
	N1	208	74
Klinisches Stadium	I	39	125
	II	21	46
	III	149	36
	IV	90	21
Nachbeobachtungszeit (Monate)*		nicht verfügbar	56,5

Histologie: ADCA: Adenokarzinom; NSCLC: nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (non small cell lung carcinoma); SQCC: Plattenepithelkarzinom (squamous cell carcinoma); SCLC: kleinzelliges Lungenkarzinom (small cell lung carcinoma);

Lymphknotenstatus: N0: keine Lymphknotenmetastasen; N1: Lymphknotenmetastasen;

* mediane Nachbeobachtungszeit aller Patienten, die am Ende der Nachbeobachtungszeit noch am Leben waren (n=104)

2.2 Material

Von jedem Studienteilnehmer wurden nach entsprechender Aufklärung und Einwilligung 20 ml Venenblut in EDTA-Röhrchen entnommen.

Die Weiterverarbeitung der Blutproben fand innerhalb von acht Stunden nach der Blutentnahme statt. Bis zur Aufbereitung wurden die Proben bei +4 bis +8° C gelagert. Dann wurden die EDTA-Venenblutröhrchen bei +10° C und 2000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten lang zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abpippetiert. Die zellulären Bestandteile des Blutes und das Plasma wurden in getrennte Probengefäße abgefüllt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° C eingefroren. Die Proben wurden dabei mit einer für jeden Studienteilnehmer spezifischen Nummer versehen und dadurch pseudonymisiert.

2.3 Methodik

Die molekulargenetischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit einer industriellen Hochdurchsatz-Genotypisierungs-Einrichtung (Sequenom Inc., San Diego, USA) durchgeführt.

2.3.1 Auswahl der genomischen Polymorphismen

Aus einer von Nelson et al. entwickelten SNP-Landkarte mit 125.799 validierten Polymorphismen [32] wurden 83.715 SNPs ausgewählt. Diese SNPs waren alle genbasiert, d. h. sie lagen alle innerhalb eines Exons, Introns oder maximal 10 kb upstream oder downstream des Gens. Die Allelfrequenz war mindestens 0.02, zu 95 % sogar >0.05. Der Abstand der SNPs betrug im Durchschnitt 15 kb.

2.3.2 Präparation der DNA-Pools

Die DNA der Studienteilnehmer wurde zunächst gepoolt, d.h. es wurden zwei DNA-Pools hergestellt, von denen der eine die DNA der Lungenkarzinompatienten, der andere die der karzinomfreien Kontrollgruppe enthielt. Dazu wurde die DNA eines jeden Teilnehmers zuerst isoliert und gereinigt, dann quantitativ bestimmt und anschließend zu einer Standardkonzentration verdünnt. Danach wurden durch automatisiertes Pipettieren äquimolare Anteile der individuellen

DNA-Proben (83 pg pro Patient) zu einem Pool vereint [1]. Von beiden DNA-Pools gingen je 25 ng in die weiteren Verfahrensschritte ein.

2.3.3 Individuelle Genotypisierung

160 SNPs, die bei der gepoolten Analyse eine Assoziation mit dem Lungenkarzinom aufwiesen, wurden durch individuelle Genotypisierung aller Studienteilnehmer auf ihre statistische Signifikanz hin untersucht. Hierbei wurden anstelle der DNA-Pools 2,5 ng der DNA jedes Teilnehmers in die Analyse eingebracht.

2.3.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCRs zur Amplifikation der DNA wurden nach Standardbedingungen durchgeführt [1]. Die PCR-Produkte wurden immobilisiert, indem sie auf Streptavidin umhüllte paramagnetische Partikel (Dynal, Oslo) über den biotinylierten universellen PCR-Primer aufgebracht wurden. Dann wurde der Doppelstrang durch Einbringen von 50 µl einer 0.1 molaren NaOH-Lösung bei Raumtemperatur denaturiert. Nach Neutralisation durch 10 mM Tris-HCl-Lösung wurde der Anti-Sense-Strang (nicht biotinyliert) abgetrennt, so dass nur der Sense-Strang gebunden blieb. Die einzelsträngigen PCR-Produkte wurden für die Primer-Verlängerung durch MassEXTEND-Reaktionen verwendet [1].

2.3.5 MassEXTEND-Reaktion

Durch MassEXTEND-Reaktionen [1] wurden allelspezifische Produkte erzeugt, d. h. die Regionen um die zu untersuchenden Polymorphismen wurden gezielt vervielfältigt: Ein assayspezifischer Primer, der neben dem zu genotypisierenden SNP hybridisiert, wird in Anwesenheit von Desoxynukleotidtriphosphaten (dNTPs) und Didesoxynukleotidtriphosphaten (ddNTPs) durch eine DNA-Polymerase verlängert. In der Mischung sind immer nur für eine bestimmte Base des genetischen Codes dNTPs vorhanden. Die Primer-Verlängerung kommt zum Abbruch, wenn ein ddNTP eingebaut wird, mit dem Ergebnis, dass jeweils ein allel-spezifisches Extensionsprodukt entsteht (ABBILDUNG 2).

Durch eine Ammoniumhydroxid-Lösung wurden die Primer-Extensions-Produkte von der festen Trägersubstanz wieder gelöst. Für die nachfolgende Massenspektrometrie wurden 15 nl der jeweiligen Probe auf einen Silizium-Chip (SpectroCHIP®), der 384 Elemente umfasst, aufgebracht.

2.3.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Durch die Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization Time-of-Flight-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) konnte das exakte Molekulargewicht der jeweiligen DNA-Probe gemessen und dadurch die Allelfrequenz für jeden SNP bestimmt werden.

Das Verfahren lässt sich zusammen gefasst folgendermaßen beschreiben: die zu analysierenden Proben, also die einzelsträngigen Extensions-Produkte, werden nach Kristallisation mit einer Trägersubstanz (Matrix) auf einen MALDI-Probenträger (384-Elemente-Silizium-Chip) aufgetragen. Die feste Matrix besteht aus niedermolekularen organischen Molekülen, welche die ultraviolette Strahlung stark absorbieren. Der Probenträger wird in das Massenspektrometer eingebracht und für Nanosekunden unter Vakuumbedingungen durch einen ultravioletten (337 nm) Laserpuls beschossen. Hierbei wird der Analyt durch Absorption des Laserstrahls in einen ionisierten, gasförmigen Zustand transformiert. Die Analytmoleküle werden durch das Spannungsfeld des Massenspektrometers beschleunigt und in den Massenanalysator gelenkt. Dabei wird das Molekulargewicht des Analyten durch eine Flugzeitanalyse bestimmt. Für jeden SNP werden drei Messungen durchgeführt [8].

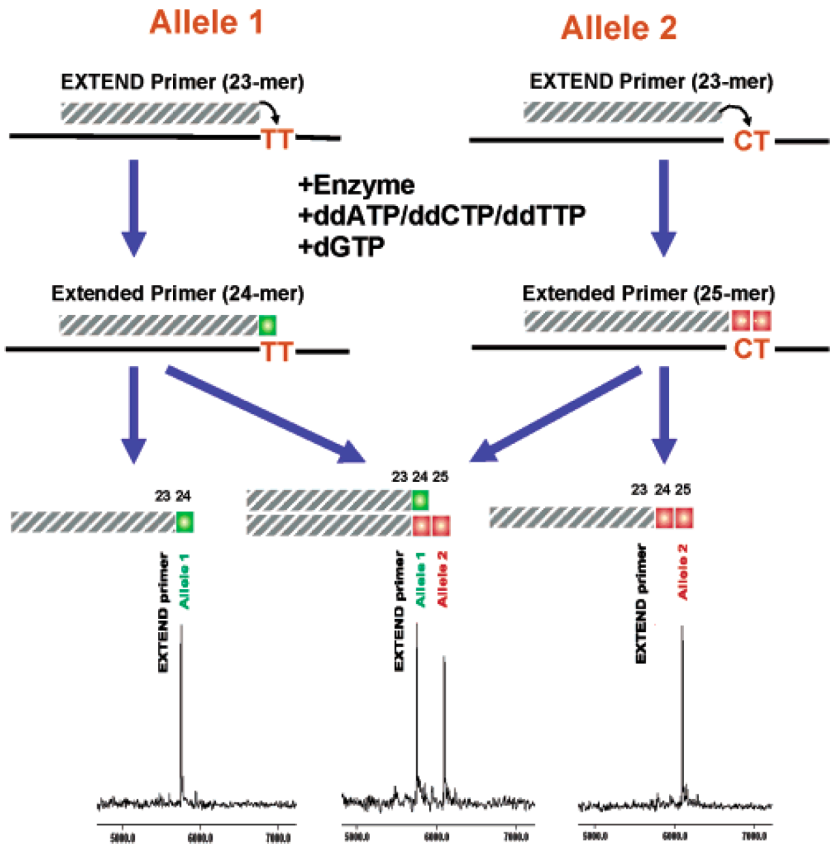


ABBILDUNG 2: PRINZIP DER MASSEXTEND-REAKTION UND DER MALDI-TOF-MASSENSPKTROMETRIE AM BEISPIEL

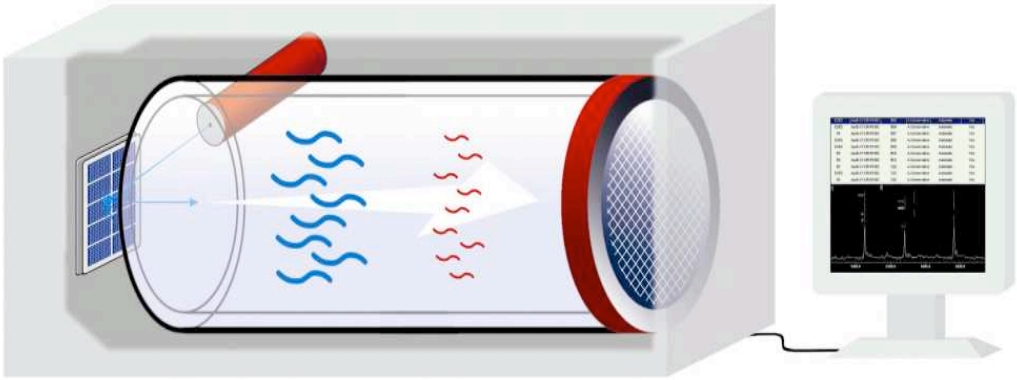


ABBILDUNG 3: MALDI-TOF-MASSENSPEKTROMETER

2.3.7 Bestimmung der Allel- und Genotyphäufigkeiten

Die Allele der SNPs unterscheiden sich durch die natürliche Massendifferenz der eingebauten Basen. Die Massendifferenzen sind anhand der Peaks in den jeweiligen Massenspektren berechenbar. Die Auswertung der Massenspektren erfolgte mithilfe einer Software (SPECTROTYPER®, SEQUENOM) durch Basislinien-Korrektur, Peak-Identifikation und Berechnung von Peak-Algorithmen. Auf diese Weise konnte zunächst die relative, unter Einbeziehung der Teilnehmerzahl dann die absolute Allelfrequenz für jeden SNP in beiden DNA-Pools bestimmt werden [45, 1].

SNPs, die in der Pool-Analyse eine Assoziation mit dem Lungenkarzinom mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von höchstens 5 % ($p<0.05$) aufwiesen, wurden individuell genotypisiert, um falsch-positive Resultate zu verringern.

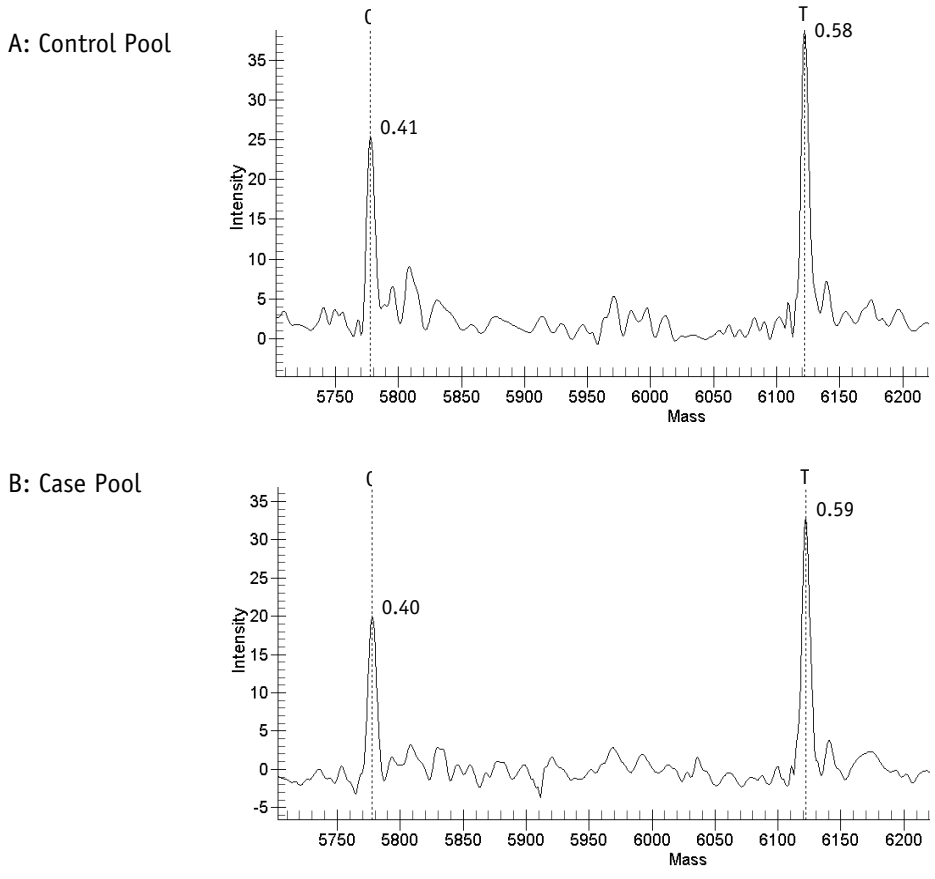


ABBILDUNG 4: MASSENSPEKTRUM EINES C/T-POLYMORPHISMUS (ANSCHAUUNGSBEISPIEL)

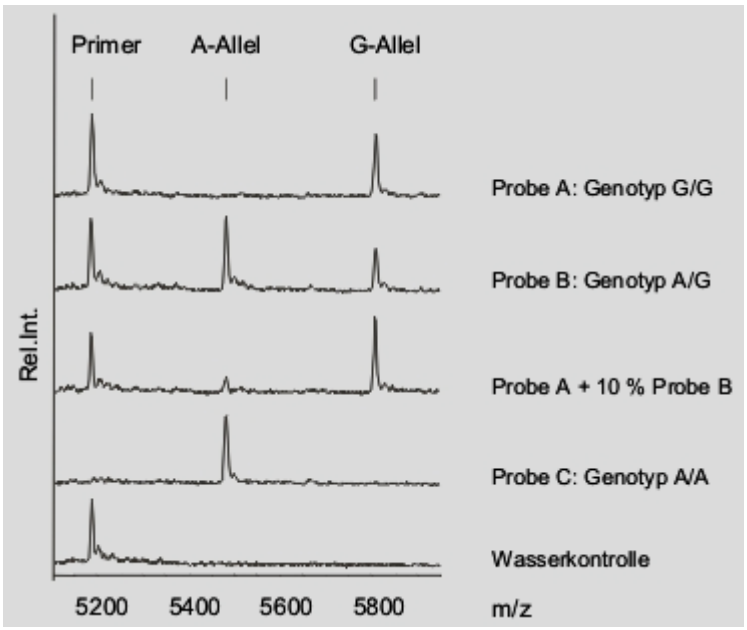


ABBILDUNG 5: MASSENSPEKTRUM EINES G/A-POLYMORPHISMUS MIT DEN DREI MÖGLICHEN GENOTYPEN (ANSCHAUUNGSBEISPIEL)

2.4 Statistik

Die ermittelten Daten wurden mittels Microsoft Excel und Microsoft Access erfasst. Die statistischen Berechnungen sind mit Hilfe der auf den Internetseiten des Instituts für Humangenetik an der GSF in München-Neuherberg implementierten speziellen Berechnungsprogramme für genetische Assoziationsstudien durchgeführt worden [56].

2.4.1 Assoziationen

Für die Prüfung der Assoziationen zwischen den einzelnen SNPs und dem Lungenkarzinomrisiko wurde der Chi^2-(Vierfelder)-Test verwendet. Dieser Test untersucht die Unabhängigkeit zweier Merkmale und wird deshalb auch Chi^2-Unabhängigkeitstest genannt. Man betrachtet also zwei Alternativmerkmale, in unserem Fall einerseits das entsprechende Allel und andererseits den Krankheitsstatus bezogen auf das Lungenkarzinom. Die Ausprägungen der beiden Merkmale, hier z. B. C-Allel bzw. G-Allel und Lungenkarzinompatient bzw. Kontrolle, und deren vier Kombinationsmöglichkeiten a, b, c, und d lassen sich anschaulich in einer Vierfeldertafel darstellen (ABBILDUNG 6).

	Kontrollen (gesund)	*Patienten mit Lungenkarzinom (krank)*	
C-Allel	a	b	a+b
G-Allel	c	d	c+d
	a+c	b+d	a+b+c+d=n

ABBILDUNG 6: VIERFELDERTAFEL

Die Nullhypothese H_0 besagt nun, dass die Ereignisse bzw. Merkmale unabhängig voneinander sind, wohingegen die Alternativhypothese H_1 von einer Abhängigkeit ausgeht. Beim Chi^2-Test werden die beobachteten Häufigkeiten mit denjenigen Häufigkeiten verglichen, die unter der Nullhypothese zu erwarten sind. Dazu wird die Prüfgröße Chi^2 mit der Formel

$$Chi^2 = \frac{n \bullet (ad - bc)^2}{(a+b)(a+c)(c+d)(b+d)}$$

berechnet.

Unter der Nullhypothese würden alle beobachteten mit den erwarteten Häufigkeiten übereinstimmen, d. h. es wäre $Chi^2=0$. Je weiter die beobachteten von den erwarteten Häufigkeiten abweichen, desto größer ist die Prüfgröße Chi^2. Liegt nun der Wert der Prüfgröße innerhalb des Intervalls $[0, Chi^2_{1;1-\alpha}]$ wird die Nullhypothese auf dem α-Niveau beibehalten, d. h. man nimmt an, dass keine Abhängigkeit der beiden Merkmale vorliegt. Für $\alpha=0.05$ wäre $Chi^2_{1;0,95}=3.841$. Ist der Wert der errechneten Prüfgröße größer als dieser $Chi^2_{1;0,95}$-Wert, wird die Nullhypothese verworfen und die Alternativhypothese angenommen, nämlich dass es eine Abhängigkeit, also eine Assoziation zwischen den beiden Merkmalen gibt.

2.4.2 Auswertung der Fragebögen

Für die Auswertung der qualitativen Merkmale wie Geschlecht, Haarfarbe oder das Vorhandensein bestimmter Erkrankungen wurde der Chi^2-Test nach Pearson angewendet. Dieser Test ist unter 2.4.1 ausführlich beschrieben.

Die quantitativen Merkmale wurden durch den Wilcoxon (-Mann-Whitney)-Test auf signifikante Unterschiede hin untersucht. Dieser Test gehört zu den sogenannten Rangsummentests und vergleicht die jeweiligen Mediane bei zwei unverbundenen Stichproben. Die Nullhypothese lautet

dabei, dass die Mediane gleich sind (H_0: $\mu_1=\mu_2$), während die Alternativhypothese davon ausgeht, dass sich die Mediane unterscheiden.

Zur Durchführung des Tests werden zunächst die Rangsummen (R_1 bzw. R_2) beider Stichproben (in unserem Fall Patienten bzw. Kontrollen) gebildet. Der Umfang der Stichproben beträgt dabei n_1 bzw. n_2. Dann berechnet man:

$$U_1 = \frac{n_1 \bullet n_2 + n_1(n_1+1)}{2 - R_1}$$

$$U_2 = \frac{n_1 \bullet n_2 + n_2(n_2+1)}{2 - R_2}$$

Der kleinere der beiden Werte wird als Prüfgröße U bezeichnet. Ist die Prüfgröße kleiner als der kritische Wert, der vom Umfang der Stichproben abhängig ist und in Tabellen nachgeschaut werden kann, oder gleich diesem, so wird die Nullhypothese abgelehnt.

3 Ergebnisse

3.1 Assoziationsstudie

In einer genomweiten Assoziationsstudie wurden bei 322 Patienten mit Lungenkarzinom und 270 gematchten Kontrollen (Raucher) aus einer süddeutschen Population 83.715 SNPs auf ihre Assoziation mit einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko untersucht. Es ergaben sich für 160 SNPs statistisch signifikante Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollgruppe. In einer zweiten, unabhängigen Stichprobe von italienischen Lungenkarzinompatienten und Kontrollen konnten diese Ergebnisse für fünf SNPs repliziert werden.

3.1.1 Der *rs1862214*-Polymorphismus

Einer der identifizierten SNPs war der *rs1862214*-Polymorphismus, ein C/G-Polymorphismus, der auf Chromosom 19q12-q13.1 lokalisiert ist und zwar 35 kb entfernt von *PDCD5* (programmed cell death 5), einem Gen, das bei der Apoptose von Zellen eine Rolle spielt [29]. Es zeigte sich, dass die Häufigkeit des selteneren G-Allels bei den Patienten mit Lungenkarzinom erhöht war (0.29) im Vergleich zu den Kontrollen (0.22) (TABELLE 6). CG- und GG-Genotypen waren unter den Patienten (41 % bzw. 9 %) häufiger als unter den Kontrollen (37 % bzw. 3 %). In beiden Gruppen waren die Genotyphäufigkeiten mit dem Hardy-Weinberg-Gesetz vereinbar, was bedeutet, dass beide Stichproben aus einer genügend großen Population hervorgegangen sind, in der Faktoren wie Migration oder Konsanguinität nicht in relevanter Weise auf die Genotyphäufigkeiten Einfluss genommen haben. Dies ist die Grundlage für die Interpretation der Ergebnisse, insofern vermieden werden soll, dass Assoziationen angenommen werden, die gar nicht bestehen.

Es ergab sich für das G-Allel eine statistisch signifikante Assoziation zu einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko im Vergleich zum C-Allel mit einem p-Wert von 0.0031 und einer odds ratio von 1.491 (Konfidenzintervall (KI): 1.142-1.945) (TABELLE 7). Beim Vergleich der Homozygoten zeigte sich ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen GG-Genotyp und Lungenkarzinomrisiko mit einem p-Wert von 0.00164 und einer odds ratio von 3.478 (KI: 1.539-7.862) (TABELLE 7). Es ergab sich außerdem, dass das Vorhandensein eines G-Allels, ob nun in homo- oder heterozygotem Zustand, das Risiko für ein Lungenkarzinom statistisch signifikant erhöht (p-Wert 0.02332, odds ratio 1.459, KI: 1.052-2.023) (TABELLE 7).

TABELLE 5: ABSOLUTE GENOTYPHÄUFIGKEITEN *RS1862214* (*PDCD5*)

		CC	*CG*	*GG*
Deutsche Stichprobe	Kontrollen n=270	161	101	8
	Fälle n=322	162	132	28
Italienische Stichprobe	Kontrollen n=233	138	86	9
	Fälle n=250	124	115	11

TABELLE 6: RELATIVE HÄUFIGKEITEN *RS1862214* (*PDCD5*)

		CC	*CG*	*GG*	*G*
Deutsche Stichprobe	Kontrollen n=270	0.60	0.37	0.03	0.22
	Fälle n=322	0.50	0.41	0.09	0.29
Italienische Stichprobe	Kontrollen n=233	0.59	0.37	0.04	0.22
	Fälle n=250	0.50	0.46	0.04	0.29

TABELLE 7: TEST AUF ASSOZIATION FÜR DAS G-ALLEL (SÜDDEUTSCHE STICHPROBE) *RS1862214* (*PDCD5*)

	OR	*KI (95 %)*	*Chi²*	*p*
Allelfrequenz C ↔ G	1.491	1.142-1.945	8.70	0.00318
Heterozygotenfrequenz CC ↔ CG	1.299	0.926-1.822	2.29	0.12992
Homozygotenfrequenz CC ↔ GG	3.478	1.539-7.862	9.92	0.00164
G-Allel-Positivität CC ↔ CG+GG	1.459	1.052-2.023	5.14	0.02332

OR: Odds Ratio; KI: Konfidenzintervall; p: p-Wert des Chi^2-Tests nach Pearson

In der Replikationsstudie ließ sich ebenfalls ein erhöhtes Risiko für Individuen, die das G-Allel homo- oder heterozygot tragen, nachweisen, jedoch nur bei den Heterozygoten statistisch signifikant (TABELLE 8). In der kombinierten Analyse beider Stichproben zeigte sich eindeutig und signifikant der Trend zu einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko von heterozygoten zu homozygoten G-Allel-Trägern (TABELLE 9).

TABELLE 8: TEST AUF ASSOZIATION FÜR DAS G-ALLEL (ITALIENISCHE STICHPROBE) *RS1862214* (*PDCD5*)

	OR	*KI (95 %)*	*Chi²*	*p*
Allelfrequenz C ↔G	1.314	0.979-1.762	3.33	0.06813
Heterozygotenfrequenz CC ↔ CG	1.488	1.028-2.154	4.45	0.03488
Homozygotenfrequenz CC ↔ GG	1.360	0.545-3.392	0.44	0.50797
G-Allel-Positivität CC ↔ CG+GG	1.476	1.030-2.116	4.50	0.03382

OR: Odds Ratio; KI: Konfidenzintervall; p: p-Wert des Chi²-Tests nach Pearson

TABELLE 9: TEST AUF ASSOZIATION FÜR DAS G-ALLEL (GESAMT) *RS1862214* (*PDCD5*)

	OR	*KI (95 %)*	*Chi²*	*p*
Allelfrequenz C ↔ G	1.410	1.158-1.716	11.72	0.00062
Heterozygotenfrequenz CC ↔ CG	1.381	1.076-1.773	6.43	0.01122
Homozygotenfrequenz CC ↔ GG	2.398	1.327-4.336	8.81	0.00300
G-Allel-Positivität CC ↔ CG+GG	1.466	1.151-1.867	9.62	0.00192

OR: Odds Ratio; KI: Konfidenzintervall; p: p-Wert des Chi²-Tests nach Pearson

3.1.2 Kopplungsungleichgewicht in der *PDCD5*-Genregion

Um die Region der höchsten Assoziation genauer zu charakterisieren, wurden 44 zusätzliche SNPs, die innerhalb eines Abstands von 50 kb zu beiden Seiten des *PDCD5*-Gens lagen, getestet (= Fine Mapping) (ABBILDUNG 7). Sechzehn der insgesamt 45 untersuchten SNPs waren signifikant mit einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko assoziiert ($p<0.05$). Die Region mit der höchsten Signifikanz erstreckte sich über eine Länge von ca. 80 kb und enthielt das *PDCD5*-Gen und das 3´-Ende des Ankyrin repeat domain 27 (*ANKRD27*)-Gens (ABBILDUNG 7A). Dieses Ergebnis stimmt mit Daten des International HapMap Projects überein und bestätigt das vermutete Kopplungsungleichgewicht [40] (ABBILDUNG 7B).

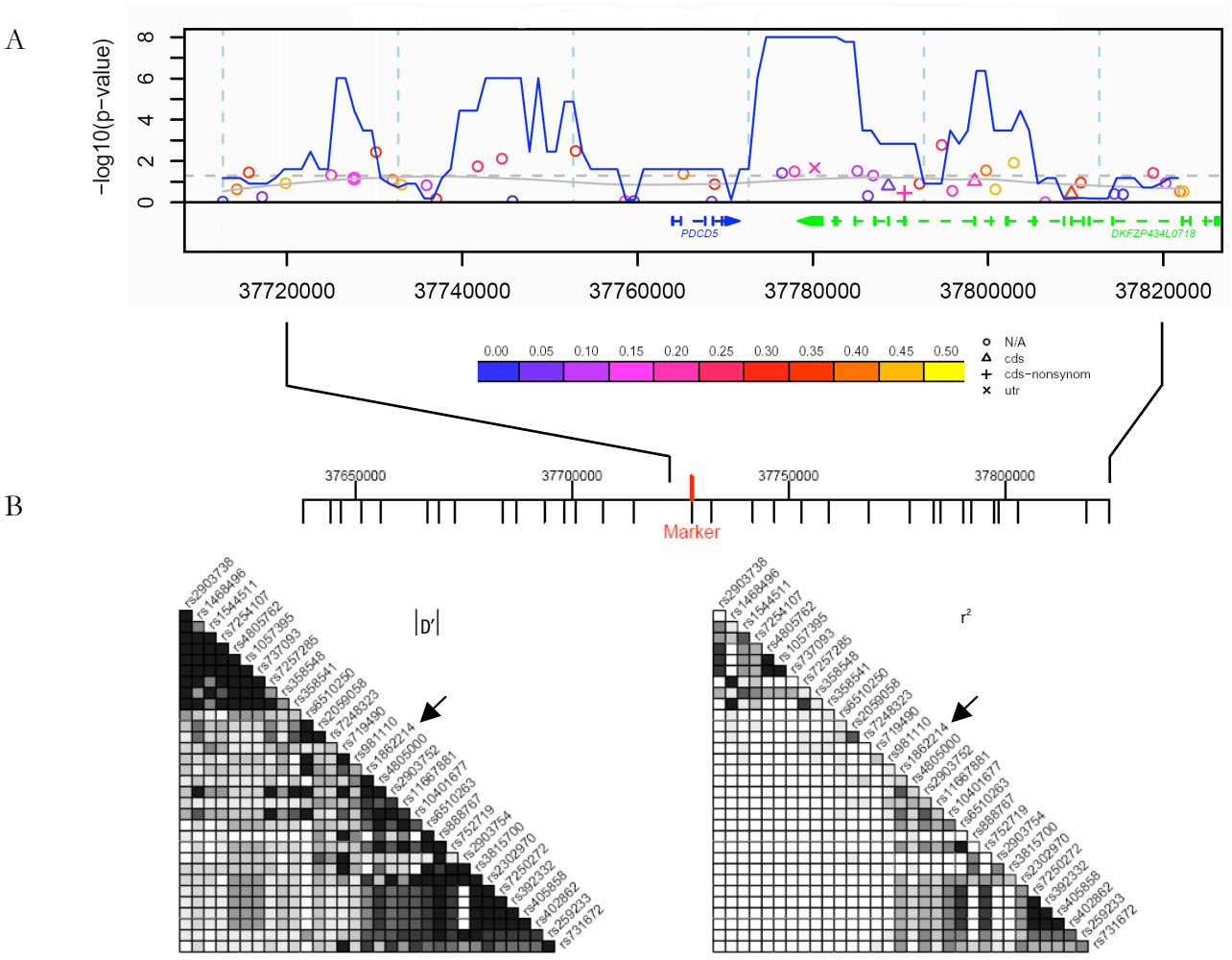


ABBILDUNG 7: FINE-MAPPING DER *PDCD5*-GENREGION AUF CHROMOSOM 19Q12-Q13.1

Legende:

(A) 45 zusätzliche SNPs, die innerhalb eines Fensters von 100 kb um den ursprünglichen Marker (roter Pfeil) gelegen waren, wurden auf Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppe getestet; 16 waren signifikant unterschiedlich bei einem p-Wert <0.05 (gestrichelte Linie). Die x-Achse zeigt die chromosomale Position, auf der y-Achse sind die p-Werte aufgetragen (-log10 Skala). Die graue durchgezogene Linie ist das Ergebnis einer nichtlinearen Ausgleichsfunktion und zeigt das gewichtete Mittel der p-Werte der Region. An der blauen durchgezogenen Linie lässt sich die Stärke der Signifikanz ablesen. Die Farbe der einzelnen Punkte entspricht der Häufigkeit des selteneren Allels jedes SNPs in der Kontrollgruppe.

(B) Schätzung des Kopplungsungleichgewichts (linkage disequilibrium, LD) in der *PDCD5*-Region, dargestellt in einer Grauskala von weiß (LD=0) bis schwarz (LD=1)

N/A: keine Spezifizierung
cds: Kodierende Sequenz (coding sequence)
cds-nonsynom: SNPs, die zwar in der kodierenden Sequenz liegen, jedoch nicht zu einer Änderung der Proteinsequenz führen
utr: nahe am Gen, in der cDNA, aber untranslatiert (untranslated region)

3.1.3 Einfluss des *rs1862214*-Polymorphismus auf die Prognose des Lungenkarzinoms

Weiterführende Untersuchungen des *rs1862214*-Polymorphismus im Hinblick auf prognostische Faktoren wurden in der italienischen Stichprobe unternommen. Es zeigten sich signifikante Zusammenhänge zwischen dem seltenen G-Allel und klinischem Stadium, Lymphknotenstatus und Überlebensrate.

Beim Vergleich von Patienten im Stadium I mit solchen in höheren Stadien zeigte sich eine statistisch signifikante Assoziation des G-Allel-Trägerstatus mit höheren klinischen Stadien (hazard ratio (HR)=1.9, 95 % KI: 1.1-3.4, p=0.023) (TABELLE 10). Lymphknotenmetastasen fanden sich öfter bei Patienten, die das G-Allel besaßen, als bei Patienten, die homozygot für C waren (HR=1.9; 95 % KI: 0.7-15.3; p=0.033) (TABELLE 9). Bezüglich der Überlebenszeiten konnte man signifikante Unterschiede zwischen den drei Genotypen feststellen (p=0.0013, log-rank Test). Die mediane Überlebenszeit bei den CC-Homozygoten betrug 79.8 Monate, bei den Heterozygoten 40.2 Monate und nur 19.0 Monate bei den GG-Homozygoten (ABBILDUNG 8).

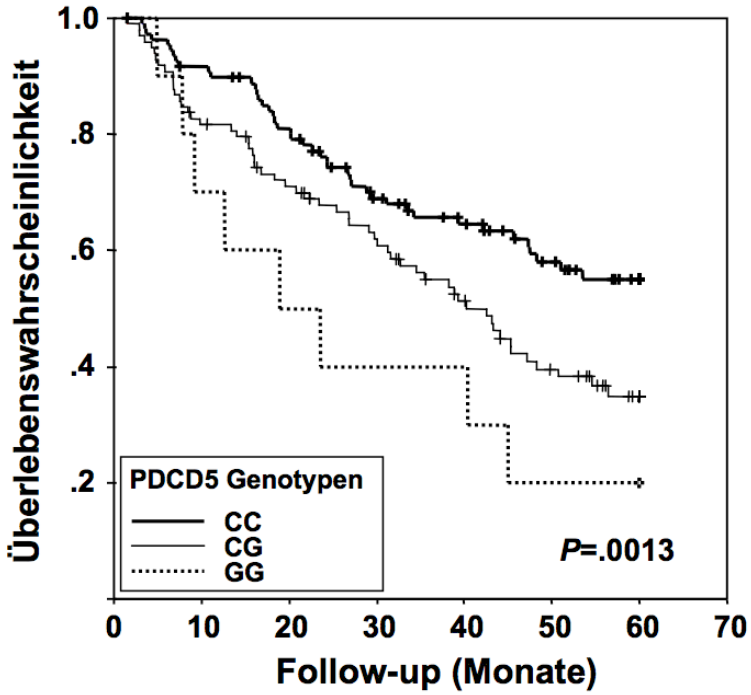


ABBILDUNG 8: KAPLAN-MEIER-ÜBERLEBENSKURVE (ITALIENISCHE STICHPROBE)

TABELLE 10: ASSOZIATION ZWISCHEN DEM *RS1862214*-POLYMORPHISMUS UND KLINISCH-PATHOLOGISCHEN MERKMALEN BEI ITALIENISCHEN LUNGENKARZINOM-PATIENTEN

Variable	*Genotyp*	*Anzahl der Patienten*	*Ereignisse* [a]	*hazard ratio (95 % KI)*
Überlebenszeit	CC	108	47	1.0
	CG	98	61	1.7 (1.2-2.5)
	GG	10	8	2.4 (1.1-5.6)
	CG oder GG	108	69	1.8 (1.2-2.6)
Klinisches Stadium [b]	CC	106	66	1.0
	CG	108	53	1.9 (1.1-3.4)
	GG	11	4	3.3 (0.7-15.3)
	CG oder GG	119	57	1.9 (1.1-3.4)
Lymphknoten-Status [c]	CC	106	77	1.0
	CG	101	63	1.9 (1.0-3.5)
	GG	10	4	5.2 (1.0-26.7)
	CG oder GG	111	67	1.9 (1.1-3.6)

a Anzahl der Todesfälle bzw. Anzahl der Patienten im klinischen Stadium I bzw. Anzahl der Patienten ohne Lymphknotenmetastasen

b Stadium I gegenüber höheren Stadien

c N_0 gegenüber $N \geq 1$

3.2 Komorbidität beim Lungenkarzinom

Die Auswertung der Fragebögen mit den anamnestisch erhobenen Daten erfolgte für ein deutsches Kollektiv, das die Teilnehmer der Initialstudie und einige weitere rekrutierte Patienten und Kontrollen einschloss. Es wurde ein besonderes Augenmerk auf das Rauchverhalten sowie auf Erkrankungen der Individuen selbst und deren Eltern gelegt (TABELLE 11).

TABELLE 11: VERGLEICH EINZELNER VARIABLEN ZWISCHEN FÄLLEN UND KONTROLLEN

	Fälle *n=369*	*Kontrollen* *n=287*	*p-Werte*
Alter ♦	59.82 – 65.45 – 71.72	53.88 – 62.98 – 71.27	p=0.00311 °
Geschlecht männlich	100 %	68 %	
Asthma	2 %	10 %	p<0.001 *
Diabetes	12 %	12 %	p=0.917 *
Herz-Kreislauf-Erkrankungen	27 %	24 %	p=0.479 *
Hypertonus	27 %	23 %	p=0.262 *
Asthma der Eltern	4 %	9 %	p=0.00293 *
Diabetes der Eltern	9 %	12 %	p=0.175 *
Herz-Kreislauf-Erkrankung der Eltern	16 %	14 %	p=0.412 *
Hypertonus der Eltern	8 %	10 %	p=0.249 *
Krebserkrankungen der Eltern	24 %	17 %	p=0.0342 *
Nichtraucher	0 %	0 %	
Rauchjahre ♦	25 – 30 – 40	20 – 29 – 40	p<0.001 °
Rauchmenge ♦	19 – 20 – 30	15 – 20 – 30	p=0.0341 °

♦ unteres Quartil – Median – oberes Quartil

* Chi^2-Test

° Wilcoxon-Test

Es zeigte sich, dass unter den Kontrollen, ebenso wie bei deren Eltern, signifikant häufiger eine Asthma-Erkrankung anzutreffen war. Für Diabetes, Herzerkrankungen und Hypertonus hingegen ließ sich kein Unterschied in der Erkrankungshäufigkeit zwischen Patienten- und Kontrollgruppe feststellen, ebenso wenig beim Vergleich der jeweiligen Elterngruppen.

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei der Häufigkeit des Vorkommens von Krebserkrankungen bei den Eltern. So war bei den Eltern der Patienten in 24 % der Fälle eine maligne Neoplasie diagnostiziert worden, bei den Eltern der Kontrollpersonen nur in 17 % (p=0.0342).

Bezüglich der Rauchgewohnheiten fand sich sowohl bei der Anzahl der Rauchjahre als auch bei der Menge der gerauchten Zigaretten ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen. Die Unterschiede lagen dabei eher im unteren Quartil, d. h. dass es unter den Kontrollen mehr Individuen gab, die kürzer und weniger rauchten als unter den Patienten.

4 Diskussion

4.1 Molekulargenetische Assoziationsstudie

Das einer molekulargenetischen Assoziationsstudie zugrunde liegende Prinzip ist einfach: tritt ein Allel an einer bestimmten Stelle des Genoms öfter bei Individuen mit einer Erkrankung auf als bei einer gesunden, hinreichend entsprechenden Kontrollgruppe, so nimmt man an, dass dieses Allel mit der Erkrankung assoziiert ist. Das Ziel einer molekulargenetischen Assoziationsstudie ist es demnach, solche Allele, die mit der Entstehung bzw. Entwicklung einer Erkrankung in Zusammenhang stehen, zu identifizieren. Dies erfolgt im Rahmen einer Fall-Kontroll-Studie beim Vergleich einer Patientengruppe mit einem gesunden Kollektiv. Ein Vorteil von Assoziationsstudien ist, dass sie sich im Gegensatz zum Beispiel zu genetischen Kopplungsanalysen hervorragend für die Erforschung nicht familiärer Erkrankungen eignen, in unserem Fall des sporadischen Lungenkarzinoms.

Man kann davon ausgehen, dass den familiären Formen zum Teil andere genetische Mechanismen zugrunde liegen, d. h. hier vermutlich monogene Mutationen eine größere Rolle spielen [38, 49]. Dennoch haben in beiden Fällen Umweltfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die Tumorentstehung. Eine Studie an eineiigen Zwillingen zeigte, dass beim Lungenkarzinom die erblichen Faktoren mit 26 % zum Entstehungsrisiko beitragen, die Umweltfaktoren hingegen mit 74 % [28]. Das Lungenkarzinom kann somit als Modell zur Beurteilung von Interaktionen zwischen Genen und Umwelt gelten [12]. Während sich die Durchführung von Studien zu den familiären Formen aufgrund der seltenen familiären Häufung und der sehr schlechten Prognose der Erkrankung schwierig gestaltet, ist die weit größere Anzahl der Lungenkarzinome als sporadisch anzusehen. Damit ist die Assoziationsstudie ein viel versprechender Weg zum besseren Verständnis interindividueller Unterschiede in der Prädisposition gegenüber einer durch Umwelteinflüsse induzierten Erkrankung.

4.1.1 Methodik und Teilnehmer

Die bisher vorherrschende Methode bei der Durchführung von Assoziationsstudien ist der Kandidatengen-Ansatz. Dabei erfolgte die Auswahl der Kandidaten in der Regel auf der Basis des Wissens um toxikologische und karzinogene Vorgänge. So wurden vornehmlich Gene untersucht, die z. B. mit der Metabolisierung von Karzinogenen, mit der DNA-Reparatur oder der Apoptose in Zusammenhang stehen [22, 26, 36, 37, 47, 48]. Der hier vorgestellten Assoziationsstudie zu den erblichen Faktoren des Lungenkarzinoms liegt ein anderer Ansatz zugrunde. Es

wurde hierbei eine Analyse von 83.715 SNPs, die über das gesamte Genom verteilt liegen, durchgeführt. Wie von Christiani [12] diskutiert, erfolgte dabei die Auswahl der SNPs zwar ohne vorherige Hypothesen über Stoffwechselweg und Funktion, jedoch auf der Basis einer von Nelson et al. entwickelten SNP-Landkarte mit 125.799 validierten Polymorphismen [32]. Die analysierten SNPs waren demnach alle genbasiert, d.h. sie lagen alle innerhalb eines für ein Gen kodierenden Bereiches. Der hier beschriebene *rs1862214*-Polymorphismus, der eine starke Assoziation mit einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko zeigt, liegt 35kb upstream des *PDCD5*-Gens.

Ein entscheidender Vorteil der hier angewandten Technik ist die Verwendung gepoolter DNA-Proben. Es wurden also vor der Durchführung von PCR, MassEXTEND-Reaktion und MALDI-TOF-Massenspektrometrie zwei DNA-Pools hergestellt, von denen der eine die DNA der Lungenkarzinompatienten, der andere die der karzinomfreien Kontrollgruppe in jeweils äquimolaren Anteilen enthielt. Die nachfolgenden Verfahrensschritte mussten folglich nicht für jede DNA-Probe einzeln durchgeführt werden, was eine enorme Reduktion der anfallenden Kosten erlaubt. In Anbetracht dessen, dass genomweite SNP-Analysen auch in den nächsten fünf bis zehn Jahren zum Goldstandard bei der Suche nach genetischen Variationen, die das Risiko für weit verbreitete Erkrankungen erhöhen können, gehören werden [23], ist diese kosteneffiziente Form der DNA-Analyse sicher von nennenswertem Vorteil.

Unterzieht man die Studienteilnehmer einer genaueren Betrachtung, so ist zu bemerken, dass es sich in den jeweiligen Studien um sehr homogene Gruppen handelt, so dass sich Patienten und Kontrollen bezüglich Herkunft, Geschlecht, Rauchstatus und im Falle der Initialstudie auch im Alter nicht signifikant unterscheiden. Damit wird den diesbezüglichen Anforderungen an eine Fall-Kontroll-Studie hinreichend entsprochen. Lediglich beim italienischen Kollektiv der Replikationsstudie besteht ein signifikanter Unterschied im Alter zwischen Patienten und Kontrollen. Dies könnte die Untersuchungsergebnisse insofern beeinflussen, als der Altersgipfel des Lungenkarzinoms zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr liegt und nicht auszuschließen ist, dass einige der Kontrollen mit fortschreitendem Alter ein Lungenkarzinom entwickeln. Wäre dies der Fall, wäre unter Umständen der Trägerstatus des G-Allels in der Kontrollgruppe nicht repräsentativ für die gesunde Bevölkerung ohne Lungenkarzinom. Die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie wird dadurch jedoch sicher nicht im Wesentlichen tangiert.

Zu diskutieren ist in diesem Zusammenhang, inwieweit die Heterogenität der Tumoren auf die Assoziationen Einfluss nimmt. Während es sich bei den Teilnehmern der Replikationsstudie ausschließlich um Patienten mit Adenokarzinom handelt, sind bei den Tumoren der Initialstudie alle histologischen Subtypen vertreten. Dies ist für solcherart Studien ein ungewöhnlicher Ansatz, in vergleichbaren Studien werden bevorzugt Patienten mit einheitlichen Tumoren untersucht [47, 48]. Der Entscheidung, in die Initialstudie alle Tumorsubtypen aufzunehmen, liegt das Streben

nach möglichst wenig Vorauswahl bei der Erfassung des Risikos für ein nicht-familiär auftretendes Lungenkarzinom zugrunde. Zur weiteren Differenzierung des Risikos bezüglich der verschiedenen Subklassen sind sicher nachfolgende Studien wünschenswert.

Eine weitere wichtige Frage ist die nach dem Einfluss des Rauchverhaltens der Studienteilnehmer auf die Ergebnisse der Studie. In der Initialstudie werden ausschließlich Raucher zugelassen, während im italienischen Kollektiv bei Patienten und Kontrollen sowohl Raucher als auch Nichtraucher vertreten sind, womit die entsprechenden Gruppen jeweils hinreichend homogen sind. Inwieweit ein Zusammenhang besteht zwischen den Rauchgewohnheiten und der Risikomodifizierung im Hinblick auf die Assoziation zum *PDCD5*-Gen, muss Gegenstand weiterer Untersuchungen bleiben (siehe hierzu auch unter 4.1.4).

Was die Unterschiede der beiden Studienpopulationen betrifft, so unterstreichen diese die Bedeutung der Assoziation des *rs1862214*-Polymorphismus zum Lungenkarzinomrisiko in verschiedenen Populationen.

4.1.2 Validität der Assoziationen

Bei der Durchführung von Assoziationsstudien ist zu beachten, dass eine offensichtliche Assoziation nicht unbedingt kausal relevant sein muss. Eine dem Anschein nach vorhandene Assoziation kann möglicherweise auf einem statistischen Fehler beruhen, d. h. dass bei einer genügend großen Menge an untersuchten Markern rein zufällig einer oder mehrere eine offensichtliche statistische Assoziation mit der Erkrankung zeigen. In unserer Studie wurden verschiedene Maßnahmen unternommen, um diesen Fehler zu vermeiden und die gefundenen Assoziationen zu validieren (ABBILDUNG 9). Durch die genomweite Analyse von 83.715 SNPs wurden zunächst 160 Polymorphismen identifiziert, die einen signifikanten Unterschied im Patienten- und Kontrollpool aufwiesen. Diese wurden zunächst drei weitere Male in denselben Pools getestet. Für die nach dreimaliger Messung statistisch signifikant dem Lungenkarzinom assoziierten SNPs wurden dann individuelle Genotypisierungen durchgeführt. Die dadurch in ihrer Signifikanz bestätigten Assoziationen wurden daraufhin in einer unabhängigen Stichprobe italienischer ADCA-Patienten auf Replizierbarkeit überprüft. Dies gelang für fünf SNPs, u. a. für den hier beschriebenen *rs1862214*-Polymorphismus, der die stärkste Assoziation zum Lungenkarzinomrisiko aufwies. Methodisch wurden damit die neuesten Richtlinien für molekulargenetische Assoziationsstudien beispielhaft erfüllt [13, 15].

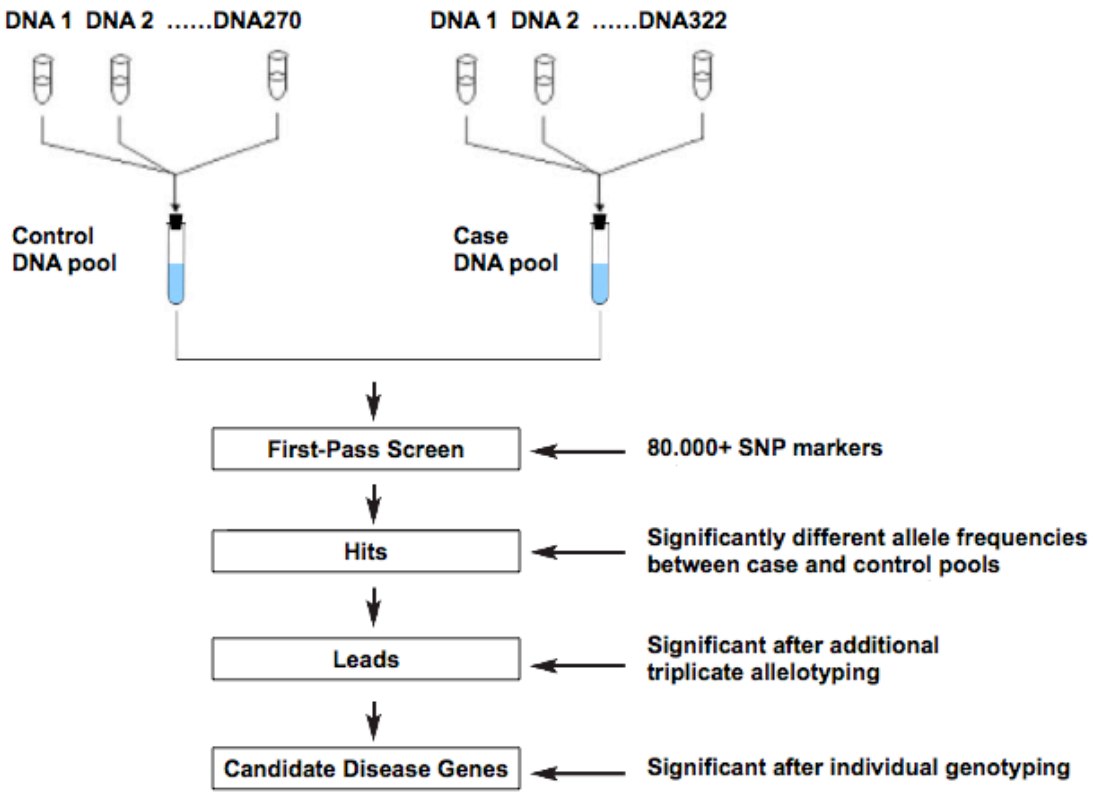


ABBILDUNG 9: ANALYTISCHER PROZESS

4.1.3 Das *PDCD5*-Gen

Nach Auffinden einer Assoziation ist nach der Prüfung deren Validität im Weiteren zu untersuchen, ob der entsprechende Polymorphismus ursächlich an der Risikomodifizierung beteiligt ist, etwa durch Beeinflussung der Genexpression, oder ob es sich vielmehr um eine Assoziation handelt, die zwischen dem Erkrankungsrisiko und einem mit dem Marker in Kopplungsungleichgewicht liegenden Allel besteht. In der hier beschriebenen Studie wurde der Bereich um die gefundene Assoziation mittels Fine Mapping genauer untersucht. Dabei erstreckte sich die Region mit der höchsten Signifikanz über eine Länge von ca. 80 kb und enthielt das *PDCD5*-Gen und das 3´-Ende des Ankyrin repeat domain 27 (*ANKRD27*)-Gens. Damit bestätigten sich die Daten des International HapMap Consortiums, denen zufolge der in dieser Studie gefundene, dem Lungenkarzinom assoziierte Polymorphismus *rs1862214* im Kopplungsungleichgewicht mit dem *PDCD5*-Gen (MIM# 604583) liegt.

Während man über die Funktion des *ANKRD27* kaum etwas weiß – in PubMed findet sich bis dato keine einzige Veröffentlichung zu diesem Gen –, ist über das *PDCD5* bekannt, dass es an

der Regulation der Apoptose beteiligt ist. Es wird in Zellen, die sich in Apoptose befinden, signifikant vermehrt exprimiert. Es wird beschrieben, dass das Protein vom Zytoplasma in den Zellkern übertritt, daraufhin Phosphatidylserin freigesetzt und die chromosomale DNA der Zelle fragmentiert wird [10]. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Einbringen eines *PDCD5*-Antikörpers in die Zelle die Apoptose unterdrückt, was die Vermutung über die vermeintliche Bedeutung von *PDCD5* in diesem Prozess bestärkt [35]. Diese Kenntnisse machen es sehr wahrscheinlich, dass es das *PDCD5*-Gen ist, welches für die Modifikation des Lungenkarzinomrisikos in Zusammenhang mit der Assoziation zum Genlokus 19q12-q13.1 verantwortlich ist. Weitere Untersuchungen zu den genauen molekularen Mechanismen sind jedoch notwendig. Insbesondere muss untersucht werden, ob sich Zellen mit dem Risikogenotyp in Bezug auf die Apoptose von Zellen mit dem Wildtyp von *PDCD5* unterscheiden.

Eine weitere wichtige Fragestellung ist, inwieweit in diesem Kontext bei der Risikomodifizierung ein Zusammenhang mit Zigarettenrauch besteht, d. h. inwieweit die Interaktion von Genen und Umwelt hier eine Rolle spielt. Dazu ist es zum einen notwendig, mehr über die biologischen Funktionen des *PDCD5* zu erfahren, zum anderen könnte in der Assoziationsstudie eine Differenzierung zwischen Rauchern und Nichtrauchern erste Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Risikogenotyp und der Exposition gegenüber dem Karzinogen geben. Dies ist in der hier beschriebenen Studie nicht gewährleistet, da es sich bei den Teilnehmern der Initialstudie ausschließlich um Raucher handelt und auch in der Replikationsstudie nicht zwischen Rauchern und Nichtrauchern differenziert wird. Um jedoch eine sinnvolle Aussage bezüglich der Gen-Umwelt-Interaktion treffen zu können, braucht es speziell dafür entworfene Studien an weit größeren Kollektiven, in denen sowohl den molekularbiologischen als auch den epidemiologischen Faktoren entsprechend Rechnung getragen wird [23].

4.1.4 Prognostischer Einfluss des *rs1862214*-Polymorphismus

Für das italienische Kollektiv der Replikationsstudie wurden Daten zu möglichen prognostischen Faktoren in Zusammenhang mit dem *rs1862214*-Polymorphismus untersucht. Dabei zeigte sich, dass der G-Allel-Trägerstatus mit höherem klinischem Stadium, vermehrtem Lymphknotenbefall und geringerer Überlebenszeit einhergeht. Die Tatsache, dass unter den Patienten mit Lungenkarzinom, die das G-Allel aufwiesen, der Tumor bereits höhere Stadien erreicht hatte, kann ein Hinweis sein auf die Bedeutung des *rs1862214*-Polymorphismus im Zusammenhang zum Beispiel mit der Tumorentstehung bzw. dem Tumorwachstum. Dass bei höheren Tumorstadien auch vermehrt Lymphknotenbefall nachgewiesen werden kann, ist nicht überraschend, ebenso wenig

die entsprechend geringere Lebenserwartung. Es können daraus keine weiterführenden Schlussfolgerungen bezüglich des Einflusses des *rs1862214*-Polymorphismus auf die Prognose des Lungenkarzinoms gezogen werden [12].

4.2 Wertigkeit der Fragebogen-Auswertung

Die anamnestische Erhebung von Daten im Rahmen der Aufklärung der Studienteilnehmer für die Initialstudie diente mehreren Zwecken. Zum einen sollte sichergestellt werden, dass sich, den Ansprüchen einer Fall-Kontroll-Studie entsprechend, Patienten und Kontrollen möglichst nur bezüglich des zu untersuchenden Merkmals unterscheiden. Aus allen rekrutierten Patienten und Kontrollen wurden deshalb nur diejenigen für die Teilnahme an der Studie ausgewählt, die den gestellten Kriterien entsprachen. Besonders wurde dabei auf Herkunft und Rauchstatus geachtet. Alle Teilnehmer waren deshalb Raucher und von ihrer Abstammung her weiße Europäer.

Das zweite Ziel der Datenerhebung anhand der Fragebögen war die Ermittlung weiterer Merkmale, die mit dem Lungenkarzinom gehäuft in Verbindung stehen. Als Grundlage hierfür dienten die erfragten Daten der potentiell für die Teilnahme an der Initialstudie geeigneten Personen (369 Lungenkarzinompatienten und 287 Kontrollen) (TABELLE 11). Auffällig war dabei unter anderem das statistisch signifikant häufigere Auftreten von Asthma bei den Kontrollpersonen und deren Eltern im Vergleich zu den Patienten. Da ein wesentlicher Anteil der Kontrollpersonen Patienten in den Lungenfachkliniken in Gerlingen und München, jedoch nicht an einem Lungenkarzinom erkrankt waren, handelt es sich hierbei vermutlich um einen methodischen Fehler, da bei der Population, aus der die Stichprobe stammt, häufiger eine Asthmaerkrankung vorlag als in der Normalbevölkerung. Die höhere Prävalenz von Asthma bei den Eltern lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis, wie zum Beispiel dem allergischen Asthma, um familiär gehäuft auftretende, also genetisch determinierte, zumindest aber multifaktorielle Erkrankungen mit wahrscheinlich starker genetischer Beteiligung handelt [20].

Eine weitere Auffälligkeit ist die offensichtliche Assoziation von elterlichen Krebserkrankungen und dem Vorkommen eines Lungenkarzinoms. Zwar handelte es sich bei den ausgewählten Patienten um sogenannte sporadische Formen des Lungenkarzinoms, d. h. es war keine familiäre Häufung von Lungentumoren detektierbar. Jedoch zeigte sich eine statistisch signifikante Häufung anderer Tumoren bei den Eltern der Patienten im Vergleich zu den Eltern der Kontrollen. Dies weist darauf hin, dass die Anfälligkeit für Neoplasien im Allgemeinen eine familiäre Häufung zeigt, was wiederum nahe legt, dass die Ursache dieser zellulären Vulnerabilität auch erblich bzw. genetisch bedingt sein kann. Dabei wird von familiären Tumorsyndromen bisher nur dann

gesprochen, wenn ein autosomal-dominanter Erbgang zugrunde liegt, wie zum Beispiel beim Li-Fraumeni-Syndrom (*p53*-Gen). Es kann jedoch anhand von suffizient durchgeführten Familienanamnesen oder Stammbaumanalysen durchaus ein gehäuftes Auftreten von Tumoren gefunden werden, ohne dass dabei das Vererbungsmuster, das betroffene Gen oder eine Mutation bekannt sein muss [17]. Zum einen wird daran deutlich, dass wir über die Mechanismen der Tumorentstehung und das Zusammenwirken unterschiedlichster Faktoren nach wie vor nur sehr wenig wissen. Es stellt sich in diesem Zusammenhang auch die Frage, ob die klassische Unterscheidung zwischen familiären und sporadischen Tumoren bezüglich der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen überhaupt weiterhin gültig sein kann. Zum anderen ergeben sich aus dem zunehmenden Bewusstsein um die Bedeutung der familiären Häufung von Tumoren außerhalb der sogenannten Tumorsyndrome neue Herausforderungen für die genetische Beratung von Patienten mit familiärem Krebsrisiko [17].

4.3 Bedeutung und Aussichten

Das Lungenkarzinom steht weltweit an der Spitze der zum Tode führenden Krebserkrankungen [26, 36]. Dabei sind in den letzten 50 Jahren kaum Fortschritte in der Erkennung und Behandlung dieser Erkrankung zu verzeichnen gewesen [2]. Der einzige kurative Ansatz ist die frühe operative Entfernung des Tumors [42]. Dafür ist die Früherkennung unabdingbare Voraussetzung. Die American Cancer Society (ACS) empfiehlt jedoch bis dato für asymptomatische Personen keine Früherkennungsmaßnahmen für das Lungenkarzinom, da die meisten Untersuchungsverfahren nur limitiert erfolgreich und dabei potentiell schädlich sind [40]. So wird in mehreren Studien die geringe Sensitivität von Thorax-Röntgenaufnahmen und Sputumzytologie beschrieben. Im Gegensatz dazu wird aber zum Beispiel der kombinierten Anwendung von Niedrig-Dosis-Computertomographie (CT) und Positronenemissionstomographie (PET) eine hohe Effektivität in der Früherkennung von Lungentumoren zugeschrieben [34]. Dabei ist es jedoch aus Kostengründen und wegen der Strahlenbelastung notwendig, nur Patienten für diese Untersuchung auszuwählen, die ein erhöhtes Risiko für ein Lungenkarzinom haben. Hier könnte die Erkennung genetischer Prädispositionen zu einer sinnvollen Vorauswahl von Risikopatienten, die weiteren Früherkennungsmaßnahmen zugeführt werden, beitragen. Die Identifizierung des *PDCD5*-Gens als potentielles Tumorsuppressorgen für das Lungenkarzinom könnte dabei ein Schritt zum effektiven Screening von Risikopatienten sein. Vielleicht wird es später möglich sein, alle identifizierten oder zumindest den wichtigsten Anteil der genetischen Dispositionen für das Lungenkarzinom auf einem Chip zu repräsentieren und bei Risikopersonen wie Rauchern oder

auch in der Allgemeinbevölkerung zu testen. Ab einer gewissen Risikoschwelle könnten dann gezielte Vorsorgeuntersuchungen zur Früherkennung von Lungenkrebs angeboten und die dringliche Empfehlung zum Nichtrauchen ausgesprochen werden.

Jedoch nicht nur die Früherkennung, auch eine gezielte Therapie nimmt Einfluss auf die Prognose des Lungenkarzinoms [42]. Für eine gezielte Therapie, die die Prognose verbessern kann, ist es notwendig, die genauen Mechanismen der Karzinogenese besser zu erkennen und zu verstehen [21]. Die in unserer hier beschriebenen Studie gewonnenen Erkenntnisse über eine potentielle Beteiligung des *PDCD5*-Gens in der Tumorgenese des Lungenkarzinoms können zu einem besseren Verständnis der molekularen Mechanismen führen und damit zur Entwicklung gezielter Therapien beitragen.

Eine entscheidende Bedeutung kommt bei den Bemühungen um die öffentliche Gesundheit neben der Früherkennung und der Therapie der Vermeidung des Lungenkarzinoms zu. Der Hauptaspekt der primären Prävention ist das Meiden aller exogenen Risikofaktoren. Die ACS empfiehlt daher allen Rauchern, das Rauchen aufzugeben, da dies der sicherste Weg ist, das Risiko zu verkleinern, an einem Lungenkarzinom zu erkranken [40]. Die Dringlichkeit dieser Empfehlung kann – nach dem Modell der multifaktoriellen Entstehung des Lungenkarzinoms – durch den Nachweis einer genetischen Prädisposition, wie es in unserer Studie gelungen ist, unterstrichen werden. Dies wird unter Umständen die Motivation des Betroffenen, mit dem Rauchen aufzuhören bzw. erst gar nicht damit anzufangen, entscheidend steigern und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Primärprävention des Lungenkarzinoms.

5 Zusammenfassung

In der hier beschriebenen genomweiten Assoziationsstudie mit 322 süddeutschen Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkarzinom und 270 Kontrollen wurden 83.715 validierte genbasierte SNPs auf eine Assoziation mit einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko untersucht. Dazu wurden zunächst DNA-Pools bereitet, zur Amplifikation PCRs durchgeführt und mittels Mass-EXTEND-Reaktion allelspezifische Produkte hergestellt. Anschließend erfolge die Testung auf Assoziationen mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie. Es wurden dabei 160 chromosomale Regionen identifiziert, die mit dem sporadischen Lungenkarzinom assoziiert sind. Die Replikation dieser Ergebnisse für fünf SNPs in einem unabhängigen italienischen Kollektiv verifizierte die Validität der beobachteten Assoziationen und deren Bedeutung in verschiedenen Populationen.

Die stärkste Assoziation zum Lungenkarzinom zeigte ein genetischer Polymorphismus (*rs1862214*-SNP), der 35 kb vom *PDCD5*-Gen entfernt auf dem langen Arm von Chromosom 19 (19q12-q13.1) liegt. Die Assoziation wurde zuerst in einer Stichprobe süddeutscher Lungenkarzinom-Patienten beobachtet und später in einem unabhängigen Kollektiv italienischer Patienten mit Adenokarzinom der Lunge bestätigt. Dies weist auf eine wichtige Rolle dieser chromosomalen Region bei der Prädisposition für das Lungenkarzinom hin. Im Kollektiv der Replikationsstudie (250 Patienten, 233 Kontrollen), für das Follow-up-Daten verfügbar waren, stand dasselbe Allel, das mit einem erhöhten Lungenkarzinomrisiko assoziiert war, auch in Zusammenhang mit einer geringeren Überlebenszeit, einem höheren klinischen Stadium und einem vermehrten Lymphknotenbefall. Diese Beobachtung stützt die Annahme über eine Beteiligung der *PDCD5*-Genregion an der Ätiologie des Lungenkarzinoms.

Obwohl die genauen molekularen Mechanismen, die für die Einflüsse des *rs1862214*-SNP bzw. des *PDCD5*-Gens auf Risiko und Prognose des Lungenkarzinoms verantwortlich sind, noch weiter untersucht werden müssen, können die Ergebnisse dieser Studie zu einer besseren Vorhersage des Lungenkarzinomrisikos und damit verbunden zu einer effektiveren primären und sekundären Prävention führen.

Die Auswertung der anamnestisch erhobenen Daten von 369 Lungenkarzinompatienten und 287 Kontrollen ergab eine signifikante Assoziation zwischen parentalen Krebserkrankungen und dem Risiko, an einem Lungenkarzinom zu erkranken. Dies unterstreicht zusätzlich die Bedeutung erblicher Prädispositionen bei der Entstehung von Tumoren und die daraus sich ergebende Notwendigkeit weiterer Forschung in der Molekularen Onkogenetik.

6 Anhang

6.1 Literaturverzeichnis

1 Bansal A, van den Boom D, Kammerer S, Honisch C, Adam G, Cantor CR, Kleyn P, Braun A. *Association testing by DNA pooling: an effective initial screen.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 2002;99:16871-16874

2 Bailey-Wilson JE et al. *A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23-25.* Am.J.Hum.Genet. 2004;75:000-000

3 Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Hirvonen A. *Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase types.* Cancer Res 1998;58:5291-5293

4 Benjamini Y, Hochberg Y. *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing.* J.R.Statist.Soc 1995;57:289-300

5 Blot WJ, McLaughlin JK. *Passive smoking and lung cancer risk: what is the story now?* J Natl Cancer Inst 1998;90:1416-1417

6 Boveri T. *Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren.* Gustav Fischer, Jena 1914. English translation: Williams and Wilkins (1929, Baltimore). *The origin of malignant tumors by Boveri*

7 Bromen K, Pohlabeln H, Jahn I, Ahrens W, Jöckel KH. *Aggregation of lung cancer in families: results from a population-based case-control study in Germany.* Am J Epidemiol 2000;152:497-505

8 Buetow KH et al. *High-throughput development and characterization of a genomewide collection of gene-based single nucleotide polymorphism markers by chip-based matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry.* Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 2001;98:581-584

9 Cajas-Salazar N, Au WW Zwischenberger JB, Sierra-Torres CH, Salama SA, Alpard SK, Tyring SK. *Effect of epoxide hydrolase polymorphisms on chromosome aberrations and risk of lung cancer.* Cancer Genet Cytogenet 2003;145:97-102

10 Chen Y, Sun R, Han W, Zhang Y, Song Q, Di C, and Ma D. *Nuclear translocation of PDCD5 (TFAR19): an early signal for apoptosis?* FEBS Lett. 2001;509:191-196

11 Chikako Kiyohara, Akiki Otsu, Taro Shirakawa, Sanae Fukuda, Julian M. Hopkin. *Genetic polymorphisms and lung cancer susceptiility: a review.* Lung Cancer 2002;37:241-256

12 Christiani DC. *Genetic susceptibility to lung cancer.* J Clin Oncol 2006;24(11):1651-1652

13 Ehm MG, Nelson MR, Spurr NK. *Guidelines for conducting and reporting whole genome/large-scale association studies.* Hum Mol Genet 2005;14(17):2485-2488

14 Fang S, Jin X, Wang R, Li Y, Guo W, Wang N, Wang Y, Wen D, Wie L, Zhang J. *Polymorphisms in the MMP1 and MMP3 promoter and non-small cell lung carcinoma in north China.* Carcinogenesis 2005;26:481-486

15 Freimer NB, Sabatti C. *Guidelines for assiciation studies in Human Molecular Genetics.* Hum Mol Genet 2005;14(17):2481-2483

16 Gsur A, Zidek T, Schnattinger K, Feik E, Haidinger G, Hallaus P, Mohn-Staudner A, Armbruster C, Madersbacher S, Schatzl g, et al. *Association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk.* Br J Cancer 2003;89:702-706

17 Hemminki K, Eng C. *Clinical genetic counselling for familial cancers requires reliable data on familial cancer risks and general action plans.* J Med Genet 2004;41:801-807

18 Hemminki K, Li X. *Familial risk for lung cancer by histology and age of onset: evidence for recessive inheritance.* Exp. Lung Res. 2005;31(2):205-215

19 Hemminki K, Rawal R, Chen B, Bermejo JL. *Genetic epidemiology of cancer: from families to heritable genes.* Int J Cancer 2004;111(6):944-950

20 Howard DT, Meyers DA, Bleecker ER. *Mapping susceptibility genes for allergic diseases.* Chest 2003;123(3 Suppl):363S-368S

21 Huber R.M., Stratakis D.F. *Molecular oncology – perspectives in lung cancer.* Lung Cancer 2004;45 Suppl 2:209-213

22 Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. *Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review.* Am J Epidemiol 2005;162(10):925-42

23 Hunter DJ. *Gene-environment interactions in human diseases.* Nat Rev Genet2005;6:287-298

24 Knudson AG. *Chasing the cancer demon.* Annu.Rev.Genet. 2000;34:1-19

25 Knudson AG. *Two genetic hits (more or less) to cancer.* Nat Rev Cancer 2001;1:157-162

26 Kiyohara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin JM. *Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review.* Lung cancer 2002;37(3):241-256

27 Lee WJ, Brennan P, Boffetta P, London SJ, benhamou S, Rannug A, To-Figueras J, Ingelmann-Sundberg M, Shields P, Gaspari L, et al. *Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk: a quantitative review.* Biomarkers 2002;7:230-241

28 Lichtenstein P, Holm N, Verkasalo P, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. *Environmental and heritable factors in the causation of cancer.* N Engl J Med 2000;343:78-85

29 Liu H, Wang Y, Zhang Y, Song Q, Di C, Chen G, Tang J, and Ma D. *TFAR19, a novel apoptosis-related gene cloned from human leukemia cell line TF-1, could enhance apoptosis of some tumor cells induced by growth factor withdrawal.* Biochem.Biophys.Res Commun. 1999;254:203-210

30 London SJ, Smart J, Daly AK. *Lung cancer risk in relation to genetic polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase among African-Americans and Caucasians in Los Angeles County.* Lung cancer 2000;28:147-155

31 Meyer P, Boettger MB, Guenther B, Haeussinger K. *Effiziente Erfassung von Patienten mit erblichen Tumorsyndromen.* DBI Der Bayer Intern 2005;25(3):142-146

32 Nelson MR, Marnellos G, Kammerer S, et al. *Large-scale validation of single nucleotide polymorphisms in gene regions.* Genome Res 2004;14:1664-1668

33 Park JY, Chen L, Elahi A, Lazarus P, Tockman MS. *Genetic analysis of microsomal epoxide hydrolase gene and ist association with lung cancer risk.* Eur J Cancer Prev 2005;14:223-230

34 Pastorino U et al. *Early lung-cancer detection with spiral CT and positron emission tomography in heavy smokers: 2-year results.* The Lancet 2003;362:593-97

35 Rui M, Chen Y, Zhang Y, and Ma D. *Transfer of anti-TFAR19 monoclonal antibody into HeLa cells by in situ electroporation can inhibit the apoptosis.* Life Sci. 2002;71:1771-1778.

36 Schwartz AG. *Genetic predisposition to lung cancer.* Chest 2004;125:86S-89S

37 Schwartz AG, Ruckdeschel JC. *Familial lung cancer: genetic susceptibility and relationship to chronic obstructive pulmonary disease.* Am J Respir Crit Care Med 2006;173:16-22

38 Sellers TA, Bailey-Wilson JE, Elston RC, Wilson AF, Ooi WL, Rothschild H. *Evidence for Mendelian inheritance in the pathogenesis of lung cancer.* J Nat Cancer Inst 1990;82:1272-1279

39 Shopland, D.R., Eyre H.J., and Pechacek, T.F. *Smoking-attributable cancer mortality in 1991: Is lung cancer now the leading cause of death among smokers in the United States?* J. Natl. Cancer Inst. 1991;83:1142-1148

40 Smith RA, Cokkiniddes V, Eyre HJ. *American Cancer Society Guidelines for the Early Detection of Cancer, 2004.* CA Cancer J Clin 2004;54:41-52

41 Spinola M, Meyer P, Kammerer S, Falvella FS, Boettger MB, Hoyal CR, Pignatiello C, Fischer R, Roth RB, Pastorino U, Haeussinger K, Nelson MR, Dierkesmann R, Dragani TA, Braun A. *Association of the PDCD5 locus with lung cancer risk and prognosis in smokers.* J Clin Oncol 2006;24(11):1672-1678

42 Spira A, Ettinger DS. *Multidisciplinary Management of Lung Cancer.* N Engl J Med. 2004;350 (4):379-392

43 Tang K, Oeth P, Kammerer S, Denissenko MF, Ekblom J, Jurinke C, van den Boom D, Braun A, Cantor CR. *Mining Disease Susceptibility Genes through SNP Analyses and Expression Profiling Using MALDI-TOF Mass Spectrometry.* Journal of Proteome Research 2004;3:218-227

44 The International HapMap Consortium. *The International HapMap Project.* Nature 2003;426:789-796

45 Werner M, Sych M, Herbon N, Illig T, Koenig JR, Wjst M. *Large-scale determination of SNP allel frequencies in DNA pools using MALDI-TOF mass spectrometry.* Hum.Mut. 2002;20:57-64

46 Wu X, Gwyn K, Amos CI, Makan N, Hong WK, Spitz MR. *The association of microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in African-Americans and Mexican-Americans.* Carcinogenesis 2001;22:923-928

47 Yanagitani N, Kohno T, Sunaga N, Kunitoh H, Tamura T, Tsuchiya S, Saito R, Yokota J. *Localisation of human lung adenocarcinoma susceptibility locus, possibly syntenic to the mouse Pas1 locus, in the vicinity of the D12S1034 locus on chromosome 12p11.2-p12.1.* Carcinogenesis 2002;23:1177-1183

48 Yanagitani N, Kohno T, Kim J-G, Kunitoh H, Tamura T, Takei Y, Tsuchiya S, Saito R, Yokota J. *Identification of D19S246 as a novel lung adenocarcinoma susceptibility locus by genome survey with 10-cM resolution microsatellite markers.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2003;12:366-371

49 Yang P, Schwartz AG, McAllister AE, Swanson GM, Aston CE. *Lung cancer risk in families of nonsmoking probants: heterogeneity by age at diagnosis.* Genet Epidemiol 1999;17:253-273

50 Yang P, Wentzlaff KA, Katzmann JA, Marks RS, Allen MS, Lesnick TG, Lindor NM, Myers JL, Wiegert E, Midthun DE et al. *Alpha1-antitrypsin deficiency allele carriers among lung cancer patients.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1999;8:461-465

51 Yu C, Pan K, Xing D, Liang L, Lin D. *Correlation between a single polymorphism in the matrix metalloproteinase-2 promoter and risk of lung cancer.* Cancer Res 2002;62:6430-6433

52 Zhao H, Spitz MR, Gwyn KM, Wu X. *Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk in non-Hispanic whites.* Mol Carcinog 2002;33:99-104

53 Zhu Y, Spitz MR, Lei L, Mills GB, Wu X. *A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 promotor enhances lung cancer susceptibility.* Cancer Res 2001;61:7825-7829

54 Zhou W, Thurston SW, Liu G, Xu LL, Miller DP, Wain JC, Lynch TJ, Su K, Christiani DC. *The interaction between microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and cumulative cigarette smoking in different histologic subtypes of lung cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2001;10:461-466

55 Zienolddiny S, Ryberg D, Maggini V, Skaug V, Canzian F, Haugen A. *Polymorphisms of the interleukin-1 β gene are associated with increased risk of non-small cell lung cancer.* Int J Cancer 2004;109:353-356

56 http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa1/.pl

57 http://www.krebshilfe.de

58 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_summary.cgi

59 http://ncbi.nlm.nih.gov/SNP/get_html.cgi?whichHtml=faq

6.2 Abkürzungsverzeichnis

ACS	American Cancer Society
ADCA	Adenokarzinom (Adenocarcinoma)
LC	Lungenkarzinom
CT	Computertomographie
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylen-Diamine-Tetra-Azetat
kb	Kilobasen
KI	Konfidenzintervall
LD	Linkage Disequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
MALDI-TOF-MS	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight-Massenspektrometrie
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (Non Small Cell Lung Carcinoma)
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDCD5	Programmed Cell Death 5
PET	Positronenemissionstomographie
SCLC	Kleinzelliges Lungenkarzinom (Small Cell Lung Carcinoma)
SNPs	Single Nucleotid Polymorphismen
SQCC	Plattenepithelkarzinom (Squamous Cell Carcinoma)

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ausgewählte Assoziationsstudien zu Polymorphismen in Kandidatengenen für Phase I und II Enzyme (aus: CHEST 2004; 125:86S-89S (eigene Übersetzung))

Tabelle 2: Ausgewählte Assoziationsstudien in Kandidatengenen für das Lungenkarzinom

Tabelle 3: Charakteristika beider Stichproben

Tabelle 4: Charakteristika der Patienten beider Stichproben

Tabelle 5: Absolute Genotyphäufigkeiten *rs1862214* (*PDCD5*)

Tabelle 6: Relative Häufigkeiten *rs1862214* (*PDCD5*)

Tabelle 7: Test auf Assoziation für das G-Allel (süddeutsche Stichprobe) *rs1862214* (*PDCD5*)

Tabelle 8: Test auf Assoziation für das G-Allel (italienische Stichprobe) *rs1862214* (*PDCD5*)

Tabelle 9: Test auf Assoziation für das G-Allel (gesamt) *rs1862214* (*PDCD5*)

Tabelle 10: Assoziation zwischen dem *rs1862214*-Polymorphismus und klinisch-pathologischen Merkmalen bei italienischen Lungenkarzinompatienten

Tabelle 11: Vergleich einzelner Variablen zwischen Fällen und Kontrollen

6.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Fragebogen Bronchialkarzinom

Abbildung 2: Prinzip der MassEXTEND-Reaktion und der MALDI-TOF-Massenspektrometrie anhand eines Beispiels (aus: Tang K et al. *Mining Disease Susceptibility Genes through SNP Analyses and Expression Profiling Using MALDI-TOF Mass Spectrometry*. Journal of Proteome Research 2004;3:218-227)

Abbildung 3: MALDI-TOF-Massenspektrometer

Abbildung 4: Massenspektrum eines C/T-Polymorphismus (Anschauungsbeispiel)

Abbildung 5: Massenspektrum eines G/A-Polymorphismus mit den drei möglichen Genotypen (Anschauungsbeispiel)

Abbildung 6: Vierfeldertafel

Abbildung 7: Fine-Mapping der *PDCD5*-Genregion auf Chromosom 19q12-q13.1

Abbildung 8: Kaplan-Meier-Überlebenskurve (italienische Stichprobe)

Abbildung 9: Analytischer Prozess (nach Kammerer S et al. *Systematic identification of disease-related genes* SEQUENOM Inc., San Diego)

6.5 Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Karl Häußinger für die Möglichkeit, diese Doktorarbeit in seiner Klinik durchführen zu können.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. med. Peter Meyer für die Überlassung des interessanten Themas und seine exzellente Betreuung. Durch seine Begeisterung und fortwährende Motivation weckte und bestärkte er in mir das Interesse für die Humangenetik und die wissenschaftliche Forschung, und in einigen Jahren konstruktiver Zusammenarbeit entstanden unter seiner Anleitung mehrere gemeinsame Publikationen. Ein gewichtiger Anteil meiner Arbeit basierte auf der statistischen Auswertung der im Rahmen der Studie gewonnenen genotypischen und phänotypischen Daten. Ich bin Herrn Meyer sehr dankbar, dass er mich motivierte und anleitete, die unterschiedlichen Statistik-Tools zu verstehen und professionell einzusetzen. Vor allem danke ich ihm für seine Offenheit und Flexibilität, seine Geduld und dafür, dass er es vermocht hat, mich mit seiner Begeisterung für die Humangenetik anzustecken.

Ich danke meinen Eltern für ihre vielseitige Unterstützung während meines gesamten Studiums.

Ein spezieller Dank an Julia Krüger, Markus Klaja und Giuseppe Sandri Tussiwand für ihre Hilfe und Unterstützung.

6.6 Lebenslauf

Melanie Barbara Böttger

geboren am 09. Oktober 1978 in München

Schulausbildung

09/1985 – 08/1989	Grundschule Zorneding
09/1989 – 06/1998	Gymnasium Vaterstetten Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

04/1999 – 03/2001	Studium der Humanmedizin im vorklinischen Studienabschnitt an der Universität Heidelberg
03/2001	Ärztliche Vorprüfung („Physikum“) in Heidelberg
04/2001 – 03/2004	Studium der Humanmedizin im ersten und zweiten klinischen Studienabschnitt an der Technischen Universität München
03/2002	Erste ärztliche Prüfung in München
03/2004	Zweite ärztliche Prüfung in München
04/2004 – 03/2005	Studium der Humanmedizin im dritten klinischen Studienabschnitt • Klinik für Anaesthesiologie, Klinikum rechts der Isar, München • I. und III. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar, München • Abt. für Chirurgie und Abt. für Plastische, Rekonstruktive und Handchirurgie, Krankenhaus München-Bogenhausen
05/2005	Dritte ärztliche Prüfung in München

Berufstätigkeit

10/2005 - 08/2006	Assistenzärztin in der Medizinisch-Psychosomatischen Klinik Roseneck, Prien
Ab 09/2006	Assistenzärztin in der Klinik für Neuropädiatrie – Epilepsiezentrum, Behandlungszentrum Vogtareuth