

Aus der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Aufbau einer Biobank von Patienten mit Barrett-Karzinom und
deren phänotypische Charakterisierung für eine
genetische Replikationsanalyse von 16 SNP-Markern
auf den Chromosomen 1 bis 3

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Constantin Johannes Ahlbrand
aus Mainz

Mainz, 2019

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion:

30. Juni 2020

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Ziel der Dissertation.....	2
2.	Literaturdiskussion	4
2.1	Methoden zur Erforschung multifaktorieller Erkrankungen.....	4
2.1.1	Theoretischer Hintergrund multifaktorieller Erkrankungen.....	4
2.1.2	Humangenetische Methoden zur Identifikation von genetischen Risikovarianten.....	6
2.1.2.1	Assoziationsuntersuchungen	6
2.1.2.2	Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)	7
2.1.3	Bioinformatische Methoden zur funktionellen Analyse und Analyse von Wechselwirkungen mit nicht-genetischen Faktoren	8
2.1.3.1	Pathway-Analysen	8
2.1.3.2	Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen.....	9
2.2	Das Barrett-Karzinom: eine multifaktorielle Erkrankung	10
2.2.1	Der Barrett-Oesophagus: Präkanzerose des Barrett-Karzinoms	10
2.2.2	Epidemiologie des Barrett-Karzinoms.....	12
2.2.3	Ätiologie des Barrett-Karzinoms	15
2.2.3.1	Komplex-genetische Vererbung	15
2.2.3.2	Genetische Risikovarianten.....	16
2.2.3.3	Histopathologische und molekularpathologische Veränderungen...	26
2.2.3.4	Nicht-genetische Risikofaktoren und protektive Faktoren	35
3.	Material und Methoden.....	41
3.1	Barrett-Konsortium g4b - <i>genes for barrett's</i>	41
3.2	Schwerpunkte der Dissertation	45
3.3	Aufbau der Biobank mit Barrett-Karzinompatienten	45
3.3.1	Ablauf der Rekrutierung	45
3.3.2	Eigenschaften des rekrutierten Kollektivs	51

3.3.2.1	DNA-Kollektiv	51
3.3.2.2	Phänotypisches Kollektiv.....	51
3.4	Auswahl der genetischen Varianten für die Replikationsanalyse sowie Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen	54
3.5	Genotypisierung der genetischen Varianten im Kollektiv der Patienten und Kontrollen.....	56
3.6	Biostatistische Analysen im Fall-Kontroll-Kollektiv mit Barrett-Karzinom-Patienten.....	56
4.	Ergebnisse	57
4.1	Ergebnisse der Replikationsanalyse	57
4.1.1	Replizierte Risikovarianten	57
4.1.2	Risikovarianten im g4b-Kollektiv	58
4.2	Charakterisierung der phänotypischen Merkmale im Kollektiv	66
4.3	Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen.....	70
4.3.1	Genotyp-Phänotyp-Analysen (GXP)	70
4.3.2	Genotyp-Umwelt-Analysen (GXU)	71
5.	Diskussion.....	73
5.1	Aufbau der Biobank.....	73
5.2	Replikationsanalyse	74
5.3	Biostatistische Analysen.....	76
5.4	Schlussfolgerung und Ausblick	77
6.	Zusammenfassung.....	79
7.	Literaturverzeichnis	82

Abkürzungsverzeichnis

BE	Barrett-Oesophagus, Barrett's esophagus	LOH	loss of heterozygosity, Verlust der Heterozygotie
BC, EAC	Barrett-Karzinom, esophageal adenocarcinoma	LSBE	Long-segment-Barrett-Oesophagus
Ca	Karzinom, Carcinom	MAF	minor allele frequency
CI	Konfidenzintervall	MDC	Metaplasie-Dysplasie-Carcinom-Sequenz
CNV	copy number variation	MHC	major histocompatibility complex
CRC	kolorektales Karzinom	py	Packyears, Packungsjahr
ESCC	Plattenepithelkarzinom des Oesophagus, esophageal squamous cell carcinoma	RR, OR	Relatives Risiko, Odds ratio
GERD	Gastrooesophageale Refluxerkrankung	SOP	Standard Operating Procedure
g4b	genes for barrett's	SNP	Single Nucleotide Polymorphisms
GWAS	genome-wide association study	SSBE	Short-segment-Barrett-Oesophagus
GXP	Genotyp-Phänotyp-Analysen	USSBE	Ultra-short-segment-Barrett-Oesophagus
GXU	Genotyp-Umwelt-Analysen		
HGIEN	High-grade intraepitheliale Neoplasie		
IEN	intraepitheliale Neoplasie		
LD	Kopplungsungleichgewicht, linkage disequilibrium		
LGIEN	Low-grade intraepitheliale Neoplasie		

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird das generische Maskulinum verwendet. Die Formulierungen umfassen gleichermaßen weibliche und männliche Personen. Ebenfalls wird die angloamerikanische Schreibweise zur Trennung von Zahlen verwendet (Bsp. 2.23%).

Abbildungsverzeichnis

Abb. 2.1 Organisationsstruktur der Haplotypen und hieraus abgeleiteten tSNPs	9
Abb. 2.2 Endoskopisches und histologisches Bild des Barrett-Oesophagus sowie schematische Zeichnung der intestinalen Metaplasie.....	15
Abb. 2.3 Konzepte zur Pathogenese der Metaplasie	16
Abb. 2.4 Zeitlicher Verlauf der Inzidenzen des Barrett-Karzinoms bei kaukasischer Ethnizität in den USA	17
Abb. 2.5 Inzidenz des Barrett-Karzinoms bei Barrett-Oesophagus-Patienten.....	19
Abb. 2.6 Modell des „Transcommitment“ einer Plattenepithel-Progenitorzelle zu Barrett-Epithel.....	32
Abb. 2.7 Hallmarks of Cancer	36
Abb. 2.8 Prozentualer Anteil der Chromosomeninstabilitäten Zugewinn (Gain) und Verlust (Loss) von Chromosomen/-abschnitten und loss of heterozygosity (LOH) über die MDC	36
Abb. 3.1 Schematischer Ablauf der Rekrutierung	50
Abb. 3.2 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie	52
Abb. 4.1 Vergleich der Effektstärken (RR/OR) des SNP-Markers rs2687201	62

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1 Kandidatengenanalysen für Barrett-Oesophagus und Barrett-Karzinom	24
Tab. 2.2 Genomweit-signifikant assoziierte Risikofaktoren für Barrett-Oesophagus und Barrett-Karzinom	29
Tab. 2.3 Übersicht relevanter endogener und exogener Risikofaktoren sowie protektiver Faktoren des Barrett-Karzinoms	39
Tab. 3.1 Interdisziplinäre Einrichtungen des Barrett-Konsortiums g4b.....	45
Tab. 3.2 Rekrutierungszentren des Barrett-Konsortiums g4b.....	47
Tab. 3.3 Länder der zentraleuropäischen Ethnizität	52
Tab. 3.4 Versandmaterial	53
Tab. 3.5 Patientenkollektiv und Subkollektiv der phänotypisch erhobenen Daten	55
Tab. 3.6 Relevante phänotypisch erhobene Daten für die Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen.....	57
Tab. 3.7 Auswahl der SNP-Marker für die Replikationsanalyse sowie Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen.....	59
Tab. 4.1 Ergebnis der 3 signifikant assoziierten SNP-Marker auf Chr. 1-3 in 1065 EAC/1019 Kontrollen [222].....	64
Tab. 4.2 Ergebnis des einen signifikant assoziierten SNP-Markers auf Chr. 1-3 in 542 BE/1106 EAC/1602 Kontrollen [224].....	64
Tab. 4.3 Ergebnis der Replikationsanalyse mit 15 SNP-Markern auf Chr. 1-3 in 1065 EAC/1019 Kontrollen [222]	65
Tab. 4.4 Geschlechtsspezifisches Ergebnis der Replikationsanalyse mit 15 SNP-Markern auf Chr. 1-3 in 938 männlichen/127 weiblichen EAC-Patienten und 498 männliche/521 weibliche Kontrollen [222]	66
Tab. 4.5 Ergebnis der Replikationsanalyse mit 1 SNP-Marker auf Chr. 1-3 in 542 BE/1106 EAC/1602 Kontrollen [224]	69
Tab. 4.6 Phänotyp-Charakteristika des Kollektivs aus 1027 EAC-Fällen	72
Tab. 4.7 Nominal signifikante Assoziationen zwischen SNP-Markern auf Chr. 1-3 und Phänotypen/Umweltfaktoren	76

1. Einleitung und Ziel der Dissertation

Als Barrett-Oesophagus (*Barrett's esophagus* BE) wird eine intestinale Metaplasie aus hochspezialisiertem Zylinderepithel im distalen Oesophagus bezeichnet. Drei wesentliche Risikofaktoren die gastrooesophageale Refluxerkrankung (*gastroesophageal reflux disease* GERD), Adipositas und Nikotinkonsum führen sowohl zu einer lokalen als auch systemischen chronischen Inflammation des Oesophagus. Über die Metaplasie-Dysplasie-Carcinom-Sequenz (MDC) kann sich ein invasives Adenokarzinom, das Barrett-Karzinom (*Barrett's carcinoma* BC, *esophageal adenocarcinoma* EAC), entwickeln. Der BE ist die einzig bekannte Präkanzerose des Karzinoms. Allerdings ist die Vordiagnose eines BE in >90% der Fälle nicht bekannt, selbst wenn eine endoskopische Voruntersuchung vorlag [181-183].

Auf Grund der stark steigenden Inzidenz des Barrett-Karzinoms in den letzten 4 Jahrzehnten [6, 7] ist die Tumorerkrankung in den Fokus wissenschaftlicher Studien gerückt. Das Malignom gehört zur 6. häufigsten Todesursache westlicher Männer [1]. Bei >40% der Patienten finden sich keine nennenswerten Refluxsymptome in der Anamnese [8, 9]. Zudem wird die Erkrankung in 40% d.F. erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert [10], so dass kurative Therapien und damit die Prognose stark limitiert sind (5 Jahres-Überleben <20% [11, 12]).

Zum Beitrag von genetischen Risikovarianten zur multifaktoriellen Genese des Barrett-Karzinoms wird in den vergangenen Jahren intensiv geforscht. Mit den genomweiten Assoziationsstudien (*genome-wide association study* GWAS) steht ein aussagekräftiges Verfahren zur Detektion dieser Varianten (*Single Nucleotide Polymorphisms* SNPs) zur Verfügung. Bisher konnten mit dieser Methode 8 krankheitsassoziierte Varianten in der Nähe zu nachfolgenden Genen identifiziert werden: FOXF1, MHC A-Allel, CRTC1, FOXP1, BARX1, GDF7, TBX5, ALDH1A2 [13-15]. Für die Untersuchung sind große Patientenkollektive erforderlich. Identifizierte SNP-Marker müssen dann in unabhängigen Kollektiven repliziert werden, um die statistische Aussagekraft zu erhöhen.

Das Barrett-Konsortium *genes for barrett's g4b* unter Leitung von Frau Univ.-Prof. Dr. med. Ines Gockel hat sich zur Aufgabe gemacht, die genetischen und zellbiologischen Ursachen des Barrett-Oesophagus und -karzinoms aufzuklären.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war ein interdisziplinäre Forschungsvorhaben des Barrett-Konsortiums an der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Mainz mit folgenden Zielen:

- 1) *Aufbau einer Biobank von Patienten mit Barrett-Karzinom und deren phänotypische Charakterisierung: Rekrutierung von Patienten, Erhebung von phänotypischen Daten mittels Interview, Erfassen klinischer Prägnanztypen und möglicher endogener, exogener Risikofaktoren sowie protektiver Faktoren aus den Daten der Phänotyp-Datenbank, Verifizierung der histopathologischen Befunde, Asservierung von Blutproben.*
- 2) *Replikation von 94 SNP-Markern, die Assoziationshinweise in der GWAS von Levine et al. [14] zeigten, im g4b-Kollektiv.*
- 3) *Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen mit den genetischen Varianten der Replikationsanalyse sowie den Daten der Phänotyp-Datenbank, um Wechselwirkungen zwischen genetischen Varianten und klinischen Phänotypen und Umweltfaktoren nachzuweisen.*

2. Literaturdiskussion

2.1 Methoden zur Erforschung multifaktorieller Erkrankungen

Zum besseren Verständnis des Barrett-Karzinoms als multifaktorielle Erkrankung werden zunächst der humangenetische Hintergrund und die Forschungsmethoden erläutert.

2.1.1 Theoretischer Hintergrund multifaktorieller Erkrankungen

Multifaktorielle Erkrankungen werden durch die Kombination komplex-genetischer und nicht-genetischer Faktoren verursacht. Im Gegensatz zu monogenen Erbgängen ist die *komplex-genetische Vererbung* durch das gleichzeitige Vorliegen von vielen *Risikovarianten* gekennzeichnet. Ein bestimmtes Allel einer Variante stellt dabei das Risiko für das Auftreten der Erkrankung dar. Dabei erhöht sich die Wahrscheinlichkeit mit der Anzahl der Risikovarianten. Mutationen in verschiedenen Genen und Loci können den gleichen Phänotyp der Erkrankung auslösen, was als *Locus-Heterogenität* bezeichnet wird. Umgekehrt kommen die Risikovarianten auch in der gesunden Bevölkerung vor. Es kann somit eine *inkomplette Penetranz* vorliegen. Des Weiteren können Krankheiten auch ohne das Vorliegen einer genetischen Risikovariante auftreten, dies nennt man *Phänokopie* [16, 17].

Die genetische Variabilität im menschlichen Genom liegt bei etwa 0.1% aller Gene. Hierbei werden zwei verschiedene Mechanismen unterschieden: Mini- sowie Mikrosatelliten, *copy number variation CNV* und *Single Nucleotide Polymorphisms SNPs*. Bei >90% der Varianten handelt es sich um SNPs, die sich nur in einer einzelnen Nukleotidbase unterscheiden [18, 19]. Nach Schätzungen des *International HapMap Projects* finden sich weltweit >10 Mio. SNPs mit einer Frequenz des selteneren Allels (*minor allele frequency MAF*) von mindestens 0.5% [20]. SNPs liegen sowohl in codierenden (hier *cSNPs* genannt) als auch nichtcodierenden Bereichen des Genoms [16, 17]. Wenn zwei SNPs in räumlicher Nähe zueinander liegen, ist die Wahrscheinlichkeit geringer, dass sie durch Rekombinationsereignisse während der Meiose getrennt werden. Beide Allele werden somit weitervererbt [21]. In der Genetik spricht man hierbei von *Kopplungsungleichgewicht (linkage disequilibrium LD)*. Der *Kopplungskoeffizient r^2* gibt das Maß des Kopplungsungleichgewichts an. Je näher 2 SNPs räumlich zueinander liegen, desto größer wird r^2 . Bei $r^2=1$ liegen die Marker im

2.1.2 Humangenetische Methoden zur Identifikation von genetischen Risikovarianten

2.1.2.1 Assoziationsuntersuchungen

Im Rahmen von Assoziationsanalysen werden *Kandidatengene* auf die Häufigkeit eines vorkommenden Allels in einem Patienten- vs. Kontrollkollektiv (Fall-Kontroll-Studien) untersucht. Eine Assoziation ist durch zwei genetische Merkmale gekennzeichnet, i.d.F. Allel und Phänotyp = Erkrankung, welche häufiger zusammen vorkommen als statistisch zufällig zu erwarten wäre. Das Relative Risiko (RR) als Maß der Assoziation beschreibt das Risiko bei Vorhandensein der Variante im Vergleich zum Wildtyp-Allel an dem phänotypischen Merkmal zu erkranken.

Bei den gefundenen Assoziationen sind folgende Mechanismen denkbar [21]:

1) Der Genotyp = Allel ist für die Ausprägung des Phänotyps = Erkrankung alleine oder in Kombination mit anderen genetischen Varianten verantwortlich.

Dies kann über ein strukturverändertes codierendes Protein direkt oder über die Regulation der Expression von Genen indirekt erfolgen.

2) Das Allel liegt in räumlicher Nähe zum wahren Genlocus und steht mit diesem in einem Kopplungsungleichgewicht (LD).

Hierbei untersucht man weitere SNPs mit hohem Kopplungsungleichgewicht in der Region um das gefundene Allel. Die assoziierte kausale Variante sollte einen niedrigeren P-Wert haben.

3) Das Allel ist falsch positiv assoziiert durch das Phänomen der Populationsstratifikation.

Die untersuchte Population trägt das Allel häufiger als die Bevölkerung. Das Ergebnis ist z.B. durch große genetische Unterschiede innerhalb des Kollektivs verzerrt. Dies lässt sich verhindern, indem man nur Populationen mit gleicher Ethnizität untersucht.

4) *Das Ergebnis an sich ist falsch positiv.*

Dies kann z.B. durch ungenügende Qualitätskontrollen oder statistische Korrektur der typisierten Proben bedingt sein.

2.1.2.2 Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Bei multifaktoriellen Erkrankungen liegen eine Vielzahl an genetischen Risikovarianten vor, die einzeln oder in Kombination als Gen-Gen-Interaktion zur Pathophysiologie beitragen. Genomweite Assoziationsstudien (*genome-wide association study GWAS*) stellen die zurzeit effektivste Methode zur Identifikation dieser Varianten dar. Bis zur Etablierung der GWAS existierten nur zwei Methoden zur Ermittlung von kausalen Genvarianten im Genom: Translokationsuntersuchungen und Kopplungsuntersuchungen. Beide sind eher für die Untersuchung von Genen geeignet, die einen großen Einfluss auf die Erkrankung haben, wie es bei monogenen Krankheiten der Fall ist [21].

Genomweite Assoziationsstudien können große Patientenkollektive hypothesenfrei mit bis zu mehreren Mio. SNPs untersuchen. Hierbei macht man sich die Haplotyp-Blockstruktur des Genoms zu Nutze. Mit den ausgewählten tSNPs lässt sich eine Aussage über weitaus mehr SNPs treffen, als bei der Analyse eingesetzt werden. Voraussetzung ist ein hohes Kopplungsungleichgewicht. GWAS werden, wie Assoziationsuntersuchungen auch, in Fall-Kontroll-Studien durchgeführt. Als Kontrollen können Super- und Populationskontrollen gewählt werden. Superkontrollen unterscheiden sich nur für das untersuchte phänotypische Merkmal. Populationskontrollen stellen einen Querschnitt durch die Gesellschaft dar. Der Phänotyp ist nicht bekannt und tritt somit mit normaler Inzidenz auf. Wichtig ist es Kollektive mit gleicher Ethnizität zu untersuchen, da ansonsten das Phänomen der Populationsstratifikation auftritt [21].

Nach chipbasierter Genotypisierung der DNA-Proben des Fall- und Kontroll-Kollektivs werden die Allelfrequenzen (AF) der ausgewählten SNPs miteinander verglichen. Die Assoziation kann aber nicht über den sonst üblichen P-Wert <0.05 , der zur Ablehnung der Hypothese führen würde, definiert werden. Da in einer Untersuchung mehrere Mio. SNPs beteiligt sein können, gibt es auch dieselbe Anzahl von Hypothesen. Dies

bezeichnet man als *multiple Testen*. Statistisch gesehen würde es – ausgehend von z. B. 1 Mio. getesteten SNPs – zu einer scheinbaren Assoziation von ca. 50.000 SNPs kommen [24]. Die meisten hiervon falsch-positiv. Um dies zu verhindern wird eine Korrektur auf multiples Testen durchgeführt: Bei GWAS gilt dabei ein P-Wert von 5×10^{-8} als genomweit signifikant assoziiert. Hieraus lässt sich schließen, dass für GWAS große Patientenkollektive notwendig sind, um eine hohe statistische Aussagekraft zu erhalten [21]. Daher ist es auch erforderlich, die gefundenen SNP-Marker in einem unabhängigen Replikationskollektiv zu überprüfen. Die Aussagekraft der Assoziation kann hiermit gestärkt und falsch-positive Ergebnisse weiter minimiert werden. Für den P-Wert in den Replikationsuntersuchungen gilt eine Bonferroni-Korrektur $0.05/n$.

Seit 2005 konnte eine Vielzahl assoziierter SNPs für unterschiedliche multifaktorielle Erkrankungen identifiziert werden. Die Ergebnisse publizierter GWAS stehen im GWAS catalog (genome.gov/gwastudies) zur Verfügung.

2.1.3 Bioinformatische Methoden zur funktionellen Analyse und Analyse von Wechselwirkungen mit nicht-genetischen Faktoren

2.1.3.1 Pathway-Analysen

Nach Identifikation der assoziierten genetischen Varianten ist die funktionelle Analyse von entscheidender Bedeutung bei der Aufklärung der Pathomechanismen einer multifaktoriellen Erkrankung. Die SNP-Marker werden hierzu in bioinformatischen Auswertungsprogrammen untersucht. Diese enthalten u.a. Daten zur Genomik, Proteomik oder Transkriptomik (sog. *omics*) und deren funktionelles Zusammenspiel in Signalwegen bis hin zum phänotypischen Merkmal. Die Informationen und Algorithmen sind abhängig vom Hersteller des Programms. Die Zusammenhänge können grafisch dargestellt werden. Üblicherweise werden unterschiedliche Signifikanzschwellen der SNP-Marker genutzt, um eine große Anzahl an potentiellen Genen in Signalwegen analysieren zu können.

2.1.3.2 Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen

Genetische Risikofaktoren tragen auch über die Wechselwirkung mit nicht-genetischen Faktoren zur Genese von multifaktoriellen Erkrankungen bei (*Gen-Umwelt-Interaktionen*). Hierzu werden die SNP-Marker auf Assoziation mit den phänotypischen Merkmalen und Umweltfaktoren des Kollektivs in einem explorativen Ansatz untersucht. Phänotypische Daten sind z.B. das Alter bei Erstmanifestation, familiäres Auftreten oder Komorbiditäten. Als Umweltfaktoren können beispielhaft exogene Risikofaktoren, wie Nikotin- oder Alkoholkonsum genannt werden. Bedingt durch Patienten- und untersuchungsabhängige Faktoren haben die erhobenen Daten in der Regel einen gewissen Bias. Meist ist es dennoch möglich, Subgruppen von phänotypischen Merkmalen und Umweltfaktoren zu identifizieren, die mit der Genvariante assoziiert sind (z.B. Raucher vs. Nichtraucher). Des Weiteren besteht auf Grund der Vielzahl an untersuchten Variablen die Schwierigkeit, die gefundenen Assoziationen dem p-Wert nach Bonferroni-Korrektur zu unterziehen. Daher ist es auch hier erforderlich, die Daten in einem unabhängigen Kollektiv zu replizieren.

2.2 Das Barrett-Karzinom: eine multifaktorielle Erkrankung

In den nachfolgenden Kapiteln wird das Barrett-Karzinom als Beispiel einer multifaktoriellen Erkrankung vorgestellt. Zunächst folgt eine kurze Darstellung des Barrett-Oesophagus, der einzig bekannten Präkanzerose des Adenokarzinoms. Anschließend wird die Bedeutung der Erforschung der Tumorerkrankung an Hand von epidemiologischen Zahlen verdeutlicht. Der wissenschaftliche Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der multifaktoriellen Ätiologie des Barrett-Karzinoms. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die genetischen Risikovarianten, die histopathologischen und molekularpathologischen Veränderungen sowie die nicht-genetischen Risikofaktoren gelegt.

2.2.1 Der Barrett-Oesophagus: Präkanzerose des Barrett-Karzinoms

Im Jahr 1950 durch den australischen Chirurgen Norman Barrett erstbeschrieben [25], imponiert der Barrett-Oesophagus als lachsfarbene Schleimhaut, z.T. zirkulär und mit zungenförmigen Ausläufern im distalen Oesophagus oberhalb des gastrooesophagealen Übergangs (**Abb. 2.2**). Seit der Montreal-Klassifikation 2006 [26] und den Prag-Kriterien 2006 [27] gilt der BE als endoskopische Diagnose. Ab einer definierten Längenausdehnung von >3cm spricht man von einem Long-segment-Barrett-Oesophagus (*LSBE*) und zwischen 1-3cm von einem Short-segment-Barrett-Oesophagus (*SSBE*). Unterhalb dieser Ausdehnung hat sich der Begriff des Ultra-short-segment-Barrett-Oesophagus (*USSBE*) im klinischen Gebrauch etabliert.

Histologisch zeigt sich das Bild einer intestinalen Zylinderepithelmetaplasie, welche als Adaption einer chronischen Exposition von gastrooesophagealem Reflux (*GERD*) entsteht [28, 29]. Die histopathologische Definition des Barrett-Oesophagus unterliegt internationalen Variationen [30]. In den meisten Ländern ist das Vorliegen einer intestinalen Metaplasie *mit Becherzellen* für die Diagnose bezeichnend [30]. In Großbritannien [31] und Japan ist dies nicht der Fall. Hier weist man (u.a.) auf Studien hin, welche das neoplastische Potential von Zylinderepithel ohne Becherzellen belegen [32]. Im Gegensatz zum ortsständigen Plattenepithel weist die hochspezialisierte Barrett-Schleimhaut diverse protektive Mechanismen auf, um den Oesophagus vor den schädigenden Einflüssen der Magensäure zu schützen. Einige hiervon sind in **Abb. 2.2** gezeigt.

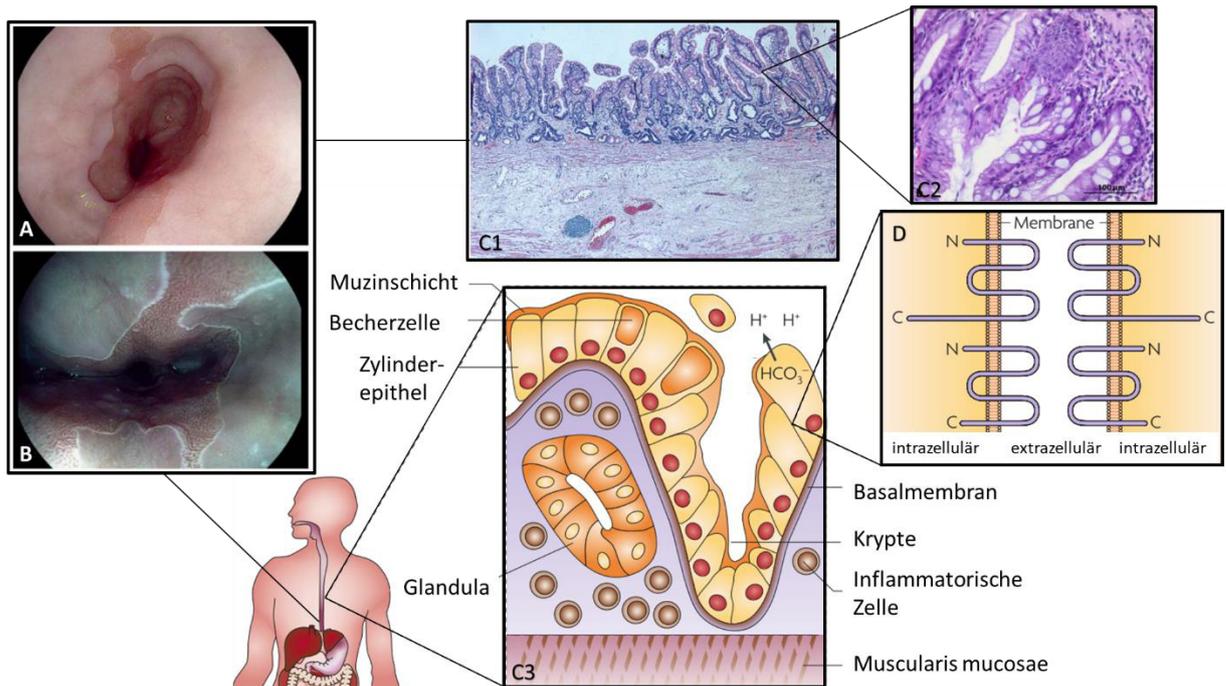


Abb. 2.2 Endoskopisches und histologisches Bild des Barrett-Oesophagus sowie schematische Zeichnung der intestinalen Metaplasie. mod. nach [33]

A. Endoskopisches Bild (Kontrastverstärkung mit Essigsäure): rötliche Zylinderepithelmetaplasie umgeben von blassem Plattenepithel [34] **B.** Endoskopisches Bild nach elektronischer Bildverarbeitung [34]. **C1** [35] **und C2** [36]. Histologisches Bild (HE): Typische Barrett-Schleimhaut mit Krypten. **C3** **und D.** Schematische Zeichnung [33]: Zylinderepithel mit typischer Kryptenstruktur: Sekretion von Muzin, Anionen und Bikarbonat [37, 38], Claudin 18 tight junctions als extrazelluläre Barriere gegen das Eindringen von Säure [39].

Zur Pathogenese der Metaplasie existieren diverse, zum Teil historische Hypothesen (**Abb. 2.3**). Die Stammzelltheorien haben zunehmende Bedeutung erlangt. Hierbei entsteht das hochspezialisierte Epithel aus der Proliferation einer „Stammzellnische“. Über den Ursprung dieser Stammzellen existiert noch kein wissenschaftlicher Konsens.

Über die Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz (*MDC*) kann sich ein invasiv glanduläres Adenokarzinom, das sogenannte Barrett-Karzinom, entwickeln. Der Barrett-Oesophagus ist die einzige bekannte Präkanzerose des EAC. BE-Patienten haben im Vergleich zur Normalbevölkerung ein 10fach höheres Risiko an dem Karzinom zu erkranken (RR 11.3; 95% CI 8.8-14.4) [1]. Die Dysplasien werden in *low*

grade und *high grade* intraepitheliale Neoplasien (*LGIEN*, *HGIEN*) unterteilt. Dem Pathologen kommt die tragende Rolle bei der Diagnostik der Dysplasien zu [30, 35], da sich hieraus bereits entsprechende therapeutische Konsequenzen ergeben.

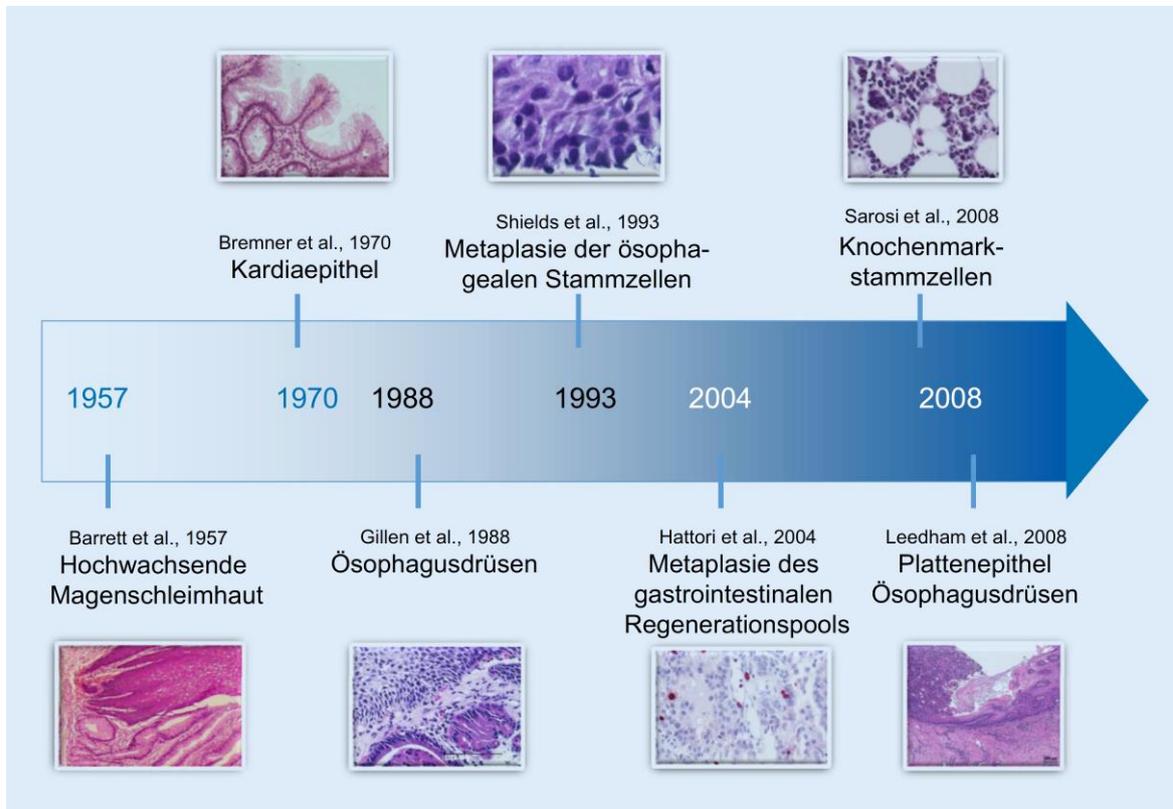


Abb. 2.3 Konzepte zur Pathogenese der Metaplasie. aus [36]

2.2.2 Epidemiologie des Barrett-Karzinoms

Das Oesophagus-Karzinom (hier beide Entitäten) ist die 8. häufigste Tumorerkrankung weltweit [40] und gehört zur 6. häufigsten Todesursache westlicher Männer [1]. Die Mortalität beträgt >80% [12, 40]. Dies liegt insbesondere daran, dass sich >40% der Patienten bei Erstdiagnose bereits in einem fortgeschrittenen Tumorstadium der Erkrankung befinden [10]. Die Prognose ist hierdurch stark limitiert. Die meisten Patienten versterben innerhalb eines Jahres [41]. Die 5 Jahres-Überlebensrate liegt trotz verbesserter Überwachungsstrategien und Therapien in den vergangenen Jahren weiterhin nur bei <20% (13.7% [11], 19.9% [12]).

In den westlichen Industrienationen zeigte sich in den letzten vier Jahrzehnten ein starker Anstieg der Inzidenz des EAC um ♂463% resp. ♀335% [6], während die Anzahl der Neuerkrankungen des Plattenepithelkarzinoms (*esophageal squamous cell carcinoma ESCC*) dagegen abnahm [6, 11, 42] (**Abb. 2.4**). Dies entspricht einem stärkeren relativen Anstieg als bei anderen soliden Tumoren wie dem Melanom, Mamma- oder Prostata-Karzinom [43].

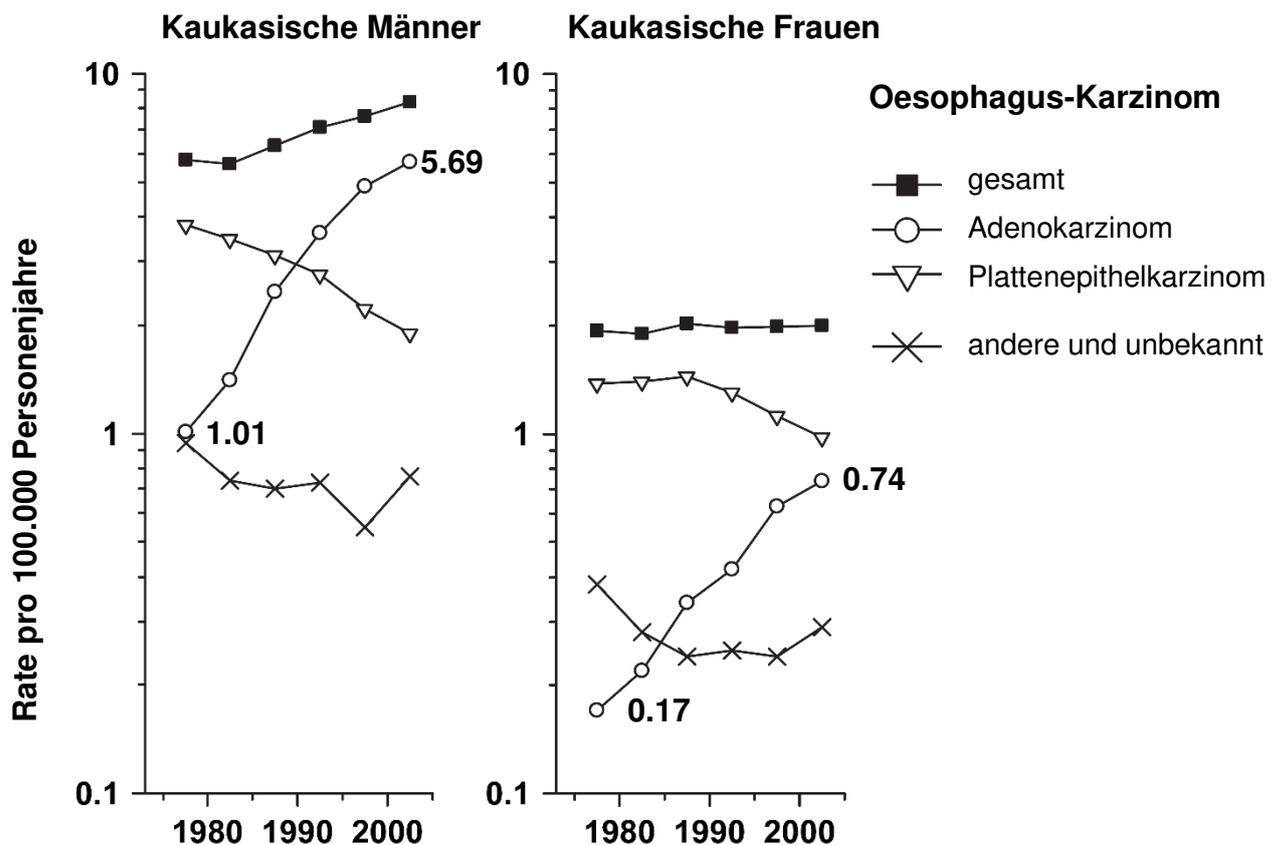


Abb. 2.4 Zeitlicher Verlauf der Inzidenzen des Barrett-Karzinoms bei kaukasischer Ethnizität in den USA (basierend auf [12]). *mod. nach* [6]

Basierend auf den SEER-Studiendaten [12] wurde von Brown *et al.* [6] eine Inzidenz des Barrett-Karzinoms von 5.69/100.000 Personenjahre (95% CI 5.47-5.91, Jahre 2000-2004) ermittelt. Für Frauen liegt diese deutlich niedriger (0.74/100.000 Personenjahre 95% CI 0.13-0.21) [6]. Das EAC zeigt eine deutliche Assoziation zum männlichen Geschlecht [1, 6, 7, 44]. 80% der Fälle sind Männer [11]. Das Alter bei

Diagnosestellung liegt im Median zwischen 60-70 Jahren [45-47]. Unter 50 Jahren ist das Auftreten der Erkrankung am niedrigsten [10].

Insbesondere sind die HGIEN und der LSBE mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines EAC verbunden [1, 46, 48]. Die Progressionsrate über die MDC in ein Adenokarzinom beträgt 0.14% der Fälle/Jahr (95% CI 0.11-0.175) [1, 48]. Bezieht man Dysplasien ein, so errechneten Bhat *et al.* eine Rate von 0.22% der Fälle/Jahr (95% CI 0.19-0.26) [48]. Das Vorliegen eines LSBE führt zu einer Progression von 0.22% der Fälle/Jahr (vgl. SSBE 0.03% der Fälle/Jahr) [49].

Während neuere Daten aus Kohortenstudien in England und den Niederlanden eine Stagnierung der Inzidenz des Barrett-Oesophagus seit 2003 nahelegen [50], ist die des BC mit ca. 2% pro Jahr seit 2000 weiter steigend [51, 52]. Zudem gibt es Hinweise für eine Häufung der Fälle in Asien, in welcher die Erkrankung bislang selten vorkam [53-55]. Einen Bias im Hinblick auf eine Überdiagnostik des EAC, auch auf Grund einer Neuklassifikation des ESCC konnten Pohl *et al.* [43] ausschließen. Thrift A. P. *et al.* [51] erwarten, dass sich der Trend der steigenden Inzidenz auch in den kommenden Jahrzehnten fortsetzt.

Auf Grund von Erkenntnissen aus endoskopischen Studien kann eine Gesamt-Prävalenz des Barrett-Oesophagus von etwa 1.6% (95% CI 0.8-2.4) [56] angenommen werden. Die Prävalenz des LSBE liegt bei 1%, der SSBE (8%) und der USSBE (15%) finden sich häufiger [49]. Nach neueren Studien scheint die Inzidenz des BC bei BE-Prädisposition durch ein Bias überschätzt worden zu sein. Hvid-Jensen *et al.* [1] ermittelten in ihrer populationsbasierten Arbeit mit 11028 Patienten 1.2 Karzinom-Fälle/1.000 Personenjahre (95% CI 0.9-1.5) bei BE-Prädisposition [1] (**Abb. 2.5**). Dies ist kongruent mit einer vergleichbaren Studie aus Nordirland [48].

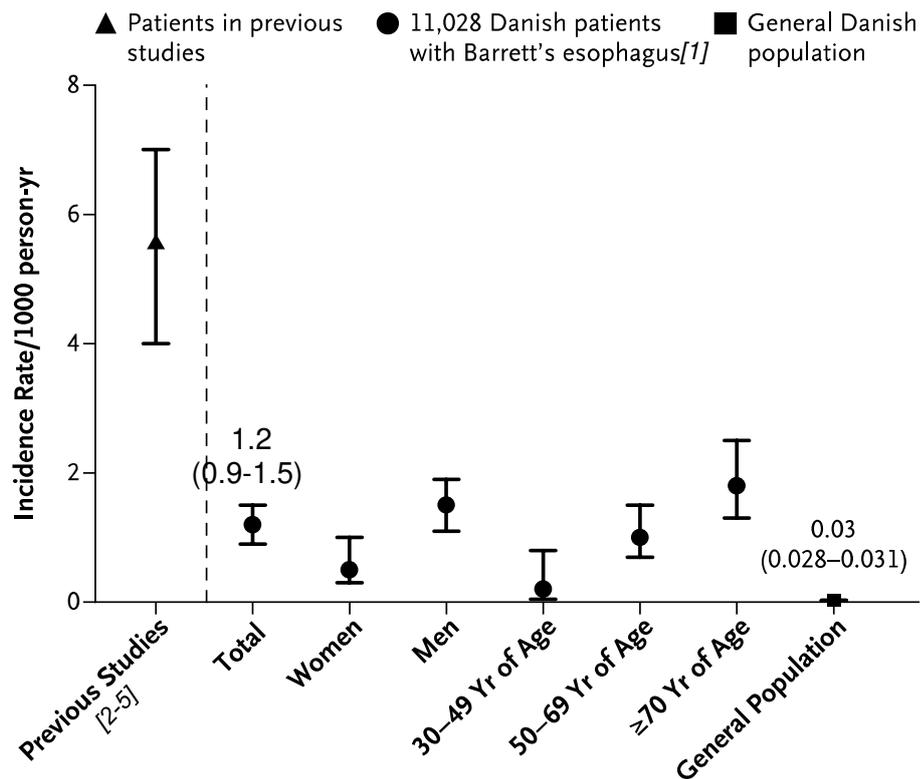


Abb. 2.5 Inzidenz des Barrett-Karzinoms bei Barrett-Oesophagus-Patienten. mod. nach [1] (Previous studies [2-5])

2.2.3 Ätiologie des Barrett-Karzinoms

2.2.3.1 Komplex-genetische Vererbung

Erste Erkenntnisse über eine genetische Komponente der Erkrankung wurden im Rahmen von Untersuchungen familiärer Fälle gewonnen. So wird in dem Abstract von Everhart *et al.* [57] 1978 erstmalig von einem familiären Fall eines Barrett-Oesophagus bei einem Vater und seinen beiden Söhnen berichtet. Die Autoren diskutierten eine autosomal dominante Vererbung [57]. 1983 gab es eine Veröffentlichung zu eineiigen Zwillingen, so dass auch hier eine hereditäre Komponente vermutet wurde [58]. Crabb *et al.* [59] berichteten 1985 über eine Familie mit Reflux und BE. Der Indexpatient hatte 5 Kinder mit GERD, wovon 3 die Barrett-Erkrankung entwickelten. Die ersten Paper zu familiären BE-Fällen und dem hieraus assoziierten Adenokarzinom gab es 1992 [60] und 1993 [61].

Eine erste systematische Untersuchung mit 58 BE/EAC/Adenokarzinom des gastrooesophagealen Übergangs und 106 Kontrollen führten Chak A. *et al.* [62] 2002 durch: Hier bestand für eine positive Familienanamnese ein deutlich erhöhtes Risiko für das Auftreten der Erkrankungen (OR 12.23, 95% CI 3.34-44.76). Derselbe Autor konnte seine Erkenntnisse 2004 in einer endoskopischen Screeningstudie mit 198 Verwandten aus 69 Familien, bei denen 23 familiäre vs. 46 sporadische Fälle untersucht wurden, verifizieren [63]. Die Verwandten von familiären BE-Patienten waren signifikant häufiger von einem BE im Screening betroffen (21% neu diagnostizierte Fälle) [63]. Im Jahr zuvor stellte Drovdic *et al.* [64] in einer Untersuchung von 957 Probanden aus 70 Familien jedoch fest, dass die meisten Fälle sporadisch (109 vs. 15 Fälle) auftreten. Des Weiteren konnten die Autoren erstmals ein höheres Erkrankungsrisiko für Männer feststellen (♂3.3: ♀1) [64].

Ein familiäres Clustering lässt sich nach aktuellen Zahlen bei 7-10% der Patienten feststellen [65, 66]. Da jedoch kein monogenes Vererbungsmuster vorliegt, spricht man von einer komplex-genetischen Vererbung. Im Falle einer positiven Familienanamnese tritt die Barrett-Erkrankung meist in jüngerem Alter <60 Jahren auf [67]. In der Kohortenstudie von Chak Amitabh *et al.* [67] konnte außerdem gezeigt werden, dass die Prävalenz der klassischen Risikofaktoren Reflux, Adipositas und Nikotinkonsum bei familiären Erkrankungen niedriger als bei sporadischen Fällen ist. Hier scheint also die Genetik ausschlaggebender zu sein.

2.2.3.2 Genetische Risikovarianten

Kandidatengenanalysen

Die ersten genetischen Risikovarianten wurden in Assoziationsstudien (*siehe Abschnitt 2.1.2.1*) gesucht. Hierbei sind ausgewählte Gene, sogenannte Kandidatengene, mit Bedeutung z.B. im Zellzyklus, bei der DNA-Reparatur, Inflammation oder dem Xenobiotika-Metabolismus, auf Assoziation mit dem BE/EAC untersucht worden (**Tab. 2.1**). Nachfolgend werden einige Erkenntnisse aus diesen Studien dargestellt:

Zellzyklus

Casson *et al.* [68] untersuchten in einem Kollektiv von 126 GERD/125 BE/56 EAC und 95 Kontrollen Polymorphismen des Gens *cyclin D1* CCND1 auf Chromosom 11q13. Das gleichnamige Protein ist ein wichtiger Regulator des Zellzyklus. Über die Inaktivierung des *retinoblastoma protein* (pRb) wird die DNA-Synthese eingeleitet (G1-auf S-Phase) [69]. Die Funktion von pRb als Onkogen konnte bereits für einige Tumore, z.B. Colon, Sarkome, Pulmo und Mamma, gezeigt werden. Allerdings resultiert die Überexpression nicht durch eine somatische Mutation, sondern durch Induktion des Tumors selbst [70]. Dies wurde auch in der Studie von Casson *et al.* [68] bestätigt: Die Expression von Cyclin D1 war in der Fallgruppe zwar erhöht (OR 3.69, 95% CI 1.46-9.29), die Genvariante jedoch nicht assoziiert.

DNA-Reparatur

Es existieren diverse Mechanismen zur Reparatur von DNA. Einzelstrangbrüche durch UV können mittels *Nucleotide excision repair* NER behoben werden. Die hierfür verantwortlichen Kandidatengene *xeroderma pigmentosum group D* XPD und *Excision repair cross-complement group 1* ERCC1 wurden in 312 EAC/454 Kontrollen untersucht [71]. Mehrere Varianten (XPD Lys751Gln, ERCC1 8092 C/A, ERCC1 118 C/T) waren mit der Erkrankung assoziiert [71].

Ein weiterer Mechanismus zur Einzelstrangreparatur ist der *Base excision repair pathway* BER. Hier werden fehlerhafte Basen innerhalb des Zellzyklus ausgetauscht. Dies stellt einen entscheidenden Faktor zur Inhibierung von Replikationsfehlern und somit Mutationen dar. Allerdings waren die hierbei beteiligten Gene *X-ray repair cross-complement group 1* XRCC1, *AP endonuclease 1* APE1 und *8-oxoguanine DNA glycosylase* hOGG1 jedoch nicht signifikant assoziiert [71, 72].

Doecke *et al.* [73] untersuchten in ihrer Studie 263 EAC/ 1337 Kontrollen auf den Polymorphismus des Gens *O⁶-methylguanine DNA methyltransferase* (MGMT). Das codierende Protein ist ein essentieller Mechanismus zur Verhinderung von Mutagenesen bei der DNA-Replikation und -Transkription, in dem es das durch alkylierende Agenzien entstehende O⁶-Alkylguanin degradiert [74]. Auf Grund der beschriebenen Schlüsselrolle stellt es einen potentiellen Ansatz als Kandidatengen

dar. Die SNPs rs12268840 und I143V waren die am stärksten assoziierten Varianten für das EAC ($p_{rs12268840} 0.005$, $p_{I143V} < 0.001$). Ebenfalls bestand die Korrelation, dass Reflux das Risiko zur Entwicklung eines Karzinoms erhöht (rs12268840 homozygot: OR 15.55, 95% CI 5.8-42). Für Nikotin galt dieser Zusammenhang nicht [73].

Das Protein 53 (p53) ist ein bedeutender Tumorsuppressor, in dem es den Zellzyklus zur DNA-Reparatur stoppen oder Apoptose einleiten kann. Mutationen und *loss of heterozygosity* (LOH) von Tp53 wurden in einer Studie von Chao [75] mit Lymphozyten von 220 BE Patienten auf Bleomycin-Sensitivität untersucht. Das Risiko, aneuploide Zellen und ein Karzinom zu entwickeln, war mit LOH von Tp53 auf Chromosom 17 assoziiert.

Inflammation

Histopathologische Veränderungen durch chronische Inflammation sind ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung des Barrett-Oesophagus und Barrett-Karzinoms. Aus diesem Grund erscheint es naheliegend, diese als Kandidatengene zu analysieren. Für die Enzyme *cyclooxygenase-2* COX-2 und *inducible nitric oxide synthase* iNOS konnte eine Überexpression in BE/EAC-Gewebe nachgewiesen werden [76]. Dabei korreliert die Aktivität mit dem Grad der Dysplasie [77]. Insbesondere spielt die COX-2 vermittelte Prostaglandinsynthese eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese und verhindert anti-karzinogene Mechanismen des Immunsystems [77]. Dies ist insofern interessant, dass zahlreiche Studien den Einsatz von NSAIDs (COX-2-Hemmung) im Hinblick auf eine protektive Wirkung untersuchen. Für iNOS wurde auch eine Assoziation zu dem Tumorsuppressor p53 gefunden, der durch Mutation oder Funktionsverlust die negativen Effekte von iNOS zum Tumorwachstum verstärkt [78]. Ferguson *et al.* [79] führten eine Kandidatengenanalyse mit 212 BE/210 EAC/248 Kontrollen durch. Die Variante COX-2 8473 mit einem homo- oder heterozygoten C Allel war im Vergleich zu TT mit einem höheren Risiko für ein EAC assoziiert (OR 1.58, 95% CI 1.04-2.40, $p 0.03$). Für Polymorphismen des iNOS Ser⁶⁰⁸Leu konnte dagegen keine statistische Signifikanz gezeigt werden [79].

Xenobiotika-Metabolismus

Der vornehmlich hepatische Xenobiotika-Metabolismus ist durch 3 Phasen charakterisiert: I. Modifikation, II. Konjugation und III. Exkretion. Hieran sind zahlreiche Enzyme beteiligt. Bekannte Vertreter sind das Cytochrome P450 Monooxygenase-System (*Phase I, CYP450*) und das Gluthation S-Transferase-System (*Phase II, GST*). Polymorphismen der Gene für den Xenobiotika-Metabolismus oder bei bestimmten Erkrankungen waren schon bekannt, so dass eine Untersuchung als Kandidatengene für den BE/EAC nahelag. Die in mehreren Studien hierzu untersuchten Gene CYP1A1 (*CYP450*) sowie GSTM1, GSTP1 und GSTT1 (*GST*) konnten jedoch keine Assoziation zeigen [80-82]. van Lieshout *et al.* [83] wiesen für die GSTP1b-Variante eine niedrigere Enzym-Aktivität nach, welche möglicherweise einen Einfluss haben könnte. Die *alcohol dehydrogenase 3* ADH₃, ebenfalls ein Phase I-Enzym, ist an der Katalysation von 80% des Ethanol zu Acetaldehyd beteiligt [84]. Acetaldehyd ist ein Karzinogen. Polymorphismen im ADH₃-Gen klassifizieren den *metabolizer*-Typ (*fast, intermediate, slow*). In einer Studie von Terry *et al.* [84] mit 114 EAC und Kardia-Ca/160 Kontrollen hatten die homozygoten ADH₃¹⁻¹-Träger (=fast *metabolizer*) ein höheres assoziiertes Risiko (OR 1.7, 95% CI 1.0-2.9, Trinker und Nicht-Trinker), wobei es nur für die Trinker statistisch signifikant war. Somit scheint der Genotyp mit einem höheren Risiko einherzugehen, inwieweit dies nun für den Alkoholkonsum gilt, konnte die Studie jedoch nicht klären [84].

Antioxidantien

Daneben wurde auch eine protektive Genvariante (NQO1 T/T) entdeckt. *NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1* NQO1 ist ein potentes Antioxidans, welches kanzerogene Stoffe der Nahrung, welche Reflux triggern oder beim Rauchen entstehen (z.B. zyklischen und azyklischen Kohlenwasserstoffverbindungen), inaktivieren kann [85, 86]. Träger der TT-Variante hatten ein 6.2-fach erniedrigtes Risiko ein EAC zu entwickeln (OR 0.16, 95% CI 0.03-0.94, P 0.04) [86]. Für die *manganese superoxide dismutase* (MnSOD), ebenfalls ein Antioxidans, konnte kein protektiver Effekt nachgewiesen werden [86].

Tab. 2.1 Kandidatengenanalysen für Barrett-Oesophagus und Barrett-Karzinom

Gen (Anz. der typisierten Varianten, wenn n>1)	Funktion des/der kodierenden Proteins/e	Patienten (n)			Kontrollen (n)	Erstautor
		Reflux ¹	BE	BC		
CYP1A1 (2), GSTP1 (3), GSTM1, GSTT1	Xenobiotika-Metabolismus		98	34	247	van Lieshout, E.M. <i>et al.</i> 1999 [83]
GSTM1, GSTP1, mEH (2), CYP1A1 GSTT1	Xenobiotika-Metabolismus DNA-Reparatur			45	45	Casson, A.G. <i>et al.</i> 2003 [87]
IL-1B, IL-1RN, IL-4, IL-6, TNF-A, IL-10 (3)	Inflammation			108	210	El-Omar, E. M. <i>et al.</i> 2003 [88]
NQO1	Antioxidantien			61	252	Sarbia, M. <i>et al.</i> 2003 [89]
GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1	Xenobiotika-Metabolismus			27	130	Abbas, A. <i>et al.</i> 2004 [80]
CCND1 XPD (2), XRCC1 (2), XRCC3, XPC	Zellzyklus DNA-Reparatur	126	125	56	95	Casson <i>et al.</i> 2005 [68, 90]
Cyclin D1, p 16	Zellzyklus			56	253	Geddert <i>et al.</i> [91]
NQO1	Antioxidans			140	260	von Rhaden <i>et al.</i> 2005 [92]
GSTT1, GSTM1, GSTP1	Xenobiotika-Metabolismus			9	137	Jain, M. <i>et al.</i> 2006 [81]
XPD (3), XPC, XRCC1, XRCC3	DNA-Reparatur			96	472	Ye <i>et al.</i> 2006 [93]
NQO1, MnSOD	Antioxidantien	146	200	144	94	di Martino <i>et al.</i> 2007 [86]
GSTM3	Xenobiotika-Metabolismus			9	200	Jain, M. <i>et al.</i> 2007 [94]

Literaturdiskussion

Gen (Anz. der typisierten Varianten, wenn n>1)	Funktion des/der kodierenden Proteins/e	Patienten (n)			Kontrollen (n)	Erstautor
		Reflux ¹	BE	BC		
PTGS2 (2) (=COX2)	Inflammation	240	255	140		Moons <i>et al.</i> 2007 [95]
GSTP1 (6), GPX2 (2) MnSOD (3)	Xenobiotika-Metabolismus Antioxidantien		189	207	223	Murphy, S.J. <i>et al.</i> 2007 [96]
ADH3	Xenobiotika-Metabolismus			114	160	Terry <i>et al.</i> 2007 [84]
GSTT1, GSTM1, GSTP1, NAT1, CYP1A1m2	Xenobiotika-Metabolismus			67	209	Wideroff <i>et al.</i> 2007 [82]
MGMT (5), ERCC1, XPD, XRCC1	DNA-Reparatur			263	1337	Doecke <i>et al.</i> 2008 [73]
COX2, iNOS hOGG1, XRCC1, XPD	Inflammation DNA-Reparatur	230	212	209	248	Ferguson <i>et al.</i> 2008 [72, 79]
EGF	Zellproliferation			312	447	Lanuti <i>et al.</i> 2008 [97]
XPD (2), ERCC1 (2), XRCC1, APE1, hOGG1	DNA-Reparatur			312	454	Tse <i>et al.</i> 2008 [71]

¹GERD oder Oesophagitis; Abk: BC: Barrett-Karzinom, BE: Barrett-Oesophagus

Genomweite Assoziationsstudien (GWAS)

Die Aussagekraft der Assoziationsanalysen zum Beitrag der genetischen Varianten zur komplex-genetischen Vererbung ist auf Grund der geringen Fallzahlen und typisierten genetischen Varianten (i.d.R. <5 Marker pro Kandidatengen) stark limitiert. Mit den genomweiten Assoziationsstudien wurde ein effektives humangenetisches Verfahren zur hypothesenfreien Untersuchung multifaktorieller Erkrankungen entwickelt (*siehe Kapitel 2.1.2.2*). Bislang sind 3 GWAS publiziert, hierbei konnten 8 Risikovarianten für den BE/EAC identifiziert werden (**Tab. 2.2**).

FOXF1 und MHC

Su et al. untersuchten in einem europäischen BE-Kollektiv 1852 BE-Fälle/5172 Kontrollen und replizierten die Ergebnisse in mehreren Kollektiven mit insgesamt 5986 Patienten/12825 Kontrollen [15]. Zwei Varianten waren mit einer Signifikanz von $p < 5 \times 10^{-8}$ mit dem Barrett-Oesophagus assoziiert. Die höchste Assoziation, SNP **rs9936833** auf Chromosom 16q24, liegt neben dem Gen **FOXF1**, einem wichtigen Transkriptionsfaktor im Rahmen der embryonalen Entwicklung des Intestinaltraktes [98]. Mutationen in diesem Gen können im Gastrointestinaltrakt u.a. zur Oesophagusatresie, Tracheo-oesophagealen Fistel und intestinaler Malrotation führen [98-101]. Der zweite SNP-Marker **rs9257809** ist auf Chromosom 6p21 in der sogenannten **MHC-Region** (*major histocompatibility complex*) zu finden. Die Zuordnung zu einem Gen gelang nicht, da im Bereich der HLA-Gene (*human leukocyte antigen*) ein sehr komplexes Kopplungsungleichgewicht zwischen genetischen Varianten besteht [102]. Die Ergebnisse konnten für FOXF1 in einer Studie von *Dura et al.* mit 318 Fällen/605 Kontrollen auch für das EAC repliziert werden [103]. Das Minor-Allel G von rs9257809 hatte eine negative Effektstärke, somit kann jedoch ein Rückschluss auf das von *Su et al.* gefundene Risiko-Allel A [15] gezogen werden [103].

CRTC1, FOXP1 und BARX1

Levine et al. führten eine zweite GWAS in einem europäischen EAC- und BE-Kollektiv von 1516 EAC/2416 BE/3209 Kontrollen durch und replizierten die Ergebnisse in einem Kollektiv von 874 EAC/759 BE/6911 Kontrollen [14]. Der signifikanteste SNP-Marker, **rs10419226** auf Chromosom 19p13, liegt im Bereich des Introns des **CRTC1**-

Gens. *Gu et al.* konnten nachweisen, dass eine fehlende Regulierung von *CRTC1* durch die Tumorsuppressorkinase *LKB1* über diverse Signalwege zur Metastasierung von oesophagealen Karzinomzellen führt [104]. Das nächstgelegene Gen des zweiten SNP-Markers **rs2687201** auf Chromosom 3p14 ist der Transkriptionsfaktor **FOXP1** aus der *FOX*-Familie, welcher eine essentielle Rolle in der embryonalen Entwicklung von Herz, Lunge und speziell der Muskulatur des Oesophagus spielt [105]. Des Weiteren ist er an der Entwicklung und Regulation von B-Zellen beteiligt [106]. Deletionen auf Chromosom 3 gehören zu den dritthäufigsten genetischen Aberrationen in Tumoren [107]. Insbesondere für die Region 3p wurde eine hohe Dichte an Tumorsuppressorgenen für solide Tumore, u.a. *SCLC*, *NSCLC*, *Mamma-Ca*, nachgewiesen [108-110]. *FOXP1* stellt ein interessantes Gen in der Funktion eines Tumorsuppressors oder Onkogens dar [111, 112]. In B-Zell-Lymphomen wird eine Funktion als Onkogen diskutiert [112]. Es existiert eine hohe Evidenz, dass *FOXP1* in soliden Tumoren die Rolle eines Tumorsuppressors einnimmt [111-113]. mRNA und Protein des vornehmlich nukleär vorkommenden *FOXP1* ist in vielen normalen Geweben nachweisbar [113]. In neoplastischem Gewebe wurden erniedrigte Level, erhöhte Level oder eine aberrante Lage im Zytoplasma nachgewiesen [113]. Oftmals geht den Veränderungen der Mechanismus des *LOH* des Gens voraus [113]. Der dritte SNP-Marker **rs11789015** auf Chromosom 9q22 konnte dem Gen **BARX1** zugeordnet werden. Der Transkriptionsfaktor ist wie *FOXP1* an der embryonalen Entwicklung von Oesophagus und Magen beteiligt [114]. Insbesondere wird die Separation von Oesophagus und Trachea sowie Migration der Plattenepithelzellen in den Oesophagus durch *BARX1* gesteuert [114].

GDF7, TBX5 und ALDH1A2

Die dritte GWAS wurde von *Palles et al.* in einem europäischen BE-Initialkollektiv von 1852 BE/5172 Kontrollen durchgeführt und anschließend mit 8306 BE/15890 Kontrollen repliziert [13]. Dabei wurden zwei weitere SNP-Marker mit signifikanter Assoziation identifiziert. Das nächstgelegene Gen zu **rs3072** auf Chromosom 2p24 ist **GDF7**, welches für das Protein *BMP12* kodiert. Der *bone morphogenetic protein*-Signalweg spielt zusammen mit dem *Hedgehog*-, *WNT*- und *Retinoic acid*-Signalweg eine bedeutende Rolle in der embryonalen Entwicklung des Vorderdarms [115]. Aus ihm entsteht der obere Gastrointestinaltrakt sowie Trachea und Pulmo. Durch

Suppression von *BMP4* mit dem Antagonisten *Noggin* (Gen *nog*) wird die Differenzierung des Zylinderepithels aus dem Vorderdarm zu Plattenepithel des Oesophagus gesteuert [115]. *Nog*-Knockout-Mäuse zeigen eine fehlende Separation des Vorderdarms sowie ein Zylinderepithel des Oesophagus [116]. Der zweite SNP-Marker **rs271108** auf Chromosom 12q24 neben dem Gen **TBX5** war mit einem niedrigeren Risiko assoziiert. Nach weiteren Analysen mit Daten des ENCODE-Projektes erreichte **rs1920562** neben dem genannten Gen eine signifikante Assoziation zum BE/EAC. **TBX5** ist an der embryonalen Entwicklung von Herz und Thorax beteiligt. Mutationen können zu thorakalen, diaphragmalen, pulmonalen und trachealen Malformationen führen [117]. Der dritte SNP-Marker **rs3784262** auf Chromosom 15q22 liegt nahe dem Gen **ALDH1A2**, einer Alkoholdehydrogenase. **ALDH1A2** katalysiert die Synthese von RA, einem Vitamin A-Metaboliten, und scheint im Alkoholmetabolismus involviert zu sein [118]. Der Effekt von Alkoholkonsum ist beim BE/EAC im Gegensatz zum Plattenepithelkarzinom invers korreliert [119]. Die RA-Synthese ist außerdem bei der embryonalen Differenzierung des Plattenepithels im Vorderdarm beteiligt [120].

Beitrag von genetischen Risikovarianten zur multifaktoriellen Genese des EAC

Nach Berechnungen von Ek *et al.* tragen genetische Varianten zu ca. 35% (SE 6.0%) zu der multifaktoriellen Genese der Barrett-Erkrankung bei [121]. Es ist jedoch stark anzunehmen, dass diese Zahl überschätzt ist. Im Vergleich zu gut untersuchten multifaktoriellen Erkrankungen mit großen Patientenkollektiven, wie dem Mamma-Karzinom und kolorektalen Karzinom (CRC), wird das tatsächliche Risiko durch genetische Varianten vermutlich bei ca. 10% liegen (Mamma-Ca ~16%, CRC ~7% [122]). Die Analyse von Palles *et al.* erscheint eher kongruent, genetische Varianten tragen hier zu 9.99% (SE 1.2%) zur multifaktoriellen Genese des EAC bei [13].

Tab. 2.2 Genomweit-signifikant assoziierte Risikofaktoren für Barrett-Oesophagus und Barrett-Karzinom

Chromosom, Variante	Gen	Funktion	Frequenz des Risikoallels bei Patienten [%]	Frequenz des Risikoallels bei Kontrollen [%]	Relatives Risiko (RR) (95% CI)	Assoziation mit EAC und/oder BE	Studie
16q24, rs9936833	FOXF1	Embryonale Entwicklung	42.0	38.0	1.14 (1.10-1.19)	BE [15] und EAC [103]	Su <i>et al.</i> (2012) [15]
6p21, rs9257809	MHC A-Allel	HLA	90.0	87.0	1.21 (1.13-1.28)	BE	
19p13, rs10419226	CRTC1	Tumorgenese	49.2	45.6	1.18 (1.12-1.24)	EAC und BE	Levine <i>et al.</i> (2013) [14]
3p14, rs2687201	FOXP1	Embryonale Entwicklung, Tumorgenese	33.5	30.3	1.18 (1.12-1.25)		
9q22, rs11789015	BARX1	Embryonale Entwicklung	74.3	71.7	1.20 (1.13-1.26)		
2p24, rs3072	GDF7		41.0	36.0	1.14 (1.09-1.18)	BE	Palles <i>et al.</i> (2015) [13]
12q24, rs2701108	TBX5		62.0	59.0	0.90 (0.86-0.93)		
15q22, rs3784262	ALDH1A2		n.a.	n.a.	0.90 (0.87-0.93)	EAC und BE	

2.2.3.3 Histopathologische und molekularpathologische Veränderungen

Zahlreiche Studien untersuchten die histopathologischen und molekularpathologischen Veränderungen, welche zur Entstehung der intestinalen Metaplasie und über die MDC-Sequenz zur Entwicklung eines Adenokarzinoms beitragen. Die zellpathologischen Prozesse sowie Beiträge einzelner Faktoren sind noch nicht vollständig verstanden. Nachfolgend werden einige relevante Mechanismen beschrieben. Die Übergänge sind fließend. Zum besseren Verständnis sind die Prozesse jedoch in Teilabschnitte gegliedert. Der Einfluss von genetischen Risikovarianten ist nicht berücksichtigt bzw. wird in Kapitel 2.2.3.2 thematisiert.

GERD

Durch die Reflux-bedingte Exposition von Magen- und Gallensäure, aber auch von Pankreasenzymen und angedauter Nahrung, wird die apikale Membran des Plattenepithels geschädigt [123]. Durch das Eindringen der Säuren in die basolaterale Membran kommt es zu einer intrazellulären Azidose mit konsekutivem Zelluntergang und Nekrose [123]. Studien konnten zeigen, dass BE-Patienten im Gegensatz zu GERD-Patienten vermehrt Gallensäuren ausgesetzt sind [124].

Lokale Inflammation: Oesophagitis

Reflux führt zu einer chronischen lokalen Inflammation, dem zentralen Pathomechanismus bei der Entstehung des Barrett-Oesophagus [125]. Die Phase der Oesophagitis ist vornehmlich von inflammatorischen Mediatoren geprägt, die von Epithelzellen und rekrutierten Immunzellen ausgeschüttet werden [125]. Th 1-Zellen beantworten die Signale mit der Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (u.a. TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-1 β) und Chemokine (u.a. IL-8) [126]. Des Weiteren werden *reactive oxygen species (ROS, Sauerstoffradikale: O₂⁻, HO und H₂O₂)* frei sowie die Enzyme COX-2 und iNOS aktiviert [125]. Die durch die COX-2 synthetisierten Prostaglandine spielen sowohl eine entscheidende Rolle bei inflammatorischen als auch neoplastischen Prozessen [33, 127].

Intestinale Metaplasie: Barrett-Oesophagus

Den Barrett-Oesophagus zeichnet das Phänomen der intestinalen Metaplasie aus. Bei dem GERD-induzierten Gewebeschaden wird das ortsständige oesophageale Plattenepithel durch ein hochspezialisiertes, intestinales Zylinderepithel ersetzt. Wissenschaftlich haben sich zwei grundlegende Modelle zum Ursprung der Zellen entwickelt [128, 129]:

1) Modell der Transdifferenzierung: Eine lokale, ausdifferenzierte Plattenepithelzelle transformiert seinen Phänotyp in spezialisiertes, intestinales Zylinderepithel [130].

2) Modell des „Transcommitment“: Eine Stamm-/Progenitorzelle migriert an den Locus und „reprogrammiert“ sich zu spezialisiertem, intestinalen Zylinderepithel [128].

Ursprung der Stamm-/Progenitorzelle:

- a) Plattenepithel-Progenitorzelle in der basalen Membran des Plattenepithels selbst [131] oder in submukösen Drüsen/-gängen [132]
- b) Zirkulierende Stammzelle des Knochenmarks [133]
- c) Zylinderepithel-Progenitorzelle der Kardia [134] oder des gastrooesophagealen Übergangs [135]

Das Modell der **Transdifferenzierung** scheint der komplexen Differenzierung des Barrett-Epithels nicht gerecht zu werden [128]. Für die differenzierten Eigenschaften des Epithels und die darin enthaltenen spezialisierten Zellen des gastralen als auch intestinalen Gewebes [128] wie Becherzellen, Paneth-Körnerzellen, enteroendokrinen Zellen, Enterozyten-ähnlichen Zellen, ist die Beteiligung von Prozessen der genetischen Umprogrammierung sehr wahrscheinlich [128, 136]. Wang David H. *et al.* [128] und Zhang W. *et al.* [129] favorisieren in ihren Reviews auf Grund der Studienlage das Modell des „**Transcommitment**“ einer Stamm-/Progenitorzelle des Plattenepithels und/oder der submukösen Drüsen/-gänge im Oesophagus (**Abb. 2.6**).

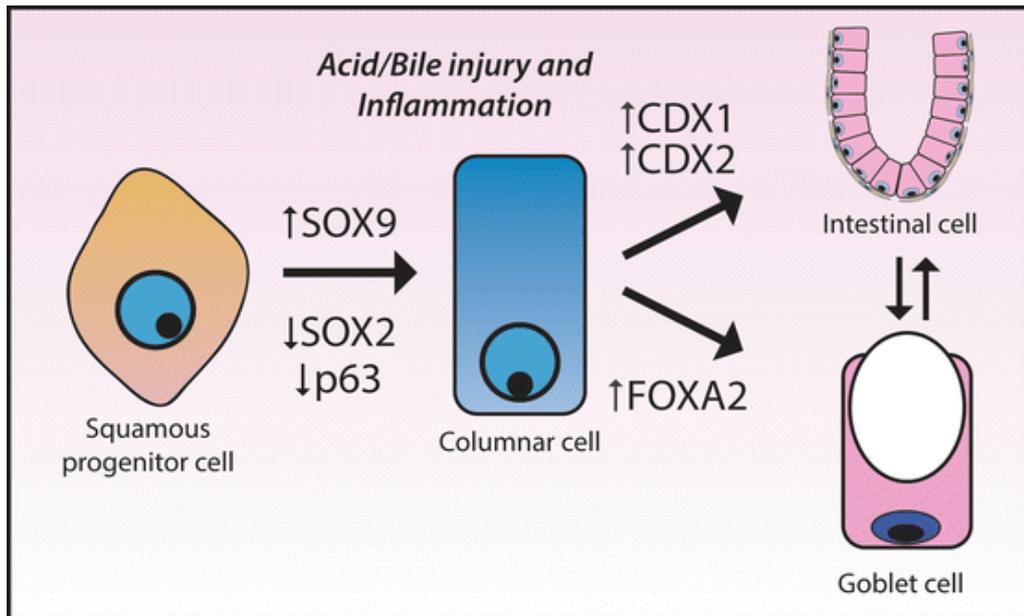


Abb. 2.6 Modell des „Transcommitment“ einer Plattenepithel-Progenitorzelle zu Barrett-Epithel. *aus* [128] Exposition von Magen- und Gallensäure aktiviert über Inflammationsprozesse Stamm-/Progenitorzellen des Plattenepithels. Upregulation des für das Zylinderepithel charakteristischen Transkriptionsfaktors SOX9 sowie Downregulation der Plattenepithel-Transkriptionsfaktoren SOX2 und p63 führen zur Differenzierung in Zylinderepithel. CDX1 und CDX2 steuert die Ausbildung zu intestinalen Zellen, während FOXA2 zu Becherzellen führt. Intestinale Zylinderepithelzellen differenzieren sich zu Becherzellen oder Becherzellen werden zu intestinalen Zellen. [128]

An Hand des Modells aus **Abb. 2.6** lassen sich die bislang bekannten molekularpathologischen Bausteine, die zur Reprogrammierung einer Stamm-/Progenitorzelle in ein Barrett-Epithel notwendig wären, in einen Gesamtkontext einbetten und so besser verstehen. Die nachfolgende Darstellung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit. Aus Gründen der Übersichtlichkeit kann nur auf einzelne relevante Aspekte eingegangen werden.

Die lokalen und möglicherweise auch systemischen inflammatorischen Prozesse führen über noch unbekannte Mechanismen zur Reprogrammierung einer Plattenepithel-Progenitorzelle. In der Progenitorzelle werden (u.a.) Signalwege aktiviert [128, 129, 137], die normalerweise eine bedeutende Rolle bei der embryonalen Entwicklung des Vorderdarms spielen [115, 138]: *Wingless* (WNT), *Hedgehog* (HH), *Bone morphogenetic protein 4* (BMP4) und *Retinoic acid* (RA).

Die Zelle induziert HH-Signale, die wiederum den BMP-Signalweg aktivieren [138]. Dieser steuert normalerweise die Differenzierung des Zylinderepithels im Vorderdarm zu Plattenepithel im späteren Oesophagus [115]. BMP4 führt hier jedoch zur Upregulation von **SOX9** [139]. Außerdem wird über den aktiven *BMP receptor type 1A* **FOXA2** hochreguliert [140]. Hierdurch werden Gene zur Differenzierung in Zylinderepithel (SOX9), z.B. DMBT1, Zytokeratin 8, und Becherzellen (FOXA2), z.B. Mucin 2 (MUC2), aktiviert [137, 139, 140].

Die inflammatorischen Prozesse induzieren den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B [141]. NF- κ B gilt als Schlüsselfaktor der Inflammation und Tumorgenese. Seine Gene codieren für Zytokine und Akutphaseproteine (u.a. CRP, TNF- α , IFN- γ , IL-1,2,6,8,12), Apoptoseregulatoren (Caspasen, TRAF) Transkriptionsfaktoren (p53, c-Myc, I κ B- κ), Zellzyklusregulatoren (p21, cyclin D1), Immunorezeptoren (EGFR), Enzyme (COX-2, iNOS) und Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, E-selectin) [141]. Interessanterweise können Magen- und Gallensäuren NF- κ B auch selbst aktivieren [141]. In dem Modell von Wang David H. *et al.* [128] induziert der Transkriptionsfaktor in der Plattenepithel-Progenitorzelle die homöotischen Gene **CDX1** und **CDX2** [142]. Die beiden Gene haben besondere Bedeutung bei der Ausbildung des Phänotyps der intestinalen Metaplasie [143]. CDX2 kann bereits in frühen Stadien der Oesophagitis nachgewiesen werden, CDX1 tritt erst später in Erscheinung [143]. BMP4 kann ebenfalls CDX2 induzieren [144].

Es erscheint naheliegend, dass im Zuge der Reprogrammierung der Plattenepithel-Progenitorzelle auch spezifische Gene für das Plattenepithel verändert werden müssen [128, 129, 137]. Der Transkriptionsfaktor **SOX2** hat im embryonalen Vorderdarm eine wichtige Bedeutung für die Steuerung der Differenzierung zu Plattenepithel [145]. Dies geschieht über Bindung an DNA als Heterodimer mit anderen Interaktionspartnern, wie z.B. p63 [146]. Heterozygotie von SOX2 ist bei Menschen mit Oesophagusatresie und Tracheo-oesophagealer Fistel assoziiert [145]. SOX2-hypomorphe Mäuse zeigen einen Phänotyp aus mehrschichtigem Zylinderepithel und ektopen Mucoszellen [145]. Des Weiteren konnte eine Überexpression von SOX2 und p63 im ESCC nachgewiesen werden [146]. Umgekehrt findet sich über die MDC ein zunehmender Verlust der SOX2-Expression [147].

RA ist wahrscheinlich auch an der morphologischen Differenzierung zu Zylinderepithel beteiligt [138]. Es konnte gezeigt werden, dass in BE-Gewebe höhere RA-Level als in Dysplasien vorkommen [138]. WNT spielt normalerweise nur für die intestinale Entwicklung eine Rolle, aberrante Signale konnten jedoch ebenfalls für die *IEN* nachgewiesen werden [148]. Die Funktion ist noch nicht verstanden.

Weiterhin bleibt unklar, ob sich Zylinderepithelzellen zu Becherzellen oder Becherzellen zu intestinalen Zellen differenzieren können [128].

Karzinogenese

Inflammation

Der Zusammenhang zwischen Inflammation und Tumorgenese ist bei anderen Tumorerkrankungen gut untersucht [149]. Es ist daher vorstellbar, dass dieser Zusammenhang auch für das EAC gilt [125]. In dem „*inflammatorischen Mikromilieu*“ wird die Proliferation von entarteten Zellen maßgeblich unterstützt [150]. Epitheliale und immunogene Zellen, proinflammatorische Mediatoren wie z.B. TNF- α , aber vor allem auch der Tumor selbst unterhalten die inflammatorischen Prozesse [151]. Daneben könnte auch eine chronische systemische Inflammation eine Rolle spielen.

Die COX-2 und ihre synthetisierten Prostaglandine sind entscheidende Faktoren bei der Inflammation und Karzinogenese, denn sie können das Überleben abnormaler Zellen entscheidend verlängern [150]. Sie sind in der Lage, Apoptose zu verhindern, die Zellproliferation und Angiogenese zu stimulieren und anti-kanzerogene Mechanismen des Immunsystems zu inhibieren [77, 152]. COX-2 und iNOS werden in Korrelation zum Grad der Dysplasie überexprimiert [76, 77], während antioxidative Enzyme wie Glutathion und Mn-SOD abnehmen [153]. Prins *et al.* [154] konnten zeigen, dass eine hohe COX-2-Expression mit einer schlechten Gesamtüberlebensrate assoziiert ist (HR 1.65 95% CI 1.04–2.61; p 0.034), für das Tumorstadium T3 sogar als unabhängiger prognostischer Faktor für das tumorspezifische Überleben (HR 1.81 95% CI 1.10–2.95; p 0.019). Ebenfalls nehmen die TNF- α -Level über die MDC zu [155] und unterstützen die Bildung von ROS im Gewebe. Dies führt zu DNA-Schäden/-Mutationen und der Aktivierung von Proto-Onkogenen [156, 157]. Die Phase der Metaplasie ist vornehmlich von einer Th 2-Zell-

Antwort mit antiinflammatorischen Zytokinen (u.a. IL-4) geprägt [158], wodurch fehlerhafte Zellen den immunogenen Mechanismen entgehen können.

Die zentrale Adipositas führt neben den bekannten metabolischen Störungen zu einer chronischen systemischen Inflammation [159]. Adipozyten sind metabolisch aktiv. Sie schütten Adipokine wie Leptin und Adiponectin und proinflammatorische Zytokine wie TNF- α oder IL-6 aus [159, 160]. Das Fettgewebe ist seinerseits von Immunzellen infiltriert, welche Zytokine produzieren. Leptin erhöht die Konzentration von Insulin und *insulin growth factor-1* IGF-1 [160]. Als potente Wachstumsfaktoren können sie direkt in die Proliferation von Zellen und Reduktion von Apoptose eingreifen [33, 160]. Supportive Daten über den Zusammenhang von erhöhten Leptin-/IGF-1-Leveln und dem Risiko für ein EAC sind vorhanden [160-163]. Für Adiponectin besteht interessanterweise eine inverse Assoziation (HR 0.34 95% CI 0.14–0.82 [162]) [160, 162].

„Hallmarks of Cancer“ der Progression zum Barrett-Karzinom

Die Prozesse von der Metaplasie über Dysplasien bis hin zum Adenokarzinom dauern vermutlich mehrere Jahre [33]. Hierzu sind nach der renommierten Hypothese von Hanahan *et al.* [164] 6 entscheidende pathophysiologische Veränderungen der Zelle, die sogenannten „*Hallmarks of Cancer*“, zur Karzinogenese notwendig. 2011 wurden sie um 4 weitere Punkte ergänzt [151] (**Abb. 2.7**). Viele molekularpathologische Prozesse des Barrett-Karzinoms sind aktuell noch nicht erforscht. Nachfolgend sind einige relevante „Hallmarks of Cancer“ dargestellt.

Die inflammatorischen Prozesse begünstigen eine genetische Instabilität, einem der entscheidenden Mechanismen der Karzinogenese [33, 165]. Chromosomeninstabilitäten, wie Zugewinn und Verlust von Chromosomen/-abschnitten und LOH scheinen die häufigsten Ereignisse der Tumorgenese des EAC zu sein [33]. Des Weiteren sind SNP-Mutationen zu nennen. Li *et al.* [166] konnten in einer genomweiten SNP-Array-Analyse von Gewebeproben eine Zunahme der Chromosomeninstabilitäten über die MDC nachweisen (BE früh <2% vs. EAC >30%, $p < 0.001$) (**Abb. 2.8**). SNP-Mutationen stiegen von <2% auf >20% an [166].

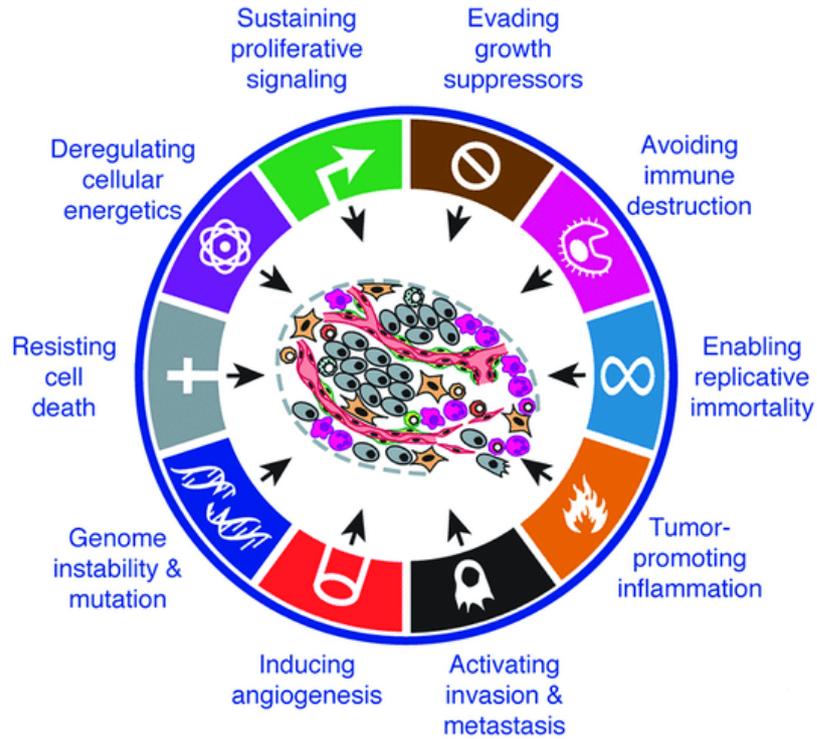


Abb. 2.7 Hallmarks of Cancer. *mod. nach* [151]

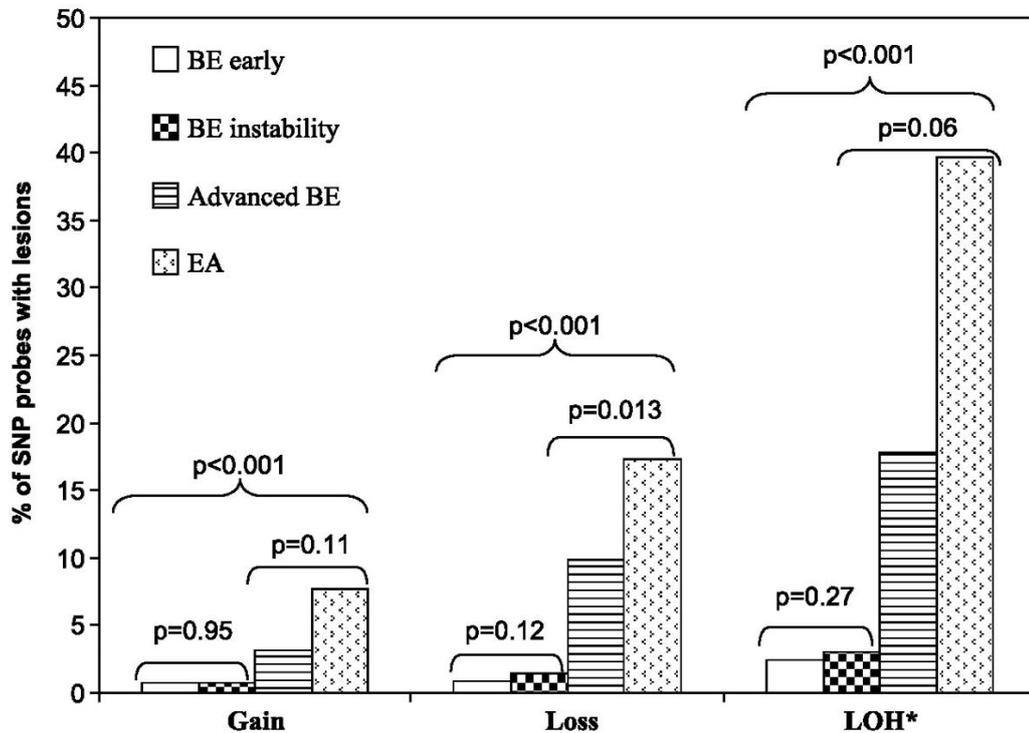


Abb. 2.8 Prozentualer Anteil der Chromosomeninstabilitäten Zugewinn (Gain) und Verlust (Loss) von Chromosomen/-abschnitten und loss of heterozygosity (LOH) über die MDC. *aus* [166]

Ein frühes Ereignis scheint der LOH auf Chromosom 9 zu sein [33, 167]. Auf Bande 9p21.3 findet sich das Gen *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* CDKN2A, welches zwei Tumorsuppressoren des Zellzyklus, p16 und p14^{ARF}, kodiert [150]. p16 inhibiert die *cyclin-dependent kinase 4* CDK4 und CDK6 und aktiviert hierdurch das *retinoblastoma protein* pRb, welches den Übergang der G1-Phase auf die S-Phase blockiert [150]. p14^{ARF} aktiviert wiederum den Tumorsuppressor Tp53. Maley [167] konnten nachweisen, dass epigenetische und genetische Aberrationen von CDKN2A zu den häufigsten Ereignissen von frühen BE-Stadien bis hin zum EAC gehören. Das Protein *cyclin D1* CCND1 auf Chromosom 11q13 leitet ebenfalls über die Inaktivierung von pRb die DNA-Synthese ein [69]. Eine onkogene Funktion wurde bereits für andere Tumore nachgewiesen [70]. Der Tumor scheint seine eigene Proliferation durch Überexpression von CCND1 zu steuern [70], welche auch in Barrett-Gewebe nachgewiesen werden konnte [168].

Ein weiterer „Hallmark“ ist die LOH und Mutationen von 17p. Auf 17p13.1 liegt der Tumorsuppressor Tp53, dem auf Grund seiner Schlüsselfunktionen der Name „Wächter des Genoms“ nachgesagt wird [169]. Zellen mit DNA-Schäden werden durch ihn in die Apoptose geschickt. Mutationen von Tp53 spielen daher eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese und sind in vielen Tumoren zu finden [169]. Dies kann so weit gehen, dass es zu einem kompletten Funktionsverlust des Gens oder seiner Produkte kommt [169]. Zellen mit DNA-Schäden können so durch die dysregulierten oder funktionslosen Zellzyklus-Kontrollpunkte proliferieren [150].

Zudem werden zelluläre Signalwege fehlreguliert, die Auswirkung auf die Zellproliferation haben. So wurde eine Überexpression von *epidermal growth factor receptor* EGFR und seinen Liganden EGF und TGF- α sowie *human epidermal growth factor receptor 2* HER2 nachgewiesen [170, 171]. HER2 tritt insbesondere in späten Stadien der Karzinogenese auf [172] und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert [173].

Durch akkumulierte Mutationen und fehlende/fehlerhafte Regulierungsmechanismen ist es Zellen möglich, sich innerhalb des Epithels zu selektieren und zu proliferieren, einen Prozess, den man als klonale Expansion bezeichnet [150].

Chromosomenaberrationen (Aneuploidie und Tetraploidie 4N) sind wie die Chromosomeninstabilitäten Ausdruck der genetischen Instabilität. Wie zu erwarten, haben durchflusszytometrische Studien eine Zunahme der Ereignisse über die MDC nachweisen können [150, 174, 175]. Interessant war allerdings folgender Aspekt. Reid *et al.* [174] führten eine Baseline-Endoskopie (T=0) durch und verfolgten die Barrett-Patienten prospektiv über 15 Jahre. Lagen zum Zeitpunkt T=0 bei Metaplasien/LGIEN Chromosomenaberrationen vor, war der genetische Status stärker für die maligne Entartung prädiktiv als der histologische Status (kumulative 5 Jahres EAC-Inzidenz_{Metaplasie/LGIEN}: 28% bei 4N/Aneuploidie zum Zeitpunkt T=0 vs. 0% bei keiner Aberration zum Zeitpunkt T=0) [174]. Es wurde daher von Reid *et al.* [33] postuliert, dass Aneuploidie und 4N [174] als Biomarker insbesondere in Kombination mit LOH von 9p und 17p [176] dienen könnten.

Telomere sind repetitive nicht-codierende DNA-Fragmente, welche das Chromosom vor Abbau oder Verschmelzung mit anderen Chromosomen schützen [150]. Sie werden bei jeder Replikation um 50-200Bp kürzer. Bei Bestehen einer kritischen Länge der Telomere wird das Chromosom geschützt, in dem die Zelle in den Zellzyklus-Arrest G₀ geschickt wird [150]. Telomerasen können die Verkürzung verhindern. Eine Reaktivierung des Enzyms lässt sich in 85-95% der Karzinome nachweisen [177]. Die Level der Telomerase RNA (hTR) nahmen über die MDC in bis zu 100% der Karzinomproben zu [178]. Die Reaktivierung der Telomerase führt zu einer Immortalisierung der Zelle.

E-cadherin stellt ein wichtiges epitheliales Protein zur Zell-Zell-Adhäsion dar. Ein Verlust der Expression ist mit der Karzinogenese von vielen Tumoren assoziiert [179]. Swami *et al.* [179] konnten diesen Zusammenhang auch für das EAC feststellen. Dabei besteht eine inverse Assoziation über die MDC, die Expressionslevel nehmen ab (p <0.01) [180]. Dies könnte die Ablösung von metastatischen Zellen aus dem Zellverbund begünstigen [142].

Die Angiogenese ist ein weiterer entscheidender „Hallmark“ für die Tumorgenese. Die Erhöhung der Expression von VEGF-A aus der Glykoprotein-Familie der *vascular endothelial growth factors* VEGFs gilt hierbei als einer der potentesten Mechanismen [178], welcher in diversen Tumoren nachzuweisen ist [181]. Auch für das EAC gibt es

Hinweise für eine Korrelation der Angiogenese mit VEGF(-A)-Expression [154, 182, 183], diese gehen mit einer schlechten Prognose einher [154].

Epigenetik

Nicht alle Phänomene lassen sich durch „reine“ genetische Prozesse erklären. Hier könnten epigenetische Phänomene, wie DNA-Methylierung [184] und Histon-Modifikation, eine Erklärung bieten und damit einen entscheidenden Beitrag zur Tumorgenese leisten [141, 184]. Interessant ist dies vor allem vor dem Hintergrund, dass Kaz *et al.* [185] eine Assoziation zwischen den Risikofaktoren Adipositas, Nikotin und Geschlecht (hier Frauen) mit DNA-Methylierungen finden konnten. Die Faktoren könnten also über epigenetische Vorgänge die Entwicklung der MDC beeinflussen [185]. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um die epigenetischen Phänomene und deren Assoziation zum Barrett-Karzinom zu untersuchen.

2.2.3.4 Nicht-genetische Risikofaktoren und protektive Faktoren

Die Ätiologie des Barrett-Karzinoms wird im nachfolgenden Kapitel um die nicht-genetischen endogenen und exogenen Risikofaktoren, aber auch um protektive Faktoren vervollständigt (**Tab. 2.3**).

Tab. 2.3 Übersicht relevanter endogener und exogener Risikofaktoren sowie protektiver Faktoren des Barrett-Karzinoms. mod. nach [186]

Endogene Faktoren	Exogene Faktoren	Protektive Faktoren	Geringe*/Keine Evidenz
Alter	Barrett-Oesophagus	<i>H. pylori</i> Infektion	Alkoholkonsum
Kaukasische Abstammung	GERD	Acetylsalicylsäure und andere NSAIDs	Verzehr von Obst* und Gemüse*
Männliches Geschlecht	LSBE	Statine	Kaffeekonsum
Positive Familienanamnese	Hiatushernie		
	Zentrale Adipositas		
	Nikotinabusus		

Endogene und exogene Risikofaktoren

Ein gut untersuchter endogener Risikofaktor ist eine kaukasische Abstammung. Im Vergleich zu einer afrikanischen Abstammung besteht ein 5-fach erhöhtes Risiko an einem EAC zu erkranken [10, 11, 187]. Wie bereits beschrieben, zeigt sich eine deutliche Assoziation zum männlichen Geschlecht [1, 6, 7, 44]. Das RR ist in etwa 7-mal höher im Vergleich zu Frauen (RR 7.49 95% CI 7.17-7.82) [10]. Auch das Risiko für die Progression eines GERD in ein BE und eines BE in ein EAC ist bei Männern verdoppelt [46]. Weitere Risikofaktoren sind ein fortgeschrittenes Alter zwischen 60-70 Jahren [45-47] und eine positive Familienanamnese [61, 64, 188].

Die intestinale Metaplasie stellt den größten Risikofaktor des Barrett-Karzinoms dar [1]. Allerdings ist die Vordiagnose eines BE in >90% der Fälle nicht bekannt, selbst wenn eine endoskopische Voruntersuchung vorlag [189-191]. Es konnte eine Korrelation zwischen Länge der Ausdehnung der intestinalen Metaplasie und dem Entartungsrisiko nachgewiesen werden [46, 192-194]. Je Zentimeter ist mit einer ca. 20%igen Erhöhung des Risikos zu rechnen [46, 193]. Daher ist es kongruent, dass in einem LSBE häufiger ein Karzinom nachgewiesen wird und die MDC-Progressionsrate im Vergleich zum SSBE deutlich höher ist [46, 49, 192, 195].

Gastrooesophagealer Reflux ist einer der am besten untersuchten exogenen Risikofaktoren des Barrett-Oesophagus und -Karzinoms. In einer Meta-Analyse von *Rubenstein et al.* [196] erhöht die Häufigkeit und Dauer der Symptome das Karzinomrisiko. Bei wöchentlichem Reflux steigt das Risiko im Vergleich zur Kontrollgruppe um das Fünffache an (OR 4.92 95% CI 3.9-6.22), bei täglichem Reflux um das Siebenfache (OR 7.4 95% CI 4.94-11.1) [196]. Bei einer Symptombdauer von <10-15 Jahren beträgt das OR 3.05 (95% CI 1.53-6.08), bei >20 Jahren erhöht es sich auf OR 5.41 (95% CI 2.45-11.9) [196]. Bemerkenswert ist allerdings die Tatsache, dass bei 40-48% der BC-Patienten keine nennenswerten Refluxsymptome in der Anamnese zu finden sind [8, 9].

Die Hiatushernie ist nicht nur ein wichtiger pathophysiologischer Faktor des GERD, sondern erhöht auch unabhängig hiervon das Risiko eines EAC (OR 7.68 95% CI 3.54-16.65) [46]. Die veränderte Anatomie führt zum Verlust der natürlichen Anti-Reflexbarriere. Durch die Schwächung des unteren Oesophagussphinkter-Tonus und

der gestörten Oesophagus-Peristaltik ist das Plattenepithel vermehrt der Magen- und Gallensäure exponiert [197, 198].

Die zentrale (viszerale) Adipositas spielt ebenfalls eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus des GERD. So erhöht der intraabdominelle Druck bedingt durch das viszerale Fettgewebe den intragastralen Druck [199]. Übersteigt er diesen, wird die physiologische anatomische Anti-Refluxbarriere geschwächt, es kommt zu Reflux von Magen- und Gallensäure [199]. Adipositas ist nicht nur mit der gastrooesophagealen Refluxerkrankung assoziiert, sondern gilt auch als unabhängiger Risikofaktor des Barrett-Karzinoms, wie die Metaanalyse von Singh *et al.* bestätigte (OR 2.51 95% CI 1.56-4.04) [200]. Männer und Frauen sind gleichermaßen betroffen [201]. Der BMI korreliert nahezu linear zum Erkrankungsrisiko [201, 202]. Patienten mit einem BMI > 40kg/m² haben im Vergleich zu einem normalen BMI (18.5-24.9kg/m²) ein 6-fach erhöhtes Risiko (OR_{BMI >40kg/m²} 6.1 95% CI 2.7-13.6) [202]. Die Kombination aus GERD und Adipositas zeigt ein noch höheres OR als Adipositas oder Reflux alleine (OR_{GERD+Adipositas} 16.5, 95% CI 8.9-30.6) [202]. Dies verdeutlicht die Tatsache, dass sowohl GERD-abhängige als auch -unabhängige Mechanismen der viszeralen Adipositas eine Rolle bei der Entwicklung des EAC spielen. Der Prozess der systemischen Inflammation könnte hierzu entscheidend beitragen. Ebenso wie das Barrett-Karzinom [6] verzeichnete die Adipositas in den letzten Jahrzehnten weltweit einen dramatischen Anstieg [203, 204]. Kong *et al.* [205] gingen der Frage nach, ob zwischen beiden Erkrankungen eine Korrelation besteht. In einer Modellstudie simulierten die Autoren die Prävalenz bzw. Inzidenz der Adipositas und EAC über den zeitlichen Verlauf von 1973-2005 bzw. im Jahr 2005 [205]. Verglichen wurden die Daten dann mit *real world Daten* der SEER-Studie [12]. Das Ergebnis war geringer als erwartet, da die steigende Prävalenz der Adipositas nur zu einem Anstieg von 6.5%- bzw. 7.6%-EAC-Fällen führte [205].

Ein weiterer etablierter Risikofaktor ist ein Nikotinabusus. Cook *et al.* konnten in einer Metaanalyse von 2990 Patienten (hiervon 1450 EAC-Fälle) des BEACON-Konsortiums ein doppelt erhöhtes Erkrankungsrisiko von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern nachweisen (OR 1.96 95% CI 1.64-2.34) [206]. Dies galt für beide Geschlechter. Des Weiteren zeigte sich eine Abhängigkeit der Risikoerhöhung zur Kumulativdosis in packyears ($p < 0.001$). Ehemalige Raucher, die den Nikotinkonsum

vor ≥ 10 Jahren einstellten, konnten zwar verglichen mit aktuellen Rauchern den Risikofaktor reduzieren (OR 0.71 95% CI 0.56-0.89), jedoch nie auf das Normalniveau eines Nichtrauchers absenken (Ehemalige Raucher vs. Nichtraucher OR 1.72 95% CI 1.38-2.15) [206]. Des Weiteren haben Raucher ein 2-fach höheres Risiko zur Progression der Metaplasie in ein HGIEN und/oder Karzinom (OR 2.03 95% CI 1.29-3.17) [207].

Protective Faktoren

Zahlreiche Studien untersuchten protective Faktoren für das EAC. So besteht in einer Metaanalyse mit 28 Studien von Chen *et al.* [208] eine inverse Assoziation für eine Infektion mit *Helicobacter pylori* (OR 0.57 95% CI 0.44–0.73). Insbesondere gilt dies für *H. pylori*, die den Virulenzfaktor *CagA* (*cytotoxin-associated gene A*) enthalten (Vgl. zu *CagA*_{negativ} OR 0.64 95% CI 0.52–0.79) [208]. Die Mechanismen sind nicht eindeutig geklärt. Es könnte mit einer Reduktion des Refluxes durch die *H.p.*-induzierte atrophische Gastritis zu tun haben [209]. Es wird deshalb auch ein Zusammenhang zwischen der steigenden Inzidenz des EAC und sinkenden *H. pylori*-Infektionen seit dem Einsatz der Antibiotika ab der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts diskutiert [209, 210]. Hierdurch könnte sich das Mikrobiom des unteren Oesophagus verändert und als Kofaktor mit in die Genese der Metaplasie und damit der Karzinogenese eingegangen sein [210].

Ein weiterer protective Faktor ist eine Medikation mit Acetylsalicylsäure und/oder anderen NSAIDs. In einer gepoolten Analyse des BEACON-Konsortiums mit 1226 EAC zeigte sich eine Risikoreduktion von 30% (OR 0.68 95% CI 0.56–0.83) [211]. Dieser Effekt verstärkte sich bei Häufigkeit und Dauer der Einnahme (OR_{täglich} 0.56 95% CI 0.43–0.73, OR_{>10Jahre} 0.63 95% CI 0.45–0.90) [211]. In der Studie von Rothwell *et al.* [212] konnte bei täglicher Einnahme von Acetylsalicylsäure vs. keiner Einnahme eine deutliche 20 Jahres-Risikoreduktion für einen Tod durch das EAC nachgewiesen werden (HR 0.36, 0.21–0.63, $p < 0.0001$). Interessanterweise galt dieser Effekt auch für andere Adenokarzinome, z.B. dem Bronchialkarzinom [212]. Es ist davon auszugehen, dass die protective Wirkung auf die Hemmung inflammatorischer Prozesse über die Cyclooxygenase 2 (COX-2) zurückzuführen ist [211].

Eine protektive Assoziation konnte auch für Statine nachgewiesen werden. In der Metaanalyse von Singh Siddharth *et al.* [213] bestätigte sich eine 41%ige Risikoreduktion bei Einnahme der Medikation, insbesondere bei Patienten mit Vordiagnose eines Barrett-Oesophagus (OR 0.59 95% CI 0.45–0.78). Statine wirken über HMG-CoA Reduktase-abhängige und -unabhängige Effekte anti-inflammatorisch, immunmodulatorisch und antikanzerogen [213].

Risikofaktoren mit geringer oder keiner Evidenz

Alkoholkonsum ist ein gut belegter Risikofaktor für viele Karzinome [214], insbesondere in der Kanzerogenese des ESCC [215]. Für das Barrett-Karzinom besteht keine Assoziation als Risiko [215]. Die Evidenz hierfür bieten (u.a.) eine prospektive niederländische Kohortenstudie mit 16.3 Jahren Follow-up (OR 1.04 95% CI 0.54–2.02) [216] und eine gepoolte Analyse des BEACON-Konsortiums aus 11 Studien (OR 0.97 95% CI 0.68–1.36) [119]. Des Weiteren besteht für die Menge des Alkoholkonsums und die Dauer in Jahren kein erhöhtes Risiko im Vergleich zu Nicht-Trinkern [119]. Auch die Progressionsrate der Metaplasie zu einer Neoplasie ist nicht erhöht (OR 1.17 95% CI 0.93–1.48) [217].

Früchte und Gemüse enthalten zahlreiche antikanzerogene Stoffe, wie Vitamine, Antioxidantien oder andere pflanzeneigene, z.T. unbekannte Substanzen. Aus diesem Grund wurde auch ein positiver Effekt für das Barrett-Karzinom untersucht. Ernährungswissenschaftliche Studien sind meist als Fall-Kontroll-Studien mit geringen Fallzahlen des EAC konzipiert [218]. Daher können sie immer gewisse Bias enthalten. Betrachtet man die Studienlage ergibt sich ein heterogenes Bild [218, 219]. Die FINBAR-Studie wies eine inverse Assoziation für Obst, nicht jedoch für Gemüse, nach (OR 0.50 95% CI 0.30–0.86) [220]. Daten des World Cancer Research Fund International's Continuous Update Projects (CUP) mit >46 analysierten Studien weltweit zeigten wiederum für Gemüse einen protektiven Effekt (OR 0.89 95% CI 0.80–0.99, 3 Studien) [221]. Dies galt jedoch nicht für Obst (OR 1.03 95% CI 0.95–1.11, 3 Studien) [221]. Insgesamt kann man auf Grund der heterogenen Datenlage aktuell keine eindeutige Aussage zu den potentiellen protektiven Effekten von Obst und Gemüse treffen.

Koffein aus Kaffee oder Tee induziert die Magensäureproduktion und schwächt den unteren Oesophagussphinkter [222]. Aus diesem Grund war es naheliegend, dass der Konsum Reflux verstärkt und damit zur Genese des Barrett-Oesophagus beiträgt. Eine große prospektive Studie mit >400.000 Probanden, von denen 142 ein EAC in einen mittleren Follow-up von 11.3 Jahren erlitten, konnte jedoch keinen negativen Effekt von Kaffee oder Tee ermitteln [223]. Dies gilt ebenfalls für den BE [224].

3. Material und Methoden

3.1 Barrett-Konsortium *g4b* - *genes for barrett's*

Die Dissertation basiert auf der interdisziplinären Forschungsarbeit des Barrett-Konsortiums *g4b=genes for barrett's* (www.barrett-konsortium.de). Dieses wurde auf Initiative von Ärzten und Naturwissenschaftlern zur Aufklärung der genetischen und zellbiologischen Ursachen des Barrett-Oesophagus und -karzinoms gegründet. Die wissenschaftliche Leitung der Studie obliegt Frau Univ.-Prof. Dr. med. Ines Gockel, MBA an der Klinik und Poliklinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Leipzig (vormals Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Mainz). Das Konsortium umfasste zum Zeitpunkt der vorliegenden Arbeit folgende interdisziplinäre Einrichtungen:

Tab. 3.1 Interdisziplinäre Einrichtungen des Barrett-Konsortiums *g4b*

Einrichtung	Aufgaben
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie der Universitätsmedizin Mainz	Studienzentrale und Rekrutierungszentrum, Asservierung von Proben, Datenmanagement
Rekrutierungszentren (Tab. 3.2.)	Identifikation und Rekrutierung von Patienten
Institut für Pathologie, Klinikum Bayreuth	Referenzpathologie, histopathologische Analysen
Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Bonn	Molekulargenetische Analysen
Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München	Biostatistische Analysen
Fred Hutchinson Cancer Centers, University of Washington, USA	Kooperationspartner

Von der Studienzentrale an der Universitätsmedizin Mainz aus wurde das Projekt koordiniert. Sie war zentraler Ansprechpartner für die Kooperationspartner und Patienten. Zudem wurden die Proben und Daten nach strengen Vorschriften verwahrt. In den kooperierenden Einrichtungen des *g4b* wurden geeignete Patienten mit der

gesicherten Diagnose eines Barrett-Oesophagus und -karzinoms identifiziert (**Tab. 3.2**). Die Patienten wurden durch den behandelnden Arzt über die Möglichkeit der Teilnahme an der Studie informiert und konnten sich bei Interesse über den bereitgestellten Flyer in der Studienzentrale melden. Die Kontaktaufnahme war auch über die Homepage barrett-konsortium.de möglich.

Die Verifizierung der pathologischen Befunde erfolgte im Institut für Pathologie des Klinikums Bayreuth, einem der Referenzzentren für den Barrett-Oesophagus. Die molekulargenetischen Analysen wurden im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt, die auf dem Gebiet der Erforschung multifaktorieller Erkrankungen eine Vorreiterrolle einnehmen. Die biostatistischen Analysen erfolgten am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München.

Zudem bestand eine enge Kooperation zu einem weiteren Barrett-Konsortium, dem BEACON-Konsortium (Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium, bea.tvcloud.org), welche die zweite GWAS 2013 publizierten [14]. Der Leiter, Herr Prof. Thomas L. Vaughan an den Fred Hutchinson Cancer Centers, University of Washington, USA, stellte die statistisch assoziierten SNP-Marker seiner Analyse [14] für die Replikationsanalysen zur Verfügung (*siehe Kapitel 3.4*).

Tab. 3.2 Rekrutierungszentren des Barrett-Konsortiums g4b. Stand 10/2013

Ort	Klinik/ Praxis	Abteilung	Ansprechpartner/Leitung	Beginn Rekrutierung	Rekrutierte Patienten
Bayreuth	Klinikum Bayreuth	Institut für Pathologie	Prof. Dr. Michael Vieth	07/2012	161
Bonn	Praxis Gastroenterologie am Burgweiher		Dr. Rupert Mayershofer jr.	08/2012	32
Berlin	Praxis Dr. med. Eckhard Löhde		Dr. med. Eckhard Löhde	02/2013	30
Düsseldorf	Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf	Innere Medizin	Prof. Dr. Horst Neuhaus	08/2012	180
Frankfurt	St. Marienkrankenhaus	Medizinische Klinik	Prof. Dr. Ralf Kiesslich	10/2012	0
Hamburg	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf	Klinik und Poliklinik für Interdisziplinäre Endoskopie	Prof. Dr. Thomas Rösch	06/2012	116
		Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie	Prof. Dr. Jakob R. Izbicki	05/2013	0
Heidelberg	Universitätsklinikum Heidelberg	Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie	Prof. Dr. Katja Ott		
Kirn	Gastroenterologische Schwerpunkt-Praxis		Dr. Hans Werner Karch	02/2012	26
Koblenz	Praxis Weismüller, Lütke & Benner		Dr. Josef Weismüller	01/2011	159
Köln	Uniklinik Köln	Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie	Prof. Dr. Elfriede Bollschweiler	05/2011	63
	Praxis Magen Darm Zentrum Wiener Platz		Dr. Jan-Hinnerk Hofer	03/2012	16

Material und Methoden

Ort	Klinik/ Praxis	Abteilung	Ansprechpartner/Leitung	Beginn Rekrutierung	Rekrutierte Patienten
Magdeburg	Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg	Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie	Prof. Dr. Peter Malfertheiner	05/2012	0
Mainz	Universitätsmedizin Mainz	Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie	Prof. Dr. Ines Gockel,	05/2011	141
		I. Medizinische Klinik	Prof. Dr. Markus Möhler		0
Münster	Universitätsklinikum Münster	Innere Medizin B	Prof. Dr. med. Karin Hengst	03/2012	0
		Klinik für Allgemein- und Abdominalchirurgie	Prof. Dr. Daniel Palmes		0
Oldenburg	Klinikum Oldenburg	Klinik für Innere Medizin – Gastroenterologie	Prof. Dr. Hans Seifert	05/2013	0
Wiesbaden	Dr. Horst Schmidt Kliniken	Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie	Prof. Dr. Dietmar Lorenz	05/2011	0
		Klinik Innere Medizin II,	Prof. Dr. Christian Eil	05/2013	732
	Deutsche Klinik für Diagnostik	Fachbereich Gastroenterologie	Prof. Dr. T. Wehrmann		
	Facharztzentrum MEDICUM			03/2012	103
Zürich	Universitäts-Spital Zürich	Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie	Dr. Paul Schneider	11/2011	0
Eigeninitiative von Patienten z.B. Kontaktaufnahme über Homepage					20
Gesamtzahl der rekrutierten Barrett-Oesophagus und –Karzinompatienten					1779

3.2 Schwerpunkte der Dissertation

Die vorliegende Arbeit gliederte sich in 4 wesentliche Schwerpunkte:

1) Aufbau einer Biobank mit 1065 Patienten: Projektkoordination, Rekrutierung von Zentren, Rekrutierung von Patienten, Phänotyp-Charakterisierung der Patienten, Erfassen klinischer Prägnanztypen und möglicher endogener, exogener Risikofaktoren sowie protektiver Faktoren aus den Daten der Phänotyp-Datenbank, Verifizierung der histopathologischen Befunde, Asservierung der Proben, Datenmanagement.

2) Auswahl der genetischen Varianten für die Replikationsanalyse.

3) Molekulargenetische Typisierung: Bereitstellung der Proben zur molekulargenetischen Typisierung von 94 SNP-Markern, die Assoziationshinweise in der GWAS von Levine et al. [14] zeigten.

4) Genotyp-Phänotypisierung und Genotyp-Umwelt-Analysen: Bereitstellung der Phänotyp-Daten zur Genotyp-Phänotypisierung und für Genotyp-Umwelt-Analysen.

Ein positives Votum der Ethik-Kommissionen Mainz und Bonn für die Durchführung der Studie und das schriftliche Einverständnis aller Teilnehmer zur Erhebung und Analyse der Daten lag vor.

3.3 Aufbau der Biobank mit Barrett-Karzinompatienten

3.3.1 Ablauf der Rekrutierung

Die Studienteilnahme der Patienten mit der Diagnose eines Barrett-Karzinoms beinhaltete die Erhebung phänotypischer Daten in einem Fragebogen und Gewinnung von Untersuchungsmaterial in Form einer Blutprobe. Die Rekrutierung erfolgte an Hand eines streng standardisierten Ablaufs, welcher in einer *Standard Operating Procedure* (SOP) verfasst wurde.

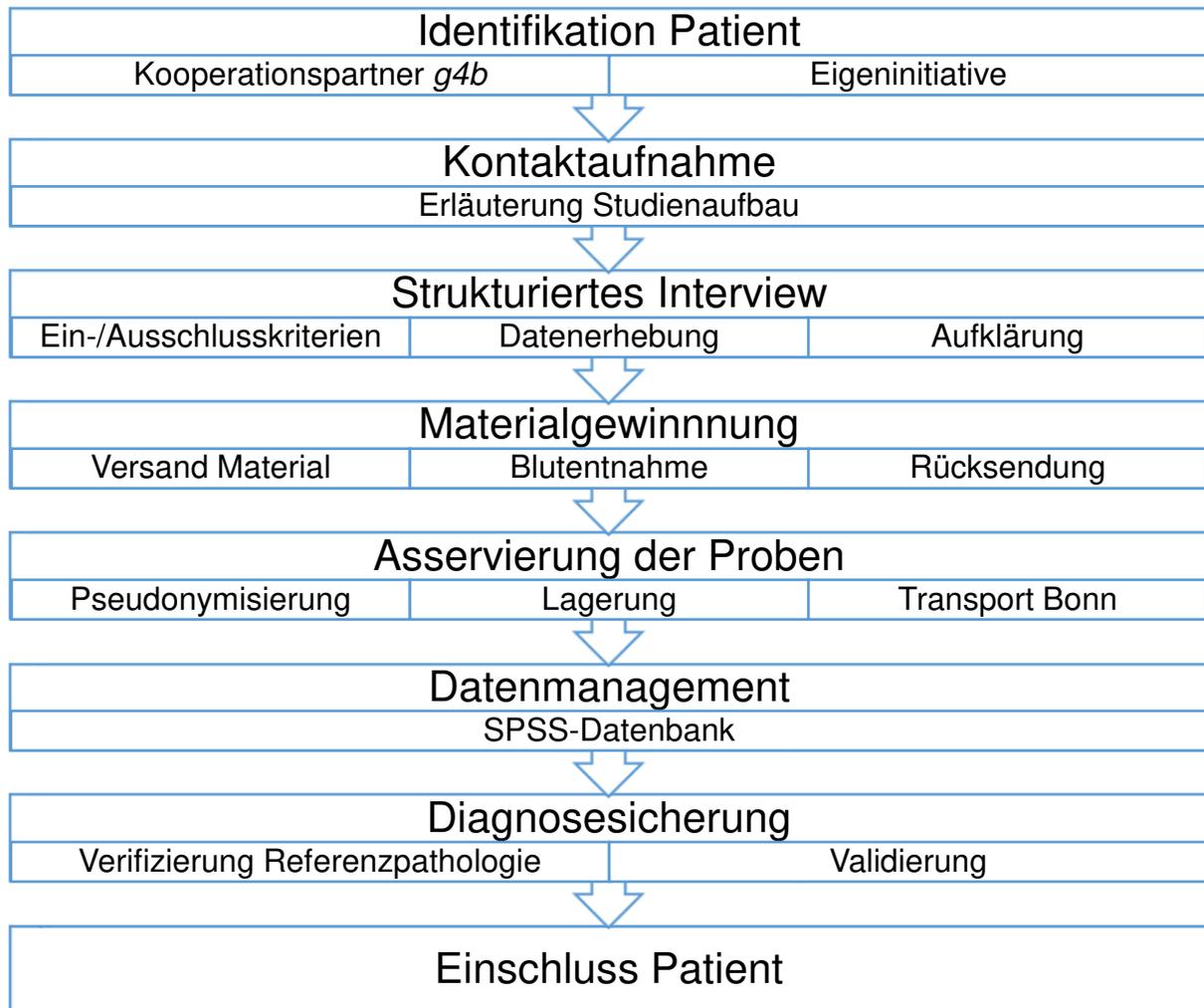


Abb. 3.1 Schematischer Ablauf der Rekrutierung

Herstellung des Erstkontaktes mit Erläuterung des Studienaufbaus

Bei Interesse an einer Teilnahme konnten die Probanden ihre Kontaktdaten hinterlegen und wurden von einem Mitarbeiter der Studienzentrale in Mainz telefonisch kontaktiert. Im Rahmen der ersten Kontaktaufnahme wurden die Projektinhalte umfangreich dargestellt und ein Termin zur Beantwortung des Fragebogens vereinbart. Die Patienten wurden angehalten, Befunde und Angaben zu Vorerkrankungen und Medikamenten für dieses Telefongespräch bereit zu halten. Des Weiteren bestand die Möglichkeit der Klärung ausstehender Fragen.

Strukturiertes Interview

Im Rahmen des zweiten Termins wurde das strukturierte Interview mit dem Patienten durchgeführt. Die Standardisierung wurde durch Schulung der Mitarbeiter gewährleistet, unter anderem stand eine SOP zur Verfügung.

An Hand eines Fragebogens wurden die Angaben des Patienten sorgfältig erfasst (*siehe Anhang*). Inhalt des Fragebogens waren

- Ein- und Ausschlusskriterien
- allgemeine Daten und Lebensgewohnheiten
- familiäre Fälle der Barrett-Erkrankung und von Reflux
- Komorbiditäten und Operationen
- Medikation
- exogene Risikofaktoren
- Refluxsymptome

vor der Erkrankung des Patienten an einem Barrett-Karzinom. Im Verlauf der Studie wurde die Rekrutierungsstrategie an die Projektziele des *g4b* angepasst: Ab November 2012 erfolgte die Verwendung des sogenannten Erfassungsbogens, der ausschließlich die

- Ein- und Ausschlusskriterien

einer Studienteilnahme überprüfte (*siehe Anhang*). Ziel der strategischen Neuausrichtung war die Fokussierung der Rekrutierungszahlen zur zeitnahen Initiierung von molekulargenetischen Analysen. Zum Zeitpunkt dieser Dissertation werden die ausstehenden phänotypischen Daten dieses Kollektivs von nachfolgenden Doktoranden erhoben.

Die Patienten wurden über folgende Punkte der Studienteilnahme ausführlich aufgeklärt:

- Erhebung, Verarbeitung und Speicherung von patientenbezogenen Daten
- Pseudonymisierungsverfahren und Datenschutz
- Ablauf der genetischen Untersuchung
- Kooperationen des *g4b*
- Freiwilligkeit der Teilnahme und Möglichkeiten des Rücktritts
- Einwilligungserklärung

Für die Entscheidung zur Teilnahme und Beantwortung von Fragen bestand ausreichend Zeit.

Prüfung der Ein- und Ausschlusskriterien

Die Ein- und Ausschlusskriterien der Studienteilnahme stellten den wichtigsten Teil der Rekrutierung des Patienten dar und wurden mehrfach sorgfältig überprüft:

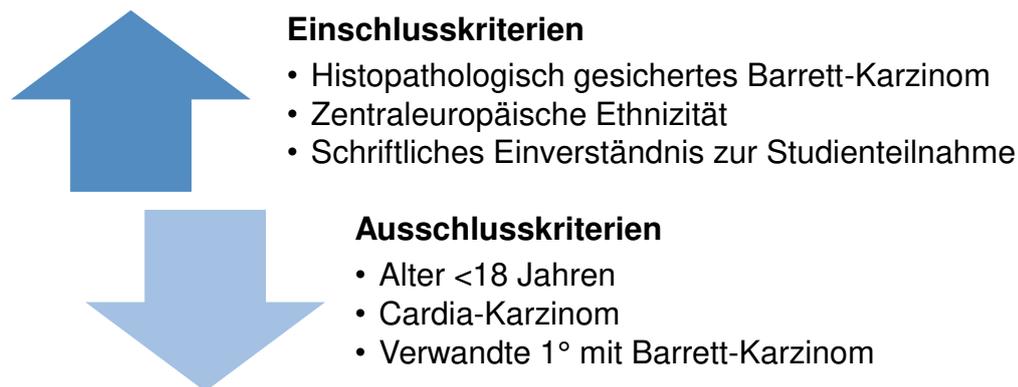


Abb. 3.2 Ein- und Ausschlusskriterien der Studie

Zum Einschluss musste ein histopathologisch gesichertes Barrett-Karzinom vorliegen. Die Teilnehmer wurden durch Befragung der Herkunft der Vorfahren auf zentraleuropäische Ethnizität überprüft (**Tab. 3.3**). Nach sorgfältiger Aufklärung und Studium der zur Verfügung gestellten Informationen musste das schriftliche Einverständnis des Patienten vorliegen.

Tab. 3.3 Länder der zentraleuropäischen Ethnizität

Teil Europas	Land
Mitteleuropa	Deutschland, Kroatien, Lichtenstein, Luxemburg, Österreich, Polen, Schweiz, Slowakische Republik, Slowenien, Tschechische Republik
Nordeuropa	Dänemark, Island, Norwegen, Schweden
Westeuropa	Andorra, Belgien, Frankreich, Großbritannien, Irland, Monaco, Niederlande, Nordirland

Auf Grund der zellpathologisch angrenzenden Loci des Barrett-Karzinoms und des Cardia-Karzinoms wurden Patienten mit der Diagnose eines Cardia-Karzinoms aus der Studienteilnahme ausgeschlossen. Jeder Befund eines Magen-Karzinoms wurde hierzu nochmals auf die Lokalisation geprüft. Bei Unklarheiten erfolgte die Validierung durch das Institut für Pathologie, Universität Bayreuth. Des Weiteren wurden an einem Barrett-Karzinom erkrankte erstgradige Verwandte ausgeschlossen, da sich die geringen molekulargenetischen Unterschiede in den Replikationsanalysen widerspiegeln. Eine Teilnahme unter 18 Jahren war nicht möglich.

Materialgewinnung

Im Anschluss an das strukturierte Interview erfolgte die Versendung folgender Utensilien und Unterlagen:

Tab. 3.4 Versandmaterial

Patient	Arzt (Hausarzt)
Studieninformation 2 Einwilligungserklärungen - Original und Kopie „Checkliste“ Dankeschreiben	Studieninformation Dankeschreiben Hinweise zur Blutentnahme Blutentnahmebesteck 3 EDTA – Monovetten 7,5ml
3 Versandhüllen mit Deckel für die EDTA-Monovetten 1 frankierter Rücksendeumschlag	

Die Entnahme des Untersuchungsmaterials sollte im Rahmen einer Routine-Laborkontrolle beim Hausarzt des Patienten erfolgen. Zur Verringerung des Aufwands wurden EDTA–Monovetten, Versandhüllen, Butterfly und Adapter bereitgestellt. Zudem war ein Informationsschreiben über den Ablauf der Studie und dem Hinweis auf ausreichende Befüllung und Schwenken der Monovetten zur Inhibition der Gerinnung beigelegt. Der Patient wurde angehalten, die Blutproben im Anschluss an die Blutentnahme schnellstmöglich postalisch aufzugeben, um die Unversehrtheit des genetischen Materials zu gewährleisten. Zur Sicherung des Rücktransports standen Versandhüllen bereit. Die Einwilligungserklärung und das Informationsschreiben sollten sorgfältig studiert werden. Es bestand die Möglichkeit zur Klärung von ausstehenden Fragen. Die unterschriebene Einwilligungserklärung (Original) und weitere Dokumente, wie Befunde, konnten mit der Blutprobe versendet werden.

Asservierung der Proben

Die Monovetten wurden von einem autorisierten Mitarbeiter der Studienzentrale in Mainz pseudonymisiert (Patienten-ID). Zur Gewährleistung der Zuordnung zwischen Blutprobe und Patientenunterlagen erhielten Einwilligungserklärung und Fragebogen den identischen Barcode. Die Lagerung des Patientenmaterials erfolgte in einem verschlossenen Raum mit temperaturkontrolliertem Kühlschrank (-20°C). In regelmäßigen Abständen erfolgte der Transport per PKW in das Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Bonn. Die Kühlkette wurde durch Lagerung auf Trockeneis sichergestellt.

Datenmanagement

Die phänotypischen Daten wurden pseudonymisiert in eine SPSS-Datenbank eingegeben. Der Zugang zu Patientenunterlagen und Datenbank wurde streng auf autorisierte Mitarbeiter der Studienzentrale in Mainz limitiert.

Histopathologische Sicherung und Validierung der Diagnose

Die histopathologische Sicherung der Befunde erfolgte in den meisten Fällen im Referenzzentrum des *g4b*, dem Institut für Pathologie, Universität Bayreuth (Leiter: Prof. Dr. med. Michael Vieth). Fremdgutachten aus anderen pathologischen Instituten wurden in Bayreuth validiert. Hierzu koordinierte die Studienzentrale in Mainz Einwilligung des Patienten und Versendung der Schnitte.

Einschluss des Patienten in die Studie

Erst nach mehrfacher Prüfung aller Unterlagen, Proben und Befunde erfolgte der Einschluss des Patienten in die Studie. Ein Rücktritt von der Teilnahme war zu jedem Zeitpunkt der Studie möglich.

3.3.2 Eigenschaften des rekrutierten Kollektivs

3.3.2.1 DNA-Kollektiv

Das Kollektiv umfasst 1065 zentraleuropäische Patienten mit histopathologisch gesichertem Barrett-Karzinom, hiervon waren 938 Männer und 127 Frauen. Als Kontrollkollektiv wurden 1019 gesunde Probanden an der Universitätsklinik Bonn untersucht (Populationskontrolle aus 498 Männern und 521 Frauen). Ein endoskopisches Screening der Probanden auf ein EAC erfolgte nicht. Somit entspricht die Inzidenz des Karzinoms der Normalbevölkerung.

3.3.2.2 Phänotypisches Kollektiv

Das Gesamtkollektiv beinhaltet phänotypische Daten von 1027 Patienten (904 Männer, 123 Frauen) (**Tab. 3.5**). Insgesamt wurden 856 ausführliche Daten in einem Patienteninterview erhoben. Der Fragebogen enthielt 27 qualitative und quantitative Variablen. Ziel war es Assoziationen zwischen genetischen Daten und Phänotypen/ Umweltfaktoren des Patienten zu untersuchen. 171 weitere Patienten wurden auf Grund des Strategiewechsels während der Rekrutierungsphase mit dem Erfassungsbogen rekrutiert. Detaillierte phänotypische Daten zu diesen Patienten werden von einer Folge-Doktorandengruppe erhoben. Die in Eigenleistung rekrutierten Patienten sind als Subkollektiv eingebracht. Die statistische Aussagekraft von genetischen Studien kann über die Fallzahl erhöht werden. Für die Kandidatengenanalysen wurde ein Kollektiv von >1000 Patienten angestrebt. Auf Grund des hohen Arbeitsaufwandes wurde die Rekrutierung auf mehrere Doktoranden aufgeteilt.

Tab. 3.5 Patientenkollektiv und Subkollektiv der phänotypisch erhobenen Daten

Phänotypische Daten	Gesamtkollektiv	Eigen rekrutiertes Subkollektiv
Fragebogen	n=856	n=205
Erfassungsbogen	n=171	n=34
Gesamt	n=1027	n=239

Das Interview enthielt Fragen zu epidemiologischen Daten, wie Geschlecht und Alter bei Diagnosestellung. Des Weiteren war ein zuvor bestehender Barrett-Oesophagus sowie dessen Längenausdehnung in SSBE und LSBE von Interesse. Die Patienten wurden nach einer familiären Häufung der Erkrankung und von Reflux als Hinweis für eine komplex-genetische Risikokomponente befragt. Ein besonderer Schwerpunkt lag auf dem am besten untersuchten Risikofaktor Reflux (Angaben zu spezifischen Symptomen, Abhängigkeiten zu Nahrung und Aktivitäten, Häufigkeit des Auftretens). Weitere exogene Einflüsse waren Alkohol-, Nikotin- und Kaffeekonsum mit Angaben zu Mengen, um eine Risikostratifizierung vornehmen zu können. Des Weiteren wurden Komorbiditäten, wie kardiovaskuläre Risikoerkrankungen, gastrointestinale Vorerkrankungen und Operationen sowie Tumor- und Autoimmunerkrankungen erfragt. Außerdem erfasste die Gruppe die aktuelle Medikation, insbesondere Reflux-assoziierte Medikamente (z.B. PPI). Wichtig war die Tatsache, dass sich die Angaben auf den Zeitraum vor der Diagnose des EAC beziehen. **Tab. 3.6** zeigt die 15 relevanten Phänotypen, die in dieser Arbeit behandelt wurden. Die Auswahl der Faktoren erfolgte an Hand von epidemiologischen und ätiologischen Überlegungen, da hier eine statistische Aussage wahrscheinlich erschien. Eine Tabelle zu allen phänotypischen Daten sowie der Frage- und Erfassungsbogen findet sich im Anhang.

Tab. 3.6 Relevante phänotypisch erhobene Daten für die Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen

Abkürzung	Kategorie	Phänotypen/Umweltfaktoren	Variable	N
sex	Epidemiologie	männlich	qualitativ	904
		weiblich		123
age_d		Alter in Jahren bei Diagnosestellung	quantitativ	1006
clas_BE	Ätiologie	Long segment Barrett-Oesophagus > 3cm	qualitativ	284
		Short segment Barrett-Oesophagus < 3cm		266
fam_BE		Familiäre Fälle 1. Grades mit Barrett-Oesophagus		24
ko3	Komorbiditäten	Ulcus ventriculi/duodeni		100
ko4		Hiatushernie		529
ko5		Bösartige Krankheit außer Barrett-Karzinom		129
ko7		<i>Helicobacter pylori</i> Infektion		108
cof1		Kaffeekonsum		714
alc2	exogene Risikofaktoren	Alkoholkonsum in Gramm pro Tag	quantitativ	566
tab2		Aktuelle Raucher packyears		99
tab4		Ehemalige Raucher packyears		506
refl2		Reflux	qualitativ	647
refl3		Reflux >2x/Woche		448
fam_refl		Familiäre Fälle 1. Grades mit Refluxsymptomatik		216
Gesamt				1027

3.4 Auswahl der genetischen Varianten für die Replikationsanalyse sowie Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen

In der veröffentlichten GWAS des BEACON-Konsortiums [14] mit einem europäischen Kollektiv von 1516 EAC/ 2416 BE/ 3209 Kontrollen zeigten 94 SNP-Marker die erforderliche statistische Testsignifikanz von $p < 10^{-4}$. Nach weiteren Analysen mit einem Replikationskollektiv von 874 EAC/ 759 BE/ 6911 Kontrollen waren SNPS an drei verschiedenen Gen-Loci von besonderem Interesse: CRT1, BARX1 und FOXP1 [14].

Das weitere Vorgehen basierte auf folgenden Überlegungen:

- 1) SNP-Marker, die nicht die erforderliche Testsignifikanz von $p < 10^{-4}$ erreicht haben, sind dennoch Risikovarianten.
- 2) Das Replikationskollektiv konnte nicht alle Gen-Loci der 94 getesteten SNP-Markern abbilden.
- 3) Die statistische Aussagekraft (=Fallzahl) des Initial- und Replikationskollektivs ist zu niedrig.
- 3) Die Varianten des Risiko-Locus sind durch einen Bias überschätzt, ein als „*winner's curse*“ bezeichnetes Phänomen.

Herr Prof. Thomas L. Vaughan (BEACON-Konsortium) stellte die statistisch signifikanten 94 SNP-Marker vor Veröffentlichung seiner Publikation (Levine *et al.* [14]) zur Verfügung. Diese wurden im g4b-Kollektiv aus 1.065 Patienten mit Barrett-Karzinom und 1.019 Kontrollen auf genetische Risikovarianten sowie Genotyp-Phänotyp-/Genotyp-Umwelt-Assoziationen untersucht.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind 16 SNP-Marker, die auf Chromosom 1-3 lokalisiert sind (**Tab. 3.7**)

.

Tab. 3.7 Auswahl der SNP-Marker für die Replikationsanalyse sowie Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen

Chromosom	SNP-Marker	Lokalisation in bp ¹	Allel 1/2 ²	Gen ³	Assoziiertes Allel in der BEACON-Studie
1	rs17030152	7083719	C/T	CAMTA1	T
	rs2075993	23836364	A/G	E2F2	n.a.
	rs3005897	56786595	C/T	PPAP2B	T
	rs3789387	94474961		ABCA4	C
	rs12122818	193686395	A/C	B3GALT2	C
2	rs2293525	201468732	C/G	AOX1	C
	rs6754666	202435352	A/G	ALS2CR11	G
	rs889838	222835057		HSPA9P PAX3	A
	rs6711386	234990980	G/T	SPP2	T
3	rs4973786	26552078	A/G	VENTXP4 LRRC3B	A
	rs4611855	31847360	C/T	OSBPL10	T
	rs11130736	59810153	A/G	FHIT	G
	rs2687201	70928930	A/C	FOXP1	A
	rs9837992	70959438	A/G		A
	rs7646638	134599236	C/T	EPHB1	T
	rs13080736	195837423	A/G	TFRC ZDHHC19	G

¹ Angabe nach hg18, ² Allel 1: das in der europäischen Population seltene Allel, Allel 2: das in der europäischen Population häufige Allel, ³ Nächstgelegenes Gen

3.5 Genotypisierung der genetischen Varianten im Kollektiv der Patienten und Kontrollen

Die molekulargenetischen Analysen des Fall- und Kontrollkollektivs wurden im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt. Die Genotypisierung erfolgte durch das Sequenom MassARRAY iPlex Gold®-System (Sequenom, San Diego, CA). Das Verfahren erlaubt die parallele Untersuchung von zahlreichen SNP-Markern: Nach PCR mit nachfolgender Massen-Extensions-Reaktion eines SNP-spezifischen massenmodifizierten Extensionsprimers wird eine massenspektrometrische Analyse (MALDI-ToF-MS=Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry) durchgeführt [225-227]. Als Qualitätskontrollen dienten Duplikate, Negativkontrollen mit H₂O sowie visuelle Kontrollen des Clusterplots des jeweiligen SNP-Markers [228]. Die Überprüfung der Daten erfolgte mehrfach mittels Hardy-Weinberg-equilibrium $P > 0.001$, call rate $> 95\%$. Geschlechtsvariable Assoziationen wurden zusammen und getrennt betrachtet [228].

3.6 Biostatistische Analysen im Fall-Kontroll-Kollektiv mit Barrett-Karzinom-Patienten

Die biostatistischen Analysen erfolgten am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München. Nach Qualitätskontrolle der genotypischen Daten wurden nur die DNA-Proben ausgewählt, die eine Genotypisierungsrate von $\geq 98\%$ aufwiesen¹. Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-equilibrium (HWE) bestand nicht (P_{HWE} Patientenkollektiv $\leq 1 \times 10^{-04}$, P_{HWE} Kontrollkollektiv $\leq 1 \times 10^{-03}$)¹. Quantitative Phänotypen wurden mittels der Software PLINK [229] als lineare Regression, binäre Phänotypen als logistische Regression analysiert, jeweils mit den Kovariaten Geschlecht und Alter. Bei nominaler Testung wurde ein p-Wert von 0.05 bei zweiseitigem Test und 0.1 bei einseitigem Test festgelegt¹. Die Signifikanzschwelle der Fall-Kontroll-Analysen nach Bonferroni-Korrektur ($p = 0.05$ bei 94 SNP-Markern) betrug $p = 5,3 \times 10^{-04}$, das Erreichen der Schwelle wurde jedoch auf Grund des multiplen Testens als unwahrscheinlich eingeschätzt¹.

¹mdl. Information Czamara D, AG Translationale Forschung, MPI für Psychiatrie, München

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der Replikationsanalyse

In der Replikationsanalyse mit 94 SNP-Markern wurden nach Qualitätskontrollen 88 der 94 Marker auf eine Assoziation mit EAC im g4b-Kollektiv von 1065 EAC/1019 Kontrollen getestet [228]. Nach Bonferroni-Korrektur $p = 5.3 \times 10^{-04}$ stellten sich keine statistisch signifikanten Ergebnisse dar. 8 SNPs waren jedoch nominal ($p < 0,05$) und 11 SNPs bei einseitiger Testung $p_{\text{einseitig}} < 0.05$ assoziiert. Die Kandidatengenanalyse des Barrett-Konsortiums [228] konnte 11 Allele, die in der GWAS von Levine *et al.* [14] krankheitsassoziiert waren, replizieren. Nachfolgend werden die in dieser Arbeit untersuchten SNP-Marker auf Chromosom 1-3 beschrieben (**Tab. 4.3, Tab. 4.4**). Der SNP rs2075993 wurde in der Qualitätskontrolle entfernt, somit handelt es sich um 15 statt 16 SNP-Marker. Von diesen erreichten 7 statistische Signifikanz (6 bei nominaler, 1 bei einseitiger Testung) (**Tab. 4.1, 4.2**).

4.1.1 Replizierte Risikovarianten

Bei dem SNP-Marker **rs2687201** auf Chromosom 3 in der Nähe des Gens **FOXP1** handelt es sich um einen der am stärksten assoziierten Risikovarianten für das EAC in den Analysen des g4b- und BEACON-Konsortiums. Das seltenere Allel A kam bei 36% der Patienten und 30,6% der Kontrollen vor ($p_{\text{1seitig}} = 0.0007$, RR 1.26; 95% CI 1.09-1.46). Insbesondere bestand eine höhere Assoziation zum männlichen Geschlecht (*male* RR 1.33 vs. *female* 1.08). Der Marker war bei Levine *et al.* mit einem RR 1.20 (CI 1.12-1.29, $p_{\text{META EAC}} = 5.76 \times 10^{-7}$) assoziiert [100] (**Abb. 4.1**).

Nach Veröffentlichung der GWAS von Palles *et al.* [13] führte das Barrett-Konsortium g4b eine weitere Replikationsanalyse mit den dort neu entdeckten 3 Risikovarianten rs3072, rs271108 und rs3784262 durch [230]. Das Kollektiv wurde zwischenzeitlich auf 542 BE/1106 EAC/1602 Kontrollen erweitert. Hierbei war der SNP **rs3072** auf Chromosom 2p24 in der Nähe des Gens **GDF7** statistisch signifikant mit dem EAC assoziiert ($p_{\text{2seitig}} = 0.001$, RR 1.20; 95% CI 1.07-1.34) [230].

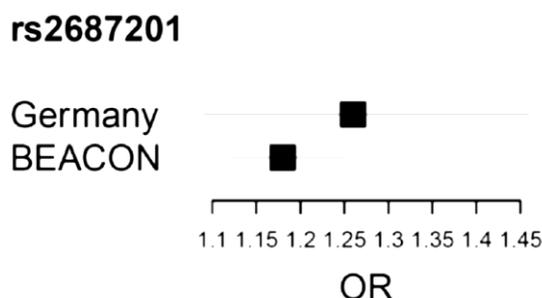


Abb. 4.1 Vergleich der Effektstärken (OR) des SNP-Markers rs2687201. aus [228]

Das seltenere Allel G war bei 41.3% der Patienten und 37% der Kontrollen zu finden. Eine geschlechtsspezifischer Effekt der Assoziation konnte nicht festgestellt werden [230]. Der Marker war bei Palles *et al.* in einer kombinierten Analyse von BE/EAC mit einem RR 1.14 (CI 1.09-1.18, $p_{\text{META EAC}}=5.76 \times 10^{-7}$) assoziiert (vgl. Becker *et al.* $RR_{\text{BE/EAC}}$ 1.15 CI 1.04-1.27, p 7.53×10^{-3} [230]).

4.1.2 Risikovarianten im g4b-Kollektiv

Neben dem replizierten SNP-Marker **rs2687201** wurde eine weitere Risikovariante auf Chromosom 3 in der Nähe des Gens **FOXP1** identifiziert. Das seltenere Allel A von SNP **rs9837992** war bei 35,5% der Patienten und 31,4% der Kontrollen vorhanden ($p_{1\text{seitig}}$ 0.002, RR 1.23; 95% CI 1.07-1.42). Der SNP-Marker war im BEACON-Kollektiv nicht signifikant. Auch hier zeigte sich ein geschlechtsspezifischer Unterschied. Männer mit einem Barrett-Karzinom trugen die Variante häufiger als Frauen (RR ♂1.30 vs. ♀1.04).

Nach einseitigem Test konnte eine neue Risikovariante auf Chromosom 1p36 ermittelt werden. Das häufigere Allel T des SNP **rs17030152** bestand bei 74.5% der Patienten und 71.8% der Kontrollen ($p_{1\text{seitig}}$ 0.034, RR 1.13). Die Variante war bei Frauen mit einem höheren Risiko als bei Männern assoziiert (RR ♀1.20 vs. ♂1.11). Das nächstgelegene Gen ist *Calmodulin-binding transcription activator 1* **CAMTA1**, dessen gleichnamiges Protein für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Über die Funktion ist wenig bekannt [NCBI Gene ID 23261].

Ein weiterer SNP, **rs6711386** auf Chromosom 2, war bei zweiseitigem Test statistisch signifikant assoziiert. Das häufigere Allel G kam bei 97.2% der EAC und 95,8% der

Kontrollen vor ($p_{2\text{seitig}}$ 0.040, RR 1.32). Der Unterschied war nach geschlechtsspezifischer Auswertung nicht mehr signifikant. In der Nähe findet sich das Gen *Secreted phosphoprotein 2* **SPP2**, welches für ein hepatisch-exprimiertes Phosphoprotein der Cystatin Superfamilie kodiert [231].

Für Männer wurden zwei weitere Risikovarianten auf Chromosom 3 identifiziert. Das Minor-Allel T von **rs4611855** war bei den Karzinompatienten häufiger (44.1% EAC vs. 42.3% Kontrollen, $p_{2\text{seitig}}$ 0.002, RR 1.20; 95% CI 1.10-1.54). In der Nähe liegt das Gen *Oxysterol-binding protein-related protein 10* **OSBPL10**, dessen Protein als intrazellulärer Lipidrezeptor eine Funktion im Lipidstoffwechsel hat und als genetische Variation möglicherweise bei Dyslipidämien vorkommt [232]. Des Weiteren kam das seltenere Allel A von **rs4973786** bei 38.6% der Fälle und 36.9% der Kontrollen vor ($p_{2\text{seitig}}$ 0.0007, RR 1.33; 95% CI 1.1-1.57). Die Variante **rs4973786** konnte in der Nähe der Gene *VENT homeobox pseudogene 4* **VENTXP4** und *leucine rich repeat containing 3B* **LRRC3B** identifiziert werden. LRRC3B wird eine Funktion als Tumorsuppressor nahegelegt [233, 234]. Hierbei werden Gene induziert, die bei der Erkennung von Tumorzellen (MHC Klasse I Antigene) und Infiltration von Lymphozyten (Interferon-Signalweg) eine Rolle spielen [234]. Die epigenetische Methylierung und/oder Deletion des Gens wurde für das Magenkarzinom [234] und 7 weitere epitheliale Karzinome [233] nachgewiesen. VENTXP4 gehört zu der Gruppe der Vent Homeobox Genfamilie, die eine DNA-Bindedomäne enthalten und in die frühe embryonale Entwicklung involviert sind [*NCBI Gene ID 152101*].

Ergebnisse

Tab. 4.1 Ergebnis der 3 signifikant assoziierten SNP-Marker auf Chr. 1-3 in 1065 EAC/1019 Kontrollen [228]

Chr	SNP	Position ¹	Allel 1/2 ²	Gruppe ³	Frequenz Allel 1 (%)		P _{2seitig} / P _{1seitig} ⁴	OR (95% CI) ⁵	Gen ⁶
					Patienten	Kontrollen			
1	rs17030152	7083719	C/T	alle	25.5	28.2	0.068/0.034	0.87 (0.75-1.01)	THAP3, DANN/C11, CAMTA1
				M	25.6	27.6	0.190/0.095	0.89 (0.75–1.06)	
				F	24.4	28.8	0.167/0.083	0.80 (0.59–1.10)	
3	rs2687201*	70928930	A/C	alle	36.0	30.6	0.0014/0.0007	1.26 (1.09-1.46)	MITF, FOXP1, EIF4E3
				M	36.4	30.2	0.0007/0.0004	1.33 (1.13–1.57)	
				F	32.8	31.0	0.620/0.310	1.08 (0.81–1.43)	
	rs9837992	70959438	A/G	alle	35.5	31.4	0.005/0.002	1.23 (1.07-1.42)	
				M	35.7	30.1	0.002/0.001	1.30 (1.10–1.54)	
				F	33.9	32.6	0.779/0.389	1.04 (0.78–1.39)	

Tab. 4.2 Ergebnis des einen signifikant assoziierten SNP-Markers auf Chr. 1-3 in 542 BE/1106 EAC/1602 Kontrollen [230]

Chr	SNP	Position ¹	Allel 1/2 ²	Gruppe ³	Frequenz Allel 1 (%)		P _{2seitig} ⁴	OR (95% CI) ⁵	Gen ⁶
					Patienten	Kontrollen			
2	rs3072*	20741887	G/A	alle	41.3	37.0	0.0014	1.20 (1.07-1.34)	GDF7

¹Angabe nach hg18, ²Allel 1:seltenes Allel/Allel 2: häufiges Allel, ³Gruppe: alle, M=male,F=female ⁴zweiseitige/einseitige Testung,⁵OR von Allel 1, ⁶nächstgelegenes Gen, *Replizierte Risikovariante; SNP-Marker mit statistischer Signifikanz = p<0,05 fettgedruckt

Ergebnisse

Tab. 4.3 Ergebnis der Replikationsanalyse mit 15 SNP-Markern auf Chr. 1-3 in 1065 EAC/1019 Kontrollen [228]

Chr	SNP	Position ¹	Allel 1/2 ²	Frequenz Allel 1 (%)		P _{2seitig} ³	OR (95% CI) ⁴	BEACON EAC OR (95% CI)	Gen ⁵
				Patienten	Kontrollen				
1	rs17030152	7083719	C/T	25.5	28.2	0.068	0.87 (0.75-1.01)	0.96 (0.89-1.03)	THAP3, DANN/C11, CAMTA1
	rs3005897	56786595	T/C	28.6	26.4	0.167	1.11 (0.96-1.29)	1.03 (0.95-1.11)	PPAP2B
	rs3789387	94474961	C/T	9.8	9.6	0.879	0,98 (0.78-1.23)	1.19 (1.06-1.34)	ABCA4
	rs12122818	193686395	C/A	4.0	4.9	0.473	0.89 (0.64-1.23)	0.71 (0.59-0.86)	B3GALT2
2	rs2293525	201468732	G/C	15.4	17.2	0.172	0.88 (0.73-1.06)	1.10 (1.02-1.19)	AOX1
	rs6754666	202435352	A/G	25.2	25.5	0.953	1.01 (0.86-1.17)	1.10 (1.02-1.19)	ALS2CR11
	rs889838	222835057	A/G	45.0	43.9	0.576	1.04 (0.91-1.19)	1.05 (0.98-1.13)	HSPA9P PAX3
	rs6711386	234990980	T/G	2.8	4.2	0.040	0.68 (0.46-0.98)	1.36 (1.12-1.64)	SPP2
3	rs4973786	26552078	A/G	39.0	38.3	0.218	1.09 (0.95-1.25)	1.06 (0.99-1.14)	VENTXP4 LRRC3B
	rs4611855	31847360	T/C	44.0	42.3	0.268	1.08 (0.94-1.24)	0.92 (0.86-0.99)	OSBPL10
	rs11130736	59810153	A/G	45.9	44.8	0.682	1.03 (0.88-1.21)	0.95 (0.89-1.02)	FHIT
	rs2687201*	70928930	A/C	36.0	30.6	0.0014	1.26 (1.09-1.46)	1.20 (1.12-1.29)	MITF, FOXP1 , EIF4E3
	rs9837992	70959438	A/G	35.5	31.4	0.005	1.23 (1.07-1.42)	1.17 (1.08-1.25)	
	rs7646638	134599236	C/T	5.6	7.0	0.285	0.86 (0.65-1.13)	0.94 (0.82-1.07)	EPHB1
	rs13080736	195837423	G/A	4.8	4.5	0.831	1.04 (0.75-1.42)	0.84 (0.72-0.99)	TFRC ZDHHC19

¹Angabe nach hg18, ²Allel 1:seltenes Allel/Allel 2: häufiges Allel, ³zweiseitige/einseitige Testung, ⁴OR von Allel 1, ⁵nächstgelegenes Gen; , Replizierte Risikovariante; SNP-Marker mit statistischer Signifikanz = p<0,05 fettgedruckt

Ergebnisse

Tab. 4.4 Geschlechtsspezifisches Ergebnis der Replikationsanalyse mit 15 SNP-Markern auf Chr. 1-3 in 938 männlichen/127 weiblichen EAC-Patienten und 498 männliche/521 weibliche Kontrollen [228]

Chr	SNP	Position ¹	Allel 1/2 ²	Gruppe ³	Frequenz Allel 1 (%)		P _{2seitig} ³	OR (95% CI) ⁴	Gen ⁵
					Patienten	Kontrollen			
1	rs17030152	7083719	C/T	alle	25.5	28.2	0.068	0.87 (0.75-1.01)	THAP3, DANN/C11, CAMTA1
				M	25,6	27.6	0,190	0.89 (0.75–1.06)	
				F	24.4	28.8	0.167	0.80 (0.59–1.10)	
	rs3005897	56786595	T/C	alle	28.6	26.4	0.167	1.11 (0.96-1.29)	PPAP2B
				M	28.5	26.8	0.613	0.96 (0.82-1.13)	
				F	29.5	26.0	0.438	0.77 (0.40-1.49)	
	rs3789387	94474961	C/T	alle	9.8	9.6	0.879	0,98 (0.78-1.23)	ABCA4
				M	9.5	10.1	0.721	0,93 (0.64-1.37)	
				F	9.5	9.2	0.894	0,98 (0,74-1,30)	
	rs12122818	193686395	C/A	alle	4.0	4.9	0.473	0.89 (0.64-1.23)	B3GALT2
				M	3.9	4.2	0.816	0,97 (0,75-1,26)	
				F	4.4	5.6	0.914	1,03 (0,64-1,65)	
2	rs2293525	201468732	G/C	alle	15.4	17.2	0.172	0.88 (0.73-1.06)	AOX1
				M	15.6	16.7	0.050	0,65 (0,43-1,00)	

Ergebnisse

				F	13.6	17.7	0.141	0,75 (0,51-1,10)	
	rs6754666	202435352	A/G	alle	25.2	25.5	0.953	1.01 (0.86-1.17)	ALS2CR11
M				25.5	24.8	0.476	0,93 (0,75-1,14)		
F				23.2	26.2	0.271	1,17 (0,89-1,53)		
	rs889838	222835057	A/G	alle	45.0	43.9	0.576	1.04 (0.91-1.19)	HSPA9P PAX3
M				44.7	44.6	0.533	1,06 (0,89-1,26)		
F				47.2	43.2	0.320	0,85 (0,61-1,17)		
	rs6711386	234990980	T/G	alle	2.8	4.2	0.040	0.68 (0.46-0.98)	SPP2
M				2.8	4.3	0.983	1,00 (0,86-1,17)		
F				3.1	4.2	0.474	0,76 (0,35-1,63)		
3	rs4973786	26552078	A/G	alle	39.0	38.3	0.218	1.09 (0.95-1.25)	VENTXP4 LRRC3B
				M	38.6	36.9	0.0007	1,33 (1,13-1,57)	
				F	42.4	39.7	0.407	0,79 (0,45-1,39)	
	rs4611855	31847360	T/C	alle	44.0	42.3	0.268	1.08 (0.94-1.24)	OSBPL10
				M	44.1	42.3	0.002	1.30 (1.10-1.54)	
				F	43.3	42.3	0.430	1,12 (0,85-1,49)	
	rs11130736	59810153	A/G	alle	45.9	44.8	0.682	1.03 (0.88-1.21)	FHIT
				M	46.2	44.6	0.259	1,10 (0,94-1,28)	

Ergebnisse

			F	44.1	45.0	0.620	1,08 (0,81-1,43)	
rs2687201	70928930	A/C	alle	36.0	30.6	0.0014	1.26 (1.09-1.46)	MITF, FOXP1 , EIF4E3
			M	36.4	30.2	0.0007	1.33 (1.13–1.57)	
			F	32.8	31.0	0.620	1.08 (0.81–1.43)	
rs9837992	70959438	A/G	alle	35.5	31.4	0.005	1.23 (1.07-1.42)	
			M	35.7	30.1	0.002	1.30 (1.10–1.54)	
			F	33.9	32.6	0.779	1.04 (0.78–1.39)	
rs7646638	134599236	C/T	alle	5.6	7.0	0.285	0.86 (0.65-1.13)	EPHB1
			M	5.5	6.3	0.530	1,06 (0,88-1,29)	
			F	6.3	7.7	0.798	1,04 (0,79-1,37)	
rs13080736	195837423	G/A	alle	4.8	4.5	0.831	1.04 (0.75-1.42)	TFRC ZDHHC19
			M	5.0	4.5	0.65	1,09 (0,76-1,57)	
			F	3.9	4.5	0.847	0,97 (0,74-1,29)	

¹Angabe nach hg18, ²Allel 1:seltenes Allel/Allel 2: häufiges Allel, ³Gruppe: alle, M=male,F=female ⁴zweiseitige/einseitige Testung,⁵OR von Allel 1, ⁶nächstgelegenes Gen; SNP-Marker P<0,05 fettgedruckt
Anmerkung; Der SNP-Marker rs2075993 wurde in der Qualitätskontrolle entfernt, somit handelt es sich um 15 statt 16 SNP-Marker.

Ergebnisse

Tab. 4.5 Ergebnis der Replikationsanalyse mit 1 SNP-Marker auf Chr. 1-3 in 542 BE/1106 EAC/1602 Kontrollen [230]

Chr	SNP	Position ¹	Allel 1/2 ²	Frequenz Allel 1 (%)		P _{2seitig} ³	Becker <i>et al.</i> BE/EAC OR (95% CI) ⁴	Palles <i>et al.</i> BE/EAC OR (95% CI)	Gen ⁵
				Patienten	Kontrollen				
2	rs3072*	20741887	G/A	41.3	37.0	0.0014	1.15 (1.04-1.27)	1.14 (1.09-1.18)	GDF7

¹Angabe nach hg18, ²Allel 1:seltenes Allel/Allel 2: häufiges Allel, ³Gruppe: alle, M=male,F=female ⁴zweiseitige/einseitige Testung,⁵OR von Allel 1, ⁶nächstgelegenes Gen; SNP-Marker P<0,05 fettgedruckt

4.2 Charakterisierung der phänotypischen Merkmale im Kollektiv

Das Kollektiv umfasste 1027 Patienten (♂ n=904, ♀ n=123), 856 detaillierte phänotypische Daten des Fragebogens standen für die Auswertung zur Verfügung. Nachfolgend werden die in Kapitel 3.3.3 ausgewählten 15 Phänotyp-Charakteristika des Kollektivs dargestellt (**Tab. 4.6**).

Das Kollektiv bestand aus 88% Männern und 12% Frauen. Durchschnittlich erkrankten die Patienten mit 61.84 Jahren (♂ 61.56 Jahre, ♀ 63.88 Jahre), der jüngste Patient war 22 Jahre und der älteste 90 Jahre. Die Mehrheit wurde im Alter zwischen 60-70 Jahren diagnostiziert (37.59%). Bei Frauen bestand ein Trend hin zu einem höheren Diagnosealter (41.46% zwischen 60-70 Jahren). Unter 50 Jahren war das Barrett-Karzinom seltener (11.49%). In 2.33% d.F. war ein Verwandter erstes Grades ebenfalls an einem BE erkrankt. Bei einem Drittel der Patienten lag ein LSBE oder SSBE bereits vor. Beide Längenausdehnungen kamen bei Männern nahezu gleich häufig vor (LSBE 28.43 vs. SSBE 25.33%). Bei Frauen war der SSBE deutlich häufiger (SSBE 30.08 vs. LSBE 21.95%).

Die gastrooesophageale Refluxkrankheit kam bei Dreiviertel (75.58%) des Kollektivs vor. Bei der Hälfte (52.34%) bestanden die Refluxsymptome mehr als 2x/Woche. In einem Fünftel der Fälle (21.73%) waren dem Barrett-Karzinom keine Symptome vorausgegangen. Ein Viertel der Befragten (25.23%) gab an, dass in der näheren Verwandtschaft eine Person an Refluxsymptomen litt. Die geschlechtsspezifische Verteilung war bei der Variable Reflux in etwa gleich. Die Hiatushernie, als wichtiger pathophysiologischer Faktor der GERD, lag bei nahezu 2/3 der Patienten vor (61.80% vs. keine Hiatushernie in 34.58% d.F.).

Die Komorbidität eines duodenalen oder ventrikulären Ulcus lag in 11.68% der Fälle vor. Eine ähnliche Zahl (12.61%) wurde für die oftmals assoziierte *Helicobacter pylori*-Infektion ermittelt. Die Patienten litten in 15.07% der Fälle vor der Diagnose des EAC unter einem Erstmalignom. Bei Zweidrittel (65.77%) war keine weitere Tumorerkrankung bekannt. Hier gab es keine relevanten Unterschiede innerhalb der Geschlechtsvariable.

Das Kollektiv bestand aus 70.68% aktuellen und ehemaligen Rauchern. 10-11% der Männer als auch der Frauen konsumierten zum Zeitpunkt der Befragung Nikotin. Die durchschnittliche Zahl der packyears war mit 25.88py hoch. Männer hatten eine höhere Anzahl an packyears als Frauen (male 26.58py vs. female 21.15py). 59.11% des Kollektivs waren ehemalige Raucher. In der geschlechtsspezifischen Auswertung zeigte sich, dass 51.99% der Männer und 29.27% der Frauen Ex-Raucher waren. Die durchschnittliche Zahl der packyears war auch in diesem Fall mit 24.91py hoch. Männer hatten auch hier deutlich mehr Nikotin konsumiert als Frauen (♂ 25.81py vs. ♀ 13.18py). Frauen waren häufiger als Männern Nicht-Raucher (♀ 60.16% vs. ♂ 38.5%).

Insgesamt 64.6% der Patienten trinken Alkohol. Hierbei unterscheidet sich das Konsumverhalten von Männern und Frauen deutlich. Männer trinken häufiger Alkohol (♂ 56.31% vs. ♀ 35.77%) und haben einen höheren Alkoholkonsum als Frauen. Dieser liegt im Mittel bei 21.29g/d (0.29-225g/d) (vgl. ♀ 13.52g/d 1.17-120g/d). Im Durchschnitt besteht in beiden Gruppen ein risikoarmes Alkoholkonsumverhalten. Frauen trinken häufiger als Männern keinen Alkohol (♀ 43.09% vs. ♂ 25.55%).

Der größte Teil des Gesamtkollektivs (83.41%) trinkt Kaffee, wobei sich der Konsum von Männern und Frauen nicht wesentlich unterschied (♂ 70% vs. ♀ 65%).

Ergebnisse

Tab. 4.6 Phänotyp-Charakteristika des Kollektivs aus 1027 EAC-Fällen

Phänotypen/Umweltfaktoren	Variable	n=verfügbare Daten	n=gesamt (in %)	davon n=male (in %)	davon n=female (in %)
Geschlecht	male/female	1027		904 (88%)	123 (12%)
Alter in Jahren bei Diagnosestellung	quantitativ	1027	1006 (97.96%), \bar{x} =61.84 Jahre (22-90 Jahre)	\bar{x} =61.56 (22-90 Jahre)	\bar{x} =63.88 (35-88 Jahre)
- davon <50 Jahre			118 (11.49%)	110 (12.17%)	8 (6.5%)
- davon ≥ 50 - <60Jahre			278 (27.07%)	250 (27.65%)	28 (22.76%)
- davon ≥ 60 - <70Jahre			386 (37.59%)	335 (37.06%)	51 (41.46%)
- davon ≥ 70 Jahre			224 (21.81%)	191 (21.13%)	33 (26.83%)
LSBE	Ja	856	284 (33.18%)	257 (28.43%)	27 (21.95%)
SSBE	Ja		266 (31.07%)	229 (25.33%)	37 (30.08%)
Familiäre Fälle 1. Grades mit Barrett-Oesophagus	Ja	1027	24 (2.33%)	22 (2.43%)	2 (1.63%)
	Nein		980 (95.70%)	862 (95.35%)	118 (95.93%)
Ulcus ventriculi/duodeni	Ja	856	100 (11.68%)	90 (9.96%)	10 (8.13%)
	Nein		742 (86.68%)	655 (72.46%)	87 (70.73%)
Hiatushernie	Ja	856	529 (61.80%)	471 (52.1%)	58 (47.15%)
	Nein		296 (34.58%)	258 (28.54%)	38 (30.89%)

Ergebnisse

Phänotypen/Umweltfaktoren	Variable	n=verfügbare Daten	n=gesamt (in %)	davon n=male (in %)	davon n=female (in %)
Weitere maligne Erkrankung	Ja	856	129 (15.07%)	112 (12.39%)	17 (13.82%)
	Nein		563 (65.77%)	502 (55.53%)	61 (49.59%)
<i>Helicobacter pylori</i> Infektion	Ja	856	108 (12.61%)	93 (10.29%)	15 (12.2%)
	Nein		721 (84.23%)	640 (70.8%)	81 (65.85%)
Kaffeekonsum	Ja	856	714 (83.41%)	634 (70.13%)	80 (65.04%)
	Nein		103 (12.03%)	89 (9.85%)	14 (11.38%)
Alkoholkonsum in g/d	quantitativ	856	n=837, \bar{x} =13.65g/d (0-225g/d)	\bar{x} =14.64g/d	\bar{x} =6.13g/d
- davon Alkoholkonsum >0g/d			n=553 (64.60%), \bar{x} =20.67g/d (0.29-225g/d)	509 (56.31%), \bar{x} =21.29g/d (0.29-225g/d)	44 (35.77%), \bar{x} =13.52g/d (1.17-120g/d)
- davon kein Alkoholkonsum			n=284 (33.18%)	231 (25.55%)	53 (43.09%)
Aktuelle Raucher in py	quantitativ	856	n=99 (11.57%), \bar{x} =25.88py	86 (9.51%), \bar{x} =26.58py	13 (10.57%), \bar{x} =21.15py
Ehemalige Raucher in py	quantitativ	856	n=506 (59.11%), \bar{x} =24.91py	470 (51.99%), \bar{x} =25.81py	36 (29.27%), \bar{x} =13.18py
Symptom Reflux	Ja	856	647 (75.58%)	574 (63.5%)	73 (59.35%)
	Nein		186 (21.73%)	163 (18.03%)	23 (18.7%)
Symptom Reflux >2x/Woche	Ja	856	448 (52.34%)	395 (43.69%)	53 (43.09%)
	Nein		359 (41.94%)	323 (35.73%)	36 (29.27%)
Familiäre Fälle 1. Grades mit Refluxsymptomatik	Ja	856	216 (25.23%)	190 (21.02%)	26 (21.14%)
	Nein		490 (57.24%)	436 (48.23%)	54 (43.9%)

4.3 Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen

Die im vorherigen Kapitel beschriebenen Phänotypen wurden auf Assoziationen zwischen genetischen Daten der Replikationsanalyse (Genotyp) und Phänotypen (GXP) sowie Genotyp-Umweltfaktoren (GXU) analysiert. Nachfolgend werden 6 SNP-Marker beschrieben, die bei den Analysen eine nominale Signifikanz erreichten (**Tab. 4.7**).

4.3.1 Genotyp-Phänotyp-Analysen (GXP)

Der Phänotyp der **Hiatushernie** war mit dem Genotyp **rs2293525** auf Chromosom 2 assoziiert. Das seltenere Allel G kam bei EAC-Patienten häufiger vor als in den Kontrollen (18.1% vs. 14.21%, $p_{2\text{seitig}}$ 0.039, OR 1.35). Das nächstgelegene Gen des Markers ist *aldehyde oxidase 1* **AOX1**. Seine Funktion besteht vor allem in der hepatischen Metabolisation von aldehydhaltigen Xenobiotika [235]. In der Veröffentlichung von Pryde *et al.* [236] wurde auch ein möglicher Einfluss von Faktoren wie Alter, Nikotinabusus, Medikamente oder Tumorerkrankungen, auf die Genaktivität diskutiert.

Für eine ***Helicobacter pylori*-Infektion** bestanden zwei assoziierte Genotypen. Das häufigere Allel C von **rs2293525** auf Chromosom 2 (Gen **AOX1**) bestand bei 85.36% EAC vs. 78.65% Kontrollen ($p_{2\text{seitig}}$ 0.016, OR 1.37). Ebenfalls war das Major-Allel G des SNP **rs889838** auf Chromosom 2 signifikant assoziiert (56.81% EAC vs. 53.57%, $p_{2\text{seitig}}$ 0.008, OR 1.33). In beiden Fällen fand sich also eine inverse Korrelation, also eine protektive Funktion der Marker zu dem Phänotyp *H.p.*-Infektion. Die Gene *heat shock protein family A (Hsp70) member 9 pseudogene 1* **HsPA9P1** und *paired box 3* **PAX3** befinden sich in der Nähe der Risikovariante rs889838. Die Familie der Heat shock Proteine haben vielfältige Aufgaben, u.a. bei der Stressantwort und Proteinfaltung. Der Subgruppe Hsp70 wurde eine bedeutende Rolle in der Immunomodulation, z.B. bei der Kennzeichnung von Tumorzellen für NK-Zellen, zugeschrieben [237]. PAX3 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, dessen *loss of function* zu einem Onkogen oder Tumorsuppressor führt [238]. Interessanterweise ist eine Fehlfunktion u.a. für die Metastasierung des Magenkarzinoms beschrieben [239].

Bei **familiären Fällen 1° mit Refluxsymptomen** bestand für die Variante **rs4611855** auf Chromosom 3 in der Nähe des Gens *oxysterol binding protein like 10* **OSBPL10** eine Assoziation. Das Allel T kam signifikant häufiger in der Patienten- als in der Kontrollgruppe vor (47.13% vs. 46.66%, $p_{2\text{seitig}}$ 0.034, OR 1.31).

4.3.2 Genotyp-Umwelt-Analysen (GXU)

Der Umweltfaktor **aktuelle Raucher in py** zeigte eine Assoziation mit zwei Genotypen. Das Minor-Allel A des bereits in der Replikationsanalyse signifikant assoziierten SNP-Markers **rs2687201** auf Chromosom 3 in der Nähe des Gens **FOXP1** kam häufiger bei EAC (35.98%) als bei den Kontrollen (30.61%) vor ($p_{2\text{seitig}}$ 0.043, BETA 1.27). Ebenfalls bestand für den SNP **rs4611855**, selteneres Allel T, eine schwache Assoziation zu dem aktuellen Status als Raucher (43.99% EAC vs. 42.28% Kontrollen, $P_{2\text{seitig}}$ 0.047, BETA 1.07). Das nächstgelegene Gen ist **OSBPL10**.

Das seltenere Allel G des SNP-Markers **rs13080736** auf Chromosom 3 zeigte eine schwache Assoziation hinsichtlich des **Alkoholkonsums in g/d** (4.83% EAC vs. 4.47% Kontrollen, $P_{2\text{seitig}}$ 0.042, BETA 1.08). Die hierzu nächstgelegenen Gene sind *transferrin receptor* **TFRC** und *zinc finger DHHC-type containing 19* **ZDHHC19**. Das Transferrin receptor protein 1 ist für die zelluläre Eisenaufnahme notwendig und häufiger in Gewebe der Erythropoese oder erhöhten Eisenumsatzes [*NCBI Gene ID 7037*]. Über die Funktion von ZDHHC19 ist nur wenig bekannt [*NCBI Gene ID 131540*].

Zu dem qualitativen Phänotyp **Kaffeekonsum** bestand für den SNP **rs7646638**, Major-Allel C auf Chromosom 3, eine inverse Assoziation (97.92% EAC vs. 94.14% Kontrollen, $p_{2\text{seitig}}$ 0.04, RR 1,66). Bei dem nächstgelegenen Gen handelt es sich um **EPHB1**. Dessen gleichnamiges Protein *EPH receptor B1* gehört zur großen Familie der Rezeptor Tyrosinkinasen. Diese haben u.a. vielfältige und ubiquitäre Funktionen in der Zell-Zellkommunikation/-interaktion und Angiogenese [240] sowie als Regulatoren der Zellproliferation von Stammzellen [241]. Von Mathot *et al.* [242] wurde im CRC ein möglicher Zusammenhang zwischen der fehlenden Zellinteraktion und Tumorgenese bei somatischer Mutation des Gens beschrieben.

Ergebnisse

Tab. 4.7 Nominal signifikante Assoziationen zwischen SNP-Markern auf Chr. 1-3 und Phänotypen/Umweltfaktoren

Chr.	SNP	Position ¹	Allel 1/2 ²	Phänotypen/ Umweltfaktoren	Frequenz Allel 1 in %		P _{2seitig} ³	OR/BETA ⁴	Gen ⁵
					Patienten	Kontrollen			
2	rs2293525	201468732	G/C	Hiatushernie	18.1	14.21	0,03871	1.35	AOX1
				<i>Helicobacter pylori</i> Infektion	14.64	21.35	0.01645	0.63	
	rs889838	222835057	A/G	<i>Helicobacter pylori</i> Infektion	43.19	46.43	0.007517	0.67	HSPA9P PAX3
3	rs4611855	31847360	T/C	Familiäre Fälle 1. Grades mit Refluxsymptomatik	47.13	40.66	0,03396	1.31	OSBPL10
				Aktuelle Raucher in py	43.99	42.28	0,04746	1.07	
	rs2687201	70928930	A/C	Aktuelle Raucher in py	35.98	30.61	0,04348	1.27	MITF, FOXP1 , EIF4E3
	rs7646638	134599236	C/T	Kaffeekonsum	2.08	5.86	0.03956	0.34	EPHB1
	rs13080736	195837423	G/A	Alkoholkonsum in g/d	4.83	4.47	0.0416	1.08	TFRC ZDHHC19

¹Angabe nach hg18, ²Allel 1:seltenes Allel/Allel 2: häufiges Allel, ³zweiseitige Testung, ⁴OR bei qualitativen Phänotypen, BETA bei quantitativen Phänotypen ⁵nächstgelegenes Gen

5. Diskussion

5.1 Aufbau der Biobank

Ein bedeutendes Ziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau einer Biobank von Patienten mit Barrett-Karzinom und deren phänotypische Charakterisierung. Einen besonderen Schwerpunkt stellte die Projektkoordination der multizentrischen Studie und die Rekrutierung von Patienten dar. Die phänotypischen Daten wurden in Form eines Interviews aufwendig erhoben.

Mit mehr als 1000 Patienten zentraleuropäischer Ethnizität umfasst die Datenbank des Barrett-Konsortiums g4b eines der weltweit größten Barrett-Karzinom-Kollektive. Die g4b-Kohorte stellt ein in vielen Punkten mit der Literatur vergleichbares epidemiologisches Kollektiv dar. Die rekrutierte Kohorte besteht hauptsächlich aus Männern, was den geschlechtsspezifischen Schwerpunkt der Erkrankung betont. Die Mehrheit ist im Alter zwischen 60-70 Jahren diagnostiziert worden, unter 50 Jahren war das Barrett-Karzinom seltener. Familiäre Fälle waren mit ca. 2% weniger häufig als in der Literatur angegeben (vgl. 7-10% [65, 66]). Die Prävalenz eines LSBE oder SSBE war mit >30% deutlich höher (vgl. ca. 1% [49]). Das Risiko der malignen Entartung in einem LSBE ist im Vergleich zum SSBE deutlich höher. Das g4b-Kollektiv erscheint somit „schwerer krank“ als der Durchschnitt. Dies könnte damit zusammenhängen, dass viele Rekrutierungszentren Schwerpunktkliniken zur Diagnostik und Therapie des Barrett-Oesophagus und -Karzinoms sind.

Refluxsymptome kamen mit >75% sehr häufig vor. Es waren weniger häufig (ca. 21%) keine Symptome der Erkrankung vorangegangen (vgl. Literatur 40-48% [8, 9]). Die Hiatushernie als sowohl wichtiger pathophysiologischer Faktor des GERD als auch unabhängiger Risikofaktor des EAC kam bei >60% d.F. vor.

Das g4b-Kollektiv bestand zu einem Großteil (ca. 70%) aus aktuellen und ehemaligen Rauchern. Die durchschnittliche Zahl der packyears war hoch (ca. 25py). Die Daten bestätigen den Einfluss des exogenen Risikofaktors Nikotin in Verbindung mit der kumulativen Anzahl an packyears auf die Entwicklung des Barrett-Karzinoms. Die Umweltfaktoren Alkohol- und Kaffeekonsum sind im Kollektiv sehr häufig vertreten. Dennoch besteht nach der Literatur kein erhöhtes Risiko für die Entwicklung des BC (siehe Kap 2.2.3.4).

Die Prävalenz der *Helicobacter pylori*-Infektion ist mit 48% in Deutschland hoch [243]. Allerdings unterliegt sie in Abhängigkeit zum Geburtsland einer großen Variation [243]. Differenziert man nach Abstammung, ergibt sich eine Prävalenz von 13% bei Deutschen. Im g4b-Kollektiv mit zentraleuropäischer Ethnizität bestand in ca. 12% d.F. eine *Helicobacter pylori*-Infektion. Die gastroduodenale Ulkuskrankheit war mit ca. 12% etwas häufiger als in der Review-Analyse von Zagari *et al.* [244] (hier 6.8% *Ulcus ventriculi*, 5.3% *Ulcus duodeni*). In 15% d.F. wurde ein Erstkarzinom in der Anamnese genannt, also vor der Diagnose des Barrett-Karzinoms. In der Literaturrecherche fanden sich keine Studien, die für das EAC spezifische Primärtumore untersucht haben. Je nach Art, Therapie (Chemotherapie, Radiatio) oder z.B. ähnlichen Risikofaktoren (z.B. Nikotinkonsum beim ESCC und Lungenkarzinom) des Erstkarzinoms lässt sich im Allgemeinen ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung eines Zweitkarzinoms feststellen. Umgekehrt konnte ein erhöhtes standardisiertes Inzidenzverhältnis (SIR) von 2.13 (95% CI 1.26-3.37) für sekundäre primäre Magenkarzinome für das BC ermittelt werden, insbesondere in den ersten 6 Monaten (SIR 4.25. 95% CI 2.19-7.42) [245]. Zur Beantwortung der Frage eines spezifischen Primärtumors des EAC wären detaillierte Datenerhebungen zu den Erstkarzinomen im Kollektiv erforderlich.

5.2 Replikationsanalyse

Für die molekulargenetische Typisierung erfolgte die Bereitstellung der Blutproben und die Auswahl der genetischen Varianten für die Replikationsanalyse. Ziel der durchgeführten Kandidatengenanalyse [228] war die Replikation der 94 identifizierten Risikovarianten des BEACON-Konsortiums [14] im g4b-Kollektiv aus 1065 EAC/1019 Kontrollen zentraleuropäischer Ethnizität [228]. Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren 16 SNP-Marker, die auf Chromosom 1-3 lokalisiert sind.

Eine neue Assoziation konnte die Kandidatengenanalyse nicht detektieren, da keiner der SNPs der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen standhielt. Ein möglicher Grund hierfür könnte die geringere Fallzahl gewesen sein, so dass die statistische Power nicht ausreichend war. Außerdem könnte die populationsbasierte Kontrollgruppe einen Einfluss auf die Aussage gehabt haben, da kein Screening auf das Vorliegen eines Barrett-Oesophagus vorgenommen wurde. Ein weiterer

Schwachpunkt der Analyse besteht im Hinblick auf geschlechtsspezifische Assoziationen, da nur ein kleiner Teil des Kollektivs aus Frauen bestand.

Zwei der am stärksten krankheitsassoziierten SNPs der Kandidatengenanalyse **rs2687201** und **rs9837992**, liegen auf Chromosomen 3p14 in der Nähe des Gens **FOXP1** [228]. Die Replikationsanalyse des g4b konnte den durch das BEACON-Konsortium identifizierten genetischen Risikolocus FOXP1 für das EAC bestätigen. Die Effektstärken waren in beiden Analysen vergleichbar [228]. Neben dem replizierten SNP rs2687201 erlangte der Marker rs9837992 im g4b-Kollektiv statistische Signifikanz. In beiden Fällen waren Männer als Träger der Varianten stärker krankheitsassoziiert als Frauen. Der Marker war im BEACON-Kollektiv nicht assoziiert. In der GXU-Analyse bestand statistische Signifikanz zwischen rs2687201 und dem Phänotyp aktuelle Raucher in py. Eine Assoziation zum Symptom Reflux konnte nicht gezeigt werden. Die Ergebnisse stehen in Kontroverse zu einer Folgeanalyse des BEACON-Konsortiums, in der die gastrooesophageale Refluxerkrankung, nicht jedoch der Nikotinkonsum mit dem SNP rs2687201 risikoassoziiert war [246]. Dies lässt vermuten, dass FOXP1 möglicherweise als Tumorsuppressorgen bei frühen molekularpathologischen Veränderungen bereits bei der GERD an der Entwicklung des Barrett-Oesophagus und -Karzinoms beteiligt ist. In Folgestudien des g4b sollte mit einem gepoolten Patientenkollektiv des BEACON- und g4b-Konsortiums 1) eine Replikation des SNPs rs9837992 durchgeführt und 2) der Zusammenhang zwischen rs2687201 und den Risikofaktoren GERD, Nikotinkonsum und Adipositas erneut untersucht werden.

In der weiteren Kandidatengenanalyse mit den von Palles *et al.* [110] neu identifizierten Risikovarianten wurde **rs3072** neben dem Gen **GDF7** auf Chromosom 2p24 als genetischer Risikolocus repliziert. Auch hier zeigten sich vergleichbare Effektstärken. Erstmals wurde der Marker für das EAC bestätigt. Zudem zeigte sich eine stärkere Assoziation für das Karzinom als für den BE (RR_{EAC} 1.20 vs. RR_{BE} 1.05). Dies legt die Vermutung nahe, dass genetische Veränderungen von GDF7 über die MDC zunehmen könnten. Weitere Studien sollten aus diesem Grund die Risikovariante mit dem Grad der Dysplasien und frühen Tumorstadien korrelieren. Die GXP-/GXU-Analyse ergab keinen assoziierten Phänotyp/Umweltfaktor.

Einige statistisch signifikante SNP-Marker liegen in der Nähe von Genen, die entweder ubiquitär vorkommen oder wenig spezifisch für die Pathophysiologie des Barrett-Karzinoms sind. Folgestudien sollten daher zum Ziel haben 1) weitere SNPs mit hohem Kopplungsungleichgewicht in der Region um das gefundene Allel zu untersuchen und 2) falsch positive Ergebnisse zu korrigieren.

5.3 Biostatistische Analysen

Für die biostatistischen Analysen erfolgte die Bereitstellung der Phänotyp-Daten und Erfassung klinischer Prägnanztypen. Diese wurden dann mit den SNP-Markern korreliert und auf Assoziationen untersucht.

Für weitere Untersuchungen könnte der SNP-Marker rs4611855 in der Nähe des Gens OSBPL10 von Interesse sein. In allen drei Analysen erreichte die Variante statistische Signifikanz. Der Genotyp war bei Männern mit einem höheren Risiko assoziiert. Zudem bestand eine statistische Signifikanz zum Phänotyp Familiäre Fälle 1. Grades mit Refluxsymptomatik und Umweltfaktor Nikotinkonsum (hier nur schwach). Das Protein von OSBPL10 fungiert als intrazellulärer Lipidrezeptor. Genetische Variationen kommen möglicherweise bei Dyslipidämien vor. Lipidstoffwechselstörungen gelten als entscheidender Risikofaktor für viele Erkrankungen (z.B. KHK). Es erscheint daher naheliegend, dass genetische Veränderungen im Lipidstoffwechsel indirekt als Kofaktor der Adipositas eine Rolle bei der Entwicklung des EAC spielen.

In der GXP war die **Hiatushernie** mit dem SNP-Marker **rs2293525** auf Chromosom 2 assoziiert. Den Phänotypen wiesen >60% der Patienten im Kollektiv auf. Eine Korrelation zu dem nächstgelegenen hepatischen Gen AOX1 erscheint unwahrscheinlich. Für die Hiatushernie wurde bislang nur der SNP-Marker **rs3134646** als genetischer Risikofaktor für Männer nachgewiesen [247]. Beide SNPs liegen auf Chromosom 2, sind jedoch ca. 12 Mio. bp voneinander entfernt, so dass kein hohes LD besteht. Das zugehörige Gen von rs3134646 ist *collagen type III alpha 1* COL3A1. Die Variante war unabhängig von der GERD assoziiert [247]. Nach Åsling *et al.* [247] könnte eine fehlende Expression von Typ III Kollagen zu einer reduzierten Stärke und Flexibilität des Oesophagusgewebes führen. In Folgestudien sollte der Marker rs3134646 im g4b-Kollektiv auf Assoziation mit der Hiatushernie untersucht werden.

Die Marker **rs2293525 (Gen AOX1)** und **rs889838**, beide Chromosom 2, waren invers zu dem Phänotyp der ***Helicobacter pylori*-Infektion** assoziiert. Träger der Varianten scheinen einen protektiven Effekt durch die bakterielle Infektion zu haben. Der protektive Faktor der *H.p.*-Infektion wurde in der Literatur vielfach belegt [206]. Unklar bleibt, welcher Zusammenhang zwischen den SNPs bzw. den nächstgelegenen Genen **AOX1**, *heat shock protein family A (Hsp70) member 9 pseudogene 1 HsPA9P1* und *paired box 3 PAX3* und dem Phänotyp besteht.

Studien konnten keinen negativen Einfluss von Kaffee für die Entwicklung des EAC zeigen [223]. Die vorliegende Analyse legt nahe, dass **Kaffeekonsum** für Träger der Variante **rs7646638** auf Chromosom 3 protektiv ist. Ein funktioneller Zusammenhang zur Familie der Rezeptor Tyrosinkinasen, wofür das nächstgelegene Gen **EPHB1** kodiert, konnte nicht hergestellt werden.

5.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Das Verständnis der multifaktoriellen Genese des Barrett-Karzinoms ist von essentieller Bedeutung für die Entwicklung von neuen diagnostischen Markern und therapeutischen Ansätzen. Drei wesentliche Risikofaktoren GERD, Adipositas und Nikotinkonsum führen sowohl zu einer lokalen als auch systemischen chronischen Inflammation des Oesophagus. Der Gewebeschaden wird beim Barrett-Oesophagus durch ein hochspezialisiertes, intestinales Zylinderepithel ersetzt. Für die komplexen Veränderungen ist die Beteiligung von Prozessen der genetischen Umprogrammierung sehr wahrscheinlich. Der Ursprung der „*ersten metaplastischen Zelle*“ ist aktuell noch unbekannt. Das Modell des „Transcommitment“ einer Stamm-/Progenitorzelle des Plattenepithels und/oder der submukösen Drüsen/-gänge im Oesophagus stellt eine vielversprechende Konzeption zur Erklärung der Genese der Metaplasie dar. Studien in Tiermodellen, Zellkulturen und an menschlichen Gewebeproben konnten Hinweise für die Möglichkeit der Differenzierung von Vorläuferzellen zu „Barrett-ähnlichem Epithel“ finden [128, 129]. Die Versuche lassen sich allerdings nur begrenzt auf menschliches Barrett-Epithel übertragen. Möglicherweise könnte es sich bei dem spezialisierten Epithel mit den darin enthaltenen spezifischen Zellen auch um eine Kombination aus mehreren Vorläuferzellen unterschiedlichen Ursprungs handeln.

Trotz zahlreicher Untersuchungen zu den histopathologischen und molekularpathologischen Veränderungen sind die genauen Prozesse, welche über die MDC zur Entwicklung des Barrett-Karzinoms führen, noch nicht verstanden. Insbesondere ist unklar, welche Risikogene und -faktoren die Tumorgenese beeinflussen, denn nicht jeder Patient entwickelt ein Karzinom. Bei den 7 der 8 durch GWAS identifizierten Risikovarianten handelt es sich interessanterweise um Gene, welche in der embryonalen Entwicklung des oberen Gastrointestinaltraktes eine bedeutende Rolle spielen. Beim Barrett-Oesophagus und -Karzinom kommt es zur (Re-) Aktivierung dieser embryonalen Signalwege. Die SNP-Risikovarianten befinden sich in Regionen um das jeweilige Gen und legen eine funktionelle Rolle bei der Genexpression und Genregulation nahe. Studien zur Identifikation von möglichen therapeutischen Zielen laufen bereits [115].

Es ist statistisch zu erwarten, dass mittels weiterer genomweiter Assoziationsstudien und Metaanalysen gepoolter Kollektive neue Risikovarianten identifiziert werden können. Daneben bieten relativ neue humangenetische Methoden wie das Next-Generation Sequencing (NGS) umfangreiche Möglichkeiten zur Erforschung multifaktorieller Erkrankungen. Mit NGS können hochauflösende Sequenzierungen genomweit vorgenommen werden, wodurch auch seltene Risikovarianten und -gene identifiziert werden können, die multifaktoriellen Krankheiten ursächlich zugrunde liegen.

Zukünftige Studien sollten sich mit den molekularpathologischen Prozessen der MDC beschäftigen und die „Hallmarks of Cancer“ vervollständigen. Hierdurch könnten geeignete Biomarkern zur frühzeitigen Detektion von neoplastischen Veränderungen entwickelt werden. Ebenfalls bietet der Einfluss der systemischen Inflammation auf die Tumorgenese ein interessantes Forschungsfeld, gerade vor dem Hintergrund der Diskussion über NSAIDs und Statine zur Primär- und Sekundärprophylaxe von Tumorerkrankungen. Letztlich sollten die Bestrebungen der Forschung darin liegen, gefährdete Patienten frühzeitig in klinische Überwachungsprogramme einzuschließen und Tumorpatienten individualisierte Therapieansätze (Bsp. Immuntherapien) anbieten zu können.

6. Zusammenfassung

Als Barrett-Oesophagus wird eine intestinale Metaplasie des Oesophagus bezeichnet, welche als Adaption einer chronischen gastrooesophagealen Refluxerkrankung (GERD) entsteht. Der Ursprung der „ersten metaplastischen Zelle“ ist aktuell noch unbekannt. Das Modell des „Transcommitment“ (Umprogrammierung) einer Stamm-/Progenitorzelle stellt eine vielversprechende Konzeption zur Erklärung der Genese der Metaplasie dar. Über die Metaplasie-Dysplasie-Carcinom-Sequenz (MDC) kann sich ein invasives Adenokarzinom, das Barrett-Karzinom (*Barrett's carcinoma* BC, *esophageal adenocarcinoma* EAC), entwickeln. Der BE ist die einzig bekannte Präkanzerose des Karzinoms. Auf Grund der stark steigenden Inzidenz und limitierten Prognose ist die Tumorerkrankung in den Fokus der Wissenschaft gerückt. Bei dem Barrett-Karzinom handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung. Die drei Risikofaktoren GERD, Nikotinkonsum und Adipositas sind wesentlich an der Karzinogenese beteiligt. Genetische Risikovarianten tragen zu etwa 10% zur Genese bei. Mit genomweiten Assoziationsstudien (*GWAS, genome-wide association study*) konnten bislang 8 krankheitsassoziierte Gene identifiziert werden, die hauptsächlich eine Rolle in der embryonalen Entwicklung des oberen Gastrointestinaltraktes spielen. Der neoplastische Prozess zum Barrett-Karzinom ist durch zahlreiche relevante „Hallmarks of Cancer“ geprägt, die durch inflammatorische Prozesse begünstigt werden. Die Aktivierung von Onkogenen, Funktionsverluste/-zugewinne von Tumorsuppressorgenen und fehlerhafte Signalwege führen schließlich zur klonalen Expansion und Metastasierung der Tumorzellen.

Das Barrett-Konsortiums *genes for barrett's g4b* hat sich zur Aufgabe gemacht, die genetischen und zellbiologischen Ursachen des Barrett-Oesophagus und -Karzinoms aufzuklären. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war der Aufbau einer Biobank von Patienten mit Barrett-Karzinom und deren phänotypische Charakterisierung für eine genetische Replikationsanalyse von 16 SNP-Markern. Die Patienten wurden hierzu aufwendig rekrutiert und phänotypische Daten zur Erfassung klinischer Präganztypen erhoben. Die Blutproben gingen in eine molekulargenetische Typisierung ein und die phänotypischen Merkmale wurden mit dem Genotyp auf Interaktionen untersucht (Gen-Phänotyp GXP/ Gen-Umwelt GXU).

Mit mehr als 1000 Patienten zentraleuropäischer Ethnizität umfasst die Datenbank des g4b eines der weltweit größten Barrett-Karzinom-Kollektive. Die Kohorte stellt ein in vielen Punkten mit der Literatur vergleichbares epidemiologisches Kollektiv dar. Auffällig war eine deutlich höhere Prävalenz des LSBE und SSBE, was vermutlich an den Rekrutierungszentren als Schwerpunktkliniken der Barrett-Erkrankung lag. Des Weiteren kamen die Risikofaktoren GERD und Nikotinkonsum sowie die Hiatushernie häufig vor. Ziel der durchgeführten Kandidatengenanalyse war die Replikation der 94 identifizierten Risikovarianten der GWAS des BEACON-Konsortiums. Eine neue Assoziation konnte nicht gefunden werden, da keiner der SNPs der Bonferroni-Korrektur für multiples Testen standhielt. Die Analyse konnte die genetische Risikovariante rs2687201 in der Nähe des Gens FOXP1 auf Chromosom 3 für das EAC bestätigen. Daneben war der SNP rs9837992, ebenfalls auf Chromosom 3, krankheitsassoziiert. In der GXU-Analyse bestand statistische Signifikanz zwischen rs2687201 und dem Phänotyp aktuelle Raucher in *py*. Interessante Aspekte für Folgestudien sind die Replikation des SNPs rs9837992 und die Untersuchung des Zusammenhangs zwischen rs2687201 und den Risikofaktoren GERD, Nikotinkonsum und Adipositas. Des Weiteren konnte die Kandidatengenanalyse eine von Palles *et al.* neu identifizierte Variante, rs3072 neben dem Gen GDF7 auf Chromosom 2 als genetischen Risikolocus replizieren. Erstmals wurde der Marker für das EAC bestätigt und eine stärkere Assoziation für das Karzinom als für den BE gezeigt. Dies legt die Vermutung nahe, dass genetische Veränderungen von GDF7 über die MDC zunehmen könnten. Die biostatistischen Analysen konnten den protektiven Effekt der *Helicobacter pylori*-Infektion bestätigen und legt zudem einen ähnlichen Effekt für Kaffeekonsum nahe.

Mittels künftiger GWAS und Metaanalysen gepoolter Kollektive wird es möglich sein, weitere Risikovarianten für den BE und das EAC zu identifizieren. Daneben bieten neue Forschungsmethoden, wie das Next-Generation Sequencing (NGS) vielfältige Möglichkeiten zur Erforschung der Erkrankung, wobei auch seltene Risikovarianten für multifaktorielle Erkrankungen identifiziert werden können. Künftige Studien sollten sich auch mit den molekularpathologischen Prozessen der MDC und den „Hallmarks of Cancer“ beschäftigen. Hierdurch könnten geeignete Biomarkern zur frühzeitigen Detektion von neoplastischen Veränderungen entwickelt und gefährdete Patienten in klinische Überwachungsprogramme eingeschlossen werden.

Acknowledgment

Ich danke allen Sponsoren für die finanzielle Förderung des Projektes, insbesondere der Else Kröner Fresenius Stiftung (EKFS), Universitätsmedizin Mainz und dem Universitätsklinikum Bonn. Ebenfalls gilt der Dank den Direktoren Prof. Dr. (AVTC Mainz) und Prof. Dr. (Humangenetik Bonn) für die Unterstützung der Studie.

Mein Dank gilt besonders unseren Kooperationspartnern:

- Herrn Univ.-Prof. Dr. und Frau Dr. , Institut für Humangenetik der Uniklinik Bonn für die Durchführung der molekularen Typisierung und Replikationsanalyse.
- Herrn Prof. Dr. und Frau Dr. , MPI für Psychiatrie München für die Durchführung der biostatistischen Analysen.
- Herrn Prof. Dr. und Herrn Dr. , Institut für Pathologie des Klinikums Bayreuth für die Zusammenarbeit und Verifizierung der histopathologischen Befunde.
- Herrn Prof. Dr. , Klinik Innere Medizin II der HSK Wiesbaden für die Zusammenarbeit bei der Rekrutierung von Patienten.
- Herrn Prof. , Fred Hutchinson Cancer Centers, University of Washington, USA, für die Überlassung der statistisch assoziierten SNP-Marker seiner Analyse für die Replikationsanalysen.
- Prof. Dr. , Institut für Experimentelle Hämatologie und Transfusionsmedizin (IHT), Universitätsklinikum Bonn für die Unterstützung bei der Etablierung einer Kontrollgruppe
- Nicht zuletzt allen Patienten und Kontrollen für die Teilnahme an der Studie

Ich danke allen Doktoranden-Kolleginnen und Kollegen der Vorgruppe, meiner Gruppe und Folgegruppe für die Zusammenarbeit und den Austausch.

7. Literaturverzeichnis

1. Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sorensen HT, Funch-Jensen P. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *N Engl J Med*. 2011;365(15):1375-83.
2. Sikkema M, de Jonge PJ, Steyerberg EW, Kuipers EJ. Risk of esophageal adenocarcinoma and mortality in patients with Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010;8(3):235-44; quiz e32.
3. Yousef F. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol*. 2008;168:237-49.
4. Thomas T, Abrams KR, De Caestecker JS, Robinson RJ. Meta analysis: Cancer risk in Barrett's oesophagus. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007;26(11-12):1465-77.
5. Chang EY, Morris CD, Seltman AK, O'Rourke RW, Chan BK, Hunter JG, *et al*. The effect of antireflux surgery on esophageal carcinogenesis in patients with barrett esophagus: a systematic review. *Ann Surg*. 2007;246(1):11-21.
6. Brown LM, Devesa SS, Chow WH. Incidence of adenocarcinoma of the esophagus among white Americans by sex, stage, and age. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(16):1184-7.
7. Hur C, Miller M, Kong CY, Dowling EC, Nattinger KJ, Dunn M, *et al*. Trends in esophageal adenocarcinoma incidence and mortality. *Cancer*. 2013;119(6):1149-58.
8. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 1999;340(11):825-31.
9. Farrow DC, Vaughan TL, Sweeney C, Gammon MD, Chow WH, Risch HA, *et al*. Gastroesophageal reflux disease, use of H2 receptor antagonists, and risk of esophageal and gastric cancer. *Cancer Causes Control*. 2000;11(3):231-8.
10. Thrift AP. The epidemic of oesophageal carcinoma: Where are we now? *Cancer Epidemiology*. 2016;41:88-95.
11. Holmes RS, Vaughan TL. Epidemiology and pathogenesis of esophageal cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2007;17(1):2-9.
12. SEER Cancer Stat Facts: Esophageal Cancer. Bethesda, MD: National Cancer Institute; [Available from: <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/esoph.html>].
13. Palles C, Chegwidden L, Li X, Findlay JM, Farnham G, Castro Giner F, *et al*. Polymorphisms near TBX5 and GDF7 are associated with increased risk for Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 2015;148(2):367-78.
14. Levine DM, Ek WE, Zhang R, Liu X, Onstad L, Sather C, *et al*. A genome-wide association study identifies new susceptibility loci for esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Nat Genet*. 2013;45(12):1487-93.
15. Su Z, Gay LJ, Strange A, Palles C, Band G, Whiteman DC, *et al*. Common variants at the MHC locus and at chromosome 16q24.1 predispose to Barrett's esophagus. *Nat Genet*. 2012;44(10):1131-6.
16. Buselmaier W, Tariverdian G. *Humangenetik*. 4 ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2007.
17. Schaaf CP, Zschocke J. *Basiswissen Humangenetik*. 2 ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2013.
18. Kruglyak L, Nickerson DA. Variation is the spice of life. *Nat Genet*. 2001;27(3):234-6.

19. Reich DE, Gabriel SB, Altshuler D. Quality and completeness of SNP databases. *Nature genetics*. 2003;33(4):457-8.
20. The International HapMap C, Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, *et al*. A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature*. 2007;449:851.
21. Becker J. Lese- und Rechtschreibstörung: Untersuchungen zur genetischen Ursache und funktionelle Aufarbeitung des DYX2-Locus [Diplomarbeit]: Universität Bonn; 2008.
22. Jeffreys AJ, Kauppi L, Neumann R. Intensely punctate meiotic recombination in the class II region of the major histocompatibility complex. *Nat Genet*. 2001;29(2):217-22.
23. †The International HapMap C, Gibbs RA, Belmont JW, Hardenbol P, Willis TD, Yu F, *et al*. The International HapMap Project. *Nature*. 2003;426:789.
24. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *Jama*. 2008;299(11):1335-44.
25. Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. *Br J Surg*. 1950;38(150):175-82.
26. Vakil N, van Zanten SV, Kahrilas P, Dent J, Jones R. The Montreal definition and classification of gastroesophageal reflux disease: a global evidence-based consensus. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(8):1900-20; quiz 43.
27. Sharma P, Dent J, Armstrong D, Bergman JJ, Gossner L, Hoshihara Y, *et al*. The development and validation of an endoscopic grading system for Barrett's esophagus: the Prague C & M criteria. *Gastroenterology*. 2006;131(5):1392-9.
28. Orlando RC. Mucosal Defense in Barrett's Esophagus. *Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma*: Blackwell Publishing Ltd; 2007. p. 60-72.
29. Burke ZD, Tosh D. Barrett's metaplasia as a paradigm for understanding the development of cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2012;22(5):494-9.
30. Veits L, Drgac J, Neumann H, Langner C, Vieth M. Barrett-Ösophagus und -Neoplasie am ösophagogastralen Übergang: Ein Leitfaden für die Routine. *Viszeralmedizin*. 2012;28(2):103-12.
31. Playford RJ. New British Society of Gastroenterology (BSG) guidelines for the diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *Gut*. 2006;55(4):442.
32. Riddell RH, Odze RD. Definition of Barrett's esophagus: time for a rethink--is intestinal metaplasia dead? *Am J Gastroenterol*. 2009;104(10):2588-94.
33. Reid BJ, Li X, Galipeau PC, Vaughan TL. Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. *Nat Rev Cancer*. 2010;10(2):87-101.
34. Labenz J, Koop H, Tannapfel A, Kiesslich R, Holscher AH. The epidemiology, diagnosis, and treatment of Barrett's carcinoma. *Dtsch Arztebl Int*. 2015;112(13):224-33; quiz 34.
35. Krugmann J, Vieth M, Neumann H. [Barrett's neoplasia: where is the problem?]. *Zentralbl Chir*. 2014;139(4):386-92.
36. Labenz J. [Barrett's esophagus]. *Internist (Berl)*. 2016;57(11):1079-92.
37. Tobey NA, Argote CM, Vanegas XC, Barlow W, Orlando RC. Electrical parameters and ion species for active transport in human esophageal stratified squamous epithelium and Barrett's specialized columnar epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;293(1):G264-70.

38. Dixon J, Strugala V, Griffin SM, Welfare MR, Dettmar PW, Allen A, *et al.* Esophageal mucin: an adherent mucus gel barrier is absent in the normal esophagus but present in columnar-lined Barrett's esophagus. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(9):2575-83.
39. Jovov B, Van Itallie CM, Shaheen NJ, Carson JL, Gambling TM, Anderson JM, *et al.* Claudin-18: a dominant tight junction protein in Barrett's esophagus and likely contributor to its acid resistance. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007;293(6):G1106-13.
40. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, *et al.* Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer.* 2015;136(5):E359-86.
41. Polednak AP. Trends in survival for both histologic types of esophageal cancer in US surveillance, epidemiology and end results areas. *Int J Cancer.* 2003;105:98-100.
42. Bollschweiler E, Wolfgarten E, Gutschow C, Holscher AH. Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer.* 2001;92(3):549-55.
43. Pohl H, Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(2):142-6.
44. Yousef F, Cardwell C, Cantwell MM, Galway K, Johnston BT, Murray L. The incidence of esophageal cancer and high-grade dysplasia in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Am J Epidemiol.* 2008;168(3):237-49.
45. de Jonge PJ, van Blankenstein M, Looman CW, Casparie MK, Meijer GA, Kuipers EJ. Risk of malignant progression in patients with Barrett's oesophagus: a Dutch nationwide cohort study. *Gut.* 2010;59(8):1030-6.
46. Pohl H, Wrobel K, Bojarski C, Voderholzer W, Sonnenberg A, Rosch T, *et al.* Risk factors in the development of esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2013;108(2):200-7.
47. Runge TM, Abrams JA, Shaheen NJ. Epidemiology of Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterol Clin North Am.* 2015;44(2):203-31.
48. Bhat S, Coleman HG, Yousef F, Johnston BT, McManus DT, Gavin AT, *et al.* Risk of malignant progression in Barrett's esophagus patients: results from a large population-based study. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103(13):1049-57.
49. Pohl H, Pech O, Arash H, Stolte M, Manner H, May A, *et al.* Length of Barrett's oesophagus and cancer risk: implications from a large sample of patients with early oesophageal adenocarcinoma. *Gut.* 2016;65(2):196-201.
50. Masclee GM, Coloma PM, de Wilde M, Kuipers EJ, Sturkenboom MC. The incidence of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma in the United Kingdom and The Netherlands is levelling off. *Aliment Pharmacol Ther.* 2014;39(11):1321-30.
51. Thrift AP, Whiteman DC. The incidence of esophageal adenocarcinoma continues to rise: analysis of period and birth cohort effects on recent trends. *Ann Oncol.* 2012;23(12):3155-62.
52. Xie S-H, Mattsson F, Lagergren J. Incidence trends in oesophageal cancer by histological type: An updated analysis in Sweden. *Cancer Epidemiology.* 2017;47:114-7.
53. Fernandes ML, Seow A, Chan YH, Ho KY. Opposing trends in incidence of esophageal squamous cell carcinoma and adenocarcinoma in a multi-ethnic Asian country. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:1430-6.
54. Shibata A, Matsuda T, Ajiki W, Sobue T. Trend in incidence of adenocarcinoma of the esophagus in Japan, 1993-2001. *Jpn J Clin Oncol.* 2008;38:464-8.

55. Haghdoost AA. Rising incidence of adenocarcinoma of the esophagus in Kerman, Iran. *Arch Iran Med.* 2008;11:364-70.
56. Ronkainen J, Aro P, Storskrubb T, Johansson SE, Lind T, Bolling-Sternevald E, *et al.* Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study. *Gastroenterology.* 2005;129(6):1825-31.
57. Everhart C, Holtzapple P, Humphries T. Occurrence of Barrett's esophagus in three members of the same family: first report of familial incidence. *Gastroenterology.* 1978.
58. Gelfand MD. Barrett esophagus in sexagenarian identical twins. *J Clin Gastroenterol.* 1983;5(3):251-3.
59. Crabb DW, Berk MA, Hall TR, Conneally PM, Biegel AA, Lehman GA. Familial gastroesophageal reflux and development of Barrett's esophagus. *Ann Intern Med.* 1985;103(1):52-4.
60. Jochem VJ, Fuerst PA, Fromkes JJ. Familial Barrett's esophagus associated with adenocarcinoma. *Gastroenterology.* 1992;102(4 Pt 1):1400-2.
61. Eng C, Spechler SJ, Ruben R, Li FP. Familial Barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1993;2(4):397-9.
62. Chak A, Lee T, Kinnard MF, Brock W, Faulx A, Willis J, *et al.* Familial aggregation of Barrett's oesophagus, oesophageal adenocarcinoma, and oesophagogastric junctional adenocarcinoma in Caucasian adults. *Gut.* 2002;51(3):323-8.
63. Chak A, Faulx A, Kinnard M, Brock W, Willis J, Wiesner GL, *et al.* Identification of Barrett's esophagus in relatives by endoscopic screening. *Am J Gastroenterol.* 2004;99(11):2107-14.
64. Drovdic CM, Goddard KA, Chak A, Brock W, Chessler L, King JF, *et al.* Demographic and phenotypic features of 70 families segregating Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *J Med Genet.* 2003;40(9):651-6.
65. Chak A. Familiality in Barrett's esophagus, adenocarcinoma of the esophagus, and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:1668-73.
66. Verbeek RE, Spittuler LF, Peute A, van Oijen MG, Ten Kate FJ, Vermeijden JR, *et al.* Familial clustering of Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma in a European cohort. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014;12(10):1656-63.e1.
67. Chak A, Chen Y, Vengoechea J, Canto MI, Elston R, Falk GW, *et al.* Variation in Age at Cancer Diagnosis in Familial versus Nonfamilial Barrett's Esophagus. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2012;21(2):376.
68. Casson AG, Zheng Z, Evans SC, Geldenhuys L, van Zanten SV, Veugelers PJ, *et al.* Cyclin D1 polymorphism (G870A) and risk for esophageal adenocarcinoma. *Cancer.* 2005;104(4):730-9.
69. Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Minireview: Cyclin D1: Normal and Abnormal Functions. *Endocrinology.* 2004;145(12):5439-47.
70. Hosokawa Y, Arnold A. Mechanism of cyclin D1 (CCND1, PRAD1) overexpression in human cancer cells: analysis of allele-specific expression. *Genes Chromosomes Cancer.* 1998;22(1):66-71.
71. Tse D, Zhai R, Zhou W, Heist RS, Asomaning K, Su L, *et al.* Polymorphisms of the NER pathway genes, ERCC1 and XPD are associated with esophageal adenocarcinoma risk. *Cancer Causes Control.* 2008;19(10):1077-83.
72. Ferguson HR, Wild CP, Anderson LA, Murphy SJ, Johnston BT, Murray LJ, *et al.* No association between hOGG1, XRCC1, and XPD polymorphisms and risk of reflux esophagitis, Barrett's esophagus,

or esophageal adenocarcinoma: results from the factors influencing the Barrett's adenocarcinoma relationship case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(3):736-9.

73. Doecke J, Zhao ZZ, Pandeya N, Sadeghi S, Stark M, Green AC, *et al.* Polymorphisms in MGMT and DNA repair genes and the risk of esophageal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 2008;123(1):174-80.

74. Kaina B, Christmann M, Naumann S, Roos WP. MGMT: key node in the battle against genotoxicity, carcinogenicity and apoptosis induced by alkylating agents. *DNA Repair (Amst).* 2007;6(8):1079-99.

75. Chao DL. Mutagen sensitivity and neoplastic progression in patients with Barrett's esophagus: a prospective analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:1935-40.

76. Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res.* 1998;58(14):2929-34.

77. Wang D, Mann JR, DuBois RN. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 2005;128(5):1445-61.

78. Lala PK, Chakraborty C. Role of nitric oxide in carcinogenesis and tumour progression. *Lancet Oncol.* 2001;2(3):149-56.

79. Ferguson HR, Wild CP, Anderson LA, Murphy SJ, Johnston BT, Murray LJ, *et al.* Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase gene polymorphisms and risk of reflux esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2008;17(3):727-31.

80. Abbas A, Delvinquiere K, Lechevrel M, Lebailly P, Gauduchon P, Launoy G, *et al.* GSTM1, GSTT1, GSTP1 and CYP1A1 genetic polymorphisms and susceptibility to esophageal cancer in a French population: different pattern of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma. *World J Gastroenterol.* 2004;10(23):3389-93.

81. Jain M, Kumar S, Rastogi N, Lal P, Ghoshal UC, Tiwari A, *et al.* GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India. *Cancer Lett.* 2006;242(1):60-7.

82. Wideroff L, Vaughan TL, Farin FM, Gammon MD, Risch H, Stanford JL, *et al.* GST, NAT1, CYP1A1 polymorphisms and risk of esophageal and gastric adenocarcinomas. *Cancer Detect Prev.* 2007;31(3):233-6.

83. van Lieshout EM, Roelofs HM, Dekker S, Mulder CJ, Wobbes T, Jansen JB, *et al.* Polymorphic expression of the glutathione S-transferase P1 gene and its susceptibility to Barrett's esophagus and esophageal carcinoma. *Cancer Res.* 1999;59(3):586-9.

84. Terry MB, Gammon MD, Zhang FF, Vaughan TL, Chow WH, Risch HA, *et al.* Alcohol dehydrogenase 3 and risk of esophageal and gastric adenocarcinomas. *Cancer Causes Control.* 2007;18(9):1039-46.

85. Smith MT. Benzene, NQO1, and genetic susceptibility to cancer. 1999;96(14):7624-6.

86. di Martino E, Hardie LJ, Wild CP, Gong YY, Olliver JR, Gough MD, *et al.* The NAD(P)H:quinone oxidoreductase I C609T polymorphism modifies the risk of Barrett esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics.* 2007;9(6):341-7.

87. Casson AG, Zheng Z, Chiasson D, MacDonald K, Riddell DC, Guernsey JR, *et al.* Associations between genetic polymorphisms of Phase I and II metabolizing enzymes, p53 and susceptibility to esophageal adenocarcinoma. *Cancer Detect Prev.* 2003;27(2):139-46.

88. El-Omar EM, Rabkin CS, Gammon MD, Vaughan TL, Risch HA, Schoenberg JB, *et al.* Increased risk of noncardia gastric cancer associated with proinflammatory cytokine gene polymorphisms. *Gastroenterology*. 2003;124(5):1193-201.
89. Sarbia M, Bitzer M, Siegel D, Ross D, Schulz WA, Zotz RB, *et al.* Association between NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 (NQO1) inactivating C609T polymorphism and adenocarcinoma of the upper gastrointestinal tract. *Int J Cancer*. 2003;107(3):381-6.
90. Casson AG. Polymorphisms in DNA repair genes in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2005;26:1536-41.
91. Geddert H, Kiel S, Zotz RB, Zhang J, Willers R, Gabbert HE, *et al.* Polymorphism of p16 INK4A and cyclin D1 in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(12):803-8.
92. von Rahden BHA, Stein HJ, Langer R, von Weyhern CW, Schenk E, Döring C, *et al.* C609T polymorphism of the NAD(P)H:quinone oxidoreductase I gene does not significantly affect susceptibility for esophageal adenocarcinoma. *International Journal of Cancer*. 2005;113(3):506-8.
93. Ye W, Kumar R, Bacova G, Lagergren J, Hemminki K, Nyren O. The XPD 751Gln allele is associated with an increased risk for esophageal adenocarcinoma: a population-based case-control study in Sweden. *Carcinogenesis*. 2006;27(9):1835-41.
94. Jain M, Kumar S, Lal P, Tiwari A, Ghoshal UC, Mittal B. Role of GSTM3 polymorphism in the risk of developing esophageal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16(1):178-81.
95. Moons LM, Kuipers EJ, Rygiel AM, Groothuisink AZ, Geldof H, Bode WA, *et al.* COX-2 CA-haplotype is a risk factor for the development of esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol*. 2007;102(11):2373-9.
96. Murphy SJ, Hughes AE, Patterson CC, Anderson LA, Watson RG, Johnston BT, *et al.* A population-based association study of SNPs of GSTP1, MnSOD, GPX2 and Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Carcinogenesis*. 2007;28(6):1323-8.
97. Lanuti M, Liu G, Goodwin JM, Zhai R, Fuchs BC, Asomaning K, *et al.* A functional epidermal growth factor (EGF) polymorphism, EGF serum levels, and esophageal adenocarcinoma risk and outcome. *Clin Cancer Res*. 2008;14(10):3216-22.
98. Mahlapuu M, Ormestad M, Enerback S, Carlsson P. The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extra-embryonic and lateral plate mesoderm. *Development*. 2001;128(2):155-66.
99. Martin V, Shaw-Smith C. Review of genetic factors in intestinal malrotation. *Pediatr Surg Int*. 2010;26(8):769-81.
100. Stankiewicz P, Sen P, Bhatt SS, Storer M, Xia Z, Bejjani BA, *et al.* Genomic and Genic Deletions of the FOX Gene Cluster on 16q24.1 and Inactivating Mutations of FOXF1 Cause Alveolar Capillary Dysplasia and Other Malformations. *The American Journal of Human Genetics*. 2009;84(6):780-91.
101. Mahlapuu M, Enerback S, Carlsson P. Haploinsufficiency of the forkhead gene Foxf1, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations. *Development*. 2001;128(12):2397-406.
102. de Bakker PI, McVean G, Sabeti PC, Miretti MM, Green T, Marchini J, *et al.* A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat Genet*. 2006;38(10):1166-72.

103. Dura P, van Veen EM, Salomon J, te Morsche RH, Roelofs HM, Kristinsson JO, *et al.* Barrett associated MHC and FOXF1 variants also increase esophageal carcinoma risk. *Int J Cancer.* 2013;133(7):1751-5.
104. Gu Y, Lin S, Li JL, Nakagawa H, Chen Z, Jin B, *et al.* Altered LKB1/CREB-regulated transcription co-activator (CRTC) signaling axis promotes esophageal cancer cell migration and invasion. *Oncogene.* 2012;31(4):469-79.
105. Shu W, Lu MM, Zhang Y, Tucker PW, Zhou D, Morrisey EE. Foxp2 and Foxp1 cooperatively regulate lung and esophagus development. *Development.* 2007;134(10):1991-2000.
106. Hu H, Wang B, Borde M, Nardone J, Maika S, Allred L, *et al.* Foxp1 is an essential transcriptional regulator of B cell development. *Nat Immunol.* 2006;7(8):819-26.
107. Seizinger BR, Klinger HP, Junien C, Nakamura Y, Le Beau M, Cavenee W, *et al.* Report of the committee on chromosome and gene loss in human neoplasia. *Cytogenetic and Genome Research.* 1991;58(3-4):1080-96.
108. Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene.* 2002;21(45):6915-35.
109. Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Adv Cancer Res.* 1997;71:27-92.
110. Huebner K. Tumor suppressors on 3p: a neoclassic quartet. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(26):14763-5.
111. Koon HB, Ippolito GC, Banham AH, Tucker PW. FOXP1: a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 2007;11(7):955-65.
112. Xiao J, He B, Zou Y, Chen X, Lu X, Xie M, *et al.* Prognostic value of decreased FOXP1 protein expression in various tumors: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2016;6:30437.
113. Banham AH, Beasley N, Campo E, Fernandez PL, Fidler C, Gatter K, *et al.* The FOXP1 Winged Helix Transcription Factor Is a Novel Candidate Tumor Suppressor Gene on Chromosome 3p. *Cancer Research.* 2001;61(24):8820-9.
114. Woo J, Miletich I, Kim BM, Sharpe PT, Shivdasani RA. Barx1-mediated inhibition of Wnt signaling in the mouse thoracic foregut controls tracheo-esophageal septation and epithelial differentiation. *PLoS One.* 2011;6(7):e22493.
115. Pavlov K, Meijer C, van den Berg A, Peters FT, Kruyt FA, Kleibeuker JH. Embryological signaling pathways in Barrett's metaplasia development and malignant transformation; mechanisms and therapeutic opportunities. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2014;92(1):25-37.
116. Que J, Choi M, Ziel JW, Klingensmith J, Hogan BLM. Morphogenesis of the trachea and esophagus: current players and new roles for noggin and Bmps. *Differentiation.* 2006;74(7):422-37.
117. Arora R, Metzger RJ, Papaioannou VE. Multiple roles and interactions of Tbx4 and Tbx5 in development of the respiratory system. *PLoS Genet.* 2012;8(8):e1002866.
118. Gyamfi MA, Kocsis MG, He L, Dai G, Mendy AJ, Wan Y-JY. The Role of Retinoid X Receptor α in Regulating Alcohol Metabolism. 2006;319(1):360-8.
119. Freedman ND, Murray LJ, Kamangar F, Abnet CC, Cook MB, Nyren O, *et al.* Alcohol intake and risk of oesophageal adenocarcinoma: a pooled analysis from the BEACON Consortium. *Gut.* 2011;60(8):1029-37.
120. Rhinn M, Dolle P. Retinoic acid signalling during development. *Development.* 2012;139(5):843-58.

121. Ek WE, Levine DM, D'Amato M, Pedersen NL, Magnusson PK, Bresso F, *et al.* Germline genetic contributions to risk for esophageal adenocarcinoma, Barrett's esophagus, and gastroesophageal reflux. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(22):1711-8.
122. Palles C, Findlay JM, Tomlinson I. Common Variants Confer Susceptibility to Barrett's Esophagus: Insights from the First Genome-Wide Association Studies. *Adv Exp Med Biol.* 2016;908:265-90.
123. Farré R, van Malenstein H, De Vos R, Geboes K, Depoortere I, Vanden Berghe P, *et al.* Short exposure of oesophageal mucosa to bile acids, both in acidic and weakly acidic conditions, can impair mucosal integrity and provoke dilated intercellular spaces. 2008;57(10):1366-74.
124. Gutschow CA, Bludau M, Vallböhmer D, Schröder W, Bollschweiler E, Hölscher AHJDD, *et al.* NERD, GERD, and Barrett's Esophagus: Role of Acid and Non-acid Reflux Revisited with Combined pH-Impedance Monitoring. 2008;53(12):3076.
125. Abdel-Latif MM, Duggan S, Reynolds JV, Kelleher D. Inflammation and esophageal carcinogenesis. *Curr Opin Pharmacol.* 2009;9(4):396-404.
126. Kavanagh ME, O'Sullivan KE, O'Hanlon C, O'Sullivan JN, Lysaght J, Reynolds JV. The esophagitis to adenocarcinoma sequence; the role of inflammation. *Cancer Lett.* 2014;345(2):182-9.
127. Elwood PC, Gallagher AM, Duthie GG, Mur LA, Morgan G. Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet.* 2009;373(9671):1301-9.
128. Wang DH, Souza RF. Transcommitment: Paving the Way to Barrett's Metaplasia. In: Jansen M, Wright NA, editors. *Stem Cells, Pre-neoplasia, and Early Cancer of the Upper Gastrointestinal Tract.* Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 183-212.
129. Zhang W, Wang DH. Origins of Metaplasia in Barrett's Esophagus: Is this an Esophageal Stem or Progenitor Cell Disease? *Dig Dis Sci.* 2018;63(8):2005-12.
130. Eberhard D, Tosh D. Transdifferentiation and metaplasia as a paradigm for understanding development and disease. *Cell Mol Life Sci.* 2008;65(1):33-40.
131. Stairs DB, Nakagawa H, Klein-Szanto A, Mitchell SD, Silberg DG, Tobias JW, *et al.* Cdx1 and c-Myc foster the initiation of transdifferentiation of the normal esophageal squamous epithelium toward Barrett's esophagus. *PLoS One.* 2008;3(10):e3534.
132. Gillen P, Keeling P, Byrne PJ, West AB, Hennessy TP. Experimental columnar metaplasia in the canine oesophagus. *Br J Surg.* 1988;75(2):113-5.
133. Sarosi G, Brown G, Jaiswal K, Feagins LA, Lee E, Crook TW, *et al.* Bone marrow progenitor cells contribute to esophageal regeneration and metaplasia in a rat model of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus.* 2008;21(1):43-50.
134. Quante M, Bhagat G, Abrams JA, Marache F, Good P, Lee MD, *et al.* Bile acid and inflammation activate gastric cardia stem cells in a mouse model of Barrett-like metaplasia. *Cancer Cell.* 2012;21(1):36-51.
135. Wang X, Ouyang H, Yamamoto Y, Kumar PA, Wei TS, Dagher R, *et al.* Residual embryonic cells as precursors of a Barrett's-like metaplasia. *Cell.* 2011;145(7):1023-35.
136. Kapoor H, Agrawal DK, Mittal SK. Barrett's esophagus: recent insights into pathogenesis and cellular ontogeny. *Transl Res.* 2015;166(1):28-40.
137. Souza RF. Reflux esophagitis and its role in the pathogenesis of Barrett's metaplasia. *Journal of Gastroenterology.* 2017;52(7):767-76.

138. Clemons NJ, Phillips WA, Lord RV. Signaling pathways in the molecular pathogenesis of adenocarcinomas of the esophagus and gastroesophageal junction. *Cancer Biology & Therapy*. 2013;14(9):782-95.
139. Wang DH, Clemons NJ, Miyashita T, Dupuy AJ, Zhang W, Szczepny A, *et al*. Aberrant epithelial-mesenchymal Hedgehog signaling characterizes Barrett's metaplasia. *Gastroenterology*. 2010;138(5):1810-22.
140. Wang DH, Tiwari A, Kim ME, Clemons NJ, Regmi NL, Hodges WA, *et al*. Hedgehog signaling regulates FOXA2 in esophageal embryogenesis and Barrett's metaplasia. *J Clin Invest*. 2014;124(9):3767-80.
141. Abdel-Latif MMM, Kelleher D, Reynolds JV. Potential Role of NF- κ B in Esophageal Adenocarcinoma: As an Emerging Molecular Target. *Journal of Surgical Research*. 2009;153(1):172-80.
142. Zagorowicz E, Jankowski J. Molecular changes in the progression of Barrett's oesophagus. 2007;83(982):529-35.
143. Eda A, Osawa H, Yanaka I, Satoh K, Mutoh H, Kihira K, *et al*. Expression of homeobox gene CDX2 precedes that of CDX1 during the progression of intestinal metaplasia. 2002;37(2):94-100.
144. Zhou G, Sun Y-G, Wang H-B, Wang W-Q, Wang X-W, Fang D-C. Acid and bile salt up-regulate BMP4 expression in human esophageal epithelium cells. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*. 2009;44(8):926-32.
145. Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam K-T, Kurotani R, Morrissey EE, *et al*. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. *Development*. 2007;134(13):2521-31.
146. Watanabe H, Ma Q, Peng S, Adelmant G, Swain D, Song W, *et al*. SOX2 and p63 colocalize at genetic loci in squamous cell carcinomas. *The Journal of Clinical Investigation*. 2014;124(4):1636-45.
147. van Olphen S, Biermann K, Spaander MCW, Kastelein F, Steyerberg EW, Stoop HA, *et al*. SOX2 as a Novel Marker to Predict Neoplastic Progression in Barrett's Esophagus. *American Journal of Gastroenterology*. 2015;110(10):1420-8.
148. Moyes LH, McEwan H, Radulescu S, Pawlikowski J, Lamm CG, Nixon C, *et al*. Activation of Wnt signalling promotes development of dysplasia in Barrett's oesophagus. *J Pathol*. 2012;228(1):99-112.
149. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002;420(6917):860-7.
150. Zagorowicz E, Jankowski J. Molecular changes in the progression of Barrett's oesophagus. *Postgrad Med J*. 2007;83(982):529-35.
151. Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
152. Wilson KT, Fu S, Ramanujam KS, Meltzer SJ. Increased Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase-2 in Barrett's Esophagus and Associated Adenocarcinomas. *Cancer Research*. 1998;58(14):2929-34.
153. Sihvo EI, Salminen JT, Rantanen TK, Ramo OJ, Ahotupa M, Farkkila M, *et al*. Oxidative stress has a role in malignant transformation in Barrett's oesophagus. *Int J Cancer*. 2002;102(6):551-5.
154. Prins MJ, Verhage RJ, ten Kate FJ, van Hillegersberg R. Cyclooxygenase isoenzyme-2 and vascular endothelial growth factor are associated with poor prognosis in esophageal adenocarcinoma. *J Gastrointest Surg*. 2012;16(5):956-66.

155. Tselepis C, Perry I, Dawson C, Hardy R, Darnton SJ, McConkey C, *et al.* Tumour necrosis factor- α in Barrett's oesophagus: a potential novel mechanism of action. *Oncogene*. 2002;21:6071.
156. Farhadi A, Fields J, Banan A, Keshavarzian A. Reactive oxygen species: are they involved in the pathogenesis of GERD, Barrett's esophagus, and the latter's progression toward esophageal cancer? *The American Journal of Gastroenterology*. 2002;97(1):22-6.
157. Lysaght J, van der Stok EP, Allott EH, Casey R, Donohoe CL, Howard JM, *et al.* Pro-inflammatory and tumour proliferative properties of excess visceral adipose tissue. *Cancer Letters*. 2011;312(1):62-72.
158. Kohata Y, Fujiwara Y, Machida H, Okazaki H, Yamagami H, Tanigawa T, *et al.* Role of Th-2 cytokines in the development of Barrett's esophagus in rats. 2011;46(7):883-93.
159. Solinas G. Molecular pathways linking metabolic inflammation and thermogenesis. 2012;13(S2):69-82.
160. Alexandre L, Long E, Beales IL. Pathophysiological mechanisms linking obesity and esophageal adenocarcinoma. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 2014;5(4):534-49.
161. Kendall BJ. Leptin and the risk of Barrett's oesophagus. *Gut*. 2008;57:448-54.
162. Duggan C, Onstad L, Hardikar S, Blount PL, Reid BJ, Vaughan TL. Association between markers of obesity and progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2013;11(8):934-43.
163. Doyle SL, Donohoe CL, Finn SP, Howard JM, Lithander FE, Reynolds JV, *et al.* IGF-1 and its receptor in esophageal cancer: association with adenocarcinoma and visceral obesity. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(2):196-204.
164. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
165. Nowell P. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976;194(4260):23-8.
166. Li X, Galipeau PC, Sanchez CA, Blount PL, Maley CC, Arnaudo J, *et al.* Single nucleotide polymorphism-based genome-wide chromosome copy change, loss of heterozygosity, and aneuploidy in BE neoplastic progression. *Can Prev Res*. 2008;1:413-23.
167. Maley CC. Selectively advantageous mutations and hitchhikers in neoplasms: p16 lesions are selected in Barrett's esophagus. *Cancer Res*. 2004;64:3414-27.
168. Bani-Hani K, Martin IG, Hardie LJ, Mapstone N, Briggs JA, Forman D, *et al.* Prospective study of cyclin D1 overexpression in Barrett's esophagus: association with increased risk of adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92(16):1316-21.
169. Surget S, Khoury MP, Bourdon J-C. Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective. *OncoTargets and therapy*. 2013;7:57-68.
170. Kwak EL, Jankowski J, Thayer SP, Lauwers GY, Brannigan BW, Harris PL, *et al.* Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations in esophageal and pancreatic adenocarcinomas. *Clin Cancer Res*. 2006;12(14 Pt 1):4283-7.
171. Gowryshankar A, Nagaraja V, Eslick GD. HER2 status in Barrett's esophagus & esophageal cancer: a meta analysis. *J Gastrointest Oncol*. 2014;5(1):25-35.
172. Langer R, Rauser S, Feith M, Nahrig JM, Feuchtinger A, Friess H, *et al.* Assessment of ErbB2 (Her2) in oesophageal adenocarcinomas: summary of a revised immunohistochemical evaluation system, bright field double in situ hybridisation and fluorescence in situ hybridisation. *Mod Pathol*. 2011;24(7):908-16.

173. Wei Q, Chen L, Sheng L, Nordgren H, Wester K, Carlsson J. EGFR, HER2 and HER3 expression in esophageal primary tumours and corresponding metastases. *Int J Oncol.* 2007;31(3):493-9.
174. Reid BJ, Levine DS, Longton G, Blount PL, Rabinovitch PS. Predictors of progression to cancer in Barrett's esophagus: baseline histology and flow cytometry identify low- and high-risk patient subsets. *Am J Gastroenterol.* 2000;95:1669-76.
175. Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet.* 2002;360(9345):1587-9.
176. Reid BJ, Prevo LJ, Galipeau PC, Sanchez CA, Longton G, Levine DS, *et al.* Predictors of progression in Barrett's esophagus II: baseline 17p (p53) loss of heterozygosity identifies a patient subset at increased risk for neoplastic progression. *Am J Gastroenterol.* 2001;96(10):2839-48.
177. Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer.* 1997;33(5):787-91.
178. Morales CP, Lee EL, Shay JW. In situ hybridization for the detection of telomerase RNA in the progression from Barrett's esophagus to esophageal adenocarcinoma. *Cancer.* 1998;83(4):652-9.
179. Swami S, Kumble S, Triadafilopoulos G. E-cadherin expression in gastroesophageal reflux disease, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma: an immunohistochemical and immunoblot study. *Am J Gastroenterol.* 1995;90(10):1808-13.
180. Bailey T, Biddlestone L, Shepherd N, Barr H, Warner P, Jankowski J. Altered cadherin and catenin complexes in the Barrett's esophagus-dysplasia-adenocarcinoma sequence: correlation with disease progression and dedifferentiation. *The American journal of pathology.* 1998;152(1):135-44.
181. Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, *et al.* Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(2):548-53.
182. Couvelard A, Paraf F, Gratio V, Scoazec JY, Henin D, Degott C, *et al.* Angiogenesis in the neoplastic sequence of Barrett's oesophagus. Correlation with VEGF expression. *J Pathol.* 2000;192(1):14-8.
183. Kleespies A, Bruns CJ, Jauch KW. Clinical significance of VEGF-A, -C and -D expression in esophageal malignancies. *Onkologie.* 2005;28(5):281-8.
184. Smith E. Similarity of aberrant DNA methylation in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma. *Mol Cancer.* 2008;7:75.
185. Kaz AM, Wong C-J, Varadan V, Willis JE, Chak A, Grady WM. Global DNA methylation patterns in Barrett's esophagus, dysplastic Barrett's, and esophageal adenocarcinoma are associated with BMI, gender, and tobacco use. *Clinical Epigenetics.* 2016;8(1):111.
186. Spechler SJ, Souza RF. Barrett's esophagus. *N Engl J Med.* 2014;371(9):836-45.
187. Cook MB, Chow WH, Devesa SS. Oesophageal cancer incidence in the United States by race, sex, and histologic type, 1977-2005. *Br J Cancer.* 2009;101(5):855-9.
188. Munitiz V, Parrilla P, Ortiz A, Martinez-de-Haro LF, Yelamos J, Molina J. High risk of malignancy in familial Barrett's esophagus: presentation of one family. *J Clin Gastroenterol.* 2008;42(7):806-9.
189. Bytzer P, Christensen PB, Damkier P, Vinding K, Seersholm N. Adenocarcinoma of the esophagus and Barrett's esophagus: a population-based study. *Am J Gastroenterol.* 1999;94(1):86-91.
190. Corley DA, Levin TR, Habel LA, Weiss NS, Buffler PA. Surveillance and survival in Barrett's adenocarcinomas: a population-based study. *Gastroenterology.* 2002;122(3):633-40.

191. Verbeek RE, Leenders M, Ten Kate FJ, van Hillegersberg R, Vleggaar FP, van Baal JW, *et al.* Surveillance of Barrett's esophagus and mortality from esophageal adenocarcinoma: a population-based cohort study. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(8):1215-22.
192. Coleman HG, Bhat SK, Murray LJ, McManus DT, O'Neill OM, Gavin AT, *et al.* Symptoms and endoscopic features at barrett's esophagus diagnosis: implications for neoplastic progression risk. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(4):527-34.
193. Avidan B, Sonnenberg A, Schnell TG, Chejfec G, Metz A, Sontag SJ. Hiatal hernia size, Barrett's length, and severity of acid reflux are all risk factors for esophageal adenocarcinoma. *Am J Gastroenterol.* 2002;97(8):1930-6.
194. Weston AP. p53 protein overexpression in low grade dysplasia (LGD) in Barrett's esophagus: immunohistochemical marker predictive of progression. *Am J Gastroenterol.* 2001;96:1355-62.
195. Desai TK, Krishnan K, Samala N, Singh J, Cluley J, Perla S, *et al.* The incidence of oesophageal adenocarcinoma in non-dysplastic Barrett's oesophagus: a meta-analysis. *Gut.* 2012;61(7):970-6.
196. Rubenstein JH. Risk factors for Barrett's esophagus. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014;30(4):408-14.
197. Gordon C, Kang JY, Neild PJ, Maxwell JD. The role of the hiatus hernia in gastro-oesophageal reflux disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;20(7):719-32.
198. Patti MG, Goldberg HI, Arcerito M, Bortolasi L, Tong J, Way LW. Hiatal hernia size affects lower esophageal sphincter function, esophageal acid exposure, and the degree of mucosal injury. *Am J Surg.* 1996;171(1):182-6.
199. Pandolfino JE, El-Serag HB, Zhang Q, Shah N, Ghosh SK, Kahrilas PJ. Obesity: a challenge to esophagogastric junction integrity. *Gastroenterology.* 2006;130(3):639-49.
200. Singh S, Sharma AN, Murad MH, Buttar NS, El-Serag HB, Katzka DA, *et al.* Central adiposity is associated with increased risk of esophageal inflammation, metaplasia, and adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(11):1399-412.e7.
201. Hoyo C, Cook MB, Kamangar F, Freedman ND, Whiteman DC, Bernstein L, *et al.* Body mass index in relation to oesophageal and oesophagogastric junction adenocarcinomas: a pooled analysis from the International BEACON Consortium. *International Journal of Epidemiology.* 2012;41(6):1706-18.
202. Whiteman DC, Sadeghi S, Pandeya N, Smithers BM, Gotley DC, Bain CJ, *et al.* Combined effects of obesity, acid reflux and smoking on the risk of adenocarcinomas of the oesophagus. *Gut.* 2008;57(2):173-80.
203. Ogden CL. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA.* 2006;295:1549-55.
204. Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nature Rev Cancer.* 2004;4:579-91.
205. Kong CY, Nattinger KJ, Hayeck TJ, Omer ZB, Wang YC, Spechler SJ, *et al.* The Impact of Obesity on the Rise in Esophageal Adenocarcinoma Incidence: Estimates from a Disease Simulation Model. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention.* 2011;20(11):2450-6.
206. Cook MB, Kamangar F, Whiteman DC, Freedman ND, Gammon MD, Bernstein L, *et al.* Cigarette smoking and adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction: a pooled analysis from the international BEACON consortium. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(17):1344-53.
207. Coleman HG, Bhat S, Johnston BT, McManus D, Gavin AT, Murray LJ. Tobacco smoking increases the risk of high-grade dysplasia and cancer among patients with Barrett's esophagus. *Gastroenterology.* 2012;142(2):233-40.

208. Chen T, Nie S, Lu M, Yang X, Huai P. Association of *Helicobacter pylori* infection with esophageal adenocarcinoma and squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Diseases of the Esophagus*. 2014;27(7):645-53.
209. Blaser MJ. Disappearing microbiota: *helicobacter pylori* protection against esophageal adenocarcinoma. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2008;1:308-11.
210. Snider EJ, Freedberg DE, Abrams JA. Potential Role of the Microbiome in Barrett's Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Digestive Diseases and Sciences*. 2016;61(8):2217-25.
211. Liao LM, Vaughan TL, Corley DA, Cook MB, Casson AG, Kamangar F, *et al*. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use reduces risk of adenocarcinomas of the esophagus and esophagogastric junction in a pooled analysis. *Gastroenterology*. 2012;142(3):442-52.e5; quiz e22-3.
212. Rothwell PM, Fowkes FGR, Belch JFF, Ogawa H, Warlow CP, Meade TW. Effect of daily aspirin on long-term risk of death due to cancer: analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet*. 2011;377(9759):31-41.
213. Singh S, Singh AG, Singh PP, Murad MH, Iyer PG. Statins Are Associated With Reduced Risk of Esophageal Cancer, Particularly in Patients With Barrett's Esophagus: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2013;11(6):620-9.
214. Schutze M, Boeing H, Pischon T, Rehm J, Kehoe T, Gmel G, *et al*. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *Bmj*. 2011;342:d1584.
215. Dong J, Thrift AP. Alcohol, smoking and risk of oesophago-gastric cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2017;31(5):509-17.
216. Steevens J, Schouten LJ, Goldbohm RA, van den Brandt PA. Alcohol consumption, cigarette smoking and risk of subtypes of oesophageal and gastric cancer: a prospective cohort study. *Gut*. 2010;59(01):39-48.
217. Lou Z, Xing H, Li D. Alcohol consumption and the neoplastic progression in Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2014;9(10):e105612.
218. Coleman HG, Xie SH, Lagergren J. The Epidemiology of Esophageal Adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2018;154(2):390-405.
219. Kubo A, Corley DA, Jensen CD, Kaur R. Dietary factors and the risks of oesophageal adenocarcinoma and Barrett's oesophagus. *Nutrition Research Reviews*. 2010;23(2):230-46.
220. Anderson LA. Risk factors for Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: results from the FINBAR study. *World J Gastroenterol*. 2007;13:1585-94.
221. Vingeliene S, Chan DSM, Vieira AR, Polemiti E, Stevens C, Abar L, *et al*. An update of the WCRF/AICR systematic literature review and meta-analysis on dietary and anthropometric factors and esophageal cancer risk. *Ann Oncol*. 2017;28(10):2409-19.
222. Sajja KC, El-Serag HB, Thrift AP. Coffee or Tea, Hot or Cold, Are Not Associated With Risk of Barrett's Esophagus. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2016;14(5):769-72.
223. Zamora-Ros R, Luján-Barroso L, Bueno-de-Mesquita HB, Dik VK, Boeing H, Steffen A, *et al*. Tea and coffee consumption and risk of esophageal cancer: The European prospective investigation into cancer and nutrition study. *International Journal of Cancer*. 2014;135(6):1470-9.
224. Sajja KC, El-Serag HB, Thrift AP. Coffee or Tea, Hot or Cold, Are Not Associated With Risk of Barrett's Esophagus. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*. 2016;14(5):769-72.

225. Buetow KH, Edmonson M, MacDonald R, Clifford R, Yip P, Kelley J, *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/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(2):581-4.
226. Haff LA, Smirnov IP. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res.* 1997;7(4):378-88.
227. Tang K, Fu D, Kotter S, Cotter RJ, Cantor CR, Koster H. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of immobilized duplex DNA probes. *Nucleic Acids Res.* 1995;23(16):3126-31.
228. Becker J, May A, Gerges C, Anders M, Veits L, Weise K, *et al.* Supportive evidence for FOXP1, BARX1, and FOXF1 as genetic risk loci for the development of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Med.* 2015;4(11):1700-4.
229. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet.* 2007;81(3):559-75.
230. Becker J, May A, Gerges C, Anders M, Schmidt C, Veits L, *et al.* The Barrett-associated variants at GDF7 and TBX5 also increase esophageal adenocarcinoma risk. *Cancer Med.* 2016.
231. Bennett CS, Khorram Khorshid HR, Alexandra Kitchen J, Arteta D, Dalglish R. Characterization of the human secreted phosphoprotein 24 gene (SPP2) and comparison of the protein sequence in nine species. *Matrix Biology.* 2004;22(8):641-51.
232. Perttala J, Merikanto K, Naukkarinen J, Surakka I, Martin NW, Tanhuanpaa K, *et al.* OSBPL10, a novel candidate gene for high triglyceride trait in dyslipidemic Finnish subjects, regulates cellular lipid metabolism. *J Mol Med (Berl).* 2009;87(8):825-35.
233. Haraldson K, Kashuba VI, Dmitriev AA, Senchenko VN, Kudryavtseva AV, Pavlova TV, *et al.* LRRC3B gene is frequently epigenetically inactivated in several epithelial malignancies and inhibits cell growth and replication. *Biochimie.* 2012;94(5):1151-7.
234. Kim M, Kim J-H, Jang H-R, Kim H-M, Lee C-W, Noh S-M, *et al.* *LRRC3B*, Encoding a Leucine-Rich Repeat-Containing Protein, Is a Putative Tumor Suppressor Gene in Gastric Cancer. *Cancer Research.* 2008;68(17):7147-55.
235. Garattini E, Terao M. The role of aldehyde oxidase in drug metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2012;8(4):487-503.
236. Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS, Tran TD. Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. *J Med Chem.* 2010;53(24):8441-60.
237. Zininga T, Ramatsui L, Shonhai A. Heat Shock Proteins as Immunomodulators. *Molecules.* 2018;23(11).
238. Arasu A, Murugan S, Essa MM, Velusamy T, Guillemin GJ. PAX3: A Molecule with Oncogenic or Tumor Suppressor Function Is Involved in Cancer %J *BioMed Research International.* 2018;2018:12.
239. Zhang L, Xia L, Zhao L, Chen Z, Shang X, Xin J, *et al.* Activation of PAX3-MET pathways due to miR-206 loss promotes gastric cancer metastasis. *Carcinogenesis.* 2015;36(3):390-9.
240. Kullander K, Klein R. Mechanisms and functions of Eph and ephrin signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002;3(7):475-86.
241. Jurek A, Genander M, Kundu P, Catchpole T, He X, Straat K, *et al.* Eph receptor interclass cooperation is required for the regulation of cell proliferation. *Exp Cell Res.* 2016;348(1):10-22.

242. Mathot L, Kundu S, Ljungström V, Svedlund J, Moens L, Adlerteg T, *et al.* Somatic Ephrin Receptor Mutations Are Associated with Metastasis in Primary Colorectal Cancer. 2017;77(7):1730-40.
243. Fischbach W, Malfertheiner P, Jansen PL, Bolten W, Bornschein J, Buderus S, *et al.* S2k-Leitlinie *Helicobacter pylori* und gastroduodenale Ulkuskrankheit. Z Gastroenterol. 2016;54(04):327-63.
244. Zagari RM, Eusebi LH, Rabitti S, Cristofori L, Vestito A, Pagano N, *et al.* Prevalence of upper gastrointestinal endoscopic findings in the community: A systematic review of studies in unselected samples of subjects. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 2016;31(9):1527-38.
245. Chuang S-C, Hashibe M, Scelo G, Brewster DH, Pukkala E, Friis S, *et al.* Risk of Second Primary Cancer among Esophageal Cancer Patients: a Pooled Analysis of 13 Cancer Registries. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2008;17(6):1543-9.
246. Dai JY, de Dieu Tapsoba J, Buas MF, Onstad LE, Levine DM, Risch HA, *et al.* A Newly Identified Susceptibility Locus near *FOXP1* Modifies the Association of Gastroesophageal Reflux with Barrett's Esophagus. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention. 2015;24(11):1739-47.
247. Åsling B, Jirholt J, Hammond P, Knutsson M, Walentinsson A, Davidson G, *et al.* Collagen type III alpha I is a gastro-oesophageal reflux disease susceptibility gene and a male risk factor for hiatus hernia. Gut. 2009;58(8):1063-9.

Anhang

Tab. A.1 Phänotypisch erhobene Daten für die Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen

Phänotyp Nr.	Abkürzung	Kategorie	Phänotypen/	Variable	Anzahl
01	sex	Geschlecht	Weiblich	qualitativ	123
	sex	Geschlecht	Männlich	qualitativ	904
	sex	Geschlecht	NA	qualitativ	0
02	age_d	Erstmanifestation	Alter in Jahren bei Diagnosestellung	quantitativ	1006
	age_d	Erstmanifestation	NA	quantitativ	21
03	clas_BE	Barrett-Diagnose	Long segment Barrett-Oesophagus	qualitativ	284
	clas_BE	Barrett-Diagnose	Short segment Barrett Oesophagus	qualitativ	267
	clas_BE	Barrett-Diagnose	NA	qualitativ	476
04	fam_BE	Familiäre Fälle BE ersten Grades	Ja	qualitativ	24
	fam_BE	Familiäre Fälle BE ersten Grades	Nein	qualitativ	980
	fam_BE	Familiäre Fälle BE ersten Grades	NA	qualitativ	23
05	act1	Körperliche Aktivität des Pat.	regelmäßig	qualitativ	496
	act1	Körperliche Aktivität des Pat.	gelegentlich	qualitativ	161
	act1	Körperliche Aktivität des Pat.	selten	qualitativ	109
	act1	Körperliche Aktivität des Pat.	nie	qualitativ	55
	act1	Körperliche Aktivität des Pat.	NA	qualitativ	206
06	act2	Körperliche Aktivität des Pat.	Ja	qualitativ	766
	act2	Körperliche Aktivität des Pat.	Nein	qualitativ	55
	act2	Körperliche Aktivität des Pat.	NA	qualitativ	206
07	ko1	Komorbidität	Ja	qualitativ	537
	ko1	Komorbidität	Nein	qualitativ	306
	ko1	Komorbidität	NA	qualitativ	184
08	ko2	Komorbidität Diabetes mellitus Typ1/2	Ja	qualitativ	151
	ko2	Komorbidität Diabetes mellitus Typ1/2	Nein	qualitativ	691
	ko2	Komorbidität Diabetes mellitus Typ1/2	NA	qualitativ	185
09	ko3	Komorbidität Ulcus ventriculi/duodeni	Ja	qualitativ	100
	ko3	Komorbidität Ulcus ventriculi/duodeni	Nein	qualitativ	742

Anhang

	ko3	Komorbidität Ulcus ventriculi/duodeni	NA	qualitativ	185
10	ko4	Komorbidität Hiatushernie	Ja	qualitativ	529
	ko4	Komorbidität Hiatushernie	Nein	qualitativ	296
	ko4	Komorbidität Hiatushernie	NA	qualitativ	202
11	ko5	Komorbidität maligner Tumor	Ja	qualitativ	129
	ko5	Komorbidität maligner Tumor	Nein	qualitativ	563
	ko5	Komorbidität maligner Tumor	NA	qualitativ	335
12	ko6	Komorbidität Allergien	Ja	qualitativ	185
	ko6	Komorbidität Allergien	Nein	qualitativ	657
	ko6	Komorbidität Allergien	NA	qualitativ	185
13	ko7	Komorbidität <i>Helicobacter pylori</i> Infektion	Ja	qualitativ	108
	ko7	Komorbidität <i>Helicobacter pylori</i> Infektion	Nein	qualitativ	721
	ko7	Komorbidität <i>Helicobacter pylori</i> Infektion	NA	qualitativ	198
14	or	Hernien OP	Ja	qualitativ	147
	or	Hernien OP	Nein	qualitativ	690
	or	Hernien OP	NA	qualitativ	190
15	cof1	Kaffeekonsum	Ja	qualitativ	714
	cof1	Kaffeekonsum	Nein	qualitativ	103
	cof1	Kaffeekonsum	NA	qualitativ	210
16	cof2	Kaffeekonsum in Tassen á 0,2l pro Tag	1	quantitativ	118
	cof2	Kaffeekonsum in Tassen á 0,2l pro Tag	2	quantitativ	208
	cof2	Kaffeekonsum in Tassen á 0,2l pro Tag	3	quantitativ	161
	cof2	Kaffeekonsum in Tassen á 0,2l pro Tag	4	quantitativ	103
	cof2	Kaffeekonsum in Tassen á 0,2l pro Tag	5	quantitativ	47
	cof2	Kaffeekonsum in Tassen á 0,2l pro Tag	6	quantitativ	34
	cof2	Kaffeekonsum in Tassen á 0,2l pro Tag	>6	quantitativ	44
	cof2	Kaffeekonsum in Tassen á 0,2l pro Tag	kein Konsum	quantitativ	76
	cof2	Kaffeekonsum in Tassen á 0,2l pro Tag	NA	quantitativ	236
17	alc1	Alkoholkonsum	Ja	qualitativ	567
	alc1	Alkoholkonsum	Nein	qualitativ	257
	alc1	Alkoholkonsum	trockener Alkoholiker	qualitativ	9
	alc1	Alkoholkonsum	NA	qualitativ	194
18	alc2	Alkoholkonsum in Gramm pro Tag		quantitativ	837

Anhang

	alc2	Alkoholkonsum in Gramm pro Tag	NA	quantitativ	190
19	alc3	Risikogruppe Alkoholkonsum	riskanter Alkoholkonsum	qualitativ	121
	alc3	Risikogruppe Alkoholkonsum	risikoarmer Alkoholkonsum	qualitativ	445
	alc3	Risikogruppe Alkoholkonsum	(m<30g/d, f<20g/d) kein Alkoholkonsum	qualitativ	259
	alc3	Risikogruppe Alkoholkonsum	NA	qualitativ	202
20	tab1	Aktueller Raucher	Ja	qualitativ	100
	tab1	Aktueller Raucher	Nein	qualitativ	736
	tab1	Aktueller Raucher	NA	qualitativ	191
21	tab2	Raucher packyears		quantitativ	99
	tab2	Raucher packyears	NA	quantitativ	928
22	tab3	Ehemaliger Raucher	Ja	qualitativ	512
	tab3	Ehemaliger Raucher	Nein	qualitativ	320
	tab3	Ehemaliger Raucher	NA	qualitativ	195
23	tab4	Ehemaliger Raucher packyears		quantitativ	506
	tab4	Ehemaliger Raucher packyears	NA	quantitativ	523
24	refl1	Reflux subjektive Beschwerden	stark	qualitativ	351
	refl1	Reflux subjektive Beschwerden	mittel	qualitativ	171
	refl1	Reflux subjektive Beschwerden	leicht	qualitativ	125
	refl1	Reflux subjektive Beschwerden	keine	qualitativ	186
	refl1	Reflux subjektive Beschwerden	NA	qualitativ	194
25	refl2	Vorhandensein von Reflux	Ja	qualitativ	647
	refl2	Vorhandensein von Reflux	Nein	qualitativ	186
	refl2	Vorhandensein von Reflux	NA	qualitativ	194
26	refl3	Reflux >2x/Woche	Ja	qualitativ	448
	refl3	Reflux >2x/Woche	Nein	qualitativ	359
	refl3	Reflux >2x/Woche	NA	qualitativ	220
27	fam_refl	Familiäre Fälle Reflux 1. Grades	Ja	qualitativ	216
	fam_refl	Familiäre Fälle Reflux 1. Grades	Nein	qualitativ	490
	fam_refl	Familiäre Fälle Reflux 1. Grades	NA	qualitativ	321

Fragebogen zum Thema Barrett – Ösophagus / Barrett - CA

Datum der aktuellen Befragung.: ____ . ____ . 20____

Interviewer: _____

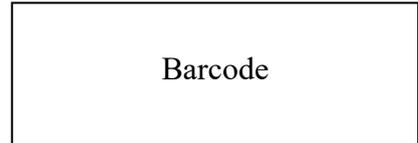
Nachname: _____

Vorname: _____

Adresse: _____

Telefon: _____

Klinik: _____



Barrett/Barrett-CA:

(1) Datum der Erstdiagnose Barrett-Ösophagus: ____ . ____ . ____

(2) Datum der Erstdiagnose Barrett-Carcinom: ____ . ____ . ____

War vor der Diagnose Barrett – CA ein Barrett – Ösophagus bekannt?

- (1) Ja Datum: _____
(2) Nein
(3) Unbekannt

Allgemeine Daten und Lebensgewohnheiten

Geschlecht: Mann (1) Frau (2)

Geburtsdatum: ____ . ____ . ____ Alter: ____ Jahre

Beruf: _____ zur Zeit:

(falls Rentner, bitte ausgeübten Beruf angeben)

- (0) keine Angabe
(1) Berufstätig:
(2) Arbeitslos:
(3) Im Ruhestand
(4) Erwerbsminderung

Körpergröße ____ cm Körpergewicht: ____ kg

Wo sind Sie geboren?

- (0) keine Angabe
(1) Deutschland
(2) Andere
(3) unbekannt

Land: _____

Wo sind Ihre Vorfahren geboren?

- (0) keine Angabe
(1) Deutschland
(2) Andere
(3) unbekannt

Land: _____

Welche Medikamente nehmen / nahmen Sie regelmäßig ein?

- | | | | | |
|--------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|---------------|--------------|
| (1) Schmerzmittel | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein | welche: _____ | Dosis: _____ |
| (2) gegen Sodbrennen | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein | | |
| (3) Herz-/Blutdruckmedikamente | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein | | |
| (4) Schlafmittel | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein | | |
| (5) Abführmittel | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein | | |
| (6) Cortison | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein | welche: _____ | Dosis: _____ |
| (7) Diuretika | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein | | |
| (8) Hormonpräparate | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein | welche: _____ | Dosis: _____ |
| (9) Andere | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein | welche: _____ | |

Welche Medikamente nehmen Sie gegen Sodbrennen?

- | | | |
|---|--|--|
| (1) <input type="checkbox"/> Antacida | (1.1) <input type="checkbox"/> Maalox | Dosis: _____ |
| | (1.2) <input type="checkbox"/> Riopan | Dosis: _____ |
| | (1.3) <input type="checkbox"/> Talcid | Dosis: _____ |
| (2) <input type="checkbox"/> Histamin-Rezeptor-Antagonisten | (2.1) <input type="checkbox"/> Cimetidin (Tagamet®) | (2.1.1) <input type="checkbox"/> 200mg
(2.1.2) <input type="checkbox"/> 400mg
(2.1.3) <input type="checkbox"/> 800mg |
| | (2.2) <input type="checkbox"/> Ranitidin (Sostril®) | (2.2.1) <input type="checkbox"/> 75mg
(2.2.2) <input type="checkbox"/> 150mg
(2.2.3) <input type="checkbox"/> 300mg |
| | (2.3) <input type="checkbox"/> Roxatidin | Dosis: _____ |
| | (2.4) <input type="checkbox"/> Nizatidin (Nizax®) | Dosis: _____ |
| | (2.5) <input type="checkbox"/> Famotidin (Pepdul®) | (2.5.1) <input type="checkbox"/> 10mg
(2.5.2) <input type="checkbox"/> 20mg
(2.5.3) <input type="checkbox"/> 40mg |
| (3) <input type="checkbox"/> Protonenpumpenhemmer (PPI) | (3.1) <input type="checkbox"/> Omeprazol (AntraMUPS®) | (3.1.1) <input type="checkbox"/> 10mg
(3.1.2) <input type="checkbox"/> 20mg
(3.1.3) <input type="checkbox"/> 40mg |
| | (3.2) <input type="checkbox"/> Esomeprazol (NexiumMUPS®) | (3.2.1) <input type="checkbox"/> 20mg
(3.2.2) <input type="checkbox"/> 40mg |
| | (3.3) <input type="checkbox"/> Pantoprazol (Pantozol®) | (3.3.1) <input type="checkbox"/> 20mg
(3.3.2) <input type="checkbox"/> 40mg |
| | (3.4) <input type="checkbox"/> Lansoprazol (Agoptan®) | (3.4.1) <input type="checkbox"/> 15mg
(3.4.2) <input type="checkbox"/> 30mg |
| | (3.5) <input type="checkbox"/> Rabeprazol (Pariet®) | (3.5.1) <input type="checkbox"/> 10mg
(3.5.2) <input type="checkbox"/> 20mg |
| Anzahl Tabletten gegen Sodbrennen | (1) <input type="checkbox"/> 1 Tablette am Tag
(2) <input type="checkbox"/> 2 Tabletten am Tag
(3) <input type="checkbox"/> 3 Tabletten am Tag
(4) <input type="checkbox"/> keine Angabe oder nicht bekannt | |

Helicobacter pylori Infektion? (1) Ja (2) Ja, Eradiziert
→ Datum : (3) Nein

Hatten Sie bereits eine genetische Untersuchung? (1) Ja, Datum : (2) Nein

Trinken Sie Kaffee? (1) Ja (2) Nein

Wie viel Kaffee trinken Sie?
(1) 1 Tasse am Tag (1 Tasse = 0.2 l)
(2) 2 Tassen am Tag (1 Tasse = 0.2 l)
(3) 3 Tassen am Tag (1 Tasse = 0.2 l)
(4) 4 Tassen am Tag (1 Tasse = 0.2 l)
(5) 5 Tassen am Tag (1 Tasse = 0.2 l)
(6) 6 Tassen am Tag (1 Tasse = 0.2 l)
(7) mehr als 6 Tassen Kaffee am Tag (1 Tasse = 0.2 l)

Trinken/Tranken Sie gelegentlich Alkohol? (1) Ja (2) Nein

Wenn ja, bitte Anzahl der Gläser pro Woche angeben:

(1) Bier:	(1) <input type="checkbox"/> Ja	(2) <input type="checkbox"/> Nein	_____ Gläser je 0,5 l
(2) Weißwein:	(1) <input type="checkbox"/> Ja	(2) <input type="checkbox"/> Nein	_____ Gläser je 0,2 l
(3) Rotwein:	(1) <input type="checkbox"/> Ja	(2) <input type="checkbox"/> Nein	_____ Gläser je 0,2 l
(4) Sekt:	(1) <input type="checkbox"/> Ja	(2) <input type="checkbox"/> Nein	_____ Gläser je 0,1 l
(5) Hochprozentiges (z.B. Schnaps)	(1) <input type="checkbox"/> Ja	(2) <input type="checkbox"/> Nein	_____ Gläser
(6) Longdrings / Cocktails	(1) <input type="checkbox"/> Ja	(2) <input type="checkbox"/> Nein	_____ Gläser
(7) Andere: _____	(1) <input type="checkbox"/> Ja	(2) <input type="checkbox"/> Nein	_____ Gläser

Rauchen Sie aktuell?

(1) Ja (2) Nein

Art :

- (0) noch nie geraucht
- (1) Zigaretten
- (2) Zigarren
- (3) Pfeife
- (4) Andere

Wie viele Zigaretten pro Tag ?

- (0) Keine
- (1) zwischen 1 – 10 Zigaretten / Zigarren / Pfeife
- (2) zwischen 11 – 20 Zigaretten / Zigarren / Pfeife
- (3) zwischen 21 – 30 Zigaretten / Zigarren / Pfeife
- (4) zwischen 31 – 40 Zigaretten / Zigarren / Pfeife
- (5) mehr als 40 Zigaretten / Zigarren / Pfeife am Tag

Seit wie vielen Jahren rauchen Sie?

- (0) noch nie geraucht
- (1) zwischen 1 – 5 Jahren
- (2) zwischen 6 – 10 Jahren
- (3) zwischen 11 – 15 Jahren
- (4) zwischen 16 – 20 Jahren
- (5) zwischen 21 – 25 Jahren
- (6) zwischen 26 – 30 Jahren
- (7) mehr als 30 Jahre

Wenn Sie als Raucher noch nie mit dem Rauchen aufgehört haben, überspringen Sie diese Frage: (0)

Haben Sie früher geraucht?

(1) Ja (2) Nein

Vor wie vielen Jahren haben Sie aufgehört zu rauchen? _____ Jahre

Art :

- (0) noch nie geraucht
- (1) Zigaretten
- (2) Zigarren
- (3) Pfeife
- (4) Andere

Wie viele Zigaretten pro Tag ?

- (0) Keine
- (1) zwischen 1 – 10 Zigaretten / Zigarren / Pfeife
- (2) zwischen 11 – 20 Zigaretten / Zigarren / Pfeife
- (3) zwischen 21 – 30 Zigaretten / Zigarren / Pfeife
- (4) zwischen 31 – 40 Zigaretten / Zigarren / Pfeife
- (5) mehr als 40 Zigaretten / Zigarren / Pfeife am Tag

Wie viele Jahre haben Sie geraucht?

- (0) Nie geraucht
- (1) zwischen 1 – 5 Jahren
- (2) zwischen 6 – 10 Jahren
- (3) zwischen 11 – 15 Jahren
- (4) zwischen 16 – 20 Jahren
- (5) zwischen 21 – 25 Jahren
- (6) zwischen 26 – 30 Jahren

(7) mehr als 30 Jahre

Inwiefern wurde Ihr Alltag vor dem Barrett – Ösophagus / CA beeinflusst?

Schmerzen:

- (1) Nicht vorhanden
- (2) Leichte Beschwerden ohne Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (3) Mittlere Beschwerden mit zeitweiliger Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (4) Starke Beschwerden mit erheblicher Beeinträchtigung der täglichen Aktivitäten

Sodbrennen:

- (1) Nicht vorhanden
- (2) Leichte Beschwerden ohne Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (3) Mittlere Beschwerden mit zeitweiliger Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (4) Starke Beschwerden mit erheblicher Beeinträchtigung der täglichen Aktivitäten

Aufstoßen von Nahrung:

- (1) Nicht vorhanden
- (2) Leichte Beschwerden ohne Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (3) Mittlere Beschwerden mit zeitweiliger Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (4) Starke Beschwerden mit erheblicher Beeinträchtigung der täglichen Aktivitäten

Schluckbeschwerden:

- (1) Nicht vorhanden
- (2) Leichte Beschwerden ohne Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (3) Mittlere Beschwerden mit zeitweiliger Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (4) Starke Beschwerden mit erheblicher Beeinträchtigung der täglichen Aktivitäten

Thoraxbeschwerden:

- (1) Nicht vorhanden
- (2) Leichte Beschwerden ohne Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (3) Mittlere Beschwerden mit zeitweiliger Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (4) Starke Beschwerden mit erheblicher Beeinträchtigung der täglichen Aktivitäten

Oberbauchbeschwerden:

- (1) Nicht vorhanden
- (2) Leichte Beschwerden ohne Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (3) Mittlere Beschwerden mit zeitweiliger Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (4) Starke Beschwerden mit erheblicher Beeinträchtigung der täglichen Aktivitäten

Übelkeit und Erbrechen:

- (1) Nicht vorhanden
- (2) Leichte Beschwerden ohne Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (3) Mittlere Beschwerden mit zeitweiliger Beeinträchtigung des täglichen Lebens
- (4) Starke Beschwerden mit erheblicher Beeinträchtigung der täglichen Aktivitäten

Pulmonale Symptome:

- | | | |
|----------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| (1) rez. Husten | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| (2) nächtlicher Husten | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| (3) Asthma | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| (4) Veränderung der Stimme | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| (5) Andere | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |

Spezifische Fragen zum Thema Sodbrennen:

(Nur beantworten, wenn Sie unter Sodbrennen litten, sonst diese Seite bitte überspringen)

1. Hatten Sie mehrmals im Monat Sodbrennen oder spürten Sie ein Brennen im Hals ?
(1) Ja (2) Nein

2. Wachten Sie nachts manchmal mit Sodbrennen auf?
(1) Ja (2) Nein

3. Bekamen Sie beim Sport oder bei anderen Anstrengungen Sodbrennen?
(1) Ja (2) Nein

4. Bemerkten Sie öfters - z. B. nach dem Essen – saures Aufstoßen ?
(1) Ja (2) Nein

5. Bemerkten Sie ein verstärktes Auftreten nach dem Verzehr von:

- | | | |
|--|---------------------------------|-----------------------------------|
| (1) <input type="checkbox"/> Süßigkeiten | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| (2) <input type="checkbox"/> kohlenensäurehaltigen Getränken | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| (3) <input type="checkbox"/> Alkohol | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| (4) <input type="checkbox"/> Kaffee | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| (5) <input type="checkbox"/> fettigen Speisen | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| (6) <input type="checkbox"/> anderen Speisen | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |

6. Hatten Sie mehr als zweimal pro Woche Sodbrennen ?
(1) Ja (2) Nein

7. Spürten Sie ab und zu oder regelmäßig Schmerzen hinter dem Brustbein, die bis in den Rücken ausstrahlten ?
(1) Ja (2) Nein

8. Litten Sie ab und zu oder regelmäßig an Heiserkeit oder Husten ?
(1) Ja (2) Nein

9. Bemerkten Sie ab und zu oder regelmäßig schlechten Geschmack/Mundgeruch?
(1) Ja (2) Nein

Was haben Sie gegen oben genannte Symptome unternommen?

10. Verzichteten sie auf bestimmte Speisen oder Getränke – aus Angst vor Sodbrennen ?
(1) Ja (2) Nein

11. Vermieden Sie späte Mahlzeiten am Abend?
(1) Ja (2) Nein

12. Schiefen Sie zur Vermeidung von Sodbrennen mit erhöhtem Oberkörper?
(1) Ja (2) Nein

13. Nahmen Sie rezeptfreie, selbst gekaufte Medikamente aus der Apotheke gegen Sodbrennen ein ?
(1) Ja (2) Nein

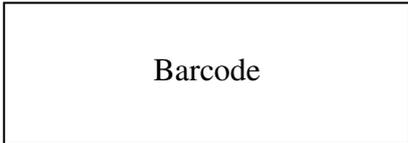
Wenn ja, welche: _____

14. Leidet noch jemand anderes in der Familie an Sodbrennen?
(1) Ja (2) Nein

- | | | | |
|---------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Wenn ja, wer: | Geschwister | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| | Kinder | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| | Eltern | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| | Zwillingsgeschwister | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |
| | Andere | (1) <input type="checkbox"/> Ja | (2) <input type="checkbox"/> Nein |

Erfassungsbogen Barrett - Carcinom

Datum der Erfassung.: ____ . ____ . 20 13 14



CA MA BK OP JW NW _____

Nachname: Vorname:

Geburtsdatum: Alter: Jahre (Berücksichtigt am 02.01.2013)

Adresse:

Telefon: _____

Klinik: Überweiser:

Datum der Erstdiagnose Barrett-Carcinom:

War vor der Diagnose Barrett – CA ein Barrett – Ösophagus bekannt?

- (1) Ja Datum:
(2) Nein
(3) Unbekannt

Geschlecht: [0=Mann 1=Frau]

Ausschlusskriterien

1) Ethnizität (0) keine Angabe
Wo sind Sie geboren? (1) Deutschland
 (2) Andere Land: _____
 (3) unbekannt

Wo sind Ihre Vorfahren geboren? (0) keine Angabe
 (1) Deutschland Land: _____
 (2) Andere
 (3) unbekannt

2) Verwandtschaft

Gibt es weitere Fälle der Barrett – Erkrankung in Ihrer Familie? (1) Ja (2) Nein

Falls ja : Verwandtschaftsgrad : Vater: (1) Ja (2) Nein
 Mutter: (1) Ja (2) Nein
 Geschwister: (1) Ja (2) Nein
 Großeltern (1) Ja (2) Nein
 Onkel / Tante (1) Ja (2) Nein
 Enkel (1) Ja (2) Nein
 Sonstige (1) Ja welche: _____

3) Cardiacarcinom? Ja Nein

Re-Kontaktierung am _____

durch CA MA BK OP JW NW _____

ORIGINAL RESEARCH

Supportive evidence for *FOXP1*, *BARX1*, and *FOXF1* as genetic risk loci for the development of esophageal adenocarcinoma

Jessica Becker^{1,2}, Andrea May³, Christian Gerges⁴, Mario Anders^{5,6}, Lothar Veits⁷, Katharina Weise^{1,2}, Darina Czamara⁸, Orestis Lyros⁹, Hendrik Manner¹⁰, Grisca Terheggen⁴, Marino Venerito¹¹, Tania Noder⁵, Rupert Mayershofer¹², Jan-Hinnerk Hofer¹³, Hans-Werner Karch¹⁴, Constantin J. Ahlbrand¹⁵, Michael Arras¹⁵, Sebastian Hofer¹⁵, Elisabeth Mangold^{1,2}, Stefanie Heilmann-Heimbach^{1,2}, Sophie K. M. Heinrichs^{1,2}, Timo Hess^{1,2}, Ralf Kiesslich¹⁰, Jakob R. Izbicki¹⁶, Arnulf H. Hölscher¹⁷, Elfriede Bollschweiler¹⁷, Peter Malfertheiner¹¹, Hauke Lang¹⁵, Markus Moehler¹⁸, Dietmar Lorenz¹⁹, Bertram Müller-Myhsok⁸, Katja Ott^{20,21}, Thomas Schmidt²¹, David C. Whiteman²², Thomas L. Vaughan^{23,24}, Markus M. Nöthen^{1,2}, Andreas Hackelsberger²⁵, Brigitte Schumacher^{4,26}, Oliver Pech²⁷, Yogesh Vashist¹⁶, Michael Vieth⁷, Josef Weismüller²⁸, Horst Neuhaus⁴, Thomas Rösch⁵, Christian Ell³, Ines Gockel^{9,15,a} & Johannes Schumacher^{1,2,a}

¹Institute of Human Genetics, University of Bonn, Bonn, Germany

²Department of Genomics, Life & Brain Center, University of Bonn, Bonn, Germany

³Department of Medicine II, Sana Klinikum, Offenbach, Germany

⁴Department of Internal Medicine II, Evangelisches Krankenhaus, Düsseldorf, Germany

⁵Department of Interdisciplinary Endoscopy, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁶Department of Gastroenterology and Interdisciplinary Endoscopy, Vivantes Wenckebach-Klinikum, Berlin, Germany

⁷Institute of Pathology, Klinikum Bayreuth, Bayreuth, Germany

⁸Statistical Genetics, Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany

⁹Department of Visceral, Transplant, Thoracic and Vascular Surgery, University Hospital of Leipzig, Leipzig, Germany

¹⁰Department of Internal Medicine II, HSK Hospital, Wiesbaden, Germany

¹¹Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Otto-von-Guericke University Hospital, Magdeburg, Germany

¹²Gastroenterologie am Burgweiher, Bonn, Germany

¹³Magen Darm Zentrum Wiener Platz, Cologne, Germany

¹⁴Gastroenterologische Schwerpunktpraxis, Baumholder, Germany

¹⁵Department of General, Visceral and Transplant Surgery, University Medical Center, University of Mainz, Mainz, Germany

¹⁶Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, University of Hamburg, Hamburg, Germany

¹⁷Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Cologne, Germany

¹⁸First Department of Internal Medicine, University Medical Center, University of Mainz, Mainz, Germany

¹⁹Department of General and Visceral Surgery, Sana Klinikum, Offenbach, Germany

²⁰Department of General, Visceral and Transplantation Surgery, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

²¹Department of General, Visceral and Thorax Surgery, RoMed Klinikum Rosenheim, Rosenheim, Germany

²²Cancer Control, QIMR Berghofer Medical Research Institute, Brisbane, Australia

²³Department of Epidemiology, University of Washington, School of Public Health, Seattle, Washington

²⁴Division of Public Health Sciences, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, Washington

²⁵Gastropraxis, Wiesbaden, Germany

²⁶Department of Internal Medicine and Gastroenterology, Elisabeth Hospital, Essen, Germany

²⁷Department of Gastroenterology and Interventional Endoscopy, St. John of God Hospital, Regensburg, Germany

²⁸Gastroenterologische Gemeinschaftspraxis, Koblenz, Germany

Keywords

BARX1, esophageal adenocarcinoma, *FOXF1*, *FOXP1*, genetic association study

Correspondence

Johannes Schumacher, Institute of Human Genetics, University of Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn, Germany. Tel: +49 228 287 51028; Fax: +49 228 287 51011; E-mail: johannes.schumacher@uni-bonn.de

Abstract

The Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium (BEACON) recently performed a genome-wide association study (GWAS) on esophageal adenocarcinoma (EAC) and Barrett's esophagus. They identified genome-wide significant association for variants at three genes, namely *CRTC1*, *FOXP1*, and *BARX1*. Furthermore, they replicated an association at the *FOXF1* gene that has been previously found in a GWAS on Barrett's esophagus. We aimed at further replicating the association at these and other loci that showed suggestive

Funding Information

B. M.-M., I. G., M. V., and J. S. received support for this work from the Else Kröner Fresenius Stiftung (EKFS) (Individual grant 2013_A118).

Received: 20 April 2015; Revised: 26 June 2015; Accepted: 26 June 2015

Cancer Medicine 2015, **4(11):1700–1704**

doi: 10.1002/cam4.500

^aThese authors contributed equally.

association with $P < 10^{-4}$ in the BEACON sample. In total, we tested 88 SNPs in an independent sample consisting of 1065 EAC cases and 1019 controls of German descent. We could replicate the association at *FOXP1*, *BARX1*, and *FOXF1* with nominal significance and thereby confirm that genetic variants at these genes confer EAC risk. In addition, we found association of variants near the genes *XRCC2* and *GATA6* that were strongly ($P < 10^{-5}$) although not genome-wide significantly associated with the BEACON GWAS. Therefore, both variants and corresponding genes represent promising candidates for future EAC association studies on independent samples.

Introduction

Recently, the Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium (BEACON) presented their genome-wide association study (GWAS) on 1516 cases with esophageal adenocarcinoma (EAC), 2416 cases with nonneoplastic Barrett's esophagus, and 3209 healthy individuals (discovery sample), all of European ancestry [1]. For the case-control analysis both disease conditions were considered as one single phenotype (total of 3932 cases). Eighty-seven single nucleotide polymorphisms (SNPs) showed disease association with $P < 10^{-4}$ and were followed up in 874 EAC and 759 Barrett's esophagus cases (total of 1633 cases) as well as 6911 controls from the United Kingdom (replication sample). In total, SNPs at three different loci showed genome-wide significant disease association in the combined sample. The first is on chromosome 19p13 (top SNP marker rs10419226) containing the gene *CREB-regulated transcription coactivator (CRTC1)*, whose aberrant activation has been associated with oncogenic activity [2]. The second locus concerns chromosome 9q22 and the most significant associated marker, rs11789015, is located in intron 3 of the gene *homeobox protein BarH-like 1b (BARX1)*, which encodes a transcription factor important in esophageal differentiation [3]. The third locus is on chromosome 3p13 (top SNP marker rs2687201). The nearest gene to this association signal is *forkhead box protein P1 (FOXP1)*, which encodes a transcription factor regulating esophagus development and acts as therapeutic target in cancer [4, 5].

Furthermore, the BEACON study refined a previously reported association with Barrett's esophagus [6] near the transcription factor *forkhead box F1 (FOXF1)* gene on chromosome 16q24. They used the most significant associated SNP marker in their discovery sample, rs3950627, and performed a stepwise conditional analysis to test for

independent SNP associations within this region. In total, they identified three additional association signals (at rs1490865, rs3111601, and rs2178146) pointing to a complex genetic risk architecture at 16q24. The association of the originally reported risk conferring SNP, rs9936833, was thereby explained by all four SNP markers that showed association in the stepwise conditional analysis.

In the present study, we aimed at further replicating the associations obtained by BEACON. We genotyped all 87 SNP markers in an independent German sample of 1065 EAC cases and 1019 controls that showed association with $P < 10^{-4}$ to EAC/Barrett's esophagus in the BEACON GWAS sample [1]. Within this marker set, five SNPs are located in the *FOXP1* region. In addition to these markers, we genotyped three further *FOXF1* SNPs that have been previously implicated in the GWAS on Barrett's esophagus [6] resulting in a total of 90 SNPs in the replication study.

Material and Methods

Our sample consisted of 1065 EAC cases and 1019 controls, all of German descent. In all cases the diagnosis of EAC was histopathologically confirmed. Controls were a population-based sample recruited among voluntary blood donors at the University of Bonn. All participants signed informed consent and the study was approved by ethics committees from the Universities of Mainz and Bonn (Germany). Although none of the controls had been diagnosed with EAC, they have not been screened regarding Barrett's esophagus status. In all, 127 cases were females and 938 were males. In controls, 521 were females and 498 were males. Of note, due to the small size of the female sample our statistical power was only moderate to detect sex-specific risk variants. Genotyping of all 90 markers was done using the Sequenom MassARRAY iPLEX Gold® system

(Sequenom, San Diego, CA). For quality control we genotyped intra- and interplate duplicates. In addition, we added negative controls (H₂O) on each 384-well plate to exclude contamination. Clusterplot of each SNP was visually checked and manually corrected if necessary. Genotyping data underwent different quality control steps (Hardy–Weinberg equilibrium $P > 0.001$, call rate $> 95\%$). After applying these criteria, 88 SNPs remained for association testing (see Table S1). Single marker association analyses including sex as covariate were performed in the whole sample set and in addition sex specifically (i.e., females and males, separately). Quality control as well as single marker association analysis were carried out using PLINK software [7].

Results

After quality control, 88 of 90 SNPs were tested for association with EAC. None of the tested variants showed EAC association in our case–control sample after Bonferroni correction ($P < 5.68 \times 10^{-4}$, Table S1). However, eight SNPs reached nominal significance ($P < 0.05$) and 11 SNPs were EAC associated when one-sided tested ($P_{1-d.f.} < 0.05$, Table S1). Of these markers, 11 showed association with the same allelic direction as reported previously in the GWAS samples (Table 1). The most significant EAC association in our sample was found for rs2687201 followed by rs9837992 ($P_{1-d.f.} = 0.0007$ and $P_{1-d.f.} = 0.002$, respectively, Table 1). Both variants are located at the same chromosomal locus 3p13 containing *FOXP1* that has been identified with genome-wide significant association in the BEACON study [1]. The association was more pronounced in male compared to female cases (e.g. $P_{1-d.f.male} = 0.0004$ and $P_{1-d.f.female} = 0.310$ for rs2687201, Table 1). Furthermore, two of the previously highlighted GWAS variants also showed EAC association in our sample with the same alleles being risk conferring (Table 1). SNP rs11789015 is located in intron 3 of *BARX1* on chromosome 9q22 and was genome-wide significantly associated with the BEACON sample [1]. This variant showed also EAC association in our sample ($P_{1-d.f.} = 0.044$), which was more pronounced in female compared to male cases ($P_{1-d.f.male} = 0.267$ and $P_{1-d.f.female} = 0.010$, Table 1). In addition, rs9936833, which was genome-wide significantly associated with the Barrett's esophagus GWAS [6] and is located near *FOXF1* on chromosome 16q24, was EAC associated ($P_{1-d.f.} = 0.045$, Table 1). In addition, two of the remaining SNPs with EAC association in our sample (Table 1) are of particular interest, as they show disease association in both BEACON samples, the discovery and the replication cohort. SNP rs11771429 is located nearby the gene *XRCC2* encoding for a DNA repair protein and showed EAC association in our sample with $P_{1-d.f.} = 0.042$ (Table 1). In addition, rs4800353 near the gene

GATA-binding protein 6 (GATA6) was EAC associated with our sample ($P_{1-d.f.} = 0.034$, Table 1). Finally, we compared the genetic effect sizes at all five implicated loci (*FOXP1*, *BARX1*, *FOXF1*, *XRCC2*, and *GATA6*) between our and the BEACON study and observed that they are all in the same range (Fig. S1, and Table S1).

Discussion

In the present study, we aimed at replicating associations to EAC/Barrett's esophagus which have been previously reported in the BEACON GWAS [1]. We tested 85 SNP markers that yielded $P < 10^{-4}$ in their GWAS discovery sample in our sample of 1065 cases with EAC and 1019 controls, all of German descent. In addition, three SNPs near *FOXF1* (in total eight SNPs) that have been highlighted in the BEACON study and in another GWAS on Barrett's esophagus [6] were genotyped. Of all 88 included variants, we found the most significantly EAC-associated SNPs at *FOXP1*, which were also genome-wide significantly associated with EAC/Barrett's esophagus in the BEACON study. Although our findings do not withstand a Bonferroni correction, they confirm that genetic variability at *FOXP1* confers risk to EAC. Furthermore, our study supports the involvement of two previously reported risk loci in the EAC pathology. When one-sided tested, variants at *BARX1* and *FOXF1* showed disease association. However, given that rs3950627, which was the strongest associated SNP at *FOXF1* in the BEACON study [1] showed no significant EAC association in our sample ($P = 0.121$, Table S1), we did not perform a conditional analysis at this locus, as has been done by BEACON. Thus, our study does not provide any further information about the genetic EAC risk architecture at this locus. Furthermore, of all previously reported risk loci we do not find association evidence for *CRTC1* ($P = 0.349$ for rs10419226, Table S1), which was the strongest disease associated variant in the BEACON study. However, the risk allele of rs10419226 identified by BEACON was also more prevalent in our cases compared to controls. One explanation for the failed replication might be limited statistical power of our study sample and/or that the risk effect at this locus has been overestimated in the initial GWAS, a phenomenon that is called the "winner's curse". Hereby, *CRTC1* represents a true risk locus, but the observed effect size in the initial study is randomly higher than the true effect size. Also other factors might be responsible for the observed differences between the BEACON GWAS and our replication study. In comparison to the GWAS sample, our replication cohort is smaller and therefore the statistical power of the present study is limited. Furthermore, the use of population-based controls instead of controls screened for Barrett's esophagus may have led

Table 1. Association results for all replicated SNPs in 1065 EAC cases and 1019 controls of German descent.

SNP	Chr: Pos ¹	Allele ²	Group	MAF in % ³		OR (95% CI) ⁴	$P_{2-d.f.}$ ⁵	$P_{1-d.f.}$ ⁵	Nearby genes ⁶
				Cases	Controls				
rs17030152	1: 7083719	C/T	All	25.5	28.2	0.87 (0.75–1.01)	0.068	0.034	<i>THAP3, DNAJC11, CAMTA1</i>
			M	25.6	27.6	0.89 (0.75–1.06)	0.190	0.095	
			F	24.4	28.8	0.80 (0.59–1.10)	0.167	0.083	
rs2687201	3: 70928930	A/C	All	36.0	30.6	1.26 (1.09–1.46)	0.0014	0.0007	<i>MITF, FOXP1, EIF4E3</i>
			M	36.4	30.2	1.33 (1.13–1.57)	0.0007	0.0004	
			F	32.8	31.0	1.08 (0.81–1.43)	0.620	0.310	
rs9837992	3: 70959438	A/G	All	35.5	31.4	1.23 (1.07–1.42)	0.005	0.002	<i>MITF, FOXP1, EIF4E3</i>
			M	35.7	30.1	1.30 (1.10–1.54)	0.002	0.001	
			F	33.9	32.6	1.04 (0.78–1.39)	0.779	0.389	
rs11771429	7: 153271877	T/C	All	15.3	16.9	0.85 (0.71–1.02)	0.083	0.042	<i>XRCC2, ACTR3B, DPP6</i>
			M	15.4	17.2	0.86 (0.70–1.06)	0.157	0.079	
			F	14.2	16.6	0.81 (0.55–1.21)	0.308	0.154	
rs4523255	8: 8713038	T/C	All	39.5	37.3	1.14 (0.99–1.31)	0.061	0.031	<i>CLDN23, MFHAS1, ERI1</i>
			M	38.7	37.1	1.07 (0.91–1.25)	0.420	0.210	
			F	45.7	37.6	1.40 (1.06–1.85)	0.018	0.009	
rs11789015	9: 96716028	G/A	All	25.1	28.1	0.87 (0.75–1.02)	0.088	0.044	<i>BARX1, PTPDC1, MIRLET7DHG</i>
			M	25.5	26.8	0.94 (0.79–1.13)	0.533	0.267	
			F	22.0	29.3	0.67 (0.48–0.94)	0.020	0.010	
rs2669333	13: 63574196	A/G	All	35.3	33.6	1.15 (1.00–1.33)	0.050	0.025	<i>DIAPH3, TRDR3, PCDH20</i>
			M	35.1	31.4	1.19 (1.01–1.41)	0.036	0.018	
			F	36.8	35.6	1.04 (0.78–1.39)	0.776	0.388	
rs10144632	14: 55242336	G/A	All	23.2	25.9	0.87 (0.75–1.02)	0.088	0.044	<i>SAMD4A, GCH1, WDHD1</i>
			M	23.2	25.8	0.88 (0.73–1.05)	0.156	0.078	
			F	23.2	26.1	0.86 (0.63–1.18)	0.342	0.171	
rs2895917	14: 102052775	T/C	All	32.7	35.6	0.88 (0.76–1.02)	0.086	0.043	<i>DIO3, PPP2R5C, DYNC1H1</i>
			M	33.0	35.1	0.91 (0.77–1.08)	0.278	0.139	
			F	30.7	36.1	0.79 (0.59–1.06)	0.120	0.060	
rs9936833	16: 86403118	C/T	All	39.4	36.9	1.13 (0.98–1.29)	0.090	0.045	<i>FENDRR, FOXF1, MTHFS</i>
			M	39.3	36.8	1.11 (0.95–1.30)	0.178	0.089	
			F	40.6	37.0	1.16 (0.88–1.51)	0.289	0.144	
rs4800353	18: 19654137	G/A	All	12.8	14.7	0.83 (0.69–1.01)	0.067	0.034	<i>MIB1, GATA6, CTAGE1</i>
			M	12.9	14.9	0.84 (0.67–1.04)	0.115	0.058	
			F	12.2	14.5	0.82 (0.54–1.25)	0.351	0.175	

In total, 11 SNPs show EAC association when one-side tested ($P_{1-d.f.} < 0.05$) with the same risk allele as observed in the previously published GWAS on EAC/Barrett's esophagus [1, 6]. The results are given for the whole sample set (All) as well as for males (M) and females (F) separately (column "Group").

¹Chromosome (Chr) and position (Pos) according to hg19.

²First allele represents the minor allele.

³Minor allele frequency (MAF) is given for cases and controls.

⁴Odds ratio (OR) with 95% confidence interval (CI) indicating the genetic effect size is given for the minor allele.

⁵ P -values using $n - 2$ degrees of freedom (column " $P_{2-d.f.}$ ") and $n - 1$ degree of freedom (column " $P_{1-d.f.}$ ") are shown, whereby P -values below 0.05 are highlighted in bold.

⁶Nearby genes are shown with the closest gene to the associated SNP given in bold.

to an additional power loss. However, two SNPs that were replicated in the BEACON replication cohort and showed strong but not genome-wide significant association ($P < 10^{-5}$) in the combined GWAS sample (discovery and replication cohort) showed EAC association within this study. SNP rs11771429 is located nearby *XRCC2* and showed disease association in the BEACON study with $P = 8.40 \times 10^{-6}$ [1]. The corresponding protein represents a member of the RAD51 family and thereby plays a pivotal role in DNA repair and carcinogenesis [8]. In

addition, rs4800353 near *GATA6* showed disease association in the BEACON study with $P = 2.69 \times 10^{-7}$ [1]. Also, *GATA6* represents a plausible EAC candidate gene as it encodes a transcription factor with an important role in the regulation of cellular differentiation. Of note, *GATA6* has already been implicated in the development of EAC [9–11]. However, although *CRCC2* and *GATA6* represent interesting candidate genes, independent replications at these loci are needed before adding the respective SNPs to the list of confirmed EAC risk variants.

In conclusion, we provide supportive evidence that genetic variants at *FOXP1*, *BARX1*, and *FOXF1* confer risk for the development of EAC. In addition, we found association with variants near *XRCC2* and *GATA6* that were strongly disease associated with the BEACON GWAS, although this was not genome-wide significant. Thus, both genes represent promising candidates for future EAC association studies on independent samples.

Acknowledgments

B. M.-M., I. G., M. V., and J. S. received support for this work from the Else Kröner Fresenius Stiftung (EKFS) (Individual grant 2013_A118). M. M. N. received support for this work from the Alfried Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung. The authors thank all patients and controls for participating to this study. In addition, we thank Prof. Bernd Pötzsch (Institute of Experimental Hematology and Transfusion Medicine, University of Bonn) for help with collecting DNA samples from anonymous blood donors. This work contains substantial parts of the doctoral theses of C.J.A., M.A. and S.H.

Conflict of Interest

None declared.

References

- Levine, D. M., W. E. Ek, R. Zhang, X. Liu, L. Onstad, C. Sather, et al. 2013. A genome-wide association study identifies new susceptibility loci for esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Nat. Genet.* 45:1487–1493.
- Gu, Y., S. Lin, J. L. Li, H. Nakagawa, Z. Chen, B. Jin, et al. 2012. Altered LKB1/CREB-regulated transcription co-activator (CRTC) signaling axis promotes esophageal cancer cell migration and invasion. *Oncogene* 31:469–479.
- Woo, J., I. Miletich, B. M. Kim, P. T. Sharpe, and R. A. Shivdasani. 2011. Barx1-mediated inhibition of Wnt signaling in the mouse thoracic foregut controls tracheo-esophageal septation and epithelial differentiation. *PLoS ONE* 6:e22493.
- Koon, H. B., G. C. Ippolito, A. H. Banham, and P. W. Tucker. 2007. FOXP1: a potential therapeutic target in cancer. *Expert Opin Ther. Targets* 11:955–965.
- Shu, W., M. M. Lu, Y. Zhang, P. W. Tucker, D. Zhou, and E. E. Morrissey. 2007. Foxp2 and Foxp1 cooperatively regulate lung and esophagus development. *Development* 134:1991–2000.
- Su, Z., L. J. Gay, A. Strange, C. Palles, G. Band, D. C. Whiteman, et al. 2012. Common variants at the MHC locus and at chromosome 16q24.1

predispose to Barrett's esophagus. *Nat. Genet.* 44:1131–1136.

- Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M. A. Ferreira, D. Bender, et al. 2007. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81:559–575.
- Thacker, J. 2005. The RAD51 gene family, genetic instability and cancer. *Cancer Lett.* 219:125–135.
- Alvarez, H., J. Opalinska, L. Zhou, D. Sohal, M. J. Fazzari, Y. Yu, et al. 2011. Widespread hypomethylation occurs early and synergizes with gene amplification during esophageal carcinogenesis. *PLoS Genet.* 7:e1001356.
- Kimchi, E. T., M. C. Posner, J. O. Park, T. E. Darga, M. Kocherginsky, T. Karrison, et al. 2005. Progression of Barrett's metaplasia to adenocarcinoma is associated with the suppression of the transcriptional programs of epidermal differentiation. *Cancer Res.* 65:3146–3154.
- Lin, L., A. J. Bass, W. W. Lockwood, Z. Wang, A. L. Silvers, D. G. Thomas, et al. 2012. Activation of GATA binding protein 6 (GATA6) sustains oncogenic lineage-survival in esophageal adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109:4251–4256.

Supporting Information

Additional supporting information may be found in the online version of this article:

Table S1. Esophageal adenocarcinoma (EAC) association findings in 1065 cases and 1019 controls at 88 SNP markers that showed disease association with $P < 10^{-4}$ in the Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium (BEACON) GWAS sample ($N = 85$) [1] and at further three SNP markers at *FOXF1* that were implicated in Barrett's esophagus [6]. In total, eight SNPs in the *FOXF1* region were tested for association (rs1490865 [16: 86387275] to rs4843376 [16: 86470082]). *P*-values below 0.05 are given in bold. The last column shows the odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI) from the BEACON GWAS. The BEACON effect sizes are based on the combined meta-analysis (5564 patients, 10,118 controls). Only for the three additional SNP markers at *FOXF1* (highlighted with an asterisk), the effect sizes are given for the BEACON discovery sample (3928 patients, 3207 controls).

Figure S1. Forest plots of the five EAC-associated markers, namely rs2687201 (*FOXP1*), rs11771429 (*XRCC2*), rs11789015 (*BARX1*), rs9936833 (*FOXF1*), and rs4800353 (*GATA6*). The odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) from the replication study (Germany) and the previous GWAS (BEACON) were plotted. Except for the *FOXF1* marker rs9936833 (based on their discovery sample [3928 patients, 3207 controls]) the BEACON OR and CI are given for combined meta-analysis (5564 patients, 10,118 controls).

Supporting Information Table S1. EAC association findings in 1065 cases and 1019 controls at 88 SNP markers that showed disease association with $P < 10^{-04}$ in the BEACON GWAS sample (N = 85) [1] and at further three SNP markers at *FOXF1* that were implicated in Barrett's esophagus [6]. In total, eight SNPs in the *FOXF1* region were tested for association (rs1490865 (16: 86387275) to rs4843376 (16: 86470082)). *P*-values below 0.05 are given in bold. The last column shows the Odds Ratios (OR) with 95% Confidence Intervals (CI) from the BEACON GWAS. The BEACON effect sizes are based on the combined meta-analysis (5564 patients, 10118 controls). Only for the three additional SNP markers at *FOXF1* (highlighted with an asterisk) the effect sizes are given for the BEACON discovery sample (3928 patients, 3207 controls).

SNP ¹	Chr: Pos ²	Allele ³	MAF in % ⁴		<i>P</i>	OR (95% CI) ⁵	BEACON OR (95% CI)
			Cases	Controls			
rs17030152	1: 7083719	C/T	25.5	28.2	0.068	0.87 (0.75-1.01)	0.92 (0.87-0.98)
rs3005897	1: 56786595	T/C	28.6	26.4	0.167	1.11 (0.96-1.29)	0.95 (0.90-1.01)
rs3789387	1: 94474961	C/T	9.8	9.6	0.879	0.98 (0.78-1.23)	1.14 (1.04-1.24)
rs12122818	1: 193686395	C/A	4.0	4.9	0.473	0.89 (0.64-1.23)	0.84 (0.74-0.96)
rs2293525	2: 201468732	G/C	15.4	17.2	0.172	0.88 (0.73-1.06)	1.10 (1.02-1.18)
rs6754666	2: 202435352	A/G	25.2	25.5	0.953	1.01 (0.86-1.17)	1.02 (0.96-1.08)
rs889838	2: 222835057	A/G	45.0	43.9	0.576	1.04 (0.91-1.19)	1.08 (1.03-1.14)
rs6711386	2: 234990980	T/G	2.8	4.2	0.040	0.68 (0.46-0.98)	1.20 (1.03-1.40)
rs4973786	3: 26552078	A/G	39.0	38.3	0.218	1.09 (0.95-1.25)	1.08 (1.02-1.14)
rs4611855	3: 31847360	T/C	44.0	42.3	0.268	1.08 (0.94-1.24)	0.91 (0.86-0.96)
rs11130736	3: 59810153	A/G	45.9	44.8	0.682	1.03 (0.88-1.21)	0.95 (0.90-1.00)
rs2687201	3: 70928930	A/C	36.0	30.6	0.001	1.26 (1.09-1.46)	1.18 (1.12-1.25)
rs9837992	3: 70959438	A/G	35.5	31.4	0.005	1.23 (1.07-1.42)	1.14 (1.08-1.21)
rs7646638	3: 134599236	C/T	5.6	7.0	0.285	0.86 (0.65-1.13)	0.86 (0.77-0.95)
rs13080736	3: 195837423	G/A	4.8	4.5	0.831	1.04 (0.75-1.42)	0.82 (0.73-0.93)
rs2380964	4: 38175276	C/T	27.4	29.9	0.041	0.85 (0.73-0.99)	1.10 (1.04-1.17)
rs1391010	4: 76081553	T/C	18.0	18.8	0.769	0.97 (0.82-1.16)	0.88 (0.82-0.94)
rs7681167	4: 76161222	G/A	16.4	15.5	0.340	1.09 (0.91-1.32)	0.89 (0.83-0.95)
rs6848890	4: 76163816	T/C	16.4	15.5	0.353	1.09 (0.91-1.31)	0.85 (0.79-0.92)
rs7691721	4: 76164287	C/T	26.7	26.8	0.928	1.01 (0.86-1.18)	0.91 (0.86-0.97)
rs1497205	4: 76169067	G/A	26.6	26.7	0.932	1.01 (0.86-1.17)	0.87 (0.82-0.93)
rs10021538	4: 76180442	G/A	9.7	9.8	0.987	1.00 (0.80-1.25)	0.88 (0.81-0.96)
rs4610302	4: 88400110	A/G	38.5	38.3	0.743	1.02 (0.89-1.18)	0.92 (0.87-0.97)
rs6449586	5: 50634878	C/T	41.9	40.9	0.431	1.06 (0.92-1.21)	0.90 (0.85-0.94)
rs17462769	5: 161648147	A/G	15.7	16.6	0.156	0.88 (0.73-1.05)	0.90 (0.84-0.96)
rs6930375	6: 40132914	A/G	44.8	44.6	0.984	1.00 (0.87-1.15)	0.92 (0.87-0.97)
rs10948748	6: 53220825	G/A	12.9	13.2	0.547	1.07 (0.87-1.31)	0.89 (0.83-0.96)
rs2342002	6: 61951860	T/C	20.9	22.3	0.371	0.93 (0.79-1.09)	1.15 (1.08-1.23)
rs1547073	6: 62545593	A/G	20.2	21.1	0.616	0.96 (0.81-1.13)	1.15 (1.07-1.23)
rs9285474	6: 133873486	C/A	13.0	13.7	0.342	0.91 (0.75-1.11)	0.90 (0.83-0.96)
rs17172185	7: 43286839	C/T	4.2	5.0	0.321	0.85 (0.61-1.17)	0.81 (0.72-0.91)
rs11771429	7: 153271877	T/C	15.3	16.9	0.083	0.85 (0.71-1.02)	0.84 (0.78-0.91)
rs7458507	7: 154374448	C/T	18.8	17.5	0.141	1.14 (0.96-1.36)	0.93 (0.87-0.99)
rs4523255	8: 8713038	T/C	39.5	37.3	0.061	1.14 (0.99-1.31)	1.13 (1.07-1.20)
rs2198011	8: 20492735	T/C	43.2	44.3	0.837	0.99 (0.86-1.13)	0.95 (0.91-1.00)
rs74568060	8: 21939567	A/G	3.0	3.0	0.803	0.95 (0.64-1.41)	0.71 (0.60-0.83)
rs3847131	8: 32282019	T/C	36.3	34.0	0.162	1.11 (0.96-1.28)	1.08 (1.03-1.14)
rs7835508	8: 38782627	C/T	38.2	39.3	0.625	0.97 (0.84-1.11)	0.95 (0.90-1.00)
rs10112358	8: 64296883	T/C	28.7	31.7	0.020	0.84 (0.73-0.97)	1.10 (1.04-1.16)
rs1431594	8: 64334749	T/C	30.2	32.8	0.036	0.86 (0.74-0.99)	1.12 (1.06-1.18)
rs10113822	8: 64335958	G/T	17.1	18.5	0.096	0.86 (0.73-1.03)	1.12 (1.04-1.20)
rs10097465	8: 113510766	A/C	30.1	32.8	0.133	0.90 (0.78-1.03)	0.93 (0.88-0.98)
rs1398034	8: 138932176	C/T	22.5	21.3	0.338	1.08 (0.92-1.28)	0.93 (0.87-0.99)
rs12552693	9: 86117401	T/C	48.8	47.6	0.764	1.02 (0.88-1.20)	0.94 (0.89-0.99)
rs11789015	9: 96716028	G/A	25.1	28.1	0.088	0.87 (0.75-1.02)	0.83 (0.79-0.88)
rs10429556	9: 96805635	C/T	49.3	48.7	0.879	0.99 (0.87-1.13)	1.05 (1.00-1.11)

rs6479527	9: 96858411	A/G	47.0	48.0	0.829	1.02 (0.89-1.16)	0.87 (0.82-0.91)
rs1490743	9: 117036047	T/G	6.9	7.8	0.374	0.89 (0.69-1.15)	1.11 (1.00-1.22)
rs4880498	10: 1402884	T/G	45.2	40.9	0.039	1.16 (1.01-1.33)	0.94 (0.90-1.00)
rs7916923	10: 6286839	C/T	48.3	47.9	0.879	1.01 (0.89-1.15)	1.12 (1.06-1.18)
rs11010572	10: 36511451	A/G	18.7	16.3	0.234	1.11 (0.93-1.33)	1.13 (1.05-1.22)
rs7904985	10: 88116479	A/G	31.8	32.6	0.817	1.02 (0.88-1.17)	1.12 (1.06-1.19)
rs79838852	11: 1587168	T/C	9.2	8.9	0.507	1.08 (0.86-1.37)	1.16 (1.04-1.28)
rs11041413	11: 7503306	A/G	1.7	1.1	0.437	1.25 (0.71-2.19)	0.76 (0.62-0.94)
rs732392	11: 11007971	G/T	31.4	30.7	0.434	1.06 (0.92-1.23)	0.90 (0.84-0.95)
rs4980598	11: 69231796	T/C	36.7	34.1	0.200	1.10 (0.95-1.26)	0.95 (0.90-1.00)
rs576425	11: 116005170	T/C	44.8	42.2	0.101	1.12 (0.98-1.29)	1.09 (1.03-1.16)
rs3897234	13: 27542030	G/A	23.7	23.6	0.903	1.01 (0.86-1.19)	1.11 (1.04-1.19)
rs7330220	13: 53286950	T/C	11.1	9.5	0.189	1.16 (0.93-1.45)	1.21 (1.10-1.33)
rs2669333	13: 63574196	A/G	35.3	33.6	0.050	1.15 (1.00-1.33)	1.11 (1.05-1.17)
rs1408906	13: 108711217	A/G	33.9	33.6	0.642	1.03 (0.90-1.19)	1.05 (0.99-1.11)
rs1575737	13: 108713121	A/C	39.1	38.8	0.956	1.00 (0.88-1.15)	0.96 (0.91-1.01)
rs12894060	14: 54226373	A/G	32.9	32.6	0.581	1.04 (0.90-1.21)	1.08 (1.02-1.14)
rs10144632	14: 55242336	G/A	23.2	25.9	0.088	0.87 (0.75-1.02)	0.93 (0.88-0.98)
rs12880053	14: 57297563	A/C	47.1	46.8	0.827	0.99 (0.86-1.13)	0.91 (0.86-0.96)
rs2895917	14: 102052775	T/C	32.7	35.6	0.086	0.88 (0.76-1.02)	0.91 (0.87-0.97)
rs3784262	15: 58253106	G/A	44.3	46.1	0.232	0.92 (0.81-1.05)	0.88 (0.83-0.92)
rs254348	16: 65980789	A/G	39.3	40.4	0.382	0.94 (0.82-1.08)	0.89 (0.84-0.94)
rs9926271	16: 73125231	C/T	1.7	2.1	0.410	0.81 (0.50-1.33)	0.70 (0.58-0.85)
rs1490865	16: 86387275	C/T	24.5	26.0	0.059	0.86 (0.74-1.01)	1.05 (0.97-1.14)*
rs3111601	16: 86400081	C/T	34.6	32.2	0.153	1.11 (0.96-1.27)	1.13 (1.07-1.19)
rs9936833	16: 86403118	C/T	39.4	36.9	0.090	1.13 (0.98-1.29)	1.16 (1.08-1.24)*
rs1532167	16: 86404204	A/C	39.4	36.8	0.102	1.12 (0.98-1.29)	1.11 (1.05-1.17)
rs3950627	16: 86436343	C/A	49.1	47.0	0.121	1.11 (0.97-1.27)	1.18 (1.10-1.26)*
rs8045253	16: 86437767	C/T	38.6	37.1	0.395	1.06 (0.92-1.22)	1.09 (1.04-1.15)
rs2178146	16: 86463695	G/A	37.9	40.3	0.221	0.92 (0.80-1.05)	0.88 (0.83-0.92)
rs4843376	16: 86470082	G/A	46.0	49.0	0.127	0.90 (0.79-1.03)	0.90 (0.85-0.96)
rs9899923	17: 70916580	T/C	45.8	45.3	0.782	1.02 (0.89-1.17)	0.95 (0.90-1.00)
rs7237326	18: 8505193	A/G	38.7	39.0	0.900	0.99 (0.86-1.14)	0.92 (0.87-0.97)
rs4800353	18: 19654137	G/A	12.8	14.7	0.067	0.83 (0.69-1.01)	0.82 (0.76-0.88)
rs16961975	18: 29046606	A/G	1.2	1.0	0.655	1.16 (0.61-2.22)	1.56 (1.23-1.98)
rs1991017	19: 18746593	T/A	34.9	33.3	0.571	1.04 (0.90-1.20)	1.14 (1.08-1.20)
rs10419226	19: 18803172	T/G	47.9	45.5	0.349	1.07 (0.93-1.22)	1.18 (1.12-1.24)
rs10423674	19: 18817903	A/C	32.8	35.4	0.346	0.93 (0.81-1.08)	0.84 (0.80-0.89)
rs2927438	19: 45242107	A/G	22.3	20.3	0.080	1.16 (0.98-1.37)	0.86 (0.80-0.91)
rs6122972	20: 49375242	G/A	15.8	17.2	0.362	0.92 (0.77-1.10)	0.91 (0.85-0.97)
rs6099816	20: 56460394	A/C	38.3	40.6	0.244	0.92 (0.80-1.06)	0.91 (0.87-0.96)
rs2039241	21: 17828046	A/G	30.5	30.8	0.158	0.90 (0.78-1.04)	0.91 (0.86-0.96)

¹In total, 90 SNPs were genotyped. Of these, rs11130736 (chr3:167725349) and rs10955616 (chr8:113213815) failed quality control steps.

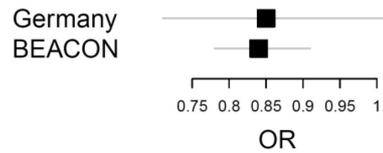
²Chromosome (Chr) and position (Pos) according to hg19. ³First allele represents the minor allele. ⁴Minor allele frequency (MAF) is given for cases and controls. ⁵Odds Ratio (OR) with 95% Confidence Interval (CI) is given for the minor allele.

Supporting Information Figure S1. Forest plots of the 5 EAC associated markers, namely rs2687201 (*FOXP1*), rs11771429 (*XRCC2*), rs11789015 (*BARX1*), rs9936833 (*FOXP1*) and rs4800353 (*GATA6*). The Odds Ratios (OR) and 95% Confidence Intervals (CI) from the replication study (Germany) and the previous GWAS (BEACON) were plotted. Except for the *FOXP1* marker rs9936833 (based on their discovery sample (3928 patients, 3207 controls)) the BEACON OR and CI are given for combined meta-analysis (5564 patients, 10118 controls).

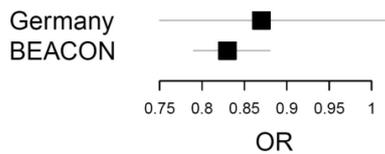
rs2687201



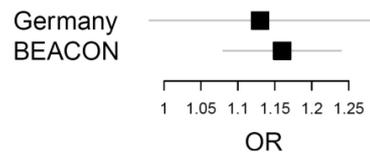
rs11771429



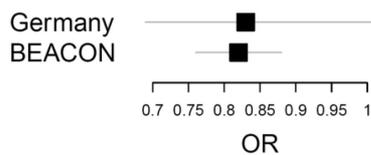
rs11789015



rs9936833



rs4800353



SHORT REPORT

The Barrett-associated variants at *GDF7* and *TBX5* also increase esophageal adenocarcinoma risk

Jessica Becker^{1,2}, Andrea May³, Christian Gerges⁴, Mario Anders^{5,6}, Claudia Schmidt⁷, Lothar Veits⁸, Tania Noder⁵, Rupert Mayershofer⁹, Nicole Kreuser¹⁰, Hendrik Manner¹¹, Marino Venerito¹², Jan-Hinnerk Hofer¹³, Orestis Lyros¹⁰, Constantin J. Ahlbrand¹⁴, Michael Arras¹⁴, Sebastian Hofer¹⁴, Sophie K. M. Heinrichs^{1,2}, Katharina Weise^{1,2}, Timo Hess^{1,2}, Anne C. Böhmer^{1,2}, Nils Kosiol^{1,2}, Ralf Kiesslich¹¹, Jakob R. Izbicki¹⁵, Arnulf H. Hölscher⁷, Elfriede Bollschweiler⁷, Peter Malfertheiner¹², Hauke Lang¹⁴, Markus Moehler¹⁶, Dietmar Lorenz¹⁷, Katja Ott^{18,19}, Thomas Schmidt¹⁹, Markus M. Nöthen^{1,2}, Andreas Hackelsberger²⁰, Brigitte Schumacher^{4,21}, Oliver Pech²², Yogesh Vashist¹⁵, Michael Vieth⁸, Josef Weismüller²³, Michael Knapp²⁴, Horst Neuhaus⁴, Thomas Rösch⁵, Christian Ell³, Ines Gockel^{10,a} & Johannes Schumacher^{1,2,a}

¹Institute of Human Genetics, University of Bonn, Bonn, Germany

²Department of Genomics, Life & Brain Center, University of Bonn, Bonn, Germany

³Department of Medicine II, Sana Klinikum, Offenbach, Germany

⁴Department of Internal Medicine II, Evangelisches Krankenhaus, Düsseldorf, Germany

⁵Department of Interdisciplinary Endoscopy, University Hospital Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

⁶Departments of Gastroenterology and Interdisciplinary Endoscopy, Vivantes Wenckebach-Klinikum, Berlin, Germany

⁷Department of General, Visceral and Cancer Surgery, University of Cologne, Cologne, Germany

⁸Institute of Pathology, Klinikum Bayreuth, Bayreuth, Germany

⁹Gastroenterologie am Burgweiher, Bonn, Germany

¹⁰Department of Visceral Transplant, Thoracic and Vascular Surgery, University Hospital of Leipzig, Leipzig, Germany

¹¹Department of Internal Medicine II, HSK Hospital, Wiesbaden, Germany

¹²Department of Gastroenterology, Hepatology and Infectious Diseases, Otto-von-Guericke University Hospital, Magdeburg, Germany

¹³Magen Darm Zentrum Wiener Platz, Cologne, Germany

¹⁴Department of General, Visceral and Transplant Surgery, University Medical Center, University of Mainz, Mainz, Germany

¹⁵Department of General, Visceral and Thoracic Surgery, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, University of Hamburg, Hamburg, Germany

¹⁶First Department of Internal Medicine, University Medical Center, University of Mainz, Mainz, Germany

¹⁷Departments of General and Visceral Surgery, Sana Klinikum, Offenbach, Germany

¹⁸Department of General, Visceral and Transplantation Surgery, University of Heidelberg, Heidelberg, Germany

¹⁹Department of General, Visceral and Thorax Surgery, RoMed Klinikum Rosenheim, Rosenheim, Germany

²⁰Gastropraxis, Wiesbaden, Germany

²¹Departments of Internal Medicine and Gastroenterology, Elisabeth Hospital, Essen, Germany

²²Departments of Gastroenterology and Interventional Endoscopy, St. John of God Hospital, Regensburg, Germany

²³Gastroenterologische Gemeinschaftspraxis, Koblenz, Germany

²⁴Institute for Medical Biometry, Informatics and Epidemiology, University of Bonn, Bonn, Germany

Keywords

Esophageal adenocarcinoma, genetic association study, *TBX5*, *GDF7*, *ALDH1A2*

Correspondence

Johannes Schumacher, Institute of Human Genetics, University of Bonn, Sigmund-Freud-Str. 25, 53127 Bonn, Germany. Tel: +49 228 287 51028; Fax: +49 228 287 51011; E-mail: johannes.schumacher@uni-bonn.de

Funding Information

I.G., M.Vieth, and J.S. received support for this work from the Else Kröner Fresenius Stiftung (EKFS); Individual grant 2013_A118. M.M.N. received support for this work from the Alfried

Abstract

Barrett's esophagus (BE) and esophageal adenocarcinoma (EAC) represent two stages within the esophagitis-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. Previously genetic risk factors have been identified that confer risk to BE and EAC development. However, to which extent the genetic variants confer risk to different stages of the BE/EAC sequence remains mainly unknown. In this study we analyzed three most recently identified BE variants at the genes *GDF7* (rs3072), *TBX5* (rs2701108), and *ALDH1A2* (rs3784262) separately in BE and EAC samples in order to determine their risk effects during BE/EAC sequence. Our data show that rs3072 at *GDF7* and rs2701108 at *TBX5* are also associated with EAC and conclude that both loci confer disease risk also at later stages of the BE/EAC sequence. In contrast, rs3784262 at *ALDH1A2* was highly significantly associated with BE, but showed no association with EAC. Our data do not provide evidence that the *ALDH1A2* locus confers equal risk in early and late stages of BE/EAC sequence.

Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung. This work contains substantial parts of the doctoral theses of C.J.A., M.A., and S.H.

Received: 15 October 2015; Revised: 16 December 2015; Accepted: 17 December 2015

doi: 10.1002/cam4.641

^aThese authors have contributed equally.

Introduction

Barrett's esophagus (BE) is characterized by replacement of squamous epithelium by metaplastic columnar epithelium and represents a common premalignant condition affecting 1–2% of the adult population in Western developed countries [1]. Individuals with BE have a 2–4% life time risk of esophageal adenocarcinoma (EAC) [2], which presents the end point in the esophagitis-metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence. Chronic inflammation due to gastroesophageal reflux disease (GERD) is the predominant etiologic factor for BE [3]. GERD and thereby BE risk is further influenced by hiatal hernia and obesity [3]. In addition, genetic factors play a role in BE and EAC development. So far, two genome-wide association studies (GWAS) for BE have been published. Su et al. used a discovery sample of 1852 BE cases and 5172 controls as well as several replication samples (total of 5986 patients and 12,825 controls) [4]. They identified genome-wide significant BE association at the HLA-region on chromosome 6p21 and near *FOXP1* on chromosome 16q24. In a following study using 318 patients and 431 controls it has been shown that both loci confer also EAC risk [5]. The second GWAS by Levine et al. used a combined discovery BE/EAC sample consisting of 2416 BE cases and 1516 EAC cases as well as 3209 controls [6]. Their best findings were followed up in a replication sample (1633 BE/EAC patients and 6911 controls), which lead to genome-wide significant associations near *CRTC1* on chromosome 19p13, *BARX1* on chromosome 9q22 and *FOXP1* on chromosome 3p13. Except for the finding at *CRTC1* the associations near *BARX1* and *FOXP1* have been independently replicated in a sample of 1065 EAC cases and 1019 controls [7].

In addition to these loci, three BE associations have been published most recently [8]. The replication of the GWAS in BE by Sue et al. was extended to a total of 8306 BE cases and 15,890 controls, in which additional 65 prioritized SNPs from the discovery phase were genotyped [4]. This lead to genome-wide significant BE

associations at rs3072 on chromosome 2p24 and at rs2701108 on chromosome 12q24 [8]. Within the chromosomal 2 region *GDF7* represents the most promising risk gene and *TBX5* within the chromosomal 12 region. In addition, the authors performed a meta-analysis using both published GWAS datasets and followed up the most significant associations in their replication samples. This lead to an additional genome-wide significant BE association at rs3784262 on chromosome 15q22 with *ALDH1A2* being the most promising risk gene at this locus [8].

In this study, we aimed at replicating the observed BE associations at *GDF7*, *TBX5*, and *ALDH1A2*. In addition, we tested whether the implicated loci are also conferring risk to EAC and if so, whether the risk effects differ between BE and EAC.

Material and Methods

Our sample consisted of 542 BE and 1106 EAC cases as well as 1602 controls, all of German descent. In all cases the diagnosis of BE or EAC was histopathologically confirmed. Controls were a population-based sample from the Heinz Nixdorf Recall (HNR) study, a population-based cohort to study risk factors for cardiovascular diseases [9]. All participants signed informed consent and the study was approved by ethics committees from the Universities of Bonn and Leipzig (Germany). Although none of the controls were diagnosed with EAC, they were not screened for Barrett's esophagus status. The use of unscreened controls may have led to a decrease in statistical power. However, as the prevalence of BE is only 1–2% in the general population [1], the power of the present association study should not have been substantially reduced by the use of unscreened controls [10]. In BE, 171 cases were females and 371 were males, whereas 134 EAC cases were females and 972 EAC cases males. In controls, 802 were females and 800 were males.

In patients, genotyping of all three reported BE risk variants (rs3072, rs2701108, rs3784262) was done using the Sequenom MassARRAY iPLEX Gold[®] system (Sequenom, San Diego, USA). For quality control intra- and interplate duplicates were genotyped. In addition, negative controls (H₂O) were added on each 384 well plate in order to exclude contamination. Clusterplot of each SNP was visually checked and manually corrected if necessary. In controls, genotypes for all three markers were obtained from Illumina's HumanOmniExpress BeadArrays (Illumina, San Diego, USA). The genome-wide data of the control sample have been previously used in several GWAS on different traits [11–13].

All genotype data underwent different quality control steps, including Hardy-Weinberg equilibrium $P > 0.001$ and call rate $>99\%$. Single-marker association analyses including sex as covariate were performed separately for

BE, EAC, and BE/EAC. In addition, for each of the three sample sets the presence of sex-specific association was tested. SAS software (SAS 8.02; SAS Institute Inc, Cary, NC) was used for the quality control as well as the single-marker association analyses.

Results

Table 1 shows the results of the case–control comparison in BE, EAC, and in the combined sample. In BE we could replicate the association at rs3784262 near *ALDH1A2* with $P = 9.70 \times 10^{-04}$ (RR = 0.79, Table 1), the same allele was disease-conferring as previously reported [8]. In addition, the same alleles at rs3072 near *GDF7* and at rs2701108 near *TBX5* that conferred BE risk in the previously published study [8] were more prevalent in patients than in controls (RR = 1.05 and RR = 0.87, respectively), although this was not significant (Table 1). In EAC we found association at rs3072 near *GDF7* with $P = 1.48 \times 10^{-03}$ (RR = 1.20) and at rs2701108 near *TBX5* with $P = 2.47 \times 10^{-02}$ (RR = 0.88, Table 1). Although the same allele at rs3784262 near *ALDH1A2* that confers BE risk was slightly more prevalent in patients than in controls, this association was not significant ($P = 1.30 \times 10^{-01}$, RR = 0.92, Table 1). Given the association findings obtained in the separate analyses, we found significant associations at all three loci in the combined BE/EAC sample. SNP rs3072 at *GDF7* was disease associated with $P = 7.53 \times 10^{-03}$ (RR = 1.15), rs2701108 at *TBX5* showed disease association with $P = 1.12 \times 10^{-02}$ (RR = 0.88), and rs3784262 at *ALDH1A2* with $P = 8.06 \times 10^{-03}$ (RR = 0.88, Table 1). At all three loci, we observed no evidence for sex-specific BE or EAC risk effects (data not shown).

Discussion

BE and EAC represent two stages within the esophagitis–metaplasia–dysplasia–adenocarcinoma sequence. It has been shown that genetic risk factors are relevant in the etiology of BE and EAC. However, this does not necessarily mean that genetic variants confer equal risk to all different stages of the disease sequence. In this study, we analyzed three previously published BE variants [8] in BE and EAC samples from Germany in order to determine their risk effects during BE/EAC sequence. Our data show that rs3072 at *GDF7* and rs2701108 at *TBX5* are also conferring risk to EAC. Although the genetic risk effect of rs2701108 was similar in BE and EAC (RR = 0.87 and RR = 0.88, respectively), the risk effect of rs3072 was even higher in EAC compared to BE (RR = 1.20 and RR = 1.05, respectively). We therefore conclude that both loci are conferring disease risk also at later stages of the BE/EAC sequence. In contrast, rs3784262 at *ALDH1A2* was highly significantly BE associated ($P = 9.70 \times 10^{-04}$), but showed no association with EAC ($P = 1.30 \times 10^{-01}$), although the size of the latter sample was substantially larger (542 BE vs. 1106 EAC cases). Although many reasons may have led to an overestimated risk effect of rs3784262 in BE and an underestimated risk effect of this variant in EAC, our data do not provide evidence that this locus confer equal risk in early and late stages of the BE/EAC sequence.

Based on their genomic location and biological function, *GDF7* near rs3072, *TBX5* at rs2701108 and *ALDH1A2* near rs3784262 are all promising risk-conferring genes for BE and EAC (summarized in Palles et al. [8]). *GDF7* encodes the BMP12 protein and thereby functions in the PMP pathway that has been already implicated in BE development [14]. Among various functions *TBX5* plays

Table 1. Association results for the three previously identified BE risk SNPs [8] in 542 BE and 1106 EAC cases as well as 1602 controls of German descent.

Phenotype	SNP	Chromosome	Position (bp) ¹	Allele ²	MAF ³ (%) in cases	MAF ³ (%) in controls	RR ⁴ (95% CI)	P value	Nearby gene ⁵
BE	rs3072	2p24	20,741,887	G/A	38.1	37.0	1.05 (0.91–1.21)	5.32×10^{-01}	<i>GDF7</i>
BE	rs2701108	12q24	113,158,644	G/A	35.5	38.6	0.87 (0.75–1.01)	6.38×10^{-02}	<i>TBX5</i>
BE	rs3784262	15q22	56,040,398	G/A	40.7	46.4	0.79 (0.68–0.91)	9.70×10^{-04}	<i>ALDH1A2</i>
EAC	rs3072	2p24	20,741,887	G/A	41.3	37.0	1.20 (1.07–1.34)	1.48×10^{-03}	<i>GDF7</i>
EAC	rs2701108	12q24	113,158,644	G/A	35.6	38.6	0.88 (0.78–0.98)	2.47×10^{-02}	<i>TBX5</i>
EAC	rs3784262	15q22	56,040,398	G/A	44.3	46.4	0.92 (0.82–1.03)	1.30×10^{-01}	<i>ALDH1A2</i>
BE/EAC	rs3072	2p24	20,741,887	G/A	40.3	37.0	1.15 (1.04–1.27)	7.53×10^{-03}	<i>GDF7</i>
BE/EAC	rs2701108	12q24	113,158,644	G/A	35.6	38.6	0.88 (0.79–0.97)	1.12×10^{-02}	<i>TBX5</i>
BE/EAC	rs3784262	15q22	56,040,398	G/A	43.1	46.4	0.88 (0.79–0.97)	8.06×10^{-03}	<i>ALDH1A2</i>

¹Chromosomal position according to hg18.

²First allele represents the minor allele.

³Minor allele frequency (MAF) is given for cases and controls.

⁴Relative Risk (RR) with 95% Confidence Interval (CI) indicating the genetic effect size is given for the minor allele.

⁵Nearest gene to the associated SNPs is shown.

a role in the development of diaphragmatic musculature [15] and genetic variation influencing *TBX5* may predispose to hiatus hernia and thereby GERD. *ALDH1A2* encodes for an enzyme that catalyzes the synthesis of retinoic acid and may also be involved in alcohol metabolism [16] and hence be relevant for inflammation. Of note, alcohol consumption has been discussed as a risk factor for BE/EAC [17, 18]. However, future studies (including animal models) have to show whether *GDF7*, *TBX5* and *ALDH1A2* represent the true risk-conferring genes at the disease associated loci. Furthermore, GWAS have led to the identification of more than 7 BE and EAC risk variants within the past 3 years [4–6, 8]. Aside from functional analyses in order to elucidate the pathophysiological mechanism at each implicated locus and to identify pathways in which risk genes are enriched, further GWAS and GWAS meta-analyses on larger and detailed phenotyped sample sizes with BE and EAC are needed. This also will allow for mapping of all risk variants and genes in the BE/EAC sequence in order to identify biomarkers that predict EAC conversion in future.

References

- Ronkainen, J., P. Aro, T. Storskrubb, S. E. Johansson, T. Lind, E. Bolling-Sternevald, et al. 2005. Prevalence of Barrett's esophagus in the general population: an endoscopic study. *Gastroenterology* 129:1825–1831.
- Jankowski, J., H. Barr, K. Wang, and B. Delaney. 2010. Diagnosis and management of Barrett's oesophagus. *BMJ* 341:c4551.
- Reid, B. J., X. Li, P. C. Galipeau, and T. L. Vaughan. 2010. Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: time for a new synthesis. *Nat. Rev. Cancer* 10:87–101.
- Su, Z., L. J. Gay, A. Strange, C. Palles, G. Band, D. C. Whiteman, et al. 2012. Common variants at the MHC locus and at chromosome 16q24.1 predispose to Barrett's esophagus. *Nat. Genet.* 44:1131–1136.
- Dura, P., E. M. van Veen, J. Salomon, R. H. te Morsche, H. M. Roelofs, J. O. Kristinsson, et al. 2013. Barrett associated MHC and FOXP1 variants also increase esophageal carcinoma risk. *Int. J. Cancer* 1:1751–1755.
- Levine, D. M., W. E. Ek, R. Zhang, X. Liu, L. Onstad, C. Sather, et al. 2013. A genome-wide association study identifies new susceptibility loci for esophageal adenocarcinoma and Barrett's esophagus. *Nat. Genet.* 45:1487–1493.
- Becker, J., A. May, C. Gerges, M. Anders, L. Veits, K. Weise, et al. 2015. Supportive evidence for FOXP1, BARX1, and FOXP1 as genetic risk loci for the development of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Med.* 4:1700–1704.
- Palles, C., L. Chegwidden, X. Li, J. M. Findlay, G. Farnham, F. Castro Giner, et al. 2015. Polymorphisms near *TBX5* and *GDF7* are associated with increased risk for Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 148:367–378.
- Schmermund, A., S. Mohlenkamp, A. Stang, D. Gronemeyer, R. Seibel, H. Hirche, et al. 2002. Assessment of clinically silent atherosclerotic disease and established and novel risk factors for predicting myocardial infarction and cardiac death in healthy middle-aged subjects: rationale and design of the Heinz Nixdorf RECALL Study. Risk Factors, Evaluation of Coronary Calcium and Lifestyle. *Am. Heart J.* 144:212–218.
- Moskvina, V., P. Holmans, K. M. Schmidt, and N. Craddock. 2005. Design of case-controls studies with unscreened controls. *Ann. Hum. Genet.* 69(Pt 5):566–576.
- Gockel, I., J. Becker, M. M. Wouters, S. Niebisch, H. R. Gockel, T. Hess, et al. 2014. Common variants in the HLA-DQ region confer susceptibility to idiopathic achalasia. *Nat. Genet.* 46:901–904.
- Ludwig, K. U., E. Mangold, S. Herms, S. Nowak, H. Reutter, A. Paul, et al. 2012. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nat. Genet.* 44:968–971.
- Mühleisen, T. W., M. Leber, T. G. Schulze, J. Strohmaier, F. Degenhardt, J. Treutlein, et al. 2014. Genome-wide association study reveals two new risk loci for bipolar disorder. *Nat. Commun.* 5:3339.
- Castillo, D., S. Puig, M. Iglesias, A. Seoane, C. de Bolos, V. Munitiz, et al. 2012. Activation of the BMP4 pathway and early expression of CDX2 characterize non-specialized columnar metaplasia in a human model of Barrett's esophagus. *J. Gastrointest Surg.* 16:227–237, discussion 37.
- Mori, A. D., and B. G. Bruneau. 2004. *TBX5* mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed. *Curr. Opin. Cardiol.* 19:211–215.
- Gyamfi, M. A., M. G. Kocsis, L. He, G. Dai, A. J. Mendy, and Y. J. Wan. 2006. The role of retinoid X receptor alpha in regulating alcohol metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319:360–368.
- Kubo, A., T. R. Levin, G. Block, G. J. Rumore, C. P. Jr Quesenberry, P. Buffler, et al. 2009. Alcohol types and sociodemographic characteristics as risk factors for Barrett's esophagus. *Gastroenterology* 136:806–815.
- Wong, A., and R. C. Fitzgerald. 2005. Epidemiologic risk factors for Barrett's esophagus and associated adenocarcinoma. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 3:1–10.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Univ.-Prof. Dr. _____, Klinik für Viszeral-, Transplantations-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Uniklinik Leipzig (vormals Universitätsmedizin Mainz), für die Überlassung dieses spannenden Themas. Liebe _____, mit großem Engagement hast Du mich auf dem Weg zur Promotion und ins Berufsleben mit fachlichen Ratschlägen, Hilfestellungen und Kritik unterstützt und mich in meiner persönlichen und beruflichen Entwicklung, insbesondere in meinem wissenschaftlichen Interesse, gefördert. Durch die enge Zusammenarbeit ist auch ein persönlicher Kontakt entstanden, den ich sehr schätze.

An dieser Stelle ist auch Herr Univ.-Prof. Dr. _____, Zentrum für Humangenetik der Uniklinik Marburg (vormals Uniklinik Bonn), herauszustellen, der das Forschungsvorhaben zusammen mit Frau Prof. _____ entscheidend weiterentwickelt und insbesondere den humangenetischen Teil meiner Arbeit mit seiner Expertise stets begleitet hat. Besten Dank lieber _____ für die vielen Ratschläge und Hilfestellungen, für die du immer ein offenes Ohr hattest.

Ich danke Herrn PD Dr. _____, I. Medizinische Klinik und Poliklinik der Universitätsmedizin Mainz, für die Übernahme des Zweitgutachtens und der Prüfung. Die klinische Zusammenarbeit mit Ihnen habe ich immer als sehr konstruktiv und angenehm empfunden.

Ich möchte mich bei meinen Kollegen Dr. _____ und Dr. _____, zu denen ich auch heute noch eine Freundschaft pflege, für die gute Zusammenarbeit bedanken. Herausstellen möchte ich _____, mit dem ich eine enge Freundschaft verbinde. In der Zeit der Promotion haben wir gemeinsam die Studie wesentlich mitentwickelt, Probleme konstruktiv gelöst und uns gegenseitig gestützt. Lieber _____, ich danke dir für die gute und produktive Zeit zusammen und würde mich freuen, wenn wir auch zukünftig in allen Lebenslagen weiterhin so einen guten Kontakt pflegen.

Zu guter Letzt möchte ich an dieser Stelle die Dissertation den Personen widmen, die mich in besonderer Art und Weise auf meinem Lebensweg begleiten:

Ich möchte meinen _____ herzlich danken, die mich immer mit Rat und Tat unterstützen und mir diesen Weg erst ermöglicht haben. Besonders bedanke ich mich bei meiner zukünftigen Frau _____ von Herzen, die mich in allen Lebensphasen begleitet und mich auf meinem Weg immer bestärkt. Ich freue mich sehr auf die gemeinsame Zukunft mit Dir.