

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

Generierung einer Biobank von Patienten mit Barrett-Karzinom und deren  
phänotypische Charakterisierung im Zuge einer genetischen Replikationsanalyse von  
12 SNP-Markern auf Chromosom 15 und 16

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

Vorgelegt von

Michael Arras  
aus Mainz

Mainz, 2019

Tag der Promotion:

30. Juni 2020

meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1 Der Barrett-Ösophagus .....	8
1.2 Das Barrett-Karzinom.....	8
1.2.1 Die besondere sozialmedizinische Bedeutung des Barrett-Karzinoms .....	9
1.2.2 Die Symptomatik des Barrett-Karzinoms .....	9
1.2.3 Mortalität und Früherkennung.....	9
1.2.4 Exogene Risikofaktoren .....	10
1.2.5 Genetische Einflussfaktoren .....	10
1.3 GWAS .....	11
1.4 Ziele der Dissertation .....	11
2. Literaturdiskussion .....	13
2.1 Über die komplex-genetische Vererbung des Barrett-Ösophagus/- Karzinoms .....	13
2.2 Zellpathologische Vorgänge beim Barrett-Ösophagus/-Karzinom .....	15
2.3 Etablierte genetische Risikovarianten beim Barrett-Ösophagus/- Karzinom .....	18
2.3.1 Assoziationsanalysen in kleinen Kollektiven (<500 Patienten) .....	18
2.3.2 Assoziationsstudien in großen Kollektiven (>1000 Patienten).....	22
2.4 Exogene Einflussfaktoren des Barrett-Ösophagus/-Karzinom .....	25
2.4.1 Unabhängige Risikofaktoren beim Barrett-Ösophagus/-Karzinom .....	25
2.4.2 Unbestätigte Risikofaktoren beim Barrett-Ösophagus/-Karzinom .....	28
2.4.3 Protektive Faktoren beim Barrett-Ösophagus/-Karzinom.....	29
2.5 Etablierte Methoden zur Genidentifikation bei multifaktoriellen Erkrankungen .....	31
2.5.1 Assoziationsuntersuchungen .....	31
2.5.2 Detaillierte bioinformatische und Genotyp-Phänotyp/-Umwelt-Analysen ..	33
2.5.3 Genomweite Assoziationsstudien .....	34
3. Material und Methoden.....	36
3.1 Rekrutierung und Phänotypisierung von Patienten mit einem Barrett- Karzinom .....	40

3.2 Erhobene Phänotypinformationen des Kollektivs an Patienten mit Barrett-Karzinom .....	46
3.3 Auswahl genetischer Varianten für die Replikationsanalyse und Genotyp-Phänotyp/-Umwelt-Analysen für das Fall-Kontroll-Kollektiv des Barrett-Konsortiums .....	51
3.4 Durchführung der Genotypisierung der genetischen Varianten Fall-Kontroll-Kollektiv des Barrett-Konsortiums .....	53
3.5 Biostatistische Analysen des Fall-Kontroll-Kollektivs des Barrett-Konsortiums .....	54
4. Ergebnisse .....	55
4.1 Darstellung der phänotypischen Merkmale des Kollektivs von 1.027 Barrett-Karzinom-Patienten .....	55
4.2 Ergebnisse der Replikationsanalyse .....	56
4.3 Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen .....	59
5. Diskussion .....	61
6. Zusammenfassung .....	68
7. Literaturverzeichnis .....	73
8. Anhang .....	83
9. Danksagung .....	105
10. Lebenslauf .....	106

## Abkürzungsverzeichnis

ADH3	Alcoholdehydrogenase 3
ALDH1A2	aldehydedehydrogenasefamily 1, subfamily A2
aOR	adjusted Odds Ratio
APC	Adenomatous-polyposis-coli
APE1	Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1
BARX1	BARX homeobox 1
BCL2	B-cell lymphoma 2-encoded protein
BEACON	Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium
BER	Base excision repair
BK	Barrett-Karzinom
BMI	Body-Mass-Index
BMP	bone morphogenic protein
BMP12	Bone morphogenetic protein 12
BÖ	Barrett-Ösophagus
Bp	Basenpaare
CCND1	Cyclin D1
CDX1	Caudal type homeobox 1
CDX2	Caudal type homeobox 2
COX-2	Cyclooxygenase 2
CpG	C-Phosphat-G
CRTC1	Encoding CREB-regulated transcription coactivator 1
CYP1A1	Cytochrome P450-1A1
CYP1A1	Cytochrome P450IA1
DAPK	Death-Associated Protein kinase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
EAGLE	Esophageal Adenocarcinoma Genetics Consortium
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
ERCC1	Excision repair cross-complementation group 1
EGF	Epidermal Growth Factor
FOXP1	Forkhead box protein P1

FOXF1	Forkhead box protein F1
G4b	Genes for barrett's
GDF7	Growth differentiation factor 7
GERD	Gastroesophageal Reflux Disease
GPx2	Glutathione peroxidase 2
GPx3	Glutathione peroxidase 3
GSTM1	Glutathione S-transferase M1
GSTM3	Glutathione S-transferase M3
GSTP1	Glutathione S-transferase P1
GSTT1	Glutathione S-transferase theta 1
GWAS	Genome-wide association study
HLA	Human Leukocyte Antigen
hOGG1	human 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1
HGIEN	High grade intraepithelialneoplasie
H. pylori	Helicobacter pylori
HR	Hazard Ratio
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IL-1	Interleukin 1
IL-4	Interleukin 4
IL-6	Interleukin 6
IL10	Interleukin 10
IL-1B	Interleukin 1 $\beta$
IL1-RN	Interleukin 1 receptorantagonist
iNOS	Nitricoxidesynthases (inducibleisoform)
KI	Konfidenzintervall
Kb	Kilo-Basen
LD	linkagedisequilibrium (Kopplungsungleichgewicht)
LGIEN	Low grade intraepithelialneoplasie
LOH	loss of heterozygosity
MALDI-ToF-MS	Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry
mEH	microsomal epoxide hydrolase

MGMT	O6-Methylguanin-DNS-Methyltransferase
Min.	Minuten
Mio.	Millionen
MnSOD	Manganesesuperoxidedismutase
mRNA	Messenger ribonukleotid-acid
NAT1	N-acetyltransferase 1
NER	Nucleotide excision repair pathway
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
NGS	Next Generation Sequencing
NQO1	NAD(P)H dehydrogenase quinone 1
NSAID	Non-steroidal anti-inflammatory drug
OR	Odds Ratio
OGJAK	Oesophagogastric junctional adenocarcinoma
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
p 16 (CDKN2A)	Protein 15 (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A)
p53	Protein 53
Prof.	Professor
py	pack-years
ROS	Reactive oxygen species
RR	Relatives Risiko
SNP	single nucleotide polymorphism
Sog.	sogenannt
SOP	Standard Operation Procedure
TBX5	T-box 5
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor alpha
tSNPs	tagging single nucleotide polymorphisms
URL	Uniform resource locator
vs.	versus
WTCC2	Wellcome Trust Case Control Consortium 2
XPC	Xerodermapigmentosum complementation group C
XPB	Xerodermapigmentosum complementation group D



XRCC1	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1
XRCC3	X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 3

## Tabellenverzeichnis

### Tabelle 1

Bisher durchgeführte Kandidatengenanalysen 1990-2015.....20

### Tabelle 2

Genomweit assoziierte Risikovarianten der ersten GWAS 2012.....23

### Tabelle 3

Genomweit assoziierte Risikovarianten der zweiten GWAS 2013.....23

### Tabelle 4

Genomweit assoziierte Risikovarianten der Replikations-GWAS 2015 .....24

### Tabelle 5

Kooperationspartner und klinische Zentren des g4b, Rekrutierungsbeginn und Anzahl rekrutierter Patienten .....36

### Tabelle 6

Zentraleuropäische Länder deren Patientenkollektiv zur Studienteilnahme geeignet war .....42

### Tabelle 7

Anzahl der über Fragebogen und Erfassungsbogen rekrutierten Patienten.....47

### Tabelle 8

Auflistung aller Daten, die im Rahmen der Studie durch Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen auf Assoziation hin untersucht wurden .....48

Tabelle 9:

Auflistung aller Daten, die im Rahmen Vorliegender Arbeit durch Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen auf Assoziation hin untersucht wurden ..... 51

Tabelle 10

SNPs auf Chromosom 15 und 16, die Einzug in die Replikationsanalysen und Genotyp-Phänotyp/Genotyp-Umwelt-Assoziationsuntersuchungen fanden ..... 53

Tabelle 11

Ergebnisse der Replikationsanalyse von 12 genetischen Varianten auf Chromosom 15 und 16, die im Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums krankheitsassoziiert waren, anhand des Fall-Kontroll-Kollektivs des Barrett-Konsortiums von 1.064 Patienten und 1.019 Kontrollen ..... 57

Tabelle 12

Ergebnisse der Replikationsanalyse von 12 genetischen Varianten auf Chromosom 15 und 16, die im Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums krankheitsassoziiert waren, anhand des Fall-Kontroll-Kollektivs des Barrett-Konsortiums mit 938 männlichen Patienten und 498 männlichen Kontrollen sowie von 127 weiblichen Patienten und 521 weiblichen Kontrollen ..... 58

Tabelle 13

Signifikante Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp/Genotyp-Umwelt Analysen von 7 Subphänotypen des Patientenkollektivs die auf Assoziation zu genetischen Varianten hin untersucht worden waren und im Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums krankheitsassoziiert waren ..... 60

Tabelle 14

Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp/Genotyp-Umwelt Analysen von 27 Phänotypen des Patientenkollektivs die auf Assoziation zu genetischen Varianten hin untersucht worden waren und im Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums krankheitsassoziiert waren ..... 83

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung Nr. 1:	Relation von SNP, Haplotyp und tagging-SNP .....	33
Abbildung Nr. 2:	Organisation des Barrett Konsortiums .....	39
Abbildung Nr. 3:	Ein- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme .....	41
Abbildung Nr. 4:	Inhalt des Fragebogens sowie des Erfassungsbogens.....	43
Abbildung Nr. 5:	Inhalt des Rekrutierungs-Sets für den Patienten .....	43
Abbildung Nr. 6:	Ablauf der Rekrutierung.....	46

## 1. Einleitung

### 1.1 Der Barrett-Ösophagus

Norman Rupert Barrett (\* 16. Mai 1903, Adelaide; † 8. Januar 1979, London) war ein britischer Chirurg mit australischen Wurzeln. Er beschrieb im Jahr 1957 als erster ein "gastrales Epithel, das den unteren Teil der anatomischen Speiseröhre bedeckt", welches später in der Medizin nach ihm benannt werden sollte. (1, 2)

Der "Barrett-Ösophagus" (im weiteren Verlauf auch als BÖ bezeichnet) stellt genauer gesagt eine metaplastische Umwandlung des Plattenepithels oberhalb des gastroösophagealen Überganges in ein hochprismatisches Zylinderepithel mit Becherzellen dar, dessen Hauptursache der Reflux von saurem Mageninhalt in die Speiseröhre ist (3, 4). Dies tritt auf bei ungefähr 0,5 bis 3% der Bevölkerung (1, 5). Dabei korrelieren die Dauer und Schwere der Refluxsymptome mit dem Risiko der Entstehung, diese können jedoch auch vollständig fehlen (5-7). Durch bisher nicht ausreichend erforschte Prozesse kann sich nun das metaplastische Epithel des Ösophagus zu einer intraepithelialen Neoplasie entwickeln, die je nach Ausprägung (low- oder high-grade Dysplasie) mit einem unterschiedlich hohen Risiko behaftet ist, in ein invasiv glandulär differenziertes Adenokarzinom überzugehen (1, 3).

### 1.2 Das Barrett-Karzinom

Der Barrett-Ösophagus gilt mit einer Konversionsrate von 0,5-1% pro Jahr (1, 5, 7) als bisher einzig bekannte Präkanzerose des invasiv glandulären Barrett-Adenokarzinoms (im weiteren Verlauf auch als BK bezeichnet) (1). Die Wahrscheinlichkeit gegenüber der Normalbevölkerung bei vorliegendem Barrett-Ösophagus ein Barrett-Karzinom zu entwickeln ist demnach um das 30-100-fache erhöht (1, 5, 8), wobei das Geschlecht eine maßgebliche Rolle spielt, da Männer im Durchschnitt drei- bis achtmal häufiger an einem Barrett-Karzinom erkranken, als Frauen (4).

### 1.2.1 Die besondere sozialmedizinische Bedeutung des Barrett-Karzinoms

Noch 1975 waren 75% der in den USA diagnostizierten Krebserkrankungen der Speiseröhre Karzinome des Plattenepithels. Lediglich bei 25% der Fälle handelte es sich um Barrett-Adenokarzinome. Aus noch ungeklärten Gründen stieg die Inzidenz der Adenokarzinome unter weißen männlichen Patienten in den kommenden Jahren von 0,4/100.000 Einwohner im Jahr 1975 auf 2,58/100.000 Einwohner im Jahre 2009(9). Dies bedeutet einen Anstieg um über 600% (10, 11), wodurch die Plattenepithelkarzinome von ihrem Platz als häufigste Krebserkrankung der Speiseröhre in den Vereinigten Staaten verdrängt wurden (9). Generell stellt es in den westlichen Industrienationen seit 1970 unter den Tumoren des Verdauungstraktes die Krebserkrankung mit der höchsten Zuwachsrate dar (12). Im Hinblick auf eine 5 Jahres-Überlebensrate von nur 10 - 20% (13-15) erklärt sich die Prägnanz dieser Entwicklung. Geschuldet ist dies zum einen einer frühen Metastasierung des Barrett-Adenokarzinoms aufgrund des fehlenden Serosaüberzuges der cervikalen und thorakalen Speiseröhre (16), zum anderen der erst spät auftretenden Symptomatik bei Erkrankung, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

### 1.2.2 Die Symptomatik des Barrett-Karzinoms

Von Patienten um den Zeitpunkt der Diagnose geschilderte Symptome des Barrett-Karzinoms sind Dysphagie (74%), Gewichtsverlust (57%), Schmerzen beim Schlucken der Nahrung (17%), langjährige Refluxbeschwerden, Dyspnoe, Husten, Heiserkeit und/oder retrosternale Schmerzen(17). Hierbei wird ersichtlich, dass die meisten dieser Symptome bereits auf eine fortgeschrittene Symptomatik deuten lassen, was die Fragestellung einer diagnostischen Früherkennung aufwirft.

### 1.2.3. Mortalität und Früherkennung

Abgesehen von der Tatsache, dass Früherkennungsmaßnahmen wie die regelmäßige Durchführung einer Endoskopie keine Belege für eine signifikante Reduktion von Todesfällen ergab (18), berechnete Sikkema et al. in einer

Metaanalyse zur Mortalität bei Patienten mit Barrett-Ösophagus, dass lediglich 7% der Patienten mit Barrett Ösophagus an den Folgen des Barrett-Karzinoms verstarben und somit rund 93% aufgrund einer anderen Erkrankung (19). Ursächlich hierfür ist die niedrige Konversionsrate vom Barrett-Ösophagus zum Karzinom von 0,5-1% (1, 5, 7). Wenngleich also die Erkrankung ein schwerwiegendes klinisches Erscheinungsbild aufweist, untergräbt dies dennoch das Argument, dass die derzeitigen Früherkennungsmaßnahmen einen signifikanten Nutzen aufweisen, geschweige denn kosteneffizient sind (5, 7, 20).

Umso bedeutender stellt diese Erkenntnis die Notwendigkeit der Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge in den Vordergrund, welche an der Entstehung des Barrett-Karzinoms beteiligt sind und möglicherweise Biomarker zur Prävention und Prognose oder neue therapeutische Angriffspunkte liefern könnten

#### 1.2.4 Exogene Risikofaktoren

Um jene pathophysiologischen Vorgänge zu verstehen, gilt es, sich mit exogenen Risikofaktoren als auch mit genetischen Einflussfaktoren auseinander zu setzen.

Als gesicherte exogene Risikofaktoren, die zur Entstehung eines Barrett-Ösophagus/-Karzinoms beitragen, gelten Nikotinkonsum und stammbetonte Adipositas, das Vorliegen einer Hiatushernie, männliches Geschlecht sowie als Hauptrisikofaktor der gastroösophagealen Reflux (GERD) (1, 7, 21, 22). Aber auch die Einnahme bestimmter Medikamente, wie ACE-Hemmer oder  $\beta$ -Blockern, und die Zugehörigkeit zu einer höheren Bildungsschicht werden derzeit noch als Risikofaktoren diskutiert (17, 23). Diese exogenen Risikofaktoren dürfen nicht nur isoliert betrachtet werden, sie können auch mit genetischen Einflussfaktoren interagieren und damit der Entstehung des Barrett-Karzinoms ursächlich zugrunde liegen.

#### 1.2.5 Genetische Einflussfaktoren

Trotz aller identifizierten exogenen Risikofaktoren entwickeln nur auffällig wenige Patienten mit Barrett-Ösophagus ein Barrett-Adenokarzinom (20). Dies liegt daran, dass das Barrett-Karzinom als multifaktorielle Erkrankung anzusehen ist, deren

Entstehung durch genetische Disposition begünstigt wird. Es liegen also neben exogenen auch genetische Risikovarianten vor, die zwar nur relativ geringe Effektstärken aufweisen (24) und daher auch in der gesunden Allgemeinbevölkerung vorkommen, jedoch an der Pathophysiologie multifaktorieller Erkrankungen beteiligt sind.

### 1.3 Genomweite Assoziationsstudie (GWAS)

Um genetische Risikovarianten bei multifaktoriellen Krankheiten identifizieren zu können, bedient man sich genomweiten Assoziationsstudien (GWAS). Die Allelverteilung jeder genetischen Variante wird dabei in Fall-Kontroll-Kollektiven auf das Vorliegen einer signifikanten Assoziation untersucht. Dies erfordert jedoch relativ große Kollektive, da der Signifikanzwert bei GWAS aufgrund des multiplen Testens nicht wie gewöhnlich bei  $p = 5 \times 10^{-02}$ , sondern bei  $p = 5 \times 10^{-08}$  liegt (25, 26).

Durch GWAS haben Su et al., Levine et al. sowie Palles et al. bereits 7 Risikovarianten für die Entstehung eines Barrett-Ösophagus identifizieren können (27-29) (s. Tabelle 2,3,4).

### 1.4 Ziele der Dissertation

Hauptziel dieser Dissertation war die Implementierung eines großen Kollektivs von Patienten mit histopathologisch gesichertem Barrett-Karzinom zwecks Realisierung der folgenden Punkte:

1. Phänotypisierung des Kollektivs anhand strukturierter Interviews betreffend den Patienten, seine Familie und seine Umwelt;
2. Erfassung exogener Risikofaktoren und klinischer Prägnanztypen;
3. Durchführung einer molekulargenetischer Replikationsanalyse mit 12 genetischen Varianten auf Chromosom 15 und 16, welche in bereits vorliegenden GWAS krankheitsassoziiert waren;



4. Durchführung von Genotyp-Phänotyp-Analysen um besagte genetische Varianten auf deren Wechselwirkung mit den erhobenen Phänotypdaten zu testen;
5. Durchführung von Genotyp-Umwelt-Analysen um besagte genetische Varianten auf deren Wechselwirkung mit den erhobenen Umweltfaktoren zu testen

## 2. Literaturdiskussion

### 2.1 Über die komplex-genetische Vererbung des Barrett-Ösophagus/-Karzinoms

Wie bereits beschrieben zählt das Barrett-Karzinom nicht zu den monogen-, sondern zu den multifaktoriell vererbten Krankheiten. Es ist also nicht nur eine Risikovariante eines Gens, sondern eine Vielzahl an Risikovarianten in unterschiedlichen Genen an der Entstehung beteiligt, die auch in der phänotypisch gesunden Bevölkerung vorkommen. Kommt es bei einer Person zu einer Anreicherung von genetischen Risikovarianten, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten der Erkrankung. Man spricht daher von einer komplex-genetischen Vererbung.

Es waren Familienstudien, die initial auf eine komplex genetische Vererbung der Barrett-Erkrankung hinwiesen. Im Folgenden sollen daher einige historische Abschnitte chronologisch die Entwicklung dieser Erkenntnis wiedergeben.

1978 beschrieben Humphries et al. in einer Publikation, welche sich mit dem endoskopischen Spektrum des Barrett-Ösophagus befasste, einen an Barrett-Ösophagus erkrankten 16-jährigen Jungen, dessen Vater und Bruder ebenfalls betroffen waren (30) und legte damit einen ersten Grundstock für die Vermutung einer familiären Komponente der Erkrankung.

1983 beschrieb Gelfand M.D. daraufhin den Fall von zwei sechzigjährigen Zwillingen, die an retrosternalem Brennen, Regurgitation und Dysphagie litten und deren Ösophagus-Biopsie das histologische Bild eines Barrett-Ösophagus zeigte. Er ging damals noch davon aus, dies könne darauf hinweisen, dass "die Metaplasie zu einem bestimmten Grad kongenitalen Ursprungs ist" (31).

Im Jahr 1985 berichteten Crabb et al. über die Familie eines älteren Mannes mit Barrett-Ösophagus, dessen 5 Kinder an einem GERD oder einer Ösophagitis litten, von denen drei "eindeutig" einen Barrett-Ösophagus entwickelt hatten (32).

Aufgrund dieser Fallbeobachtungen kam es zur Durchführung weiterer systematischer Familienstudien, die eine signifikant höhere Erkrankungsrate bei Familien von Indexpatienten nachwiesen.

1992 publizierten Jochem et al. über eine Familie mit sechs Fällen von Barrett-Ösophagus, die sich über 3 Generationen erstreckten und von denen drei ein Adenokarzinom entwickelten. Er legte die Schlussfolgerung nahe, dass "das Vererbungsmuster mit einem autosomal dominanten Muster mit nahezu vollständiger

Penetranz vergleichbar ist" (33). Zu der gleichen Schlussfolgerung kamen auch Eng et al. in einer Familienstudie im Jahre 1993, die dies auch weiterführend auf die gastroösophageale Refluxkrankheit bezogen (34).

Anzumerken ist jedoch, dass in den beiden letztgenannten Studien nur jeweils eine Familie untersucht wurde und somit eine geringe Anzahl an Patienten zugrunde lag. 1991 beschrieb eine Studie der International Union Against Cancer (35) mit 111 histologisch gesicherten Barrett-Ösophagus-Patienten eine 2,6-fach höhere Inzidenz bei Männern als bei Frauen (95% KI = 1,7-4,0), wobei die National Barrett's Oesophagus Registry 1991 (36) zwar nur einen Faktor von 1,5 errechnete (95% KI = 1,1-2,3), jedoch ein dreifach erhöhtes Risiko eines Barrett-Adenokarzinoms unter Männern feststellte.

2003 bestätigten Drovdic et al. eine erhöhte Inzidenz bei männlichen Patienten und führten selbst eine Studie mit 957 Probanden in 70 Familien durch, unter denen sich 101 BÖ und 52 BK oder OGJAK-Patienten befanden. Sie stellten sowohl ein signifikant jüngeres Manifestationsalter von Patienten mit Barrett-Ösophagus/Karzinom mit positiver Familienanamnese fest, als auch eine frühere Manifestation beim männlichen Geschlecht (50,6 für BÖ bzw. 57,4 für BK bei Männern und 52,1 bzw. 63,5 bei Frauen). Außerdem sei eine familiäre Häufung zwar "seit mindestens drei Dekaden bekannt..." jedoch würde immer noch "der überwiegende Anteil der BÖ und BK sporadisch auftreten" (37).

Munitiz et al. bestätigten in einer Literatursichtung im Jahr 2008 ein früheres und häufigeres Auftreten bei familiären Fällen und hoben hervor, dass die Entartungsrate ebenfalls weitaus höher liegt, als die 0,5% Marke bei sporadischem Auftreten (38).

Diese Beobachtung konnten Chak et al. in einer im Jahr 2004 durchgeführten Screeningstudie zur Identifikation von Barrett-Ösophagus/-Karzinom bei Verwandten von Indexpatienten bestätigen. 138 Patienten mit BK oder BÖ wurden in die Studie eingeschlossen, davon 111 mit isoliertem und 27 mit familiärem Vorkommen von BÖ/BK. Bei rund 13 (21%) der 62 Verwandten ersten Grades war ein BÖ/BK nachweisbar (39).

2006 führten Chak et al. in der bis dahin größten Studie zur Erfassung der familiären Häufung eine Umfrage an sechs Kliniken mittels strukturierter Fragebögen durch, die ausschließlich an Barrett-Ösophagus/-Karzinom- und Patienten mit einem Adenokarzinom der Kardia ausgehändigt wurden (40).

71 von 411 Patienten berichteten von einem weiteren Familienmitglied ersten oder zweiten Grades mit Verdacht auf eine Speiseröhrenerkrankung.

Nach Prüfung der medizinischen Daten konnte bei rund 30 der 411 Patienten (7,3%) ein Barrett-Ösophagus/-Karzinom oder ein Adenokarzinom der Kardia nachgewiesen werden.

Die familiäre Häufung und das Vererbungsmuster oben genannter Studien legten nun in fast allen Fällen den Schluss nahe, dass der Genese des Barrett-Ösophagus/-Karzinoms eine komplex-genetische Vererbung mit multifaktorieller Genese und kein monogenes Vererbungsmuster zugrunde liegt.

## 2.2 Zellpathologische Vorgänge beim Barrett-Ösophagus/-Karzinom

Es gab zahlreiche zellpathologische Thesen über den Zusammenhang von Reflux und der Entstehung des Barrett-Ösophagus.

In einer These ging man von einer Migration vom Zylinderepithel des Magens in den distalen Ösophagus zwecks Reparatur des vom Reflux beschädigten Epithels aus. Dies wurde jedoch verworfen, da sich zum einen das metaplastische Epithel von dem des Magens unterschied, und zum anderen, weil es gelang, im Tiermodell Speiseröhre und Magen voneinander zu separieren, mit dem Ergebnis, dass sich dennoch eine Barrett-Metaplasie ausbildete (41, 42).

Eine andere These beschreibt, wie multipotente Knochenmark-Stammzellen das Epithel der beschädigten Speiseröhre reparieren und dabei eine Barrett-Metaplasie entstehen lassen. Im Tierversuch entwickelten die Stammzellen jedoch nicht das Potential, sich aus Mesoderm zu Epithel zu differenzieren. Außerdem wies nichts auf die Differenzierung zu einer Vorläuferzelle des Barrett-Epithels hin (42).

Die mit Abstand populärste These ist die Transdifferentiations-Theorie.

Diese geht davon aus, dass der Reflux die Stammzellen in der Basalzellschicht dazu stimuliert eine Differenzierung zu metaplastischem Barrett-Epithel anstatt zu normalem Plattenepithel zu vollziehen (41, 42).

Der Reflux mit den darin enthaltenen Magen- und Gallensäuren induziert dabei eine chronische Inflammation von lokalem-, aber auch systemischen Charakter. Diese führt unter anderem über die Bildung von Sauerstoffradikalen (reaktive oxygenspecies, ROS), die Induktion von Kinase-Pathways, der Veränderung von Transkriptionsfaktoren (CDX, NF-κB) und der Produktion von Zytokinen und Enzymen zur Barrett-Karzinogenese (43).

Folgende Faktoren sind hieran beteiligt:

- Die Induktion des anti-apoptotischen NF- $\kappa$ B-Proteins:  
Eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B ist in vielen Tumoren nachweisbar. Es ist unter anderem für die Regulation von Zelltod und Zellüberleben zuständig und kann so unter anderem die Transkription von Zytokinen (IL-1,6, TNF-alpha), Wachstumsfaktoren und anti-apoptotischen Proteinen (z.B. BCL-2) regulieren (41). Es wird angenommen, dass die durch Reflux ausgelöste chronische Inflammation über NF- $\kappa$ B anti-apoptotische Proteine induziert wird.  
NF- $\kappa$ B induziert auch die Caudalen Homöobox Gene CDX1 und CDX2 (44). Sie stellen wichtige Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung intestinalen Zylinderepithels und damit des metaplastischen Barrett-Epithels dar (41, 44, 45). In normaler Magen-Mucosa scheinen sie nicht exprimiert zu werden, sie sind jedoch physiologisch an der embryonalen Differenzierung des Intestinaltraktes beteiligt (46, 47). Wong et al. (48) konnten demnach die Expression von CDX1-Protein und mRNA in allen getesteten Barrett-Metaplasie-Proben nachweisen, jedoch in keiner für den Ösophagus physiologischen Plattenepithel-Probe. CDX-2-Protein und mRNA konnte bereits im Stadium der Ösophagitis, als auch in Barrett-Ösophagus und Barrett-Adenokarzinom-Proben, nachgewiesen werden (42, 44). CDX-2 scheint demnach bereits sehr früh an der Genese des Barrett-Karzinoms beteiligt zu sein.
- Die Induktion von epigenetische Veränderungen durch Inflammation (49).  
Hahn et al. (50) konnten in diesem Zusammenhang nachweisen, dass eine chronische Inflammation aberrante DNA-Methylierungen induzieren kann. Histon-Modifikationen sind ebenfalls nachweisbar.  
In Barrett-Ösophagus und BK nachgewiesene epigenetische Auswirkungen sind unter anderem Gene Silencing durch den Verlust chromosomaler Teilabschnitte (loss of heterozygosity, LOH). Dies konnten insbesondere auf Chromosom 3p21, 17p13.1, 9p21 und 5p21 nachgewiesen werden. Die drei zuletzt genannten stellen jeweils den Locus für die Tumorsuppressoren-, Pro-apoptotische- und Zellzyklus-Kontroll-Gene p53, p16 und APC dar (51-53).

Die Methylierung pro-apoptotischer Gene wie DAPK (54) und des DNA-Reparatur-Gens O6-methylguanin-DNA methyltransferase (MGMT) (55), das wie bereits beschrieben Zellen vor mutagenen und karzinogenen Effekten schützt, wurde nachgewiesen. Im Bezug auf den BÖ konnte bei der Glutathionperoxidase 3 (GPx3), das am zelleigenen Oxidationsschutz gegen radikale Sauerstoffatome (ROS) beteiligt ist, ebenfalls eine Methylierung nachgewiesen werden (56).

- Die Produktion von Sauerstoffradikalen (reaktive oxygen species ROS) wird außerdem durch die Inflammation selbst unterhalten. Sie besitzen die Eigenschaft, basische DNA-Moleküle zu oxygenieren und sich so toxisch auf die DNA auszuwirken. Hierdurch kann eine veränderte Transkription, genomische Instabilität und Replikationsfehler zustande kommen (43). ROS können des Weiteren auch NF-κB aktivieren (41).
- Gastroösophagealer Reflux scheint zusätzlich über einen ROS- induzierten Pfad die Expression von Cyclooxygenase-2 (COX-2) anzukurbeln (43). Diese reduziert Apoptose und Zell-Adhäsion, erhöht dabei die Zellproliferation, wirkt fördern auf die Angiogenese und trägt zum Schutz entarteter Zellen vor der Immunantwort bei (57). COX-2 wird zwar auch im normalen Ösophagus exprimiert, jedoch wurde eine signifikant erhöhte Expression im BÖ, wie auch in High Grade Dysplasie und BK nachgewiesen (44). Demnach geht eine neoplastische Progression der Barrett-Metaplasie laut Kandilet al. sowie Wilson et al. mit einer erhöhten COX-2 Expression einher (57, 58). COX-2 scheint dabei über die Bildung von Prostaglandinen in die Karzinogenese eingebunden zu sein, welche unter anderem neoplastische Eigenschaften besitzen (59). Die Exprimierung von COX-2 scheint wie CDX-2 relativ früh an der Karzinogenese beteiligt zu sein (58).

Die hier dargestellten zellpathologischen Vorgänge sind trotz intensiver Forschung immernoch nur lückenhaft verstanden worden und hinzukommen auch an der Bildung anderer onkologischer Krankheiten beteiligt.

Mit Hilfe des *Next-Generation-Sequencing* (NGS), über das schon kleine somatische Mutationen (sog. driver mutations) gesichtet werden können, erhofft man sich diese Abläufe in ihrem vollen Umfang darstellen und besser verstehen zu können (60).

## 2.3 Etablierte genetische Risikovarianten beim Barrett-Ösophagus/-Karzinom

### 2.3.1 Assoziationsanalysen in kleinen Kollektiven (<500 Patienten)

Auf der Suche nach genetischen Ursachen für die Entstehung des Barrett-Ösophagus und des Barrett-Karzinoms wurden zunächst Assoziationsuntersuchungen an Kandidatengen durchgeführt. Als Kandidatengen bezeichnet man Gene, denen aufgrund ihrer Funktion Bedeutung an der Entstehung einer Erkrankung zukommen könnte. Im Bezug auf den Barrett-Ösophagus und das Barrett-Karzinom handelt es sich beispielsweise um Gene, die an DNA-Reparaturprozessen, der Entwicklung der Speiseröhre, dem Metabolismus xenobiotischer Substanzen oder der Transkription von Regulatorproteinen beteiligt sind, aber auch um Gene, die eine Veränderung, - z.B. durch Methylierung infolge der chronischen Inflammation-, erfahren haben. Im Folgenden sollen beispielhaft einige dieser Kandidatengene beschrieben werden.

Gen für die O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT):

MGMT ist ein DNA-Reparaturprotein, das mutagene und karzinogene Effekte durch alkylierende Substanzen abfängt (55). Dass die Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promoter von MGMT und damit der Verlust oder die Reduzierung von MGMT mit gastrointestinalen Tumoren in Verbindung gebracht wird, ist bekannt (61, 62). Scheinbar stellt es jedoch auch eine frühe Komponente bei der Entstehung des Barrett-Karzinoms dar, wie Kuester et al. in der Analyse von 133 Patienten feststellen konnte. Eine Hypermethylierung kam dabei in 78,9% der Barrett-Adenokarzinome vor, in 100% der intraepithelialen Neoplasien sowie in 88,9% der Metaplasien, jedoch nur in 21,4% des normalen Epithels der Speiseröhre ( $p < 0,001$ ) und korrelierte signifikant mit einer Downregulation von MGMT ( $p = 0,048$ ) und der Protein-Expression ( $p = 0,02$ ) (55). Doecke et al. konnte in diesem Zusammenhang eine Assoziation der MGMT-Allele von rs12268840 und I143V mit einem erhöhten Risiko für ein Barrett-Karzinom nachweisen (63).

Gene für den Nucleotide excision repair pathway (NER):

NER ist unter anderem an der Reparatur von UV-induzierten Schäden sowie von Crosslinks involviert (64), wodurch sich entsprechende Gene hervorragend als Kandidaten für die Untersuchung von Polymorphismen, die mit der Entstehung von Barrett-Karzinomen assoziiert sein können, eignen.

XPD (xeroderma pigmentosum group D) und ERCC1 (Excision repair cross-complementgroup 1) sind Schlüsselproteine dieses Pathways (65) und wurden von Tse et al. in einer Studie mit 312BK-Fällen und 454 Kontrollen auf Assoziation analysiert. Die Polymorphismen Lys 751 Gln in XPD sowie 8092C/A und 118C/T in ERCC1 wurden signifikant mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung eines BK assoziiert. Ferguson et al. untersuchte den Polymorphismus Lys 751Gln in XPD ebenfalls, konnte jedoch keinerlei Assoziation nachweisen (66). Diese Studie umfasste 212 BÖ, 210 BK-Patienten und 248 Kontrollen.

Gene für den Base excision repairpathway (BER):

Der BER-Pathway ist beteiligt an der Reparatur von Einzelstrangbrüchen, die durch Exposition gegenüber Sauerstoffradikalen (ROS), ionisierender Strahlung oder alkylierenden Substanzen ausgelöst wurden und stellt daher ein Kandidat für die Genese von Tumoren dar.

XRCC1 (X-ray repair cross-complement group 1), APE1 (AP endonuclease 1) und hOGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase) sind die Schlüsselproteine dieses Pathways (65). Für XRCC1 (Arg 399 Gln) sowie für APE 1 (Asp 148 Glu) und hOGG1 (Ser 326 Cys) konnte Tse et al. allerdings keine signifikante Assoziation nachweisen (64).

Ferguson et al. konnten die Studienergebnisse von Tse et al. für hOGG1 (Ser 326 Cys) und XRCC1 (Arg 399 Gln) in ihrer Arbeit bestätigen (66) und stellten ebenfalls keine Assoziation fest.

Gen für CCND1:

Das CCND1 Gen befindet sich auf Chromosom 11q13 und kodiert für Cyclin D1, welches ein Schlüsselprotein für den Übergang der G1 zur S-Phase im Zellzyklus darstellt (67). Das Protein Cyclin D1 wurde bereits in zahlreichen Studien mit der



Entstehung des BK in Verbindung gebracht (68, 69), wobei gerade dessen Überexpression mit einem signifikant höherem Risiko der Entstehung eines BK aus dem BÖ vergesellschaftet scheint (68).

Interessanterweise konnten Casson et al. in einer Studie mit 56 BK, 125 BÖ Patienten und 95 Kontrollen zwar ein signifikant erhöhtes Risiko von G780A in CCND1 für die Entstehung sowohl eines GERD, eines BÖ und eines BK zeigen, jedoch keine signifikante Assoziation dieser Variante mit der scheinbar karzinogenen Überexpression von Cyclin D1 feststellen (67).

Diese kurze Auflistung von Kandidatengenanalysen veranschaulicht zum einen, dass ein großes Bestreben nach der Identifikation von Risikovarianten für die Barrett-Erkrankung besteht. Zum anderen wird deutlich, dass Kollektive mit < 500 Patienten nicht geeignet sind, um Risikovarianten hypothesenfrei für die Barrett-Erkrankung mit einer ausreichenden statistischen Power nachzuweisen.

**Tabelle 1:** Bisher durchgeführte Kandidatengenanalysen 1990-2015

Gene	Typisierte Varianten (N)	Patienten (N)	Kontrollen (N)	Erstautor	Jahr
GSTM3	1	9 BK	200	(70)	1990
GSTP1	6	207 BK, 189 BÖ	223	(71)	1996
MnSOD	3	207 BK, 189 BÖ	223	(71)	1996
GPX2	2	207 BK, 189 BÖ	223	(71)	1996
NQO1	1	144 BK, 200 BÖ	94	(72)	1999
MnSOD	1	144 BK, 200 BÖ	94	(72)	1999
PTGS2	2	140 BK, 255 BÖ	NA	(73)	2002
IL-1B	1	108 BK	210	(74)	2003
IL-1RN	1	108 BK	210	(74)	2003
IL-4	1	108 BK	210	(74)	2003
IL-6	1	108 BK	210	(74)	2003
IL-10	3	108 BK	210	(74)	2003
TNF-A	1	108 BK	210	(74)	2003
XPD	2	56 BK <sup>1</sup> , 125 BÖ <sup>2</sup>	95	(75)	2004
XRCC1	2	56 BK, 125 BÖ	95	(75)	2004
XRCC3	1	56 BK, 125 BÖ	95	(75)	2004

XPC	1	56 BK,125 BÖ	95	(75)	2004
CCND1	1	56 BK, 125 BÖ	95	(67)	2005
MGMT	5	263 BK	1337	(63)	2008
ERCC1	1	263 BK	1337	(63)	2008
XPD	1	263 BK	1337	(63)	2008
XRCC1	1	263 BK	1337	(63)	2008
XPD	2	312 BK	454	(64)	2008
ERCC1	2	312 BK	454	(64)	2008
XRCC1	1	312 BK	454	(64)	2008
APE1	1	312 BK	454	(64)	2008
hOGG1	1	312 BK	454	(64)	2008
hOGG1	1	209 BK, 212 BÖ	248	(66)	2008
XRCC1	1	209 BK, 212 BÖ	248	(66)	2008
XPD	1	209 BK, 212 BÖ	248	(66)	2008
EGF	1	312 BK	447	(47)	2008
Cyclin D1	1	56 BK	253	(76)	2009
p 16	1	56 BK	253	(76)	2009
NQO1	1	140 BK	260	(77)	2009
XPD	3	96 BK	472	(78)	2010
XPC	1	96 BK	472	(78)	2010
XRCC1	1	96 BK	472	(78)	2010
XRCC3	1	96 BK	472	(78)	2010
GSTT1	1	9 BK	137	(79)	2010
GSTM1	1	9 BK	137	(79)	2010
GSTP1	1	9 BK	137	(79)	2010
CYP1A1	2	21 BK, 98 BÖ	247	(80)	2012
GSTP1	3	21 BK, 98 BÖ	247	(80)	2012
GSTM1	1	21 BK, 98 BÖ	247	(80)	2012
GSTT1	1	21 BK, 98 BÖ	247	(80)	2012
GSTM1	1	27 BK	130	(81)	2012
GSTT1	1	27 BK	130	(81)	2012
GSTP1	1	27 BK	130	(81)	2012
CYP1A1	1	27 BK	107	(81)	2012

COX2	1	209 BK, 212 BÖ	248	(82)	2013
iNOS	1	209 BK, 212 BÖ	248	(82)	2013
GSTT1	1	45 BK	45	(83)	2014
GSTM1	1	45 BK	45	(83)	2014
GSTP1	1	45 BK	45	(83)	2014
mEH	2	45 BK	45	(83)	2014
CYP1A1	1	45 BK	45	(83)	2014
NQO1	1	61 BK	252	(84)	2014
ADH3	1	114 BK und KA <sup>3</sup>	160	(85)	2015
GSTT1	1	67 BK	209	(86)	2015
GSTM1	1	67 BK	209	(86)	2015
GSTP1	1	67 BK	209	(86)	2015
NAT1	1	67 BK	209	(86)	2015
CYP1A1	1	67 BK	209	(86)	2015

<sup>1</sup>BK: Barrett-Karzinom

<sup>2</sup>BÖ: Barrett-Ösophagus

<sup>3</sup>KA: Kardia-Karzinom

### 2.3.2 Assoziationsstudien in großen Kollektiven (>1000 Patienten)

Nachdem Studien mit weniger als 500 Patienten sich als ungeeignet für den hypothesenfreien Nachweis von Risikovarianten für die Barrett-Erkrankung erwiesen hatten, wurden von 2012 bis 2015 zwei genomweite Assoziationsstudien (GWAS) und eine Replikationsanalyse einer GWAS publiziert. Hierbei wurden auch erstmals mehr als 1000 Patienten mit Barrett-Karzinom untersucht.

Das Esophageal Adenocarcinoma Genetics Consortium (EAGLE) und das Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2) publizierten die erste GWAS, die 1.852 BÖ-Patienten und 5.172 Kontrollen europäischer Abstammung umfassten (27).

Gefundene genetischen Assoziationen wurden in mehreren Replikationsstudien mit insgesamt 5.986 Patienten und 12.825 Kontrollen erneut auf Signifikanz getestet, wobei zwei Loci identifiziert werden konnten, in denen SNP-Marker dem teststatistischen Signifikanzwert einer GWAS von  $p < 5 \times 10^{-08}$  standhielten.

**Tabelle 2:** Genomweit assoziierte Risikovarianten der ersten GWAS 2012

EAGLE & WTCCC2 (Su et al.)					
Variante	Chromosom	Gen	Frequenz des Risikoallels bei Patienten	Frequenz des Risikoallels bei Kontrollen	Relatives Risiko (RR)
rs9257809	6p21	MHC	89%	87%	1,14
rs9936833	16q24	FOXF1	42%	37%	1,21

Das nächstgelegene proteinkodierende Gen des als signifikant befundenen SNP rs9936833 ist dabei FOXF1, welches in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor eine Teilhabe an Struktur und Entwicklung des Ösophagus aufweist und somit eine besonders interessante Risikovariante darstellt. Dagegen befindet sich der zweite SNP rs9257809 in der HLA-Region auf Chromosom 6p21. Aufgrund des ausgeprägten Kopplungsungleichgewichtes (LD) in diesem Bereich des Genoms (81) konnte allerdings kein plausibles Effektorgen dieser Assoziation benannt werden.

Das BEACON-Konsortium (Levine et al.) führte die zweite GWAS mit einem Kollektiv aus 3.928 Barrett-Ösophagus/-Karzinom-Patienten und 3.207 Kontrollen durch (28). Wie auch bei der ersten GWAS waren alle Teilnehmer europäischer Abstammung und signifikant assoziierte SNPs ( $n=94$  mit  $p < 10^{-04}$ ) wurden einer Replikationsanalyse mit 1.633 Patienten und 6.911 Kontrollen unterzogen. Zu beachten ist hierbei, dass es sich um eine Mischgruppe aus Barrett-Ösophagus und -Karzinom-Patienten handelte.

Drei Loci konnten in dieser GWAS die Signifikanzschwelle von  $p < 5 \times 10^{-08}$  erreichen.

**Tabelle 3:** Genomweit assoziierte Risikovarianten der zweiten GWAS 2013

BEACON-Konsortium (Levine et al.)					
Variante	Chromosom	Gen	Frequenz des Risikoallels bei Patienten	Frequenz des Risikoallels bei Kontrollen	Relatives Risiko (RR)
rs10419226	19p13	CRTC1	49,2	45,6	1,18
rs2687201	3p14	FOXP1	33,5	30,3	1,18
rs11789015	9q22	BARX1	74,4	71,7	1,2

Auch hier fanden sich SNPs in Bereichen, in denen Gene lokalisiert sind, die in Zusammenhang mit der Entwicklung der Speiseröhre stehen. SNP rs2687201 befindet sich nahe dem Transkriptionsfaktor FOXP1, welcher eine bedeutende Rolle

in der Ausdifferenzierung der Speiseröhre spielt. SNP rs11789015 liegt in der Nähe von BARX1, dem als Transkriptionsfaktor Bedeutung an der Entstehung der Barrett-Erkrankung zukommen könnte. Dagegen stellt rs10419226 einen SNP im Transkriptions-Koaktivator CRTC1 dar, dessen aberrante Aktivierung mit erhöhtem onkogenem Potential in Verbindung steht.

Die GWAS-Replikation, die durch Palles et al. (29) durchgeführt wurde und unter anderem vielversprechende Varianten des BEACON-Konsortiums beinhaltete, umfasste 8.306 Patienten mit BE und 15.890 Kontrollen. Durch die Analysen konnten zwei Loci mit einem teststatistischen Signifikanzwert von  $p < 5 \times 10^{-08}$  nachgewiesen werden (siehe unten). Außerdem wurde eine Meta-Analyse der beiden bisher publizierten GWAS durchgeführt, die zu einer genomweiten BÖ-Assoziation auf Chromosom 15q21 führte und so den SNP rs3784262 in der Nähe des Gens ALDH1A2 identifizierte.

**Tabelle 4:** Genomweit assoziierte Risikovarianten der GWAS-Replikation 2015

Palles et al.					
Variante	Chromosom	Gen	Frequenz des Risikoallels bei Patienten	Frequenz des Risikoallels bei Kontrollen	Relatives Risiko (RR)
rs3072	2p24	GDF7	41	36	1,14
rs2701108	12q24	TBX5	62	59	0,9

Die Variante rs3072 befindet sich nahe dem Protein-kodierenden Gen GDF7, welches für das BMP12 Protein im bone morphogenic protein pathway (BMP) kodiert, von dem angenommen wird, dass es an der Entwicklung der Speiseröhre beteiligt ist. GDF7 spielt außerdem eine Rolle in der Regulierung von Pathways, die einen Einfluss auf die Entwicklung der Speiseröhre durch FOXF1 und TBX5 haben (29).

SNP rs2701108 befindet sich nahe des Transkriptionsfaktor kodierenden Gens TBX5, welches an der Regulation der Entwicklung der Speiseröhre und des Herzens involviert ist. Interessanterweise führt dessen Fehlregulation zu Malformationen des Zwerchfells (87, 88), weshalb angenommen wird, dass es möglicherweise für die Entwicklung einer Hiatushernie und damit für eine Refluxkrankheit prädisponiert.

SNP rs3784262 befindet sich in der Nähe des Gens ALDH1A2, welches für ein Enzym kodiert, das die Synthese von Retinsäuren katalysiert und so unter anderem

in der Metabolisation von Alkohol involviert ist (89). Die Variante könnte somit zu einem inflammatorischen Prozess im Epithel der Speiseröhre beitragen.

Aufgrund ihrer Befunde legen Palles et al. die Hypothese nahe, dass die bisher assoziierten SNPs bzw. die Gene in deren Nähe eine Refluxerkrankung durch eine gestörte Entwicklung thorakaler und diaphragmaler Strukturen und durch eine gesteigerte inflammatorische Antwort beeinflussen. Die bisher assoziierten SNPs befinden sich jedenfalls in der Nähe von Genen, die als Transkriptionsfaktoren für die Entwicklung des Thorax, des Diaphragmas und des Ösophagus von Bedeutung sind (FOXF1, FOXP1, BARX1 und TBX5). Zum anderen befinden sie sich in der HLA-Region, in der Gene für die Inflammation verantwortlich sind.

## 2.4 Exogene Einflussfaktoren des Barrett-Ösophagus/-Karzinom

Die Entstehung des Barrett-Ösophagus und des Barrett-Karzinoms ist unter anderem auch mit exogenen Einflussfaktoren behaftet. Hierbei sind vor allem zwei Erkenntnisse bemerkenswert. Zunächst muss ein Risikofaktor, der zur Entstehung eines Barrett-Ösophagus beiträgt, nicht zwangsläufig auch an der Pathogenese eines Barrett-Karzinoms beteiligt sein und andersherum. Des Weiteren stehen alle maßgeblichen Risikofaktoren in Zusammenhang mit dem Hauptrisikofaktor gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD).

### 2.4.1 Unabhängige Risikofaktoren beim Barrett-Ösophagus/-Karzinom

Mittlerweile ist die gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) als maßgeblicher Faktor der Genese des Barrett-Ösophagus sowie auch des Barrett-Karzinoms weiträumig anerkannt (4, 6, 90). Für die Entstehung eines Barrett-Ösophagus durch GERD variieren die Angaben in der Literatur zwischen einem 5 und 10%igen Risiko (4, 17). Die Wahrscheinlichkeit, ein Barrett-Adenokarzinom zu entwickeln, erhöht sich bereits durch das alleinige Vorhandensein von Reflux um 300% (91) und kann sich je nach Häufigkeit der Symptomatik (wöchentlich oder täglich) auf ein bis zu 7,4-faches Risiko erhöhen (OR 7.40; 95% KI = 4.94-11,1) (92). Lagergren et al. stellten zudem fest, dass wohl nicht nur die Frequenz, sondern auch die Dauer (20 Jahre und mehr) und Schwere der Symptomatik (retrosternales Brennen und Regurgitation) eine Rolle in der Entstehung des Barrett-Adenokarzinoms zu spielen scheinen (OR 43.5; 95 KI

= 18.3-103.5) (6). Von 189 Patienten gaben 113 (60%) an, mindestens einmal in der Woche retrosternales Brennen, Regurgitation oder beides zu erfahren. In der Kontrollgruppe, bestehend aus 820 Personen, gaben lediglich 135 (16%) die gleiche Symptomatik an (OR 7,7; 95% KI = 5,3-11,4), wobei sich das Risiko bei gleicher Voraussetzung, aber nächtlicher Symptomatik, nahezu auf das elffache erhöhte (OR 10,8; 95% KI = 7,0-16,7).

Mit diesem Hintergrund bleibt es weiterhin bemerkenswert, dass bei über 45% der Barrett-Ösophagus- und 40% der Barrett-Karzinom-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose keinerlei Refluxsymptome erinnereich sind (7, 35).

Pohl et al. fanden heraus, dass die Entstehung des GERD direkt mit dem Vorhandensein der axialen Hiatushernie des Ösophagus in Zusammenhang steht (OR 3.62; 95 % KI = 2.15–6.09), wobei die Odds Ratio mit der Größe der Hernie bis zu einem Faktor von 4 zunahm (OR 4.23; 95 % KI = 2.03–8.81) (8). Eine Assoziation zum Barrett-Ösophagus konnte ebenfalls nachgewiesen werden (OR 2.43; 95 % KI = 1.50 – 3.94).

Wu et al., die bereits einen signifikanten Zusammenhang zwischen Reflux und Barrett-Adenokarzinom nachweisen konnten, stellten in ihrer Befragung von 222 Patienten mit BK sowohl den Reflux als auch die Hiatushernie als unabhängige Risikofaktoren für die Genese eines BK heraus.

So erhöhte eine Hiatushernie ohne weitere Risikofaktoren das Risiko um 600% (OR 5,85; 95% KI = 3,18-10,75), eine Hiatushernie mit Reflux als Risikofaktor erhöhte das Risiko um bis zu 800% (OR 8,11; 95% KI = 4,75-13,87) (91).

Ein weiterer Risikofaktor, der mit der Entstehung einer Hiatushernie assoziiert schien, war die Adipositas. Gordon et al. beschrieben unter anderem eine Magenhochwanderung durch erhöhten intraabdominellen Druck als ursächlich.

Wilson et al., fanden einen signifikanten Zusammenhang zwischen einem erhöhten BMI und der Genese der Hiatushernie mit Folge einer Refluxösophagitis (93) was durch Studien von Barak et al. bestätigt wurde (94). Stene-Larson et al. fanden in zwei Studien mit 385 bzw. 1.224 Patienten, die eine Endoskopie durchliefen, heraus, dass Adipositas ein unabhängiger Risikofaktor sowohl für die Hiatushernie als auch für die Refluxösophagitis darstellt.

Dies stellt den Zusammenhang drei der wichtigsten Risikofaktoren (Reflux, Hiatushernie, Adipositas) für die Genese des BK her.

Daraufhin wurde Adipositas ebenfalls Forschungsthema zahlreicher Studien zum Thema Barrett-Ösophagus und Karzinom.

Mit der Frage, ob auch die Adipositas einen direkten unabhängigen Risikofaktor für den BÖ oder den BK darstellt, beschäftigten sich Singh et al. in einer Metaanalyse von 40 Artikeln, die zu dem Ergebnis gelangte, dass stammbetonte Adipositas unabhängig von Refluxsymptomen sowohl mit der Genese des BÖ (aOR 2.04; 95% KI = 1.44–2.90) als auch mit der Genese des BK (aOR 2.51; 95% KI = 1.54–4.06) assoziiert ist (95). Schneider et al. stellten daraufhin fest, dass es lediglich die stammbetonte Adipositas, nicht aber der BMI zu sein scheint, die mit der Entstehung des Barrett-Ösophagus zusammenhängt, jedoch beide Faktoren an der Entstehung des Adenokarzinoms beteiligt sind. Das Risiko korreliert mit steigendem BMI sowohl bei Männern als auch bei Frauen (OR 2.4; 95% KI = 1.9-3.2 und OR 1.9; 95% KI = 1.5-2.5), wobei ein BMI > 25 mit einem zweifachen Risiko und ein BMI von >40 mit einem fast fünffachen Risiko einhergeht (OR 4,76: 95% KI = 2,96-7,66) (4). Eine Analyse des BEACON Konsortiums in zwei Kohortenstudien, die 2.000 Fälle und 12.000 Kontrollen umfasste, kam zu demselben Schluss (96).

Gleiches Konsortium führte ebenfalls eine Studie mit 1.059 BÖ, 1.332 GERD und 1.143 Kontrollen zum Risikofaktor Nikotin durch und fand heraus, dass Patienten mit einem BÖ signifikant öfter Raucher waren als die populationsbasierten Kontrollpersonen (OR 1,67; 95% KI = 1,04-2,67). Eine Assoziation zur Nikotinaufnahme korrelierte mit der Anzahl der pack-years bis ein Plateau bei 20py erreicht wurde (97). Es stellte sich ein nicht strikt linearer Zuwachs dar mit einem Risikofaktor von 1,5 bei unter 15 und 15 bis 29 pack-years und einem Risikofaktor von 2 bei 30-44 und über 45 pack-years im Vergleich zu Patienten, die niemals Raucher waren.

Eine Metaanalyse von fünf Studien untermauerte die Ergebnisse des BEACON-Konsortiums und konnte zudem auch eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Nikotinaufnahme und Ausbildung eines BK nachweisen, wobei das Risiko geschlechtsspezifisch variierte (4). Männliche, ehemalige/derzeitige Raucher wiesen demnach ein geringfügig höheres Risiko auf (OR: 2.10; 95% KI: 1.71e259) als Frauen (OR: 1.74; 95% KI: 1.21e2.51). Bei beiden Gruppen sank das Risiko mit Beendigung des Raucherstatus, war aber nach 10 Jahren im Vergleich zu einem Nie-Raucher-Status immernoch signifikant erhöht (OR 1,72; 95% KI = 1,38-2,15).

Auch bei diesem Risikofaktor ist wiederum anzumerken, dass er die Entstehung von GERD fördert.

Zuletzt bleibt noch das Alter der Patienten zu erwähnen.



Gatenby et al. (98) erfassten in einer Statistik das durchschnittliche Alter von 7.877 Patienten bei Diagnosestellung Barrett-Ösophagus und kamen zu dem Ergebnis, dass Männer früher diagnostiziert wurden als Frauen (61,6 Jahre vs. 67,3 Jahre). Drovdic et al. (37) untersuchten 70 Familien bei denen sowohl Barrett-Ösophagus als auch Barrett-Karzinome vorkamen. Bei familiärer Vorbelastung lag das Durchschnittsalter für die Diagnose eines BÖ bei Männern bei 50,6 und Frauen 57,4 Jahren, die Diagnose eines Barrett-Karzinoms lag bei durchschnittlich 57,4 und 63,5 Jahren. De Jonge et al. (99) kamen in einer groß angelegten Studie nach Evaluation von 42.207 BÖ-Patienten zu dem Schluss, dass das Alter ein unabhängiger Risikofaktor für die Entstehung der HGD und des BK darstellt (>75 Jahre HR 12; 95% KI = 8,0-18).

#### 2.4.2 Unbestätigte Risikofaktoren beim Barrett-Ösophagus/-Karzinom

Sowohl die Aufnahme von Alkohol als auch der Konsum von Kaffee wurden in zahlreichen Studien auf ihre Assoziation hin überprüft. Nach derzeitigen Erkenntnissen stellt keines von beidem einen Risikofaktor in der Entstehung des Barrett-Ösophagus oder das Barrett-Karzinoms dar.

Sehr wohl konnte Keshavarzian et al. zwar einen Einfluss von Alkohol auf die Motilität des unteren Ösophagussphinkter nachweisen, wobei dessen Kontraktionsamplitude und Druck absanken (100). In eine Metaanalyse von Lou et al., die 882 Fälle und 6.867 Kontrollen umfasste, konnte im Rahmen von 10 Fall-Kontroll und 4 Kohortenstudien jedoch kein Zusammenhang zwischen Alkoholaufnahme und einer erhöhten Inzidenz einer High Grade Dysplasie oder einem BK gefunden werden (RR 1,17: 95% KI = 0,93-1,48) (101).

Schneider et al. bestätigten in ihrem Review von 16 Studien zur Epidemiologie des BÖ und BK, dass keinerlei Korrelation zwischen der Aufnahme von Alkohol und der Ausbildung eines BÖ oder eines BK besteht, selbst wenn größere Mengen (>7 Drinks) konsumiert worden sind (OR 0,97: 95% KI = 0,68-1,36). Ganz im Gegenteil werden in zwei Studien sogar ein gering ausgeprägter protektiver Effekt bei Aufnahme kleiner Mengen, speziell von Wein, beschrieben (0,5-<1 Drink/Tag) (102, 103).

Ebenso wie bei der Aufnahme von Alkohol reduziert sich bei Kaffeekonsum nachweislich der Druck über dem unteren Ösophagussphinkter (104).

Jedoch konnten Nocon et al. in einer Studie mit 7.124 gesunden Probanden keinen signifikanten Einfluss von Kaffeekonsum und der Ausbildung eines GERD aufweisen (105), wobei Nilsson et al. sogar einen moderat protektiven Einfluss feststellte (106).

In einer Metaanalyse von 15 Fall-Kontroll-Studien konnte Kim et al. ebenfalls keine Korrelation zwischen Kaffeekonsum und einem erhöhten Risiko für gastroösophagealen Reflux aufzeigen (OR 1,06; 95% KI = 0,94-1,19) (107).

#### 2.4.3 Protektive Faktoren beim Barrett-Ösophagus/-Karzinom

Zahlreiche Studien beschreiben eine Korrelation zwischen der negativen Infektion mit *Helicobacter Pylori* und dem Vorliegen eines Barrett-Ösophagus (1, 4) (OR 0,64; 95% KI = 0.43-0,94) (108). Es wird hinter dem scheinbar protektiven Effekt eine Reduktion der Säureproduktion des Magens durch die von *H.pylori* hervorgerufene gastrale Atrophie vermutet (11). Wang et al. führten eine Metaanalyse von 12 Fall-Kontroll-Studien mit insgesamt 550 BÖ und 2.979 Kontrollen durch und stellten fest, dass die Prävalenz von *H. pylori* in BÖ-Patienten signifikant niedriger war als in gesunden Kontrollen (23.1 % vs. 42.7 % , OR 0.50; 95 % KI =0.27–0.93, p= 0.03) (109). Fischbach et al. bestätigten diese Ergebnisse in einer weiteren Metaanalyse (RR 0.46; 95% KI = 0.35-0.60) (110).

Rokkas et al. konnten zudem in einer Metaanalyse, die 18 Kohorten- und Fall-Kontroll-Studien einbezog, eine invers-signifikante Assoziation von *H. pylori* und der Genese eines Barrett-Karzinoms feststellen (OR 0,52; 95% KI = 0,37-0.73) (108).

Ernährungsfaktoren spielen ebenfalls eine zentrale Rolle in der Prävention des BÖ und BK. Kubo et al. führten eine Fall-Kontroll-Studie mit 296 BÖ, 308 GERD und 309 gesunden Probanden durch. Omega-3-Fettsäuren (OR= 0.46; 95% KI = 0.22–0.97), mehrfach ungesättigte Fettsäuren (OR= 0.34; 95% KI = 0.15–0.76) und Fasern von Obst und Gemüse (OR=0.47; 95% KI = 0.25–0.88) waren mit einem niedrigeren Risiko für die Ausbildung eines BÖ assoziiert (111).

Coleman et al. beschrieben in einer Metaanalyse ebenfalls zwei Studien, die Ballaststoffe als protektiv gegenüber BÖ identifizierten mit einer Risikoreduktion von 60-66% bei hoher Ballaststoffaufnahme, sowie acht Studien die eine invers-

signifikante Assoziation zwischen BK und hoher Ballaststoffaufnahme zeigte (OR 0.66; 95% KI = 0.44–0.98) (112).

Der protektive Effekt wird in einer Reduktion des GERD und durch Phytinsäure in ballaststoffreicher Nahrung vermutet, welche Apoptose fördernd wirkt und dadurch das Zellwachstum eines Barrett-Karzinoms inhibiert (4).

Vitamin C, Beta Karotin und insbesondere Vitamin E scheinen mit einem niedrigeren BÖ-Risiko zu korrelieren (113).

#### Aspirin und andere NSAID

Des Weiteren scheint der BÖ mit steigendem Dysplasiegrad eine erhöhten Expression von Cyclooxygenase 2 (COX-2) aufzuweisen, deren Inhibition die Progression der Metaplasie zum Karzinom aufhalten könnte (1). Das BEACON Konsortium analysierte fünf Fall-Kontroll- und eine Kohortenstudie mit rund 1.226 BK Patienten. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Einnahme von Aspirin und anderen NSAID eine statistisch-signifikante Risikoreduktion für die Entwicklung eines BK aufwies (OR 0,68; 95% KI = 0,56-0,83). Eine hochfrequente Einnahme (täglich) über Jahre (>10 Jahre) war sogar mit einer Risikoreduktion um bis zu 40% behaftet (OR 0,56; 95% KI = 0,43-0,73;  $p < 0,001$ ) (114).

Eine Metaanalyse von Zhang et al. bestätigte ebenfalls ein reduziertes Risiko unter Aspirin (RR 0.63; 95% KI = 0.43–0.94) und anderen NSAID (RR 0.50; 95% KI = 0.32–0.78) für die Entstehung einer High-Grade-Dysplasie (HGD) oder eines Adenokarzinoms unter BÖ-Patienten. Es wurde jedoch festgestellt, dass bereits geringe Dosen ausreichend waren, um einen protektiven Effekt zu erzeugen (115).

#### Körperliche Aktivität

Ein weiterer protektiver Faktor stellt die Ausübung körperlicher Aktivitäten dar. Nilsson et al. (106) eruierten in einer Studie zu mit dem Lebensstil der Patienten assoziierten Risikofaktoren für gastroösophagealen Reflux, dass einmal wöchentlich ausgeübte körperliche Aktivität wie Joggen und Schwimmen das Refluxrisiko im Vergleich zu körperlich inaktiven Personen um bis zu 50% senken konnte (OR = 0,5; 95% KI = 0,4-0,7,  $p < 0,001$ ). Da lange Zeit vermutet wurde, dass körperliche Aktivität den Reflux sogar noch steigert, gingen auch Dore et al. dieser Frage nach und konnten untermauern, dass Personen, die nie körperlich aktiv waren, sogar ein dreifach höheres Risiko für die Entwicklung eines GERD aufwiesen, als solche, die

sich zwei oder mehr Stunden pro Woche körperlich betätigten (OR = 2,7; 95% KI = 1,6 - 4,6, P = 0,001) (116).

## 2.5 Methoden zur Genidentifikation bei multifaktoriellen Erkrankungen

Auf dem Gebiet der molekulargenetischen Forschung sind Assoziationsanalysen zur Genidentifikation bei multifaktoriellen Erkrankungen zu nennen. Hierbei werden genetische Varianten in Fall-Kontroll-Kollektiven analysiert. Anschließend wird die Ausprägung der Varianten in beiden Gruppen verglichen. Als genetische Varianten werden dabei üblicherweise SNPs (singlenucleotidepolymorphisms) untersucht, da sie die häufigsten Varianten im humanen Genom sind. Assoziationsanalysen können mittlerweile auch genomweit durchgeführt werden,

Sind Assoziationsanalysen in ihrem Aussagewert bei sorgfältiger Durchführung der Studie auch noch so genau, so stellen multifaktorielle Erkrankungen in ihrer genetischen Architektur ein äußerst komplexes Gebilde dar, deren genaue Analyse vor allem durch drei Störphänomene beeinflusst wird:

I. Die Locus-Heterogenität kann dazu führen, dass ein ähnlicher oder identischer Phänotyp durch Mutationen in verschiedenen Genen verursacht wird. Verschiedene Mutationen an demselben Locus werden als allelische Heterogenität bezeichnet (117).

II. Eine unvollständige Penetranz kann dazu führen, dass eine genetische Risikovariante nicht bei allen, sondern nur bei einem Teil der Individuen den Phänotyp bestimmt. Die Risikovariante kann also auch in der gesunden Allgemeinbevölkerung auftreten (118).

III. Als Phänokopie beschreibt man die Entstehung von Phänotypen durch nichterbliche, umweltbedingte Nachahmungen von Phänotypen. Die zur Ausbildung des Phänotyps verantwortliche Risikovariante liegt also nicht vor (119).

### 2.5.1 Assoziationsuntersuchungen

Assoziationsuntersuchungen befassen sich mit der Fragestellung, ob eine genetische Variante signifikant häufiger bei Patienten als bei Kontrollpersonen

vorkommt und erlauben so beispielsweise Aussagen über den Effekt der Variante auf eine Erkrankung (120). Die häufigsten genetischen Varianten stellen einfache Basenpaarsubstitutionen, sogenannte singlenucleotidepolymorphisms (SNPs) dar, die über das Relative Risiko (RR) im Grad ihrer Assoziation zur Krankheit gemessen werden können. Das Relative Risiko erlaubt also eine Aussage über den Faktor der Wahrscheinlichkeit des Auftretens einer Krankheit bei Trägern im Vergleich zu Nicht-Trägern einer genetischen Variante.

Folgende Mechanismen stellen die Basis für eine Assoziation zwischen einem Allel und dem Auftreten einer Erkrankung dar:

I. Direkter Zusammenhang: Ein Allel selbst erhöht die Wahrscheinlichkeit, eine Erkrankung zu entwickeln (120).

II. Populationsstratifikation: Ein Allel kommt in der untersuchten Subgruppe zufällig häufiger vor, als in der Gesamtpopulation (120).

III. Kopplungsungleichgewicht

Ein Kopplungsungleichgewicht (engl. LD, linkagedisequilibrium) liegt vor, wenn zwei Allele an zwei benachbarten Genorten häufiger gemeinsam vererbt werden, als durch Zufall in einer Population zu erwarten wäre. Es beschreibt ähnlich einer Korrelation den Zusammenhang zwischen zwei Genotypen, zum Beispiel zwischen zwei SNPs (121-123). Diese Erkenntnis macht es möglich, das Kopplungsungleichgewicht (LD) in der Kartierung des Genoms nutzbar zu machen. Im Rahmen von Assoziationsstudien kann man sich beispielsweise innerhalb eines Sets von SNPs, welche hochgradig miteinander korrelieren, lediglich zugunsten der Genotypisierung eines SNP entscheiden, der als Marker für das Vorhandensein des gesamten Sets dient (122). Grundvoraussetzung hierfür ist jedoch, dass das Kopplungsungleichgewicht und damit die Assoziation der Genloci im Laufe der Evolution nicht durch Rekombination verloren gehen. Detaillierte Untersuchungen des menschlichen Genoms haben in diesem Bezug zu der Erkenntnis geführt, dass dieses in LD-Blöcke mit hohem LD unterteilt werden kann. Die Blöcke sind auf Rekombinationshotspots zurückzuführen (124-126). LD-Blöcke, in denen also ein hohes LD besteht, zeigen über viele Generationen hinweg dieselbe Ausprägung. Die Allel-Kombinationen der SNPs innerhalb dieser LD-Blöcke werden als Haplotypen

bezeichnet, die nun also anhand nur eines für sie typischen SNPs die Kartierung des gesamten Blockes und eine weitaus schnellere Kartierung des Genomes ermöglichen. Der für die jeweiligen Haplotypen charakteristische SNP wird dabei als tagging SNP (tSNP) bezeichnet (127, 128). Durch systematische Identifizierung der tSNPs und der charakteristischen Haplotyp-Blockstruktur im sogenannten HapMap Projekt ist es nun möglich, den Aufwand und die Kosten für die Erfassung häufig vorkommender genetischer Variabilität erheblich zu reduzieren (129, 130).



**Abbildung Nr. 1:** Relation von SNP (a), Haplotyp (b) und tagging-SNP (c) (130)

## 2.5.2 Detaillierte bioinformatische und Genotyp-Phänotyp/-Umwelt-Analysen

Sind in Assoziationsuntersuchungen SNP-Marker als potentielle Risikovarianten identifiziert worden, können die dazugehörigen Gene sogenannten pathway-Analysen zugeführt werden. Mit Hilfe von bioinformatischen Auswertungsprogrammen, die bereits vorhandene Geninformationen und Algorithmen verwenden, können so funktionell zusammengehörige Gene identifiziert und priorisiert werden. Um eine ausreichend große Anzahl von Genen für diese Analysen bereit zu stellen, werden für die einzelnen SNP-Assoziationen unterschiedliche Signifikanzschwellen verwendet, wodurch eine Anreicherung von assoziierten Risikogenen in bestimmten zellulären Pathways nachgewiesen werden kann. Stehen diese Pathways in pathophysiologischem Zusammenhang mit

multifaktoriellen Erkrankungen, können sie weiteren funktionellen Untersuchungen zugeführt werden.

Sind detaillierte Informationen zum Phänotyp eines Patienten (z.B. Alter bei Diagnosestellung, familiäre Häufung) und seiner Umwelt bekannt (z.B. Nikotin und Alkohol), so können identifizierte Risikovarianten auch explorativen Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen zugeführt werden. Oftmals lassen sich durch das Studiendesign oder individuelle Faktoren des Patienten zwar keine genauen Informationen erheben, jedoch ist meist die Bildung von Extremgruppen möglich (z.B. regelmäßige vs. unregelmäßige Exposition gegenüber Umweltfaktoren). Dies erlaubt die Einteilung des Gesamtkollektivs in Subgruppen, deren Klinik oder Umweltfaktoren Erkenntnisse bezüglich der Risikovariante oder der Krankheit an sich liefern können.

So schließt sich den Analysen meist eine unabhängige Fall-Kontroll Studie an, anhand derer die Ergebnisse mit entsprechenden Phänotyp-Informationen betrachtet werden.

### 2.5.3 Genomweite Assoziationsstudien

Im Gegensatz zu Kandidatengenstudien, die nur Variationen in bestimmten Genen und Regionen analysieren, untersuchen GWAS systematisch das gesamte Genom auf Loci, die mit einem bestimmten Phänotyp, beispielsweise einer Krankheit, assoziiert sind (131). Nicht selten werden dabei mehrere Millionen Genvarianten (z.B. 1M SNPs) in die Analysen einbezogen, womit dieses hypothesenfreie Vorgehen insbesondere für multifaktorielle Erkrankungen mit teilweise nur geringer Effektstärke eine effiziente Analysemethode darstellt (25). Um insbesondere diese schwach ausgeprägten genetischen Effekte aufzudecken und darstellen zu können, sind Fall-Kontroll-Studien durch die vergleichsweise leichte Generierung größerer Patientenzahlen ein ideales Studiendesign (25). Das Kontrollkollektiv besteht im Falle multifaktorieller Erkrankungen dabei zwangsläufig auch aus Trägern genetischer Risikovarianten, wobei die zu untersuchende Erkrankung bei diesen populationsbasierten Kontrollen in ihrer normalen Prävalenz auftritt.

GWAS bedienen sich wie auch herkömmliche Assoziationsstudien der tSNPs um die häufige Variabilität des Genoms erfassen zu können. Nach deren Typisierung wird die Häufigkeit der Allelverteilung jedes SNPs zwischen Phänotyp (Patient) und Kontrolle verglichen, wobei das Vorliegen signifikant unterschiedlicher

Allelfrequenzen für eine Assoziation spricht (zum Beispiel auf Seiten des Patienten mit einer Risikovariante und auf Seiten der Kontrolle mit einer protektiven oder nicht-assoziierten Variante).

Eine typische GWA-Studie besteht laut Depner (132) also aus vier Sequenzen:

1. Identifizierung und Rekrutierung einer möglichst hohen Anzahl von Patienten mit dem gesuchten Phänotyp und einer populationsbasierten Kontrollgruppe;
2. Genotypisierung der DNA-Proben beider Kollektive mittels eines Chips, der genomweite Marker beinhaltet;
3. Statistische Testung der mit dem Phänotyp assoziierten SNPs auf Signifikanz;
4. Replikation der Ergebnisse in unabhängigen Fall-Kontroll-Kollektiven.

Es ist anzumerken, dass nach multiplem Testen von bis zu 1Mio. SNPs und mehr der statistische Signifikanzwert in GWAS nicht bei  $p = 5 \times 10^{-02}$  liegt, wie in Assoziationsstudien üblich, sondern weitaus niedriger, nämlich bei  $p = 5 \times 10^{-08}$ . Dieser Wert hat sich allgemein für genomweit signifikante Assoziationsbefunde durchgesetzt (26).

Dies ist einer der Gründe für die Durchführung von Replikationsanalysen, in denen die Signifikanzschwelle nun nach erneuter Selektion mit weniger Varianten niedriger angesetzt werden kann. Assoziationsbefunde, welche die Schwelle der genomweiten Signifikanz nicht überschritten, jedoch in deren Nähe lagen, können so einer erneuten Assoziationsuntersuchung zugeführt werden. Um eine Signifikanzschwelle festzulegen, wird dann in der Regel der p-Wert der Assoziation einer Variante durch die Anzahl der untersuchten Marker dividiert. Diese Methode wird als Bonferroni-Korrektur bezeichnet (26, 133).

Die Ergebnisse der in den letzten acht Jahren publizierten GWAS können in einem eigenen GWAS-Katalog eingesehen werden, der Aufschluss über die bisher erzielten Erfolge bei der Identifikation von krankheitsassoziierten SNPs und der Aufklärung multifaktorieller Krankheiten gibt (134).



### 3. Material und Methoden

Da die Barrett-Erkrankung zwar eine an Häufigkeit zunehmende, aber vergleichsweise seltene Entität darstellt, war die Implementierung einer soliden Basis notwendig, die zum Ziel hatte, eine möglichst große Anzahl von Patienten für umfangreiche Analysen mit signifikanten Ergebnissen generieren zu können. Zu diesem Zweck wurde das Barrett-Konsortium "g4b" (genes for barrett's) als Grundpfeiler für das weitere Forschungsvorhaben gegründet. Hierunter ist ein Zusammenschluss von Ärzten und Naturwissenschaftlern an derzeit 23 beteiligten Universitätskliniken, Krankenhäusern und großen Arztpraxen zu verstehen, die als gemeinsames Ziel die Vertiefung des Verständnisses der molekulargenetischen Ursachen des Barrett-Ösophagus und Barrett-Karzinoms verfolgen (s. Tabelle 5).

**Tabelle 5:** Kooperationspartner und klinische Zentren des g4b, Rekrutierungsbeginn und Anzahl rekrutierter Patienten

Standort	Rekrutierungsbeginn	Rekrutierte Patienten (BÖ/ BK)
<b>Bayreuth</b> Prof. Dr. Michael Vieth, Institut für Pathologie, Klinikum Bayreuth	Juli/2012	161
<b>Bonn</b> Dr. Rupert Mayershofer jr., Praxis Gastroenterologie am Burgweiher	Aug./2012	32
<b>Berlin</b> Praxis Dr. med. Eckhard Löhde	Feb./2013	30
<b>Düsseldorf</b> Prof. Dr. Horst Neuhaus, Innere Medizin, Evangelisches Krankenhaus Düsseldorf	Aug./2012	180
<b>Frankfurt a.M.</b> Prof. Dr. Ralf Kiesslich, Medizinische Klinik, St. Marienkrankenhaus	Okt./2012	0
<b>Hamburg</b> Prof. Dr. Thomas Rösch, Klinik und Poliklinik für Interdisziplinäre Endoskopie und Prof. Dr. Jakob R. Izbicki, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf	Juni/2012 Mai/2013	116 0
<b>Heidelberg</b> Prof. Dr. Katja Ott, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Heidelberg	Mai/2013	0

<b>Kirn</b> Gastroenterologische Schwerpunkt-Praxis Dr. Karch	Feb./2012	26
<b>Koblenz</b> Praxis Weismüller, Lütke & Benner (Dr. Josef Weismüller)	Jan./2011	159
<b>Köln</b> Prof. Dr. Elfriede Bollschweiler, Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Tumorchirurgie, Uniklinik Köln und	Mai/2011	63
Dr. Jan-Hinnerk Hofer, Praxis Magen Darm Zentrum Wiener Platz	März/2012	16
<b>Magdeburg</b> Prof. Dr. Peter Malfertheiner, Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg	Mai/2012	0
<b>Mainz</b> Prof. Dr. Ines Gockel, Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie und	Mai/2011	141
Prof Dr. Markus Möhler, I. Medizinische Klinik, Universitätsmedizin Mainz		0
<b>Münster</b> Prof. Dr. med. Karin Hengst, Innere Medizin B und	März/2012	0
Prof. Dr. Daniel Palmes, Klinik für Allgemein- und Abdominalchirurgie, Universitätsklinikum Münster		0
<b>Oldenburg</b> Prof. Dr. Hans Seifert, Universitätsklinik für Innere Medizin - Gastroenterologie, Klinikum Oldenburg ()	Mai/2013	
<b>Wiesbaden</b> Prof. Dr. Dietmar Lorenz Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie und	Mai/2011	0
Prof. Dr. Christian Ell Klinik Innere Medizin II, Dr. Horst Schmidt Kliniken		732
Prof. Dr. T. Wehrmann, Fachbereich Gastroenterologie, Deutsche Klinik für Diagnostik	Mai/2013	
Facharztzentrum MEDICUM	März/2012	103
<b>Zürich</b> Dr. Paul Schneider Klinik für Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitäts-Spital Zürich	Nov./2011	0
<b>Eigeninitiative der Patienten</b>		20
<b>Gesamtzahl der rekrutierten Barrett-Oesophagus und -Karzinompatienten</b>		<b>1779</b>

Stand: 10/2013

Das Votum der Ethik-Kommission Rheinland-Pfalz vom 17.06.2009 ermöglichte es dem Barrett-Konsortium g4b, seine Rekrutierungsarbeit aufzunehmen

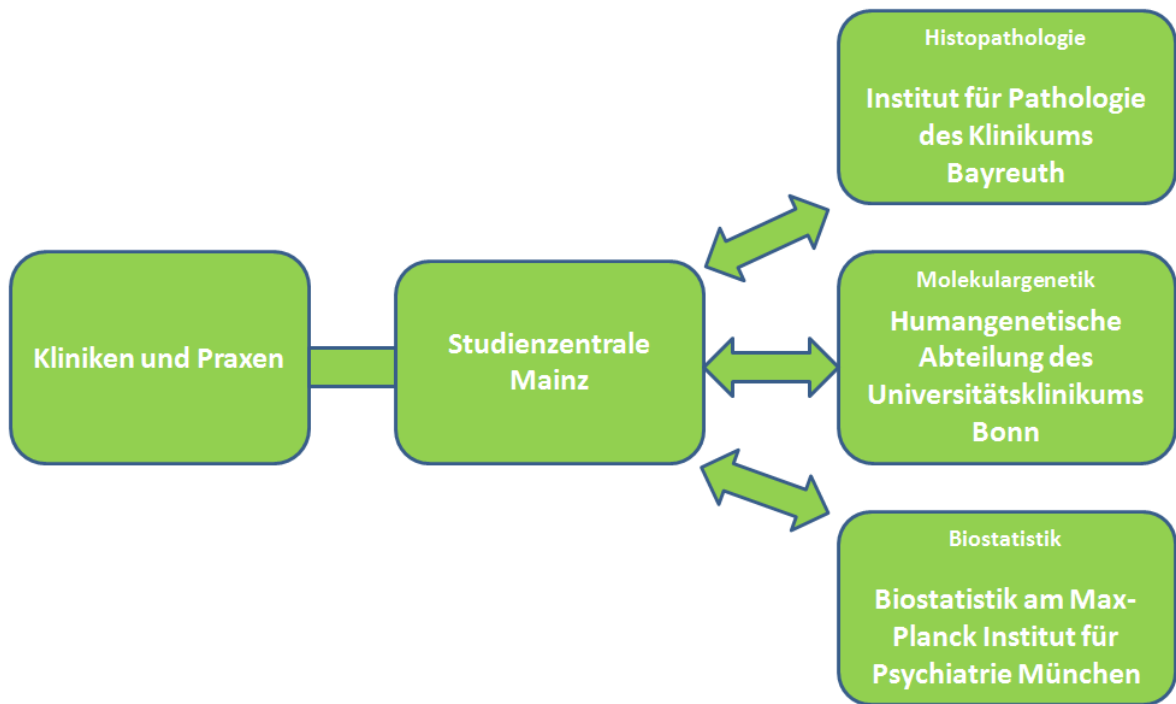
Zur Umsetzung dieses Ziels, bedarf es zum einen der kontinuierlichen Rekrutierung von bereits bestehenden und neu diagnostizierten Patienten, zum anderen dem Aufbau einer möglichst großen Bio-Datenbank mittels Asservierung von DNA-Proben. Um die gewonnenen genetischen Informationen in Relation zum Phänotyp und zu potentiellen Umwelt-Interaktionen des Patienten setzen zu können und somit weitere, wertvolle Daten über die Entstehung des Barrett-Karzinoms in Erfahrung bringen zu können, müssen außerdem potentiell krankheitsbezogene Informationen, wie exogene Risikofaktoren und familienanamnestische Daten, gesammelt und in das Gesamtkonzept einbezogen werden.

Die Erhebung jener Daten findet, -wie auch der eigentliche Kern der Rekrutierung mittels Aufklärung und Gewinnung der Patienten für das Forschungsvorhaben-, durch die Studienzentrale an der Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie an der Universitätsmedizin in Mainz statt.

In den in Tabelle 5 genannten Einrichtungen wurden Patienten mit einem Barrett-Karzinom zuvor gezielt von ärztlichen Mitarbeitern auf deren Interesse an einem Beitrag zur Erforschung ihrer Erkrankung angesprochen. Dadurch wurde ihnen gleichzeitig die Möglichkeit zur Auseinandersetzung mit ihrer Erkrankung durch einen Informationszugewinn angeboten. Entschied sich der Patient für eine Studienteilnahme, hinterlegte er seine Kontaktdaten und konnte daraufhin von der Studienzentrale in Mainz kontaktiert werden.

Unter Frau Prof. Dr. Ines Gockel, der Leiterin von g4b, werden hier standardisierte Interviews anhand von Fragebögen durchgeführt, anonymisiert und archiviert. Auch die Asservierung von DNA-Proben und klinischen Berichten seitens der Mitglieder des Konsortiums wird unter Frau Prof. Dr. Gockels Leitung koordiniert.

Im Anschluss an die Rekrutierungsarbeit kommen drei weitere Grundpfeiler des Barrett-Konsortiums zum Tragen. In einem ersten Schritt sichert das pathologische Referenzzentrum des Klinikums Bayreuth die Diagnose des Barrett-Karzinoms. Danach finden durch das Institut für Humangenetik der Universität Bonn die molekulargenetischen Analysen der asservierten Proben statt. Die daraufhin gewonnenen Genotyp-Daten werden inklusive der seitens der Studienzentrale erhobenen Phänotyp- und Umweltdaten durch das Max-Planck Institut für Psychiatrie in München biostatistisch analysiert und ausgewertet.



**Abbildung Nr. 2:** Organisation des Barrett-Konsortiums

Nicht zuletzt besteht in Zusammenarbeit mit anderen internationalen Arbeitsgemeinschaften zudem die Möglichkeit der Koordinierung von Ressourcen und Ergebnissen. Herr Prof. Thomas L. Vaughan vom Fred Hutchinson Cancer Center der University of Washington (USA) stellte g4b als Vertreter des BEACON-Konsortiums zu diesem Zweck beispielsweise signifikante Daten zur Replikation von Genotyp-Phänotyp- sowie Genotyp-Umwelt-Analysen zu Verfügung.

Basierend auf dieser nationalen und internationalen Verflechtung von Interessengemeinschaften konnte die vorliegende Doktorarbeit erstellt und in vier Stufen gegliedert werden:

- I. Rekrutierung und Erhebung von Phänotyp sowie Umweltinformationen aller teilnehmenden Patienten mit Barrett-Karzinom (n=1.064);
- II. Bereitstellung und Koordinierung der DNA Asservierung;
- III. Molekulargenetische Aufarbeitung der asservierten DNA unter Hinzuziehung von 94 zuvor durch das BEACON-Konsortium definierten SNP-Markern, welche im Initialkollektiv der BEACON-Studie bereits Assoziationshinweise ( $p < 10^{-04}$ ) zeigten (28);

IV. Einpflegen der unter Schritt 1 und 3 gewonnenen Daten in SPSS zwecks Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analyse.

### 3.1 Rekrutierung und Phänotypisierung von Patienten mit Barrett-Karzinom

Nahm ein Patient an der Studie teil, durchlief er einen streng standardisierten Rekrutierungsprozess (s. Abbildung Nr. 6). Dieser beinhaltete zwei Kernelemente als Grundlage unserer Forschungsarbeiten: Zum einen die Beantwortung des Frage- oder Erfassungsbogens (s. Abbildung 4 und Anhang 8) zur Erfassung von Einschluss/Ausschluss-, Phänotyp- und Umweltinformationen, zum anderen die Entnahme einer Blutprobe zur DNA-Asservation, die genetische Analysen ermöglichte. Der Rekrutierungsprozess soll im Folgenden kurz dargestellt werden.

#### *1. Kontaktaufnahme mit Index- und neu diagnostizierten Patienten durch das Konsortium*

Um Indexpatienten und neu diagnostizierte Patienten über das Forschungsvorhaben informieren zu können, wurden Flyer mit umfangreichen Informationen über die Studie und ihren Inhalt gestaltet und den teilnehmenden Kliniken, Krankenhäusern und Praxen zur Auslage zu Verfügung gestellt (s. Anhang 1). Jeder neu diagnostizierte Patient, aber auch jeder Patient der zwecks einer Follow-Up Untersuchung die jeweilige Einrichtung besuchte, konnte so teilweise auch im persönlichen Gespräch über die Studie informiert werden.

Um Indexpatienten erreichen zu können, wurden Flyer in vorfrankierte Briefumschläge eingelegt und der jeweils behandelnden Einrichtung zugeführt. Diese konnte dann aus ihren Datenbanken potentielle Teilnehmer ermitteln und direkt anschreiben.

Bestanden Unklarheiten oder wollte der Patient sich vor Studienteilnahme nochmals ausführlicher informieren, konnte er mittels des Flyers aus drei Optionen wählen:

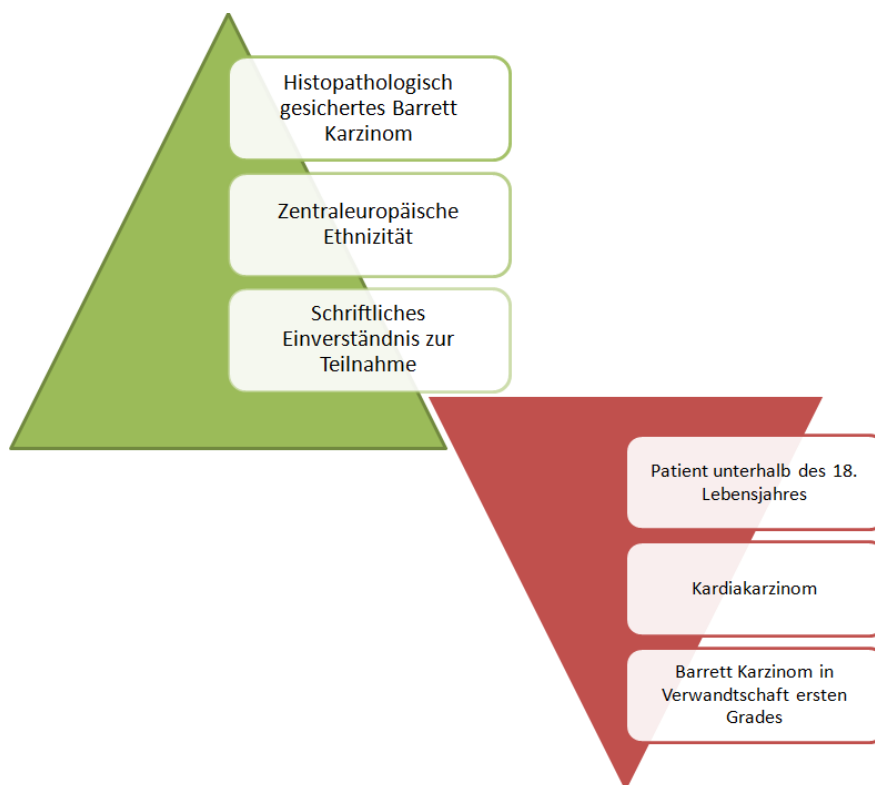
Telefonische Kontaktierung des Studienbüros unter angegebener Nummer,  
formlose Anfrage unter der angegebenen E-Mail Adresse oder  
Bezug weiterer Informationen über das Internet mittels angegebener URL.

## 2. Kontaktaufnahme, Überprüfung der Eignung und Erläuterung der Projektinhalte

Entschied sich der Patient für eine Teilnahme, so konnte er entweder eine der zuvor genannten Optionen wahrnehmen oder den Flyer mit Name, Adresse und Telefonnummer oder E-Mail versehen und über einen vorfrankierten Briefumschlag, der jedem Flyer beigelegt wurde, an die Studienzentrale in Mainz versenden.

Der Patient wurde daraufhin seitens der Studienzentrale kontaktiert und ein Termin zur telefonischen Erörterung des Projektes, sowie zur Beantwortung des Fragebogens vereinbart.

Im Gespräch mit dem Patienten wurde daraufhin zuerst die Eignung zur Teilnahme geklärt, ohne die ein Einschluss in die Studie entweder aus rechtlichen-, humangenetischen oder histopathologischen Gründen nicht möglich war (s. Tabelle 6 und Abbildung Nr. 3).



**Abbildung Nr. 3:** Ein- und Ausschlusskriterien für die Studienteilnahme

**Tabelle 6:** Zentraleuropäische Länder deren Patientenkollektiv zur Studienteilnahme geeignet waren

Land	KFZ	Lokalisation	Land	KFZ	Lokalisation
Andorra	AND	Westeuropa	Monaco	MC	Westeuropa
Belgien	B	Westeuropa	Niederlande	NL	Westeuropa
Dänemark	DK	Nordeuropa	Nordirland	GB	Westeuropa
Deutschland	D	Mitteleuropa	Norwegen	N	Nordeuropa
Frankreich	F	Westeuropa	Österreich	A	Mitteleuropa
Großbritannien	GB	Westeuropa	Polen	PL	Mitteleuropa
Irland	IRL	Westeuropa	Schweden	S	Nordeuropa
Island	IS	Nordeuropa	Schweiz	CH	Mitteleuropa
Kroatien	HR	Mitteleuropa	Slowakische Republik	SK	Mitteleuropa
Lichtenstein	FL	Mitteleuropa	Slowenien	SLO	Mitteleuropa
Luxemburg	L	Mitteleuropa	Tschechische Republik	CZ	Mitteleuropa

### *3. Durchführung eines standardisierten Interviews mit dem Patienten*

War der Patient zur Studienteilnahme geeignet, erfolgte ein strukturiertes Interview zur Phänotypisierung und Erfassung von klinischen Präganztypen sowie der für die Erkrankung potentiell relevanten Umweltinformationen.

Die gemeinsame Erhebung des Fragebogens war zuvor unter den Mitarbeitern der Studienzentrale durch Standard Operating Procedures (SOP's) standardisiert worden, sodass eine subjektive Beeinflussung des Patienten durch den Mitarbeiter weitestgehend ausgeschlossen wurde. Ziel des Fragebogens war es, alle Phänotypdaten so objektiv wie möglich zu erfassen (die Bearbeitungszeit betrug hierbei ca. 20 Minuten).

Ab November 2012 wurde statt dem Fragebogen ein sogenannter Erfassungsbogen verwendet (s. Anhang 9). Auch hier erfolgte die Rekrutierung standardisiert nach SOP's, jedoch hatte der Erfassungsbogen zum Ziel, in kurzer Zeit (Bearbeitungszeit ca. 5 Minuten) ein Maximum an Patientenzahlen zu generieren um eine Kandidatengenanalyse zu initiieren. Ausstehende phänotypische Daten des detaillierten Fragebogens werden derzeit noch von Mitarbeitern des Barrett-Konsortiums erhoben.

Fragebogen	Erfassungsbogen
<ul style="list-style-type: none"> <li>• allgemeine Daten zur Person</li> <li>• Ein- und Ausschlusskriterien</li> <li>• familiäre Fälle der Barrett-Erkrankung</li> </ul> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Lebensgewohnheiten</li> <li>• Komorbiditäten</li> <li>• Operationen</li> <li>• Medikation</li> <li>• Exogene Risikofaktoren</li> <li>• Protektive Faktoren</li> <li>• Beschwerden durch die Erkrankung</li> <li>• Symptome der Erkrankung</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• allgemeine Daten zur Person</li> <li>• Ein- und Ausschlusskriterien</li> <li>• familiäre Fälle der Barrett-Erkrankung</li> </ul>

**Abbildung Nr. 4:** Inhalt des Fragebogens sowie des Erfassungsbogens

#### 4. Versand eines standardisierten Rekrutierungs-Sets an den Patienten

Die teilnehmenden Patienten wurden über den Erhalt eines Päckchens und dessen Inhalt zwecks Blutentnahme und Einwilligung zur Studie informiert (s. Anhang 2,3,4). In der Regel erhielt der Patient das Päckchen innerhalb der ersten Woche nach dem Interview.

##### Blutentnahmezubehör

- 1 Butterfly
- 1 Adapter
- 3 "EDTA"- Blutröhrchen

##### Versandzubehör

- 3 Versandhülsen mit Deckel
- 1 frankierter Rücksendeumschlag

##### Dokumente für den Patienten

- 1 Informationsschreiben (S. 88 Anhang)
- 1 Gebrauchsanweisung (S. 86 Anhang)
- 1 Checkliste (S. 94 Anhang)
- 2 Einwilligungserklärungen (S. 91 Anhang)
- 1 Danksagung für Studienteilnehmer (S. 95 Anhang)

##### Dokumente für den Arzt des Patienten

- 1 Informationsschreiben (S. 96 Anhang)

**Abbildung Nr. 5:** Inhalt des Rekrutierungs-Sets für den Patienten



### *5. Einwilligung und Gewinnung der DNA*

Nach Empfang des Rekrutierungs-Sets war der Patient angehalten, die beiliegenden Unterlagen sorgfältig zu studieren. Die Gebrauchsanweisung enthielt Instruktionen über das weitere Vorgehen, wie beispielsweise die Handhabung des Blutentnahme- und des Versandzubehörs mit darauffolgendem Besuch beim Hausarzt oder Gastroenterologen zur Blutentnahme. Die erste Einwilligungserklärung konnte den persönlichen Unterlagen des Patienten zugeführt werden, die zweite war mit Name, Datum, Ort und Unterschrift zu versehen. Außerdem sollten Haken an entsprechenden Einwilligungsoptionen gesetzt werden (s. Anhang 4).

Mit dem Informationsschreiben, dem Blutentnahme- und Versandzubehör suchte der Patient im Anschluss entweder im Rahmen einer Routine-Blutentnahme oder ganz gezielt seinen Hausarzt oder Gastroenterologen auf. Dieser konnte durch das Schreiben (s. Anhang 7) alle wichtigen Informationen zur Studie in kurzer Zeit sichten und hatte mit dem Blutentnahmeset bereits alle dafür benötigten Utensilien zur Hand, sodass keine weiteren Kosten anfielen. Die drei EDTA Blutröhrchen sollten bis zu entsprechender Markierung mit Blut gefüllt und mehrere Male leicht geschwenkt werden, um eine ausreichende Inhibierung der Gerinnung gewährleisten zu können.

### *5. Rückführung des Rekrutierungs-Sets an die Studienzentrale*

Nach der Blutentnahme verpackte der Arzt oder der Patient die drei EDTA-Blutröhrchen in die dafür vorgesehenen Versandhüllen und schickte sie zusammen mit der zweiten Einwilligungserklärung innerhalb von drei Tagen in dem vorfrankierten Umschlag an die Studienzentrale in Mainz zurück. Die beigelegte Checkliste (s. Anhang 5) half dem Patienten dabei, die Übersicht über die zurückzuführenden Dokumente, Zeiträume und Utensilien zu bewahren.

### *6. DNA Asservierung, histopathologische Verifizierung und Molekulargenetische Analyse*

In der Studienzentrale in Mainz erfolgte in der Regel bereits kurz nach postalischem Eingang die tägliche Sichtung der eingehenden Rücksendeumschläge. Die 3 EDTA-Blutröhrchen wurden unter strengem Eigenschutz, wie bei Umgang mit Blutprodukten üblich, entnommen und bei -20 Grad Celsius eingelagert. Alle Blutproben, die

beiliegende Einwilligungserklärung und der Fragebogen des Patienten wurden außerdem mit Barcodes pseudonymisiert.

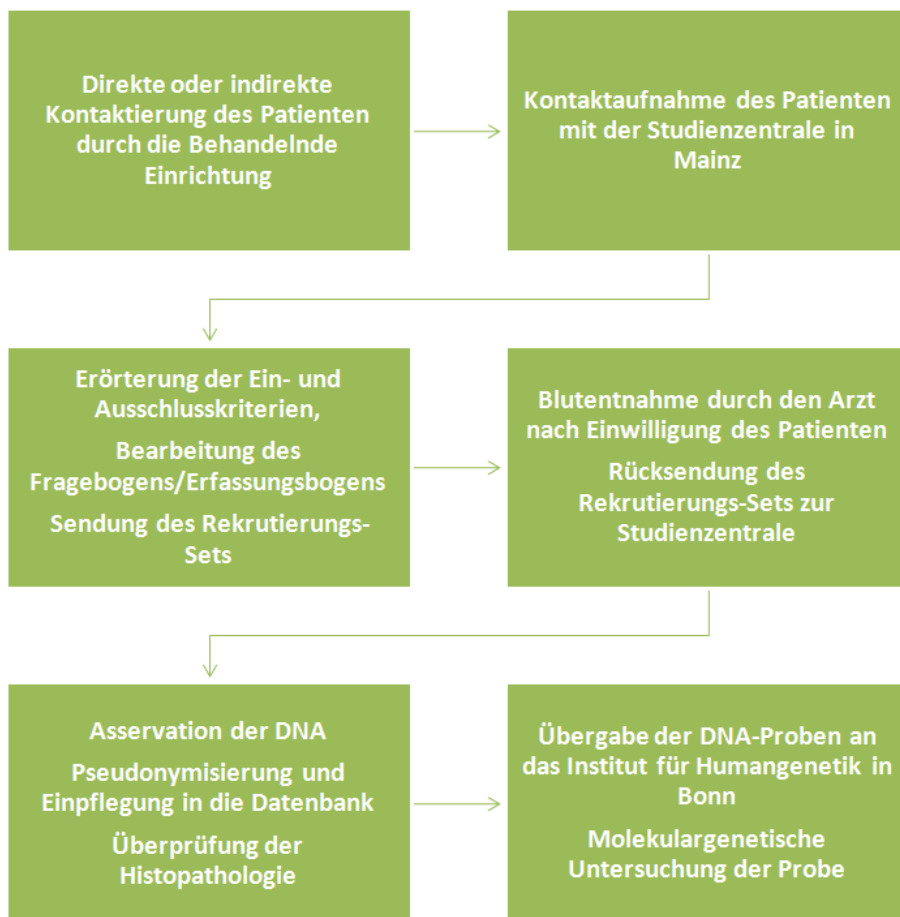
Nur autorisierte Mitarbeiter der Studienzentrale konnten über einen gesicherten Zugang Barcodes und Patientendaten in SPSS einpflegen und die dort über den Fragebogen erhobene Phänotyp- Daten sichten.

Anschließend erfolgte die Verifizierung der histopathologischen Proben aus der Speiseröhre des Patienten auf die Entität eines Barrett Karzinoms. War aus den Unterlagen des Patienten nicht ohnehin eine histopathologische Sicherung des Instituts für Pathologie in Bayreuth zu entnehmen, so erfolgte dort unter Leitung von Priv.- Doz. Dr. Michael Vieth die Zweitsichtung der Proben.

Die so zur molekulargenetischen Analyse freigegebenen Blutproben konnten nun in regelmäßigen Abständen an das Institut für Humangenetik der Universitätsklinik Bonn überführt werden. Die Proben wurden hierfür auf Trockeneis in extra dafür vorgesehenen Transportboxen gelagert und per PKW nach Bonn transportiert. Dort angekommen wurden die Proben erneut auf -20 Grad Celsius gekühlt und anschließend den molekulargenetischen Analysen unterzogen.

#### *7. Rückmeldung und Dankeschreiben an den Patienten*

Hatte der Patient erfolgreich teilgenommen, wurde ihm im Anschluss ein Dankeschreiben zugesandt(s. Anhang 6) in dem seine Beteiligung zur Erforschung der Ursachen des Barrett-Karzinoms gewürdigt und angeboten wurde, bei noch ausstehenden Fragen jederzeit die Studienzentrale in Mainz kontaktieren zu können. Außerdem wurden alle Patienten zur Teilnahme an künftigen Informationsveranstaltungen eingeladen.



**Abbildung Nr. 6:** Ablauf der Rekrutierung

### 3.2 Erhobene Phänotypinformationen des Kollektivs an Patienten mit Barrett-Karzinom

Insgesamt konnten 856 Fragebögen durch strukturierte, standardisierten Interviews mit Patienten erhoben werden (s. Tabelle 7). Weitere 171 Patienten wurden per Erfassungsbogen rekrutiert, welcher, wie zuvor beschrieben, jedoch keine Phänotyp- oder Umweltinformationen enthielt. Aus den Fragebögen wurden insgesamt 27 teils qualitative, teils quantitative Phänotypen/Umweltfaktoren ausgewählt und anschließend Genotyp-Phänotyp- sowie Genotyp-Umwelt-Assoziationsanalysen unterzogen (s. Tabelle 8). Die davon in vorliegender Dissertation verwendeten Daten sind in Tabelle 9 ersichtlich.

**Tabelle 7:** Anzahl der über Fragebogen und Erfassungsbogen rekrutierten Patienten

	Patienten aus eigener Rekrutierung (N)	Gesamtkollektiv der rekrutierten Patienten (N)
Fragebogen	205	856
Erfassungsbogen	34	171
Gesamt	239	1.207

Erfasst wurden unter anderem das Datum der Erstdiagnose eines Barrett-Karzinoms oder Barrett-Ösophagus, wobei nochmals differenziert wurde, ob vor der Diagnose des Karzinoms bereits ein Barrett Ösophagus nachgewiesen wurde und ob dieser eine Länge von über 3cm (Long segment) oder unter 3cm (Short segment) aufwies. Konnte der Patient zu diesen und anderen Fragestellungen, wie beispielsweise dem Alter bei Diagnosestellung, keine genauen Angaben machen, so war es teilweise möglich, den Fragebogen durch klinische- und histopathologische Befunde zu ergänzen.

Das Geschlecht des Patienten, die Einschätzung seiner körperlichen Aktivität, seine Herkunft und die seiner Vorfahren wurden ebenso erfasst wie das Vorkommen von weiteren Barrett Erkrankungen in seiner Familie oder Verwandtschaft. Des Weiteren wurde der Patient zu Komorbiditäten wie Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems, Diabetes Mellitus Typ I und II, dem Vorkommen von malignen Tumoren, Allergien oder Autoimmunerkrankungen, einem stattgehabten Ulcus ventriculi/duodeni, einer diagnostizierten oder behandelten Helicobacter-pylori-Infektion und ihm bekannten Hiatushernien befragt.

Festgehalten wurden außerdem den Magen-Darm-Trakt betreffende Operationen, wie eine Fundoplikatio oder Vagotomie, eine Mukosaablation oder Photodynamische Therapie, sowie das entsprechende Datum des Eingriffs. Besonderes Augenmerk lag auf der qualitativen und quantitativen Erfassung von exogenen Risikofaktoren, wie die Erfassung des Kaffeekonsums (Kaffeekonsum ja/nein sowie Anzahl der Tassen (0,2L) pro Tag), des Nikotinkonsums (Nikotinkonsum ja/nein, ehemaliger Nikotinkonsum ja/nein, Berechnung der pack-years) sowie des Alkoholkonsums (Alkoholkonsum ja/nein sowie Konsum in Gramm pro Tag).

Um einen der Hauptrisikofaktoren, den gastroösophagealen Reflux, ausgiebig darstellen zu können, wurde der Patient über Beschwerden im Bezug zur täglichen Lebensqualität befragt. Stellung genommen wurde unter anderem zum Auftreten

von Reflux bei täglichen Aktivitäten wie dem Verzehr bestimmter Speisen, der Ausübung sportlicher Tätigkeiten oder dem Ein- und Durchschlafprozess. Zuletzt wurde erfasst, welche Medikamente der Patient derzeit und vor der Diagnose der Barrett-Krankheit einnahm um die Refluxsymptome zu mildern, und ob in der Verwandtschaft weitere Personen mit etwaigen Symptomen vorkommen.

**Tabelle 8:** Auflistung aller Daten, die im Rahmen der Studie durch Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen auf Assoziation hin untersucht wurden.

Phänotyp Nr.	Abkürzung	Kategorie	Phänotypen/ Umweltfaktoren	Variable	Anzahl (N)
<b>01</b>	sex	Geschlecht	Weiblich	qualitativ	123
	sex	Geschlecht	Männlich	qualitativ	904
	sex	Geschlecht	NA	qualitativ	0
<b>02</b>	age_d	Erstmanifestation	Alter in Jahren bei Diagnosestellung	quantitativ	1006
	age_d	Erstmanifestation	NA	quantitativ	21
<b>03</b>	clas_BE	Barrett-Diagnose	Long segment Barrett-	qualitativ	284
	clas_BE	Barrett-Diagnose	Short segment Barrett	qualitativ	267
	clas_BE	Barrett-Diagnose	NA	qualitativ	476
<b>04</b>	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
<b>05</b>	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
<b>06</b>	act2	Körperliche Aktivität des Pat.	Ja	qualitativ	766
	act2	Körperliche Aktivität des Pat.	Nein	qualitativ	55
	act2	Körperliche Aktivität des Pat.	NA	qualitativ	206
<b>07</b>	ko1	Komorbidität Herz-Kreislaufkrankungen	Ja	qualitativ	537
	ko1	Komorbidität Herz-Kreislaufkrankungen	Nein	qualitativ	306
	ko1	Komorbidität Herz-Kreislaufkrankungen	NA	qualitativ	184
<b>08</b>	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
<b>09</b>	ko3	Komorbidität Ulcus ventriculi/duodeni	Ja	qualitativ	100
	ko3	Komorbidität Ulcus ventriculi/duodeni	Nein	qualitativ	742
	ko3	Komorbidität Ulcus ventriculi/duodeni	NA	qualitativ	185
<b>10</b>	ko4	Komorbidität Hiatushernie	Ja	qualitativ	529
	ko4	Komorbidität Hiatushernie	Nein	qualitativ	296
	ko4	Komorbidität Hiatushernie	NA	qualitativ	202
<b>11</b>	ko5	Komorbidität maligner Tumor	Ja	qualitativ	129
	ko5	Komorbidität maligner Tumor	Nein	qualitativ	563
	ko5	Komorbidität maligner Tumor	NA	qualitativ	335
<b>12</b>	ko6	Komorbidität Allergien	Ja	qualitativ	185
	ko6	Komorbidität Allergien	Nein	qualitativ	657
	ko6	Komorbidität Allergien	NA	qualitativ	185
<b>13</b>	ko7	Komorbidität Helicobacterpylori Infektion	Ja	qualitativ	108
	ko7	Komorbidität Helicobacterpylori Infektion	Nein	qualitativ	721
	ko7	Komorbidität Helicobacterpylori Infektion	NA	qualitativ	198
<b>14</b>	or	Hernien OP	Ja	qualitativ	147
	or	Hernien OP	Nein	qualitativ	690
	or	Hernien OP	NA	qualitativ	190
<b>15</b>	cof1	Kaffeekonsum	Ja	qualitativ	714
	cof1	Kaffeekonsum	Nein	qualitativ	103
	cof1	Kaffeekonsum	NA	qualitativ	210
<b>16</b>	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
<b>17</b>	alc1	Alkoholkonsum	Ja	qualitativ	567
	alc1	Alkoholkonsum	Nein	qualitativ	257

	alc1	Alkoholkonsum	trockener Alkoholiker	qualitativ	9
	alc1	Alkoholkonsum	NA	qualitativ	194
<b>18</b>	alc2	Alkoholkonsum in Gramm pro Tag		quantitativ	837
	alc2	Alkoholkonsum in Gramm pro Tag	NA	quantitativ	190
<b>19</b>	alc3	Risikogruppe Alkoholkonsum	riskanter Alkoholkonsum	qualitativ	121
	alc3	Risikogruppe Alkoholkonsum	risikoarmer Alkoholkonsum (m<30g/d.	qualitativ	445
	alc3	Risikogruppe Alkoholkonsum	kein Alkoholkonsum	qualitativ	259
	alc3	Risikogruppe Alkoholkonsum	NA	qualitativ	202
<b>20</b>	tab1	Aktueller Raucher	Ja	qualitativ	100
	tab1	Aktueller Raucher	Nein	qualitativ	736
	tab1	Aktueller Raucher	NA	qualitativ	191
<b>21</b>	tab2	Raucher pack-years		quantitativ	99
	tab2	Raucher pack-years	NA	quantitativ	928
<b>22</b>	tab3	Ehemaliger Raucher	Ja	qualitativ	512
	tab3	Ehemaliger Raucher	Nein	qualitativ	320
	tab3	Ehemaliger Raucher	NA	qualitativ	195
<b>23</b>	tab4	Ehemaliger Raucher pack-years		quantitativ	506
	tab4	Ehemaliger Raucher pack-years	NA	quantitativ	523
<b>24</b>	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
<b>25</b>	refl2	Vorhandensein von Reflux	Ja	qualitativ	647
	refl2	Vorhandensein von Reflux	Nein	qualitativ	186
	refl2	Vorhandensein von Reflux	NA	qualitativ	194
<b>26</b>	refl3	Reflux >2x/Woche	Ja	qualitativ	448
	refl3	Reflux >2x/Woche	Nein	qualitativ	359
	refl3	Reflux >2x/Woche	NA	qualitativ	220
<b>27</b>	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

**Tabelle 9:** Auflistung aller Daten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen auf Assoziation hin untersucht wurden.

Abkürzung	Kategorie	Phänotypen/ Umweltfaktoren	Variable	Anzahl (N)
<b>Age</b>	Durchschnittliches Alter in Jahren bei Diagnosestellung		Quantitativ	21 (NA)
<b>famBE</b>	Familiäre Fälle BE 1. Grades	Ja	Qualitativ	24
	Familiäre Fälle BE 1. Grades	Nein	Qualitativ	980
	Familiäre Fälle BE 1. Grades	NA	Qualitativ	23
<b>Ref11</b>	Reflux subjektives Beschwerden	Keine	Qualitativ	186
	Reflux subjektives Beschwerden	Leicht	Qualitativ	125
	Reflux subjektives Beschwerden	Mittel	Qualitativ	171
	Reflux subjektives Beschwerden	Stark	Qualitativ	351
	Reflux subjektives Beschwerden	NA	Qualitativ	194
<b>Ref13</b>	Reflux >2x pro Woche	Ja	Qualitativ	216
	Reflux >2x pro Woche	Nein	Qualitativ	490
	Reflux >2x pro Woche	NA	Qualitativ	220
<b>Cof1</b>	Kaffeekonsum	Ja	Qualitativ	714
	Kaffeekonsum	Nein	Qualitativ	103
	Kaffeekonsum	NA	Qualitativ	210
<b>Tab1</b>	Aktueller Raucher	Ja	Qualitativ	100
	Aktueller Raucher	Nein	Qualitativ	736
	Aktueller Raucher	NA	Qualitativ	191
<b>Act1</b>	Körperliche Aktivität des Patienten	Nie	Qualitativ	55
	Körperliche Aktivität des Patienten	Selten	Qualitativ	109
	Körperliche Aktivität des Patienten	Gelegentlich	Qualitativ	161
	Körperliche Aktivität des Patienten	Regelmäßig	Qualitativ	496
	Körperliche Aktivität des Patienten	NA	Qualitativ	206

### 3.3 Auswahl genetischer Varianten für die Replikationsanalyse und Genotyp-Phänotyp-/Umwelt-Analysen des Fall-Kontroll-Kollektivs des Barrett-Konsortiums

In Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Thomas L. Vaughan, dem Leiter des BEACON-Konsortiums, wurden g4b 94 SNP-Marker zur Replikationsanalyse und Testung auf Genotyp-Phänotyp- sowie Genotyp-Umwelt-Assoziationen am rekrutierten Kollektiv (1.064 Barrett-Karzinom Patienten und 1.019 Kontrollen) zur Verfügung gestellt.



Diese 94 SNPs hatten in der bis dahin noch nicht publizierten Studie des BEACON-Konsortiums (Levine et al.) (28) mit einem p-Wert von  $<10^{-04}$  im Initialkollektiv (3.928 Patienten mit Barrett-Ösophagus/-Karzinom und 3.207 Kontrollen europäischer Abstammung) Assoziationen zum Barrett Ösophagus/-Karzinom aufgewiesen.

In der ersten GWAS wurden zwei Risikovarianten identifiziert, die genomweite Signifikanz aufwiesen. Eine im majorhistocompatibilitycomplex (Chromosom 6p21) und eine in der Nähe des FOXF1 Gens (auf Chromosom 16q24). Im weiteren Verlauf sollten Levine et al. noch drei weitere Risikovarianten in CRTC1 (Chromosom 19p13), in BARX1 (Chomosom 9q22) und eines in der Nähe des FOXP1 Gens entdecken (auf Chromosom 3p14), während g4b noch vor Publikation von Levine et al. mit den Analysen beginnen konnte. Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind 12 der 94 SNP-Marker, die auf Chromosom 15 und 16 Lokalisiert sind (s. Tabelle 10). Unabhängig von der Tatsache, dass die Analysen des g4b sich auf die Replikation der genetischen Varianten der 94 SNPs konzentrierten, ist davon auszugehen, dass weder im Initial- noch im Replikationskollektiv des BEACON-Konsortiums damit wirklich alle relevanten Risikovarianten für die Entwicklung eines Barrett-Karzinoms erfasst wurden. Zum einen ist die statistische Aussagekraft des verwendeten Replikationskollektivs immernoch relativ klein, zum anderen könnten im Initialkollektiv durch Zufall Barrett-Patienten mit besonderen Wechselwirkungen zwischen genetischen und exogenen Risikofaktoren vorhanden gewesen sein, wodurch sie in der Replikationsanalyse eine Verifizierung der Signifikanz nicht standhielten.

**Tabelle 10:** SNPs auf Chromosom 15 und 16, die Einzug in die Replikationsanalysen und Genotyp-Phänotyp/Genotyp-Umwelt-Assoziationsuntersuchungen fanden.

Chromosom	SNP-Marker	Lokalisation in bp <sup>1</sup>	Allel 1/2 <sup>2</sup>	Gen <sup>3</sup>	Assoziiertes Alle der BEACON Studie
15	rs4646638	58248783	G/A	ALDH1A2	EXISTIERT NICHT
15	rs3784262	58253106	T/C	ALDH1A2	A
16	rs254348	65980789	A/G	CDH5	G
16	rs9926271	73125231	C/T	LOC100132068	T
16	rs1490865	86387275	G/A	FOXF1	G
16	rs3111601	86400081	C/T	FOXF1	C
16	rs9936833	86403118	C/T	FOXF1	C
16	rs1532167	86404204	T/G	FOXF1	T
16	rs3950627	86436343	A/C	FOXF1	A
16	rs8045253	86437767	C/T	FOXF1	C
16	rs2178146	86463695	T/C	FOXF1	C
16	rs4843376	86470082	A/G	FOXF1	G

<sup>1</sup> Angabe nach hg18

<sup>2</sup> Allel 1: das in der europäischen Population seltene Allel, Allel 2: das in der europäischen Population häufige Allel

<sup>3</sup> Nächstgelegenes Gen

### 3.4 Durchführung der Genotypisierung genetischer Varianten des Fall-Kontroll-Kollektivs des Barrett-Konsortiums

Am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn wurden die zuvor genannten SNP-Marker durch die dort verfügbare Sequenom Technologie mit einer sogenannten iPlex Reaktion der Genotypisierung zugeführt. Diese Technologie macht es möglich, in einem Reaktionsansatz bis zu 40 SNPs gleichzeitig zu genotypisieren. Das Prinzip basiert auf einer PCR mit anschließender Massen-Extensions-Reaktion eines massenmodifizierten Zusatzprimers (Extensionsprimer), der SNP-spezifisch ist. Anschließend findet eine Analyse mittels der sogenannten MALDI-ToF-MS (Matrix-assisted-Laser-Desorption/Ionisation-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry) statt (135-137).

Im Anschluss an das Fallkollektiv des Barrett-Konsortiums von 1.064 Barrett-Karzinom Patienten deutscher Ethnizität wurden die genetischen Varianten in einem Kontrollkollektiv von 1.019 Probanden gleicher Ethnizität (498 männlichen- und 521 weiblichen Geschlechtes), die ihr Einverständnis zur Durchführung von Assoziationsanalysen erteilt hatten, genotypisiert. Diese sogenannten

Universalkontrollen des Institutes für Humangenetik des Universitätsklinikums in Bonn wurden bereits für zahlreiche andere Assoziationsanalysen herangezogen und waren anamnestisch gesund.

### 3.5 Biostatistische Analysen des Fall-Kontroll-Kollektivs des Barrett-Konsortiums

Die biostatistischen Analysen der vorliegenden Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Müller-Myhsok vom Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München vorgenommen. Zu Beginn fand eine Qualitätskontrolle der Genotypdaten statt, durch welche ausschließlich DNA-Proben mit einer Genotypisierungsrate von  $\geq 98\%$  Verwendung fanden. Mit Hilfe des Programms PLINK wurden daraufhin quantitative Phänotypen als lineare- und binäre Phänotypen als logistische Regression analysiert, wobei das Alter sowie Geschlecht als Kovarianten verwendet wurden. Eine Abweichung vom Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE), dessen Schwelle bei  $P_{\text{HWE}} \leq 1 \times 10^{-04}$  im Patientenkollektiv und  $P_{\text{HWE}} \leq 1 \times 10^{-03}$  im Kontrollkollektiv gewählt wurde, wies keine der in vorliegender Dissertation verwendeten Varianten auf.

Bei den Genotyp-Phänotyp-/Genotyp-Umwelt-Analysen wurde ein explorativer Ansatz mit einer Signifikanzschwelle von  $p = 0,05$  (zweiseitig, nominal signifikant) gewählt. Bei den Fall-Kontroll-Analysen wurde eine Signifikanzschwelle nach Bonferroni (Bonferroni-Korrektur:  $p = 0,05$  bei 94 SNP-Markern) mit  $p = 5,3 \times 10^{-04}$  angesetzt. Einer nominalen Assoziation wurde ein p-Wert von 0,05 (bei zweiseitiger Testung) bzw. 0,1 (bei einseitiger Testung) zugewiesen.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Darstellung der phänotypischen Merkmale des Kollektivs von 1.027 Barrett-Karzinom-Patienten

Basierend auf der Befragung unseres Kollektivs von 1.027 Patienten, wurden sieben von insgesamt siebenundzwanzig Phänotypen in vorliegender Dissertation zur genaueren Betrachtung ausgewählt.

Es wurde das durchschnittliche Alter des Patienten bei Diagnosestellung errechnet sowie die subjektive Stärke seiner Refluxbeschwerden und deren Häufigkeit erfragt. In diesem Kontext äußerte sich der Patient auch über Familienangehörige ersten Grades mit BÖ/BK. Hinzukommend wurde der Raucherstatus abgeklärt, die Ausübung regelmäßiger körperlicher Aktivität mit einbezogen und der Konsum von Kaffee festgehalten.

Das durchschnittliche Alter männlicher Patienten bei Diagnosestellung lag bei 61,56 Jahren, wobei der jüngste Patient 22 Jahre und der älteste Patient 90 Jahre alt war.

Bei den weiblichen Patienten lag das durchschnittliche Alter bei Diagnosestellung geringfügig höher, nämlich bei 63,88 Jahren, wobei die jüngste Patientin 35 Jahre und die älteste Patientin 88 Jahre alt war. Bei 21 Patienten ließ sich keine Angabe zum Alter bei Diagnosestellung erheben.

Bei den subjektiven Refluxbeschwerden gaben 351 (34,17%) Patienten an, unter starkem Reflux gelitten zu haben, 171 (16,65%) litten unter mittlerem, 125 (12,17%) unter leichten Refluxbeschwerden. Rund 186 (18,11%) der Barrett-Karzinom-Patienten gaben an, keinerlei Refluxbeschwerden erfahren zu haben. 194 (18,88%) konnten dazu keine Angaben machen.

Von jenen Patienten, die unter Reflux litten, gaben 216 (21,03%) an, mehr als zweimal pro Woche Reflux verspürt zu haben. 490 (47,71%) Patienten hatten weniger als zweimal pro Woche Reflux und 220 (21,42%) Patienten konnten diesbezüglich keine genauen Angaben machen.

Die Befragung des Kollektivs zu Familienangehörigen ersten Grades mit BÖ oder BK ergab interessanterweise bei nur 24 (2,33%) von 1027 Patienten eine positive Familienanamnese. Bei 980 (95,42%) wurde die Diagnose BÖ/BK bei Familienangehörigen ersten Grades verneint und 23 (2,23%) Patienten konnten diesbezüglich keine genauen Angaben machen.

Rund 100 (9,73%) Patienten gaben an, aktuell zu rauchen. 736 (71,66%) hatten derzeit keinen aktiven Raucherstatus und 191 (18,59%) machten keine Angabe.

Ein Großteil der Patienten (n = 714) gab an, Kaffee zu konsumieren, was immerhin (69,52%) des Kollektivs ausmachte. Nur 103 (10,02%) Patienten verneinten den Konsum von Kaffee, zu 210 (20,44%) Patienten lagen diesbezüglich keine Daten vor.

Zuletzt gaben die Patienten Auskunft über die Häufigkeit körperlicher Aktivität. Regelmäßig sind der überwiegende Anteil des Kollektivs, nämlich 496 (48,29%) der Patienten, körperlich aktiv. Gelegentlich sind es 161 (15,67%) Patienten und selten 109 (10,61%) Patienten. Gut 55 (5,35%) Patienten sind nie körperlich aktiv und von 206 (20,05%) Patienten ließen sich diesbezüglich keine Angaben erheben.

#### 4.2 Ergebnisse der Replikationsanalyse

Ein Fall-Kontroll-Kollektiv von 1.064 Barrett-Karzinompatienten und 1.019 Kontrollen wurde in der vorliegenden Arbeit einer Replikationsanalyse unterzogen. Dabei wurde versucht, 12 genetische Risikovarianten auf Chromosom 15 und 16, die im Kollektiv des BEACON-Konsortiums einen p-Wert von  $<10^{-04}$  aufwiesen und somit Assoziation zum Barrett-Ösophagus oder Barrett-Karzinom zeigten, zu replizieren.

Unter zweiseitiger Testung wies jedoch keiner der SNP-Marker eine signifikante Assoziation zum Barrett-Karzinom auf.

Sowohl das häufige Allel T des SNP-Markers rs1490865, der 157 kb vom Gen FOXF1 (Forkhead Box) entfernt ist, als auch das häufigere Allel A des SNP-Markers rs2178146, das 80kb von FOXF1 entfernt lokalisiert ist, verfehlten knapp eine signifikante Assoziation.

Das häufige Allel T des SNP-Markers rs1490865 lag bei 75,52% der Patienten und bei 74,02% der Kontrollen vor ( $p_{\text{einseitig}} = 0,059$ , RR = 1,136). Das häufigere Allel A des SNP-Markers rs2178146 kam bei 62,15% der Patienten im Vergleich zu 59,66% bei den Kontrollen vor ( $p_{\text{einseitig}} = 0,089$ , RR = 1,131). Zuletzt kam das seltenere Allel C des SNP-Markers rs9936833, das 141 kb von FOXF1 (Forkhead Box) lokalisiert ist, bei 39,42% der Patienten gegenüber 36,88% bei Kontrollen vor. Die Variante rs9936833 hatte sowohl in der ersten GWAS des WTCCC2 (27) als auch in der zweiten GWAS des BEACON-Konsortiums (28) eine genomweit signifikante

Assoziation gezeigt. Im g4b-Kollektiv konnte eine Krankheitsassoziation jedoch nicht repliziert werden ( $p_{\text{einseitig}} = 0,090$ ,  $RR = 1,125$ ).

Auch SNP Marker rs3111601, der in der GWAS des BEACON-Konsortiums eine Assoziation zum BÖ und BK aufwies und nahe des Gens FOXF1 lag, konnte in unserer Replikationsanalyse nicht als nominal signifikant befunden werden. Das BEACON-Konsortium hatte diesen und drei weitere SNPs mit signifikanteren P-Werten nahe FOXF1 als rs9936833 identifiziert (28). Dessen risikoassoziiertes Allel C kam jedoch in beiden Studien häufiger und mit vergleichbaren Frequenzen bei Patienten gegenüber Kontrollen vor (34,57% versus 32,18%,  $p = 0,237$ ,  $RR = 1,103$ ).

**Tabelle 11:** Ergebnisse der Replikationsanalyse von 12 genetischen Varianten auf Chromosom 15 und 16, die im Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums krankheitsassoziiert waren, anhand des Fall-Kontroll-Kollektivs des Barrett-Konsortiums von 1.064 Patienten und 1.019 Kontrollen.

Chr.	SNP	Position <sup>1</sup>	Allel 1/2 <sup>2</sup>	Frequenz Allel 1(%)		RR <sup>3</sup>	L95	U95	P <sup>4</sup>	Gen <sup>5</sup>
				Pat.	Kontr.					
15	rs4646638	58248783	C/T	44,7	45,97	1,0440	0,8925	1,2220	0,589	ALDH1A2
15	rs3784262	58253106	G/A	44,32	46,07	1,0170	0,8687	1,1910	0,834	ALDH1A2
16	rs254348	65980789	A/G	39,25	40,35	0,9410	0,8211	1,0790	0,382	CDH5
16	rs9926271	73125231	C/T	1,687	2,089	0,8126	0,4959	1,3310	0,41	LOC100132068
16	rs1490865	86387275	C/T	24,48	25,98	0,8644	0,7429	1,0060	0,0593	FOXF1
16	rs3111601	86400081	C/T	34,57	32,18	1,1030	0,9378	1,2970	0,237	FOXF1
16	rs9936833	86403118	C/T	39,42	36,88	1,1250	0,9819	1,2880	0,0898	FOXF1
16	rs1532167	86404204	A/C	39,44	36,81	1,1210	0,9776	1,2860	0,102	FOXF1
16	rs3950627	86436343	C/A	49,13	46,95	1,1130	0,9722	1,2740	0,121	FOXF1
16	rs8045253	86437767	C/T	38,55	37,06	1,0620	0,9246	1,2200	0,395	FOXF1
16	rs2178146	86463695	G/A	37,85	40,34	0,8691	0,7391	1,0220	0,0895	FOXF1
16	rs4843376	86470082	G/A	46,02	49,03	0,8995	0,7851	1,0310	0,127	FOXF1

<sup>1</sup> Angabe nach hg18

<sup>2</sup> Allel 1: das in der europäischen Population seltene Allel, Allel 2: das in der europäischen Population häufige Allel

<sup>3</sup>RR von Allel 1

<sup>4</sup>zweiseitige Testung

<sup>5</sup>nächstgelegenes Gen

Des Weiteren wurden alle 12 SNP Marker geschlechtsspezifisch auf signifikante Assoziationen zum Barrett-Karzinom getestet. Dabei lagen dem Kollektiv entsprechend der Literatur (35-37) weitaus mehr männliche Patienten zugrunde (938 Patienten, 498 Kontrollen) als weibliche (127 Patienten, 521 Kontrollen). Das häufige Allel T von rs4646638 kam signifikant häufiger bei männlichen Patienten als bei männlichen Kontrollen vor (56,07% Patienten 52,09% Kontrollen,  $p_{\text{zweiseitig}} = 0,033$ ,  $RR = 1,153$ ). Im Kollektiv der weiblichen Patienten und Kontrollen ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen. Hier war das seltene Allel C von rs4646638 häufiger bei den Patienten als bei den Kontrollen, nämlich 49,61% vs. 44,12%,  $p = 0,073$ ,  $RR = 1,287$ . Das häufige Allel A von rs3784262 kam signifikant häufiger bei männlichen Patienten

als bei männlichen Kontrollen vor (56,34% vs. 52,09%  $p_{\text{zweiseitig}} = 0,0457$   $RR = 1,144$ ). Im Kollektiv der weiblichen Patienten und Kontrollen ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen. Hier kam das seltene Allel G von rs3784262 häufiger bei den Patienten als bei den Kontrollen vor (49,21% vs. 44,31%,  $p = 0,162$ ,  $RR = 1,217$ ). Beide SNPs befinden sich in nächster Nähe zum Gen ALDH1A2.

Das häufige Allel A von rs4843376, dessen nächstgelegenes Gen FOXF1 ist, kam signifikant häufiger bei männlichen Patienten als bei männlichen Kontrollen vor (54,68% vs. 50,5%,  $p_{\text{zweiseitig}} = 0,034$ ,  $RR = 1,156$ ). Im Kollektiv der weiblichen Patienten und Kontrollen ließ sich dieser Effekt nicht nachweisen. Hier war das seltene Allel G von rs4843376 häufiger bei den Patienten als bei den Kontrollen (48,82% vs. 48,57%,  $p = 0,523$ ,  $RR = 1,094$ ) vorhanden.

**Tabelle 12:** Ergebnisse der Replikationsanalyse von 12 genetischen Varianten auf Chromosom 15 und 16, die im Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums krankheitsassoziiert waren, anhand des Fall-Kontroll-Kollektivs des Barrett-Konsortiums mit 938 männlichen Patienten und 498 männlichen Kontrollen, sowie von 127 weiblichen Patienten und 521 weiblichen Kontrollen.

Chr.	SNP	Position <sup>1</sup>	Allel 1/2 <sup>2</sup>	m /w <sup>3</sup>	Frequenz Allel 1 (%)		RR <sup>4</sup>	L95	U95	P <sup>5</sup>	Gen <sup>6</sup>
					Pat.	Kontr.					
15	rs4646638	58248783	C/T	m	43,93	47,91	0,8467	0,7269	0,9863	0,03253	ALDH1A2
15	rs4646638	58248783	C/T	w	49,61	44,12	1,287	0,9765	1,696	0,07332	ALDH1A2
15	rs3784262	58253106	G/A	m	43,66	47,91	0,8564	0,7355	0,997	0,04571	ALDH1A2
15	rs3784262	58253106	G/A	w	49,21	44,31	1,217	0,924	1,602	0,1624	ALDH1A2
16	rs254348	65980789	A/G	m	39,47	40,24	0,9585	0,8193	1,121	0,597	CDH5
16	rs254348	65980789	A/G	w	37,6	40,46	0,8888	0,6737	1,173	0,404	CDH5
16	rs9926271	73125231	C/T	m	1,649	2,083	0,7764	0,4413	1,366	0,38	LOC10013 2068
16	rs9926271	73125231	C/T	w	1,969	2,095	0,9309	0,3577	2,422	0,883	LOC10013 2068
16	rs1490865	86387275	C/T	m	24,76	27,77	0,8541	0,7198	1,013	0,070	FOXF1
16	rs1490865	86387275	C/T	w	22,4	24,28	0,9025	0,6536	1,246	0,533	FOXF1
16	rs3111601	86400081	C/T	m	34,5	32,7	1,09	0,928	1,281	0,293	FOXF1
16	rs3111601	86400081	C/T	w	35,04	31,69	1,158	0,8784	1,528	0,298	FOXF1
16	rs9936833	86403118	C/T	m	39,27	36,81	1,1140	0,9521	1,303	0,178	FOXF1
16	rs9936833	86403118	C/T	w	40,55	36,95	1,157	0,8838	1,514	0,289	FOXF1
16	rs1532167	86404204	A/C	m	39,31	37,02	1,106	0,9443	1,296	0,211	FOXF1
16	rs1532167	86404204	A/C	w	40,4	36,61	1,168	0,8882	1,535	0,267	FOXF1
16	rs3950627	86436343	C/A	m	49,07	46,57	1,1150	0,9553	1,302	0,168	FOXF1
16	rs3950627	86436343	C/A	w	49,6	47,3	1,106	0,8381	1,459	0,478	FOXF1
16	rs8045253	86437767	C/T	m	38,67	37,22	1,07	0,9118	1,255	0,409	FOXF1
16	rs8045253	86437767	C/T	w	37,6	36,9	1,039	0,7858	1,373	0,79	FOXF1
16	rs2178146	86463695	G/A	m	37,65	39,66	0,9143	0,779	1,073	0,272	FOXF1
16	rs2178146	86463695	G/A	w	39,37	40,99	0,9258	0,7017	1,2220	0,586	FOXF1
16	rs4843376	86470082	G/A	m	45,32	49,5	0,8439	0,7213	0,9872	0,0339	FOXF1
16	rs4843376	86470082	G/A	w	48,82	48,57	1,094	0,8313	1,439	0,523	FOXF1

<sup>1</sup> Angabe nach hg18

<sup>2</sup> Allel 1: das in der europäischen Population seltene Allel, Allel 2: das in der europäischen Population häufige Allel

<sup>3</sup> m = männlich, w = weiblich

<sup>4</sup> RR von Allel 1

<sup>5</sup> zweiseitige Testung

<sup>6</sup> nächstgelegenes Gen

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

Mit dem Ziel, genetische Varianten zu identifizieren, die signifikante Assoziationen zu ausgewählten klinischen Subphänotypen des 1.027 großen Patiententeilkollektivs aufweisen, wurden die Patienten für vorliegende Arbeit zu 7 Subphänotypen detailliert befragt. Die erfassten Daten und die SNPs der genetischen Varianten der Replikationsanalyse wurden daraufhin einer Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analyse unterzogen (Alle Ergebnisse siehe Anhang 1).

Dabei wurden fünf genetische Varianten identifiziert, die nominal signifikant mit Subphänotypen des Patientenkollektivs assoziiert waren (s. Tabelle 13). Allel A des SNP-Markers rs4843376, das 74kb vom Gen Forkhead Box F1 (FOXF1) lokalisiert ist und sich bereits zweiseitig signifikant assoziiert im männlichen Barrett-Karzinom-Kollektiv zeigte, war sowohl mit familiären Fällen ersten Grades mit Barrett-Ösophagus (fam\_BE) als auch mit Patienten, die keinen Kaffee konsumierten (cof1), signifikant assoziiert. Allel A kam bei Patienten mit familiären Fällen ersten Grades mit Barrett-Ösophagus (N = 23) signifikant häufiger vor als bei Patienten ohne familiären Fälle ersten Grades mit Barrett-Ösophagus (N = 23) (45,45% vs. 34,78%,  $p_{\text{zweiseitig}} = 0,008$ , RR = 1,568). Das Allel war außerdem signifikant häufiger bei Patienten ohne Kaffeekonsum (N = 96) gegenüber Patienten mit Kaffeekonsum (N = 666) (48,57% versus 38,02%,  $p_{\text{zweiseitig}} = 0,006$ , RR = 1,359) auszumachen. Im Gesamtkollektiv trat Allel A häufiger bei Patienten gegenüber den Kontrollen auf (53,98% vs. 50,97%). Allel A des SNP Markers rs2178146, das 80kb vom Gen FOXF1 entfernt ist, war ebenfalls signifikant häufiger bei Patienten ohne Kaffeekonsum (N = 663) als bei Patienten, die Kaffee konsumierten, vorhanden (N = 96) (39,74% vs. 28,69%,  $p_{\text{zweiseitig}} = 0,008$ , RR = 1,363). Im Gesamtkollektiv war Allel A geringfügig häufiger bei Patienten als bei Kontrollen zu finden (62,15% vs. 59,66%). Allel C des SNP Markers rs8045253, das 106kb vom Gen FOXF1 entfernt liegt, kam bei Patienten, die aktuellen Raucherstatus (N = 664) besaßen, signifikant häufiger vor, als bei Patienten die aktuell nicht rauchten (N = 93) (39,98% vs. 31,18%,  $p_{\text{zweiseitig}} = 0,008$ , RR = 1,582). Im Gesamtkollektiv trat Allel C nahezu gleich häufig bei Patienten, wie auch bei Kontrollen auf (38,55% vs. 37,06%). Auch Allel C des SNP Markers rs3950627, das 108kb vom Gen FOXF1 entfernt liegt, war signifikant häufiger bei Patienten mit aktuellem Raucherstatus zu finden (N = 652) als bei Patienten, die aktuell nicht rauchten (N = 92) (49,16% vs. 43,48%,  $p_{\text{zweiseitig}} =$



0,035, RR = 1,408). Im Gesamtkollektiv war Allel C häufiger bei Patienten als bei Kontrollen vorhanden (49,13% vs. 46,95%).

**Tabelle 13:** Signifikante Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp/Genotyp-Umwelt Analysen von sieben Subphänotypen des Patientenkollektivs die auf Assoziation zu genetischen Varianten hin untersucht worden waren und im Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums als krankheitsassoziiert befunden worden waren.

Chr.	SNP	Position <sup>1</sup>	Allel 1/2 <sup>2</sup>	Phänotyp	Kategorie	Variable	P-Wert <sup>3</sup>	RR <sup>4</sup>	Gen <sup>5</sup>
16	rs4843376	86470082	G/A	fam_BE	Familiäre Fälle BE 1. Grades	qualitativ	0,008392	0.4318	FOXF1
16	rs4843376	86470082	G/A	cof1	Kaffeekonsum	qualitativ	0.00564	0.6405	FOXF1
16	rs2178146	86463695	G/A	cof1	Kaffeekonsum	qualitativ	0.007669	0.6367	FOXF1
16	rs8045253	86437767	C/T	tab1	Aktueller Raucher	qualitativ	0.007831	1.582	FOXF1
16	rs3950627	86436343	C/A	tab1	Aktueller Raucher	qualitativ	0.03456	1.408	FOXF1

<sup>1</sup> Angabe nach hg18

<sup>2</sup> Allel 1: das in der europäischen Population seltene Allel, Allel 2: das in der europäischen Population häufige Allel

<sup>3</sup> zweiseitige Testung

<sup>4</sup> RR von Allel 1

<sup>5</sup> nächstgelegenes Gen

## 5. Diskussion

Das BEACON-Konsortium unter der Leitung von Prof. Thomas Vaughan vom Fred Hutchinson Cancer Center der University of Washington stellte g4b Informationen über 94 SNP-Marker zu Verfügung, die in der GWAS des BEACON Konsortiums keine genomweite Signifikanz aufwiesen, jedoch mit einem p-Wert von  $< 10^{-04}$  für eine Replikationsanalyse von großem Interesse waren (28). Gegenstand dieser Arbeit waren 12 dieser SNPs, die sich auf Chromosom 15 und 16 befanden und an einem Kollektiv von 1.064 Patienten mit Barrett-Karzinom und 1.019 Kontrollen europäischer Herkunft repliziert wurden. Alle Patienten durchliefen hierbei ein strukturiertes Interview zur Erfassung von Phänotypinformationen quantitativer und qualitativer Art und gewährten Akteneinsicht zur Diagnosesicherung. Außerdem wurden Blutproben asserviert, um die darin enthaltene DNA molekulargenetisch aufzuarbeiten. Die derzeit noch fortlaufende Studie stellt bereits jetzt eines der weltweit größten Kollektive von Patienten mit Barrett-Karzinom dar, zu denen detaillierte Informationen verfügbar sind. Diese wurden in der vorliegenden Arbeit genutzt, um die Replikationsanalyse durch Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Beziehungen zu ergänzen. Die Erfassung des Barrett-Karzinoms als genetisch-multifaktorielle Erkrankung stellte hierbei eine besondere Herausforderung dar. Rückblickend ließ sich bereits in der Beschreibung von Humphrey et al. (30) aus dem Jahre 1982 eine genetische Komponente hinter der Entwicklung eines Barrett-Ösophagus vermuten, da darin sowohl bei einem 16-jährigen Jungen, als auch bei dessen Bruder und Vater ein BÖ nachgewiesen wurde. Wo zunächst eine monogene Erbkrankheit vermutet wurde, konnte spätestens seit Durchführung größerer Studien mit der Hypothese einer Krankheit multifaktorieller Genese gearbeitet werden, die sich teilweise bereits bei Verwandten ersten und zweiten Grades manifestiert (40).

G4b erfasste die Patienten der Studie daher ebenfalls anamnestisch gezielt auf das Vorliegen eines Barrett-Ösophagus/Karzinoms bei Verwandten ersten oder zweiten Grades und konnten dieses bei 24 (2,33%) der erstgradig Verwandten von 1027 Barrett-Karzinompatienten bestätigen.

Obwohl die Aufnahme von Kaffee nachweislich zu einer Reduktion des Drucks über dem unteren Ösophagussphinkter führt (105), kamen sowohl Nocon et al. in einer Studie mit 7124 Probanden, als auch Kim et al. (107) in einer Metaanalyse von 15 Fall-Kontroll-Studien abschließend zu dem Ergebnis, dass der Konsum von Kaffee nicht in signifikanter Assoziation zum gastroösophagealen Reflux steht. Zengh et al.

(138), aber auch andere Studien legten sogar den Verdacht auf einen protektiven Effekt von Kaffee auf die Entstehung eines BKs nahe (106). Demgegenüber steht die überwiegende Anzahl der Patienten des g4b-Kollektivs, die den täglichen Konsum von Kaffee bejahten (N = 714 (69,52%)). In diesem Zusammenhang gewinnen die Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp-Analysen zusätzlich an Bedeutung. Dementsprechend wurde das Kollektiv ebenfalls auf die subjektiv empfundene Schwere des Refluxes befragt, welcher in der Literatur als einer der maßgeblichen Risikofaktoren für die Entstehung des Barrett-Ösophagus/Karzinoms gilt (4, 6, 90). Rund 351 (34,17%) der befragten Patienten gaben an, unter schwerem Reflux zu leiden. 171 (16,65%) gaben eine als "mittel" empfundene Refluxsymptomatik an, wohingegen 125 (12,17%) der Patienten vor der Diagnose einer Barrett-Erkrankung nur eine leichte Symptomatik erinnernlich ist. Lagergren et al. (6) hatten in diesem Zusammenhang festgestellt, dass der Schwere der Symptomatik eine Rolle in der Entstehung des Barrett-Adenokarzinoms zugesprochen werden muss, wobei dieser Faktor in Kombination mit Frequenz und Dauer der Symptomatik (die ebenfalls in das subjektive Empfinden der Schwere des Refluxes des Patienten einfließen) ein Odds Ratio von 43,5 für die Entstehung eines Karzinoms erzeugte. In gleicher Studie gaben 60% der untersuchten Patienten an, mindestens einmal in der Woche retrosternales Brennen, Regurgitation oder beides erfahren zu haben, während Rubenstein et al. (92) bezüglich der Häufigkeit der Symptomatik (wöchentlich bis täglich) ein bis zu 7,4-faches Risiko angeben konnten. Im g4b-Kollektiv waren es rund 21,03% (N = 216) der Patienten, denen eine Refluxsymptomatik allerdings nicht einmal pro Woche, sondern häufiger als zweimal pro Woche erinnernlich waren. Weitere 21,42% (N = 220) konnten dazu teilweise aufgrund lang zurückliegender Diagnose keine eindeutigen Angaben machen. Es ist also davon auszugehen, dass diese Anzahl geringfügig nach oben korrigiert werden muss.

Interessanterweise gaben rund 186 (18,11%) der befragten Patienten an, keinerlei Reflux vor der Diagnose einer Barrett-Erkrankung verspürt zu haben. Auch in der Literatur findet sich Hinweise darauf, dass bei 45% der Barrett-Ösophagus- und 40% der Barrett-Karzinom-Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose keinerlei Refluxsymptome erinnernlich sind (5-7, 35).

Mit der Ausbildung von Reflux assoziiert ist ebenfalls der Raucherstatus des Patienten(4). In der Literatur ist eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Nikotinaufnahme und Ausbildung eines BÖ (139) sowie eines BK nachweisbar (4, 97). Allerdings ebenso ein signifikant erhöhtes Risiko für die Ausbildung eines BK,

sofern der Patient einfach nur einen derzeitigen Raucherstatus besaß (140, 141), wie aktuell auch 100 (9,73%) der durch das Konsortium befragten Patienten. Anzumerken ist, dass diese Anzahl, ebenso wie in den genannten Studien, lediglich die Anzahl derzeitiger Raucher darstellt. Ein Bezug zu früheren Rauchern und der Anzahl gerauchter pack-years wird nicht hergestellt. Der aktuelle Raucherstatus ist also unabhängig von Dauer und Menge des aufgenommenen Nikotins für sich schon ein signifikanter Risikofaktor.

Zahlreiche Studien und Metaanalysen stellten fest, dass die Ausübung körperlicher Aktivitäten (Joggen, Schwimmen) einen protektiven Faktor für die Genese des Barrett-Ösophagus/-Karzinoms darstellen (105, 142, 143) und körperliche Inaktivität die Gefahr des Refluxes sogar um das Dreifache erhöht (116). Dennoch gaben 496 (48,29%) der befragten Patienten an, regelmäßig, und 161 (15,67%) gelegentlich körperlich aktiv zu sein. Nur 109 (10,61%) gaben an selten körperlich aktiv zu sein, und rund 55 von 1.027 Patienten (5,35%) sind laut eigener Aussage nie körperlich aktiv. Da das Kollektiv ausschließlich Patienten mit Barrett-Karzinom enthielt, wäre eigentlich mit einer Verschiebung der Zahlen hin zu körperlicher Inaktivität zu rechnen gewesen. Dies erklärt sich möglicherweise durch die ungenaue Angabe der "körperlichen Aktivität" als solche. Patienten, die Ausdauer- und Hochleistungssport praktizieren, sind in "regelmäßig körperlicher Aktivität" ebenso enthalten wie Patienten, die regelmäßig wandern oder spazieren gehen. In der Literatur stellten Nilsson et al. eine Risikoreduktion von 50%(106) für Reflux erst bei mindestens 30 minütigem Sport pro Woche (Joggen, Schwimmen) fest. Eine Meta-Analyse (144) fand hingegen eine 32%ige Risikoreduktion für BK, beschrieb jedoch eine moderate Heterogenität der analysierten Studien aufgrund verschiedener Definitionen physischer Aktivität. Möglicherweise ist die Risikoreduktion allerdings auch auf eine "healthyuserbias" zurückzuführen, nachdem physisch aktive Patienten sich möglicherweise gesünder ernähren, weniger rauchen oder generell einen gesünderen Lebensstil praktizieren.

Zuletzt wurden die Patienten über ihr Alter bei Diagnosestellung befragt.

Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass ein erhöhtes Alter (> 75 Jahren) als unabhängiger Risikofaktor angesehen werden kann (99), wie auch die Tatsache, dass Männer im Durchschnitt einige Jahre früher erkranken als Frauen (98). Dies konnte von g4b in Analysen repliziert werden. Im Durchschnitt wurden männliche Patienten im Alter von 61,56 Jahren und Frauen im Alter von 63,88 Jahren diagnostiziert. Diese Zahlen kommen der Studie von Drovdic et al. (37) sehr nahe,

die ein durchschnittliches Alter von 57,4 Jahren bei männlichen und 63,5 Jahren bei weiblichen Patienten anführt.

Die Replikationsanalyse der 12 SNP Marker auf Chromosom 15 und 16 erbrachte keinen neuen genetischen Risikofaktor, der ursächlich für die Entstehung eines Barrett-Karzinoms sein könnte. Weder nach Korrektur auf multiples Testen nach Bonferroni, noch nach zweiseitiger Testung befand sich eine Variante unterhalb der Signifikanzschwelle von  $p = 5 \times 10^{-02}$ , sodass keine signifikante Assoziation zum Barrett-Karzinom festgestellt werden konnte.

Drei der untersuchten SNPs verfehlten knapp eine signifikante Krankheitsassoziation.

Das häufigere Allel T des SNP rs1490865 lag im g4b-Kollektiv bei 75,52% der Patienten und 74,02% der Kontrollen vor ( $p = 0,0593$ ,  $RR = 1,136$ ). Im Initialkollektiv der BEACON-Studie war das seltenere Allel C des SNPs krankheitsassoziiert (24,3% Patienten, 24,1% Kontrollen). In diesem Fall kann es sich sowohl um einen falsch-negativen Befund der von g4b durchgeführten Analyse handeln, welcher sich möglicherweise durch ein zu kleines Patientenkollektiv ergibt, als auch um einen falsch-positiven Befund des BEACON-Initialkollektivs, der beispielsweise auf ein Kollektiv zurückzuführen ist, in welchem durch Zufall die Allel-Frequenz des vermeintlichen Risikoallels häufiger vorkam.

Bei SNP rs2178146 lag ebenfalls beim häufigeren Allel A knapp keine einseitige Krankheitsassoziation vor, mit 62,15% der Patienten und 59,66% der Kontrollen ( $p = 0,089$ ,  $RR = 1,131$ ). Das Initialkollektiv der BEACON-Studie konnte in diesem Fall eine Assoziation zum häufigeren Allel A bestätigen (62% der Patienten und 57,6% der Kontrollen).

Der dritte SNP, rs9936833 und dessen seltenes Allel C, welcher knapp die Krankheitsassoziation verfehlte, wurde bei 39,42% der Patienten und 36,88% der Kontrollen nachgewiesen ( $p = 0,090$ ,  $RR = 1,103$ ) und war in der BEACON-Studie mit vergleichbarer Frequenz krankheitsassoziiert (39,7% der Patienten und 36,6% der Kontrollen).

Das nächstgelegene Gen aller drei SNPs ist FOXF1, das ein hochinteressantes Kandidatengen in der Genese des Barrett-Karzinoms darstellt. Generell stellen die Forkhead-box-Proteine (FOX) Transkriptionsfaktoren dar, die sowohl an Zellregulationsvorgängen (Reparatur, Proliferation, Differenzierung), als auch an der Embryogenese des Ösophagus beteiligt sind (145). Sie sind Zielgene des Hedgehog

Signalwegs, der eine Schlüsselstellung in der Embryogenese darstellt (146). FOXF1 spielt eine essentielle Rolle in der Organogenese des Gastrointestinaltraktes, was unter anderem daran zu erkennen ist, dass Mikrodeletionen im Fox Gencluster zur Ösophagusatresie und Tracheo-ösophagealer Fistelung führt (147). Zwei weitere SNPs waren in den Analysen des BEACON-Konsortiums hochgradig signifikant krankheitsassoziiert, verfehlten jedoch in unserer Studie die Grenze zur Signifikanz. Zum einen SNP rs3111601, der in den Analysen des BEACON-Konsortiums in hohem Kopplungsungleichgewicht mit rs9936833 stand, zum anderen rs3950627, der sich 39kb näher an FOXF1 befindet und den signifikantesten SNP im FOXF1 Genregion darstellte. Erneut ist ein zu kleines Patientenkollektiv oder eine zufällige Rarefizierung der Allel-Frequenz des vermeintlichen Risikoallels im g4b Patientenkollektiv zu diskutieren.

Das seltene Allel C des SNP rs3111601, das sich aus den Analysen von g4b ergab, entsprach auch dem assoziierten Allel der BEACON-Studie, und die Allelfrequenzen unterschieden sich nicht wesentlich (Barrett-Konsortium: 34,57% Patienten vs. 32,18% Kontrollen, BEACON-Konsortium: 34,3% Patienten vs. 30,3% Kontrollen). Jedoch konnte auch hier keine Signifikanz erreicht werden. Gleiches gilt für das seltene Allel C des SNP 3950627 (Barrett-Konsortium: 49,13% Patienten vs. 46,95% Kontrollen, BEACON-Konsortium: 49,4% Patienten vs. 46,5% Kontrollen).

Bezüglich der geschlechtsspezifischen Analyse zeigten interessanterweise die Allele dreier SNPs auf Chromosom 15 und 16 ein signifikant häufigeres Vorkommen bei Karzinompatienten des männlichen Geschlechtes. Davon erreichten zwei SNPs (rs3784262, rs4843376) in der BEACON-Studie zweiseitige Signifikanz. Der SNP Marker rs4646638 wurde dabei in den Analysen des BEACON Konsortiums nicht berücksichtigt, da nicht alle Kandidatengene, die Herr Prof. Thomas I. Vaughan uns zu Verfügung stellte, einer Analyse zugeführt wurden und kann daher in seiner Allelfrequenz und seiner Signifikanz nicht verglichen werden. Diese SNP Marker und weitere Marker auf anderen Chromosomen könnten mit einen Grund für das erhöhte Vorkommen des Barrett-Karzinoms beim männlichen Geschlecht liefern und stellen möglicherweise einen Baustein für eine zukünftige Risikostratifizierung der Entstehung eines Barrett-Karzinoms bei männlichen Patienten dar.

Das häufige Allel A des SNP Markers rs3784262 kam bei 56,34% der männlichen Patienten und bei 52,09% der männlichen Kontrollen vor ( $p = 0,046$ ,  $RR = 1,144$ ) und

hatte in der Replikations-GWAS von Palles et al. (29) genomweite Signifikanz erreicht, jedoch nur in Bezug zu Barrett-Ösophagus-Patienten, wohingegen die geschlechtsspezifische Analyse des Barrett-Konsortiums eine Assoziation zu männlichen Barrett-Karzinompatienten feststellen konnte. Das nächstgelegene Gen des SNPs rs3784262 ist ALDH1A2, das indirekt durch seine Rolle in der Metabolisation von Alkohol in Verdacht steht, an einem inflammatorischen Prozess der Speiseröhre beteiligt zu sein (89). Dieser Marker sollte in zukünftigen Analysen demnach erneut auf seine Assoziation zum Barrett-Karzinom überprüft werden.

Das häufige Allel T des SNPs rs4646638 befindet sich ebenfalls in der Nähe des Gens ALDH1A2, kam bei 56,07% der männlichen Patienten und 52,09% Kontrollen vor und war ebenfalls zweiseitig signifikant mit männlichem Geschlecht assoziiert ( $p = 0,033$ ,  $RR = 1,287$ ). Da dieser SNP Marker dem Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums nicht zugeführt wurde und auch nicht von Palles et al. untersucht wurde, sich jedoch laut Analysen des Barrett-Konsortiums eine signifikante Assoziation in der Nähe eines potentiell krankheitszutraglichen Gens bei männlichen Karzinompatienten feststellen ließ, sollte dieser interessante SNP Marker weiteren Untersuchungen unterzogen werden.

Die Risikoallele der SNP Marker rs4646638 und rs3784262 erreichten zwar in unserer Replikationsanalyse keine Signifikanz, dies könnte jedoch auch an einem zu kleinen Patientenkollektiv liegen.

Das häufige Allel A des SNPs rs4843376 in der Nähe von FOXF1, das ebenfalls bei männlichen Patienten häufiger als bei männlichen Kontrollen vorkam (54,68% vs. 50,5%,  $p = 0,034$ ,  $RR = 1,156$ ) und in der Replikationsanalyse die einseitige Signifikanz nicht erreichte ( $p = 0,127$ ,  $RR = 1,101$ ) stellt jedoch ebenfalls im Kollektiv des BEACON Konsortiums ein signifikant assoziiertes Krankheitsallel dar ( $p = 0,0007$ ,  $RR = 1,14$ ).

Hinzukommend erreichte Allel A des SNP Markers im Rahmen der Genotyp-Phänotyp Analyse die einseitige Signifikanzschwelle für gleich zwei Phänotypen des Patientenkollektivs, nämlich "Familiäre Fälle ersten Grades mit Barrett-Ösophagus" und "Kaffeekonsum".

Das Allel kam damit häufiger bei Barrett-Karzinompatienten vor, deren Verwandte ersten Grades einen Barrett-Ösophagus entwickelt hatten ( $p = 0,008$ ,  $RR = 1,568$ ) und häufiger bei Patienten, die keinen Kaffee konsumierten ( $p = 0,006$ ,  $RR = 1,359$ ) (siehe Tabelle 13). Da die Barrett-Erkrankung eine genetisch multifaktorielle

Erkrankung darstellt, stellt Allel A des SNPs rs4843376 demnach einen weiteren erblichen Risikofaktor dar, dessen Vererbung die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Barrett-Ösophagus bei Verwandten ersten Grades begünstigt. Diese Hypothese müsste allerdings durch weitere Untersuchungen an Kollektiven von Patienten mit Barrett-Karzinom und weiteren phänotypischen Informationen, insbesondere unter Einbeziehung einer ausreichend hohen Anzahl an Verwandten ersten Grades verifiziert werden.

In Bezug auf den Kaffeekonsum kam Allel A des SNP Markers rs4843376 ( $p = 0,006$ ,  $RR = 1,568$ ) aber auch Allel A des SNP Markers rs2178146 ( $p = 0,008$ ,  $RR = 1,363$ ), häufiger bei Patienten ohne Kaffeekonsum vor und zeigten entsprechend der Literatur somit keine Assoziation zwischen Kaffeekonsum und der Ausbildung eines BK sondern untermauerte sogar den Verdacht einer protektiven Wirkung des Kaffeekonsums (105-107).

In Bezug auf den aktuellen Raucherstatus fanden sich ebenfalls zwei signifikant assoziierte SNPs. Allel C des SNP Markers rs8045253 ( $p = 0,008$ ,  $RR = 1,582$ ) und Allel C des SNP Markers rs3950627 ( $p = 0,0346$ ,  $RR = 1,408$ ) waren jeweils mit dem aktuellen Raucherstatus assoziiert und unterstützen somit die in der Literatur beschriebene Assoziation zwischen dem Raucherstatus und der Entwicklung eines BK(4, 140, 141). Da das BEACON Konsortium keine Datenerhebung zu diesen Phänotypen vorgenommen hat, können in diesen Punkten keine vergleichenden Aussagen getätigt werden. Eine Replikation dieser Ergebnisse an einem unabhängigen Kollektiv von Barrett-Karzinompatienten könnte hier weitere Informationen erbringen.

Abschließend gilt es, die Gründe für das Verfehlen der Signifikanzschwelle der 12 replizierten SNPs zu diskutieren.

Wie schon zuvor erwähnt können Kollektive zufällige Anhäufungen eines vermeintlichen Risikoallels zeigen. Es ist jedoch wahrscheinlicher, dass der Nichtreplikation eine zu kleine Fallzahl an Barrett-Karzinom-Patienten zugrundeliegt.

Das Barrett-Konsortium hatte hierzu 1.064 Patienten und 1.019 Kontrollen in die Analysen miteinbeziehen können, wohingegen das BEACON-Konsortium ein Initialkollektiv von 3.928 Patienten und 3.207 Kontrollen aufwies und somit eine höhere statistische Power erreichen konnte.



## 6. Zusammenfassung

Gegenstand vorliegender Dissertation ist das Barrett-Karzinom, das in den letzten vier Jahrzehnten aufgrund seiner starken Zuwachsrate von über 600% (10, 11) und der 5 Jahres-Überlebensrate von maximal 20% in fortgeschrittenen Stadien (13-15) in den westlichen Industrienationen an enormer sozialmedizinischer Bedeutung gewonnen hat.

Eine chronische lokale Inflammation, die durch exogene Risikofaktoren bedingt ist, löst dabei einen Umbauvorgang des Plattenepithels der Speiseröhre aus. Im Rahmen dieser Metaplasie-Dysplasie-Karzinom-Sequenz entsteht als Metaplasie zuerst der Barrett-Ösophagus, der mit einer Konversionsrate von bis zu einem Prozent die einzig bekannte Präkanzerose des Barrett-Karzinoms darstellt (1, 5, 7).

Gesicherte exogene Risikofaktoren stellen derzeit die gastroösophageale Refluxkrankheit (GERD) (3, 4), das Vorliegen einer Hiatushernie, die stammbetonte Adipositas und der Konsum von Nikotin dar (1, 7, 21, 22). Aufgrund der familiären Häufung wurde darüber hinaus festgestellt, dass auch genetische Risikofaktoren an der Entwicklung des Barrett-Ösophagus und Barrett-Karzinoms beteiligt sind. Dabei handelt es sich um multifaktorielle bzw. komplex genetische Erkrankungen, die durch das Zusammenwirken von zahlreichen genetischen Risikovarianten gekennzeichnet sind, die einzeln auch in der gesunden Allgemeinbevölkerung vorkommen. Um sie zu identifizieren, bedient man sich sogenannter genomweiter Assoziationsstudien (GWAS). Hierbei werden genetische Varianten genomweit in großen Fall-Kontrollkollektiven typisiert. Anschließend wird untersucht, ob die Ausprägung der Genvarianten in beiden Kollektiven unterschiedlich ist. Als genetische Varianten werden sogenannte single nucleotide polymorphisms (SNPs) verwendet. Bei GWAS müssen allerdings möglichst große Fall-Kontrollkollektive verwendet werden, da der Signifikanzwert einer GWAS-Assoziation aufgrund des multiplen Testens bei  $p = 5 \times 10^{-08}$  liegt (25, 26).

Unter diesem Aspekt lag das Primäre Ziel dieser Dissertation in der Generierung einer Biobank eines großen Kollektivs von Patienten mit gesichertem Barrett-Karzinom.

Die Studiengruppe des Barrett-Konsortiums rekrutierte zu diesem Zweck in Phase Eins der Studie 1.064 Patienten von welchen 1.027 mit gesicherter

histopathologischer Diagnose eines Barrett-Karzinomes in die Studie eingeschlossen wurden.

In einer zweiten Phase erfolgten strukturiert und standardisierte Interviews um sowohl detaillierte Phänotypdaten zum Patienten, seiner Familie und seiner Umwelt zu erheben, als auch exogene Risikofaktoren und klinische Prägnanztypen zu erfassen.

In der dritten Phase wurde eine Replikationsanalyse mit 12 genetischen Varianten auf Chromosom 15 und 16 durchgeführt, welche in bereits vorliegenden GWAS krankheitsassoziiert waren, und weiterführend auf geschlechtsspezifische Assoziationen getestet. In der letzten Phase wurden von allen Patienten Blutproben zur DNA Extraktion asserviert und mit den bisher erhobenen Daten der Phasen Eins bis Drei Genotyp-Phänotyp- und Genotyp-Umwelt-Analysen durchgeführt.

Insgesamt wurden aus dem Patientenkollektiv 27 Phänotypinformationen seitens des Barrett-Konsortiums erhoben von welchen in vorliegender Arbeit 7 Subphänotypen genauer untersucht wurden.

Von in der Literatur vorbeschriebenen exogenen Risikofaktoren (1, 7, 21, 22), die zur Inflammation und Umwandlung des Plattenepithels der Speiseröhre beitragen, beschrieben passend hierzu im erfassten Patientenkollektiv 62,99% den maßgeblichen Risikofaktor der Refluxsymptomatik vor der Diagnosestellung, wobei 34,17% Patienten unter starkem Reflux litten und 21,03% der Patienten diesen sogar mehr als zweimal pro Woche wahrnahmen.

Lediglich 100 (9,73%) Patienten gaben an, aktuell zu rauchen. Jedoch gaben 736 (71,66%) der Patienten an, in der Vergangenheit einen aktiven Raucherstatus gehabt zu haben.

In der Literatur zeigt sich keine signifikante Assoziation von Kaffeekonsum zum gastroösophagealen Reflux (107) und möglicherweise sogar ein protektiver Effekt gegen die Entstehung eines Barrett-Ösophagus (106). Dennoch wiesen (69,52%) der Barrett-Karzinom-Patienten des Kollektivs einen täglichen Kaffeekonsum auf.

Entsprechend einer komplex-genetischen Vererbung mit multifaktorieller Genese konnte das Vorliegen eines Barrett-Ösophagus/Karzinoms bei Verwandten ersten oder zweiten Grades bei lediglich 24 (2,33%) der erstgradig Verwandten bestätigt werden.

Zahlreiche Studien und Metaanalysen stellten fest, dass die Ausübung körperlicher Aktivitäten (Joggen, Schwimmen) einen protektiven Faktor für die Genese des Barrett-Ösophagus/-Karzinoms darstellen (105, 142, 143) und körperliche Inaktivität die Gefahr des Refluxes sogar um das Dreifache erhöht (116). Dennoch gaben 496 (48,29%) der befragten Patienten an, regelmäßig, und 161 (15,67%) gelegentlich körperlich aktiv zu sein. Da das Kollektiv ausschließlich Patienten mit Barrett-Karzinom enthielt, wäre eigentlich mit einer Verschiebung der Zahlen hin zu körperlicher Inaktivität zu rechnen gewesen. Dies erklärt sich möglicherweise durch die ungenaue Angabe der "körperlichen Aktivität" als solche.

Zuletzt wurden die Patienten über ihr Alter bei Diagnosestellung befragt. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass ein erhöhtes Alter (> 75 Jahren) als unabhängiger Risikofaktor angesehen werden kann (99), wie auch die Tatsache, dass Männer im Durchschnitt einige Jahre früher erkranken als Frauen (98). Dies konnte von g4b in Analysen repliziert werden. Im Durchschnitt wurden männliche Patienten im Alter von 61,56 Jahren und Frauen im Alter von 63,88 Jahren diagnostiziert.

Auf die, in der Literatur weiterhin genannten, Risikofaktoren Hiatushernie, stammbetonte Adipositas und das männliche Geschlecht (1, 7, 21, 22) wird im Rahmen einer anderen Dissertation des Barrett-Konsortiums eingegangen.

Das Fall-Kontroll-Kollektiv des Barrett-Konsortiums wurde zudem in der vorliegenden Arbeit einer Replikationsanalyse unterzogen. Dabei wurde versucht, 12 genetische Risikovarianten auf Chromosom 15 und 16, die im Kollektiv des BEACON-Konsortiums einen p-Wert von  $<10^{-04}$  aufwiesen und somit Assoziation zum Barrett-Ösophagus oder Barrett-Karzinom zeigten, zu replizieren.

Unter zweiseitiger Testung wies jedoch keiner der SNP-Marker eine signifikante Assoziation zum Barrett-Karzinom auf.

Drei der untersuchten SNPs verfehlten knapp eine signifikante Krankheitsassoziation (rs1490865, rs2178146 und rs9936833). Dies könnte einem noch zu kleinen Patientenkollektiv geschuldet sein. Deren nächstgelegenes Gen (FOXF1) zählt zu den Forkhead-box- Proteinen (FOX), welche Transkriptionsfaktoren darstellen, die sowohl an Zellregulationsvorgängen (Reparatur, Proliferation, Differenzierung), als auch an der Embryogenese des Ösophagus beteiligt sind (145) und damit ein hochinteressantes Kandidatengen in der Genese des Barrett-Karzinoms darstellt.

Auch SNP Marker rs3111601, der in der GWAS des BEACON-Konsortiums eine Assoziation zum BÖ und BK aufwies und nahe des Gens FOXF1 lag, konnte in unserer Replikationsanalyse nicht als nominal signifikant befunden werden. Das BEACON-Konsortium hatte diesen und drei weitere SNPs mit signifikanteren P-Werten nahe FOXF1 identifiziert (28).

Des Weiteren wurden alle 12 SNP Marker auf Chromosom 15 und 16 geschlechtsspezifisch auf signifikante Assoziationen zum Barrett-Karzinom getestet.

Die geschlechtsspezifischen Analyse zeigte bei den Allelen dreier SNPs (rs4646638, rs3784262 und rs4843376) ein signifikant häufigeres Vorkommen bei Karzinompatienten des männlichen Geschlechtes.

Das häufige Allel A des SNP Markers rs3784262 hatte interessanterweise in der Metaanalyse von Palles et al. (29) genomweite Signifikanz erreicht, jedoch nur im Bezug zu Barrett-Ösophagus-Patienten, wohingegen die geschlechtsspezifische Analyse des Barrett-Konsortiums eine Assoziation zu männlichen Barrett-Karzinompatienten feststellen konnte. Das nächstgelegene Gen dieses SNPs ist ALDH1A2, welches indirekt durch seine Rolle in der Metabolisation von Alkohol in Verdacht steht, an einem inflammatorischen Prozess der Speiseröhre beteiligt zu sein (89). Zukünftige Analysen sollten der Fragestellung einer Barrett-Karzinom-Assoziation dieses Markers nachgehen.

Das häufige Allel T des SNPs rs4646638, ebenfalls befindlich in der Nähe des Gens ALDH1A2, war ebenfalls zweiseitig signifikant assoziiert und wurde sowohl dem Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums, als auch des Kollektivs von Palles et al. nicht zugeführt, konnte sich damit also lediglich in der Studie des Barrett-Konsortiums als potentiell krankheitszuträgliches Gen darstellen. Dieser interessante SNP Marker sollte daher ebenfalls weiteren Untersuchungen unterzogen werden. Ebenso das häufige Allel A von rs4843376 dessen nächstgelegenes Gen FOXF1 darstellt. Im Kollektiv der weiblichen Patientinnen ließ sich keine signifikante Assoziation nachweisen. Diese SNP Marker könnten mit einen Grund für das erhöhte Vorkommen des Barrett-Karzinoms beim männlichen Geschlecht darstellen.

Hinzukommend erreichte Allel A des SNP Markers rs4843376 im Rahmen der Genotyp-Phänotyp Analyse der zuvor genannten 7 Subphänotypen die einseitige Signifikanzschwelle für gleich zwei Phänotypen des Patientenkollektivs. Es liegt häufiger vor bei Barrett-Karzinompatienten, deren Verwandte ersten Grades ebenfalls einen Barrett-Ösophagus entwickelt hatten (Phänotyp "Familiäre Fälle

ersten Grades mit Barrett-Ösophagus" als auch bei Patienten die keinen Kaffee konsumieren (Phänotyp "Kaffeekonsum"). Letzteres gilt ebenso für den SNP Marker rs2178146. Entsprechend der Literatur (105-107) zeigten diese beiden SNPs somit keine Assoziation zwischen Kaffeekonsum und der Ausbildung eines BK, sondern untermauern den Verdacht der protektiven Wirkung des Kaffeekonsums.

In Bezug auf den aktuellen Raucherstatus fanden sich ebenfalls zwei signifikant assoziierte SNPs. Allel C des SNP Markers rs8045253 und Allel C des SNP Markers rs3950627. Diese waren jeweils mit dem aktuellen Raucherstatus assoziiert und unterstützen somit die in der Literatur beschriebene Assoziation zwischen dem Raucherstatus und der Entwicklung eines BK (4, 140, 141)

Um genauere Replikationsanalysen mit größeren Fallzahlen durchführen zu können und weitere Genotyp-Phänotyp Assoziationen zu erforschen, wird die Rekrutierungsarbeit des Barrett-Konsortiums g4b zur Zeit mit noch detaillierteren Fragebögen weitergeführt. Die bisher gewonnenen Daten, die anteilig in der vorliegenden Arbeit behandelt wurden, bestätigen die Erkenntnisse neuester Literatur über das Barrett-Karzinom und konnten diese mit den Ergebnissen der geschlechtsspezifischen- sowie Genotyp-Phänotyp-/Genotyp-Umwelt-Analysen sogar noch ergänzen.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Gilbert EW, Luna RA, Harrison VL, Hunter JG. Barrett's esophagus: a review of the literature. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2011 May;15(5):708-18.
2. Barrett NR. Chronic peptic ulcer of the oesophagus and 'oesophagitis'. *The British journal of surgery*. 1950 Oct;38(150):175-82.
3. Morales CP, Souza RF, Spechler SJ. Hallmarks of cancer progression in Barrett's oesophagus. *Lancet (London, England)*. 2002 Nov 16;360(9345):1587-9.
4. Schneider JL, Corley DA. A review of the epidemiology of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2015 Feb;29(1):29-39.
5. Peitz U, Malfertheiner P. [Barrett carcinoma--diagnosis, screening, surveillance, endoscopic treatment, prevention]. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2007 Dec;45(12):1264-72.
6. Lagergren J, Bergstrom R, Lindgren A, Nyren O. Symptomatic gastroesophageal reflux as a risk factor for esophageal adenocarcinoma. *The New England journal of medicine*. 1999 Mar 18;340(11):825-31.
7. de Jonge PJ, van Blankenstein M, Grady WM, Kuipers EJ. Barrett's oesophagus: epidemiology, cancer risk and implications for management. *Gut*. 2014 Jan;63(1):191-202.
8. Pohl H, Wrobel K, Bojarski C, Voderholzer W, Sonnenberg A, Rosch T, et al. Risk factors in the development of esophageal adenocarcinoma. *The American journal of gastroenterology*. 2013 Feb;108(2):200-7.
9. Schlansky B, Dimarino AJ, Jr., Loren D, Infantolino A, Kowalski T, Cohen S. A survey of oesophageal cancer: pathology, stage and clinical presentation. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2006 Mar 1;23(5):587-93.
10. Hur C, Miller M, Kong CY, Dowling EC, Nattinger KJ, Dunn M, et al. Trends in esophageal adenocarcinoma incidence and mortality. *Cancer*. 2013 Mar 15;119(6):1149-58.
11. Spechler SJ, Souza RF. Barrett's esophagus. *The New England journal of medicine*. 2014 Aug 28;371(9):836-45.
12. Pohl H, Welch HG. The role of overdiagnosis and reclassification in the marked increase of esophageal adenocarcinoma incidence. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005 Jan 19;97(2):142-6.
13. Hagen JA, DeMeester SR, Peters JH, Chandrasoma P, DeMeester TR. Curative resection for esophageal adenocarcinoma: analysis of 100 en bloc esophagectomies. *Annals of surgery*. 2001 Oct;234(4):520-30; discussion 30-1.
14. Sihvo EI, Luostarinen ME, Salo JA. Fate of patients with adenocarcinoma of the esophagus and the esophagogastric junction: a population-based analysis. *The American journal of gastroenterology*. 2004 Mar;99(3):419-24.
15. Victorzon M, Tolonen P, Kohonen M, Salmo M. Outcome of surgery for oesophageal carcinoma in a low volume centre, with and without preoperative chemoradiotherapy. *Scandinavian journal of surgery : SJS : official organ for the Finnish Surgical Society and the Scandinavian Surgical Society*. 2004;93(1):37-42.
16. Gerd Herold. *Innere Medizin* ed2011. S.428 p.
17. Enzinger PC, Mayer RJ. Esophageal cancer. *The New England journal of medicine*. 2003 Dec 4;349(23):2241-52.

18. Sharma P, McQuaid K, Dent J, Fennerty MB, Sampliner R, Spechler S, et al. A critical review of the diagnosis and management of Barrett's esophagus: the AGA Chicago Workshop. *Gastroenterology*. 2004 Jul;127(1):310-30.
19. 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. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2010 Mar;8(3):235-44; quiz e32.
20. Hvid-Jensen F, Pedersen L, Drewes AM, Sorensen HT, Funch-Jensen P. Incidence of adenocarcinoma among patients with Barrett's esophagus. *The New England journal of medicine*. 2011 Oct 13;365(15):1375-83.
21. Gatenby P, Soon Y. Barrett's oesophagus: Evidence from the current meta-analyses. *World journal of gastrointestinal pathophysiology*. 2014 Aug 15;5(3):178-87.
22. Rubenstein JH. Risk factors for Barrett's esophagus. *Current opinion in gastroenterology*. 2014 Jul;30(4):408-14.
23. Ford AC, Forman D, Reynolds PD, Cooper BT, Moayyedi P. Ethnicity, gender, and socioeconomic status as risk factors for esophagitis and Barrett's esophagus. *American journal of epidemiology*. 2005 Sep 1;162(5):454-60.
24. Tom Strachan APR. *Molekulare Humangenetik*. 3. Aufl. ed2005. S.118 p.
25. Grimm D, Blum HE, Thimme R. [Genome-wide association studies]. *Deutsche medizinische Wochenschrift (1946)*. 2011 Jan;136(3):95-8.
26. Pearson TA, Manolio TA. How to interpret a genome-wide association study. *Jama*. 2008 Mar 19;299(11):1335-44.
27. 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. *Nature genetics*. 2012 Oct;44(10):1131-6.
28. 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. 2013 Dec;45(12):1487-93.
29. Palles C, Chegwidzen 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 Feb;148(2):367-78.
30. Humphries TJ, Everhart CW, Jr. Barrett's esophagus. *Gastrointestinal endoscopy*. 1982 Aug;28(3):210-1.
31. Gelfand MD. Barrett esophagus in sexagenarian identical twins. *Journal of clinical gastroenterology*. 1983 Jun;5(3):251-3.
32. Crabb DW, Berk MA, Hall TR, Conneally PM, Biegel AA, Lehman GA. Familial gastroesophageal reflux and development of Barrett's esophagus. *Annals of internal medicine*. 1985 Jul;103(1):52-4.
33. Jochem VJ, Fuerst PA, Fromkes JJ. Familial Barrett's esophagus associated with adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 1992 Apr;102(4 Pt 1):1400-2.
34. Eng C, Spechler SJ, Ruben R, Li FP. Familial Barrett esophagus and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 1993 Jul-Aug;2(4):397-9.

35. Barrett's esophagus: epidemiological and clinical results of a multicentric survey. Gruppo Operativo per lo Studio delle Precancerosi dell'Esofago (GOSPE). *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1991 May 30;48(3):364-8.
36. Caygill CP, Reed PI, Hill MJ, Watson A. An initial comparison of nine centres registering patients with the UK National Barrett's Oesophagus Registry (UKBOR). *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 1999 Dec;8(6):539-42.
37. 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. *Journal of medical genetics*. 2003 Sep;40(9):651-6.
38. 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. *Journal of clinical gastroenterology*. 2008 Aug;42(7):806-9.
39. Chak A, Faulx A, Kinnard M, Brock W, Willis J, Wiesner GL, et al. Identification of Barrett's esophagus in relatives by endoscopic screening. *The American journal of gastroenterology*. 2004 Nov;99(11):2107-14.
40. Chak A, Ochs-Balcom H, Falk G, Grady WM, Kinnard M, Willis JE, et al. Familiality in Barrett's esophagus, adenocarcinoma of the esophagus, and adenocarcinoma of the gastroesophageal junction. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2006 Sep;15(9):1668-73.
41. Jurgens S, Meyer F, Spechler SJ, Souza R. The role of bile acids in the neoplastic progression of Barrett's esophagus - a short representative overview. *Zeitschrift fur Gastroenterologie*. 2012 Sep;50(9):1028-34.
42. Xian W, Ho KY, Crum CP, McKeon F. Cellular origin of Barrett's esophagus: controversy and therapeutic implications. *Gastroenterology*. 2012 Jun;142(7):1424-30.
43. Poehlmann A, Kuester D, Malfertheiner P, Guenther T, Roessner A. Inflammation and Barrett's carcinogenesis. *Pathology, research and practice*. 2012 May 15;208(5):269-80.
44. Zagorowicz E, Jankowski J. Molecular changes in the progression of Barrett's oesophagus. *Postgraduate medical journal*. 2007 Aug;83(982):529-35.
45. Guo RJ, Suh ER, Lynch JP. The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer biology & therapy*. 2004 Jul;3(7):593-601.
46. 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 (Cambridge, England)*. 2001 Jan;128(2):155-66.
47. 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. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2008 May 15;14(10):3216-22.
48. Wong NA, Wilding J, Bartlett S, Liu Y, Warren BF, Piris J, et al. CDX1 is an important molecular mediator of Barrett's metaplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005 May 24;102(21):7565-70.
49. Kundu JK, Surh YJ. Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutation research*. 2008 Jul-Aug;659(1-2):15-30.
50. Hahn MA, Hahn T, Lee DH, Esworthy RS, Kim BW, Riggs AD, et al. Methylation of polycomb target genes in intestinal cancer is mediated by inflammation. *Cancer research*. 2008 Dec 15;68(24):10280-9.



51. Wang JS, Guo M, Montgomery EA, Thompson RE, Cosby H, Hicks L, et al. DNA promoter hypermethylation of p16 and APC predicts neoplastic progression in Barrett's esophagus. *The American journal of gastroenterology*. 2009 Sep;104(9):2153-60.
52. 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. *The American journal of gastroenterology*. 2001 Oct;96(10):2839-48.
53. Ohki R, Nemoto J, Murasawa H, Oda E, Inazawa J, Tanaka N, et al. Reprimo, a new candidate mediator of the p53-mediated cell cycle arrest at the G2 phase. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Jul 28;275(30):22627-30.
54. Kuester D, Dar AA, Moskaluk CC, Krueger S, Meyer F, Hartig R, et al. Early involvement of death-associated protein kinase promoter hypermethylation in the carcinogenesis of Barrett's esophageal adenocarcinoma and its association with clinical progression. *Neoplasia (New York, NY)*. 2007 Mar;9(3):236-45.
55. Kuester D, El-Rifai W, Peng D, Ruemmele P, Kroeckel I, Peters B, et al. Silencing of MGMT expression by promoter hypermethylation in the metaplasia-dysplasia-carcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Cancer letters*. 2009 Mar 8;275(1):117-26.
56. Lee OJ, Schneider-Stock R, McChesney PA, Kuester D, Roessner A, Vieth M, et al. Hypermethylation and loss of expression of glutathione peroxidase-3 in Barrett's tumorigenesis. *Neoplasia (New York, NY)*. 2005 Sep;7(9):854-61.
57. 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 Jul 15;58(14):2929-34.
58. Kandil HM, Tanner G, Smalley W, Halter S, Radhika A, Dubois RN. Cyclooxygenase-2 expression in Barrett's esophagus. *Digestive diseases and sciences*. 2001 Apr;46(4):785-9.
59. Elwood PC, Gallagher AM, Duthie GG, Mur LA, Morgan G. Aspirin, salicylates, and cancer. *Lancet (London, England)*. 2009 Apr 11;373(9671):1301-9.
60. Anderson LA, Watson RG, Murphy SJ, Johnston BT, Comber H, Mc Guigan J, et al. Risk factors for Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma: results from the FINBAR study. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2007 Mar 14;13(10):1585-94.
61. Matsukura S, Soejima H, Nakagawachi T, Yakushiji H, Ogawa A, Fukuhara M, et al. CpG methylation of MGMT and hMLH1 promoter in hepatocellular carcinoma associated with hepatitis viral infection. *British journal of cancer*. 2003 Feb 24;88(4):521-9.
62. Koga Y, Kitajima Y, Miyoshi A, Sato K, Kitahara K, Soejima H, et al. Tumor progression through epigenetic gene silencing of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase in human biliary tract cancers. *Annals of surgical oncology*. 2005 May;12(5):354-63.
63. 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. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008 Jul 1;123(1):174-80.
64. 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 : CCC*. 2008 Dec;19(10):1077-83.
65. Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TD, et al. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*. 2000 May;21(5):965-71.

66. 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 epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2008 Mar;17(3):736-9.
67. 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 Aug 15;104(4):730-9.
68. Arber N, Lightdale C, Rotterdam H, Han KH, Sgambato A, Yap E, et al. Increased expression of the cyclin D1 gene in Barrett's esophagus. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 1996 Jun;5(6):457-9.
69. 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. *Journal of the National Cancer Institute.* 2000 Aug 16;92(16):1316-21.
70. Jain M, Kumar S, Lal P, Tiwari A, Ghoshal UC, Mittal B. Role of GSTM3 polymorphism in the risk of developing esophageal cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology.* 2007 Jan;16(1):178-81.
71. 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 Jun;28(6):1323-8.
72. 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 Jun;9(6):341-7.
73. 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. *The American journal of gastroenterology.* 2007 Nov;102(11):2373-9.
74. 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 May;124(5):1193-201.
75. Casson AG, Zheng Z, Evans SC, Veugelers PJ, Porter GA, Guernsey DL. Polymorphisms in DNA repair genes in the molecular pathogenesis of esophageal (Barrett) adenocarcinoma. *Carcinogenesis.* 2005 Sep;26(9):1536-41.
76. 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. *Journal of cancer research and clinical oncology.* 2005 Dec;131(12):803-8.
77. von Rahden BH, Stein HJ, Langer R, von Weyhern CW, Schenk E, Doring 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 Journal international du cancer.* 2005 Jan 20;113(3):506-8.
78. 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 Sep;27(9):1835-41.
79. 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 letters.* 2006 Oct 8;242(1):60-7.

80. 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 research*. 1999 Feb 1;59(3):586-9.
81. 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 journal of gastroenterology : WJG*. 2004 Dec 1;10(23):3389-93.
82. 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 epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2008 Mar;17(3):727-31.
83. 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 detection and prevention*. 2003;27(2):139-46.
84. 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. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2003 Nov 10;107(3):381-6.
85. 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 : CCC*. 2007 Nov;18(9):1039-46.
86. 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 detection and prevention*. 2007;31(3):233-6.
87. Mori AD, Bruneau BG. TBX5 mutations and congenital heart disease: Holt-Oram syndrome revealed. *Current opinion in cardiology*. 2004 May;19(3):211-5.
88. Arora R, Metzger RJ, Papaioannou VE. Multiple roles and interactions of Tbx4 and Tbx5 in development of the respiratory system. *PLoS genetics*. 2012;8(8):e1002866.
89. Gyamfi MA, Kocsis MG, He L, Dai G, Mendy AJ, Wan YJ. The role of retinoid X receptor alpha in regulating alcohol metabolism. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006 Oct;319(1):360-8.
90. Spechler SJ, Goyal RK. The columnar-lined esophagus, intestinal metaplasia, and Norman Barrett. *Gastroenterology*. 1996 Feb;110(2):614-21.
91. Wu AH, Tseng CC, Bernstein L. Hiatal hernia, reflux symptoms, body size, and risk of esophageal and gastric adenocarcinoma. *Cancer*. 2003 Sep 1;98(5):940-8.
92. Rubenstein JH, Taylor JB. Meta-analysis: the association of oesophageal adenocarcinoma with symptoms of gastro-oesophageal reflux. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2010 Nov;32(10):1222-7.
93. Wilson LJ, Ma W, Hirschowitz BI. Association of obesity with hiatal hernia and esophagitis. *The American journal of gastroenterology*. 1999 Oct;94(10):2840-4.
94. Barak N, Ehrenpreis ED, Harrison JR, Sitrin MD. Gastro-oesophageal reflux disease in obesity: pathophysiological and therapeutic considerations. *Obesity reviews : an official journal of the International Association for the Study of Obesity*. 2002 Feb;3(1):9-15.
95. 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. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2013 Nov;11(11):1399-412.e7.

96. 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 Dec;41(6):1706-18.

97. Cook MB, Shaheen NJ, Anderson LA, Giffen C, Chow WH, Vaughan TL, et al. Cigarette smoking increases risk of Barrett's esophagus: an analysis of the Barrett's and Esophageal Adenocarcinoma Consortium. *Gastroenterology*. 2012 Apr;142(4):744-53.

98. Gatenby P, Caygill C, Wall C, Bhattacharjee S, Ramus J, Watson A, et al. Lifetime risk of esophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus. *World journal of gastroenterology : WJG*. 2014 Jul 28;20(28):9611-7.

99. 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 Aug;59(8):1030-6.

100. Keshavarzian A, Polepalle C, Iber FL, Durkin M. Esophageal motor disorder in alcoholics: result of alcoholism or withdrawal? *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1990 Aug;14(4):561-7.

101. 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.

102. Anderson LA, Cantwell MM, Watson RG, Johnston BT, Murphy SJ, Ferguson HR, et al. The association between alcohol and reflux esophagitis, Barrett's esophagus, and esophageal adenocarcinoma. *Gastroenterology*. 2009 Mar;136(3):799-805.

103. Kubo A, Levin TR, Block G, Rumore GJ, Quesenberry CP, Jr., Buffler P, et al. Alcohol types and sociodemographic characteristics as risk factors for Barrett's esophagus. *Gastroenterology*. 2009 Mar;136(3):806-15.

104. Thomas FB, Steinbaugh JT, Fromkes JJ, Mekhjian HS, Caldwell JH. Inhibitory effect of coffee on lower esophageal sphincter pressure. *Gastroenterology*. 1980 Dec;79(6):1262-6.

105. Nocon M, Labenz J, Willich SN. Lifestyle factors and symptoms of gastro-oesophageal reflux - a population-based study. *Alimentary pharmacology & therapeutics*. 2006 Jan 1;23(1):169-74.

106. Nilsson M, Johnsen R, Ye W, Hveem K, Lagergren J. Lifestyle related risk factors in the aetiology of gastro-oesophageal reflux. *Gut*. 2004 Dec;53(12):1730-5.

107. Kim J, Oh SW, Myung SK, Kwon H, Lee C, Yun JM, et al. Association between coffee intake and gastroesophageal reflux disease: a meta-analysis. *Diseases of the esophagus : official journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / ISDE*. 2014 May-Jun;27(4):311-7.

108. Rokkas T, Pisiolas D, Sechopoulos P, Robotis I, Margantinis G. Relationship between *Helicobacter pylori* infection and esophageal neoplasia: a meta-analysis. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2007 Dec;5(12):1413-7, 7.e1-2.

109. Wang C, Yuan Y, Hunt RH. *Helicobacter pylori* infection and Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *The American journal of gastroenterology*. 2009 Feb;104(2):492-500; quiz 491, 501.

110. Fischbach LA, Nordenstedt H, Kramer JR, Gandhi S, Dick-Onuoha S, Lewis A, et al. The association between Barrett's esophagus and *Helicobacter pylori* infection: a meta-analysis. *Helicobacter*. 2012 Jun;17(3):163-75.

111. Kubo A, Block G, Quesenberry CP, Jr., Buffler P, Corley DA. Effects of dietary fiber, fats, and meat intakes on the risk of Barrett's esophagus. *Nutrition and cancer*. 2009;61(5):607-16.
112. Coleman HG, Murray LJ, Hicks B, Bhat SK, Kubo A, Corley DA, et al. Dietary fiber and the risk of precancerous lesions and cancer of the esophagus: a systematic review and meta-analysis. *Nutrition reviews*. 2013 Jul;71(7):474-82.
113. Kubo A, Levin TR, Block G, Rumore GJ, Quesenberry CP, Jr., Buffler P, et al. Dietary antioxidants, fruits, and vegetables and the risk of Barrett's esophagus. *The American journal of gastroenterology*. 2008 Jul;103(7):1614-23; quiz 24.
114. 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 Mar;142(3):442-52.e5; quiz e22-3.
115. Zhang S, Zhang XQ, Ding XW, Yang RK, Huang SL, Kastelein F, et al. Cyclooxygenase inhibitors use is associated with reduced risk of esophageal adenocarcinoma in patients with Barrett's esophagus: a meta-analysis. *British journal of cancer*. 2014 Apr 29;110(9):2378-88.
116. Dore MP, Maragkoudakis E, Fraley K, Pedroni A, Tadeu V, Realdi G, et al. Diet, lifestyle and gender in gastro-esophageal reflux disease. *Digestive diseases and sciences*. 2008 Aug;53(8):2027-32.
117. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/genetische-heterogenitaet/27276>. 02.07.2015.
118. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/penetranz/8752>. 02.07.2015.
119. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie-kompakt/phaenokopie/8929>. 03.07.2015.
120. Tom Strachan APR. *Molekulare Humangenetik*. 3. Aufl. ed2005. S.517 p.
121. Martin Depner. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München. 2009. S.30. p.
122. Martin Depner. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München. 2009. S.52. p.
- .
123. Jan Murken. Tiemo Grimm. Elke Holinski-Feder. *Taschenlehrbuch Humangenetik* 7. Auflage S. 348 p.
124. Patil N, Berno AJ, Hinds DA, Barrett WA, Doshi JM, Hacker CR, et al. Blocks of limited haplotype diversity revealed by high-resolution scanning of human chromosome 21. *Science (New York, NY)*. 2001 Nov 23;294(5547):1719-23.
125. Daly MJ, Rioux JD, Schaffner SF, Hudson TJ, Lander ES. High-resolution haplotype structure in the human genome. *Nature genetics*. 2001 Oct;29(2):229-32.
126. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Roy J, Blumenstiel B, et al. The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science (New York, NY)*. 2002 Jun 21;296(5576):2225-9.
127. Johnson GC, Esposito L, Barratt BJ, Smith AN, Heward J, Di Genova G, et al. Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nature genetics*. 2001 Oct;29(2):233-7.
128. Tom Strachan APR. *Molekulare Humangenetik*. 3.Aufl. ed2005. S.462 p.
129. A haplotype map of the human genome. *Nature*. 2005 Oct 27;437(7063):1299-320.
130. The International HapMap Project. *Nature*. 2003 Dec 18;426(6968):789-96.
131. Martin Depner. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München. 2009. S.36. p.

132. Martin Depner. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München. 2009. S.37. p.
133. Yang Q, Cui J, Chazaro I, Cupples LA, Demissie S. Power and type I error rate of false discovery rate approaches in genome-wide association studies. *BMC genetics*. 2005;6 Suppl 1:S134.
134. National Human Genome Research Institute DoGM. A Catalog of Published Genome-Wide Association Studies 10.09.2014. Available from: [http://www.genome.gov/page.cfm?pageid=26525384&clearquery=1#result\\_table](http://www.genome.gov/page.cfm?pageid=26525384&clearquery=1#result_table).
135. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001 Jan 16;98(2):581-4.
136. 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 research*. 1995 Aug 25;23(16):3126-31.
137. Haff LA, Smirnov IP. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome research*. 1997 Apr;7(4):378-88.
138. Zheng JS, Yang J, Fu YQ, Huang T, Huang YJ, Li D. Effects of green tea, black tea, and coffee consumption on the risk of esophageal cancer: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Nutrition and cancer*. 2013;65(1):1-16.
139. Balasubramanian G, Gupta N, Giacchino M, Singh M, Kanakadandi V, Gaddam S, et al. Cigarette smoking is a modifiable risk factor for Barrett's oesophagus. *United European gastroenterology journal*. 2013 Dec;1(6):430-7.
140. 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. *Journal of the National Cancer Institute*. 2010 Sep 8;102(17):1344-53.
141. Smith KJ, O'Brien SM, Green AC, Webb PM, Whiteman DC. Current and past smoking significantly increase risk for Barrett's esophagus. *Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*. 2009 Aug;7(8):840-8.
142. Abioye AI, Odesanya MO, Abioye AI, Ibrahim NA. Physical activity and risk of gastric cancer: a meta-analysis of observational studies. *British journal of sports medicine*. 2015 Feb;49(4):224-9.
143. Chen Y, Yu C, Li Y. Physical activity and risks of esophageal and gastric cancers: a meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(2):e88082.
144. Singh S, Devanna S, Edakkanambeth Varayil J, Murad MH, Iyer PG. Physical activity is associated with reduced risk of esophageal cancer, particularly esophageal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *BMC gastroenterology*. 2014;14:101.
145. Katoh M, Igarashi M, Fukuda H, Nakagama H, Katoh M. Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer letters*. 2013 Jan 28;328(2):198-206.
146. Madison BB, McKenna LB, Dolson D, Epstein DJ, Kaestner KH. FoxF1 and FoxL1 link hedgehog signaling and the control of epithelial proliferation in the developing stomach and intestine. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Feb 27;284(9):5936-44.

147. Mahlapuu M, Enerback S, Carlsson P. Haploinsufficiency of the forkhead gene *Foxf1*, a target for sonic hedgehog signaling, causes lung and foregut malformations. *Development (Cambridge, England)*. 2001 Jun;128(12):2397-406.

## 8. Anhang

**Tabelle 14:** Ergebnisse der Genotyp-Phänotyp/Genotyp-Umwelt Analysen von 27 Phänotypen des Patientenkollektivs die auf Assoziation zu genetischen Varianten hin untersucht worden waren und im Initialkollektiv des BEACON-Konsortiums krankheitsassoziiert waren

Chr. <sup>1</sup>	SNP	Position in bp <sup>2</sup>	A1 <sup>3</sup>	OR/BETA	L95	U95	P-Wert <sup>4</sup>	Phänotyp
15	rs4646638	58248783	C	0.6786	0.4414	1.043	0.07719	act2
15	rs3784262	58253106	G	0.6879	0.4478	1.057	0.0876	act2
15	rs3784262	58253106	G	1.579	0.8563	1.33270	0.1435	fam_BE
15	rs3784262	58253106	G	-0.06669	-0.1607	0.02737	0.165	act1
15	rs4646638	58248783	C	-0.06628	-0.1604	0.02782	0.1679	act1
15	rs3784262	58253106	G	0.07662	-0.04262	0.1959	0.2083	refl1
15	rs4646638	58248783	C	1.444	0.7918	2.633	0.2307	fam_BE
15	rs4646638	58248783	C	0.06633	-0.05303	0.1857	0.2764	refl1
15	rs3784262	58253106	G	1.138	0.8414	1.539	0.4018	cof1
15	rs4646638	58248783	C	1.118	0.8266	1.513	0.4685	cof1
15	rs3784262	58253106	G	0.9757	0.7153	1.331	0.8766	tab1
15	rs4646638	58248783	C	1.008	0.7389	1.376	0.959	tab1
16	rs4843376	86470082	G	0.6405	0.4672	0.878	0.00564	cof1
16	rs2178146	86463695	G	0.6367	0.4568	0.8873	0.007669	cof1
16	rs8045253	86437767	C	1.582	1.128	2.218	0.007831	tab1
16	rs4843376	86470082	G	0.4318	0.2313	0.8063	0.008392	fam_BE
16	rs3950627	86436343	C	1.408	1.025	1.935	0.03456	tab1
16	rs8045253	86437767	C	-0.1128	-0.2337	0.008042	0.06771	refl1
16	rs1490865	86387275	C	1.359	0.9322	1.982	0.1106	tab1
16	rs9936833	86403118	C	0.7835	0.5734	1.071	0.1256	cof1
16	rs254348	65980789	A	0.6487	0.3595	1.171	0.1508	fam_BE
16	rs1490865	86387275	C	1.272	0.9121	1.774	0.1563	cof1
16	rs2178146	86463695	G	0.6518	0.3586	1.185	0.1605	fam_BE
16	rs1490865	86387275	C	0.09324	-0.04134	0.2278	0.1749	refl1
16	rs1532167	86404204	A	0.8082	0.5892	1.109	0.1867	cof1
16	rs2178146	86463695	G	0.0827	-0.04067	0.2061	0.1893	refl1
16	rs1490865	86387275	C	0.7082	0.4218	1.189	0.1917	act2
16	rs3111601	86400081	C	-0.08127	-0.2041	0.04159	0.1952	refl1
16	rs9926271	73125231	C	0.3729	0.08191	1.698	0.2021	fam_BE
16	rs3111601	86400081	C	0.8141	0.5911	1.121	0.2081	cof1
16	rs9936833	86403118	C	-0.07675	-0.1965	0.04305	0.2096	refl1
16	rs254348	65980789	A	0.7684	0.491	1.203	0.249	act2
16	rs9926271	73125231	C	-0.2571	-0.7082	0.1941	0.2645	refl1
16	rs1532167	86404204	A	-0.06695	-0.188	0.05413	0.2788	refl1
16	rs254348	65980789	A	0.8471	0.6132	1.42736	0.3143	tab1
16	rs3950627	86436343	C	0.8184	0.5423	1.235	0.3398	act2
16	rs1532167	86404204	A	0.8627	0.6307	1.43101	0.3556	tab1



16	rs254348	65980789	A	-0.05816	-0.1838	0.0675	0.3646	ref1
16	rs3111601	86400081	C	0.8702	0.6338	1.195	0.3898	tab1
16	rs2178146	86463695	G	1.151	0.8286	1.599	0.4017	tab1
16	rs3111601	86400081	C	0.7798	0.4313	1.14977	0.4104	fam_BE
16	rs1532167	86404204	A	0.844	0.5498	1.296	0.4379	act2
16	rs9926271	73125231	C	1.799	0.4018	8.058	0.4426	tab1
16	rs3950627	86436343	C	1.126	0.8304	1.525	0.4459	cof1
16	rs9936833	86403118	C	0.8877	0.6517	1.209	0.45	tab1
16	rs9936833	86403118	C	0.8601	0.5646	1.11324	0.4827	act2
16	rs3950627	86436343	C	-0.03399	-0.1294	0.06146	0.4854	act1
16	rs8045253	86437767	C	0.8656	0.567	1.322	0.5039	act2
16	rs1532167	86404204	A	-0.03062	-0.1269	0.0657	0.5334	act1
16	rs1490865	86387275	C	-0.03232	-0.1401	0.07544	0.5568	act1
16	rs9926271	73125231	C	0.778	0.3365	1.798	0.557	fam_refl
16	rs8045253	86437767	C	1.094	0.8043	1.487	0.5682	cof1
16	rs4843376	86470082	G	0.03291	-0.08717	0.153	0.5913	ref1
16	rs4843376	86470082	G	1.085	0.7925	1.486	0.6101	tab1
16	rs3950627	86436343	C	1.156	0.6466	2.066	0.6252	fam_BE
16	rs2178146	86463695	G	0.9042	0.5854	1.397	0.6499	act2
16	rs1490865	86387275	C	1.146	0.58	2.266	0.6942	fam_BE
16	rs9936833	86403118	C	-0.01903	-0.1141	0.07599	0.6947	act1
16	rs254348	65980789	A	1.062	0.7725	1.461	0.7102	cof1
16	rs3111601	86400081	C	0.0182	-0.07883	0.1152	0.7133	act1
16	rs254348	65980789	A	0.01852	-0.08084	0.1179	0.715	act1
16	rs2178146	86463695	G	-0.01758	-0.1152	0.08002	0.7242	act1
16	rs8045253	86437767	C	0.9093	0.5064	1.633	0.7502	fam_BE
16	rs9926271	73125231	C	-0.0565	-0.4187	0.3057	0.7599	act1
16	rs8045253	86437767	C	-0.01435	-0.1104	0.08172	0.7697	act1
16	rs9926271	73125231	C	0.8333	0.2452	2.832	0.7701	cof1
16	rs3111601	86400081	C	0.9461	0.6154	1.455	0.8009	act2
16	rs1532167	86404204	A	0.9446	0.521	1.712	0.851	fam_BE
16	rs9936833	86403118	C	0.9504	0.5268	1.715	0.866	fam_BE
16	rs4843376	86470082	G	0.008093	-0.08732	0.1035	0.868	act1
16	rs4843376	86470082	G	1.001	0.6616	1.516	0.9948	act2
16	rs9926271	73125231	C	0,00000844	0	inf	0.9968	act2

<sup>1</sup> Chromosom

<sup>2</sup>Angabe nach hg18

<sup>2</sup> Allel 1: das in der europäischen Population seltene Allel, Allel 2: das in der europäischen Population häufige Allel

<sup>3</sup>zweiseitige Testung















































## 10. Lebenslauf

Name: Georg Michael Arras  
Geburtstag/-ort: 08.07.1986 in Erbach Odenwaldkreis  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Verheiratet

### Schulbildung

1993 - 1996 Rodenstein Grundschule in Fränkisch-Crumbach  
1996 - 2006 Georg-August-Zinn Gesamtschule in Reichelsheim  
Juni 2006 Abitur

### Freiwilliges Soziales Jahr

2006 - 2007 Georg-August-Zinn Schule Reichelsheim,  
Unterricht 5. bis 10. Klassen

### Hochschulausbildung

Okt. 2007 - April 2008 Studium der Wirtschaftsinformatik, Universität Mannheim  
April 2008 - Mai 2015 Studium der Humanmedizin, Johannes-Gutenberg-Universität Mainz  
August 2010 1. Staatsexamen  
April 2014 2. Staatsexamen  
Mai 2015 3. Staatsexamen

### Famulaturen

März 2011 Radiologie im Fort Malakoff  
Februar 2012 Institut für Rechtsmedizin der Universitätsmedizin Mainz  
September 2012 Hämato,-und Pneumologie der Universitätsmedizin Mainz  
März 2013 Anästhesie an der HNO Klinik der Universitätsmedizin Mainz  
November 2013 Notaufnahme der Universitätsmedizin Mainz

### Praktische Tätigkeiten

Mai 2010 - Aug. 2010 OP Helfer und 2. Assistenz in der Orthopädie, Heilig Geist KKH in Bingen  
Nov. 2010 - Mai 2012 Patientenmanagement und Bedienung des Hochfeld-MRT, Radiologie im Fort Malakoff in Mainz

### Praktisches Jahr

Mai 2014 - April 2015 Innere Medizin Gesundheitszentrum Odenwaldkreis GmbH  
Chirurgie Bundeswehrkrankenhaus Koblenz  
Allgemeinmedizin Chemiekonzern BASF Ludwigshafen  
sowie Praxis für Allgemeinmedizin Dr. Wallacher Ludwigshafen

### Ärztliche Tätigkeit

Okt. 2016 - derzeit Assistenzarzt im Bereich Innere Medizin des Gesundheitszentrums Odenwaldkreis in Erbach (GZO) Klinikum der Grund - und Regelversorgung