

Aus dem Institut für Humangenetik  
des Universitätsklinikums Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Markus M. Nöthen

**Genetische Untersuchungen zur Aufklärung der  
Heterogenität adenomatöser Polyposis-Syndrome**

Kumulative Habilitationsschrift  
zur Erlangung der *venia legendi*  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
für das Lehrgebiet  
„Humangenetik“

vorgelegt von  
Dr. med. Stefan Aretz  
Wissenschaftlicher Angestellter  
an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Bonn 2009

**Habilitations-Kolloquium bestanden am 18. November 2009**

**Nachfolgende Arbeiten bilden die wissenschaftliche Grundlage der vorliegenden kumulativen Habilitationsschrift:**

1. **Aretz S**, Uhlhaas S, Caspari R, Mangold E, Pagenstecher C, Propping P, Friedl W (2004). Frequency and parental origin of *de novo* APC mutations in familial adenomatous polyposis. *European Journal of Human Genetics* 12:52-58.
2. **Aretz S**, Uhlhaas S, Sun Y, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Möslein G, Schulmann K, Propping P, Friedl W (2004). Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Human Mutation* 24:370-380.
3. **Aretz S**, Stienen D, Uhlhaas S, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W (2005). Large submicroscopic genomic APC deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis. *Journal of Medical Genetics* 42:185-192.
4. **Aretz S**, Koch A, Uhlhaas S, Friedl W, Propping P, Schweinitz DV, Pietsch T (2006). Should children at risk for familial adenomatous polyposis be screened for hepatoblastoma and children with apparently sporadic hepatoblastoma be screened for APC germline mutations? *Pediatric Blood & Cancer* 47:811-818.
5. **Aretz S**, Uhlhaas S, Goergens H, Siberg K, Vogel M, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W (2006). MUTYH-associated polyposis (MAP): 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *International Journal of Cancer* 119: 807-814.
6. Pagenstecher C, Gadzicki D, Stienen D, Uhlhaas S, Mangold E, Rahner N, Arslan-Kirchner M, Propping P, Friedl W, **Aretz S** (2007). A complex rearrangement in the APC gene uncovered by MLPA. *The Journal of Molecular Diagnostics* 9:122-126.
7. **Aretz S**, Stienen D, Friedrichs N, Stemmler S, Uhlhaas S, Rahner N, Propping P, Friedl W (2007). Somatic APC mosaicism: a frequent cause of familial adenomatous polyposis (FAP). *Human Mutation* 28:985-992.
8. Kaufmann A, Vogt S, Uhlhaas S, Stienen D, Kurth I, Hameister H, Mangold E, Kötting J, Kaminsky E, Propping P, Friedl W, **Aretz S** (2009). Analysis of rare APC variants at mRNA level: six pathogenic mutations and literature review. *The Journal of Molecular Diagnostics* 11:131-139.
9. Vogt S, Jones N, Christian D, Engel C, Nielsen M, Kaufmann A, Uhlhaas S, Steinke V, Propping P, Hes FJ, Sampson JR, **Aretz S** (2009). Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 137:1976-1985.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Die untersuchten Krankheitsbilder</b>	<b>2</b>
1.1.1	Historischer Überblick .....	2
1.1.2	<i>APC</i> -assoziierte familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) .....	4
1.1.3	<i>MUTYH</i> -assoziierte Polyposis (MAP) .....	8
1.1.4	Mutations-negative adenomatöse Polyposis.....	10
<b>1.2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>10</b>
1.2.1	Patienten.....	10
1.2.2	Molekulargenetische Untersuchungsmethoden .....	11
<b>2</b>	<b>EIGENE ARBEITEN: ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)</b>	<b>14</b>
2.1.1	Häufigkeit und parentale Herkunft von <i>de novo APC</i> -Mutationen.....	14
2.1.2	Große genomische Deletionen und Duplikationen im <i>APC</i> -Gen.....	16
2.1.3	Charakterisierung einer komplexen Mutation im <i>APC</i> -Gen.....	18
2.1.4	Funktionelle Untersuchung unklarer Varianten des <i>APC</i> -Gens .....	20
2.1.5	Ausmaß und Bedeutung von Mutations-Mosaiken bei der FAP.....	23
2.1.6	<i>APC</i> -assoziiertes Hepatoblastom .....	25
<b>2.2</b>	<b><i>MUTYH</i>-assoziierte Polyposis (MAP)</b>	<b>26</b>
2.2.1	Mutationsspektrum und kolorektaler Phänotyp der MAP .....	27
2.2.2	Extrakolonisches Tumorspektrum bei MAP-Patienten .....	30
<b>3</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>33</b>
<b>4</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>35</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>37</b>
<b>6</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>45</b>

# 1 EINLEITUNG

Der Dickdarmkrebs (kolorektales Karzinom, CRC) zählt zu den häufigsten bösartigen Tumoren in Westeuropa; allein in Deutschland stellt es mit circa 70.000 Neuerkrankungen pro Jahr die zweithäufigste Krebserkrankung und die zweithäufigste Krebstodesursache bei beiden Geschlechtern dar ([www.rki.de](http://www.rki.de)). Fortschritte im Bereich der Prävention und Therapie haben deshalb herausragende Bedeutung sowohl für die Betreuung des einzelnen Patienten wie für das Gesundheitswesen allgemein. Es handelt sich beim CRC fast ausschließlich um Adenokarzinome, die Ätiologie ist allerdings ausgesprochen heterogen. Die meisten Fälle treten in höherem Lebensalter und sporadisch – das heißt als Einzelfall innerhalb einer Familie – auf und sind nicht erblich. Bei etwa 20-25 % der Patienten findet man eine gewisse familiäre Häufung der Erkrankung im mittleren bis höheren Lebensalter ohne klar erkennbaren Erbgang; hier vermutet man heute meistens ein multifaktorielles bzw. polygenes Bedingungsgefüge, bei dem neben Umweltfaktoren eine Kombination niedrigpenetranter Risikoallele zur malignen Transformation prädisponiert (Easton and Eeles 2008; Houlston et al. 2008; Küry et al. 2008). Aufgrund der Verbreitung des CRC muss eine familiäre Häufung zum Teil aber auch durch zufällige Koinzidenz zustande kommen, deren Ausmaß bisher aber noch nicht genau bestimmt wurde (Engel et al. 2007). Bei 3-5 % der Patienten liegt eine erbliche Form von Dickdarmkrebs im engeren Sinne vor (monogene Disposition). Diese erblichen Tumorerkrankungen (hereditäre Tumordispositions-Syndrome) des Magen-Darm-Traktes umfassen mehrere klinisch und molekulargenetisch differenzierbare Krankheitsbilder, insbesondere den *erblichen Dickdarmkrebs ohne Polyposis* (HNPPC oder Lynch-Syndrom) und die hereditären Polyposis-Syndrome.

Das Auftreten einzelner Polypen im Dickdarm ist ein häufiges und altersabhängiges Phänomen (Clark et al. 1985; Ransohoff and Lang 1991; Rex et al. 1993). Die zur Diagnose einer Polyposis notwendige Mindestzahl von Polypen ist nicht klar definiert und hängt unter anderem vom Polypentyp und dessen Verbreitung in der Allgemeinbevölkerung, der Polypenverteilung im Darm und dem Alter des Patienten ab. Aufgrund der Adenom-Karzinom-Sequenz kommt adenomatösen Polypen hier eine besondere klinische Relevanz zu. Gastrointestinale Polyposis-Syndrome umfassen zahlreiche seltene Entitäten, die zum Teil klinisch und genetisch gut charakterisiert sind, zum Teil aber noch am Anfang ihrer ursächlichen Aufklärung und phänotypischen Abgrenzung stehen (Friedl et al. 1999; Bronner 2003; Lowichik et al. 2003; Schulmann et al. 2007; Jass 2008). Bei den bisher bekannten hereditären Formen handelt es sich um Präkanzerosen, die für etwa 1% aller kolorektalen Karzinome (CRC) verantwortlich sind; sie stellen damit nach dem HNPPC bzw. Lynch-Syndrom die häufigste Ursache des erblichen Dickdarmkrebses dar.

Patienten mit einer Polyposis begegnen dem Arzt in jeder Altersgruppe und zeigen eine mitunter ausgeprägte inter- und intrafamiliäre Variabilität des klinischen Verlaufs. Der Erkennung und korrekten Differentialdiagnose kommt klinisch große Bedeutung zu, da die meisten Formen einerseits durch ein hohes Lebenszeitrisiko für frühmanifeste gastrointestinale und zum Teil auch extraintestinale Karzinome sowie ein hohes Wiederholungsrisiko bei erstgradig verwandten Familienangehörigen gekennzeichnet sind, andererseits mit der regelmäßigen endoskopischen Vorsorge und Entfernung der Polypen aber ein effizientes Instrument zur Krebsprävention verfügbar ist (Jarvinen et al. 1995; Aretz and Propping 2004).

Die Aufklärung der genetischen Grundlagen, Charakterisierung der Krankheitsverläufe und Beschreibung von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen stellt eine wichtige wissenschaftliche Aufgabe dar, die einerseits zu einer direkten Verbesserung der klinischen Betreuung der Familien führen

kann, andererseits über die Kenntnis der beteiligten genetischen Faktoren und Signalwege aber auch das pathogenetische Verständnis nicht nur der seltenen Polyposis, sondern auch des CRC im Allgemeinen fördert und hierüber langfristig die Möglichkeit zur Entwicklung neuer therapeutischer Konzepte eröffnet.

Die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) ist die häufigste und am längsten bekannte Form der gastrointestinalen Polyposis-Syndrome. Unsere Arbeitsgruppe am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn beschäftigt sich seit 1988 mit der molekulargenetischen Diagnostik, humangenetischen Beratung und wissenschaftlichen Bearbeitung adenomatöser Polyposis-Syndrome. Mit Unterstützung der *Deutschen Krebshilfe* wurden diesbezüglich zahlreiche wissenschaftliche Arbeiten erstellt, die einen wesentlichen Beitrag zum heutigen Kenntnisstand des Mutationsspektrums und der Genotyp-Phänotyp-Beziehungen der FAP geleistet haben (Übersichten in Friedl and Lamberti 2001; Friedl and Aretz 2005).

Aufbauend auf den grundlegenden Untersuchungen zur FAP in den 1990er Jahren betreffen die hier vorgestellten, in den Jahren 2003 bis 2009 durchgeführten Studien vertiefend und erweiternd speziellere Fragestellungen zum *APC*-Mutationsspektrum (große Deletionen, komplexes Rearrangement), zur Charakterisierung bestimmter *APC*-Mutationsarten (elterliche Herkunft von Neumutationen; Relevanz von Mosaiken; Transkriptanalyse von funktionell unklaren Varianten) und hinsichtlich seltener klinischer Manifestationen (Hepatoblastom). Ein weiterer Schwerpunkt war die genetische und phänotypische Charakterisierung der erst seit kurzem bekannten *MUTYH*-assoziierten Polyposis (MAP). Es handelt sich um Arbeiten der humangenetischen Grundlagenforschung, die sich immer auch an klinisch relevanten Aspekten der Krankheitsbilder orientieren und zum Teil erst durch die Größe des vorhandenen und langjährig erschlossenen Patientenkollektivs möglich wurden.

## **1.1 Die untersuchten Krankheitsbilder**

### **1.1.1 Historischer Überblick**

Obwohl erste Berichte einer intestinalen Polyposis bereits im frühen 18. Jahrhundert erschienen, gelang die Abgrenzung der einzelnen Formen gegenüber inflammatorischen Darmerkrankungen und die ersten gesicherten Beschreibungen der adenomatösen Polyposis in den Jahren 1859 (Chargelaigue 1959) und 1881 (Sklifasowski 1881) erst nach Etablierung der Techniken zur histopathologischen Differenzierung von Darmpolypen (Bussey 1975). Noch im 19. Jahrhundert wurden mit dem frühen Erkrankungsalter, der familiären Häufung, dem hohen Karzinomrisiko und der gastroduodenalen Beteiligung die wichtigsten, auch heute noch gültigen klinischen Charakteristika der FAP benannt. Den dominanten Erbgang und präkanzerösen Charakter der Adenome erkannte Lockhart-Mummery 1925 (Lockhart-Mummery 1925); vom im gleichen Jahr gegründeten ersten Polyposis-Register am St. Mark's Hospital in London nahm die systematische Erforschung der gastrointestinalen Polyposis auch ihren Ausgang, die 1952 in einem ersten umfassenden klinischen Überblick der familiären intestinalen Polyposis bei 42 Familien durch Dukes breitere Beachtung fand (Übersichten in Spigelman and Thomson 1994; Bülow et al. 2006).

Neben der früher geläufigsten Bezeichnung *Familiäre Polyposis coli* existieren zahlreiche Synonyme (*multiple Adenomatosis*, *Familiäre Adenomatosis coli*, *Familiäre adenomatöse Polyposis coli*). Die insbesondere von der 1985 gegründeten internationalen Experten-Gruppe Leeds

*Castle Polyposis Group* (LCPG) propagierte Bezeichnung *Familiäre Adenomatöse Polyposis* (FAP) hat sich inzwischen weitgehend durchgesetzt und beschreibt die dominierende Symptomatik am treffendsten.

Der hereditäre Charakter der FAP fiel früh auf. 1927 beschrieb Cockayne erstmals den dominanten Erbgang (Cockayne 1927). Mit der Kartierung des *APC*-Gens 1987 und seiner Identifizierung 1991 wurde der Pathomechanismus zum Teil aufgeklärt und die Beschreibung von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen möglich. Neben der Tumorsuppressorfunktion des multifunktionalen *APC*-Proteins wurde kürzlich auch dessen Bedeutung für die chromosomale Stabilität erkannt. Durch die indirekte und später auch direkte prädiktive molekulargenetische Diagnostik konnte die Anlageträgerschaft von Risikopersonen ab Ende der 1980er Jahre erstmals im präsymptomatischen Stadium sicher nachgewiesen oder ausgeschlossen werden.

Die differentialdiagnostische Abgrenzung der einzelnen Polyposisformen begleitete das gesamte 20. Jahrhundert parallel mit einer bis heute anhaltenden Weiterentwicklung der histopathologischen Klassifikation gastrointestinaler Polypen. 1921 und 1949 wurde das Peutz-Jeghers-Syndrom, 1966 die juvenile Polyposis beschrieben. Die Aufklärung der genetischen Grundlagen ab den späten 1980er Jahren setzt diese Entwicklung auf molekularer Ebene fort und führte in jüngster Zeit zur Lösung der autosomal-rezessiv erblichen *MUTYH*-assoziierten Polyposis aus der Gruppe *APC*-negativer Fälle, während die nosologische Stellung anderer, scheinbar eigenständiger Krankheitsbilder revidiert werden musste: sowohl die anfangs als *hereditary flat adenoma syndrome* (HFAS) bezeichnete attenuierte Verlaufsform, wie auch die als Gardner-Syndrom bekannte Kombination einer adenomatösen Polyposis mit bestimmten extraintestinalen Manifestationen (Gardner and Richards 1953) und ein Teil der Fälle des Turcot-Syndroms (primäre Hirntumoren bei multiplen kolorektalen Adenomen/Karzinomen) (Turcot et al. 1959) erwiesen sich als phänotypische Variante der *APC*-assoziierten FAP. Bei den übrigen Fällen des Turcot-Syndroms handelt es sich um Hirntumoren auf dem Boden des HNPCC.

Der im Vordergrund stehende Befall des Kolorektums ließ bereits im frühen 20. Jahrhundert erfolgreiche therapeutische Interventionen zu, die ebenfalls wesentlich vom St. Mark's Hospital vorangetrieben wurden. Die ersten operativen Eingriffe ab 1916 erfolgten noch primär zur Behandlung eines manifesten CRC; der Einsicht Lockhart-Mummerys folgend, dass nicht der Krebs selbst, sondern die Disposition hierfür vererbt wird, wurden aber schon bald die präventiven Möglichkeiten der Dickdarmentfernung erkannt und zunehmend auch prophylaktische Kolektomien durchgeführt. Dominierte lange Zeit die totale Proktokolektomie mit Ileostoma-Anlage, führte die operationstechnische Weiterentwicklung mit der ersten ileorektalen Anastomose 1948 und der Einführung der restaurativen Proktokolektomie mit Pouchanlage 1977 zu einer deutlichen Steigerung der Akzeptanz der chirurgischen Therapie. Beide Maßnahmen erfordern allerdings endoskopische Verlaufskontrollen des Rektums bzw. Pouches. Bis heute werden die Indikationen sowie die Vor- und Nachteile beider Verfahren kontrovers diskutiert. Seit Ende der 1990er Jahre wird auch die laparoskopische Kolektomie erfolgreich eingesetzt.

Demgegenüber beschränken sich Versuche einer Chemoprävention zur Verzögerung des Polypenwachstums auf attenuierte Verläufe oder die Behandlung bzw. Prophylaxe von Adenomen im Rektum nach Kolektomie mit ileorektaler Anastomose. Hierfür wurde seit 1983 vor allem das Indomethacinderivat Sulindac aus der Gruppe der nichtsteroidalen Antiphlogistika erfolgreich eingesetzt. Es inhibiert als Cyclooxygenase-Hemmer die Prostaglandinsynthese. Die Hoffnung, die chirurgische Behandlung ähnlich wie beim Magencancer durch medikamentöse Therapieerfolge abzulösen, ist derzeit allerdings noch nicht in greifbarer Nähe.

Eine überragende Bedeutung für die Prognose kommt der endoskopischen Überwachung des Magendarmtraktes von Risikopersonen zu, die bereits 1928 empfohlen wurde (Jüngling 1928). Das 1999 von der LCPG erarbeitete und inzwischen fest etablierte Vorsorge-Programm für die FAP (Vasen et al. 1999; Vasen et al. 2008) hat die Früherkennung und rechtzeitige Behandlung der Erkrankung entscheidend verbessert und zusammen mit der prophylaktischen Kolektomie dazu geführt, dass das CRC nicht mehr den bestimmenden prognostischen Faktor darstellt (Bülow 1986; Jarvinen 1992).

Mit der Beschreibung des *APC*-Gens und seiner Interaktionspartner gelang in den 1990er Jahren die Identifizierung eines der zentralen Regulationswege (Wnt-Signalweg) des Zellwachstums, dessen Fehlsteuerung nicht nur bei der hereditären, sondern auch bei sporadischen Formen zur Initiation der Adenombildung beiträgt. Schon früh wurde die Bedeutung der FAP als Modell-Erkrankung für das Verständnis des Dickdarmkrebses im Allgemeinen deutlich und ließ die Erforschung der Pathogenese dieser seltenen Veranlagung in einem größeren Zusammenhang erscheinen. Seit 1992 existieren auch Mausmodelle der FAP (Su et al. 1992). Insbesondere das zentrale Paradigma der Adenom-Karzinom-Sequenz konnte durch das synchrone Vorkommen aller Adenomstadien in Reinform studiert werden, sodass die FAP entscheidende Anstöße zur Entwicklung des Vogelstein'schen Modells der kolorektalen Karzinogenese gab (Vogelstein et al. 1988; Fearon and Vogelstein 1990). Sachatello bezeichnete die FAP deshalb als das ultimative Modell der menschlichen Karzinogenese und Smith formulierte schon 1968 hoffnungsvoll, dass vermutlich jede signifikante Entdeckung bei der FAP Bedeutung für das viel größere Problem des CRC haben würde (Smith 1968; Sachatello 1971).

## **1.1.2 APC-assoziierte familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)**

### **1.1.2.1 Genetik, Epidemiologie und Pathogenese**

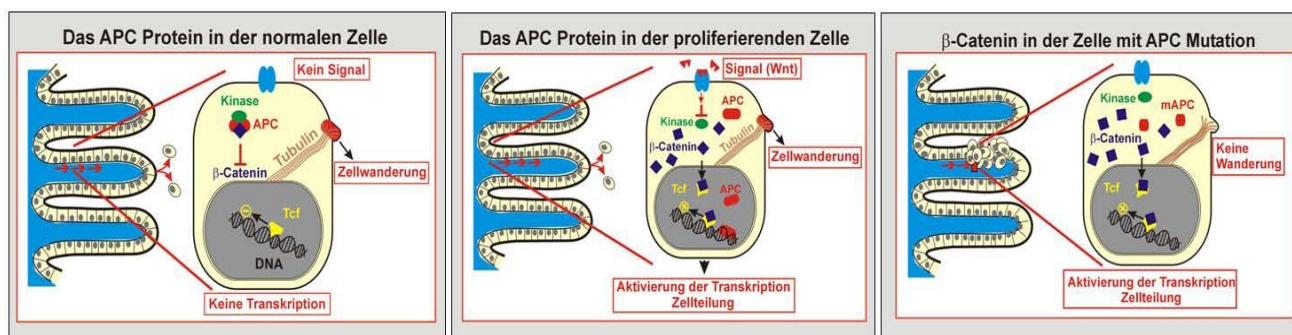
Die FAP [MIM \*175100] ist ein autosomal-dominant erbliches gastrointestinales Tumordispositions-Syndrom, das durch eine heterozygot vorliegende Keimbahnmutation im *APC*-Gen verursacht wird. Sie stellt mit einer Inzidenz von etwa 1:10.000 (1:7000-1:24.000) und einer Prävalenz von 1:30.000-40.000 die häufigste kolorektale Polyposis dar (Bisgaard et al. 1994; Bülow et al. 1996). Die epidemiologischen Daten stammen größtenteils aus dänischen und skandinavischen Polyposis-Registern; aufgrund der hohen Neumutationsrate ist aber von einer weltweit vergleichbaren Inzidenz auszugehen.

Beim *APC*-Gen handelt es sich um ein Tumorsuppressor-Gen, das 1987 in der chromosomalen Region 5q21-q22 kartiert (Bodmer et al. 1987; Leppert et al. 1987) und 1991 identifiziert wurde (Grodin et al. 1991; Kinzler et al. 1991). Die genomische Sequenz umfasst knapp über 108 Kilobasen (kb) (Genbank: NC\_000005.8; genomische Region 112.101.483 - 112.209.835) und kodiert ein 2843 Aminosäuren langes zytoplasmatisches Protein (mRNA-Referenzsequenz Genbank: NM\_000038.4). Das letzte der 15 kodierenden Exons umfasst etwa 77 % der gesamten kodierenden Sequenz. Es wurden zahlreiche, zum Teil gewebsspezifische Isoformen beschrieben, insbesondere Exon 9 und 10a werden alternativ gespleißt.

Das APC-Protein ist als komplexes, aus zahlreichen strukturellen und funktionellen Domänen bestehendes Makromolekül zentraler Bestandteil des Wnt-Signaltransduktionswegs und hier als „gatekeeper“ an der Kontrolle des Zellwachstums (Proliferation), der interzellulären Adhäsion und der Regulation des Zellzyklus der Enterozyten beteiligt (**Abb. 1.1**) (Polakis 1997). In einem Multi-



proteinkomplex ist es durch die Interaktion mit  $\beta$ -Catenin an der Regulierung von Wnt-vermittelten Wachstumssignalen beteiligt. Entsprechend der von Knudson 1971 postulierten Second-Hit-Hypothese (Knudson 1971) führen somatische Mutationen in den Enterozyten von heterozygoten Trägern einer APC-Keimbahnmutation (FAP-Anlageträger) zum (kompletten) Ausfall des APC-Proteins. Folge hiervon ist eine Stabilisierung von  $\beta$ -Catenin, das dann eine unkontrollierte Aktivierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern bedingt (Morin et al. 1997). Die Verteilung der beiden APC-Mutationen im Tumorgewebe ist dabei nicht zufällig, sondern scheint hinsichtlich einer für den Tumor optimalen Restfunktion des Proteins selektiert zu werden; nach neuesten Untersuchungen können während der Tumorphase auch weitere Mutationen (third-hit) des APC-Gens auftreten (Segditsas et al. 2009). In jüngster Zeit wurde auch die Bedeutung des APC-Proteins für die chromosomale Stabilität erkannt (Alberici and Fodde 2006).



**Abb. 1.1** Das APC-Protein ist an der Herunterregulierung des intrazellulären  $\beta$ -Catenins beteiligt. Wnt-vermittelte Wachstumssignale führen ebenso wie ein mutationsbedingter Funktionsverlust des APC-Proteins zu einem Anstieg des  $\beta$ -Catenin-Spiegels und in der Folge zur Aktivierung proliferationsfördernder Transkriptionsfaktoren (Abbildungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Oliver Müller, MPI für molekulare Physiologie Dortmund).

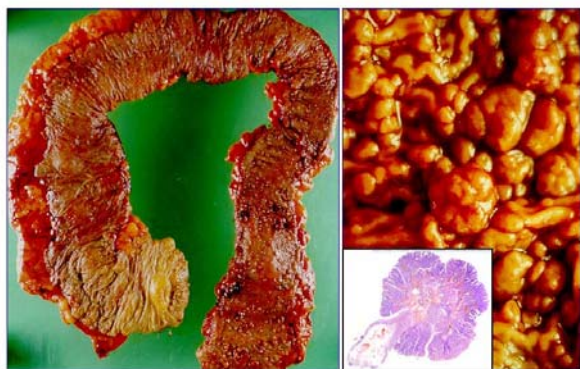
Bis heute wurden über 900 verschiedene APC-Keimbahnmutationen bei FAP-Patienten beschrieben (Human Gene Mutation Database; [www.hgmd.cf.ac.uk](http://www.hgmd.cf.ac.uk), [www.lovd.nl/APC](http://www.lovd.nl/APC)). Es handelt sich in der weit überwiegenden Mehrheit um proteintrunkierende Veränderungen (Stopp-Mutationen, Leseraster-Verschiebungen). Diese „Punktmutationen“ liegen meist in der 5'-Hälfte des APC-Gens ab Exon 3. Bei einem Teil der Patienten mit unauffälliger Familiengeschichte ist die ursächliche APC-Mutation in der entsprechenden Ei- oder Samenzelle ihrer Eltern neu aufgetreten (*de novo* Mutation).

### 1.1.2.2 Klinisches Erscheinungsbild und Vorsorge

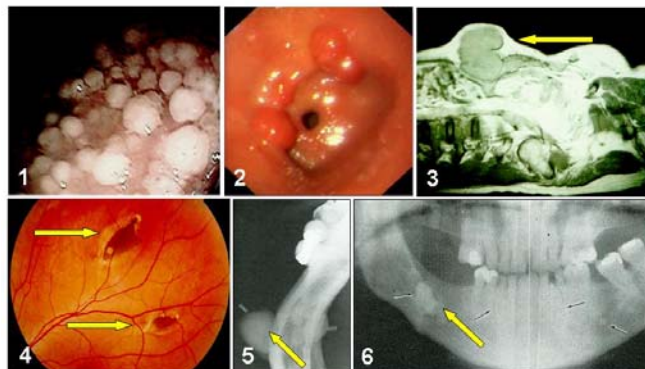
Die klassische (typische) FAP ist durch das Auftreten Hunderter bis Tausender kolorektaler Adenome im zweiten Lebensjahrzehnt gekennzeichnet, die oft erst im dritten Lebensjahrzehnt symptomatisch werden (**Abb. 1.2**). Unbehandelt entwickeln sich bei nahezu allen Betroffenen im Laufe des Lebens aus einem oder mehreren Adenomen kolorektale Karzinome (Übersicht bei Friedl and Lamberti 2001; Bülow 2003; Galiatsatos and Foulkes 2006). In etwa 80 % der Familien lässt sich eine APC-Mutation nachweisen.

Mildere Verläufe der Erkrankung werden meist als attenuierte FAP (AFAP) bezeichnet. Es handelt sich allerdings um eine klinisch schlecht definierte und genetisch vermutlich heterogene Patientengruppe, nur bei etwa 20-30% der Indexpatienten lässt sich eine APC-Mutation nachweisen. Als diagnostische Kriterien der AFAP werden typischerweise eine geringere Polypenzahl (<100) und ein in der Regel 10-15 Jahre späteres Manifestationsalter im Vergleich zur klassi-

schen FAP herangezogen (Knudsen et al. 2003); die Adenome sind im Gegensatz zur klassischen FAP häufig im proximalen Kolon lokalisiert. Letztlich handelt es sich aber bei der Ausprägung der Polyposis um ein biologisches Kontinuum und die dichotome Einteilung markiert eher die beiden phänotypischen Extreme als klare nosologische Einheiten. Unbehandelt ist das Lebenszeitrisiko für ein CRC auch bei der AFAP sehr hoch.



**Abb. 1.2.** Kolektomiepräparat eines Patienten mit klassischer FAP: Der Dickdarm ist mit Polypen übersät, die histologisch Adenomen entsprechen (Aufnahmen von Prof. Dr. K. Jäger, jetzt Chirurgische Abt. Marienhospital Brühl, und von Prof. em. Dr. U. Pfeifer, Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Bonn).



**Abb. 1.3.** Typische extrakolonische Manifestationen der FAP: 1 = Drüsenkörperzysten im Magen; 2 = duodenale Polyposis; 3 = intramurales Desmoid; 4 = retinale Pigmentflecken (CHRPE); 5 = Osteome im Unterkiefer; 6 = Osteome und Zahnfehlstellung (Aufnahmen aus Friedl und Lamberti 2001 [1]; von PD Dr. R. Caspari, jetzt Reha-Zentrum Ückeritz, Usedom [2]; Prof. Dr. G. Möslein, jetzt Chirurgische Abt. St. Josefs-Hospital Bochum [3]; PD Dr. T. Böker, jetzt Augenklinik Klinikum Dortmund [4] und aus Herrera 1989 [5,6]).

Polypen des Magens treten bei über 50% (13-84%) der FAP-Patienten auf, es handelt sich allerdings überwiegend um gutartige Drüsenkörperzysten (**Abb. 1.3**), Magenkarzinome scheinen bei FAP-Patienten nicht signifikant häufiger zu sein (Inzidenz 0,6%). Duodenaladenome werden hingegen bei bis zu 90% der Patienten beschrieben, das relative Risiko für die Entstehung eines Duodenalkarzinoms ist deutlich erhöht (~300), das Lebenszeitrisiko wird mit etwa 5 % angegeben (Offerhaus et al. 1992; Bülow et al. 2004).

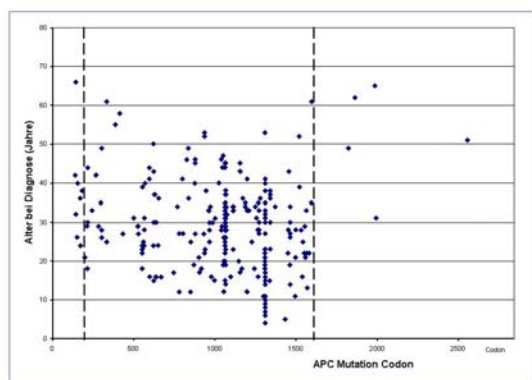
Bei einem Teil der Patienten treten typische, zum Teil unter dem Begriff Gardner-Syndrom zusammengefasste extraintestinale Manifestationen wie Osteome, Fibrome oder Epidermoidzysten auf; die zum Teil aggressiv wachsenden Desmoide werden in 4-13 % beobachtet (Kadmon et al. 1995; Abb. 1.3). Da Desmoide insbesondere durch ein mechanisches Trauma ausgelöst werden, können Entscheidungen über invasive therapeutische Eingriffe (Kolektomie) durch eine familiäre Häufung von Desmoiden unter Umständen beeinflusst werden. Die FAP-typischen gutartigen Pigmentveränderungen der Netzhaut (CHRPE) haben ihren Stellenwert in der prädiktiven Diagnostik und in der Entscheidung über das Vorgehen bei der Mutationssuche inzwischen weitgehend verloren. An extraintestinalen Malignomen wurden insbesondere Hepatoblastome, Medulloblastome und Schilddrüsenkarzinome beschrieben, aufgrund ihrer geringen Inzidenz (1-2 %) sind spezifische Vorsorgemaßnahmen allerdings umstritten (Aretz et al. 2006a; Vasen et al. 2008).

Die Effizienz frühzeitiger und engmaschiger Koloskopien zur Prävention des CRC ist für die FAP gut belegt (Jarvinen 1992) und führte zur Etablierung eines krankheitsspezifischen intensiven Früherkennungs- bzw. Vorsorge-Programms für Risikopersonen (erstgradig verwandte Personen

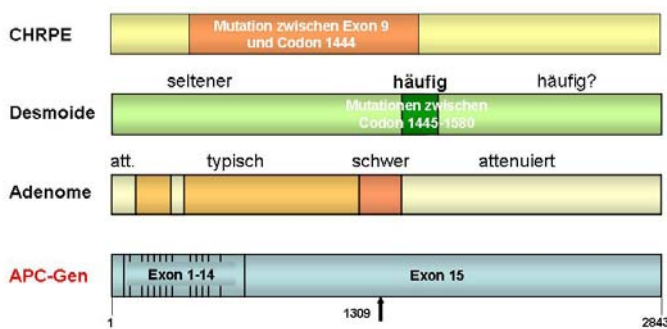
eines FAP-Patienten) (Schmiegel et al. 2004; Vasen et al. 2008). Die international erhobenen Befunde konnten durch eigene Untersuchungen bestätigt werden (Aretz et al., unpublizierte Daten), hierbei zeigte sich allerdings auch, dass die Koloskopie derzeit im Mittel noch etwa zehn Jahre zu spät begonnen wird.

### 1.1.2.3 Genotyp-Phänotyp-Beziehungen

Genotyp-Phänotyp-Beziehungen hinsichtlich des Schweregrads der kolorektalen Polyposis und der Expression extrakolonischer Manifestationen sind seit längerem bekannt und lassen sich zum Teil überzeugend mit dem Ausfall der entsprechenden funktionellen Domänen im APC-Protein in Einklang bringen: Mutationen am Beginn (Codons 77-157), in der alternativ gespleißten Region von Exon 9 (Codons 312-412) und in der distalen Hälfte des APC-Gens (etwa ab Codon 1580) sind mit einem milderen Verlauf assoziiert, während Mutationen zwischen Codon 1250 und 1330 – insbesondere im Bereich von Codon 1309 – häufig mit einer besonders früh manifesten Verlaufsform einhergehen (Nagase et al. 1992; Spirio et al. 1993; Caspari et al. 1994; Friedl et al. 2001; **Abb 1.4 und 1.5**).



**Abb. 1.4.** Trotz der statistisch nachweisbaren Korrelation zwischen Krankheitsschwere (Alter bei FAP-Diagnose) und Genotyp besteht eine große inter- und intrafamiliäre Variabilität (Friedl et al. 2001).



**Abb. 1.5.** In großen FAP-Kollektiven ließen sich bezüglich des Schweregrades der Polyposis und des Auftretens extraintestinaler Symptome reproduzierbare Genotyp-Phänotyp-Beziehungen beschreiben.

Trotz der hohen Korrelation ist die Streuung der klinischen Parameter – selbst intrafamiliär – allerdings groß. Es handelt sich deshalb immer nur um statistische Genotyp-Phänotyp-Beziehungen, die Kenntnis der APC-Mutation kann den Krankheitsverlauf bei einem individuellen Patienten nicht sicher vorhersagen und eignet sich somit kaum als Grundlage für therapeutische Entscheidungen.

CHRPE treten fast ausschließlich bei Mutationen im zentralen Anteil des Gens auf (Codons 463-1387) und finden sich deshalb fast nie bei der AFAP; eine Häufung von Desmoiden und Osteomen wurde bei Mutationen zwischen Codon 1445 und 1578 gefunden (Wallis et al. 1994; Caspari et al. 1995); **Abb. 1.5**).

### 1.1.3 *MUTYH*-assoziierte Polyposis (MAP)

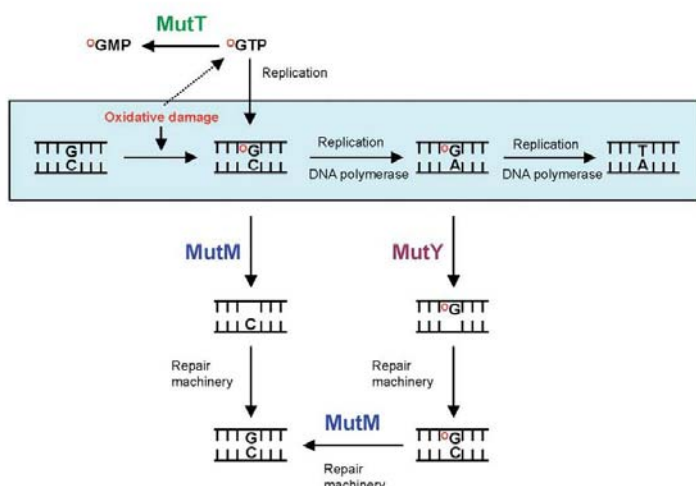
#### 1.1.3.1 Genetik, Epidemiologie und Pathogenese

Die im Gegensatz zur FAP autosomal-rezessiv erbliche *MUTYH*-assoziierte Polyposis (MAP, [MIM \*608456]) wird durch biallele Keimbahn-Mutationen im *MUTYH*-Gen (anfangs als *MYH*-Gen bezeichnet) verursacht. Die MAP wurde im Jahr 2002 erstmals beschrieben und stellt heute die wichtigste Differentialdiagnose der *APC*-assoziierten FAP dar (Al-Tassan et al. 2002; Sampson et al. 2003; Sieber et al. 2003).

Verlässliche Zahlen zur Epidemiologie liegen bisher nicht vor. In Abhängigkeit von den Einschlusskriterien, den Methoden der Mutationssuche und dem ethnischen Hintergrund machen biallele Mutationsträger (MAP-Patienten) 3-40 % der *APC*-mutationsnegativen Patienten mit adenomatöser Polyposis aus. Entsprechend der Heterozygotenfrequenz von 1-2 % in der kaukasischen Allgemeinbevölkerung dürfte die Inzidenz der Krankheit in westlichen Ländern zwischen 1:10.000-40.000 liegen. Aufgrund des autosomal-rezessiven Erbgangs haben Kinder (und Eltern) eines MAP-Patienten bei nicht-konsanguinen Partnerschaften im Gegensatz zur FAP ein nur geringes Wiederholungsrisiko.

Das *MUTYH*-Gen (humanes MutY-Homolog) liegt in der chromosomalen Region 1p34.1 und besteht aus 16 Exons. Die genomische Sequenz umfasst über 11 kb (Genbank: NC\_000001.9; genomische Region 45.567.501 - 45.578.729) und kodiert ein 549 Aminosäuren langes Protein. Es wurden verschiedene Transkripte identifiziert, die in den letzten Jahren mehrmals zu einer Änderung der Referenzsequenz auf RNA-Ebene und damit der Bezeichnung von *MUTYH*-Mutationen führten (siehe unten).

Das *MUTYH*-Protein ist eine DNA-Glykosylase und als „caretaker“ Bestandteil des Basen-Exzisions-Reparatur-Systems (BER) der Zelle, das durch oxidativen Stress entstandene Basenfehlpaarungen (Punktmutationen) der DNA (8-oxo-7,8-dihydroxy-2'-deoxyguanosine = 8-oxoG) korrigiert (**Abb 1.6**). Der Funktionsverlust des Enzyms durch biallele Keimbahnmutationen führt zu einer Anhäufung somatischer Mutationen durch 8-oxoG induzierte G:C>T:A Transversionen in anderen Zielgenen (zum Beispiel dem *APC*-Gen) und hierüber insbesondere zur Entstehung von Adenomen im Gastrointestinaltrakt. In den beiden anderen, synergistisch wirkenden Genen *MTH1* (humanes MutT-Homolog) und *OGG1* (humanes MutM-Homolog) wurden bisher bei Polyposis-Patienten keine Keimbahnmutationen identifiziert (Al-Tassan et al. 2002; Jones et al. 2002).



**Abb. 1.6** Die Basen-Exzisions-Reparatur (Base excision repair = BER) in *E. coli*: die Glykosylase MutY (humanes Homolog: *MUTYH*) entfernt A-Basen, die sich bei der DNA-Replikation gegenüber 8-oxoG (°G), dem stabilsten Produkt von oxidativen DNA-Schäden, angelagert haben. MutY erkennt hierbei als einzige der drei beteiligten Glykosylasen die intermediäre Basenfehlpaarung °G-A. Der Ausfall des Enzyms führt deshalb über die Bildung von °G-A zu G:C > T:A-Mutationen (blauer Kasten) (aus: Cheadle and Sampson 2003)



*MUTYH*-Mutationen finden sich bei biallelen Mutationsträgern über das ganze Gen verstreut, abgesehen von den ersten beiden Exons (*MUTYH* LOVD [Leiden Open Variation Database; [http://chromium.liacs.nl/LOVD2/colon\\_cancer/home.php](http://chromium.liacs.nl/LOVD2/colon_cancer/home.php)] und HGMD [Human Gene Mutation Database; [www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)]). Bei einem nennenswerten Anteil handelt es sich um Missense-Mutationen, die vermutlich die katalytischen Eigenschaften des Enzyms reduzieren. Der experimentelle Nachweis der funktionellen Relevanz konnte bisher aber nur für einen Teil der Varianten erbracht werden.

Bei Patienten europäischen Ursprungs dominieren zwei Missense-Mutationen in Exon 7 und 13, die nach der ursprünglich von Al-Tassan benutzten und verbreiteten mRNA-Referenzsequenz (1608 bp; Genbank: U63329.1) als c.494A>G;p.Tyr165Cys (Y165C) und c.1145G>A;p.Gly382Asp (G382D) bezeichnet werden, nach der aktuellen, 42 Nukleotide längeren Referenzsequenz (1650 bp; Genbank: NM\_001128425) hingegen als c.536A>G;p.Tyr179Cys (Y179C) und c.1187G>A;p.Gly396Asp (G396D). Die kombinierte Allelfrequenz beider Mutationen liegt bei europäischen Patienten zwischen 50 und 82 %, während beide Mutationen in asiatischen Populationen kaum oder gar nicht vorzukommen scheinen (Miyaki et al. 2005; Kim et al. 2007; Yanaru-Fujisawa et al. 2008); dies lässt an für autosomal-rezessive Erkrankungen nicht ungewöhnliche Founder-Effekte denken. Passend hierzu wurden auch in anderen Ländern populationspezifische Gründermutationen beschrieben (Sampson et al. 2003; Kanter-Smoler et al. 2006; Dolwani et al. 2007; Ajith Kumar et al. 2008). In einem Kooperationsprojekt mit Roberto Colombo, Professor für Klinische Genetik an der *Catholic University of the Sacred Heart* in Mailand, konnten wir gerade bei 32 biallelen Trägern der beiden häufigen *MUTYH*-Mutationen aus Deutschland einen ancestralen Haplotyp identifizieren und das Alter der beiden Mutationen mittels populationsgenetischer Algorithmen auf die Zeit zwischen dem 3. Jahrtausend und 16. Jahrhundert v. Chr. für G382D bzw. 6. Jahrhundert v. Chr. bis 3. Jahrhundert n. Chr. für Y165C eingrenzen (Aretz et al., zur Publikation eingereicht).

### 1.1.3.2 Klinisches Erscheinungsbild und Vorsorge

Die MAP ist klinisch im Wesentlichen mit der durch *APC*-Mutationen verursachten attenuierten bzw. atypischen FAP vergleichbar (Phänotyp-Klassifikation siehe Kapitel 1.2.1): meist treten zwischen 20 und einigen hundert Adenomen auf, das Alter bei Diagnose liegt im Mittel bei 45 Jahren (Streuung 12-68 Jahre), unbehandelt beträgt das Lebenszeitrisiko für ein CRC vermutlich wie bei der AFAP bis zu 100 % (Farrington et al. 2005). Nach neuesten Daten bestehen aber bei bis zu einem Drittel der MAP-Patienten mit einem CRC keine kolorektalen Polypen (Cleary et al. 2009).

Entsprechend dem autosomal-rezessiven Erbgang tritt die MAP häufig sporadisch oder mehrmals in Geschwisterschaften auf. Wegen des hohen CRC-Risikos wird Betroffenen, biallelen asymptomatischen Anlageträgern und Geschwistern, die nicht prädiktiv getestet wurden, derzeit das gleiche gastrointestinale Früherkennungsprogramm wie bei der attenuierten FAP empfohlen. Im Rahmen der unten erwähnten internationalen Studie (Kapitel 2.2.2) konnten erstmals signifikante Genotyp-Phänotyp-Korrelationen hinsichtlich der kolorektalen Manifestation nachgewiesen werden (Nielsen et al. 2009).

Das CRC-Risiko von heterozygoten Anlageträgern wurde anfangs kontrovers diskutiert (Croitoru et al. 2004; Peterlongo et al. 2006; Webb et al. 2006; Balaguer et al. 2007). Zwei große populationsbasierte Assoziations-Untersuchungen an über 2000 und 3800 CRC-Patienten schätzten

das relative Risiko dann auf etwa 1,7 (95% CI 1,07-2,95) bei über 55-Jährigen (Farrington et al. 2005) bzw. auf insgesamt 1,5 (95% CI 1,02-2,16) (Cleary et al. 2009). Wir haben im Rahmen der erwähnten internationalen Studie bei 273 heterozygoten Anlageträgern ein mit 2,12 (95% CI 1,30-3,28;  $p < 0.01$ ) in etwa verdoppeltes relatives Risiko festgestellt und kamen so mit einem anderen methodischen Ansatz zu einem ähnlichen Ergebnis (Jones et al., zur Publikation eingereicht).

#### **1.1.4 Mutations-negative adenomatöse Polyposis**

Bei einem nennenswerten Teil der Indexpatienten (44-52 %) kann die genetische Ursache der adenomatösen Polyposis nicht geklärt werden. Durch die immer bessere klinische Erfassung und molekulargenetische Diagnostik bei mildereren Formen wird der Anteil zukünftig noch weiter ansteigen. Aufgrund der hohen Mutationsdetektionsrate bei der klassischen Form finden sich bei den APC- und MUTYH-mutationsnegativen Patienten vermehrt mildere Ausprägungen (AFAP, multiple kolorektale Adenome = MCA), ein sporadisches Auftreten und seltener extrakolonische Manifestationen. Es handelt sich vermutlich um einen genetisch und klinisch heterogenen Phänotyp. Trotz zahlreicher wissenschaftlicher Bemühungen mit verschiedenen methodischen Ansätzen (Kandidatengene, LOH-Studien, Expressions- und Kopienzahl-Untersuchungen) wurde bei der Aufklärung der genetischen Grundlagen allerdings bisher – abgesehen von der Identifizierung der MAP – kein substantieller Durchbruch erzielt.

Bei einigen Patienten lässt sich die ergebnislose Mutationssuche mit diagnostischen Schwierigkeiten bzw. Fehldiagnosen erklären. Bei wenigen (5-30) kolorektalen Adenomen muss differentialdiagnostisch insbesondere an den *erblichen Dickdarmkrebs ohne Polyposis* (HNPCC, Lynch-Syndrom) gedacht werden. In HNPCC-assoziierten Karzinomen lässt sich das Phänomen der Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) sowie immunhistochemisch der Ausfall eines MMR-Proteins nachweisen. Daneben werden aber auch bei anderen intestinalen Polyposis-Syndromen (*familiäre juvenile Polyposis; Peutz-Jeghers-Syndrom; hereditäres gemischtes Polyposis-Syndrom*) neben dem jeweiligen dominierenden Polypentyp Adenome beobachtet. Den übrigen Fällen liegen wahrscheinlich entweder APC-Mutationen zugrunde, die im Rahmen der Routinediagnostik nicht identifiziert bzw. interpretiert werden können, oder Veränderungen anderer, noch unbekannter Gene, wobei hier sowohl eine monogene, wie auch komplexere, multifaktorielle Ätiologie denkbar ist.

## **1.2 Material und Methoden**

### **1.2.1 Patienten**

#### **Kollektiv / Rekrutierung**

Bis Januar 2009 wurde am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Bonn bei 1452 Familien mit adenomatöser Polyposis eine molekulargenetische Diagnostik durchgeführt. Bei allen in die verschiedenen Studien eingeschlossenen Patienten wurde eine APC-Mutationsanalyse aufgrund einer adenomatösen Polyposis veranlasst. Die klinischen Informationen wurden zum Teil bei der Einsendung der Blutproben mitgeliefert oder im Rahmen der genetischen Beratung in unserem Institut erhoben, zum größten Teil allerdings anlässlich verschiedener wissen-

schaftlicher Studien aktiv und systematisch bei den betreuenden Ärzten und Krankenhäusern angefordert.

## Phänotyp-Klassifikation

Die zur Diagnose einer gastrointestinalen adenomatösen Polyposis notwendige Mindestzahl von Polypen ist nicht klar definiert, sicher sollten aber bei Erstdiagnose und leerer Familienanamnese mehr als zehn synchrone kolorektale Adenome vorliegen. Die von unserer Arbeitsgruppe verwendete Klassifikation der verschiedenen Schweregrade des Krankheitsverlaufs orientiert sich an den international üblichen Standards und basiert auf der Adenomzahl, dem Diagnosealter und dem Auftreten eines CRC: **i) klassische oder typische FAP**: über 100 Adenome vor dem 35. Lebensjahr oder klinische Symptome vor dem 35. Lebensjahr (wenn Koloskopiebefunde nicht verfügbar oder unklar); **ii) attenuierte FAP (AFAP)**: 10-100 Adenome nach dem 25. Lebensjahr oder über 100 Adenome bei Erstdiagnose nach dem 45. Lebensjahr bzw. klinische Symptome erstmals nach 45. Lebensjahr; **iii) atypische Polyposis**: die Kriterien für eine typische oder attenuierte FAP sind nicht erfüllt, sodass eine eindeutige Zuordnung nicht möglich ist, meist handelt es sich um intermediäre Verläufe mit über 100 Adenomen bei einem Diagnosealter zwischen 35 und 40 Jahren oder um eine starke Diskrepanz zwischen dem Beginn von Symptomen und der Polypenzahl.

## 1.2.2 Molekulargenetische Untersuchungsmethoden

### Suche nach Punktmutationen im *APC*- und *MUTYH*-Gen

Die genomische DNA der Patienten wurde aus peripherem Blut (Leukozyten) entsprechend dem Aussalzverfahren extrahiert (Miller et al. 1988). Das Screening nach *APC*-Punktmutationen erfolgte anfangs (seit 1991) mittels Heteroduplexanalyse (HD) und *single-strand conformational polymorphism analysis* (SSCP) und später mit dem Protein-Trunkationstest (PTT) für Exon 15 und der *denaturing high-performance liquid chromatography* (DHPLC) (WAVE, Transgenomics) für die Exons 1-14 und die ersten 500 Basenpaare (bp) von Exon 15 (Abschnitte 15A und 15B). Auffällige PCR-Fragmente wurden anschließend mit einem Gel- oder Kapillar-Sequenzier (ABI prism 377, ABI 3100; Applied Biosystems) mittels Cycle-Sequencing und BigDye-Terminatoren (Kit Versionen 1.1 und 2.0) sequenziert. Die Suche nach *MUTYH*-Mutationen in allen 16 kodierenden Exons und den angrenzenden Intronsequenzen erfolgte durch direkte Sequenzierung von 11 PCR-Produkten ohne vorherige Screeningverfahren. Zur Beschreibung der Mutationen wurden die kodierenden Nukleotide entsprechend der mRNA-Referenz-Sequenz des *APC*-Gens (GenBank NM\_000038) und *MUTYH*-Gens (Genbank U63329.1 bzw. NM\_001128425) nummeriert. Das erste Nukleotid entspricht dabei dem A des ATG-Translations-Initiations-Codons.

### Screening auf große genomische Deletionen und Duplikationen des *APC*-Gens

Das Screening auf große genomische Deletionen und Duplikationen des *APC*-Gens erfolgte mit der MLPA-Methode (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Das MLPA-Test-Kit (SALSA P043 APC exon deletion test kit, MRC Holland) enthält 20 gepaarte Proben des *APC*-Gens zur semiquantitativen Untersuchung der ersten 14 Exons, von drei Abschnitten aus der

Promotorregion, von drei am Anfang, in der Mitte und am Ende von Exon 15 gelegenen Fragmenten sowie 11 Kontrollproben anderer chromosomaler Regionen.

Je ein Probenpaar für jedes einzelne Fragment (Exon) wird dabei mit der zu untersuchenden DNA nach Hitzedenaturierung hybridisiert, die angelagerten Proben werden durch Ligation verbunden, mit dem gleichen Primerpaar für alle Fragmente mittels PCR amplifiziert und auf einem ABI 3100 Kapillar-Sequenzierer aufgetrennt. Als Positiv- und Negativ-Kontrollen wird parallel DNA gesunder Personen und von Trägern bekannter *APC*-Deletionen untersucht.

Der Datenexport erfolgte mittels GeneMapper-Software. Die Elektropherogramme wurden anfangs durch visuelle Beurteilung der Peak-Höhen der einzelnen *APC*-Fragmente im Vergleich mit den benachbarten Kontrollfragmenten ausgewertet, später auch durch die Berechnung der Dosisquotienten mittels der *Coffalyzer*-Software. Hierzu wird das Verhältnis der Peak-Area eines *APC*-Exons und der angrenzenden internen Kontroll-Fragmente berechnet und durch den medianen Wert des entsprechenden Verhältnisses bei allen Proben desselben Laufs normalisiert. Die erwarteten Werte für große heterozygote Deletionen liegen bei etwa 0,5. Alle Deletionen und unklaren Befunde wurden durch eine zweite unabhängige Wiederholung bestätigt.

### **RNA-Untersuchungen (Transkriptanalyse)**

Hierzu wurden den Patienten von den betreuenden Ärzten frische venöse Blutproben in speziellen, mit einem RNA stabilisierenden Zusatz versehenen Röhrchen (PAXgene RNA Blutröhrchen, PreAnalytiX, Qiagen, Hilden) abgenommen. Hieraus wurde die gesamte RNA extrahiert (PAXgene Blood RNA Kit, Qiagen, Hilden). 2-3 µg der RNA wurden anschließend durch random hexamer-primed reverse Transkription mit dem Superscript-1st-strand-System für RT-PCR (Invitrogen GmbH, Karlsruhe) in cDNA umgeschrieben. Mittels Standard-PCR-Protokollen wurden die gewünschten RT-PCR Fragmente unter Verwendung entsprechender Primer generiert, auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetragen und mittels eines UV Imaging Systems (BIORAD) analysiert. Aberrante und normale Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, gereinigt (High Pure PCR Product Purification Kit, Roche), mit denselben Primern reamplifiziert und sequenziert.

### **SNaPshot-Analyse**

Die SNaPshot-Analyse (ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kit, Applied Biosystems) wurde insbesondere zur Verifizierung der Mutationen und Quantifizierung des Mosaikgrades bei Patienten mit vermutetem *APC*-Mosaik eingesetzt. Es handelt sich um eine Primer-Extensions-Methode, die auf der Anlagerung eines einzelnen fluoreszenzmarkierten Dideoxy-Nukleotids (entweder des Wildtyp- oder des Mutations-Nukleotids) an speziell gelegte Primer beruht. Die Primer reichen bis unmittelbar an die zu untersuchende Variante heran (Uhlmann et al. 2002; Kaminsky et al. 2005).

Hierzu wird das die *APC*-Mutation tragende Exon mit den üblichen Primern amplifiziert und dann ein Aliquot des PCR-Produktes für die SNaPshot-Analyse entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet. Parallel wurden auch normale Kontrollen und – soweit verfügbar – DNA-Proben mit einer Vollmutation untersucht. Die Produkte der Primer-Extensions-Reaktion wurden anschließend auf einem ABI 3100 Kapillarsequenzierer analysiert und das Verhältnis der Peakflächen von normaler und mutierter DNA mit der GeneMapper-Software Version 3.0 (Applied Biosystems) quantifiziert.



## Loss of heterozygosity (LOH)

Mithilfe von polymorphen Mikrosatelliten-Markern können segmentale Allelverluste (= Deletionen) im Tumorgewebe als „loss of heterozygosity“ (LOH) dargestellt werden. Entsprechend der Zwei-Treffer-Theorie von Knudson stellt eine somatische Deletion häufig den zweiten Treffer („second hit“) dar, der im Tumorgewebe zur Inaktivierung des Tumorsuppressorgens (hier *APC*-Gens) führt und das Tumorwachstum initiiert.

Zum Nachweis von LOH wurde aus Leukozyten und kolorektalem Adenomgewebe extrahierte DNA mit den drei nahe am *APC*-Gen lokalisierten Mikrosatellitenmarkern D5S346, D5S82 and D5S1965 untersucht. Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte wurden auf einem ABI 3100 Sequenzierer aufgetrennt und mit der GeneMapper-Software Version 3.0 (Applied Biosystems) evaluiert. Von einem LOH wurde ausgegangen, wenn eines der beiden in Leukozyten-DNA nachweisbaren Allele eines informativen Markers in der Tumor-DNA fehlte bzw. deutlich reduziert war.

## Kopplungsuntersuchungen / Haplotyp-Analyse

Die Haplotypanalyse im Bereich des *APC*-Locus erfolgte unter Verwendung des intragenischen Polymorphismus rs465899 (c.5880G>A;p.Pro1960 in Exon 15 des *APC*-Gens) sowie von sieben die *APC*-Region flankierenden Mikrosatelliten-Markern (D5S299 - D5S82 - D5S134 – *APC* – D5S346 – D5S2001 – D5S1385 – D5S138), die einen genomischen Bereich von 14 cM umfassen.

## In-silico-Analysen

Zur in-silico-Analyse der funktionellen Konsequenzen unklarer Varianten in Exon- und Intronbereichen des *APC*-Gens wurden drei verschiedene Programme benutzt. Zur Prädiktion der Spleißeffizienz von Wildtyp- und mutierten Sequenzen wurden die Programme *Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP)* ([www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) und *SpliceSiteFinder* ([www.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html](http://www.genet.sickkids.on.ca/~ali/splicesitefinder.html)) eingesetzt. Der Einfluss von exonischen Basensubstitutionen auf mutmaßliche *exonic splice enhancer* (ESE) Motive wurde mittels des *ESEfinder* Programms (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/>) eingeschätzt (Cartegni et al. 2003).

## 2 EIGENE ARBEITEN: ERGEBNISSE UND DISKUSSION

### 2.1 Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)

#### 2.1.1 Häufigkeit und parentale Herkunft von *de novo* APC-Mutationen

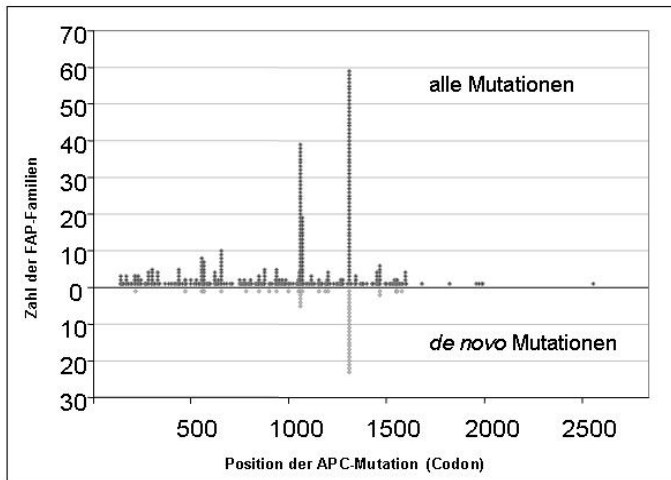
(Aretz et al., Eur J Hum Genet 2004)

In der Literatur wird der Anteil von *APC*-Neumutationen (*de novo* Mutationen) bei FAP-Patienten mit bis zu 25 %, die *APC*-Mutationsrate mit  $5-9 \times 10^{-6}$  Mutationen pro Gamet und Generation angegeben (Rustin et al. 1990; Bisgaard et al. 1994). Alters- und geschlechtsspezifische Muster der parentalen Herkunft von *de novo* Mutationen wurden für zahlreiche monogene Syndrome mit hoher Neumutationsrate beschrieben (Chandley 1991; Crow 2000); im Jahr 2002 lagen aber noch keine entsprechenden Untersuchungen bei der FAP vor. Die Kenntnis der elterlichen Herkunft von Neumutationen erlaubt Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Entstehungsmechanismus genetischer Veränderungen während der Gametogenese, die systematische Analyse wird allerdings vor allem durch die Notwendigkeit erschwert, zur Bestimmung der Haplotypen Blutproben von drei Generationen der betroffenen Familien zu erhalten. Wir beschlossen, einen Beitrag zur Frage der Häufigkeit, des Mutationsspektrums und der parentalen Herkunft von *de novo* Mutationen im *APC*-Gen zu leisten. Hierzu wurden die Familienanamnesen zahlreicher FAP-Patienten komplettiert und neue Blutproben von betroffenen und nicht betroffenen Familienangehörigen angefordert.

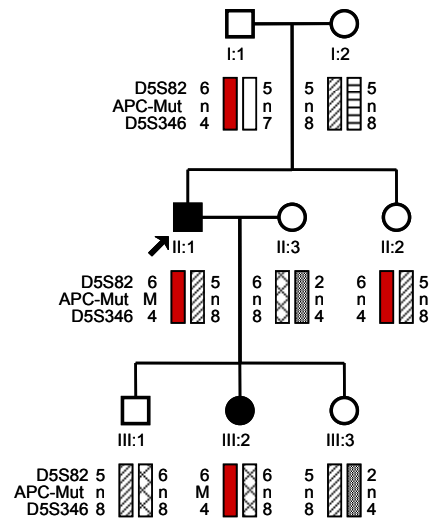
Bei der überwiegenden Mehrheit der *APC*-Keimbahn-Mutationen handelt es sich um über das Gen verstreute seltene („private“) Ereignisse. Eine Ausnahme bilden die 5-Basen-Deletionen c.3927\_3931delAAAGA in Codon 1309 und c.3183\_3187delACAAA in Codon 1061, die wesentlich häufiger auftreten und mit einem schwereren Krankheitsverlauf einhergehen (Caspari et al. 1994; Friedl et al. 2001). Es ist naheliegend zu vermuten, dass die genomische Sequenz im Bereich von Codon 1061 (...ATGAAATAAAACAAAGT...) und 1309 (...GCAGAAATAAAAGAAAAGAT...) durch ungleiches Crossing over bzw. Replikationsfehler während der Keimzellbildung zu diesen Mutationen prädisponiert. Im Widerspruch hierzu scheinen allerdings Berichte über eine sehr unterschiedliche Frequenz der Mutationen in verschiedenen Ländern zu stehen, die eher an Gründer-Ereignisse („Founder-Mutationen“) als an Mutations-Hotspots mit einer hohen Neumutationsrate denken lassen.

Unter 563 nicht-verwandten FAP-Familien mit bekannter Familienanamnese fanden wir 58 Patienten mit wahrscheinlicher Neumutation (10 %). Bei 52 der 58 Fälle lag eine *APC*-Mutation vor (49 Punktmutationen, 3 große Deletionen). Bei 38 dieser Patienten konnte die *APC*-Mutation bei beiden Eltern ausgeschlossen und damit eine Neumutation bewiesen werden. Die Mutation c.3927\_3931delAAAGA wurde in der Gruppe der Patienten mit Neumutation weitaus häufiger nachgewiesen ( $17/58 = 29\%$  bzw.  $17/38 = 45\%$ ) als in der Gruppe der familiären Fälle ( $26/505 = 5\%$ ) (**Abb. 2.1**). Sie segregierte mit unterschiedlichen Haplotypen. Die hohe Frequenz der Mutation in Codon 1309 ist somit nicht durch das Vorliegen einer Gründer-Mutation („founder effect“) sondern durch eine erhöhte Mutationsrate in dieser Gensequenz zu erklären. Die unterschiedliche Häufigkeit der Mutation zwischen familiären und *de novo* Fällen ist am wahrscheinlichsten Folge des höheren Selektionsdruckes auf den schwereren Phänotyp der Mutation (Gayther et al. 1994). Die berichtete hohe Variation in der Häufigkeit der Mutation in Codon 1309 ist vermutlich

darauf zurückzuführen, dass familiäre Fälle eine höhere Wahrscheinlichkeit der Erfassung haben als singuläre Fälle.



**Abb. 2.1** Verteilung von APC-Keimbahn-Mutationen (ohne große Deletionen) über das Gen in 441 der 917 nicht-verwandten FAP-Familien (obere Bildhälfte) im Vergleich zur Verteilung von *de novo* Mutationen bei 49 nicht verwandten FAP-Patienten.



**Abb. 2.2** Haplotype-Analyse einer FAP-Familie mit bestätigter *de novo*-Punktmutation im APC-Gen, die auf dem väterlichen Allel entstanden ist. Es sind nur informative Marker dargestellt; der mutationstragende Haplotype ist rot gefärbt.

Wir konnten die elterliche Herkunft der Neumutationen in 16 der oben erwähnten 38 Familien ermitteln. Hierfür wurden Drei-Generationen-Familien mittels Kopplungsmarkern aus dem Bereich des APC-Gens untersucht (**Abb. 2.2**). Es fand sich insgesamt eine höhere Anzahl von Neumutationen in der väterlichen Keimbahn: In 12 Fällen wurde eine paternale und in 4 Fällen eine maternale Herkunft der Neumutation gefunden. Wir konnten hierbei bei der FAP erstmals geschlechtsabhängige Unterschiede bezüglich der Mutationsart nachweisen: große (zytogenetisch sichtbare) Deletionen sowie Einzelbasen-Substitutionen fanden sich ausschließlich in der väterlichen Keimbahn, während kleine Deletionen und Insertionen ein gleiches Verhältnis zwischen maternaler und paternaler Herkunft der Neumutation (4:4) aufwiesen.

Die Befunde stehen in Einklang mit der Erwartung des bevorzugten Auftretens von Punktmutationen während der Spermatogenese und den Beobachtungen bei anderen Erkrankungen wie der Achondroplasie oder syndromalen Kraniosynostosen, bei denen die krankheitsauslösenden Punktmutationen ausschließlich paternalen Ursprungs sind. Die erhöhte Sensitivität postmeiotischer Stadien der Spermatogenese für Deletionen und Translokationen ist von Mikrodeletions-syndromen und Tiermodellen bekannt. Im Gegensatz hierzu scheinen kleine Deletionen wie die 5-Basenpaar-Deletion in Codon 1309 und kleine Duplikationen als häufigste Mutationstypen bei der FAP meiotischen Ursprungs und damit geschlechtsunabhängig zu sein. In der bis 2004 einzigen diesbezüglichen Publikation bei der FAP wurden keine parentalen Unterschiede festgestellt, da das untersuchte Kollektiv hauptsächlich kleine Frameshift-Mutationen aufwies (Ripa et al. 2002). Ripa et al. zogen aus diesem Befund den (voreiligen) Schluss, dass APC-Keimbahn-Mutationen (ausschließlich) während der meiotischen Zellteilung entstünden.

Die publizierten Daten zum Anteil der Neumutationen bei der FAP und die daraus mit der direkten Methode (Vogel and Motulsky 1997) berechnete APC-Mutationsrate stammen aus den frühen 1990er Jahren und basieren auf der klinischen Einschätzung von betroffenen und nicht-erkrank-

ten Personen. Die von Bisgaard et al. (1994) und Rustin et al. (1990) errechnete Neumutationsrate ist deshalb sicher überschätzt. Die Häufigkeit unbekannter Nicht-Vaterschaften liegt in der Allgemeinbevölkerung westlicher Länder vermutlich in der Größenordnung von etwa 4 % (Bellis et al. 2005) und beeinflusst die Zahlen dann zwar nicht substantiell, relevant dürften aber unvollständig erhobene Familiengeschichten (keine Koloskopiebefunde der Eltern) und Phänekopien sein: ein Teil der sporadischen Fälle ist auf andere genetische Ursachen wie die autosomal-rezessive MAP sowie noch nicht identifizierte autosomal-rezessive oder multifaktorielle Dispositionen zurückzuführen. Darüber hinaus wurde in den früheren Untersuchungen überwiegend nur die klassische FAP (>100 Adenome) berücksichtigt, bei der aufgrund des schwereren Phänotyps von einem höheren Anteil an Neumutationen im Vergleich zur attenuierten FAP auszugehen ist. Umgekehrt wurde die auf der indirekten Methode (Vogel and Motulsky 1997) basierende APC-Mutationsrate vermutlich unterschätzt, da sich die reproduktive Fitness der FAP durch die verbesserte Prognose seit der verbreiteten Anwendung der Kolektomie in den skandinavischen Ländern in den 1940er Jahren erhöhte.

Der in unserem Kollektiv ermittelte Anteil von Neumutationen könnte leicht unterschätzt sein, da Familien mit einer Neumutation leichter einer negativen Auslese unterliegen, d. h. nicht als hereditäre Fälle erkannt und damit nicht in entsprechenden Registern erfasst werden. Weder die Häufigkeit der FAP, noch die APC-Mutationsrate lassen sich anhand der uns vorliegenden Daten berechnen, da in Deutschland keine vollständige populationsbasierte Erfassung von FAP-Familien erfolgt. In Zusammenschau der Daten erscheint ein Anteil von APC-Neumutationen in der Größenordnung von 10-15 % realistisch. Aufgrund unserer Befunde sind trunkierende Einzelbasen-Substitutionen (Stopp-, Spleißmutationen) hierbei überwiegend paternalen Herkunft, sie machen allerdings insgesamt nur etwa 25 % der APC-Keimbahn-Mutationen aus. Der durch Einzelbasen-Substitutionen hervorgerufene geschlechtsspezifische Effekt macht sich aufgrund des hohen Anteils kleiner Deletionen (insbesondere hervorgerufen durch die 5-Basenpaar-Deletion in Codon 1309) somit bei den Neumutationen insgesamt nicht deutlich bemerkbar: kombiniert mit den Fällen von Ripa et al. betrug das Verhältnis 10:16 zugunsten der väterlichen Herkunft.

### **2.1.2 Große genomische Deletionen und Duplikationen im APC-Gen**

(Aretz et al., J Med Genet 2005; Kaufmann et al., J Mol Diag 2009)

Bis vor kurzem war der Nachweis großer submikroskopischer genomischer Deletionen und Duplikationen methodisch schwierig, da dieser Mutationstyp mit den in der Routinediagnostik angewendeten PCR-basierten molekulargenetischen Untersuchungstechniken bei autosomalen Genen nicht sicher festzustellen war. Bis 2005 wurden bei der FAP und anderen monogenen Erkrankungen mittels Haplotyp-Analyse, Fluoreszenz-in-situ-Hybridisation (FISH), Southern-Blot, quantitativer PCR, comparativer genomischer Hybridisierung (CGH) oder durch RNA-Untersuchungen einzelne große Deletionen beschrieben; Ausmaß, quantitative Bedeutung und phänotypische Konsequenzen der Mutationen blieben aber weitgehend unbekannt.

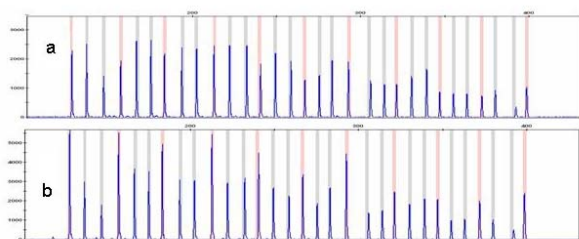
Mit der Entwicklung neuer Techniken zur Semiquantifizierung von multiplex-PCR-Produkten (Wang et al. 2002) und der methodischen Weiterentwicklung in der *multiplex amplification and probe hybridization* (MAPH) (Armour et al. 2000) wurde es erstmals möglich, Gene exonweise und systematisch hinsichtlich Kopienzahlvarianten (große Deletionen und Duplikationen) zu untersuchen. Den Durchbruch erfuhr das Deletions-Screening dann mit der Etablierung der *multiplex ligation dependent probe amplification* (MLPA)-Methode durch die Firma MRC Holland

(Schouten et al. 2002), die sich als einfache, zuverlässige und schnelle Methode für den Einsatz in der Routinediagnostik anbot.

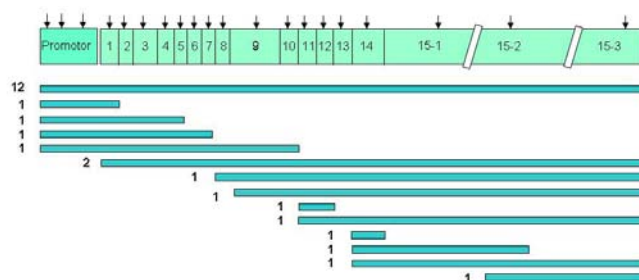
Bis 2005 publizierte Untersuchungen zahlreicher monogener Krankheiten zeigten, dass große Deletionen ganzer Gene oder einzelner Exons einen quantitativ bedeutsamen Mutationstyp darstellen; bei hereditären Tumorsyndromen wie dem erblichen Brust- und Eierstockkrebs oder HNPCC trugen diese Veränderungen mit 10-15 %, beim Peutz-Jeghers-Syndrom sogar mit etwa 30 % zur Mutationslast bei (Petrij-Bosch et al. 1997; Wijnen et al. 1998; Taylor et al. 2003; Wang et al. 2003; Aretz et al. 2005). Durch unsere 2004 durchgeführte Untersuchung an 174 mutationsnegativen, nicht selektierten FAP-Patienten konnten wir die bis dahin umfangreichsten systematisch erhobenen Daten über die Häufigkeit großer Deletionen im *APC*-Gen publizieren und klare Genotyp-Phänotyp-Beziehungen herausarbeiten.

Im Rahmen von Kopplungsanalysen zur prädiktiven Diagnostik bei FAP-Familien fand unsere Arbeitsgruppe schon früher als Zufallsbefund bei vier Familien Hinweise auf das Vorliegen einer großen submikroskopischen *APC*-Deletion (Mandl et al. 1996), bei drei weiteren Patienten bestand eine zytogenetisch sichtbare Deletion. Zur Untersuchung der Häufigkeit von großen Deletionen war zunächst geplant, die Southern-Hybridisierung einzusetzen und eine halbquantitative Multiplex-PCR zu etablieren. Während der Laufzeit des Forschungsprojekts wurde dann die MLPA-Methode eingeführt und wenig später von MRC Holland auch ein Kit für das *APC*-Gen entwickelt.

Der MLPA-Test zum Nachweis von Deletionen im *APC*-Gen wurde in unserem Labor etabliert und anhand der o. g. sieben Patienten mit bereits bekannter Deletion verifiziert. Das Ausmaß der mittels Kopplungsanalyse detektierten Deletion in drei Familien konnte mittels MLPA näher charakterisiert werden. **Abb. 2.3.** zeigt ein Beispiel für ein normales Chromatogramm und ein Chromatogramm bei einem Patienten mit einer Deletion des ganzen *APC*-Gens einschließlich der Promotorregion.



**Abb. 2.3.** Identifizierung einer Deletion des kompletten *APC*-Gens. a) Kontrollprobe, b) FAP-Patient: Die Referenz-Peaks sind rosa unterlegt, alle übrigen Fragmente sind im Vergleich zu den Referenz-Peaks deletiert.



**Abb. 2.4** Mittels MLPA charakterisierte Deletionen im *APC*-Gen bei 26 FAP-Patienten. Bei 12 Patienten ist das ganze Gen deletiert, bei 2 Patienten nur die Exons 1-15 (ohne Promotor-Region). Die Pfeile markieren die Hybridisierungsstellen der MLPA-Sonden.

Anschließend wurden alle 2004 verfügbaren 170 Indexpatienten, bei denen keine Punktmutation im *APC*-Gen identifiziert worden war, mittels MLPA untersucht. Hierdurch fand sich bei weiteren 22 Patienten eine Deletion einzelner Exons oder des ganzen Gens einschließlich der Promoter-Region. Insgesamt bestanden so bei 15 % der nicht-verwandten FAP-Patienten (26/174) 14 unterschiedliche submikroskopische Deletionen (**Abb. 2.4**).

Bei einer mittels MLPA festgestellten Deletion eines einzelnen Exons kann es sich um ein falsch positives Ergebnis handeln, hervorgerufen durch z. B. eine Sequenzvariante in der Hybridisierungssequenz der entsprechenden MLPA-Probe. Derartige Befunde sollten deshalb immer durch eine Sequenzierung des Exons und eine zweite unabhängige Methode überprüft werden (Wehner et al. 2005). Bei einem unserer Patienten fand sich eine isolierte Deletion von Exon 14 bei einer unauffälligen Sequenz des Exons; die Deletion wurde anschließend durch eine Long-Range-PCR bestätigt, sie passt zu den Segregations- und Haplotypdaten der Familie.

Die Analyse des kolorektalen Phänotyps bei Indexpatienten und betroffenen Verwandten ergab eine klare und von Größe und Lokalisation der Deletion weitgehend unabhängige Korrelation dieses Mutationstyps mit einer klassischen FAP: eine Deletion fand sich bei knapp der Hälfte (48 %) der untersuchten Fälle mit zahlreichen (> 100) frühmanifesten Polypen, aber bei keinem der Patienten mit einem attenuierten Verlauf. Ähnliche Befunde wurden von anderen Gruppen publiziert (Bunyan et al. 2004; Michils et al. 2005). Der Nachweis großer Deletionen führte somit zu einem deutlichen Anstieg der Mutationsdetektionsrate bei der klassischen FAP.

Der bei großen Deletionen dominierende klassische kolorektale Phänotyp stimmt mit dem von Punktmutationen in vergleichbarer Position erwarteten Krankheitsverlauf überein; die klinischen Daten beeinflussen deshalb auch die Hypothesenbildung bezüglich des zum Teil immer noch unverständlichen Pathomechanismus von *APC*-Mutationen: weder können die phänotypischen Konsequenzen trunkierender Punktmutationen mit dominant-negativen Mechanismen, noch der milde Verlauf bei Mutationen am 5'Ende des *APC*-Gens mit Null-Allelen erklärt werden.

Im Gegensatz hierzu wurde bisher erst eine einzige Duplikation des *APC*-Gens beschrieben (McCart et al. 2006). Mittels MLPA fanden wir bei zwei anscheinend nicht verwandten Familien mit klassischer FAP eine Verdoppelung der Exons 10-11. Anders als bei Deletionen, die mehrere Exons umfassen, kann die Pathogenität einer Duplikation nicht per se angenommen werden, da die Vervielfältigung kodierender Bereiche nicht mit einer Funktionsbeeinträchtigung des Proteins einhergehen muss und die MLPA-Untersuchung keine Rückschlüsse auf die genomische Position der Duplikation erlaubt. Durch RNA-Analyse konnte die Mutation dann jedoch als korrekt gespleißte Exon-Abfolge 9–10–11–10–11–12 charakterisiert werden, die zu einem vorzeitigen Stopp-Codon führt (Kaufmann et al. 2009).

### **2.1.3 Charakterisierung einer komplexen Mutation im *APC*-Gen**

(Pagenstecher et al., J Mol Diagn 2007)

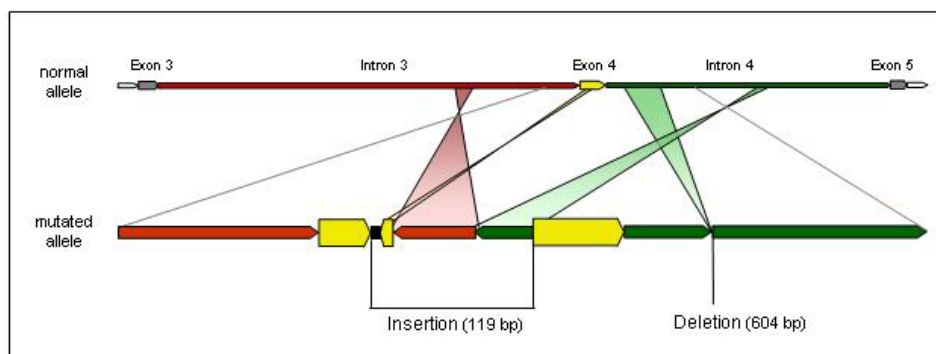
Auch mit allen heute verfügbaren Methoden lässt sich bei etwa 20 % der Indexpatienten mit einer klassischen FAP und 50-70 % der Patienten mit einer attenuierten Verlaufsform keine pathogene Keimbahn-Mutation im *APC*- oder *MUTYH*-Gen identifizieren. Neben Fehl- bzw. Differential-Diagnosen (HNPCC, andere Polyposis-Syndrome), noch unbekanntem Genen und pathogenetisch unklaren *APC*-Varianten tragen hierzu auch kryptische *APC*-Mutationen bei, die mit den üblichen Untersuchungsmethoden nicht entdeckt werden bzw. außerhalb der untersuchten Regionen liegen (z. B. in Intron- oder Promoter-Bereichen). Hierauf deuten sowohl einzelne publizierte Familien mit positiven Kopplungsbefunden in der *APC*-Region wie auch eine verminderte allelspezifische RNA- bzw. Protein-Expression des *APC*-Gens in bis zu einem Drittel der mutationsnegativen Familien hin (Laken et al. 1999; Renkonen et al. 2005).

Auch größere genomische Umbauten in der *APC*-Region stellen eine mögliche Ursache unentdeckter pathogener *APC*-Mutationen dar. Im Jahr 2006 konnten wir eine bei der MLPA-Untersuchung als Zufallsbefund entdeckte Veränderung des *APC*-Gens durch zusätzliche molekular-genetische Untersuchungen einschließlich RNA-Analyse als komplexes genomisches Rearrangement charakterisieren:

Bei der Routine-Untersuchung auf große Deletionen mittels MLPA fand sich bei einer Patientin mit einer attenuierten FAP ein Hinweis auf eine heterozygote Deletion von Exon 4 des *APC*-Gens. Um festzustellen, ob es sich hierbei um eine echte Deletion eines einzelnen Exons oder möglicherweise um eine Punktmutation bzw. genetische Variante im Hybridisierungsbereich der MLPA-Proben handelte, wurden weitere Untersuchungen angeschlossen:

- Die Sequenzierung von Exon 4 ergab nur die normale Wildtyp-Sequenz.
- Mittels Long-range-PCR (Primer in Exon 3 und in Exon 5 gelegen) fand sich ein Hinweis auf eine relativ kleine Deletion. Durch weitere Eingrenzung wurde eine Deletion von 604 Basenpaaren (bp) festgestellt, die allerdings nur in Intron 4 des *APC*-Gens lag und die mittels MLPA identifizierte Exon-„Deletion“ nicht erklären konnte.
- Der Bruchpunkt für die Intron-Deletion lag genau im Bereich des Rückwärtsprimers für Exon 4. Sequenzierungen mit einem neuen Rückwärtsprimer für Exon 4 ergaben eine Insertion von 119 bp in Exon 4, welche genau im Bereich der Hybridisierung der MLPA-Sonde für Exon 4 lag und damit die „Deletion“ dieses Exons vortäuschte. Diese Insertion führt bereits im zweiten Triplet zu einem vorzeitigen Stopp-Codon.
- Die Sequenzierung der cDNA zeigte eine heterozygote Deletion des kompletten vierten Exons.

Die Untersuchungsergebnisse der genomischen DNA und der mRNA beschrieben somit eine komplexe Mutation (**Abb. 2.5**), die letztlich zu einem aberranten Spleißen und damit zu einem Verlust von Exon 4 des *APC*-Gens führte. Die Mutation wurde stabil vererbt: sie lag bei Polyposis-Patienten aus drei Generationen der Familie vor. Der milde kolorektale Verlauf und das Fehlen FAP-typischer Netzhautveränderungen (CHRPE) bei der Index-Patientin stimmen mit der etablierten Genotyp-Phänotyp-Beziehung überein.



**Abb. 2.5** Schematische Darstellung des komplexen genomischen Umbaus im Bereich von Exon 4 des *APC*-Gens. Die Insertion enthält Teile von Exon 4, Intron 3 und Intron 4 jeweils in entgegengesetzter Richtung.

Komplexe genomische Umbauten entstehen vermutlich durch vielfältige Mechanismen, diese sind aber häufig rein hypothetisch und lassen sich wie auch in unserem Fall nur schwer nachweisen. Sowohl ungleiches Crossing-over durch Retrotransposon-vermittelte homologe Rekombina-

tion als auch *replication slippage* werden vermutet, können aber komplexere Rearrangements nicht immer überzeugend erklären. Ein Alu-vermittelter Mechanismus war in unserem Fall unwahrscheinlich, da alle Bruchpunkte außerhalb repetitiver Sequenzen lagen. Auffällig waren allerdings kurze homologe Sequenz-Wiederholungen an den Enden der inserierten Fragmente, die eventuell die Formation komplexer sekundärer genomischer Strukturen wie Schleifenbildungen begünstigten.

Die Mutation war in der Routine-Diagnostik (exonweise PCR-basierte Untersuchung auf Mutationen) nicht aufgefallen, da die Deletion in Intron 4 der Sequenz des Rückwärtsprimers liegt und das mutierte Allel daher nicht amplifiziert werden konnte. Auch mittels MLPA wurde die Veränderung nur durch Zufall entdeckt, da die zusätzliche Insertion im Bereich der Hybridisierungssequenz der MLPA-Sonden für Exon 4 liegt. Dieses Beispiel ist ein weiterer Hinweis dafür, dass bei einem Teil der FAP-Patienten Mutationen im APC-Gen vorliegen dürften, die nur durch den Einsatz eines erweiterten Methodenspektrums erfasst werden können und damit derzeit meist wissenschaftlichen Projekten vorbehalten sind.

#### **2.1.4 Funktionelle Untersuchung unklarer Varianten des APC-Gens**

(Aretz et al., Hum Mutat 2004; Kaufmann et al., J Mol Diagn 2009)

Die Einschätzung der pathogenen Relevanz einer Keimbahn-Variante ist sowohl für die ursächliche Klärung einer monogen erblichen Krankheit wie auch für die genetische Beratung der Familienangehörigen und insbesondere für die verantwortungsbewusste Durchführung einer prädiktiven Diagnostik bei asymptomatischen Verwandten einer betroffenen Person entscheidend. Bestimmte Mutationstypen wie Stopp- und Frameshift-Mutationen, große genomische Deletionen oder Mutationen der hochkonservierten intronischen Spleiß-Sequenzen werden per se als krankheitsverursachend eingestuft, da sie über die vermutete Trunkation eine Verkürzung bzw. einen Ausfall des entsprechenden Proteins bedingen.

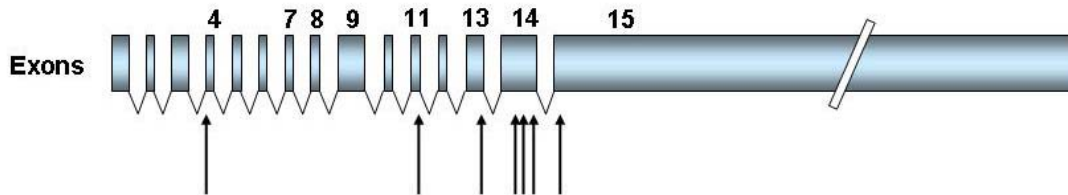
Im Gegensatz dazu ist die funktionelle Bedeutung seltener Basensubstitutionen, die (scheinbar) zu Missense- oder stummen Mutationen führen, von Varianten in gering konservierten Intronsequenzen und von kleinen in-frame-Deletionen meist unklar. Zwar wurden Kriterien für die zu vermutende Pathogenität einer Sequenzvariante entwickelt (*de novo* Mutation, Änderung der Aminosäure-Polarität, Auftreten in einer evolutionär konservierten Sequenz, Fehlen in normalen Kontrollpersonen, Ko-Segregation mit dem Phänotyp, LOH im Tumorgewebe) (Cotton and Scriver 1998); diese Parameter erlauben allerdings keine sichere Beurteilung, wie sie für die Anwendung in der Patientenversorgung zu fordern ist.

Aufgrund des rasch zunehmenden Umfangs der molekulargenetischen Diagnostik wird eine immer größere Zahl dieser funktionell unklaren Varianten (*unclassified variants*, UV) in der Literatur bzw. in zentralen und locus-spezifischen Mutationsdatenbanken beschrieben (Übersicht unter [www.hgvs.org](http://www.hgvs.org)). Durch die sich etablierenden Hochdurchsatz-Sequenzieretechniken („second generation sequencing“) wird diese Zahl in naher Zukunft sicher weiter stark ansteigen. Die Erfassung und funktionelle Klärung von UVs stellt somit eine große wissenschaftliche Herausforderung dar, die inzwischen erkannt wurde und bereits zu ambitionierten internationalen Initiativen wie dem Human Variome Project (HVP) führte ([www.humanvariomeproject.org](http://www.humanvariomeproject.org)).

Bisher wurden bei FAP-Patienten nur wenige Missense- und stumme Mutationen im APC-Gen beschrieben und nur einzelne dieser Varianten funktionell untersucht (HGMD; [www.hgmd.org](http://www.hgmd.org)).

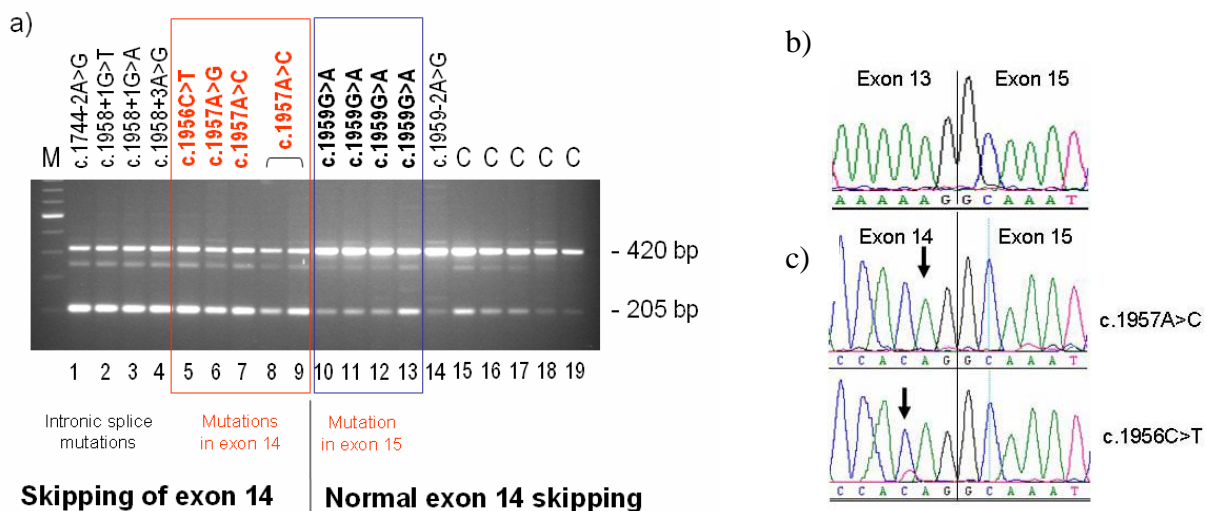


Aufgrund der großen Zahl uns bekannter FAP-Familien und einer intensiven Rekrutierungsarbeit gelang es unserer Arbeitsgruppe während der letzten fünf Jahre, die Konsequenzen von 15 verschiedenen seltenen heterozygoten Basensubstitutionen im kodierenden Bereich des *APC*-Gens oder in wenig konservierten intronischen Spleißpositionen sowie eine große genomische Duplikation mittels Transkriptanalyse funktionell zu charakterisieren (**Tab. 2.1**). Wir verglichen hierbei die mRNA dieser Patienten mit der von Patienten mit Mutationen in hochkonservierten Spleißsequenzen. Hierfür mussten neue Blutproben angefordert werden, die in speziellen, RNA-Stabilisator enthaltenden Röhrchen verschickt wurden.



**Abb. 2.6** Schematische Darstellung des *APC*-Gens. Die Pfeile markieren die Lage der identifizierten scheinbaren Missense- oder stummen Mutationen in Exon 4, 11, 13, 14 und 15A.

Wir führten 2003 die erste systematische Untersuchung der Konsequenz von Missense- und stummen Mutationen sowie von Spleißmutationen im *APC*-Gen auf Transkript-Ebene durch. Bei 12 Patienten fanden wir insgesamt sieben verschiedene seltene Einzelbasen-Substitutionen in der kodierenden Sequenz, die alle in der Nähe der Exongrenzen lagen (**Abb. 2.6**). Mittels RT-PCR konnte nachgewiesen werden, dass 6 der 7 Basensubstitutionen zum vollständigen Herauspleißen eines Exons führten; der Effekt war mit dem von Mutationen in den hochkonservierten intronischen AG/GT-Spleißsequenzen vergleichbar (**Abb. 2.7**). Die Mutationen führen somit nicht zu der prognostizierten veränderten Aminosäuresequenz, sondern zu einem veränderten Spleißen mit nachfolgender Bildung eines vorzeitigen Stopp-Codons.



**Abb. 2.7** Untersuchung der cDNA von Patienten mit verschiedenen Mutationen in Spleißsequenzen und am Ende von Exon 14 oder am Anfang von Exon 15 des *APC*-Gens. a) Auftrennung von RT-PCR-Produkten auf Agarosegel. b) Sequenzierung des 205 bp Produkts, in dem Exon 14 deletiert ist. c) In dem normalen Fragment ist nur das Allel mit der Wildtyp-Sequenz (c.1957A) bzw. nur ein geringfügiger Anteil des mutierten Alleles (c.1956T) enthalten.

Die Befunde wichen zum Teil deutlich von dem Spleißverhalten ab, welches von dem auf traditionellen Spleißsequenzen beruhenden Programm BDGP vorhergesagt wurde. Dies lässt sich auf die intronnahe Position der involvierten Nukleotide zurückführen, die in Bindungsstellen für wichtige exonische Spleißfaktoren (*exonic splicing enhancers*, ESE) liegen. Durch Veränderung der Bindungsstellen wird der Spleißvorgang erheblich beeinträchtigt. Auch die Basensubstitutionen an wenig konservierten intronischen Spleißpositionen führten zum Verlust eines Exons oder zu aberranten Transkripten mit vorzeitigem Abbruch der Proteinsynthese. Der klinische Verlauf der Erkrankung bei Patienten mit den in Tab. 2.1 charakterisierten Varianten ist vergleichbar mit dem von Patienten mit „echten“ Spleißmutationen in den entsprechenden Exons.

**Tabelle 2.1** Charakterisierung seltener APC-Varianten durch Transkript-Analyse

Position	Mutation	vorhergesagte Konsequenz	Einfluß auf normale Spleißeffizienz*	tatsächlicher Effekt (RNA)	kolorektaler Phänotyp
Exon 4	c.423G>T	p.Arg141Ser	nicht erkannt	Deletion Exon 4	attenuiert
Exon 11	c.1548G>A	p.Lys516	1,00 → 0,84	Deletion Exon 11	klassisch
Exon 13	c.1742A>G	p.Lys581Arg	0,92 → 0,78	Deletion Exon 13 (partiell)	attenuiert
Exon 14	c.1956C>T	p.His652	0,91 → 0,90	Deletion Exon 14 (partiell)	klassisch
Exon 14	c.1957A>G	p.Arg653Gly	0,91 → 0,38	Deletion Exon 14	klassisch
Exon 14	c.1957A>C	p.Arg653	0,91 → 0,42	Deletion Exon 14	variabel
Exon 15A	c.1959G>A	p.Arg653	0,81 → 0,72	Kein Effekt	variabel
Intron 3	c.423-5A>G	aberrantes Spleißen	nicht erkannt	Deletion Exon 4	variabel
Intron 4	c.531+5G>C	aberrantes Spleißen	0,98 → 0,25	Deletion Exon 4	attenuiert
Intron 4	c.531+5_531+8 delGTAA	aberrantes Spleißen	0,98 → 0,15	Deletion Exon 4	attenuiert
Intron 4	c.532-8G>A	aberrantes Spleißen	0,45 → <0,01	vorzeitiger Stopp	klassisch
Intron 9	c.1312+3A>G	aberrantes Spleißen	0,94 → 0,40	Deletion Exon 9	attenuiert
Intron 9	c.1312+5G>A	aberrantes Spleißen	0,94 → 0,07	Deletion Exon 9	klassisch
Intron 10	c.1409-2_1409 delAGG	aberrantes Spleißen	Spleißakzeptorstelle zerstört	Aktivierung von zwei kryptischen Spleißstellen	attenuiert
Intron 14	c.1958+3A>G	aberrantes Spleißen	0,91 → 0,47	Deletion Exon 14	klassisch

\* Die Spleißeffizienz der normalen und der mutierten Sequenzen wurde mit dem Programm BDGP geschätzt

Die Ergebnisse unserer Transkript-Analyse legen in Zusammenschau mit anderen publizierten Daten (Azzopardi et al. 2008) die Vermutung nahe, dass der überwiegenden Mehrheit seltener, bei Polyposis-Patienten identifizierter Basensubstitutionen im APC-Gen pathogene Relevanz zukommt. Auch wenn eine Erfassungs- und Publikations-Auslese nicht vollständig auszuschließen ist, stimmt diese Tendenz mit kürzlich vorgestellten Analysen systematischer Daten zur genetischen Variation des Menschen überein (Kryukov et al. 2007; Boyko et al. 2008). Der Nachweis von auch auf Transkriptebene stummen Varianten sowie die Diskrepanzen zu der In-silico-Analyse verdeutlichen allerdings die Notwendigkeit einer funktionellen Klärung jeder unklaren Variante, insbesondere wenn diese für eine prädiktive Diagnostik herangezogen werden soll.

## 2.1.5 Ausmaß und Bedeutung von Mutations-Mosaiken bei der FAP

(Aretz et al., Hum Mutat 2007)

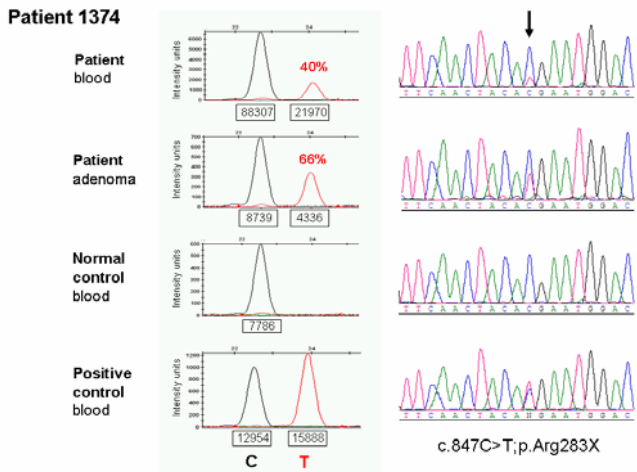
Die Identifizierung und Beurteilung somatischer Mutations-Mosaiken (mit und ohne Beteiligung der Keimbahn) stellt eine Herausforderung sowohl für die genetische wie klinische Diagnostik dar. Somatische Mosaiken wurden insbesondere bei sporadischen Fällen monogener Krankheiten mit einer hohen Neumutationsrate wie der Hämophilie, der Duchenne'schen Muskeldystrophie und auch verschiedenen hereditären Tumordispositions-Syndromen in quantitativ relevantem Ausmaß beschrieben, was ihre praktische Bedeutung zunehmend erkennen läßt (Hall 1988; Yousoufian and Pyeritz 2002; Erickson 2003). Obwohl die geschätzte Neumutationsrate des APC-Gens mit  $5-9 \times 10^{-6}$  Mutationen pro Gamet pro Generation das häufige Vorkommen postzygotischer *de novo*-Mutationen wahrscheinlich macht, wurden bei der FAP bis 2007 keine diesbezüglichen systematischen Untersuchungen publiziert.

Bei 8 unserer insgesamt 1248 auf APC-Mutationen untersuchten, nicht-verwandten FAP-Patienten (Stand Oktober 2006) deuteten die Befunde der Screening-Untersuchungen (DHPLC, PTT) auf das Vorliegen einer Mutation in Form eines somatischen Mosaiks. Die Sequenzierung der entsprechenden APC-Fragmente zeigte sehr geringe Anteile eines mutierten Allels, die ohne die Screeningbefunde leicht übersehen worden wären. Vermutete APC-Mosaiken wurden deshalb mit verschiedenen Methoden gezielt untersucht.

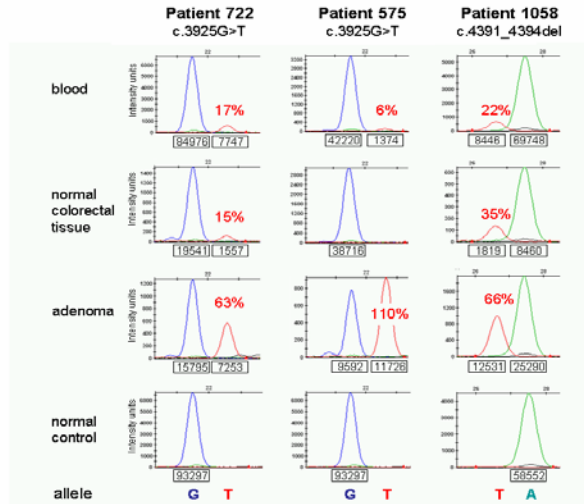
Hierfür nahmen wir zu allen Patienten mit Verdacht auf ein Mosaik Kontakt auf und forderten eine zweite EDTA-Blutprobe an. Von 6 Patienten konnte paraffineingebettetes kolorektales Adenomgewebe, von 3 dieser Patienten auch normale Kolon-Schleimhaut und von einem weiteren Patienten Mundschleimhaut akquiriert werden. Alle 8 Mutationen konnten in der zweiten Blutprobe bestätigt werden. Eine ungleiche Allel-Amplifikation aufgrund z. B. einer Variante in der Primer-Sequenz konnte durch Sequenzierung eines zweiten PCR-Produktes mit anderen Primern ausgeschlossen werden. Darüber hinaus ließen sich die Mutationen bei allen untersuchten Patienten in der DNA aus Adenomen und normaler Kolonschleimhaut nachweisen. Bei einem Patienten fanden wir das schwache Mosaik auch in der Wangenschleimhaut, erwartungsgemäß aber nicht bei beiden Eltern. Bei zwei Patienten waren früher bereits zusätzliche Methoden (allel-spezifische PCR, Untersuchung neuer Restriktionsstellen) zur Verifizierung der Mutationsbefunde eingesetzt worden.

Wir etablierten in unserem Labor die SNaPshot-Methode (ABI Prism® SNaPshot™ Multiplex Kit, Applied Biosystems), welche herkömmlichen Verfahren zur Quantifizierung des Mosaikgrades wie der zeitaufwändigen und teuren Sequenzierung großer Mengen von klonierten PCR-Produkten überlegen ist. Es handelt sich um eine Primer-Extensions-Technik, bei der die Menge der mutierten und der Wildtyp-DNA sowohl graphisch in einem Chromatogramm als auch über Höhe oder Fläche der Amplituden berechnet werden kann. Der Grad des Mosaiks wurde als Prozentsatz mutierter DNA eines Allels ausgedrückt.

Um die Präzision der SNaPshot-Methode zu überprüfen, wurde ein Verdünnungs-Experiment mit absteigenden Konzentrationen von Leukozyten-DNA mit einer Vollmutation durchgeführt. Die berechneten Werte des mutierten Allels (T) stimmten bis zu einer Menge von 5 % der Gesamt-DNA gut mit den erwarteten Werten überein und waren bis zum 1 %-Niveau noch in den Chromatogrammen sichtbar. Bei der SNaPshot-Quantifizierung der somatischen Mosaiken in Blut und Adenomgewebe im Vergleich zu Normalkontrollen und der gleichen Mutation als Nicht-Mosaik wurde insgesamt eine gute Übereinstimmung der Amplitudenhöhe mit dem Sequenziermuster festgestellt (**Abb. 2.8**).



**Abb. 2.8** SNaPshot- und Sequenzier-Ergebnisse der DNA aus Leukozyten und Adenomgewebe von Patient 1374, verglichen mit einer normalen Kontrolle und mit einem Patienten, der die gleiche APC-Mutation als Vollmutation trägt. Die eingerahmten Zahlen entsprechen den Flächen unter den Peaks.



**Abb. 2.9** SNaPshot-Chromatogramme von DNA-Proben verschiedener Gewebe bei drei der acht Patienten mit einem somatischen APC-Mosaik. Die Prozentzahlen in den Diagrammen geben den Grad des Mosaik bezogen auf das mutierte Allel an.

Die Quantifizierung der Mutationen in verschiedenen Geweben mittels SNaPshot-Analyse ergab eine große Variation des Mosaikgrades in Leukozyten-DNA zwischen den 8 Patienten (6-75 %) und als konsistenten Befund einen deutlich höheren Anteil der mutierten DNA in Adenomen verglichen mit dem Anteil in Blut und normaler Kolonschleimhaut (**Abb. 2.9**). Bei Patient 575 ließ sich kein mutiertes Allel in normaler Kolonschleimhaut nachweisen. Es bestand keine Korrelation zwischen dem Mosaikgrad in Blut und anderen Geweben.

Die Mehrheit der 8 Patienten hatte einen attenuierten (4/8) oder atypischen (2/8) kolorektalen Phänotyp (Definitionen siehe Kapitel 1.2.1) (**Tab. 2.2**), obwohl aufgrund der Lage der Mutation im APC-Gen ein klassischer oder sogar schwerer Verlauf zu erwarten gewesen wäre. Bei einigen Patienten war auch der obere Gastrointestinaltrakt involviert; extraintestinale Manifestationen wurden bei keinem der Patienten berichtet. Erwartungsgemäß bestand keine Korrelation zwischen dem Mosaikgrad in Leukozyten-DNA und der Schwere der kolorektalen Polyposis.

**Tabelle 2.2** Klinische Befunde der 8 Polyposis-Patienten mit einem somatischen APC-Mosaik

Mutation (Exon)	Alter bei Diagnose	kolorektale Adenome	CRC bei Diagnose	Duodenale Adenome	Phänotyp
6	50	>50	nein	nein	attenuiert
8	37	<100	nein	multiple	attenuiert
15A	26	50	nein	4	attenuiert
15E	49	<100	nein	multiple	attenuiert
15F	37	>100	nein	nein	atypisch
15G	41	viele	nein	1	atypisch
15G	14	>100	nein	nein	klassisch
15H	21	>200	ja	unbekannt	klassisch

Alle 8 Fälle mit nachgewiesenem somatischem APC-Mosaik gehörten zu den 75 Polyposis-Patienten mit nachgewiesener oder vermuteter Neumutation. Die Häufigkeit eines APC-Mosaiks bei unseren FAP-Neumutationen liegt somit bei etwa 11 %. Ähnliche Zahlen wurden bei anderen

monogen erblichen Erkrankungen und kürzlich auch von einer niederländischen Arbeitsgruppe bei der FAP berichtet (Hes et al. 2008).

Es handelt sich um die erste publizierte systematische Untersuchung zur Häufigkeit und zum Phänotyp von somatischen *APC*-Mosaiken bei Polyposis-Patienten. Zusammenfassend konnte unsere Studie zeigen, dass somatische *APC*-Mosaik eine für die Routinediagnostik relevante Gruppe darstellen. Ein niedriggradiges somatisches Mosaik kann leicht übersehen oder falsch interpretiert werden. Auffällige Ergebnisse sollten immer kritisch überprüft bzw. mit anderen Methoden bestätigt werden. Screening-Methoden wie DHPLC und PTT sind sensitiver in der Identifizierung von somatischen Mosaiken als die direkte Sequenzierung. Die SNaPshot-Analyse eignet sich als günstiges, einfaches und zuverlässiges Verfahren zur Bestätigung und Quantifizierung fraglicher Mosaik. Bei einigen mutationsnegativen Patienten könnte ein auf das Entoderm beschränktes und deshalb durch eine Blutuntersuchung nicht zu entdeckendes Mosaik vorliegen.

Somatische Mosaik tragen zur phänotypischen Variabilität der FAP bei und erklären insbesondere einen Teil unerwartet milder Verläufe. Die Identifizierung eines somatischen Mosaiks hat Bedeutung für die klinische Betreuung der Familien: Kinder eines Mosaik-Patienten können einen schwereren klinischen Verlauf mit früherer Manifestation entwickeln, was Einfluss auf den Beginn der Vorsorge-Untersuchungen hat; andererseits sollten die Eltern eines Patienten mit vermeintlicher Neumutation klinisch gründlich untersucht werden, da ein milder Phänotyp aufgrund eines somatischen Mosaiks andernfalls möglicherweise übersehen wird.

### **2.1.6 *APC*-assoziiertes Hepatoblastom**

(Aretz et al., *Pediatr Blood Cancer* 2006)

Neben der Dickdarmspiegelung sind die endoskopische Überwachung des oberen Magen-darmtraktes und die adäquate Behandlung von Desmoiden für die Prognose von FAP-Patienten entscheidend und unumstritten. Bei den FAP-assoziierten extraintestinalen Malignomen wie Hepatoblastom, Medulloblastom und Schilddrüsenkarzinom werden Früherkennungs-Untersuchungen aufgrund der geringen Inzidenz (1-2%) hingegen kontrovers diskutiert.

Das Hepatoblastom (HB) ist ein frühmanifestierender bösartiger embryonaler Lebertumor, der bei Kindern von FAP-Patienten wesentlich häufiger als in der Allgemeinbevölkerung auftritt und trotz einer inzwischen deutlich verbesserten Therapie immer noch von etwa einem Viertel der Patienten nicht überlebt wird. Da das Thema in der Literatur nicht adäquat diskutiert wurde, nahmen wir die Kenntnis von mehreren fortgeschrittenen HB-Fällen im eigenen Patientenkollektiv zum Anlass, unsere diesbezüglichen Daten zusammenzufassen und die wenigen Publikationen um eine abwägende ausführliche Gegenüberstellung der Vor- und Nachteile eines frühkindlichen HB-Screenings zu ergänzen, wie sie sich paradigmatisch auch beim Screening-Programm für embryonale Tumoren des Beckwith-Wiedemann-Syndroms (BWS) zeigen.

In Anlehnung an die bisherigen Erfahrungen mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom kann eine effiziente Früherkennung des HB nur durch unmittelbar postnatal beginnende regelmäßige Ultraschall-Untersuchungen in Kombination mit einem Monitoring der  $\alpha$ -Fetoprotein-Spiegel in etwa 2-3-monatigen Abständen erwartet werden. Den Vorteilen einer früheren Diagnose mit potentiell verbesserter Prognose und geringeren therapiebedingten Nebenwirkungen stehen allerdings die Gefahren der Überdiagnose, der psychischen und körperlichen Belastung durch häufige bildgebende und invasive Untersuchungen im Kleinkindesalter, die größtenteils unnötige Verunsiche-

rung der Eltern und die Vorverlegung der prädiktiven genetischen Testung in das Neugeborenenalter gegenüber.

Durch die Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Professor Torsten Pietsch, dem Direktor des Instituts für Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn, gelang es uns, die initiale Fragestellung um einen interessanten Aspekt zu ergänzen:

Die Arbeitsgruppe hat Zugriff auf ein großes Kollektiv sporadischer HB-Fälle. In gesundem Gewebe (Blut, normales Lebergewebe) von 50 klinisch und familienanamnestisch ausreichend charakterisierten Fällen führten wir ein komplettes Mutations-Screening im *APC*-Gen durch und konnten bei 5 Patienten (10 %) eine pathogene Keimbahnmutation identifizieren. Diese erstmals systematisch an einer großen Fallzahl erhobenen Daten ließen vermuten, dass es sich bei einem nennenswerten Anteil scheinbar sporadischer HB tatsächlich um die frühe Manifestation einer FAP auf dem Boden einer *APC*-Neumutation handelt. Unerkannt werden diese Patienten nach erfolgreich therapiertem HB später wahrscheinlich erst im symptomatischen Stadium der FAP mit fortgeschrittener Polyposis oder sogar einem manifestem CRC auffällig. Ein Routine-*APC*-Screening jedes sporadischen HB-Falles könnte hier Abhilfe schaffen; durch die bei unseren FAP-assoziierten HB festgestellte sehr hohe Mutationsdetektionsrate sollten hierdurch die meisten hereditären Fälle sicher identifiziert werden, um sie einer späteren gastrointestinalen Vorsorge zuzuführen. Eine neulich publizierte Studie an 29 ebenfalls sporadischen HB konnte unsere Ergebnisse nicht bestätigen (Harvey et al. 2008), allerdings war der Unterschied bei der Größe der untersuchten Kollektive nicht signifikant. Die klinische Relevanz von *APC*-Keimbahnmutationen bei sporadischen HB ist somit bisher nicht abschließend geklärt, aufgrund der recht hohen *APC*-Neumutationsrate muss aber unter sporadischen HB ein gewisser Anteil von *APC*-assoziierten Tumoren erwartet werden.

## 2.2 *MUTYH*-assoziierte Polyposis (MAP)

Inzidenz, Mutationsspektrum und kolorektaler Phänotyp der MAP wurden in den vergangenen sieben Jahren in verschiedenen Patientengruppen (FAP, HNPCC, sporadisches CRC) umfassend charakterisiert (Sampson et al. 2003; Fleischmann et al. 2004; Gismondi et al. 2004; Isidro et al. 2004; Venesio et al. 2004; Wang et al. 2004; Eliason et al. 2005; Nielsen et al. 2005; Kanter-Smoler et al. 2006). Hierzu leistete auch unsere Untersuchung am international bisher größten Kollektiv einen wichtigen Beitrag (Aretz et al. 2006b, siehe **Kapitel 2.2.1**).

Einige klinisch relevante Aspekte des Tumordispositions-Syndroms wurden bis zum Jahr 2009 jedoch nicht hinreichend untersucht bzw. nicht abschließend geklärt: So existierten keine systematischen Untersuchungen zu Spektrum und Inzidenz extrakolonischer Tumoren bei MAP-Patienten und zum Darmkrebsrisiko von heterozygoten *MUTYH*-Anlageträgern („Heterozygotenrisiko“). Auch die biologischen Eigenschaften des MAP-assoziierten CRC sind erst ansatzweise erforscht.

Die verlässliche Beantwortung der oben genannten Fragen ist nur durch Untersuchung vieler MAP-Patienten bzw. heterozygoter Anlageträger möglich. Zur Gewinnung belastbarer Daten wurde deshalb eine Kooperation mit den Arbeitsgruppen von Professor Julian Sampson (Institute of Medical Genetics, Cardiff, England) und Dr. Frederik Hes (Center for Human and Clinical Genetics, Leiden, Niederlande) initiiert, die zu den führenden Gruppen auf diesem Gebiet gehören und ebenfalls Zugriff auf größere Patientengruppen haben.

Das europäische Kooperationsprojekt sollte folgende Fragen beantworten:

- **Extrakolonisches Tumorspektrum bei der MAP**  
(Federführung Aretz, Bonn)
- **CRC-Risiko bei heterozygoten *MUTYH*-Mutationsträgern**  
(Federführung Sampson, Cardiff)
- **Überleben von Patienten nach einem *MUTYH*-assoziierten CRC**  
(Federführung Hes, Leiden)
- **Genotyp-Phänotyp-Beziehungen**

Entsprechend dem gemeinsam erarbeiteten Studienprotokoll wurden nach Erstellung entsprechender Formulare alle den drei Zentren bekannten MAP-Indexpatienten und betroffenen Geschwister direkt oder über die einsendenden Ärzte kontaktiert. Die möglichst umfassende Rekrutierung erforderte zeitaufwändige Erinnerungsschreiben und das Recherchieren aktueller Adressen. Nach Erhalt des schriftlichen Einverständnisses wurden alle teilnehmenden Patienten aus Deutschland und ein großer Teil der niederländischen Patienten in einem längeren persönlichen Telefongespräch anhand eines strukturierten Fragebogens ausführlich zu Krankheitsverlauf, möglichen extrakolonischen Tumormanifestationen und dem Gesundheitszustand der Eltern befragt. Die relevanten klinischen Befunde wurden anschließend bei den betreuenden Ärzten bzw. Krankenhäusern und Pathologischen Instituten angefordert und ausgewertet. Bedingt durch unterschiedliche Gesundheitssysteme und unterschiedliche Zugriffsmöglichkeiten auf Patientendaten bzw. Möglichkeiten der direkten Kontaktaufnahme unterschied sich das Vorgehen zwischen den Zentren in einigen Punkten.

Die Datensammlung wurde im Frühjahr 2008 abgeschlossen. In die Studie konnten insgesamt 276 MAP-Fälle (bialele Mutationsträger) und 350 Eltern (obligat heterozygote Anlageträger) aufgenommen werden. Es handelt sich damit um die mit Abstand größte bisher untersuchte Gruppe von Patienten und heterozygoten Anlageträgern; das Bonner Teilkollektiv ist dabei das hinsichtlich Umfang (98 MAP-Patienten) und klinischen Befunden qualitativ hochwertigste. Der Nachweis einer signifikanten Genotyp-Phänotyp-Korrelation bezüglich der Erstmanifestation der Erkrankung und die Ergebnisse des Heterozygotenrisikos wurden inzwischen publiziert (Nielsen et al. 2009, Jones et al. 2009; siehe Einleitung). Auch die Auswertung der Inzidenz extrakolonischer Tumore konnte kürzlich hochrangig veröffentlicht werden (Vogt et al. 2009; siehe **Kapitel 2.2.2**).

### **2.2.1 Mutationsspektrum und kolorektaler Phänotyp der MAP**

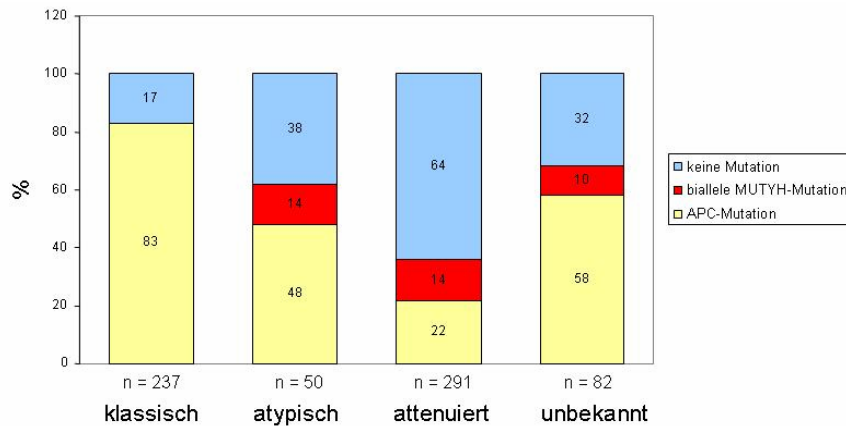
(Aretz et al.; Int J Cancer 2006)

Nach der 2002 erfolgten Identifizierung der *MUTYH*-assoziierte Polyposis (MAP) als eigenständiges, autosomal-rezessives Krankheitsbild (Al-Tassan et al. 2002) lag es nahe, an unserem großen Polyposiskollektiv retrospektiv eine systematische Untersuchung durchzuführen, um die Häufigkeit der MAP bei Patienten mit adenomatöser Polyposis, das Mutationsspektrum und den dominierenden Phänotyp zu ermitteln. Hierzu etablierten wir die molekulargenetische Diagnostik des *MUTYH*-Gens mittels direkter Sequenzierung aller 16 Exons in unserem Labor.

Bis zum Zeitpunkt der Auswertung der Daten für die oben genannte Publikation (Oktober 2005) konnten wir 660 von insgesamt 1170 nicht verwandten FAP-Indexpatienten komplett mittels PTT und DHPLC auf Punktmutationen im *APC*-Gen und mittels MLPA hinsichtlich großer genomischer Deletionen/Duplikationen im *APC*-Gen untersuchen. Eine pathogene *APC*-Keimbahnmutation ließ



sich bei 331 der 660 Patienten nachweisen. Die Mutationsdetektionsrate im *APC*-Gen betrug somit im Gesamtkollektiv 50 %, zeigte aber erwartungsgemäß große Unterschiede hinsichtlich des kolorektalen Phänotyps: bei Patienten mit klassischer FAP betrug sie 83 %, bei der attenuierten FAP nur 22 % (**Abb. 2.10**).



**Abb. 2.10** Mutationsdetektionsrate in den Genen *APC* und *MUTYH* bei 660 nicht verwandten Polyposis-Patienten bezogen auf den kolorektalen Phänotyp.

Um die Häufigkeit der *MUTYH*-assoziierten Polyposis (MAP) zu ermitteln, wurden die verbliebenen unselektierten 329 *APC*-mutationsnegativen FAP-Indexpatienten anschließend auf *MUTYH*-Keimbahnmutationen untersucht. Die wesentlichen Befunde lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Bei 17 % (55/329) der nicht nach Familienanamnese oder Phänotyp selektierten Indexpatienten fanden sich bialele *MUTYH*-Mutationen. Das Mutationsspektrum in unserem Kollektiv war breit und umfasste 21 verschiedene *MUTYH*-Mutationen, sieben davon wurden von uns erstmalig beschrieben.

Es ließ sich eine klare Abhängigkeit der Mutationsdetektionsrate vom kolorektalen Phänotyp nachweisen: eine MAP bestand bei 18 % (40/227) der attenuierten Fälle und bei 27 % (7/26) der atypischen Fälle, aber bei keinem der 41 Patienten mit eindeutig klassischer Polyposis (frühmanifest, >100 Adenome). Durch ein *MUTYH*-Mutations-Screening wird die Mutationsdetektionsrate bei Patienten mit attenuierter oder atypischer adenomatöser Polyposis somit deutlich gesteigert (**Abb. 2.10**).

Monoallele *MUTYH*-Mutationen mit zu vermutender pathogener Relevanz wurden nur bei 0,9 % (3/329) der Patienten identifiziert. Die Heterozygoten-Frequenz bei unseren Polyposis-Patienten entsprach somit der in der Allgemeinbevölkerung. Dies unterstützt die Hypothese, dass heterozygote *MUTYH*-Mutationen keinen nennenswerten Krankheitswert haben und lässt außerdem vermuten, dass die Mutationsdetektionsrate bei der kompletten Sequenzierung des Gens sehr hoch ist. Große Deletionen scheinen demnach im Gegensatz zum Tumorsuppressor-Gen *APC* keine nennenswerte Rolle zu spielen.

Bei 48 % der MAP-Patienten fanden sich die Mutationen Y165C und G382D in homozygotem oder compound-heterozygotem Zustand, bei 31 % der Patienten mit bialleler Mutation bestand hingegen nur eine und bei 20 % keine der beiden in der kaukasischen Bevölkerung häufigen Mutationen. Durch ein Mutations-Screening, das sich primär auf den Nachweis von Y165C und G382D beschränkt und eine komplette Sequenzierung des *MUTYH*-Gens nur beim Vorliegen



einer der beiden häufigen Mutationen in heterozygotem Zustand anschließt, wäre somit bei etwa 1/5 der Patienten keine MAP diagnostiziert worden.

Zur Beschreibung des Mutationsspektrums wurden noch 9 weitere selektierte Indexpatienten und zur klinischen Charakterisierung der MAP weitere 7 erkrankte Verwandte von Indexpatienten in die Analyse eingeschlossen (insgesamt dann 71 Patienten). Fast alle Patienten zeigten einen attenuierten (80 %) oder atypischen (18 %) kolorektalen Phänotyp (Abb. 2.10).

Der Phänotyp der Patienten ist in **Tab. 2.3** zusammengefasst. Aufgrund des häufig sporadischen Auftretens wurde die Diagnose bei der überwiegenden Mehrheit unserer Patienten in symptomatischem Zustand gestellt. Die hohe Inzidenz des CRC bei Diagnose ist vergleichbar der in symptomatischem Stadium diagnostizierten APC-assoziierten FAP.

**Tabelle 2.3** Phänotyp von 64 MAP-Indexpatienten und 7 betroffenen Verwandten

Phänotyp	Häufigkeit
bei Diagnose symptomatisch	87 %
kolorektaler Phänotyp	attenuiert oder atypisch
mittleres Alter bei Diagnose in Jahren (Spannbreite)	45 (24 – 72)
kolorektale Adenomzahl	20 bis mehrere Hundert
proximale Adenom-Verteilung	40 %
CRC bei Diagnose	50 %
jüngstes Alter bei Diagnose eines CRC (Jahre)	29
fortgeschrittenes CRC-Stadium (T3, T4)	81 %
duodenale Adenome	24 %
extraintestinale Manifestation	6 %
Familienanamnese	31 x aut-rez, 7 x pseudo-dominant

Bezogen auf die Anzahl kolorektaler Adenome (15-100 versus  $\geq 100$ ) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der Inzidenz bialleler Mutationen (**Tab. 2.4**). Bei Patienten mit weniger als 15 Adenomen traten hingegen in Übereinstimmung mit der Literatur keine biallelen Mutationen auf. Auffällig ist, dass auch bei Patienten mit  $\geq 100$  Adenomen ein deutlich fortgeschrittenes Alter bei Diagnosestellung bestand. Auf der Basis dieser Daten sollte deshalb die häufig publizierte hohe Inzidenz klassischer bzw. typischer Verläufe bei MAP-Patienten, der meist lediglich die Polypenzahl ( $\geq 100$ ) als klassifizierendes Kriterium zugrunde liegt, revidiert werden: wie bei der attenuierten FAP findet sich bei MAP-Patienten mit einer hohen Adenomzahl ein im Vergleich zur klassischen FAP deutlich späteres Alter bei Diagnose und eine häufig proximal betonte Adenomverteilung. Das charakteristischste Zeichen der MAP scheint somit der eher spät einsetzende Krankheitsverlauf und weniger die Zahl kolorektaler Adenome zu sein.

**Tabelle 2.4** Häufigkeit bialleler *MUTYH*-Mutationen bezogen auf die Anzahl kolorektaler Adenome bei 329 nicht verwandten Patienten

Polypenzahl	untersuchte Patienten		identifizierte MAP-Patienten	
	Zahl der Patienten	mittleres Alter bei Diagnose (Jahre)	Zahl der Patienten	mittleres Alter bei Diagnose (Jahre)
1-15	30	46 (17-66)	0	
>15-100	85	45 (5-76)	17 (20 %)	43 (30-60)
>100	55	45 (11-71)	8 (15 %)	50 (35-68)
multiple	75	44 (12-65)	13 (17 %)	45 (24-63)
unbekannt	84	43 (14-55)	17 (20 %)	48 (39-55)

Das Erkrankungsrisiko der Kinder von MAP-Patienten ist im Gegensatz zur FAP gering (etwa 0,5-1 %), soweit keine konsanguinen Partnerschaften bestehen. Intensivierte Früherkennungs-Untersuchungen sollten deshalb bei klinisch Betroffenen, asymptomatischen biallelen Mutationsträgern und bei Geschwistern von Indexpatienten, die sich nicht prädiktiv testen lassen wollen, durchgeführt werden. Auf der Basis unserer Daten können sich Beginn und Umfang der Vorsorge sowie der Zeitpunkt einer prädiktiven Testung an der attenuierten FAP orientieren.

Zusammenfassend leistete unsere molekulargenetische und klinische Untersuchung am größten publizierten MAP-Kollektiv einen Beitrag sowohl zur Klärung der Inzidenz bialleler *MUTYH*-Mutationsträger bei verschiedenen kolorektalen Phänotypen, des Mutationsspektrums und der Relevanz heterozygoter *MUTYH*-Mutationen, wie auch zur detaillierten Beschreibung der klinischen Ausprägung und den daraus resultierenden Früherkennungs-Empfehlungen.

## 2.2.2 Extrakolonisches Tumorspektrum bei MAP-Patienten

(Vogt et al., Gastroenterology 2009)

Die Kenntnis des extrakolonischen Tumorspektrums der MAP ist wichtig, um adäquate Vorsorgeempfehlungen für MAP-Patienten zu erarbeiten und die Kenntnisse der Funktion des *MUTYH*-Proteins zu erweitern. Die Fragestellung wurde als Teilprojekt der oben erwähnten europäischen Kooperation unter Federführung des Bonner Zentrums an dem gemeinsam rekrutierten Patientenkollektiv bearbeitet. Die Auswertung der Daten bezüglich des Spektrums und der Häufigkeit extrakolonischer Tumoren bei 276 MAP-Patienten erfolgte in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Informatik, Statistik und Epidemiologie (IMISE) der Universität Leipzig. Hierfür wurden die kumulativen Lebenszeitriskien im Alter von 75 Jahren für die mehr als einmal im Patienten-Kollektiv gefundenen Malignome berechnet; im Vergleich mit der altersspezifischen Tumorzinzidenz der Allgemeinbevölkerung (Saarländisches Krebsregister) wurden außerdem die standardisierten Inzidenz-Ratios (SIR) bestimmt (**Tab. 2.5**). Die Auswertung der Daten führte zu den folgenden Ergebnissen:

Die Beteiligung des oberen Gastrointestinaltraktes ist bei der MAP hinsichtlich Häufigkeit und Konsequenzen klinisch relevant: 17 % der Patienten entwickelten duodenale Adenome, 12 % eine Magenpolyposis. Ähnlich wie bei der FAP ist das relative Risiko für Duodenalkarzinome deutlich erhöht (SIR 130; 95%CI 16-470). Auch wenn das kumulative Lebenszeitrisiko mit 3,6 % vergleichsweise gering ist, stellen Duodenalkarzinome eine prognostisch ungünstige Komplikation dar, was auch durch die Publikation weiterer Kasuisten unterstrichen wird. Deshalb werden präventive Gastroduodenoskopien in einem Umfang wie bei der FAP empfohlen.

Hinsichtlich der extraintestinalen Tumoren ergibt sich ein vielschichtigeres Bild. Bei 13 % der Patienten fand sich mindestens ein extraintestinales Karzinom. Das Risiko für die Entwicklung eines extraintestinalen Karzinoms ist im Vergleich zur alterstandardisierten Normalbevölkerung fast verdoppelt (SIR 1,8), das Lebenszeitrisiko beträgt 40%. Allerdings handelt es sich – passend zum kolorektalen Phänotyp und zum Pathomechanismus – überwiegend um spätmanifeste Malignome. Das breite Tumorspektrum und die meist niedrige Inzidenz jeder einzelnen Entität sprechen eher für zufällige Ereignisse auf dem Boden der bestehenden genetischen Disposition, ein klar dominierender extraintestinaler Tumor ließ sich nicht nachweisen.

Eine leichte bis moderate, aber signifikante relative Risikoerhöhung fand sich für Haut- und Blasenkrebs sowie für Eierstockkrebs und für Brustkrebs, sofern nicht die Zahl der von Brustkrebs betroffenen Frauen, sondern die Zahl unabhängig aufgetretener Primärkarzinome berück-

sichtigt wurde. Während ein erhöhtes Risiko für Blasen- und Hautkrebs bisher bei der MAP nicht berichtet wurde, gab es bereits Hinweise für ein erhöhtes Brustkrebsrisiko (Nielsen et al. 2005). Drei Ovarial- und zwei Endometriumkarzinome im Kollektiv sind auffällig. Der Befund stimmt mit Ergebnissen einer systematischen *MUTYH*-Suche bei Endometriumkarzinomen (Barnetson et al. 2007) und mehreren kasuistischen Berichten überein und spricht zusammen mit den Brustkrebsfällen für eine geringe, aber wahrnehmbare Erhöhung gynäkologischer Malignome; allerdings hatte die Studie nicht genug statistische Power, um die Relevanz aller dieser Tumoren eindeutig zu klären (Tab. 2.5).

**Tabelle 2.5** Inzidenz extrakolonischer Karzinome, die mindestens bei zwei der 276 MAP-Patienten (118 weiblich, 158 männlich) aufgetreten sind.

Lokalisation des Karzinoms	n	SIR (95%CI)	Obs%-Risiko 75 J (95%CI)	Alter bei Diagnose <sup>b)</sup>
alle extraintestinalen Malignome <sup>a)</sup>	45	1,9 (1,4 – 2,5)	38 (23 – 52)	54 (27 – 78)
Ösophagus	2	5,5 (0,7 – 19,9)	2 (0 – 4)	53 (46, 59)
Magen	3	4,2 (0,9 – 12,4)	1 (0 – 3)	38 (17 - 48)
Duodenum	2	130,1 (15,8 – 470,0)	4 (0 – 9)	61 (56, 65)
Harnblase	4	7,2 (2,0 – 18,5)	6 (0 – 12)	61 (45 – 67)
Haut <sup>c)</sup>	13	2,8 (1,5 – 4,8)	22 (7 – 37)	58 (30 – 71)
Lunge	2	0,7 (0,1 – 2,3)	3 (0 – 9)	60 (51, 69)
Mamma <sup>d)</sup>	8 11 <sup>e)</sup>	2,1 (0,9 – 4,2) 3,0 (1,5 – 5,4)	26 (0 – 51)	55 (45 – 78)
Ovar <sup>d)</sup>	3 <sup>f)</sup>	5,7 (1,2 – 16,7)	10 (0 – 22)	51 (45, 56)
Endometrium <sup>d)</sup>	2	4,7 (0,6 – 16,9)	3 (0-7)	51 (47, 54)

<sup>a)</sup> hier wurden alle bei den 276 Patienten dokumentierten extraintestinalen Malignome berücksichtigt; <sup>b)</sup> Medianes Alter in Jahren (Spanne); <sup>c)</sup> Melanome, Spinaliome, Basaliome; <sup>d)</sup> Daten bezogen auf die 118 MAP-Patientinnen; <sup>e)</sup> bezogen auf die Zahl an einem Mammakarzinom erkrankter Frauen (n = 8) bzw. die Zahl der Mammakarzinome (n = 11); <sup>f)</sup> von einem Patienten war das Diagnosealter des Ovarialkarzinoms nicht bekannt; zur Berechnung wurde bei diesem Fall das mittlere Erkrankungsalter der weiblichen Allgemeinbevölkerung (67 Jahre) verwendet. SIR = standardisierte Inzidenz-Ratio; J = Jahre; CI = Konfidenz-Intervall.

Hinweise für eine Häufung typischer FAP-assoziiertes extraintestinalen gutartiger Tumoren (Desmoide, Osteome, CHRPE) fanden sich nicht. Als Bestätigung einiger kasuistischer Berichte beobachteten wir jedoch eine auffällige Häufung von Talgdrüsentumoren (n = 5), die bisher nur mit dem Muir-Torre-Syndrom, einer phänotypischen Variante des HNPCC, in Verbindung gebracht wurden, in der Allgemeinbevölkerung aber nur sehr selten beobachtet werden. Auch wenn die Zahlen aufgrund fehlender populationsbasierter Daten nicht immer klar zu interpretieren sind, ergibt sich zusammen mit dem möglicherweise leicht erhöhten Risiko für gynäkologische Tumoren das Bild einer phänotypischen Überlappung zwischen der MAP und HNPCC, die sich mit einer ähnlichen bzw. funktionell ineinandergreifenden Funktionsweise der beteiligten Gene bzw. Reparatur-Mechanismen (Base-excision-repair versus mismatch-repair) erklären lässt. Hierzu passt auch die aktuelle Beobachtung, dass bei einem Teil der MAP-Patienten mit einem CRC keine kolorektale Polyposis besteht und sich bei *MUTYH*-Mutationsträgern signifikant häufiger als beim sporadischen CRC eine niedrige Mikrosatelliten-Instabilität (MSI-L) des Karzinoms nachweisen lässt (Cleary et al. 2009). Diese Beobachtungen ermöglichen somit einen interessanten neuen Blickpunkt auf die zugrunde liegende Pathophysiologie und könnten zukünftige Forschungsprojekte anregen.

Retrospektive klinische Datenerhebungen und eine Rekrutierung von Patienten aus spezialisierten Zentren heraus können leicht zu verzerrten Ergebnissen führen und müssen deshalb kritisch gewertet werden. Hierzu zählen die Patientenselektion zugunsten eines schwereren und damit auffälligeren Krankheitsverlaufs sowie eine unvollständige Datenerhebung, insbesondere bei verstorbenen Patienten. Hinsichtlich des extraintestinalen Tumorspektrums ist hier grundsätzlich nicht von einer selektiven Rekrutierung auszugehen, da in der Regel die gastrointestinale Symptomatik den Grund zur Veranlassung der Diagnostik darstellte. Da sich andererseits aber fast die Hälfte der extrakolonischen Malignome vor der Diagnose der MAP manifestierten, ist zu vermuten, dass einige, an solchen Malignomen früh verstorbene Patienten nicht erfasst wurden und damit eine Unterrepräsentation von Karzinomen mit schlechter Prognose besteht. Die unterschiedliche Frequenz extrakolonischer Tumoren in den drei nationalen Gruppen legt nahe, dass bestimmte Rekrutierungsstrategien bzw. Einschränkungen der Rekrutierungsmöglichkeiten in gewissem Ausmaß zur Unterschätzung geführt haben.

Andererseits kann auch vermutet werden, dass das Patientenkollektiv gründlicher als die Allgemeinbevölkerung untersucht wurde und daraus beim Vergleich mit Inzidenzen aus populationsbasierten Krebsregistern (in denen bestimmte Tumoren dann unterrepräsentiert wären) eine gewisse Überschätzung der Risikoerhöhung resultiert. Verzerrungen dieser Art lassen sich bei dem gewählten Studiendesign nicht gänzlich vermeiden und müssen in Kauf genommen werden, da eine Klärung der Fragen durch sehr aufwändige und langfristig angelegte prospektive Studien unrealistisch ist und sich auf absehbare Zeit vermutlich kein größeres und besser untersuchtes Kollektiv zusammenstellen lässt.

Zusammenfassend sprechen die Daten somit für ein insgesamt leicht bis moderat erhöhtes extraintestinales Krebsrisiko von MAP-Patienten. Über die gerade publizierten Genotyp-Phänotyp-Beziehungen (Nielsen et al. 2009) hinaus ließen sich keine neuen Korrelationen nachweisen. Aufgrund unserer Ergebnisse (Tumorspektrum, moderate Risikoerhöhung, überwiegend späte Manifestation) erscheint eine spezifische Erweiterung der bestehenden Vorsorge-Empfehlungen nicht notwendig, insbesondere da Mammakarzinome weitestgehend durch die bestehenden Früherkennungs-Untersuchungen der weiblichen Allgemeinbevölkerung in westlichen Ländern erfasst werden sollten und das Screening bezüglich des vergleichbar häufigen Urothelkarzinoms bei HNPCC mittels Urin-Zytologie wegen der geringen Sensitivität und hohen Zahl falsch positiver Befunde nicht mehr empfohlen wird. Ratsam erscheint allenfalls eine allgemein erhöhte Sensibilität von MAP-Patienten gegenüber extraintestinalen Tumoren einschließlich dermatologischer Veränderungen.

### 3 Ausblick

Trotz großer Fortschritte bei der klinischen und genetischen Charakterisierung hereditärer kolorektaler Tumordispositions-Syndrome in den letzten beiden Jahrzehnten bleiben nach wie vor etwa 40-50 % aller Fälle einer adenomatösen Polyposis ursächlich ungeklärt. Dieses Faktum stellt eine Herausforderung und wichtige Aufgabe der humangenetischen Grundlagenforschung dar, denn die ätiologische Klärung einer kolorektalen Polyposis hat große Bedeutung sowohl für das pathogenetische Verständnis der Erkrankung und damit für die Möglichkeit der Entwicklung therapeutischer Ansätze, als auch für die klinische Betreuung der Familien (Wiederholungsrisiko, prädiktive Diagnostik, genetische Beratung, Vorsorge-Untersuchungen). Schätzungsweise 15-20 % der nicht-monogenen CRC-Fälle sind durch disponierende genetische Faktoren mitverursacht (de la Chapelle 2004); die Identifizierung weiterer ursächlich beteiligter Gene bzw. Risikoallele bei kolorektalen Tumorsyndromen hat deshalb auch Modellcharakter für das kausale Verständnis des CRC im Allgemeinen.

Eine hereditäre Ursache der derzeit noch ungeklärten Polyposis-Formen ist wahrscheinlich, da sich das Auftreten zahlreicher synchroner und metachroner intestinaler Adenome nicht überzeugend durch exogene Faktoren erklären lässt. Insbesondere bei leerer oder unklarer Familienanamnese könnte es sich um multifaktorielle bzw. poly-/oligogene, aber auch autosomal-rezessive Formen handeln. Eine hohe Zahl von autosomal-dominanten Neumutationen ist bei attenuiertem klinischem Verlauf aus formalgenetischen Überlegungen (niedriger Selektionsdruck) hingegen wenig wahrscheinlich.

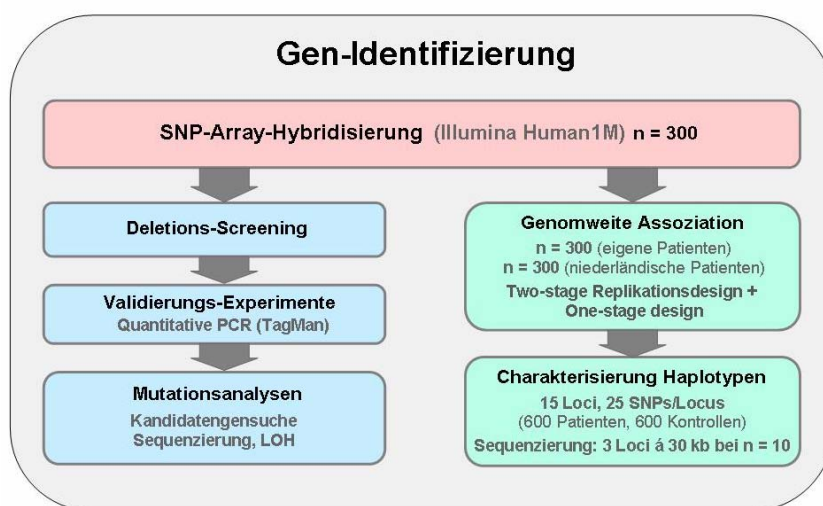
Mutationsanalysen in Kandidatengen, aber auch LOH-Untersuchungen oder array-basierte Expressionsstudien an Tumorgewebe führten bisher abgesehen von der Identifizierung der MAP zu keinem substantiellen wissenschaftlichen Durchbruch. Die Situation ändert sich derzeit allerdings rasch durch die zunehmende Verfügbarkeit und Weiterentwicklung neuer methodischer Ansätze, insbesondere der Hochdurchsatz-Sequenzierung („*next generation sequencing*“) und der hochauflösenden SNP-Array-Analyse. Diese Methoden wurden in den letzten Jahren zur Durchführung genomweiter Assoziationsstudien fest etabliert (Zanke et al. 2007), sie haben sich durch den genomweiten Nachweis von Kopienzahl-Veränderungen (copy number variation = CNV) aber auch als leistungsfähiges Verfahren zur Identifizierung ursächlich relevanter Gene bei monogenen Krankheitsbildern erwiesen (Peiffer et al. 2006; Rivera et al. 2007, Übersicht bei Vissers et al. 2005).

Der wissenschaftliche Schwerpunkt unserer Arbeitsgruppe in den nächsten Jahren wird deshalb in der genetischen Charakterisierung der derzeit ätiologisch unklaren adenomatösen Polyposis-Formen liegen. Im Hinblick auf die Charakteristika des Patientenkollektivs erscheint eine genomweite SNP-Array-Analyse als die vielversprechendste und derzeit effektivste Methode zur Identifizierung neuer Risikoallele bzw. Kandidatenregionen. Die materielle Voraussetzung wurde gerade durch ein von der *Deutschen Krebshilfe* gefördertes dreijähriges Drittmittelprojekt geschaffen. Hierfür erfolgt derzeit eine kontinuierlichen Rekrutierung, klinische Charakterisierung und Sammlung von Blut- und Gewebeproben aller uns bekannten Probanden. Der SNP-Array-Untersuchung geht eine umfassende Suche nach bisher unentdeckten („kryptischen“) APC-Mutationen mittels kompletter Sequenzierung des Gens, Transkriptanalyse und Untersuchung der allelspezifischen Expression voraus.

Aufbauend auf der Rekrutierung und umfassenden klinischen Aufarbeitung unseres Kollektivs werden alle Studienpatienten dann mittels quantitativer SNP-Array-Analyse systematisch auf

genomische Keimbahn-Deletionen hin untersucht. Im gleichen Experiment sollen parallel genomweite Assoziationsdaten erhoben und zusammen mit einem unabhängigen, ähnlich großen und ethnisch vergleichbaren Patientenkollektiv verglichen werden (**Abb. 3.1**); hierzu bestehen Kooperationen mit europäischen Arbeitsgruppen.

Durch dieses Vorgehen wird sowohl einem monogenen, auf bisher unentdeckten (Tumor-suppressor-)Genen beruhenden, wie auch einem polygenen bzw. multifaktoriellen ätiologischen Modell Rechnung getragen. Es ist zu erwarten, dass die array-basierte Untersuchung große Datenmengen generieren wird, die anschließend in unterschiedliche Richtungen und mit verschiedenen methodischen Ansätzen (quantitative PCR, LOH-Untersuchungen, Charakterisierung krankheitsassoziiierter Haplotypen) weiter bearbeitet werden können. Zur Dateninterpretation und Eingrenzung vielversprechender Kandidatenregionen sollen auch die in immer größerer Menge in zentralen Datenbanken verfügbaren genomweiten Informationen hinsichtlich Expressionsprofilen, Methylierungsmustern sowie Assoziations- und Kopplungsbefunden herangezogen werden.



**Abb. 3.1** Geplante Strategie der Identifizierung ursächlicher Gene bzw. Risikoallele mittels SNP-Array bei Patienten mit adenomatöser Polyposis ohne nachweisbare *APC*- oder *MUTYH*-Mutation.

Neben der Identifizierung neuer genetischer Dispositionen stellt die funktionelle Klärung seltener Basensubstitutionen in kodierenden und nicht-kodierenden Bereichen bekannter Gene eine wichtige wissenschaftliche Aufgabe dar, die durch die kontinuierliche Ausweitung der Sequenzierkapazitäten zunehmend an Bedeutung gewinnt. Kürzlich erfolgte Analysen systematisch erhobener genomweiter Daten zur humanen genetischen Variation lassen vermuten, dass ein beträchtlicher Anteil von (*de novo* aufgetretenen) seltenen Missense-Varianten pathogene Effekte verursacht (Kryukov et al. 2007; Boyko et al. 2008). Entsprechend der *rare-variant-Hypothese* trägt eine Häufung seltener und mäßig penetranter Missense-Mutationen in bekannten und noch nicht identifizierten Genen in ihrer Gesamtheit substantiell auch zur Entstehung multipler Adenome bei (Fearhead et al. 2004). Genomweite Sequenzierungsansätze werden es zukünftig realistisch erscheinen lassen, die postulierte Bedeutung seltener Varianten für die Krankheitsentstehung besser einzuschätzen, allerdings werden die hierfür benötigten finanziellen und personellen Ressourcen vermutlich beträchtlich sein.

## 4 Zusammenfassung

Ausgehend von der molekulargenetischen Diagnostik und humangenetischen Beratung beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe seit 20 Jahren wissenschaftlich mit gastrointestinalen Polyposis-Syndromen. Die hier beschriebenen und in den Jahren 2003 bis 2009 durchgeführten Untersuchungen haben die genetische und phänotypische Charakterisierung von adenomatösen Polyposis-Syndromen zum Gegenstand. Nach den grundlegenden Arbeiten zu Mutationsspektrum und Genotyp-Phänotyp-Korrelationen der autosomal-dominanten *Familiären Adenomatösen Polyposis* (FAP) in den 1990er Jahren wurde mit der *MUTYH-assoziierten Polyposis* (MAP) im Jahre 2002 erstmals eine weitere und autosomal-rezessiv vererbte adenomatöse Polyposis beschrieben, die oft nur molekulargenetisch von der FAP abgegrenzt werden kann.

Die Verfügbarkeit eines der weltweit größten Polyposiskollektive ermöglichte uns die systematische Untersuchung von Fragestellungen, die an kleinen Patientengruppen nicht zu bearbeiten sind. Methodisch kamen einerseits Techniken der Routinediagnostik wie die Sequenzierung, Kopplungsanalyse und das Deletions-Screening mittels MLPA sowie die umfassende Anforderung und Auswertung klinischer Daten zum Einsatz, andererseits wurden bei speziellen Fragen mit SNaPshot-Analyse, Transkriptanalyse und LOH-Untersuchungen auch aufwändigere Verfahren angewendet.

Wir konnten zeigen, dass die hohe Frequenz der 5-Basen-Deletion in Codon 1309 des *APC*-Gens nicht durch einen „Founder-Effekt“, sondern durch eine erhöhte Mutationsrate in dieser Gensequenz erklärt werden kann. Es gelang uns, das Spektrum von *APC*-Neumutationen zu beschreiben und erstmals bei der FAP geschlechtsspezifische Unterschiede bezüglich der Art der Neumutation herauszuarbeiten, die in Einklang mit Befunden bei anderen dominanten Erkrankungen und theoretischen Überlegungen stehen.

Durch ein Deletions-Screening bei 170 nicht verwandten FAP-Patienten ohne *APC*-Punktmutation charakterisierten wir Häufigkeit und Spektrum von großen genomischen *APC*-Deletionen und beschrieben eine klare Korrelation zwischen dem Vorliegen einer großen Deletion und der Entwicklung einer klassischen FAP.

Im Rahmen eines längerfristig angelegten Projektes gelang uns die funktionelle Charakterisierung der mit Abstand größten publizierten Zahl seltener unklarer *APC*-Varianten: die bisher insgesamt von uns auf Transkriptebene untersuchten sieben verschiedenen exonischen und acht intronischen Einzelbasen-Substitutionen sowie eine große genomische Duplikation zeigten interessanterweise, dass der Mehrheit seltener Varianten im *APC*-Gen, die bei Polyposis-Patienten identifiziert werden, offensichtlich pathogene Relevanz zukommt.

Die mittels mehrerer Methoden auf genomischer und cDNA-Ebene erfolgte Charakterisierung eines komplexen *APC*-Rearrangements in einer FAP-Familie erlaubte Spekulationen über die Entstehung größerer genomischer Umbauten und veranschaulichte, dass sich bestimmte Mutationstypen den Detektionsmethoden der Routinediagnostik entziehen und daher in bisherigen Untersuchungen und Datenbanken vermutlich unterrepräsentiert sind.

Erstmals konnten wir umfassende Daten zu Ausmaß und klinischen Konsequenzen somatischer Mutations-Mosaik im *APC*-Gen bei Polyposis-Patienten generieren: in einer methodisch aufwändigen Studie demonstrierten wir, dass somatische *APC*-Mosaik bei Patienten mit einer Neumutation häufig auftreten, beim üblichen Mutations-Screening aber leicht übersehen werden und mit der SNaPshot-Methode gut zu quantifizieren sind. Der ermittelte Mosaikgrad in verschie-

denen Geweben ließ sich mit Hypothesen der Mosaikentstehung in Einklang bringen. Somatische *APC*-Mosaikungen können einen Teil der Abweichungen von etablierten Genotyp-Phänotyp-Beziehungen bei FAP-Patienten erklären und haben Bedeutung für die adäquate Einschätzung des Umfangs von Früherkennungs-Untersuchungen.

Eine andere Studie beschäftigte sich mit dem FAP-assoziierten Hepatoblastom. Ein *APC*-Mutationsscreening bei 50 Patienten mit (scheinbar) sporadischem Hepatoblastom ließ vermuten, dass es sich bei einem nennenswerten Teil der Fälle (8-10 %) tatsächlich um die frühe Manifestation einer FAP auf dem Boden einer *APC*-Neumutation handelt, was Konsequenzen für die klinische Betreuung der Patienten hätte. Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Vor- und Nachteile eines frühkindlichen Hepatoblastom-Screenings bei Kindern von FAP-Patienten unter Einbeziehung eigener Daten und von Ergebnissen bei anderen embryonalen Tumorsyndromen umfassend diskutiert.

Ein parallel durchgeführtes Projekt beschäftigt sich mit der *MUTYH*-assoziierten Polyposis (MAP). Durch die retrospektive molekulargenetische Untersuchung und Auswertung klinischer Befunde von 71 MAP-Patienten konnten wir einen wesentlichen Beitrag zur Beschreibung des Mutationspektrums und zur Charakterisierung des kolorektalen Phänotyps der MAP leisten. Hierbei zeigte sich insbesondere, dass die MAP praktisch nie der klassischen FAP entspricht, sondern eine atypische oder attenuierte klinische Ausprägung hat.

In einer Kooperation mit zwei europäischen Arbeitsgruppen werteten wir federführend die gemeinsam zusammengetragenen klinischen Daten zum extrakolonischen Tumorspektrum bei 276 MAP-Patienten aus. Hierbei ergab sich neben einer pathophysiologisch interessanten phänotypischen Überlappung zum HNPCC eine signifikant erhöhte Rate extrakolonischer Malignome. Es ließ sich allerdings kein dominierendes extraintestinales Karzinom nachweisen, sodass die bisher empfohlenen Früherkennungs-Untersuchungen für MAP-Patienten nicht spezifisch erweitert werden müssen. Im Rahmen des Kooperationsprojektes beteiligten wir uns außerdem an der Analyse des Heterozygotenrisikos und von Genotyp-Phänotyp-Beziehungen.

Durch die genannten Arbeiten gelang uns eine vertiefende Charakterisierung der FAP und der MAP. Nach wie vor ist allerdings ein nennenswerter Teil der Polyposis-Fälle ätiologisch ungeklärt. Das aktuelle Projekt der genetischen Grundlagenforschung unserer Gruppe hat deshalb insbesondere die Identifizierung weiterer Risikoallele zum Ziel. Hierfür wurde durch die Verfügbarkeit neuer genomweiter Hochdurchsatz-Techniken wie der hochauflösenden SNP-Array-Analyse und dem Next-Generation-Sequencing die methodische Grundlage geschaffen. Bezüglich der MAP sind prospektive Untersuchungen zur altersabhängigen Penetranz kolorektaler Tumoren bei prädiktiv getesteten MAP-Anlageträgern und eine Feststellung der Häufigkeit bialleler *MUTYH*-Keimbahn-Mutationen bei unselektierten Trägern von Talgdrüsen-Neoplasien geplant.



## 5 Literaturverzeichnis

- Ajith Kumar VK, Gold JA, Mallon E, Thomas S, Hodgson SV (2008) Sebaceous adenomas in an MYH associated polyposis patient of Indian (Gujarati) origin. *Fam Cancer* 7:187-189.
- Alberici P, Fodde R (2006) The role of the APC tumor suppressor in chromosomal instability. *Genome Dyn* 1:149-170.
- Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP (2002) Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30:227-232.
- Aretz S, Koch A, Uhlhaas S, Friedl W, Propping P, von Schweinitz D, Pietsch T (2006a) Should children at risk for familial adenomatous polyposis be screened for hepatoblastoma and children with apparently sporadic hepatoblastoma be screened for APC germline mutations? *Pediatr Blood Cancer* 47:811-818.
- Aretz S, Propping P (2004) Prävention durch die Humangenetik. In Hurrelmann, K.; Klotz, Th.; Haisch, J. (Hrsg): *Lehrbuch Prävention und Gesundheitsförderung*; Verlag Hans Huber, S. 265-278.
- Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Loff S, Back W, Pagenstecher C, McLeod DR, Graham GE, Mangold E, Santer R, Propping P, Friedl W (2005) High proportion of large genomic STK11 deletions in Peutz-Jeghers syndrome. *Hum Mutat* 26:513-519.
- Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H, Siberg K, Vogel M, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W (2006b) MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 119:807-814.
- Armour JA, Sismani C, Patsalis PC, Cross G (2000) Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucleic Acids Res* 28:605-609.
- Azzopardi D, Dallosso AR, Eliason K, Hendrickson BC, Jones N, Rawstorne E, Colley J, Moskvina V, Frye C, Sampson JR, Wenstrup R, Scholl T, Cheadle JP (2008) Multiple rare nonsynonymous variants in the adenomatous polyposis coli gene predispose to colorectal adenomas. *Cancer Res* 68:358-363.
- Balaguer F, Castellvi-Bel S, Castells A, Andreu M, Munoz J, Gisbert JP, Llor X, Jover R, de Cid R, Gonzalo V, Bessa X, Xicola RM, Pons E, Alenda C, Paya A, Pique JM (2007) Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case-control, population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 5:379-387.
- Barnetson RA, Devlin L, Miller J, Farrington SM, Slater S, Drake AC, Campbell H, Dunlop MG, Porteous ME (2007) Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, MYH, in patients with endometrial cancer. *Clin Genet* 72:551-555.
- Bellis MA, Hughes K, Hughes S, Ashton JR (2005) Measuring paternal discrepancy and its public health consequences. *J Epidemiol Community Health* 59:749-754.
- Bisgaard ML, Fenger K, Bulow S, Niebuhr E, Mohr J (1994) Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate. *Hum Mutat* 3:121-125.
- Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, et al. (1987) Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328:614-616.
- Boyko AR, Williamson SH, Indap AR, Degenhardt JD, Hernandez RD, Lohmueller KE, Adams MD, Schmidt S, Sninsky JJ, Sunyaev SR, White TJ, Nielsen R, Clark AG, Bustamante CD (2008) Assessing the evolutionary impact of amino acid mutations in the human genome. *PLoS Genet* 4:e1000083.

- Bronner MP (2003) Gastrointestinal polyposis syndromes. *Am J Med Genet A* 122A:335-341.
- Bülow S (1986) Clinical features in familial polyposis coli. Results of the Danish polyposis register. *Dis Colon Rectum* 29:102-107.
- Bülow S (2003) Results of national registration of familial adenomatous polyposis. *Gut* 52:742-746.
- Bülow S, Berk T, Neale K (2006) The history of familial adenomatous polyposis. *Fam Cancer* 5:213-220.
- Bülow S, Bjork J, Christensen IJ, Fausa O, Jarvinen H, Moesgaard F, Vasen HF (2004) Duodenal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *Gut* 53:381-386.
- Bülow S, Faurschou Nielsen T, Bulow C, Bisgaard ML, Karlsen L, Moesgaard F (1996) The incidence rate of familial adenomatous polyposis. Results from the Danish polyposis register. *Int J Colorectal Dis* 11:88-91.
- Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, Duncan PJ, Curtis CE, Robinson DO, Harvey JF, Cross NC (2004) Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer* 91:1155-1159.
- Bussey HJR (1975) Familial polyposis coli. Family studies, histopathology, differential diagnosis, and results of treatment. Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Cartegni L, Wang J, Zhu Z, Zhang MQ, Krainer AR (2003) ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res* 31:3568-3571.
- Caspari R, Friedl W, Mandl M, Moslein G, Kadmon M, Knapp M, Jacobasch KH, Ecker KW, Kreissler-Haag D, Timmermanns G, et al. (1994) Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet* 343:629-632.
- Caspari R, Olschwang S, Friedl W, Mandl M, Boisson C, Boker T, Augustin A, Kadmon M, Möslein G, Thomas G, Propping P (1995) Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum Mol Genet* 4:337-340.
- Chandley AC (1991) On the parental origin of de novo mutation in man. *J Med Genet* 28:217-223.
- Chargelaigue A (1959) Des polypes du rectum. Thesis, Paris.
- Cheadle JP, Sampson JR (2003) Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease. *Hum Mol Genet* 12:R159-165.
- Clark JC, Collan Y, Eide TJ, Esteve J, Ewen S, Gibbs NM, Jensen OM, Koskela E, MacLennan R, Simpson JG, et al. (1985) Prevalence of polyps in an autopsy series from areas with varying incidence of large-bowel cancer. *Int J Cancer* 36:179-186.
- Cleary SP, Cotterchio M, Jenkins MA, Kim H, Bristow R, Green R, Haile R, Hopper JL, Lemarchand L, Lindor N, Parfrey P, Potter J, Youngusband B, Gallinger S (2009) Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: A multisite case-control study. *Gastroenterology* (epub ahead of print).
- Cockayne EA (1927) Heredity in relation to cancer. *Cancer Rev* 2:337-347.
- Cotton RG, Scriver CR (1998) Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat* 12:1-3.
- Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, Manno M, Selander T, Aronson M, Redston M, Cotterchio M, Knight J, Gryfe R, Gallinger S (2004) Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 96:1631-1634.
- Crow JF (2000) The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nat Rev Genet* 1:40-47.
- de la Chapelle A (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 4:769-780.

- Dolwani S, Williams GT, West KP, Newman J, Stock D, Griffiths AP, Best J, Cheadle JP, Sampson JR (2007) Analysis of inherited MYH/(MutYH) mutations in British Asian patients with colorectal cancer. *Gut* 56:593.
- Easton DF, Eeles RA (2008) Genome-wide association studies in cancer. *Hum Mol Genet* 17:R109-115.
- Eliason K, Hendrickson BC, Judkins T, Norton M, Leclair B, Lyon E, Ward B, Noll W, Scholl T (2005) The potential for increased clinical sensitivity in genetic testing for polyposis colorectal cancer through the analysis of MYH mutations in North American patients. *J Med Genet* 42:95-96.
- Engel C, Propping P, Holinski-Feder E, Rahner N, Schackert H-K, von Knebel Doeberitz M, Schmiegel W, Moeslein G, Royer-Pokora B, Loeffler M (2007) How many families suspected of having Lynch syndrome show colorectal cancer clustering by coincidence? *Medizinische Genetik* 19:169.
- Erickson RP (2003) Somatic gene mutation and human disease other than cancer. *Mutat Res* 543:125-136.
- Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, Wiltshire A, Prendergast J, Porteous M, Campbell H, Dunlop MG (2005) Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am J Hum Genet* 77:112-119.
- Fearnhead NS, Wilding JL, Winney B, Tonks S, Bartlett S, Bicknell DC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF (2004) Multiple rare variants in different genes account for multifactorial inherited susceptibility to colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15992-15997.
- Fearon ER, Vogelstein B (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61:759-767.
- Fleischmann C, Peto J, Cheadle J, Shah B, Sampson J, Houlston RS (2004) Comprehensive analysis of the contribution of germline MYH variation to early-onset colorectal cancer. *Int J Cancer* 109:554-558.
- Friedl W, Aretz S (2005) Familial adenomatous polyposis - experience from a study on 1164 German unrelated polyposis patients. *Hereditary Cancer* 3:95-114.
- Friedl W, Caspari R, Sengteller M, Uhlhaas S, Lamberti C, Jungck M, Kadmon M, Wolf M, Fahnenstich J, Gebert J, Moslein G, Mangold E, Propping P (2001) Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 FAP families. *Gut* 48:515-521.
- Friedl W, Kruse R, Jungck M, Back W, Loff S, Propping P, Jenne D (1999) Hamartomatöse Polyposis-Syndrome. *Deutsches Ärzteblatt* 96:A 2285-2291.
- Friedl W, Lamberti C (2001) Familiäre Adenomatöse Polyposis. In: Ganten D, Ruckpaul K (Hrsg) *Molekularmedizinische Grundlagen von hereditären Tumorerkrankungen* Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 303-329.
- Galiatsatos P, Foulkes WD (2006) Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101:385-398.
- Gardner EJ, Richards RC (1953) Multiple cutaneous and subcutaneous lesions occurring simultaneously with hereditary polyposis and osteomatosis. *Am J Hum Genet* 5:139-147.
- Gayther SA, Rees M, Delhanty JD (1994) Frequent normal allele loss and maternal origin of the mutation shown by DNA homoduplex analysis in a severely affected patient with adenomatous polyposis coli. *Ann Hum Genet* 58:101-106.
- Gismondi V, Meta M, Bonelli L, Radice P, Sala P, Bertario L, Viel A, Fornasarig M, Arrigoni A, Gentile M, Ponz de Leon M, Anselmi L, Mareni C, Bruzzi P, Varesco L (2004) Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer* 109:680-684.

- Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, et al. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66:589-600.
- Hall JG (1988) Review and hypotheses: somatic mosaicism: observations related to clinical genetics. *Am J Hum Genet* 43:355-363.
- Harvey J, Clark S, Hyer W, Hadzic N, Tomlinson I, Hinds R (2008) Germline APC mutations are not commonly seen in children with sporadic hepatoblastoma. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 47:675-677.
- Herrera Le (1989) Familial adenomatous polyposis. Alan R. Liss, Inc., New York.
- Hes FJ, Nielsen M, Bik EC, Konvalinka D, Wijnen JT, Bakker E, Vasen HF, Breuning MH, Tops CM (2008) Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli. *Gut* 57:71-76.
- Houlston RS, Webb E, Broderick P, Pittman AM, Di Bernardo MC, Lubbe S, Chandler I, et al. (2008) Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet* 40:1426-1435.
- Isidro G, Laranjeira F, Pires A, Leite J, Regateiro F, Castro e Sousa F, Soares J, Castro C, Gira J, Brito MJ, Medeira A, Teixeira R, Morna H, Gaspar I, Marinho C, Jorge R, Brehm A, Ramos JS, Boavida MG (2004) Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum Mutat* 24:353-354.
- Jarvinen HJ (1992) Epidemiology of familial adenomatous polyposis in Finland: impact of family screening on the colorectal cancer rate and survival. *Gut* 33:357-360.
- Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P (1995) Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 108:1405-1411.
- Jass JR (2008) Colorectal polyposis: from phenotype to diagnosis. *Pathol Res Pract* 204:431-447.
- Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, Sampson JR, Cheadle JP (2002) Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum Mol Genet* 11:2961-2967.
- Jones N, Vogt S, Nielsen M, Christian D, Wark PA, Eccles D, Edwards E, Evans DG, Maher ER, Vasen HF, Hes FJ, Aretz S, Sampson JR (2009) Increased colorectal cancer incidence in obligate carriers of heterozygous mutations in MUTYH. *Gastroenterology* 137:489-94.
- Jüngling O (1928) Polyposis intestini. Hereditäre Verhältnisse und Beziehungen zum Carcinom. *Beitr Klin Chir* 143:476-483.
- Kadmon M, Möslin G, Buhr HJ, Herfarth C (1995) Desmoide bei Patienten mit familiärer adenomatöser Polyposis (FAP). Klinische und therapeutische Beobachtungen des Heidelberger Polyposis-Registers. *Chirurg* 66:997-1005.
- Kaminsky ZA, Assadzadeh A, Flanagan J, Petronis A (2005) Single nucleotide extension technology for quantitative site-specific evaluation of metC/C in GC-rich regions. *Nucleic Acids Res* 33:e95.
- Kanter-Smoler G, Bjork J, Fritzell K, Engwall Y, Hallberg B, Karlsson G, Gronberg H, Karlsson P, Wallgren A, Wahlstrom J, Hultcrantz R, Nordling M (2006) Novel findings in Swedish patients with MYH-associated polyposis: mutation detection and clinical characterization. *Clin Gastroenterol Hepatol* 4:499-506.
- Kaufmann A, Vogt S, Uhlhaas S, Stienen D, Kurth I, Hameister H, Mangold E, Kötting J, Kaminsky E, Propping P, Friedl W, Aretz S (2009) Analysis of rare APC variants at mRNA level: six pathogenic mutations and literature review. *J Mol Diagn* 11:131-139.

- Kim DW, Kim IJ, Kang HC, Jang SG, Kim K, Yoon HJ, Ahn SA, Han SY, Hong SH, Hwang JA, Sohn DK, Jeong SY, Choi HS, Hong CW, Lim SB, Park JG (2007) Germline mutations of the MYH gene in Korean patients with multiple colorectal adenomas. *Int J Colorectal Dis* 22:1173-1178.
- Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al. (1991) Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253:661-665.
- Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S (2003) Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2:43-55.
- Knudson AG, Jr. (1971) Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68:820-823.
- Kryukov GV, Pennacchio LA, Sunyaev SR (2007) Most rare missense alleles are deleterious in humans: implications for complex disease and association studies. *Am J Hum Genet* 80:727-739.
- Küry S, Buecher B, Robiou-du-Pont S, Scoul C, Colman H, Le Neel T, Le Houerou C, Faroux R, Ollivry J, Lafraise B, Chupin LD, Sebille V, Bezieau S (2008) Low-penetrance alleles predisposing to sporadic colorectal cancers: a French case-controlled genetic association study. *BMC Cancer* 8:326.
- Laken SJ, Papadopoulos N, Petersen GM, Gruber SB, Hamilton SR, Giardiello FM, Brensinger JD, Vogelstein B, Kinzler KW (1999) Analysis of masked mutations in familial adenomatous polyposis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:2322-2326.
- Leppert M, Dobbs M, Scambler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer D, Woodward S, Burt R, Hughes J, Gardner E, et al. (1987) The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238:1411-1413.
- Lockhart-Mummery P (1925) Cancer and heredity. *Lancet* 1:427-429.
- Lowichik A, Jackson WD, Coffin CM (2003) Gastrointestinal polyposis in childhood: clinicopathologic and genetic features. *Pediatr Dev Pathol* 6:371-391.
- Mandl M, Caspari R, Jauch A, Boker T, Raschke H, Sengteller M, Propping P, Friedl W (1996) Familial adenomatous polyposis: a submicroscopic deletion at the APC locus in a family with mentally normal patients. *Hum Genet* 97:204-208.
- McCart A, Latchford A, Volikos E, Rowan A, Tomlinson I, Silver A (2006) A novel exon duplication event leading to a truncating germ-line mutation of the APC gene in a familial adenomatous polyposis family. *Fam Cancer* 5:205-208.
- Michils G, Tejpar S, Thoelen R, van Cutsem E, Vermeesch JR, Fryns JP, Legius E, Matthijs G (2005) Large deletions of the APC gene in 15% of mutation-negative patients with classical polyposis (FAP): a Belgian study. *Hum Mutat* 25:125-134.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Miyaki M, Iijima T, Yamaguchi T, Hishima T, Tamura K, Utsunomiya J, Mori T (2005) Germline mutations of the MYH gene in Japanese patients with multiple colorectal adenomas. *Mutat Res* 578:430-433.
- Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275:1787-1790.
- Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, Aoki T, Ogawa M, Utsunomiya J, Baba S, Sasazuki T, Nakamura Y (1992) Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 52:4055-4057.

- Nielsen M, Franken PF, Reinards TH, Weiss MM, Wagner A, van der Klift H, Kloosterman S, Houwing-Duistermaat JJ, Aalfs CM, Ausems MG, Brocker-Vriends AH, Gomez Garcia EB, Hoogerbrugge N, Menko FH, Sijmons RH, Verhoef S, Kuipers EJ, Morreau H, Breuning MH, Tops CM, Wijnen JT, Vasen HF, Fodde R, Hes FJ (2005) Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *J Med Genet* 42:e54.
- Nielsen M, Joerink-van de Beld MC, Jones N, Vogt S, Tops CM, Vasen HF, Sampson JR, Aretz S, Hes FJ (2009) Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients with MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 136:471-476.
- Offerhaus GJ, Giardiello FM, Krush AJ, Booker SV, Tersmette AC, Kelley NC, Hamilton SR (1992) The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 102:1980-1982.
- Peiffer DA, Le JM, Steemers FJ, Chang W, Jenniges T, Garcia F, Haden K, Li J, Shaw CA, Belmont J, Cheung SW, Shen RM, Barker DL, Gunderson KL (2006) High-resolution genomic profiling of chromosomal aberrations using Infinium whole-genome genotyping. *Genome Res* 16:1136-1148.
- Peterlongo P, Mitra N, de Abajo AS, de la Hoya M, Bassi C, Bertario L, Radice P, Glogowski E, Nafa K, Caldes T, Offit K, Ellis NA (2006) Increased frequency of disease-causing MYH mutations in colon cancer families. *Carcinogenesis* 27:2243-2249.
- Petrij-Bosch A, Peelen T, van Vliet M, van Eijk R, Olmer R, Drusedau M, Hogervorst FB, Hageman S, Arts PJ, Ligtenberg MJ, Meijers-Heijboer H, Klijn JG, Vasen HF, Cornelisse CJ, van 't Veer LJ, Bakker E, van Ommen GJ, Devilee P (1997) BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Nat Genet* 17:341-345.
- Polakis P (1997) The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta* 1332:F127-147.
- Ransohoff DF, Lang CA (1991) Screening for colorectal cancer. *N Engl J Med* 325:37-41.
- Renkonen ET, Nieminen P, Abdel-Rahman WM, Moisio AL, Jarvela I, Arte S, Jarvinen HJ, Peltomaki P (2005) Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous. *J Clin Oncol* 23:5651-5659.
- Rex DK, Lehman GA, Ulbright TM, Smith JJ, Pound DC, Hawes RH, Helper DJ, Wiersema MJ, Langefeld CD, Li W (1993) Colonic neoplasia in asymptomatic persons with negative fecal occult blood tests: influence of age, gender, and family history. *Am J Gastroenterol* 88:825-831.
- Ripa R, Bisgaard ML, Bulow S, Nielsen FC (2002) De novo mutations in familial adenomatous polyposis (FAP). *Eur J Hum Genet* 10:631-637.
- Rivera MN, Kim WJ, Wells J, Driscoll DR, Brannigan BW, Han M, Kim JC, Feinberg AP, Gerald WL, Vargas SO, Chin L, Iafrate AJ, Bell DW, Haber DA (2007) An X chromosome gene, WTX, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 315:642-645.
- Rustin RB, Jagelman DG, McGannon E, Fazio VW, Lavery IC, Weakley FL (1990) Spontaneous mutation in familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 33:52-55.
- Sachatello CR (1971) Familial polyposis of the colon. A four-decade follow-up. *Cancer* 28:581-587.
- Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, Frayling I, Jordan S, Maher ER, Mak T, Maynard J, Pigatto F, Shaw J, Cheadle JP (2003) Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 362:39-41.
- Schmiegel W, Pox C, Adler G, Fleig W, Folsch UR, Fruhmorgen P, Graeven U, Hohenberger W, Holstege A, Junginger T, Kuhlbacher T, Porschen R, Propping P, Riemann JF, Sauer R,

- Sauerbruch T, Schmoll HJ, Zeitz M, Selbmann HK (2004) S3-Leitlinienkonferenz "Kolorektales Karzinom" 2004. *Z Gastroenterol* 42:1129-1177.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30:e57.
- Schulmann K, Pox C, Tannapfel A, Schmiegeler W (2007) The patient with multiple intestinal polyps. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 21:409-426.
- Segditsas S, Rowan AJ, Howarth K, Jones A, Leedham S, Wright NA, Gorman P, Chambers W, Domingo E, Roylance RR, Sawyer EJ, Sieber OM, Tomlinson IP (2009) APC and the three-hit hypothesis. *Oncogene* 28:146-155.
- Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, Thomas HJ, Tomlinson IP (2003) Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 348:791-799.
- Sklifasowski NW (1881) Polyadenoma tractus intestinalis. *Vrac* 4:55-57.
- Smith WG (1968) Familial multiple polyposis: research tool for investigating the etiology of carcinoma of the colon? *Dis Colon Rectum* 11:17-31.
- Spigelman AD, Thomson JPS (1994) Introduction, history and registries. In: Phillips RKS, Spigelman AD, Thomson JPS (eds): *Familial adenomatous polyposis and other polyposis syndromes*. Edward Arnold, London Boston; S. 3-14.
- Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, et al. (1993) Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75:951-957.
- Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF (1992) Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 256:668-670.
- Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR (2003) Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* 22:428-433.
- Turcot J, Despres JP, St Pierre F (1959) Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum* 2:465-468.
- Uhlmann K, Brinckmann A, Toliat MR, Ritter H, Nurnberg P (2002) Evaluation of a potential epigenetic biomarker by quantitative methyl-single nucleotide polymorphism analysis. *Electrophoresis* 23:4072-4079.
- Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, et al. (2008) Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut* 57:704-713.
- Vasen HFA, Bülow S, Group a (1999) Guidelines for the surveillance and management of familial adenomatous polyposis (FAP): a world wide survey among 41 registries. *Colorectal Dis* 1:214-221.
- Venesio T, Molatore S, Cattaneo F, Arrigoni A, Risio M, Ranzani GN (2004) High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 126:1681-1685.
- Visser LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG (2005) Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. *Hum Mol Genet* 14:R215-223.
- Vogel F, Motulsky A (1997) *Human Genetics - Problems and Approaches*, 3rd Edn. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.

- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319:525-532.
- Vogt S, Jones N, Christian D, Engel C, Nielsen M, Kaufmann A, Steinke V, Vasen HF, Propping P, Sampson JR, Hes FJ, Aretz S (2009) Expanded Extracolonic Tumor Spectrum in MUTYH-Associated Polyposis. *Gastroenterology* 137:1976-1985.
- Wallis YL, Macdonald F, Hulten M, Morton JE, McKeown CM, Neoptolemos JP, Keighley M, Morton DG (1994) Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 94:543-548.
- Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, Steenblock KJ, Petersen GM, Halling KC, French AJ, Johnson RA, Burgart LJ, Rabe K, Lindor NM, Thibodeau SN (2004) MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterology* 127:9-16.
- Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, Propping P, Mangold E (2003) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer* 103:636-641.
- Wang Y, Friedl W, Sengteller M, Jungck M, Filges I, Propping P, Mangold E (2002) A modified multiplex PCR assay for detection of large deletions in MSH2 and MLH1. *Hum Mutat* 19:279-286.
- Webb EL, Rudd MF, Houlston RS (2006) Colorectal Cancer Risk in Monoallelic Carriers of MYH Variants. *Am J Hum Genet* 79:768-771.
- Wehner M, Mangold E, Sengteller M, Friedrichs N, Aretz S, Friedl W, Propping P, Pagenstecher C (2005) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: pitfalls in deletion screening in MSH2 and MLH1 genes. *Eur J Hum Genet* 13:983-986.
- Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, Khan PM, Menko F, Tops C, Meijers Heijboer H, Lindhout D, Moller P, Fodde R (1998) MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet* 20:326-328.
- Yanaru-Fujisawa R, Matsumoto T, Ushijima Y, Esaki M, Hirahashi M, Gushima M, Yao T, Nakabeppu Y, Iida M (2008) Genomic and functional analyses of MUTYH in Japanese patients with adenomatous polyposis. *Clin Genet* 73:545-553.
- Yousoufian H, Pyeritz RE (2002) Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nat Rev Genet* 3:748-758.
- Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM, Prendergast J, et al. (2007) Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet* 39:989-994.



## 6 Danksagung

Ganz besonders und an erster Stelle möchte ich Frau Dr. Waltraut Friedl danken, ohne deren geduldige und intensive fachliche Unterstützung sowie herausragende methodische Kenntnisse viele Arbeiten nicht so hätten durchgeführt werden können. Ihre zahlreichen Anregungen und sorgfältigen Manuskript-Korrekturen (inklusive der Durchsicht dieses Textes), die aktive Mitarbeit bei allen Projekten und die zahlreichen interessanten und konstruktiven Diskussionen trugen wesentlich zur Qualität und zum Vorankommen der hier beschriebenen Studien bei. Durch ihre langjährige Aufbauarbeit und das große Engagement im Umgang mit Mitarbeitern und Patienten wurden die Grundlagen für die kontinuierlich erfolgreiche wissenschaftliche Arbeit der Gruppe geschaffen. Ihr altersbedingtes Ausscheiden aus dem Institut stellt deshalb einen großen fachlichen und persönlichen Verlust dar.

Sehr zu Dank verpflichtet bin ich ebenfalls Herrn Prof. Dr. Peter Propping für die großzügige und langjährige Unterstützung, die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen und die kritische Durchsicht aller Manuskripte und Anträge mit vielen wertvollen Verbesserungsvorschlägen. Hierzu zählen auch die immer freundliche und vorbildliche Art im Führen des Instituts und seiner Mitarbeiter, das motivierende Umfeld und das Schaffen einer harmonischen Arbeitsatmosphäre, ohne die eine erfolgreiche wissenschaftliche Arbeit kaum möglich ist. Danken möchte ich dabei auch ganz besonders für das mir jederzeit und uneingeschränkt entgegengebrachte Vertrauen, das sich auch in der Übertragung wichtiger Aufgabenbereiche und eigenverantwortlicher Tätigkeiten im Institut widerspiegelte.

Mein besonderer Dank gilt darüber hinaus Herrn Prof. Dr. Markus M. Nöthen für das Interesse an der Arbeit unserer Gruppe, die konstruktive Unterstützung bei Anträgen und Publikationen und das große persönliche Engagement zur erfolgreichen Fortsetzung neuer wissenschaftlicher Projekte.

Die Arbeit wäre nicht ohne den Beitrag der anderen Mitglieder unserer Arbeitsgruppe „Erblicher Darmkrebs“ möglich gewesen. Daher danke ich insbesondere Dietlinde Stienen und Siegfried Uhlhaas für die stets sorgfältig und zuverlässig durchgeführten Laborarbeiten und das Einbringen ihrer großen Erfahrung im Bereich der molekulargenetischen Methodik, den Doktoranden Kirsten Sieberg und Daria Christian für die Unterstützung bei der Anforderung, Dokumentation und Auswertung klinischer Befunde sowie meinen Mitarbeiterinnen Astrid Kaufmann und Stefanie Vogt für die gute Zusammenarbeit und zeitintensive Patientenrekrutierung.

Danken möchte ich auch den vielen übrigen Mitarbeitern des Instituts, die durch ihre Kollegialität und Unterstützung mit Ratschlägen und Kommentaren für die gute Arbeitsatmosphäre verantwortlich sind, sowie für die geduldige Unterstützung bei kleineren und größeren technischen Problemen durch Andreas Stein.

Weiterhin danke ich in- und ausländischen Kooperationspartnern, insbesondere Julian Sampson (Cardiff, England), Frederik Hes (Leiden, Niederlande) und Roberto Colombo (Mailand, Italien), die durch ihre Zusammenarbeit wichtige Impulse und Anregungen geliefert haben und einige Projekte erst ermöglichten, sowie Christoph Engel vom IMSIE Leipzig für die statistische Auswertung einiger Daten.

Ganz besonders möchte ich auch der *Deutschen Krebshilfe* danken, die mit ihrem Vertrauen und der langjährigen finanziellen Unterstützung eine Voraussetzung für die erfolgreiche Arbeit unserer Gruppe geschaffen hat und uns auch gegenwärtig wieder in großem Umfang fördert.

Den FAP-Patienten und der Selbsthilfegruppe *Familienhilfe Polyposis e.V.* danke ich für die bereitwillige Teilnahme an wissenschaftlichen Studien und die vielen persönlichen Kontakte.

Besonders herzlich danken möchte ich meiner Frau und meinen Kindern, die meine häufige Abwesenheit mit Fassung tragen und mich trotzdem noch als vollwertiges Familienmitglied betrachten.