

Abteilung Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. med. Walther Vogel

Kopplungsanalyse auf Chromosom 20 bei familiärem Prostatakarzinom

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

Florian Kurtz aus Augsburg

2006

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Walther Vogel

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Paiss

Tag der Promotion: 23.11.2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1.	Einleitung	8
1.1	Das Prostatakarzinom	9
1.1.1	Inzidenz und Epidemiologie	9
1.1.2	Ätiologie und Pathologie	10
1.1.3	Diagnostik, Therapie und Prognose	11
1.2	PCA als hereditäre Erkrankung	13
1.2.1	Familiäre Häufung	13
1.2.2	Unterscheidung familiär – hereditär	13
1.2.3	Nachweismethoden genetisch bedingter Erkrankungen	14
1.3	Die Kopplungsanalyse	16
1.3.1	Mikrosatelliten-Marker	16
1.3.2	Bestimmung von Kopplung	17
1.3.3	Übersicht der bisherigen Ergebnisse	18
1.3.4	Probleme bei komplexen Erkrankungen	21
1.4	Das Chromosom 20	23
1.4.1	Allgemeines	23
1.4.2	HPC20	24
1.5	Fragestellung	26
2.	Material und Methoden	28
2.1	Patienten	28
2.2	Molekulargenetische Methoden	30
2.2.1	DNA-Präparation	30
2.2.2	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	31
2.2.3	Polymerasekettenreaktion	31
2.2.4	Fragmentanalyse	37
2.3	Datenanalyse	40
2.3.1	Genehunter	40
2.3.2	Genehunter Plus	47
2.3.3	FBAT	49

3.	Ergebnisse	52
3.1	Allele	52
3.2	Ergebnisse der Multipoint-Analyse	55
3.3	Ergebnisse nach der Allel-Sharing Methode	62
3.3.1	Analyse mit 9 Markern	62
3.3.2	Analyse mit 15 Markern	67
3.4	Ergebnisse der Assoziationsanalyse	72
4.	Diskussion	74
4.1	Kritische Betrachtung der Ergebnisse	76
4.1.1	Vererbungsmodelle	77
4.2	Vergleich der Ergebnisse mit anderen Untersuchungen auf Chromosom 20 zum familiärem Prostatakarzinom	78
4.2.1	Vergleich meiner Ergebnisse mit den bisherigen Replikationsversuchen des HPC20	81
4.3	Entwicklung der Ergebnisse für HPC-20 und Ausblick	83
5.	Zusammenfassung	86
6.	Literaturverzeichnis	88
	Danksagung	100
	Curriculum vitae	101

Abkürzungsverzeichnis:

ABI 310	DNA-Sequenzierautomat der Firma Applied Biosystems
ASM	Allele sharing method
bp	Base pairs (Basenpaare)
CA	Cytosin-Adenin
CCD-Kamera	Charged Coupled Device-Kamera (elektronische Kamera mit CCD-Chip)
CEPH	Centre d'étude du polymorphisme humain
cM	centiMorgan, der genetische Abstand zweier Loci auf einem Chromosom
dATP	Deoxyadenosinetriphosphate
dCTP	Deoxycytosinetriphosphate
dGTP	Deoxyguanosinetriphosphate
DNA	Deoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTP	Deoxynucleotidtriphosphate
dTTP	Deoxytyrosinetriphosphate
ED	Erstdiagnose
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELAC2/HPC2	ElaC (E.coli) homlog/ Hereditary prostate cancer 2
FBAT	Family based association test
FRR	familiäres relatives Risiko
HLOD	LOD-Wert bei Annahme von Heterogenität
HPC	Hereditary Prostate Cancer (Familiäres Prostatakarzinom)

HPC1	Hereditary Prostate Cancer 1
HPC20	Hereditary Prostate Cancer 20
HPCX	Hereditary Prostate Cancer, X-linked
ICPCG	International consortium for prostate cancer genetics
ID	Personenidentifikationsnummer
LOD	Logarithm of the odds, Wahrscheinlichkeit für die Kopplung von Genen
LOH	Loss of Heterozygosity
mol	Mol, die Stoffmenge eines Systems, das aus ebensoviel Einzelteilchen besteht, wie Atome in 0,012 Kilogramm 12 des Kohlenstoffnuklids C enthalten sind.
mM	Millimol, 0,1 Mol
ml	Milliliter, 10^{-3} Liter
μ l	Mikroliter, 10^{-6} Liter
MSR1	Macrophage scavenger receptor 1 gene
mtm	Male-to-male
NCBI	National center for biotechnology information
ng	Nanogramm, 10^{-9} Kilogramm
nm	Non-male-to male
NPL	Non-parametric LOD-Score, parameterfreie Kopplungsuntersuchung
NPLZ	Non-parametric linkage
p	„petite“, Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms
p	Fehlerwahrscheinlichkeit
PCA	Prostatakarzinom
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

ped	pedigree / Familienidentifikationsnummer
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
q	„queue“, Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms.
rpm	Rotations per minute
TNM	Tumor / Lymphknoten (Nodus) / Metastasen
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TRUS	Transrektaler Ultraschall
VNTRs	variable number of tandem repeats
Z _{lr}	Likelihood ratio z-score

1. Einleitung

Das Prostatakarzinom ist mittlerweile die häufigste Krebserkrankung bei Männern und steht mit etwa 12 000 Sterbefällen pro Jahr an dritter Stelle bei den zum Tode führenden Krebserkrankungen in Deutschland.

In schätzungsweise 10% der Fälle geht man dabei von hereditären Fällen aus, d.h. der Erkrankung liegt eine genetische Prädisposition zugrunde.

Die Ergebnisse mehrerer Segregationsanalysen deuten auf ein autosomal-dominantes Vererbungsmodell mit einem seltenen Risikoallel und hoher Penetranz, darüber hinaus ergeben sich aber auch Anhaltspunkte für eine X-chromosomale Vererbung.

Durch genomweite Linkage-Analysen konnten mehrere Loci identifiziert werden, die ein prädisponierendes Gen enthalten sollten. Ausgehend von diesen Ergebnissen ist es mittlerweile gelungen 3 Gene zu identifizieren, allerdings mit bisher unbekannter Funktion.

Die bisherigen Ergebnisse sprechen für eine stark ausgeprägte Heterogenität des Prostatakarzinoms, d.h. es existieren mehrerer Gene, die für eine Prädisposition verantwortlich sein könnten. Auch ein multifaktorielles Modell, bei dem mehrere Gene interagieren scheint möglich.

Ein verdächtiger Locus auf dem Chromosom 20q13 wurde erstmals von einer Gruppe der Mayo-Klinik/Rochester bei einer genomweiten Suche gefunden und HPC20 genannt.

Die Region 20q13, in der ein häufiger „Loss of Heterozygosity“ (LOH) beobachtet wurde, wird in mehreren Arbeiten mit der Entstehung von bösartigen Tumoren, speziell auch von Brustkrebs und Prostatakrebs, in Verbindung gebracht.

1.1 Das Prostatakarzinom

1.1.1 Inzidenz und Epidemiologie

In Deutschland werden derzeit jährlich etwa 31.500 Prostatakarzinome diagnostiziert. Damit ist die Prostata mit 18,7% inzwischen die häufigste Lokalisation bösartiger Neubildungen beim Mann und hat damit 1998 erstmals den Lungenkrebs als häufigsten Tumor der Männer abgelöst. Bei den zum Tod führenden Krebserkrankungen liegt das Prostatakarzinom mit 72 Jahren durchschnittlicher Lebenserwartung vergleichsweise hoch, 6 Jahre höher als für Krebserkrankungen insgesamt. Erste Erkrankungen treten kaum vor dem 50. Lebensjahr auf (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002).

Im Vergleich mit den übrigen Ländern der EU liegen die in Deutschland ermittelten Erkrankungsraten für Prostatakrebs im oberen Bereich. Die höchsten Raten finden sich in Schweden, Finnland und den Niederlanden. Die niedrigsten in Griechenland, Italien, Spanien und Portugal. Es zeichnet sich also ein deutliches Nord-Süd-Gefälle für das Prostatakarzinom ab, das auf den Einfluss des Lebensraums und der jeweiligen Lebens- und Ernährungsgewohnheiten als wichtigen ätiologischen Faktor hinweist. Möglich sind aber auch genetische Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Bevölkerungen an sich.

Im weltweiten Vergleich zeigen sich deutliche ethnische und geographische Unterschiede. Eine hohe Inzidenz besteht vor allem bei schwarzen, weniger ausgeprägt bei weißen US-Amerikanern, Schweden und Kanadiern. Japaner und Chinesen hingegen zeichnen sich durch eine besonders niedere Inzidenz aus (Hsing et al. 2000).

Eine Besonderheit des Prostatakarzinoms stellen die sog. latenten (stummen) Tumore dar. Diese klinisch unauffälligen Karzinome werden meist zufällig im Rahmen von Autopsiestudien entdeckt, treten aber erstaunlicherweise bei mehr als 30% der Männer über 45 Jahren auf (Dhom 1991; Dhom 1983) und weisen im Alter von 80 Jahren bereits eine Inzidenz von über 80% auf.

Im Gegensatz zum klinisch manifesten Karzinom treten beim latenten PCA offensichtlich keine ethnischen Unterschiede auf.

Dies kann als Hinweis dafür angesehen werden, dass in erster Linie Umweltfaktoren für die großen regionalen Unterschiede in der Inzidenz des klinisch manifesten PCAs

verantwortlich sein können, oder aber, dass die ethnischen/genetischen Unterschiede für die Tumorprogression relevant sind.

1.1.2 Ätiologie und Pathologie

Bei der Entstehung des Prostatakarzinoms wird eine mögliche vorhandene genetische Disposition bei Erkrankungsfällen in der Familie als einer der wichtigsten Risikofaktoren angesehen. Aber auch eine ganze Reihe exogener Faktoren erhöhen das Erkrankungsrisiko für das Prostatakarzinom wie sexuelle Aktivität, hoher Fettkonsum, hormonelle Faktoren, virale Infektion (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002), Übergewicht, Verzehr von rotem Fleisch (Ekman 1999), Alkoholkonsum (Putnam et al. 2000), Rauchen (Hsing et al. 1991), Cadmiumexposition (Elghany et al. 1990) und physische Aktivität (Cerhan et al. 1997). Welche Rolle dabei diesen exogenen im Vergleich zu genetischen Faktoren zukommt muss vorerst offen bleiben.

Bei 97% der PCA-Tumoren handelt es sich um Adenokarzinome, in seltenen Fällen treten auch Übergangs- oder Plattenepithelkarzinome auf. Das Karzinom ist in über 70% im peripher-dorsalen Anteil, in 15-20% im zentralen und in 10-15% im periurethralen Anteil (Transitional- oder Übergangszone) der Prostata lokalisiert. Die Ausbreitung des Tumors erfolgt primär zentral und erst in einem nächsten Schritt peripher. Dabei stellt die Prostatakapsel eine gewisse Barriere dar, bevor Samenblase, Blasenboden und in ca. 10% der Fälle der Harnleiter infiltriert werden. Die Metastasierung erfolgt überwiegend lymphogen über die periprostatistischen Lymphknoten.

Die Lymphknoten in der Fossa obturatoria, dem Raum zwischen Symphyse, Arteria und Vena iliaca externa, Arteria iliaca interna und dem Nervus obturatorius sind dabei die erste Station der lymphogenen Streuung. Sie dienen beim Lymphknotenstaging als Indikator für eine positive oder negative lymphogene Metastasierung. Hämatogene Fernmetastasen lassen sich überwiegend in Skelett, Leber und Lunge finden (Dhom 1976).

Die Stadieneinteilung erfolgt nach dem klassischen TNM-System. T0-4 steht hier für die Tumorgöße und die Tumorausdehnung; N0/1 kennzeichnet das Vorliegen von befallenen, regionären Lymphknoten und M0/1 gibt Auskunft über das Vorliegen von Fernmetastasen.

Bei dem vor allem im angloamerikanischen Raum verwendeten Gleason-Score handelt es sich um ein speziell für das Prostatakarzinom entwickeltes histopathologisches Gradingssystem, das die pathologischen Gewebeveränderungen mit einer Punktzahl von 1-5 bewertet.

Der Gleasonscore wird aus der Summe der am häufigsten und am zweithäufigsten beobachteten geweblichen Veränderungen gebildet. Je höher die erreichte Punktzahl, desto maligner und aggressiver der Tumor.

1.1.3 Diagnostik, Therapie und Prognose

Im Frühstadium eines Prostatakarzinoms treten keine Symptome auf, bei der Erstdiagnose finden sich daher in 50% der Fälle bereits ein organüberschreitender oder metastasierter Tumor.

Typische Symptome wie Miktionsbeschwerden treten erst in fortgeschrittenen Stadien auf und sind anamnestisch nicht von denen einer benignen Prostatahyperplasie zu unterscheiden.

Die Prostata-Vorsorgeuntersuchung wird ab dem 45. Lebensjahr jährlich empfohlen, bei Risikogruppen (Vorliegen von PCA bei Verwandten I. und II. Grades) schon ab dem 40. Lebensjahr.

Techniken zur Sicherung einer Diagnose sind die rektale Untersuchung, die transrektale Sonographie (TRUS) und die transrektale Saug- oder Stanzbiopsie der Prostata.

Immer wieder kontrovers diskutiert wird der Nutzen einer PSA-Wert- Bestimmung. Dabei handelt es sich um das prostataspezifische Antigen (PSA), das auch in normalem Prostatadrüsengewebe gebildet wird.

Der früher gebräuchliche Normalwert von 4ng/ml als Normalwert wurde durch einen altersspezifischen Grenzwert verbessert:

bis 50 Jahre 2,5 ng/ml, bis 60 Jahre 3,5ng/ml, bis 70 Jahre 4,5ng/ml und bis 80 Jahre 6,5 ng/ml.

Eine weitere Verbesserung der Spezifität wird durch die Bestimmung der PSA-Anstiegszeit erreicht. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit PCA eine deutlichere Zunahme der PSA-Serumkonzentration pro Jahr aufweisen (>0,75ng/ml/Jahr) im Vergleich zu Patienten mit einer gutartigen Prostataerkrankung.

PSA ist zu einem außerordentlich wichtigen Suchtest zur Früherkennung des Prostatakarzinoms geworden.

Leider gibt es aber auch Patienten mit einem normalen PSA und einem malignen Tumor, dessen Zellen so entartet sein können, dass sie kein PSA mehr produzieren. Daher kann der PSA-Wert immer nur als ein Hinweis verwendet werden und nie zum Ausschluss einer Tumorerkrankung.

Die Behandlung des PCA erfolgt in Abhängigkeit vom Tumorstadium sowie dem Alter und dem Allgemeinzustand des Patienten. Durch die Altersstruktur und die Co-Morbidität ist ein Vergleich der verschiedenen Therapiekonzepte schwierig.

Bei lokalisiertem Prostatakarzinom wird eine komplette Heilung angestrebt, die durch eine radikale Prostatektomie oder eine Strahlentherapie erreicht werden kann.

Ein „watchfull waiting“ impliziert, dass die Diagnose des Prostatakarzinoms gestellt wurde und dass so lange nicht therapiert wird, bis der Patient auf Grund lokaler Komplikationen oder Metastasen symptomatisch wird. Diese abwartende Haltung ist gerechtfertigt, wenn es sich um Patienten mit begrenzter Lebenserwartung von weniger als zehn Jahren, mit signifikanter Begleitmorbidität und mit hoch differenzierten, niedrig malignen Tumoren handelt.

Beim disseminierten, d.h. metastasierten Prostatakarzinom ist eine Heilung nicht mehr möglich. Ziel ist in diesen Fällen deshalb die Aufrechterhaltung der Lebensqualität für den Patienten.

Die meisten Prostatakarzinome sind androgenabhängig und ihr Wachstum wird durch Testosteron bzw. den Metaboliten Dihydrotestosteron stimuliert, eine Androgensuppression führt daher in ca. 80% zu einer Remission des Tumors. Diese Androgendeprivation kann chirurgisch (Orchiektomie) oder hormonell (LHRH - Analoga, Antiandrogene) erfolgen.

Kommt es erneut zu einer Progression des Karzinoms, können kombinierte Hormonchemotherapie, Chemotherapie und Analgetika eingesetzt werden (Brawer 1995).

Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt bei etwa 70%.

Bei der Prognose sind langsame Progressionen von aggressiven, metastasierenden Verlaufsformen zu unterscheiden, die häufiger bei Männern in unteren Altersgruppen auftreten.

Durch den frühzeitigen Tod an Prostatakrebs gehen Männern in Deutschland jährlich insgesamt 97.400 Lebensjahre verloren. Den Erkrankten gehen auf Grund des

hohen Erkrankungs- und Sterbealters durchschnittlich 3 Jahre an Lebenserwartung verloren (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2002).

1.2 PCA als hereditäre Erkrankung

1.2.1 Familiäre Häufung

In den meisten Fällen liegt das Prostatakarzinom sporadisch vor, d.h. in der Familie ist lediglich ein Angehöriger an Prostatakarzinom erkrankt. Aber bereits im Jahr 1956 machte Morganti darauf aufmerksam, dass das Prostatakarzinom in manchen Familien gehäuft vorkommt (Morganti et al. 1956). Eine familiäre Disposition wurde bald als Hinweis auf ein Erkrankungsrisiko anerkannt.

Diese Beobachtung wurde eindrucksvoll durch Studien an den großen Mormonenfamilien, den sog. Utah-Familien, bestätigt. Hier fanden sich zum Teil über 20 Erkrankungsfälle innerhalb einer Familie (Cannon et al. 1982).

Heute geht man davon aus, dass etwa 10 –15% der PCA-Fälle familiär auftreten, d.h. dass mindestens ein weiteres Familienmitglied ebenfalls an Prostatakrebs erkrankt ist (Narod et al. 1998).

Neben den möglichen exogenen Ursachen und dem ethnischen Hintergrund gilt heute eine positive Familiengeschichte als deutlichster Risikofaktor für eine Prostatakarzinomerkrankung. Durchschnittlich besteht ein etwa zweifach erhöhtes Risiko bei Angehörigen eines betroffenen Verwandten I. Grades. Mit zunehmender Zahl der Betroffenen bzw. abnehmendem Manifestationsalter steigen die relativen Risiken für Angehörige.

Allerdings muss dabei beachtet werden, dass aufgrund der hohen PCA - Inzidenz in der Bevölkerung zwei oder mehr sporadische Erkrankungsfälle auch zufallsbedingt in einer Familie auftreten können.

1.2.2 Unterscheidung familiär - hereditär

Wegen der Schwierigkeit einer korrekten Zuordnung wurden 1993 von Carter und Mitarbeitern Kriterien formuliert, die eine Klassifizierung von erblich bedingten

(hereditären) und gehäuft in Familien auftretenden bzw. sporadischen Fällen ermöglichen sollen.

Ein hereditäres Prostatakarzinom entsprechend der sog. Carter-Kriterien liegt dann vor, wenn eine Familie

- drei Betroffene in aufeinanderfolgenden Generationen,
- mindestens drei Betroffene Verwandte I. Grades oder
- zwei Brüder mit einem Erkrankungsalter unter 55 Jahren aufweist.

(Carter et al. 1993)

Dieser Definition folgend werden gegenwärtig knapp 10% der PCA – Fälle als hereditär eingestuft. Eine sichere Unterscheidung von hereditären und nicht-hereditären Fällen, wie z.B. bei der familiären Adenomatosis Polyposis (FAP) oder dem familiären Mammakarzinom durch molekulargenetische Diagnostik, ist beim PCA derzeit nicht möglich. Auch klinische oder histologische Kriterien erlauben keine Unterscheidung. Lediglich ein frühes Erkrankungsalter könnte erste Hinweise auf eine erbliche Prädisposition geben.

1.2.3 Nachweismethoden genetisch bedingter Erkrankungen

Für eine vererbliche Komponente bei der Entstehung des PCA spricht das Auftreten von zahlreichen Prostatakarzinomen in einzelnen Familien und die damit verbundenen erhöhten relativen Risiken für Verwandte erkrankter Personen.

Diese Zusammenhänge wurden in zahlreichen Fall-Kontrollstudien belegt (Woolf 1960; Glover et al. 1998; Keetch et al.1995).

In einer Kohortenstudie zeigte Goldgar et al. die familiäre Häufung bei 28 Krebserkrankungen auf der Grundlage von Registerdaten der Bevölkerung in Utah, USA. Auch diese Studie zeigte für das Prostatakarzinom für Angehörige I. Grades ein familiäres relatives Risiko (FRR) von 2,21 (95%-Konfidenzintervall: 2,05-2,38) bzw. für ein PCA vor dem 60. Lebensjahr von 4,1 (95%-Konfidenzintervall: 2,0-7,1) (Goldgar et al. 1994).

In Zwillingsstudien, die als der klassische Beweis für die Bedeutung genetischer Ursachen gelten, wurde eine vierfach höhere Konkordanzrate monozygoter Zwillinge gegenüber dizygoten Zwillingen gefunden (Page et al. 1997; Gronberg et al. 1994)

Der Unterschied in den beobachteten Konkordanzraten ist dem höheren Anteil an gemeinsamen Genen monozygoter Zwillinge zuzuschreiben.

Aufgrund dieser Ergebnisse von Fall-Kontroll-Studien, Kohortenstudien und Zwillingsstudien ist eine genetische Ursache für einen Teil der auftretenden Prostatakarzinome gesichert.

Manche Autoren gehen bei einem möglichen Vererbungsmodus von einem rezessiven oder X-chromosomalen Modell aus, da sie ein höheres relatives Risiko für Brüder im Vergleich zu Vätern Betroffener beobachten (Narod et al. 1995; Monroe et al. 1995).

Dagegen ergaben diverse Segregationsanalysen die höchste Wahrscheinlichkeit für ein autosomal-dominantes Vererbungsmodell, dessen Gen eine geschätzte Frequenz von 0,003-0,016 und eine geschätzte Penetranz von 63-88% bedingen soll (Schaid et al. 1998; Gronberg et al. 1997; Carter et al. 1992).

Für diese epidemiologischen Studien muss man annehmen, dass sich eine dominante Vererbung wesentlich leichter (mit höherer Sensitivität) entdecken lässt als ein rezessiver Erbgang, der kaum von Umweltfaktoren oder von X-chromosomaler Vererbung trennbar ist.

In einem weiteren Schritt versucht man durch genetische Analysen einen Locus oder im Idealfall ein oder mehrere Gene einzugrenzen, die für eine Prädisposition in Verbindung mit Prostatakarzinom in Frage kommen.

Im Wesentlichen gibt es 2 Untersuchungsansätze, um in einer Situation wie beim PCA (eine Vielzahl sporadischer Fälle steht einem Anteil genetisch bedingter familiärer Fälle gegenüber) genetische Faktoren zu identifizieren, wobei beide Ansätze auf unterschiedliche Probandenkollektive zurückgreifen, unterschiedliche Typen von Prädispositionen erfassen und damit zu ganz verschiedenen Aussagen führen.

Der eine Ansatz ist die klassische Kopplungsanalyse, wie sie seit langem mit über das ganze Genom verstreuten Markern als „genome wide scan“ durchgeführt wird und als Ziel die Identifikation eines entsprechenden Gens durch eine Positionsklonierung hat.

Dieser zweite Ansatz prüft in Form einer Fallkontrollstudie, ob bestimmte Allele eines bestimmten Gens zum Auftreten oder zur Manifestation eines PCAs beitragen und deshalb bei Betroffenen häufiger zu finden sind als bei Kontrollen.

Er hat zur Voraussetzung, dass der zu untersuchende DNA-Marker sehr eng benachbart (i.d.R. nur einige wenige tausend Basenpaare) bei derjenigen Sequenzveränderung der DNA liegt, die für die Risikoerhöhung verantwortlich ist.

Bislang sind solche Assoziationsstudien deshalb nur innerhalb eines bestimmten Locus oder bei Kandidatengenomen möglich. Eine genomweite Suche würde einerseits einen enormen Stichprobenumfang und andererseits eine enorm große Zahl von Markern (weit mehr als 100 000) erfordern, so dass weitere technische Entwicklungen abzuwarten sind, bevor ein solcher Ansatz sinnvoll wäre.

Eine Übersicht der Vielzahl von Assoziationsstudien wurde von Ostrander und Stanford (Ostrander u. Stanford 2000) sowie von Vogel veröffentlicht (Vogel et al. 2003).

1.3 Die Kopplungsanalyse

1.3.1 Mikrosatelliten-Marker

Mit Hilfe der Kopplungs- oder Linkageuntersuchung kann die Kosegregation eines Phänotyps mit einem bestimmten Locus, der für ein einzelnes Gen oder eine bestimmte Gensequenz steht, untersucht werden. Der jeweilige Genotyp wird dabei mit Hilfe sogenannter Mikrosatelliten-Markern bestimmt. Diese bestehen vor allem aus (CA)_n-Wiederholungen, sogenannte VNTRs (variable number of tandem repeats). Dinucleotid-Wiederholungen führen bei der PCR-Amplifizierung jedoch leicht zu Verschiebungen der Replikation, so dass jedes Allel im Gel eine Reihe sogenannter „Stotterbanden“ zeigt. Dies kann bei der Interpretation der Ergebnisse zu Problemen führen. Repetitive Tri- und Tetranucleotidsequenzen führen im allgemeinen zu eindeutigeren Resultaten – mit einer einzigen Bande für jedes Allel. Grosse Anstrengungen werden darauf verwendet, passende Sätze von Mikrosatelliten-Markern herzustellen, die sich zusammen in Multiplex-PCR-Ansätzen amplifizieren lassen und deren Allele sich nicht aufgrund ihrer Grösse im Gel überlagern, so dass man sie in einer Spur auftragen kann. Durch die inzwischen mögliche Fluoreszenzmarkierung mit verschiedenen Farbstoffen und durch Verwendung automatisierter Gelverfahren wurde die Genkartierung entscheidend beschleunigt und vereinfacht.

1.3.2 Bestimmung von Kopplung

Je näher zwei Genorte zueinander liegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie gemeinsam vererbt werden bzw. umso kleiner ist die Wahrscheinlichkeit einer Rekombination zwischen ihnen.

Bei nichtgekoppelten Genorten ist die Rekombinationsrate $\theta = 0,5$, bei gekoppelten ist $\theta < 0,5$. Die Rekombinationsrate θ korreliert mit dem Abstand zweier Genorte, der in Morgan (M) gemessen wird. Ein Morgan entspricht dabei derjenigen DNA-Länge, in der durchschnittlich ein Cross-over-Ereignis pro Meiose zu erwarten ist.

Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein einer Kopplung wird statistisch mit dem LOD- (Logarithm of the odds-) Score ausgedrückt.

Der LOD-Score drückt das Log₁₀-Verhältnis zwischen der Wahrscheinlichkeit für eine konkrete Familienkonstellation bei einer geschätzten Rekombinationsrate und der Wahrscheinlichkeit für diese konkret beobachtete Familienkonstellation bei einer Rekombinationsrate von $\theta = 0,5$ (keine Kopplung) aus.

Die in einzelnen Familien eines zu testenden Kollektivs ermittelten LOD-Scores dürfen addiert werden, da dies der Multiplikation von Wahrscheinlichkeiten unabhängiger Fälle entspricht.

Die Analyse bei Kopplungsuntersuchungen kann parametrisch unter der Annahme bestimmter Voraussetzungen wie der Frequenz eines Suszeptibilitätsallels, der altersabhängigen Penetranz oder der Phänokopierate erfolgen.

Bei der Variante der parameterfreien Analyse werden sogenannte NPLZ-Scores (nonparametric linkage) auf der Grundlage beobachteter und erwarteter Allelübereinstimmungen bei betroffenen Verwandten berechnet.

Beweisend für die Kopplung des untersuchten Phänotyps mit einem Locus gelten nach allgemeiner Konvention LOD-Werte von mindestens 3,0; für Werte kleiner als -2,0 ist eine Kopplung auszuschließen. Jedoch sind diese Werte für genomweite Analysen definiert worden, bei denen mit 200 Markern und mehr gearbeitet wird. Für die Untersuchungen einzelner Chromosomen oder Chromosomenabschnitte sind diese Grenzwerte unter Umständen nicht verwendbar und nicht erreichbar. Sie müssen für Analysen mit einer geringen Anzahl von Markern angepasst oder entsprechend interpretiert werden.

1.3.3 Übersicht der wichtigsten bisherigen Ergebnisse

Es wurden seit vielen Jahren große Anstrengungen unternommen und zahlreiche genomweite Linkage-Untersuchungen wurden in unterschiedlichen Patientenkollektiven weltweit durchgeführt. Die bisherigen Ergebnisse sind sehr uneinheitlich und mittlerweile gibt es auf jedem Chromosom mindestens eine, manchmal mehrere Regionen, die verdächtig sind, ein für das Prostatakarzinom ursächliches Gen zu enthalten.

Die Tabelle 1 gibt einen kurzen Überblick über die initialen Ergebnisse der ersten Kopplungsuntersuchungen zum Prostatakarzinom.

Tabelle 1: Überblick der Ergebnisse der ersten Kopplungsuntersuchungen zum Prostatakarzinom

Bezeichnung	Position	Autor	Familien	Mittleres Erkrankungsalter	NPL	Twopoint-LOD-Score	Multipoint-LOD-Score
HPC 1/ RNASEL	1q24-25	Smith et al. 1996	66 nordamerikanische + 12 schwedische	64,9 (39-85)	4,16	3,65	5,43
PcaP	1q42,2-43	Berthon et al. 1998	47 französische und 9 deutsche, davon 9 mit e.o.	65,9 (41-85)	3,1 / e.o.: 3,32	2,7 / e.o.: 3,31	2,2 / e.o.: 3,3
HPCX	Xq27-28	Xu et al. 1998	262 nordamerikanische, 57 finnische und 41 schwedische	66,3 (39-93)	/	4,60	3,85
CAPB	1p36	Gibbs et al. 1999	71 nordamerikanische Familien	66,5	2,24	3,22	1,85
HPC20	20q13	Berry et al. 2000	162 Familien der Mayo-Klinik	66,5 (47-77)	3,02	2,69	3,02
ELAC2 /HPC2	17p11	Tavtigian et al. 2001	298 Utah-Hochrisiko-Familien	68,3	/	4,5	/
MSR1	8p22-23	Xu et al. 2001	159 nordamerikanische HPC-Familien	59,3	2,16	1,73	/

LOD-Score: Wert des „Logarithm of the odds“, Wahrscheinlichkeit für die Kopplung von Genen
 NPL: Non-parametric-LOD-Score, Ergebnis für eine parameterfreie Analyse

In einer weiteren Studie von Suarez (Suarez et al. 2000) fanden sich positive Signale für die Chromosomen 2q, 12p, 15q, 16p und 16q.

Mit einem dominanten Modell auf den Chromosomen 10,12 und 14 sowie mit einem rezessivem Modell auf den Chromosomen 1, 8, 10 und 16 konnte Gibbs LOD-Werte größer 1,5 errechnen (Gibbs et al. 2000).

Mit einer modellfreien Kopplungsuntersuchung wurden für die Chromosomen 1, 4, und X positive LOD- Werte gefunden (Goddard et al. 2001).

Auf 17p11 wurde durch eine Kopplungsuntersuchung ELAC/HPC2 als Kandidatengen identifiziert und bei einer anschließenden Analyse konnten Sequenzvarianten entdeckt werden, die gemeinsam mit dem PCA vererbt wurden. Zum ersten Mal gelang es in diesem Zusammenhang das ELAC2-Gen zu klonieren, dessen Funktion allerdings noch nicht vollständig geklärt ist (Tavtigian et al. 2001).

Ein weiteres Kandidatengen wurde auf 8p22-23 in einer Subgruppe von Familien mit einem Durchschnittsalter von weniger als 65 Jahren zum Diagnosezeitpunkt gefunden (Xu et al. 2001). Aufmerksam auf diesen Locus wurde man dadurch, das ein „Loss of heterozygosity“ von Markern auf 8p als eine der häufigsten Alterationen des PCAs beschrieben wurden (Cunningham et al. 1996). Diese Ergebnisse führten zur Isolierung eines auf 8p22-23 lokalisierten Gens PG1 mit bislang unbekannter Funktion (Cohen et al. 1999).

In dieser Region konnten in der Zwischenzeit auch im MSR1-Gen auf 8p22 Mutationen gefunden werden, die in betroffenen Familien mit dem Prostatakarzinom kosegregieren (Xu et al. 2001).

In einer weiteren Untersuchung von Witte et al. wurde der Frage nachgegangen, warum manche PCAs lebenslang latent bleiben, während andere sich zu aggressiven, metastasierenden und lebensbedrohlichen Tumoren entwickeln (Witte et al. 2000). Bei der Suche nach dem sog. Tumor-Aggressiveness-Locus fanden sich in den Regionen 5p1.3-33.3, 7q32.3 und 19q12 positive Signale, jedoch ist in diesem Zusammenhang die Isolierung eines einzelnen Gens noch nicht in Sicht.

1.3.4 Probleme bei komplexen Erkrankungen

Die Ergebnisse dieser angeführten Untersuchungen, sowie zahlreiche andere Studien weisen auf eine große Heterogenität in der Vererbung des Prostatakarzinoms hin, mittlerweile wird diese Heterogenität als bewiesen angenommen (Hsieh et al. 2001). Damit kommt nicht die Sequenzvariante eines einzelnen Gens für die Entstehung des Prostatakarzinoms in Frage, sondern es handelt sich um mehrere Gene alternativ oder eine Kombination aus unterschiedlichen Genen; zudem können in unterschiedlichen Kollektiven auch unterschiedliche Gene beteiligt sein.

Diese genetische Komplexität ist Ursache dafür, dass die zuvor genannten Suszeptibilitätsgene nicht oder nicht zwangsläufig durch nachfolgende Studien signifikant bestätigt werden konnten.

Mit ausreichender Anzahl von Suszeptibilitätsgenen ist es durchaus wahrscheinlich, dass eines oder mehrere dieser Gene zwar zufällig in einem Kollektiv vorherrschen und daher auch in einer Kopplungsuntersuchung entdeckt werden. Es ist jedoch höchst unwahrscheinlich, dass in einer Replikationsstudie also einem anderen Kollektiv, welche dasselbe Gen untersucht, derselbe Zufall eintritt und wiederum dieses Gen vorherrscht. Es ist also vorhersehbar, dass Replikationsstudien in vielen Fällen in ihrem Versuch fehlschlagen, das gefundene Suszeptibilitätsgen zu bestätigen; es sei denn, in der Replikationsstudie sind fünf- bis zehnmal mehr Familien verfügbar als in der ursprünglichen Studie – was, wenn man den Aufwand bedenkt, der bereits zur Etablierung des Originalkollektivs nötig ist, in den seltensten Fällen realisierbar sein dürfte (Otto 1999).

In Replikationsstudien eines signifikanten Ergebnisses werden bereits Wahrscheinlichkeitswerte von 0,01-0,05 beziehungsweise LOD-Werte von über 1,0 als signifikant betrachtet (Lander u. Kruglyak 1995).

Bei einer genomweiten Untersuchung werden dagegen viele Marker auf vielen „Vererbungseinheiten“ verwendet, man spricht in diesem Fall von „multiplem Testen“. Da bei vielen Tests „Zufallstreffer“ wahrscheinlicher sind als nur bei

einem Test, muss man in diesem Fall die Grenzen der Wahrscheinlichkeitswerte für ein signifikantes Ergebnis nach unten korrigieren.

Im Rahmen dieser Problematik bedingt durch die genetische Komplexität des Prostatakarzinoms wurden folgende drei Prinzipien aufgestellt (Ostrander u. Stanford 2000):

1. Die Anzahl der Gene, die am Prostatakarzinom beteiligt sind, ist groß genug, dass zwar in einer ursprünglichen Kopplungsuntersuchung durch Zufall ein bestimmtes Gen im Kollektiv bevorzugt auftritt und der Locus entdeckt werden kann, es jedoch unwahrscheinlich ist, dass in einer nachfolgenden Studie nochmals dasselbe zufällige Ereignis auftritt.
2. Bei genetisch heterogenen Krankheiten ist die modellfreie Analyse vorzuziehen, da für die unterschiedlichen beteiligten Gene unterschiedliche Modelle zutreffen können. Das jeweils zutreffende Modell ist nicht mit Sicherheit vorhersehbar. Ein falsches Modell wird zwar kaum zu falsch-positiven, kann jedoch zu falsch-negativen Ergebnissen führen.
3. Die Bildung homogener Subgruppen ist sowohl zur Identifizierung als auch zur Bestätigung von Suszeptibilitätsgenen eine effektive Strategie, da dieses Vorgehen die Heterogenität vermindert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die gefundenen Loci durchaus als „reell“ eingestuft werden können, auch wenn sie in nachfolgenden Studien nur nicht signifikant oder überhaupt nicht bestätigt werden konnten.

Eine Übersicht zu Kopplungsuntersuchungen und Replikationsstudien findet sich bei Ostrander und Stanford (Ostrander u. Stanford 2000).

Neben der genetischen Heterogenität und Komplexität erschweren noch einige spezielle Voraussetzungen den Aufbau eines geeigneten Kollektivs:

- Die problematische Differenzierung zwischen hereditären und sporadischen Fällen,
- die möglicherweise unvollständige Penetranz der Suszeptibilitätsgene,
- das späte Manifestationsalter,
- sowie die extrem hohe Prävalenz, die eine hohe Phänotypierate erwarten lässt.

1.4 Das Chromosom 20

1.4.1 Allgemeines

In der Nature Ausgabe 414 im Dezember 2001 wird die vollständige Sequenzierung und Analysierung des Chromosoms 20 beschrieben (Deloukas et al. 2001).

Demnach besteht die Sequenz des metazentrischen Chromosom 20 aus 59.187.298 Basenpaaren; 727 Genen und 168 Pseudogenen.

Man stellte in dieser Untersuchung fest, dass der durchschnittliche G-C-Gehalt bei 44,1% und damit über dem genomweiten Durchschnitt von 41% liegt. Dieser erhöhte Gehalt wird mit einer überdurchschnittlichen Transkriptionsrate gleichgesetzt.

Der Proteinindex ähnelt dem des übrigen menschlichen Proteoms, lediglich 4 Domänen kommen häufiger vor:

- der Cystein-Proteinase-Inhibitor (IPR000010)
- eine Immunoglobulin Unterart (IPR003599)
- das Milchsäureprotein (WAP) (IPR00222)
- der pankreatische Trypsin-Inhibitor (Kunitz/Bovine) (IPR002223)

Am bekanntesten ist das Chromosom 20 dafür, dass das auslösende Gen für die Creutzfeld-Jakob-Erkrankung (PRNP) und die schwere kombinierte Immunschwäche (ADA) auf ihm lokalisiert ist.

Einige seltenere Gendefekte auf Chromosom 20 werden für mehrere Syndrome, wie etwa das Algaille- (JAG1) (Li et al. 1997), das McKusick-Kaufman- (MKKS) (Stone et al. 2000) und das Hallervorden-Spatz-Syndrom (PANK2) (Zhou et al. 2001) verantwortlich gemacht.

Aber auch bei der Entstehung multifaktorieller Erkrankungen, z.B. dem Typ 2 Diabetes, der Adipositas, dem Katarakt und dem Morbus Basedow wird eine Beteiligung des Chromosom 20 vermutet.

Neben den bereits erwähnten Hinweisen auf einen für das hereditäre Prostatakarzinom verdächtigen Locus 20q13 (Zheng et al. 2001 6; Berry et al. 2000) wird auch eine Verbindung mit Brustkrebs auf 20q13.2 erwähnt (Collins et al. 2001) und ein häufiger „Loss of Heterozygosity“ (LOH) in dieser Region beobachtet (Bench et al. 1998; Rigaud et al. 2001).

Ein Zusammenhang zwischen einem Tumorsuppressorgen auf dem Chromosom 20p 11.23-12 und der Metastasierung des Prostatakarzinoms konnte ebenfalls durch eine Studie belegt werden (Goodarzi et al. 2001).

1.4.2 HPC20

Die Bezeichnung HPC20 für ein Suszeptibilitätsgen auf dem Chromosom 20 wurde von Berry et al. erstmals in ihrer genomweiten Kopplungsuntersuchung an 162 nordamerikanischen Prostatafamilien (≥ 3 betroffene Angehörige) der Mayo Klinik Rochester geprägt (Berry et al. 2000).

Dieses Kollektiv setzte sich aus 161 Familien weißer Abstammung und einer Familie mexikanischer Abstammung zusammen. Für das gesamte Kollektiv ergab sich ein maximaler Two-point LOD-Score von 2.69 für den Marker D20S196, sowie ein maximaler Multipoint NPL-Score von 3.02 ($P = 0,002$) für den Marker D20S887.

Nach Durchführung von Stratifizierungen nach den Kriterien

- < 5 betroffene Angehörige in der Familie
- ein spätes durchschnittliches Diagnosealter und
- das Nichtvorhandensein einer „male-to-male transmission“

ergab sich für die Gruppe ($n = 19$), die diesen 3 Voraussetzungen entsprach ein Multipoint NPL-Score von 3.69 ($P = 0,0001$) für den Marker D20S893 auf 20q13 und ein weiterer kleinerer Peak für den Marker D20S186 auf 20p.

Das höchste beobachtete Ergebnis mit einem Multipoint NPL-Score von 3.94 ($P = 0,00007$) trat in der Gruppe auf, in der keine „male-to-male transmission“ vorlag.

Das hohe Ergebnis innerhalb dieser Subgruppe könnte als Hinweis auf ein X-chromosomales Vererbungsmodell interpretiert werden. Daraufhin wurde mit Hilfe der Analyseprogramme „GeneHunter Plus“ und „HOMOG 3R“ eine mögliche Interaktion zwischen Chromosom 20 und dem X-Chromosom getestet, die aber nicht bestätigt werden konnte.

Die Frage, ob ein dominantes oder rezessives Modell wahrscheinlicher ist, konnte mit den erhobenen Daten ebenfalls nicht geklärt werden. Mit beiden Modellen ergaben sich ähnliche Ergebnisse.

Insgesamt ergaben sich jedoch statistisch korrekte Daten und Berry et al. führten mit ihrem HPC20 einen bisher unbekanntem, neuen Lokus auf 20q13 ein.

In einer Untersuchung an 159 HPC-Familien (≥ 3 betroffene Angehörige) des John Hopkins-Hospitals versuchten Zheng et al. den Lokus HPC20 zu bestätigen (Zheng et al. 2001). Die Ergebnisse waren zwar positiv, aber nicht statistisch signifikant mit dem höchsten nicht-parametrischen NPL-Score von 1,02 ($P = 0,15$) für den Marker D20S195 auf 20q11, berechnet für das gesamte Kollektiv.

Ebenso wie in der Originalstudie von Berry et al. fanden sich höhere Ergebnisse in den Stratifizierungen nach einem höheren durchschnittlichen Diagnosealter, weniger als 5 betroffene Angehörige und dem Nichtvorhandensein von „male-to-male transmission“. Allerdings zeigte sich in der Untergruppe, die allen drei Stratifizierungsmerkmalen entsprach kein Hinweis mehr auf Kopplung, weder in der parametrischen, noch in der nichtparametrischen Analyse.

Bemerkenswert ist an dieser Studie auch, dass die Beiträge zu einem positiven Kopplungsergebnis von 133 Familien kaukasischer Herkunft stammten, mit einem maximalen NPL-Score von 1,11 ($P = 0,13$) für den Marker D20S186, während der NPL-Score der 14 afroamerikanischen Familien in allen Fällen null ergab.

Diese Ergebnisse können statistisch nicht als Beweis des HPC20, sondern lediglich als ein Hinweis gewertet werden.

In einem weiteren Versuch den Lokus HPC20 zu bestätigen untersuchten Bock et al. 172 HPC-Familien des „Prostate Cancer Genetics Project (PCGP)“ der

Universität Michigan (Bock et al. 2001). Das über alle Familien berechnete Ergebnis konnte mit einem HLOD von 0,09 ($P = 0,39$) für den Marker D20S171 den HPC20-Lokus nicht bestätigen. Lediglich in einer Untergruppe des Gesamtkollektivs mit 16 afroamerikanischen Familien errechnete sich ein LOD-Score von 0,86 und ein Z-Score von 1,99 ($P = 0,023$) in einem Bereich zwischen den Markern D20S893 und D20S120 in der Nähe des eigentlichen HPC20-Lokus.

Das Ergebnis innerhalb dieser Untergruppe kann aber bestenfalls als ein Hinweis auf eine mögliche Kopplung gewertet werden, die Ergebnisse der kompletten Untersuchung können eine Kopplung für HPC20 in diesem Kollektiv nicht bestätigen.

1.5 Fragestellung

Die bislang durchgeführten Kopplungsuntersuchungen zum Prostatakarzinom zeigen keine einheitlichen Ergebnisse. Mittlerweile gilt es als bewiesen, dass es sich beim PCA um eine sehr stark heterogenetische Erkrankung handelt. Demnach ist an der Entstehung der Erkrankung sicher nicht nur ein Gen beteiligt, sondern man geht davon aus, dass unterschiedliche Gene beteiligt sind. Auch ein Zusammenspiel von mehreren verschiedenen Genen erscheint sehr wahrscheinlich. Die bisherigen Ergebnisse haben aber auch gezeigt, dass in unterschiedlichen Kollektiven auch jeweils unterschiedliche Gene eine Rolle spielen.

Das Chromosom 20 könnte mit dem HPC20-Lokus eine Rolle bei der Entstehung des Prostatakarzinoms spielen. Diese Vermutung scheint möglich, da das Chromosom 20 auch bei der Entwicklung von anderen malignen Erkrankungen eine Rolle spielt und so den Verdacht auf ein mögliches Tumorsuppressorgen in dieser Region nahe legt.

Wie bereits erwähnt konnte auch ein Tumorsuppressorgen auf Chromosom 20 in einer Studie nachgewiesen werden, das die Metastasierung des Prostatakarzinoms beeinflusst (Goodarzi et al. 2001).

Ziel der von mir durchgeführten Studie war es zu untersuchen, ob in dem Kollektiv der Ulmer Prostatafamilien eine Kopplung zum HPC20 vorliegt.

Dafür sollten in 108 Familien die Allele für 7 polymorphe Marker des Chromosoms bestimmt und eine Linkageuntersuchung durchgeführt werden. Die Daten können danach mit Hilfe verschiedener Analyseprogramme und durch Stratifikation genauer untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Patienten

Grundlage einer Kopplungsuntersuchung ist ein geeignetes Testkollektiv, in dem das vermutete Kandidatengen segregiert.

Bei der Suche nach einem für das Prostatakarzinom verantwortlichen Gen, sind demnach Familien mit möglichst vielen erkrankten Angehörigen erfolgsversprechend. Jedoch kämpft man dabei mit dem für das Prostatakarzinom typischen Problem der hohen Phänokopierate; mehrere erkrankte Angehörige in einer Familie können lediglich ein Hinweis auf ein verursachendes Gen sein, aber keinesfalls ein Beweis.

Die Familien mit Fällen von Prostatakarzinom, die in diese Untersuchung eingingen, wurden von der Urologischen Abteilung der Universitätsklinik Ulm in Zusammenarbeit mit 140 Urologischen Kliniken, 117 niedergelassenen Urologen und 13 Rehabilitationskliniken rekrutiert.

Insgesamt wurden 5750 Patienten mit Prostatakarzinom kontaktiert.

Anhand der Ergebnisse eines Fragebogens wurden die Patienten, die mindestens einen weiteren Angehörigen mit Prostatakarzinom hatten, der Gruppe des familiären Prostatakarzinoms zugeordnet. Man versuchte im Anschluss von möglichst vielen Betroffenen innerhalb dieser Gruppe und deren Angehörigen Blut für eine DNA-Analyse zu erhalten.

Bei den übrigen Patienten ging man vom Vorliegen einer sporadischen Erkrankung aus.

Die Daten dieser Untersuchung stammen von 108 Familien mit insgesamt 277 Betroffenen, 354 verfügbaren DNA-Proben und zusätzlichen Informationen wie Erkrankungsalter, TNM-Stadium (für 202 Betroffene verfügbar), Grading (für 186 Betroffene verfügbar), Gleason-Score (für 64 Betroffene verfügbar) und die jeweiligen Familienstammbäume.

Das mittlere Erkrankungsalter lag bei den familiären Patienten bei 64,1 Jahren (41 – 89), bei den sporadischen Fällen bei 64,6 Jahren (39 – 90).

Unabhängig von der Anzahl der PCA-Fälle, lag das durchschnittliche Erkrankungsalter der Angehörigen innerhalb einer Familie bei ca. 64 Jahren.

Im Schnitt fanden sich 2,8 Betroffene pro Familie; große Prostatakarzinomfamilien mit mindestens fünf Angehörigen sind in der deutschen Bevölkerung verglichen mit Amerika sehr selten.

Die Analyse der Stammbäume ergab für 42 % der Familien eine Konstellation, die auf einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus schließen lässt.

Es erfolgte eine Einteilung der Familien nach den folgenden Hereditätskriterien in fünf Ulmer Kategorien, die auch zur Stratifizierung in homogenere Subgruppen benutzt wurden:

Kategorie I: Mindestens drei Betroffene ersten Grades oder Betroffene in drei aufeinanderfolgenden Generationen oder zwei Brüder mit einem Erkrankungsalter unter 55 Jahren = Familien, die die Hereditätskriterien nach Carter (Carter et al 1993) erfüllen.

Kategorie II: Mindestens drei Betroffene in einer Nicht-Kategorie I-Familie oder mindestens zwei gesicherte und zwei anamnestische Fälle.

Kategorie III: Zwei gesicherte Fälle und ein anamnestischer Fall.

Kategorie IV: Zwei Brüder mit einem Erkrankungsalter über 55 Jahren.

Kategorie V: Zwei Cousins oder Onkel und Nefte oder Großvater und Enkel.

2.2 Molekulargenetische Methoden

Bei der Durchführung der geforderten molekulargenetischen Verfahren habe ich mich an die Angaben des Standardwerks „Molecular Cloning“ gehalten (Maniatis et al. 1989).

Bei Kits wurde nach Herstellerangaben vorgegangen.

Hier in Kürze einige Aspekte ausgeführt:

2.2.1 DNA-Präparation

Die in der Analyse verwendete genomische DNA wurde aus EDTA-Vollblut isoliert.

Hierfür wurden 10 ml EDTA-Vollblut in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegossen und mit 30 ml Lysis-Puffer (Amonium-Chlorid) 10 bis 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dabei mehrmals invertiert, was zu einer differentiellen Lyse der Erythrozyten führte.

Nach 10 Minuten Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C wurde der Überstand, in dem sich nun Proteine und Erythrozytenreste befanden, verworfen.

Das Sediment mit den kernhaltigen Zellen wurde mit 10 ml Lysis-Puffer resuspendiert und unter den genannten Bedingungen erneut für 10 Minuten zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf).

Anschließend wurde das Sediment nach Abkippen des Überstands in 5 ml SE-Puffer aufgenommen und nach Zugabe von 50 µl Proteinase K und 250 µl SDS (20%) über Nacht bei 37°C zur Lyse der Zellen und zum Abbau des Hauptanteils der Proteine inkubiert.

Die verbleibenden Proteine und Zelltrümmer wurden mit 1,8 ml NaCl (6 M) ausgefällt und bei 400 rpm mit Raumtemperatur für 15 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand mit der darin verbliebenen DNA wurde in ein neues Gefäß überführt und mit dem doppelten Volumen 100 % Ethanol aufgefüllt, wodurch die DNA ausfiel und mit Hilfe eines Glasspatels herausgefischt werden konnte. Das

DNA-Knäuel wurde in 70 % Ethanol gewaschen und in 100 – 500 µl TE-Puffer (Tris-EDTA-Puffer) gelöst.

Vor Gebrauch wurde die DNA-Lösung auf 50 ng / µl verdünnt.

2.2.2 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) von verdünnter DNA (1:50) in Quarzküvetten mit Hilfe eines Spektralphotometers (AP-Biotech).

Dabei wird jeweils bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäure und bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum von Proteinen gemessen.

Anschließend kann die DNA-Konzentration nach dem Lambert-Beer-Gesetz berechnet werden, wonach die Extinktion (E) einer Lösung proportional ist zu der Konzentration (c) der darin gelösten lichtabsorbierenden Substanz, ihrem molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) und der Schichtdicke (d) der Lösung.

Lambert-Beer-Gesetz: $E = \epsilon * c * d$

Die Messung der OD₂₈₀ dient der Überprüfung des Reinheitsgrades, da das Verhältnis von OD₂₆₀/OD₂₈₀ den Grad der Verunreinigung der Probe angibt.

Ein Quotient von 1,8 - 2,0 lässt auf einen genügend hohen Reinheitsgrad schließen. Die DNA-Konzentration beträgt bei einer Schichtdicke der Küvette von 1cm 50ng/µl doppelsträngiger DNA.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine zellunabhängige Art der DNA-Klonierung, die Mitte der achtziger Jahre von Mullis et al. entwickelt worden ist. Mit ihrer Hilfe kann man definierte Ziel-DNA-Sequenzen eines bestimmten

Ausgangsmaterials, wie etwa der gesamten genomischen DNA, in vitro schnell vervielfältigen.

Man benötigt dazu zwei ca. 15-20 Nukleotide lange Primer (Amplimere), welche die gewünschte DNA-Zielsequenz einrahmen und spezifisch an die komplementären Sequenzen der denaturierten genomischen DNA binden.

Wenn eine hitzestabile DNA-Polymerase, meist die sogenannte Taq-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*, sowie als DNA-Vorstufen die vier Desoxynucleosidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP, dTTP vorhanden sind, können die Amplimere die Synthese neuer DNA-Stränge starten. Dabei sind die neuen DNA-Stränge komplementär zu den einzelnen DNA-Strängen der gesuchten Ziel-Sequenz und überlappen einander.

Die neusynthetisierten DNA-Stränge dienen in den folgenden Zyklen als Matrizen der Kettenreaktion, so dass nach 30 Zyklen etwa 1 000 000 Kopien der speziellen DNA-Zielsequenz zusätzlich zur Ausgangs-DNA entstanden sind.

Die in dieser Untersuchung verwendeten Primer wurden einem kommerziellen Panel, dem ABI PRISM® Linkage Mapping Set (Version 2) des Herstellers Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien) entnommen.

Dieses Mapping Set ist für eine genomweite Kopplungsuntersuchung ausgelegt und die enthaltenen Marker haben einen ungefähren Abstand von 10cM.

Die einzelnen Marker werden in 28 Panels zusammengefasst, dabei wurden die Marker mit verschiedenen Farben gelabelt (=markiert) und so kombiniert, dass es nicht zu Überschneidungen bei der Fragmentanalyse kommen kann. Durch diese besondere Zusammenstellung in Panels ist es möglich eine größere Anzahl von Markern gleichzeitig in einem PCR-Produkte-Pool zusammen zu fassen.

Die PCR wurde entsprechend den Angaben von PE Biosystems vorbereitet.

Die Primer wurden jeweils auf Eis aufgetaut, gevortext und zentrifugiert (Centrifuge 5417, Eppendorf).

Der PCR-Reaktionsansatz wurde aus folgenden Komponenten nach einem festen Schema pipettiert.

Tabelle 2: Pipettierschema der Polymerase-Ketten-Reaktion

Pro Reaktionsansatz	
Primer-Mix (5 µl je Primer)	1,0 µl
DNA (50 ng / µl)	1,2 µl
True Allel PCR Premix (10 x GeneAmp PCR Buffer II, Gene Amp dNTP mix (2,5 mM), AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 25 mM MgCl ₂)	9,0 µl
H ₂ O	3,8 µl
Gesamtvolumen	15,0 µl

dNTP: Deoxynucleotidtriphosphate
µl: Mikroliter
mM: Millimol
DNA: Deoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
PCR: Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)

Da für eine Kopplungsanalyse eine große Anzahl an Einzelproben verarbeitet werden muss, ist der Einsatz so genannter Pipettier-Roboter in diesem Bereich sehr vorteilhaft und weitverbreitet.

Teil der Aufgabenstellung meiner Arbeit war es die Probenvorbereitung und das Pipettieren der Reaktionsansätze zu automatisieren. Zu diesem Zweck wurde ein Pipettier-Roboter „Multi Probe II“ des Herstellers Packard von mir programmiert und für die Erstellung des PCR-Reaktionsansatzes etabliert.

Anschließend wurde die Polymerasekettenreaktion in einem PCR-Gerät (PTC 100, MGR-Research) nach folgendem Schema durchgeführt:

Tabelle 3: Programm der Polymerase-Ketten-Reaktion

Schritt	Zeit / Temperatur	Vorgang
1	12 Minuten bei 95°C	Aktivierung der AmpliTaq Gold DNA Polymerase
2	15 Sekunden bei 94°C	Denaturierung der DNA
3	15 Sekunden bei 55°C	Spezifische Bindung der beiden Oligonucleotid-Primer, an die Zielsequenz der denaturierten DNA
4	30 Sekunden bei 70°C	Synthese der komplementären DNA-Stränge
5		Wiederholung der Schritte 2. bis 4. neunmal
6	15 Sekunden bei 89°C	Denaturierung
7	15 Sekunden bei 55°C	Bindung der Primer
8	30 Sekunden bei 72°C	Synthese der komplementären DNA-Stränge
9		Wiederholung der Schritte 6. bis 8. neunmal
10	10 Minuten bei 72°C	DNA-Synthese

DNA: Deoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)

Insgesamt wurden in dieser Untersuchung 15 verschiedene Primerpaare verwendet,

7 stammen aus dem Panel 25 aus dem ABI Linkage Mapping Set von Applied Biosystems®.

Nach ersten Analysen wurden die Anzahl der Marker erst auf neun und schließlich auf 15 Marker erhöht, da auffiel, dass die Markerabstände in einem

entscheidenden Abschnitt des Chromosoms 20 zu groß waren. Diese zusätzlichen Marker stammen aus dem Panel 26 und 27 des ABI Linkage Mapping Sets. Zwei zusätzliche Marker (D20S177, D20S186) wurden von der Firma Interactiva, Ulm bestellt.

Mit den insgesamt 15 Markern konnte das Chromosom 20 schließlich gut abgedeckt werden.

Die ungefähren Größen der Primer wurden von dem Hersteller PE Applied Biosystems® und Interactiva, Ulm angegeben, während bei deren Lokalisation und Abstand zueinander die Ergebnisse des National Center for Biotechnology Information (NCBI; Internetadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) übernommen wurden.

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Marker
(*Marker der Firma Interactiva, Ulm).

Marker-Bezeichnung	Zytogenetische Position	Fluoreszenz-Markierung	Lokalisation	Abstände (Mbp)	Kumulierte Abstände	Größe (bp)
D20S117	20p13	FAM	2.83	-	-	154-190
D20S889	20p13	FAM	11.20	9.03	9.03	93-129
D20S115	20p12.3	NED	21.15	12.73	21.76	238-250
D20S177*	20p12.1	HEX	24.70	2.86	24.62	94-102
D20S186*	20p12.1	HEX	32.30	7.06	31.68	121-143
D20S852	20p11.23	HEX	36.58	4.98	36.66	212-235
D20S112	20p11.23	FAM	39.25	4.79	41.45	217-241

D20S471	20p11.22	HEX	42.28	4.68	46.13	140-155
D20S912	20p11.22	HEX	46.71	1.92	48.09	283-301
D20S195	20q11.21	FAM	50.81	6.71	54.76	133-159
D20S107	20q12	FAM	55.74	4.12	58.88	200-224
D20S119	20q13.12	FAM	61.77	7.62	66.5	109-129
D20S196	20q13.13	NED	75.01	9.07	75.57	263-299
D20S100	20q13.2	HEX	84.78	10.49	86.06	213-239
D20S171	20q13.32	HEX	95.70	9.67	95.73	130-158

p: „petite“, Bezeichnung für den kurzen Arm eines Chromosoms
q: „queue“, Bezeichnung für den langen Arm eines Chromosoms

Für jeden Patienten oder Angehörigen einer Prostatakarzinomfamilie erhielt man so 10 unterschiedliche, fluoreszenzmarkierte und in ihrer Länge differierende PCR-Produkte. Diese wurden für jede Person in einem PCR-Pool zusammenpipettiert.

Dabei musste man aufgrund der unterschiedlichen Fluoreszenz-Intensität der jeweiligen Markierungsstoffe ein Verhältnis von NED : HEX : FAM = 2:2:1 einhalten.

2.2.4 Fragmentanalyse

Die Fragmentanalyse sollte ähnlich wie die Vorbereitung der Polymerasekettenreaktion durch einen Pipettier-Roboter vereinfacht und möglichst automatisiert werden, um eine möglichst große Anzahl von Proben und Markern schnell zu bewältigen.

Zu diesem Zweck wurde die Fragmentanalyse automatisiert in einem ABI 310 der Firma PE Applied Biosystems® durchgeführt. Die Etablierung dieses Geräts war wiederum ein Bestandteil dieser Arbeit.

Vorteil des ABI 310 gegenüber älteren Methoden der Fragmentanalyse wie etwa dem ALFexpres ist es, dass das System mit 4 verschiedenen Fluoreszenzfarben arbeitet und man so gleichzeitig in einem Lauf mehrere Marker sowie einen Größenstandard verwenden kann.

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszenzfarbstoff	Farbe
ROX	Rot
HEX	Grün
NED	Gelb
FAM	Blau

Die verwendeten Marker wurden vom Hersteller PE Applied Biosystems® so ausgewählt, dass sich die Größen der Marker mit gleicher Fluoreszenzmarkierung deutlich unterscheiden und es nicht zu Überschneidungen kommen kann.

In der Untersuchung des Chromosoms 20 konnten so gleichzeitig 7 Marker (D20S117, D20S889, D20S115, D20S112, D20S196, D20S100, D20S171) verwendet werden.

Dabei war der verwendete Größenstandard GeneScan 400HD (Applied Biosystems) mit dem Fluoreszenzfarbstoff ROX markiert; auf die verschiedenen Marker entfielen die Farbstoffe HEX, NED, FAM (siehe Tabelle 5).

Die nachträglich mit in die Untersuchung aufgenommenen acht Marker (D20S177, D20S186, D20S852, D20S471, D20S912, D20S195, D20S107, D20S119) der Firma Interactiva (Ulm) waren mit dem Farbstoff HEX markiert.

Vor der Analyse musste ausgehend von den PCR-Pools einer jeden genotypisierten Person ein Injektionsmix nach folgendem Schema für den ABI 310 hergestellt werden:

Tabelle 6: Pipettierschema des Injektionsmixes für den ABI 310

PCR-Produkt-Pool	1,0 µl
Size Standard (Gene Scan 400 HD ROX)	0,5 µl
deionisiertes Formamid	12,0 µl

PCR: Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
 µl: Mikroliter, 10^{-6} Liter

Die Proben mussten anschließend bei 95°C für 3 Minuten denaturiert werden und konnten dann in den ABI 310 zur Fragmentanalyse geladen werden.

Der ABI 310 arbeitet mit einer 47 cm langen Kapillare mit einem Innendurchmesser von 50 µm, die mit einem Polymer (POP4- Polymer, PE-Biosystems®) gefüllt wurde.

Die Kapillare taucht mit einem Ende, an dem sich die Kathode befindet, in die vorgelegten Proben ein.

Legt man eine Spannung an, so kommt es zu einem Stromfluss zwischen der Kathode (-) und der Anode (+) am anderen Ende der Kapillare, durch den geladene Teile aus der Probe aufgenommen werden.

Nach diesem Vorgang der elektrokinetischen Injektion wird die Kathode wieder in einem Puffer platziert und es wird keine weitere DNA aus der Probe aufgenommen.

In dem elektrischen Feld wandern geladene Teilchen (z.B. DNA) unterschiedlich schnell, je nach Größe der Teilchen, durch die Kapillare hin zur Anode.

Auf ihrem Weg passieren die Teilchen nach ca. 36cm ein Detektionsfenster, das im Strahl eines Argonlasers liegt.

Die fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte werden durch den Laser zur Emission angeregt und die emittierten Fluoreszenzen von einer CCD-Kamera aufgenommen.

Anhand des verwendeten Größenstandards berechnet die GeneScan Analysis Software die Größe der fluoreszenzmarkierten PCR-Produkte.

Ein weiterer Vorteil des ABI 310 besteht darin, das die GeneScan Analysis Software nach entsprechender Programmierung in der Lage ist, aus den gesammelten Rohdaten die Zugehörigkeit von PCR-Produkten zu dem jeweiligen Marker entsprechend Farbe und Größe zu bestimmen.

Es mussten nur noch die Allele nach ihrer Größe beziehungsweise nach der Anzahl ihrer Repeats von Hand benannt werden.

Für die weiteren Auswertungen wurden die Daten der GeneScan Analysis Software, die auf einem Apple Macintosh Rechner läuft mit Hilfe des Windows-Programms „Notepad“ in Microsoft Excel transferiert und standen so zur weiteren Analyse auf herkömmlichen Windows-PCs zur Verfügung.

2.3 Datenanalyse

Der LOD-Wert ist der dekadische Logarithmus des Quotienten der berechneten Rekombinationshäufigkeit θ dividiert durch die Rekombinationshäufigkeit 0.5. In der vorliegenden Untersuchung entspricht dabei θ dem genetischen Abstand eines untersuchten Markers auf Chromosom 20 zum gesuchten Locus (der Ursache des familiären Prostatakarzinoms). Dabei ist 0.5 der Abstand, der auf fehlende Kopplung hinweist; er entspricht dem Abstand zwischen unabhängig voneinander segregierenden Loci. Parametrische LOD-Werte werden unter Einbeziehung zusätzlicher Informationen wie z.B. Vererbungsmodus oder Penetranz berechnet. Nichtparametrische LOD-Werte, die sogenannten NPL-Werte, werden aus dem Vergleich von erwarteter und beobachteter AllelÜbereinstimmung ohne Einbeziehung weiterer Informationen berechnet.

2.3.1 Genehunter

Zur Berechnung der parametrischen MultiPoint-LOD-Werte und der nicht parametrischen NPL-Werte für das gesamte Kollektiv, sowie für homogene Subgruppen wurde das Analyseprogramm GENEHUNTER, Version 1.3 (Kruglyak et al. 1996) benutzt. Es handelt es sich dabei um ein frei verfügbares Computerprogramm für das Betriebssystem UNIX.

(Internetadresse: <http://www.fhcrc.org/labs/kruglyak/Downloads/index.html>)

Zur Durchführung der Berechnungen benötigt GENEHUNTER zwei Eingabedateien:

1. Ein sogenanntes Datafile, das die notwendigen Daten über Anzahl der Marker bzw. Loci, Genfrequenzen, Liability-Klassen (Erkrankungswahrscheinlichkeiten bei gegebenen Genotypen, die notwendig für die Berechnung parametrischer LOD-Werte sind), Penetranzen (für die Unterscheidung von dominanten und rezessiven Modellen) und Marker (Allelfrequenzen und Abstände) enthält.

2. Ein sogenanntes Pedfile, das Informationen über jedes Individuum beinhaltet: Eltern, Geschlecht, Erkrankungsstatus, Liability-Klasse und die beiden Allele jedes Markers. In ein Pedfile können sowohl alle Familien eines Sets, als auch nur Familien mit einem bestimmten gemeinsamen Merkmal aufgenommen werden, z.B. Familien mit mehr als drei Betroffenen, so dass Stratifizierungen in mehr oder weniger homogene Subgruppen vorgenommen werden können.

Die Allelfrequenzen für die Marker wurden mit dem Programm FBAT, Version 1.2 aus den unabhängigen, das heißt nicht miteinander verwandten Personen (sog. Founder) des Kollektivs berechnet.

Die Abstände wurden, wie bereits erwähnt, von den Ergebnissen des NCBI (Internetadresse: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) übernommen.

Zur Schätzung der Penetranzen in den Datafiles wurde für das autosomal-dominante Modell die Annahme von Smith (Smith et al. 1996), die von einer Genfrequenz von 0.003 und einer festen Phänokopierate von 15% ausgehen übernommen. Frauen werden als unbekannte Phänotypen betrachtet, bei Männern wird die Lebenszeitpenetranz von homo- und heterozygoten Genträgern (AA und Aa) auf 63% geschätzt und das Lebenszeitrisiko für ein Prostatakarzinom bei Nicht-Genträgern (aa) auf 0.2%.

Für das autosomal-rezessive Modell wird die Penetranz der heterozygoten Genträger derjenigen der Nicht-Genträger angeglichen und die Allelfrequenz des Kandidatengens auf 0.077 verändert (Berry et al. 2000).

Tabelle 7: Übersicht der in den Datafiles verwendeten Penetranzen

Genotyp:	aa	aA	AA	
	0.002	0.630	0.630	Penetranzen Männer autosomal-dominant
	0.002	0.002	0.630	Penetranzen Männer autosomal-rezessiv
	0.500	0.500	0.500	Penetranzen Frauen

Tabelle 8: Beispiel für ein Datafile

1) 11 0 0 5 << NO. OF LOCI, RISK LOCUS, SEXLINKED (IF 1) PROGRAM
2) 0.0 0.00 << MUT LOCUS, MUT RATE, HAPLOTYPE FREQUENCIES(IF1)
3) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11
4) 1 2 << AFFECTATION, NO. OF ALLELES
5) 0.997000 0.0030000 << GENE FREQUENCIES
6) 2 << NO. OF LIABILITY CLASSES
7) 0.002 0.630 0.630 # penetrances all man
8) 0.000 0.000 0.000 # penetrances female
9) 3 13 # D20S117
10) 0.110436 0.131421 0.124099 0.141382 0.154206 0.115505 0.033967
0.142818
11) 0.014914 0.002959 0.018317 0.002912 0.007065 << GENE FREQUENCIES
12) 3 18 # D20S889
13) 0.123461 0.049839 0.069443 0.279703 0.005319 0.019748 0.058792
0.045019
14) 0.051670 0.017631 0.005319 0.036912 0.036541 0.100345 0.040682
0.027887
15) 0.022871 0.008819 << GENE FREQUENCIES
16) 3 6 # D20S115
17) 0.393897 0.000000 0.252416 0.000000 0.222311 0.131376 << GENE
18) FREQUENCIES
19) 3 7 # D20S177
20) 0.008919 0.056844 0.522655 0.376327 0.013481 0.018719 0.003055 <<
GENE
21) FREQUENCIES
22) 3 14 # D20S186
23) 0.144931 0.000000 0.000000 0.109105 0.033477 0.031648 0.268995
0.041910
24) 0.150353 0.074056 0.111057 0.031344 0.000000 0.003124 << GENE
25) FREQUENCIES
26) 3 16 # D20S118

27) 0.003330 0.028444 0.034016 0.076717 0.201277 0.150021 0.248581
 0.097094
28) 0.047534 0.010320 0.062787 0.000000 0.024413 0.009261 0.002972
 0.003232
29) << GENE FREQUENCIES
30) 3 15 # D20S112
31) 0.276513 0.243640 0.041858 0.112403 0.097733 0.067412 0.000000
 0.015896
32) 0.114727 0.003078 0.005892 0.014638 0.000000 0.000000 0.006211
33) <<GENEFREQUENCIES
34) 3 18 # D20S196
35) 0.154246 0.286682 0.050806 0.217006 0.000000 0.009424 0.052599
 0.025252
36) 0.024247 0.000000 0.032532 0.007688 0.048005 0.045725 0.012743
 0.012394
37) 0.002551 0.018100 << GENE FREQUENCIES
38) 3 10 # D20S100
39) 0.278422 0.059372 0.193475 0.374795 0.000000 0.012090 0.024108
 0.000000
40) 0.052786 0.004950 << GENE FREQUENCIES
41) 3 9 # D20S171
42) 0.241855 0.287207 0.143451 0.040611 0.160030 0.099855 0.008812
 0.000000
43) 0.018179 << GENE FREQUENCIES
44) << SEX DIFFERENCE, INTERFERENCE (IF 1 OR 2)
45) 1.0 8.37 9.95 3.55 7.60 6.95 0.1 35.22 10,31 10.92 << cM
46) 1 0.1 0.45 << REC VARIED, INCREMENT, FINISHING VALUE

Legende zur Tabelle 8:

Zeile 1:	11	Anzahl der Marker + Risikolocus (10+1=11).
	0	Risikolocus (falls bekannt).
	0	Untersuchung eines autosomalen (nicht X-chromosomalen) Markers.
	5	Code für das verwendete Computerprogramm.

- Zeile 2: 0 Für keinen Locus wird das Vorhandensein von Mutationen angenommen.
0 Es wird keine bestimmte Mutationshäufigkeit angenommen.
0 Es wird kein Linkage Disequilibrium angenommen.
(Linkage Disequilibrium bezeichnet die Beobachtung, dass bestimmte Allele an verschiedenen Loci eines Haplotyps nicht unabhängig voneinander auftreten.)
- Zeile 3: Die verwendeten Marker (+ Risikolocus) in ihrer Reihenfolge
- Zeile 4: 1 Der Status einer Person in Bezug auf die Betroffenheit durch die Erkrankung wird im Pedfile an dieser Stelle angegeben (in der ersten Spalte nach den Standardangaben zur Person).
1 Anzahl der Allele (ein gesundes Allel, ein Krankheits-Allel).
- Zeile 5: Geschätzte Häufigkeit des Krankheitsallels in der Population (0.003) nach Smith et al. (1996).
- Zeile 6: 2 Anzahl der Liability-Klassen
- Zeile 7: 0.002 Erkrankungsrisiko eines Mannes ohne Suszeptibilitäts-gen.
0.630 Erkrankungsrisiko eines Mannes mit Suszeptibilitäts-gen. (heterozygot).
0.630 Erkrankungsrisiko eines Mannes mit Suszeptibilitäts-gen (homozygot).
- In dem Beispiel wird ein autosomal-dominantes Suszeptibilitäts-gen angenommen, die Werte sind von Smith et al. (1996) übernommen.
- Zeile 8: Erkrankungsrisiko einer Frau mit bzw. ohne Suszeptibilitäts-gen. 0.000, da das Prostatakarzinom nur bei Männern auftritt.
- Zeile 9-43: Marker in der Reihenfolge
Der Markerbezeichnung ist die Anzahl seiner Allele vorangestellt, es folgen die Häufigkeiten der einzelnen Allele (berechnet mit FBAT, Version 1.2 Xin Xu 1999, 2000).
- Zeile 49: 0 Es werden keine unterschiedlichen Rekombinationsraten von männlichen und weiblichen Meiosen angenommen.
0 Es wird die Abwesenheit von Interferenz angenommen.
(Interferenz bezeichnet den Umstand, dass Crossover entlang eines Chromosoms nicht unabhängig voneinander auftreten.)

Zeile 45: Abstände zwischen den verwendeten Markern in centiMorgan berechnet nach den Daten des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Zeile 46: Die zu variierende Rekombinationsfraktion, die Schrittgröße und derjenige Wert der Rekombinationsfraktion θ , bei dem die Berechnung endet.

Tabelle 9: Beispiel für ein Pedfile

ped	ID	V	M	sex	affect.	liability	D20S117		D20S889		D20S115		D20S112		D20S196		D20S100		D20S171	
ped2	1	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ped2	2	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ped2	11	1	2	1	2	1	7	8	0	0	1	5	2	6	3	1	4	6	6	6
ped2	12	1	2	1	2	1	7	8	16	7	1	5	4	6	3	7	1	6	3	6
ped2	13	1	2	1	2	1	2	7	1	14	1	5	2	6	3	7	4	1	3	2
ped3	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ped3	2	0	0	2	1	2	4	1	0	0	3	5	2	1	2	4	1	1	7	2
ped3	11	1	2	1	2	1	4	1	4	1	3	1	4	2	1	4	1	3	7	5
ped3	12	1	2	1	2	1	4	1	0	0	1	5	2	1	2	1	1	3	7	5
ped4	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ped4	2	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ped4	11	1	2	1	2	1	0	0	0	0	6	6	2	1	1	4	1	3	2	5
ped4	12	1	2	1	2	1	2	1	17	1	5	5	2	1	1	0	0	3	3	2
ped4	13	1	2	2	1	2	2	1	17	1	5	5	2	1	1	4	3	3	2	5
ped4	14	1	2	2	1	2	2	2	16	8	5	5	9	2	2	1	3	3	2	5
ped5	1	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ped5	2	0	0	2	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ped5	11	1	2	1	1	2	5	6	1	14	1	5	5	6	2	4	1	2	2	5
ped5	12	1	2	1	2	1	1	11	1	14	1	6	9	6	2	4	1	2	2	5
ped5	13	1	2	1	2	1	5	6	4	4	5	5	2	5	2	2	1	2	2	1
ped5	14	1	2	1	2	1	1	11	4	14	5	6	9	2	15	4	4	1	1	5
Ped5	15	1	2	1	2	1	5	11	4	4	1	5	9	6	2	15	1	2	2	1
Ped5	16	1	2	1	1	2	0	0	0	0	1	5	5	6	2	4	1	2	2	1

Legende zu Tabelle 9:

ped	=	pedigree / Familienidentifikationsnummer
ID	=	Personen-Identifikationsnummer
V	=	ID des Vaters (0 = nicht im Pedfile erfasste Person)
M	=	ID der Mutter (0 = nicht im Pedfile erfasste Person)
sex	=	Geschlecht der Person (1 = männlich, 2 = weiblich)
affect.	=	Status bezüglich Prostatakarzinom 1 = betroffen, 2 = nicht betroffen
liab.	=	Liability-Klasse (1 = männlich, 2 = weiblich)

Es folgen die Marker in ihrer Reihenfolge; zu jedem Marker sind die beiden von GeneScan ermittelten Allele angegeben.

2.3.2 Genehunter Plus

Mit dem GENEHUNTER-PLUS, Version 1.2 (Kong u. Cox 1997) bietet sich die Möglichkeit einer weniger konservativen Methode zur Berechnung nicht-parametrischer LOD-Werte und Fehlerwahrscheinlichkeiten. Es handelt sich dabei um eine Erweiterung des GENEHUNTER, Version 1.3 und ist voll darin integriert, d.h. die Datafiles und Pedfiles können weiter verwendet werden.

Diese Version ist frei verfügbar und kann für Unix-Rechner unter folgender Adresse heruntergeladen werden: <ftp://galton.uchicago.edu/pub/kong>

Das erweiterte Analysemodell basiert auf der sogenannten Allel Sharing Methode (ASM) und ist besonders geeignet für inkomplette Datensätze, die durch fehlende Typisierung und fehlende DNA von Familienmitgliedern typischerweise bei Kopplungsanalysen auftreten. Aber auch bei der Verwendung wenig heterozygoter oder weit auseinanderliegender Marker bietet GENEHUNTER-PLUS gegenüber der einfachen GENEHUNTER-Version deutliche Vorteile.

Es werden sogenannte Z_{lr} -Werte berechnet („lr“ = linkage ratio), deren Fehlerwahrscheinlichkeit p mit einem einseitigen Z-Test bestimmt wird. Für eine genügend große Anzahl von Familien wird die Verteilung von Z als standardnormal angenommen. Aus dem Z_{lr} -Werte kann ein LOD-Wert berechnet werden, dessen Fehlerwahrscheinlichkeit p sich über einen χ^2 -Test bestimmen:

$$\text{LOD} = \frac{(Z_{lr})^2}{2.0 \cdot \ln(10.0)}$$

Die aus den Z_{lr} -Werten berechneten $\text{LOD}_{Z_{lr}}$ -Werte sind den LOD-Werten einer traditionellen parametrischen Analyse sehr ähnlich. Allerdings sind $\text{LOD}_{Z_{lr}}$ -Werte immer nicht-negativ, und es können unterschiedliche Parameter an unterschiedlichen Lokalisationen angenommen werden, während beim traditionellen LOD-Wert die Parameter (wie Penetranzen und Allelfrequenzen) für alle Lokalisationen gleich bleiben.

GENEHUNTER-PLUS erlaubt sowohl die Berechnung von Z_{lr} -Werten für ein komplettes Set von Familien als auch die unterschiedliche Gewichtung von Familien mit bestimmten Eigenschaften.

In der vorliegenden Untersuchung wurden jeweils Z_{lr} -Werte und die dazugehörigen p -Werte berechnet. Diese Berechnung wurde einmal für das gesamte, ungewichtete Set von 108 Familien und zum anderen für zwei verschieden gewichtete Modelle (ein $\text{weight}_{\text{prop}}$ -Modell und ein weight_{0-2} -Modell) berechnet, die besonders eine Interaktion mit dem X-Chromosom und eine „male-to-male transmission“ berücksichtigen sollten.

Tabelle 10: Übersicht der Gewichtungverteilung in den verwendeten weight- Modellen.

weight_{prop}	weight₀: Familien mit NPL < 0 für HPCX
	proportional-weight: Familien-NPL für HPCX als proportionale Gewichtung
weight₀₋₂	weight₀: Familien mit NPL < 0 für HPCX
	weight₁: Familien mit NPL > 0 für HPCX
	weight₂: mtm-Familien und NPL > 0 für HPCX

2.3.3 FBAT:

Bei dem Softwarepaket FBAT (Family Based Association Test) handelt es sich um ein Programm, das in der Lage ist in Familien Verwandtschaftsgrade zu berücksichtigen und eine Assoziation zu berechnen.

Das Programm läuft unter Windows und ist unter folgender Adresse frei herunterladbar:

<http://www.biostat.harvard.edu/fbat/default.html>

Als Eingabedatei wird eine sogenanntes „Pedigree File“ ähnlich wie bei dem Programm GENEHUNTER benutzt:

Tabelle 11: Ausschnitt aus einem verwendeten Pedigree File als Eingabedatei für das FBAT-Programm

	D20S117	D20S889	D20S115	D20S177	D20S186	D20S118	D20S112	D20S196	D20S10								
D20S117																	
D20S171																	
ped2 1	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ped2 2	0	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ped2 11	1	2	1	2	7	8	0	0	1	5	3	4	1	7	7	7	2
6	3	1	4	6	6	6											
ped2 12	1	2	1	2	7	8	16	7	1	5	3	4	1	7	0	0	4
6	3	7	1	6	3	6											
ped2 13	1	2	1	2	2	7	1	14	1	5	3	4	1	7	7	7	2
6	3	7	4	1	3	2											
ped3 1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0											
ped3 2	0	0	2	1	4	1	0	0	3	5	3	4	7	9	5	7	2
1	2	4	1	1	7	2											
ped3 11	1	2	1	2	4	1	4	1	3	1	3	4	7	7	5	5	4
2	1	4	1	3	7	5											
ped3 12	1	2	1	2	4	1	0	0	1	5	3	4	9	9	5	7	2
1	2	1	1	3	7	5											

Erklärungen zu Tabelle 11:

Zeile 1-2: Bezeichnung aller verwendeten Marker in ihrer entsprechenden Reihenfolge

Aufbau der folgende Zeilen: pid, id, fid, mid, sex, aff, A11 A12 A21 A22...

pid: pedigree ID (Familienkennnummer)

id: individual ID (Personenkennnummer)

fid: father id (Kennnummer des Vaters), 0 bei nicht-spezifizierten Eltern

mid: mother id (Kennnummer der Mutter), 0 bei nicht-spezifizierten Eltern

sex: 1 = male, 2 = female

aff: affection status (2 = affected, 1 = unaffected, 0 = unknown)

Aij: Allel jedes Markers i. 0 für nichtvorhandene Allele

3. ERGEBNISSE

In der vorliegenden Arbeit habe ich überprüft, ob der Locus HPC 20 oder ein bisher noch nicht bekannter Locus auf Chromosom 20 in einem Zusammenhang mit dem familiärem Prostatakarzinom in einem deutschen Kollektiv steht. Zu diesem Zweck wurden die sogenannten Ulmer Prostatakarzinom-Familien mit 277 Betroffenen aus 108 Familien und insgesamt 354 verfügbaren DNA-Proben mittels 15 Markern genotypisiert. Anschließend wurden die erhaltenen Daten für eine Kopplungsanalyse verwendet und mit verschiedenen Analyseprogrammen bearbeitet. Dabei wurde versucht durch Stratifizierung der einzelnen Familien nach unterschiedlichen Kriterien homogene Untergruppen zu bilden, um einen möglichen genetischen Zusammenhang zwischen familiärem Prostatakarzinom und Chromosom 20 auch unter den für die jeweilige Untergruppe speziellen Voraussetzungen wie etwa male-to-male Transmission zu überprüfen.

3.1 Allele

Im ersten Schritt einer Kopplungsuntersuchung, der Fragmentanalyse erhält man die einzelnen Allele und deren Verteilung für den jeweiligen Marker. Ausgehend von diesen Rohdaten kann die Allelseggregation innerhalb der Familien genaueren Analysen unterzogen werden.

Am Anfang dieser Arbeit war es unbekannt, wie viele und welche Allele ich bei den verschiedenen Markern finden würde. Aus diesem Grund habe ich mich zunächst an den Ergebnissen des Centre d'Étude du Polymorphisme humain (CEPH) orientiert. Dabei handelt es sich um ein Institut in Paris, das eine führende Rolle bei der genetischen und physikalischen Kartierung des menschlichen Genoms gespielt hat. Die sogenannten CEPH-Familien, eine

Gruppe von 60 Familien, die jeweils aus mindestens sechs Kindern, den Eltern sowie vier Großeltern bestehen, wurden vollständig kartiert und die Ergebnisse öffentlich zugänglich gemacht.

Die DNA des CEPH-Familienmitglieds 1347_02, dessen Genotyp bekannt ist und damit Vergleiche mit den übrigen von CEPH gefundenen Allelen, sowie deren Frequenzen zulässt stand mir zur Verfügung. Es stellte sich jedoch heraus, dass im Ulmer Kollektiv bei einigen Markern zahlenmäßig mehr und andere Allele zu finden waren, andererseits jedoch die von CEPH gefundenen Allele gar nicht vorkamen. Dieser Umstand erklärt die teilweise diskontinuierliche Benennung der Allele und machte es notwendig, dass die Allelfrequenzen aus unabhängigen Personen („Foundern“) der Karzinomfamilien berechnet werden mussten und nicht wie geplant von CEPH übernommen werden konnten.

Eine kurze Übersicht der Anzahl der Allele mit Angabe der Größe in Basenpaaren für jeden Marker findet sich in Tabelle 12.

Für die jeweiligen Marker variiert die Anzahl der gefundenen Allele zwischen 7 (bei D20S177) und 20 (bei D20S471).

Für den Marker D20S177 mit der kleinsten Anzahl von Repeats (4) fanden sich auch zahlenmäßig am wenigsten Allele (7), dagegen fanden sich die meisten Allele nicht bei den beiden Markern (D20S117, D20S889) mit der größten Anzahl von Repeats (je 18), sondern mit 20 Allelen bei dem Marker D20S471, der mit 7 Repeats eher im unteren Mittel liegt.

Tabelle 12: Übersicht über die Anzahl der Allele der verwendeten Marker

Marker	Größe (bp)	Spannweite vom kleinsten zum größten Allel pro Marker (bp)	Anzahl der Repeats pro Marker	Allelanzahl
D20S117	154-190	36	18	13
D20S889	93-129	36	18	18
D20S115	238-250	12	6	6
D20S177	94-102	8	4	7
D20S186	121-143	22	11	14
D20S852	212-235	23	11	15
D20S112	217-241	24	12	14
D20S471	140-155	15	7	20
D20S912	283-301	18	9	12
D20S195	133-159	26	13	15
D20S107	200-224	24	12	16
D20S119	109-129	20	10	13
D20S196	263-299	36	18	18
D20S100	213-239	26	13	10
D20S171	130-158	28	14	9

bp: Base pairs (Basenpaare)

Es folgt die Darstellung der Ergebnisse der Analyseprogramme.

Zunächst werden die Ergebnisse mit 9 und 10 Markern präsentiert. Aufgrund dieser ersten Ergebnisse ergab sich die Notwendigkeit, noch zusätzliche Marker mit in die Analyse einzubeziehen, um größere Lücken zwischen den ursprünglichen Markern zu schließen.

3.2 Ergebnisse der Multipointanalyse

Als Ergebnis einer Kopplungsanalyse erhält man den sog. LOD-Wert (Logarithm of the odds), ein Maß für die Wahrscheinlichkeit einer genetischen Kopplung.

Der LOD-Wert kann ohne Einbeziehung zusätzlicher Informationen berechnet werden, man spricht in diesem Fall vom sogenannten nichtparametrischem LOD-Wert (NPL).

Werden bei der Berechnung Zusatzinformationen wie etwa der Vererbungsmodus mitberücksichtigt, so erhält man den parametrischen LOD-Wert.

Ein Wert unter -2 gilt meist als Beleg dafür, dass keine Kopplung vorliegt. Bei Werten von mindestens $+3$, oder einer zugehörigen Fehlerwahrscheinlichkeit (p) von weniger als 0.001 kann man ein signifikantes Ergebnis annehmen und auf das Vorliegen einer Kopplung schließen.

Bei LOD-Werten über $+2.0$ und unter -1.0 geht man von einem „Hinweis“ aus.

Dagegen kann man nach Lander und Kruglyak (Lander u. Kruglyak 1995) bei einer Replikationsstudie, dem Versuch einen bereits bekannten Locus in einem anderen Kollektiv zu bestätigen, aufgrund der differenzierten Bedingungen bei heterogenen Erkrankungen bereits LOD-Werte von mehr als 1.0 als Beweis und Fehlerwahrscheinlichkeiten von weniger als 0.1 als signifikant betrachten.

In meiner hier vorliegenden Arbeit habe ich eine Multipoint-Kopplungsuntersuchung an dem gesamten zu Verfügung stehendem Kollektiv,

wie auch in verschiedenen möglichst homogenen Subgruppen durchgeführt. Das Gesamtkollektiv wurde nach folgenden Merkmalen in Untergruppen stratifiziert:

- **Alter der Erstdiagnose (ED):** Dabei galt ein Alter bei Erstdiagnose von < 65 Jahren als „jung“ und ein Alter > 65 Jahre als „alt“. Es wurde jeweils das niedrigste ED-Alter innerhalb einer Familie berücksichtigt.
- **Anzahl der Betroffenen in der Familie bzw. Kernfamilie:** Es wurde unterteilt in Familien mit mehr als drei Erkrankungsfälle, oder weniger als drei.
- **Transmission:** Es wurde zwischen male-to-male (mtm) und non-male-to-male (nmtm) unterschieden. Die Zuordnung erfolgte nach Betrachtung der Stammbäume; mtm-Transmission wurde angenommen, wenn ein betroffener Vater zusammen mit mindestens einem betroffenen Sohn auftrat oder wenn Fälle von Prostatakrebs in der Familie des Vaters, jedoch keine Erkrankungsfälle in der Familie der Mutter vorkamen.
- **Vorhandene oder nicht vorhandene Kopplung zum Chromosom X:**
Das in dieser Arbeit untersuchte Kollektiv besteht aus den selben Familien, in denen auch ein deutlicher Hinweis auf eine Kopplung mit dem HPCX-Locus im Zusammenhang mit dem Auftreten des familiären Prostatakarzinoms nachgewiesen werden konnte (Bochum et al. 2002)
Die Stratifizierung fand entsprechend dem NPL-Ergebnis für Marker auf dem X-Chromosom in den jeweiligen Familien statt; es wurde unterteilt in Familien mit einem NPL-Wert > 1 (Hinweis auf mögliche Kopplung zum X-Chromosom) und einem NPL-Wert < 1 (fehlender Hinweis auf einen X-chromosomalen Zusammenhang).
Normalerweise würde man für einen X-chromosomalen Locus keine Kopplung zu einem autosomalen Locus erwarten. Dies würde sich für rein autosomale oder rein X-chromosomale Erbgänge gegenseitig

ausschließen. Aber eine mögliche Interaktion oder ein multifaktorielles Geschehen kann mit nicht regulären Erbgängen erklärt werden und könnte beim familiärem Prostatakarzinom eine Rolle spielen.

Denkbar wäre eine Vererbung aus beiden Familienästen, der mütterlichen und väterlichen Seite, mit unterschiedlichen Erbgängen.

Bei diesen komplexen Erbgängen mit einer Interaktion zwischen Autosomen und X-Chromosom, würde die mtm-Komponente durch die Autosomen vertreten, die sich in den Söhnen manifestiert. Diese Manifestation könnte aber von einem x-chromosomalen Allel abhängig sein, dessen gemeinsame Vererbung von der Mutter zu dem positivem NPL-Score führt.

Eine Übersicht der Multipoint-Ergebnisse über den gesamten Datensatz, sowie in den einzelnen Untergruppen folgt in Tabelle 13. Dabei wird jeweils die Anzahl der Personen und die Anzahl der Familien angegeben, des weiteren der maximal erreichte NPL, der parametrische LOD-Wert, der sogenannte α -HLOD, der zugehörige p-Wert und die ungefähre von GENEHUNTER errechnete Position des möglichen Krankheitslokus. Der α -HLOD repräsentiert dabei den parametrischen LOD-Wert, der unter der Annahme von Heterogenität berechnet wurde.

Im Fall des Prostatakarzinoms konnten bisher durch mehrere genomweite Linkageanalysen verschiedene potentielle Loci identifiziert werden und mittlerweile ist es auch gelungen drei Gene zu identifizieren. Diese Ergebnisse sprechen für eine stark ausgeprägte Heterogenität des Prostatakarzinoms, d.h. es existieren mehrere Gene, die für eine Prädisposition verantwortlich sein könnten. Auch ein multifaktorielles Modell, bei dem mehrere Gene interagieren scheint möglich.

Bei der Berechnung mit dem gesamten verfügbaren Datensatz, 354 genotypisierten Personen aus 108 verschiedenen Familien, ergab sich mit einem

maximalen NPL von 0.55 bei einem p-Wert von 0.29 kein Hinweis auf einen mit dem Prostatakarzinom koppelnden Locus.

Die Multipoint-Berechnungen für die einzelnen Stratifizierungen ergaben folgende Ergebnisse:

- Familien, die anhand des Erstdiagnosealters der betroffenen Mitglieder in „jung“ (ED < 65 Jahre) oder „alt“ (ED > 65 Jahre) unterteilt wurden, lieferten einen max. NPL von 0.54 bei einem p von 0.29 für die Untergruppe „jung“ und einem max. NPL von 0.18 bei einem p von 0.43 für die Untergruppe „alt“.
- Bei der Stratifizierung nach der Anzahl der betroffenen Mitglieder innerhalb einer Familie zeigten sich für Familien mit mehr als drei Erkrankungsfällen deutlich höhere Werte (max. NPL = 1.04, p = 0.15) als für Familien mit weniger als drei Erkrankungsfällen (max. NPL = -0.30, p = 0.64).
- Wesentlich höhere Ergebnisse wiesen die Familien auf, in denen die Stammbaumkonstellation eine male-to-male-Transmission vermuten lässt. Sie ergaben einen max. NPL von 2.17 bei einem p von 0.01. Die Familien mit none-male-to-male-Transmission kamen dabei nur auf negative Werte. (max. NPL = -0.22, p = 0.59).
- Einen positiven max. NPL von 1.49 bei einem p von 0.07 ergab die Stratifizierung nach Vorliegen von X-Kopplung in den betroffenen Familien. Für Familien ohne X-Kopplung fanden sich nur negative Werte (max. NPL = -0.59, p = 0.73).
- Durch die Kombination der zwei Stratifizierungsmerkmale, die die höchsten positiven Werte geliefert haben, mtm-Transmission und Kopplung zum X-Chromosom, konnte ein nach allgemeinen Kriterien für die Kopplungsanalyse signifikantes Ergebnis erzielt werden. Für die Untergruppe mtm-Transmission und X-Kopplung errechnete sich ein max. NPL von 3.03 bei einem p von 0.001.

Für den H-LOD und den einfachen LOD-Wert berechnete sich jeweils ein Wert von 4.10. Der Widerspruch der sich hier auf den ersten Blick

gegenseitig ausschließenden Stratifizierungsmerkmale mtm-Transmission und X-chromosomale Kopplung wurde auf S.55/56 besprochen und dabei mögliche Erklärungen zur Auflösung dieses Widerspruchs geliefert.

Die Genehunter-Multipoint-Analyse mit den ursprünglichen 7 Markern lieferte für die Position 39.10 auf der genetischen Karte mit einem des Chromosoms 20 statistisch signifikante Werte ($NPL > 3$). Die Position entsprach mit einer tolerierbaren Abweichung der Lokalisation des Markers D20S112 auf 20p11.23. Bei nicht-mendelschen Erbgängen liefern Multipoint-Kopplungsanalysen nur sehr ungenaue Lokalisationen, die durchaus Differenzen von 10cM zulassen.

Tabelle 13: Übersicht der Multipoint-Ergebnisse insgesamt und in den einzelnen Stratifizierungen mit den ursprünglichen 7 Markern.

Stratifizierungen	Anzahl Pers./ Fam.	max. NPL	LOD beim max. NPL	α - HLOD beim max. NPL	p-Wert	Position
alle Daten	589/103	0.55	-21.86	0.36	0.29	20.0
Fam. „jung“ < 65	408/71	0.54	-17.88	0.03	0.29	39.10
Fam. „alt“ > 65	101/20	0.18	-4.52	0.88	0.43	20.0
Fam. mit > 3 Fällen	176/24	1.04	-8.83	0.10	0.15	0.0
Fam. mit < 3 Fällen	193/40	-0.30	-7.15	-0.005	0.64	20.0
Fam. mit mtm	256/41	2.17	0.09	2.26	0.01	39.10
Fam. mit nmtm	333/62	-0.22	-15.35	-0.003	0.59	20.0
Fam. mit X-Kopplung	348/61	1.49	-7.70	1.20	0.07	39.10
Fam. ohne X-Kopplung	196/36	-0.59	-10.94	0.44	0.73	20.0
Fam. mit mtm und ohne X-Kopplung	64/12	0.45	-2.39	0.07	0.33	0.0
Fam. mit mtm und X-Kopplung	162/26	3.03	4.10	4.10	0.001	39.10

HLOD: LOD-Wert bei Annahme von Heterogenität

LOD: Logarithm of the odds, Wahrscheinlichkeit für die Kopplung von Genen

NPL: Non-parametric LOD-Score

nmtm: none-male-to-male

mtm: male-to-male

p: Fehlerwahrscheinlichkeit

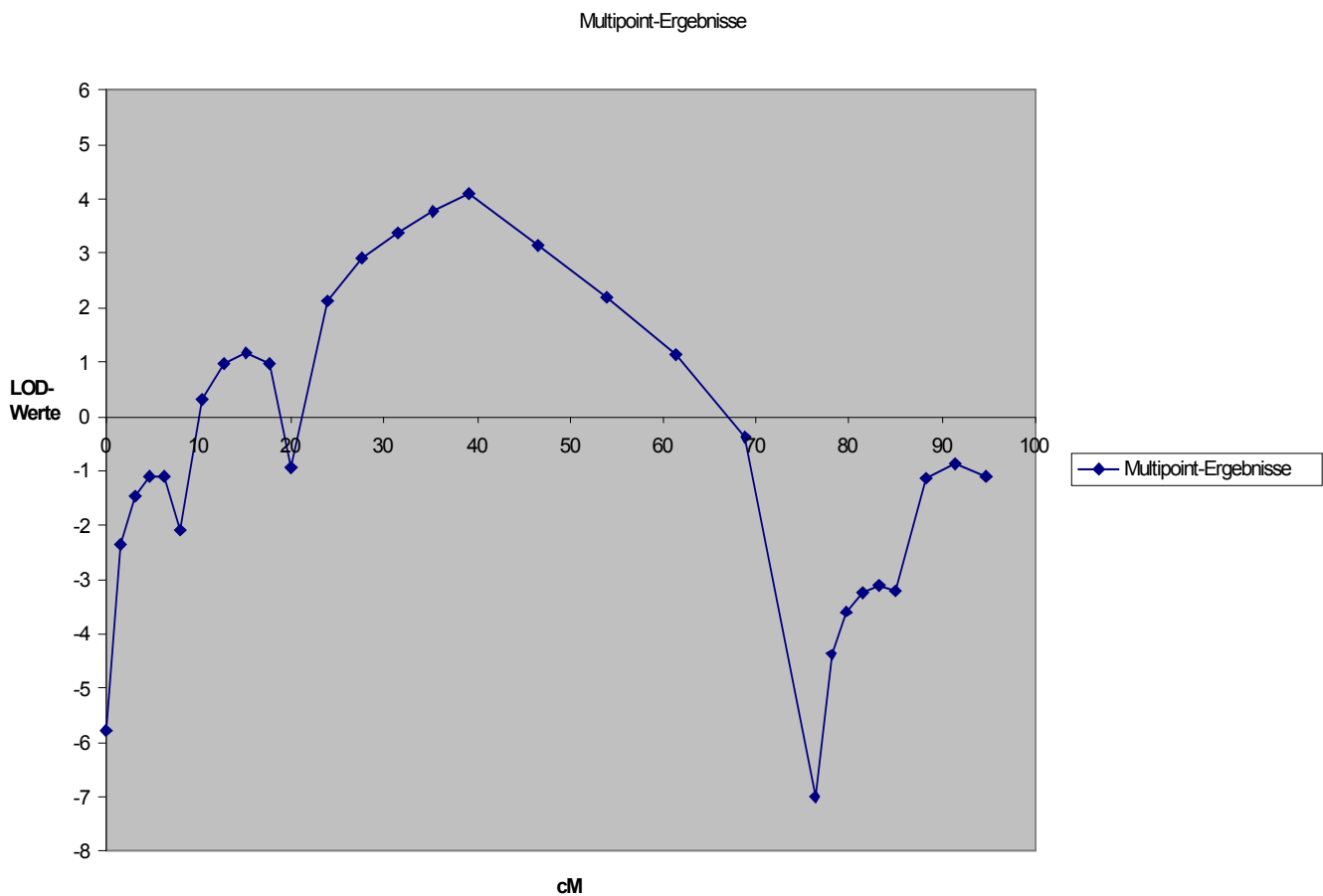


Abbildung 1: Darstellung der Multipoint-Ergebnisse mit 7 Markern als Funktion der Logarithm of the odds-Werte (LOD-Werte)

X-Achse: Position der Marker in centiMorgan (cM)

Y-Achse: Angabe der Logarithm of the odds-Werte (LOD-Werte)

In Abbildung 1 ist der Multipoint-LOD-Wert als Funktion der Position in CentiMorgan (cM) auf der genetischen Karte des Chromosoms 20 dargestellt. Es zeigt sich deutlich, dass die ursprünglich in dieser Arbeit verwendeten 7 Marker das Chromosom in teilweise sehr großen Abständen abdeckt. Vor allem in der Region um den Marker D20S112 mit den höchsten Ergebnissen waren die Abstände zu den jeweils nächsten Markern sehr groß (ca. 36cM) und die Notwendigkeit die Abstände durch Aufnahme zusätzlicher Marker zu verringern gegeben.

Die Erweiterung des Markersets erfolgt in zwei Schritten, zunächst wurden 2 Marker der Firma Interactiva, Ulm (D20S177, D20S186) aufgenommen und in einem zweiten Schritt wurden 6 weitere Marker (D20S852, D20S471, D20S912, D20S195, D20S107, D20S119) aus den Panels 26 und 27 des ABI Linkage Mapping Sets des Herstellers PE Applied Biosystems® hinzugefügt.

3.3 Ergebnisse der Analyse mit der Allel-sharing-Methode

3.3.1 Analyse mit 9 Markern

Die Daten der vorangegangenen Analysen weisen auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Familien mit mtm-Transmission und einer gleichzeitig vorhandenen Kopplung zum X-Chromosom in Verbindung mit einem für das Prostatakarzinom ursächlichen Locus auf Chromosom 20 hin. Dieser Hinweis sollte nach der Einführung von zwei zusätzlichen Markern mit Hilfe der zuvor beschriebenen „Kong & Cox allel sharing“-Methode auf der Grundlage des Standardprogramms Genehunter-Plus, einer Erweiterung des Genehunter 1.3. überprüft werden.

Es wurden 3 Analysen durchgeführt; die genannten Analyse-Modelle wurden im Abschnitt „Material und Methoden“ erläutert und anhand eines Schemas dargestellt (siehe S.39-48).

- Eine Analyse ohne Gewichtung.
- Eine Berechnung mit dem „weight_{prop}model“, das die Familien proportional ihrem NPL für die Kopplung zum X-Chromosom gewichtet.
- Durch Verwendung des „weight₀₋₂model“ konnte eine Abstufung der Gewichtung vorgenommen werden. Dabei werden besonders Familien mit mtm, X-Kopplung und mit „early onset disease“(ED < 65) gewichtet.

Tabelle 14: Übersicht der Genehunter-Plus-Ergebnisse mit 9 Markern; einmal ohne Gewichtung und mit den zwei Gewichtungsmodellen $\text{weight}_{\text{prop}}$ und weight_{0-2} . Dabei ist jedem Z_{lr} -Wert der jeweilige $\text{LOD}_{Z_{\text{lr}}}$ -Werte zugeordnet.

Marker	Position der Marker (cM)	Ergebnisse no - weights		Ergebnisse $\text{weight}_{\text{prop}}$		Ergebnisse weight_{0-2}	
		Z_{lr} -Wert	assoziierte $\text{LOD}_{Z_{\text{lr}}}$ -Werte	Z_{lr} -Wert	assoziierte $\text{LOD}_{Z_{\text{lr}}}$ -Werte	Z_{lr} -Wert	assoziierte $\text{LOD}_{Z_{\text{lr}}}$ -Werte
D20S117	0	0.36	0.03	-0.01	2×10^{-5}	-0.001	2×10^{-7}
D20S889	8,37	-0.41	0.04	-0.16	5×10^{-3}	0.19	8×10^{-3}
D20S115	18,32	1.36	0.04	1.08	0.25	1.24	0.33
D20S177	21,87	-0.49	0.05	0.54	0.64	0.48	0.05
D20S186	29,47	1.34	0.39	1.12	0.27	1.04	0.24
D20S112	36,42	0.53	0.06	2.81	1.72	3.45	2.58
D20S196	71,64	-2.46	1.32	-1.04	0.24	-1.28	0.36
D20S100	81,95	-2.04	0.90	0.33	0.02	0.16	5×10^{-3}
D20S171	92,87	-2.22	1.07	-1.43	0.44	-1.06	0.24

cM: centiMorgan, der genetische Abstand zweier Loci auf einem Chromosom

Z_{lr} -Wert: Likelihood ratio z-score

$\text{LOD}_{Z_{\text{lr}}}$ -Werte: Logarithm of the odds errechnet aus den Z_{lr} -Werten

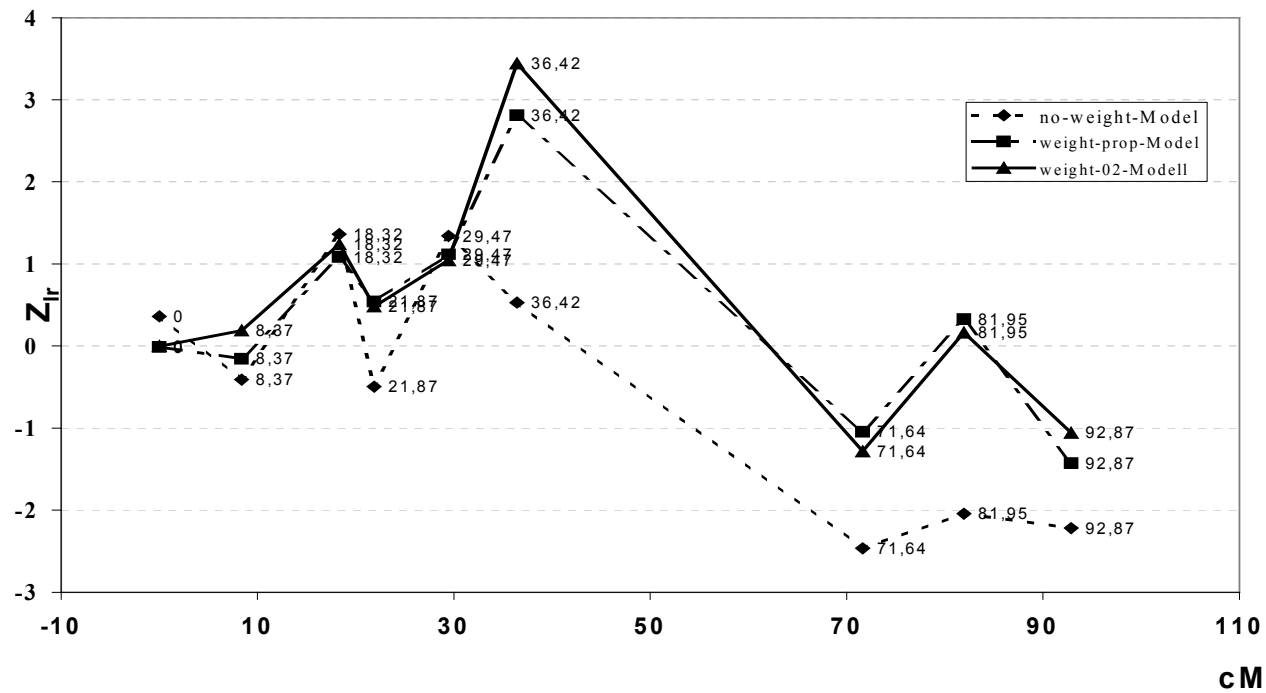


Abbildung 2: Darstellung der Ergebnisse aus der Berechnung mit der Allele-Sharing-Methode und 9 Markern als Funktion der Z_{lr}-Werte mit der Angabe der jeweiligen Position in centiMorgan.

X-Achse: Position der Marker in centiMorgan.

Y-Achse: Z_{lr}-Wert (Likelihood ratio z-score)

Der Ansatz der Allel-Sharing-Methode erlaubt eine modellfreie Analyse, bei gleichzeitiger Berücksichtigung weiterer Parameter (quantitativ und qualitativ) in der Berechnung. Dies scheint im Hinblick darauf, dass sich alle bisherigen Modelle als nicht zutreffend erwiesen haben von Vorteil, da die Verwendung eines falschen Modells natürlich die Ergebnisse der Analyse beeinflusst.

Bei der Berechnung mit den Gewichtungsmodellen ($weight_{prop}$ und $weight_{0-2}$) stieg der Z_{ir} -Score von anfänglich 0.53 in der Berechnung ohne Gewichtung über den gesamten Datensatz auf 3.45 in der Berechnung mit dem $weight_{0-2}$ -Modell, das besonders die Familien mit X-Kopplung und mtm-Transmission berücksichtigt.

Die aus den Z_{ir} -Werten errechneten LOD-Werte stiegen von anfänglich praktisch null auf 2.57, bei einer zugehörigen Fehlerwahrscheinlichkeit p von weniger als 0.001. Die Fehlerwahrscheinlichkeit wurde dabei mit dem Programm CHIPROB (Utility programs for analysis of genetic linkage, J.Ott) berechnet.

Diese Ergebnisse (siehe auch Tabelle 14) und die graphische Darstellung (Abbildung 2) zeigen, dass demnach auch bei der Analyse mit dem „allel sharing model“ nach Kong & Cox die höchsten Ergebnisse durch besondere Gewichtung der Familien mit X-Kopplung und mtm-Transmission resultieren, was als ein Hinweis auf eine mögliche Interaktion zwischen dem Chromosom 20 und dem X-Chromosom im Zusammenhang mit dem familiäre Prostatakarzinom gewertet werden kann.

Wie auch schon für die Ergebnisse der Multipoint-Analyse ausgeführt, stellt der sich normalerweise gegenseitig ausschließende Zusammenhang von X-chromosomaler Interaktion mit einem autosomalem Locus und mtm-Transmission bei einer so heterogenen Erkrankung wie dem Prostatakarzinom durchaus einen möglichen Ansatz durch nichtreguläre Erbgänge dar.

Damit zeigte die Analyse mit nunmehr 9 Markern mit Hilfe des Genhunter-Plus und dem „allel sharing model“ nach Kong & Cox für den Marker D20S112 in der Region 20p11.23 zwar mit einem LOD-Wert von 2.57 einen nicht mehr ganz so

hohen Wert wie die Geneunterberechnung mit 7 Markern von 4.10, aber in beiden Fällen mit einem deutlich signifikanten p von 0.001.

3.3.2 Analyse mit 15 Markern

Aus Abbildung 1 wird auch deutlich, dass zwischen den Markern D20S112 und dem folgenden Marker D20S196 noch ein sehr großer Abstand von ca. 36 cM bestand, der in einem weiteren Schritt durch die Einführung von 6 weiteren Markern wesentlich verkleinert wurde.

In Abbildung 3 sind die Multi-Point-Ergebnisse mit 15 Markern in der Untergruppe der Familien mit mtm-Transmission und einem $NPL \geq 1$ für das X-Chromosom graphisch dargestellt.

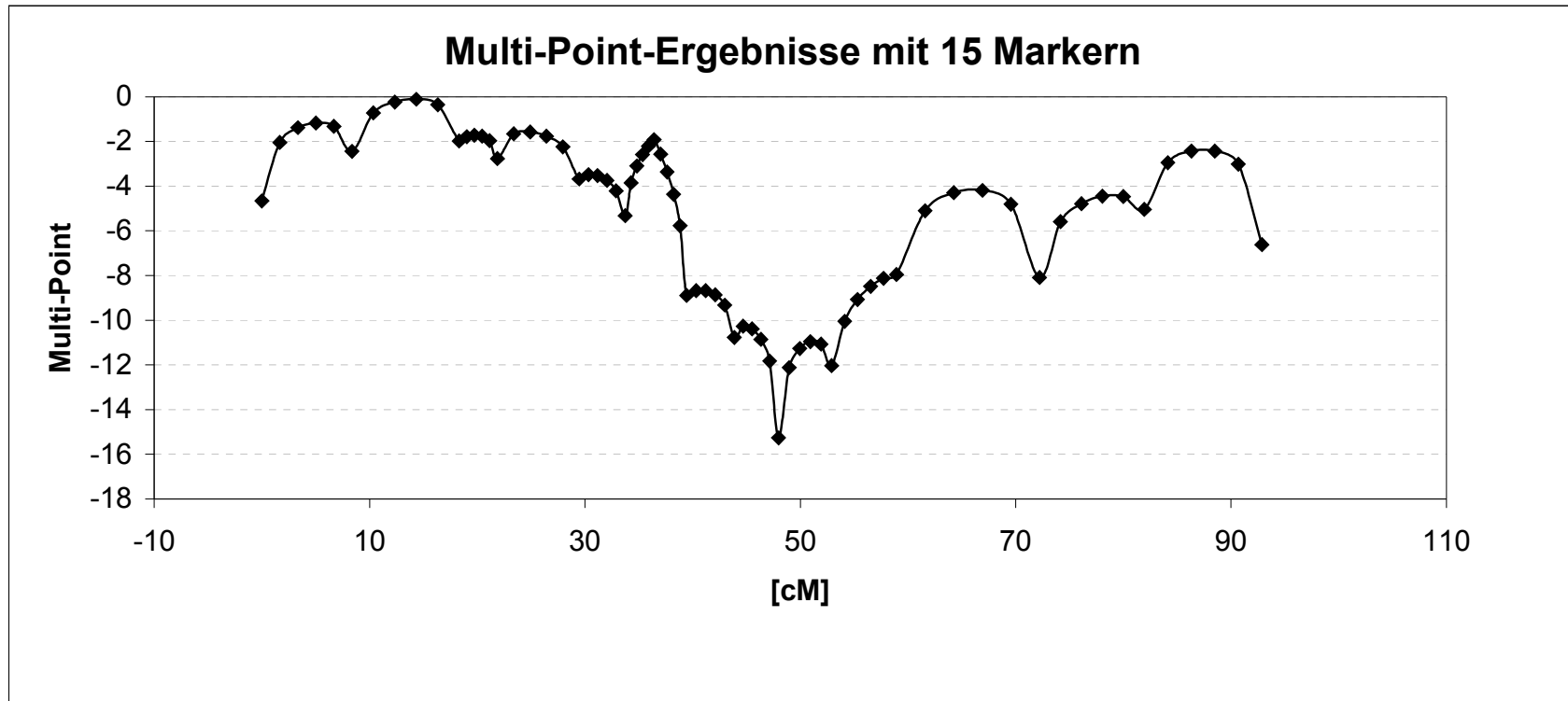


Abbildung 3:

Darstellung der Multipoint-Ergebnisse mit 15 Markern in der Untergruppe der Familien mit mtm-Transmission und einem $NPL \geq 1$ für das X-Chromosom.

X-Achse:

Position der Marker in cM (centiMorgan, der genetische Abstand zweier Loci auf einem Chromosom)

Y-Achse:

Multipoint-LOD-Werte (Logarithm of the odds, Wahrscheinlichkeit für die Kopplung von Genen)

Wie aus Abbildung 3 deutlich hervorgeht hat sich der zuvor deutlich positive Peak im Bereich des Markers D20S112 bei der Analyse mit 15 Markern in den negativen Bereich verschoben. An der Position 36.42, der Stelle des bisherigen Maximums, berechnete sich ein LOD von -1.92 , ein α -HLOD von 0.74 und ein NPL von 1.07 bei einer dazugehörigen Fehlerwahrscheinlichkeit von $p = 0.14$.

Das höchste Ergebnis der Multipoint-Analyse ergibt sich für die Position 18.32 mit einem α -HLOD von 0.913 und einem NPL von 1.41 bei einem p von 0.08 . Diese Position entspricht ungefähr der Position des Markers D20S115, der in den vorhergehenden Analysen keine besonderen Ergebnisse aufwies.

Die LOD-Berechnung kann als Zweipunkt-Analyse und als Multipoint-Analyse durchgeführt werden.

Bei der Kopplungsanalyse mit zwei Genorten ist einer der beiden Loci bekannt, bzw. kartiert und der andere noch nicht kartiert. Dabei wird für die Kartierung von krankheits-verursachenden Genen, bzw. allgemein von Genen, die für die Ausprägung einer bestimmten Eigenschaft verantwortlich sind, ebenfalls ein bekannter Marker verwendet und der zweite Genort dem des putativen Krankheitslocus gleichgesetzt, dessen Kopplung zum Marker getestet wird.

Die Multipoint-Analyse ist eine Erweiterung der Zweipunkt-Analyse, bei der eine Gruppe von bereits bekannten Markern zugrunde gelegt wird.

Es wird geprüft, ob der Krankheitslocus an bzw. innerhalb dieser Markergruppe gekoppelt ist bzw. bestimmt dessen wahrscheinlichste genetische Position. Es ist erforderlich, die genaue Reihenfolge der Marker anzugeben, die Rekombinationsfrequenzen zwischen den Markern der Gruppe möglichst genau zu kennen und korrekte Annahmen über die Interferenz zu machen.

An dieser Stelle möchte ich den Begriff der Interferenz näher erklären:

Bei der Aufstellung einer Genkarte ist die relative Crossing-over-Wahrscheinlichkeit zwischen zwei Genen (Genorten) entscheidend. Liegen zwei Genorte auf einem Chromosom nahe beieinander, ist die Wahrscheinlichkeit

ihrer Trennung durch Crossing-over gering; mit steigendem Abstand nimmt sie zu. Die Austauschhäufigkeiten lassen sich mit den Genabständen korrelieren und die Genabstände verhalten sich additiv, d.h. der Abstand A - C ist gleich der Summe aus A-B + B-C. Daraus folgt, dass die Genorte A, B und C linear auf dem Chromosom angeordnet sind. Die Werte für große Genabstände sind jedoch oft niedriger als erwartet (niedriger als die Summe kurzer Teilstrecken). Dieses Phänomen, Interferenz genannt, beruht auf der Beeinflussung der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines weiteren Crossing-over Ereignisses durch ein vorangegangenes.

Werden diese Voraussetzungen erfüllt, so hat die Multi-Marker-Analyse den großen Vorteil, dass sie einen mangelnden Informationsgehalt über das Vererbungsmuster an einem bestimmten Genort ausgleichen kann, indem sie die Information benachbarter Marker mitverwendet und dadurch eine kontinuierliche Positionierung des Lokus erlaubt, nicht nur die Wahrscheinlichkeitsbestimmung für die untersuchten Markerpositionen.

Die Verwendung des Multi-Marker-Ansatzes ist daher essentiell für eine akzeptable Mächtigkeit des Tests auf Kopplung.

Nicht konsistent mit den Ergebnissen der Multipoint-Berechnungen zeigten sich die Ergebnisse einer Singlepoint-Auswertung für die gleichen Familien mit mtm-Transmission und X-Kopplung mit 15 Markern.

Wie aus der Tabelle 15, einer Übersicht der Single-Point-Ergebnisse, hervorgeht, bestätigen sich signifikant die deutlich positiven Werte für den Marker D20S112 mit einem LOD-Wert von 3.63, einem α -HLOD von 3.63 und einem NPL von 2.40 bei einem p von 0.01.

Tabelle 15: Übersicht der Singlepoint-Analyse in den Familien mit mtm-Transmission und gleichzeitiger Kopplung zum X-Chromosom.

Marker	LOD-Score	α -HLOD-Score	NPL-Score	p-Wert	Markerabstände (cM)
D20S117	-5.44	0.33	0.53	0.30	0
D20S889	-3.84	0.01	0.23	0.41	8.37
D20S115	-2.62	0.32	0.84	0.20	9.95
D20S177	-1.61	0.01	0.38	0.35	3.55
D20S186	-0.74	0.44	1.06	0.14	7.6
D20S852	-5.29	0.01	-0.36	0.64	4.28
D20S112	3.63	3.63	2.40	0.01	2.67
D20S471	-8.87	-0.001	-0.96	0.83	3.03
D20S912	6.74	-0.003	-0.57	0.71	4.43
D20S195	-13.96	-0.000	-1.94	0.97	4.1
D20S107	-12.47	-0.000	-1.78	0.96	4.93
D20S119	-5.07	0.01	0.23	0.41	6.03
D20S196	-6.40	0.08	-0.46	0.67	13.28
D20S100	-3.97	0.12	0.06	0.47	9.73
D20S171	-5.98	-0.003	-0.70	0.76	10.92

cM: centiMorgan, der genetische Abstand zweier Loci auf einem Chromosom
 α -HLOD-Score: LOD-Wert bei Annahme von Heterogenität
NPL-Score: parameterfreier LOD-Wert
LOD-Score: Logarithm of the odds, Wahrscheinlichkeit für die Kopplung von Genen
P: Fehlerwahrscheinlichkeit

Bei der Interpretation eines Kopplungsergebnisses muss man jedoch auch immer die LOD-Werte der benachbarten Marker berücksichtigen.

Für die benachbarten Marker des Markers D20S112 sind die Ergebnisse deutlich negativ (D20S852: LOD = -5.29; D20S471: LOD = -8.87). Dieses Nebeneinander von stark positiven und deutlich negativen LOD-Werten (Markerabstände ca. 3cM) ist nicht vereinbar mit der Theorie der Kopplungsuntersuchung, da so dicht zusammenliegende Genorte auch meistens miteinander vererbt werden und ein so stark unterschiedliches LOD-Ergebnis (LOD-Differenz von etwa 9) nicht zulassen.

Bei einem Multi-Marker-Ansatz, wie in dieser vorliegenden Kopplungsuntersuchung, hat das Ergebnis der Multi-Point-Analyse jedoch eine größere Aussagekraft als die Singlepoint-Analyse.

Die Diskrepanz der beiden Ergebnisse ist allerdings diskussionswürdig.

3.4 Ergebnisse der Assoziationsanalyse

Wie bereits erwähnt gibt es bei der Identifikation eines krankheitsverursachenden Gens im allgemeinen zwei Herangehensweisen, die Kopplungsanalyse und die Assoziationsanalyse.

Während die Kosegregation eines bestimmten Phänotyps und eines Markers bzw. mehrerer Marker innerhalb eines Familienstammbaums durch die Kopplungsanalyse getestet wird, wird Korrelation auf Populationsebene mittels einer Assoziationsanalyse untersucht.

Als Ergebnis der Assoziationsanalyse mit Hilfe des zuvor beschriebenen Programms FBAT erhielten wir für 2 Marker ein positives und bei einem Grenzwert von $p = 0.005$ für die Fehlerwahrscheinlichkeit hochsignifikantes Ergebnis.

Einmal für den Marker D20S112, wobei bei der Berechnung über das komplette Kollektiv in 15 Familien eine positive Assoziation mit einem p-Wert von 0.022 beobachtet wurde, sowie für den Marker D20S177 in 12 Familien mit einem p-Wert von 0.003.

Bezeichnenderweise handelt es sich dabei um die beiden Marker, die schon in den Ergebnissen der Genehunter- und Genehunter-Plus-Auswertungen positive Ergebnisse gezeigt haben.

4. Diskussion

Die genetische Epidemiologie beschäftigt sich mit der Identifizierung und Charakterisierung von Genen, die ursächlich an der Entstehung von Krankheiten beim Menschen beteiligt sind. Im Unterschied zu anderen Forschungsrichtungen, bei denen es z.B. um die Sequenzierung des gesamten Genoms oder um die Bestimmung von Aufbau und Funktion geht, stehen in der Genetischen Epidemiologie jeweils die für eine bestimmte Krankheit ursächlichen genetischen Faktoren im Vordergrund. Hat man ein Gen gefunden, das eine bestimmte Krankheit verursacht oder zum Ausbruch der Krankheit beiträgt, so ergeben sich mehrere Möglichkeiten. Die wichtigste liegt in der Aufklärung des biologischen Defektes, welcher der Krankheit zugrunde liegt und dessen Ausgangspunkt die Mutation ist. Kennt man den Krankheitsmechanismus, so eröffnet dies die Perspektive, hieraus eine Therapie zu entwickeln, welche nicht am Symptom, sondern direkt an der Ursache der Krankheit angreift. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, die Krankheit bereits vor ihrem Ausbruch zu diagnostizieren, indem man die Mutation nachweist. Auf diese Weise können rechtzeitig vorbeugende Maßnahmen ergriffen werden. Die Möglichkeit einer Gentherapie gilt als Hoffnung, ist aber bislang noch nicht realisiert.

Bevor man ein krankheitsverursachendes Gen identifizieren und schließlich sequenzieren kann, muss es zunächst kartiert werden, also im Genom lokalisiert werden. Dabei ist zu untersuchen, in welcher genetischen Region betroffene Individuen zunächst Gemeinsamkeiten haben, die sie nicht mit Gesunden teilen. Dies geschieht üblicherweise mit Kopplungsanalyse, d.h. ausschließlich durch die Beobachtung, ob die Krankheit und ein Marker mit bekannter Position gemeinsam vererbt werden, also kosegregieren. Kenntnisse über funktionale Zusammenhänge zwischen bestimmten Genen oder Proteinen und der Krankheit sind hierfür nicht erforderlich. Kosegregation eines bestimmten Phänotyps und eines Markers bzw. mehrerer Marker innerhalb eines Familienstammbaums prüft man durch eine Kopplungsanalyse. Die Korrelation zwischen dem Auftreten einer Krankheit und einem bestimmten Allel eines Gens auf der Populationsebene wird

mittels einer Assoziationsanalyse untersucht. Die Kopplungsanalyse ist in der Lage, Kosegregation auch über vergleichsweise größere Distanzen festzustellen. Daher entscheidet man sich im allgemeinen für dieses Verfahren, wenn zu Anfang einer genetischen Studie keinerlei Hinweise auf die Position des gesuchten Gens vorliegen.

Kopplungs- und Assoziationsanalyse sind Standardmethoden der Genetischen Epidemiologie. Dank eines dichten Netzes von Markern auf allen menschlichen Chromosomen führt eine Kombination aus beiden Methoden relativ sicher zum Ziel, ein dichotomes Merkmal mit Mendelscher Vererbung zu kartieren, sofern dieses Merkmal durch ein einziges Gen definiert wird. Dichotome Merkmale haben zwei mögliche Ausprägungen, also beispielsweise von einer Krankheit „betroffen“ oder „nicht betroffen“. Der Begriff der Mendelschen Vererbung umfasst den dominanten und rezessiven monogenen Erbgang. Deutlich schwieriger ist die Kartierung komplexer Erkrankungen, bei denen die Ausprägung der Krankheit von Umweltfaktoren und von zusätzlichen genetischen Faktoren abhängt. Eine Kopplungsanalyse kann in dieser Situation nur Hauptgene identifizieren und ist durch die zwangsläufige Heterogenität bezüglich Power und Reproduzierbarkeit stark eingeschränkt. Weiterhin können Personen betroffen sein, ohne die betreffende Mutation zu haben (sporadische Fälle oder Phänokopien) oder umgekehrt gesund sein, obwohl sie die Mutation tragen (reduzierte Penetranz).

Eine solche erschwerte Situation stellt sich bei der Suche nach einem Kandidatengen für das familiäre Prostatakarzinom.

In meiner Arbeit gehe ich der Frage nach, ob und in welchem Umfang im deutschen Kollektiv das hereditäre Prostatakarzinom mit einem Locus auf Chromosom 20 gekoppelt ist und der Locus HPC20 bestätigt werden kann.

4.1 Kritische Betrachtung meiner Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit können den Lokus HPC20 auf 20q von Berry et al. (2000) nicht bestätigen.

Die Daten der Multipointberechnung erbrachten bei der Analyse des Gesamtkollektivs keinen Hinweis auf eine mögliche Kopplung des hereditären Prostatakarzinoms mit dem Chromosom 20q.

Die Untersuchung der durch Stratifikation nach jeweils gemeinsamen Eigenschaften (z.B. mtm-Transmission, gleichzeitig vorhandene Kopplung zum X-Chromosom) gewonnen Untergruppen konnte letztendlich auch keine Bestätigung des HPC20 oder den Hinweis auf einen anderen Lokus auf Chromosom 20 innerhalb des Ulmer Kollektivs erbringen.

Bei der Identifizierung von Kandidatengenen und insbesondere bei der Bestätigung solcher Gene in nachfolgenden Studien durch Kopplungsuntersuchungen treten besonders im Fall des hereditären Prostatakarzinoms zahlreiche Probleme auf, die eine erfolgreiche Suche erschweren:

- Keine sichere Unterscheidung zwischen sporadischen und hereditären Fällen.
- Unvollständige Penetranz.
- Hohe Phänokopierate.
- Hohes Manifestationsalter.
- Starke Heterogenität, die es unwahrscheinlich macht, dass ein bestimmtes Gen in zwei verschiedenen Kollektiven Prostatakarzinom hervorruft.

Aufgrund dieser besonderen Voraussetzungen beim Prostatakarzinom ist zu erwarten, dass ein gefundener Locus in einer Replikationsstudie innerhalb eines anderen Kollektivs nur schwer bestätigt werden kann, obwohl er tatsächlich innerhalb des ursprünglichen Kollektivs eine Rolle bei der Entstehung oder Entwicklung des Prostatakarzinoms spielt.

Dies erklärt die zahlreichen unterschiedlichen, scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse für das Prostatakarzinom.

4.1.1 Vererbungsmodelle

Für die Vererbung des Prostatakarzinoms wurden sowohl Hinweise für ein autosomal-dominantes (Carter et al. 1992; Schaid et al. 1998) als auch für ein autosomal-rezessives oder X-chromosomales Vererbungsmodell (Monroe et al. 1995; Narod et al. 1995) gefunden.

Möglich scheint auch ein sog. „Two-Locus-Model“, das für Familien mit „early-onset“ einen autosomal-dominanten Effekt vorsieht und für Familien mit „late-onset“ eher einen autosomal-rezessiven oder X-gekoppelten Effekt.

Große Familien mit mehreren Betroffenen in jeder Generation, welche in den bislang durchgeführten Kopplungsuntersuchungen häufig bevorzugt wurden, setzen einen autosomal-dominanten Erbgang voraus. Ein autosomal-rezessiver Erbgang hingegen erklärt eher das Vorkommen zweier betroffener Brüder bei nicht betroffenem Vater. Im Ulmer Kollektiv waren häufig zwei betroffene Brüder der Grund für die Aufnahme einer Familie in die Studie. In 42% der Familien hingegen weist die Stammbaumstruktur auf einen autosomal-dominanten Erbgang hin.

Die Ergebnisse dieser Studie geben keinen Hinweis dafür, dass einer der oben erwähnten Vererbungsmodi für das untersuchte Kollektiv zutreffender wäre als der andere.

Die jeweils höheren LOD-Werte in allen Analysen meiner Arbeit mit der Stratifizierung, die besonders eine gleichzeitig vorliegende Kopplung mit dem X-Chromosom betont, sprechen für eine mögliche X-chromosomale Vererbung mit einer Interaktion der beiden Chromosome.

Eine andere Schlussfolgerung lassen die hohen LOD-Werte in der Stratifizierung zu, die das Nebeneinander von vorliegender Kopplung zum X-Chromosom bei gleichzeitiger mtm-Transmission betont. Diese beiden Voraussetzungen schließen sich eigentlich nach der klassischen Mendelschen Vererbungslehre

aus, da normalerweise für einen X-chromosomalen Lokus keine Kopplung zu einem autosomalen Lokus möglich ist. Diese Voraussetzungen würden sich bei rein autosomalen oder rein X-chromosomalen Erbgängen gegenseitig ausschließen. Aber eine mögliche Interaktion oder ein multifaktorielles Geschehen kann mit nicht regulären Erbgängen vereinbar sein (siehe dazu Ergebnisteil S.56/57) und könnte beim familiärem Prostatakarzinom eine Rolle spielen.

4.2 Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit anderen Untersuchungen auf Chromosom 20 zum familiären Prostatakarzinom

Durch eine genomweite Linkageuntersuchung mit 162 Nordamerikanischen Familien mit ≥ 3 an Prostatakrebs erkrankten Angehörigen fanden Berry und Mitarbeiter im Jahr 2000 erstmals Beweise für eine Kopplung mit Markern auf dem Chromosom 20, genauer auf dem langen Arm des Chromosoms (20q13).

Für den gesamten Datensatz dieser Autoren errechnete sich ein maximaler Multipoint NPL von 3.02 ($p = 0.001$) für den Marker D20S887.

Der stärkste Hinweis auf Kopplung wurde in den folgenden Stratifizierungen gefunden:

- Familien mit weniger als 5 erkrankten Angehörigen
(Multipoint-NPL = 3.22, $p = 0.001$)
- Ein spätes durchschnittliches Diagnosealter
(Multipoint_NPL = 3.40, $p = 0.001$)
- Vorliegen von non-male-to-male Transmission
(Multipoint-NPL = 3.94, $p < 0.001$)

Durch die Kombination dieser drei Stratifizierungsmerkmale ($n=19$ Familien) errechnete sich ein Multipoint-NPL von 3.69 ($p = 0.0001$) für den Marker D20S196 auf Chromosom 20q13. Auch durch eine weitere Analyse nach der

modelfreien „Allele-sharing-Methode“ ergaben sich mit einem NPL-Score von 3.94 ($p < 0.0001$) starke Hinweise für eine Kopplung.

Die von Berry et al. (2000) erhobenen Daten ergaben keine signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen bei der Verwendung eines rezessiven gegenüber einem dominanten Model. Durch Stratifizierungen ergab sich lediglich der Hinweis auf das Vorliegen einer „non-male-to-male“ Transmission. Die Frage des Vererbungsmodells konnte, ebenso wie in meiner hier vorliegenden Untersuchung, nicht geklärt werden.

Der Locus HPC20 von Berry et al.(2000) scheint also verantwortlich für eine weniger aggressive Form des familiären Prostatakarzinoms mit einer nicht besonders starken Penetranz und mit „non-male-to-male“ Transmission.

Meine Ergebnisse können den HPC20 von Berry et al. (2000) nicht bestätigen. Für deren am stärksten gekoppelten Marker D20S196 auf 20q13 ergab meine Analyse einen LOD-Score von $-6,4$ sowie einen NPL-Score von -0.456 ($p = 0.67$) und damit einen Ausschluss von Kopplung in diesem Bereich des Ulmer Kollektivs.

Meine Ergebnisse ergeben lediglich einen schwachen Hinweis im Bereich des Markers D20S115 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20p, also in einem völlig anderen Region von Chromosom 20. Interessanterweise erhielten Berry et al. (2000) in einem nicht weit entfernten Bereich ($< 10\text{cM}$) für den Marker D20S186 auf 20p einen zweiten, weniger stark positiven Peak (NPL = 1.26), auf den allerdings im Originalartikel nicht weiter eingegangen wurde.

Die Stratifizierungen in meiner Arbeit zeigten eine ganz andere Tendenz als bei Berry et al. (2000). Tendenziell höhere Ergebnisse erhielt ich in den Stratifizierungen mit

- einem durchschnittlichen Erstdiagnosealter < 65 Jahre,
- mehr als drei Erkrankungsfälle innerhalb einer Familie,
- Vorliegen von „male-to-male“ Transmission und
- Positiven NPL-Werten für Marker auf dem X-Chromosom

Die Stratifizierungen meiner Untersuchung weisen auf einen Locus hin, der verantwortlich wäre für ein frühes Auftreten innerhalb von Familien mit mehreren Betroffenen und einer Vererbung vom Vater auf die Söhne, also einem x-chromosomalen Erbgang.

Die Kombination der beiden Stratifizierungen mit den höchsten Ergebnissen, „male-to-male“ Transmission und X-Kopplung, schließen sich eigentlich aus.

Aber eine mögliche Interaktion oder ein multifaktorielles Geschehen kann mit nicht regulären Erbgängen erklärt werden und könnte beim familiärem Prostatakarzinom eine Rolle spielen. Denkbar wäre eine Vererbung aus beiden Familienästen, der mütterlichen und väterlichen Seite, mit unterschiedlichen Erbgängen.

Bei diesen komplexen Erbgängen mit einer Interaktion zwischen Autosomen und X-Chromosom, würde die mtm-Komponente durch die Autosomen vertreten, die sich in den Söhnen manifestiert. Diese Manifestation könnte aber von einem x-chromosomalen Allel abhängig sein, dessen gemeinsame Vererbung von der Mutter zu dem positivem NPL-Score führt.

Berry et al. (2000) überprüften ihre Familien ebenfalls auf eine mögliche Interaktion zwischen dem Chromosom 20 und dem X-Chromosom. Dabei fanden sie für 16% ihrer Familien eine positive Kopplung mit HPCX (Marker AFMA 113zf5). Allerdings sprachen die Ergebnisse letztendlich nicht für eine Interaktion, wobei die Möglichkeiten einer aussagekräftigen Analyse in dieser Fragestellung von Berry et al. (2000) als sehr begrenzt eingestuft wurden, da keine systematische Prüfung durchgeführt wurde.

Dagegen wiesen die Familien in meiner Untersuchung in fast 65% der Familien (63 von insgesamt 103 Familien) eine scheinbar positive Kopplung zum HPCX auf. Diese mtm-Transduktion stammt jedoch aus den sog. anamnestischen Vätern in denen die Marker nicht bekannt waren und kann daher nicht gewertet werden.

4.2.1 Vergleich meiner Ergebnisse mit den bisherigen Replikationsversuchen des HPC20:

Bislang konnte der HPC20 in keiner Replikationsstudie definitiv bestätigt werden. In zwei Studien fanden sich lediglich Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen Chromosom 20 und dem familiären Prostatakarzinom (Bock et al. 2001; Zheng et al. 2001; Cancel-Tassin et al. 2001), während vier weitere Untersuchungen keinerlei Hinweis auf einen Zusammenhang ergaben (Cancel-Tassin et al. 2001; Hsieh et al. 2001 ;Smith et al. 1996; Suarez 2000).

Bock et al. (2001) fanden in ihrer Analyse den stärksten Hinweis auf Kopplung in 16 afroamerikanischen Familien ($LOD = 0.86$, $Z_{lr} = 1.99$, $p = 0.023$) im Bereich der Marker D20S893 und D20S120 unter der Annahme eines autosomal-dominanten Vererbungsmodells. Diese Marker liegen zwar nur einige centiMorgan (< 10 cM) entfernt von HPC 20 auf 20q13, aber die Originalstudie von Berry et al. (2000) enthielt keine afroamerikanischen Familien und nach der Stratifizierung entsprechend den Kriterien von Berry et al. (2000) fanden Bock et al. (2001) keinerlei Hinweis mehr auf eine Kopplung zum Chromosom 20.

Höhere Ergebnisse, aber letztlich ebenfalls keine statistisch signifikante Bestätigung des HPC 20 erhielten Zheng et al. (2001) in ihrer Untersuchung an 159 Familien des John Hopkins-Hospitals mit einem NPL-Score von 1.02 ($p = 0.15$) auf D20S195 20q11.

Wie bei Berry et al. (2000) fanden sich größere NPL-Werte in den Untergruppen mit folgenden Kriterien:

- Höheres Diagnosealter (≥ 65), $NPL = 1.94$, $p = 0.029$, für D20S186
- ≤ 5 betroffene Familienmitglieder, $NPL = 1.74$, $p = 0.037$, für D20S889
- „no-male-to-male“ Transmission, $NPL = 1.01$, $p = 0.15$, für D20S117

Aber in den Familien, die allen drei oben genannten Voraussetzungen entsprechen, zeigte sich kein Hinweis für Linkage, weder parametrisch noch nicht-parametrisch.

Interessanterweise stammen die Beiträge zur Kopplung von 133 kaukasischen Familien, während für die 14 afroamerikanischen Familien der NPL-Score null ergab.

Auffällig ist in dieser Untersuchung das Ergebnis für den Marker D20S186 auf 20p. Er taucht auch wie schon zuvor erwähnt bei Berry et al. (2000) auf und ist nicht weit entfernt ($<10\text{cM}$) von dem Marker D20S115 mit einem NPL von 1.26 in meiner Untersuchung.

Ebenfalls positive Ergebnisse fanden Zheng et al. (2001) im Bereich des Markers D20S112 für 80 Familien, deren Erkrankungsalter ≥ 65 Jahre beträgt (NPL = 1.80, $p = 0.038$). Dieser Marker hat in den Ergebnissen meiner Singlepoint-Analysen die positivsten Ergebnisse erreicht (NPL = 2.40, $p = 0.01$), allerdings stehen diese Singlepoint-Ergebnisse in einer deutlichen Diskrepanz zu den Ergebnissen der Multipoint-Analyse meiner Untersuchung. Bemerkenswert ist jedoch, dass Marker in einem sehr engen Bereich auf 20p wiederholt in unabhängigen Untersuchungen positive Ergebnisse zeigen. Ein Sachverhalt, der für den ursprünglich gefundenen HPC 20 auf 20q13 bislang nicht zutrifft.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse meiner Studie jedoch keinen statistisch harten Hinweis auf ein Suszeptibilitätsgen auf Chromosom 20.

Die positiven NPL- und HLOD-Werte der Multipoint-Analyse scheinen nicht real möglich, da der Marker mit positiven Werten von Markern mit negativen Werten flankiert wird. Normalerweise wäre zu erwarten, dass dicht benachbarte Marker ebenfalls in einem gewissen Umfang miteinander koppeln. Dies trifft für die untersuchten Marker jedoch nicht zu. In den ersten Analysen waren die Abstände der verwendeten Marker sehr groß. Beim Versuch der Feinkartierung nach Erweiterung des Markersets und damit einer deutlichen Verkleinerung der einzelnen Markerabstände zueinander zeigten sich keine eindeutig positiven LOD-Werte mehr. Eine mögliche Erklärung könnte hierfür das für Linkageanalysen bekannte, sogenannte „Pushing off the map“- Phänomen bieten. Dabei führen Modellierungsfehler zu einer Verschiebung des

Krankheitslokus von den Marken weg; liegen die Marker sehr dicht, so kann ein Krankheitslokus ganz aus der Kopplung herausfallen.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle könnte darin bestehen, dass der beobachtete Ausschluss X-chromosomaler Kopplung, also eine Vererbung vom Vater an seine Söhne, nicht wirklich vorliegt, sondern es sich dabei in einer der Generationen um Phänokopien handelt und nicht um direkte Vererbung. In diesem Fall würde ein möglicherweise vorhandenes Linkage-Signal verschwinden.

4.3 Entwicklung der Ergebnisse für HPC-20 und Ausblick

Im Jahre 2004 wurde durch das „International Consortium for Prostate Cancer Genetics (ICPCG)“ der Versuch unternommen den HPC20-Lokus auf Chromosom 20q13 zu replizieren (Schaid et al. 2005). Dabei handelt es sich um ein Gemeinschaftsunternehmen vieler internationaler Prostatakarzinom-Forschungsgruppen mit der Zielsetzung möglichst viele Prostatakarzinomfamilien für gemeinsame Analysen zusammenzuführen, um so bisherige positive Linkage-Ergebnisse in Replikationsstudien mit hohen Fallzahlen zu bestätigen.

Für den Versuch einer Replikation des HPC20 standen so insgesamt 108 Familien zu Verfügung. Im Fall der 158 sog. Mayo-Familien der Originalstudie von Berry et al. errechnete sich ein HLOD von 2,78. In den restlichen nicht an der Orginalanalyse beteiligten 1076 Prostatakarzinomfamilien des ICPCG wurde ein HLOD von 0,06 erreicht. Damit konnte der HPC20, einer der Loci mit der bisher stärksten Kopplung in der Literatur weder über die gesamten Familien noch in Untergruppen bestätigt werden.

Die wohl einfachste Erklärung wäre, würde man den HPC 20 von Berry et al. (2000) als falsch positives Ergebnis ansehen. Daneben gibt es aber eine Reihe weiterer Möglichkeiten, so dass ein falsch positives Ergebnis ebenso wenig auszuschließen ist. Die Gründe sind vielfältig und auch international gibt es keine allgemein akzeptierten Interpretationen oder Lösungsansätze, z.B. konnte die

Analyse des ICPCG zu Chromosom 20 auf der weltweiten Familiensammlung nur dann zu einem Kopplungsbefund führen, wenn die fehlende Reproduzierbarkeit des Kopplungsbefunds nicht durch Heterogenität bedingt war. Bei Heterogenität wird diese mit der Vergrößerung der Stichprobe nur ebenfalls vergrößert.

Im folgenden seien einige weitere ähnliche Aspekte kurz angesprochen: Besonders schwierig ist Heterogenität, wenn die Diskrepanz der Untersuchungsergebnisse auch auf Populationsunterschiede zurückzuführen ist. Ein großer Teil der Mayo-Familien hat skandinavische Vorfahren, eine Population, die in dem Pool der ICPCG-Familien nicht stark repräsentiert ist.

Weiterhin stellen auch in diesem Zusammenhang Phänokopien ein Problem dar, da eine Phänokopie in einem kleineren Stammbaum mit nur 2 oder 3 Generationen ein eigentlich vorhandenes Linkage-Signal verschwinden lässt. Allgemein könnten die Probleme von Replikationsstudien in der hohen Phänokopierate liegen, da es bislang keine sicheren Tumor- oder klinischen Kriterien gibt, die eine Unterscheidung zwischen hereditärem und nicht hereditärem Prostatakarzinom zulassen. Aus diesem Grund bleibt die wahre Phänokopierate unbekannt und bei der Durchführung von Linkageanalysen weiterhin eine schwer zu berücksichtigende Unbekannte.

Um diesen Schwierigkeiten zu begegnen wären leistungsfähigere Analyseprogramme notwendig, die verschiedene potentielle Loci gleichzeitig berücksichtigen können, da es als sicher angesehen wird, dass die Entstehung des Prostatakarzinoms nicht durch ein einzelnes unabhängiges, autosomal-dominantes Gen, sondern wahrscheinlich durch multiple, rezessive und miteinander interagierende Gene zu erklären ist, die sich zudem noch stark in unterschiedlichen Populationen unterscheiden (Risch 2001).

Ein anderer Möglichkeit besteht darin weitere Linkage-Analysen durchzuführen, die nur extrem aggressive Erkrankungsverläufe, oder pathologische Informationen wie beispielsweise den Gleason-Score als Grad der Tumormalignität berücksichtigen (Witte et al. 2000).

Die angeführten Ergebnisse scheinen zu zeigen, dass der Locus HPC20 oder andere Loci auf Chromosom 20 eher weniger mit dem hereditärem Prostatakarzinom in Verbindung zu bringen sind. Jedoch wurde in anderen Studien gezeigt, dass das Chromosom 20 durchaus eine Rolle bei der Entstehung und vor allem der Entwicklung von Metastasen beim Prostatakarzinom spielt. So wurde ein Tumormetastasen-Suppressorregion auf dem kurzen Arm des Chromosoms 20 (20p11.23-22) lokalisiert (Goodarzi et al. 2001). Eine andere Untersuchung zeigte eine Überexpression von 4 Genen (CSEIL, ZNF217, MYBL2 und STK15) auf 20q13 in Prostatakarzinomen, zwei davon zeigten ebenfalls eine Überexpression in Prostatakarzinom-Metastasen (MYBL2, STK15) (Bar-Shira et al. 2002).

Derartige Befunde bieten Ansätze zur Stratifizierung von Familien und sollten solange verfolgt werden, bis bessere Programme für umfassendere Analysen unter Berücksichtigung von Heterogenität und Phänokopien zur Verfügung stehen.

Die Frage nach der Rolle des Chromosoms 20 bei der Entstehung und Metastasierung des Prostatakarzinoms bleibt also weiterhin unbeantwortet und weitere Studien müssen zur Klärung abgewartet werden.

5. Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom ist die zweithäufigste Krebserkrankung und die dritthäufigste krebsbedingte Todesursache bei Männern in Deutschland. Man geht dabei in ca. 10% von hereditären Fällen aus, d.h. der Erkrankung liegt eine genetische Prädisposition zugrunde.

Dabei ist der Vererbungsmodus unbekannt und lediglich eine starke genetische Heterogenität gesichert, d.h. ursächlich sind mehrere Gene. Wahrscheinlich sind auch in verschiedenen Patientenkollektiven ganz unterschiedliche Gene für eine Prädisposition zur Ausprägung eines Prostatakarzinoms verantwortlich.

Bei der Suche nach entsprechenden Kandidatengenen bedient man sich der Methode der Kopplungsanalyse, die die Kosegregation eines bestimmten Phänotyps (in unserem Fall die maligne Entartung der Prostata) mit einem Locus untersucht und das Ergebnis mit einem LOD-(Logarithm of the odds-)Wert ausdrückt. Für die Kopplung eines untersuchten Phänotyps mit einem Locus gelten nach allgemeiner Konvention LOD-Werte von mindestens 3,0 als signifikant (in Replikationsstudien bereits für LOD-Werte > 1); für Werte kleiner als $-2,0$ ist eine Kopplung auszuschließen.

Bislang wurde in verschiedenen Untersuchungen eine Kopplung zu jeweils unterschiedlichen Chromosomen und Loci gefunden.

Auf Chromosom 20q13 zeigten sich in einer genomweiten Kopplungsanalyse mit 162 nordamerikanischen Familien deutlich positive Signale.

In der vorliegenden Untersuchung, dem Versuch einer Replikationsstudie, wurde das Kollektiv der Ulmer Prostatakarzinom-Familien auf eine eventuell vorhandene Kopplung mit dem Chromosom 20 untersucht.

Dabei wurden 108 Familien mit 277 Betroffenen und 354 verfügbaren DNA-(Deoxyribonukleinsäure-) Proben mit zunächst 9 Markern und in einem zweiten Schritt mit insgesamt 15 Markern, um die anfangs großen Abstände zwischen den ursprünglichen Markern zu verringern, genotypisiert und anschließend mit verschiedenen Analyseprogrammen (GENEHUNTER, GENEHUNTER PLUS und FBAT) ausgewertet. Dabei wurde auch versucht durch Stratifizierung nach

unterschiedlichen Kriterien homogene Untergruppen zu bilden, um einen genetischen Zusammenhang unter speziellen Voraussetzungen wie etwa mtm- (male-to-male) Transmission zu überprüfen.

Über das gesamte Kollektiv konnte in den jeweiligen Analysen kein Hinweis für Kopplung gefunden werden und der Locus HPC20 auf D20q13 nicht im Ulmer Kollektiv bestätigt werden.

In einer Auswertung nach der „Kong & Cox-allele-sharing“-Methode (GENEHUNTER-PLUS) zeigte sich bei einer Gewichtung der Familien mit mtm, X-Kopplung und einem early onset disease (ED < 65) besonders für den Marker D20S112 ein Kopplungshinweis (Z_{lr} -Wert von 2,81; assoziierter $LOD_{Z_{lr}}$ -Wert von 2,58). Die GENEHUNTER-PLUS -Analyse ergab einen formal signifikanten LOD-Wert von 3,63 (NPL = Non-parametric-LOD-Score 2,40; p = Fehlerwahrscheinlichkeit 0,01) im Bereich des Marker D20S112.

Dabei zeigten allerdings die flankierenden Marker D20S852 und D20S471 stark negative Werte, ein Ergebnis, das mit der Theorie der Kopplungsuntersuchung nicht vereinbar ist und unter anderem durch zu große Abstände zwischen den Markern erklärbar ist. Nach Ergänzung des Markersets auf insgesamt 15 Markern verschob sich der zuvor deutlich positive Wert im Bereich des Markers D20S112 in den negativen Bereich; an der Stelle des bisherigen Maximums zeigte sich nun ein LOD-Wert von $-1,92$ ($p = 0,14$) und damit kein Hinweis mehr auf Kopplung.

Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte durch das sog. „Pushing off the map“-Phänomen oder durch das vermeintliche Vorliegen von x-chromosomalen Erbgängen bei tatsächlich vorliegenden Phänokopien erklärt werden.

Insgesamt bleibt die Rolle des Chromosom 20 in Verbindung mit dem familiärem Prostatakarzinom unklar. Eventuell kann mit Hilfe besserer Analyse-Programme unter Berücksichtigung von Heterogenität und Phänokopien in weiteren Untersuchungen diese Frage geklärt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends, 3. erweiterte und aktualisierte Ausgabe, Saarbrücken 2002, 56-57.
2. Bar-Shira A, Pinthus JH, Rozovsky U, Goldstein M, Sellers WR, Yaron Y, Eshhar Z, Orr-Urtreger A: Multiple genes in human 20q13 chromosomal region are involved in an advanced prostate cancer xenograft. *Cancer Res* 2002;62:6803-07.
3. Bench AJ, Aldred MA, Humphray SJ, Champion KM, Gilbert JG, Asimakopoulos FA, Deloukas P, Gwilliam R, Bentley DR, Green AR: A detailed physical and transcriptional map of the region of chromosome 20 that is deleted in myeloproliferative disorders and refinement of the common deleted region. *Genomics* 1998;49:351-62.
4. Berry R, Schroeder JJ, French AJ, McDonnell SK, Peterson BJ, Cunningham JM, Thibodeau SN, Schaid DJ: Evidence for a prostate cancer-susceptibility locus on chromosome 20. *Am J Hum Genet* 2000;67:82-91.

5. Bochum S, Paiss T, Vogel W, Herkommer K, Hautmann R, Haeussler J: Confirmation of the prostate cancer susceptibility locus HPCX in a set of 104 German prostate cancer families. *Prostate* 2002;52:12-19.
6. Bock CH, Cunningham JM, McDonnell SK, Schaid DJ, Peterson BJ, Pavlic RJ, Schroeder JJ, Klein J, French AJ, Marks A, Thibodeau SN, Lange EM, Cooney KA: Analysis of the prostate cancer-susceptibility locus HPC20 in 172 families affected by prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 2001;68:795-801.
7. Brawer MK: Prostate cancer. *J Urol* 1995;153:115-16.
8. Cancel-Tassin G, Latil A, Valeri A, Guillaume E, Mangin P, Fournier G, Berthon P, Cussenot O: No evidence of linkage to HPC20 on chromosome 20q13 in hereditary prostate cancer. *Int J Cancer* 2001;93:455-56.
9. Cannon L, Bishop Dt, Skolnick M, Hunt S, Lyon JL, Smart CR: Genetic epidemiology of prostate cancer in the Utah Mormon genealogy. *Cancer Surv* 1982;47-69.
10. Carter B, Beaty T, Steinberg G, Childs B, Walsh P: Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proc Natl Sci USA* 1992;89:3367-71.
11. Carter BS, Bova GS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Isaacs WB: Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *J Urol* 1993;150:797-802.

12. Cerhan JR, Torner JC, Lynch CF, Rubenstein LM, Lemke JH, Cohen MB, Lubaroff DM, Wallace RB: Association of smoking, body mass, and physical activity with risk of prostate cancer in the Iowa 65+ Rural Health Study (United States). *Cancer Causes Control* 1997;8:229-38.
13. Cohen D, Chumakov, I., Blumfeld M, and Bougueleret L: Prostate cancer Gene. (US005945522A). 31-8-1999. US. Ref Type: Patent
14. Collins C, Volik S, Kowbel D, Ginzinger D, Ylstra B, Cloutier T, Hawkins T, Predki P, Martin C, Wernick M, Kuo WL, Alberts A, Gray JW: Comprehensive genome sequence analysis of a breast cancer amplicon. *Genome Res* 2001;11:1034-42.
15. Cunningham JM, Shan A, Wick MJ, McDonnell SK, Schaid DJ, Tester DJ: Allelic imbalance and microsatellite instability in prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1996;56:4475-82.
16. Deloukas P, Matthews LH, Ashurst J, Burton J, Gilbert JG, Jones M Stavrides G, Almeida JP, Babbage AK, Bagguley CL, Bailey J, Barlow KF, Bates KN, Beard LM, Beare DM, Beasley OP, Bird CP, Blakey SE, Bridgeman AM, Brown AJ, Buck D, Burrill W, Butler AP, Carder C, Carter NP, Chapman JC, Clamp M, Clark G, Clark LN, Clark SY, Clee CM, Clegg S, Copley VE, Collier RE, Connor R, Corby NR, Coulson A, Coville GJ, Deadman R, Dhami P, Dunn M, Ellington AG, Frankland JA, Fraser A, French L, Garner P, Grafham DV, Griffiths C, Griffiths MN, Gwilliam R, Hall RE, Hammond S, Harley JL, Heath PD, Ho S, Holden JL, Howden PJ,

- Huckle E, Hunt AR, Hunt SE, Jekosch K, Johnson CM, Johnson D, Kay MP, Kimberley AM, King A, Knights A, Laird GK, Lawlor S, Lehvaslaiho MH, Leversha M, Lloyd C, Lloyd DM, Lovell JD, Marsh VL, Martin SL, McConnachie LJ, McLay K, McMurray AA, Milne S, Mistry D, Moore MJ, Mullikin JC, Nickerson T, Oliver K, Parker A, Patel R, Pearce TA, Peck AI, Phillimore BJ, Prathalingam SR, Plumb RW, Ramsay H, Rice CM, Ross MT, Scott CE, Sehra HK, Shownkeen R, Sims S, Skuce CD, Smith ML, Soderlund C, Steward CA, Sulston JE, Swann M, Sycamore N, Taylor R, Tee L, Thomas DW, Thorpe A, Tracey A, Tromans AC, Vaudin M, Wall M, Wallis JM, Whitehead SL, Whittaker P, Willey DL, Williams L, Williams SA, Wilming L, Wray PW, Hubbard T, Durbin RM, Bentley DR, Beck S, Rogers J: The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 20. *Nature* 2001;414:865-71.
17. Dhom G: Pathology and classification of prostatic carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 1976;210-18.
18. Dhom G: Epidemiologic aspects of latent and clinically manifest carcinoma of the prostate. *J Cancer Res Clin Oncol* 1983;106:210-18.
19. Dhom G: Epidemiologic and morphogenetic aspects of prostate cancer. *Urologe A* 1991;30:3-4.
20. Ekman P: Genetic and environmental factors in prostate cancer genesis: identifying high-risk cohorts. *Eur Urol* 1999;35:362-69.

21. Elghany NA, Schumacher MC, Slattery ML, West DW, Lee JS:
Occupation, cadmium exposure, and prostate cancer. *Epidemiology*
1990;1:107-15.
22. Gibbs M, Stanford JL, Jarvik GP, Janer M, Badzioch M, Peters MA Goode
EL, Kolb S, Chakrabarti L, Shook M, Basom R, Ostrander EA, Hood L: A
genomic scan of families with prostate cancer identifies multiple regions of
interest. *Am J Hum Genet* 2000;67:100-09.
23. Glover FE, Jr., Coffey DS, Douglas LL, Russell H, Cadigan M, Tulloch T,
Wedderburn K, Wan RL, Baker TD, Walsh PC: Familial study of prostate
cancer in Jamaica. *Urology* 1998;52:441-43.
24. Goddard KA, Witte JS, Suarez BK, Catalona WJ, Olson JM. Model-free
linkage analysis with covariates confirms linkage of prostate cancer to
chromosomes 1 and 4. *Am J Hum Genet* 2001;68:1197-206.
25. Goldgar DE, Easton DF, Cannon-Albright LA, Skolnick MH: Systematic
population-based assessment of cancer risk in first-degree relatives of
cancer probands. *J Natl Cancer Inst* 1994;86:1600-08.
26. Goodarzi G., Mashimo T, Watabe M, Cuthbert AP, Newbold R, Pai SK,
Hirota S, Hosobe S, Miura K, Bandyopadhyay S, Gross SC, Balaji KC,
Watabe K: Identification of tumor metastasis suppressor region on the short
arm of human chromosom 20. *Cancer* 2001;32:33-42.

27. Goodarzi G, Mashimo T, Watabe M, Cuthbert AP, Newbold RF, Pai SK et al. Identification of tumor metastasis suppressor region on the short arm of human chromosome 20. *Genes Chromosomes Cancer* 2001;32:33-42.
28. Gronberg H, Damber L, Damber JE: Studies of genetic factors in prostate cancer in a twin population. *J Urol* 1994;152:1484-87.
29. Gronberg H, Damber L, Damber JE, Iselius L: Segregation analysis of prostate cancer in Sweden: support for dominant inheritance. *Am J Epidemiol* 1997;146:552-57.
30. Hsieh CL, Oakley-Girvan I, Balise RR, Halpern J, Gallagher RP, Wu AH, Kolonel LN, O'Brien LE, Lin IG, Van Den Berg DJ, Teh CZ, West DW, Whittemore AS : A genome screen of families with multiple cases of prostate cancer: evidence of genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet* 2001;69:148-58.
31. Hsing AW, McLaughlin JK, Hrubec Z, Blot WJ, Fraumeni JF Jr: Tobacco use and prostate cancer: 26-year follow-up of US veterans. *Am J Epidemiol* 1991;133:437-41.
32. Hsing AW, Tsao L, Devesa SS: International trends and patterns of prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer* 2000;85:60-67.
33. Keetch DW, Rice JP, Suarez BK, Catalona WJ: Familial aspects of prostate cancer: a case control study. *J Urol* 1995;154:2100-02.

34. Kong A, Cox NJ: Allele-sharing models: LOD scores and accurate linkage tests. *Am J Hum Genet* 1997;61:1179-88.
35. Kruglyak L, Daly M, Reeve-Daly M, Lander E: Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am J Hum Genet* 1996;1347-63.
36. Lander E, Kruglyak L: Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nat Genet* 1995;11:241-47.
37. Li L, Krantz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont ME, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB: Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1. *Nat Genet* 1997;16:243-51.
38. Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: *Molecular Cloning (A laboratory manual)*, 2. Auflage, New York: Cold Spring Harbor Laboratory 1989, 13.3-14.30.
39. Monroe KR, Yu Mc, Kolonel LN, Coetzee GA, Wilkens LR, Ross RK, Henderson BE: Evidence for an X-linked or recessive genetic component to prostate cancer risk. *Nat Med* 1995;1:827-29.
40. Morganti G, Gianferrari L, Cresseri A, Arrigoni G, Lovati G. Recherches clinicostatistiques et génétiques sur les néoplasies de la prostate. *Acta Genet Stat Med* 1956;6:304-05.

41. Narod S: Genetic epidemiology of prostate cancer. *Biochim Biophys Acta* 1998;F1-F13.
42. Narod SA, Dupont A, Cusan L, Diamond P, Gomez JL, Suburu R, Labrie F: The impact of family history on early detection of prostate cancer. *Nat Med* 1995;1:99-101.
43. Ostrander EA, Stanford JL: Genetics of prostate cancer: too many loci, too few genes. *Am J Hum Genet* 2000;67:1367-75.
44. Otto J, *Complex Traits, Analysis of Human Genetics, Third Edition*, The John Hopkins University Press, Baltimore and London 1999, 320-325.
45. Page WF, Braun MM, Partin AW, Caporaso N, Walsh P: Heredity and prostate cancer: a study of World War II veteran twins. *Prostate* 1997;33:240-45.
46. Putnam SD, Cerhan JR, Parker AS, Bianchi GD, Wallace RB, Cantor KP, Lynch CF: Lifestyle and anthropometric risk factors for prostate cancer in a cohort of Iowa men. *Ann Epidemiol* 2000;10:361-69.
47. Rigaud G, Missiaglia E, Moore PS, Zamboni G, Falconi M, Talamini G, Pesci A, Baron A, Lissandrini D, Rindi G, Grigolato P, Pederzoli P, Scarpa A: High resolution allelotype of nonfunctional pancreatic endocrine tumors: identification of two molecular subgroups with clinical implications. *Cancer Res* 2001;61:285-92.

48. Risch N. The genetic epidemiology of cancer: Interpreting familial and twin studies and their implications for molecular genetic approaches. *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prevention* 2001;7:33-41.
49. Schaid DJ, Chang BL, International Consortium For Prostate Cancer Genetics. Description of the International Consortium for Prostate Cancer Genetics, and Failure to Replicate Linkage of Hereditary Prostate Cancer to 20q13. *Prostate* 2005;63:276-90.
50. Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN: Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet* 1998;62:1425-38.
51. Schaid DJ, McDonnell SK, Blute ML, Thibodeau SN. Evidence for autosomal dominant inheritance of prostate cancer. *Am J Hum Genet* 1998;62:1425-38.
52. Smith JR, Freije D., Carpten JD, Grönberg H, Xu J, Isaacs SD, Brownstein MJ, Bova GS, Guo H, Bujnovszky P, Nusskern DR, Damber JE, Bergh A, Emanuelsson M, Kallioniemi OP, Walker-Daniels J, Bailey-Wilson JE, Beaty TH, Meyers DA, Walsh PC, Collins FS, Trent JM, Isaacs WB: Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* 1996;274:1371-74.

53. Stone DL, Slavotinek A, Bouffard GG, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Barr M, Biesecker LG: Mutation of a gene encoding a putative chaperonin causes McKusick-Kaufman syndrome. *Nat Genet* 2000;25:79-82.
54. Suarez BK, Lin J, Burmester JK, Broman KW, Weber JL, Banerjee TK, Goddard KA, Witte JS, Elston RC, Catalona WJ: A genome screen of multiplex sibships with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2000;66:933-44.
55. Suarez BK, Lin J, Witte JS, Conti DV, Resnick MI, Klein EA, Burmester JK, Vaske DA, Banerjee TK, Catalona WJ: Replication linkage study for prostate cancer susceptibility genes. *Prostate* 2000;45:106-14.
56. Tavtigian SV, Simard J, Teng DH, Abtin V, Baumgard M, Beck A, Camp NJ, Carillo AR, Chen Y, Dayananth P, Desrochers M, Dumont M, Farnham JM, Frank D, Frye C, Ghaffari S, Gupte JS, Hu R, Iliev D, Janecki T, Kort EN, Laity KE, Leavitt A, Leblanc G, McArthur-Morrison J, Pederson A, Penn B, Peterson KT, Reid JE, Richards S, Schroeder M, Smith R, Snyder SC, Swedlund B, Swensen J, Thomas A, Tranchant M, Woodland AM, Labrie F, Skolnick MH, Neuhausen S, Rommens J, Cannon-Albright LA: A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nat Genet* 2001;27:172-80.
57. Vogel W, Maier C, Paiss T: Prostate Cancer, *Encyclopedia of the human genom*; Macmillan Publisher Ltd.; Nature Publishing Group 2003, 1058-1067.

58. Witte JS, Goddard KA, Conti DV, Elston RC, Lin J, Suarez BK, Broman KW, Burmester JK, Weber JL, Catalona WJ: Genomewide scan for prostate cancer-aggressiveness loci. *Am J Hum Genet* 2000;67:92-99.
59. Woolf CM. An Investigation of the familial aspects of carcinoma of the prostate. *Cancer* 1960;739-44.
60. Xu J, Meyers D, Freije D, Isaacs S, Wiley K, Nusskern D, Ewing C, Wilkens E, Bujnovszky P, Bova GS, Walsh P, Isaacs W, Schleutker J, Matikainen M, Tammela T, Visakorpi T, Kallioniemi OP, Berry R, Schaid D, French A, McDonnell S, Schroeder J, Blute M, Thibodeau S, Trent J: Evidence for a prostate cancer susceptibility locus on the X chromosome. *Nat Genet* 1998; 2:175-179.
61. Xu J, Zheng SL, Hawkins GA, Faith DA, Kelly B, Isaacs SD, Wiley KE, Chang B, Ewing CM, Bujnovszky P, Carpten JD, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB: Linkage and association studies of prostate cancer susceptibility: evidence for linkage at 8p22-23. *Am J Hum Genet* 2001;69:341-50.
62. Zheng SL, Xu J, Isaacs SD, Wiley K, Chang B, Bleecker ER, Walsh PC, Trent JM, Meyers DA, Isaacs WB: Evidence for a prostate cancer linkage to chromosome 20 in 159 hereditary prostate cancer families. *Hum Genet* 2001;108:430-35.

63. Zhou B, Westaway SK, Levinson B, Johnson MA, Gitschier J, Hayflick SJ:
A novel pantothenate kinase gene (PANK2) is defective in Hallervorden-
Spatz syndrome. *Nat Genet* 2001;28:345-49.

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bedanken bei ...

... Prof. Walther Vogel, da er diese Arbeit ermöglicht hat und mir über einen langen Zeitraum jederzeit geduldig mit Rat und Hilfe zur Seite stand.

... Jürgen Häußler für sein Engagement bei der Lösung meiner kleineren und größeren Probleme und die Einführung in die Analyseprogramme.

... Prof. Thomas Paiss, der mir die genetische Statistik immer wieder erklärt hat.

... Margot Brunner, Petra Reutter, Danuta Kreis-Jurowitz und Kathrin Rösch für die Einarbeitung in die Methoden der Humangenetik, ihre Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen und die sehr nette Zusammenarbeit.

... Sonja Wörner, die mir immer einen Schritt voraus war – aber damit sehr geholfen hat.

... Christiane Maier und Jürgen Häusler, die mir mit ihrer Erfahrung viele nützliche Ratschläge geben konnten.

... Barbara Braunger, Karina Eiwien, Regina Heidenreich, Maren Höhne, Silke Jainta, Brenda Patino Garcia, Elena Peik, Michaela Schedel, Dominik Varga für die gute Zusammenarbeit und die nette Stimmung im ganzen Team.

... meinen Eltern Edith und Dieter Kurtz, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich immer wieder zu dieser Arbeit motiviert haben.

Curriculum vitae

Florian Kurtz
geboren am 05.07.1975 in Augsburg, Bayern,
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Pfrontener Str. 81/2
86163 Augsburg
E-Mail: f.kurtz@gmx.de

Schulbildung:

1982 - 1986 Grundschule, Neuschwansteinschule in Augsburg
1986 – 1995 Gymnasium, Rudolf-Diesel-Gymnasium in
Augsburg (Neusprachliches Gymnasium)

Hochschulstudium:

Oktober 1996 Medizinstudium an der Universität Ulm
08/09 2001 2 Monatiger China-Aufenthalt als Stipendiat der
Universität Ulm mit einer Famulatur in der Chirurgie der
Universitätsklinik Nanjing.
1. PJ-Tertial Innere Medizin (Pneumologie und Kardiologie).
an der Uni – Klinik Ulm (21.10.02 bis 09.02.03).
2. PJ-Tertial: Urologie an der Uni – Klinik Ulm (10.02.03 bis
01.06.03).
3. PJ-Tertial: Unfallchirurgie an der Uni – Klinik Ulm (02.06.03 bis
19.09.03).
04.10.2003 Abschluss des Studiums mit dem 3.Staatsexamen an
der Universität Ulm.

Facharztausbildung:

01.07.04 bis 31.06.05 Assistenzarzt der Abteilung für Urologie am
Universitätskrankenhaus des Inselspitals Bern, Schweiz
(Leiter: Prof. Dr. med. U. E. Studer)
seit 01.07.05 Assistenzarzt der Abteilung für Urologie der Universität
Ulm. (Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. h.c. R. Hautmann)

Dissertation: „Das familiäre Prostatakarzinom – Eine Linkageanalyse
auf dem Chromosom 20“.
Doktorvater: Prof. Dr. med. Vogel,
Abteilung für Humangenetik der Universität Ulm

Mitgliedschaften: - Schatzmeister der German Society of Residents in
Urology (GeSRU)
- Deutsche Gesellschaft für Urologie (DGU)
- European Association of Urology (EAU)