

Aus der Klinik  
für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Polymorphismen in Genen des Folatstoffwechsels als Risikofaktoren für die  
Entstehung von Magenkarzinomen

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Tobias Götze

aus Magdeburg

Magdeburg 2006

## **Dokumentationsblatt**

### Bibliographische Beschreibung

Götze, Tobias: Polymorphismen in Genen des Folatstoffwechsels als Risikofaktoren für die Entstehung von Magenkarzinomen. 2006. 55 Blatt, 8 Tabellen, 18 Abbildungen, 51 Literaturzitate.

Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie (Direktor: Prof. Dr. med. P. Malfertheiner)

### Kurzreferat

In Deutschland erkranken jährlich ca. 20000 Menschen an einem Magenkarzinom. Die grundlegenden Mechanismen der Entstehung des Magenkarzinoms sind noch weitestgehend unklar. Zahlreiche Untersuchungen belegen eine Rolle von Folaten bei der Tumorentstehung. Die vorliegende Arbeit untersuchte insgesamt drei Polymorphismen von Genen die am Folatstoffwechsel beteiligt sind bei 106 Patienten mit klinisch nachgewiesenem Magenkarzinom, und verglich die Häufigkeit des Auftretens mit einer gesunden Kontrollgruppe. Für den MTHFR-C677T- und den GCP-C1561T-Polymorphismus konnte dabei keine Assoziation nachgewiesen werden. Der RFC-G80A-Polymorphismus zeigte eine signifikante Häufung bei Karzinomen des distalen Magens und einem niedrigen Tumordifferenzierungsgrad.

### Schlüsselwörter

MTHFR, GCP, RFC, Magenkarzinom, Homocystein, Folat

Hiermit bitte ich um die Eröffnung des Promotionsverfahrens an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg.

Magdeburg, den

---

Tobias Götze

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
Inhaltsverzeichnis	1
Abkürzungsverzeichnis	3
Tabellenverzeichnis	5
Abbildungsverzeichnis	6
1. Das Magenkarzinom	7
1.1. Epidemiologie	7
1.2. Risikofaktoren	7
1.3. Pathogenese	8
1.4. Histologie und TNM-Klassifikation	9
1.5. Topographie und Tumorlokalisationen	11
1.6. Diagnose	12
1.7. Prognose	12
2. Folsäuremetabolismus und Bedeutung der Polymorphismen	13
2.1. Folatkreislauf	13
2.2. Folate bei Tumorerkrankungen	15
2.3. Methylentetrahydrofolatreduktase-C677T-Polymorphismus	16
2.4. Glutamatcarboxypeptidase-C1561T-Polymorphismus	17
2.5. Reduced Folate Carrier-G80A-Polymorphismus	17
3. Fragestellung	19
4. Probanden, Material und Methoden	20
4.1. Patientenkollektive	20
4.1.1. Patienten der Karzinomgruppe	20
4.1.2. Kontrollgruppe, Ein-und Ausschlusskriterien	20
4.2. <i>Helicobacter pylori</i> -Serologie	21
4.3. DNA-Extraktion	22
4.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)	22
4.5. Genotypisierung mittels dHPLC	24
4.6. Klinisch-laborchemische Parameter	26

4.7. Einteilung von Tumorstadien und Tumorlokalisationen	27
4.8. Statistische Auswertung	27
5. Auswertung	28
5.1. Klinische Charakteristika der Probandenkollektive	28
5.2. Methylentetrahydrofolatreduktase-C677T-Polymorphismus	30
5.3. Glutamatcarboxypeptidase-C1561T-Polymorphismus	33
5.4. Reduced Folate Carrier-G80A-Polymorphismus	36
5.5. Vergleichende Analyse der Polymorphismen	39
6. Diskussion	40
6.1. Methylentetrahydrofolatreduktase-C677T-Polymorphismus	40
6.1.1. MTHFR-C677T-Polymorphismus, Homocystein und Folsäurespiegel	44
6.2. Glutamatcarboxypeptidase-C1561T-Polymorphismus	45
6.3. Reduced Folate Carrier-G80A-Polymorphismus	46
6.4. Kombiniertes Vergleich der Polymorphismen	47
7. Zusammenfassung	49
8. Literaturverzeichnis	50
9. Danksagung	56
10. Eidesstaatliche Erklärung	57
11. Lebenslauf	58
12. Veröffentlichungen	59

## Abkürzungsverzeichnis

<b>ALAT</b>	Alanin-Aminotransferase
<b>ASAT</b>	Aspartat-Aminotransferase
<b>BMI</b>	Body Mass Index
<b>CDK</b>	Cyclin Dependent Kinases
<b>CEA</b>	Carcino-Embryonales-Antigen
<b>CIN</b>	Cervikale Intraepitheliale Neoplasie
<b>CRP</b>	C-Reaktives Protein
<b>CT</b>	Computertomograph
<b>dHPLC</b>	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
<b>EGF</b>	Epidermal Growth Factor
<b>FH4</b>	Tetrahydrofolsäure
<b>GCPII</b>	Glutamatcarboxypeptidase
<b>GGT / <math>\gamma</math>GT</b>	Gamma-Glutamyl-Transferase
<b>Hb</b>	Hämoglobin
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>MCH</b>	Mean Corpuscular Hemoglobin
<b>MCHC</b>	Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration
<b>MCV</b>	Mean Corpuscular Volume
<b>MTHFR</b>	Methylentetrahydrofolatreduktase
<b>MTX</b>	Methotrexat
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>RBC</b>	Red Blood Cell
<b>RCF</b>	Red Cell Folate
<b>RFC</b>	Reduced Folate Carrier

<b>SAH</b>	S-Adenosyl-Homocystein
<b>SAM</b>	S-Adenosyl-Methionin
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Transforming Growth Factor Alpha
<b>tHcy</b>	Totales Homocystein
<b>TSH</b>	Thyroidea-stimulierendes Hormon
<b>UICC</b>	Union Internationale Contre Le Cancer
<b>WBC</b>	White Blood Cell
<b>WHO</b>	World Health Organisation

## **Tabellenverzeichnis**

1. TNM-Klassifikation von Magenkarzinoms
2. UICC-Klassifikation des Magenkarzinoms
3. Charakteristika der Kollektive (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)
4. Häufigkeit von MTHFR-C677T in Subkategorien der Karzinomgruppe
5. Häufigkeit von GCP-C1561T in Subkategorien der Karzinomgruppe
6. Häufigkeit von RFC-G80A in Subkategorien der Karzinomgruppe
7. Vergleichende Analyse der Polymorphismen untereinander
8. Übersicht über Studien zum MTHFR-C677T-Polymorphismus



## Abbildungsverzeichnis

1. Modell der Entstehung von Magenkarzinomen nach Correa
2. Anatomische Einteilung der Magenregionen
3. chemische Struktur von Folat
4. Beziehungen der Polymorphismen zum Folatkreislauf
5. Duplexbildung bei dHPLC
6. MTHFR-C677T-Chromatogramm
7. GCP-C1561T-Chromatogramm
8. RFC-G80A-Chromatogramm
9. Altersverteilung der Karzinomgruppe
10. Altersverteilung der Kontrollgruppe
11. Folatspiegel in den Kollektiven (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)
12. Vitamin B12-Spiegel in den Kollektiven (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)
13. Homocysteinspiegel in den Kollektiven (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)
14. Häufigkeit von MTHFR-C677T in den Kollektiven
15. MTHFR-Polymorphismus vs. Nikotinabusus
16. Häufigkeit von GCP-C1561T in den Kollektiven
17. Häufigkeit von RFC-G80A in den Kollektiven
18. RFC-G80A-Polymorphismus vs. Nikotinabusus

# 1. Das Magenkarzinom

## 1.1. Epidemiologie

Das Magenkarzinom ist ein maligner Tumor des Gastrointestinaltraktes mit weltweit sehr unterschiedlicher Inzidenz. Besonders häufig tritt es in Ostasien (Japan), in der Andenregion Südamerikas und in Osteuropa auf [1]. Hingegen weisen z.B. die USA, Australien oder Neuseeland eine geringere Inzidenz auf. Über 60% aller Magenkarzinome entstehen in Entwicklungsländern. In den Hochrisikogebieten liegt die Inzidenz bei >40/100.000, in Niedrigrisikogebieten bei <15/100.000 (jeweils männliche Population) [1]. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen dem 50. und dem 70. Lebensjahr, mit einem Gipfel zwischen dem 60. und 65. Lebensjahr. Im Durchschnitt sind Männer zweimal so häufig betroffen wie Frauen. Amerikanische Studien zeigen eine leichte Risikoerhöhung für Afroamerikaner, Hispano-Amerikaner und amerikanische Ureinwohner (Risiko 1.5-2.5fach erhöht) [2]. Insgesamt betrachtet ist die Inzidenz und die Mortalität von Personen, die an Magenkarzinomen erkranken, rückläufig. Im Jahr 2000 war es die vierthäufigste Tumorerkrankung weltweit mit einer geschätzten Anzahl von 870.000 neuen Fällen pro Jahr und 650.000 an der Krankheit Verstorbenen [1]. Entgegen dem rückläufigen Trend der Gesamtinzidenz steigt die Erkrankungsrate von Karzinomen in der Cardiaregion des Magens an. Die Ursache hierfür ist im Moment noch unbekannt. Eine wichtige Rolle spielt die Laurén-Klassifikation bei der Betrachtung der Inzidenzentwicklung. Es hat sich gezeigt, dass der diffuse Typ nach Laurén in seiner Häufigkeit nicht wesentlich rückläufig ist. Man geht davon aus, dass diese Form des Magenkarzinoms eher durch individuelle (oder genetische) Faktoren verursacht wird anstatt durch Umweltfaktoren.

## 1.2. Risikofaktoren

Die Entstehung des Magenkarzinoms ist nach heutigem Stand der Erkenntnis ein multifaktorieller Prozess mit unterschiedlich zu gewichtenden Einflussfaktoren. Den wichtigsten Risikofaktor stellt dabei eine Infektion mit *Helicobacter pylori* dar - das Bakterium besitzt ein vergleichbar starkes Risikopotential für das Magenkarzinom wie das Rauchen für das Bronchialkarzinom [3]. Nach der Wiederentdeckung von *Helicobacter pylori* 1983 und der Erforschung seiner Ursächlichkeit für die Entstehung einer chronischen Gastritis in den folgenden Jahren konnte gezeigt werden, dass *Helicobacter pylori* einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des

Magenkarzinoms ist. Demnach ist das Entstehungsrisiko für Individuen mit *Helicobacter pylori*-Infektion ca. 3 bis 10-fach erhöht. Vor allem in Kombination mit der familiären Vorbelastung als endogenem Risikofaktor steigt das Risiko signifikant. Neben *Helicobacter pylori* gelten als gesicherte Risikofaktoren ein Zustand nach Magenteilresektion, Magenadenome, Dysplasie und verschiedene histomorphologische Veränderungen wie intestinale Metaplasie oder Atrophie. Darüber hinaus zeigten Studien einen Zusammenhang mit Ernährungsgewohnheiten [4, 5] und Nikotinmißbrauch [6] für die Entwicklung eines Magenkarzinoms.

### 1.3. Pathogenese

Die Pathogenese des Magenkarzinoms ist auch heute noch nicht vollständig aufgeklärt. Durch die Untersuchung zahlreicher Risikofaktoren gilt es allerdings als sicher, dass eine multifaktorielle Genese die Ursache ist. Ein weit verbreitetes Genesemodell stammt von Correa [7, Abbildung 1]. Zunächst kommt es zu einer Schädigung des Magenepithels durch verschiedenste Ursachen, zum Beispiel chemische Noxen oder durch *Helicobacter pylori*-Infektion. Eine chronische Gastritis, wie sie bei jedem Patienten der mit *Helicobacter pylori* infiziert ist, vorliegt, kann sich mit zunehmender Erkrankungsdauer in eine atrophische Gastritis umwandeln. Eine *Helicobacter pylori*-Infektion bewirkt dabei eine verstärkte Expression von bestimmten Interleukinen, insbesondere von Interleukin 1 $\beta$  und Interleukin 8 [8]. Vor allem für das entzündungsfördernde Interleukin 1 wurde eine vermehrte Bildung nachgewiesen. In Studien konnte gezeigt werden, dass bestimmte Polymorphismen des Interleukin 1 $\beta$ -Gens mit der Entwicklung von Adenokarzinomen des Magens assoziiert sind, vor allem bei gleichzeitiger Infektion mit bestimmten *Helicobacter*-Subtypen wie dem Cag-A-Stamm [8]. Aus der atrophischen Gastritis resultiert ein Rückgang der Magensäuresekretion und damit konsekutiv eine Hypergastrinämie, welche einen Proliferationsreiz für das Gewebe darstellt. Der nächste Schritt der Karzinogenese ist die intestinale Metaplasie. Diese geht dann in die Dysplasie bzw. die intraepitheliale Neoplasie über, die eine Präkanzerose für das Magenkarzinom darstellt. Diese Abfolge gilt allerdings nur für den intestinalen Typ nach Lauren. Die genauen Vorstufen des diffusen Typs sind weiterhin unklar.

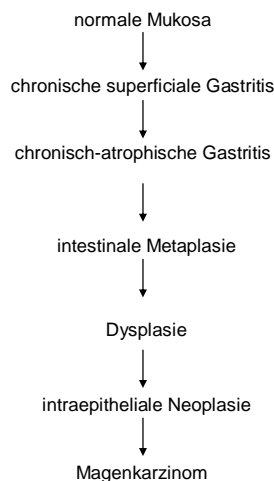


Abbildung 1: Modell der Entstehung von Magenkarzinomen nach Correa [7]

#### 1.4. Histologie und TNM-Klassifikation

Die histologische Typisierung erfolgt seit 1990 nach WHO-Richtlinien. Es entfallen ca. 70% aller Karzinome des Magens auf das Adenokarzinom, davon wiederum ca. 50% auf das tubuläre Adenokarzinom. Andere Unterformen sind das papilläre und das mucinöse Adenokarzinom. Das undifferenzierte Karzinom macht etwa 20% aus, das Siegelringkarzinom 10%. Weitere Subtypen sind das adenosquamöse Karzinom, das kleinzellige Karzinom und das Plattenepithelkarzinom des Magens. Eine weitere Einteilungsform stellt die Klassifikation nach Laurén dar. Sie ist insbesondere für die klinisch-therapeutische Planung von großer Wichtigkeit. Nach Laurén werden 2 Subtypen des Magenkarzinoms unterschieden, zum einen der diffuse Subtyp (ca. 37%), zum anderen der intestinale Subtyp (ca. 46%). Kann ein Karzinom keiner der beiden Gattungen zugeordnet werden spricht man vom Mischtyp (ca. 17%). Karzinome vom diffusen Typ sind in der Regel schlecht begrenzt, weisen eine ausgedehnte Tiefeninfiltration der Magenwand auf und zeigen oft weit voneinander entfernt zu findende Tumorzellen. Schon aus dieser morphologischen Beschreibung wird ersichtlich, dass dieser Subtyp als aggressiver und gefährlicher gilt – insbesondere da die histologische Ausdehnung dieses Typs oft nicht der makroskopischen entspricht und selbst mehrere Zentimeter vom Resektionsbereich entfernt sich noch Tumorzellen finden können. Karzinome vom intestinalen Typ sind dagegen eher (gut) begrenzt und haben eine bessere Prognose. Karzinome vom diffusen Typ können sich oft unter einer inspektorisch völlig normalen Magenschleimhaut entwickeln und fallen erst im

Spätstadium durch eine Verdickung der Magenwand auf. Pathologisch und klinisch wird das Magenkarzinom in europäischen Regionen nach dem TNM-System eingeteilt, während in Japan ein eigenes Klassifikationssystem eingesetzt wird. Das TNM-System für das Magenkarzinom gliedert sich wie folgt:

Tabelle 1: TNM-Klassifikation von Magenkarzinomen [9]

<b>T</b>	<b>Primärtumor</b>
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	Karzinoma in Situ intraepithelialer Tumor jedoch ohne Infiltration der Lamina propria
T1	Tumor infiltrierte Lamina propria oder Submucosa
T2	Tumor infiltrierte Muscularis propria oder Subserosa
T3	Tumor penetrierte Serosa (viszerales Peritoneum) keine Infiltration benachbarter Strukturen
T4	Tumor infiltrierte benachbarte Strukturen
<b>N</b>	<b>regionäre Lymphknoten</b>
NX	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1-6 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 7-15 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in mehr als 15 regionären Lymphknoten
<b>M</b>	<b>Fernmetastasen</b>
MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Zum T3-Stadium muss angefügt werden, dass sich ein Tumor über die Muscularis propria sowohl in das große oder auch kleine Netz bzw. in das Ligamentum hepatogastricum oder Ligamentum gastrocolicum ausbreiten kann. Dabei muss es jedoch nicht zwangsläufig zu einer Penetration des viszeralen Peritoneums kommen. Ist dies der Fall, wird ein derartiger Tumor als T2 klassifiziert, andernfalls als T3. Das Stadium T4 bezieht sich auf benachbarte Organe, zu denen Leber, Milz, Kolon transversum, Pancreas, Zwerchfell, Bauchwand, Niere und Nebennieren, Dünndarm und Retroperitoneum gehören. Im Fall des Magens befinden sich die regionären Lymphknoten des N-Stadiums an der großen bzw. kleinen Curvatur, ebenso entlang der Gefäße A. gastrica sinistra, A. hepatica communis, A. lienalis, A. coeliaca sowie hepatoduodenale Lymphknoten. Eine zusammenfassende Gruppierung der TNM-Klassen findet sich in der UICC-Klassifikation (1997):

Tabelle 2: UICC-Klassifikation des Magenkarzinoms [9]

UICC-Klasse	entsprechendes TNM-Level
I	T1N0M0
	T2N0M0
II	T3N0M0
	T4N0M0
IIIa	jedes T mit N1 und M0
IIIb	jedes T mit N2 und M0
IV	jedes T und jedes N mit M1

### 1.5. Topographie und Tumorlokalisationen

Grundsätzlich wird der Magen in 5 Teilabschnitte eingeteilt [10]. Abschnitt eins stellt die Cardia dar, in sie mündet der Ösophagus ein. Abschnitt zwei ist der Magenfundus, auch als Magengewölbe bezeichnet. Er schliesst sich im Verlauf an die Cardia an und befindet sich unterhalb des linken Zwerchfells. Den flächenmäßig größten Anteil des Magens nimmt der dritte Abschnitt, der Corpus, ein. Die letzten beiden Abschnitte sind der Übergang zum Duodenum, der Pylorus, und der davor befindliche Abschnitt, das Antrum (Abbildung 2). 75% der Karzinome befinden sich im distalen Drittel des Magens, davon 50% im Antrum, vor allem an der kleinen Curvatur. Nur 10% sind im Cardia-Bereich lokalisiert, etwa der gleiche Prozentsatz entfällt auf multizentrische Typen.

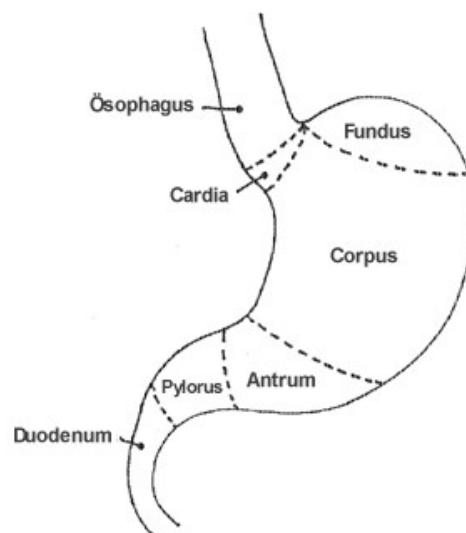


Abbildung 2: Anatomische Einteilung der Magenregionen

## 1.6. Diagnose

Die rechtzeitige Diagnose des Magenkarzinoms stellt heute eines der Hauptprobleme in der Therapie dieser gefährlichen Tumorerkrankung dar. Ein im Stadium des Frühkarzinoms entdeckter Tumor besitzt eine recht gute Prognose. Leider werden lediglich 15% aller Tumore in Deutschland in diesem Stadium diagnostiziert [11]. Ursache dafür ist die unspezifische und oft den Patienten auch nur gering belastende Klinik sowie das Fehlen einer geeigneten und preiswerten Screeningmethode. Aus diesem Grund findet sich bei der endgültigen Diagnose meist schon ein fortgeschrittenes Tumorstadium. Primäres Diagnoseinstrument ist die Gastroskopie in Kombination mit der Entnahme von Proben zur histologischen Untersuchung. Die Kombination aus Endoskopie und Biopsie erreicht eine Sensitivität von ca. 95% [2]. Neben der Endoskopie als Goldstandard gehören nach heutigen Leitlinien zur Therapieplanung eine endoskopische Sonographie für die Klärung der Tiefeninfiltration sowie TNM-Staging und die Suche nach Fernmetastasen via Computertomogramm bzw. nach Lebermetastasen via abdominellem Ultraschall. Zunehmende Bedeutung erlangt die Laparoskopie inklusive Lavage zur Abklärung einer bereits bestehenden Peritonealkarzinose, da sich Sonographie und CT in diesem Teilgebiet der Diagnostik als unzureichend erwiesen haben. Die Bestimmung von Tumormarkern hat praktisch keine Bedeutung für die Erlangung einer Diagnose. Zwar ist zum Beispiel das karzinogen-embryonale Antigen (CEA) oder CA 19-9 bei bis zu 30% der Patienten mit Magenkarzinomen erhöht, allerdings ist bei diesen Patienten die Erkrankung schon weit fortgeschritten [12]. Zur Früherkennung des Magenkarzinoms sind Tumormarker deshalb zum jetzigen Zeitpunkt als nicht geeignet zu betrachten.

## 1.7. Prognose

Die Prognose für das Magenkarzinom hängt im wesentlichen vom Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose der Krankheit ab. So beträgt das kumulative 5-Jahres Überleben für das UICC-Stadium IA in Deutschland ca. 85%. Für das UICC-Stadium II sinkt dieser Wert auf fast 45%. Ein im Stadium UICC IV - d.h. es sind Fernmetastasen vorhanden - diagnostizierter Tumor hat nur noch eine kumulative 5-Jahres Überlebenschance von ca. 10% [13]. Eine kurative Therapie, die vollständige chirurgische R0-Resektion, ist nur im Stadium I möglich. Mit wachsender Tumorgroße und steigendem Tumorstadium sinkt die Wahrscheinlichkeit, eine R0-Resektion zu erreichen, jedoch immer weiter ab. Zudem ist die Lymphknotenmetastasierung der

wichtigste prognostische Faktor. Bei nachgewiesenen Lymphknotenmetastasen ist eine kurative Resektion nicht möglich, andererseits ist der Wert der adjuvanten Chemotherapie beim Magenkarzinom nicht gesichert. Vor diesem Hintergrund ist die Früherkennung des Karzinoms und die Identifizierung von Risikogruppen der entscheidende Weg zur Verbesserung der Prognose dieser Patientengruppe.

## 2. Folsäuremetabolismus und Bedeutung der Polymorphismen

### 2.1. Folatkreislauf

Der Begriff Folsäure stellt einen Oberbegriff dar, der im eigentlichen Sinne die Bezeichnung für die synthetische Form des Vitamins ist. Dabei handelt es sich um Pteroylmonoglutaminsäure, eine stabile Form des Vitamins, die so in der Natur nicht vorkommt. Natürliche Formen des Vitamins sind die Folate, die sich im Grad der Oxidationsstufe, der Methylsubstituenten und der Anzahl der Glutaminsäuremoleküle im Molekül unterscheiden [14]. Das wasserlösliche Vitamin Folsäure besitzt eine heterozyklische Struktur und besteht aus Pteridin, p-Aminobenzoessäure und L-Glutamat (Abbildung 3).

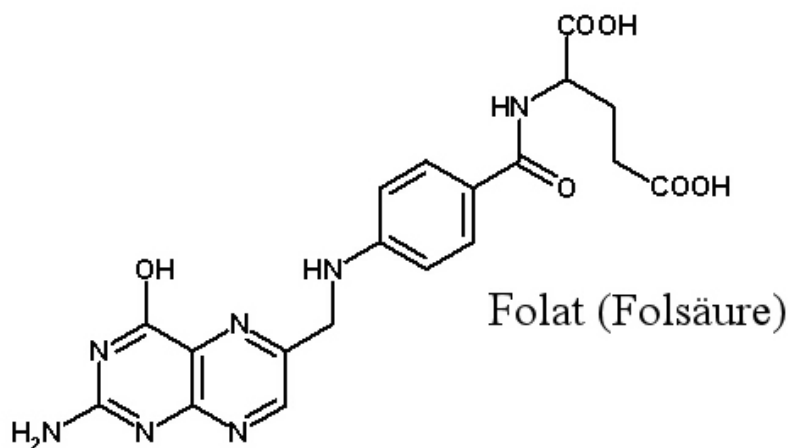


Abbildung 3: chemische Struktur von Folat

In der Nahrung liegen Folate zu ca. 40% als Monoglutamat (Monoglutamylfolat) und zu ca. 60% als Polyglutamat (Polyglutamylfolat) vor. Besonders ergiebige natürliche Folatquellen sind Spinat, Spargel, Salat, Tomaten, Gurken, Getreide und Leber. Der in Polyglutamatform vorliegende Anteil des Folates muss vor der Resorption zunächst zu Monoglutamaten enzymatisch hydrolysiert werden und kann dann Carrier-vermittelt vom Darmlumen in die mucosalen Zellen aufgenommen werden. Für die Hydrolyse ist



das Enzym Glutamatcarboxypeptidase II (GCP) entscheidend, der Carriertransport geschieht durch den Reduced Folate Carrier (RFC) [15]. Durch Folatreduktase erfolgt in den Zellen die Umwandlung in 7,8-Dihydrofolsäure, welche durch die Dihydrofolatreduktase zu 5,6,7,8-Tetrahydrofolsäure prozessiert wird. Aus dieser Vorstufe entsteht dann die im Blutkreislauf hauptsächlich zu findende 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure. Die biologisch aktive Form des Vitamins ist die Tetrahydrofolsäure, welche im Körper als 5-Methyl-Tetrahydrofolsäure, 5,10-Methylen-Tetrahydrofolsäure, 5,10-Methenyl-Tetrahydrofolsäure und auch als 5-Formyl-Tetrahydrofolsäure vorkommt. Die Synthese von Tetrahydrofolsäure geschieht in einer NADPH-abhängigen Reduktion durch die Enzyme Folatreduktase und Dihydrofolatreduktase [16]. Im Körpergewebe liegen Folate zu über 95% als Polyglutamate mit 5 bis 8 Glutamatresten vor. Die Glutamatreste sind dabei jeweils über  $\gamma$ -Carboxylgruppen mit der  $\alpha$ -Aminogruppe des vorhergehenden Glutamatrestes verknüpft. Typisch für diese Form der Folate ist die höhere Affinität zu Enzymen des 1-Kohlenstoffwechsels. Tetrahydrofolsäure funktioniert in diesem Stoffwechsel-kreislauf als Co-Enzym zur Übertragung von 1-Kohlenstoffresten welche als Methyl-, Formyl-, Formiat-, oder Hydroxymethylreste vorkommen können. Sind diese Reste an Tetrahydrofolsäure gebunden stellen sie den Ausgangspunkt für verschiedene Biosyntheseprozesse im menschlichen Körper dar, wozu beispielsweise gehören: die Synthese der Atome C2 und C8 des Purins, die Synthese von dTMP, die Bildung des  $\beta$ -Kohlenstoffes des Serin bei der Umwandlung von Glycin in Serin sowie der Methylgruppen des Cholins [17]. Der für die weitere Betrachtung hier wichtigste Synthesevorgang ist jedoch die Bereitstellung des Kohlenstoffs für die Methylierung von Homocystein zu Methionin. Aus der Aminosäure Methionin kann durch Reaktion mit ATP unter Abspaltung von Phosphat und Pyrophosphat S-Adenosylmethionin entstehen, eine universell einsetzbare Verbindung welche unter anderem zur Methylierung der Basen bei der DNA-Synthese benötigt wird. Aus S-Adenosylmethionin entsteht dabei nach Methylübertragung und Abspaltung des Adenosinrestes wieder Homocystein. Für die Bildung von Methionin ist eine Vitamin B12-abhängige Reaktion von Homocystein mit 5-Methyl-Tetrahydrofolat nötig. Um im Folsäurekreislauf 5-Methyl-Tetrahydrofolat zu erzeugen ist als Schlüsselenzym 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat-Reduktase - im folgenden als MTHFR bezeichnet - notwendig, welches 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat irreversibel reduziert. Im Körper stellt 5,10-Methylen-Tetrahydrofolat die Hauptform an intrazellulärer Folsäure dar,

während 5-Methyl-Tetrahydrofolat die dominierende Form im Plasma ist. Abbildung 4 veranschaulicht die Abläufe im Folsäuremetabolismus.

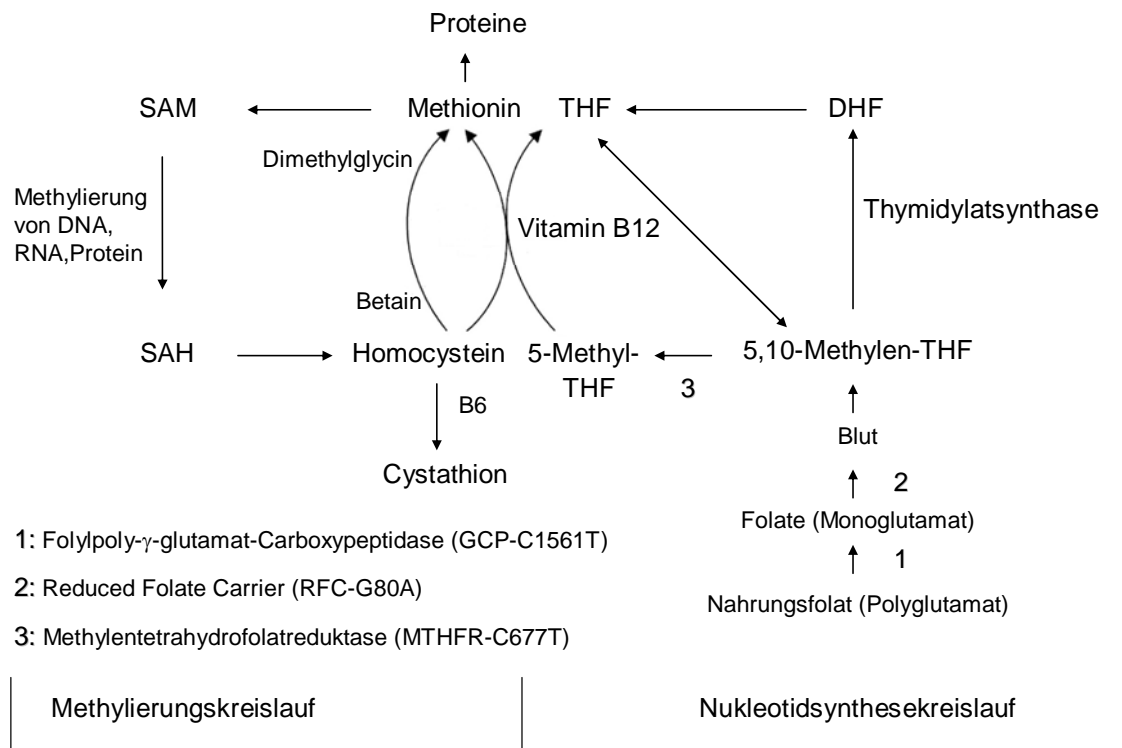


Abbildung 4: Beziehungen der Polymorphismen zum Folatkreislauf

## 2.2. Folate bei Tumorerkrankungen

Nach den bisher entwickelten und erforschten Modellen können Folate auf zwei unterschiedliche Arten an der Entwicklung von Tumoren beteiligt sein. Auf der einen Seite muss die Rolle im 1-Kohlenstoffwechsel und damit an der S-Adenosylmethioninsynthese in Betracht gezogen werden, auf der anderen Seite werden Folate für die normale DNA-Synthese und die DNA-Reparatur benötigt. Vor allem in letzterem Bereich kann ein Folatdefizit zu einem Mangel an DNA-Vorstufen, zum fehlerhaften Einbau von Uracil anstatt Thymin bei der Replikation und zu Chromosomenbrüchigkeit führen. Die bisherige Erforschung des Einflusses von Folsäure auf eine Tumorentwicklung konzentrierte sich vor allem auf den Bereich des kolorektalen Karzinoms. Dort sind in zwei groß angelegten, prospektiven Kohortenstudien Hinweise darauf gefunden worden, dass ein niedriger Folatstatus ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an einem kolorektalen Karzinom zur Folge hat. Im einzelnen handelt es sich dabei um die Nurses' Health Study und die Health

Professionals Follow-Up Study [16]. Die Nurses' Study ergab einen Risikounterschied von 35% zwischen Probanden mit der höchsten und Probanden mit der geringsten Folatezufuhr. Auch für das Magenkarzinom existieren Studien über den Folateinfluss. Zhu Shunshi et al. [18] publizierten 2003 eine randomisierte, Placebo-kontrollierte Studie um den Einfluss von  $\beta$ -Carotin und Folsäure auf die Entstehung von Magenkarzinomen sowie weiteren gastrointestinalen Tumoren zu untersuchen. Nach den Erkenntnissen der Studie führt die Folsäuregabe dazu, die Pathogenese nach dem Correa-Modell entweder zu unterbrechen oder die Progression einer präkanzerogenen Läsion zu verlangsamen. Auf molekularbiologischer Ebene kam die Studie zu dem Ergebnis, dass schon beim ersten Follow-Up nach 6 Monaten die DNA-Methylierung unter Folsäuresupplementierung deutlich verbessert war.

### 2.3. Methylentetrahydrofolatreduktase-C677T-Polymorphismus

Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR) ist ein Schlüsselenzym für die Regulation des menschlichen Folatkreislaufs. Das Gen, welches für MTHFR kodiert, befindet sich auf Chromosom 1p36.3 und weist zahlreiche Polymorphismen auf. Einer dieser Polymorphismen ist der MTHFR-C677T-Polymorphismus im Exon 4. Beim C677T-Polymorphismus findet in der DNA-Sequenz bei Codon 222 ein Austausch der Base Thymin gegen Cytosin statt, was im Ergebnis der Aminosäuren Valin anstatt Alanin ergibt. Demzufolge kann das Gen in 3 Varianten vorkommen: als 677CC-Wildtyp, als heterozygote Variante 677CT und als homozygote Variante 677TT [19]. Der Grad der Verbreitung der MTHFR-Genotypen scheint regional sehr unterschiedlich zu sein. Eine finnische Studie untersuchte die MTHFR-Genotypen bei 394 Patienten im Grossraum Helsinki, wobei 5% die 677TT-Variante des Gens aufwiesen [20]. Eine französische Studie mit 291 aus dem Großraum Paris stammenden Personen zeigte dagegen einen Anteil von 16.8% für den 677TT-Genotyp [21]. Aus China (Nanjing) stammende Studiendaten zeigen gar 24% für die 677TT-Variation [22]. Nach den bisher vorliegenden Daten ist der Polymorphismus im asiatischen Raum stärker verbreitet als zum Beispiel in Westeuropa. In einem nordchinesischen Kollektiv zeigte der 677TT-Genotyp eine Häufigkeit von 44% und liegt damit weit über den bei europäischen Studien üblichen Anteilen [23]. Der Grad der Aktivität von MTHFR differiert je nach Genvariation. Träger von 677TT besitzen nur 30% der MTHFR-in-vitro-Aktivität von Trägern des 677CC-Wildtyps, Träger der heterozygoten Variante 677CT weisen noch 65% Restaktivität auf [19]. In der Erstbeschreibung aus dem Jahr 1995 gehen die

homozygoten und heterozygoten Polymorphismen mit einer erhöhten Konzentration von Homocystein im Serum und einer erniedrigten Konzentration von Folsäure einher.

#### 2.4. Glutamatcarboxypeptidase-C1561T-Polymorphismus

Das Enzym Folylpoly- $\gamma$ -glutamat-Carboxypeptidase (FGCP) nimmt eine Schlüsselrolle bei der Aufnahme von Folaten in den menschlichen Kreislauf ein. Es wird vom sogenannten GCPII-Gen (Glutamatcarboxypeptidase II-Gen) kodiert. Das GCP-II-Gen befindet sich auf Chromosom 11p11.2 und besitzt 19 kodierende Exons [24]. Die Funktion von Folylpoly- $\gamma$ -glutamat-Carboxypeptidase besteht darin, Folatpolyglutamat zu Folatmonoglutamat zu reduzieren. Die Folatpolyglutamate machen den größten Teil des Nahrungsfolates aus und können in diesem Zustand nicht resorbiert werden. Um von der intestinalen Mucosa aufgenommen zu werden müssen sie daher zu Monoglutamaten gespalten werden. Erst dann kann es zu einer Carrier-vermittelten Resorption durch den Reduced Folate Carrier (RFC) kommen. Eine Störung des FGCP-Enzyms selber oder eine Mutation seines Gens geht theoretisch mit einer verminderten Fähigkeit zur Folsäureresorption einher und würde zu erniedrigten Folsäurekonzentrationen führen. Ein GCPII-Polymorphismus wurde von Devlin et al. [25] im Jahr 2000 beschrieben. Beim GCP-C1561T-Polymorphismus liegt ein Einzelbasenaustausch von Cytosin zu Tyrosin am Nucleotid 1561 vor. Dadurch kommt es im korrespondierenden Codon 475 zu einem Austausch der Aminosäure Histidin gegen Tyrosin. Daher wird dieser Polymorphismus auch als H475Y-Polymorphismus bezeichnet. Er bewirkt im Zellversuch im heterozygoten Stadium eine um 53% geringere Aktivität von FGCP als bei Individuen ohne die Mutation [25].

#### 2.5. Reduced Folate Carrier-G80A-Polymorphismus

Die Aufnahme von Folsäure in den Blutkreislauf erfolgt mit Hilfe eines Carrier-Transportmechanismus, der auch als RFC (Reduced Folate Carrier) bezeichnet wird. Nach erfolgter Hydrolyse der terminalen Folylpoly- $\gamma$ -glutamate durch das GCP-II-kodierte Enzym Carboxypeptidase II kann der Reduced Folate Carrier die Monoglutamatform aus dem enterohepatischen Kreislauf aufnehmen. Chango et al. beschrieben einen Polymorphismus an der Position 80 im 2. Exon des Gens 21q22.2, bei welchem Guanin gegen Adenin ausgetauscht wird [26]. Nach den Ergebnissen der Studie weisen homozygote Träger ein höheres Niveau an Homocystein auf, vor allem wenn sie gleichzeitig den MTHFR-C677T-Polymorphismus besitzen. Die Häufigkeit

betrug im untersuchten Kollektiv (169 Patienten) 27.1% für den 80GG-Genotyp, 50.9% für den 80GA-Genotyp und 21.9% für den 80AA-Genotyp. Der Reduced Folate Carrier ist nicht nur für den Folsäuremetabolismus von großer Wichtigkeit, sondern auch für die Chemotherapie zum Beispiel mit Methotrexat. Methotrexat benutzt ebenfalls den RFC-Transportmechanismus um in die Zellen aufgenommen zu werden. Födinger et al. [27] wiesen in ihrem Kollektiv von Dialysepatienten für den RFC-G80A-Polymorphismus keine Veränderung der Homocysteinkonzentration zwischen den Genotypen nach. Ma et al. erstellten für das Kolonkarzinom ein Tiermodell, in welchem Knock-out Mäuse benutzt wurden. Wenngleich die Folsäurehomöostase nicht beeinträchtigt war, so zeigte sich doch eine erhöhte Zellproliferation bei den Mäusen ohne das RFC-Gen. Nach 38 Wochen waren signifikant mehr fokale Entzündungen und Adenokarzinome als in den Wildtyp-Mäusen nachweisbar [28]. Ein möglicher Zusammenhang des Reduced Folate Carrier-G80A-Polymorphismus und der Entwicklung von Tumoren ist bisher in Studien nicht untersucht worden.

### 3. Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war die Klärung folgender Fragen:

1. Unterscheiden sich die Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten des Methylentetrahydrofolatreduktase-C677T-Polymorphismus bei Magenkarzinompatienten von einem gesunden Kollektiv ?
2. Unterscheiden sich die Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten des Glutamatcarboxypeptidase-C1561T-Polymorphismus bei Magenkarzinompatienten von einem gesunden Kollektiv ?
3. Unterscheiden sich die Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten des Reduced Folate Carrier-G80A-Polymorphismus bei Magenkarzinompatienten von einem gesunden Kollektiv ?
4. Unterscheiden sich die Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten der genannten Polymorphismen bei kombiniertem Auftreten bei Magenkarzinompatienten von einem gesunden Kollektiv ?
5. Sind die Polymorphismen und die Genotyphäufigkeit bei Magenkarzinompatienten mit klinisch-pathologischen Charakteristika der Tumorprogression assoziiert ?

## 4. Probanden, Material und Methoden

### 4.1. Patientenkollektive

#### 4.1.1. Patienten der Karzinomgruppe

Das Kollektiv der Karzinompatienten umfasste 106 Personen mit histologisch gesichertem Magenkarzinom. Davon waren 28 weiblichen und 78 männlichen Geschlechts. Die Gewebe- und Blutproben wurden in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie in den Jahren 1995-2002 gesammelt und aufbewahrt. Für das Tumorkollektiv wurden die selben Daten gesammelt wie sie für die Kontrollgruppe vorlagen, u.a. Nikotinstatus, Alkoholanamnese und Vorerkrankungen. Die Patienten wurden hinsichtlich des Magenkarzinoms in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie untersucht. Dabei kamen zur Diagnosestellung sowohl Endoskopie als auch endoskopischer Ultraschall zum Einsatz. Eine mögliche Infektion mit *Helicobacter pylori* wurde histologisch und serologisch untersucht. Die histologische Bestätigung wurde im Institut für Pathologie durchgeführt. Anschließend erfolgte die Festlegung des TNM-Status, des Gradings sowie des Tumortyps. Die Patientendaten wurden für die Studie anonymisiert. Die Bestimmung der Polymorphismen aus DNA erfolgte aus Blutproben oder dem nicht-Tumor-Anteil des Magenpräparates.

#### 4.1.2. Kontrollgruppe, Ein-und Ausschlusskriterien

Die Kontrollgruppe umfasste insgesamt 106 Frauen und Männer die vom Institut für Klinische Chemie der Universität Magdeburg im Jahr 2001 rekrutiert wurden. Die Probanden wurden aus einem größeren Kollektiv ohne Kenntnis von Laborwerten oder anderen Parametern ausgewählt und den Karzinompatienten bezüglich Alter und Geschlecht soweit möglich angeglichen. Das Kollektiv umfasste 43 Frauen und 63 Männer. Folgende Erkrankungen führten zum Ausschluss aus der Studie:

- akute oder chronische Gastritis
- Z.n. Magen-oder Darmresektion
- Z.n. Myocardinfarkt, Apoplex
- Neoplasien
- Alkohol-oder Medikamentenabusus
- Diabetes Mellitus

Desweiteren wurden Probanden ausgeschlossen bei denen ein bekannter Vitamin B12-Mangel vorlag oder die eines der folgenden Medikamente einnahmen:

- Zytostatika
- Protonenpumpeninhibitoren
- H<sub>2</sub>-Rezeptor-Antagonisten
- Antacida
- Antiepileptika

Bei der Rekrutierung der Probanden wurde eine ausführliche Anamnese durchgeführt, der Taillen- und Hüftumfang gemessen und eine Nüchternblutprobe gewonnen. Im einzelnen erfasst wurden folgende Parameter:

- BMI = Body Mass Index (Körpergewicht in Kilogramm / (Körpergröße in Meter)<sup>2</sup> )
- *Helicobacter pylori* - Status
- Nikotinstatus
- Diabetes Mellitus
- Homocystein- und Vitaminstatus (Folsäure, Vitamin B6, Vitamin B12)
- Klinische Chemie (Blutbild, Leberenzyme, Nierenfunktion, Schilddrüsenfunktion, CRP)

#### 4.2. *Helicobacter pylori*-Serologie

Der Nachweis von *Helicobacter pylori* wurde mit Hilfe des Enzymimmunoassays "Pyloriset EIA-G III" der Firma Orion Diagnostica, Finnland durchgeführt. Dieser Assay weist IgG-Antikörper gegen *Helicobacter pylori* nach. Der Vorteil dieser Nachweismethode liegt nicht nur in einer hohen Sensitivität und Spezifität, sondern auch in der Tatsache, dass sich auch nach einer erfolgreichen Eradikationstherapie eine ehemalige Infektion nachweisen lässt. Das Funktionsprinzip folgt dem allgemeinen Aufbau eines Enzymimmunoassays. Die Mikrotiterplatten des Kits wurden mit spezifischen Anti-*Helicobacter-pylori*-Antigenen beschichtet. Bringt man Serumproben mit *Helicobacter-pylori*-IgG-Antikörpern mit diesen Platten in Kontakt so kommt es zu einer Reaktion mit den an die Matrix gebundenen Antigenen. Es entsteht ein Antigen-Antikörper-Komplex. Dieser Komplex kann durch mit Peroxidase markiertem Antihuman-IgG nachgewiesen werden. Das Enzymkonjugat bindet dabei an den Antigen-Antikörper-Komplex, nach erfolgter Reinigung wird Substrat hinzugegeben.



Nach Beendigung der Substratreaktion erfolgt eine photometrische Auswertung des Tests. Dabei ist die Intensität der Farbe proportional der Konzentration der spezifischen IgG-Antikörper gegen *Helicobacter pylori*. Die Auswertung erfolgte dabei automatisch durch die Software SOFTmax PRO.

#### 4.3. DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion für die Gruppe der Karzinompatienten wurde mit E.Z.N.A.-Tissue-DNA-Mini-Kits der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH Erlangen durchgeführt. Der Kit kombiniert dabei Zentrifugationssäulenmethoden mit den Bindungseigenschaften von HiBind-Silikamembranen. Das Funktionsprinzip besteht darin, die Gewebeproben zunächst zu homogenisieren, dann unter denaturierten Bedingungen zu lysieren und in diesem Zustand auf eine HiBind-Zentrifugensäule zu laden. Dort binden die in der Probe enthaltenen DNA-Moleküle an die enthaltene Silikamembran. Nun können in mehrerer Waschvorgängen mit speziellen Puffern alle Kontaminationen oder auch Proteine bzw. zelluläre Debris entfernt werden. Das verwendete System erlaubt die Isolierung von bis zu 30 µg genomischer DNA mit einer maximalen Moleküllänge von 60 kbp. Nach der Extraktion wurde die Konzentration der DNA photometrisch bestimmt. Dazu wurden 5 µl DNA mit 65 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gemischt und nach Eichung des Photometers bei 260 nm die Photometrie durchgeführt. Für die Kontrollgruppe wurde das QIAamp DNA Blood Mini Kit der Firma Qiagen GmbH, Hilden, benutzt.

#### 4.4. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR für den RFC-G80A-Polymorphismus wurde nach der Methode von Chango et al. [26] durchgeführt. Die DNA-Extraktion erfolgte mit dem QiAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Der Ansatz für die PCR bestand aus folgenden Komponenten:

PCR-Mastermix:	25 µl (Promega GmbH, Mannheim)
Primer 1:	2 µl [10 pmol/µl] in nukleasefreiem Wasser
Primer 2:	2 µl [10 pmol/µl] in nukleasefreiem Wasser
H <sub>2</sub> O:	16 µl
Pat.-DNA:	5 µl DNA-Suspension in nukleasefreiem Wasser

-----

Gesamtmenge: 50 µl

Der fertige Ansatz wurde anschliessend nach folgendem Muster amplifiziert:

2 min	94° C	
-----		
30 sec	94° C	
45 sec	61° C	35 Zyklen
45 sec	72° C	
-----		
7 min	72° C	

Das verwendete Primerpaar für RFC-G80A [26]:

5' AGT GTC ACC TTC GTC CCC TC 3'

5' CTC CCG CGT GAA GTT CTT 3'

Im Gegensatz zur Originalmethode wurde beim zweiten Annealingschritt statt 30 Sekunden bei 58°C eine Temperatur von 61°C für 45 Sekunden gewählt. Nach dem letzten Zyklus erfolgte dann jeweils eine Abkühlung auf 4 °C und damit der Abschluss der PCR-Reaktion. Analog wurde der Ansatz für die MTHFR-C677T und GCP-C1561-T-Bestimmung erstellt und für MTHFR-C677T nach folgendem Muster amplifiziert:

2 min	96° C	
-----		
50 sec	93° C	
50 sec	55° C	35 Zyklen
30 sec	72° C	
-----		
7 min	72° C	

Das verwendete Primerpaar für MTHFR-C677T lautet [29]:

5' TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA 3'

5' AGGACGGTGCGGTGAGAGTG 3'

Die Zyklenfolge für GCP-C1561T lautete:

2 min	95° C	
-----		
30 sec	95° C	
45 sec	57° C	35 Zyklen
45 sec	72° C	
-----		
7 min	72° C	

Das verwendete Primerpaar für GCP-C1561T [25]:

5'-CATTCTGGTAGGAATTTAGCA-3'

5'-AAACACCACCTATGTTTAACA-3'

Die PCR-Produkte wurden dann mit einer temperaturmodulierten Heteroduplexanalyse (dHPLC, Transgenomic Inc, Omaha, USA) weiter analysiert. Für die Durchführung der PCR wurde der PCR-Master-Mix der Firma Promega (Mannheim) verwendet. Er besteht aus 50 Einheiten Taq DNA-Polymerase, 400  $\mu\text{M}$  dATP, 400  $\mu\text{M}$  dGTP, 400  $\mu\text{M}$  dCTP, 400  $\mu\text{M}$  dTTP und 3 mM  $\text{MgCl}_2$  in einem Reaktionspuffer mit einem pH-Wert von 8,5.

#### 4.5. Genotypisierung mittels dHPLC

dHPLC, welche auch als denaturierende Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie bezeichnet wird, ist ein Verfahren mit dem insbesondere Punktmutationen, kleine Deletionen sowie Insertionen mit hoher Zuverlässigkeit erkannt werden können. Als Vorarbeit muss DNA via PCR amplifiziert werden. Bei der sich anschließenden Hybridisierung, wird das doppelsträngige, helikale PCR Produkt bei 95° C in zwei DNA-Einzelstränge geschmolzen. Durch langsames Abkühlen auf circa 12° C werden die DNA-Einzelstränge zufällig wieder zu doppelsträngiger DNA zusammengeführt (Abbildung 5). Doppelsträngige DNA, die sich aus zwei komplementären Einzelsträngen gebildet hat, wird als Homoduplex bezeichnet. Als Heteroduplex wird doppelsträngige DNA bezeichnet, die sich aus zwei unterschiedlichen DNA-Einzelsträngen gebildet hat.

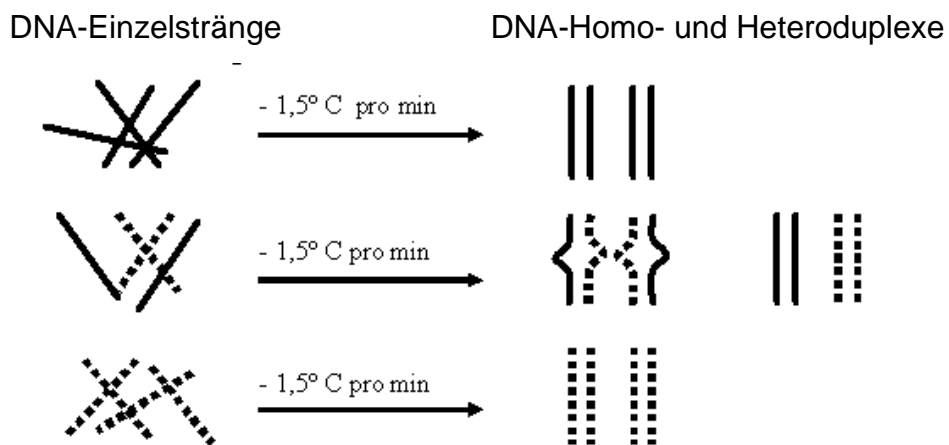


Abbildung 5: Duplexbildung bei dHPLC

Bei heterozygoten Probanden entstehen bei der Hybridisierung Homo- und Heteroduplexe, bei Wildtypen und homozygoten Mutanten entstehen nur Homoduplexe. Homo- und Heteroduplexe haben unterschiedliche Schmelztemperaturen. Heteroduplexe schmelzen bei einer niedrigeren Temperatur in ihre DNA-Einzelstränge als Homoduplexe. Letztendlich entsteht ein Chromatogramm mit einem Doppelpeak

(Heteroduplexchromatogramm). Der Peak mit der kürzeren Retentionszeit repräsentiert die DNA-Einzelstränge des Heteroduplexes, der Peak mit der längeren Retentionszeit die Wildtyp-DNA. Bei Wildtyp-PCR-Produkten und bei PCR-Produkten von homozygoten Mutanten ist nur ein Peak im Chromatogramm (Homoduplexchromatogramm) zu erkennen (Abbildungen 6-8). Bei drei Patienten der untersuchten Kollektive konnte keine DNA amplifiziert und somit auch keine dHLPC durchgeführt werden.

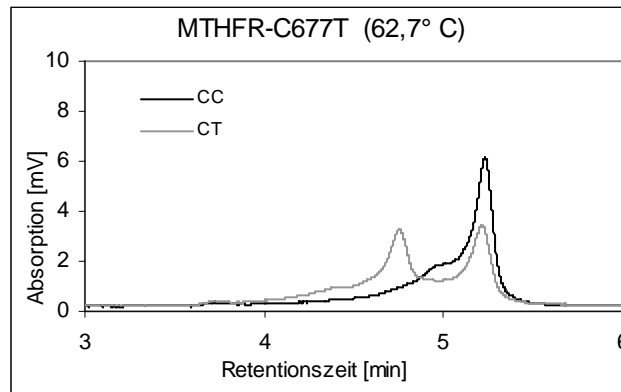


Abbildung 6: MTHFR-C677T-Chromatogramm

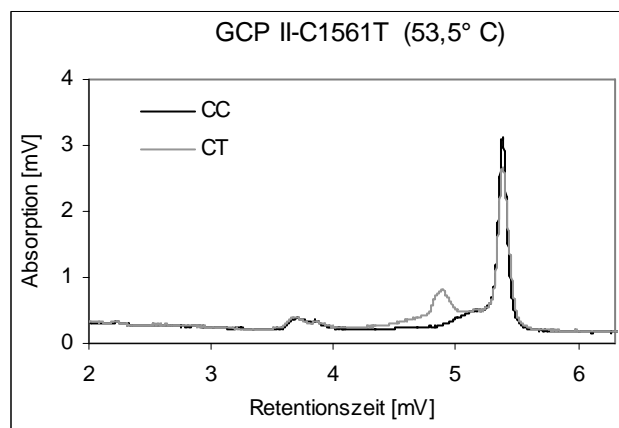


Abbildung 7: GCP-C1561T-Chromatogramm

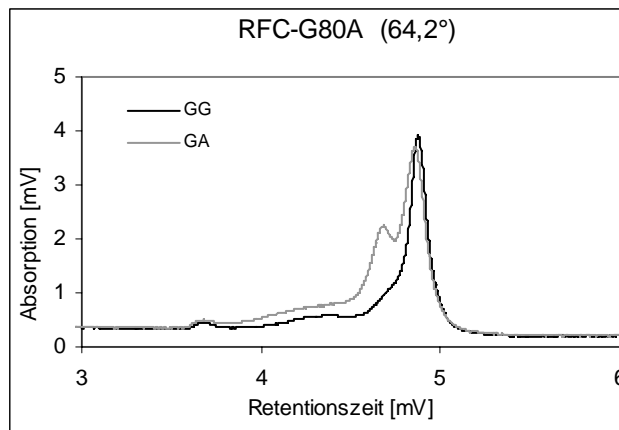


Abbildung 8: RFC-G80A-Chromatogramm

Für diese Studie kam das WAVE® Nucleic Acid Fragment Analysis Systems (WAVE, Transgenomic, Omaha, USA) zum Einsatz.

#### 4.6. Klinisch-laborchemische Parameter

Die klinisch-chemischen Laborparameter wurden mittels Routinemethoden auf Analyseautomaten des Instituts für Klinische Chemie der Universitätsklinik Magdeburg bestimmt. Homocystein wurde durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion untersucht. Für die Bestimmung von Folat und Vitamin B12 kamen kommerzielle Testassays der Firma Roche Diagnostics (Mannheim) zum Einsatz.

#### 4.7. Einteilung von Tumorstadien und Tumorlokalisationen

Das Kollektiv der Karzinompatienten wurde hinsichtlich des histologischen Gradings und des Tumorstadiums (nach UICC) in Subgruppen unterteilt. Die Stadien UICC 1 und 2 wurden zu einer Gruppe von Patienten zusammengefasst, die Stadien UICC 3 und 4 zu einer weiteren. Dies geschah sowohl aus statistischen als auch aus medizinischen Überlegungen, da die UICC-Stadien 3 und 4 den metastasierten Karzinomen vorbehalten sind (regionale Lymphknotenmetastasierung bzw. Fernmetastasen). Auch bei der Einteilung nach dem Grading wurden aus statistischen Gründen Stadien zusammengelegt. Gruppe 1 umfasste die Differenzierungsgrade 0 und 1, Gruppe 2 den Differenzierungsgrad 2 und Gruppe 3 die Differenzierungsgrade 3 und 4. Bei der Einteilung nach der Lokalisation des Magenkarzinoms wurden aus statistischen Gründen 2 Subgruppen gebildet. Der ersten Gruppe wurden alle Patienten mit einem Karzinom der Magencardia zugeteilt (n=28), der zweiten Gruppe sämtliche Patienten deren Karzinom sich nicht in der Cardia-Region befand (n=78).

#### 4.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte via SPSS-Analyse-Software Version 9 in Kooperation mit dem Institut für Biometrie und Medizinische Informatik der Universität Magdeburg. Der Vergleich der Merkmale inklusive Genotypenhäufigkeit zwischen den beiden Kollektiven wurde mittels  $\chi^2$ -Test durchgeführt. Für kontinuierliche Variablen kam der Student's t-Test zum Einsatz. Desweiteren wurde eine logistische Regression mit der Krankheit als abhängige Variable durchgeführt. Hierbei wurde jeweils das relative Risiko und das 95%-Konfidenzintervall angegeben. Für alle Tests betrug das Signifikanzniveau 0.05.

## 5. Auswertung

### 5.1. Klinische Charakteristika der Probandenkollektive

Eine allgemeine Übersicht über die Charakteristika der Kollektive findet sich in Tabelle 3. Trotz grösstmöglicher Anpassung der beiden untersuchten Kollektive aneinander blieb im t-Test ein signifikanter Altersunterschied ( $p=0,03$ ) bestehen. Dabei waren Probanden der Kontrollgruppe durchschnittlich 2,8 Jahre älter als Patienten des Karzinomkollektivs (Abbildungen 9, 10). In der geschlechts- und altersadjustierten logistischen Regression ergab sich für den Altersunterschied ein relatives Risiko von 0,97 [0,94-1,01]. Für das Geschlecht betrug das relative Risiko 1,78 [0,99-3,21]. Die Kollektive unterschieden sich ebenso im Raucherstatus ( $p=0,03$ ), wobei dieser nicht für jeden Karzinompatienten verifiziert werden konnte ( $n=66$ ). In den Parametern BMI, Folat und Vitamin B12 gab es dagegen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Kollektiven. Der Median für Folat betrug in der Kontrollgruppe 7,4 ng/ml und in der Karzinomgruppe 6,6 ng/ml. Für Vitamin B12 betrug der Median in der Kontrollgruppe 377 pg/ml und in der Karzinomgruppe 297 pg/ml. Folat, Vitamin B12 und Homocystein konnten nur für einen Teil der Karzinomgruppe bestimmt werden. Die Ursache hierfür lag in der begrenzten Verfügbarkeit von asservierten Seren (Folat:  $n=54$ ; Vitamin B12:  $n=55$ ; Homocystein:  $n=43$ ). Die Abbildungen 11-13 zeigen jeweils den Mittelwert und die Standardabweichung dieser Parameter in den Kollektiven. Für Homocystein ergab sich ein signifikanter Unterschied ( $p=0,02$ ).

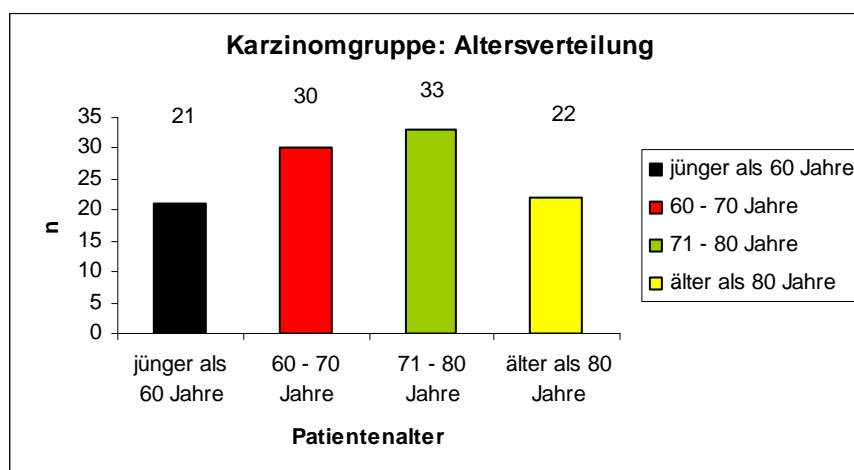


Abbildung 9: Altersverteilung der Karzinomgruppe

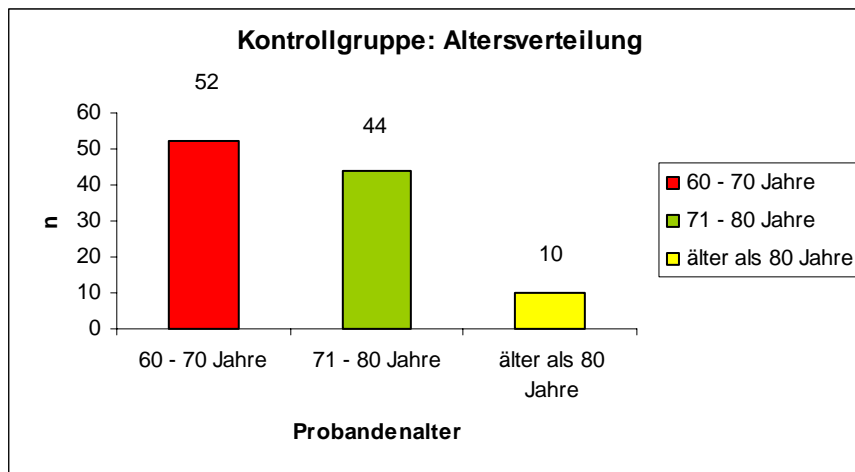


Abbildung 10: Altersverteilung der Kontrollgruppe

Tabelle 3: Charakteristika der Kollektive (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Parameter	Einheit	Karzinomgruppe	Kontrollgruppe	p
Alter	Jahr	65.0 ( $\pm$ 11)	67.8 ( $\pm$ 6)	0.033
Geschlecht		Männer: 78, Frauen: 28	Männer: 63, Frauen: 43	0.029
BMI	kg/m <sup>2</sup>	24.67 ( $\pm$ 4.70)	25.89 ( $\pm$ 3.41)	0.068
Raucher		37 (35 %)	41 (39 %)	0.026
Folat	ng/ml	11.8 ( $\pm$ 21.0)	9.9 ( $\pm$ 8.1)	0.512
Vitamin B12	pg/ml	416 ( $\pm$ 394)	410 ( $\pm$ 176)	0.924
tHcy	$\mu$ mol/l	15.3 ( $\pm$ 6.3)	12.8 ( $\pm$ 3.8)	0.019
HP positiv		37 (64.91%)	62 (58.49%)	0.641

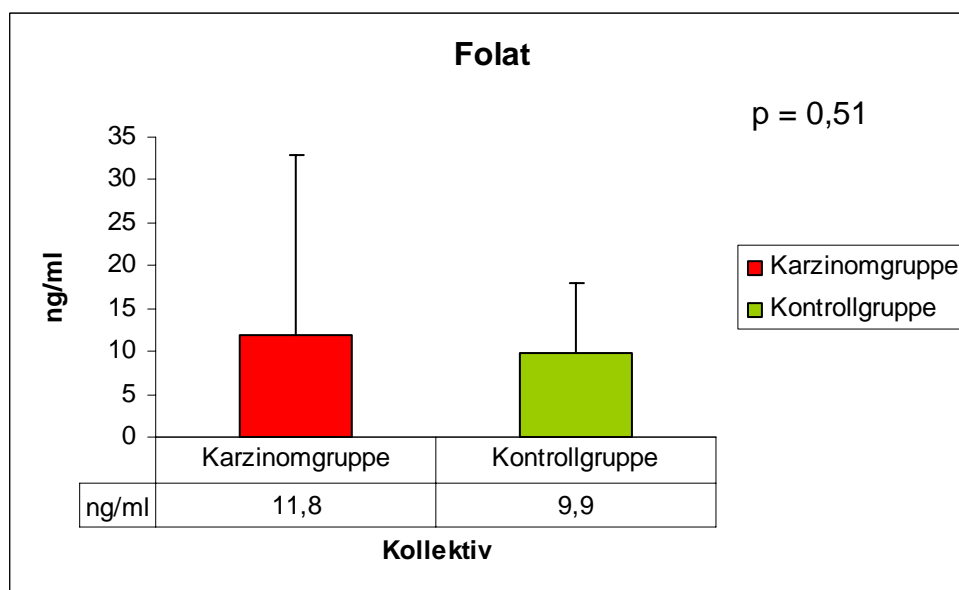


Abbildung 11: Folatspiegel in den Kollektiven (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)



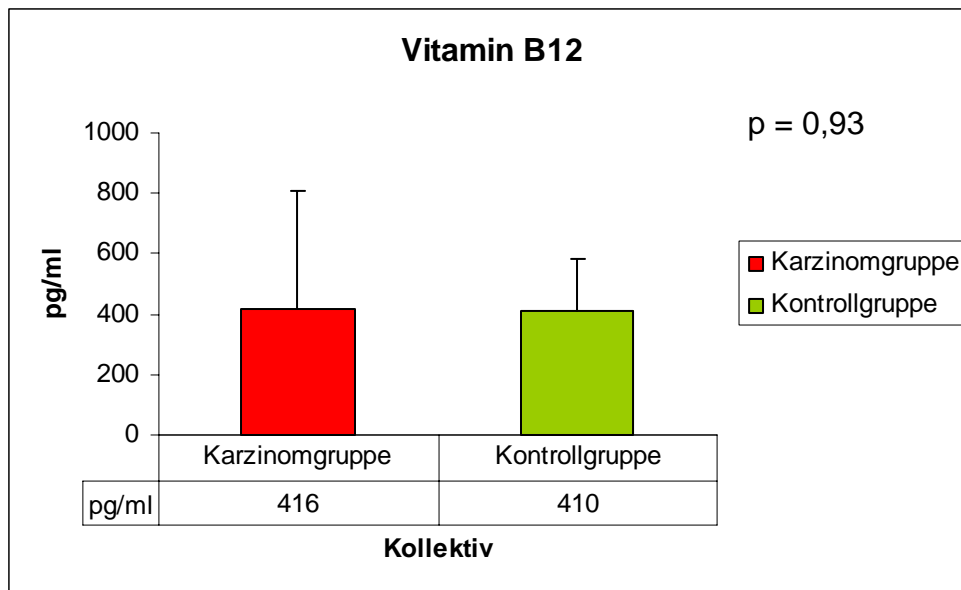


Abbildung 12: Vitamin B12-Spiegel in den Kollektiven (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

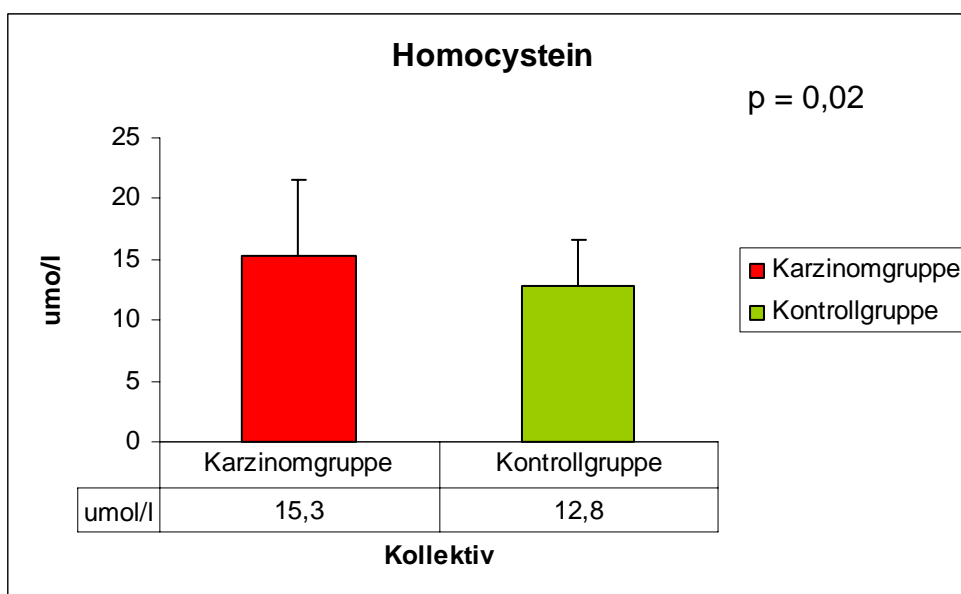


Abbildung 13: Homocysteinspiegel in den Kollektiven (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

## 5.2. Methylentetrahydrofolatreduktase-C677T-Polymorphismus

In der Kontrollgruppe zeigten 41 Personen den 677CC-Genotyp, 49 den 677CT-Genotyp und 16 den 677TT-Genotyp. In der Karzinomgruppe dagegen hatten 46 Personen den 677CC-Genotyp, 45 den 677CT-Genotyp und 12 den 677TT-Genotyp. Für 3 Patienten aus der Karzinomgruppe konnte der Polymorphismus nicht bestimmt werden. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,61. Daraus folgt, dass zwischen beiden Gesamtkollektiven keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der

Häufigkeit des MTHFR-C677T-Polymorphismus bestehen (Abbildung 14). Die logistische Regression bestätigte dieses Ergebnis. Im alters- und geschlechtsadjustierten Vergleich der Genotypen 677CC und 677CT gegen 677TT ergab sich ein relatives Risiko von 0,84 [0,37-1,91] bei Trägern des 677TT-Genotyps an einem Magenkarzinom zu erkranken. Führt man die gleiche Analyse für die Kombination 677CC gegen 677CT und 677TT durch so beträgt das relative Risiko für den 677CC-Genotyp 0,82 [0,47-1,45].

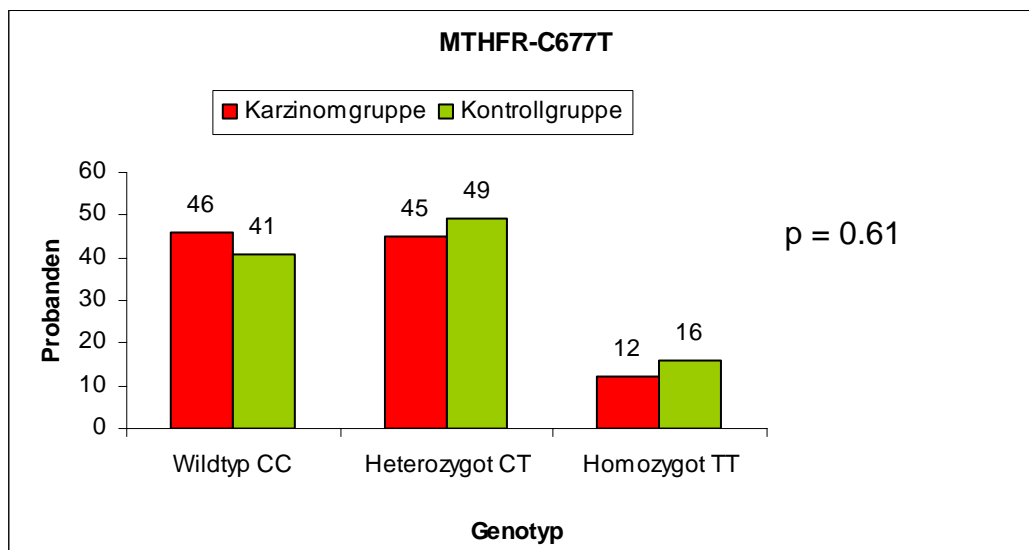


Abbildung 14: Häufigkeit von MTHFR-C677T in den Kollektiven

Tabelle 4 zeigt die Genotypenverteilung in den einzelnen Subkategorien. Bei der Analyse der Lokalisation des Magentumors fand sich bei 27 Patienten ein Cardia-Tumor. Davon wiesen jeweils 13 den 677CC bzw. 677CT-Genotyp sowie 1 Patient den 677TT-Genotyp auf. Die 2. Gruppe mit Patienten ohne Cardia-Tumor bestand aus 76 Personen, davon hatten 33 den 677CC-Genotyp, 32 den 677CT-Genotyp und 11 den 677TT-Genotyp. Die Verteilung der Genotypen war nicht signifikant verschieden ( $p=0,33$ ). Die Einteilung nach der UICC-Klassifikation ergab 7 Patienten mit dem 677CC-Genotyp in den UICC-Stadien 1 und 2 sowie 36 Patienten in den UICC-Stadien 3 und 4. Beim 677CT-Genotyp entfielen 12 Patienten auf UICC 1 und 2 sowie 28 Patienten auf die Gruppe UICC 3 und 4. Beim 677TT-Genotyp gehörten 4 Patienten zum UICC-Stadium 1 oder 2 und 7 zum UICC-Stadium 3 oder 4. Höhere Stadien nach der UICC-Klassifikation traten unabhängig vom Genotyp des MTHFR-C677T-Polymorphismus auf ( $p=0,22$ ). In der Aufteilung nach dem Tumordifferenzierungsgrad wurden vom 677CC-Genotyp 3 Patienten der Gradinggruppe 0 und 1, 6 Patienten der

Gradinggruppe 2 und 33 der Gradinggruppe 3 und 4 zugeordnet. Beim 677CT-Genotyp waren es 1 Patient (Grading 0+1), 9 Patienten (Grading 2) bzw. 30 (Grading 3+4) und beim 677TT-Genotyp konnte 1 Patient der Gruppe 0 und 1 zugeordnet werden, 2 dem Grading 2 und 8 der Gradinggruppe 3 und 4. Der Tumordifferenzierungsgrad war unabhängig vom Genotyp des MTHFR-C677T-Polymorphismus ( $p=0,74$ ). Bei der Einteilung nach Lauren gehörten 18 Patienten des 677CC-Genotyps dem diffusen Typ und 21 dem intestinalen Typ an. Beim 677CT-Genotyp waren es 15 bzw. 24 und beim 677TT-Genotyp entfielen 4 auf den diffusen Typ und 8 auf den intestinalen. Es gab keinen Zusammenhang zwischen dem Tumortyp nach Lauren und dem Polymorphismus ( $p=0,66$ ).

Tabelle 4: Häufigkeit von MTHFR-C677T in Subkategorien der Karzinomgruppe

<b>MTHFR-C677T</b>	<b>Wildtyp CC</b>	<b>Heterozygot CT</b>	<b>Homozygot TT</b>	<b>p</b>
Cardia	13	13	1	0.32
Non-Cardia	33	32	11	
UICC 1+2	7	12	4	0.22
UICC 3+4	36	28	7	
Grading 0+1	3	1	1	0.74
Grading 2	6	9	2	
Grading 3+4	33	30	8	
Lauren diffus	18	15	4	0.66
Lauren intestinal	21	24	8	

Keiner der drei Genotypen des MTHFR-C677T-Polymorphismus zeigte im Kollektiv der Karzinompatienten oder im Gesamtkollektiv eine Assoziation mit *Helicobacter pylori*. Der Genotyp 677CT trat im Kontrollkollektiv jedoch signifikant häufiger bei Nichtrauchern als bei Rauchern auf. (Abbildung 15). Der MTHFR-C677T-Polymorphismus zeigte jedoch keinen Zusammenhang mit einer Erhöhung des Folsäurespiegels ( $p=0,2$ ), des Vitamin B12-Spiegels ( $p=0,7$ ) oder des Homocysteinlevels ( $p=0,9$ ).

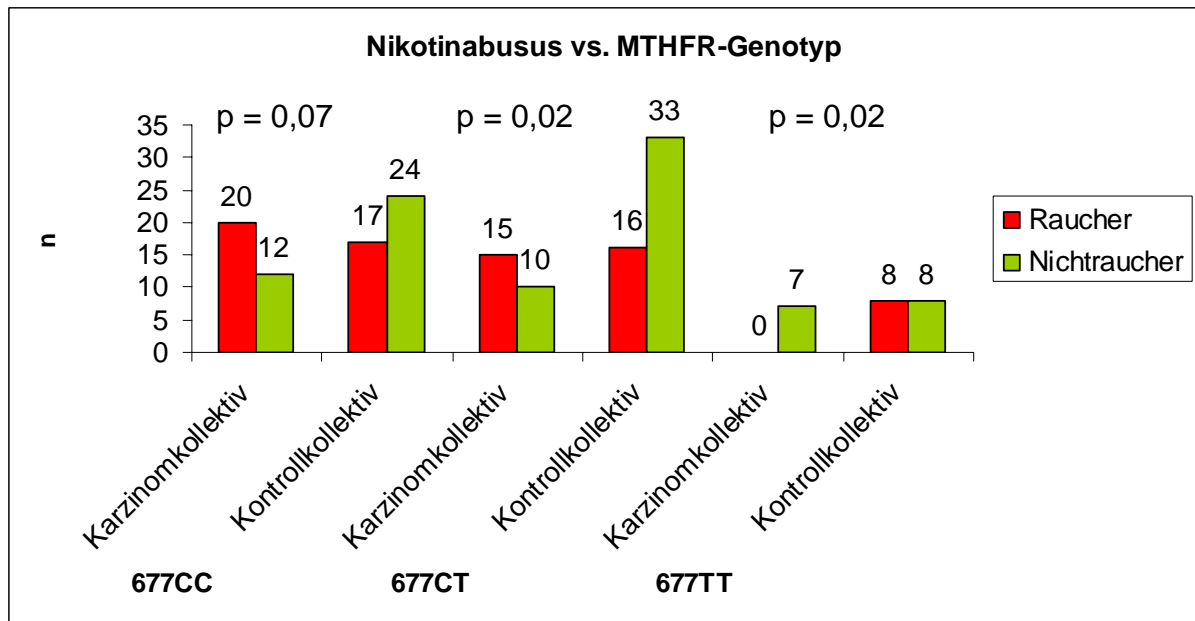


Abbildung 15: MTHFR-Polymorphismus vs. Nikotinabusus

### 5.3. Glutamatcarboxypeptidase-C1561T-Polymorphismus

In der Kontrollgruppe fanden sich 94 Personen mit dem 1561CC-Genotyp sowie 11 mit dem 1561CT-Genotyp, in der Karzinomgruppe hingegen 93 Personen mit dem 1561CC-Genotyp und 10 mit dem 1561CT-Genotyp. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,85. Daraus folgt, dass zwischen beiden Kollektiven keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Häufigkeit des GCP-C1561T-Polymorphismus bestehen (Abbildung 16). Dies zeigte auch die logistische Regression. Im alters- und geschlechtsadjustierten Vergleich ergab sich für 1561CT-Merkmalsträger ein relatives Risiko von 0,93 [0,37-2,33] zur Tumorgruppe zu gehören.

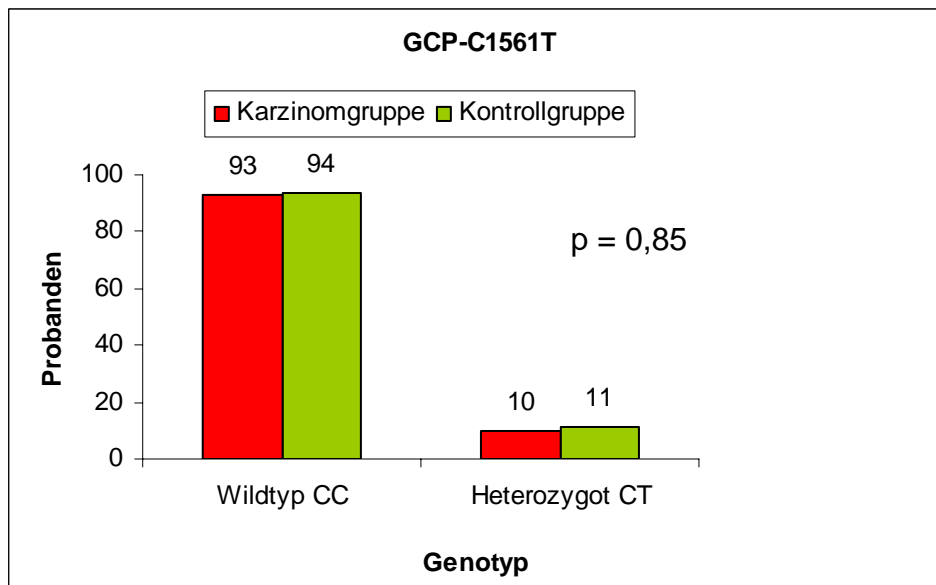


Abbildung 16: Häufigkeit von GCP-C1561T in den Kollektiven

Tabelle 5 stellt die Genotypenverteilung in den einzelnen Subkategorien für den Polymorphismus dar. Bei der Unterteilung nach der Lokalisation wiesen 24 Patienten den 1561CC-Genotyp und 3 den 1561CT-Genotyp auf. Die zweite Gruppe mit Patienten ohne Cardia-Tumor bestand aus 76 Personen, davon hatten 69 den 1561CC-Genotyp und 7 den 1561CT-Genotyp. Es bestand kein Unterschied in der Häufigkeit des Auftretens von Cardia sowie Nicht-Cardia-Tumoren hinsichtlich der unterschiedlichen Genotypen des GCP-C1561T-Polymorphismus ( $p=0,77$ ). In der Analyse des Tumorstadiums gehörten 19 Patienten mit dem 1561CC-Genotyp der Gruppe UICC 1 und 2 an, 65 Patienten der Gruppe UICC 3 und 4. Beim 1561CT-Genotyp entfielen 4 Patienten auf UICC 1 und 2 sowie 6 Patienten auf die Gruppe UICC 3 und 4. Höhere Stadien nach der UICC-Klassifikation traten unabhängig vom Genotyp des GCP-C1561T-Polymorphismus auf ( $p=0,23$ ). Hinsichtlich des Tumordifferenzierungsgrades ergab sich folgende Häufigkeitsverteilung: Dem 1561CC-Genotyp gehörten 4 Patienten in Gruppe 1, 15 Patienten in Gruppe 2 und 64 Patienten in Gruppe 3 an. Beim 1561CT-Genotyp entfiel nur 1 Patient in die 1. Gruppe, 2 in die 2. Gruppe und 7 in die 3. Gruppe. Laut statistischer Analyse bestand kein Zusammenhang zwischen dem Tumorgrading und dem Genotyp ( $p=0,77$ ). In der Analyse des Lauren-Typs wiesen 34 Patienten den 1561CC-Genotyp bei diffusem Typ nach Lauren auf, 47 gehörten dem intestinalen Typ an. Beim 1561CT-Genotyp entfielen nur 3 Patienten auf den diffusen Typ und 6 auf den intestinalen. Es bestand kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp und dem Tumortyp nach Lauren ( $p=0,62$ ).

Tabelle 5: Häufigkeit von GCP-C1561T in Subkategorien der Karzinomgruppe

<b>GCP-C1561T</b>	<b>Wildtyp CC</b>	<b>Heterozygot CT</b>	<b>p</b>
Cardia	24	3	0.77
Non-Cardia	69	7	
UICC 1+2	19	4	0.23
UICC 3+4	65	6	
Grading 0+1	4	1	0.77
Grading 2	15	2	
Grading 3+4	64	7	
Lauren diffus	34	3	0.62
Lauren intestinal	47	6	

Keiner der Genotypen des GCP-C1561-Polymorphismus zeigte im Karzinom- oder Gesamtkollektiv eine Assoziation mit *Helicobacter pylori*. Es zeigte sich außerdem keine Häufung des Polymorphismus bei Rauchern gegenüber Nichtrauchern im Gesamt- und Tumorkollektiv. Individuen mit dem GCP-C1561T-Polymorphismus zeigten keine Assoziation mit einer Erhöhung des Folsäurespiegels ( $p=0,5$ ), des Vitamin B12-Spiegels ( $p=0,6$ ) oder des Homocysteinlevels ( $p=0,3$ ).

#### 5.4. Reduced Folate Carrier-G80A-Polymorphismus

Beim RFC-G80A-Polymorphismus befanden sich in der Kontrollgruppe 31 Personen mit dem 80GG-Genotyp, 51 mit dem 80GA-Genotyp und 22 mit dem 80AA-Genotyp. In der Karzinomgruppe hatten 39 Personen den 80GG-Genotyp, 43 den 80GA-Genotyp und 21 den 80AA-Genotyp. Zwischen beiden Kollektiven gab es keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Häufigkeit des RFC-G80A-Polymorphismus ( $p=0,45$ ; Abbildung 17). Die logistische Regression ergab im alters- und geschlechtsadjustierten Vergleich der Genotypen 80GG gegen 80GA und 80AA ein relatives Risiko von 0,66 [0,37-1,20] bei Trägern des 80GG-Genotyps an einem Magenkarzinom zu erkranken.

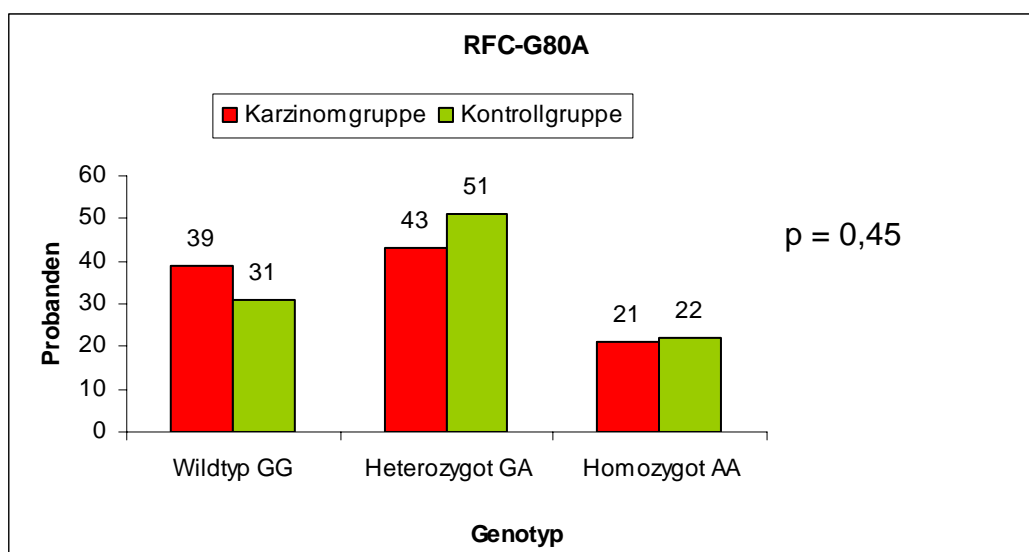


Abbildung 17: Häufigkeit von RFC-G80A in den Kollektiven

Tabelle 6 stellt die Genotypenverteilung in den einzelnen Subkategorien dar. Bei der Analyse der Karzinomgruppe hinsichtlich der Verteilung von Cardia-Tumoren vs. Non-Cardia-Tumoren ergab sich ein signifikanter Unterschied. In der Cardia-Gruppe wiesen 16 Patienten den 80GG-Genotyp auf, 8 weitere den 80GA-Genotyp und 3 den 80AA-Genotyp. Dagegen hatten in der Non-Cardia-Gruppe 23 Patienten den 80GG-Genotyp, 35 den 80GA-Genotyp und 18 den 80AA-Genotyp. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,03 und damit einen signifikanten Unterschied. Es zeigte sich, dass Patienten mit einem A-Allel (GA und AA) häufiger eine Tumorlokalisierung außerhalb der Cardia-Region aufwiesen als Patienten ohne das A-Allel (GG). Dieses Ergebnis blieb auch nach Adjustierung für Alter und Geschlecht konstant. Das relative Risiko für Personen mit einem 80GG-Genotyp, an einem Tumor außerhalb der Cardia-Region erkrankt zu sein, betrug 0,28 [0,11-0,71]. Die Einteilung nach der UICC-Klassifikation

ergab 8 Patienten mit dem 80GG-Genotyp im UICC-Stadium 1 und 2 sowie 28 Patienten im UICC-Stadium 3 und 4. Beim 80GA-Genotyp entfielen 12 Patienten auf UICC 1 und 2 sowie 27 Patienten auf die Gruppe UICC 3 und 4. Beim 80AA-Genotyp gehörten 3 Patienten zum UICC-Stadium 1 oder 2 und 16 zum UICC-Stadium 3 oder 4. Höhere Stadien nach der UICC-Klassifikation traten unabhängig vom Genotyp des RFC-G80A-Polymorphismus auf ( $p=0,43$ ). In der Aufteilung nach dem Tumordifferenzierungsgrad wurden beim 80GG-Genotyp 1 Patient der Gradinggruppe 0 und 1, 2 Patienten der Gradinggruppe 2 und 34 der Gradinggruppe 3 und 4 zugeordnet. Beim 80GA-Genotyp waren es 2 Patienten (Grading 0+1), 9 Patienten (Grading 2) bzw. 27 (Grading 3+4) und beim 80AA-Genotyp konnten 2 Patienten der Gruppe 0 und 1 zugeordnet werden, 6 dem Grading 2 und 10 der Gradinggruppe 3 und 4. Der Chi-Quadrat-Test ergab einen p-Wert von 0,04. Daraus folgt, dass es einen signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen Genotypen hinsichtlich des Grades der Tumordifferenzierung gibt. Die Mutation trat signifikant häufiger bei Patienten auf, die Tumore mit einem niedrigerem Differenzierungsgrad aufwiesen. Bei der Einteilung nach Lauren gehörten 17 Patienten des 80GG-Genotyps dem diffusen Typ und 18 dem intestinalen Typ an. Beim 80GA-Genotyp waren es 14 bzw. 22 und beim AA-Genotyp entfielen 6 auf den diffusen Typ und 13 auf den intestinalen Typ. Es gab keinen Zusammenhang zwischen dem Tumortyp nach Lauren und dem Genotyp des Polymorphismus ( $p=0,45$ ). Zusammenfassend ist das A-Allel (GA, AA) mit einer Tumorentwicklung im distalen Magen und einer stärkeren Entdifferenzierung assoziiert.



Tabelle 6: Häufigkeit von RFC-G80A in Subkategorien der Karzinomgruppe

<b>RFC-G80A</b>	<b>Wildtyp GG</b>	<b>Heterozygot GA</b>	<b>Homozygot AA</b>	<b>p</b>
Cardia	16	8	3	0.03
Non-Cardia	23	35	18	
UICC 1+2	8	12	3	0.43
UICC 3+4	28	27	16	
Grading 0+1	1	2	2	0.04
Grading 2	2	9	6	
Grading 3+4	34	27	10	
Lauren diffus	17	14	6	0.45
Lauren intestinal	18	22	13	

Keiner der drei Genotypen des RFC-G80A-Polymorphismus zeigte im Tumor- oder Gesamtkollektiv eine Assoziation mit *Helicobacter pylori*. Der Genotyp 80AA trat im Kontrollkollektiv jedoch häufiger bei Nichtrauchern als bei Rauchern auf ( $p=0,04$ ; Abbildung 18). Träger des RFC-G80A-Polymorphismus zeigten keine Assoziation mit einer Erhöhung des Folsäurespiegels ( $p=0,3$ ), des Vitamin B12-Spiegels ( $p=0,4$ ) oder des Homocysteinlevels ( $p=0,5$ ).

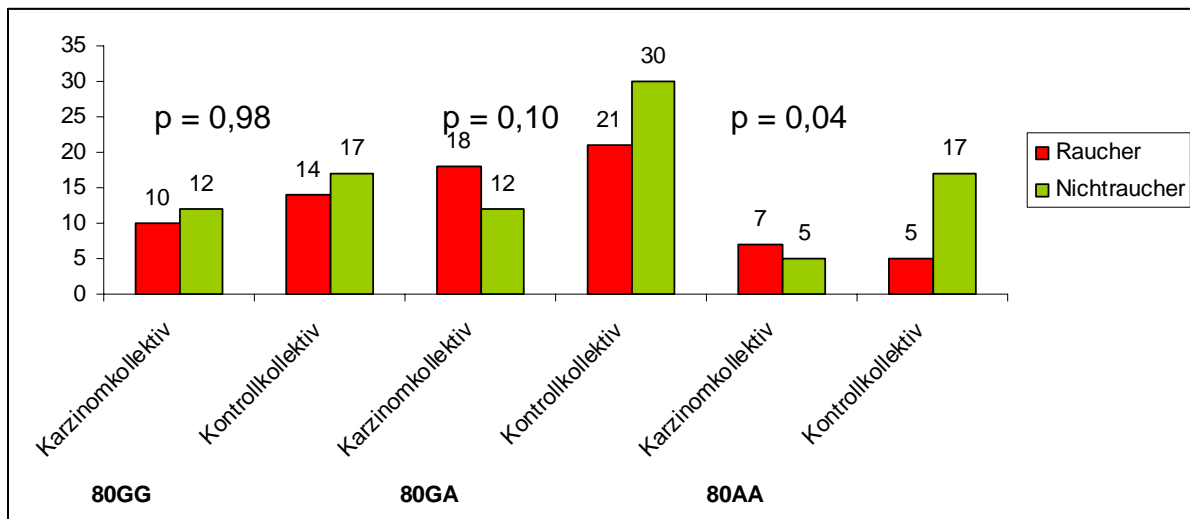


Abbildung 18: RFC-G80A-Polymorphismus vs. Nikotinabusus

### 5.5. Vergleichende Analyse der Polymorphismen

Zusätzlich zur Auswertung eines Polymorphismus isoliert gegen die Kontrollgruppe wurde auch ein Kreuzvergleich der drei Polymorphismen untereinander durchgeführt. Damit sollte untersucht werden, ob ein gehäuftes Auftreten eines Polymorphismus mit einem der beiden übrigen assoziiert ist. Dies war in keiner der drei Analysen der Fall. Bei der Analyse GCP-C1561T vs. RFC-G80A ergab der Chi-Quadrat-Test einen p-Wert von 0,47. Dies bedeutet, dass kein signifikanter Zusammenhang besteht und die beiden Polymorphismen in keiner Kombination gehäuft miteinander auftreten. Bei der Analyse RFC-G80A vs. MTHFR-C677T ergab der Chi-Quadrat-Test einen p-Wert von 0,48. Auch in dieser Kombination besteht also kein signifikanter Zusammenhang in der Häufigkeit des Auftretens der beiden Polymorphismen. Zu dem gleichen Ergebnis kommt die Analyse des MTHFR-C677T-Polymorphismus vs. GCP-C1561T-Polymorphismus. Hier ergab der Chi-Quadrat-Test einen p-Wert von 0,43 und somit erneut keinen signifikanten Zusammenhang.

Tabelle 7: Analyse der Polymorphismen untereinander

<b>Polymorphismen</b>	<b>p</b>
RFC-G80A vs. GCP-C1561T	0.47
RFC-G80A vs. MTHFR-C677T	0.48
MTHFR-C677T vs. GCP-C1561T	0.43

## 6. Diskussion

Es war das Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob sich die Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten des Methylentetrahydrofolatreduktase-C677T-Polymorphismus, des Glutamatcarboxypeptidase-C1561T-Polymorphismus und des Reduced Folate Carrier-G80A-Polymorphismus bei Magenkarzinompatienten und einem gesunden Kontrollkollektiv unterscheiden. Es zeigte sich, dass im untersuchten Kollektiv mit einer Ausnahme keiner der genannten Single Nucleotide Polymorphismen (SNP's) mit einer erhöhten Karzinomhäufigkeit in Verbindung gebracht werden kann. Ein wichtiges Ergebnis ist jedoch, dass der RFC-G80A-Polymorphismus häufiger mit Karzinomen im distalen Magen und einem niedrigerem Grad der Tumordifferenzierung assoziiert ist. Zudem zeigte diese Untersuchung, dass in einem gesunden Kontrollkollektiv der MTHFR-C677T-Polymorphismus und der RFC-G80A-Polymorphismus bevorzugt bei Nichtrauchern auftreten.

### 6.1. Methylentetrahydrofolatreduktase-C677T-Polymorphismus

Der MTHFR-C677T-Genpolymorphismus wurde 1995 das erste Mal beschrieben. Seitdem haben sich zahlreiche Studien mit dem Einfluss des MTHFR-C677T-Polymorphismus auf den Folatstoffwechsel sowie einem möglichen Einfluß auf die Genese von Tumoren beschäftigt. Die Ergebnisse dieser Studien zeigen allerdings ein uneinheitliches Bild und unterscheiden sich je nach geographischer Lokalisation und ethnischer Zusammensetzung der untersuchten Kollektive. Bereits bei der Häufigkeit des Polymorphismus gibt es große Unterschiede. In Europa beträgt die Häufigkeit der homozygoten 677TT-Variation zumeist 5 bis 20%, während im asiatischen Raum bis zu 40% der untersuchten Personen diesen Genotyp aufweisen [23]. In dem hier untersuchten Kollektiv aus insgesamt 206 Personen - welche sich aus der Region Sachsen-Anhalt bzw. Norddeutschland rekrutierten - betrug die Häufigkeit des 677TT-Genotyps 13.4%. Diese Häufigkeit liegt im Bereich anderer europäischer Studien und entspricht somit den Erwartungen. Als Ausgangspunkt der Studie dienten Ergebnisse einer Untersuchung aus China, welche den MTHFR-C677T-Polymorphismus als Risikofaktor für das Magenkarzinom beschrieb, vor allem für Karzinome in der Cardia-Region [30]. Dort wurde, ebenso wie hier, eine Fall-Kontroll-Studie durchgeführt. In den insgesamt mehr als 600 Personen umfassenden Kollektiven ergab sich ein relatives Riskiko für den 677TT-Genotyp von 1,79 [1,02-3,15]. Dieses Resultat können unsere

Ergebnisse nicht bestätigen. Im Vergleich der Kontrollgruppe vs. Karzinomgruppe zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit des MTHFR-C677T-Genpolymorphismus. Im Gegensatz zur chinesischen Studie weisen die hier untersuchten Kollektive jeweils eine geringere Fallzahl auf.

Für die Karzinogenese scheint der Aktivitätsgrad von MTHFR dennoch eine entscheidende Rolle zu spielen. Man geht heute von der Vermutung aus, dass die DNA-Methylierung sowohl das Mutationsrisiko als auch die Stabilität der DNA beeinflussen kann. Dabei werden in den frühen Phasen der Karzinogenese sowohl eine allgemeine Hypomethylierung als auch eine lokalisierte Hypermethylierung beobachtet [31]. Theoretisch bewirkt eine erniedrigte Aktivität von MTHFR ein erhöhtes Angebot von 5,10-Methylen-Tetrahydrofolsäure, dass wiederum zu einer erleichterten Bildung von dTMP führen würde. Auf der anderen Seite konnte nachgewiesen werden, dass ein Mangel an S-Adenosylmethionin die Richtung des Folsäurestoffwechsels durch Erhöhung der MTHFR-Aktivität ändert, fort von der DNA bzw. dTMP-Synthese und hin zur Methylierung von Homocystein und letztendlich damit zur verstärkten Bildung von S-Adenosylmethionin [32]. Diese exponierte und komplexe Stellung im Folsäurehaushalt könnte die Ursache sein für die teils widersprüchlichen Ergebnisse in den bisherigen MTHFR-Studien. In der Literatur zum Thema MTHFR-C677T-Polymorphismus und Tumorentwicklung finden sich hauptsächlich Fall-Kontroll-Studien. Der Zusammenhang zwischen MTHFR-C677T-Polymorphismus und dem Magenkarzinom wurde erst kürzlich erneut in einer chinesischen Studie in Nanjing untersucht. Die Kollektive bestanden aus 320 Adenokarzinomen und 313 Kontrollen. Die Autoren konnten ihre früheren Ergebnisse bestätigen und fanden für den 677TT-Genotyp ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms. Dies galt insbesondere für Karzinome der Cardia-Region [33]. Graziona et al. veröffentlichten 2005 eine Studie mit 162 italienischen Patienten mit Magenkarzinom. Dort war das T-Allel (677CT / 677TT) ebenfalls mit einem signifikant höheren Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms assoziiert [34]. Weitere europäische Studien über MTHFR als Risikofaktor für die Entstehung von Magenkarzinomen liegen bisher nicht vor. Die Daten der vorliegenden Studien unterstützen die Hypothese, dass es erhebliche ethnische Unterschiede hinsichtlich der Bedeutung des MTHFR-C677T-Polymorphismus gibt [23]. Die Unterschiede könnten jedoch auch den wichtigen Einfluss von Ernährungsgewohnheiten widerspiegeln. Auch für andere Tumorentitäten

wurden Studien durchgeführt (siehe Tabelle 8). Für das Kolonkarzinom z.B. ergab sich zumeist eine protektive Wirkung des 677TT-Genotyps, oft jedoch mit der Einschränkung einer genügenden Folatezufuhr. Aber auch exakt gegenteilige Ergebnisse wurden publiziert [35]. Als Ursache dafür kommen zwei Gründe in Frage. Zum einen unterscheiden sich die untersuchten Kollektive sehr stark in der Versorgung mit Folat. In Deutschland besteht, im Gegensatz zu vielen anderen Ländern und Gebieten, generell kein Folatmangel. Es werden keine künstliche Nahrungsergänzungen vorgenommen. Vor allem bei Interventionsstudien wird dagegen oft eine künstliche Supplementation von Folat durch Folsäurepräparate vorgenommen. Es ist fraglich, ob eine intensivierete Zufuhr, beschränkt auf den Beobachtungszeitraum, mit der natürlichen Folateversorgung über Nahrungsmittel zu vergleichen ist. Zum zweiten unterscheiden sich die Kollektive in der Häufigkeit des Polymorphismus sehr stark. Es ist anzunehmen, dass eine Kombination der beiden genannten Gründe für die Ergebnisdivergenz verantwortlich ist. Biochemisch betrachtet bewirkt der C677T-Polymorphismus eine verminderte Aktivität von MTHFR. Dadurch wird die Synthese von Methionin und SAM verringert. Dies hat Einfluß auf die Methylierung von DNA und RNA und damit auf die Karzinogenese. Allerdings besteht, wie bei allen genetischen Veränderungen, die Möglichkeit, dass Änderungen des Genotyps nicht zu einer Änderung des Phänotyps führen. Im Fall von MTHFR könnte eine derartige – stumme – Variation vorliegen, welche zwar genetisch nachweisbar ist, sich physiologisch aber nicht nachteilig auswirkt. Zusammenfassend kann man sagen, dass unsere Daten den MTHFR-C677T-Polymorphismus nicht als wesentlichen Risikofaktor für das Magenkarzinom bestätigen. Dies wird zudem durch unsere eigene Beobachtung unterstützt, dass die Folsäurespiegel bei Trägern des 677CT- und 677TT-Genotyps nicht wesentlich verändert waren.

Tabelle 8: Übersicht über Studien zum MTHFR-C677T-Polymorphismus  
 [33,34,36,37,35,38,39,40,41,42]

Studie	Jahr	Fälle	Kontrollen	Tumor	Ergebnis	OR [95% KI]
Shen	2005	320	313	Magen	C677TT-Genotyp erhöht Risiko (Cardia)	1.79 [1.02-3.15]
Graziano	2005	162	164	Magen	C677TT-Genotyp erhöht Risiko	2.49 [1.48-4.20]
Lin	2004	457	457	Blase	C677TT-Genotyp erhöht Risiko	3.51 [1.59-6.52]
Sull	2004	462	454	Zervix	C677TT-Genotyp erhöht Risiko	1.40 [0.90-2.30]
Kim	2004	243	225	Kolon	C677CT/TT-Genotyp erhöht Risiko	2.01 [1.14-3.53]
Ulvik	2004	2179	2179	Kolon	C677TT-Genotyp senkt Risiko	0.73 [0.58-0.92]
Yin	2004	685	778	Kolon	C677TT-Genotyp senkt Risiko bei genügender Folatzufuhr	0.69 [0.51-0.93]
Jing	1997	202	326	Kolon	C677TT-Genotyp senkt Risiko bei genügender Folatzufuhr	0.32 [0.15-0.68]
Jing	1997	202	326	Kolon	C677TT-Genotyp senkt Risiko bei geringem Alkoholkonsum	0.12 [0.03-0.57]
Henao	2005	436		cervikale intraepitheliale Neoplasie	C677TT-Genotyp senkt Risiko bei adäquatem Folatstatus	0.43 [0.23-0.79]
Yang	2005	165	495	Ösophagus	C677TT-Genotyp senkt Risiko bei starkem Alkoholkonsum	0.27 [0.09-0.76]

### 6.1.1. MTHFR-C677T-Polymorphismus, Homocystein und Folsäurespiegel

Den Zusammenhang von MTHFR-C677T-Genotyp und der Serumkonzentration von Folsäure bzw. von Homocystein haben zahlreiche Studien nach der Entdeckung des Polymorphismus untersucht. Klerk et al. veröffentlichten 2002 eine Metaanalyse zum Zusammenhang von MTHFR-C677T-Polymorphismus, Homocysteinspiegel und koronarer Herzkrankheit [43]. Die mittlere Prävalenz des 677TT-Genotyps lag bei etwa 11%, der mittlere Homocysteinspiegel bei 10.3  $\mu\text{mol/l}$  in Europa (22 Studien wurden eingeschlossen). Die Studienanalyse auch außereuropäischer Studien bestätigte diese Ergebnisse. Bei diesen Studien handelt es sich nahezu ausschliesslich um Beobachtungsstudien im cross-sektionalen Design. Die Studie von de Bree et al. zeigte bei geringer Folatzufuhr keinen Unterschied im Folsäurespiegel unter den einzelnen Genotypen, bei hoher Folatzufuhr wies der 677TT-Genotyp allerdings die geringsten Folsäurespiegel auf. In Bezug auf die Homocysteinkonzentration hatte der 677TT-Genotyp höhere Konzentrationen, als die beiden anderen Genotypen bei geringer Folatzufuhr, bei hoher Folatzufuhr verschwand der beobachtete Zusammenhang [44]. Mit dem wichtigen Zusammenhang der Geschlechtsdifferenzierung befasste sich die Studie von Chango et al. Der 677TT-Genotyp wies dort eine Gesamtfrequenz von 16.8% auf (219 Probanden). In Hinsicht auf Homocystein konnte kein Unterschied in Bezug auf die Altersstruktur nachgewiesen werden, sehr wohl aber nach Geschlechtsunterteilung. Männer mit dem 677TT-Genotyp zeigten die höchsten Homocysteinspiegel wohingegen bei Frauen kein Einfluss des MTHFR-C677T-Polymorphismus auf den Homocysteinspiegel gezeigt werden konnte. Dierkes et al. identifizierten in ihrer Studie von 2001 als mögliche Ursache von Geschlechtsunterschieden im Homocysteinspiegel die Fett-freie-Körpermasse sowie den Estradiolspiegel [45]. Unsere eigene Studie zeigte einen signifikanten Unterschied in der Homocysteinkonzentration zwischen dem Kontrollkollektiv und dem Karzinomkollektiv ( $p= 0,02$ ). Der Mittelwert lag dabei in der Karzinomgruppe bei 15,3  $\text{pg/ml}$  und bei den Kontrollprobanden bei 12,8  $\text{pg/ml}$ . Jedoch konnten wir nur bei 43 Patienten den Homocysteinspiegel bestimmen. Für die jeweiligen Polymorphismen konnte kein Zusammenhang mit dem Homocysteinspiegel nachgewiesen werden. Ebenso gab es keine Unterschiede hinsichtlich des Folsäurespiegels. Dies könnte daran liegen das Deutschland kein Folsäuremangelgebiet ist. Daher würden Veränderungen im Stoffwechsel des Folates vermutlich für eine gewisse Zeit durch eine erhöhte Absorption kompensiert.

## 6.2. Glutamatcarboxypeptidase-C1561T-Polymorphismus

Im Vergleich zum MTHFR-C677T-Polymorphismus ist der GCP-C1561T-Polymorphismus bisher sehr wenig untersucht worden. Die Häufigkeit im Gesamtkollektiv betrug ca. 10% für den heterozygoten 1561CT-Genotyp. Damit tritt der GCP-C1561T-Polymorphismus etwas seltener als der MTHFR-C677T-Polymorphismus auf. Im Gegensatz zu anderen Studien fanden sich bei unseren Untersuchungen keine homozygoten Varianten. Im Framingham-Kollektiv wurden ca. 1200 Personen auf den Polymorphismus untersucht, dort betrug die Häufigkeit des 1561CT-Genotyps 9.9% und die Häufigkeit des homozygoten 1561TT-Genotyps 0.5% [46]. Daher besteht die Wahrscheinlichkeit, dass in einem größeren Kollektiv auch in unserer geographischen Region homozygote Varianten gefunden werden können. Devlin et al. konnten bei ihrer Erstbeschreibung eine niedrigere Folsäurekonzentration und höhere Homocysteinwerte im Serum ihres Kollektivs nachweisen, welches aber nur 75 Probanden umfasste. Dem entgegen steht die Studie von Vargas-Martinez et al. [46]. Sie fand bei männlichen Trägern der heterozygoten Mutation sogar höhere Plasmaspiegel an Folsäure als beim Wildtyp, bei Frauen konnte kein Zusammenhang zwischen der Mutation und dem Folsäurestatus nachgewiesen werden. Drogan et al. fanden in ihrer Untersuchung eines deutschen Kollektivs mit mehr als 400 Personen keinerlei Einfluß des GCP-C1561T-Polymorphismus auf Plasmafolatkonzentration, Erythrozytenfolat-konzentration oder den Homocysteinspiegel [47]. In unserer Untersuchung zeigte sich ebenfalls kein Zusammenhang zwischen den Genotypen des GCP-C1561T-Polymorphismus und Folat ( $p=0,5$ ), Vitamin B12 ( $p=0,6$ ) oder Homocystein ( $p=0,3$ ). Ein möglicher Zusammenhang des GCP-II-Polymorphismus und der Entwicklung von Tumoren ist bisher nicht untersucht worden. Die wenigen vorliegenden Studien nach der Erstbeschreibung konzentrieren sich fast ausschliesslich auf den Einfluss des Polymorphismus auf den Folsäurespiegel bzw. Plasmahomocysteinspiegel [48,49,50]. Der GCP-C1561T-Polymorphismus tritt in einem Gen auf, das sehr früh in die Verarbeitung von Folat im Körper eingreift. Daher wäre zu erwarten, dass Veränderungen des Gens einen erheblichen Einfluss auf den gesamten Folatstoffwechsel haben. Nach unseren Ergebnissen ist dies nicht der Fall. Der GCP-C1561T-Polymorphismus ist im Tumorkollektiv nicht häufiger vertreten als bei den gesunden Kontrollen ( $p=0,85$ ). Möglicherweise besitzt der Genpolymorphismus eine geringere Bedeutung als zu Studienbeginn vermutet. Auch in der Kombination mit dem



MTHFR-C677T-Polymorphismus konnte keine erhöhte Tumorfrequenz gefunden werden. Die bisherigen Studien zeigten einen Einfluss auf die Folatkonzentration und den Homocysteinspiegel [46,48,27], was unsere Ergebnisse nicht bestätigen können. Der GCP-C1561T-Polymorphismus könnte ein Risikofaktor für die Entwicklung anderer Tumore als das Magenkarzinom sein. Hierzu sollten Studien an deutlich größeren Kollektiven durchgeführt werden da der homozygote Genotyp sehr selten auftritt.

### 6.3. RFC-G80A-Polymorphismus

Auch der RFC-G80A-Polymorphismus ist als Risikofaktor für Tumore in Studien noch nicht oft analysiert worden. In unseren untersuchten Kollektiven betrug die Häufigkeit des homozygoten 80AA-Genotyps ca. 21%. Dabei unterschieden sich die Karzinomgruppe und die Kontrollgruppe in der Häufigkeit des Polymorphismus nicht voneinander ( $p=0,45$ ). Aus den USA vorliegende Studiendaten zeigen eine Häufigkeit von ca. 30% für den homozygoten Genotyp [51]. Damit tritt der RFC-G80A-Polymorphismus – wie auch der GCP-C1561T-Polymorphismus – in unserem Kollektiv seltener auf als in anderen geographischen Regionen. Bisherige Studien analysierten den Polymorphismus vor allem im Zusammenhang mit der Effektivität von Chemotherapien mit Methotrexat oder Grundlagen seiner Entstehung. Studiendaten hinsichtlich eines erhöhten Karzinomrisikos liegen bisher nicht vor. In unseren Ergebnissen zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der Aufteilung des Karzinomkollektivs nach der Tumorlokalisation. Bei Patienten mit den Genotypen 80GA und 80AA zeigt sich häufiger eine Tumorlokalisation im distalen Magen ( $p=0,03$ ). Es ist bekannt, dass die Inzidenz von Magentumoren in der Cardiaregion ansteigt. Hingegen sinkt die Inzidenz für das Magenkarzinom insgesamt. Desweiteren zeigte sich in den Ergebnissen, dass die Genotypvarianten 80GA und 80AA häufiger mit einem geringeren Differenzierungsgrad assoziiert sind und damit eine allgemein schlechtere Prognose aufweisen. Allerdings muss gesagt werden, dass dieses Ergebnis eher als ein Trend zu verstehen ist. Diese Ergebnisse müssen aufgrund der relativ geringen Fallzahl erst noch in einem größeren Kollektiv validiert werden.

### 6.4. Kombiniertes Vergleich der Polymorphismen

Aufgrund ihrer physiologischen Bedeutung im Folsäurestoffwechsel betreffen Veränderungen der unterschiedlichen Enzyme gleichzeitig den gesamten Regelkreis. Daher wurde auch untersucht, ob die Kombination bestimmter Genotypen der einzelnen

Polymorphismen gehäuft im Tumorkollektiv auftreten oder nicht. Eine derartige Untersuchung ist bisher noch nicht publiziert worden, deswegen gibt es keine Vergleichsergebnisse. Bei der Analyse RFC-G80A vs. MTHFR-C677T ( $p=0,48$ ) kommen die mutierten Genotypen von MTHFR-C677T nicht gehäuft mit einem der RFC-G80A-Genotypen vor. Bei der Analyse GCP-C1561T vs. RFC-G80A ergab der Chi-Quadrat-Test einen p-Wert von 0,47 und damit sind beide Polymorphismen ebenfalls unabhängig voneinander. Zu dem gleichen Ergebnis kommt die Analyse MTHFR-C677T vs. GCP-C1561T. Hier ergab der Chi-Quadrat-Test einen p-Wert von 0,43 und somit erneut keinen signifikanten Zusammenhang. Nach diesen Ergebnissen besteht im untersuchten Kollektiv keinerlei Zusammenhang zwischen den drei Polymorphismen. Sie treten unabhängig voneinander auf.

Beide Kollektive unterschieden sich nicht hinsichtlich der Infektionshäufigkeit von *Helicobacter pylori*. In keinem Fall war ein Polymorphismus mit *Helicobacter*-Infektion assoziiert. Ebenso bestand kein Unterschied bei der Folat- und Vitamin B12-Konzentration. Für Homocystein konnte eine signifikante Erhöhung im Tumorkollektiv nachgewiesen werden. Interessanterweise trat der Genotyp 677CT des MTHFR-C677T-Polymorphismus häufiger bei Nichtrauchern auf, ebenso der 80AA-Genotyp des RFC-G80A-Polymorphismus. Sollten sich diese Beobachtungen in größeren Studien bestätigen, so weist dieses Ergebnis möglicherweise auf biologische Unterschiede in der Karzinogenese bei Nichtrauchern und Rauchern hin.

Bei der Betrachtung der Limitationen dieser Studie muss man zunächst die geringe Fallzahl nennen. Möglicherweise könnten in einem größeren Kollektiv auch Personen mit dem homozygoten 1561TT-Genotyp identifiziert werden. Desweiteren handelt es sich bei unserer Studie um eine retrospektive Untersuchung. Die Nachteile dieses Designs liegen in der begrenzten Verfügbarkeit von vollständigen Patientendaten sowie einer ausreichenden Versorgung mit analysefähigem Gewebe- und Serummaterial. Aufgrund des retrospektiven Charakters wurde die Angleichung der Karzinom- und Kontrollgruppe ebenfalls nach dem Aquirieren der Patientendaten bzw. des Materials vorgenommen. Hierbei war eine vollständige Angleichung, konkret in den Bereichen Alter und Geschlecht, nicht möglich. Darüber hinaus war es nicht möglich von allen Karzinompatienten verwertbare Daten über den Folat-, Vitamin B12- und Homocysteinstatus zu erheben. Zusammengefasst können diese Daten keinen neuen

Zusammenhang zwischen Polymorphismen von Genen im Folatstoffwechsel und der Entstehung von Magenkarzinomen nachweisen, wenngleich ein Zusammenhang des RFC-G80A-Polymorphismus mit der Lokalisation im distalen Magen und der histologischen Entdifferenzierung in einem größeren Kollektiv untersucht werden sollte.

## 7. Zusammenfassung

In Deutschland erkranken jährlich ca. 20000 Menschen an einem Magenkarzinom. Die grundlegenden Mechanismen der Entstehung des Magenkarzinoms sind noch weitestgehend unklar. Zahlreiche Untersuchungen belegen eine Rolle von Folaten bei der Tumorentstehung. Es war das Ziel dieser Arbeit, zu untersuchen, ob sich die Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten des Methylentetrahydrofolatreduktase-C677T-Polymorphismus, des Glutamatcarboxypeptidase-C1561T-Polymorphismus und des Reduced Folate Carrier-G80A-Polymorphismus bei Magenkarzinompatienten von einem gesunden Kontrollkollektiv unterscheiden. Dazu wurden die Polymorphismen dieser Gene in der DNA von 106 Patienten mit klinisch nachgewiesenem Magenkarzinom untersucht und mit einer gleich großen gesunden Kontrollgruppe verglichen. Es konnte kein Unterschied zwischen Tumor- und Kontrollkollektiv bezüglich der Häufigkeit der Polymorphismen nachgewiesen werden. In der Subgruppenanalyse zeigte sich jedoch, dass der RFC-G80A-Polymorphismus häufiger mit Karzinomen im distalen Magen und einem niedrigerem Grad der Tumordifferenzierung assoziiert war. Zudem zeigte diese Untersuchung, dass in einem gesunden Kontrollkollektiv der MTHFR-C677T-Polymorphismus (677CT) und der RFC-G80A-Polymorphismus (80AA) bevorzugt bei Nichtrauchern nachweisbar war. Es bestand jedoch trotz der verschiedenen Polymorphismen kein Unterschied bei der Folat- und Vitamin B12-Konzentration zwischen den Kollektiven. Für Homocystein konnte eine signifikante Erhöhung im Tumorkollektiv verglichen zum Kontrollkollektiv nachgewiesen werden, die jedoch ebenfalls unabhängig von den Polymorphismen auftrat. Insgesamt ergab diese Untersuchung keinen neuen Zusammenhang zwischen Polymorphismen von Genen im Folatstoffwechsel und der Entstehung von Magenkarzinomen, wenngleich ein Zusammenhang des RFC-G80A-Polymorphismus mit der Tumorlokalisierung im distalen Magen und der histologischen Entdifferenzierung in einem größeren Kollektiv untersucht werden sollte.

## 8. Literaturverzeichnis

- 1 Steward, B.W.: WHO: World Cancer Report 2003. pp. 194-195 (2004) IARC Press. Lyon 2003.
- 2 Fuchs, C.S., Mayer, R.: Gastric Carcinoma – Medical Progress. N. Engl. J. Med. 32 (1995)
- 3 Malfertheiner, P., Sipponen, P., Naumann, M., Moayyedi, P., Megraud, F., Xiao, S.D., Sugano, K., Nyren, O.: Lejondal H.pylori-Gastric Cancer Task Force: Helicobacter pylori eradication has the potential to prevent gastric cancer: a state-of-the-art critique. Am. J. Gastroenterol. 100. 2100-2115 (2005)
- 4 Zhu, S., Mason, J., Shi, Y., Hu, Y., Li, R., Wahg, M., Zhou, Y., Jin, G., Xie, Y., Wu, G., Xia, D., Qian, Z., Sohng, H., Zhang, L., Russell, R., Xiao, S.: The effect of folic acid on the development of stomach and other gastrointestinal cancers. Chin. Med. J. 116. 15-19 (2003)
- 5 Tsugane, S.: Salt, salted food intake, and risk of gastric cancer: epidemiologic evidence. Cancer Sci. 96. 1-6 (2005)
- 6 Shina, V.Y., Liua, E. S. L., Yea, Y., Kooa, M. W. L., Chub, K.-M., Choa, C.-H.: A mechanistic study of cigarette smoke and cyclooxygenase-2 on proliferation of gastric cancer cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 195. 103-112 (2004)
- 7 Correa, P.: A human model of gastric carcinogenesis. Cancer Res. 48. 3554-3560 (1988)
- 8 Rocha, G.A., Guerra, J.B., Rocha, A.M., Saraiva, I.E., da Silva, D.A., de Oliveira, C.A., Queiroz, D.M.: IL1RN polymorphic gene and cagA-positive status independently increase the risk of noncardia gastric carcinoma. Int. J. Canc. 115. 678-683 (2005)
- 9 Pollock, R.E., Doroshow, J.H., Khayat, D., Nakao, A., O'Sullivan, B.: UICC Manual of Clinical Oncology. John Wiley & Sons. New Jersey 2005.
- 10 Waldeyer, A., Mayet, A.: Anatomie des Menschen. Band 1. pp. 271-272. Walter de Gruyter. New York 1993.

- 11 Becker, K., Böttcher, K., Bumm, R., Dittler, H.J., Fink, U., Janetschek, P., Krämling, H.J., Roder, J.D., Sander, R., Weber, B.: Gastrointestinale Tumorempfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge. Tumorzentrum München (1997)
- 12 Takahashi, Y.: Gastrointestinal Cancer. *Gan To Kagaku Ryoho*. 31. 1275-1279 (2004)
- 13 Sendler, A., Nekarda, H., Böttcher, K., Fink, U., Siewert, J.R.: Prognosefaktoren beim Magenkarzinom. *Dtsch. med. Wschr.* 122. 794-800 (1997)
- 14 Heinz, J., Dierkes, J.: Die Bedeutung von Folsäure für die Gesundheit in verschiedenen Lebensphasen. *Ernährung & Medizin*. 19. 141-146 (2004)
- 15 Sierra, E.E., Goldman, I.D.: Recent advances in the understanding of the mechanism of membrane transport of folates and antifolates. *Semin. Oncol.* 2. 11-23 (1999)
- 16 Giovannucci, E., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Rimm, E.B., Trichopoulos, D., Rosner, B.A., Speizer, F.E., Willett, W.C.: Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 85. 875-884 (1993)
- 17 Fowler, B.: The folate cycle and disease in humans. *Kidney Int. Suppl.* 78. 221-229 (2001)
- 18 Shunshi, Z., Mason, J., Yao, S., Yunbiao, H., Rongrong, L., Min, W., Guanqiu, J., Yuye, X., Guiquan, W., Dehuang, X., Zhenhua, Q., Hailian, S., Baiqiang, T., Lidong, Z., Russell, R., Shudong, X.: The effect of folic acid on the development of stomach and other gastrointestinal cancers. *Chin. Med. J.* 116. 15-19 (2003)
- 19 Frosst, P., Blom, H.J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C.A., Matthews, R.G., Boers, G.J., den Heijer, M., Kluijtmans, L.A., van den Heuvel, L.P.: A candidate genetic risk factor for vaskular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Gen.* 10. 111-113 (1995)

- 20 Alfthan, G., Laurinen, M.S., Valsta, L.M., Pastinen, T., Aro, A.: Folate intake, plasma folate and homocysteine status in a random Finnish population. *Eur. J. Clin. Nutr.* 57. 81-88 (2003)
- 21 Chango, A., Potier De Courcy, G., Boisson, F., Guillard, J.C., Barbe, F., Perrin, M.O., Christides, J.P., Rabhi, K., Pfister, M., Galan, P., Hercberg, S., Nicolas, J.P.: 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase common mutations, folate status and plasma homocysteine in healthy French adults of the Supplementation en Vitamines et Mineraux Antioxydants (SU.VI.MAX) cohort. *Br. J. Nutr.* 84. 891-896 (2000)
- 22 Gao, C.M., Lu, J.W., Toshiro, T., Wu, J.Z., Cao, H.X., Chen, H.Q., Feng, J.F., Kazuo, T.: Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and sensitivity of stomach cancer to fluoropyrimidine-based chemotherapy. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi.* 25. 1054-1058 (2004)
- 23 Zhang, J., Zotz, R.B., Li, Y., Wang, R., Kiel, S., Schulz, W.A., Wen, D., Chen, Z., Zhang, L., Wang, S., Gabbert, H.E., Sarbia, M.: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism and predisposition towards esophageal squamous cell carcinoma in a German Caucasian and a northern Chinese population. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 130. 574-580 (2004)
- 24 Maraj, B.H., Leek, J.P., Karayi, M., Ali, M., Lench, N.J., Markham, A.F.: Detailed genetic mapping around a putative prostate-specific membrane antigen locus on human chromosome 11p11.2. *Cytogenet. Cell Genet.* 81. 3-9 (1998)
- 25 Devlin, A.M., Ling, E.H., Peerson, J.M., Fernando, S., Clarke, R., Smith, A.D., Halsted, C.H.: Glutamate carboxypeptidase II: a polymorphism associated with lower levels of serum folate and hyperhomocysteinemia. *Hum. Mol. Gen.* 19. 2837-2844 (2000)
- 26 Chango, A., Emery-Fillon, N., de Courcy, G.P., Lambert, D., Pfister, M., Rosenblatt, D.S., Nicolas, J.P.: A Polymorphism (80G->A) in the Reduced Folate Carrier Gene and Its Associations with Folate Status and Homocysteinemia. *Mol. Genet. Metab.* 70. 310-315 (2000)
- 27 Fodinger, M., Dierkes, J., Skoupy, S., Rohrer, C., Hagen, W., Puttinger, H., Hauser, A.C., Vychytil, A., Sunder-Plassmann, G.: Effect of Glutamate Carboxypeptidase II and Reduced Folate Carrier Polymorphisms on Folate and Total Homocysteine Concentrations in Dialysis Patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14. 1314-1319 (2003)

- 28 Ma, D.W., Finnell, R.H., Davidson, L.A., Callaway, E.S., Spiegelstein, O., Piedrahita, J.A., Salbaum, J.M., Kappen, C., Weeks, B.R., James, J., Bozinov, D., Lupton, J.R., Chapkin, R.S.: Folate transport gene inactivation in mice increases sensitivity to colon carcinogenesis. *Cancer Res.* 65. 887- 897 (2005)
- 29 Kluijtmans, L.A., van den Heuvel, L.P., Boers, G.H., Frosst, P., Stevens, E.M., van Oost, B.A., den Heijer, M., Trijbels, F.J., Rozen, R., Blom, H.J.: A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Am. J. Hum. Genet.* 58. 35-41 (1996)
- 30 Shen, H., Xu, Y., Zheng, Y., Qian, Y., Yu, R., Qin, Y., Wang, X., Spitz, M.R., Wei, Q.: Polymorphisms of 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase and risk of gastric cancer in a Chinese population: a case-control study. *Int. J. Cancer.* 95. 332-336 (2001)
- 31 Jones, P.A.: DNA Methylation Errors and Cancer. *Cancer Res.* 56. 2463-2467 (1996)
- 32 Scott, J.M., Weir, D.G.: The methyl folate trap. *Lancet.* iii. 337-340 (1981)
- 33 Shen, H., Newmann, A.S., Hu, Z., Zhang, Z., Xu, Y., Wang, L., Hu, X., Guo, J., Wang, X., Wei, Q.: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms / haplotypes and risk of gastric cancer: a case-control analysis in China. *Oncol. Rep.* 13. 355-360 (2005)
- 34 Graziano, F., Kawakami, K., Ruzzo, A., Watanabe, G., Santini, D., Pizzagalli, F., Bissoni, R., Mari, D., Floriani, I., Catalano, V., Silva, R., Tonini, G., Torri, V., Giustini, L., Magnani, M.: Methylenetetrahydrofolate reductase 677C/T gene polymorphism, gastric cancer susceptibility and genomic DNA hypomethylation in an at-risk Italian population. *Int. J. Cancer.* 118. 628- 632 (2006)
- 35 Kim, D.H., Ahn, Yo., Lee, B.H., Tsuji, E., Kiyohara, C., Kono, S.: Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, alcohol intake, and risks of colon and rectal cancers in Korea. *Cancer Lett.* 216. 199-205 (2004)
- 36 Lin, J., Spitz, M.R., Wang, Y., Schabath, M.B., Gorlov, I.P., Hernandez, L.M., Pillow, P.C., Grossman, H.B., Wu, X.: Polymorphisms of folate metabolic genes and susceptibility to bladder cancer: a case-control study. *Carcinogenesis.* 25. 1639-1647 (2004)



- 37 Sull, J.W., Jee, S.H., Yi, S., Lee, J.E., Park, J.S., Kim, S., Ohrr, H.: The effect of methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism C677T on cervical cancer in Korean women. *Gynecol. Oncol.* 95. 557-563 (2004)
- 38 Ulvik, A., Vollset, S.E., Hansen, S., Gislefoss, R., Jellum, E., Ueland, P.M.: Colorectal cancer and the methylenetetrahydrofolate reductase 677C -> T and methionine synthase 2756A -> G polymorphisms: a study of 2,168 case-control pairs from the JANUS cohort. *Cancer Epidemiol. Biomarkers.* 13. 2175-2180 (2004)
- 39 Yin, G., Kono, S., Toyomura, K., Hagiwara, T., Nagano, J., Mizoue, T., Mibu, R., Tanaka, M., Kakeji, Y., Maehara, Y., Okamura, T., Ikejiri, K., Futami, K., Yasunami, Y., Maekawa, T., Takenaka, K., Ichimiya, H., Imaizumi, N.: Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. *Cancer Sci.* 95. 908-913 (2004)
- 40 Ma, J., Stampfer, M.J., Giovannucci, E., Artigas, C., Hunter, D.J., Fuchs, C., Willett, W.C., Selhub, J., Hennekens, C.H., Rozen, R.: Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphism, Dietary Interactions, and Risk of Colorectal Cancer. *Canc. Res.* 57. 1098-1102 (1997)
- 41 Henao, O.L., Piyathilake, C.J., Waterbor, J.W., Funkhouser, E., Johanning, G.L., Heimbürger, D.C., Partridge, E.E.: Women with polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) and methionine synthase (MS) are less likely to have cervical intraepithelial neoplasia (CIN) 2 or 3. *Int. J. Cancer.* 113. 991-997 (2005)
- 42 Yang, C.X., Matsuo, K., Ito, H., Shinoda, M., Hatooka, S., Hirose, K., Wakai, K., Saito, T., Suzuki, T., Maeda, T., Tajima, K.: Gene-environment interactions between alcohol drinking and the MTHFR C677T polymorphism impact on esophageal cancer risk: results of a case-control study in Japan. *Carcinogenesis.* 26. 1285-1290 (2005)
- 43 Klerk, M., Verhoef, P., Clarke, R., Blom, H.J., Kok, F.J., Schouten, E.G.: MTHFR 677C-->T polymorphism and risk of coronary heart disease: a meta-analysis. *JAMA.* 288. 2023-2031 (2002)
- 44 de Bree, A., Verschuren, W.M., Bjorke-Monsen, A.L., van der Put, N.M., Heil, S.G., Trijbels, F.J., Blom, H.J.: Effect of the methylenetetrahydrofolate reductase 677C-->T mutation on the relations among folate intake and plasma folate and homocysteine concentrations in a general population sample. *Am. J. Clin. Nutr.* 77. 687-693 (2003)

- 45 Dierkes, J., Jeckel, A., Ambrosch, A., Westphal, S., Luley, C., Boeing, H.: Factors explaining the difference of total homocysteine between men and women in the European Investigation Into Cancer and Nutrition Potsdam study. *Metabolism*. 50. 640-645 (2001)
- 46 Vargas-Martinez, C., Ordovas, J.M., Wilson, P.W., Selhub, J.: The Glutamate Carboxypeptidase Gene II (C>T) Polymorphism Does Not Affect Folate Status in The Framingham Offspring Cohort. *J. Nutr.* 132. 1176-1179 (2002)
- 47 Drogan, D., Klipstein-Grobusch, K., Wans, S., Luley, C., Boeing, H., Dierkes, J.: Plasma folate as marker of folate status in epidemiological studies: the European Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Potsdam study. *Br. J. Nutr.* 92. 489-496 (2004)
- 48 Winkelmayr, W.C., Eberle, C., Sunder-Plassmann, G., Fodinger, M.: Effects of the glutamate carboxypeptidase II (GCP2 1561C>T) and reduced folate carrier (RFC1 80G>A) allelic variants on folate and total homocysteine levels in kidney transplant patients. *Kidney Int.* 63. 2280-2285 (2003)
- 49 Afman, L.A., Trijbels, F.J.M., Blom, H.: The H475Y Polymorphism in the Glutamate Carboxypeptidase II Gene Increases Plasma Folate without Affecting the Risk for Neural Tube Defects in Humans. *J. Nutr.* 133. 75-77 (2003)
- 50 Lievers, K.J., Kluijtmans, L.A., Boers, G.H., Verhoef, P., den Heijer, M., Trijbels, F.J., Blom, H.J.: Influence of a glutamate carboxypeptidase II (GCPII) polymorphism (1561C>T) on plasma homocysteine, folate and vitamin B12 levels and its relationship to cardiovascular disease risk. *Atheroscler.* 164. 269-273 (2002)
- 51 Yang, R., Sowers, R., Mazza, B., Healey, J.H., Huvos, A., Grier, H., Bernstein M., Beardsley, G.P., Krailo, M.D., Devidas, M., Bertino, J.R., Meyers, P.A., Gorlick, R.: Sequence alterations in the reduced folate carrier are observed in osteosarcoma tumor samples. *Clin. Cancer Res.* 9. 837-844 (2003)

## Danksagung

Herrn Prof. Dr. P. Malfertheiner, Direktor der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit durchführen zu können. Herrn PD Dr. M. Ebert danke ich für die Betreuung der Arbeit. Ihm gilt mein besonderer Dank, nicht nur für die Möglichkeit diese Arbeit zu verfassen, sondern auch für seine Geduld, seine wertvollen fachlichen Ratschläge und die beständige Hilfsbereitschaft zu jedem Zeitpunkt der Promotion. Frau PD Dr. J. Dierkes danke ich für ihre Unterstützung, nicht nur bei der praktischen Durchführung und bei der Bereitstellung des Kontrollkollektivs, sondern vor allem für ihre Bereitschaft zur Diskussion und ihren unermüdlichen Einsatz bei der Erstellung und der Verbesserung der Arbeit. Dr. F.-W. Röhl danke ich für seine wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung. Frau I. Bierwirth danke ich für die Hilfe bei der DNA-Extraktion und die Einarbeitung in alle Labortätigkeiten. Frau E. Hinze danke ich für ihre Hilfe bei der Genotypisierung der Polymorphismen. Herrn S. Wans danke ich für seine Hilfe bei der Darstellung des dHPLC-Verfahrens. Dr. K. Schüttler danke ich für ihre Hilfe bei der Datenstrukturierung und statistischen Aufarbeitung. Dr. J. Hoffmann danke ich für ihre Unterstützung bei der Niederschrift der Promotion. Dr. T. Wex danke ich für seine Hilfe bei der *Helicobacter pylori*-Serologie. Frau U. Stolz danke ich für ihre freundliche Hilfe bei der Durchführung der *Helicobacter pylori*-Serologie. Meiner Familie, vor allem meinen Eltern, danke ich für ihre Unterstützung und ihr Verständnis.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

### **"Polymorphismen in Genen des Folatstoffwechsels als Risikofaktoren für die Entstehung von Magenkarzinomen"**

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie mit Unterstützung durch PD Dr. med. M. Ebert & PD Dr. oec. troph. J. Dierkes ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht.

Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den 02.01.2006

Tobias Götze

## Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Tobias Götze
Geburtsdatum	11.09.1979
Geburtsort	Magdeburg
Familienstand	ledig

### Schulbildung

1986-1987	Otto-Grotewohl-Schule Magdeburg
1987-1991	Hans-Reichel-Schule Magdeburg
1991-1998	Geschwister-Scholl-Gymnasium Magdeburg

### Studium

1999-2005	Humanmedizin, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
2002	Beginn der Promotion
2004-2005	Praktisches Jahr:  1. Tertial: Chirurgie, Universitätsklinik Magdeburg 2. Tertial: Urologie, Universitätsklinik Magdeburg 3. Tertial: Innere Medizin, Universitätsklinik Magdeburg
November 2005	Approbation

Tobias Götze

## Veröffentlichungen

- 1 Götze, T., Schütte, K., Röcken, C., Malfertheiner, P., Ebert, M.P.: Recent developments in chemotherapy of advanced gastric cancer. Dig. Dis. 22. 360-365 (2004)
- 2 Chen, J., Röcken, C., Klein-Hitpass, L., Götze, T., Leodolter, A., Malfertheiner, P., Ebert, M.P.: Microarray analysis of gene expression in metastatic gastric cancer cells after incubation with the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. Clin. Exp. Metastasis. 21. 389-397 ( 2004)
- 3 Chen, J., Kahne, T., Röcken, C., Götze, T., Yu, J., Sung, J.J., Chen, M., Hu, P., Malfertheiner, P., Ebert, M.P.: Proteome analysis of gastric cancer metastasis by two-dimensional gel electrophoresis and matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry for identification of metastasis-related proteins. J. Proteome Res. 3. 1009-1016 (2004)
- 4 Vorstellung der Arbeit auf dem 6. Europäischen Bridging Meeting der Europäischen Gesellschaft für Gastroenterologie in Kaunas, Litauen, November 2004