

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

**Einfluss von Polymorphismen im *IL 1B*-Gen und *IL 1 RN*-Gen,  
sowie der assoziierten Haplotypen auf die Entwicklung von  
Magenkarzinomen und deren prämaligen Konditionen**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von	Carolin Nestler, geb. Albrecht
geboren in	Stendal (jetzt Hansestadt Stendal)
Norderstedt	2014

## **Bibliographische Beschreibung**

Carolin Nestler:

Einfluss von Polymorphismen im *IL 1B*-Gen und *IL 1 RN*-Gen, sowie der assoziierten Haplotypen auf die Entwicklung von Magenkarzinomen und deren prämaligen Konditionen.

- 2014, 98 Seiten, 25 Abbildungen, 9 Tabellen, 5 Anhänge

### Kurzreferat

Bei Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism; SNP) handelt es sich um Variationen einzelner Basenpaare eines DNA-Stranges. Als Risikofaktor für die Magenkarzinomentstehung sind vor allem SNP an vier Genloci der Promotorregion des *IL 1B*-Gens (-3737, -1464, -511 und -31) im Einzelnen, als auch in Kombination von Interesse, da sie mit hoher Frequenz in der Bevölkerung zu finden sind. Es wurde die Assoziation zwischen diesen SNPs, zugehöriger Haplotypen und Haplotypenpaare und der Magenkarzinomentstehung analysiert. Die variable Anzahl von „tandem repeats“ (VNTR) im *IL 1* Rezeptorantagonist-Gen (*IL 1 RN*-Gen) wurde ebenfalls ermittelt, da auch *IL 1 RN*\*2 (Allel 2 des *IL 1 RN*-Gens) eine Vergesellschaftung mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko zugesprochen wird. Die SNP und die Haplotypenkonfiguration von 116 Magenkarzinompatienten wurde mit denen von 142 Patienten mit einer Risikogastritis, 81 Verwandten ersten Grades von Magenkarzinompatienten und 94 magengesunden Kontrollen verglichen. Mittels Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) und Massenspektrometrie wurden die Genotypen der genannten Regionen bestimmt. Zur Beurteilung der Assoziation von SNP zu bestimmten Tumorcharakteristika oder einer Begleitentzündung wurden endoskopisch gewonnene Proben der Karzinompatienten histologisch beurteilt.

Keiner der untersuchten SNP war signifikant mit dem Vorliegen eines Magenkarzinoms oder prämaligener Läsionen vergesellschaftet. Auch unter den Haplotypen oder Haplotypenpaarkonfigurationen fand sich keine, die mit der Magenkarzinomentstehung oder der Entwicklung prämaligener Veränderungen der Magenmukosa assoziiert war. Eine Assoziation zwischen SNP und der Ausbildung bestimmter Tumorcharakteristika bei den Karzinompatienten konnte ebenfalls nicht belegt werden. Einzig im Vergleich der Karzinompatienten mit und ohne intestinale Metaplasie wurden signifikante Unterschiede nachgewiesen. Tumorpatienten, bei denen durch die histologische Beurteilung eine intestinale Metaplasie aufgezeigt wurde, waren im Vergleich zu Patienten ohne Nachweis einer intestinalen Metaplasie signifikant häufiger Träger des Genotyps *IL 1B* -3737 C/T und auch deren Haplotypenkonfiguration unterschied sich deutlich von Patienten, bei denen keine intestinale Metaplasie nachgewiesen wurde. Eine intestinale Metaplasie war bei Karzinompatienten signifikant mit dem häufigeren Vorliegen des Haplotyps 3 assoziiert. Diese Zusammenhänge konnten bisher durch keine weitere veröffentlichte Studie gestützt

werden. Ein Einfluss auf die Ausbildung einer intestinalen Metaplasie durch Interleukinpolymorphismen bei Karzinompatienten ist jedoch denkbar.

**Schlüsselwörter:**

SNP des *IL 1B*-Gens, VNTR des *IL 1 RN*-Gens, Magenkarzinom, Tumorcharakteristika, Haplotypen, Haplotypenpaare

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung .....	1
1.1 Epidemiologie und Einteilungen des Magenkarzinoms .....	1
1.2 Ätiologie des Magenkarzinoms .....	3
1.2.1 Wirtsfaktoren .....	3
1.2.2 Umweltfaktoren .....	3
1.2.3 <i>Helicobacter pylori</i> .....	4
1.3 <i>H. pylori</i> und das Magenkarzinom .....	4
1.4 <i>H. pylori</i> und die gastrale Entzündung .....	6
1.5 Zytokine .....	7
1.5.1 Definitionen .....	8
1.5.2 <i>IL 1<math>\beta</math></i> .....	9
1.5.2.1 Allgemeine Wirkung von <i>IL 1<math>\beta</math></i> .....	9
1.5.2.2 Wirkung von <i>IL 1<math>\beta</math></i> auf die gastrale Mukosa .....	10
1.5.3 <i>IL 1</i> Rezeptorantagonist .....	11
1.6 <i>H. pylori</i> und <i>IL 1<math>\beta</math></i> .....	12
1.7 Zytokinpolymorphismen .....	13
1.7.1 Begriffsklärung .....	13
1.7.2 Polymorphismen im <i>IL 1B</i> - und <i>IL 1 RN</i> -Gen .....	14
1.7.3 Haplotypen .....	16
1.7.4 Haplotypenpaare .....	18
1.8 Zielsetzung der Arbeit .....	18
2. Material und Methoden .....	19
2.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppen .....	19
2.2 Endoskopie .....	20
2.3 Histologische Charakterisierung von Patienten mit Magenkarzinom und Risikogastritis .....	20
2.4 Ermittlung des <i>H. pylori</i> -Status .....	21
2.4.1 Ermittlung der Anti- <i>H. pylori</i> -IgG .....	21
2.4.2 Ermittlung des <i>CagA</i> -Status .....	22

2.5 DNA-Isolierung.....	22
2.6 Polymerasekettenreaktion zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte.....	23
2.7 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus zur Analyse der Polymorphismen an Position <i>IL1B</i> -3737 und-1464.....	24
2.7.1 Polymorphismen an Position <i>IL 1B</i> -3737 .....	24
2.7.2 Polymorphismen an Position <i>IL 1B</i> -1464 .....	25
2.7.3 Gelelektrophorese.....	26
2.8 Analyse des <i>IL 1B</i> -Gens an Position -511 und -31 .....	27
2.9 Bestimmung der Allele im <i>IL 1 RN</i> -Gen.....	27
2.10 Einteilung der Haplotypen .....	28
2.11 Einteilung der Haplotypenpaare .....	28
2.12 Statistische Auswertung .....	29
2.13 Eigenanteil der experimentellen Arbeiten .....	29
3. Ergebnisse .....	31
3.1 Demographische Daten der Patientengruppen .....	31
3.2 Untersuchung der <i>IL 1β</i> -Polymorphismen .....	32
3.3 Analyse des <i>IL 1</i> Rezeptorantagonist-Gens.....	35
3.4 Analyse der Haplotypen .....	36
3.4.1 Haplotypenanalyse allgemein.....	36
3.4.2 Haplotypenpaare.....	39
3.5 Vergleich histologischer Typen des Magenkarzinoms .....	40
3.5.1 Demographische Daten der Magenkarzinompatienten .....	40
3.5.2 Polymorphismen bei Karzinompatienten .....	41
3.5.3 Haplotypen bei Karzinompatienten in Abhängigkeit tumorspezifischer Charakteristika .....	467
3.5.4 Haplotypenpaare bei Karzinompatienten .....	51
3.6. Logistisches Regressionsmodell.....	52
4. Diskussion .....	54
4.1 Allgemeine Anmerkungen .....	54
4.1.1 Unterschiede in den Kollektiven .....	54

4.1.2 <i>H. pylori</i> .....	54
4.1.3 Histologische Beurteilung .....	55
4.1.4 Polymorphismenanalyse.....	56
4.2 Polymorphismen im <i>IL 1B</i> - und <i>IL 1 RN</i> -Gen .....	57
4.2.1 Einfluss der Polymorphismen in der kaukasischen Bevölkerung .....	58
4.2.2 Unterschiedliche Vergleichsgruppen .....	60
4.3 Haplotypen .....	61
4.3.1 Haplotypen und deren Zusammenhang mit prämaligen Läsionen und dem Magenkarzinom .....	61
4.3.2 Haplotypen und <i>H. pylori</i> .....	63
4.4 Haplotypenpaare.....	63
4.4.1 Haplotypenpaare und <i>IL 1β</i> -Expression.....	63
4.4.2 Haplotypenpaare und Magenkarzinom .....	65
4.5 Histologie von Magenkarzinomen im Zusammenhang mit Polymorphismen im <i>IL 1B</i> - und <i>IL 1 RN</i> -Gen.....	66
4.5.1 Intestinale Metaplasie.....	66
4.6 Histologie von Magenkarzinomen im Zusammenhang mit Haplotypen und Haplotypenpaaren im <i>IL 1B</i> -Gen.....	67
4.6.1 Tumorcharakteristika.....	67
4.6.2 Intestinale Metaplasie.....	68
4.6.3 <i>H. pylori</i> .....	68
4.7 Schlussfolgerung und Blick in die Zukunft.....	68
5. Zusammenfassung .....	71
6. Literaturverzeichnis.....	73
7. Anhang .....	81
Danksagung .....	85
Ehrenerklärung .....	87
Lebenslauf .....	88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
BabA	Blutgruppen-Antigen-bindendes Adhesin
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CagA	Cytotoxisches Antigen A
CagPAI	Cag Pathogenitätsinsel
CDH1	Cadherin 1
CrP	C-reaktives Protein
CTP	Cytosintriphosphat
Da	Dalton
dd	Didesoxynukleosidphosphat
DNA	Desoxy-Ribonukleinsäure (englisch: Desoxy-Ribonucleic Acid)
ECL-Zellen	enterochromaffin-ähnliche (englisch: enterochromaffin like) Zellen
EIU	Enzym-Immunoheiten (englisch: enzyme immuno units)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
fw	forward (vorwärts) Primer
G	Differenzierungsgrad
G	Guanin
G-CSF	Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GTP	Guanosintriphosphat
G-Zelle	Gastrin produzierende Zelle
H	Haplotyp
<i>H. pylori</i>	Helicobacter pylori
HCL	Salzsäure
Hst Master Mix	HotStar Taq Master Mix
HUT	Harnstoff-Urease-Schnelltest
IARC	International Agency for Research on Cancer
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
<i>IL 1B</i>	Bezeichnung für das Interleukin <i>1B</i> -Gen
<i>IL 1β</i>	Bezeichnung für das dem <i>IL 1B</i> -Gen entsprechende Protein
<i>IL 1 RN</i>	Interleukin 1 Rezeptorantagonist
<i>IL 1 RN*2</i>	Allel 2 im <i>IL 1 RN</i> -Gen (im Intron 2)
IM	Intestinale Metaplasie
KI	Konfidenzintervall
L	lange Genotypen im Intron 2 des <i>IL 1 RN</i> -Gens
Loka	Lokalisation der primären Tumormasse bei Patienten mit Magenkarzinom
Magen-Ca	Magenkarzinom
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (messenger Ribonucleic Acid)
NFκB	Nuclear Factor κB
NO	Stickstoffmonoxid
ÖGD	Ösophago-Gastro-Duodenoskopie
OR	Odds Ratio (deutsch: Chancenverhältnis)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
Pos.	Position
RFLP	Restriktion-Fragment-Längen-Polymorphismus



RNA	Ribonukleinsäure (Ribonucleic Acid)
rw	reverse (rückwärts) Primer
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismus (englisch: single nucleotide polymorphism)
Standardabw	Standardabweichung
T	Tyrosin
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
TTP	Tyrosintriphosphat
U/min	Umdrehungen pro Minute
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin A
VNTR	variable Anzahl von „tandem repeats“ (englisch: variable number of tandem repeats)
vs.	versus
WHO	World Health Organisation

## 1. Einleitung

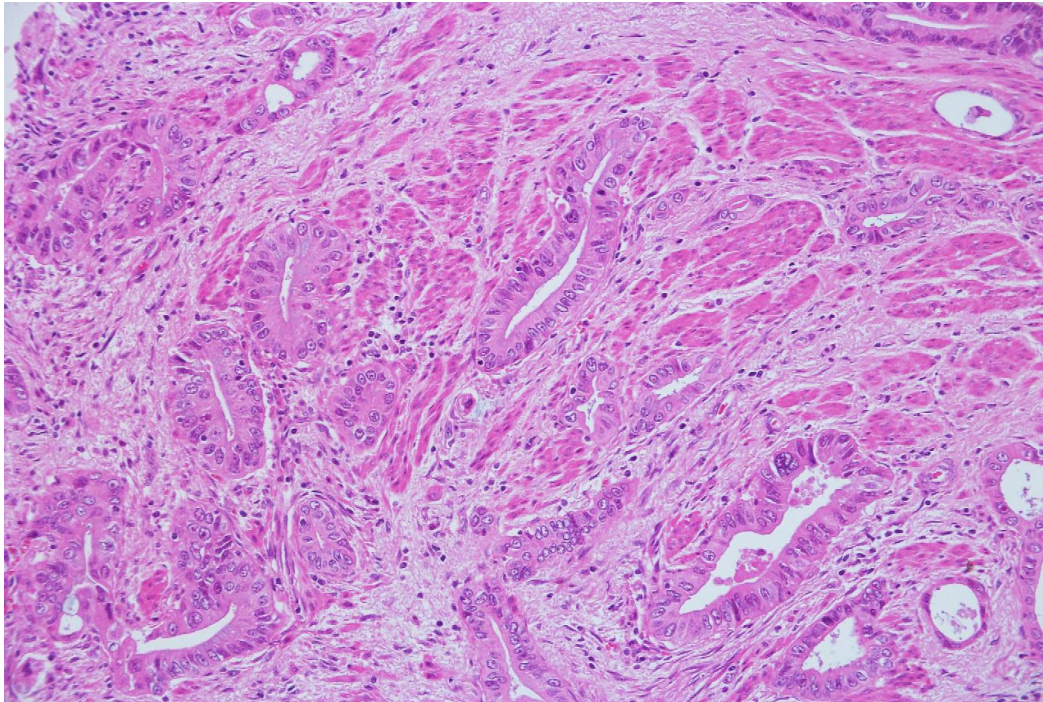
### 1.1 Epidemiologie und Einteilungen des Magenkarzinoms

Maligne Neoplasien des oberen Verdauungstraktes sind überwiegend Adenokarzinome des Magens oder des distalen Ösophagus und Plattenepithelkarzinome der Speiseröhre. Bei dem Magenkarzinom handelt es sich um den insgesamt vierthäufigsten malignen Tumor und die zweithäufigste tumorbedingte Todesursache weltweit [1, 3]. Bei Männern ist das Magenkarzinom eine häufigere krebsbedingte Todesursache als bei Frauen [2]. Jedoch zeigt sich regional eine erhebliche Varianz hinsichtlich Inzidenz und Prävalenz der Erkrankung. Zu den Regionen mit einer sehr hohen Prävalenz zählen vor allem ostasiatische Länder, zum Beispiel Japan, Korea und China [1, 3, 4]. In Deutschland steht das Magenkarzinom bezüglich der Neuerkrankungen an sechster Stelle bei Männern und an achter Stelle bei Frauen [5]. Das mittlere Erkrankungsalter zeigt geschlechtsspezifische Unterschiede und liegt bei Männern bei 70 Jahren, bei Frauen bei 76 Jahren. Insgesamt sank die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland wie auch in anderen Industrienationen in den letzten Jahrzehnten. Des Weiteren wurde eine Verschiebung der Verteilung von den in ihrer Häufigkeit rückläufigen distalen Magenkarzinomen zu proximalen Entitäten hin verzeichnet [6].

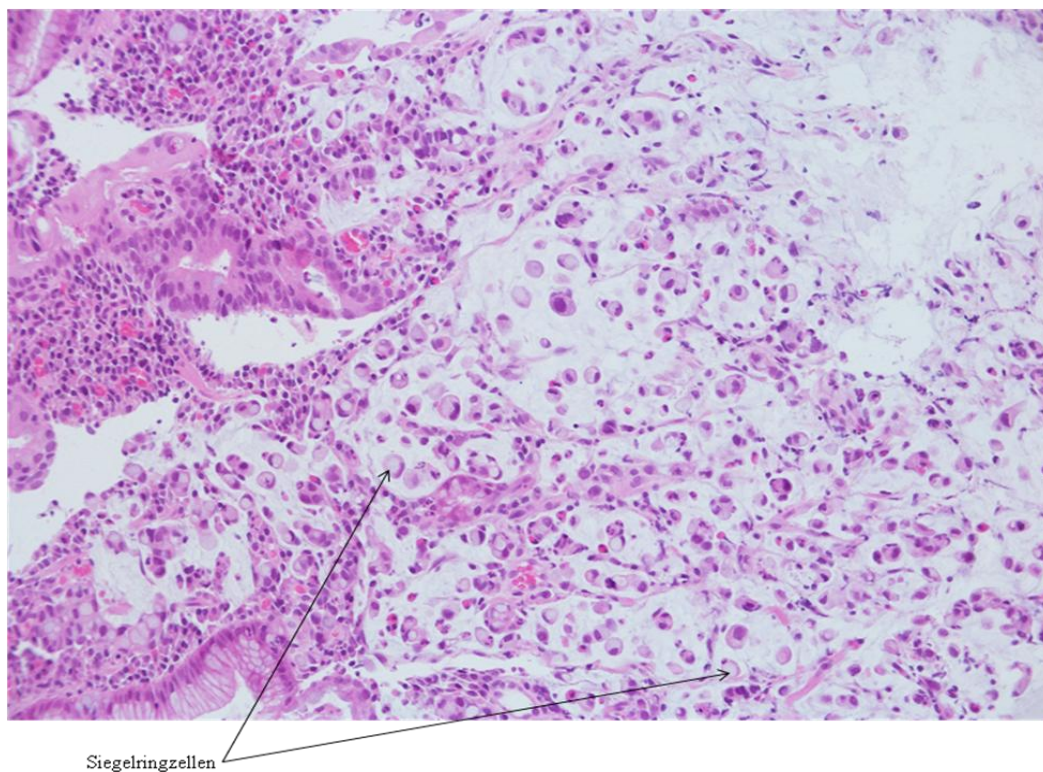
Die Prognose des Magenkarzinoms ist im Allgemeinen schlecht, da es in ca. 80 % der Fälle erst in fortgeschrittenem Stadium entdeckt wird. Zu diesem Zeitpunkt bestehen oft keine Heilungschancen mehr. Bei der Mehrheit der Patienten ist die Anamnese mit typischen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen, Appetitverlust, Anämie, epigastrischen Schmerzen oder Gewichtsabnahme sehr kurz. So zeigen etwa 40 % der Karzinompatienten keine dyspeptische Beschwerden in ihrer jüngeren Krankheitsgeschichte [7]. Aufgrund der oft fehlenden Frühsymptome und der deshalb späten Erstdiagnose sind die Ein- und die Fünf-Jahres-Überlebensrate mit 42 % beziehungsweise 24 - 30 % weiterhin alarmierend niedrig [5, 8]. Weltweit sterben etwa 700 000 Patienten jährlich an der Erkrankung [1, 2, 3].

Nach Laurén werden Adenokarzinome des Magens in drei Entitäten unterteilt: den intestinalen, den diffusen und den Mischtyp [9]. Beim intestinalen Typ zeigt sich ein polypös-expansives Wachstum. Karzinome dieses Typs sind gut begrenzt und histologisch gut differenziert, während die deutlich aggressiveren Karzinome vom diffusen Typ ein lokal infiltratives Wachstum zeigen, schlecht abzugrenzen sind und Zellen mit einem geringen

Differenzierungsgrad aufweisen (**Abb. 1 und 2**), sodass eine radikalere Therapieform gewählt werden muss.



**Abbildung 1: Histologisches Bild eines Magenkarzinoms vom intestinalen Typ.**  
Es ist eine gute Differenzierung der malignen Zellen zu erkennen. (Färbung Hämatoxylin-Eosin)



**Abbildung 2: Histologisches Bild eines Magenkarzinoms vom diffusen Typ.**  
Im Gegensatz zu der ersten Abbildung zeigen sich die malignen Zellen hier schlechter differenziert. (Färbung Hämatoxylin-Eosin)

Der Mischtyp ist nicht klar einer der beiden Entitäten zuzuordnen und wird entsprechend wie die prognostisch ungünstigere Variante, also wie ein Karzinom vom diffusen Typ, behandelt [9].

## 1.2 Ätiologie des Magenkarzinoms

Das Adenokarzinom des Magens hat eine multifaktorielle Genese und tritt in der Mehrzahl der Fälle ( $\geq 97\%$ ) sporadisch auf [10].

### 1.2.1 Wirtsfaktoren

Männliches Geschlecht, kaukasische Abstammung und höheres Alter gelten als allgemein anerkannte Risikofaktoren für Adenokarzinome des oberen Gastrointestinaltraktes. Weitere durch den Wirt bedingte Risikofaktoren für die Entwicklung eines Magenkarzinoms sind außerdem hereditäre genetische Veränderungen [11]. Beim hereditären diffusen Magenkarzinom im engeren Sinne liegt in der Regel eine Keimbahnmutation im *CDHI*-Gen, dem Gen des E-Cadherins, vor. Ein Verlust oder eine Verminderung der Expression des Gens durch Mutationen kann zu einer veränderten Zellmorphologie und vermehrter Invasivität der Gewebeverbände führen, wie sie bei Adenokarzinomen vom diffusen Typ gefunden werden [12, 13, 14].

Neben Mutationen im *CDHI*-Gen sind auch Polymorphismen in anderen, vor allem immunmodulatorischen Genen für die Entwicklung von Adenokarzinomen des Magens von Interesse. Bei Polymorphismen handelt es sich um mehrere Genvarianten in einer Population, die mit mindestens einem Prozent in der Bevölkerung vertreten sind. Diese Polymorphismen sind von Bedeutung für die Ausprägung der körpereigenen Antwort auf umweltbezogene Karzinogene. Im Abschnitt 1.6 wird darauf im Detail noch eingegangen.

### 1.2.2 Umweltfaktoren

Hoher Salzkonsum, die Aufnahme von Nitrosaminen, Alkohol und Rauchen werden als Risikofaktoren für die Magenkarzinomentstehung diskutiert [15, 16, 17, 18, 19]. Die letztendliche quantitative Auswirkung all dieser Faktoren ist jedoch nicht abschließend geklärt [20]. Eine kürzlich erschienene Metaanalyse zeigte, dass sich das Risiko für die Entstehung eines Magenkarzinoms bei zusätzlicher Infektion mit dem Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) durch die oben genannten Faktoren deutlich erhöht, sodass

diesem Umweltfaktor die entscheidende Rolle bei der Magenkarzinomentwicklung zugeschrieben wird [21].

### 1.2.3 *Helicobacter pylori*

Das gramnegative, begeißelte, mikroaerophile Bakterium *H. pylori* wurde 1984 von Marshall und Warren erstmals charakterisiert (**Abb. 3**). Zunächst wurde seine Präsenz im Zusammenhang mit Gastritiden und Ulzera des Magens und des Duodenums beschrieben. 1994 wurde *H. pylori* als einer der wenigen mikrobiologischen Erreger von der IARC (International Agency for Research on Cancer), einer Gruppe der WHO, als Karzinogen der Klasse I eingestuft [22].



**Abbildung 3: Schemazeichnung des Bakteriums *Helicobacter pylori*.**

Gut zu erkennen ist die lophotriche Begeißelung mit mehreren Flagellen an einem Zellpol, die dem Bakterium eine ausgezeichnete Bewegung ermöglicht.

### 1.3 *H. pylori* und das Magenkarzinom

Der Zusammenhang der *H. pylori*-Infektion mit der Entstehung gastraler Adenokarzinome wurde erstmals in epidemiologischen Studien beschrieben und konnte in Tierexperimenten eindeutig nachgewiesen werden, bei denen *H. pylori* allein, ohne zusätzliches Einwirken eines Co-Karzinogens die Entstehung eines Adenokarzinoms des Magens induzieren konnte [23]. In der Magenschleimhaut mongolischer Wüstenrennmäuse, die mit *H. pylori* infiziert worden waren, zeigte sich nach sechs Monaten eine atrophische Antrumgastritis und eine fokale intestinale Metaplasie (IM), die sich nach zwölf Monaten stärker ausbreitete und mit dysplastischen Veränderungen assoziiert war. Bei zwei von fünf Tieren lagen nach

18 Monaten gut differenzierte Adenokarzinome des Magens vor, während Vergleichstiere, die nicht infiziert worden waren, keine histologischen Veränderungen der Magenmukosa aufwiesen [23]. Diese Ergebnisse konnten durch eine andere Arbeitsgruppe bestätigt werden [24].

Die Bedeutung des *H. pylori* als Risikofaktor für Magenkarzinome im humanen System konnte in einer Metaanalyse bestätigt werden. Es wurden insgesamt 19 Kohorten- oder Fall-Kontroll-Studien mit 2491 Patienten und 3959 Kontrollen ausgewertet. Bei *H. pylori*-positiven Patienten lag die Odds Ratio (OR) für eine Magenkarzinomentwicklung bei 1,92 [25]. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich durch eine andere Metaanalyse von 42 Studien mit einer OR von 2,04 (95 % Konfidenzintervall: KI 1,69 - 2,45) [26].

Eine genauere Bestimmung des relativen Risikos für Adenokarzinome des Magens bei bestehender *H. pylori*-Infektion nahm die *Helicobacter and Cancer Collaborative Group* 2001 vor [27]. Es konnten 12 Studien mit 1228 Patienten eingeschlossen und eine klare Assoziation von *H. pylori* und Nicht-Kardia-Karzinomen (OR 3,0; 95 % KI 2,3 - 3,8) gezeigt werden. Dieser Zusammenhang erwies sich sogar noch als stärker bei Patienten, deren Blutproben für die *H. pylori*-Serologie 10 Jahre oder noch länger vor der Krebsdiagnose zur Verfügung standen (OR 5,9; 95 % KI 3,4 - 10,3) [27].

Einen positiven Zusammenhang der *H. pylori*-Infektion mit der gastralen Adenokarzinogenese konnten auch Uemura *et al.* an etwa 1500 Patienten nachweisen, die aufgrund dyspeptischer Beschwerden, Magenulzera oder hyperplastischen Polypen gastroscopiert wurden. Während der Langzeitbeobachtung von 7,8 Jahren entwickelten ausschließlich *H. pylori*-positive Patienten ein Magenkarzinom [28].

Um das Risiko durch *H. pylori* für die Karzinogenese noch genauer beurteilen zu können, wurden auch bakterielle Virulenzfaktoren in die Analyse mit einbezogen, die das malignitätsfördernde Potential jedes einzelnen *H. pylori*-Stammes definieren. Dabei kommt der *Cag*-Pathogenitätsinsel (CagPAI) nach bisherigen Erkenntnissen die größte Bedeutung zu. Die CagPAI ist eine 40 Kilobasen große Insertion, die etwa 30 Gene umfasst. Sowohl der Virulenzfaktor zytotoxisches Antigen A (*CagA*) selbst, als auch ein für die notwendige Translokation in die Wirtszelle benötigter Transferapparat (Typ IV Sekretionssystem) sind auf der CagPAI kodiert. Das *CagA* induziert eine verstärkte Entzündungsreaktion und erhöht so auch das Risiko für die Magenkarzinomentstehung [29, 30]. Über eine Aktivierung von NFκB (englisch: nuclear factor κB), einem Regulator der Transkription inflammatorischer



Gene, kommt es beispielsweise zu einem Anstieg des proinflammatorischen Zytokins *IL 8* (Interleukin 8) und *TNF  $\alpha$*  (Tumornekrosefaktor  $\alpha$ ) [31]. Zuletzt wurden auch zunehmend Daten zu einer *CagA*-unabhängigen Aktivierung von NF $\kappa$ B publiziert, wobei in der Regel Proteine beteiligt waren, die auf der *CagPAI* codiert sind [32, 33]. Da das *CagA*-Protein sowohl die Zell-Zell-Kontakte (tight junctions, adherense junctions) als auch die apikale und basolaterale Differenzierung der Epithelzellen beeinflusst, ist ein Verlust der Integrität der Magenmukosa ebenfalls möglich [34]. Eine Metaanalyse bestätigte für Träger *CagA*-positiver *H. pylori*-Stämme ein zusätzlich um den Faktor 1,64 erhöhtes Risiko für die Entstehung eines Magenkarzinoms im Vergleich zu *CagA*-negativen Individuen [35]. Weitere Virulenzfaktoren von *H. pylori* sind das vakuolisierende Zytotoxin A (*VacA*), welches in die Regulation des Zellzyklus und der Apoptose eingreift, und das Blutgruppen-Antigen-bindende Adhesin (*BabA*), welches zu einer stärkeren Entzündungsreaktion führt [36, 37]. Das kombinierte Vorliegen aller drei Virulenzfaktoren führt nach heutigem Kenntnisstand zum höchsten Risiko für die Entwicklung eines Magenkarzinoms in den Trägern der jeweiligen Stämme [38].

#### **1.4 *H. pylori* und die gastrale Entzündung**

Die Ansiedlung von *H. pylori* erfolgt nach Infektion zunächst in Regionen des Magens, an denen ein höherer pH-Wert zu finden ist (meist im Antrum).

Es wurden bisher drei verschiedene Phänotypen der *H. pylori*-Gastritis beschrieben [39]. Die häufigste und ungefährlichste Form ist dabei eine milde Pangastritis mit nur leichter Störung der gastralen Säureproduktion, die meist bei asymptomatischen Patienten zu finden ist. Mit 15 % die zweithäufigste Erscheinungsform stellt die Antrum-dominierende Gastritis dar, die über eine erhöhte Ausschüttung von Gastrin zu starker Säureproduktion und damit zur Entwicklung gastraler und duodenaler Ulzera prädisponiert [40, 39, 41]. Seltener, aber dafür schwerwiegender, ist die korpusdominierende Form der Gastritis. Durch niedrige sekretorische Kapazität des Wirtes für Magensäure kann sich *H. pylori* auf der Korpusmukosa ausbreiten und zu einer Atrophie der Schleimhaut mit resultierender Hypochlorhydrie führen [41, 42]. Diese Ausprägung der *H. pylori*-induzierten atrophischen Gastritis gilt als eine häufige Vorstufe bei der Entstehung eines Magenkarzinoms.

In einer japanischen Studie konnte gezeigt werden, dass *H. pylori*-positive Patienten mit bestehender atrophischer Gastritis, korpusprädominanter Gastritis und intestinaler Metaplasie (IM) ein höheres Risiko für maligne Entartung zeigen, als jene, bei denen diese

Schleimhautveränderungen nicht vorliegen [28]. In einer weiteren prospektiven Studie zeigten alle Patienten, die trotz erfolgreicher Eradikationstherapie während eines Beobachtungszeitraums von 9 Jahren ein Magenkarzinom entwickelten, eine schwerwiegende atrophische Gastritis bei Studieneinschluss [43]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das Risiko für ein Adenokarzinom des Magens mit dem Schweregrad der Mukosaatrophie korreliert [44].

Neben der Atrophie wird auch die intestinale Metaplasie als prä- oder paramaligne Kondition des Magens angesehen. Welin und Kollegen zeigten einen direkten Zusammenhang zwischen intestinaler Metaplasie und Karzinomen vom intestinalen Typ [45]. Das konnte auch eine neuere landesweite Kohortenstudie aus den Niederlanden veranschaulichen. Bei mehr als 9000 Teilnehmern war eine stufenweise Zunahme der jährlichen Inzidenz des Magenkarzinoms von 0,1 % bei Patienten mit atrophischer Gastritis, über 0,25 % beim Vorliegen einer IM des Magens, 0,6 % bei milder Dysplasie, bis hin zu 6 % bei schwergradigen dysplastischen Veränderung zu verzeichnen [46].

Diese Ergebnisse untermauern die 1988 von Correa und Kollegen erstmals an einer Population in Kolumbien beschriebenen Sequenz, die eine schrittweise Entwicklung des Karzinoms über eine Drüsenhalshyperplasie, gastrale Atrophie, intestinale Metaplasie und Dysplasie bis hin zum Adenokarzinom zeigt [47, 48].

### 1.5 Zytokine

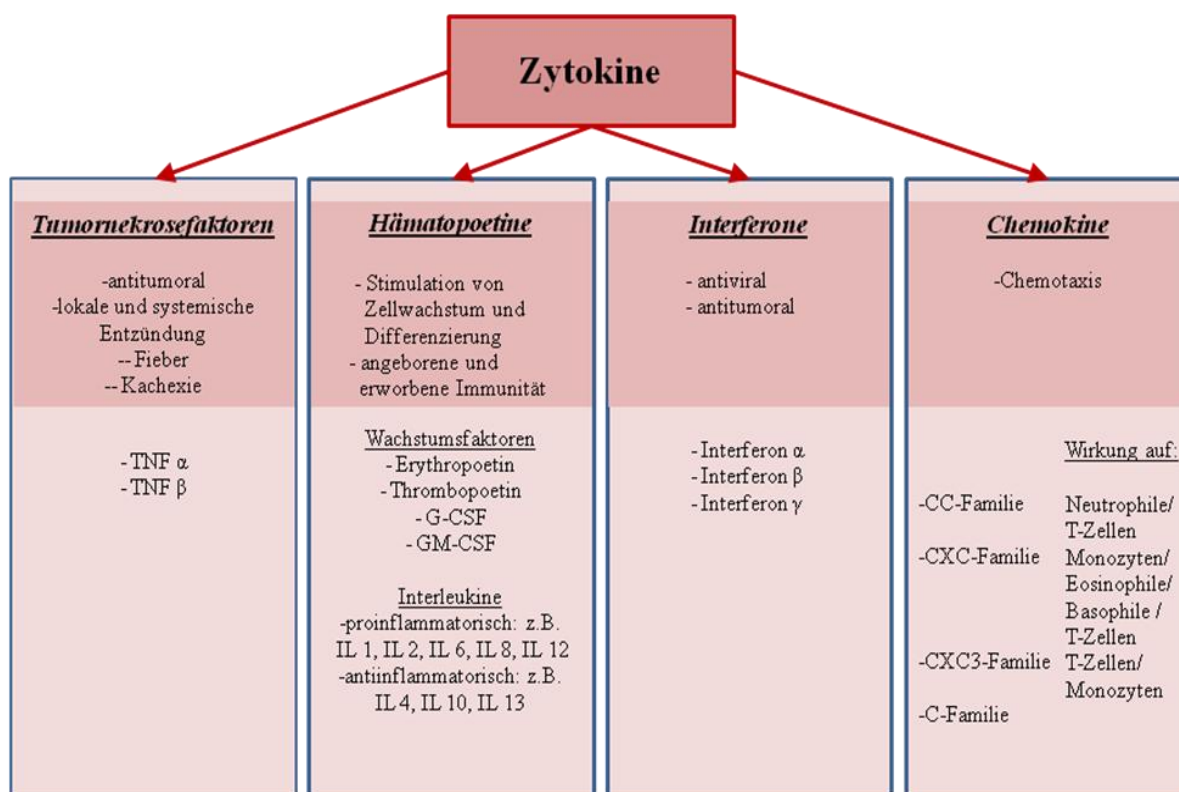
Interleukine sind Botenstoffe, die insbesondere in der Zell-Zell-vermittelten Immunantwort ihre besondere Bedeutung haben. Der Begriff Interleukin („sich zwischen weißen Zellen bewegen“) und die Nummerierung der bekannten Mediatoren wurden eingeführt, um eine einheitliche Nomenklatur zu schaffen. Die Bezeichnungen sind jedoch irreführend, da sich das Wirkungsspektrum nicht auf die Leukozyten beschränkt und die Unterteilung in Untergruppen nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung und nicht nach dem Wirkmechanismus erfolgte. Eine präzisere Beschreibung ist daher der Begriff Zytokin („sich zwischen den Zellen bewegen“).

Dass es bei einer Besiedelung der Magenmukosa durch *H. pylori* bei unterschiedlichen Individuen auch zu unterschiedlichen Phänotypen der *H. pylori*-Infektion kommt, lässt sich unter anderem auf die inflammatorische Antwort des Wirtes beziehen, die durch pro- und antiinflammatorische Zytokine beeinflusst wird.



### 1.5.1 Definitionen

Bei Zytokinen handelt es sich um lösliche Glykoproteine, die sich über spezifische Rezeptoren an Zielzellen binden und dort eine Vielzahl von Reaktionen auslösen können. *In-vivo* sind sie in sehr niedrigen Konzentrationen vorhanden und können neben lokalen auch systemische Wirkungen haben [49]. Entsprechend ihrer molekularen Struktur kann man Zytokine in Hauptgruppen einteilen (**Abb. 4**).



**Abbildung 4: Einteilung der Zytokine und deren Funktion.**

*Tumornekrosefaktoren sind neben ihrer antitumoralen Wirkung auch für lokale und systemische Entzündungsreaktionen verantwortlich; Hämatopoetine sorgen für das Wachstum und die Differenzierung verschiedener Zellen sowie für angeborene und erworbene Immunität (hierzu gehören auch pro- und antiinflammatorische Zytokine); durch Chemokine wird die Chemotaxis, vor allem von Immunzellen gewährleistet. G-CSF = Granulozyten-Kolonie stimulierender Faktor, GM-CSF = Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor.*

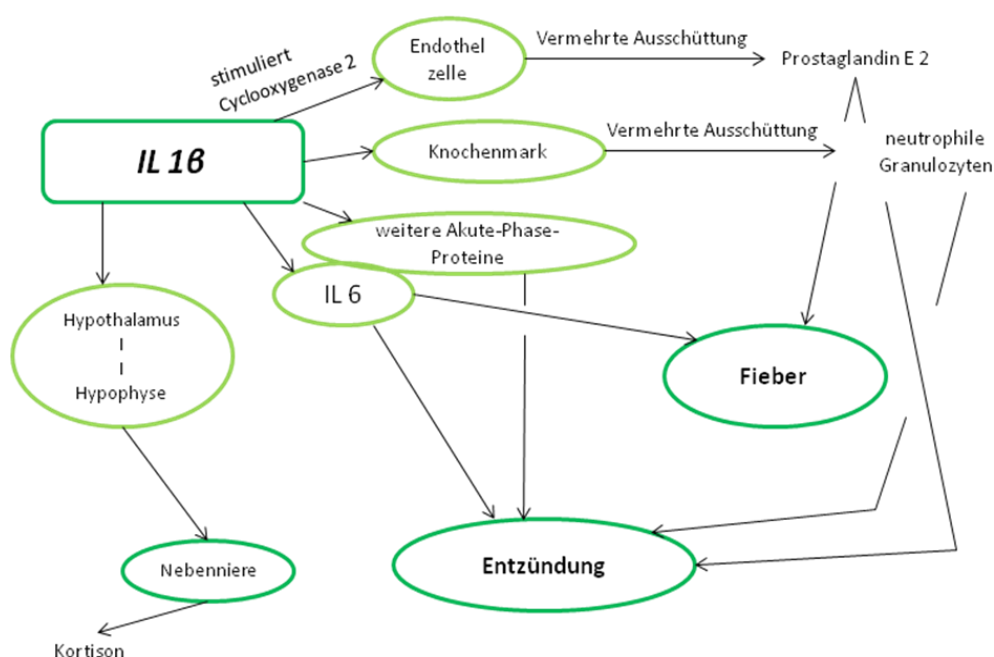
Dazu gehören die Hämatopoetin-Gruppe, in der Wachstumsfaktoren und zahlreiche Interleukine mit Funktionen der erworbenen und angeborenen Immunität zusammengefasst werden, die TNF-Gruppe, die ebenfalls sowohl bei der angeborenen als auch bei der erworbenen Immunität von Bedeutung ist, die Interferone, die der immunologische Abwehr von Viren dienen und die Gruppe der Chemokine. Diese Moleküle induzieren eine gerichtete Chemotaxis vor allem von Leukozyten und leiten Monozyten, neutrophile Granulozyten und

andere Effektorzellen aus der Blutbahn. Des Weiteren fördern sie die Wanderung im Gewebe zu Infektionsherden [50].

Bekannt sind bisher drei Mitglieder der *IL 1*-Genfamilie. *IL 1 $\alpha$*  und *IL 1 $\beta$*  sind Agonisten, der *IL 1 RN* (*IL 1* Rezeptorantagonist) ein natürlicher Gegenspieler am *IL 1*-Rezeptor [51].

### 1.5.2 *IL 1 $\beta$*

#### 1.5.2.1 Allgemeine Wirkung von *IL 1 $\beta$*



**Abbildung 5: Übersicht über die systemische Wirkung von *IL 1 $\beta$* .**

Über verschiedene Wege ist *IL 1 $\beta$*  an der Auslösung von Fieber und einer systemischen Entzündungsreaktion mit der Aktivierung von Endothelzellen, dem Knochenmark und Akute-Phase-Proteinen beteiligt.

Entzündungshemmend hingegen ist die Langzeitwirkung über die Aktivierung der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse zur Ausschüttung von Kortison.

Bei dem Interleukin 1 $\beta$  handelt es sich um ein potentes proinflammatorisches Zytokin. Fast alle bakteriellen Erreger oder deren Produkte stimulieren nach Infektion des Wirtes die Transkription und Synthese von *IL 1 $\beta$*  [51]. Daneben führen auch nicht mikrobielle Stimuli wie Hyperosmolarität, Reperfusion nach vorangegangener Ischämie oder thermische Verletzungen zu einem Anstieg dieses Zytokins oder dessen m-RNA in Monozyten [51]. Das Wirkspektrum von *IL 1 $\beta$*  ist breit gefächert (**Abb. 5**). Es resultiert vor allem aus einer Induktion der Expression von vielen anderen Genen durch Förderung derer Transkription oder Stabilisierung derer m-RNA [41]. Zu diesen gehören Gene proinflammatorischer Zytokine wie *IL 2*, *IL 6*, *IL 12* und *TNF  $\alpha$* . Systemisch verursacht es Fieber, den Anstieg von im Blut

zirkulierenden Neutrophilen, zirkulierendem Stickstoffmonoxid (NO) und Akute-Phase-Proteinen sowie eine Thrombozytose. Lokale Wirkungen sind je nach Gewebe unterschiedlich. Es kann beispielsweise zur Zerstörung von Knorpelgewebe und zur Freisetzung von Calcium aus dem Knochen führen. Des Weiteren ist eine vermehrte Proliferation von Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Mesangiumzellen durch ein erhöhtes *IL 1 $\beta$*  zur Unterstützung eines Heilungsprozesses nach Untergang von Gewebe zu verzeichnen [41].

#### 1.5.2.2 Wirkung von *IL 1 $\beta$* auf die gastrale Mukosa

Die Funktion vieler gastraler Zellen wird durch *IL 1 $\beta$*  moduliert (**Abb. 6**). In Ratten wurde gezeigt, dass die intraperitoneale Gabe von rekombinantem *IL 1 $\beta$*  zu einer Minderung der sekretorischen Kapazität und zur Verzögerung der Magenentleerung führt. Am ehesten wird dies durch spezifische Rezeptoren an Parietalzellen (Belegzellen), Zellen der glatten Muskulatur und Prostaglandin produzierenden Zellen vermittelt [52, 53]. Ein *in-vitro*-Experiment an kultivierten Parietalzellen von Kaninchen zeigte eine Hemmung der basalen Magensäuresekretion durch *IL 1 $\beta$*  und *TNF  $\alpha$*  [54]. Auch *in-vivo* konnten ähnliche Schlussfolgerungen gezogen werden. Nach Injektion sowohl von humanem als auch von Ratten-*IL 1 $\beta$*  kam es zu einer Suppression der Magensäureproduktion bei behandelten Ratten, die über den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Stunden anhielt [55]. Die antisekretorische Wirkung von *IL 1 $\beta$*  wurde sogar auf das 100-fache des Protonenpumpenhemmers Omeprazol und das 6000-fache des Antihistaminikums Cimetidin geschätzt [56].

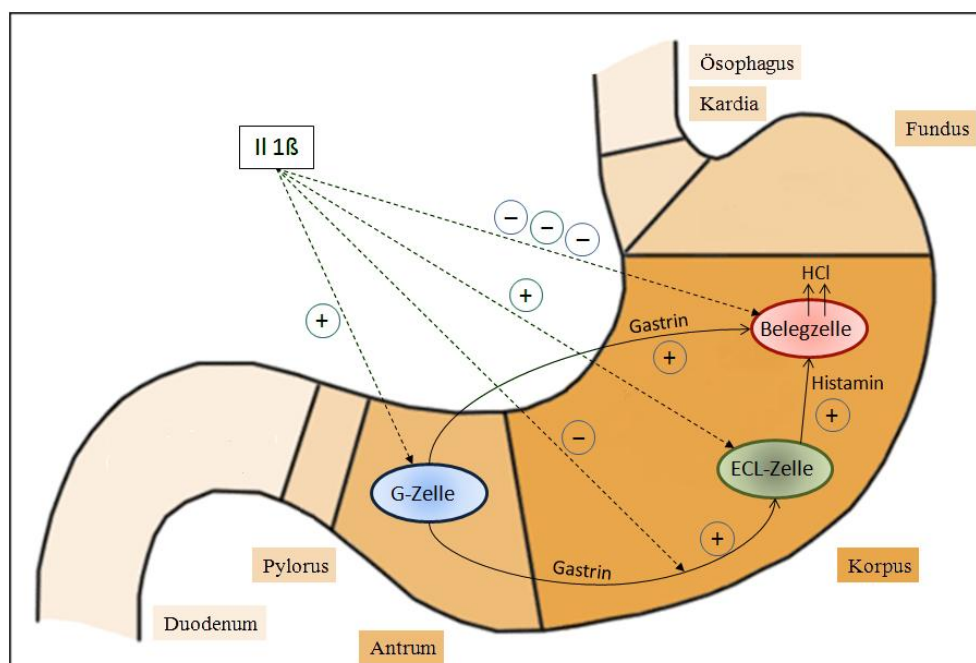
Trotz seiner proinflammatorischen und säurehemmenden Wirkung wurden *IL 1 $\beta$*  gelegentlich auch schleimhautschützende Wirkungen gegen verschiedene Noxen bescheinigt [52, 57]. So konnte eine Injektion von rekombinantem *IL 1 $\beta$*  dosisabhängig die Ausbildung von Ethanol-induzierten nekrotischen Läsionen der Magenmukosa verhindern [57]. Ausschlaggebend hierfür scheint die säurehemmende Wirkung zu sein.

Des Weiteren kommt es durch vermutlich direkte Stimulation von *IL 1 $\beta$* -Rezeptoren auf antralen G-Zellen zu einem Anstieg der Gastrinsekretion [58].

Dass auch enterochromaffin-ähnliche Zellen (ECL-Zellen) der Magenschleimhaut Rezeptoren für *IL 1 $\beta$*  besitzen, wurde experimentell an kultivierten Zellen von Ratten gezeigt. Durch *IL 1 $\beta$*  kam es zu einer Stimulation der Histaminausschüttung aus ECL-Zellen [59, 60]. Da aus hohen Histaminspiegeln eine Anregung von Parietalzellen zur Magensäureproduktion

resultiert, wäre damit ein niedriger pH-Wert im Magen zu erklären. In einer anderen Studie kam es jedoch durch eine längere Inkubation mit *IL 1 $\beta$*  nicht mehr zu einem Anstieg der Magensäureproduktion, da eine durch Gastrin stimulierte Histaminsekretion um 40 – 50 % abnahm [59].

Durch diese Ergebnisse lässt sich die Komplexität der Wirkung von *IL 1 $\beta$*  in der Magenmukosa erahnen. Trotz Förderung der Magensäureproduktion durch Stimulation der Gastrin- oder Histaminausschüttung, führt eine starke direkte Hemmung der Parietalzellen zu einer Suppression der Magensäureproduktion.



**Abbildung 6: Wirkung von *IL 1 $\beta$*  auf gastrale Mukosazellen.**

*IL 1 $\beta$*  besitzt eine säuresupprimierende Wirkung auf die Belegzellen. Zusätzlich werden G-Zellen zur Gastrinausschüttung, sowie ECL-Zellen zur Histaminausschüttung angeregt. Die durch Gastrin bedingte Histaminausschüttung wird wiederum gehemmt. Es resultiert insgesamt eine säuresupprimierende Wirkung durch die starke direkte Hemmung der Belegzellen. G-Zelle = Gastrin produzierende Zelle, ECL-Zelle = Enterochromaffin-ähnliche Zelle, HCl = Salzsäure, '+' = fördernde Wirkung, '-' = hemmende Wirkung. Abbildung modifiziert nach <http://diesteinlaus.files.wordpress.com/2008/11/magen.jpg>

### 1.5.3 *IL 1* Rezeptorantagonist

Der *IL 1* Rezeptorantagonist (*IL 1 RN*) ist ein natürlicher Konkurrent von *IL 1 $\alpha$*  und *IL 1 $\beta$*  am *IL 1*-Rezeptor. Es kommt zwar zu einer Bindung am Rezeptor, es wird jedoch keine Signaltransduktion eingeleitet. Dass die Wirkung von *IL 1 $\beta$*  durch *IL 1 RN* neutralisiert wird, konnte eindrucksvoll durch die Beobachtung von Magensäuresekretion, mRNA-Spiegel und

Serumgastrinwerten bei mongolischen Wüstenrennmäusen gezeigt werden [61]. Dieses wird im nächsten Abschnitt noch ausführlich beschrieben. Eine neutralisierende Wirkung des *IL 1 RN* auf eine erhöhte Gastrinproduktion konnte auch in einer weiteren Studie nachgewiesen werden. Hierbei wurde eine Stimulation der Gastrinsekretion antraler G-Zellen von Kaninchen durch *IL 1 $\beta$*  mittels Zugabe von *IL 1 RN* antagonisiert [58].

### **1.6 *H. pylori* und *IL 1 $\beta$***

In mehreren Studien konnte nach einer Infektion mit *H. pylori* ein deutlicher Anstieg von vor allem *IL 1 $\beta$*  und *IL 6* gezeigt werden [62, 63]. Weiterhin zeigte sich eine vermehrte Ausschüttung von *IL 8* und *TNF  $\alpha$*  [62, 64]. *IL 1 $\beta$*  wird im Rahmen der *H. pylori*-vermittelten Entzündungsreaktion von Makrophagen und zu einem geringeren Anteil von dendritischen Zellen sezerniert. Wie bereits erwähnt, induziert es die Expression weiterer Zytokine, wie *IL 2*, Interferon und *TNF  $\alpha$*  [62, 65]. Eine folgende Infiltration der gastralen Mukosa durch Granulozyten und Monozyten bleibt über den gesamten Zeitraum einer Kolonisation mit dem Bakterium bestehen und führt somit zu einer chronischen Entzündung, deren Ausprägung vor allem vom Muster der Besiedlung durch *H. pylori* abhängig ist [66].

Takashima *et al.* untersuchten Veränderungen an mongolischen Wüstenrennmäusen nach oraler Beimpfung mit *H. pylori* [61]. Die Mäuse zeigten sowohl nach sechs, als auch zwölf Wochen eine zunehmende Entzündung der Magenschleimhaut und erhöhte Gastrinspiegel bei gleichzeitig signifikanter Abnahme der Magensäureproduktion. Diese Entdeckungen waren mit erhöhten *IL 1 $\beta$* -mRNA-Spiegeln vergesellschaftet, sodass ein eindeutiger Zusammenhang zwischen *H. pylori* und *IL 1 $\beta$*  hergestellt werden konnte. Nach intraperitonealer Injektion von rekombinantem *IL 1 RN* kam es wieder zu einer Abnahme des Gastrinspiegels und einer Normalisierung der Säureproduktion auf Ausgangswerte [61]. Durch diesen Sachverhalt begründet sich die Hypothese, nach der hohe *IL 1 $\beta$* -Spiegel die Entwicklung von Magenkarzinomen begünstigen. Die starke Säuresuppression erleichtert eine Ausbreitung von *H. pylori* auch in den Magenkörper, deren Folge häufig eine atrophische Gastritis mit erhöhtem Risiko für Adenokarzinome des Magens ist.

## 1.7 Zytokinpolymorphismen

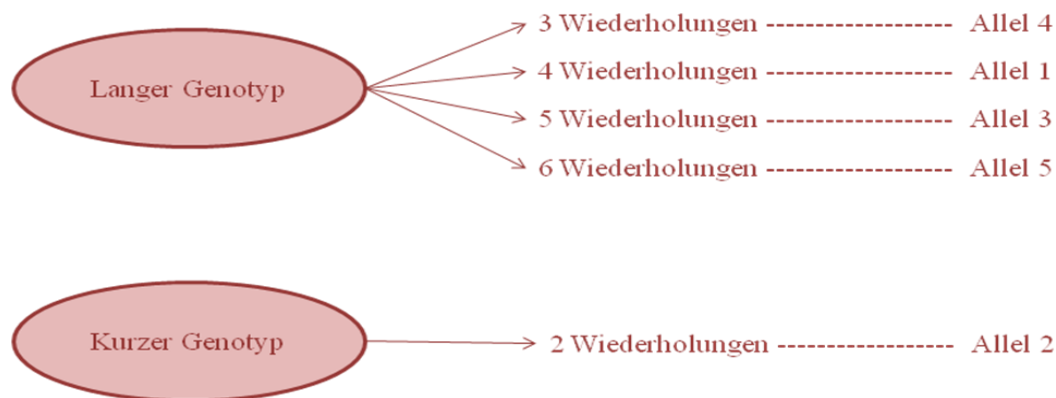
### 1.7.1 Begriffsklärung

Mutationen, die im Laufe der Evolution im Genom kumulieren, die zugehörige Funktion des entsprechenden Locus aber nicht wesentlich verändern, bezeichnet man als Polymorphismen. Unter Einzelnukleotidpolymorphismen (single nucleotide polymorphism: SNP) versteht man dabei Variationen nur einzelner Basenpaare eines DNA-Stranges. In der Promotorregion des *IL 1B*-Gens waren zunächst die Regionen -511 und -31 von Interesse. Das negative Vorzeichen kennzeichnet dabei, dass diese Loci in der Promotorregion vor der eigentlichen Transkriptionseinheit liegen, die Zahl gibt Auskunft darüber, an welcher Position sich der Polymorphismus vor der Transkriptionseinheit befindet. So beschreibt *IL 1B -31 C* beispielsweise, dass die Base Cytosin an 31. Position vor der Transkriptionseinheit in der Promotorregion des *IL 1B*-Gens zu finden ist.

Bei der Bezeichnung „Haplotyp“ handelt es sich um eine Abkürzung von „haploider Genotyp“. Ein Haplotyp sind miteinander gekoppelte Nukleotidsequenzvarianten, die an Nachkommen weiter gegeben werden können [67].

Wiederholungen kurzer Basenpaarmuster in einem DNA- oder RNA-Strang werden in der Genetik als „tandem repeats“ bezeichnet. Auch im Intron 2 (nicht kodierender Abschnitt des Gens) des *IL 1 RN*-Gens fand man bei verschiedenen Individuen eine variable Anzahl von „tandem repeats“ (variable number of tandem repeats: VNTR) mit 86 Basenpaaren, die in einer veränderten transkriptionellen Aktivität des Gens resultierten. Man teilte sie in kurze (< 3 Wiederholungen) und lange ( $\geq 3$  Wiederholungen) Genotypen ein (**Abb. 7**) [68, 69].

Als Allel 1 des *IL 1 RN*-Gens wird seitdem ein Genotyp mit vier „tandem repeats“ bezeichnet. Allel 2 (Schreibweise: *IL 1 RN\*2*) besitzt zwei Wiederholungen, Allel 3 fünf Wiederholungen, Allel 4 drei Wiederholungen und Allel 5 sechs Wiederholungen. Die Allele 1, 3, 4 und 5 können demnach als Gruppe der langen Genotypen (L) zusammengefasst werden [68, 69, 70].



**Abbildung 7: Anzahl der „tandem repeats“ (VNTR) im Intron 2 des *IL 1 RN*-Gens und deren Zuordnung zu Allelen.**

Zu den langen Genotypen werden mehr als 2 Wiederholungen gezählt. Dazu gehören die Allele 1,3,4 und 5. Allel 2 mit nur 2 Wiederholungen wird als kurzer Genotyp bezeichnet.

### 1.7.2 Polymorphismen im *IL 1B*- und *IL 1 RN*-Gen

El-Omar *et al.* berichteten erstmals im Jahre 2000 von Zytokinpolymorphismen im Zusammenhang mit der Entstehung eines Magenkarzinoms in einem Kollektiv erstgradig Verwandter von Magenkarzinompatienten in Schottland [68]. Bei *H. pylori*-infizierten Individuen beschrieben sie einen Zusammenhang zwischen vermehrtem Auftreten einer Hypochlorhydrie und dem proinflammatorischen *IL 1 RN*\*2, sowie dem Haplotyp *IL 1B* -31 C (Cytosin)/*IL 1B* -511 T (Tyrosin). Daraufhin wurden auch Karzinompatienten und Magengesunde aus einer Fall-Kontroll-Studie in Polen in die Untersuchungen einbezogen. Analysiert wurden Polymorphismen an den Positionen -511, -31 und +3954 des *IL 1B*-Gens und die VNTR des *IL 1 RN*-Gens bei 429 Magenkarzinompatienten und 366 Gesunden. Es zeigte sich eine starke Kopplung der Genloci -511 und -31, sodass in diesen Kollektiven gehäuft entweder der Haplotyp *IL 1B* -31 C/*IL 1B* -511 T oder *IL 1B* -31 T/*IL 1B* -511 C auftrat. Träger des *IL 1B* -31 C-Allels wiesen mit einer OR von 1,9 (95 % KI 1,5 - 2,6) ein erhöhtes Magenkarzinomrisiko auf. Ein Unterschied zwischen homozygoten und heterozygoten Trägern bestand dabei nicht. Durch die Kopplung der Genloci lag nahe, dass auch für Träger des -511 T-Allels das Magenkarzinomrisiko erhöht wäre (*IL 1B* -511 T/T: OR 2,6; 95 % KI 1,7 - 3,9; *IL 1B* -511 C/T: OR 1,8; 95 % KI 1,3 - 2,4) [68]. Das Vorliegen von *IL 1 RN* 2/2 war in dieser Studie ebenfalls mit einem erhöhten Karzinomrisiko verbunden (OR 3,7; 95 % KI 2,4 - 5,7). Für Position +3954 ergaben sich keine signifikanten Ergebnisse [68].

Machado und Kollegen fanden ebenso eine positive Korrelation zwischen Polymorphismen und Adenokarzinomen. In einer Fall-Kontroll-Studie an 152 Karzinompatienten und 220 gesunden Kontrollen konnte für Träger von *IL 1B* -511 T (OR 2,7; 95 % KI 1,5 - 4,9) und homozygote Individuen für *IL 1RN*\*2 (OR 3,1; 95 % KI 1,5 - 6,5) ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Magenkarzinomen des intestinalen Typs gezeigt werden. Bei gleichzeitigem Vorliegen beider Merkmale erhöhte sich das Risiko sogar noch, sodass man auf einen synergistischen Effekt schloss. Ein Trend in Richtung eines erhöhten Risikos durch die vorhandenen Polymorphismen ließ sich auch für Karzinome vom diffusen Typ verzeichnen [69]. Viele weitere Studien, die in Folge dieser ersten Arbeiten veröffentlicht wurden, zeigten ähnliche Resultate [71, 72, 73, 102]. Zuletzt wurden jedoch auch widersprüchliche Daten veröffentlicht [83, 100, 104].

Von den bis 2008 veröffentlichten vier Metanalysen konnte in dreien ein erhöhtes Risiko durch *IL 1B*- und *IL 1RN*-Polymorphismen für die Entwicklung von Magenkarzinomen nachgewiesen werden, während dies in der vierten nicht bestätigt werden konnte. In dieser Analyse wurden 35 Studien mit 5500 Patienten und 7800 Kontrollen berücksichtigt, in denen Veränderungen am Genlocus *IL 1B* -511 und dem Intron 2 des *IL 1RN*-Gens erfasst worden waren [74]. Je mehr Studien zur Bestimmung des kumulativen Risikos einbezogen wurden, desto geringer zeigte sich die Assoziation zwischen den untersuchten Polymorphismen und dem Risiko für ein Magenkarzinom. Die zusammengefasste OR für *IL 1B* -511 C/T gegenüber dem Wildtyp C/C betrug 1,07 (95 % KI 0,91 - 1,25), bei der Beurteilung von -511 T/T gegenüber dem Wildtyp lag sie bei 1,16 (95 % KI 0,95 - 1,42). Insgesamt konnte auch das *IL 1RN*-Gen betreffend kein Zusammenhang mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko gefunden werden. Die Ergebnisse der einzelnen Studien variierten allerdings erheblich in Abhängigkeit von der histologischen Untergruppe des Magentumors, des Genlokus, der untersucht wurde, und der geographischen Region, in der die Studie erhoben wurde [74].

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen waren die Aussagen der anderen drei Metanalysen ähnlich. Camargo *et al.* bewerteten neben Studien, die sich mit Polymorphismen an Position -511 des *IL 1B*-Gens und Intron 2 des *IL 1RN*-Gens befassten, auch solche, die Polymorphismen an abweichenden Positionen mit untersuchten. Dazu gehörten, die bereits von El-Omar beschriebenen Loci -31 und +3954. Insgesamt wurden 25 Studien eingeschlossen. Eine signifikante Assoziation zu einem erhöhten Magenkarzinomrisiko bestand für Träger des T-Allels an Position -511 und für Träger von *IL 1RN*\*2. Allerdings



traf dies nur für die kaukasische Population zu. Das vermehrte Risiko war für die Entwicklung von Karzinomen des intestinalen Typs, die nicht in der Kardia lagen, am größten [75]. Eine andere Metaanalyse bestätigte das erhöhte Risiko für die Entwicklung von Karzinomen vom intestinalen Typ (OR 1,76; 95 % KI 1,12 - 2,57) im Vergleich zum diffusen Typ (OR 1,16; 95 % KI 0,86 - 1,52) [76]. In einer Metaanalyse von 2008 zeigte sich ebenfalls ein erhöhtes Magenkarzinomrisiko bei vorhandenem T-Allel im *IL 1B* -511-Gen mit einer OR von 1,23 (95 % KI 1,09 - 1,37). Auch hier beschränkte sich die Risikoerhöhung auf Kaukasier (OR 1,56; 95 % KI 1,32 - 1,84) und traf für Asiaten nicht zu (OR 1,0; 95 % KI 0,85 - 1,16) [77].

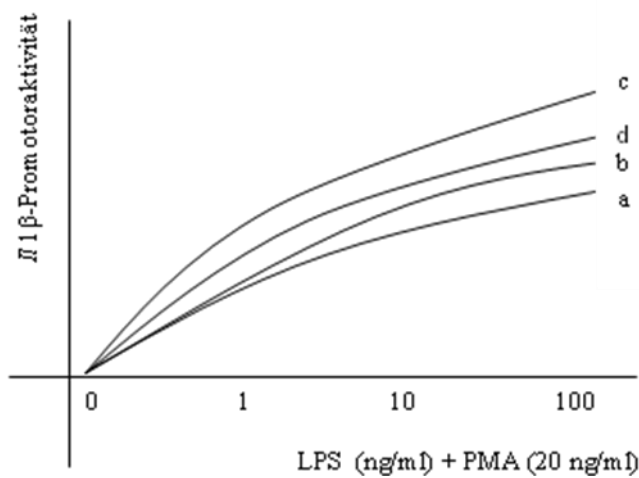
Neuere Studien an einer europäischen Population mit tendenziell negativer Assoziation zwischen Interleukinpolymorphismen und erhöhtem Magenkarzinomrisiko wurden jedoch noch nicht mit in die Metaanalysen einbezogen [78, 79]. Vereinzelt gab es auch immer wieder Studien, die das *IL 1B*-Gen an anderen Positionen untersuchten und eine Assoziation zu erhöhtem Karzinomrisiko zeigten. Beispielsweise wurde ein neuer Polymorphismus an Position -1473 der *IL 1B*-Gens gefunden. In einer Fall-Kontroll-Studie an koreanischer Bevölkerung konnte eine positive Korrelation zwischen dem Allel Guanin (G) am Locus -1473 und einem erhöhten Karzinomrisiko, vor allem für Tumore vom intestinalen Typ, nachgewiesen werden [80]. Bestätigungen durch weitere Studien blieben bislang jedoch aus.

### 1.7.3 Haplotypen

Durch Sequenzierung des *IL 1B*-Gens über 12 Kilobasen an 25 gesunden Probanden wurden 20 verschiedene Polymorphismen identifiziert, von denen 12 in der Promotorregion des Gens zu finden waren. Vier dieser SNP traten mit einer Frequenz > 4 % im untersuchten Kollektiv auf und wurden Gegenstand einer weiterführenden Untersuchung, bei der die transkriptionelle Aktivität im Haplotypenkontext analysiert wurde [81] (**Abb. 8**).

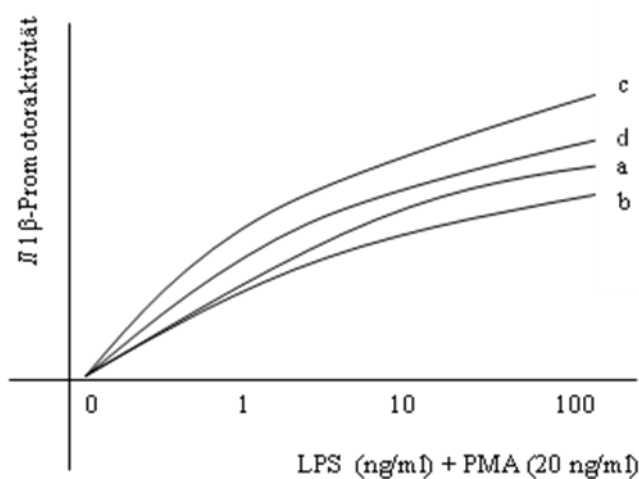
Es wurde dabei gezeigt, dass eine hohe transkriptionelle Aktivität durch das Vorliegen des *IL 1B* -511 T-Allels zusätzlich von der Haplotypenzusammensetzung an Position *IL 1B* -3737 und -1464 abhängig war. Die höchste Aktivität der Transkription lag bei gleichzeitigem Vorhandensein von *IL 1B* -511 T zusammen mit den beiden Wildtypvarianten an Position -3737 (C) und -1464 (G) vor. Die Alternativpolymorphismen (-3737 T und -1464 C) hatten eine geringere Aktivierung der Transkription des proinflammatorischen *IL 1B*-Gens zur Folge [81].

a) *Transkriptionelle Aktivität in Abhängigkeit von Änderungen an Position -3737*



	-3737	-1464	-511	-31
a	C	G	C	T
b	T	G	C	T
c	C	G	T	C
d	T	G	T	C

b) *Transkriptionelle Aktivität in Abhängigkeit von Änderungen an Position -1464*



	-3737	-1464	-511	-31
a	C	G	C	T
b	C	C	C	T
c	C	G	T	C
d	C	C	T	C

**Abbildung 8: Analyse transkriptioneller Aktivität des IL 1B-Gens verschiedener Haplotypen.**

Abbildung modifiziert nach Chen et al., Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context, Human Molecular Genetics, 2006, Vol.15, No. 4, 519-529  
LPS = Lipopolysaccharide, PMA = Phorbol-12-myristat-13-acetat

a) ein Wechsel von Allel 1(C) zu Allel 2(T) an Position (Pos.) -3737 hatte keinen wesentlichen Effekt auf die Promotoraktivität (Kurve a gegen b); die erhöhte transkriptionelle Aktivität durch Allel 2 an Pos. -511 und -31 konnte jedoch maßgeblich durch gleichzeitiges Vorhandensein von Allel 2 an Pos. -3737 gesenkt werden (Kurve c gegen d).

b) Zu einer leichten Verminderung der Promotoraktivität kam es bei Änderung des SNP an Pos. -1464 von Allel 1(G) zu 2(C) im Vergleich zum Wildtyp (Kurve a gegen b). Lagen gleichzeitig an Pos. -511 und -31 die Allele 2 vor, konnte deren Einfluss auf eine erhöhte Promotoraktivität durch den SNP an Pos. -1464 maßgeblich gesenkt werden (Kurve c gegen d).

#### 1.7.4 Haplotypenpaare

Als ein Haplotypenpaar wird die Kombination beider in einem Individuum vorhandenen Haplotypen der doppelsträngigen DNA bezeichnet. 2008 wurde erstmalig auch der Einfluss von Haplotypenpaaren der *IL 1B*-Promotorregion auf den *IL 1β*-Spiegel *in-vivo* bestimmt [93]. Dabei konnte eine deutliche Assoziation zwischen vier der zehn untersuchten Haplotypenpaare mit höheren *IL 1β*-Spiegeln in menschlichem Speichel nachgewiesen werden.

#### 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Der Einfluss von Polymorphismen im *IL 1B*-Gen im Bezug auf das Risiko für ein Magenkarzinom mit oder ohne die gleichzeitige Einwirkung von *H. pylori* ist weiterhin nicht eindeutig geklärt. Daher ist auch fraglich, ob sich die Bestimmung der *IL 1B*-Polymorphismen als Screeningmethode für bestimmte Risikogruppen mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko eignet.

Die oben genannten neuen Erkenntnisse wurden in bisherige Studien noch nicht einbezogen und bis heute ist nicht genau bekannt, ob die von Chen und Kollegen *in-vitro* analysierten Haplotypen auch eine Auswirkung auf die Aktivität der Transkription des *IL 1B*-Gens *in-vivo* haben.

Die vorliegende Dissertation hatte zum Ziel, folgende Arbeitshypothesen zu bestätigen:

- 1) *Magenkarzinompatienten und deren erstgradige Angehörige sind häufiger Träger von SNP im IL 1B-Gen an den Positionen -3737, -1464, -511 und -31, im IL 1 RN-Gen beziehungsweise assoziierter Haplotypen.*
- 2) *Das Vorliegen von Polymorphismen im IL 1B-Gen ist assoziiert mit dem Auftreten präaligner Konditionen der gastralen Mukosa sowie mit spezifischen pathobiologischen Eigenschaften des Magenkarzinoms.*

Hierzu wurden Patienten mit Magenkarzinom, deren erstgradige Angehörige, Patienten mit einer Risikogastritis und eine gesunde Kontrollpopulation auf ihren *H. pylori*-Status geprüft und die Verteilung von Polymorphismen der Allele -3737, -1464, -511 und -31 im *IL 1B*-Gen sowie deren Haplotypenkonfiguration beurteilt. Berücksichtigt wurden dabei auch die VNTR des *IL 1 RN*-Gens.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Patientenkollektiv und Kontrollgruppen**

Insgesamt wurden 433 Individuen in die Studie eingeschlossen. Einbezogen wurden Patienten mit histologisch gesichertem Magenkarzinom, Patienten mit einer Risikogastritis (siehe unten), erstgradig Angehörige von Magenkarzinompatienten und magengesunde Kontrollen. Karzinompatienten und Patienten mit Risikogastritis sind im Zeitraum zwischen 1998 und 2008 in ambulanter oder stationärer Behandlung in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Deutschland, betreut worden.

Magenkarzinompatienten wurden therapienaiv nach Erstdiagnose in die Studie eingeschlossen. Ausschlusskriterien für diese Gruppe waren Zweitmalignome, signifikante chronische Erkrankungen (zum Beispiel chronisch entzündliche Darmerkrankungen, Leberzirrhose, HIV-Infektion), chirurgische Eingriffe am Gastrointestinaltrakt oder im pankreatiko-hepatobiliären System in der Eigenanamnese, die Einnahme bestimmter Medikamente, wie oraler Antikoagulanzen oder nichtsteroidaler Antirheumatika und bestehende Kontraindikationen gegen eine Gastroskopie.

Das Kollektiv der Patienten mit Risikogastritis wurde aus der Ambulanz der Klinik rekrutiert.

Das Kontrollkollektiv bestand zum einen aus gesunden Probanden ohne Anzeichen für gastrointestinale Erkrankungen (insbesondere keine dyspeptischen oder Refluxbeschwerden), die sich freiwillig im Rahmen klinischer Studien gemeldet hatten. Zum anderen zählten hierzu Patienten der Ambulanz, die sich zwar aufgrund dyspeptischer Beschwerden vorstellten, endoskopisch und histologisch jedoch keine Auffälligkeiten zeigten. Der Einschluss der ambulanten Patienten, Verwandten und der Kontrollen in die Studie sowie die Aufklärung und Einverständniserklärung erfolgte durch Dr. A. Leodolter im Rahmen einer spezifischen Sprechstunde. Die Studie wurde im Rahmen eines klinikinternen Forschungsprojektes zur Charakterisierung der Entzündung im Gastrointestinaltrakt bezüglich *H. pylori* und Gastroösophagealer Refluxerkrankung (Ethikvotum: 132/01) durchgeführt.

Ausschlusskriterien für die drei Vergleichsgruppen (Verwandte ersten Grades, Patienten mit Risikogastritis und die gesunde Kontrollgruppe) waren das Vorliegen einer malignen Erkrankung oder eine positive Eigenanamnese für ein Malignom. Des Weiteren wurden

Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, gastro-ösophagealer Refluxerkrankung oder chirurgischen Eingriffen im Gastrointestinal- und im pankreatiko-hepatobiliären System in der Vorgeschichte ausgeschlossen.

Nach Aufklärung und schriftlicher Einwilligung durch die Studienteilnehmer wurden demnach 116 Karzinompatienten, 142 Patienten mit einer Risikogastritis, 81 Verwandte ersten Grades von Magenkarzinompatienten und 94 magengesunde Kontrollen in die Studie eingeschlossen.

## **2.2 Endoskopie**

Die endoskopischen Untersuchungen wurden mit einem Standardendoskop vom Typ GIF Q 145 oder GIF Q 180 der Firma Olympus Optical Europe (Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Im Rahmen der Ösophago-Gastro-Duodenoskopie (ÖGD) wurden von jedem Patienten Biopsien der gastralen Mukosa entnommen, jeweils aus dem Antrum und dem Korpus. Die Antrumproben wurden 3 - 5 cm proximal des Pylorus von der großen und kleinen Kurvatur und die des Korpus an der Mitte der großen Kurvatur entnommen.

## **2.3 Histologische Charakterisierung von Patienten mit Magenkarzinom und Risikogastritis**

Die Schleimhautproben wurden im Institut für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg unter Nutzung etablierter Standardmethoden aufgearbeitet und die Färbungen (Hämatoxylin/Eosin; modifizierte Giemsa-Färbung für *H. pylori*-Nachweis) durch eine erfahrene Pathologin begutachtet. Biopisches Material oder chirurgische Resektate waren bei 98 der insgesamt 116 Karzinompatienten und bei allen 142 Patienten mit einer Risikogastritis verfügbar. Die histologische Bewertung einer vorhandenen Gastritis erfolgte semiquantitativ nach der überarbeiteten Sydney-Klassifikation von 1994 [82]. In die histologische Beurteilung ging die Aktivität der Entzündung unter Berücksichtigung der Infiltration mit neutrophilen Granulozyten und die Chronizität der Entzündung durch die Bewertung der Infiltration mit Lymphozyten und Plasmazellen mit ein. Zudem erfolgte eine Beurteilung der Atrophie des Drüsenkörpers, der intestinalen Metaplasie sowie der Kolonisation durch *H. pylori*. In einer vierstufigen Skala wurde die Ausprägung der einzelnen Parameter graduiert von normaler Schleimhaut (Grad 0) bis zu einer hochgradigen Ausbildung (Grad 3).

Zur histologischen Charakterisierung von Magenkarzinomen wurden diese nach Laurén in intestinale, diffuse und Mischtypen unterteilt [9]. Auch bei Vorliegen eines Karzinoms wurde eine vorhandene Entzündung der nicht neoplastischen Mukosa nach der überarbeiteten Sydney-Klassifikation bewertet, soweit das je nach Tumorausdehnung möglich war.

Unter den Begriff der Risikogastritis [28, 92] fielen

- a) die Pan-Gastritis mit gleich starker Entzündung der Mukosa im Magenkorpus und im Antrum,
- b) die korpusprädominante Gastritis mit oder ohne Atrophie der Magenschleimhaut und
- c) das Vorliegen einer intestinalen Metaplasie in Antrum oder Korpus.

## 2.4 Ermittlung des *H. pylori*-Status

Der *H. pylori*-Status wurde bei allen Studienteilnehmern serologisch bestimmt, da der Nachweis positiver *H. pylori*-Antikörper zum einen in hohem Maße mit einer Keimbesiedlung des Magens korreliert, zum anderen aber auch bereits abgelaufene und behandelte Infektionen durch diese Methode nachgewiesen werden können. Auf diese Weise war die Beurteilung der generellen Assoziation zwischen *H. pylori* und der Magenkarzinomentwicklung auch nach kurerter Infektion möglich. Unterstützend fanden andere Nachweismethoden wie die histologische Beurteilung der Bakterienbesiedlung mittels der modifizierten Giemsa-Färbung und der Harnstoff-Urease-Schnelltest (HUT<sup>®</sup>, Astra-Zeneca, Wedel, Deutschland) Anwendung. Letztgenannter Test wurde während der Endoskopie durchgeführt, wie vormals beschrieben [83].

### 2.4.1 Ermittlung der Anti-*H. pylori*-IgG

Den Patienten wurde eine Standardmonovette Blut (ca. 9 ml) zur serologischen Untersuchung sowie eine EDTA-Monovette zur Isolierung der Mononukleären Zellen (ca. 4,5 ml) entnommen. Das separierte Serum wurde bis zur Analyse der zu untersuchenden Faktoren bei 4° C gelagert. Danach wurden die Proben bei -20° C weiter aufbewahrt. Zur Bestimmung der *H. pylori*-IgG wurde das „Helicobacter pylori IgG ELISA-Kit“ der Firma Biohit HealthCare, Helsinki, Finland, verwendet.

Zunächst wurde eine zweihundertfache Verdünnung des Serums hergestellt. Die verdünnten Proben (100 µl) und vier Referenzserumproben wurden für eine Doppelbestimmung jeweils für 30 Minuten bei 37° C inkubiert. Nach dieser ersten Inkubation erfolgte die dreimalige

Zugabe von 350 µl Waschpuffer. Anschließend wurden 100 µl einer verdünnten Konjugatlösung, bestehend aus Meerrettichperoxidase gekoppeltem monoklonalem IgG in Stabilisierungspuffer, hinzugefügt. Es erfolgte eine erneute Inkubation bei 37° C für 30 Minuten. Ein weiterer Waschschrift mit dreimalig jeweils 350 µl Waschpuffer schloss sich an. Zur Visualisierung einer positiven Reaktion erfolgte im Anschluss die Zugabe von 100 µl Tetramethylbenzidin und eine Inkubation für 30 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Nach dem Stoppen der Enzymreaktionen durch Zusatz der schwefelsäurehaltigen Stop-Lösung erfolgten die Ablesungen spektralphotometrisch bei 450 nm. Aus den mittleren Absorptionswerten für die von Patienten entnommenen Proben wurden die Enzym-Immunoheiten berechnet. Eine Serumprobe galt als positiv bei einem Titer von  $\geq 30$  EIU und als negativ bei Werten  $< 30$  EIU.

#### 2.4.2 Ermittlung des CagA-Status

Ebenfalls serologisch wurde die Anwesenheit von spezifischen CagA-Antikörpern im Serum der Patienten mittels des CagA IgG ELISA Kit™ (Omega / Genesis Diagnostics, Cambridgeshire, UK), wie vom Hersteller beschrieben, bestimmt.

Die Patientenproben wurden hierfür zweihundertfach verdünnt. 100 µl dieser Verdünnung sowie mehrere Standards und positive und negative Kontrollen wurden in dafür vorgesehenen Vertiefungen einer Platte für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten drei automatische Waschschriffe. Im Anschluss wurden 100 µl einer Konjugatlösung, bestehend aus meerrettichperoxidasegekoppelten monoklonalen Kaninchen-IgG in Stabilisierungspuffer, hinzugefügt. Eine erneute Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur und vier Waschschriffe schlossen sich an. Danach wurden mit einer Repetierpipette 100 µl TBM-Substrat in jede Vertiefung gegeben und die Platte für 10 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe von 100 µl Stopplösung konnte die optische Dichte spektralphotometrisch bei 450 nm bestimmt werden. Im Vergleich mit den unterschiedlich verdünnten Standards konnte der CagA-Status ermittelt werden. Werte über 6,25 U/ml sprachen dabei für einen signifikanten CagA-Antikörperspiegel und wurden als positiv gewertet.

#### 2.5 DNA-Isolierung

Nach Zentrifugation des EDTA-Blutes der Patienten wurde die Gesamt-DNA der Zellen (mononukleäre Zellen) unter Nutzung eines in unserem Labor etablierten Protokolls

extrahiert. Dafür wurde das QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Worldwide / Germany) verwendet.

200 µl der zu untersuchenden Zellen wurden in einen 1,5 ml Röhrchen mit 20 µl Proteinase K und 200 µl Puffer AL gegeben. Durch anschließendes Mischen und Inkubation für 10 Minuten bei 56° C wurden die Zellen durch die Proteinase enzymatisch zerstört. Danach wurden je Probe 200 µl 96%iges Ethanol hinzugegeben und wieder gemischt, sodass die Bindungsfähigkeit der DNA erhöht war. Der gesamte Inhalt eines Röhrchens wurde in eine Zentrifugiersäule mit einem 2 ml Sammelröhrchen gegeben. In der Zentrifugiersäule befand sich eine Silika-Membran, an der die DNA binden konnte. Durch Zentrifugation mit 8000 U/min (Umdrehungen pro Minute; entspricht 6000x g) für eine Minute wurden andere Bestandteile des Gemisches durch die Membran in das Sammelröhrchen gedrückt. Die Zentrifugiersäule wurde anschließend in ein neues Sammelröhrchen überführt. Nach Zugabe von 500 µl Puffer AW1 wurde erneut für eine Minute bei 8000 U/min zentrifugiert. Ein weiterer Reinigungsschritt mit 500 µl Puffer AW2 schloss sich an. Es wurde für 3 Minuten mit 13000 U/min zentrifugiert. Die Zentrifugiersäule wurde wieder in ein neues Sammelröhrchen überführt und trocken zentrifugiert. Nach Überführung der Zentrifugiersäule in ein sauberes 1,5 ml Röhrchen erfolgte die Zugabe von 100 µl Puffer AE zu den Proben. Dieser hatte die Aufgabe, die DNA aus der Membran zu lösen. Das Gemisch wurde für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und für eine Minute (8000 U/min) zentrifugiert. Nach erneuter Zugabe von 100 µl Puffer AE wurde dieser Vorgang wiederholt.

## **2.6 Polymerasekettenreaktion zur Vervielfältigung bestimmter DNA-Abschnitte**

Die so extrahierte DNA wurde für anschließende Genanalysen der SNP *IL 1B* -3737 und -1464 mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) unter Verwendung des HotStar Taq Plus master Mix Kit (Qiagen, Worldwide / Germany) vervielfältigt.

Hierfür wurde ein Gemisch mit einem Gesamtvolumen von 30 µl je Ansatz hergestellt. Verwendet wurde für alle Ansätze ein Hst Master Mix (HotStar Taq Master Mix), welcher die Polymerase, Puffer, Salze und Wasser enthält. Um einen bestimmten Genabschnitt zu vervielfältigen, waren zwei genspezifische Primer notwendig (**Tab. 2 unter 2.7**).

Zum Master Mix wurden je 0,2 µl des „forward“ (fw) und 0,2 µl des „reverse“ (rw) Primers, sowie 2 µl des DNA-Ansatzes hinzugefügt. Der Rest zu 30 µl Gesamtvolumen wurde mit RNase freiem Wasser aufgefüllt (**Abb. 9**).



30,0 µl	Gesamt
- 15,0 µl	Master Mix (zweifach konzentriert)
- 0,2 µl	fw Primer (50 µM)
- 0,2 µl	rw Primer (50 µM)
- 2,0 µl	DNA
<hr/>	
= 12,6 µl	RNAse freies Wasser

**Abbildung 9: Zusammensetzung des Ansatzes für die PCR.**  
fw = forward, rw = reverse

In einem Thermocycler wurden anschließend 35 Zyklen zur Primeranlagerung und Elongation der DNA durchlaufen (**Tab. 1**).

**Tabelle 1: Schritte der PCR.** Bei den angegebenen Temperaturen werden die jeweiligen Ziele erreicht, durch Temperaturänderung wird der nächste Schritt eingeleitet

Dauer	Temperatur	Ziel
15 min	95° C	Polymeraseaktivierung
35 sec	95,5° C	DNA-Denaturierung
30 sec	52° C	Primeranlagerung
30 sec	72° C	Elongation
10 min	72° C	abschließende Elongation

} 35 x

## 2.7 Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus zur Analyse der Polymorphismen an Position IL1B -3737 und -1464

### 2.7.1 Polymorphismen an Position IL1B -3737

Nach Erhalt des PCR-Produktes mit den Primern -3737 (OPERON eurofins, mwg / operon) konnte die Restriktion mit dem Enzym Drd I erfolgen (**Tab. 2**).

Dazu wurden 7 µl des PCR-Produktes mit 23 µl eines Restriktionsmastermixes versetzt. Dieser bestand aus 0,3 µl Drd I, 3 µl Puffer (NEPuffer 4) und Wasser. Der Ansatz musste für drei Stunden bei 37° C inkubiert werden.

### 2.7.2 Polymorphismen an Position IL1B -1464

Nach der PCR mit den Primern -1464 (OPERON eurofins, mwg / operon) erfolgte die Restriktion des Produktes mit dem Enzym Sty I (**Tab. 2**).

**Table 2: Primer und mögliche Produkte der RFLP-Analyse der SNP's -1464 und -3737.** Die Enzyme spalten die PCR-Produkte je nach Vorhandensein des Genotyps an der zu untersuchenden Stelle in unterschiedlich große Fragmente; liegt an Position -1464 des IL 1B-Gens der Genotyp T/T vor, erfolgt keine Spaltung, sodass nur Fragmente mit 163 Basenpaaren (bp) vorhanden sind. Liegt der heterozygote Typ vor, sind neben ungespaltenen Fragmenten von 163 bp auch kürzere Fragmente von 127 bp und 36 bp vorhanden. Bei Vorliegen von -1464 C/C kann man nur die beiden kürzeren Fragmente vorfinden. Ist der Genotyp -3737 C/C vorhanden, können in der Gelelektrophorese nur gleich lange Fragmente von 143 bp sichtbar gemacht werden. Daneben gibt es beim heterozygoten Typ zusätzlich Fragmente mit einer Länge von 108 und 35 bp. Beim homozygoten G/G-Genotyp finden sich nur die beiden kürzeren Fragmente.

SNP	Primer	Enzym	Fragmente
-1464	5'-CCC-TCG-TGT-CTC-AAA-TAC-TTG-C-3' 5'-GCA-CAG-TGC-CTG-GCA-TGT-AC-3'	Sty I	C/C: 127 bp, 36 bp C/T: 163 bp, 127 bp, 36 bp T/T: 163 bp
-3737	5'-GCC-CTC-CTT-GTT-CTA-GAC-CAG-GGA-GGA-GAC-TGG-AAT-G-3' 5'-ATC-GCT-TCC-ACT-TCC-TTT-ATG-GCA-TC-3'	Drd I	G/G: 108 bp, 35 bp G/C: 143 bp, 108 bp, 35 bp C/C: 143 bp

Auch hierzu wurden 7 µl PCR-Produkt mit 23 µl Restriktionsmastermix, bestehend aus 0,3µl des Enzyms, 3 µl Puffer (NEPuffer 3) 0,3 µl BSA und Wasser, versetzt. Dieser Ansatz wurde ebenfalls bei 37° C für drei Stunden inkubiert.

Durch die Restriktionsenzyme entstanden Fragmente unterschiedlicher Länge, je nach vorliegendem Genotyp an den Positionen -1464 und -3737 des IL 1B-Gens (**Tab. 2**).

### 2.7.3 Gelelektrophorese

Die Fragmentlängen der RFLP-Produkte wurden per Agarosegelelektrophorese in 2%igem Agarosegel überprüft.

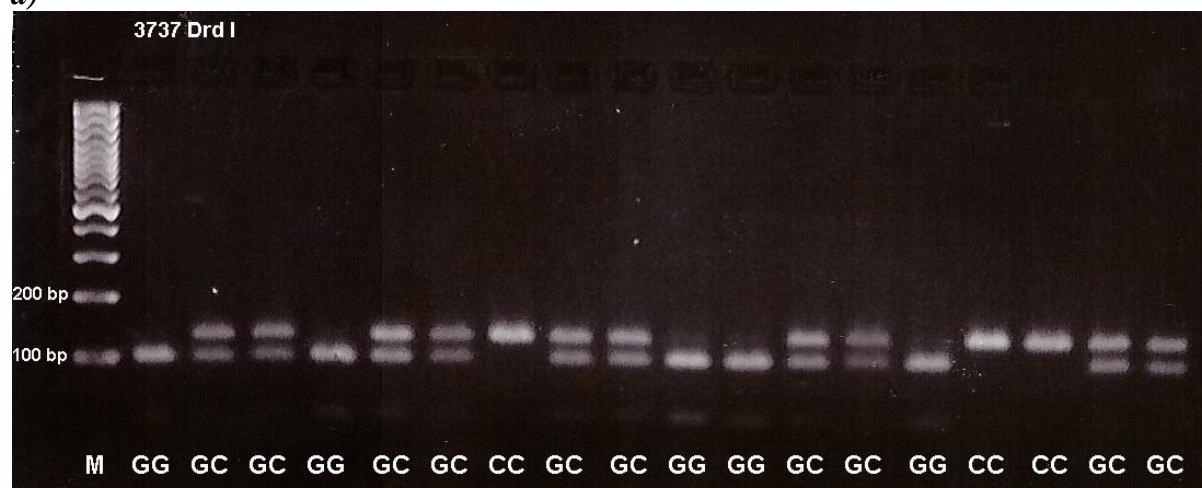
1,2 g Agarose (Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde in 60 ml 1 x TBE-Puffer (im Labor selbst angesetzt mit Reagenzien der Firma Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) gelöst, in der Mikrowelle bei 600 W erhitzt, mit Ethidiumbromid versetzt, welches in Nukleinsäuren interkaliert, und anschließend in einen 12 cm breiten Gelträger gegossen. Nach dem Erkalten wurde das Gel in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt.

Zu den 30 µl der RFLP-Produkte wurden je 8 µl Ladepuffer gegeben. Jede Geltasche wurde mit 20 µl dieses Gemisches beschickt. Die Elektrophorese erfolgte für 1,5 Stunden bei 95 V.

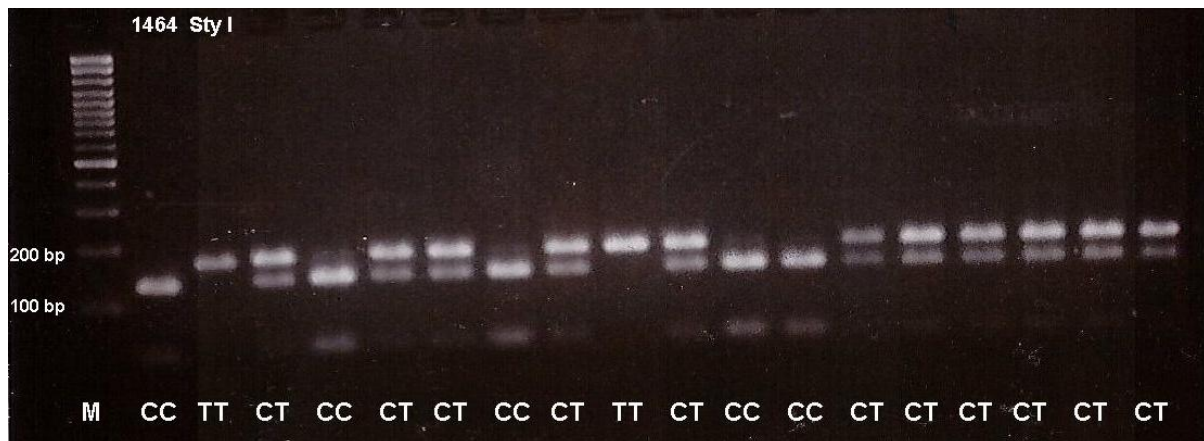
Die DNA-Banden wurden mittels eines UV-Transilluminators (Herolab, Biometra, Göttingen, Deutschland) sichtbar gemacht, wobei das interkalierende Ethidiumbromid durch seine Fluoreszenz die Nukleinsäuren markierte.

Wie in Tabelle 2 dargestellt, waren je nach vorliegendem Genotyp eine, zwei oder drei DNA-Banden in der Agarosegelelektrophorese nachweisbar, auf deren Grundlage der jeweilige Genotyp bestimmt wurde.

a)



b)



**Abbildung 10 a und b: Ergebnisse der Gelelektrophorese.**

Wie in Tabelle 2 aufgezeigt, werden nach der Gelelektrophorese eine, zwei oder drei DNA-Banden sichtbar.

Daraus lässt sich der Genotyp an den Positionen -3737 (Abbildung a) und -1464 (Abbildung b) schlussfolgern.

## **2.8 Analyse des IL1B-Gens an Position -511 und -31**

Die SNP der Position -511 und -31 wurden unter Verwendung einer massenspektrometrischen Methode analysiert. Diese Untersuchungen wurden von der Arbeitsgruppe um PD Dr. Kähne (Institut für Experimentelle Medizin) durchgeführt.

Die Methodik basiert auf der sequenzspezifischen Verlängerung der PCR-Produkte in Gegenwart von Didesoxynukleosidphosphaten („Sanger-Methode“), bei der es zu einem Abbruch der Reaktion nach Einbau eines Didesoxynukleosidphosphates kommt. Dadurch entstehen PCR-Produkte mit geringfügigen Massenunterschieden, die in der Massenspektrometrie identifiziert werden können. Auf der Basis der auftretenden Signale „peaks“ lässt sich nachfolgend der Genotyp ermitteln. Da diese Untersuchungen im Rahmen eines Kooperationsprojektes zwischen den Einrichtungen durchgeführt wurden und ich nicht direkt daran beteiligt war, habe ich auf die Darstellung der methodischen Details verzichtet. Diese sind in der Originalpublikation dargestellt [10].

## **2.9 Bestimmung der Allele im IL 1 RN-Gen**

Die Anzahl der Tandem Repeats im Intron 2 des *IL 1 RN*-Gens wurde durch die Durchführung einer PCR und anschließende Gelelektrophorese wie oben beschrieben ermittelt. Es wurden die Primer 5'-CTC-AGC-AAC-ACT-CCT-AT-3' und 5'-TCC-TGG-TCT-GCA-GGT-AA-3' verwendet. Die verschiedenen Allele wurden durch unterschiedliche Längen der PCR-Fragmente ermittelt.

### 2.10 Einteilung der Haplotypen

Nach Ermittlung der SNP an Position -3737, -1464, -511 und -31 des *IL 1B*-Gens wurden die Haplotypen, wie von Chen *et al.* beschrieben, eingeteilt (**Tab. 3**) [81].

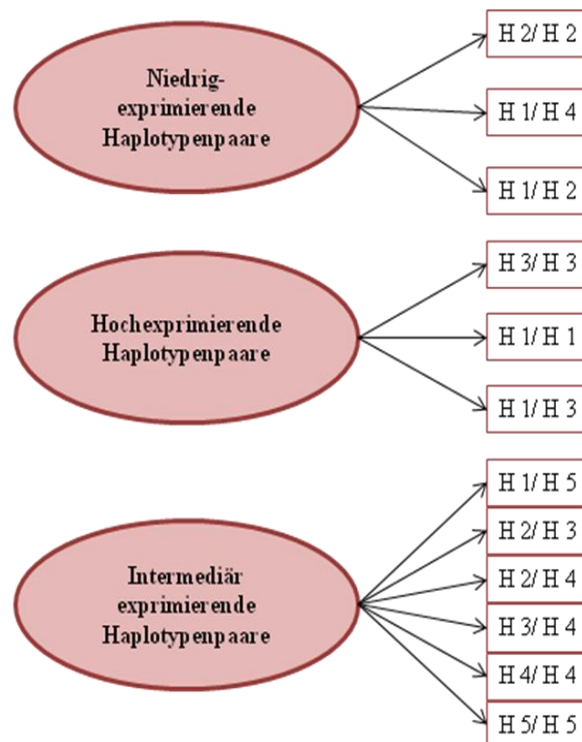
**Tabelle 3: Auflistung der häufigsten Haplotypen.** Unter dem Haplotypen 5 wurden alle selteneren Haplotypen zusammengefasst.

Haplotyp	-3737	-1464	-511	-31
H1	T	G	C	T
H2	C	C	T	C
H3	C	G	C	T
H4	C	G	T	C
H5	seltene	Haplotypen		

H = Haplotyp, C = Cytosin, G = Guanin, T = Tyrosin

### 2.11 Einteilung der Haplotypenpaare

Unter Berücksichtigung neuerer Erkenntnisse über die Bedeutung von Haplotypenpaaren, wie sie von Rogus *et al.* beschrieben wurden, erfolgte auch eine Beurteilung dieser Paarungen [93]. Basierend auf den von Rogus *et al.* verfassten Daten wurden die Haplotypenpaare in drei Gruppen zusammengefasst. Es ergeben sich dabei Paare, die zu einer eher niedrigen Genexpression des *IL 1B*-Gens führen, wie Kombinationen, die nur den Haplotyp 2 oder 4 enthalten. Andererseits existieren Haplotypenpaare, die zu einer hochexprimierenden Gruppe gezählt werden. Dazu gehören Kombinationen, die den Haplotyp 1 oder 3 beinhalten. In eine intermediäre Gruppe werden alle übrigen Kombinationen eingeordnet (**Abb. 11**).



**Abbildung 11: Einteilung der Haplotypenpaare in Gruppen.**

Haplotypenpaare, die entweder den Haplotyp 2 oder den Haplotyp 4 besaßen, wurden zu niedrigexprimierenden Haplotypenpaaren gezählt. Kombinationen aus Haplotypen 1 und 3 wurden in die Gruppe der hochexprimierenden Haplotypen eingeordnet. Restliche Kombinationen gehörten in eine intermediäre Gruppe [93]. *H* = Haplotyp

## 2.12 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurden parametrische und nicht parametrische Tests angewendet. Das mittlere Alter der Studienkollektive wurde mittels ANOVA-Test verglichen, kategoriale Daten wie z.B. das Geschlecht oder der Genotyp mittels Chi-Quadrat-Tests oder des Exakt Tests nach Fisher verglichen. Zusätzlich wurde die Odds Ratio zur Risikobewertung für Karzinompatienten und Patienten mit Hochrisikogastritis gegenüber dem Kontrollkollektiv bezüglich der Assoziation zu verschiedenen Polymorphismen und Haplotypenkonfigurationen bestimmt. Als Odds Ratio (OR) bezeichnet man dabei das Maß des Zusammenhangs zwischen der Exposition gegenüber einem Risikofaktor und einer Ereignisvariablen. Die OR beschreibt die Wahrscheinlichkeit des Eintretens eines bestimmten Ereignisses unter dem Einfluss eines bestimmten Faktors, im Vergleich zu der Wahrscheinlichkeit dass das Ereignis auch ohne Exposition auftritt (OR=1: Faktor hat keinen Einfluss auf das Ereignis, OR>1: Faktor ist mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Ereignis assoziiert, OR<1: Faktor ist mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für das Ereignis assoziiert) [84]. Für alle Analysen wurde ein zweiseitiger p-Wert von 0,05 als signifikant angenommen. Für die Analysen stand die SPSS Version 16.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) zur Verfügung.

Um den Einfluss spezifischer Faktoren auf das Risiko sowohl für ein Magenkarzinom als auch für eine Hochrisikogastritis zu untersuchen wurde eine generalisierte lineare Modell-Analyse angewandt (ein logistisches Regressionsmodell). Wir berücksichtigten hierbei Alter, Geschlecht, *H. pylori*-Status und Lauren-Typ als Kovariablen in unserem Regressionmodell, um sowohl den direkten Effekt als auch eine mögliche Interaktion der Parameter zu erfassen.

### **2.13 Eigenanteil der experimentellen Arbeiten**

Die in dieser Dissertation verwendeten, experimentell ermittelten Daten wurden mit Hilfe von Frau Stolz und Frau Holley zusammengetragen. Alle oben genannten Methoden wurden von mir erlernt und die genutzten Daten wurden von mir teilweise selbst erhoben. Weiterführende Computeranalysen zur Differenzierung der Tumorcharakteristika bei Karzinompatienten gingen über das Maß dieser Arbeit hinaus und wurden daher in diesem Rahmen nicht erwähnt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Demographische Daten der Patientengruppen

Es wurden insgesamt 433 Individuen in die Studie eingeschlossen. Im Einzelnen waren dies 116 Patienten mit einem Magenkarzinom sowie 81 erstgradig Verwandte dieser Patienten, weiterhin 142 Patienten mit einer Risikogastritis und 94 Personen, die klinisch gesund waren oder bei dyspeptischen Beschwerden keine histologisch nachweisbaren Magenschleimhautveränderungen aufwiesen (Kontrollgruppe). Populationspezifische Charakteristika sind in Tabelle 4 aufgeführt.

**Tabelle 4: Zusammensetzung der Studienkollektive.** Signifikanz im Gruppenvergleich für  $p < 0.05$ . Der ANOVA-Test wurde zum Vergleich des Alters, der Chi-Quadrat-Test für Vergleiche der übrigen Merkmale angewendet.

	Magen-Ca (n= 116)	Risikogastritis (n= 142)	Kontrollen (n= 94)	Erstgradig Verwandte (n=81)	<i>p</i>
Alter in Jahren (Mittelwert ± Standardabw)	65,67 ± 13,4	61,0 ± 11,1	42,2 ± 15,4	48.06 ± 12.7	< 0,001*
Geschlecht männlich/weiblich	78 / 38 67,2 % / 32,8 %	65 / 77 45,8 % / 54,2 %	49 / 45 52,1 % / 47,9 %	32 / 49 39.5 % / 60.5 %	< 0,001*
<i>H. pylori</i> -positiv / -negativ	92 / 24 79,3 % / 20,7 %	122 / 20 85,9 % / 14,1 %	61 / 33 64,9 % / 35,1 %	59 / 22 72,8 % / 27,2 %	0,003*
<i>CagA</i> -positiv / -negativ	80 / 12 87,0 % / 13,0 %	105 / 17 86,0 % / 14,0 %	41 / 20 67,2 % / 32,8 %	39 / 20 66.1 % / 33.9 %	<0,001*

Der *CagA*-Status bezieht sich auf alle *H.pylori*-positiven Individuen. Magen-Ca = Magenkarzinom; Standardabw. = Standardabweichung, „\*“ = signifikantes Ergebnis

Ein signifikanter Unterschied zeigte sich im Alter der Untersuchungsgruppen. Patienten mit Risikogastritis oder Magenkarzinom zeigten ein höheres mittleres Alter als die beiden Vergleichsgruppen.

Der höchste Anteil männlicher Individuen war dabei bei Karzinompatienten zu finden, während die Gruppe erstgradig Angehöriger von Karzinompatienten den geringsten Anteil männlicher Individuen aufzeigte.

Ein Vergleich des *H. pylori*-Antikörperstatus unter den vier Kollektiven zeigte ebenfalls signifikante Differenzen. Insgesamt waren 79 % der Karzinomgruppe und 86 % der



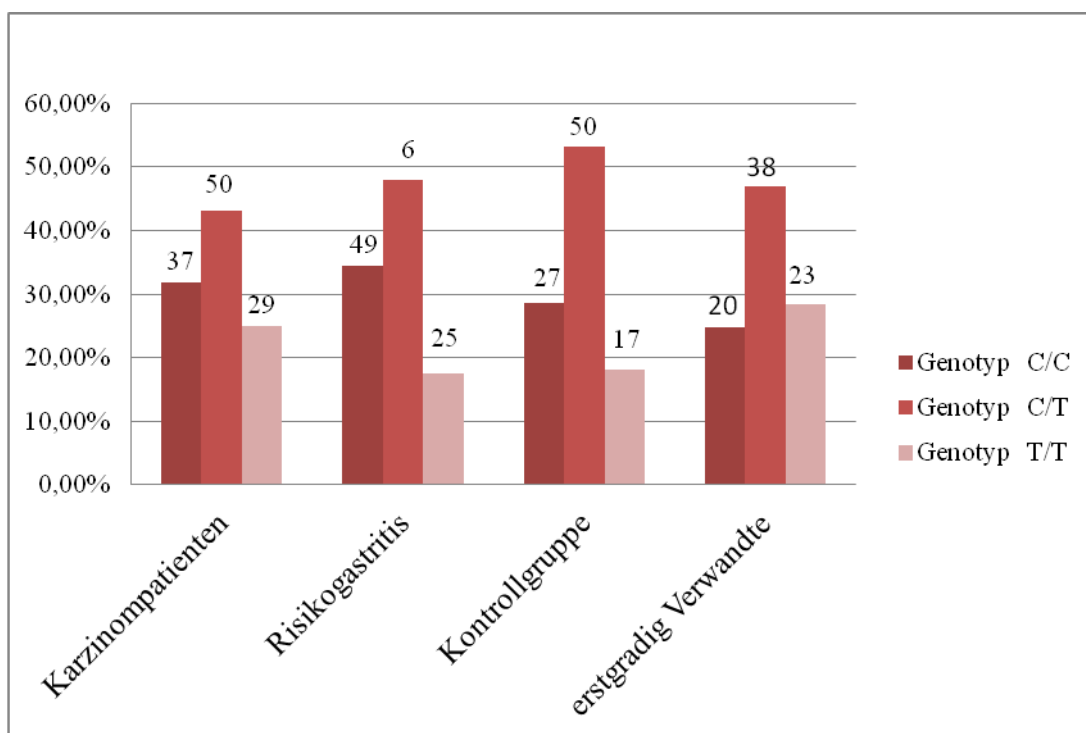
Risikogastritis-Gruppe *H. pylori*-positiv. Bei erstgradig Verwandten und den Kontrollen traf dies auf weniger Teilnehmer zu, obwohl auch hier der Anteil an *H. pylori*-positiven Individuen über 50 % lag.

### 3.2 Untersuchung der IL 1 $\beta$ -Polymorphismen

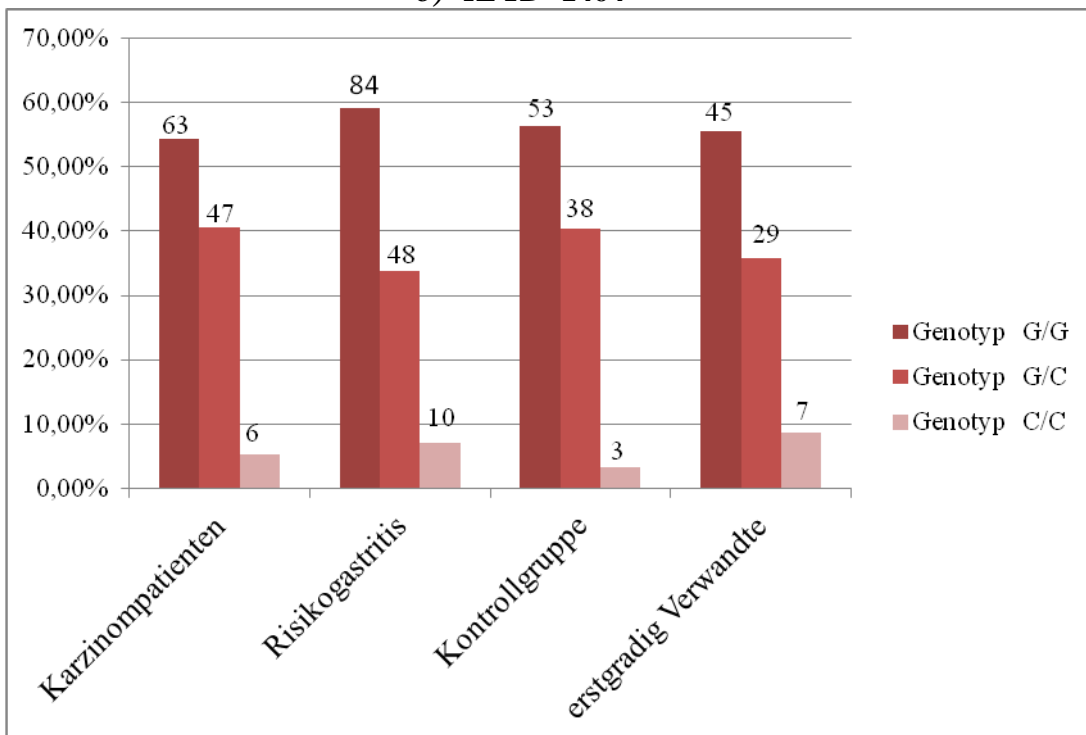
Bei allen Studienteilnehmern wurde der Genotyp der Loci -3737, -1464, -511 und -31 im *IL 1B*-Gen bestimmt (Abb. 12a-d).

Eine Kopplung bestimmter Allelkombinationen der Genloci -511 und -31 im *IL 1B*-Gen trat bei 429 von 433 (99 %) der untersuchten Probanden auf. Sie zeigten entweder den Haplotyp -511T/-31C oder den Haplotyp -511C/-31T.

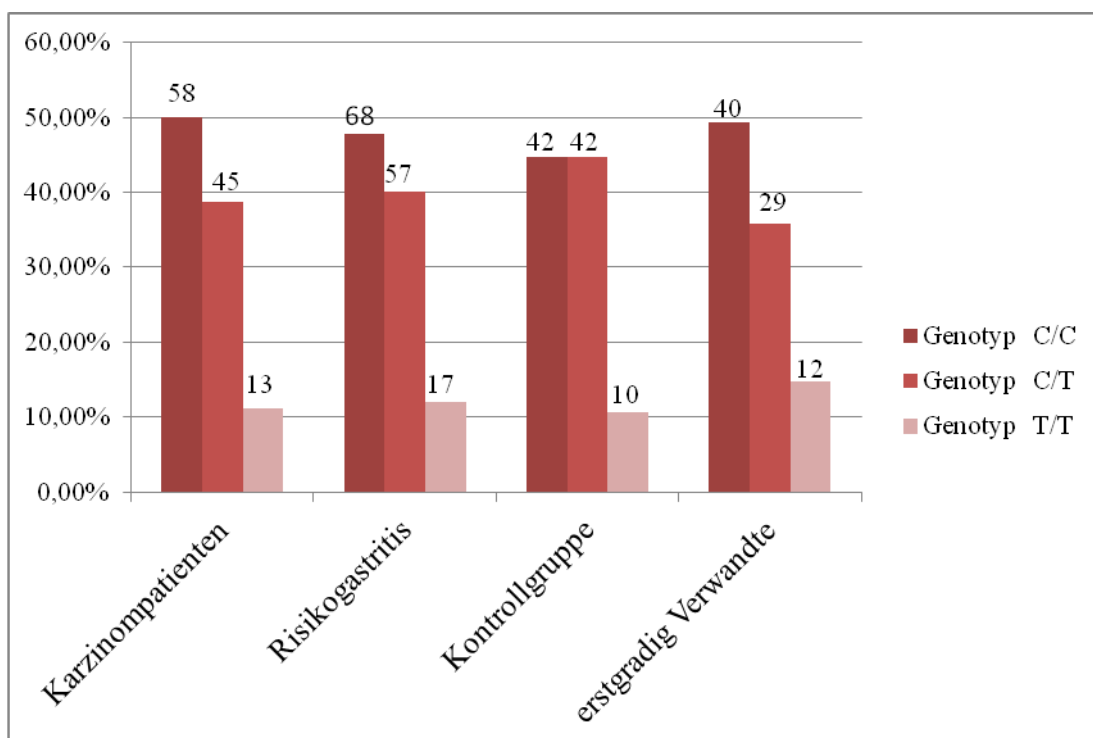
#### a) *L 1B -3737*

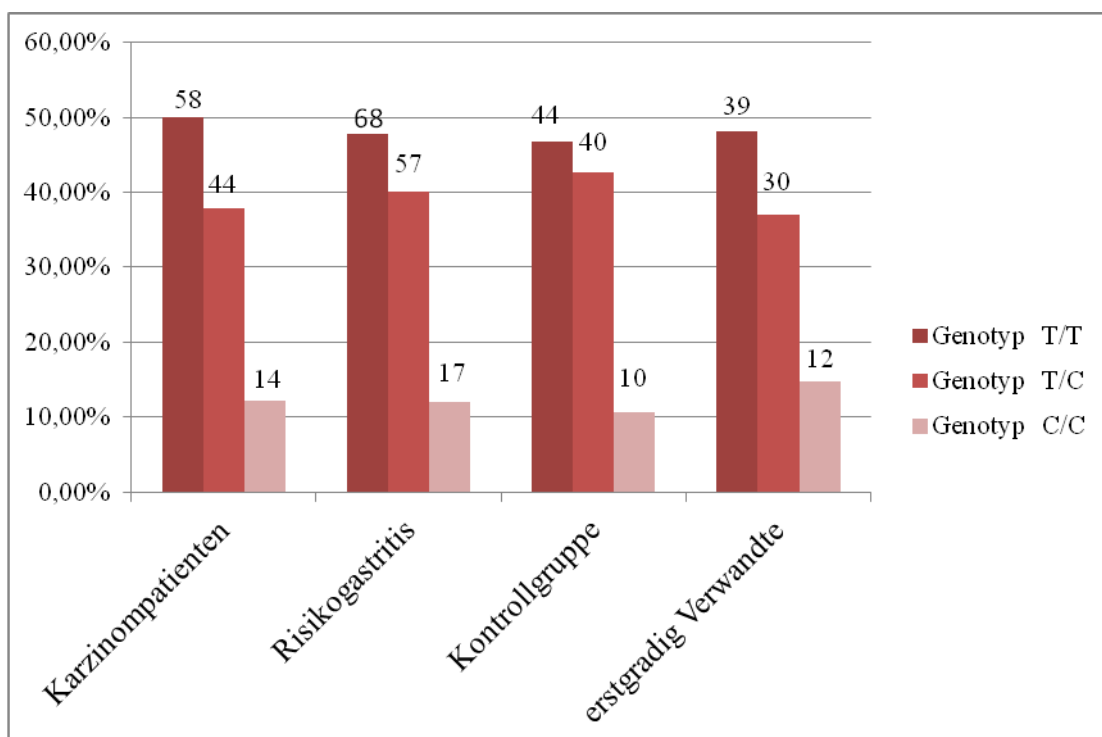


**b) IL 1B -1464**



**c) IL 1B -511**



d) *IL 1B -31*

**Abbildung 12 a-d.:** Verteilung der Genotypen an Position -3737, -1464, -511 und -31 des *IL 1B*-Gens zwischen den Patientengruppen. C (Cytosin), T (Tyrosin), G (Guanin). Darstellung im prozentualen Anteil. Die Zahlen über den Säulen geben die absolute Patientenanzahl mit dem jeweiligen Genotyp in den Gruppen wieder. Im Vergleich der Häufigkeitsverteilung zwischen den einzelnen Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Chi-Quadrat-Test; Position -3737:  $p = 0,337$ ; Position -1464:  $p = 0,686$ ; Position -511:  $p = 0,920$ ; Position -31:  $p = 0,977$ ).

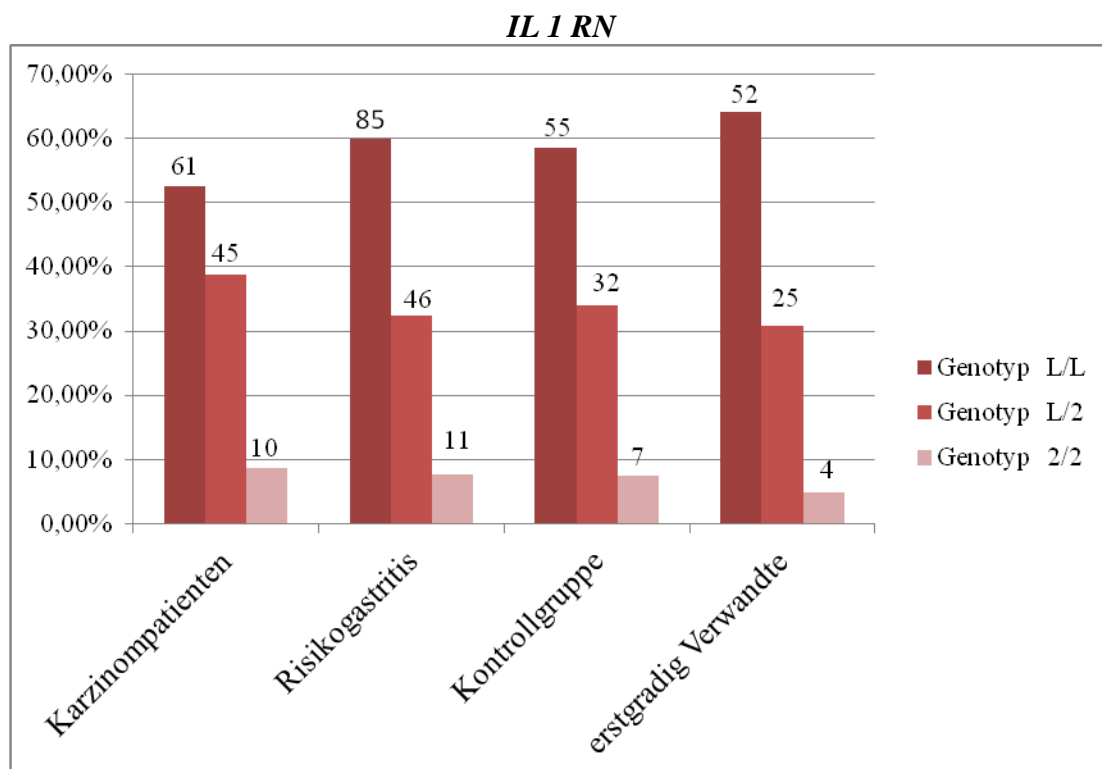
Eine globale Analyse der Genotypenfrequenzen in den Kollektiven wies an Position -3737 ein häufiges Auftreten des C/T-Genotyps auf. Das homozygote Vorliegen von jeweils zwei Allelen des Wildtyps (C) oder der Alternativvariante war in allen Kollektiven seltener. Für die Häufigkeit der Genotypen an den Positionen -1464, -511 und -31 zeigte sich ein anderes Verteilungsmuster. An diesen drei Genloci lag die homozygote Wildtypvariante bei allen Patientenkollektiven am häufigsten vor. Das homozygote Vorliegen des Alternativallels war in allen Kollektiven am seltensten anzutreffen (**Abb. 12 a-d**).

Jedoch zeigte die Verteilung der Genotypen an allen untersuchten Positionen des *IL 1B*-Gens keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kollektiven.

Es wurden weiterhin die OR und das 95 % KI für die Gruppen der Karzinompatienten und der Risikogastritis jeweils im Vergleich zu gesunden Probanden als Referenzgruppe bestimmt. Die Ergebnisse sind im Anhang aufgeführt (**Anhang 1**). Auf den Vergleich der erstgradig Verwandten mit der Kontrollgruppe zur Bestimmung der OR wurde dabei verzichtet.

### 3.3 Analyse des *IL 1* Rezeptorantagonist-Gens

Zur Analyse der VNTR im Intron 2 des *IL 1 RN*-Gens erfolgte zunächst eine Zusammenfassung der verschiedenen Allelkombinationen in drei Gruppen. Der Genotyp 2/2 stand dabei für das homozygote Vorliegen des Allels 2. Allele mit drei oder mehreren „tandem repeats“ (Allel 1, 3, 4 und 5) wurden zu den langen Wiederholungen zusammengefasst (L). Bei fehlendem Allel 2 lag demnach der Genotyp L/L vor. Fand sich bei der Analyse ein Allel 2 und eines mit einer langen Wiederholung, so wurde dieser Genotyp mit L/2 betitelt (**Abb. 13**). In allen vier Patientengruppen trat der L/L-Genotyp am häufigsten auf. Ein homozygoter Auftreten des Allels 2 lag in den vier Gruppen jeweils unter 10 %. Bezüglich der Verteilung der Genotypen lag zwischen den einzelnen Studiengruppen kein statistisch signifikanter Unterschied vor ( $p = 0,780$ ).



**Abbildung 13: Verteilung der VNTR (variable number of tandem repeats) im Intron 2 des *IL 1 RN*-Gens zwischen den Patientengruppen.**

L = Allele mit langen Wiederholungen (> 3), 2 = Allel mit 2 Wiederholungen. Darstellung im prozentualen Anteil. Die Zahlen über den Säulen geben die absolute Patientenanzahl mit dem jeweiligen Genotyp in den Gruppen wieder. Im Vergleich der Häufigkeitsverteilung zwischen den einzelnen Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Chi-Quadrat-Test).

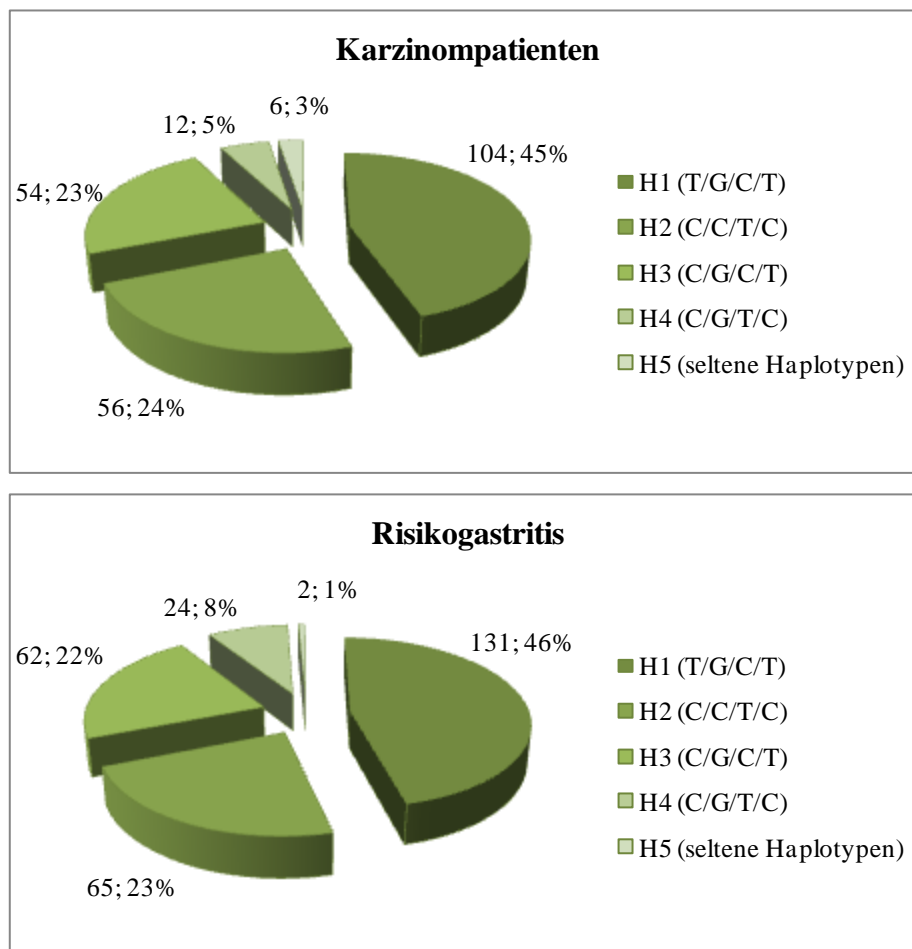
Zur Risikostratifizierung erfolgte eine weitere Zusammenfassung in nur zwei Genotypengruppen, wobei Träger des Genotyps „2“ (L/2 und 2/2) in eine Gruppe und die

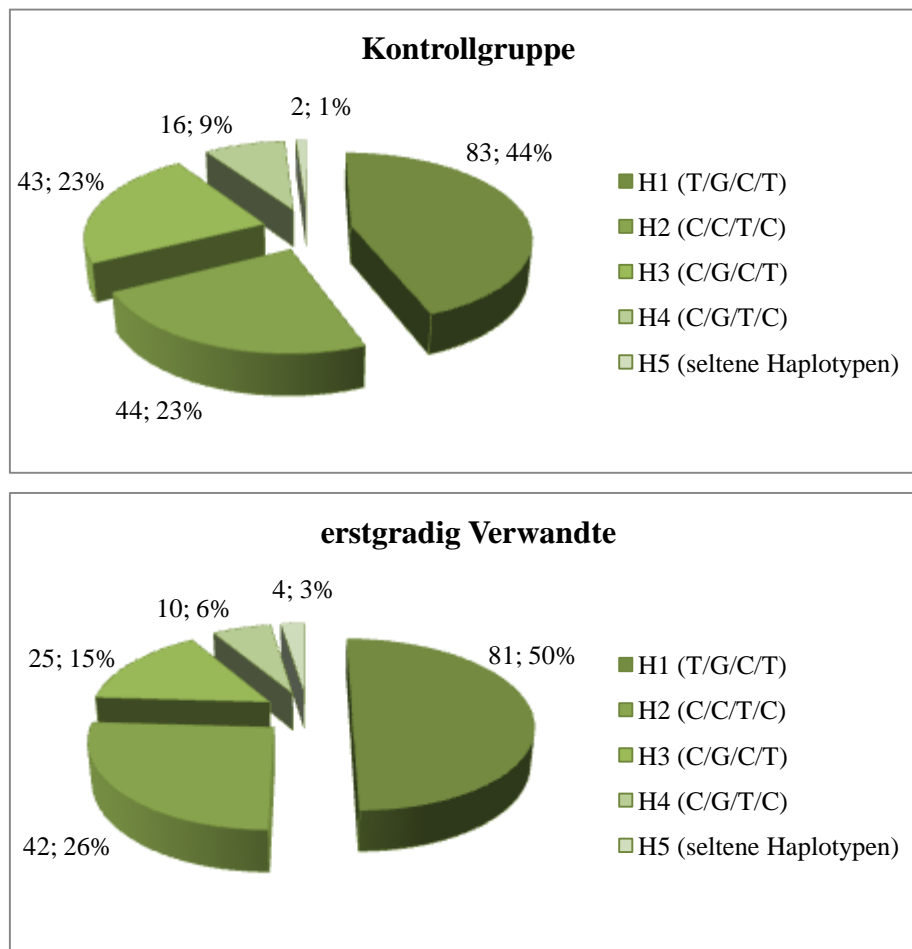
Probanden mit einem L/L-Genotyp in die andere Gruppe eingeteilt wurden. Jedoch ließ sich auch hier kein Unterschied im Auftreten der jeweiligen Genotypen zwischen den vier Kollektiven nachweisen ( $p = 0,414$ ).

### 3.4 Analyse der Haplotypen

#### 3.4.1 Haplotypenanalyse allgemein

Basierend auf der von Chen *et al.* beschriebenen Haplotypenzusammensetzung wurden die ermittelten Informationen über die Genotypen an den vier Positionen der Promotorregion des *IL 1B*-Gens den entsprechenden Haplotypen zugeordnet (**Abb. 14**). Eine Zuteilung zu den vier häufigsten Haplotypen war in 852 der insgesamt 866 Fälle (98,4 %) möglich, während nur 14 Proben (1,6 %) nicht diesen Haplotypen zugeordnet werden konnten und in einer weiteren Gruppe (H5) zusammengefasst wurden. Alle sich anschließenden Berechnungen umfassen nur die Berücksichtigung der Haplotypen 1 - 4.





**Abbildung 14: Häufigkeitsverteilung der Haplotypen in den verschiedenen Kollektiven.**

H1 - H5 = Haplotypen 1 - 5, in Klammern die jeweilige Abkürzung der Base an den Genloci -3737, -1464, -511 und -31 des IL1B-Gens (C = Cytosin, T = Tyrosin, G = Guanin), Darstellung jeweils in absoluter Anzahl in den Patientenkollektiven und prozentual (Unterschiede nicht statistisch signifikant, Chi-Quadrat-Test).

Der Haplotyp 1 war in allen Kollektiven am häufigsten zu finden. Der Haplotyp 4 fand sich am seltensten. Die Verteilung der jeweiligen Haplotypen 1 - 4 zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen ( $p = 0,625$ ).

Bei den Haplotypvergleichen wurde die Ermittlung der OR und des 95 % KI für Karzinompatienten und Patienten mit einer Risikogastritis angeschlossen. Der Haplotyp 3 galt in diesen Untersuchungen als Bezugspunkt. Ein Vergleich mit erstgradig Verwandten von Karzinompatienten wurde nicht vorgenommen. Als Referenzgruppe galt das Kontrollkollektiv (**Anhang 1**). Es konnte für keinen Haplotypen eine Assoziation zwischen dem Auftreten eines Magenkarzinoms oder einer Risikogastritis nachgewiesen werden.

Es wurde ein Vergleich der Verteilung weiblicher und männlicher Individuen bei Vorliegen der jeweiligen Haplotypen durchgeführt, um einen Zusammenhang zwischen den höher

aktiven Haplotypenvarianten 2 und 4 und einem der beiden Geschlechter auszuschließen (**Tab. 5**).

**Tabelle 5: Geschlechterverteilung unter den Haplotypen 1 - 4.** (Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant; Chi-Quadrat-Test;  $p = 0,272$ )

	<b>Männlich</b>	<b>Weiblich</b>
<b>H1</b>	204 (51,1 %)	195 (48,9 %)
<b>H2</b>	118 (57 %)	89 (43 %)
<b>H3</b>	87 (47,3 %)	97 (52,7 %)
<b>H4</b>	31 (50 %)	31 (50 %)

H = Haplotyp

Obwohl sich für den Haplotyp 2 ein höherer Anteil männlicher Träger (57 %) gegenüber den weiblichen (43 %) abzeichnete, war dieser Unterschied statistisch nicht signifikant ( $p = 0,273$ ).

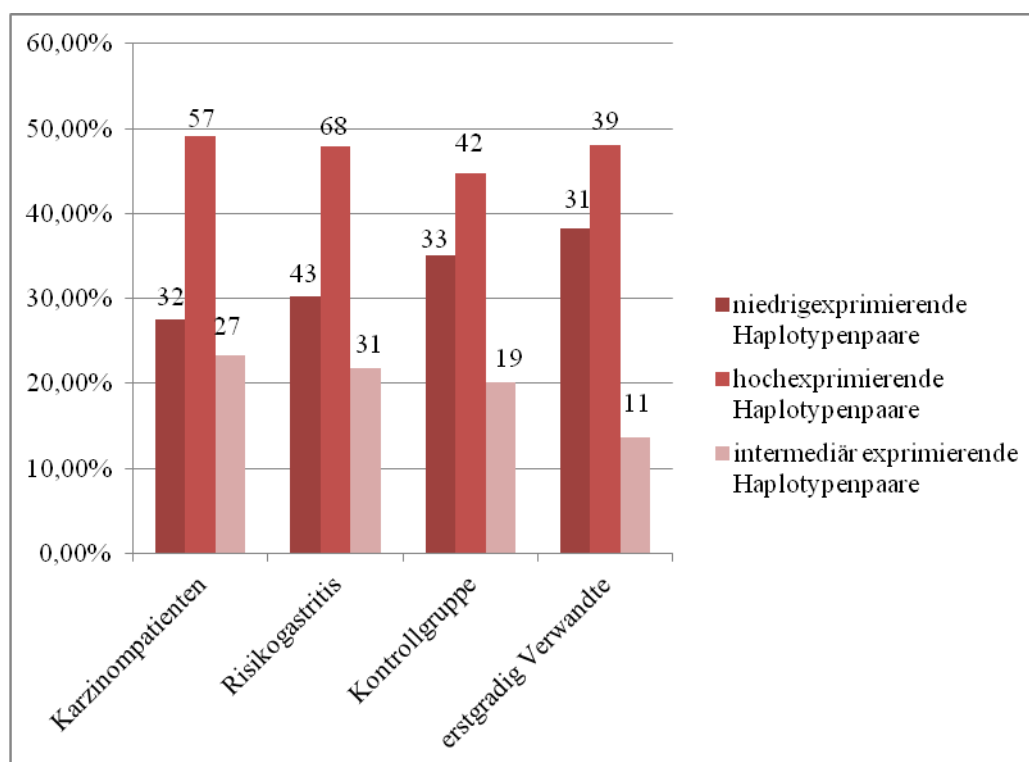
Bei dem Vergleich des *H. pylori*-Status mit den verschiedenen Haplotypen ließ sich, wie auch schon unter Punkt 3.1. zwar ein generell in allen Gruppen höherer Anteil *H. pylori*-und *CagA*-positiver als negativer Teilnehmer an dieser Studie zeigen. Ein signifikanter Unterschied in der Verteilung zwischen den vier häufigsten Haplotypen bei *H. pylori*-positiven oder negativen Personen war jedoch nicht zu erkennen ( $p = 0,224$ ).

**Tabelle 6: Vergleich *H. pylori* Status zwischen den Haplotypenvarianten 1 - 4.** (Unterschiede zwischen den Gruppen waren statistisch nicht signifikant; Chi-Quadrat-Test;  $p = 0,233$ ).

	<i>H. pylori</i> -	<i>H. pylori</i> +
<b>H1</b>	94 (23,6 %)	305 (76,4 %)
<b>H2</b>	46 (22,2 %)	61 (77,8 %)
<b>H3</b>	36 (19,6 %)	148 (80,4 %)
<b>H4</b>	20 (32,3 %)	42 (67,7 %)

H = Haplotyp

### 3.4.2 Haplotypenpaare

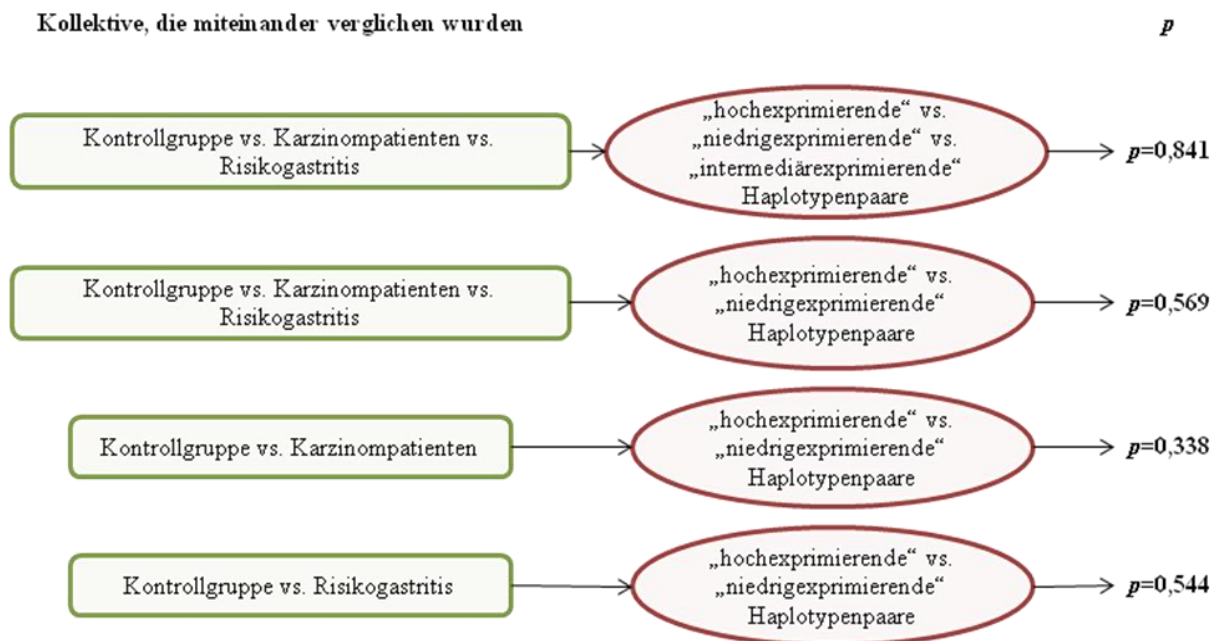


**Abbildung 15: Verteilung der drei Gruppen von Haplotypenpaaren in den untersuchten Patientenkollektiven.** Die Zahlen über den Säulen geben die absolute Anzahl der Probanden mit diesen Haplotypenpaaren in den jeweiligen Kollektiven wieder.

Es zeigte sich ein Überwiegen der „hochexprimierenden“ Haplotypenpaare (H1/H3, H1/H1, H3/H3) in allen vier Patientengruppen (**Abb. 15**). Der Anteil „niedrigexprimierender“ Paare (H2/H2, H1/H2, H1/H4) war in allen Gruppen geringer, wobei der geringste Anteil mit 27,6 % bei den Karzinompatienten zu verzeichnen war.



Im Vergleich aller drei Haplotypenpaargruppen unter den Kollektiven Magenkarzinompatienten, Risikogastritis und Kontrollgruppe zeigte sich kein Unterschied. Auch Vergleiche unter Ausschluss von „intermediärexprimierenden“ Haplotypenpaaren zeigten keine signifikanten Ergebnisse (*Abb. 16*). Die OR zu den jeweiligen Gruppenvergleichen finden Sie im Anhang (*Anhang I*).



**Abbildung 16: Vergleich verschiedener Konstellationen aus Haplotypenpaargruppen und Kollektiven zur Bestimmung von Unterschieden.**

Unterschiede waren statistisch nicht signifikant; Chi-Quadrat-Test für die ersten zwei Vergleiche, exakter Test nach Fisher für die letzten zwei ; vs. = versus

### 3.5 Vergleich histologischer Typen des Magenkarzinoms

#### 3.5.1 Demographische Daten der Magenkarzinompatienten

In diese Analyse wurden nur Patienten einbezogen, von denen vollständige Daten zur Histologie des Magentumors und bezüglich ihrer Genotypen im *IL 1B*-Gen zur Verfügung standen (n = 87). Es erfolgte eine gruppenspezifische Analyse nach Stratifizierung der Karzinompatienten je nach Lauréntyp (intestinal vs. diffus). Patienten mit einem Magenkarzinom vom gemischten Typ nach Laurén wurden in dieser Analyse nicht berücksichtigt (*Tab. 7*).

**Tabelle 7: Zusammensetzung des Studienkollektivs der Magenkarzinompatienten stratifiziert nach Laurén-Typ. Exakter Test nach Fisher**

	Magen-Ca vom intestinalen Typ n = 45	Magen-Ca vom diffusen Typ n = 42	Gesamt n = 87	<i>p</i>
Geschlecht männlich / weiblich	33 / 12 73,3 % / 26,7 %	21 / 21 50 % / 50 %	54 / 33 62,1 % / 37,9 %	0,029*
<i>H. pylori</i> -positiv / -negativ	37 / 8 82,2 % / 17,8 %	32 / 10 76,2 % / 23,8 %	69 / 18 79,3 % / 20,7 %	0,599
<i>CagA</i> -positiv / -negativ	30 / 7 81,1 % / 18,9 %	29 / 3 90,6 % / 9,4 %	59 / 10 85,5 % / 14,5 %	0,823
Intestinale Metaplasie positiv / negativ	37 / 8 82,2 % / 17,8 %	25 / 17 59,5 % / 40,5 %	62 / 25 71,3 % / 28,7 %	0,032*
Atrophie positiv / negativ	27 / 18 60,0 % / 40,0 %	8 / 34 19,0 % / 81,0 %	35 / 52 40,2 % / 59,8 %	< 0,001*
Grading G1/G2 vs. G3/G4	28 / 17 62,2 % / 37,8 %	08 / 34 19,0 % / 81,0 %	36 / 51 41,4 % / 58,6 %	< 0,001*
Lokalisation distal / proximal	25 / 20 55,6 % / 44,4 %	25 / 17 59,5 % / 40,5 %	50 / 37 57,5 % / 42,5 %	0,829

Ca = Karzinom, Differenzierungsgrad des Tumors (G = Grad)

\* = signifikantes Ergebnis

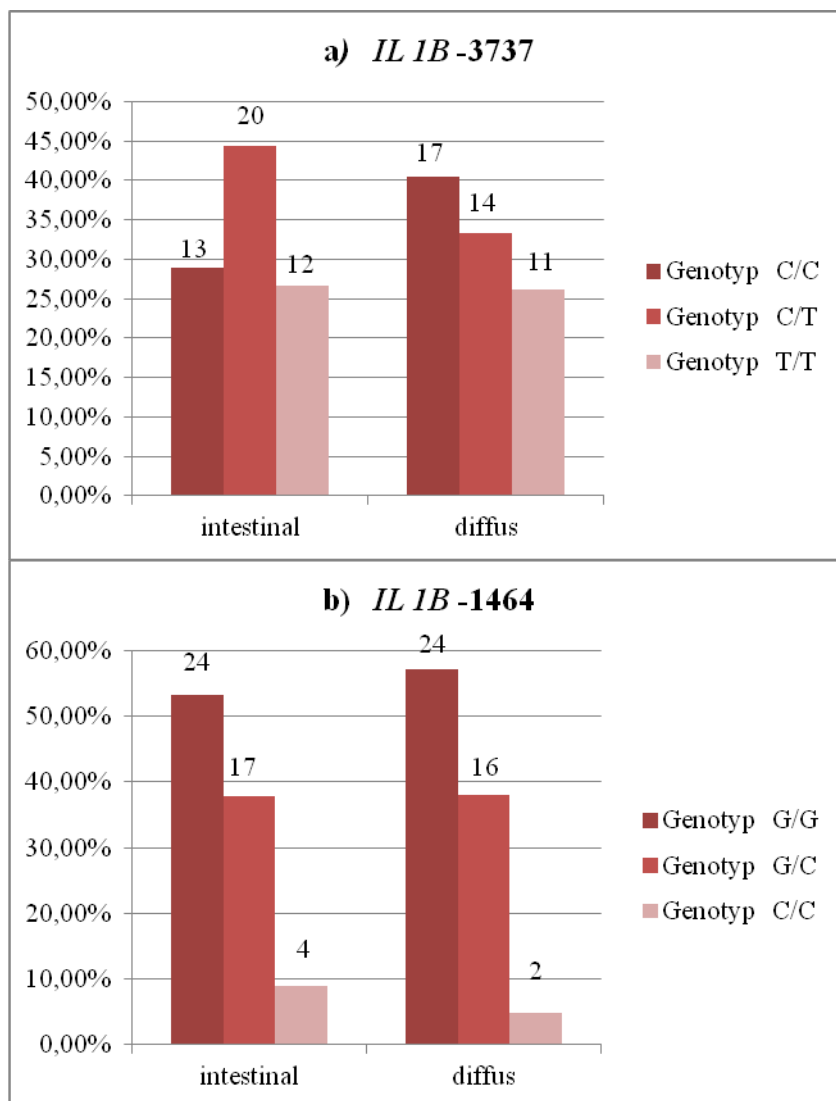
Bezüglich des *H. pylori*-Status zeigte sich kein Unterschied zwischen Patienten mit diffusum und solchen mit intestinalem Magenkarzinom. Ebenso bestand kein Unterschied in der Lokalisation des Primärtumors (**Tab. 7**).

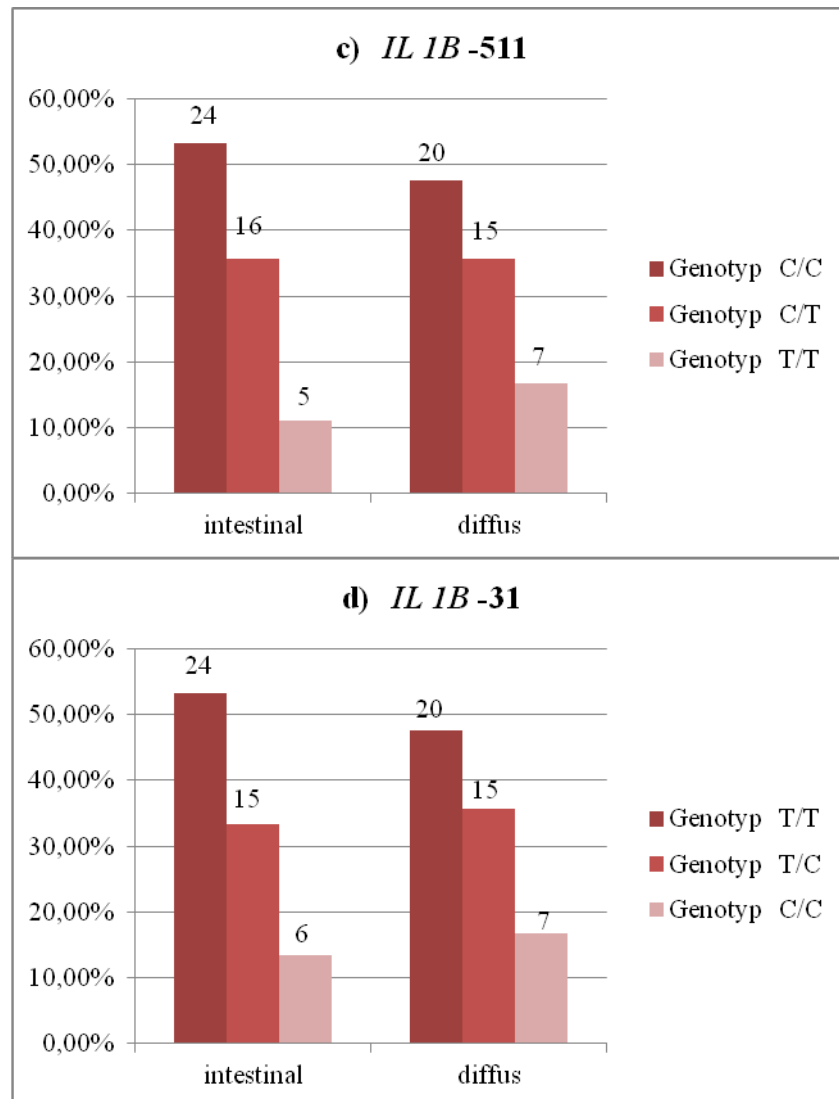
Bei Patienten mit einem Karzinom vom intestinalen Typ lag häufiger als beim diffusen Typ eine intestinale Metaplasie vor (82,2 % vs. 59,5 %;  $p = 0,032$ ). Das Gleiche galt für das Vorliegen einer Magenschleimhautatrophie (60,0 % vs. 19,0 %;  $p < 0,001$ ). Karzinome vom diffusen Typ wiesen einen schlechteren Differenzierungsgrad auf. Bei 81 % der Patienten lag eine schlechte Differenzierung (Grad 3) oder sogar eine Entdifferenzierung (Grad 4) der Tumorzellen vor.

### 3.5.2 Polymorphismen bei Karzinompatienten

Außer an Position -3737 im *IL 1B*-Gen lag an allen übrigen untersuchten Positionen in beiden Gruppen am häufigsten der homozygote Wildtyp vor (**Abb. 17**). Am seltensten trat die

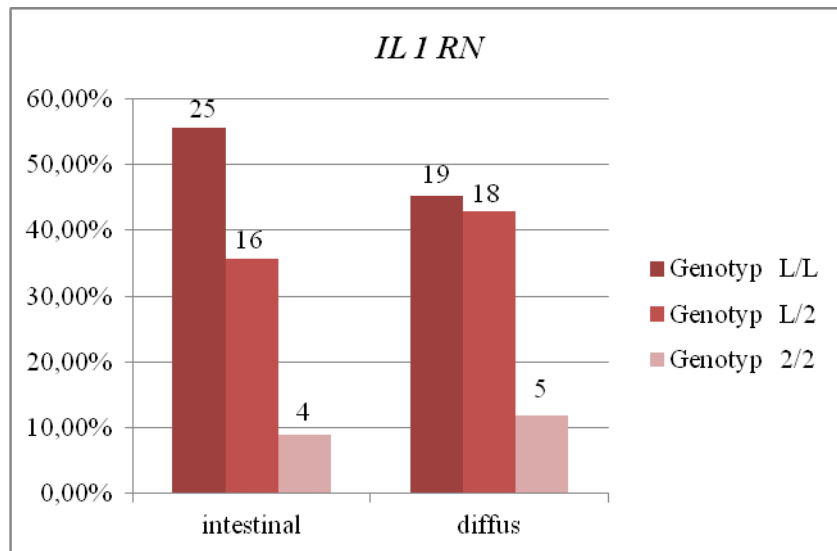
homozygote Alternativvariante auf. Ein Unterschied in der Häufigkeitsverteilung zwischen der Gruppe von Karzinompatienten mit Tumoren vom intestinalen Typ verglichen mit denen vom diffusen Typ zeigte sich nur bei der Beurteilung des Genotyps bei *IL 1B -3737*. Ein C/C-Genotyp war in der Gruppe mit diffusen Karzinomen mit 40,5 % die am häufigsten vorliegende Variante. In der Gruppe intestinaler Tumoren war dies mit 28,9 % die zweithäufigste Ausprägungsform. Hier war der heterozygote C/T-Genotyp vorherrschend. Statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht ( $p = 0,464$ ).





**Abbildung 17 a - d: Häufigkeitsverteilung der Polymorphismen an Position -3737, -1464, -511 und -31 in den Patientengruppen mit einem intestinalen oder diffusen Magenkarzinom.**  
 Darstellung im prozentualen Anteil. Die Zahlen über den Säulen geben die absoluten Patientenzahlen mit dem jeweiligen Genotyp in dieser Gruppe an. C = Cytosin; T = Tyrosin; G = Guanin. Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test).

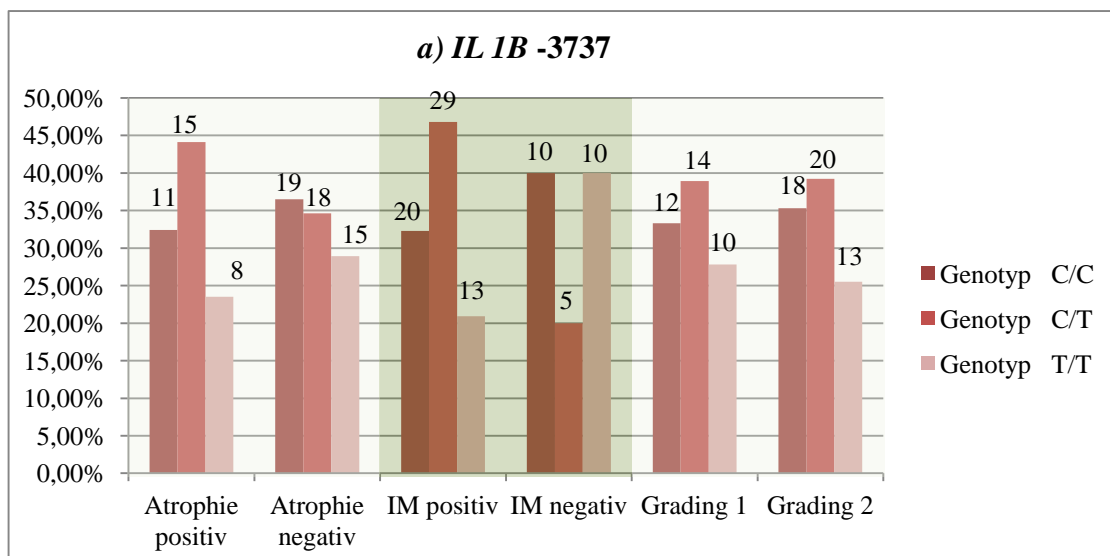
Ähnliche Ergebnisse waren auch bei der Beurteilung des *IL 1 RN*-Gens zu finden. Lange Wiederholungen (L) der VNTR lagen sowohl bei Karzinomen vom intestinalen als auch vom diffusen Typ am häufigsten homozygot vor. Das homozygote *IL 1 RN*\*2-Allel war in beiden Gruppen gleichermaßen selten vertreten (**Abb. 18**).

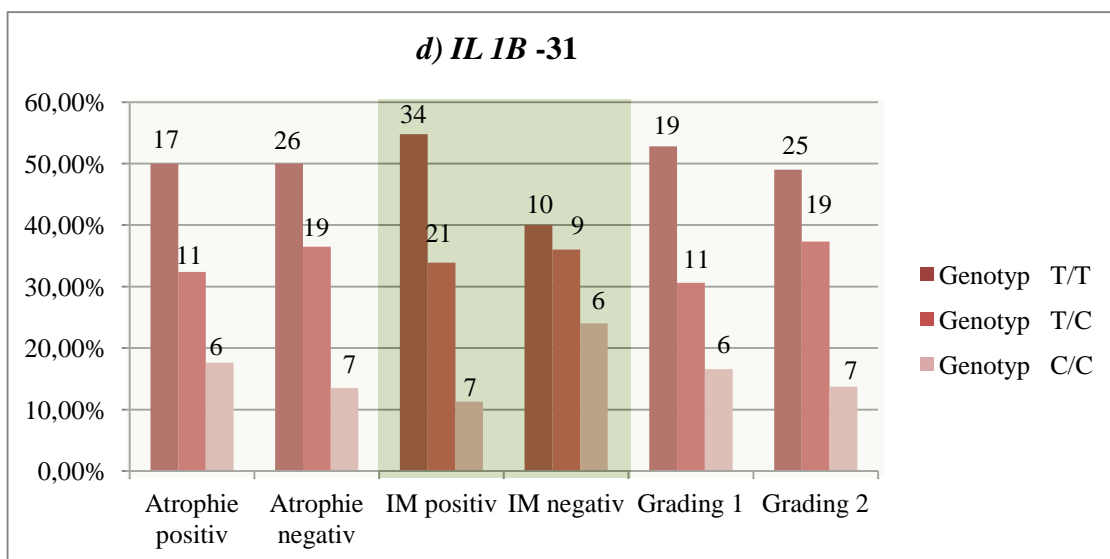
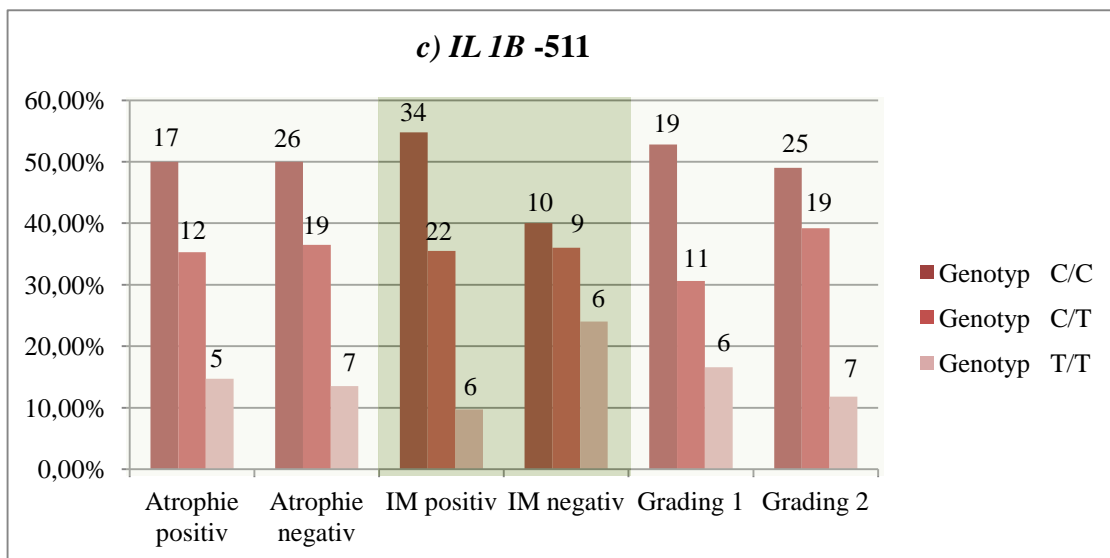
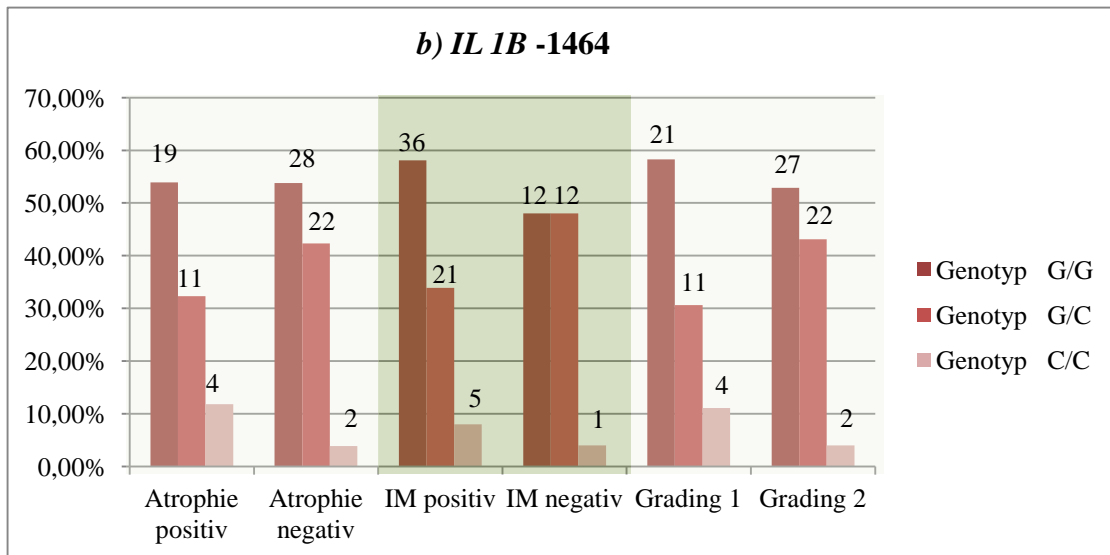


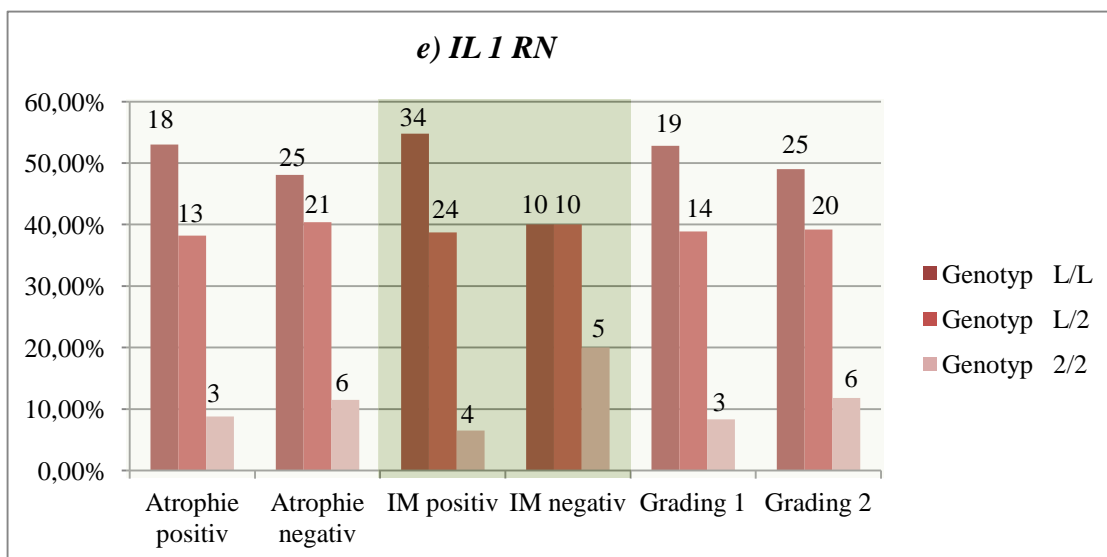
**Abbildung 18: Verteilung der VNTR im Intron 2 des IL 1 RN-Gens nach Lauréntyp.**

*L = Allele mit langen Wiederholungen ( $\geq 3$ ), 2 = Allel mit 2 Wiederholungen. Darstellung im prozentualen Anteil. Die Zahlen über den Säulen geben die absolute Patientenzahl mit dem jeweiligen Genotyp in den Gruppen wieder. Im Vergleich der Häufigkeitsverteilung nach Lauréntyp zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Chi-Quadrat-Test).*

Abbildung 19 zeigt den Zusammenhang der jeweiligen Polymorphismen mit dem Vorliegen einer Atrophie, einer intestinalen Metaplasie und dem Differenzierungsgrad des Tumors.







**Abbildung 19 a-e: Vergleich von Polymorphismen und der Ausprägung histologischer Merkmale von Magenkarzinomen.**

*IM = intestinale Metaplasie; Grading 1 = Differenzierungsgrad 1 + 2, Grading 2 = Differenzierungsgrad 3 + 4; C = Cytosin, T = Tyrosin, G = Guanin, L =  $\geq 3$  Wiederholungen von „tandem repeats“ im *IL 1 RN*-Gen, 2 = *IL 1 RN*\*2-Allel. Darstellung in prozentualen Anteilen. Die Zahlen über den Säulen geben die absolute Patientenanzahl mit dem jeweiligen histologischen Merkmal und dem Genotyp wieder.*

Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen Patienten mit Atrophie der Magenschleimhaut und Patienten ohne Atrophie im Bezug auf das Vorliegen der untersuchten Polymorphismen im *IL 1B*-Gen (**Tab. 8**). Einzig auffällig bei Betrachtung der Häufigkeitsverteilungen war das Vorherrschen des C/T-Genotyps an Position -3737 bei Patienten mit Atrophie, während jene ohne Atrophie am häufigsten den homozygoten Wildtyp in *IL 1B* -3737 zeigten (Ergebnis nicht statistisch signifikant).

Bei Trägern des C/T-Genotyps an Position -3737 des *IL 1B*-Gens lag häufiger eine begleitende intestinale Metaplasie vor ( $p = 0,049$ ) (**Tab. 8**). Unter den Patienten mit einem Magenkarzinom und einer IM zeigten 46,8 % diesen Genotyp bei *IL 1B* -3737, im Vergleich zu 32,3 % mit dem Genotyp C/C und 20,9 % mit dem Genotyp T/T.

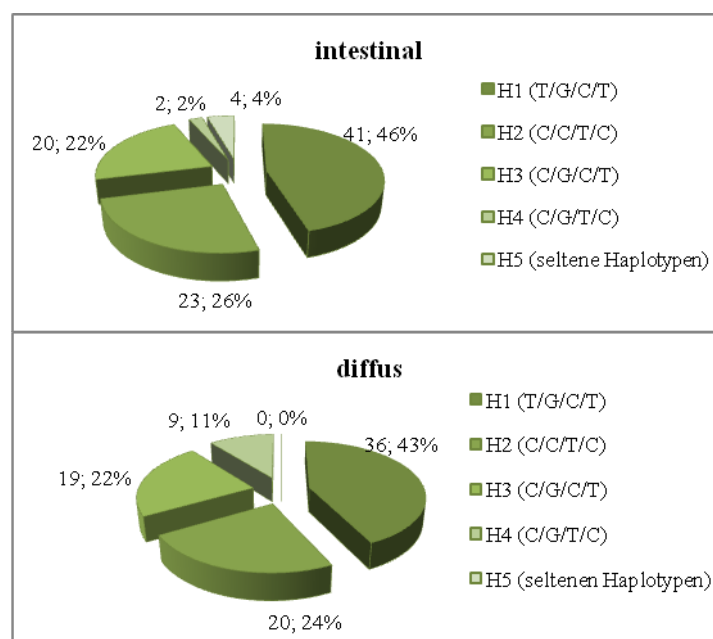
Die Untersuchung des Differenzierungsgrades des Tumors zeigte keinen signifikanten Unterschied sowohl für die vier Loci in der Promotorregion des *IL 1B*-Gens, als auch für die VNTR im *IL 1 RN*-Gen.

**Tabelle 8: Vergleich der SNP in den nach Ausprägungsgrad von Atrophie, IM und Differenzierungsgrad eingeteilten Gruppen. Chi-Quadrat-Test; \* = signifikantes Ergebnis**

	<b>Atrophie</b>	<b>IM</b>	<b>Grading</b>
<b>-3737</b>	0,667	0,049*	0,968
<b>-1464</b>	0,518	0,429	0,276
<b>-511</b>	0,907	0,180	0,647
<b>-31</b>	0,856	0,256	0,796
<b>IL 1 RN</b>	0,869	0,139	0,861

### 3.5.3 Haplotypen bei Karzinompatienten in Abhängigkeit tumorspezifischer Charakteristika

Ein Vergleich der Haplotypenzusammensetzung bei Karzinomen vom intestinalen gegenüber dem diffusen Typ zeigte im Bezug auf die Haplotypen 1 - 3 keine wesentlichen Unterschiede. Der Haplotyp 1 lag in beiden Gruppen am häufigsten vor, gefolgt vom Haplotyp 2 und 3 (**Abb. 20**).



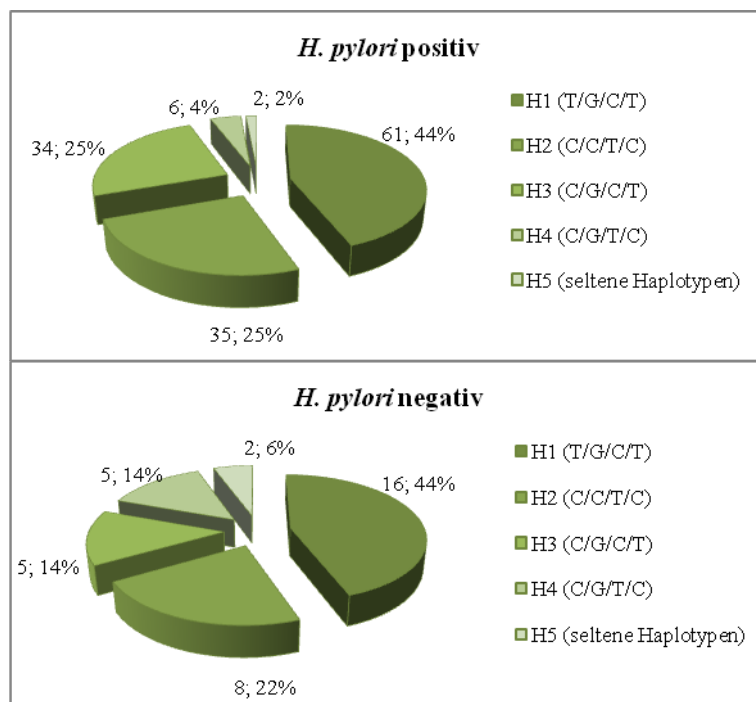
**Abbildung 20: Häufigkeitsverteilung der Haplotypen bei Patienten mit Karzinomen vom diffusen gegenüber dem intestinalen Typ.**

Chi-Quadrat-Test;  $p = 0,172$ , H1 - H5 = Haplotypen 1 - 5, in Klammern Abkürzung der Base an den Genloci - 3737, -1464, -511 und -31 des IL 1B-Gens (C = Cytosin, T = Tyrosin, G = Guanin), Darstellung jeweils in absoluter Anzahl und prozentual.



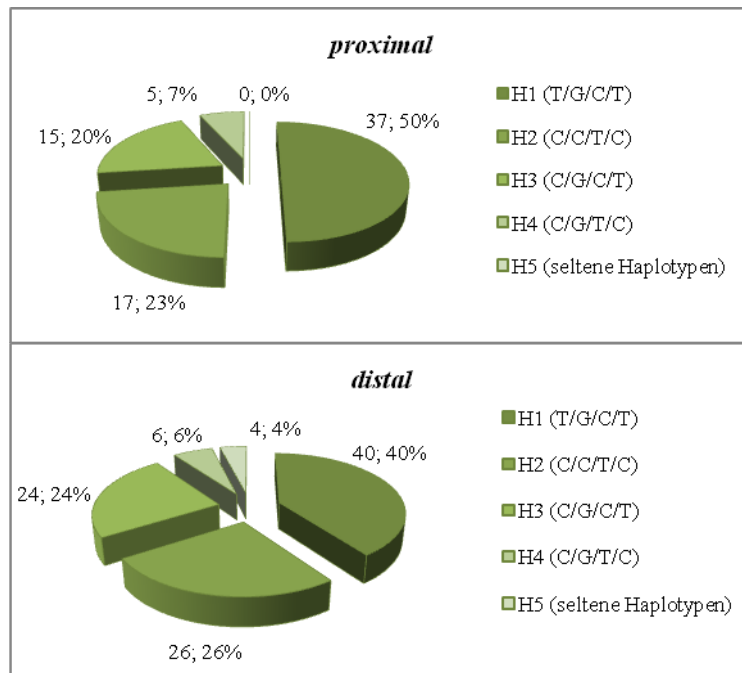
Zu bemerken ist ein häufigeres Auffinden des mit höherer transkriptioneller Aktivität verbundenen Haplotyp 4 bei Karzinomen vom diffusen Typ (11 % gegenüber 2 %; statistisch nicht signifikant).

Der Haplotyp 4 war mit 14 % bei *H. pylori*-negativen Patienten gegenüber 4 % bei *H. pylori*-positiven prozentual häufiger vertreten (**Abb. 21**). Der Unterschied war statistisch jedoch nicht signifikant.



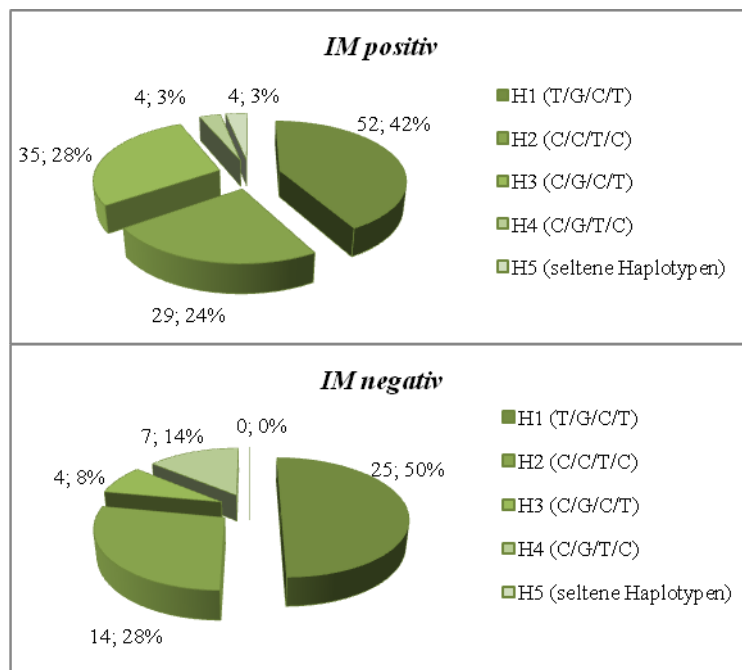
**Abbildung 21: Häufigkeitsverteilung der Haplotypen bei *H. pylori*-positiven und -negativen Patienten.**  
 Chi-Quadrat-Test;  $p = 0122$ , H1 - H5 = Haplotypen 1 - 5, in Klammern Abkürzung der Base an den Genloci - 3737, -1464, -511 und -31 des IL 1B-Gens (C = Cytosin, T = Tyrosin, G = Guanin), Darstellung jeweils in absoluter Anzahl und prozentual.

Ein nachweisbarer Zusammenhang zwischen der Lokalisation mit eher proximaler oder distaler Ausbildung des Tumors und den verschiedenen Haplotypen ließ sich nicht aufzeigen (**Abb. 22**).



**Abbildung 22: Häufigkeitsverteilung der Haplotypen bei Patienten mit proximalen gegenüber distalen Magenkarzinomen.**

Chi-Quadrat-Test;  $p = 0,719$ , H1 - H5 = Haplotypen 1 - 5, in Klammern Abkürzung der Base an den Genloci - 3737, -1464, -511 und -31 des IL 1B-Gens (C = Cytosin, T = Tyrosin, G = Guanin), Darstellung jeweils in absoluter Anzahl und prozentual.

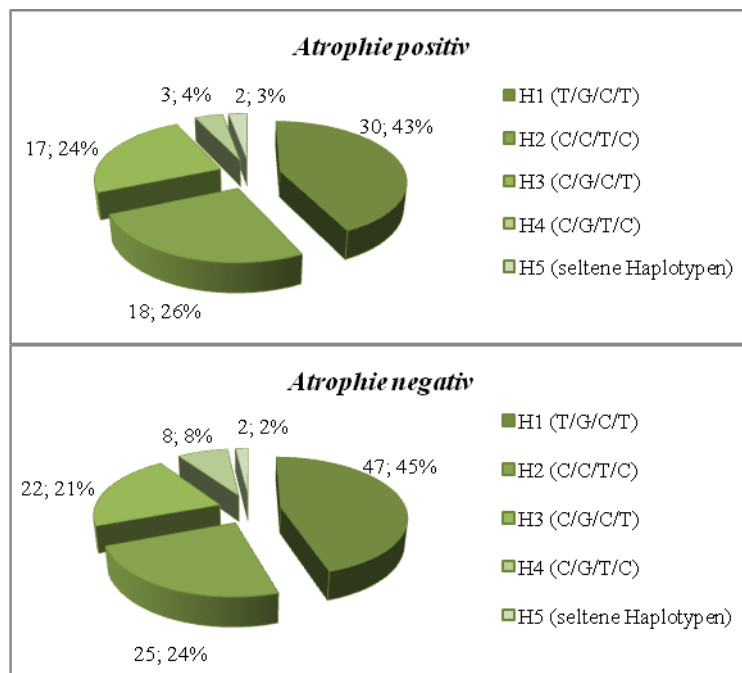


**Abbildung 23: Häufigkeitsverteilung der Haplotypen bei Patienten mit begleitender intestinaler Metaplasie gegenüber Karzinompatienten ohne nachweisbare intestinale Metaplasie.**

Chi-Quadrat-Test;  $p = 0,003^*$ , H1 - H5 = Haplotypen 1 - 5, in Klammern Abkürzung der Base an den Genloci - 3737, -1464, -511 und -31 des IL 1B-Gens (C = Cytosin, T = Tyrosin, G = Guanin), Darstellung jeweils in absoluter Anzahl und prozentual.

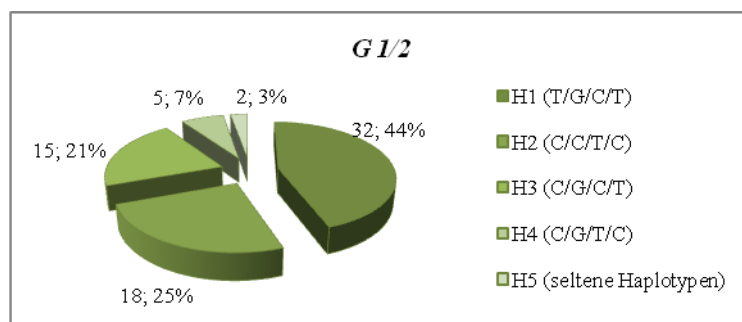
Der Haplotyp 3 war bei Karzinompatienten ohne intestinale Metaplasie wesentlich seltener zu finden als bei denen mit histologisch nachgewiesener intestinaler Metaplasie (8 % vs. 28 %). Auf der anderen Seite war der Haplotyp 4 bei dieser Patientengruppe sehr stark vertreten (14 % vs. 3 %;  $p = 0,003$ ) (**Abb. 23**).

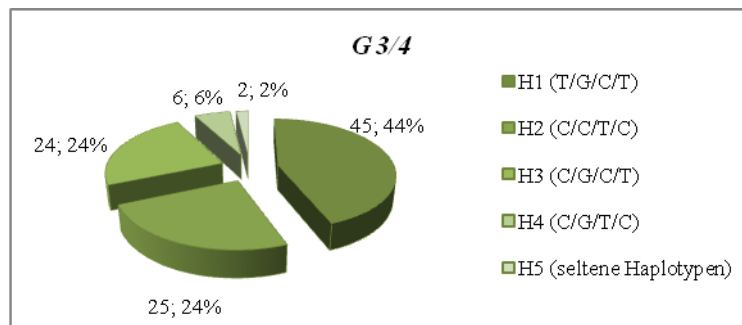
Es zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der Ausbildung einer Schleimhautatrophie oder dem Differenzierungsgrad des Tumors und der jeweiligen Haplotypenausprägung bei den untersuchten Patienten (**Abb. 24 / 25**).



**Abbildung 24: Häufigkeitsverteilung der Haplotypen bei Karzinompatienten mit begleitender Schleimhautatrophie gegenüber Patienten ohne Atrophie.**

Chi-Quadrat-Test;  $p = 0,790$ , H1 - H5 = Haplotypen 1 - 5, in Klammern Abkürzung der Base an den Genloci -3737, -1464, -511 und -31 des IL 1B-Gens (C = Cytosin, T = Tyrosin, G = Guanin), Darstellung jeweils in absoluter Anzahl und prozentual.





**Abbildung 25: Häufigkeitsverteilung der Haplotypen bei Patienten mit höhergradiger gegenüber Patienten mit niedrigerer Entdifferenzierung.**

Chi-Quadrat-Test;  $p = 0,975$ ,  $G = \text{Grad}$ ,  $H1 - H5 = \text{Haplotypen } 1 - 5$ , in Klammern Abkürzung der Base an den Genloci -3737, -1464, -511 und -31 des *IL 1B*-Gens ( $C = \text{Cytosin}$ ,  $T = \text{Tyrosin}$ ,  $G = \text{Guanin}$ ), Darstellung jeweils in absoluter Anzahl und prozentual.

### 3.5.4 Haplotypenpaare bei Karzinompatienten

Zusätzlich zur Untersuchung einzelner Haplotypen erfolgte eine Betrachtung der Assoziation zwischen Haplotypenpaaren und der Ausbildung von Tumorcharakteristika sowie histologischer und epidemiologischer Merkmale. Die Einteilung der Haplotypenpaare erfolgte wie unter 2.11 aufgeführt in die drei Gruppen: „hochexprimierende“, „niedrigexprimierende“ und „intermediäreexprimierende“ Haplotypenpaare.

Bei globaler Beurteilung aller Merkmale zeigte sich ein generell häufiges Vorhandensein der „hochexprimierenden“ Haplotypenpaargruppe (**Tab. 9**).

Weibliche Karzinompatienten wiesen prozentual häufiger „hochexprimierende“ Haplotypenpaare auf als männliche Probanden (63,6 % vs. 40,7 %). Zu beachten ist der im Untersuchungskollektiv insgesamt wesentlich höhere Anteil männlicher als weiblicher Patienten. Diese Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant.

„Niedrigexprimierende“ Haplotypenpaargruppen waren bei intestinalen Tumoren häufiger als bei diffusen zu finden (31,1 % vs. 21,4 %). Bei Karzinomen vom diffusen Typ fiel vor allem der hohe Anteil „intermediäreexprimierender“ Paare auf (31,0 % vs. 17,8 %). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Karzinompatienten mit Tumoren vom intestinalen oder diffusen Typ ließ sich bezüglich der Haplotypenpaarverteilung jedoch nicht finden. Auch bei der Betrachtung des *H. pylori*-Status fielen keine Unterschiede auf. Für die anderen, in Tabelle 9 genannten Tumorcharakteristika konnten bezüglich der Haplotypenpaarverteilung ebenfalls keine Unterschiede verzeichnet werden. Bei Patienten mit einer tumorbegleitenden Schleimhautatrophie lag zwar die „niedrigexprimierende“ Haplotypenpaargruppe häufiger vor

als bei denen ohne Atrophie (31,4 % vs. 23,1 %). Hier wurde jedoch ebenfalls keine Signifikanz erreicht.

**Tabelle 9: Betrachtung der Häufigkeitsverteilung der Haplotypenpaargruppen unter verschiedenen Gesichtspunkten wie Tumorcharakteristika, Geschlecht der Patienten und *H. pylori*-Status. Chi-Quadrat-Test; Ergebnisse statistisch nicht signifikant.**

		Niedrig exprimierende Haplotypenpaar- gruppe	Hoch exprimierende Haplotypenpaar- gruppe	Intermediär exprimierende Haplotypenpaar- gruppe	<i>p</i>
Geschlecht	männlich	17 31,5 %	22 40,7 %	15 27,8 %	0,115
	weiblich	6 18,2 %	21 63,6 %	6 18,2 %	
Laurén	intestinal	14 31,1 %	23 51,1 %	8 17,8 %	0,303
	diffus	9 21,4 %	20 47,6 %	13 31,0 %	
<i>H. pylori</i>	positiv	18 26,1 %	35 50,7 %	16 23,2 %	0,881
	negativ	5 27,8 %	8 44,4 %	5 27,8 %	
Loka	proximal	9 24,3 %	19 51,4 %	9 24,3 %	0,924
	distal	14 28,0 %	24 48,0 %	12 24,0 %	
IM	positiv	17 27,4 %	33 53,2 %	12 19,4 %	0,252
	negativ	6 24,0 %	10 40,0 %	9 36,0 %	
Atrophie	positiv	11 31,4 %	18 51,4 %	6 17,2 %	0,594
	negativ	12 23,1 %	25 48,1 %	15 28,8 %	

Loka = Lokalisation (Vergleich proximal / distal); IM = intestinale Metaplasie

Auch bei Stratifizierung der Gruppen in „hochexprimierende“ und „niedrigexprimierende“ Haplotypenpaare unter Ausschluss der „intermediärexprimierenden“ zeigten sich keine Unterschiede bezüglich der Ausprägung der in der Tabelle 9 aufgeführten Merkmale.

### **3.6 Logistisches Regressionsmodell**

Zur Ermittlung des Einflusses spezifischer Faktoren auf das Risiko für ein Magenkarzinom und für eine Hochrisikogastritis wurde ein logistisches Regressionsmodell angewandt. In dem

Regressionsmodell wurden Alter, Geschlecht, *H. pylori*-Status und Lauren-Typ als Kovariablen berücksichtigt, um sowohl den direkten Effekt als auch eine mögliche Interaktion der Parameter zu erfassen.

Ein signifikanter unabhängiger Effekt zeigte sich lediglich für das Alter (Regressionskoeffizient  $p < 0.01$ ). Eine stufenweise modellbasierte Selektion der Variablen [85] konnte anhand unserer Kohorte weder bestätigen, dass eine weitere Kovariable, noch eine Kombination weiterer Kovariablen einen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis haben, wobei jeweils eine variablenbezogene Anpassung der Daten erfolgte.

Darüber hinaus erfolgte eine logistische Regressionanalyse, um den Zusammenhang der untersuchten Polymorphismen mit dem individuellen Risiko für ein Magenkarzinom oder eine Hochrisikogastritis zu erfassen. Keine der berücksichtigten Kovariablen hatte einen direkten oder indirekten Effekt, das heißt, die Koeffizienten im entsprechenden linearen Regressionmodell erreichten nicht das Signifikanzniveau.

## 4. Diskussion

### 4.1 Allgemeine Anmerkungen

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Dissertation beschäftigte sich mit der Assoziation zwischen Polymorphismen, Haplotypen und deren Kombinationen im *IL 1B*-Gen und *IL 1RN*-Gen und dem Risiko, ein Magenkarzinom zu entwickeln. Für das bessere Verständnis der Ergebnisse soll noch einmal auf einige grundsätzliche Merkmale im Studienaufbau hingewiesen werden.

#### 4.1.1 Unterschiede in den Kollektiven

Die untersuchten vier Kollektive unterscheiden sich signifikant hinsichtlich der Verteilung von Alter und Geschlecht. Eine Anpassung der Gruppen bezüglich dieser Merkmale war für die Magenkarzinompatienten und das Kollektiv der Verwandten ersten Grades nicht möglich. Daher wurde auch bei den anderen beiden Kollektiven darauf verzichtet. Die Magenkarzinompatienten zeigen aufgrund der späten Inzidenz dieses Tumors ein deutlich höheres Alter als die Vergleichskollektive. Da das männliche Geschlecht als Risikofaktor für die Entwicklung eines Magenkarzinoms anzusehen ist, erklärt sich auch der höhere männliche Anteil bei Magenkarzinompatienten im Vergleich zu den anderen Kollektiven [2, 5]. Das Kontrollkollektiv und das Kollektiv erstgradig Verwandter von Karzinompatienten bestehen aus einer heterogenen Mischpopulation, die der durchschnittlichen kaukasischen Bevölkerung in Deutschland weitgehend entspricht.

#### 4.1.2 *H. pylori*

Auffallend ist der hohe Anteil *H. pylori*-positiver Individuen mit über 60 % in allen Gruppen, einschließlich der Kontrollgruppe. Die Durchseuchung mit diesem Bakterium ist demnach auch in der hiesigen Allgemeinbevölkerung hoch.

Der S3-Leitlinie zu *H. pylori* zufolge liegt die Prävalenz für eine *H. pylori*-Infektion zwischen 5 % bei deutschen Kindern und 24 % bei Erwachsenen. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen Männern und Frauen, wobei die Prävalenz bei über 35-jährigen Frauen um 12% zu finden ist, bei Männern des gleichen Alters liegt sie bei 24 % [86]. Jedoch ist die Variation der *H. pylori*-positiven auch in Deutschland groß [86]. In Sachsen-Anhalt lag die Seroprävalenz für *H. pylori*-Infektionen im Jahr 2010 bei 44,4 % [87]. Des Weiteren zeigt sich

eine Zunahme der Betroffenen mit steigendem Alter [87, 88]. In Industrienationen nimmt die Prävalenz um etwa 1 % pro Lebensjahr zu [89]. So waren von den 0-20-jährigen in Sachsen-Anhalt nur 14,6 % *H. pylori*-positiv, während bei 45,5 % der 41-50-jährigen und bei 50,8 % der 51-60-jährigen *H. pylori* serologisch nachgewiesen werden konnte [87]. Daraus ergeben sich Hinweise für den hohen Anteil *H. pylori*-positiver Studienteilnehmer in der vorliegenden Studie.

Patienten mit einem Magenkarzinom und solche mit einer Risikogastritis zeigen signifikant häufiger einen positiven Nachweis für eine *H. pylori*-Infektion. Dies ist zum Teil durch das höhere Alter dieser Studiengruppen bedingt. Zum anderen ergibt sich dieser Sachverhalt aus der nachgewiesenen Karzinogenität von *H. pylori* bei der Entwicklung eines Magenkarzinoms über verschiedene Vorstufen (Correa-Kaskade). Somit spiegelt sich der bereits in vielen anderen Studien aufgezeigte Zusammenhang zwischen *H. pylori* und einer Risikogastritis, beziehungsweise einem Magenkarzinom auch in der vorliegenden Studie wider [22, 23, 24, 25, 26, 47, 48].

Der Anteil *CagA*-positiver Studienteilnehmer wurde in Bezug auf die *H. pylori*-positiven Patienten beurteilt, also nicht auf das Gesamtkollektiv bezogen. Als *H. pylori*-positiv galt, bei wem serologisch Antikörper gegen *H. pylori* allgemein oder im Speziellen gegen das *CagA*-Protein nachweisbar waren, beziehungsweise auch, falls beide Tests ein positives Resultat zeigten. Nachteile des rein serologischen Nachweises der *H. pylori*-Infektion zeigen sich darin, dass auch bei bereits abgelaufener, das heißt kurerter Infektion, noch ein positiver Antikörperrnachweis vorliegen kann. So zeigten Studien an einer asiatischen Population eine nicht ausreichende Sensitivität dieser Methode im Vergleich zur histologischen Beurteilung oder zum Urease Test, was den Nachweis aktiver Infektionen betrifft [90, 91]. Befunde anderer diagnostischer Verfahren zum Nachweis einer Helicobacterinfektion wurden zwar mit erfasst und zur Validierung der serologischen Daten herangezogen, allerdings in der eigentlichen Analyse des *H. pylori*-Status nicht berücksichtigt. In der vorliegenden Studie wurde bewusst der serologische Nachweis als Referenz gewählt, damit auch die Assoziation einer vormalig bestehenden *H. pylori*-Infektion berücksichtigt werden konnte.

#### 4.1.3 Histologische Beurteilung

Eine mögliche Einschränkung der Studie besteht in der Zuordnung der Patienten zu der Gruppe mit einer Risikogastritis. Dazu wurden sowohl Patienten mit einer Pangastritis bei gleich starker Entzündung der Mukosa in Antrum und Korpus, als auch Patienten mit einer



korpusprädominanten Gastritis oder jene mit intestinaler Metaplasie gezählt, sodass der Begriff weit gefasst wurde und dabei ein heterogenes Kollektiv entstand [28, 92].

Die Kontrollgruppe wurde aus ethischen Gründen keiner endoskopischen Untersuchung mit anschließender histologischer Beurteilung unterzogen, sofern auch keine klinischen Beschwerden vorhanden waren. Eine falsche Zuordnung einiger Patienten mit einer Risikogastritis in die Kontrollgruppe kann daher nicht ausgeschlossen werden.

Für eine zusätzliche Analyse wurden retrospektiv Daten zusammengestellt, um die umgebende Entzündung der Magenmukosa bei Patienten mit gastralem Adenokarzinom genauer zu charakterisieren. Diese Daten waren nicht für alle Patienten aus dieser Gruppe vollständig verfügbar. Dies lag unter anderem an der eingeschränkten Beurteilbarkeit der Magenmukosa bei Patienten mit ausgedehntem Tumorbefund. In die Analyse histologischer Merkmale im Zusammenhang mit Polymorphismen im *IL 1B*-Gen und *IL 1RN*-Gen wurden jedoch nur Patienten einbezogen, deren histologische Daten vollständig erfasst waren.

#### 4.1.4 Polymorphismenanalyse

Es besteht ein nahezu komplettes Kopplungsgleichgewicht für *IL 1B* -511 und *IL 1B* -31 bei den untersuchten Studienteilnehmern. In Kombination mit den ermittelten Frequenzen der häufigsten Haplotypen, die mit den Frequenzen aus anderen kaukasischen Kollektiven übereinstimmen, können grobe technische Fehler bei der Genotypbestimmung ausgeschlossen werden [81,93]. So war der Haplotyp 4 in einer Studie von Chen *et al.* bei 6 % der kaukasischen Bevölkerung zu finden [81]. In den hier untersuchten Kollektiven lag die Frequenz zwischen 5 und 9 %.

Die Untersuchung des Genotyps an bestimmten Positionen des *IL 1B*-Gens war auf die vier häufigsten, in der Bevölkerung vorkommenden Polymorphismen beschränkt. Mögliche Interaktionen mit Polymorphismen anderer proinflammatorischer Gene können daher nicht aufgezeigt werden. Des Weiteren wurden keine *IL 1β*-Spiegel im Serum bestimmt. Die kausale Kette des Einflusses von *IL 1B*-Polymorphismen auf den *IL 1β*-Spiegel und daraus folgend dessen Einfluss auf Magenschleimhautveränderungen bis zum Karzinom wurde bisher in keiner Studie direkt an Patienten nachgewiesen und bedarf weiterer intensiver Forschung.

#### 4.2 Polymorphismen im *IL 1B*- und *IL 1RN*-Gen

Während die Polymorphismen *IL 1B* -511 T und -31 C im *IL 1B*-Gen vormals als Risikofaktor für die Entwicklung eines Magenkarzinoms an einer kaukasischen Population bezeichnet wurden, ist dies nach den vorliegenden Ergebnissen nicht der Fall. Keiner der untersuchten Polymorphismen trat mit einem signifikanten Unterschied in einem der Kollektive häufiger auf.

In der statistischen Auswertung wurde für das Kollektiv der erstgradig Verwandten von Karzinompatienten auf die Ermittlung der Odds Ratio gegenüber dem Kontrollkollektiv verzichtet, da sich schon bei Karzinompatienten und Patienten mit einer Risikogastritis kein erhöhtes Risiko durch verschiedene Polymorphismen oder deren Kombination zeigte. Aus biologischer Sicht ergäbe sich in diesem Zusammenhang keine sinnvolle Interpretation für einen ermittelten Wert.

Neben drei zuvor publizierten Metaanalysen zeigte auch eine jüngere Analyse eine positive Assoziation zwischen einzelnen Polymorphismen und dem Karzinomrisiko bei kaukasischen Individuen auf [75, 76, 77, 94]. Hierbei konnte eine stabile Korrelation sowohl zwischen *IL 1B* - 511 T-Trägern, als auch *IL 1RN*\*2-Trägern und der Magenkarzinomentstehung nachgewiesen werden. Bei alleiniger Betrachtung der kaukasischen Population lag die OR für *IL 1B* -511 T gegenüber *IL 1B* -511 C/C bei 1,33 (95 % KI: 1,04 - 1,71), für *IL 1RN*\*2 gegenüber L/L bei 1,31 (95 % KI: 1,07 - 1,61). Für Träger des *IL 1B* -31 C Allels ließ sich in dieser Metaanalyse kein signifikant erhöhtes Risiko gegenüber Trägern des Wildtypallel aufweisen, obwohl ein nahezu komplettes Kopplungsgleichgewicht der Genloci *IL 1B* -511 und -31 bestand [94]. In einer Metaanalyse von 2012 wurde ebenfalls ein erhöhtes Magenkarzinomrisiko für Träger von *IL 1RN*\*2 gegenüber Trägern der langen Genotypen (L) ermittelt. Nach der Auswertung von 71 Fall-Kontroll-Studien mit 14854 Fällen und 19337 Kontrollen konnte für *IL 1RN*\*2 vs. L eine OR von 1,20 (95% KI: 1,05 – 1,38) aufgezeigt werden. Bei dem Vergleich von *IL 1RN* 2/2 vs. L/L zeigte sich hingegen kein erhöhtes Risiko (OR 1,20; 95% KI: 0,85 – 1,69) [95].

Für Asiaten und Lateinamerikaner konnten alle bislang veröffentlichten Metaanalysen kein erhöhtes Risiko belegen. Grund für den unterschiedlichen Einfluss der Polymorphismen auf die Karzinomentstehung könnten die unterschiedliche ethnische Herkunft sowie auch externe Einflüsse in den Populationen sein. So konnte gezeigt werden, dass die Haplotypen im *IL 1B*-Gen mit sehr verschiedenen Häufigkeiten bei unterschiedlichen Ethnizitäten zu finden waren [81].

In einer Metaanalyse, in der der Einfluss von Polymorphismen an Position *IL 1B* -31 auf das generelle Karzinomrisiko beurteilt wurde, wurden 47 publizierte Studien berücksichtigt. Bei ca. 11100 Fällen und 14500 Kontrollen wurde nicht nur das Magenkarzinomrisiko sondern beispielsweise auch das Risiko für die Entstehung eines hepatozellulären Karzinoms und ein Mammakarzinom bewertet [96]. Es wurden 21 europäische Studien einbezogen. Hier fand sich ein niedrigeres Risiko für ein Magenkarzinom bei Trägern des Genotyps -31 C/C gegenüber T/T (OR 0,87; 95 % KI 0,77 - 0,98). Da in vorherigen publizierten Studien eher ein erhöhtes Risiko aufgezeigt wurde, bleiben die Ergebnisse kontrovers [96].

In der neuesten Publikation von 2013 wurde ebenfalls der Einfluss von *IL 1B*-Polymorphismen auf das Magenkarzinom und auf andere Krebsformen in einer Metaanalyse zusammengefasst [97]. Nach der Beurteilung von insgesamt 91 Fall-Kontroll-Studien konnte für *IL 1B* -511 T/T + C/T vs. C/C ein protektiver Effekt auf die Ausbildung eines hepatozellulären Karzinoms (OR 0,68; 95 % KI 0,47 - 0,99) und ein erhöhtes Risiko für das Zervixkarzinom (OR 1,74; 95 % KI 1,35 - 2,23) nachgewiesen werden. Für das Magenkarzinom ließ sich bei Betrachtung aller Tumorformen, Lokalisationen und Kollektive insgesamt kein erhöhtes Risiko für Träger des *IL 1B* -511 T-Allels aufzeigen. Ein gering erhöhtes Risiko konnte jedoch für Karzinome vom intestinalen Typ (OR 1,24; 95 % KI 1,04 - 1,49) und Nicht-Kardia-Karzinome (OR 1,57; 95% KI 1,06 - 2,31) ermittelt werden [97]. Diese Metaanalyse zeigt, dass durch die Einbeziehung neuerer Studien eine immer geringer werdende Assoziation zwischen *IL 1B*-Polymorphismen und einem erhöhten Magenkarzinomrisiko nachgewiesen werden kann, sodass man von einem weitaus geringeren oder fehlendem Effekt der Polymorphismen auf die Karzinomentstehung ausgehen muss.

#### 4.2.1 Einfluss der Polymorphismen in der kaukasischen Bevölkerung

Auch die Ergebnisse der einzelnen Studien hinsichtlich der kaukasischen Population waren heterogen. So konnten Xue *et al.* bei detaillierter Untersuchung der in eine Metaanalyse einbezogenen Publikationen Unterschiede in den Ergebnissen vor und nach 2006 aufzeigen. Für *IL 1B* -511 T-Träger vs. C/C ließ sich ein erhöhtes Risiko für die Magenkarzinomentwicklung in veröffentlichten Studien vor 2006 nachweisen. In Publikationen danach konnte dieser Zusammenhang jedoch nicht mehr dargestellt werden [94].

Berücksichtigt man Studien aus dem europäischen Raum, so halten sich positive und negative Ergebnisse die Waage, sodass der Zusammenhang zwischen Zytokinpolymorphismen und der Begünstigung der Magenkarzinomentstehung in Frage gestellt werden muss.

So wurde bei türkischen Patienten mit einem Magenkarzinom häufiger das *IL 1 RN\*2*-Allel gefunden als bei einer Vergleichsgruppe mit dyspeptischen Beschwerden ohne maligne Magenschleimhautveränderungen oder ein Ulkus ( $p = 0,014$ ) [98]. In einer polnischen Studie wiederum trugen die Karzinompatienten häufiger als Patienten mit duodenalen Ulcera den C/T-Genotyp bei *IL 1B* -511 (OR 1,72; 95 % KI 1,00 - 2,95) [99]. Auf der anderen Seite konnten Persson und Kollegen diese Zusammenhänge in einer Fall-Kontroll-Studie an einer schwedischen Untersuchungsgruppe nicht bestätigen. Sie untersuchten sowohl das *IL 1B*-Gen an Position -511, -31 und +3954, als auch das *IL 1 RN*-Gen bei 351 Magenkarzinompatienten und 539 Kontrollen und wiesen keinen signifikanten Unterschied in der Polymorphismenverteilung nach [79]. Auch in einer italienischen Studie aus dem Jahr 2008 war der Einfluss von Polymorphismen im *IL 1B*-Gen und *IL 1 RN*-Gen weniger deutlich als erwartet. Es wurden ca. 250 Patienten und 770 Kontrollen auf 20 verschiedene Polymorphismen in immunmodulatorischen Genen untersucht. Für *IL 1 RN* 2/2 zeigte sich jedoch nur dann ein erhöhtes Magenkarzinomrisiko, wenn gleichzeitig eine *H. pylori*-Infektion bestand (OR 2,43; 95 % KI 1,19 - 4,96) [100]. Bei *H. pylori*-negativen Studienteilnehmern ließ sich für Träger von *IL 1 RN* 2/2 gegenüber Trägern der anderen VNTR kein statistisch signifikant erhöhtes Magenkarzinomrisiko nachweisen. Auch für Polymorphismen an *IL 1B* -31 zeigte sich kein erhöhtes Risiko für eine Magenkarzinomentstehung [100]. Dieses Ergebnis weist erneut auf die Bedeutung von *H. pylori* bei der Magentumorentstehung hin. Verschiedene Polymorphismen scheinen dabei möglicherweise einen additiven Effekt zu besitzen.

In einer Fall-Kontroll-Studie an einem deutschen Kollektiv konnte für verschiedene Polymorphismen, auch für Polymorphismen des *IL 1B*-Gen allein, kein erhöhtes Magenkarzinomrisiko festgestellt werden [101]. Betrachtet wurde hier allerdings das Risiko für die Ausbildung einer chronisch atrophischen Gastritis als prämaligene Läsion. Nur für einen Polymorphismus im *IL 10*-Gen konnte in dieser Studie mit einer Borderline-Signifikanz eine Risikoerhöhung für die Entwicklung einer atrophischen Gastritis ausgemacht werden.

#### 4.2.2 Unterschiedliche Vergleichsgruppen

Diskrepanzen in den Ergebnissen unterschiedlicher Studien an kaukasischen Populationen sind bei gleicher Ethnizität der Studienteilnehmer möglicherweise auf Unterschiede im Studiendesign zurückzuführen. Beispielsweise wurden einerseits Karzinompatienten mit Dyspepsie-Patienten [98] oder Patienten mit duodenalen Ulcera [99] verglichen, auf der anderen Seite galten gesunde Probanden als Kontrollkollektiv [79, 100]. Aus diesen unterschiedlichen Kollektiven ergeben sich auch verschiedene Wichtungen von Umweltfaktoren, vor allem der *H. pylori*-Besiedlung. So sind Patienten mit einem Ulcus in der Regel häufiger *H. pylori*-positiv als gesunde Probanden.

In einige Studien wurden beispielsweise nur *H. pylori*-positive Patienten einbezogen [98, 99], während *H. pylori*-Negativität in anderen Studien kein Ausschlusskriterium darstellte [79, 100]. Der isolierte Einfluss von Polymorphismen auf die Magenkarzinomentstehung kann so bei fehlender Vergleichbarkeit der Studien nicht eindeutig geklärt werden.

Gegenüber den erwähnten europäischen Veröffentlichungen hat die hier vorliegende Studie den Vorteil, dass neben Karzinompatienten auch Patienten mit einer Risikogastritis und erstgradig Verwandte von Karzinompatienten beurteilt wurden. Karzinompatienten und Patienten mit einer Risikogastritis wurden in den bisher veröffentlichten Metaanalysen nicht gemeinsam untersucht [74, 75, 76, 77, 96, 98]. Dies ist die erste Studie an einer kaukasischen Population, die auch die Genotypisierung erstgradiger Angehöriger in die Untersuchungen mit einbezog. Starzynska *et al.* berücksichtigten zwar die Familienanamnese von Karzinompatienten, auf eine Polymorphismenbestimmung bei Verwandten wurde jedoch verzichtet [99]. Es wurden in dieser Untersuchung vor allem Patienten mit negativer Familienanamnese durch einen *IL 1B* -511-Polymorphismus in ihrem Karzinomrisiko beeinflusst.

Eine Bedeutung der prophylaktischen Bestimmung von Polymorphismen im *IL 1B*- oder *IL 1RN*-Gen bei erstgradig Verwandten von Karzinompatienten konnte in der vorliegenden Studie nicht gezeigt werden, da sie sich in ihrem Polymorphismenbesatz nicht von dem gesunden Kontrollkollektiv unterschieden.

In den bisher veröffentlichten Studien und Metaanalysen wurden nur einzelne Polymorphismen immunmodulatorischer Gene in ihrem Zusammenhang mit Magenkarzinomen oder prämaligen Läsionen untersucht.

Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass vor allem die Haplotypenzusammensetzung eine wichtige Rolle für die funktionelle Relevanz von Polymorphismen in der Promotorregion des *IL 1B*-Gens spielt [81].

### 4.3 Haplotypen

#### 4.3.1 Haplotypen und deren Zusammenhang mit prämaligen Läsionen und dem Magenkarzinom

Die zuerst von Chen *et al.* beschriebenen häufigsten Haplotypen 1 - 4 in der Promotorregion des *IL 1B*-Gens haben einen Einfluss auf die Transkriptionsrate dieses Gens [81]. Betrachtet wurden zur Haplotypenbestimmung nur Polymorphismen an den Positionen -3737, -1464, -511 und -31. Dabei zeigte sich eine deutlich höhere Transkriptionsrate bei vorliegendem Haplotyp 2 oder 4 als bei den Haplotypen 1 oder 3 (Haplotypenunterteilungen siehe unter 2.10.) [81]. Als mögliche Konsequenz aus diesen Ergebnissen könnte auch ein erhöhtes Magenkarzinomrisiko durch die proinflammatorischen Haplotypen 2 und 4 bestehen. Ein höheres *IL 1β*-Niveau durch vermehrte Transkription könnte über eine Kaskade vom erhöhtem pH-Wert im Magen bis zu einer korpusdominanten atrophischen Gastritis als prämaligene Kondition zu der Ausbildung eines Magenkarzinoms führen.

Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse aus *in-vitro*-Analysen wurde in der vorliegenden Studie zum ersten Mal die Bedeutung dieser Haplotypen im *IL 1B*-Gen für die klinischen Diagnosen eines Magenkarzinoms und einer Risikogastritis untersucht. Die Assoziation zwischen der Haplotypenzusammensetzung und dem Risiko für erstgradig Verwandte von Karzinompatienten wurde dabei ebenfalls berücksichtigt.

Bisher wurde die potentielle Verknüpfung zwischen *IL 1β*-Polymorphismenkombinationen und Magenkarzinomen bei deutschen Probanden kaukasischer Abstammung in drei weiteren Studien thematisiert. Glas *et al.* verglichen 88 Patienten mit einem Magenfrühkarzinom mit 144 gesunden Kontrollen [102]. Der Genotyp *IL 1 RN\*2/2* war signifikant häufiger bei Patienten mit einem Magenfrühkarzinom anzutreffen als in der Kontrollgruppe ( $p < 0,001$ ). Für Polymorphismen an der Position *IL 1B* -31 oder -511 fand sich kein Unterschied zwischen den Gruppen. Jedoch lagen mehrere Polymorphismen in Kombination (im *IL 1B*-Gen, *IL 1 RN*-Gen oder *TNF A*-Gen) signifikant häufiger bei den Karzinompatienten vor. Bei 48 % der Patientengruppe konnten 2 ( $p < 0,0001$ ), bei 9 % sogar 3 der

Hochrisikopolymorphismen ( $p < 0,01$ ) nachgewiesen werden. Die Vermutung, dass während der Tumorprogression eine Selektion von Polymorphismen stattfindet und daher bei fortgeschrittenen Karzinomen auch signifikant häufiger das *IL 1B* -511 T-Allel oder -31 C-Allel anzutreffen ist [102], kann durch die vorliegende Studie nicht bestätigt werden. Bei Patienten mit einem Magenkarzinom traten die proinflammatorischen Haplotypen 2 und 4 des *IL 1B*-Gens (mit den Allelen -511 T und -31 C) nicht häufiger auf, als bei den anderen Gruppen. Nach dieser These müsste sich das Haplotypenmuster zwischen Patienten mit einer Risikogastritis und den Karzinompatienten auch deutlich unterscheiden, was in der hier untersuchten Population nicht der Fall war.

In einer anderen Studie wurden 210 *H. pylori*-positive Patienten mit einer chronischen Gastritis auf Polymorphismen im *IL 1B*- und *IL 1RN*-Gen und das Risiko für eine schwere Entzündung inklusive der Ausbildung einer atrophischen Gastritis und intestinalen Metaplasie untersucht [103]. Hier konnte für einzelne Polymorphismen kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit schweren Entzündungsformen und Patienten mit leichteren Verläufen gefunden werden. Erst die Kombination *IL 1B* -511 T / *IL 1B* -31 C / *IL 1RN*\*2 war mit einem erhöhten Risiko für Entzündungen mit starker Granulozyten- oder Lymphozyteninfiltration der Mukosa, einer atrophischen Gastritis oder einer intestinalen Metaplasie verbunden [103]. Das entspräche den Haplotypen 2 oder 4 in vorliegenden Untersuchungen.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Gao *et al.* bei der Untersuchung von 534 Patienten mit einer serologisch definierten atrophischen Gastritis [101]. Nur bei Kombination mehrerer proinflammatorischer Polymorphismen lag mit Signifikanz ein erhöhtes Risiko für eine chronisch atrophische Gastritis vor.

Unter Berücksichtigung der Haplotypenkonfigurationen auch an Position -3737 und -1464 im *IL 1B*-Gen können die Ergebnisse dieser drei Publikationen nicht bestätigt werden. In der vorliegenden Studie waren proinflammatorische Haplotypen des *IL 1B*-Gens weder mit einer Risikogastritis noch mit einem Magenkarzinom assoziiert. Auch erstgradig Verwandte von Karzinompatienten zeigten keine von den Vergleichsgruppen abweichende Haplotypenzusammensetzung.

Kupcinkas und Kollegen betrachteten die gleichen Polymorphismen im Haplotypenkontext, und deren Einfluss auf die Entstehung prämaligener Läsionen [104]. Sie stellten allerdings bei

Kaukasiern mit dem Haplotyp 2 eine Tendenz zur Ausbildung einer atrophischen Antrumgastritis und einer intestinalen Metaplasie in der Incisura angularis fest.

#### 4.3.2 Haplotypen und *H. pylori*

Ein Zusammenhang zwischen den vorliegenden Haplotypen und dem *H. pylori*-Status der Patienten konnte bei den 433 Studienteilnehmern nicht nachgewiesen werden.

Auch Arango und Kollegen konnten keine Begünstigung einer *H. pylori*-Infektion durch bestimmte Polymorphismen im *IL 1B*-Gen aufzeigen [105]. Die Genotypen an Position -511, -31 und +3954 des *IL 1B*-Gens unterschieden sich nicht zwischen den *H. pylori*-positiven und den *H. pylori*-negativen Probanden. Auch in einer anderen Studie fand sich kein Einfluss von Polymorphismen auf die Infektion mit bestimmten *H. pylori*-Stämmen [103]. Die Frequenz der Infektionen mit *CagA*- oder *VacA*-positiven *H. pylori*-Stämmen unterschied sich bei Trägern verschiedener Genotypen an den Positionen -511 und -31 des *IL 1B*-Gens oder im *IL 1RN*-Gen nicht. Unabhängig von der Haplotypenkonfiguration zeigten jedoch alle Patienten, die mit *CagA*- und *VacA*-negativen *H. pylori*-Stämmen infiziert waren, keine schwerwiegenden Gastritiden [103]. Daher scheinen bakterielle Virulenzfaktoren einen wesentlichen Einfluss auf die Entstehung schwerer Magenschleimhautveränderungen bis hin zum Magenkarzinom zu haben [103]. Polymorphismen proinflammatorischer Zytokine könnten die Schwere der Mukosaveränderungen beeinflussen, spielen jedoch keine übergeordnete Rolle bei der Entwicklung schwerer Magenschleimhautentzündungen. Dieses Erkenntnis geht mit den in dieser Dissertation ermittelten Ergebnissen konform, dass Polymorphismen im *IL 1B*-Gen und auch deren Haplotypenzusammensetzung nicht zu einem erhöhten Risiko für das Magenkarzinom oder dessen prämaligne Veränderungen führen.

### 4.4 Haplotypenpaare

#### 4.4.1 Haplotypenpaare und *IL 1β*-Expression

In einer neueren Studie konnte die Bedeutsamkeit der Analyse von Haplotypenpaaren gezeigt werden [93]. Es wurde das *IL 1β*-Niveau aus Speichel und isolierten mononukleären Zellen von 900 Kaukasiern bestimmt und der Zusammenhang mit den vorliegenden Haplotypenpaaren untersucht, die durch den Genotyp an Position -3737, -1464 und -511 definiert waren. Zusätzlich wurde der Einfluss von Haplotypenpaaren auf das C-reaktive



Protein (CrP) als serologischen Marker für inflammatorische Prozesse analysiert. Nach Ermittlung einer Rangfolge von „hochexprimierenden“ bis zu „niedrigexprimierenden“ Haplotypenpaaren durch den Vergleich aller Paare untereinander und die Bestimmung des zugehörigen *IL 1 $\beta$* -Niveaus wurden die Paare in drei Gruppen („hoch-, niedrig- und intermediärexprimierende“ Gruppe) eingeteilt. Als Referenzgruppe für weitere Berechnungen galten die „niedrigexprimierenden“ Haplotypenpaare. Dies war die erste Studie, die an humanen Gewebeproben unterschiedliche *IL 1 $\beta$* -Spiegel bei Vorliegen verschiedener Haplotypenpaare nachwies. Bei dem Vergleich der einzelnen Paare war die *IL 1 $\beta$* -Produktion bei der Kombination H3/H3 53 % höher als bei der Kombination H1/H2. In isolierten mononukleären Zellen war der Unterschied mit fast 4-fach höherem Wert noch größer. Drei der Haplotypenpaare (H3/H3, H3/H2, H3/H4), die mit einem erhöhten *IL 1 $\beta$* -Niveau verbunden waren, führten ebenfalls zu hohen CrP-Werten. Bei zwei anderen Haplotypenpaaren konnte dieser Zusammenhang nicht gezeigt werden [93]. Obwohl nicht klar ist, ob es eine regulatorische Verbindung zwischen der *IL 1 $\beta$* - und der CrP-Produktion gibt oder diese Studie auf zwei unabhängige Phänomene hindeutet, zeigt dieser Sachverhalt die Komplexität der Analyse von definierbarem Genotyp auf der einen Seite und funktioneller Variabilität auf der anderen [10]. Der Haplotyp H3 entspricht in dieser Studie dem Vorhandensein nur von Wildtypallelen an allen untersuchten Positionen (-3737C / -1464G / -511C / -31T). Somit widersprechen die Erkenntnisse von Rogus und Kollegen denen von Chen *et al.* [93, 81]. Der Haplotyp 3 besaß in der von Chen und Kollegen veröffentlichten Studie die niedrigste transkriptionelle Aktivität. H2 und H4 mit Alternativallelen an Position -511 und -31 hingegen führten zu einer wesentlich höheren Aktivierung der Transkription, was auch mit den Ergebnissen vorheriger Studien übereinstimmt [68, 69, 75, 76, 77]. Differenzen zwischen den von Rogus und Chen *et al.* veröffentlichten Daten sind möglicherweise durch die Betrachtung unterschiedlicher Endpunkte bedingt. Chen und Kollegen bewerteten die Transkription des *IL 1 $\beta$* -Gens *in-vitro*, während sich die Daten von Rogus *et al.* auf den Proteinspiegel von *IL 1 $\beta$*  *in-vivo* bezogen. Des Weiteren wurden bei Rogus *et al.* die durch die Erstellung einer Rangliste ermittelten „niedrigexprimierenden“ Haplotypenpaare als Referenz genutzt, sodass ein Vergleich mit anderen Studien, die beispielsweise das Vorhandensein von Wildtypallelen als Kontrolle nutzten, nicht möglich ist.

#### 4.4.2 Haplotypenpaare und Magenkarzinom

Es zeigt sich durch diese Diskrepanzen, dass die Bewertung auch des Magenkarzinomrisikos durch *IL 1 $\beta$* -Polymorphismen und deren Haplotypenkonfiguration sehr komplex ist und von vielen Faktoren und Interaktionen der Polymorphismen abhängig zu sein scheint. Eine Schlussfolgerung über das Proteinniveau bei der Bestimmung der transkriptionellen Aktivität scheint nach Betrachtung der bislang publizierten Daten ebenfalls nicht möglich zu sein. Der Nachweis eines eindeutigen Einflusses von Polymorphismen und deren Haplotypenkonfiguration auf das Magenkarzinomrisiko gestaltete sich daher in der Vergangenheit schwierig und wird auch in Zukunft kontrovers bleiben [79, 98, 99, 100, 101].

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen keine Assoziation zwischen der Haplotypenpaarzusammensetzung und dem Magenkarzinomrisiko oder dem Risiko der Entwicklung prämaligener Läsionen. Weder Magenkarzinompatienten noch Patienten mit einer Risikogastritis besaßen eine der Haplotypenpaargruppen signifikant häufiger als die gesunde Kontrollgruppe. Aufgrund der oben genannten Differenzen wurde bei der statistischen Auswertung neben der Einteilung nach Rogus *et al.* eine weitere Gruppeneinteilung gewählt, um die Erkenntnisse aus der Veröffentlichung von Chen *et al.* zu berücksichtigen. Jedoch ließen sich auch bei einer anderen Einteilung der Haplotypenpaare keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Magenkarzinomrisikos aufzeigen (**Anhang 2 und 3**). Auch die Kombination „hochexprimierender“ Haplotypenpaare mit den Allelen *IL 1 RN* 2/2 war nicht mit Magenkarzinomen oder einer Risikogastritis assoziiert (**Anhang 4 und 5**). Andere Autoren berichteten hingegen immer wieder von einer Kumulation der Risiken bei gleichzeitigem Vorhandensein proinflammatorischer Polymorphismen im *IL 1B*-Gen und dem Allel 2 im *IL 1 RN*-Gen [102, 103, 106]. So bestimmten Rad *et al.* die Genotypen an Position -511 und -31 im *IL 1B*-Gen, die VNTR im *IL 1 RN*-Gen und deren Einfluss auf das mRNA-Niveau von *IL 1 $\beta$*  an 207 *H. pylori*-positiven Patienten mit chronischer Gastritis [106]. Jeder einzelne Polymorphismus führte zu einem erhöhten *IL 1 $\beta$*  mRNA-Spiegel. Das höchste Niveau wurde jedoch durch gleichzeitiges Vorliegen von *IL 1B* -511 T und *IL 1 RN*\*2 registriert.

#### 4.5 Histologie von Magenkarzinomen im Zusammenhang mit Polymorphismen im *IL 1B*- und *IL 1 RN*-Gen

Intestinale Metaplasie und Atrophie waren wesentlich häufiger bei Karzinomen vom intestinalen Typ zu finden. Tumoren vom diffusen Typ waren deutlich schlechter differenziert als intestinale Magenkarzinome. Diese Unterschiede spiegeln die typischen Charakteristika der beiden Tumorentitäten wider [9, 47]. Keine Unterschiede zeigten sich bezüglich der Polymorphismenverteilung in diesen beiden Gruppen. Karzinompatienten mit einem Tumor vom intestinalen Typ wiesen häufiger den heterozygoten Genotyp *IL 1B* -3737 C/T auf als jene mit Karzinomen vom diffusen Typ. In dieser Gruppe war die Wildtypenkonfiguration -3737 C/C am häufigsten vertreten, auch wenn dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war.

##### 4.5.1 Intestinale Metaplasie

Dieser Erkenntnis entsprechend zeigten sich ebenfalls Differenzen in der Genotypenkonfiguration an Position -3737 des *IL 1B*-Gens im Bezug auf das Vorhandensein einer intestinalen Metaplasie. *IL 1B* -3737 C/T fand sich bei 46,8 % der Patienten mit einer intestinalen Metaplasie und nur bei 20 % der Patienten ohne diese. Hier lag ein signifikanter Unterschied vor. Ein größerer Einfluss von Polymorphismen im *IL 1B*-Gen auf die Entwicklung von Magenkarzinomen vom intestinalen Typ ist aufgrund unterschiedlicher Entstehungswege von intestinalen und diffusen Karzinomen möglich. Die intestinale Metaplasie wird als prämaligne Kondition des Magenkarzinoms vom intestinalen Typ angesehen.

Auch Peleteiro und Kollegen untersuchten in einer Metaanalyse die Auswirkung von Polymorphismen auf die Entwicklung präkanzeröser Konditionen, wie der IM und der chronisch atrophischen Gastritis, und nicht auf das Magenkarzinom selbst [107]. Während für den *IL 1B* -511-Polymorphismus keine Assoziation zu vermehrten prämaligen Läsionen der Magenschleimhaut festgestellt wurde, zeigte sich ein erhöhtes Risiko für deren Ausbildung bei Trägern des Allels 2 im *IL 1 RN* Gen mit einer OR von 1,35 (95 % KI 1,12 - 1,63). Solch ein positiver Zusammenhang bestand auch bei alleiniger Betrachtung der kaukasischen Population, welcher sich für *H. pylori*-positive Patienten noch verstärkte [107].

## 4.6 Histologie von Magenkarzinomen im Zusammenhang mit Haplotypen und Haplotypenpaaren im IL 1B-Gen

### 4.6.1 Tumorcharakteristika

Obwohl der Haplotyp 4 bei Patienten mit Magenkarzinomen vom diffusen Typ häufiger vorlag als bei Patienten mit Tumoren vom intestinalen Typ, fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen in ihrer Haplotypenverteilung. Durch die Zuordnung der zwei Gruppen zu 5 Haplotypen liegen allerdings sehr niedrige Fallzahlen für jeden Haplotyp vor. Es ist fraglich, ob sich hier bei der Untersuchung eines größeren Kollektivs ein signifikanter Unterschied einstellt. Weitere Studien an Magenkarzinompatienten, die sich auf die beschriebenen Haplotypen beziehen, liegen derzeit noch nicht vor.

Die Karzinogenese des Magenkarzinoms durch Umweltfaktoren, allen voran *H. pylori*, konnte bisher eindeutig bei Tumoren vom intestinalen Typ nachgewiesen werden, während die sequentielle Entstehung von diffusen Magenkarzinomen im Zusammenhang mit *H. pylori* derzeit noch nicht geklärt ist. Über die stufenweise Entwicklung aus einer chronischen Gastritis mit prämaligen Konditionen (Correa-Kaskade) vergeht bei der Entstehung eines Magenkarzinoms vom intestinalen Typ verglichen mit diffusen Magenkarzinomen eventuell ein längerer Zeitraum, sodass die proinflammatorischen Polymorphismen im *IL 1B*-Gen eine andere Relevanz entfalten. Dafür sprechen auch Ergebnisse aus einer Fall-Kontroll-Studie an einer chinesischen, gesunden Studienpopulation und Magenkarzinompatienten [108]. Für Träger des Genotyps *IL 1B* -511 T/T zeigte sich nicht nur ein insgesamt erhöhtes Magenkarzinomrisiko, dieser Genotyp war auch signifikant mit Karzinomen vom intestinalen Typ assoziiert.

Für Polymorphismen am Locus *IL 1B* -511 konnte durch die vorliegende Studie allerdings kein Unterschied zwischen Karzinomen vom intestinalen Typ und jenen vom diffusen Typ aufgezeigt werden. Zur eindeutigen Risikobeurteilung sind in Zukunft weitere Untersuchungen nötig.

Während Yu *et al.* zusätzlich eine Verbindung zwischen dem Genotyp *IL 1B* -511 T/T und wenig differenzierten Karzinomen herstellen konnten, zeigte sich diese Allelkombination in der vorliegenden Arbeit eher bei besser differenzierten Tumoren [108]. Statistische Signifikanz lag jedoch nicht vor, sodass es auch zur Beurteilung des Einflusses von

Polymorphismen auf die Entdifferenzierung von Magenkarzinomzellen weiterer Untersuchungen bedarf.

#### 4.6.2 Intestinale Metaplasie

Karzinompatienten, bei denen histologisch keine intestinale Metaplasie nachzuweisen war, trugen wesentlich häufiger den Haplotyp 4 als Patienten mit intestinaler Metaplasie.

Bei positivem Nachweis einer intestinalen Metaplasie ließ sich dagegen häufiger der Haplotyp 3 nachweisen. Auch Zabaleta *et al.* untersuchten den Einfluss des Haplotypen -511 -31/ +3954 im *IL 1B*-Gen auf prämaligne Läsionen des Magens [109]. Sie fanden für die 361 untersuchten Afroamerikaner einen positiven Zusammenhang zwischen dem Haplotyp -511 T/-31 C/+3954 T und dem Auftreten von intestinaler Metaplasie und Dysplasie. Die Betrachtung von 208 kaukasischen Studienteilnehmern hingegen zeigte keinen Zusammenhang zwischen einer bestimmten Haplotypenkonfiguration und prämaligen Veränderungen. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie müssen im weiteren Verlauf noch an einer größeren Population bestätigt werden.

#### 4.6.3 *H. pylori*

Auch bei dem Vergleich der Haplotypenverteilung bei *H. pylori*-positiven und -negativen Patienten zeigte sich lediglich eine Tendenz zu einer geringeren Durchseuchung mit *H. pylori* bei Trägern der proinflammatorischen Haplotypen. Der Haplotyp 4 war beispielsweise bei 14 % der *H. pylori*-negativen und nur bei 4 % der *H. pylori*-positiven Patienten zu finden. Bei starken Unterschieden in den Gruppengrößen durch die große Anzahl *H. pylori*-positiver Studienteilnehmer kann hierzu jedoch keine eindeutige Interpretation vorgenommen werden. Neue Untersuchungen, eventuell in einer Fall-Kontroll-Studie mit gleicher Anzahl *H. pylori*-positiver und -negativer Karzinompatienten, zur Beurteilung des Einflusses der Haplotypen auf die *H. pylori*-Besiedlung wären dafür sinnvoll.

### 4.7 Schlussfolgerung und Blick in die Zukunft

Die Arbeitshypothesen:

- 1) Magenkarzinompatienten und deren erstgradige Angehörige sind häufiger Träger von SNPs im *IL 1B*-Gen an den Positionen -3737, -1464, -511 und -31, im *IL 1 RN*-Gen beziehungsweise assoziierter Haplotypen.

- 2) *Das Vorliegen bestimmter SNPs im IL 1B-Gen ist assoziiert mit dem Auftreten prämaligener Konditionen der gastralen Mukosa beziehungsweise mit bestimmten Tumorcharakteristika bei Patienten mit Magenkarzinom.*

konnten durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden. Jedoch können die Ergebnisse als ein weiteres Element für das Verständnis der komplexen Zusammenhänge zwischen *IL 1B*- und *IL 1 RN*-Polymorphismen angesehen werden. Diese Komplexität wurde in der Vergangenheit erst nach und nach, beispielsweise durch die Entdeckung des Einflusses von Haplotypen und Haplotypenpaaren auf die Transkription von *IL 1β*, bekannt. Jedoch wurden bisher nur wenige weitere Studien veröffentlicht, die auch diese neuen Erkenntnisse berücksichtigten.

Der initial starke Zusammenhang zwischen *IL 1β*-Polymorphismen und der Ausbildung von Magenkarzinomen zeigt sich in neueren Analysen weniger deutlich, selbst wenn doch immer wieder auch positive Assoziationen ermittelt wurden. Der Einfluss von Polymorphismen auf Magenkarzinome ist, wenn überhaupt vorhanden, weitaus geringer als anfänglich vermutet. Sollte ein nur sehr geringer Effekt von *IL 1β*-Polymorphismen auf die Magenkarzinomentstehung vorliegen, ist ein Nachweis dieses Zusammenhangs aufgrund der relativ kleinen Patientenkollektive in dieser Dissertation nicht zu erwarten.

Stark positive Zusammenhänge werden demnach wohl auch in Zukunft nicht mehr gezeigt werden können. In neuen Studien zur Risikobewertung für die Magenkarzinomentwicklung sollten neben einer Polymorphismenbestimmung auch die *IL 1β*-Spiegel im Serum bestimmt werden. Der kausale Zusammenhang zwischen beiden Parametern und dem Risiko für die Ausbildung von Magenkarzinomen oder einer Risikogastritis kann nur so eindeutig geklärt werden.

In unseren Untersuchungen zeigte sich ein positiver Zusammenhang zwischen der Genotypausprägung -3737 C/T beziehungsweise dem Haplotyp 3 und dem gehäuftem Auftreten einer intestinalen Metaplasie bei Karzinompatienten. Dies ist bislang noch nicht vorbeschrieben und sollte durch weiter fortführende Studien bestätigt und näher evaluiert werden.

Alle mir bekannten Ergebnisse lassen mich zu der Schlussfolgerung kommen, dass die Polymorphismenbestimmung als Screeningmethode zur Ermittlung von Patienten mit einem höheren Magenkarzinomrisiko für die klinische Praxis ungeeignet ist, da kein eindeutiger

Zusammenhang zwischen den Polymorphismen im *IL 1B*-Gen oder *IL 1 RN*-Gen und der Ausbildung von Magenkarzinomen oder deren Vorstufen besteht.

## 5. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Assoziation zwischen SNP („single nucleotide polymorphism“ = Einzelnukleotidpolymorphismen), zugehörigen Haplotypen und Haplotypenpaaren im *IL 1B*- und *IL 1RN*-Gen und der Magenkarzinomentstehung untersucht. Unter Einzelnukleotidpolymorphismen versteht man dabei Mutationen nur einzelner Basenpaare eines DNA-Stranges, bei denen sich die zugehörige Funktion des entsprechenden Locus aber nicht verändert. Seit den Veröffentlichungen von El-Omar im Jahr 2000 wird der Zusammenhang vor allem von SNP in der Promotorregion des *IL 1B*-Gens und von VNTR des *IL 1RN*-Gens mit einem erhöhten Magenkarzinomrisiko kontrovers diskutiert.

Die vorliegende Studie umfasste insgesamt 433 Studienteilnehmer, die sich in vier Gruppen unterteilten (116 Magenkarzinompatienten, 142 Patienten mit einer Hochrisikogastritis, 81 Verwandte ersten Grades von Magenkarzinompatienten und 94 magengesunde Kontrollen). Nach Extraktion und Aufarbeitung der DNA aus dem Blut der Teilnehmer erfolgte die Genotypisierung mittels RFLP und Massenspektrometrie an den vier Genloci -3737, -1464, -511 und -31 der Promotorregion des *IL 1B*-Gens und die Bestimmung der VNTR im *IL 1RN*-Gen. Darüber hinaus wurden endoskopisch gewonnene Proben von Karzinompatienten und Patienten mit einer Risikogastritis hinsichtlich des Entzündungsgrades und der Tumorcharakteristika histopathologisch beurteilt. Des Weiteren wurde der *H. pylori*-Status von jedem Studienteilnehmer serologisch ermittelt.

Die Genotypenbestimmung zeigte keine Unterschiede im Polymorphismenstatus zwischen den verschiedenen Kollektiven. Auch konnte kein Zusammenhang zwischen einem bestimmten Haplotyp und dem Risiko für die Entstehung eines Magenkarzinoms oder der Ausbildung prämaligener Konditionen der Magenmukosa aufgezeigt werden. Eine Assoziation zwischen SNP und einer *H. pylori*-Infektion oder der Ausbildung einer Schleimhautatrophie beziehungsweise eines höheren Differenzierungsgrades bei Karzinompatienten wurde ebenfalls nicht belegt. Aufgrund der widersprüchlichen Studienergebnisse in der Vergangenheit können die Resultate dieser Dissertation als ein weiteres Element für das Verständnis der komplexen Zusammenhänge zwischen *IL 1B*- und *IL 1RN*-Polymorphismen und der Ausbildung eines Magenkarzinoms angesehen werden.

Einzig bei dem Vergleich von Karzinompatienten mit und ohne Ausbildung einer intestinalen Metaplasie ließen sich signifikante Unterschiede im Polymorphismenbesatz feststellen. Die häufigere Ausbildung einer intestinalen Metaplasie bei Karzinompatienten mit dem Genotyp



*IL 1B* -3737 C/T wurde bisher jedoch in keiner weiteren Studie bestätigt, sodass die eindeutige Zuordnung dieses Ergebnisses weiterer Belege bedarf. Auch die Betrachtung der Haplotypenkonfiguration bei Karzinompatienten mit und ohne intestinale Metaplasie zeigte einen signifikanten Unterschied, sodass Hinweise auf eine Assoziation von Haplotypen im *IL 1B*-Gen zu der Ausbildung einer intestinalen Metaplasie bestehen. Da sich die Karzinompatienten mit verschiedenen Haplotypenkonfigurationen jedoch weder im Bezug auf eine Schleimhautatrophie noch auf die Tumorcharakteristika unterschieden, muss dieser Zusammenhang weiter untersucht und im biologischen Kontext eingeordnet werden.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1 Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. **Global cancer statistics, 2002.** CA Cancer J Clin. 2005 Mar-Apr;55(2):74 - 108.
- 2 Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. **Global cancer statistics.** CA Cancer J Clin. 2011; 61 (2): 69 - 90.
- 3 Globocan 2008 **Cancer Fact Sheet** IARC 2008. <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/stomach.asp>
- 4 Leung WK, Wu MS, Kakugawa Y, Kim JJ, Yeoh KG, Goh KL, Wu KC, Wu DC, Sollano J, Kachintorn U, Gotoda T, Lin JT, You WC, Ng EK, Sung JJ; Asia Pacific Working Group on Gastric Cancer. Institute of Digestive Disease, Chinese University of Hong Kong, Hong Kong, China.-**Screening for gastric cancer in Asia: current evidence and practice** Lancet Oncol. 2008; 9 (3): 279-87
- 5 Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Baras N, Barnes B, Bertz J, Dahm S, Haberland J, Kraywinkel K, Laudi A, Wolf U. **Krebs in Deutschland 2007/2008.** 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2012, ISBN 978-3-89606-214-7
- 6 Krejs GJ. **Gastric cancer: epidemiology and risk factors.** Dig Dis 2010; 28(4-5):600-3.
- 7 Schmidt N, Peitz U, Lippert H, Malfertheiner P: **Missing gastric cancer in dyspepsia.** Aliment Pharmacol Ther. 2005; 21: 813 - 820.
- 8 Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Estève J, Sant M, Storm H, Allemani C, Ciccolallo L, Santaquilani M, Berrino F; EUROCORE Working Group. **EUROCORE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century.** Ann Oncol. 2003; 14 Suppl 5: 128-49
- 9 Lauren P. **The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification.** Acta Pathol Microbiol Scand. 1965; 64: 31 - 49
- 10 Wex T, Leodolter A, Bornschein J, Kuester D, Kähne T, Kropf S, Albrecht C, Naumann M, Roessner A, Malfertheiner P. **Interleukin 1 beta (IL1B) gene polymorphisms are not associated with gastric carcinogenesis in Germany.** Anticancer Res. 2010; 30 (2): 505-11.
- 11 Barber M, Fitzgerald RC, Caldas C. **Familial gastric cancer-aetiology and pathogenesis.** Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2006; 20 (4): 721-34.
- 12 Mayer B, Johnson JP, Leitl F, Jauch KW, Heiss M, Schildberg FW, Birchmeier W, Funke I. **E-Cadherin Expression in Primary and Metastatic Gastric Cancer: Down-Regulation Correlates with Cellular Dedifferentiation and Glandular Disintegration.** Cancer Res. 1993; 53(7): 1690-5.
- 13 Handschuh G, Candidus S, Lubert B, Reich U, Schott C, Oswald S, Becke H, Hutzler P, Birchmeier W, Höfler H, Becker KF. **Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility.** Oncogene. 1999; 18 (30): 4301-12
- 14 Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N, Butterfield YS, Jeyes J, Schinas J, Bacani J, Kelsey M, Ferreira P, MacGillivray B, MacLeod P, Micek M, Ford J, Foulkes W, Australie K, Greenberg C, LaPointe M, Gilpin C, Nikkel S, Gilchrist D, Hughes R, Jackson CE, Monaghan KG, Oliveira MJ, Seruca R, Gallinger S, Caldas C, Huntsman D. **Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria.** J Med Genet. 2004; 41 (7): 508-17.

- 15 Palli D. **Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence.** *J Gastroenterol.* 2000; 35 Suppl 12: 84-89.
- 16 Takahashi M, Hasegawa R. **Enhancing effects of dietary salt on both initiation and promotion stages of rat gastric carcinogenesis.** *Princess Takamatsu Symp.* 1985; 16: 169-82.
- 17 Tatematsu M, Takahashi M, Hananouchi M, Shirai T, Hirose M. **Protective effect of mucin on experimental gastric cancer induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine plus sodium chloride in rats.** *Gann.* 1976; 67 (2): 223-9.
- 18 Ladeiras-Lopes R, Pereira AK, Nogueira A, Pinheiro-Torres T, Pinto I, Santos-Pereira R, Lunet N. **Smoking and gastric cancer: systematic review and meta-analysis of cohort studies.** *Cancer Causes Control.* 2008; 19 (7): 689 - 701.
- 19 Trédaniel J, Boffetta P, Buiatti E, Saracci R, Hirsch A. **Tobacco smoking and gastric cancer: review and meta-analysis.** *Int J Cancer.* 1997; 72 (4): 565-73.
- 20 Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. **Epidemiology of stomach cancer.** *Methods Mol Biol.* 2009; 472: 467-77.
- 21 González CA, López-Carrillo L. **Helicobacter pylori, nutrition and smoking interactions: their impact in gastric carcinogenesis.** *Scand J Gastroenterol.* 2010; 45 (1): 6-14.
- 22 IARC Lyon, 7-14 June 1994. **Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans.** *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 1994; 61: 1-241.
- 23 Honda S, Fujioka T, Tokieda M, Satoh R, Nishizono A, Nasu M. **Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils.** *Cancer Res.* 1998; 58: 4255-4259.
- 24 Watanabe T, Tada M, Nagai H, Sasaki S, Nakao M. **Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils.** *Gastroenterology.* 1998; 115: 642-648.
- 25 Huang JQ, Sridhar S, Chen Y, Hunt RH. **Meta-analysis of the relationship between Helicobacter pylori seropositivity and gastric cancer.** *Gastroenterology.* 1998; 114 (6): 1169-79.
- 26 Eslick GD, Lim LL, Byles JE, Xia HH, Talley NJ. **Association of Helicobacter pylori infection with gastric carcinoma: a meta-analysis.** *Am J Gastroenterol.* 1999; 94 (9): 2373-9.
- 27 Helicobacter and Cancer Collaborative Group. **Gastric cancer and Helicobacter pylori: a combined analysis of 12 case control studies nested within prospective cohorts.** *Gut.* 2001;49 (3): 347-53.
- 28 Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S. **H. pylori infection and the development of gastric cancer.** *Keio J Med.* 2002; 51 Suppl 2: 63-8.
- 29 Blaser MJ, Perez-Perez GI, Kleanthous H, Cover TL, Peek RM, Chyou PH, Stemmermann GN, Nomura A. **Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach.** *Cancer Res.* 1995; 55: 2111-2115.
- 30 Parsonnet J, Friedman GD, Orentreich N, Vogelman H. **Risk for gastric cancer in people with CagA positive or CagA negative Helicobacter pylori infection.** *Gut.* 1997; 40: 297-301.
- 31 Kim H, Lim JW, Kim KH. **Helicobacter pylori-induced expression of interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in AGS gastric epithelial cells: mediation by nuclear factor-kappaB.** *Scand J Gastroenterol.* 2001; 36: 706-716.

- 32 Gorrell RJ, Guan J, Xin Y, Tafreshi MA, Hutton ML, McGuckin MA, Ferrero RL, Kwok T. **A novel NOD1- and CagA-independent pathway of interleukin-8 induction mediated by the Helicobacter pylori type IV secretion system.** *Cell Microbiol.* 2013 Apr;15(4):554-70.
- 33 Glocker EI, Lange C, Covacci A, Bereswill S, Kist M, Pahl HL. **Proteins encoded by the cag pathogenicity island of Helicobacter pylori are required for NF-kappaB activation.** *Infect Immun.* 1998 May;66(5):2346-8.
- 34 Saadat I, Higashi H, Obuse C, Umeda M, Murata-Kamiya N, Saito Y, Lu H, Ohnishi N, Azuma T, Suzuki A, Ohno S, Hatakeyama M. **Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity.** *Nature.* 2007; 447: 330-333.
- 35 Huang JQ, Zheng GF, Sumanac K, Irvine EJ, Hunt RH. **Meta-analysis of the relationship between cagA seropositivity and gastric cancer.** *Gastroenterology* 2003; 125 (6): 1636-44.
- 36 Manente L, Perna A, Buommino E, Altucci L, Lucariello A, Citro G, Baldi A, Iaquinto G, Tufano MA, De LA. **The Helicobacter pylori's protein VacA has direct effects on the regulation of cell cycle and apoptosis in gastric epithelial cells.** *J Cell Physiol.* 2008; 214: 582-587.
- 37 Rad R, Gerhard M, Lang R, Schoniger M, Rosch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C. **The Helicobacter pylori blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response.** *J Immunol.* 2002; 168: 3033-3041.
- 38 Gerhard M, Lehn N, Neumayer N, Boren T, Rad R, Schepp W, Miehle S, Classen M, Prinz C. **Clinical relevance of the Helicobacter pylori gene for blood-group antigen-binding adhesin.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 12778-12783.
- 39 Manuel R, Amievaand Emad M. el-Omar. **Reviews in basic and clinical Gastroenterology: Host bacterial interactions in helicobacter pylori infection.** *Gastroenterology* 2008; 134; 306-323.
- 40 Wu MS, Chen CJ, Lin JT. **Host-environment interactions: their impact on progression from gastric inflammation to carcinogenesis and on development of new approaches to prevent and treat gastric cancer.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14 (8): 1878-82.
- 41 El-Omar EM. **The importance of interleukin 1beta in Helicobacter pylori associated disease.** *Gut.* 2001; 48 (6): 743-7.
- 42 El-Omar EM, Oien K, El-Nujumi A, Gillen D, Wirz A, Dahill S, Williams C, Ardill JE, McColl KE. **Helicobacter pylori infection and chronic gastric acid hyposecretion.** *Gastroenterology* 1997; 113 (1): 15-24.
- 43 Kamada T, Hata J, Sugiu K, Kusunoki H, Ito M, Tanaka S, Inoue K, Kawamura Y, Chayama K, Haruma K. **Clinical features of gastric cancer discovered after successful eradication of Helicobacter pylori: results from a 9-year prospective follow-up study in Japan.** *Aliment Pharmacol Ther.* 2005; 21: 1121-1126.
- 44 Take S, Mizuno M, Ishiki K, Nagahara Y, Yoshida T, Yokota K, Oguma K. **Baseline gastric mucosal atrophy is a risk factor associated with the development of gastric cancer after Helicobacter pylori eradication therapy in patients with peptic ulcer diseases.** *J Gastroenterol.* 2007; 42 Suppl 17: 21-27.
- 45 Welin M, Holmgren NM, Nilsson P, Enroth H. **Statistical model of the interactions between Helicobacter pylori infection and gastric cancer development.** *Helicobacter.* 2003; 8 (1): 72-8.
- 46 de Vries AC, van Grieken NC, Looman CW, Casparie MK, de Vries E, Meijer GA, Kuipers EJ. **Gastric cancer risk in patients with premalignant gastric lesions: a nationwide cohort study in the Netherlands.** *Gastroenterology* 2008; 134 (4): 945-52.

- 47 Correa P. **A Human Model of Gastric Carcinogenesis.** *Cancer Res.* 1988; 48(13): 3554-60.
- 48 Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. **Gastric Precancerous Process in a High Risk Population: Cohort Follow-up.** *Cancer Res.* 1990; 50(15): 4737-40.
- 49 Büttner R, Thomas C. **Allgemeine Pathologie.** Schattauer 2003; 3. Auflage: S. 113
- 50 Grundmann herausgegeben von A. Roessner et al. **Allgemeine Pathologie und Grundlagen der speziellen Pathologie.** Elsevier Urban & Fischer 2008; 11. Auflage: S. 139
- 51 Dinarello CA. **Biologic basis for interleukin-1 in disease.** *Blood* 1996; 87 (6): 2095-147.
- 52 Robert A, Olafsson AS, Lancaster C, Zhang WR. **Interleukin-1 is cytoprotective, antisecretory, stimulates PGE2 synthesis by the stomach, and retards gastric emptying.** *Life Sci.* 1991; 48 (2): 123-34.
- 53 Schepp W, Dehne K, Herrmuth H, Pfeffer K, Prinz C. **Identification and functional importance of IL-1 receptors on rat parietal cells.** *Am J Physiol.* 1998; 275 (5 Pt 1): G1094-105.
- 54 Beales IL, Calam J. **Interleukin 1 beta and tumour necrosis factor alpha inhibit acid secretion in cultured rabbit parietal cells by multiple pathways.** *Gut* 1998; 42 (2): 227-34.
- 55 Saperas ES, Yang H, Rivier C, Taché Y. **Central action of recombinant interleukin-1 to inhibit acid secretion in rats.** *Gastroenterology* 1990; 99 (6): 1599-606.
- 56 Wolfe MM, Nompleggi DJ. **Cytokine inhibition of gastric acid secretion--a little goes a long way.** *Gastroenterology* 1992; 102(6): 2177-8.
- 57 Robert A, Saperas E, Zhang WR, Olafsson AS, Lancaster C, Tracey DE, Chosay JG, Taché Y. **Gastric cytoprotection by intracisternal interleukin-1 beta in the rat.** *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 174 (3): 1117-24.
- 58 Weigert N, Schaffer K, Schusdziarra V, Classen M, Schepp W. **Gastrin secretion from primary cultures of rabbit antral G cells: stimulation by inflammatory cytokines.** *Gastroenterology* 1996; 110 (1): 147- 54.
- 59 Prinz C, Neumayer N, Mahr S, Classen M, Schepp W. **Functional impairment of rat enterochromaffin-like cells by interleukin 1 beta.** *Gastroenterology* 1997; 112 (2): 364-75.
- 60 Mahr S, Neumayer N, Gerhard M, Classen M, Prinz C. **IL-1beta-induced apoptosis in rat gastric enterochromaffin-like cells is mediated by iNOS, NF-kappaB, and Bax protein.** *Gastroenterology* 2000; 118 (3): 515-24.
- 61 Takashima M, Furuta T, Hanai H, Sugimura H, Kaneko E. **Effects of Helicobacter pylori infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils.** *Gut* 2001; 48 (6): 765-73.
- 62 Lindholm C, Quiding-Järbrink M, Lönroth H, Hamlet A, Svennerholm AM. **Local cytokine response in Helicobacter pylori-infected subjects.** *Infect Immun.* 1998; 66 (12): 5964-71.
- 63 Basso D, Scrigner M, Toma A, Navaglia F, Di Mario F, Rugge M, Plebani M. **Helicobacter pylori infection enhances mucosal interleukin-1 beta, interleukin-6, and the soluble receptor of interleukin-2.** *Int J Clin Lab Res.* 1996; 26 (3): 207-10.

- 64 Holck S, Nørgaard A, Bennedsen M, Permin H, Norn S, Andersen LP. **Gastric mucosal cytokine responses in *Helicobacter pylori*-infected patients with gastritis and peptic ulcers. Association with inflammatory parameters and bacteria load.** FEMS Immunol Med Microbiol. 2003; 36 (3): 175-80.
- 65 Dinarello CA. **Interleukin-1, interleukin-1 receptors and interleukin-1 receptor antagonist.** Int Rev Immunol. 1998; 16 (5-6): 457-99.
- 66 Goll R, Gruber F, Olsen T, Cui G, Raschpichler G, Buset M, Asfeldt AM, Husebekk A, Florholmen J. ***Helicobacter pylori* stimulates a mixed adaptive immune response with a strong T-regulatory component in human gastric mucosa.** Helicobacter 2007; 12 (3): 185-92.
- 67 Strachan T., Read A. **Molekulare Humangenetik.** Elsevier, Spektrum, Akad. Verlag, 2005; 3. Ausgabe
- 68 El-Omar EM, Carrington M, Chow WH, McColl KE, Bream JH, Young HA, Herrera J, Lissowska J, Yuan CC, Rothman N, Lanyon G, Martin M, Fraumeni JF Jr, Rabkin CS. **Interleukin-1 polymorphisms associated with increased risk of gastric cancer.** Nature. 2000; 404 (6776): 398-402.
- 69 Machado JC, Pharoah P, Sousa S, Carvalho R, Oliveira C, Figueiredo C, Amorim A, Seruca R, Caldas C, Carneiro F, Sobrinho-Simões M. **Interleukin 1B and interleukin 1RN polymorphisms are associated with increased risk of gastric carcinoma.** Gastroenterology. 2001; 121 (4): 823-9.
- 70 Ruzzo A, Graziano F, Pizzagalli F, Santini D, Battistelli V, Panunzi S, Canestrari E, Catalano V, Humar B, Ficarella R, Bearzi I, Cascinu S, Naldi N, Testa E, Magnani M. **Interleukin 1B gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms in *Helicobacter pylori*-negative gastric cancer of intestinal and diffuse histotype.** Ann Oncol. 2005; 16 (6): 887-92.
- 71 Garza-González E, Bosques-Padilla FJ, El-Omar E, Hold G, Tijerina-Menchaca R, Maldonado-Garza HJ, Pérez-Pérez GI. **Role of the polymorphic IL-1B, IL-1RN and TNF-A genes in distal gastric cancer in Mexico.** Int J Cancer. 2005; 114 (2): 237-41.
- 72 Chen A, Li CN, Hsu PI, Lai KH, Tseng HH, Hsu PN, Lo GH, Lo CC, Lin CK, Hwang IR, Yamaoka Y, Chen HC. **Risks of interleukin-1 genetic polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection in the development of gastric cancer.** Aliment Pharmacol Ther 2004; 20: 203 – 11.
- 73 He X, Jiang L, Fu B, Zhang X. **Relationship between interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and susceptibility to gastric cancer.** Zhonghua Yi Xue Za Zhi 2002; 82: 685 – 8.
- 74 Kamangar F, Cheng C, Abnet CC, Rabkin CS. **Interleukin-1B polymorphisms and gastric cancer risk--a meta-analysis.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006; 15 (10): 1920-8.
- 75 Camargo MC, Mera R, Correa P, Peek RM Jr, Fontham ET, Goodman KJ, Piazuelo MB, Sicinski L, Zabaleta J, Schneider BG. **Interleukin-1beta and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms and gastric cancer: a meta-analysis.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006 ; 15 (9): 1674-87.
- 76 Wang P, Xia H, Zhang J, Dai L, Xu X, Wang K. **Association of interleukin-1 gene polymorphisms with gastric cancer: A meta-analysis.** Int. J. Cancer 2006; 120 (3): 552–562.
- 77 Vincenzi B, Patti G, Galluzzo S, Pantano F, Venditti O, Santini D, Ruzzo A, Schiavon G, Caraglia M, Marra M, Graziano F, Tonini G. **Interleukin 1beta-511T gene (IL1beta) polymorphism is correlated with gastric cancer in the Caucasian population: results from a meta-analysis.** Oncol Rep. 2008; 20 (5): 1213-20
- 78 Lahner E, Corleto VD, D'Ambra G, Di Giulio E, Delle Fave G, Annibale B. **Is interleukin-1 genotyping useful for the clinical management of patients with atrophic body gastritis?** Aliment Pharmacol Ther. 2008; 27 (4): 355-65.

- 79 Persson C, Engstrand L, Nyrén O, Hansson LE, Enroth H, Ekström AM, Ye W. **Interleukin 1-beta gene polymorphisms and risk of gastric cancer in Sweden.** *Scand J Gastroenterol.* 2009; 44 (3): 339-45.
- 80 Lee KA, Ki CS, Kim HJ, Sohn KM, Kim JW, Kang WK, Rhee JC, Song SY, Sohn TS. **Novel interleukin 1beta polymorphism increased the risk of gastric cancer in a Korean population.** *J Gastroenterol.* 2004; 39 (5): 429-33.
- 81 Chen H, Wilkins LM, Aziz N, Cannings C, Wyllie DH, Bingle C, Rogus J, Beck JD, Offenbacher S, MJ, Rafie-Kolpin M, Hsieh CM, Kornman KS, Duff GW. **Single nucleotide polymorphisms in the human interleukin-1B gene affect transcription according to haplotype context.** *Hum Mol Genet.* 2006; 15 (4): 519-29.
- 82 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. **Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994.** *Am J Surg Pathol.* 1996; 20 (10): 1161-81.
- 83 Malfertheiner P, Enrique Domínguez-Muñoz J, Heckenmüller H, Neubrand M, Fischer HP, Sauerbruch T. **Modified rapid urease test for detection of Helicobacter pylori infection.** *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 1996; 8 (1): 53-6.
- 84 Magdalena Szumilas, MSc. **Explaining Odds Ratios.** *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 2010 Aug; 19(3): 227–229.
- 85 Gareth J, Witten D, Hastie T, Tibshirani R. **An introduction to statistical learning.** New York: springer, 2013.
- 86 Fischbach W, Malfertheiner P, Hoffmann JC, Bolten W, Bornschein J, Götze O, Höhne W, Kist M, Koletzko S, Labenz J, Layer P, Miehle S, Morgner A, Peitz U, Preiss J, Prinz C, Rosien U, Schmidt W, Schwarzer A, Suerbaum S, Timmer A, Treiber G, Vieth M; German society for hygiene and microbiology; German society for pediatric gastroenterology and nutrition e. V; German society for rheumatology. **S3-guideline "helicobacter pylori and gastroduodenal ulcer disease" of the German society for digestive and metabolic diseases (DGVS) in cooperation with the German society for hygiene and microbiology, society for pediatric gastroenterology and nutrition e. V., German society for rheumatology.** *Z Gastroenterol.* 2009; 47(12):1230-63.
- 87 Wex T, Venerito M, Kreutzer J, Götze T, Kandulski A, Malfertheiner P. **Serological prevalence of Helicobacter pylori infection in Saxony-Anhalt, Germany, in 2010.** *Clin Vaccine Immunol.* 2011; 18 (12): 2109-12.
- 88 Fischbach W, Malfertheiner P, Hoffmann JC, Bolten W, Kist M, Koletzko S. **Helicobacter pylori und gastroduodenale Ulkuskrankheit.** *Clinical Practice Guideline: Helicobacter Pylori and Gastroduodenal Ulcer Disease Dtsch Arztebl Int* 2009; 106 (49): 801-8
- 89 Roosendaal R, Kuipers EJ, Buitenwerf J, van Uffelen C, Meuwissen SG, van Kamp GJ, Vandenbroucke- Grauls CM. **Helicobacter pylori and the birth cohort effect: evidence of a continuous decrease of infection rates in childhood.** *Am J Gastroenterol.* 1997; 92 (9): 1480-2.
- 90 Miwa H, Kikuchi S, Ohtaka K, Kobayashi O, Ogihara A, Hojo M, Nagahara A, Sato N. **Insufficient diagnostic accuracy of imported serological kits for Helicobacter pylori infection in Japanese population.** *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2000; 36 (2): 95-9.
- 91 Tabata H, Fuchigami T, Kobayashi H, Sakai Y, Nakanishi M, Tomioka K, Nakamura S, Fujishima M. **Helicobacter pylori and mucosal atrophy in patients with gastric cancer: a special study regarding the methods for detecting Helicobacter pylori.** *Dig Dis Sci.* 1999; 44 (10): 2027-34.
- 92 Meining A, Bayerdörffer E, Müller P, Miehle S, Lehn N, Hölzel D, Hatz R, Stolte M. **Gastric carcinoma risk index in patients infected with Helicobacter pylori.** *Virchows Arch* 1998; 432: 311–314

- 93 Rogus J, Beck JD, Offenbacher S, Huttner K, Iacoviello L, Latella MC, de Gaetano M, Wang HY, Kornman KS, Duff GW. **IL1B gene promoter haplotype pairs predict clinical levels of interleukin-1beta and C-reactive protein.** Hum Genet. 2008; 123 (4): 387-98.
- 94 Xue H, Lin B, Ni P, Xu H, Huang G. **Interleukin-1B and interleukin -1 RN polymorphisms and gastric carcinoma risk: A meta-analysis.** J Gastroenterol Hepatol. 2010; 25 (10): 1604-17.
- 95 Zhang Y, Liu C, Peng H, Zhang J, Feng Q. **IL1 receptor antagonist gene IL1-RN variable number of tandem repeats polymorphism and cancer risk: a literature review and meta-analysis.** PLoS One. 2012;7(9): e46017.
- 96 He B, Zhang Y, Pan Y, Xu Y, Gu L, Chen L, Wang S. **Interleukin 1 beta (IL1B) promoter polymorphism and cancer risk: evidence from 47 published studies.** Mutagenesis. 2011; 26 (5): 637-42.
- 97 Xu J, Yin Z, Cao S, Gao W, Liu L, Yin Y, Liu P, Shu Y. **Systematic Review and Meta-Analysis on the Association between IL-1B Polymorphisms and Cancer Risk.** PLoS One. 2013;8(5):e63654.
- 98 Erzin Y, Koksall V, Altun S, Dobrucali A, Aslan M, Erdamar S, Goksel S, Dirican A, Kocazeybek B. **Role of host interleukin 1beta gene (IL-1B) and interleukin 1 receptor antagonist gene (IL-1RN) polymorphisms in clinical outcomes in Helicobacter pylori-positive Turkish patients with dyspepsia.** J Gastroenterol. 2008; 43 (9): 705-10.
- 99 Starzyńska T, Ferenc K, Wex T, Kähne T, Lubiński J, Lawniczak M, Marlicz K, Malfertheiner P. : **The association between the interleukin-1 polymorphisms and gastric cancer risk depends on the family history of gastric carcinoma in the study population.** Am J Gastroenterol. 2006; 101 (2): 248-54.
- 100 Crusius JB, Canzian F, Capellá G, Peña AS, Pera G, Sala N, Agudo A, Rico F, Del Giudice G, Palli D, Plebani M, Boeing H, Bueno-de-Mesquita HB, Carneiro F, Pala V, Save VE, Vineis P, Tumino R, Panico S, Berglund G, Manjer J, Stenling R, Hallmans G, Martínez C, Dorronsoro M, Barricarte A, Navarro C, Quirós JR, Allen N, Key TJ, Bingham S, Caldas C, Linseisen J, Kaaks R, Overvad K, Tjønneland A, Büchner FC, Peeters PH, Numans ME, Clavel-Chapelon F, Trichopoulou A, Lund E, Jenab M, Rinaldi S, Ferrari P, Riboli E, González CA. **Cytokine gene polymorphisms and the risk of adenocarcinoma of the stomach in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC-EURGAST).** Ann Oncol. 2008; 19 (11): 1894-902.
- 101 Gao L, Weck MN, Nieters A, Brenner H. **Association between a pro-inflammatory genetic profile and the risk of chronic atrophic gastritis among older adults from Germany.** Eur J Cancer. 2009; 45 (3): 428-34.
- 102 Glas J, Török H, Schneider A, Brännler G, Kopp R, Albert E, Stolte M, Folwaczny C. **Allele 2 of the Interleukin-1 Receptor Antagonist Gene Is Associated With Early Gastric Cancer.** J Clin Oncol. 2004; 22 (23): 4746-52.
- 103 Rad R, Prinz C, Neu B, Neuhofer M, Zeitner M, Voland P, Becker I, Schepp W, Gerhard M. **Synergistic effect of Helicobacter pylori virulence factors and interleukin-1 polymorphisms for the development of severe histological changes in the gastric mucosa.** J Infect Dis. 2003; 188 (2): 272-81.
- 104 Kupcinkas L, Wex T, Kupcinkas J, Leja M, Ivanauskas A, Jonaitis LV, Janciauskas D, Kiudelis G, Funka K, Sudraba A, Chiu HM, Lin JT, Malfertheiner P. **Interleukin-1B and interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphisms are not associated with premalignant gastric conditions: a combined haplotype analysis.** Eur J Gastroenterol Hepatol. 2010; 22 (10): 1189-95.
- 105 Arango MT, Jaramillo C, Montealegre MC, Bohórquez MH, Delgado Mdel P. **Genetic characterization of the interleukin 1 b polymorphisms -511, -31 y +3954 in a Colombian population with dyspepsia.** Biomedica. 2010; 30 (2): 199-206.



- 106 Rad R, Dossumbekova A, Neu B, Lang R, Bauer S, Saur D, Gerhard M, Prinz C. **Cytokine gene polymorphisms influence mucosal cytokine expression, gastric inflammation, and host specific colonisation during Helicobacter pylori infection.** Gut. 2004; 53 (8): 1082-9.
- 107 Peleteiro B, Lunet N, Carrilho C, Durães C, Machado JC, La Vecchia C, Barros H. **Association between cytokine gene polymorphisms and gastric precancerous lesions: systematic review and meta-analysis.** Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010; 19 (3): 762-76.
- 108 Yu J, Zeng Z, Wang S, Tian L, Wu J, Xue L, Lee CW, Zhang M, Goggins WB, Chen M, Hu P, Sung JJ. **IL-1B-511 polymorphism is associated with increased risk of certain subtypes of gastric cancer in Chinese: a case-control study.** Am J Gastroenterol. 2010; 105 (3): 557-64.
- 109 Zabaleta J, Camargo MC, Ritchie MD, Piazuelo MB, Sierra RA, Turner SD, Delgado A, Fontham ET, Schneider BG, Correa P, Ochoa AC. **Association of haplotypes of inflammation-related genes with gastric preneoplastic lesions in African Americans and Caucasians.** Int J Cancer. 2011; 128 (3): 668-75.

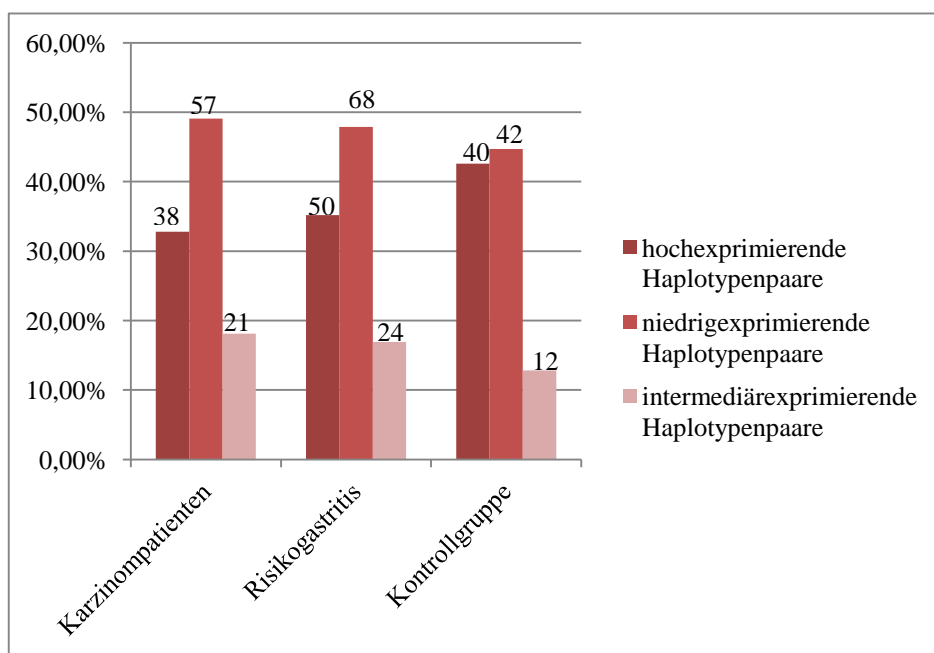
## 7. Anhang

**Anhang 1: OR und KI bei dem Vergleich der Kontrollgruppe mit den Magenkarzinompatienten beziehungsweise der Kontrollgruppe mit den Patienten mit einer Risikogastritis.** Die Gruppen wurden bezüglich der Polymorphismen an den einzelnen Genloci allein und auch in Kombination mit den VNTR des *IL1RN*- Gens verglichen. Als Referenz galten die jeweiligen Wildtypkonfigurationen. Bei dem Vergleich der Gruppen bezüglich der Haplotypenkonfiguration wurde der Haplotyp 3 als Referenz bestimmt.

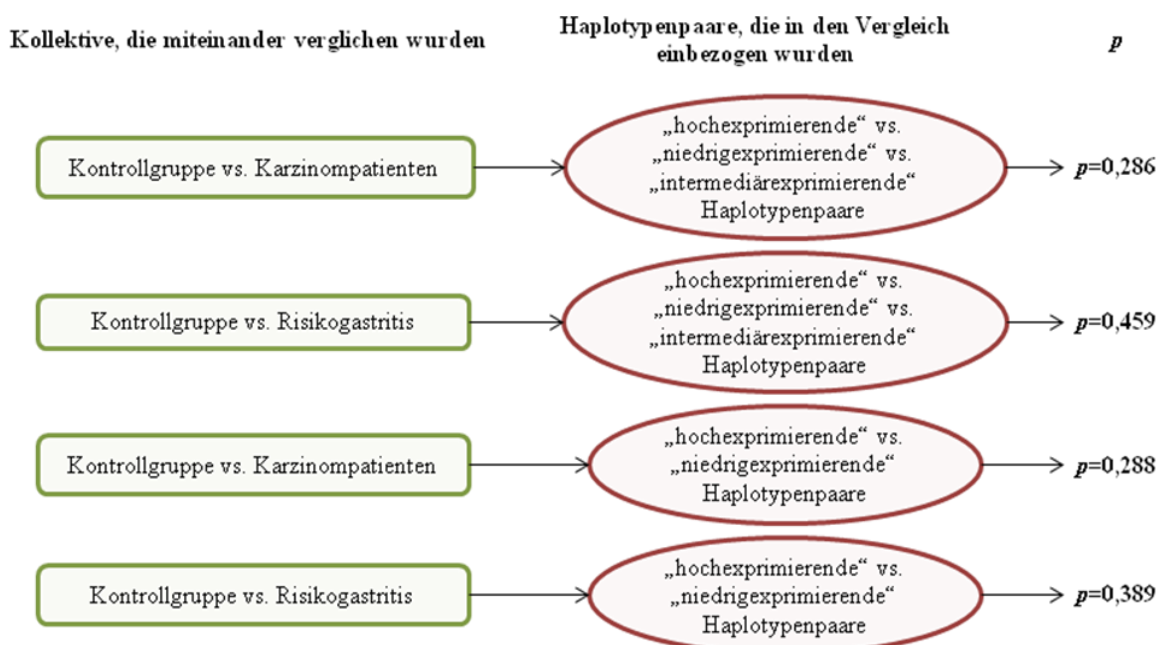
Vergleich	Referenz	Lokus	Vergleich	Kontr vs. GC		Kontr vs. RG			
				OR	KI	OR	KI		
Loci allg.	11	-3737	12	0.730	0.388-1.373	0.749	0.413-1.359		
			22	1.245	0.572-2.709	0.810	0.373-1.759		
		-1464	12	1.041	0.593-1.826	0.797	0.461-1.377		
			22	1.683	0.401-7.054	2.103	0.553-7.994		
		-511	12	0.776	0.435-1.383	0.838	0.482-1.459		
			22	0.941	0.377-2.351	1.050	0.440-2.508		
		-31	12	0.834	0.467-1.491	0.922	0.530-1.605		
			22	1.062	0.431-2.615	1.100	0.462-2.621		
		<i>IL1RN</i>	12	1.268	0.709-2.268	0.930	0.529-1.636		
			22	1.288	0.459-3.616	1.017	0.372-2.782		
		Loci + Rec	11/55 (0)	-3737	12/22 (1)	1.083	0.131-8.946	2.167	0.376-12.495
					22/22 (2)	3.250	0.296-35.658	0.722	0.041-12.638
12/25 (3)	1.254				0.463-3.397	0.608	0.229-1.613		
22/25 (4)	1.083				0.182-6.439	0.722	0.125-4.165		
-1464	12/22 (1)			0.833	0.225-3.084	0.464	0.118-1.827		

			22/22 (2)	1.667	0.146-19.062	2.319	0.250-21.471		
			12/25 (3)	1.343	0.652-2.765	0.902	0.444-1.832		
			22/25 (4)	1.667	0.290-9.576	1.739	0.335-9.029		
		-511	12/22 (1)	1.159	0.183-7.330	1.193	0.207-6.863		
			22/22 (2)	0.773	0.180-3.315	0.596	0.140-2.542		
			12/25 (3)	0.966	0.461-2.022	0.835	0.409-1.705		
			22/25 (4)	1.391	0.427-4.532	1.193	0.376-3.785		
		-31	12/22 (1)	1.227	0.194-7.748	1.263	0.220-7.254		
			22/22 (2)	0.818	0.191-3.503	0.632	0.149-2.685		
			12/25 (3)	1.023	0.491-2.132	0.884	0.435-1.798		
			22/25 (4)	1.473	0.453-4.786	1.263	0.399-3.996		
		Haplo	3	Haplo1	1	0.998	0.443-2.249	0.998	0.443-2.249
					2	1.820	0.632-5.241	1.820	0.632-5.241
					4	0.173	0.018-1.681	0.173	0.018-1.681
				Haplo2	1	1.267	0.588-2.731	1.267	0.588-2.731
					2	0.792	0.405-1.548	0.792	0.405-1.548
4	0.769				0.294-2.013	0.769	0.294-2.013		

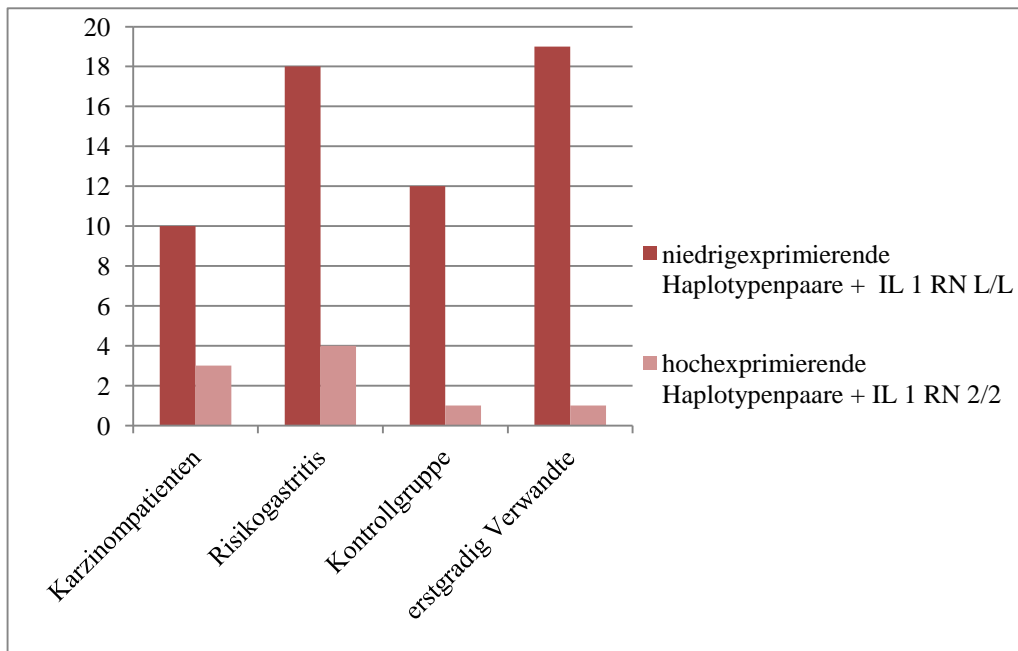
Loci: 1=Wildtypallel, 2= Alternativallel; Rec= Rezeptor: 2= Allel 2 des *IL 1 RN*-Gens, zu 5 wurden alle anderen Allele zusammengefasst; Haplo 1 und 2 entsprechen den Haplotypenkonfigurationen auf dem ersten beziehungsweise zweiten Chromosom der untersuchten Personen.



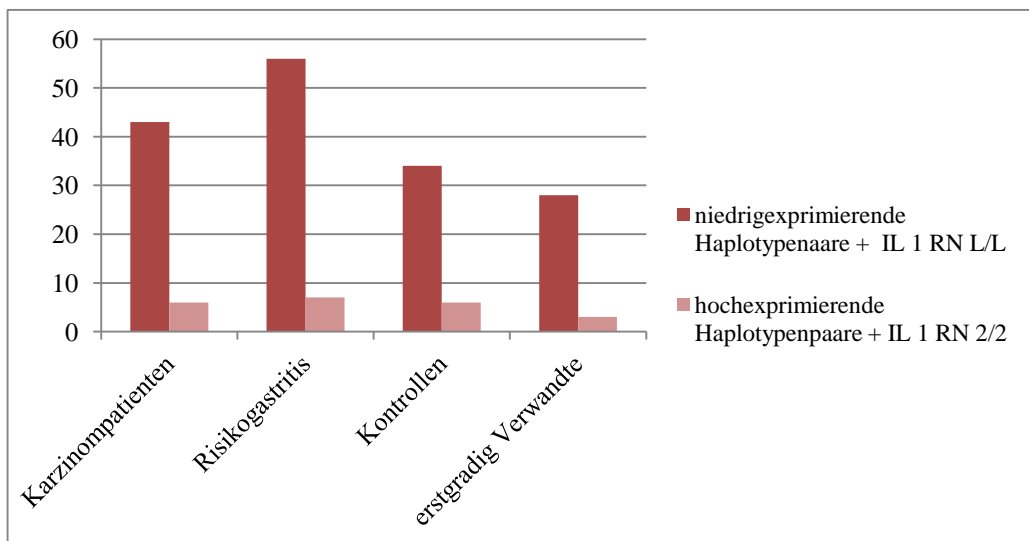
**Anhang 2: Verteilung der drei Gruppen von Haplotypenpaaren in den untersuchten Patientenkollektiven.** Zuordnung modifiziert: hochexprimierende Haplotypenpaare (Haplotyp 2/2, 1/2, 1/4, 2/4, 4/4), niedrigexprimierende Haplotypenpaare (Haplotyp 1/1, 1/3, 3/3), intermediärexprimierende Haplotypenpaare (alle übrigen Kombinationen). Die Zahlen über den Säulen geben die absolute Anzahl der Probanden mit diesen Haplotypenpaaren in den jeweiligen Kollektiven wieder; Unterschiede statistisch nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test).



**Anhang 3: Vergleich verschiedener Konstellationen aus Haplotypenpaargruppen und Kollektiven zur Bestimmung von Unterschieden.** Zuordnung modifiziert: hochexprimierende Haplotypenpaare (Haplotyp 2/2, 1/2, 1/4, 2/4, 4/4), niedrigexprimierende Haplotypenpaare (Haplotyp 1/1, 1/3, 3/3), intermediärexprimierende Haplotypenpaare (alle übrigen Kombinationen). Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test für die ersten zwei Vergleiche, exakter Test nach Fisher für die letzten beiden); vs. = versus.



**Anhang 4: Verteilung der Niedrigrisiko ( $H1/H2 + IL\ 1\ RN\ L/L$ ;  $H1/H4 + IL\ 1\ RN\ L/L$ ;  $H2/H2 + IL\ 1\ RN\ L/L$ )- und Hochrisikokonstellationen ( $H1/H1 + IL\ 1\ RN\ 2/2$ ;  $H1/H3 + IL\ 1\ RN\ 2/2$ ;  $H3/H3 + IL\ 1\ RN\ 2/2$ ) in den untersuchten Kollektiven. Ein Großteil der Patientenzahlen konnte keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden ( $n = 365$ ) und wurde in der graphischen Darstellung nicht berücksichtigt. Unterschied statistisch nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test;  $p = 0,377$ ). Angaben in absoluten Patientenzahlen.**



**Anhang 5: Verteilung der Niedrigrisiko ( $H1/H1 + IL\ 1\ RN\ L/L$ ;  $H1/H3 + IL\ 1\ RN\ L/L$ ;  $H3/H3 + IL\ 1\ RN\ L/L$ )- und Hochrisikokonstellationen ( $H1/H2 + IL\ 1\ RN\ 2/2$ ;  $H1/H4 + IL\ 1\ RN\ 2/2$ ;  $H2/H2 + IL\ 1\ RN\ 2/2$ ;  $H2/H4 + IL\ 1\ RN\ 2/2$ ;  $H4/H4 + IL\ 1\ RN\ 2/2$ ) in den untersuchten Kollektiven modifiziert nach Chen et al.. Auch nach dieser Einteilung konnte ein Großteil der Patientenzahlen keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden ( $n = 250$ ) und wurde in der graphischen Darstellung nicht berücksichtigt. Unterschied statistisch nicht signifikant (Chi-Quadrat-Test;  $p = 0,908$ ). Angaben in absoluten Patientenzahlen.**

## Danksagung

Ich möchte mich bei allen, die mich in den letzten Jahren so hilfreich unterstützt haben, bedanken. Ohne die große Hilfe wäre diese Dissertation nicht zustande gekommen.

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Malfertheiner und der ganzen Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie für die Möglichkeit, dass ich die Arbeiten für meine Dissertation in diesem Rahmen durchführen konnte.

Bei Herrn Dr. med. Jan Bornschein möchte ich mich für die unglaubliche Geduld und die geopferten Abende und Wochenenden bedanken. Er brachte mir nicht nur die Grundzüge des wissenschaftlichen Arbeitens bei, sondern zeigte mir auch, wie wichtig es ist, immer wieder kritisch mit sich selbst zu sein. Letztendlich verdanke ich es vor allem seiner motivierenden und zielstrebigem Art, dass diese Arbeit doch noch irgendwann fertig werden konnte.

(Nochmals danke für deine endlose Geduld mit meinen nervigen e-mails, gerade in der letzten Zeit, in der du eigentlich selbst erst einmal an deiner neuen Arbeitsstelle ankommen musstest und dir trotzdem so viel Zeit genommen hast!)

*Danke für das allzeit offene Ohr und die sehr gute fachliche Betreuung!*

Bei Herrn Privatdozenten Dr. rer. nat. Thomas Wex möchte ich mich für die sehr gute Betreuung des experimentellen Teils des Projekts bedanken. Auch bei Verständnisproblemen stand er immer mit Rat und Tat zur Seite, sodass mir das Arbeiten an dieser Dissertation viel leichter fiel. Vielen Dank auch für die Begutachtung der Zwischen- und Endversion dieser Niederschrift.

Ein ganz besonderer Dank gilt Ursel Stolz, Marion Holley und Nadine Schüler, die mir gern ihre fachlichen Kenntnisse und Fertigkeiten vermittelten und eine sehr angenehme Arbeitsatmosphäre im Labor schafften.

Großer Dank gebührt auch Frau Dr. med. Dörthe Jeschorek für die hervorragende Betreuung der Studie seitens des Instituts für Pathologie. Frau Dr. Jeschorek war durch die Befundung der Biopsien eine wesentliche Stütze in diesem Projekt.

Dem Team der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie danke ich für die hervorragende klinische Betreuung der Studie. Insbesondere den Kollegen der Endoskopie danke ich für die Entnahme und Katalogisierung der Gewebeproben.

Ein besonderer Dank gilt auch Professor Dr. Herrlinger und dem Team der Inneren Medizin der Asklepios Klinik Nord Hamburg. Durch ihre freundliche Unterstützung war es mir möglich, trotz Erfüllung meiner Arbeiten und Pflichten weiter an dieser Dissertation zu arbeiten.

Des Weiteren danke ich Frau Katrin Frauenschläger für die Auswahl histologischer Bilder des Magenkarzinoms, die ich als Abbildungen in dieser Arbeit verwenden durfte.

Der Arbeitsgruppe um PD Dr. Kähne danke ich für die Kooperation in diesem Projekt und die Bereitstellung der Daten zur massenspektrometrischen Ermittlung genetischer Polymorphismen. Ohne Sie hätten wir nicht auf eine so große Bandbreite an Informationen zurückgreifen können.

Danke sage ich auch an die anderen Doktoranden der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, vor allem jedoch an Maren Warnecke. Durch den ständigen Erfahrungsaustausch und den einen oder anderen Kaffee spät am Abend in der Pathologie hat es immer wieder Spaß gemacht, an diesem Projekt zu arbeiten.

Diese Dissertation und auch mein Studium wären nicht ohne die Unterstützung meiner Eltern Ines und Fred Albrecht und meines Ehemanns Vincent Nestler möglich gewesen. Sie haben mir mein Studium nicht nur ermöglicht, sondern mir auch in schwierigen Zeiten immer wieder das Gefühl gegeben, dass meine Arbeit sinnvoll ist und es sich lohnt, ein Ziel weiter zu verfolgen. Ohne meine Mutter, wäre diese Dissertation nach der Geburt meiner Tochter wohl im Schrank eingestaubt aber sie hat mir den nötigen Freiraum verschafft, um konzentriert weiter zu arbeiten. Ich hoffe, dass ich mich in Zukunft für eure Hilfe revanchieren kann!

**Auch an alle, die ich vergessen haben sollte: DANKE!**

### Ehrenerklärung

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

**„Einfluss von Polymorphismen im *IL 1B*-Gen und *IL 1RN*-Gen, sowie der assoziierten Haplotypen auf die Entwicklung von Magenkarzinomen und deren prämaligen Konditionen“**

in der Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

mit Unterstützung durch Herrn Dr. med. Jan Bornschein und Herrn PD Dr. rer. nat. Thomas Wex

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation 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.

Norderstedt, den 20.10.2014



## Lebenslauf

### **Persönliches**

Name	Carolin Nestler, geborene Albrecht
Geburtsdatum	26.02.1985
Geburtsort	Stendal, jetzt Hansestadt Stendal
Familienstand	verheiratet
Kinder	Nestler, Janna; geboren am 09.08.2013
wohnhaft	Buckhörner Moor 12 22846 Norderstedt

### **Beruflicher Werdegang**

seit 09/2011	ärztliche Tätigkeit als Weiterbildungsassistentin in der Allgemeinen Inneren Medizin mit den Schwerpunkten Gastroenterologie, Onkologie, Infektiologie und Diabetologie der Asklepios Klinik Nord Hamburg
07/2013 – 08/2014	Mutterschutz und Elternzeit

### **Hochschulausbildung**

10/2004 – 11/2010	Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
11/2010	Erfolgreicher Abschluss des Studiums der Humanmedizin mit der Gesamtnote 1,83
12/2010	Approbation als Ärztin

11/2010 – 09/2011 Promotionsstudium an der Otto-von-Guericke-Universität  
Magdeburg

#### Praktisches Jahr

08/2009 – 12/2009 Klinikum Aschersleben-Staßfurt, Innere Medizin, CA  
Dipl.-med. H. Kramer

12/2009 – 03/2010 Klinikum Aschersleben-Staßfurt, Kinder-und Jugendmedizin,  
CÄ Dr. med. B. Moldenhauer

03/2010 – 07/2010 Universitätsklinikum Magdeburg, Kinderchirurgie, OA Dr. med.  
H. Krause, chirurgische Intensivstation, OA Dr. med. U. Lodes

#### Schulische Ausbildung

08/1991 – 07/2004 Grundschule und Gymnasium Tangerhütte/Wolmirstedt  
Abschluss: Abitur  
Abiturnote: 1,0

#### Promotion

03/2007 Beginn der Promotionsarbeit in der Klinik für  
Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie der Otto-von-  
Guericke-Universität Magdeburg

Thema: Einfluss von Polymorphismen im IL 1B-Gen und IL 1  
RN-Gen, sowie der assoziierten Haplotypen auf die  
Entwicklung von Magenkarzinomen und deren prämaligen  
Konditionen