

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Die Rolle des SNP rs2075820 bei Entstehung und Verlauf des Magenkarzinoms
und seine Auswirkung auf die Funktion des NOD1-Rezeptors“

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Evelyn Regina Seelow

aus Bonn

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. R. Schumann

2. Prof. Dr. med. B. Rau

3. Prof. Dr. rer. nat. T. Wex

Datum der Promotion: 22.03.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1 Einleitung.....	3
1.1 Das Immunsystem	3
1.2 Das angeborene Immunsystem.....	3
1.2.1 Toll-like-Rezeptoren	4
1.2.2 NOD-like Rezeptoren	5
1.2.2.1 NOD1	6
1.2.2.2 Der SNP rs2075820.....	9
1.2.2.3 Weltweite Verteilung der rs2075820-Genotypen.....	10
1.2.2.4 Mit NOD1 assoziierte Erkrankungen	11
1.2.3 Das angeborene Immunsystem in der mukosalen Immunität.....	12
1.3 Die <i>Helicobacter pylori</i> -Infektion.....	13
1.3.1 Epidemiologie	13
1.3.2 Pathophysiologie der <i>H. pylori</i> -Infektion	14
1.3.3 Virulenzfaktoren	14
1.3.4 Therapie	16
1.3.5 NOD1 und die <i>H. pylori</i> -Infektion.....	16
1.4 Das Magenkarzinom	17
1.4.1 Epidemiologie	17
1.4.2 Risikofaktoren.....	18
1.4.3 Die Kaskade der Krebsentstehung.....	19
1.4.4 Histologische Einteilung.....	21
1.4.5 TNM-Klassifikation und UICC-Stadieneinteilung	22
1.4.6 Therapie	24
1.5 Chronische Entzündung und Krebsentstehung	25
1.5.1 Zytokine	26
1.5.2 Mustererkennende Rezeptoren und genetische Variationen.....	28
1.6 Genetische Einflüsse bei Krankheitsentstehung und -verlauf.....	28
1.6.1 Single Nucleotide Polymorphisms.....	29
2 Zielstellung.....	31
3 Material und Methoden.....	32
3.1 Die Genotypisierungsstudie	32

3.1.1	Das Patientenkollektiv	32
3.1.1.1	Ein- und Ausschlusskriterien.....	32
3.1.1.2	Allgemeine Charakteristika	32
3.1.1.3	Eingesetzte Tumor-Klassifikationen	33
3.1.1.4	Durchgeführte Therapiemaßnahmen	34
3.1.1.5	Tumornachsorge	34
3.1.1.6	Gesundes Kontrollkollektiv	34
3.1.2	Präparation genomischer DNA	35
3.1.3	Genotypisierung	36
3.1.3.1	Prinzip der real-time-PCR am LightCycler®	36
3.1.3.2	LightCycler®-Protokoll	38
3.1.3.3	Prinzip der Genotypisierung durch Restriktionsanalyse	41
3.1.3.4	Protokoll der Restriktionsanalyse	42
3.1.4	Serologischer <i>H. pylori</i> -Nachweis	44
3.2	Überexpression von NOD1 in HEK293-Zellen	45
3.2.1	Eingesetzte Plasmid-DNA	45
3.2.2	Mutagenese der Plasmid-DNA	48
3.2.2.1	Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese	48
3.2.2.2	Protokoll der Mutagenese	48
3.2.2.3	Klonierung des NOD1-Rezeptors.....	50
3.2.3	Kultur von HEK293-Zellen	51
3.2.4	Transfektion von HEK293-Zellen	52
3.2.4.1	Prinzip der Transfektion	52
3.2.4.2	Protokoll der HEK293-Zelltransfektion	53
3.2.5	Stimulation der HEK293-Zellen	53
3.2.6	Reporter-Gen-Assays	53
3.2.6.1	Prinzip des Luciferase-Reporter-Gen-Assays.....	53
3.2.6.2	Protokoll des Luciferase-Reporter-Gen-Assays	54
3.2.6.3	Prinzip des <i>Renilla</i> -Luciferase-Reporter-Gen-Assays.....	55
3.2.6.4	Protokoll des <i>Renilla</i> -Luciferase-Reporter-Gen-Assays	56
3.3	Stimulation humaner Monozyten	56
3.3.1	Isolierung humaner Monozyten	57
3.3.2	Kultur und Stimulation der Monozyten	57
3.3.3	IL-1 β - ELISA	58
3.4	Statistische Analyse.....	60

4	Ergebnisse	62
4.1	Die Genotypisierungsstudie	62
4.1.1	Die Verteilung der Genotypen des SNP rs2075820	62
4.1.2	Der SNP rs2075820 und das Tumorstadium	62
4.1.3	Der SNP rs2075820 und histopathologische Tumormerkmale	65
4.1.4	Der SNP rs2075820 und der Verlauf des Magenkarzinoms.....	68
4.2	Überexpression von beiden <i>NOD1</i> -Varianten in HEK293-Zellen.....	69
4.2.1	Ergebnis der Mutagenese	69
4.2.2	Ergebnis des Überexpressionsversuchs	71
4.3	Stimulation humaner Monozyten	71
5	Diskussion	77
5.1	Zusammenhang zwischen Magenkarzinom und rs2075820-Genotyp	77
5.2	Verlauf des Magenkarzinoms in Abhängigkeit des Genotyps	78
5.3	Funktionelle Charakterisierung der Allele des SNP rs2075820.....	80
5.4	Ausblick	82
6	Zusammenfassung	85
7	Literaturverzeichnis	87
8	Anhang	94
8.1	Danksagung	94
8.2	Lebenslauf	95
8.3	Eidesstattliche Erklärung.....	96

Abkürzungsverzeichnis

AGS	adenocarcinoma gastric cells
BIR	baculovirus inhibitor of apoptosis protein repeat
cag-PAI	cag Pathogenitätsinsel
CARD	<i>caspase-activating and recruitment domain</i> , Kaspasenaktivierungs- und Rekrutierungsdomäne
CLR	<i>C-type lectine receptor</i> , C-Typ-Lektin-Rezeptor
DAP	<i>diaminopimelate acid</i> , Diaminopimelinsäure
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptions-test
FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
HEK293	<i>human embyonic kidney cells</i>
iE-DAP	<i>meso</i> -Diaminopimelinsäure (in der Literatur auch als γ -d-Glu-DAP bezeichnet)
IKK	I κ B-Kinasekomplex
IL	Interleukin
LBP	<i>lipopolysaccharide-binding protein</i> , Lipopolysaccharid-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich repeats</i> , leucinreiche Wiederholungssequenz
NBD	<i>nucleotide-binding domain</i> , Nukleotid-bindende Domäne
NF- κ B	<i>nuclear factor κB</i> , Kernfaktor κ B
NLR	<i>NOD-like receptor</i> , NOD-like Rezeptor
NOD	<i>nucleotide oligomerization domain</i> , Nukleotidoligomerisierungsdomäne
PAMP	<i>pathogen-associated molecular pattern</i> , Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> , mustererkennender Rezeptor
PYD	Pyrimidindomäne
RLR	<i>RIG-I-like-receptor</i> , <i>retinoic-acid-inducible gene I-like receptor</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
T4SS	TypIV-Sekretionssystem
TIR	<i>Toll-IL-1 receptor</i> -domain, Toll-IL-1-Rezeptor-Domäne
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
VacA	vakuolisierendes Zytotoxin

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem dient der Abwehr von Infektionen durch Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten. Es lässt sich in zwei Komponenten unterteilen: die angeborene Immunantwort (*innate immunity*) und die erworbene Immunantwort (*adaptive immunity*). Die angeborene Immunantwort ist das phylogenetisch deutlich ältere System (Janeway, 2001). Es ist in leicht abgewandelter Form in allen mehrzelligen Organismen einschließlich Pflanzen zu finden. Die erworbene Immunantwort hingegen hat sich nur bei höheren Vertebraten ausgebildet. Der entscheidende Unterschied zwischen den zwei Systemen ist die Latenz, mit der sie auf eindringende Pathogene reagieren können. Die angeborene Immunantwort erkennt stark konservierte mikrobielle Moleküle und erlaubt eine sofortige, jedoch wenig spezifische Bekämpfung des Erregers unabhängig davon, ob es bereits in der Vergangenheit mit ihm in Kontakt gekommen ist. Eine bleibende Immunität nach Infektion bildet sie nicht aus. Die Mechanismen der erworbenen Immunität greifen erst mit einer Latenz von einigen Tagen nach Infektion, da sie zunächst eine gegen spezifische Antigene des eindringenden Keims gerichtete Immunantwort ausbilden muss. Vorteil hierbei ist, dass sie sehr zielgerichtet agiert und ein immunologisches Gedächtnis ausprägt, das bei Reinfektion mit demselben Erreger eine sofortige Reaktion ermöglicht (Janeway, 2001). Obwohl sich bei Vertebraten die erworbene Immunantwort ausgebildet hat, ist die angeborene Immunantwort unverzichtbar für die frühe Abwehr von Infektionen und für die Einleitung der nachfolgenden erworbenen Immunantwort (Medzhitov, 1998).

1.2 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Verteidigungslinie gegen eindringende Mikroorganismen dar. Zu den Komponenten des angeborenen Immunsystems gehören das Epithel mit seiner anatomischen und physiologischen Barrierefunktion, das Komplementsystem und Immunzellen wie neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, das Monozyten-/Makrophagensystem und natürliche Killerzellen.

Während dem erworbenen Immunsystem durch somatische Rekombination ein nahezu unerschöpfliches Repertoire an Rezeptoren zur Erkennung von Antigenen zur Verfügung steht, erfolgt die Pathogenerkennung der angeborenen Immunantwort durch eine begrenzte Anzahl von keimbahnkodierten mustererkennenden Rezeptoren. Diese Rezeptoren werden als *pattern-recognition receptors* (PRRs) bezeichnet und erkennen hoch konservierte Molekularstrukturen von Mikroorganismen, auch *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) genannt (Medzhitov, 2000). Diese PAMPs sind essentielle Bestandteile der Mikroorganismen. Mutationsbedingte Variationen sind selten, sodass eine Resistenzentwicklung gegenüber der angeborenen Immunantwort kaum stattfindet. Bekannte PAMPs sind zum Beispiel bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) der Gram-negativen Bakterien, Flagellin von begeißelten Bakterien, Lipoteichonsäure aus Gram-positiven Bakterien, Abbauprodukte des bakteriellen Peptidoglykans sowie virusspezifische DNA- und RNA-Sequenzen.

Die Aktivierung der PRRs initiiert eine Signaltransduktionskaskade, die über die Translokation von Transkriptionsfaktoren in den Zellkern zu einer Induktion von Genen, die für unterschiedliche proinflammatorische Zytokine kodieren, führt. Es wird u.a. die Bildung und Sekretion von Zytokinen und Chemokinen sowie die Expression von ko-stimulatorischen Molekülen an der Zelloberfläche angeregt.

PRRs werden in unterschiedliche Rezeptorfamilien eingeteilt und liegen in löslicher, membranständiger und intrazellulärer Form vor. Zu den löslichen Rezeptoren gehören z.B. das LPS-bindende Protein (LBP) und das Mannan-bindende Lektin, zu den membranständigen Rezeptoren u.a. die Toll-like-Rezeptoren (TLRs), die C-Typ-Lektin-Rezeptoren (CLRs) und die Scavenger-Rezeptoren. Im Zytosol befinden sich die NOD-like-Rezeptoren (NLRs), welche vor allem bakterielle Bestandteile erkennen, und die RIG-I-like-Rezeptoren (RLRs), die Virus-Nukleinsäuren erkennen.

1.2.1 Toll-like-Rezeptoren

Die bekannteste Gruppe von PRRs ist die Toll-like Rezeptor-Familie. Toll-like-Rezeptoren (TLRs) sind Transmembranproteine, die entweder an der Zelloberfläche (z.B. TLR1, TLR2,

TLR4) oder im Endosom (z.B. TLR7, TLR8, TLR9) lokalisiert sind. Sie bestehen aus einer extrazellulär bzw. endosomal-luminal lokalisierten, Leucin-reichen Domäne (LRR-Domäne; *leucine rich repeats*) und der intrazellulären *Toll-IL-1 receptor*-Domäne. Die LRR-Domäne ist für die Erkennung der PAMPs zuständig, die TIR-Domäne aktiviert die Signalkaskade. Erkennt ein TLR-Rezeptor sein für ihn spezifisches PAMP, wird er aktiviert. Das Signal wird über eine Phosphorylierungskaskade weitergegeben und führt z.B. zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Dieser induziert die Transkription pro-inflammatorischer Zytokine.

Insgesamt wurden im Menschen bisher zehn unterschiedliche TLRs beschrieben. Jeder TLR ist für unterschiedliche PAMPs spezifisch (siehe Tabelle 1).

Tabelle 1 Eine Auswahl von Liganden und Adaptermoleküle der humanen TLRs




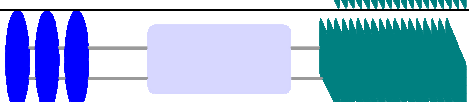


TLRs an der Zelloberfläche	Ligand (PAMP)	Adaptermoleküle
TLR1	verschiedene triacylierte Lipopeptide	MyD88, MAL
TLR2	verschiedene Glykolipide verschiedene Lipopeptide und -proteine	MyD88, MAL
TLR4	HSP70 Lipopolysaccharid (LPS) HSP60 und-70 Taxol	MyD88, MAL, TRIF, TRAM
TLR5	Flagellin	MyD88
TLR6	verschiedene diacylierte Lipopeptide	MyD88, MAL
TLR10	unbekannt	unbekannt
endosomale TLRs		
TLR3	doppelsträngige RNA	TRIF
TLR7	kurze einzel- und doppelsträngige RNA	MyD88
TLR8	kurze einzel- und doppelsträngige RNA	MyD88
TLR9	unmethylierte CpG-Insel DNA	MyD88

1.2.2 NOD-like Rezeptoren

Die Familie der NOD-like-Rezeptoren (NLRs) spielt eine entscheidende Rolle in der Erkennung bakterieller Bestandteile im Zytosol. Kennzeichnend für diese im Zytoplasma lokalisierte Rezeptorfamilie ist eine zentrale NBD-Domäne (*Nucleotide-binding domain*) und C-terminale leucinreiche Wiederholungssequenzen (LRRs). Die LRRs vermitteln die Pathogenerkennung, die NBD-Domäne eine ATP-abhängige Selbst-Oligomerisation des NLR, die Voraussetzung für die Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade ist. Am N-Terminus der NLRs befinden sich unterschiedliche Effektor-bindende Domänen, z.B. eine Caspase-rekrutierende Domäne

(CARD), ein *Baculovirus-Inhibitor-of-apoptosis-protein-Repeat* (BIR) oder eine Pyrimindomäne (PYD), welche Apoptose und Inflammation modulieren (Gumucio, 2002). Die Effektorbindende Domäne aktiviert die Signalkaskade. Der erste identifizierte NLR war NOD1 (Bertin, 1999; Inohara, 1999). Mittlerweile wurden für den Menschen mehr als 20 Vertreter der NLRs beschrieben, ein Großteil ist funktionell weitestgehend nicht untersucht. In Tabelle 2 ist eine Auswahl von NLRs mit ihrem Aufbau, ihren Liganden und den bekannten Signalwegen aufgeführt.

Tabelle 2 Eine Auswahl von NLRs mit ihrer Struktur, ihren Liganden und dem Signalweg

NLR	Domänen	Ligand (PAMP)	Signalweg
NOD1		iEDAP	NF-κB MAPK
NOD2		MDP	NF-κB MAPK
Nlrc4		Flagellin	Caspase-1
Naip		unbekannt	Caspase-1
Nlrp3		virale RNA und DNA bakterielle RNA Harnsäurekristalle LPS	Caspase-1
Legende:			

1.2.2.1 NOD1

NOD1 ist ein zytosolischer mustererkennender Rezeptor der angeborenen Immunabwehr und gehört zu der Familie der NOD-like Rezeptoren. Er besteht aus zehn Leucin-reichen Wiederholungssequenzen (*leucin-rich repeats*; LRR) am C-Terminus (Inohara, 1999) und einer zentral lokalisierten Nukleotid-bindenden Domäne (*nucleotide binding domain*; NBD). Effektor ist eine N-terminale Caspase-rekrutierende Domäne (*caspase recruitment domain*; CARD). Spezifischer Ligand von NOD1 ist die *meso*-Diaminopimelinsäure (iE-DAP), ein Bestandteil des bakteriellen

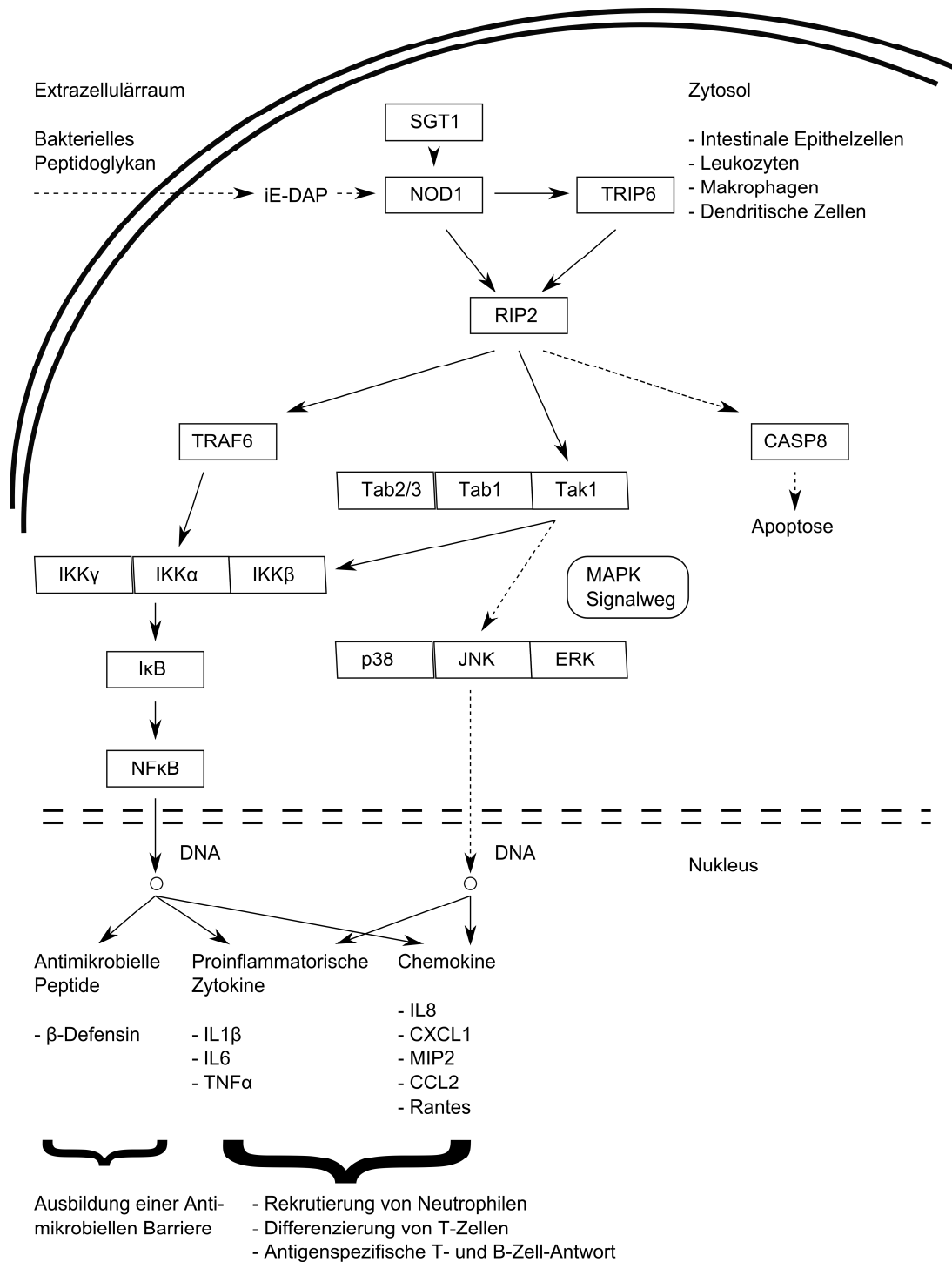
Peptidoglykans, der vor allem in Gram-negativen, aber auch vereinzelt in Gram-positiven Bakterien enthalten ist (Girardin, 2003). Der Rezeptor wird nur aktiviert, wenn das iE-DAP ins Zytosol gelangt. Dies kann auf drei Wegen erfolgen: 1) Bakterien entkommen der extrazellulären Erkennung durch TLRs und dringen direkt in die Zelle ein, 2) bakterielle Bestandteile werden durch ein Sekretionssystem oder durch porenbildende Toxine in das Zytosol geschleust oder 3) die bakteriellen Bestandteile werden durch Phagozytose oder Pinozytose in die Zelle aufgenommen und gelangen anschließend aus dem Endosom ins Zytoplasma. NOD1 wird zum Beispiel bei Infektion mit invasiven *Shigella flexneri* (Girardin, 2001), *Campylobacter jejuni* (Zilbauer, 2007), cagPAI-positiven *Helicobacter pylori*-Stämmen (Viala, 2004), *Chlamydomphila pneumoniae* (Opitz, 2005), *Streptococcus pneumoniae* (Opitz, 2004) und *Lysteria monozytogenes* (Opitz, 2006) aktiviert.

Bindet NOD1 das iE-DAP, kommt es über die NBD zur Selbst-Oligomerisation und zur Rekrutierung des Adapter-Proteins Rip2, welches den I κ B-Kinasekomplex (IKK) aktiviert. Dieser wiederum aktiviert durch Phosphorylierung der I κ B α -Proteine den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Inohara 1999; Hasegawa, 2008). Ebenfalls über Rip2 wird die JNK MAP-Kinase-Signalkaskade aktiviert (Da Silva, 2007). NF- κ B und die MAP-Kinasen translozieren anschließend in den Zellkern, wo sie die Transkription zahlreicher Gene regulieren, die die Immunantwort steuern. So führt die Aktivierung von NOD1 zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden wie z.B. den β -Defensinen (Boughan, 2006) sowie zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie z.B. IL-8 und IL-1 β (Opitz, 2006; Yoo 2002). Über die Freisetzung von Chemokinen führt NOD1 zur Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten (Masumoto, 2006). Des Weiteren fungiert NOD1 als Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem, indem es Zytokin-vermittelt die Differenzierung von T-Zellen anregt und so die Ausbildung der adaptiven Immunantwort fördert (Fritz, 2007).

Neben der Bedeutung für die angeborene Immunantwort scheint NOD1 auch abhängig von Caspase-8 und Caspase-9 Apoptose induzieren zu können und in der Regulation des Tumorstwachstums eine Rolle zu spielen (Da Silva, 2006, 2007). Polymorphismen im *NOD1*-Gen schei-

nen die Funktion des Rezeptors zu beeinflussen. In Abbildung 1 sind alle derzeit bekannten Signalwege des NOD1-Rezeptors dargestellt.

Abbildung 1 Derzeit bekannte intrazelluläre Signalwege des NOD1-Rezeptors



Schematische Darstellung der NOD1-vermittelten Signaltransduktion (basierend auf dem Kegg pathway KO04621; www.genome.jp/kegg/; Stand: 29.07.2012).

1.2.2.2 Der SNP rs2075820

Der SNP rs2075820 ist ein nicht-synonymer Einzelbasenaustausch im Exon 6 des *NOD1*-Gens. Der zugrunde liegende Basenaustausch G>A befindet sich an Position 796 der kodierenden DNA des Transkripts ENST00000222823 (NOD1-001) und führt zu einem Aminosäureaustausch von Glutamat zu Lysin an Position 266 des Genprodukts innerhalb der NBD-Domäne des NOD1-Rezeptors. Dieser Polymorphismus wird daher häufig auch als *NOD1-G796A*- oder *NOD1-E266K-Polymorphismus* bezeichnet.

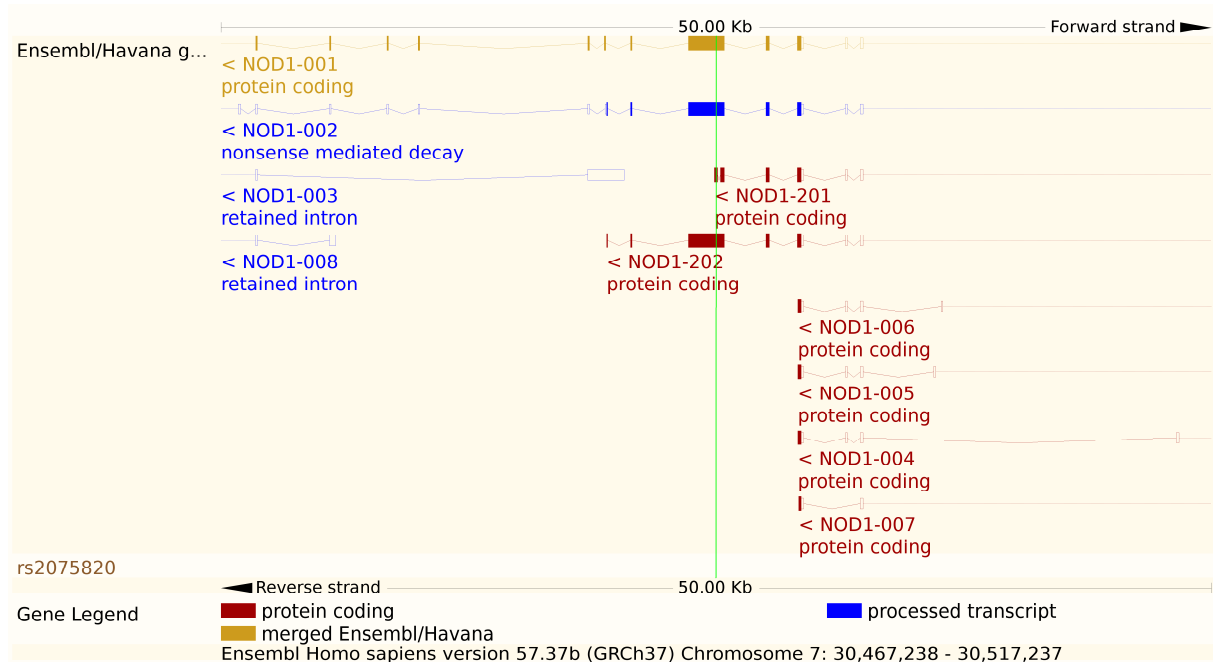
Beide Allele dieses Polymorphismus sind ähnlich häufig. Dabei überwiegt in Europa das Referenzallel ('*major allele*') G, während in Asien das '*minor allele*' A häufiger ist (siehe Tabelle 3). Es ist daher nicht möglich, ein 'Wildtyp'-Allel zu determinieren. In dieser Arbeit werden aus diesem Grunde immer die tatsächlichen Genotypen (G/G, G/A oder A/A) angegeben.

Durch alternatives Spleißen der prä-mRNA kann ein Gen für mehrere verschiedene Isoformen eines Proteins kodieren, die sich in ihrer Funktionen grundsätzlich unterscheiden können. Da das menschliche Genom 20.000 bis 25.000 Gene umfasst, die über 100.000 Proteine kodieren, wird davon ausgegangen, dass mehr als 90 % aller Gene alternativ gespleißt werden (Wang, 2008). In Ensembl sind zehn unterschiedliche Transkripte für das *NOD1*-Gen annotiert. Sieben werden als protein-kodierend angegeben, ein weiteres wird vorzeitig durch *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut. Zwei Transkripte sind nicht-kodierend (siehe Abbildung 2).

Die in der Literatur beschriebene Isoform des NOD1-Rezeptors (Inohara, 1999) ist das Genprodukt des Transkripts ENST00000222823 (NOD1-001). Funktionelle Untersuchungen der kürzeren Isoformen des NOD1-Proteins, die von den anderen Transkripten kodiert werden, wurden bislang nicht durchgeführt.

Der SNP rs2075820 führt in zwei Isoformen des NOD1-Proteins ebenfalls zu einem Aminosäureaustausch von Glutamat zu Lysin (Transkripte ENST00000434755 bzw. NOD1-002 und ENST00000439183 bzw. NOD1-202). In einem weiteren Transkript ist der Polymorphismus ein synonymer SNP (Transkript ENST00000423334 bzw. NOD1-201).

Abbildung 2 Das *NOD1*-Gen und seine zehn Transkripte (Ensembl)



In Ensembl sind zehn unterschiedliche Transkripte für das *NOD1*-Gen annotiert. Sieben werden als protein-kodierend angegeben, ein weiteres wird vorzeitig durch *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut. Zwei Transkripte sind nicht-kodierend. Die Position des SNP rs2075820 ist als grüne vertikale Linie inmitten der verschiedenen in Ensembl annotierten *NOD1*-Transkripte (gelbe, blaue und rote horizontale Linien) dargestellt. Die in der Literatur beschriebene Isoform des *NOD1*-Rezeptors (Inohara, 1999) ist das Genprodukt des Transkripts ENST00000222823 (*NOD1*-001). Quelle: Ensembl Version 57

1.2.2.3 Weltweite Verteilung der rs2075820-Genotypen

Die Variante A ist besonders häufig in Japan vertreten. Hier sind das Referenzallel und die Variante A etwa gleich häufig, über 30 % der Bevölkerung weisen den A/A-Genotyp auf. Japan ist auch das Land mit einer der weltweit höchsten Inzidenzen für das Magenkarzinom. Die Häufigkeit von Polymorphismen kann in verschiedenen Regionen und zwischen Populationen unterschiedlicher ethnischer Herkunft stark variieren. Auch die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion und die Inzidenz des Magenkarzinoms weisen starke regionale Unterschiede auf. In Tabelle 3 sind die Allelfrequenzen des SNP rs2075820, die Inzidenz des Magenkarzinoms und die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion verschiedener Populationen gegenübergestellt. In Japan ist die Inzidenz des Magenkarzinoms mit bis zu 51/100.000 eine der höchsten weltweit, die Prävalenz der *H. pylori*-Infektion beträgt durchschnittlich etwa 39 %. Je nach Kohorte beträgt die Allelfrequenz des Polymorphismus in Japan 0.45 bis 0.50. Das *minor allele* ist in Japan somit etwa doppelt so häufig wie im deutschen (gesunde Kontrollgruppe) und im europäisch-kaukasischen (HapMap-

CEU) Kollektiv. Auch in der afrikanischen (subsaharischen) Kohorte (HapMap-YRI) ist der Polymorphismus fast doppelt so häufig wie in Europa. Trotz einer hohen Durchseuchung mit *H. pylori* von bis zu 90 %, ist die Inzidenz des Magenkarzinoms in dieser Region mit 6-9/100.000 deutlich niedriger als erwartet. Dieses Phänomen wird als das „Afrikanische Enigma“ bezeichnet (Campbell, 2001). Es wird davon ausgegangen, dass genetische Faktoren oder Umweltfaktoren diese niedrige Inzidenzrate des Magenkarzinoms bedingen.

Tabelle 3 Verteilung der rs2075820-Genotypen in Ostasien, Europa und Afrika

Population	Allel- und Genotypfrequenzen			Genotypisierte Population/ Anzahl untersuchte Allele ¹	Inzidenz Magenkarzinom n/100.000 ²	Prävalenz <i>H. pylori</i> -Infektion
	Allel A	Allel G	Genotyp A/A			
Ost-Asien (Japan)	0,50	0,50	0,32	HapMap-JPT; n: 88	19,8 - 51,3	39 % ³
Ost-Asien (Japan)	0,45	0,55	nicht bekannt	JBIC-allele; n: 1228		
Europa (Nord/West)	0,17	0,83	0,02	HapMap-CEU ⁵ ; n: 226	2,4 - 4,5	
Deutschland	0,24	0,76	0,08	Gesunde Kontrollen; n: 376	8,4 - 16,2	40 % ⁴
Afrika (Sub-Sahara)	0,42	0,58	0,19	HapMap-YRI; n: 282	6,9 - 9,0	71-93 % ⁶

¹Alle Genotypisierungsdaten wurden dbSNP (Sayers, 2010) entnommen ²Alle Inzidenzdaten entstammen der offiziellen Website der Internationalen Agentur für Krebsforschung International Agency for Research on Cancer (<http://www-dep.iarc.fr>; Curado, 2007). Angegeben sind jeweils die altersstandardisierte Inzidenz (pro 100.000 Einwohner) für Frauen (erster Wert) und für Männer (zweiter Wert). ³(Fock 2010). ⁴(Seher, 2000). ⁵Das HapMap-CEU-Kollektiv ist ein Modellkollektiv für Menschen europäisch-kaukasischer Abstammung. Es besteht aus Einwohnern des US-Bundesstaates Utah mit Nord- und Westeuropäischen Vorfahren. Für dieses Kollektiv wurde die Magenkarzinominzidenz von Utah angegeben. ⁶(Mbulaiteye, 2006).

1.2.2.4 Mit NOD1 assoziierte Erkrankungen

Genetische Variationen im *NOD1*-Gen sind mit einer Reihe von entzündlichen Erkrankungen assoziiert. Hierzu gehören Krankheiten aus dem atopischen Formenkreis, wie das atopische Ekzem und Asthma bronchiale (Hysi, 2005), chronisch entzündliche Darmerkrankungen (Huebner, 2009) und Infektionserkrankungen wie die *H. pylori*-Infektion (s. Kap. 1.3.5.). Der SNP rs2075820 ist mit verschiedenen *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen wie z.B. der duodenalen Ulkuserkrankung und der intestinalen Metaplasie der Magenschleimhaut (s. Kap 1.3.5) assozii-

iert. In einigen Populationen haben Träger des *minor allele* ein erhöhtes Risiko an M. Crohn (Molnar, 2007) oder an Sarkoidose (Tanabe, 2006) zu erkranken.

1.2.3 Das angeborene Immunsystem in der mukosalen Immunität

Der menschliche Darm ist mit unzähligen nicht-invasiven Mikroorganismen besiedelt. Diese bilden die natürliche Darmflora und erfüllen wichtige Aufgaben im Wertsstoffwechsel. Hierzu gehören z.B. die Versorgung des Organismus mit Vitaminen, die Bereitstellung von kurzkettigen Fettsäuren für das Kolonepithel (Wolin, 1983) aber auch der Schutz vor invasiven Pathogenen (Rakoff-Nahoum, 2004). Die Darmflora besteht hauptsächlich aus anaeroben Bakterien und umfasst mehrere hundert verschiedene Bakterienarten (Guarner, 2006). Von der Darmflora grundsätzlich zu unterscheiden sind pathogene Bakterien und andere Mikroorganismen, die in der Lage sind, eine Infektionserkrankung auszulösen. Sie zeichnen sich durch Virulenzfaktoren aus, die es ihnen ermöglichen, an das Epithel zu binden und in die Zellen einzudringen. Der Organismus muss deshalb eine Toleranz gegenüber der residuellen Darmflora ausüben und zugleich jederzeit auf invasive Bakterien reagieren können. Die Darmschleimhaut (Mukosa) ist sowohl eine anatomische als auch eine immunologische Barriere gegen eindringende Mikroorganismen. Sie besteht aus einer Epithelschicht und einer angrenzenden Bindegewebsschicht. Zu den mannigfaltigen Aufgaben der angeborenen Immunabwehr gehört es 1) diese Barriere aufrechtzuerhalten, 2) Apoptose in Folge einer zu starken Immunreaktion zu verhindern, 3) die Wundheilung und Gewebsregeneration zu beschleunigen, 4) das Eindringen von pathogenen Mikroorganismen zu verhindern, gleichzeitig 5) die Toleranz gegenüber kommensalen Bakterien zu bewahren und, wenn notwendig, 6) die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort zu steuern (Cario, 2008). Ein Ungleichgewicht zwischen Toleranz und Abwehr von Mikroorganismen, begünstigt die Entstehung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sowie von gastrointestinalen Tumoren.

Das Epithel der Darmschleimhaut ist mit mustererkennenden Rezeptoren (PRRs) der angeborenen Immunantwort ausgestattet. Eine entscheidende Besonderheit der intestinalen Epithelzellen ist die spärliche Expression von TLR2 und TLR4 an der luminalen Zelloberfläche (Lavelle, 2010; Michelsen, 2007). Dies erklärt das geringe Ansprechen der Zellen auf LPS und Lipotei-

chonsäure, die durch die kommensalen Bakterien im Darmlumen freigesetzt werden. Im Gegensatz zu den TLRs sind die zytosolischen NOD-like Rezeptoren (NLRs) NOD1 und NOD2 stark im intestinalen Epithel exprimiert (Inohara, 1999; Gutierrez, 2002). Wenn invasive Bakterien in das Epithel eindringen, erkennen sie Peptidoglykanfragmente und vermitteln über die Bildung von inflammatorischen Zytokinen die angeborene Immunantwort. Die Signalkaskaden der Toll-like- und NOD-like-Rezeptoren stehen in komplexer Wechselwirkung. Beim Gesunden schützen sie die Barrierefunktion der Darmmukosa und vermitteln die Toleranz gegenüber der Kommensalen. Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie dem M. Crohn ist diese Toleranz gestört; es konnte nachgewiesen werden, dass bei dieser Erkrankung die Expression von TLR2 und TLR4 auf den Epithelzellen hochreguliert ist (Cario, 2000; Hausmann, 2002). Das Ungleichgewicht in der PRR-Aktivierung führt zu einer überschießenden Inflammation mit Epithelschädigung (Becker, 2007). Auch Mutationen im *NOD2*- und im *NOD1*-Gen sind mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen assoziiert (Cummings, 2010).

1.3 Die *Helicobacter pylori*-Infektion

1.3.1 Epidemiologie

Helicobacter pylori ist ein Gram-negatives, mikroaerophiles Bakterium, das die Magenschleimhaut kolonisiert und zu einer chronisch aktiven Gastritis führt (Marshall, 1984). Über die Hälfte der Weltbevölkerung ist mit diesem Bakterium infiziert (Parsonnet, 1998). Die Prävalenz ist abhängig vom sozioökonomischen Status, in Entwicklungsländern beträgt sie 80 % bei Personen mittleren Alters, in Industrienationen nur 20-50 % (Suerbaum, 2002). In Industrienationen ist die Infektionsrate über die letzten Dekaden stetig zurückgegangen. Als Faustregel gilt, dass die Prävalenz (in %) in den unterschiedlichen Altersgruppen in etwa dem Alter (in Jahren) entspricht. Die Infektion verläuft in den meisten Fällen asymptomatisch, in 10-20 % der Fälle führt sie jedoch zu Ulzera in Magen und Duodenum (Dorer, 2009). Eine chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* erhöht das Risiko an Magenkrebs zu erkranken um das drei- bis sechsfache (Seher, 2000). Damit ist die *H. pylori*-Infektion der stärkste bisher bekannte Risikofaktor für die Entstehung des Magenkarzinoms (IARC Working Group, 1994).

1.3.2 Pathophysiologie der *H. pylori*-Infektion

Helicobacter pylori wird höchstwahrscheinlich fäkal-oral übertragen. Im Magen schützt es sich vor der Magensäure, indem es Urease produziert. Dieses Enzym spaltet Harnstoff zu Kohlenstoffdioxid und Ammoniak, welches den pH-Wert in unmittelbarer Umgebung des Bakteriums anhebt. Auch kann *H. pylori* mithilfe seiner Geißeln tief in die Mukusschicht vordringen, wo es vor der Zerstörung durch die menschliche Magensäure geschützt ist. Mithilfe von Adhäsionsmolekülen kann es sich stabil an die Epithelzellen binden. Das begeißelte Bakterium weist eine hohe genetische Variabilität auf und ist stark an den Menschen adaptiert. Durch verschiedene Mechanismen kann es der Immunantwort des Wirtes entkommen und so die Magenschleimhaut dauerhaft kolonisieren. Ohne eine spezifische antibiotische Therapie wird das Bakterium in der Regel nicht eliminiert (Suerbaum, 2002).

Bei allen mit *Helicobacter pylori* infizierten Individuen kommt es unabhängig von der Symptomatik zu einer Entzündungsreaktion. Monozyten werden aktiviert und sezernieren proinflammatorische Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p40). Neutrophile und dendritische Zellen werden in das entzündete Gewebe rekrutiert. Hier kommt es zur Heranreifung von dendritischen Zellen. Diese wiederum wandern in die sekundären lymphatischen Organe und induzieren dort die erworbene Immunantwort durch Aktivierung von CD4-positiven Th1-Helferzellen (Fehlings, 2012). Histologisch imponiert eine Infiltration der Submukosa vornehmlich mit neutrophilen Granulozyten, das klinische Bild wird als chronisch-aktive Gastritis bezeichnet. In späteren Stadien der Erkrankung kann es zu fokaler Atrophie der Magenschleimhaut kommen sowie zu einer intestinalen Metaplasie des betroffenen Gewebes (Mills, 2007). Letztere ist eine Vorstufe des Magenkarzinoms (Peek, 2002).

1.3.3 Virulenzfaktoren

Es gibt eine Vielzahl verschiedener *H. pylori*-Virulenzfaktoren, wie zum Beispiel das Adhäsionsmolekül BabA, das vakuolisierende Zytotoxin A (VacA) und das Zytotoxin-assoziierte Antigen (CagA). Das Auftreten von *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen wie die chronisch-atrophe

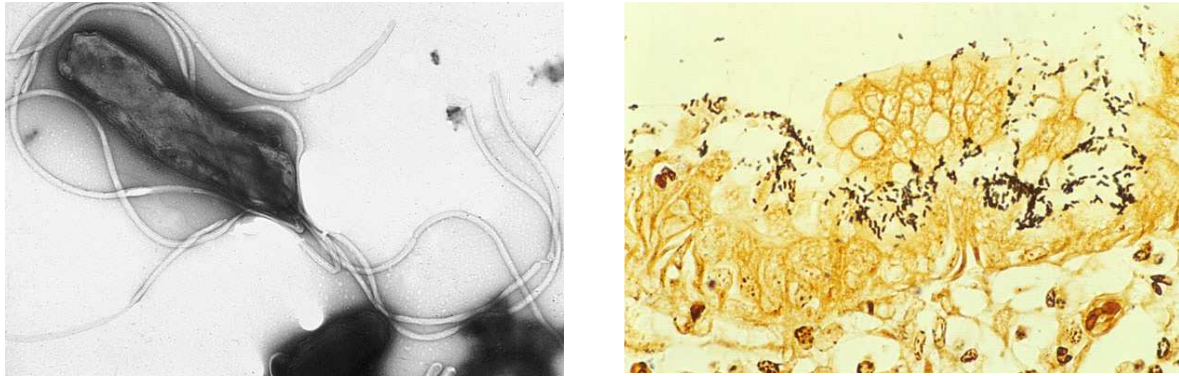
Gastritis, die Ulkuserkrankung, das Magenkarzinom oder das MALT-Lymphom ist stark abhängig von diesen Virulenzfaktoren.

Das Adhäsionsmolekül BabA (*blood group binding antigen adhesin*) ist ein 78-kD großes Membranprotein, das sich an fucosyliertes Lewis B-Blutgruppenantigen auf den Epithelzellen des Wirtes bindet (Ilver, 1998). BabA begünstigt die Kolonisation der Magenschleimhaut mit *H. pylori* und induziert eine Entzündung der Magenschleimhaut (Prinz, 2001).

VacA ist ein sekretorisches Exotoxin, welches sich in die Zellmembran der Wirtszelle inseriert und dort einen hexameren, Anionen-selektiven und spannungsabhängigen Ionenkanal bildet, der die Freisetzung von organischen Anionen und Hydrogencarbonat bewirkt. VacA kann auch durch Freisetzung von Cytochrom c aus der Mitochondrienmembran die Apoptose der Wirtszelle induzieren (Szabo, 1999; Galliche, 2000). Genetische Variationen im *VacA*-Gen wirken sich auf die Zytotoxizität des Proteins aus. *H. pylori*-Stämme mit dem *VacA* s1/m1-Genotyp weisen die höchste vakuolisierende Aktivität auf und erhöhen das Risiko, an gastralen und duodenalen Ulzera und am Magenkarzinom zu erkranken (Atherton, 1997; Miehle, 2000).

CagA ist ein 121-145-kD großes Protein, welches mithilfe eines TypIV-Sekretionssystems (T4SS) in die Wirtszelle injiziert wird. Dort verändert es das Zytoskelett und greift in Signalwege der Zellen ein (Backert, 2008). CagA ist mit dem Magenkarzinom, der gastroduodenalen Ulkuserkrankung und besonders ausgeprägten Formen der *H. pylori*-Gastritis assoziiert (Blaser, 2002). CagA und das T4SS werden nur von *H. pylori*-Bakterienstämmen exprimiert, die eine intakte *cag*-Pathogenitätsinsel (*cag*-PAI) besitzen. Diese ist eine 37-kb umfassende Gensequenz, die 29 Gene enthält und sowohl für das T4SS als auch für CagA kodiert. Bakterienstämmen mit einer verkürzten oder fehlenden *cag*-Pathogenitätsinsel lösen signifikant weniger Inflammation und Ulzera aus (Viala, 2004).

Abbildung 3 Elektronenmikroskopisches und histologisches Bild von *H. pylori*



Links: elektronenmikroskopische Abbildung eines *Helicobacter pylori* Bakteriums. Rechts: multiple *Helicobacter pylori* Bakterien kolonisieren das Magenepithel (Silberfärbung). Quelle: Yutaka Tsutsumi, M.D. Professor Department of Pathology Fujita Health University School of Medicine.

1.3.4 Therapie

Eine Therapie der *H. pylori*-Infektion ist unter anderem bei symptomatischer Gastritis, bei atropher *H. pylori*-Gastritis, bei gastroduadener Ulkuskrankheit mit Nachweis von *H. pylori*, bei MALT-Lymphom und nach Resektion eines Magenfrühkarzinoms indiziert. Die Eradikationstherapie wird als Triple-Therapie bezeichnet und besteht aus jeweils zwei Antibiotika und einem Protonenpumpenhemmer. Die gängigste Therapie ist die sogenannte *French triple*. Sie besteht aus Amoxicillin, Clarithromycin und Pantoprazol.

1.3.5 NOD1 und die *H. pylori*-Infektion

Im Jahr 2004 wurde erstmals gezeigt, dass der NOD1-Rezeptor die angeborene Immunantwort auf *Helicobacter pylori* vermittelt (Viala, 2004). Die *in vitro* Infektion von NOD1-exprimierenden, humanen HEK293-Zellen (*human embryonic kidney cells*) und AGS-Zellen (*adenocarcinoma gastric cells*) mit verschiedenen *H. pylori* Stämmen führte in den Zellen zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Viala, 2004). Die Transfektion dieser Zellen mit einem dominant-negativen *NOD1*-Vektor inhibierte die NF- κ B-Aktivierung. Dieser Effekt konnte auch in einem RNA-Interferenzversuch mit siRNA gegen die CARD-Domäne des NOD1-Rezeptors gezeigt werden (Viala, 2004). Eine NF- κ B-Aktivierung wurde nur bei Infektion mit *cagPAI*-positiven Bakterienstämmen beobachtet, die ein intaktes TypIV-Sekretionssystem besaßen (Viala, 2004). In dieser Arbeit wurde weiterhin nachgewiesen, dass NOD1 das

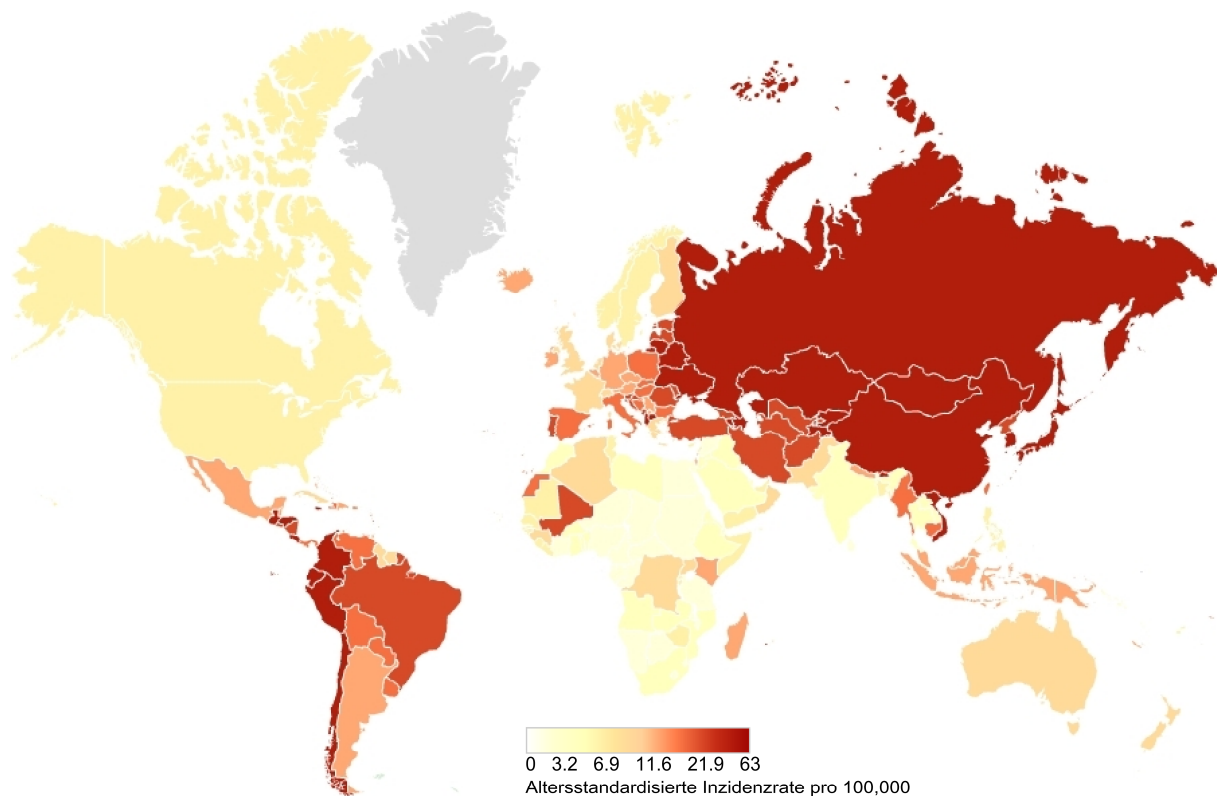
bakterielle Protein CagA erkennt, welches durch das T4SS in die Wirtszelle injiziert wird. *In vivo* wurde bei *NOD1*-defizienten Mäusen eine stärkere Anfälligkeit für die Infektion mit *cag*-PAI-positiven *Helicobacter pylori* beobachtet (Viala, 2004). Eine andere Studie zeigte, dass *NOD1* eine Schlüsselrolle in der Regulation der beta-Defensine während der *H. pylori*-Infektion einnimmt (Boughan, 2006). Die Untersuchung von biopsisch entnommenen, primären Magenepithelzellen ergab, dass die *NOD1*-Proteinexpression bei Patienten mit *H. pylori*-Gastritis hochreguliert ist (Rosenstiel, 2006). In einer epidemiologischen Studie konnte gezeigt werden, dass der SNP rs2075820 mit der gastroduodenalen Ulkuserkrankung assoziiert ist. *H. pylori*-positive Patienten, die homozygot für das *minor allele* (Genotyp AA) des SNPs waren, wiesen ein 3.5-fach erhöhtes Risiko für Duodenalulcera auf (Hofner, 2007). In einer Studie an 150 türkischen Patienten mit einer *H. pylori*-Infektion hatten Träger des AA-Genotyps ein signifikant erhöhtes Risiko für eine Atrophie und für eine intestinale Metaplasie des Magenansatzes und ein 15-fach erhöhtes Risiko nach Eradikationstherapie einen Rezidiv zu erleiden (Kara, 2010).

1.4 Das Magenkarzinom

1.4.1 Epidemiologie

Beim Magenkarzinom handelt es sich um ein Adenokarzinom, das vom Drüsenepithel der Magenschleimhaut ausgeht. Das Magenkarzinom macht 90 % aller Malignome des Magens aus und gehört zu den vier häufigsten Krebsarten weltweit. Die Inzidenz in Deutschland liegt bei etwa 20/100.000 Einwohner jährlich (Husmann, 2010). Im weltweiten Vergleich rangiert Deutschland damit im Mittelfeld (siehe Abbildung 4). Zu den Populationen mit dem höchsten Risiko gehört unter anderem Japan mit einer Inzidenzrate von bis zu 80/100.000 (Curado, 2007). Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate unter 30 % ist es verantwortlich für jeden zweiten Tod durch eine Krebserkrankung (Brenner, 2009). Weltweit sterben jedes Jahr etwa 700.000 Menschen am Magenkarzinom. Das mittlere Erkrankungsalter liegt in der Regel um das 70. Lebensjahr, Männer sind zweimal häufiger betroffen als Frauen.

Abbildung 4 Inzidenz des Magenkarzinoms



Die geschätzte weltweite Inzidenz von Magenkrebs für das Jahr 2008 (in der männlichen Bevölkerung). Quelle: GLOBOCON 2008, International Agency for Research on cancer.

1.4.2 Risikofaktoren

Größter Risikofaktor für das Magenkarzinom ist die Infektion mit *Helicobacter pylori*. Mehr als 90 % aller Patienten weisen im frühen Stadium des Magenkarzinoms eine *H. pylori*-Gastritis auf, etwa 75 % aller Magenkarzinome werden auf eine chronische Infektion mit *H. pylori* zurückgeführt (Herrera, 2009). Seit 1994 wird das Bakterium daher von der World Health Organization (WHO) als Karzinogen der Klasse I geführt (IARC Working Group, 1994). Es entwickelt jedoch nur ein kleiner Prozentsatz aller mit *H. pylori* infizierten Menschen im Laufe des Lebens ein Magenkarzinom. Entscheidende Einflussgrößen hierfür sind unter anderem die Virulenzfaktoren des Bakteriums, genetische Variationen des Wirtes sowie Umweltfaktoren. Bekannte Virulenzfaktoren, die das Risiko für ein Magenkarzinom erhöhen sind die *cag*-Pathogenitätsinsel, CagA und VacA (Blaser, 2002; s. Kap. 1.3.3). Zu den Mutationen, die mit dem Magenkarzinom assoziiert sind gehören Mutationen im E-Cadherin-Gen wie sie beim hereditären Karzinom nachgewiesen werden können. Darüber hinaus spielen eine Reihe von Polymorphismen in Genen des ange-

borenen Immunsystems, z.B. Mutationen im IL-1 β -Gen und im IL-1RN-Gen, eine Rolle (Sugimoto, 2010). Weitere Risikofaktoren sind eine chronisch-atrophische Gastritis Typ A, eine perniziöse Anämie, nitratreiche Ernährung, Alkohol- und Nikotinabusus, der Morbus Ménétrier und adenomatöse Magenpolypen.

1.4.3 Die Kaskade der Krebsentstehung

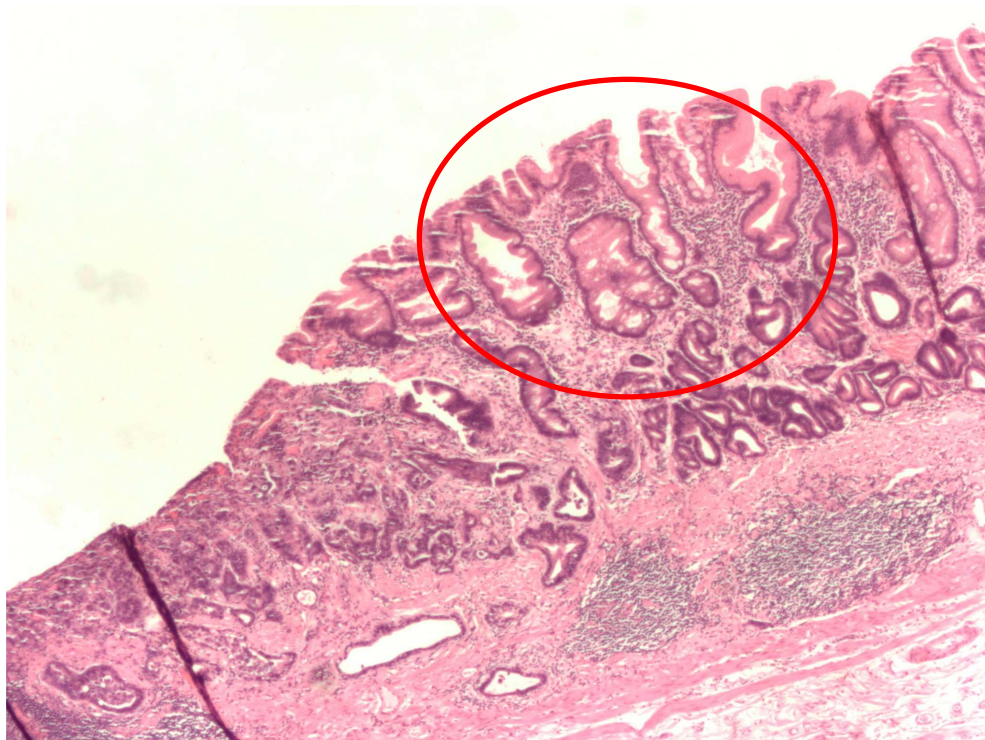
Das Magenkarzinom entwickelt sich aus einer Kaskade von Krebsvorstufen (Correa, 1988). Ausgangspunkt der Kaskade ist die chronisch-aktive, nicht-atrophe Gastritis. Sie ist durch eine diffuse Infiltration der Magenmukosa mit Lymphozyten, Plasmazellen und neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet. Die chronische Entzündung der Schleimhaut führt im Verlauf zu einem Verlust von Drüsenzellen. Eine multifokale Atrophie des Magenepithels ist die Folge. In den atrophischen Arealen kann es zur reversiblen Umwandlung (Metaplasie) der gastralen Epithelzellen kommen. Sie werden durch Zellen mit einem intestinalen Phänotyp ersetzt (siehe Abbildung 5). Diese Zellen weisen Merkmale des Dünndarm- und später auch des Kolonepithels auf (intestinale Metaplasie). Die metaplastischen Zellen können sich zu dysplastischen Zellen weiterentwickeln, die sich durch Atypien des Zellkerns und des Gewebeaufbaus auszeichnen. Diese dysplastischen Zellen stellen bereits eine intraepitheliale Neoplasie dar und sind direkte Vorstufen des invasiven Karzinoms. Die Entwicklung von der chronisch-aktiven, nicht-atropen Gastritis bis zum Magenkarzinom ist ein schleichender Prozess, der sich in der Regel über mehrere Dekaden hinzieht. Eine schematische Darstellung der Karzinogenese ist in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4 Karzinogenese des Magenkarzinoms

chronisch-aktive, nicht-atrophe Gastritis	
1,7	7,5
multifokale, atrophe Gastritis	
4,4	6,7
intestinale Metaplasie	
5,7	3,2
Dysplasie (intraepitheliale Neoplasie)	
invasives Karzinom	

Die Kaskade der Magenkarzinomentstehung. In einer kolumbianischen Hochrisikopopulation (n=1422) wurde die Progressions- bzw. Regressionsrate zwischen den verschiedenen Krebsvorstufen untersucht. Die Zahlen geben die Transitionsrate zwischen erster und der follow-up Biopsie je 100 Personenjahre an. Der Beobachtungszeitraum betrug 3-16 Jahre (im Mittel 5,1 Jahre). Quelle: adaptiert nach Correa P, 1988 und 1990

Abbildung 5 Intestinale Metaplasie des Magenepithels

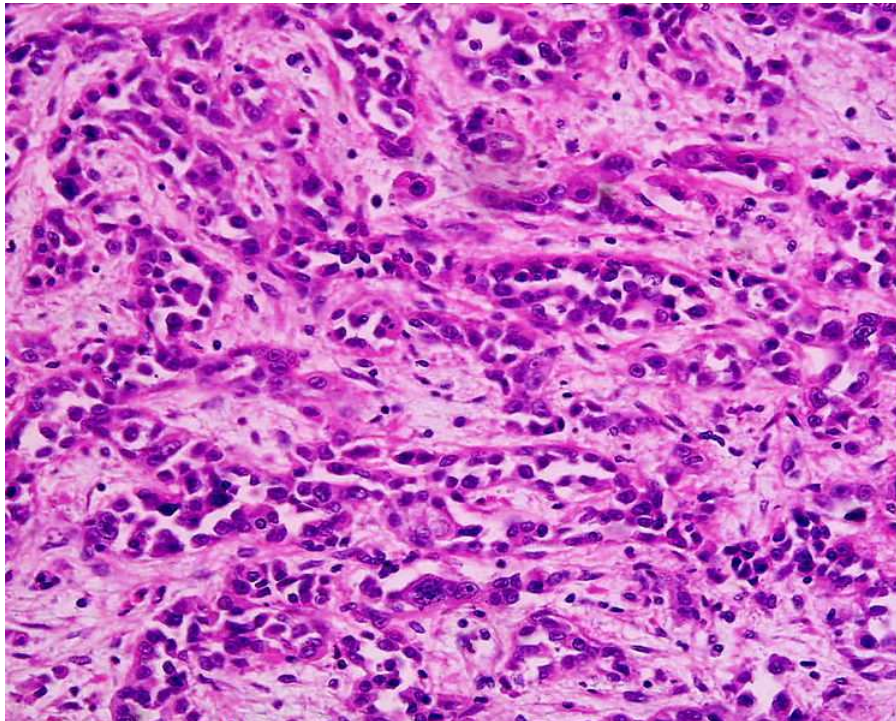


Histologisches Präparat eines Magenkarzinoms (links im Bild) im Magenantrum mit ausgeprägter intestinaler Metaplasie, die durch die Anwesenheit von Becherzellen gekennzeichnet ist (siehe eingekreistes Areal). HE-Färbung. Quelle: Nephron.

1.4.4 Histologische Einteilung

Die Laurén-Klassifikation (Laurén, 1965) unterscheidet histologisch zwei unterschiedliche Wachstumsmuster des Magenkarzinoms: den intestinalen und den diffusen Typ. Der intestinale Typ wächst expansiv (polypös) und lässt sich gut gegenüber der gesunden Magenschleimhaut abgrenzen. Die malignen Zellen bilden drüsenähnliche Strukturen aus. Das histologische Bild erinnert an Drüsenepithel des Gastrointestinaltrakts. Der diffuse Typ wächst infiltrativ und lässt sich schlecht vom gesunden Gewebe abgrenzen. Er neigt zu frühzeitiger Lymphknotenmetastasierung und hat eine schlechtere Prognose als der intestinale Typ. Liegen sowohl Merkmale vom intestinalen als auch vom diffusen Typ vor, so spricht man vom Mischtyp. Die Laurén-Klassifikation hat Bedeutung für das Ausmaß der Tumorentfernung. Der gut begrenzte intestinale Typ erfordert bei der Resektion einen Sicherheitsabstand von fünf Zentimetern, der schlechter abgrenzbare diffuse Typ von acht Zentimetern. Da der Mischtyp auch Merkmale des diffusen Typs aufweist, wird er ebenfalls mit einem größerem Sicherheitsabstand reseziert.

Abbildung 6 Histologisches Bild eines niedrig differenzierten Magenkarzinoms



Histologisches Bild eines niedrig differenzierten Adenokarzinoms des Magens (HE-Färbung). Quelle: Dept. Clinical Pathomorphology and Cytology, Medical University, Lodz, Polen.

Ein weiteres, prognostisch ungünstiges, histologisches Merkmal sind Siegelringzellen. Diese weisen auf ein schleimproduzierendes Adenokarzinom hin. Die Tumorzellen enthalten eine große Menge Schleim. Dadurch wird der Zellkern an den Rand gedrängt. Die Morphologie der Zelle erinnert unter dem Mikroskop an einen Siegelring.

1.4.5 TNM-Klassifikation und UICC-Stadieneinteilung

Im Folgenden werden die Nomenklatur der TNM-Klassifikation, die WHO-Tumorgraduierung und die UICC-Stadieneinteilung erläutert. In der Genotypisierungsstudie wurden diese Klassifikationen genutzt, um das Patientenkollektiv hinsichtlich des Tumorstadiums und der Prognose in Gruppen zu unterteilen.

Die TNM-Klassifikation trifft eine Aussage über die Ausdehnung der Tumorerkrankung (Sobin et al, 1997). T steht für die lokale Ausdehnung des Primärtumors, L für den Befall von regionalen Lymphknoten und M für das Vorliegen von Fernmetastasen (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5 Die TNM-Klassifikation

T (Primärtumor)	
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	kein Anhalt für einen Primärtumor
Tis	<i>Carcinoma in situ</i> ; intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der <i>Lamina propria</i>
T1	Magenfrühkarzinom; Tumor infiltriert die <i>Lamina propria</i> oder Submukosa
T2	Tumor infiltriert <i>Muscularis propria</i> oder Subserosa
T3	Tumor penetriert Serosa ohne Infiltration benachbarter Strukturen
T4	Tumor infiltriert benachbarte Strukturen (Milz, Colon transversum, Leber, Zwerchfell, Pankreas, Bauchwand, Nebennieren, Nieren, Dünndarm, Retroperitoneum)
N (regionärer Lymphknotenbefall)	
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastasen in 1 bis 6 regionären Lymphknoten
N2	Metastasen in 7 bis 15 regionären Lymphknoten
N3	Metastasen in mehr als 15 regionären Lymphknoten
M (Fernmetastasen)	
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Ein Unterpunkt der TNM-Klassifikation ist die L-Klassifikation. Diese bestimmt anhand des histologischen Präparats des Tumorresektats, ob eine Invasion von Tumorzellen in die abführenden Lymphgefäße vorliegt. Dies ist von prognostischer Bedeutung, da ein Einbruch in das

Lymphgefäßsystem die Wahrscheinlichkeit der Ausbildung lokoregionärer Lymphknotenmetastasen erhöht. Die Einteilung ist wie folgt:

L0: Eine Lymphgefäßinvasion

L1: Nachweisbare Lymphgefäßinvasion

Ein weiteres Merkmal, das im histologischen Präparat bestimmt wird, ist die Veneninvasion. Hierbei wird ermittelt, ob eine Invasion von Tumorzellen in das venöse Gefäßsystem vorliegt. Dies wird ebenfalls als prognostisch ungünstig gewertet, da eine Veneninvasion das Risiko für das Auftreten von Fernmetastasen erhöht. Die Veneninvasion wird im TNM-System folgendermaßen klassifiziert:

V0: Keine Blutgefäßinvasion

V1: Nachweisbare Blutgefäßinvasion

Beim fortgeschrittenen Magenkarzinom hängt die Prognose hauptsächlich davon ab, ob der Tumor im Gesunden entfernt werden konnte oder ob nach der Operation noch ein Resttumor in der Bauchhöhle verblieben ist. Dies gibt die R-Klassifikation an. Hierzu werden die Schnittländer des Resektats auf Tumorfreiheit untersucht. Ist der Schnitttrand histologisch oder makroskopisch nicht frei von Tumorzellen, so ist die Wahrscheinlichkeit eines lokalen Rezidivs sehr hoch. Einteilung:

R0: Kein nachweisbarer Residualtumor

R1: Mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor

R2: Makroskopisch beschriebener Residualtumor

Der Differenzierungsgrad (*grading*) des Tumors wird anhand verschiedener Kriterien im histologischen Präparat ermittelt. Hierzu gehören die Form und die Anzahl der Zellkerne, die Tei-

lungsaktivität der Zellen (gemessen an den beobachteten Mitosen) und die Ähnlichkeit des Tumors mit dem Ursprungsgewebe. Die UICC unterscheidet vier Grade:

G1: Gut differenziert (*low grade*)

G2: Mäßig differenziert

G3: Schlecht differenziert

G4: Undifferenziert (*high grade*).

Für die Einschätzung der Prognose und für die Therapieplanung wurde die UICC/AJCC-Klassifikation der *Union internationale contre le cancer* entwickelt. Diese Einteilung basiert auf den TNM-Stadien und fasst diese in vier Gruppen zusammen, die jeweils eine ähnliche mittlere Überlebensdauer aufweisen. In Tabelle 6 werden beide Einteilungen gegenübergestellt.

Tabelle 6 Stadieneinteilung nach TNM- und UICC-Klassifikation

UICC/AJCC-Stadium	TNM-Stadien			5-Jahres-Überleben [%] ¹
I	T1	N0	M0	82-69,2
	T1	N1	M0	
	T2	N0	M0	
II	T1	N2	M0	43,7
	T2	N1	M0	
	T3	N0	M0	
III	T2	N2	M0	28,6-17,7
	T3	N1	M0	
	T4	N0	M0	
	T3	N2	M0	
IV	T4	N1, N2	M0	8,7
	jedes T	N3	M0	
	jedes T	jedes N	M1	

¹Überlebensdaten von der Österreichischen Gesellschaft für Chirurgie

1.4.6 Therapie

Ist das Magenkarzinom bei Diagnosestellung nicht metastasiert, so wird es mit kurativer Zielsetzung operiert. Angestrebt wird hierbei eine R0-Resektion, das heißt eine Entfernung ohne Verbleib von Resttumor. Die Standard-Vorgehensweise umfasst eine Tumorentfernung unter

Einhaltung des Sicherheitsabstandes sowie die Entfernung des großen und des kleinen Netzes und eine Lymphknotendisektion der Kompartimente I und II (Hohenberger, 2005). Eine totale Gastrektomie bietet gegenüber der subtotalen Gastrektomie keinen Überlebensvorteil (Bozzetti, 1999). Je nach Lokalisation und Ausdehnung des Tumors können ebenfalls eine Splenektomie und eine distale Ösophagusresektion erforderlich sein. Bei einem lokal ausgedehntem Tumor ohne Fernmetastasen, der primär nicht operabel ist, kann durch eine neoadjuvante Chemotherapie mit 5-Fluorouracil (5-FU), Folinsäure, Cisplatin und Etoposid eine Reduktion der Tumormasse versucht werden um anschließend eine kurative Resektion durchführen zu können (Mezhir, 2010). Ist eine kurative Zielsetzung nicht möglich, so stehen einige palliative Therapiemaßnahmen zur Verfügung, die sowohl eine Überlebenszeitverlängerung als auch eine Verbesserung der Lebensqualität zum Ziel haben. Hierzu gehören eine Gastroenterostomie, eine palliative Gastrektomie oder die Anlage einer perkutanen Ernährungsfistel zur Behandlung einer Obstruktion der Magen-Darm-Passage. Um die Progredienz der Erkrankung aufzuhalten, stehen unterschiedliche palliative Chemotherapieregime unter anderem mit 5-FU und Folinsäure zur Verfügung.

1.5 Chronische Entzündung und Krebsentstehung

Die Entzündungsreaktion (Inflammation) dient der Bekämpfung von Krankheitserregern. Sie wird durch das angeborene Immunsystem vermittelt und ist in der Regel ein akuter, selbstlimitierender Prozess (Janeway, 2001). Epithel- und Entzündungszellen (Makrophagen, Dendritische Zellen) detektieren über ihre mustererkennende Rezeptoren (z.B. TLRs) konservierte Bestandteile der Bakterienmembran. Hierdurch werden die Zellen aktiviert und produzieren Zytokine und Chemokine. Die Entzündungsmediatoren steuern die akute Entzündungsreaktion mit Vasodilatation und gesteigerter Permeabilität der Gefäßwände. Die Gefäßendothelien exprimieren Adhäsionsmoleküle, sodass Leukozyten (vor allem neutrophile Granulozyten aber auch Monozyten) in das Gewebe einwandern und durch Chemotaxis an den Ort der Entzündung gelangen können. Die Granulozyten produzieren reaktive Sauerstoffspezies, welche den Krankheitserreger direkt abtöten. Makrophagen phagozytieren die Bakterien und prozessieren sie im Phagolysosom.

Durch Antigenpräsentation wird das erworbene Immunsystem aktiviert. Wurde der eingedrungene Krankheitserreger erfolgreich eliminiert, sistiert die Entzündungsreaktion.

Bei einer chronischen Infektion mit Persistenz des Erregers kann es zu einer anhaltenden Entzündungsreaktion kommen. Diese begünstigt die Entstehung und das Voranschreiten einer Krebserkrankung (Balkwill, 2005). Es wird davon ausgegangen, dass mindestens 20 % aller Tumoren auf eine zugrundeliegende Infektion oder Entzündung zurückzuführen sind. Viele Krankheitserreger, die in der Lage sind, Schleimhäute oder Epithelien dauerhaft zu kolonisieren und zu einer chronischen, lokalen Entzündungsreaktion führen, erhöhen das Risiko für die Ausbildung eines Tumors in dem betroffenen Gewebe. Als gesichert gilt der Zusammenhang zwischen Schistosomiasis (Rosin, 1994) und Blasenkrebs sowie zwischen der chronischen *H. pylori*-Gastritis und dem Magenkarzinom (IARC Working Group, 1994). Auch Virusinfektionen können Krebserkrankungen auslösen. Beispielsweise führen bestimmte Subtypen des humanen Papillomavirus zu Gebärmutterhalskrebs (Muñoz, 1992) und Hepatitis B und C Viren zum hepatozellulären Karzinom (Sherlock, 1994). Bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen ist das Risiko für eine Tumorerkrankung ebenfalls erhöht (Dobbins, 1984).

Nicht alle molekularen Mechanismen, die die Krebsentstehung auf dem Boden einer chronischen Inflammation fördern, sind bekannt. Es wird davon ausgegangen, dass es dabei zu einer generell erhöhten Zellproliferation und Angiogenese und zu Veränderungen in der Apoptoseregulation und in der DNA-Methylierung kommt (Schetter, 2010). Die Überproduktion von reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies übt durch DNA-Schädigung mit Strangbrüchen und Punktmutationen auch einen direkten kanzerogenen Effekt aus (Wu, 2006). Genetische Variationen in inflammatorischen Genen, die sich funktionell auf die Immunantwort auswirken, haben einen Einfluss auf das Krebsrisiko. Es sind z.B. Zytokin- und PRR-Polymorphismen bekannt, die mit Tumorerkrankungen assoziiert sind (s. Kap 1.5.1 und 1.5.2).

1.5.1 Zytokine

Zytokine sind Signalmoleküle, die die Entzündungsreaktion steuern. Sie können in proinflammatorische (u.a. IL-1, IL-12, IL-15, IL-17, IL-23 und TNF) und anti-inflammatorische

Zytokine (u.a. IL-4, IL-10, IL-13, und TGF- β) unterteilt werden. Binden sie an ihren spezifischen Membranrezeptor, aktivieren sie eine Signalkaskade, die zu Apoptose, Zellteilung, Zellalterung oder Zellwachstum führt (Cannon, 2000). Je nach Eigenschaften können Zytokine die Krebsentstehung fördern oder hemmen. Generell gilt jedoch, dass eine länger anhaltende Exposition gegenüber hohen Konzentrationen pro-inflammatorischer Zytokine das Tumorwachstum fördert (Schetter, 2010). Das Mikroumfeld bei chronischer Inflammation ist reich an Zytokinen, Chemokinen und Angiogenese-fördernden Mediatoren, die von den Epithelzellen des betroffenen Gewebes, den umgebenden Immunzellen und den Gefäßendothelien freigesetzt werden. Es bietet somit einen guten Nährboden für die Entstehung und Proliferation von Tumorzellen.

Zu den Entzündungsmediatoren, die die Tumorentstehung und das Tumorwachstum fördern, zählt unter anderem der Tumornekrosefaktor (TNF). TNF ist ein potenter Entzündungsmediator. Er reguliert die Funktion von Immunzellen und erzeugt Fieber. Über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt TNF zur Sekretion von inflammatorischen Zytokinen (Wajant, 2003). Polymorphismen, die zu einer verstärkten TNF-Aktivität führen, sind unter anderem mit einem erhöhten Risiko an Brust- und an Magenkrebs zu erkranken und mit einer schlechten Prognose von hämatologischen Krebserkrankungen assoziiert (Mocellin, 2004).

Auch das pro-inflammatorische Zytokin IL-1 β fördert das Tumorwachstum und die Metastasierung. Im Tiermodell zeigen IL-1 β -defiziente Mäuse eine reduzierte Anfälligkeit gegenüber chemisch induzierten Tumoren, bei Krebspatienten korrelieren hohe IL-1-Konzentrationen im Blut mit der Malignität des Tumors und sind in der Regel mit einer schlechten Prognose assoziiert (Apte, 2006). Genetische Variationen im *IL-1 β* -Gen, die zu einer erhöhten IL-1 β -Produktion führen, sind mit dem Magenkarzinom assoziiert (Sugimoto, 2010).

Das Interleukin-6 (IL-6) hat ebenfalls eine tumor-fördernde Wirkung. Im Mausmodell ist es Voraussetzung für die Entwicklung vom Kolitis-assoziierten Kolonkarzinom. Hohe Konzentrationen des Zytokins im Blut von Krebspatienten ist mit Knochenmetastasen und mit einer schlechteren Heilungsrate assoziiert (Ara, 2010).

Eine Meta-Analyse von elf Studien ergab, dass eine funktionelle Variation im Promoter vom Interleukin-10 mit einem erniedrigten Magenkrebs-Risiko assoziiert ist (Xue, 2012).

1.5.2 Mustererkennende Rezeptoren und genetische Variationen

PRRs (*pattern-recognition-receptors*) sind mustererkennende Rezeptoren der angeborenen Immunantwort (s. Kap. 1.2). Liganden-abhängig steuern sie die Zytokinproduktion und -sekretion. Variationen in den Genen der PRRs können die Funktion der Rezeptoren beeinflussen und dadurch zu einer veränderten Immunantwort führen. Bei einer unzureichenden Immunantwort mit einem Ungleichgewicht der Zytokinsekretion, ist die Anfälligkeit für Infektionserkrankungen erhöht. Auch kann es bei fehlender Elimination des Krankheitserregers zu einer chronischen Infektion mit einer ebenfalls chronischen Entzündungsreaktion kommen (s. Kap 1.5). Diese führt zu einem erhöhten Risiko für die Ausbildung einer Tumorerkrankung. Dies erklärt, weshalb mittlerweile eine ganze Reihe von TLR und NLR-Polymorphismen bekannt sind, die mit Krebserkrankungen assoziiert sind. Das Prostatakarzinom z.B. ist mit verschiedenen Polymorphismen des TLR1 und TLR6 assoziiert (El-Omar, 2010). Die drei bekannten Variationen im *NOD2*-Gen (R702W, G908R, 3020insC), die mit M. Crohn assoziiert sind, sind in einer polnischen und einer griechischen Population auch mit dem kolorektalen Karzinom assoziiert (Fukata, 2009). In einer griechischen Population konnte zudem eine Assoziation von den *NOD2*-Variationen R702W und 1007fs und dem Magenkarzinom beobachtet werden (Angletti, 2009). Die TLR4-Rezeptoraktivität zeigte im Tiermodell einen tumor-fördernden Effekt, epidemiologisch gibt es beim Menschen aber keinen gesicherten Zusammenhang zwischen TLR4 Polymorphismen und Krebserkrankungen (Lee, 2010).

1.6 Genetische Einflüsse bei Krankheitsentstehung und -verlauf

Nur ein Bruchteil aller bekannten Erkrankungen hat eine rein genetische Ursache und ist auf eine einzelne Mutation zurückzuführen. Die meisten Erkrankungen gehören zu den sogenannten ‚komplexen Erkrankungen‘ und haben eine multifaktorielle Genese. Neben der genetischen Veranlagung zählen auch Umweltbedingungen und Ernährungsgewohnheiten zu den Auslösern. Bei übertragbaren Erkrankungen ist eine Erkrankung zusätzlich abhängig von den Virulenzfaktoren des Krankheitserregers. Die Summe der Faktoren führt zum Ausbruch der Erkrankung, während ein einzelner Faktor nur ein geringes Risiko birgt und alleine die Krankheit nicht auszulösen

vermag. Sowohl bei Krebserkrankungen als auch bei Infektionserkrankungen spielt die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle. Es sind diverse Mutationen bekannt, die das Risiko, an Krebs zu erkranken, stark erhöhen. Diese Mutationen betreffen in der Regel Gene, die den Zellzyklus regulieren, und konnten bei familiären Tumorerkrankungen nachgewiesen werden. Hierzu gehören zum Beispiel Mutationen im *APC*-Gen beim kolorektalen Karzinom (Nagase, 1993), im *BRCA1*- und *BRCA2*-Gen beim Mammakarzinom (Lee, 2001) und im *TP53*-Gen beim Li-Fraumeni-Syndrom (Srivastava, 1990). Bei sporadisch auftretenden Tumorerkrankungen kann häufig keine der bekannten Mutationen nachgewiesen werden. Man geht davon aus, dass in diesen Fällen natürliche Variationen des Erbguts das individuelle Risiko erhöhen (Houlston, 2004; Kutikhin, 2012) und die betroffenen Patienten Träger mehrerer Risikoallele sind. Jedes Allel einzeln betrachtet, trägt nur gering zum Risiko bei. Nur die Summe der Allele bedingt ein signifikantes Krebsrisiko. Ziel von Assoziationsanalysen ist es, diese Risikoallele zu identifizieren, um so bessere Aussagen über das individuelle Erkrankungsrisiko einer Person treffen zu können.

1.6.1 Single Nucleotide Polymorphisms

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) sind Einzelbasenaustausche in einem DNA-Strang. Das heißt, dass für eine homologe Nukleotid-Sequenz mehrere alternative Sequenzen (Allele) existieren. Das häufigere Allel ist das Referenzallel oder *major allele*, das seltenere wird als *minor allele* bezeichnet. Als echte Polymorphismen gelten per Definition nur Basenaustausche, deren *minor allele* eine Häufigkeit von mehr als 1 % in der untersuchten Population aufweist¹. Veränderungen mit einer Häufigkeit unter 1 % werden unter dem Begriff ‚seltene Varianten‘ zusammengefasst. SNPs treten etwa alle 1000 Basen auf (Brookes, 1999). *Single nucleotide polymorphisms* machen damit mehr als 90 % der Variabilität des menschlichen Genoms aus. SNPs können in kodierenden oder nicht-kodierenden Regionen des Genoms liegen. Innerhalb der kodierenden Sequenz unterscheidet man zwischen synonymen und nicht-synonymen Polymorphismen. Ein synonyme Einzelbasenaustausch hat keine Veränderung der Aminosäuresequenz zur Folge,

¹ http://www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/faq/snps.shtml

während eine nicht-synonyme Veränderung zu einem Aminosäureaustausch führt. Kommt es durch einen SNP zu einem vorzeitigen Stopcodon, so spricht man von einem *nonsense* Polymorphismus. SNPs in nicht-kodierenden Regionen können z.B. Spleißstellen oder Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen beeinflussen. Die meisten SNPs hingegen haben keinen Einfluss auf die Funktion der Zelle, sodass ihnen nur wenig Krankheitspotenzial zugeschrieben wird. In der Forschung werden sie als biologische Marker genutzt, um Gene zu lokalisieren, die mit Krankheiten assoziiert sind. Polymorphismen innerhalb eines Gens oder in dessen regulatorischen Regionen können sich jedoch auch direkt auf die Genfunktion oder -expression auswirken und somit ein Risiko für Erkrankungen darstellen. Vor allem SNPs in Genen, die die Entzündungsreaktion steuern, scheinen die Anfälligkeit eines Individuums für und den Verlauf von Infektionskrankungen (Flores, 2009; Namath, 2009), sowie das Risiko für die Entstehung von Krebserkrankungen (Sugimoto, 2010) zu beeinflussen. Umstritten ist, inwiefern die Polymorphismen durch Funktionalität ein direktes Erkrankungsrisiko darstellen oder nur genetische Marker für krankmachende Mutationen sind, mit denen sie gekoppelt vererbt werden (Manolio, 2010).

Es gibt eine Reihe von öffentlich zugänglichen Datenbanken für SNPs. In der wichtigsten, der *dbSNP*-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI; Sayers, 2010), sind Informationen über 30.4 Millionen menschliche Polymorphismen gespeichert¹. Jedoch erfüllen nicht alle in *dbSNP* aufgeführten SNPs die klassische Definition eines SNPs. Vielmehr sind in der Datenbank auch Insertions/Deletions-Mutationen gespeichert. Problematisch ist zudem, dass nur ein geringer Anteil der aufgelisteten Polymorphismen die Anforderungen an die Allelfrequenzen tatsächlich erfüllt. Die Datenbank des Internationalen HapMap Projekts (HapMap) listet 2.7 Millionen echte Polymorphismen in der CEU-Population (Referenzpopulation für Menschen europäischer Abstammung)².

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> Stand: 27.02.2011 (release b132)

² <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/biomart/martview/14a70f1883a3ec0ead0a70779a6f0b2d> Stand: 04.08.2010

2 Zielstellung

Die chronische Infektion mit *H. pylori* ist der stärkste Risikofaktor für das Magenkarzinom. *H. pylori* kolonisiert die Magenschleimhaut und führt dort zu einer chronisch-aktiven Gastritis. Die Erkennung des Bakteriums erfolgt über den mustererkennenden Rezeptor NOD1. Dieser erkennt die *meso*-Diaminopimelinsäure (iE-DAP), ein Bestandteil des bakteriellen Peptidoglykans, und vermittelt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine Zytokinantwort mit Ausschüttung von IL-1 β , TNF und IL-6 (u.a.). Diese Zytokine steuern die Inflammation, haben aber auch eine tumor-fördernde Wirkung. Beim Menschen korrelieren hohe Konzentrationen dieser Entzündungsmediatoren im Blut mit einem erhöhten Risiko für bestimmte Tumorerkrankungen (TNF), bzw. mit einer erhöhten Metastasierungsrate (IL-6) und einer schlechten Prognose (IL-1 β , IL-6, TNF). Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkung der Allele des SNPs rs2075820 auf die Funktion des NOD1-Rezeptors zu untersuchen und ihre epidemiologische Bedeutung für das *H. pylori*-positive Magenkarzinom zu ermitteln. Dabei ist die Rolle des Polymorphismus in einer Reihe von *H. pylori*-assoziierten Erkrankungen bereits bekannt: Der A/A-Genotyp erhöht das Risiko für eine Schleimhautatrophie und eine intestinale Metaplasie im Magenantrum. Eine Assoziation mit der *H. pylori*-assoziierten gastroduodenalen Ulkuserkrankung wurde für den A/A-Genotyp ebenfalls beobachtet. Im ersten Teil dieser Arbeit werden daher die Allel- und Genotypfrequenzen des SNP in einem Magenkrebskollektiv und einem Kontrollkollektiv mittels Light-Cycler-PCR ermittelt und verglichen. Für das Patientenkollektiv werden die Verlaufsdaten in Abhängigkeit des Genotyps ausgewertet. Im zweiten Teil werden funktionelle Untersuchungen durchgeführt, um die Auswirkungen der rs2075820-Allele auf die Signalkaskade zu charakterisieren. Hierzu werden beide Allele des SNPs in HEK293-Zellen überexprimiert, eine Stimulation mit dem NOD1-spezifischen Liganden iE-DAP vorgenommen, und in einem Reporteragen-Assay die NF- κ B-Aktivierung gemessen. In einem zweiten Versuch werden Monozyten von gesunden, genotypisierten Probanden isoliert, ebenfalls mit dem Liganden iE-DAP stimuliert und anschließend die IL1 β -Ausschüttung gemessen. Verglichen wird die IL1 β -Antwort von Trägern des A/A-Genotyps mit derjenigen von Trägern des G/G-Genotyps.

3 Material und Methoden

3.1 Die Genotypisierungsstudie

3.1.1 Das Patientenkollektiv

3.1.1.1 Ein- und Ausschlusskriterien

Die retrospektive Kohorten-Studie umfasst 269 Magenkrebspatienten und 188 gesunde Kontrollen. Eingeschlossen wurden Patienten mit histologisch nachgewiesenem Adenokarzinom des distalen Magens (Lokalisation des Karzinoms unterhalb der Kardie), die zwischen 1991 und 2006 in der Klinik für Chirurgie und Onkochirurgie der Robert-Rössle-Klinik der Charité Universitätsmedizin Berlin (Campus Berlin-Buch) operiert wurden. Alle Patienten hatten im Vorfeld der Therapie eine Einverständniserklärung zur Durchführung genetischer Analysen im Bezug auf ihre Erkrankung unterzeichnet. Die Studie wurde von der lokalen Ethikkommission der Charité bewilligt, die Durchführung unterlag zu jeder Zeit der Helsinki-Deklaration. Von der Studie ausgeschlossen wurden Patienten mit voroperiertem Magen, präoperativer Chemotherapie, Speiseröhrenkrebs oder anderen Malignomen mit Ausnahme des distalen Magenkarzinoms, Patienten mit unbekannter Tumorlokalisation oder unbekanntem Tumorstadium sowie Patienten bei denen keine Blut- oder Gewebeproben zur DNA-Präparation asserviert waren.

3.1.1.2 Allgemeine Charakteristika

In die Studie eingeschlossen wurden 269 Patienten mit einem Adenokarzinom des distalen Magens. 157 (58 %) von ihnen waren Männer, das mittlere Erkrankungsalter lag bei 63 Lebensjahren. 59 % der Patienten litten bei Diagnosestellung bereits an einem fortgeschrittenen Tumorleiden (UICC-Stadium III und IV), in 27 % der Fälle lag das lokal begrenzte UICC-Stadium I vor. 93 Patienten (34 %) wiesen bereits bei der Erstdiagnose Fernmetastasen auf, diese wurden primär palliativ versorgt. Die verbleibenden 176 Patienten (66 %) ohne Fernmetastasen wurden mit kurativer Zielsetzung operiert. Wichtige Charakteristika des Patientenkollektivs und der gesunden Kontrollen sind Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7 Allgemeine Charakteristika

		Patienten	Kontrollen
Anzahl der Probanden		269	188
Anteil Männer		157 (58 %)	137 (73 %)
mittleres Alter [Jahre] ± SD		63 ± 12	52 ± 6
UICC Tumorstadium	I	73 (27 %)	-
	II	37 (14 %)	-
	III	46 (17 %)	-
	IV	113 (42 %)	-
¹ Laurén Klassifikation	intestinal	73 (32 %)	-
	diffus	128 (57 %)	-
	Mischttyp	25 (11 %)	-
¹ Siegelringzellen	nachweisbar	133 (62 %)	-
	nicht nachweisbar	80 (38 %)	-

¹fehlende Werte aufgrund von fehlender bzw. nicht möglicher Klassifizierung; fehlende Laurén-Klassifikation: n = 43 (16 %), fehlende histologische Untersuchung auf Siegelringzellen: n = 56 (21 %).

Das gesunde Kontrollkollektiv bestand aus 188 gesunden Blutspendern. Auch diese Kohorte hatte einen hohen Anteil an männlichen Probanden. Mit 73 % lag dieser über dem des Patientenkollektivs (157 von 269 Patienten vs. 137 von 188 Kontrollen bzw. 58 vs. 73 %). Die Kontrollprobanden waren alle Erwachsene mittleren Alters. Die Teilnehmer hatten ein durchschnittliches Alter von 52 Jahren und lagen damit unter dem Altersdurchschnitt der Magenkarzinompatienten (mittleres Alter und Standardabweichung in Jahren von 52 ± 6 vs. 63 ± 12).

3.1.1.3 Eingesetzte Tumor-Klassifikationen

Die Beurteilung der Tumorausdehnung basierte auf der 5. Edition der klinischen und pathologischen TNM-Klassifikation (Sobin, 1997). Für die Überlebensstatistik wurde die UICC/AJCC-Stadieneinteilung eingesetzt. Bei der histologischen Aufarbeitung des entfernten Tumorgewebes wurden die Präparate zusätzlich auf Lymphgefäßinvasion (L0/L1), Veneninvasion (V0/V1), auf Vorliegen eines Residualtumors (R0/R1/R2) und auf Siegelringzellen hin untersucht. Das Wachstumsmuster wurde mit der Laurén-Klassifikation (Laurén, 1965) charakterisiert. Der Differenzierungsgrad (*Grading*) des Tumors wurde wie folgt angegeben (Tumorgraduierung nach UICC, 1997):

- G1: Hohe Differenzierung („*low-grade*“)
- G2: Mäßige Differenzierung
- G3: Geringe Differenzierung
- G4: Undifferenziert („*high-grade*“)

3.1.1.4 Durchgeführte Therapiemaßnahmen

Die Behandlung der Patienten erfolgte streng standardisiert nach den für das jeweilige Tumorstadium geltenden Leitlinien. Bei Tumoren ohne Fernmetastasen wurde eine Gastrektomie mit kurativer Zielsetzung, d.h. eine Resektion ohne Verbleib eines Residualtumors und eine Lymphknotendissektion der Kompartimente I und II durchgeführt. Zu den palliativ durchgeführten Therapiemaßnahmen gehörten die Implantation eines venösen Ports mit anschließender palliativer Chemotherapie, die Anlage einer perkutanen Ernährungsfistel und bei Magenausgangsstenose eine Gastroenterostomie oder eine palliative Gastrektomie (ohne Lymphknotendissektion). In Tabelle 8 sind die unterschiedlichen operativen Prozeduren aufgeführt, die in Abhängigkeit von der Tumorausdehnung und von der Zielsetzung durchgeführt wurden. Eine palliative Chemotherapie erhielten 80 Patienten, sechs weitere wurden mit einer palliativen kombinierten Radiochemotherapie behandelt.

3.1.1.5 Tumornachsorge

Die engmaschige Tumornachsorge erfolgte in der Ambulanz der Klinik für Chirurgie und Onkochirurgie der Robert-Rössle-Klinik in Berlin Buch. Der postoperative Verlauf wurde zusätzlich von der Studienzentrale der Charité mitverfolgt und dokumentiert.

3.1.1.6 Gesundes Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv bestand aus 188 gesunden Freiwilligen europäisch-kaukasischer Abstammung. Sie wurden in einem Zentrum für Blutspenden in Halle an der Saale rekrutiert.

Tabelle 8 **Durchgeführte operative Eingriffe**

Operation	Fallzahl	
	n	% ¹
Gastrektomie	180	67
Subtotale (4/5) Resektion	21	8
Distale (2/3) Resektion	17	6
Jejunuminterponat	137	51
gastroenterale Anastomose	5	2
Splenektomie	97	36
Pankreasresektion	7	3
Querkolonresektion	9	3
Zwerchfellresektion	6	2
Anlage eines venösen Ports	41	15
Stenteinlage (zur Wiederherstellung der Magen-Darm-Passage)	7	3

¹In den Klammern sind Prozentwerte angegeben; da einige Patienten mehr als einer dieser Prozeduren unterzogen wurden, addieren sich die Prozentwerte auf über 100 %.

3.1.2 Präparation genomischer DNA

Die genomische DNA wurde in der Regel aus Lymphozyten aus peripher venösem Blut gewonnen. Die DNA-Extraktion erfolgte mithilfe des *QIAamp*[®] *Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Deutschland). Hierbei erfolgten die einzelnen Arbeitsschritte genau wie im Handbuch des Herstellers beschrieben¹. Eingesetzt wurden jeweils 200 µl EDTA-versetztes Vollblut, die DNA wurde mit 200 µl Elutionspuffer des Kits eluiert.

Von 19 Patienten waren keinen Blutproben mehr vorhanden, in diesen Fällen wurde die DNA aus Gewebeproben isoliert. Zur DNA-Extraktion wurde stets Normalgewebe und niemals Tumorgewebe eingesetzt. Hierbei wurde das *Invisorb Spin Tissue Mini Kit* (Invitex, Berlin, Deutschland) eingesetzt. Es wurde ebenfalls streng nach dem Protokoll des Herstellers vorge-

¹ <http://www1.qiagen.com/literature/render.aspx?id=3398>; Stand Januar 2004

gangen¹. Eingesetzt wurden jeweils etwa 20 bis 40 mg Gewebe. Die DNA wurde mit 200 µl Elutionspuffer eluiert.

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Deutschland). Als Blindwert wurde die optische Dichte des entsprechenden Puffers herangezogen. Dieser Wert wurde von den Messwerten abgezogen. Um eine Verunreinigung durch Proteine auszuschließen, wurde zusätzlich die Extinktion bei 280 nm bestimmt. Proben mit einem Quotient OD_{260} / OD_{280} unter 1,8 wurden verworfen. Die Lagerung der DNA erfolgte bei -80 °C.

3.1.3 Genotypisierung

Die Genotypisierung des NOD1 SNPs rs2075820 wurde mittels real-time-PCR am LightCycler® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Zur Qualitätskontrolle und bei unklaren Ergebnissen wurde für einige Proben zusätzlich eine DNA-Restriktionsanalyse durchgeführt. Im Folgenden werden beide Verfahren kurz erläutert.

3.1.3.1 Prinzip der real-time-PCR am LightCycler®

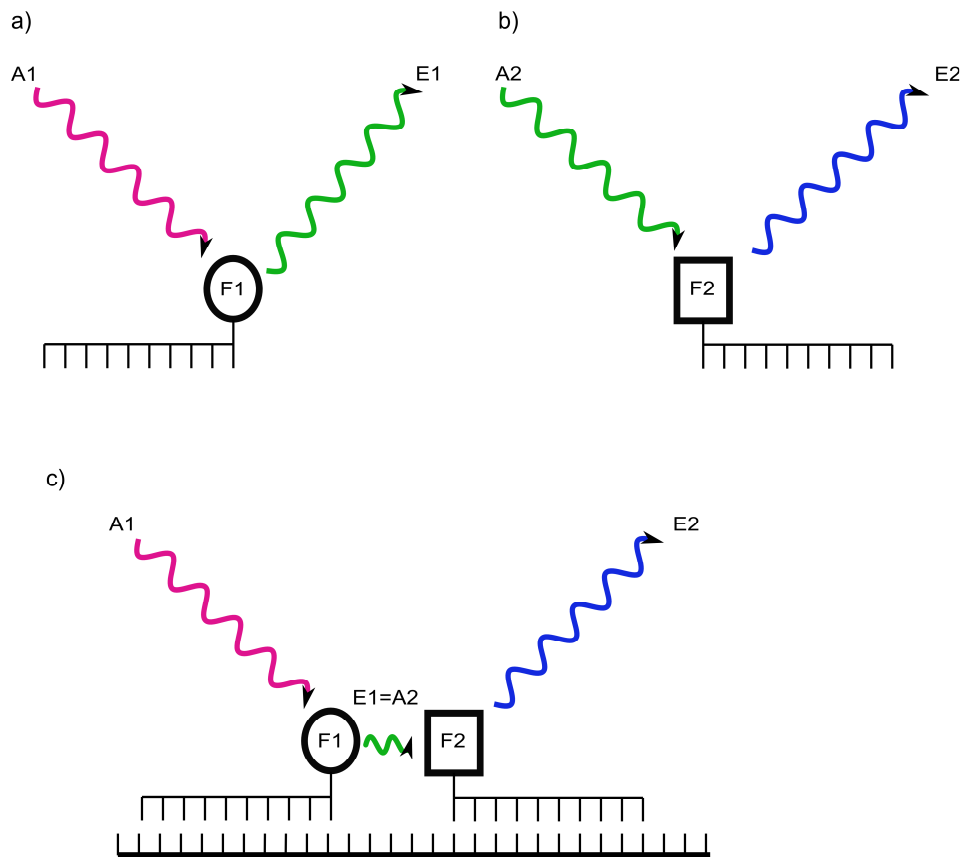
Bei der real-time-PCR wird eine herkömmliche PCR durchgeführt, zusätzlich erfolgt die simultane Quantifizierung der PCR-Produkte mittels einer Fluoreszenzmessung. Eingesetzt werden neben den beiden Primern zwei Oligonukleotidsonden (Hybridisierungssonden), die komplementär zu der zu amplifizierenden Sequenz sind. Im Falle von Genotypisierungsstudien werden die Sonden dabei so gelegt, dass eine von ihnen den Polymorphismus überspannt. Bei der Amplifizierung wird so für ein Allel ein vollkommen komplementärer Produktstrang erzeugt, bei anderen Allelen entsteht eine Fehlpaarung. Eine der Sonden trägt am 3'-Ende einen Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom 1, in der Regel Fluorescein), die andere ist 5'-terminal ebenfalls mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom 2) markiert. Während der Anlagerungsphase-Phase (*annea-*

¹ http://www.invitex.eu/products_and_service/product_catalogue/kits/genomic_dna/tissue/; Stand August 2007

ling) lagern sich die Sonden in einem Abstand von 1-5 Basen zueinander an das Amplifikat an. Da sich nun das Fluorescein und das Fluorochrom 2 in ausreichender Nähe zueinander befinden, kann das Fluorescein (Donor), das von der Leuchtdiode des LightCyclers angeregt wird, Energie auf das Fluorochrom 2 (Akzeptor) übertragen. Das Fluorochrom 2 emittiert dann Licht, welches vom LightCycler® bei einer, dem Emissionsspektrum des Fluorochroms angepassten Wellenlänge erfasst wird. Licht dieser Wellenlänge wird nur emittiert, solange beide Sonden an die DNA gebunden sind. Lösen sie sich, kann keine Energie mehr vom Donor auf den Akzeptor übertragen werden, das Signal erlischt. Dieses Prinzip wird Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) genannt. Eine schematische Darstellung des Prinzips ist der Abbildung 7 zu entnehmen.

Um die Genotypen zu bestimmen, wird im Anschluss an die PCR eine Schmelzkurvenanalyse am LightCycler® durchgeführt. Hierbei wird der Umstand genutzt, dass die eingesetzten Hybridisierungssonden sequenzspezifisch, d.h. je nach Herstellung entweder mutationsspezifisch oder wildtypspezifisch sind. Bei dem Allel, für das die Sonden nicht spezifisch sind, kommt es bei der Hybridisierung zu einer Basenfehlpaarung. Die Anlagerung der Sonde an den Produktstrang ist daher weniger stabil, der Schmelzpunkt herabgesetzt. Bei einer stufenweisen Erhöhung der Temperatur lösen sich die Sonden zu einem früheren Zeitpunkt. Sobald der Schmelzpunkt erreicht ist und sich die Sonden von der Matrize lösen, nimmt die Fluoreszenz ab. Der LightCycler® detektiert das Fluoreszenzverhalten in Abhängigkeit der Temperatur und ermöglicht somit die Differenzierung zwischen den Genotypen.

Abbildung 7 Das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET)



Das Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET). a) und b) Beide Fluorochrome (F1 und F2) besitzen ein spezifisches Anregungs- und Emissionsspektrum (A1 und E1 bzw. A2 und E2). c) Entspricht das Emissionsspektrum E1 des Fluorochroms F1 dem Anregungsspektrum A2 des Fluorochroms F2, so kann das emittierte Licht des angeregten ersten Fluorochroms das zweite Fluorochrom anregen, das daraufhin Licht seiner spezifischen Wellenlänge emittiert. Voraussetzung für den Energietransfer ist, dass sich beide Fluorochrome in ausreichender Nähe zueinander befinden. (Abbildung adaptiert nach Mülhardt C, 2006a)

3.1.3.2 LightCycler®-Protokoll

Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind Tabelle 9 zu entnehmen; der PCR-Ansatz war wie in Tabelle 10 beschrieben zusammengesetzt. Die PCR wurde am Kapillar-LightCycler® (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland; Software Version 3.5) durchgeführt und ausgewertet. Die Programme für die real time PCR sowie die Schmelzkurvenbestimmung werden in den Tabellen 11 und 12 wiedergegeben.

Tabelle 9 Sequenzen der Primer und Hybridisierungs sonden

Oligonukleotid¹	Sequenz
Vorwärtsstrang-Primer	5'- cctgctcttcaagcactact
Gegenstrang-Primer	5'- ctggaagcaccggaagat
Donor-Sonde	5'- gtgggggaagcgcagcagga--FL
Akzeptor-Sonde	5'- LC640 ² -gcaaacacctctcggggt--PH

¹Alle Oligonukleotide von TIBMOLBIOL GmbH, Berlin, Deutschland

²LightCycler[®] Red 640 (Fluoreszenzfarbstoff mit einem Emissionsmaximum bei 640 nm)

Tabelle 10 PCR-Ansatz

Reagenz	Menge je Probe
DNA	2 µl
Vorwärtsstrang-Primer (10µM)	1,6 µl
Gegenstrang-Primer (10µM)	0,4 µl
Donor-Sonde (4µM)	1 µl
Akzeptor-Sonde (4µM)	1 µl
Mastermix*	4 µl
H ₂ O	10 µl
Gesamtansatz	20 µl

* LightCycler[®] FastStart DNA Master HybProbe von Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland)

Tabelle 11 PCR-Programm

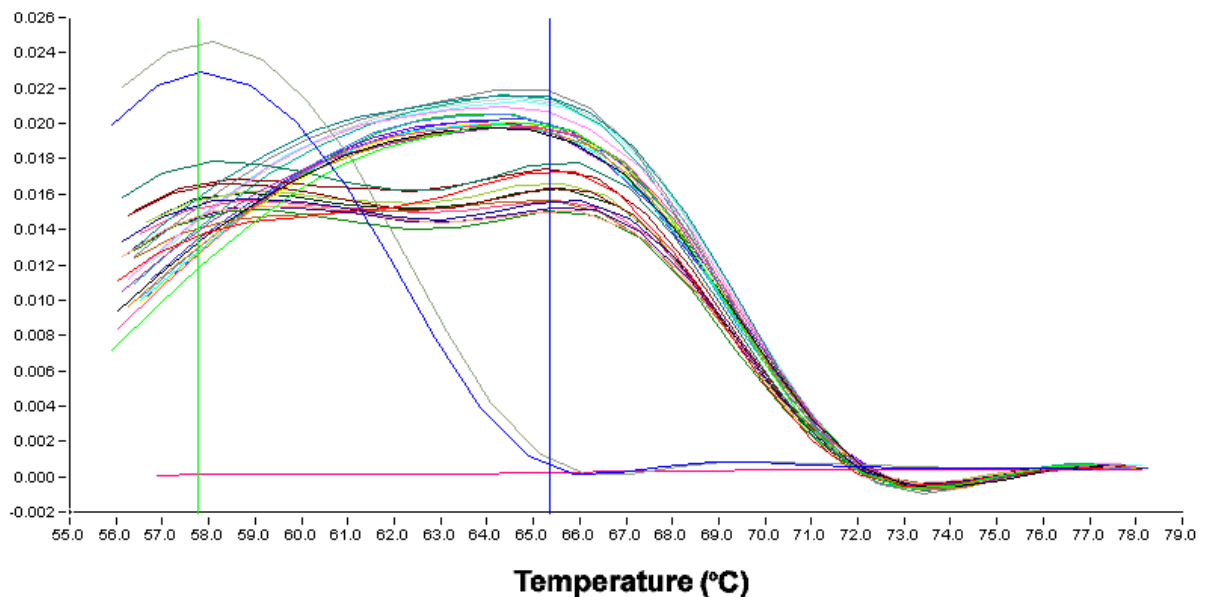
Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	10 min	1
Amplifikation			
1. Denaturierung	95	0 s	40
2. Annealing	62	10 s	
3. Elongation	72	20 s	

Tabelle 12 Schmelzkurvenanalyse

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Temperaturänderung °C /s
	95	0	20.00
	50	30 s	20.00
	85	0	0.20
Kühlung	40	30 s	20.00

Während der Schmelzkurvenanalyse wurde die Fluoreszenz kontinuierlich aufgezeichnet. Die für die Genotypisierung des NOD1 SNPs rs2075820 eingesetzten Hybridisierungs sonden waren spezifisch für das Referenzallel. Daraus ergab sich ein Schmelzpunkt von 65 °C für das Referenzallel und von 58 °C für das *minor allele*. Eine Grafik mit den für alle drei Genotypen unterschiedlich verlaufenden Schmelzkurven ist in Abbildung 8 zu sehen.

Abbildung 8 Schmelzkurven für den NOD1 SNP rs2075820



Proben, die homozygot für das *major allele* (Referenzallel) sind, haben einen Schmelzpunkt bei 65 °C, Proben, die homozygot für das *minor allele* sind bei 58 °C. Heterozygote Proben sind zweigipflig. In dieser Abbildung von einem Lauf mit 32 Proben am Kapillar-LightCycler® sind zwei Proben zu sehen, die homozygot für das *minor allele* sind. Eine ist eine Patientenprobe, die zweite eine mitgeführte, sequenzierte Kontrolle. 16 Proben sind homozygot für das *major allele*, 12 Proben heterozygot. Auch für das *major allele* wurde eine sequenzierte Positivkontrolle mitgeführt. Die flach verlaufende rosa Kurve ohne identifizierbare Schmelzpunkte ist die mitgeführte Negativkontrolle.

3.1.3.3 Prinzip der Genotypisierung durch Restriktionsanalyse

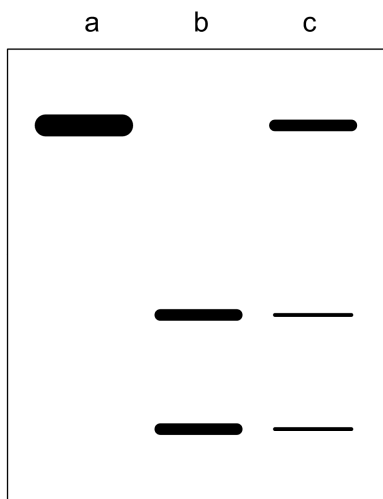
Bei dieser Methode wird im Anschluss an eine konventionelle PCR ein Enzymverdau (Restriktion) des PCR-Produktes vorgenommen. DNA-Restriktionsenzyme sind in der Regel hochspezifisch und schneiden einen DNA-Strang nur an einer für sie spezifischen Basenabfolge. Aufgrund der Vielzahl verschiedener Endonukleasen ist es deshalb häufig möglich, ein Enzym zu finden, das nur eines der beiden Allele als Schnittstelle erkennt. Ein PCR-Produkt, das den zu untersuchenden Polymorphismus enthält, kann so durch eine Inkubation mit diesem Enzym abhängig vom Genotyp geschnitten werden oder unverändert bleiben.

Die Trennung und Differenzierung der Fragmente unterschiedlicher Länge werden mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese und anschließender Visualisierung in einer Geldokumentationsanlage bewerkstelligt. Die DNA-Fragmente des Restriktionsenzymverdaus werden hierfür zunächst mithilfe einer Agarose-Gelelektrophorese ihrer Größe nach aufgetrennt. Bei dieser Methode wandert die negativ geladene DNA in einem elektrischen Feld durch eine neutrale, halb feste Gelmatrix zur Elektrode der umgekehrten Polarität (Anode). Das Gel fungiert dabei als Sieb; es lässt kleine Fragmente schneller wandern als größere. Ein Nukleinsäure-Farbstoff, der in dem Gel enthalten ist, interkaliert mit der DNA. Unter UV-Licht lässt sich der DNA-Farbstoff-Komplex dann zur Fluoreszenz anregen und somit sichtbar machen.

Wird das Produkt nach dem Verdau auf ein Gel aufgetragen, sind die folgenden Möglichkeiten denkbar (Abbildung 9):

- a) Probe ist homozygot für Allel 1 (Enzym schneidet nicht)
- b) Probe ist homozygot für Allel 2 (Enzym schneidet)
- c) Probe ist heterozygot, das Enzym schneidet lediglich das Allel 2

Abbildung 9 Restriktionsanalyse zur Genotypisierung



Schematische Darstellung des Agarosegels bei der Restriktionsanalyse. In Abhängigkeit des Genotyps liegt a) nur ein langes Fragment vor (das Enzym schneidet nicht), liegen b) zwei kurze Fragmente vor (das gesamte PCR-Produkt wird geschnitten), liegen c) ein langes und zwei kurze Fragmente vor (heterozygote Probe). Mithilfe eines auf dem Gel aufgetragenen Größenstandards (im Schema nicht dargestellt) kann die Fragmentlänge abgeschätzt werden.

Ein bei jeder Gelelektrophorese mitgeführter Größenstandard, der DNA-Fragmente genau definierter Größen enthält, erlaubt anschließend zusätzlich eine Längenbestimmung der Fragmente.

3.1.3.4 Protokoll der Restriktionsanalyse

Die Sequenzen der verwendeten Primer sind Tabelle 13 zu entnehmen; der PCR-Ansatz war wie in Tabelle 14 beschrieben zusammengesetzt. Die PCR wurde mit einem Biometra Thermocycler (Biometra Whatman, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Das PCR-Programm sowie der Ansatz für den Restriktionsenzymverdau werden in den Tabellen 15 und 16 wiedergegeben.

Tabelle 13 Primersequenzen

Oligonukleotid*	Sequenz
Vorwärtsstrang-Primer	5'- tgagaccatcttcacctgg
Gegenstrang-Primer	5'- ctcccactgagcaggttg

*Alle Oligonukleotide von TIBMOBBIOL GmbH, Berlin, Deutschland

Tabelle 14 PCR-Ansatz

Reagenz	Menge je Probe
DNA	2 µl
Vorwärtsstrang-Primer (10 µM)	2,5 µl
Gegenstrang-Primer (10 µM)	2,5 µl
10xPuffer	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1 µl
dNTPs (2,5 mM)	2 µl
Taq-Gentherm-Polymerase	0,25 µl
H ₂ O	12,25 µl
Gesamtansatz	25 µl

Tabelle 15 PCR-Programm

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	4 min	1
Amplifikation			
1. Denaturierung	95	30 s	39
2. Annealing	61	20 s	
3. Elongation	72	20 s	
Finale Elongation	72	10 min	1

Tabelle 16 Enzymverdau

Reagenz	Menge je Probe
PCR-Produkt	5 µl
Puffer	2 µl
Enzym (<i>Eco881</i>)	1 µl
H ₂ O	12 µl
Gesamtansatz	20 µl

Restriktionsenzym: *Eco881* (*Ava1*); Puffer: 1x Buffer Tango™ (beides Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland)

Gelelektrophorese

Abhängig von der Größe und somit des Laufverhaltens der zu detektierenden Fragmente wird eine passende Agarosekonzentration gewählt. In diesem Fall wurde ein 1,5 %- Agarose-Gel hergestellt. Hierzu wurde 1x TBE-Puffer und Agarose mit einer Endkonzentration von 1,5 % in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C wurde der Nukleinsäure-Farbstoff Gel-Red™ (Biotium, Darmstadt, Deutschland) in einer Verdünnung von 1:1000 hinzugefügt und durchmischt. Anschließend wurde die Flüssigkeit in eine Horizontalgelkammer (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegossen. Nachdem das Gel erstarrt war, wurde die verdaute DNA mit 1x Ladepuffer (6x DNA Laufpuffer, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt und je Probe 15 µl in die Gel-Taschen pipettiert. Auf jedes Gel wurden auch 5 µl eines DNA-Größenstandards (O'Range Ruler™ 50bp DNA Ladder, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) aufgetragen. Der Standard umfasst DNA-Fragmente in einer Größe von 50 bis 1000 bp, mit einer Größenabstufung in 50 bp-Schritten. An die Gelelektrophoresekammer wurde eine Gleichstromspannung von 100 V angelegt. Nachdem die Fragmente im elektrischen Feld ausreichend aufgetrennt waren, wurden sie in einer Geldokumentationsanlage (SynGene Bio Imaging Sys, Langenfeld, Deutschland) unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. In Tabelle 17 sind für jeden Genotypen die Anzahl und Länge der Restriktionsfragmente aufgeführt.

Tabelle 17 Anzahl und Länge der Restriktionsfragmente für den SNP rs2075820

Anzahl der Fragmente	Fragmentlänge (bp)	Genotyp
1	379	A/A; <i>minor allele</i>
2	209, 170	G/G; <i>major allele</i>
3	379, 209, 170	G/A; heterozygot

3.1.4 Serologischer *H. pylori*-Nachweis

Ein serologischer Nachweis von IgG und IgA-Antikörpern in asservierten Serumproben des Patientenkollektivs mittels ELISA (Siemens) war geplant. Dieser konnte aufgrund eines techni-

schen Defekts des Tiefkühlaggregats und daraus resultierendem Verlust der Serumproben nicht durchgeführt werden.

3.2 **Überexpression von NOD1 in HEK293-Zellen**

Um die Auswirkung des SNP rs2075820 auf die Funktion des NOD1-Rezeptors zu untersuchen, wurden Überexpressionsexperimente in humanen Zellen ohne eigene NOD1-Expression durchgeführt. Hierfür wurde zunächst aus einem Plasmid, das die Referenz-cDNA des NOD1-Rezeptors enthielt (Transkript ENST00000222823 bzw. NOD1-001), mittels Mutagenese ein Plasmid erstellt, das für das *minor allele* des SNP rs2075820 kodiert. Um beide Varianten des NOD1-Proteins in Zellen zu exprimieren, wurden beide Plasmide transient in HEK293-Zellen (*Human Embryonic Kidney cells*) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit dem NOD1-Liganden iE-DAP stimuliert. Die konsekutive NF- κ B-Aktivierung wurde mittels eines Reporter-gen-Assays für beide Varianten des NOD1-Rezeptors ermittelt und miteinander verglichen.

3.2.1 **Eingesetzte Plasmid-DNA**

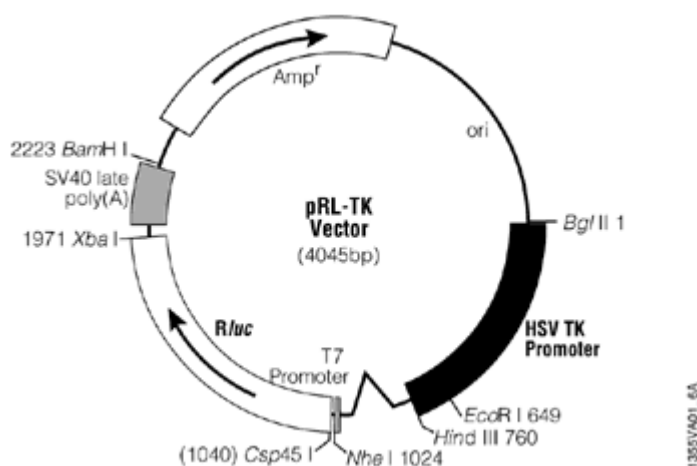
Der *NOD1*-Referenz Vektor ist ein pcDNA3.1-Vektor, der die kodierende DNA-Sequenz für den humanen NOD1-Rezeptor enthält. Dieser Vektor verfügt über eine FLAG-Markierungssequenz (FLAG-tag) am 5'-Ende der *NOD1*-cDNA und diente als Referenz-Plasmid. Aus diesem Vektor wurde mittels Mutagenese ein Vektor erstellt, der für das *minor allele* des SNP rs2075820 kodiert (*NOD1-G796A*-Vektor). Als Negativkontrolle diente der humane Expressionsvektor pcDNA3.1 (Leervektor) von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland). Ebenfalls bei der Transfektion eingesetzt wurden ein *Renilla*-Luciferase-Reporter gen zur Evaluierung der Transfektionseffizienz (pRL-TK Vector; Promega, Mannheim, Deutschland) und ein Luciferase-Reporter gen zur Bestimmung der NF- κ B-Aktivierung (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. B. Opitz; Charité-Universitätsmedizin Berlin, Deutschland). Dies ist ein PGL3Basisvektor (Promega, Mannheim, Deutschland), in den sechs NF κ -B-Bindungsstellen, gefolgt von einem β -Globin-Promotor und einem Glühwürmchen-Luciferasegen kloniert wurden (Krüll, 1999). In Tabelle 18

sind alle Vektorinformationen zusammengefasst. Die korrespondierenden Vektorkarten sind in den Abbildungen 10 bis 12 zu sehen.

Tabelle 18 Vektorinformationen

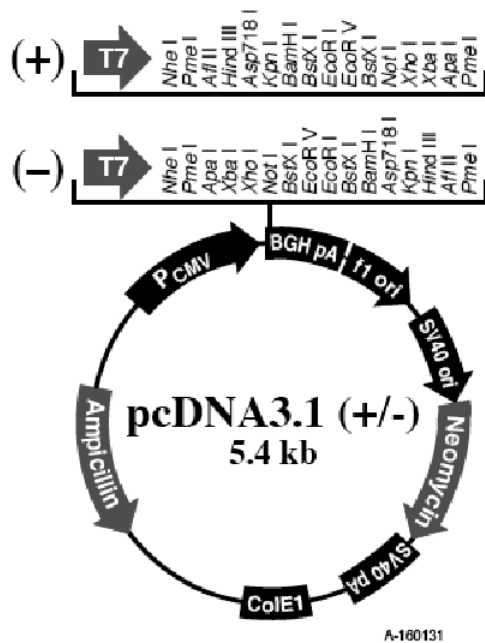
Name	Vektoreigenschaften	Hersteller
NOD1-Referenz	pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen) in den die am 5'-Ende FLAG-markierte cDNA des NOD1-Rezeptors (Transkript ENST00000222823 bzw. NOD1-001) kloniert wurde. Die Sequenz entspricht der <i>major variante</i> des SNP rs2075820.	Zur Verfügung gestellt von Herrn G. Nuñez (Ann Arbor, Michigan, USA)
NOD1-G796A	pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen) mit einem Insert, das die DNA-Sequenz des NOD1-Rezeptors (Transkript ENST00000222823 bzw. NOD1-001) mit dem Basenaustausch G796A enthält. Die Sequenz entspricht der <i>minor variante</i> des SNP rs2075820, sie ist ebenfalls am 5'-Ende FLAG-markiert).	Durch ortsspezifische Mutagenese aus dem Vektor NOD1-Referenz generiert
Leervektor	Handelsname: pcDNA3.1 Der Vektor enthält u.a. einen humanen Cytomegalievirus (CMV) Promoter, <i>Multiple cloning sites</i> in vorwärts (+) und rückwärts (-) Orientierung und ein Neomycin- sowie ein Ampicillin-Resistenzgen.	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Renilla-Luciferase Reporter	Handelsname: pRL-TK Vector Der Vektor enthält die cDNA für die <i>Renilla</i> -Luciferase und einen konstitutiven Herpes simplex Thymidin-Kinase Promoter.	Promega (Mannheim, Deutschland)
NFκB-Luciferase-Reporter	PGL3Basisvektor (Promega, Mannheim, Deutschland), in den sechs NFκB-Bindungsstellen, gefolgt von einem β-Globin-Promotor und einem Luciferasegen kloniert wurden. (Krüll, 1999)	Zur Verfügung gestellt von Herrn B. Opitz (Charité- Universitätsmedizin Berlin, Deutschland).

Abbildung 10 Vektorkarte des *Renilla*-Luciferase Reporters (pRL-TK Vector)



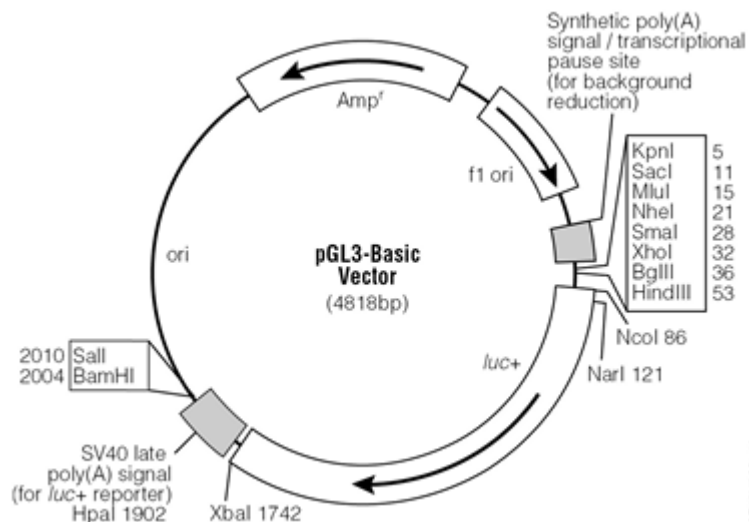
Der Vektor enthält die cDNA für die Renilla-Luciferase (Rluc) und einen konstitutiven Herpes simplex Thymidin-Kinase (HSV TK) Promoter.

Abbildung 11 Vektorkarte des pcDNA3.1 Vektors



Der pcDNA3 Vektor (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) enthält einen humanen Cytomegalievirus (CMV) Promoter für eine hohe Expression, Multiple cloning sites in vorwärts (+) und rückwärts (-) Orientierung für eine einfache Klonierung und ein Neomycin- sowie ein Ampicillin-Resistenzgen zur Antibiotikaselektion. Bei dem NOD1-Referenz Expressionsvektor wurde die NOD1 cDNA (3402 bp) über die Restriktionsstellen HindIII und XhoI in den pcDNA 3.1 Vektor einkloniert. Quelle: Invitrogen

Abbildung 12 Vektorkarte des Luciferase-Reporters



Der Vektor enthält die cDNA für die Glühwürmchen Luciferase (*luc*). Bei dem NFκB-Luciferase-Reporter wurden über die *SmaI* Restriktionsstelle sechs Nfk-B-Bindungsstellen und über *XhoI/HindIII* ein β-Globin-Promotor einkloniert (Krüll, 1999).

3.2.2 Mutagenese der Plasmid-DNA

3.2.2.1 Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese (engl. *site-directed mutagenesis*) erlaubt es DNA gezielt zu verändern. Hierfür werden zwei Primer synthetisiert - ein Strang- und ein Gegenstrangprimer -, die beide die gewünschte Mutation enthalten. Anschließend wird eine PCR durchgeführt, bei der sich die Primer an die Vorlage-DNA anlagern können. Eine *proofreading*-Polymerase synthetisiert den komplementären DNA-Strang unter Einbezug der mutierten Primer. Der so entstandene Strang enthält somit die gewünschte Mutation. Zur Trennung des neu generierten, mutierten, PCR-Produkts von der eingesetzten Ausgangs-DNA, wird die DNA nach der PCR mit dem Enzym *Dpn I* verdaut. Dieses schneidet spezifisch die methylierte, unmutierte Vorlage-DNA. Übrig bleibt der unmethylierte, neu synthetisierte, und mutierte DNA-Strang. Zum Schluss erfolgt die Transformation des offenkettigen Strangs in kompetente Bakterien. Dort wird er zu einem geschlossenen Plasmid ligiert und vermehrt wird. Eine schematische Darstellung des Prinzips ist in Abbildung 13 dargestellt.

3.2.2.2 Protokoll der Mutagenese

Die Mutagenese des NOD1-Referenz-Plasmids zum NOD1-G796A-Plasmids wurde mit dem QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA) durchgeführt. Die Vorgehensweise richtete sich dabei nach dem Protokoll des Herstellers. Die PCR wurde am Biometra Thermocycler (Biometra Whatman, Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Primersequenzen, der PCR-Ansatz, das PCR-Protokoll sind tabellarisch dargestellt (Tabellen 19 bis 21). Für den enzymatischen Verdau der Vorlage-DNA wurde anschließend 1 µl des Enzyms *Dpn I* (10 U/µl) zum PCR-Produkt (51 µl) hinzupipettiert. Die Lösung wurde vorsichtig durchmischt, in einer Mikrozentrifuge für eine Minute abzentrifugiert und anschließend eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

Abbildung 13 Das Prinzip der ortsspezifischen Mutagenese

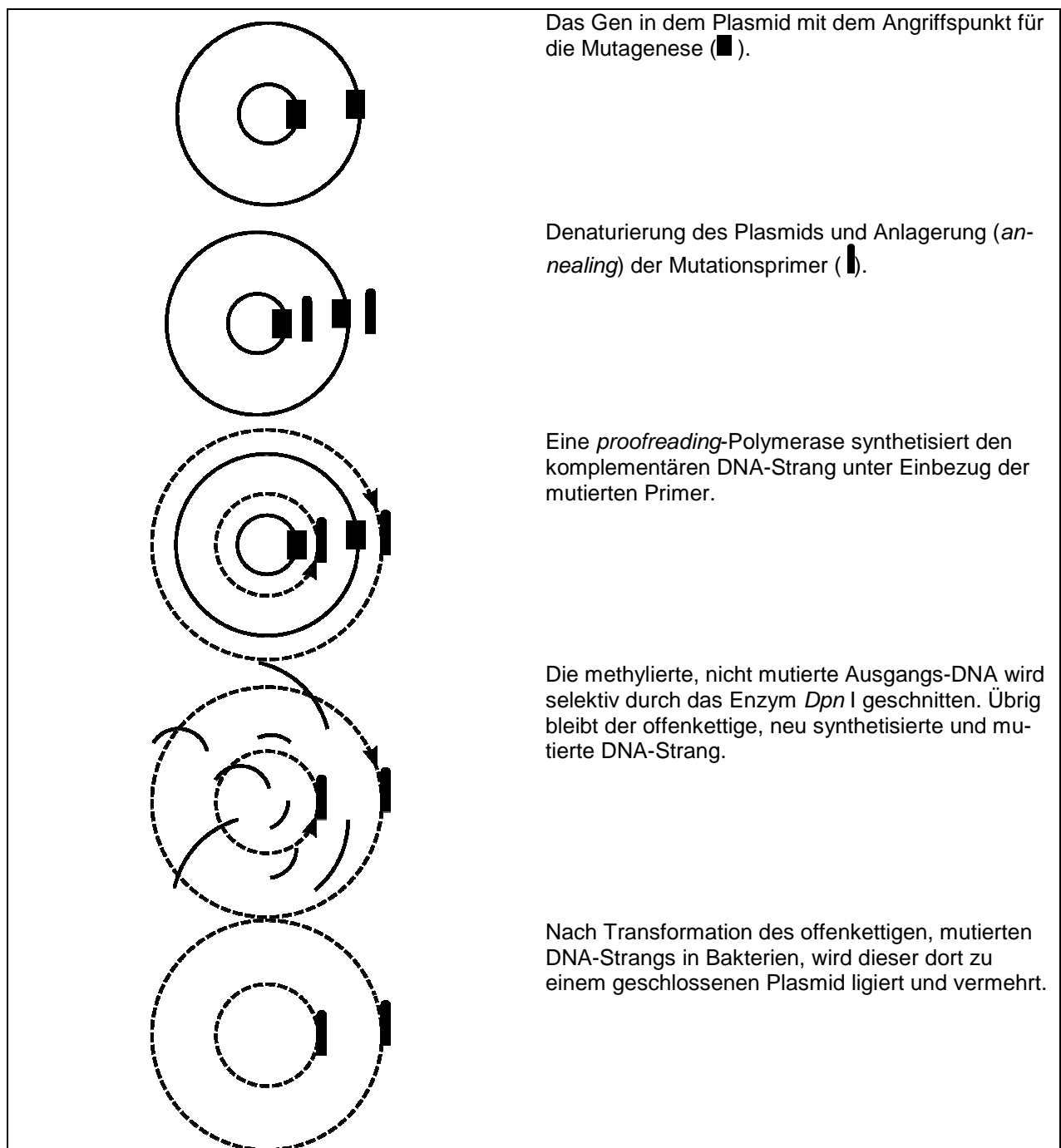


Tabelle 19 Primersequenzen

Oligonukleotid*	Sequenz
Vorwärtsstrang- Primer	5'- ctaccagagcgcgacccaaggagggtttg
Gegenstrang- Primer	5'- caaacacctcctggggtcgcgctctgggtag

*Alle Oligonukleotide von TIBMOLBIOL GmbH, Berlin, Deutschland

Tabelle 20 PCR-Ansatz

Reagenz	Menge je Probe
Vorlage-DNA (4 ng/μl)	12,5 μl
Vorwärtsstrang- Primer (50 ng/μl)	2,5 μl
Gegenstrang- Primer (50 ng/μl)	2,5 μl
10xPuffer	5 μl
dNTPs (2,5 mM)	1 μl
QuikSolution*	3 μl
H ₂ O	23,5 μl
<i>PfuTurbo</i> DNA Polymerase (2.5 U/μl)*	1 μl
Gesamtansatz	51 μl

*QuikChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, USA)

Tabelle 21 PCR-Programm

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Zyklenanzahl
Initiale Denaturierung	95	1 min	1
Amplifikation			
1. Denaturierung	95	50 s	18
2. Annealing	60	50 s	
3. Elongation	68	1 min	
Finale Elongation	68	7 min	1

3.2.2.3 Klonierung des NOD1-Rezeptors

Das Einbringen fremder DNA in Bakterien wird als Transformation bezeichnet. Daraus abgeleitet ist die Klonierung, bei der kompetente Bakterien durch Plasmid-DNA transformiert werden und anschließend das im Plasmid enthaltene Gen vermehren und dessen Genprodukt (Protein oder Peptid) herstellen. Vor der Einführung der PCR war dieses Verfahren die Standardmethode zum Vervielfältigen von DNA, beispielsweise vor einer Sequenzierung. Die Klonierung wird heute nach wie vor genutzt, um Plasmid-DNA zu vermehren oder um unbekannte DNA bzw. cDNA Sequenzen zu identifizieren.

Um das durch die Mutagenese gewonnene Plasmid zu vervielfältigen und somit später transfizieren zu können, wurden kompetente (d.h. transformierbare) Bakterien mit ihm transformiert. Die Transformation erfolgte in One Shot® TOP10 Chemically Competent *E. coli* (TA Cloning® Kit, Invitrogen, Darmstadt, Deutschland). Diese Bakterien haben einen Mangel an Endonukleasen und Rekombinasen, der eine hohe Transformationseffizienz bedingt.

Die Transformation der kompetenten *E. coli* mit der *Dpn* I-verdauten Plasmid-DNA erfolgte mittels Hitzeschock. Die einzelnen Arbeitsschritte richteten sich dabei genau nach dem Handbuch des Herstellers¹.

Schließlich wurden jeweils 200 µl des Reaktionsgemisches auf LB-Ampicillin Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Nur die erfolgreich transformierten *E. coli* konnten auf diesen Agarplatten wachsen, da der Klonierungsvektor (pcDNA3.1) ein Ampicillin-Resistenzgen enthielt. Am Folgetag wurden acht Klone gepickt und die Plasmid-DNA mithilfe des Invisorb® Spin Plasmid Mini Two Kits (Invitek, Berlin Deutschland²) präpariert.

Die isolierte Plasmid-DNA der acht Klone wurde mittels Restriktionsenzyuverdau (siehe Kapitel 3.1.3.3) und mittels real-time-PCR (siehe Kapitel 3.1.3.1) auf das Vorhandensein des gewünschten Basenaustausches (G796A) hin untersucht. Anschließend wurde die gesamte Sequenz des Klons, der den Basenaustausch enthielt und bei der Transfektion eingesetzt wurde, durch Sequenzierung überprüft (Sequenzierservice Dr. M. Meixner GmbH, Berlin, Deutschland).

3.2.3 Kultur von HEK293-Zellen

Um die Auswirkung des SNP rs2075820 auf die Funktion des NOD1-Rezeptors untersuchen zu können, wurden beide Allele des SNP durch eine Transfektion in HEK293-Zellen eingebracht. HEK293 ist eine humane Zelllinie, die durch eine Transformation von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK- *Human Embryonic Kidney*) und DNA-Fragmenten des Adenovirus 5 entstanden ist (Graham, 1977). Die HEK293-Zellen haben einen natürlichen Mangel an TLRs und

¹ http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/ta_man.pdf; Stand: 7. April 2004

² http://www.invitek.eu/e1531/e1658/e2414/e2415/e2421/ip_manual4664/SpinPlasmidminikittwo.pdf; Stand 2008

NLRs und lassen sich leicht kultivieren und transfizieren. Sie werden häufig für Überexpressionsexperimente eingesetzt, bei denen ein Gen mittels Transfektion in die Zellen eingebracht wird, um das anschließend exprimierte Protein zu untersuchen.

Die Kultur der adhärenenten HEK293-Zellen (DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig) erfolgte in T75-Zellkulturflaschen. Als Nährmedium wurde mit 10 % FCS versetztes DMEM (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) eingesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und mit 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und mit frischem Nährmedium versorgt. Vor jedem Versuch wurden die Zellen mikroskopisch hinsichtlich ihrer Vitalität und zum Ausschluss einer Kontamination untersucht.

3.2.4 Transfektion von HEK293-Zellen

3.2.4.1 Prinzip der Transfektion

Bei einer Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryote Zellen eingeschleust. Hierbei wird zwischen einer zeitweiligen (transienten) Transfektion durch Einbringen eines Plasmids und einer dauerhaften (stabilen) Transfektion unterschieden, bei der die Fremd-DNA in das Genom der Wirtszelle eingebaut wird. Es gibt chemische, physikalische und biologische Verfahren um Zellen zu transfizieren (Mülhardt C, 2006b).

Bei der transienten Transfektion der NOD1-Expressionsvektoren NOD1-Referenz und NOD1-G796A in HEK293-Zellen wurde die Calcium-Phosphat-Präzipitation gewählt. Dieses Transfektionsverfahren wird sehr häufig angewandt. Es ist kostengünstig und einfach in der Durchführung. Eine Transfektionseffizienz von bis zu 30 % kann erzielt werden. Das zugrundeliegende Prinzip ist noch nicht vollständig erklärt. Es wird davon ausgegangen, dass Calciumphosphatkristalle ausfallen, an die die Plasmid-DNA bindet. Gibt man das Präzipitat aus Calciumphosphat und DNA anschließend auf die Zellen, wird es über Endozytose aufgenommen.

3.2.4.2 Protokoll der HEK293-Zelltransfektion

Für die Transfektion wurden die HEK293-Zellen in 24-well-Zellkulturplatten (Falcon®) ausgesät. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von etwa 70 % erreicht hatten, wurden die HEK293-Zellen transient transfiziert. Hierfür wurde das CalPhos™ Mammalian Transfection Kit (BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Der Transfektionsansatz, bestehend aus dem Calciumphosphat-Reagenz und der Plasmid-DNA, wurde nach Anleitung des Herstellers erstellt und anschließend den einzelnen Wells zugesetzt. Die hinzugefügte Plasmid-DNA-Menge betrug dabei jeweils 2 ng pro Well für den NOD1-Vektor (NOD1-Referenz, NOD1-G796A oder Leervektor) und jeweils 5 ng pro Well für die beiden Reportergene Renilla und NF- κ B-Luciferase.

3.2.5 Stimulation der HEK293-Zellen

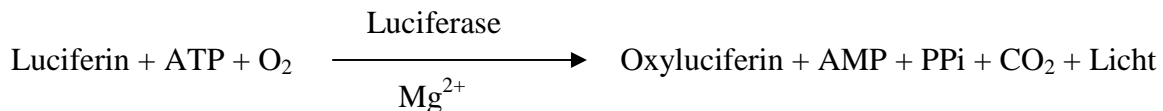
Die Zellstimulation mit dem spezifischen NOD1-Liganden iE-DAP wurde zeitgleich mit der Zelltransfektion durchgeführt, um durch das Calciumphosphat ein besseres Eindringen des Stimulanzes in die Zelle zu gewährleisten. Das iE-DAP wurde in drei unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt: 10, 20 und 50 mg/ml. Um Dreifachwerte bestimmen zu können, wurde jede Konzentration in jeweils drei Wells eingesetzt. Als Kontrolle diente Medium ohne Stimulanzzusatz. Fünf Stunden nach der Stimulation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um die Stimulation abzustoppen. Nach weiteren 15 Stunden wurden die Zellen für die Reporter-Gen-Assays lysiert.

3.2.6 Reporter-Gen-Assays

3.2.6.1 Prinzip des Luciferase-Reporter-Gen-Assays

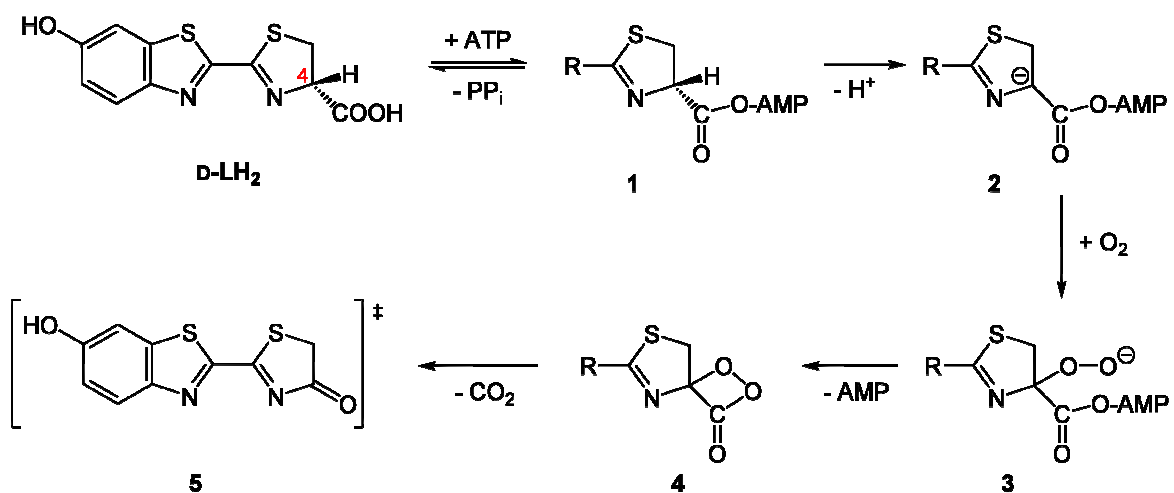
Um die NF- κ B-Aktivierung der HEK-Zellen durch die Stimulation mit iE-DAP quantifizieren zu können, wurden die Zellen bei der Transfektion mit einem Reporterplasmid ko-transfiziert. Das Reporterplasmid enthielt eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor NF- κ B und nachgeschaltet einen Promoter und das Luciferase-Gen. Die Aktivierung von NF- κ B führt so zur

Transkription des Luciferase-Gens und damit zur Expression der Luciferase. Wird der Transkriptionsfaktor aktiviert, bindet er an das Plasmid und das Luciferase-Gen wird transkribiert. Konsequent kommt es zur Expression der Luciferase. Je stärker die NF-κB-Aktivierung, desto mehr Luciferase wird exprimiert. Bei Hinzugabe des Substrates katalysiert das Enzym eine Reaktion, bei der Licht emittiert wird:



Die Lichtproduktion ist proportional zur Luciferasemenge, die wiederum abhängig von der NF-κB-Menge in den Zellen ist, und kann mit einem Luminometer gemessen werden.

Abbildung 14 Reaktionsmechanismus der Glühwürmchen-Luciferin-Reaktion



Durch ATP wird das D-Luciferin an der Carboxygruppe adenyliert. Hierbei wird Pyrophosphat freigesetzt (1). Durch diese Aktivierung kann das Proton am C4-Atom abstrahiert werden, wodurch sich ein Carbanion bildet (2). Anschließend kann das Luciferin am C4-Atom oxygeniert werden, es bildet sich ein lineares Hydroperoxid (3). Dieses bildet unter Abspaltung von AMP ein Dioxetanonring (4). Nach Decarboxylierung bildet sich daraus Oxyluciferin. Es ist in einem energetisch angeregten Zustand. Unter Abgabe eines Photons (Emission von Licht) fällt es in seinen Grundzustand zurück.

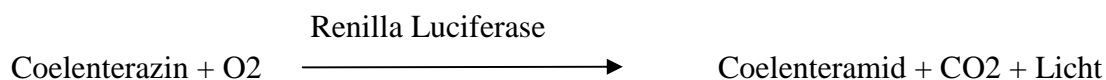
3.2.6.2 Protokoll des Luciferase-Reportergen-Assays

Der Luciferase-Nachweis wurde mit dem „Luciferase Assay System“ von Promega (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen zunächst mit 100 µl/well Promega Lyse-puffer lysiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer über 2 Minuten bei 300 g abzentrifugiert

(Zentrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Je Probe wurde jeweils 10 µl Überstand entnommen und mit 10 µl des Luciferase Reaktionspuffers (Promega) versetzt. Nach drei Sekunden wurde die Lichtemission bei 562 nm im Luminometer (Lumat LB 9501, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland) gemessen.

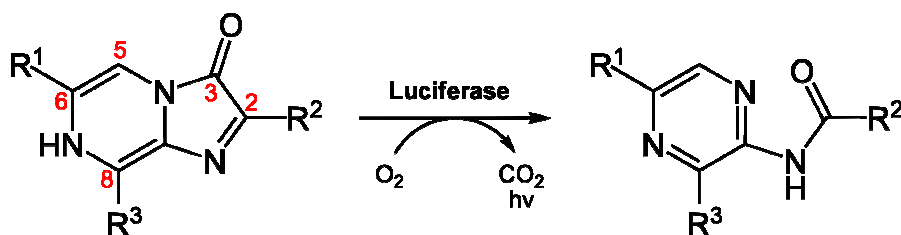
3.2.6.3 Prinzip des *Renilla*-Luciferase-Reportergen-Assays

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz und zur Standardisierung der mittels Luciferase-Reportergen ermittelten NF-κB-Aktivierung wurde zusätzlich ein *Renilla*-Reporterplasmid kointransfiziert. Dieses Plasmid kodiert für die Quallen-Luciferase (aus *Renilla reniformis*). Dieser ist ein konstitutiver Promoter vorgeschaltet. Das Enzym wird daher in allen erfolgreich transfizierten Zellen konstitutiv exprimiert und emittiert bei Zugabe des Substrats Licht. Wird das Substrat im Überschuss eingesetzt, ist die Enzymaktivität und somit die Lichtintensität proportional zur Transfektionseffizienz.



Die Lichtemission kann im Luminometer bei 480 nm gemessen werden.

Abbildung 15 Umsetzung des Coelenterazins durch die *Renilla* Luciferase



Das Coelenterazin reagiert mit Sauerstoff zu Coelenteramiden. Hierbei tritt eine Decarboxylierung ein, es bildet sich das Anion eines Coelenteramides. Dieses emittiert blaues Licht. Die Reaktion wird durch die *Renilla* Luciferase biokatalysiert (Biolumineszenz).

3.2.6.4 Protokoll des Renilla-Luciferase-Reportergen-Assays

Der *Renilla*-Luciferase-Nachweis wurde mit dem *Renilla*-Luciferase Assay System von Promega (Mannheim, Deutschland) durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 5 µl des Zelllysates (Lyse siehe Kap. 3.2.6.2) eingesetzt und mit 5 µl des *Renilla*-Luciferase-Substrat-Puffers von Promega versetzt. Die Messung der Lichtemission erfolgte nach 3 Sekunden bei 480 nm im Lumat Lumino-meter.

Die relative NF-κB-Aktivierung ergab sich aus dem Quotienten von Glühwürmchen-Luciferase- und *Renilla*-Luciferaseaktivität.

3.3 Stimulation humaner Monozyten

Um die Auswirkung des NOD1-SNP rs2075820 auf die NOD1-Rezeptor-Aktivität in Monozyten zu untersuchen, wurde eine Stimulation von humanen Monozyten durchgeführt. Hierfür wurde zunächst ein gesundes Probandenkollektiv genotypisiert und Probanden herausgesucht, die homozygot entweder für das Referenzallel waren (G/G-Genotyp) oder den A/A-Genotyp trugen. Anschließend wurde diesen Probanden Blut zur Isolation von Monozyten entnommen. Für jeden Probanden lag eine schriftliche Einverständniserklärung zur Blutabnahme für humangenetische Untersuchungen und zur Gewinnung von Zellen für zellbiologische Versuche vor.

Die Stimulation von humanen Monozyten erfolgte ebenso wie die HEK293-Zelltransfektion *in vitro*. Vorteil bei dieser Methode ist, dass mit primären humanen Zellen gearbeitet wird, die nicht wie die HEK293-Zellen durch die Transformation mit einem Virus verändert wurden. Die Monozyten sind daher mit ihrem natürlichen, breiten Repertoire von mustererkennenden Rezeptoren, darunter auch NLRs und TLRs ausgestattet. Die Expression des zu untersuchenden Proteins wird im Gegensatz zu den Transfektionsexperimenten nicht durch zusätzliches Einbringen (Transfektion) von Fremd-DNA verstärkt (Überexpression). Bei der Stimulation von Monozyten können auch synergistische Effekte und Proteininteraktionen besser untersucht werden.

3.3.1 Isolierung humaner Monozyten

Die Isolierung der peripheren Blutmonozyten (PBMCs) erfolgte mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation. Hierzu wurde den Probanden jeweils etwa 45 ml Blut in Heparin-beschichtete Spritzen entnommen. Anschließend wurde das Blut 1:2 mit RPMI-Minimalmedium (RPMI-Medium ohne FCS, 1 % L-Glutamin, 1 % Natriumpyruvat) verdünnt. Jeweils 15 ml Ficoll-Paque-Trennmedium (spezifische Dichte 1,077 g/ml) wurden in einem 50 ml BD Falcon™-Röhrchen (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) vorgelegt, jeweils 30 ml des verdünnten Blutes vorsichtig darüber geschichtet und dann für 45 min bei Raumtemperatur und 400 g zentrifugiert. Nach der Zentrifugation war unmittelbar oberhalb des Trennmediums eine helle Schicht erkennbar, die die PBMCs enthielt. Diese Schicht wurde vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgenommen, in ein neues Falcon™-Röhrchen überführt und mit RPMI-Minimalmedium auf 30 ml aufgefüllt. Anschließend wurden die Zellen zwei Mal durch Zentrifugation (10 min 300 g) mit RPMI-Minimalmedium gewaschen. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt von 15 min bei 100 g zur Entfernung der Thrombozyten. Anschließend wurde das Pellet in 8 ml RPMI-Minimalmedium aufgenommen.

3.3.2 Kultur und Stimulation der Monozyten

Für die Kultur und für die Stimulation der PMBC wurde jeweils RPMI-Minimalmedium ohne Zusatz von Antibiotika verwendet. Nach der Isolierung der PBMC (siehe Kapitel 3.3.1) wurde zunächst die Zahl der vitalen Zellen in einer 1:100 Verdünnung mit Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Es folgte die Aussaat von jeweils $3 \cdot 10^5$ Zellen pro Loch in eine 96-Loch-Flachbodenplatte. Nach zweistündiger Ruhezeit im Brutschrank bei 37 °C wurden alle nicht adhärenen Zellen entfernt und die Stimulation durch Lipopolysaccharid (LPS) O11:B4 und ieDAP begonnen. Hierfür wurden die Stimulanzen im RPMI-Minimalmedium auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Das LPS wurde in Konzentrationen von 1 und 10 ng/ml, das ieDAP in Konzentrationen von 10, 20 und 50 µg/ml eingesetzt. Der Stimulationsansatz betrug 100 µl pro Loch. Zur verbesserten Aufnahme des ieDAPs in die Zellen wurde zum Stimulations-

ansatz die Transfektionsreagenzien Calciumphosphat (CalPhos™ Mammalian Transfection Kit; BD Biosciences Clontech, Heidelberg, Deutschland) oder Lipofectamin (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) hinzugefügt. Um Dreifachwerte bestimmen zu können, wurde jedes Stimulanz in jeweils drei Wells eingesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 18 Stunden wurde der Kulturüberstand abpipettiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur geplanten IL-1 β -Bestimmung (siehe unten) eingefroren. Um eine Kinetik der IL-1 β Ausschüttung zu erstellen, wurden Kulturüberstände zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 12, 24, 48 h nach Stimulation abgenommen.

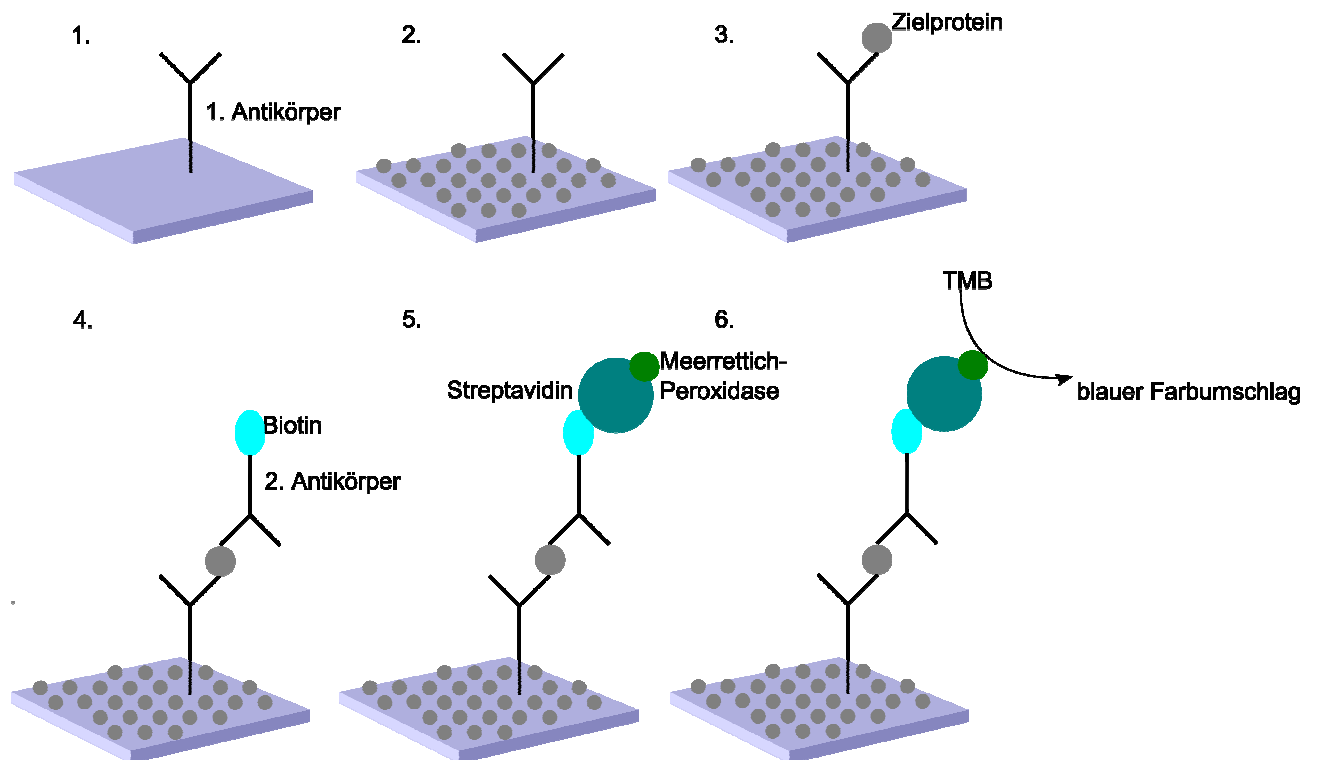
3.3.3 IL-1 β - ELISA

Der Sandwich-Elisa ist ein immunologisches Nachweisverfahren, das eine quantitative Bestimmung von Proteinen in einer Lösung ermöglicht. Er wurde eingesetzt, um die IL-1 β -Konzentration in den Überständen der mit unterschiedlichen Liganden stimulierten humanen Monozyten zu messen. Im folgenden Abschnitt werden das Prinzip und der Versuchsaufbau im Detail erklärt. Eine schematische Darstellung des Prinzips ist der Abbildung 16 zu entnehmen.

Zunächst wurde eine 96-Loch-Platte mit einem monoklonalen Antikörper gegen humanes IL-1 β (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) beschichtet. Hierzu wurde der Antikörper in Carbonatpuffer NaHCO_3 (pH 9,3) bis auf $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ verdünnt. Pro Loch wurden $50\text{ }\mu\text{l}$ der Lösung eingesetzt. Die Platte wurde über Nacht (mindestens 12 Stunden) bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Am nächsten Tag wurde die Platte drei Mal mit jeweils $200\text{ }\mu\text{l}$ Waschpuffer pro Loch gewaschen und anschließend die freien Bindungsstellen mittels Blockierpuffer blockiert. Der verwendete Blockierpuffer setzte sich zusammen aus dem Waschpuffer (1x PBS, 0,05 % Tween®20) und 2,5 % fetalem Kälberserum (FCS). Nach einer Inkubation von einer Stunde und drei erneuten Waschschrritten wurden der Standard und die Proben nach einem zuvor festgelegten Schema auf die Mikrotiterplatte aufgetragen (jeweils $50\text{ }\mu\text{l}$ pro Loch). Die Standardverdünungsreihe umfasste dabei sieben Konzentrationen von minimal $15,6\text{ pg/ml}$ bis maximal 1000 pg/ml rekombinantem, humanem IL-1 β (R&D Systems). Aufgrund der teilweise sehr hohen gemessenen IL-1 β -Konzentrationen in den Proben wurden diese zum Teil 1:2 verdünnt aufgetragen. In der Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur band der auf der Platte immo-

bilisierte Antikörper das in Probe und Standard enthaltene IL-1 β . Danach erfolgte wiederum ein Waschschrift, in dem ungebundenes Substrat entfernt wurde. Ein zweiter polyklonaler und biotinylierter IL-1 β -Antikörper (R&D Systems) wurde in Waschpuffer und 2,5 % FCS auf eine Konzentration von 400 ng/ml verdünnt und auf die Platte aufgetragen (50 μ l pro Loch). Während der Inkubation über eine Stunde bei Raumtemperatur wurde die Bindung des biotinylierten Antikörpers an das IL-1 β ermöglicht. Nach erneutem Waschen zur Entfernung ungebundenen Antikörpers wurde im darauf folgenden Schritt Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) in einer Konzentration von 1 μ g/ml aufgetragen (100 μ l je Loch). Diese war an Streptavidin gekoppelt, welches an das Biotin des zweiten Antikörpers bindet. Nach einer Inkubation von 30 min wurde ungebundene Peroxidase durch zweimaliges Waschen entfernt. Anschließend erfolgte je Loch die Zugabe von 100 μ l des Chromogens TMB (3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin). Die gebundene Peroxidase katalysiert in diesem Schritt eine enzymatische Farbreaktion, die das vorher fast farblose TMB zu seinem blauen Endprodukt oxidiert. Diese Reaktion wurde etwa 15 min im Dunkeln inkubiert und anschließend mit jeweils 50 μ l H₂SO₄ gestoppt. Durch die Veränderung des pH-Wertes entsteht dabei ein stabiler gelber Farbkomplex. Die Intensität der Farbtintensität ist proportional zur IL-1 β -Konzentration in der Lösung und wurde im Photometer Spectra Fluor Plus (Tecan Crailsheim, Deutschland) bei 450 nm bestimmt. Mithilfe der mitgeführten Standardreihe wurde mit der Software Tecan Magellan3 (Tecan Crailsheim, Deutschland) eine Standardkurve erstellt, anhand derer die IL-1 β -Konzentration in den Zellüberständen errechnet wurde. Alle Messungen wurden mindestens als Doppelbestimmungen durchgeführt.

Abbildung 16 Das Prinzip des Sandwich-ELISAs



Der Sandwich-Elisa ist ein immunologisches Nachweisverfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen in einer Lösung. 1. Zunächst wird ein Antikörper gegen das nachzuweisende Antigen auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert. 2. und 3. Nachdem mögliche freie unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden, wird das Antigen aufgetragen. 4. Im nächsten Schritt wird ein zweiter, biotinylierter Antikörper, der ebenfalls gegen das Antigen gerichtet ist, hinzugegeben. 5. Das Biotin geht eine hochaffine Bindung mit der nachfolgend aufgetragenen Streptavidin-Peroxidase ein. 6. Wird TMB, das Substrat der Peroxidase, hinzugegeben, wird es enzymatisch umgesetzt und es kommt zu einem blauen Farbumschlag. Dieser kann photometrisch gemessen werden und ist proportional zu der Konzentration des Antigens in der Lösung ist.

3.4 Statistische Analyse

Zur Speicherung aller klinischer Informationen und der experimentell gewonnenen Genotypisierungsdaten wurde eine Datenbank in SPSS erstellt. Hierfür wurde eine Tabelle angelegt, in die die Tumordatenbank der Robert-Rössle-Klinik importiert wurde. Für die Genotypisierungsdaten und Verlaufsdaten sowie für die UICC-Klassifikation wurden weitere Attribute angelegt und Inhalte errechnet. Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS (SPSS GmbH Software, München, Deutschland; Version 17.0 für Windows). Kategorische Variablen wurden im Hinblick auf Unterschiede in der Verteilung mithilfe des Chi-Quadrat (χ^2)-Tests (Chernoff, 1954) untersucht. Betrug die erwartete Häufigkeit einer Variable weniger als fünf, wurde der zweiseitige exakte

Test nach Fisher (Fisher, 1922) angewandt. Als Assoziationsmaß wurde die Odds Ratio (OR) mithilfe der Mantel und Haenzel Statistik ermittelt. Bei numerischen Daten, die eine Normalverteilung aufwiesen, wurden der Mittelwert sowie die Standardabweichung berechnet. In diesem Fall wurden die Mittelwerte mit dem T-Test verglichen. Lag keine Normalverteilung vor, wurden der Median und der Interquartilabstand (IQR) angegeben. Um Unterschiede festzustellen, wurde hier der nicht-parametrische Mann-Whitney U-Test (Wilcoxon, 1945; Mann 1947) eingesetzt. Das Überleben in Abhängigkeit des Genotyps wurde in einer Kaplan-Meier Kurve (Kaplan, 1958) dargestellt und mit dem Log Rank Test (Mantel, 1966) auf eine signifikante Assoziation hin überprüft. Für alle statistischen Berechnungen wurde ein P-Wert < 0.05 als statistisch signifikant angenommen. Die graphische Darstellung der Überlebenskurven und der Ergebnisse der Zellstimulationsexperimente wurde mithilfe der GraphPad Prism® Software Version 4 für Windows (GraphPad Software, Inc., La Jolla, USA) erstellt.

4 Ergebnisse

4.1 Die Genotypisierungsstudie

4.1.1 Die Verteilung der Genotypen des SNP rs2075820

Die Allelfrequenz und die Genotypenfrequenz der Patienten unterschieden sich nicht von denen gesunder Kontrollpersonen. Die untersuchte Kohorte bestand aus 269 Magenkarzinompatienten, von denen 54 % den G/G-, 38 % den G/A- und 8 % den A/A-Genotyp aufwiesen. Die Genotypenverteilung war im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht (Chi-Quadrat-Test $\chi^2 = 0.29$; $p = 0.5908$) und ergab eine Allelfrequenz von 0.267 für das A-Allel. In der gesunden Kontrollgruppe wurden vergleichbare Allel- und Genotypenfrequenzen beobachtet (G/G: 59 %, G/A: 33 %, A/A: 8 %, Allelfrequenz des A-Allels: 0.244). Auch hier entsprach die Verteilung der Allele dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht. In der Tabelle 22 sind die Häufigkeiten der Genotypen zusammengefasst dargestellt.

Tabelle 22 Verteilung der NOD1-Genotypen

Genotyp	Gesunde Kontrollen		Patienten		p-Wert ¹
	n	%	n	%	
G/G	111	59	146	54	0.3120
G/A	62	33	102	38	0.2786
A/A	15	8	21	8	0.9464
Summe	188	100	269	100	-

¹ χ^2 -Test; Vierfelder-Tafel

4.1.2 Der SNP rs2075820 und das Tumorstadium

Bei Patienten mit dem A/A-Genotyp wurde das Magenkarzinom signifikant früher diagnostiziert als beim A/G- und beim G/G-Genotyp. 48 % der insgesamt 21 Träger des A/A-Genotyps wurden im UICC-Stadium I diagnostiziert. Bei dem G/G- und G/A-Genotyp hingegen wurde der Tumor jeweils in nur etwa 25 % der Fälle bereits in Stadium I entdeckt. Dieser Unterschied war

statistisch signifikant ($p = 0.028$; Chi-Quadrat-Test; OR = 2.670, CI [1.082 – 6.585]). Die Frequenz des A/A-Genotyps lag folglich im UICC-Stadium I mit 14 % auch über der Frequenz im gesunden Kontrollkollektiv (8 %). In den fortgeschritteneren Tumorstadien lag seine Frequenz etwas unterhalb der im Kontrollkollektiv beobachteten Häufigkeit (jeweils 5 % in Stadium II und IV und 7 % im Stadium III). Diese Werte waren jedoch nicht statistisch signifikant. 42 % ($n=61$) der Patienten mit dem G/G-Genotyp und 45 % ($n = 46$) der Träger des G/A-Genotyps wurden erst im Stadium IV diagnostiziert, bei dem A/A-Genotyp waren es nur 29 % ($n = 6$; Chi-Quadrat-Test $p > 0.05$). Eine detaillierte Darstellung der Genotypenfrequenzen innerhalb der UICC-Tumorstadien ist in Tabelle 23, Tabelle 24, Tabelle 25 und in der Abbildung 17 dargestellt.

Tabelle 23 Verteilung der NOD1-Genotypen innerhalb der Tumorstadien

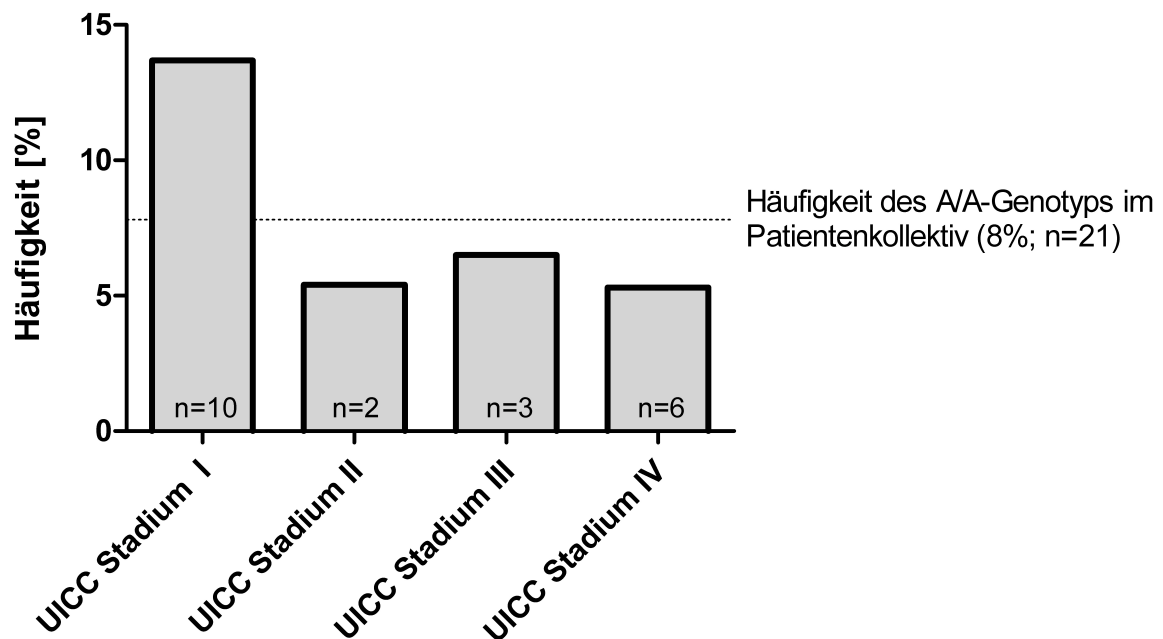
Genotyp	UICC-Stadium								Gesunde Kontrollen	
	I		II		III		IV		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%		
G/G	37	51	24	65	24	52	61	54	111	59
A/G	26	36	11	30	19	41	46	41	62	33
A/A	10	14	2	5	3	7	6	5	15	6
Summe	73		37		46		113		188	

Tabelle 24 Verteilung der NOD1-Genotypen im UICC-Stadium I

Genotyp	UICC-Stadium I	UICC-Stadium > I
A/A	10 ¹ (48 %)	11 (52 %)
A/G	26 (25 %)	76 (75 %)
G/G	37 (25 %)	109 (75 %)

¹ $p = 0.028$, χ^2 -Test, Vierfeldertafel; OR = 2.670, CI [1.082 – 6.585]

Abbildung 17 Verteilung des A/A-Genotyps innerhalb der UICC-Stadien



Die Frequenz des A/A-Genotyps war im UICC-Stadium höher als im gesunden Kontrollkollektiv (14 vs. 8 %). In den fortgeschritteneren Tumorstadien lag seine Frequenz etwas unterhalb der im Kontrollkollektiv beobachteten Häufigkeit (jeweils 5 % in Stadium II und IV und 7 % im Stadium III)

Tabelle 25 Verteilung der NOD1-Genotypen im UICC-Stadium IV

Genotyp	UICC-Stadium IV	UICC-Stadium < IV
AA	6 ¹ (29 %)	15 (71 %)
A/G	46 (45 %)	56 (55 %)
G/G	61 (42 %)	85 (58 %)

¹ns; $p = 0.194$, χ^2 -Test, Vierfeldertafel; OR = 0.527, CI [0.198 – 1.404]

Der A/A-Genotyp wies seltener Fernmetastasen bei Erstdiagnose auf, er wurde häufiger mit primär kurativer Intention behandelt. Insgesamt wiesen 93 Patienten (34 %) bei der Erstdiagnose Fernmetastasen auf. Unter diesen Patienten waren 5 Individuen mit dem A/A-Genotyp (dies entspricht 24 % aller Patienten mit diesem Genotyp), 40 heterozygote Allelträger (39 % aller Patienten mit dem G/A-Genotyp) und 48 homozygote Träger des Referenzallels (33 % aller Patienten mit dem G/G-Genotyp). Folglich konnten Patienten mit dem A/A-Genotyp in 76 % der

Fälle mit kurativer Intention operiert werden, Träger des Referenzallels oder nur einer Kopie des A-Allels nur in 66 % bzw. 63 % der Fälle ($p > 0.05$; siehe Tabelle 26).

Tabelle 26 Primäre Intention der Operation

Genotyp	kurativ	palliativ	p-Wert ¹
A/A	16 (76 %)	5 (24 %)	0.2801
A/G	64 (63 %)	38 (37 %)	0.4697
G/G	96 (66 %)	50 (34 %)	0.9025
Summe	176	93	-

¹ χ^2 -Test, Vierfeldertafel

4.1.3 Der SNP rs2075820 und histopathologische Tumormerkmale

Die Genotypen unterschieden sich nicht hinsichtlich der Lymphgefäßinvasion. In dem Patientenkollektiv wurde zwischen den Genotypen kein Unterschied in der Lymphgefäßinvasion beobachtet: 58 % der Patienten mit dem A/A-Genotyp, 51 % der heterozygoten Polymorphismusträger und 54 % der Träger des G/G-Genotyps wiesen eine Lymphgefäßinvasion auf ($p > 0.05$; siehe Tabelle 27).

Tabelle 27 Lymphgefäßinvasion

Genotyp	Lymphgefäßinvasion	Keine Lymphgefäßinvasion	p-Wert ¹
A/A	11 (58 %)	8 (42 %)	0.6850
A/G	43 (51 %)	41 (49 %)	0.6034
G/G	70 (54 %)	59 (46 %)	0.7805

¹ χ^2 -Test, Vierfeldertafel. Fehlende Klassifikation: n = 37

Die Patienten mit dem A/A-Genotyp wiesen seltener eine Veneninvasion auf. Im histologischen Präparat wies der A/A-Genotyp in nur 17 % der Fälle eine Veneninvasion auf (n = 3), heterozygote Allelträger in 29 % (n = 23) und der G/G-Genotyp in 32 % (n = 40). Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ($p > 0.05$; siehe Tabelle 28).

Tabelle 28 **Veneninvasion**

Genotyp	Veneninvasion	Keine Invasion	p-Wert¹
A/A	3 (17 %)	15 (83 %)	0.2142
A/G	23 (29 %)	57 (71 %)	0.8612
G/G	40 (32 %)	86 (68 %)	0.3956

¹ χ^2 -Test, Vierfeldertafel. Fehlende Klassifikation: n = 45

Die Genotypen unterschieden sich nicht hinsichtlich des Differenzierungsgrades des Magenkarzinoms. In Tabelle 29 ist der Differenzierungsgrad in Abhängigkeit des Genotyps dargestellt. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund der kleinen Subgruppen nicht vorgenommen. Die Tumorzellen waren bei 90 % der Patienten mit dem A/A-Genotyp schlecht differenziert, auch bei etwa 80 % der heterozygoten Polymorphismusträger und Patienten mit dem G/G-Genotyp war der Tumor nur schlecht differenziert oder undifferenziert.

Tabelle 29 **Differenzierungsgrad des Tumors**

Genotyp	UICC Differenzierungsgrad (Grading)				Fehlendes Grading
	G1	G2	G3	G4	
A/A	0 (0)	2 (10)	19 (90)	0 (0)	0 (0)
A/G	2 (2)	14 (15)	74 (78)	5 (5)	7 (7)
G/G	4 (3)	27 (19)	107 (75)	4 (3)	4 (3)

Bei den Patienten mit dem A/A-Genotyp, die mit kurativer Intention operiert wurden, konnte in 100 % der Fälle eine Entfernung im Gesunden erfolgen. Bei Trägern des Referenzallels oder nur einer Kopie des A-Allels (G/G bzw. G/A) gelang nur in jeweils 91 % der Fälle eine Resektion *in sano* (n = 87 bzw. 58; p > 0.05). In Tabelle 30 ist die R-Klassifikation in Abhängigkeit des Genotyps dargestellt.

Tabelle 30 Lokaler Residualtumor bei kurativer Operation

Genotyp	Lokaler Residualtumor (R-Klassifikation)		
	R0	R1	R2
A/A	16 (100) ¹	0 (0)	0 (0)
A/G	58 (91)	4 (6)	2 (3)
G/G	87 (91)	7 (7)	2 (2)

¹ p = 0.2003; χ^2 -Test, Vierfelder-Tafel

Die Genotypen unterschieden sich nicht hinsichtlich des Wachstumsmusters des Tumors. Ein Großteil aller Tumoren wurde mithilfe der Laurén-Klassifikation als diffuser Typ bzw. Mischtyp eingestuft (siehe Tabelle 31). 22 % des A/A-Genotyps und jeweils 33 % des G/A- und G/G-Genotyps wiesen ein intestinales Wachstumsmuster auf.

Tabelle 31 Histopathologische Tumormerkmale

Genotyp	A/A	A/G bzw. G/G	p-Wert ¹
Gesamtanzahl der Patienten	21	248	-
Laurén-Klassifikation erfolgt (% von Gesamtanzahl)	18 (86)	208 (84)	0.8248
Auf Siegelringzellen untersucht (% von Gesamtanzahl)	17 (81)	196 (79)	0.8351
Laurén-Klassifikation (Gültige Prozente; %)	Intestinal	4 (22)	69 (33)
	Diffus	10 (56)	118 (57)
	Mischtyp	4 (22)	21 (10)
Siegelringzellen (Gültige Prozente; %)	nachweisbar	14 (82)	119 (61)
	nicht nachweisbar	3 (18)	77 (39)

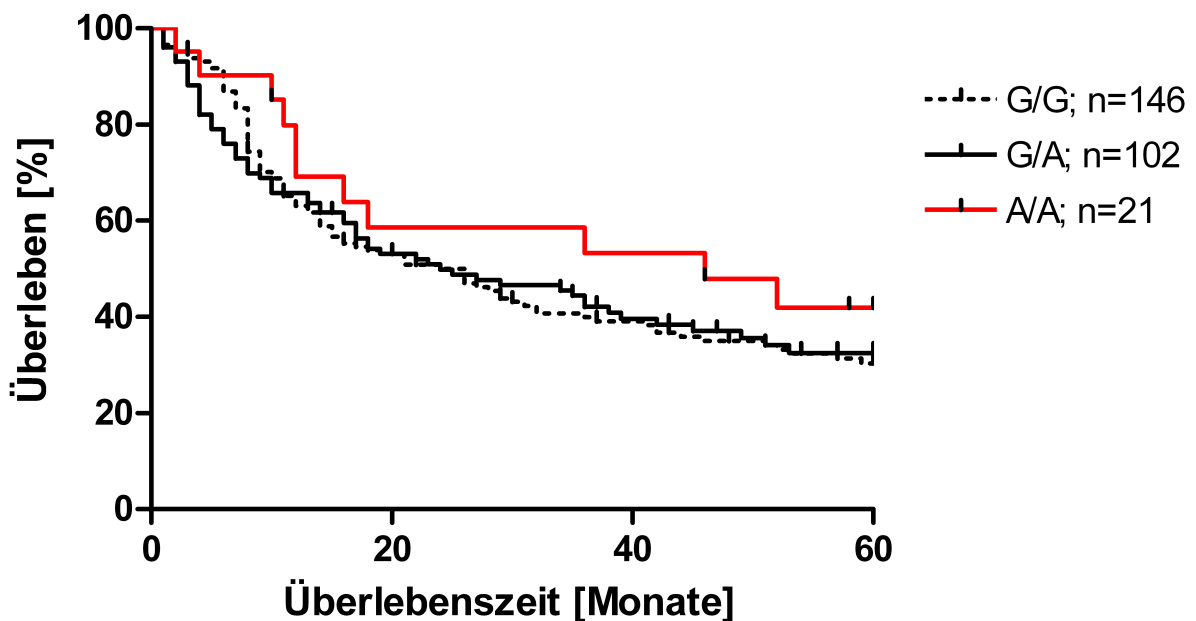
¹ χ^2 -Test, Vierfeldertafel

Siegelringzellen wurden häufiger bei Patienten mit dem A/A-Genotyp nachgewiesen. Bei Patienten mit dem A/A-Genotyp waren in 14 von 17 Fällen (82 %) Siegelringzellen nachweisbar, bei heterozygoten Allelträgern in 50 von 78 Fällen (64 %) und beim G/G-Genotyp nur in 69 von 118 Fällen (58 %) nachweisbar (p = 0.08; Chi-Quadrat-Test, siehe auch Tabelle 31).

4.1.4 Der SNP rs2075820 und der Verlauf des Magenkarzinoms

Patienten mit dem A/A-Genotyp haben eine längere mediane Überlebenszeit. Patienten mit dem A/A-Genotyp wiesen ein längeres medianes Überleben (46.4 Monate versus 25.0 Monate) auf als Träger des Referenzallels (G/G-Genotyp) und Patienten mit einem heterozygoten Genotyp (G/A-Genotyp). Diese Beobachtung war jedoch statistisch nicht signifikant (Mantel-Haenszel-Test/*logrank test*; $p=0.27$). Der G/A-Genotyp und der G/G-Genotyp unterschieden sich nicht hinsichtlich der Überlebensdauer. Die Überlebensanalyse innerhalb der UICC-Stadien wurde nicht durchgeführt, da diese Untergruppen zu klein für eine aussagekräftige statistische Beurteilung waren. Eine Kaplan-Meier-Überlebenskurve in Abhängigkeit des Genotyps ist in Abbildung 18 zu sehen.

Abbildung 18 5-Jahres-Überlebenskurve für die unterschiedlichen Genotypen



Patienten mit dem A/A-Genotyp (rote Kurve) wiesen ein längeres medianes Überleben (46.4 Monate versus 25.0 Monate) auf als Träger des Referenzallels (G/G-Genotyp; schwarze gestrichelte Kurve) und Patienten mit einem heterozygoten Genotyp (G/A-Genotyp; schwarze durchgezogene Kurve). Mantel-Haenszel Test/ *logrank test*: $p>0,05$

4.2 Überexpression von beiden *NOD1*-Varianten in HEK293-Zellen

4.2.1 Ergebnis der Mutagenese

Die erfolgreiche Mutagenese mit dem gewünschten Basenaustausch an Position 796 der kodierenden Sequenz konnte mittels Restriktionsenzymverdau und real-time-PCR bestätigt werden. Erst nach den Überexpressionsversuchen wurde eine komplette Sequenzierung beider Vektoren durchgeführt, um mögliche Abweichungen von der Referenzsequenz auszuschließen. Hierbei zeigte sich allerdings, dass bereits der *NOD1*-Referenz Vektor, welcher in der Mutagenese eingesetzt wurde, um den *NOD1-G796A* Vektor herzustellen, an Position 1733 der kodierenden Sequenz eine Base enthält, die von der Referenzsequenz abweicht (T->C). An dieser Position ist kein natürlich vorkommender Polymorphismus bekannt¹. Der Basenaustausch führt zu einem Aminosäureaustausch, das resultierende Protein weist an Position 578 die Aminosäure Prolin anstatt Leucin auf. Auch bei dem *NOD1-G796A* Vektor wurde mittels Sequenzierung neben dem gewünschten Basenaustausch an Position 796 diese Abweichung festgestellt. Die aberrante Aminosäure liegt außerhalb der bekannten funktionellen Domänen des Rezeptors. In dem webbasierten Programm MutationTaster (Schwarz, 2010), welches das Krankheitspotential von Mutationen errechnet, wird der Basenaustausch als Polymorphismus mit einem niedrigen Krankheitspotential eingestuft (Abfrage am 18.02.2012; siehe Abb. 19). Die Wahrscheinlichkeit einer richtigen Vorhersage liegt bei diesem Programm in etwa bei 90%. Auch SIFT und PolyPhen-2, zwei weitere gängige Vorhersageprogramme, stufen die Wahrscheinlichkeit, dass der Basenaustausch eine Auswirkung auf die Proteinfunktion hat, als gering ein (Kumar, 2009; Adzhubei, 2012; Abfrage am 18.02.2012). Der ungewünschte Basenaustausch wird derzeit auch *in vitro* auf seine Funktionalität hin untersucht.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/> Stand: 04.08.2010

Abbildung 19 Analyse des Basenaustauschs im Vorhersageprogramm MutationTaster



[documentation](#)

mutation t@sting

Prediction

polymorphism Model: *simple_aae_p* (probability: 0.98389480113956) [\(explain\)](#)

Summary

- amino acid sequence changed
- protein features (might be) affected
- splice site changes

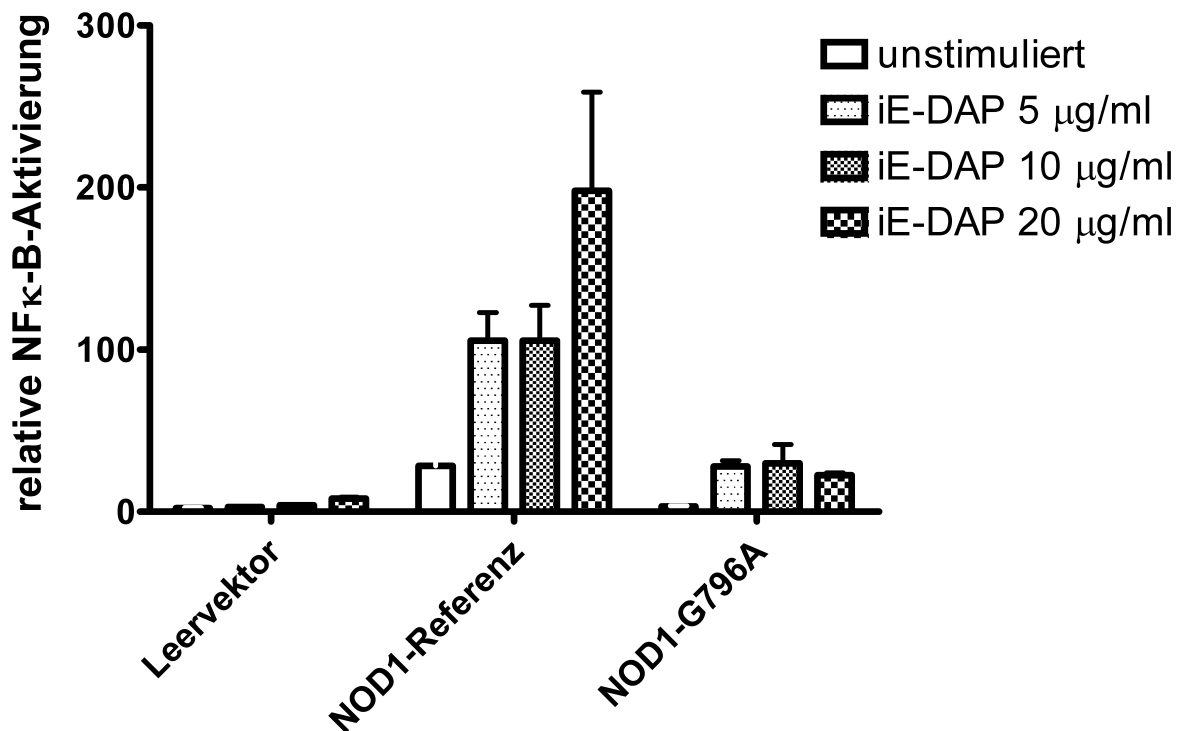
analysed issue	analysis result
name of alteration	no title
HGNC symbol	NOD1
Ensembl transcript ID	ENST00000222623
UniProt peptide	Q9Y239
alteration type	single base exchange
alteration region	CDS
alteration on nucleotide level	T>C
coding sequence (CDS) position	1733
AA changes	L578P Score: 2.67 (explain score(s))
frameshift	no
SNPs	no SNPs in altered region found
splice sites	effect gDNA position score sequence Donor increased 27102 wt: 0.70 / mu: 0.95 GACCTCTCAAGAAC / CCTCttca
stop codon consensus sequence altered?	N/A
conservation	species match gene aa alignment
protein level for non-synonymous changes	Human 578 C L Q G S G P A R E D L F K N K D H F Q F T N L
	mutated not conserved 578 C L Q G S G P A R E D P F K N K D H F Q F T N
	Chimp all identical ENSPTRG00000019040 578 C L Q G S G P A R E D P F K N K D H F Q F T N
	Rhesus all identical ENSMUUG00000012547 578 C L R G S S P S R E D P F K N K D H F Q F T N
	Cat all identical ENSFCAg00000012184 578 C L R G P G L A G E D P F K N K D H F Q F T N
	Mouse not conserved ENSMUSg000000038058 578 C L G G R S R L G P D P F R N K D H F Q F T N
	Chicken not conserved ENSgALg000000011535 582 P L T G - - - - E D P F R N N E H F H F T N
	Xenopus no homologue
	Zebrafish not conserved ENSdARG000000036308 560 C L K N T K P R E S D A F Q T - - N F Q F T N
	Fugu not conserved ENSTRUG000000014043 566 C C I Q D S S K V I T K A S S A N E H L Q F T N
	Elegans no homologue
	Drosophila no homologue
variants	N/A
protein features	start (aa) end (aa) feature details
	632 656 REPEAT LRR 1. might get lost (downstream of altered splice site)
	702 725 REPEAT LRR 2. might get lost (downstream of altered splice site)
	727 750 REPEAT LRR 3. might get lost (downstream of altered splice site)
	755 778 REPEAT LRR 4. might get lost (downstream of altered splice site)
	783 806 REPEAT LRR 5. might get lost (downstream of altered splice site)
	839 862 REPEAT LRR 6. might get lost (downstream of altered splice site)
	867 891 REPEAT LRR 7. might get lost (downstream of altered splice site)
	895 918 REPEAT LRR 8. might get lost (downstream of altered splice site)
	923 946 REPEAT LRR 9. might get lost (downstream of altered splice site)
length of protein	Protein of normal length (unless alteration is in UTR...)
AA sequence altered	yes
position(s) of altered AA	N/A
AAK alteration in CDS	
position of stopcodon in wt / mu CDS	2862 / 2862
position (AA) of stopcodon in wt / mu AA sequence	954 / 954
poly(A) signal	N/A
conservation	species match gene aa alignment
nucleotide level for all changes - no scoring up to now	Human 27101 G C G G G A A G A C C T C T T C A A G A A C A A
	mutated not conserved 27101 g c g g g a a g a c c c c t t c a a g a a c a
	Chimp all identical ENSPTRG00000019040 29468 g c g g g a a g a c c c c t t c a a g a a c a
	Rhesus all identical ENSMUUG00000012547 29382 a c g g g a a g a c c c c t t c a a g a a c a
	Cat all identical ENSFCAg00000012184 8469 c g g g g a g g a c c c c t t c a a g a a c a
	Mouse no alignment ENSMUSg000000038058 n/a
	Chicken no alignment ENSgALg000000011535 n/a
	Xenopus no alignment ENSXFTG000000022012 n/a
	Zebrafish no alignment ENSdARG000000036308 n/a
	Fugu no alignment ENSTRUG000000014043 n/a
	Elegans no homologue
	Drosophila no homologue

Die Abbildung zeigt einen Screenshot des web-basierten Vorhersageprogramms MutationTaster. Zu sehen ist das Ergebnis der Analyse des Basenaustausches T>C an Position 1733 im *NOD1*-Gen; Stand: 18.02.2012.

4.2.2 Ergebnis des Überexpressionsversuchs

Der Überexpressionsversuch in HEK293-Zellen zeigt, dass das A-Allel mit dem Basenaustausch G796A zu einem Funktionsverlust des NOD1-Rezeptors führt. Die ligandenvermittelte Aktivierbarkeit mit konsekutiver Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B ist stark vermindert (siehe Abbildung 20).

Abbildung 20 Liganden-abhängige NF κ -B-Aktivierung in HEK293-Zellen



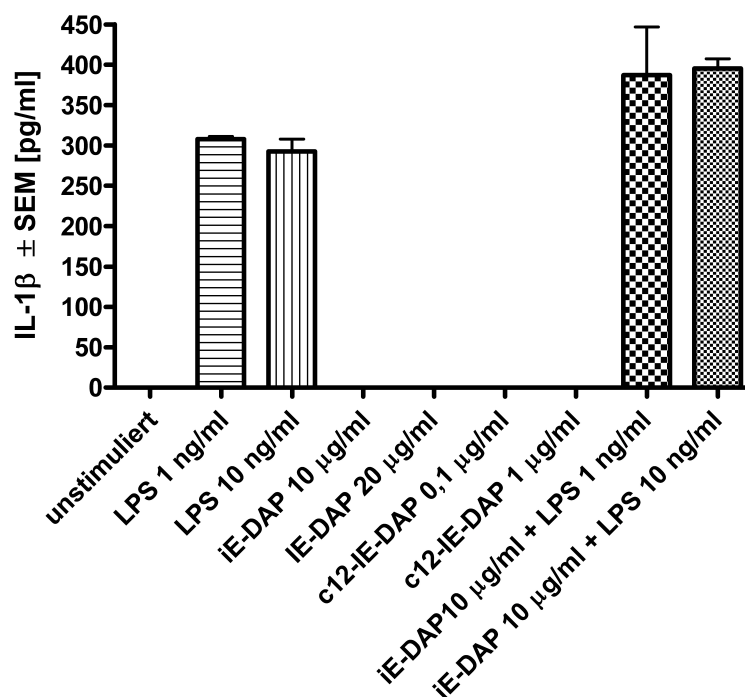
Im Überexpressionsversuch wurden HEK293-Zellen transient mit einem pcDNA3.1-Vektor transfiziert. Dieser enthielt entweder die Referenz-cDNA des NOD1-Rezeptors (NOD1-Referenz), oder das A-Allel des SNP rs2075820 mit dem Basenaustausch G798A (NOD1-G796A). Als Kontrolle wurden zudem Zellen mit einem leeren pcDNA3.1-Vektor transfiziert (Leervektor). Es folgt eine Stimulation der Zellen mit dem NOD1-Liganden iE-DAP. Zellen mit Überexpression des A-Allels wiesen im Vergleich zur Referenz-cDNA eine deutlich verminderte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch iE-DAP auf. Die Abbildung ist repräsentativ für drei unabhängig voneinander durchgeführte Versuche. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM von Dreifachbestimmungen.

4.3 Stimulation humaner Monozyten

Zunächst wurde an Monozyten des G/G-Genotyps die für die Stimulation notwendige iE-DAP Konzentration ermittelt (siehe Abbildung 21). Eine alleinige Stimulation mit iE-DAP führte zu keiner messbaren IL-1 β -Ausschüttung. Eine alleinige Stimulation mit dem synthetischen NOD1-

Liganden c12-iE-DAP, der zusätzlich zu dem iE-DAP einen c12-Fettsäurerest enthält, um eine bessere Membrangängigkeit des Liganden zu erzielen, führte ebenfalls zu keiner messbaren IL-1 β -Zytokinantwort. Eine im selbigen Experiment durchgeführte Kontroll-Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS war erfolgreich. Eine kombinierte Stimulation mit LPS und iE-DAP führte zu einem synergistischen Effekt mit einer gesteigerten IL-1 β -Ausschüttung im Vergleich zur isolierten Stimulation mit LPS.

Abbildung 21 Stimulation von humanen Monozyten mit NOD1- und TLR4-Liganden

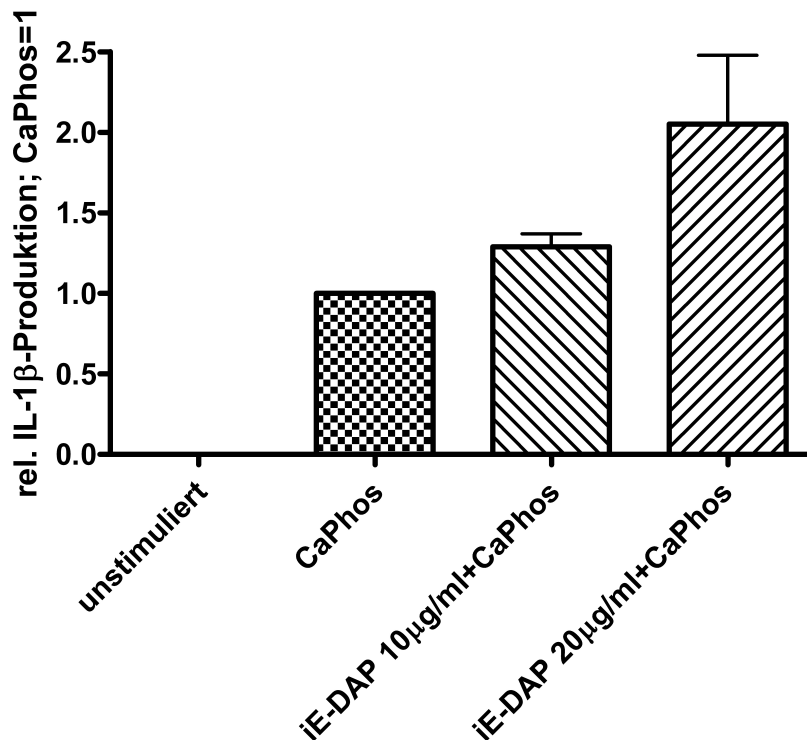


Die IL-1 β -Zytokinantwort 18 h nach Stimulation von humanen Monozyten mit NOD1- und TLR4-Liganden. Humane Monozyten wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen von LPS, iE-DAP, c-12iE-DAP sowie einer Kombination von iE-DAP und LPS stimuliert. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus Dreifachbestimmungen.

Um eine messbare IL-1 β -Ausschüttung durch isolierte Stimulation mit iE-DAP zu erzielen, wurde in einem zweiten Experiment zusätzlich zu dem iE-DAP das Transfektionsreagenz Calciumphosphat eingesetzt, welches die Aufnahme des Liganden in die Zellen erleichtern sollte. Hierbei zeigte sich eine IL-1 β -Ausschüttung durch iE-DAP. Eine alleinige Hinzugabe von Calciumphosphat zu den Monozyten führte ebenfalls zu einer Ausschüttung von IL-1 β (Abbildung 22). Im

Folgendes wurde die IL-1 β -Ausschüttung deshalb auf die Calciumphosphat-Grundstimulation normiert (Calciumphosphat-abhängige IL-1 β -Ausschüttung = 1).

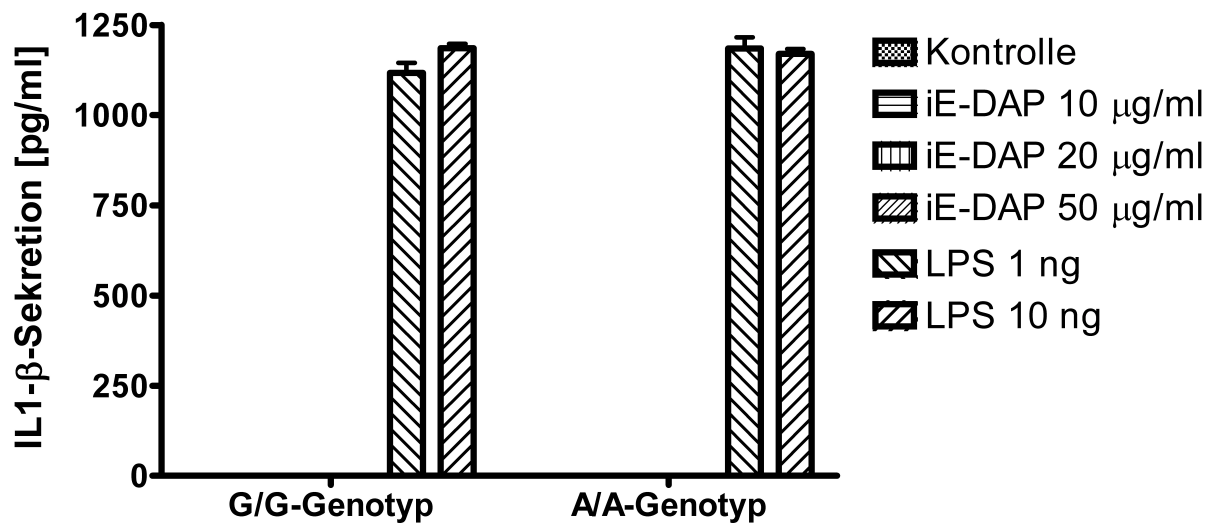
Abbildung 22 Stimulation von humanen Monozyten mit iE-DAP und Calciumphosphat



Die IL-1 β -Zytokinantwort humaner Monozyten 18h nach Stimulation mit iE-DAP unter Hinzugabe von Calciumphosphat. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus Dreifachbestimmungen.

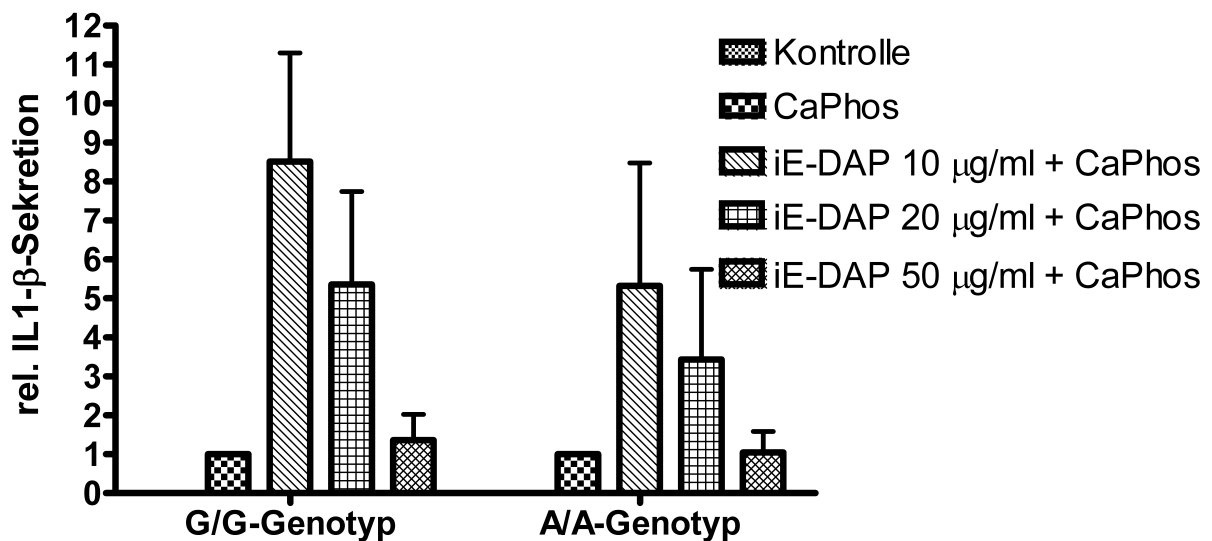
Im nächsten Versuch wurden die Monozyten zweier gesunder Probanden, einer Träger des A/A-Genotyps, der andere Träger des G/G-Genotyps, parallel stimuliert. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 23 und 24 zu sehen. Wie bereits in den Vorversuchen zu diesem Experiment führte eine Stimulation mit iE-DAP ohne Zusatz eines Transfektionsreagenzes zu keiner messbaren IL-1 β -Ausschüttung. Eine Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS bewirkte bei beiden Genotypen eine gleich starke IL-1 β -Ausschüttung (Abbildung 23). Bei Zusatz von Calciumphosphat zu dem Stimulationsansatz konnte eine iE-DAP-abhängige IL-1 β -Ausschüttung beobachtet werden. Monozyten mit dem A/A-Genotyp zeigten im Gegensatz zu dem G/G-Genotyp eine abgeschwächte relative IL-1 β -Ausschüttung nach Stimulation mit iE-DAP (Abbildung 24).

Abbildung 23 iE-DAP-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung von humanen Monozyten ohne Transfektionsreagenz



Die IL-1 β -Zytokinantwort von Monozyten mit dem G/G-Genotyp und dem A/A-Genotyp 18h nach Stimulation mit iE-DAP ohne Hinzugabe eines Transfektionsreagenzes. Als Kontrolle wurde mit LPS stimuliert. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus Dreifachbestimmungen. In den leeren Spalten wurde kein Signal gemessen.

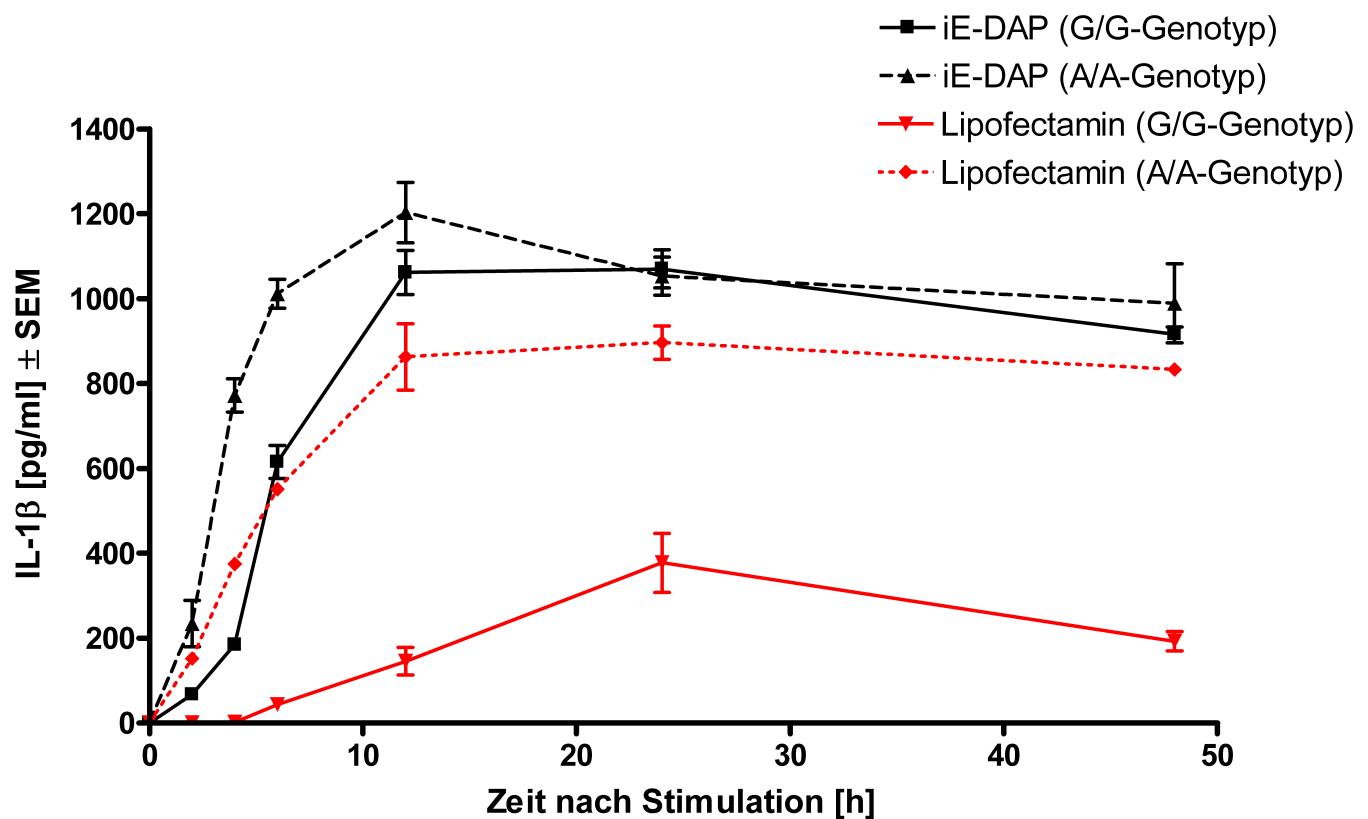
Abbildung 24 iE-DAP-vermittelte IL-1 β -Ausschüttung von Monozyten unter Hinzugabe von Calciumphosphat



Die IL-1 β -Zytokinantwort von Monozyten mit dem G/G-Genotyp und dem A/A-Genotyp 18h nach Stimulation mit iE-DAP unter Hinzugabe von Calciumphosphat. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus Dreifachbestimmungen und sind auf die Grundstimulation durch Calciumphosphat normiert (Calciumphosphat-abhängige IL-1 β -Ausschüttung = 1).

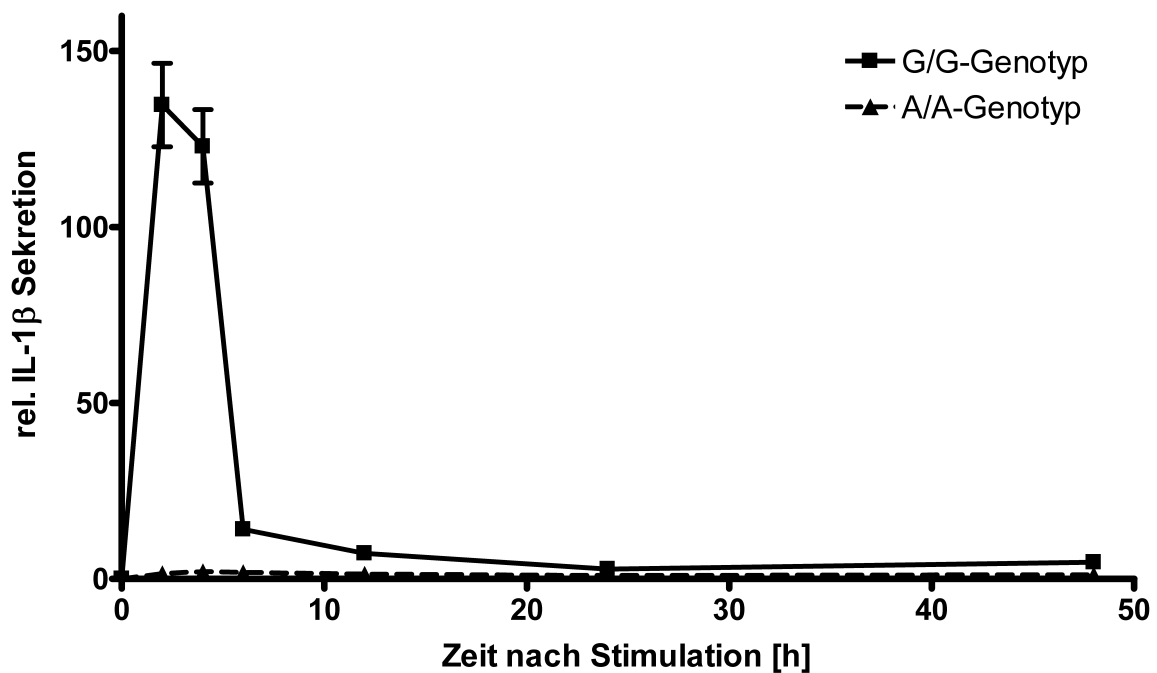
Bei zwei weiteren, jeweils für A bzw. G homozygoten Probanden, wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamin eingesetzt und eine Kinetik der IL-1 β -Zytokinantwort erstellt. Ebenso wie Calciumphosphat führte Lipofectamin zu einer hohen Grundstimulation der Monozyten, sodass die gemessene IL-1 β -Ausschüttung auf die Grundstimulation durch Lipofectamin normiert wurde (Lipofectamin-abhängige IL-1 β -Ausschüttung = 1). Auch in diesem Experiment war die relative IL-1 β -Ausschüttung bei Monozyten mit dem A/A-Genotyp vermindert. In Abbildung 25 sind die absoluten Werte, in Abbildung 26 die auf Lipofectamin normierten Werte zu sehen.

Abbildung 25 Zeitlicher Verlauf der IL-1 β -Zytokinantwort (Absolutwerte)



Die Kinetik der IL-1 β -Zytokinantwort von Monozyten mit dem G/G-Genotyp und dem A/A-Genotyp nach Stimulation mit 10 μ g/ml iE-DAP unter Hinzugabe von Lipofectamin. Angegeben ist die absolute IL-1 β -Konzentration. Die Grundstimulation durch Lipofectamin ist für beide Genotypen dargestellt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus Dreifachbestimmungen.

Abbildung 26 Zeitlicher Verlauf der IL-1 β -Zytokinantwort (normierte Werte)



Die Kinetik der IL-1 β -Zytokinantwort von Monozyten mit dem G/G-Genotyp und dem A/A-Genotyp nach Stimulation mit 10 μ g/ml iE-DAP unter Hinzugabe von Lipofectamin. Die Daten entsprechen den Mittelwerten \pm SEM aus Dreifachbestimmungen und sind auf die Grundstimulation durch Lipofectamin normiert (Lipofectamin-abhängige IL-1 β -Ausschüttung = 1).

Zusammengefasst zeigen Monozyten bei isolierter Stimulation mit dem NOD1-Liganden iE-DAP keine messbare IL-1 β -Ausschüttung. Erst die Hinzugabe eines Transfektionsreagenzes führte zu einer messbaren Aktivierung von NOD1 durch iE-DAP. Die Transfektionsreagenzien führen zu einer starken Grundstimulation der Zellen, sodass die Ergebnisse auf die Grundstimulation normiert wurden. In der Monozytenstimulation bedingte der A/A-Genotyp eine verminderte Aktivierbarkeit des NOD1-Rezeptors durch iE-DAP mit im Vergleich zu dem G/G-Genotyp abgeschwächter IL-1 β -Ausschüttung.

5 Diskussion

5.1 Zusammenhang zwischen Magenkarzinom und rs2075820-Genotyp

In unserer Genotypisierungsstudie konnte kein Zusammenhang zwischen dem rs2075820-Genotyp und dem Auftreten des Magenkarzinoms gezeigt werden. Dieses kann zum Einen daran liegen, dass das A-Allel mit einer Allelfrequenz von 0.244 in Europa zu selten ist, um in einem Kollektiv von 269 Patienten eine Assoziation zu detektieren. Dies träfe vor allem dann zu, wenn nur der homozygote A/A-Genotyp, der in der europäischen Normalbevölkerung mit einer Frequenz von 8% auftritt, mit dem Magenkarzinom assoziiert wäre. Zum Anderen besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass der rs2075820-Genotyp gar keinen oder nur einen schwachen Risikofaktor für das Magenkarzinom darstellt. Die Relevanz der angeborenen Immunantwort bei der Entstehung des Magenkarzinoms ist nicht eindeutig belegt; es ist also durchaus denkbar, dass die untersuchten Gene das Krebsrisiko überhaupt nicht beeinflussen. Vorangegangene epidemiologische Studien konnten bisher ebenfalls keine sichere Assoziation von Polymorphismen in Genen der angeborenen Immunantwort und dem Magenkarzinom nachweisen (Kamangar, 2006 Wang 2010). Es ist daher zu vermuten, dass die Genotypen einzelner Polymorphismen höchstens in sehr geringem Maße zum Krebsrisiko beitragen und somit nur durch eine wesentlich größere Probandenzahl als Risikofaktor bestätigt werden könnten. Dies ließe sich auch dadurch erklären, dass ein hohes Krankheitspotential dieses Basenaustausches zu einem Selektionsnachteil und somit zu einer Abreicherung des betroffenen Allels in der Bevölkerung führt. Auch wenn das Magenkarzinom in allen hier untersuchten Probanden erst deutlich nach der Geschlechtsreife auftrat, dürfte ein sehr hohes Krebsrisiko im Alter mit einem zumindest deutlich erhöhten Risiko in der reproduktiven Phase einhergehen. Alle bisher bekannten, keimbahnkodierten genetischen Risikofaktoren für Krebserkrankungen weisen aufgrund ihres hohen Krankheitspotentials ein junges Erkrankungsalter und eine deutlich seltenere Allelfrequenz in der Bevölkerung auf. Ein Beispiel ist die familiäre adenomatöse Polyposis, die eine Keimbahnmutation des APC-Gens zur Ursache hat und nur mit einer Häufigkeit von 1:5.000 bis 1:10.000 auftritt. Das Risiko von Mu-

tationsträgern, an Darmkrebs zu erkranken, liegt hier bei nahezu 100%, das mittlere Erkrankungsalter beträgt 39 Jahre (Jaspersen, 1998). Die meisten genetischen Mutationen, welche bei Krebserkrankungen nachgewiesen werden, sind nicht keimbahnkodiert sondern somatische Mutationen im betroffenen Gewebe. So sind auch beim Magenkarzinom eine Reihe von somatischen Mutationen bekannt (*tpr-met*, *K-ras*, *p53*, *DCC*-Verlust, *C-erb-2*), die über die bekannten Krebsvorstufen bis zum invasiven Karzinom führen (Correa P, 1994). Es ist davon auszugehen, dass bei der Karzinogenese diese bereits bekannten Mutationen die entscheidende Rolle spielen und dass der rs2075820-Genotyp hier keine ausschlaggebende Rolle spielt.

Wie bereits beschrieben, werden etwa 75 % aller Magenkarzinome auf eine chronische Infektion mit *H. pylori* zurückgeführt (Herrera, 2009). Vor dem Hintergrund einer chronischen bakteriellen Infektion könnten Polymorphismen in der angeborenen Immunantwort bei der Karzinogenese an Bedeutung gewinnen. Eine Assoziation des rs2075820-Genotyps mit dem Magenkarzinom bei *H. pylori*-positiven Patienten ist denkbar. Bei Kenntnis der *H. pylori*-Serologie hätte gezielt eine Assoziation der Allele bzw. Genotypen mit dem *H. pylori*-positiven Magenkarzinom untersucht werden können. Eine Subgruppenanalyse, welche diesen Zusammenhang überprüft hätte, konnte in dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da der *H. pylori*-Status der Patienten aufgrund des Verlustes der Serumproben durch einen technischen Defekt des Tiefkühlaggregates nicht bestimmt werden konnte.

5.2 Verlauf des Magenkarzinoms in Abhängigkeit des Genotyps

Die Tatsache, dass das Magenkarzinom beim A/A-Genotyp signifikant häufiger im frühen, lokal begrenzten UICC-Tumorstadium I diagnostiziert wurde und somit auch bedeutend häufiger primär kurativ behandelt werden konnte, kann zweierlei bedeuten: Zum einen könnte die frühzeitige Diagnosestellung beim A/A-Genotyp aufgrund von früh einsetzenden Krankheitssymptomen erfolgen. Mögliche Symptome, die zur Durchführung einer diagnostischen Magenspiegelung führen, sind Völlegefühl, Oberbauchschmerzen, Appetitlosigkeit, Übelkeit und Brechreiz. Dies sind jedoch alles Spätsymptome des Magenkarzinoms; im Frühstadium ist das Magenkarzinom in der Regel asymptomatisch (Mayer, 2008). Ähnliche Symptome werden allerdings auch bei

einer akuten *H. pylori*-Infektion beobachtet. Hier kann es ebenfalls zu Dyspepsie, Übelkeit, Erbrechen und Oberbauchschmerzen kommen (Taylor, 1991). Eine mögliche Erklärung ist daher, dass Individuen mit dem A/A-Genotyp häufiger an symptomatischen *H. pylori*-Infektionen erkranken, in deren Rahmen als Zufallsbefund das Magenkarzinom im Frühstadium diagnostiziert wird. Dass der A/A-Genotyp häufiger an symptomatischen *H. pylori*-Infektionen leidet, ist bereits in der Literatur beschrieben worden. In einer Studie an 85 Mitteleuropäern wurde für den A/A-Genotyp ein 3,5-fach erhöhtes Risiko für Duodenalulcera beschrieben (Hofner, 2007), in einer Studie an einem türkischen Patientenkollektiv (n=150) hatten Patienten mit dem A/A-Genotyp ein 15-fach erhöhtes Risiko, nach erfolgter Eradikationstherapie ein Rezidiv der *H. pylori*-Infektion zu erleiden (Kara, 2010).

Eine andere Erklärung für die frühe Diagnosestellung beim A/A-Genotyp wären unterschiedliche Eigenschaften des Tumors wie z.B. ein langsames Tumorwachstum oder eine verzögerte Metastasierung. Ein Indiz hierfür ist die beim A/A-Genotyp seltener beobachtete Veneninvasion im histologischen Präparat, welche eine seltenere/spätere Fernmetastasierung erklären kann. Diese Beobachtung ließe sich durch eine verminderte NOD1-abhängige IL-1 β -Sekretion beim A/A-Genotyp erklären, welche eine abgeschwächte Entzündungsreaktion sowie ein langsames Tumorwachstum mit lokal begrenzter Ausdehnung und verzögerter Fernmetastasierung zur Folge haben könnte. In vorangegangenen Studien hat sich bereits gezeigt, dass bei Krebspatienten hohe IL-1-Konzentrationen im Blut mit der Malignität des Tumors korrelieren und mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Apte, 2006). In den funktionellen Untersuchungen sollte überprüft werden, ob das A-Allel zu einer verminderten IL1 β -Sekretion führt.

5.3 Funktionelle Charakterisierung der Allele des SNP rs2075820

In dieser Arbeit wurde erstmalig eine funktionelle Charakterisierung der Proteinvarianten des SNP rs2075820 vorgenommen. Die größte Schwierigkeit bei den *in vitro* Stimulationsversuchen war der intrazellulären Lokalisation des NOD1-Rezeptors geschuldet. Um eine Stimulation zu bewirken, muss der spezifische Ligand iE-DAP in ausreichender Menge in die Zelle gelangen. Bei den Überexpressionsversuchen gelang dies durch Hinzugabe des Stimulanzes während der Transfektion, bei den Monozytenstimulationsversuchen durch Hinzugabe eines Transfektionsreagenzes zum Stimulationsansatz. In beiden Versuchen erfolgte daher zum Zeitpunkt der Stimulation auch eine Exposition der Zellen gegenüber einem Transfektionsreagenz. Es zeigte sich in gleichzeitig durchgeführten Negativkontrollen, dass das Transfektionsreagenz allein eine ligandenunabhängige Aktivierung des NOD1-Rezeptors bewirkte. Dieser Effekt trat dabei unabhängig vom Transfektionsreagenz (Lipofectamin, Calciumphosphat) auf und ließ sich durch Dosisverringerung des Reagenzes zwar abschwächen aber nicht gänzlich beseitigen. Ein gänzlicher Verzicht auf Transfektionsreagenzien war in beiden Versuchsreihen nicht möglich, da in den Überexpressionsversuchen sowohl Transfektion als auch Stimulation und in den Monozytenstimulationsversuchen die Stimulation den Einsatz erforderlich machten. Die Vielzahl an Reaktionsschritten und Reagenzien führte zudem zu einer hohen interexperimentellen Variabilität der Messwerte.

Die Aussagekraft des Überexpressionsversuchs in HEK-Zellen wird hauptsächlich durch den Basenaustausch im Referenz-Vektor limitiert, der zu einer Abweichung von der *NOD1*-Referenzsequenz mit einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Prolin an Position 578 des NOD1-Proteins führt. Die aberrante Aminosäure liegt außerhalb der bekannten funktionellen Domänen des Rezeptors. Da Prolin jedoch aufgrund der starren Proteinbindung einen starken Einfluss auf die Proteinfaltung, insbesondere durch die Unterbrechung von α -Helices und β -Faltblättern, ausüben kann, ist eine relevante funktionelle Auswirkung des Basenaustausches denkbar. Zumindest stuft das Vorhersageprogramm MutationTaster die Wahrscheinlichkeit, dass die Variation zu einer veränderten Proteinfunktion führt, als gering ein.

Ein generelles Problem von Überexpressionsversuchen ist zudem der stark veränderte Zellzyklus. Dieses wird bei den Stimulationsexperimenten an humanen Monozyten vermieden. Die Zellen vollziehen einen normalen Zellzyklus, sind nicht gentechnisch verändert worden und besitzen ein natürliches Expressionsmuster von NOD1 sowie vieler anderer mustererkennender Rezeptoren. *In vivo* häufig vorkommende Interaktionen zwischen den Signalwegen der mustererkennenden Rezeptoren werden in diesem *in vitro*-Experiment ebenfalls berücksichtigt. Aufgrund der zahlreichen möglichen Interaktionen bei diesem Versuchsaufbau ist die in dieser Arbeit durchgeführte Versuchsanzahl mit Monozyten von zwei Probandenpärchen jedoch zu gering, um eine Aussage mit statistischer Signifikanz treffen zu können. Auch muss bei den primären Zellen von starken Unterschieden in der Aktivierbarkeit und Sekretionsleistung der Zellen ausgegangen werden. Eine Vielzahl von Probandenpärchen wäre erforderlich, um die Aussagekraft zu erhöhen. Hierfür war das vorhandene Kollektiv gesunder, genotypisierter Probanden zu klein.

Die Auswirkung der Allele des SNP rs2075820 auf die Funktion des NOD1-Rezeptors konnte aufgrund der aufgeführten Faktoren in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Jedoch deuten sowohl die Überexpressionsversuche als auch die Monozytenstimulationsexperimente darauf hin, dass der Aminosäureaustausch E266K (G→A Allel) die ligandenvermittelte Aktivierbarkeit des NOD1-Rezeptors herabsetzt.

In Zusammenschau mit den Genotypisierungsdaten weisen die Ergebnisse darauf hin, dass sich der SNP rs2075820 auf die Funktion des NOD1-Rezeptors auswirkt und dass bei Individuen mit dem A/A-Genotyp die Aktivierbarkeit des NOD1-Rezeptor vermindert ist. Im Rahmen einer *H. pylori*-Infektion könnte die NOD-1-vermittelte NF-κB-Aktivierung und IL-1β-Ausschüttung bei diesem Genotyp abgeschwächt sein, wodurch es häufiger zu symptomatischen *H. pylori*-Infektionen kommt. Dies würde die Beobachtung erklären, dass der A/A-Genotyp ein 3.5-fach erhöhtes Risiko hat ein Duodenalulkus zu entwickeln und ein 15-fach erhöhtes Risiko, nach erfolgter Eradikationstherapie einen Rezidiv der *H. pylori*-Infektion zu erleiden (Hofner, 2007; Kara, 2010). Es ist möglich, dass bei Patienten mit dem A/A-Genotyp im Rahmen der (gastroskopischen) Abklärung der symptomatischen *H. pylori*-Infektion in einigen Fällen auch ein zeitgleich bestehendes, noch asymptomatisches Magenkarzinom entdeckt wird. Diese Patienten hät-

ten aufgrund der frühen Diagnosestellung eine deutlich bessere Prognose als Patienten, bei denen der Tumor aufgrund der langen Symptomfreiheit erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert wird. Da hohe IL-1-Konzentrationen im Blut bekanntermaßen mit der Malignität des Tumors korrelieren und mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Apte, 2006), könnte der A/A-Genotyp aufgrund der verminderten NOD1-abhängigen IL-1 β -Ausschüttung auch ein langsames Tumorwachstum und eine langsamere Metastasierung zur Folge haben. Zumindest vor dem Hintergrund einer chronischen *H. pylori*-Infektion mit kontinuierlicher NOD-1 Aktivierung wäre beim A/A-Genotyp aufgrund der verminderten NOD1-vermittelten IL-1 β -Ausschüttung ein langsames Tumorwachstum mit einer langsameren Metastasierung und somit einer besseren Prognose denkbar. Vor allem beim *H. pylori*-positiven Magenkarzinom, d.h. dem zeitgleichen Vorhandensein der chronischen *H. pylori*-Infektion und des Magenkarzinoms, könnten Polymorphismen in Genen der angeborenen Immunantwort einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf der Krebserkrankung haben.

5.4 Ausblick

Diese Arbeit weist darauf hin, dass NOD1 an der Immunantwort auf das Magenkarzinom beteiligt sein könnte. Polymorphismen im *NOD1*-Gen wie z.B. der SNP rs2075820 könnten diese entscheidend beeinflussen und sich somit auch auf den Verlauf der Erkrankung auswirken. Auf dem Wege zur individualisierten Medizin könnte der rs2075820-Genotyp so als ein Marker zur Prognoseabschätzung des Magenkarzinoms - insbesondere unter Berücksichtigung des *H. Pylo-ri*-Status - eingesetzt werden. Immunmodulatorische Therapien zur Tumorbekämpfung in Gestalt von monoklonalen Antikörpern gegen Interleukinrezeptoren werden bereits in der Klinik eingesetzt (Ball, 2010). NOD1 als therapeutischer Ansatzpunkt erscheint zum derzeitigen Zeitpunkt aufgrund seiner intrazellulären Lokalisation jedoch als schwieriger Kandidat, zumal die bisherigen experimentellen Daten einen derartigen Therapieansatz zu diesem Zeitpunkt nicht rechtfertigen.

Zur genaueren Untersuchung der Rolle von NOD1 beim Magenkarzinom wurde, aufbauend auf diese Arbeit, bereits eine prospektive Genotypisierungsstudie begonnen. Neben dem SNP

rs2075820 werden in dieser Studie eine Reihe weiterer bekannter Polymorphismen im *NOD1*-Gen untersucht. Zur Identifikation bisher nicht bekannter Mutationen bzw. Polymorphismen wird *NOD1* zudem komplett sequenziert werden.

An klinischen Parametern wird in dieser neuen Studie, neben dem Tumorstadium bei Diagnosestellung und der Verlaufsdaten, auch der *H. pylori*-Status des Patienten bestimmt werden. Geplant ist außerdem eine Asservierung von histologischen Präparaten (Operationsresektat, endoskopisch gewonnene Biopsien). Bisher ist nicht bekannt, ob Magenkarzinomzellen eventuell somatische Mutationen im *NOD1*-Gen aufweisen und ob diese ebenfalls als prognostischer Marker genutzt werden können. Eine Sequenzierung des Gens in den Krebszellen könnte darüber Aufschluss geben. Hierbei könnten Next Generation Sequencing Verfahren zum Einsatz kommen, um kostengünstig viele Patienten auf einmal zu sequenzieren und ggf. auch Mutationen zu entdecken, die lediglich in einem Teil der Krebszellen, also als Mosaik, vorliegen. Neben der anatomisch-pathologischen Begutachtung zur Klassifizierung des Tumorstadiums soll anhand der Präparate auch die peritumorale Infiltration mit Entzündungszellen untersucht, charakterisiert und in Schweregrade eingeteilt werden. Im tumorfreien Gewebe sollen *H. pylori*-typische Läsionen (Typ B-Gastritis, intestinale Metaplasie) identifiziert und ein *H. pylori*-Direktnachweis durchgeführt werden. Als altersangepasste Kontrollgruppen werden sowohl gesunde *H. pylori*-negative als auch *H. pylori*-positive Probanden eingesetzt werden.

Eine Wiederholung der Überexpressionsexperimente mit einem fehlerfreien *NOD1*-Vektor findet derzeit statt. Ziel ist es, die bereits erzielten Ergebnisse zu validieren. Des Weiteren ist geplant, die nun etablierten Monozytenstimulationsexperimente an einem größeren Probandenkollektiv zu wiederholen, um die Aussagekraft zu erhöhen. Daher wird das Kollektiv der gesunden Probanden kontinuierlich vergrößert. Angestrebt wird eine Anzahl von etwa 150 Personen, sodass auch für den in Europa seltenen A/A-Genotyp eine Mindestanzahl von zehn Probanden vorliegen wird und alle Experimente an Monozyten aus zehn unterschiedlichen Individuen durchgeführt werden können. In den kommenden Stimulationsversuchen sollen dabei nicht nur der A/A bzw. der G/G-Genotyp, sondern auch der heterozygote G/A-Genotyp untersucht werden.

Zurzeit wird neben weiteren chemischen Transfektionsreagenzien auch die Elektroporation erprobt, um die Grundstimulation der Zellen durch die Transfektionreagenzien zu vermeiden. Es sollen zudem zusätzliche funktionelle Untersuchungen erfolgen, die die bisherigen Ergebnisse bezüglich des Einflusses des SNPs auf die NOD1-abhängige Zytokinantwort untermauern könnten und in denen weitere Signalwege von NOD1 untersucht werden sollen. Geplant ist zum Beispiel, die Auswirkung der rs2075820 Genotypen auf die NOD1-vermittelte Apoptoseregulation zu ergründen.

Über die angelaufene Studie hinaus wären weitere Experimente sinnvoll: So spielen beim Magenkarzinom neben den Epithelzellen der Mukosa auch die den Tumor umgebenden Immunzellen und Stromazellen eine entscheidende Rolle. Die Expression von NOD1 in diesen Zelltypen ist bislang noch unbekannt und soll untersucht werden. Ebenso wäre eine Studie über die ligandenabhängige Aktivierung von NOD1 für die rs2075820-Genotypen in diesen Zelltypen sinnvoll. Dabei könnten zum Beispiel die auch bei der Tumorabwehr wichtigen dendritischen Zellen isoliert und mit iE-DAP stimuliert werden, um im Anschluss und mit Hilfe einer Durchflusszytometrie intrazellulär gebildete Zytokine und die Apoptoserate zu bestimmen.

6 Zusammenfassung

Die chronische Infektion mit *Helicobacter pylori* ist der stärkste Risikofaktor für das Magenkarzinom. Die Erkennung des Bakteriums erfolgt über den intrazellulär lokalisierten, mustererkennenden Rezeptor NOD1. Dieser vermittelt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B eine Zytokinantwort, unter anderem mit Ausschüttung von IL-1 β . Der SNP rs2075820 kodiert für einen Basenaustausch im *NOD1*-Gen. Er führt zu einem Aminosäureaustausch in der NBD-Domäne des Rezeptors. Ziel dieser retrospektiven monozentrischen Studie war es, die epidemiologische Bedeutung der Allele des SNPs rs2075820 für das Magenkarzinom zu untersuchen. In einer Überexpressionsstudie in HEK293-Zellen und in Stimulationsexperimenten an humanen Monozyten sollte die Auswirkung der rs2075820-Genotypen auf die Funktion des NOD1-Rezeptors studiert werden.

269 Magenkarzinompatienten und 188 gesunde Kontrollprobanden wurden mittels LightCycler[®]-PCR für den SNP rs2075820 genotypisiert und die Allel- und Genotypfrequenzen miteinander verglichen. Im Patientenkollektiv wiesen 54 % den G/G-, 38 % den G/A- und 8 % den A/A-Genotyp auf. Dies entsprach der Genotypenverteilung im Kontrollkollektiv. Bei den Patienten mit dem A/A-Genotyp wurde das Magenkarzinom in einem signifikant früheren Tumorstadium diagnostiziert als beim G/A- und beim G/G-Genotyp; die Hälfte der Träger des A/A-Genotyps wurden im UICC-Stadium I diagnostiziert, die Träger des G/A- und G/G-Genotyps nur in jeweils einem Viertel der Fälle. Patienten mit dem A/A-Genotyp wiesen zudem seltener Fernmetastasen bei Erstdiagnose auf und wurden häufiger mit primär kurativer Intention behandelt. Sie überlebten deutlich länger als solche mit den Genotypen G/A bzw. G/G.

Zur funktionellen Charakterisierung des SNPs rs2075820 wurden beide Allele in HEK293-Zellen überexprimiert, eine Stimulation mit dem NOD1-spezifischen Liganden iE-DAP durchgeführt und anschließend in einem Reporter-gen-Assay die NF- κ B-Aktivierung gemessen. Das A-Allel wies eine stark verminderte Liganden-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B auf. Eine Sequenzierung der eingesetzten Vektoren zeigte jedoch, dass der *NOD1*-Referenz Vektor, der in der Mutagenese eingesetzt wurde, an Position 1733 eine Base enthält,

die von der *NOD1*-Referenzsequenz abweicht und zu einem Aminosäureaustausch führt. Bei den Stimulationsexperimenten an humanen Monozyten wiesen Monozyten mit dem A/A-Genotyp im Gegensatz zu Monozyten mit dem G/G-Genotyp eine abgeschwächte ligandenvermittelte IL-1 β -Ausschüttung auf.

Die Genotypisierungsstudie zeigte, dass weder einzelne Allele noch Genotypen des SNPs rs2075820 mit dem Magenkarzinom assoziiert sind. Jedoch erwies sich der A/A-Genotyp durch ein lokal begrenztes Tumorstadium bei Diagnosestellung und ein längeres medianes Überleben als ein prognostisch günstiger Faktor. Die funktionellen Untersuchungen weisen dabei auf eine verringerte Aktivierbarkeit des NOD1-Rezeptors bei dem A/A-Genotyp hin. Die Aussagekraft des Überexpressionsversuchs in HEK-Zellen wird hauptsächlich durch den Basenaustausch im Referenz-Vektor limitiert, die der Monozytenstimulationsexperimente vor allem durch die Vielzahl an experimentellen Schritten und die daraus resultierenden möglichen Fehlerquellen. Weitere Experimente sind notwendig, um die Auswirkung des SNP rs2075820 auf die Funktion des NOD1-Rezeptors genauer und umfassend beschreiben zu können.

7 Literaturverzeichnis

Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR. *Nat Methods* 7(4):248-249 (2010)

Angeletti S, Galluzzo S, Santini D, et al. NOD2/CARD15 polymorphisms impair innate immunity and increase susceptibility to gastric cancer in an Italian population. *Hum Immunol.* 2009 Sep;70(9):729-32. Epub 2009 May 4.

Apte RN, Dotan S, Elkabets M, et al. The involvement of IL-1 in tumorigenesis, tumor invasiveness, metastasis and tumor-host interactions. *Cancer Metastasis Rev.* 2006 Sep;25(3):387-408.

Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer.* 2010 May;46(7):1223-31. Epub 2010 Mar 23.

Atherton JC, Peek RM Jr, Tham KT, Cover TL, Blaser MJ. Clinical and pathological importance of heterogeneity in vacA, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori*. *Gastroenterology.* 1997 Jan;112(1):92-9.

Backert S, Selbach M. Role of type IV secretion in *Helicobacter pylori* pathogenesis. *Cell Microbiol.* 2008 Aug;10(8):1573-81.

Balkwill F, Charles KA, Mantovani A. Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell.* 2005 Mar;7(3):211-7.

Ball ED, Broome HE. Monoclonal antibodies in the treatment of hematologic malignancy. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2010 Sep;23(3):403-16.

Becker CE, O'Neill LA. Inflammasomes in inflammatory disorders: the role of TLRs and their interactions with NLRs. *Semin Immunopathol.* 2007 Sep;29(3):239-48. Epub 2007 Sep 6.

Bertin J, Nir WJ, Fischer CM, et al. Human CARD4 protein is a novel CED-4/Apaf-1 cell death family member that activates NF-kappaB. *J Biol Chem.* 1999 May 7;274(19):12955-8.

Boughan PK, Argent RH, Body-Malapel M, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain-1 and epidermal growth factor receptor: critical regulators of beta-defensins during *Helicobacter pylori* infection. *J Biol Chem.* 2006 Apr 28;281(17):11637-48.

Bozzetti F, Marubini E, Bonfanti G, Miceli R, Piano C, Gennari L. Subtotal versus total gastrectomy for gastric cancer: five-year survival rates in a multicenter randomized Italian trial. Italian Gastrointestinal Tumor Study Group. *Ann Surg.* 1999 Aug;230(2):170-8.

Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. *Methods Mol Biol.* 2009;472:467-77.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene.* 1999 Jul 8;234(2):177-86.

Campbell DI, Warren BF, Thomas JE, Figura N, Telford JL, Sullivan PB. The African enigma: low prevalence of gastric atrophy, high prevalence of chronic inflammation in West African adults and children. *Helicobacter.* 2001 Dec;6(4):263-7.

Cannon JG. Inflammatory Cytokines in Nonpathological States. *News Physiol Sci.* 2000 Dec;15:298-303.

Cario E. Innate immune signalling at intestinal mucosal surfaces: a fine line between host protection and destruction. *Curr Opin Gastroenterol.* 2008 Nov;24(6):725-32.

- Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 (TLR3) and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun*. 2000 Dec;68(12):7010-7.
- Chernoff H, Lehmann EL. The use of maximum likelihood estimates in χ^2 tests for goodness-of-fit. *The Annals of Mathematical Statistics* 1954;25: 579–586.
- Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 1988 Jul 1;48(13):3554-60.
- Correa P, Haenszel W, Cuello C, et al. Gastric precancerous process in a high risk population: cohort follow-up. *Cancer Res*. 1990 Aug 1;50(15):4737-40.
- Correa P, Shiao YH. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Res*. 1994 Apr 1;54(7 Suppl):1941s-1943s.
- Cummings JR, Cooney RM, Clarke G, et al. The genetics of NOD-like receptors in Crohn's disease. *Tissue Antigens*. 2010 Jul;76(1):48-56.
- Curado MP, Edwards B, Shin HR, et al. *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. IX*. IARC Scientific Publications No. 160, Lyon, IARC, 2007.
- da Silva Correia J, Miranda Y, Austin-Brown N, et al. Nod1-dependent control of tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Feb 7;103(6):1840-5.
- da Silva Correia J, Miranda Y, Leonard N, Hsu J, Ulevitch RJ. Regulation of Nod1-mediated signaling pathways. *Cell Death Differ*. 2007 Apr;14(4):830-9.
- Dobbins WO 3rd. Dysplasia and malignancy in inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med*. 1984;35:33-48.
- Dorer MS, Talarico S, Salama NR. *Helicobacter pylori's* unconventional role in health and disease. *PLoS Pathog*. 2009 Oct;5(10):e1000544.
- El-Omar EM, Ng MT, Hold GL. Polymorphisms in Toll-like receptor genes and risk of cancer. *Oncogene*. 2008 Jan 7;27(2):244-52.
- Fehlings M, Drobbe L, Moos V, et al. Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. *Infect Immun*. 2012 May 21.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. *GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10* [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010.
- Fisher RA. On the Interpretation of χ^2 from Contingency Tables, and the Calculation of P. *Royal Statistical Society*. 1922 Jan; 85 (1): 87-94.
- Flores J, Okhuysen PC. Genetics of susceptibility to infection with enteric pathogens. *Curr Opin Infect Dis*. 2009 Oct;22(5):471-6.
- Fock KM, Ang TL. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer in Asia. *J Gastroenterol Hepatol*. 2010 Mar;25(3):479-86.
- Fritz JH, Le Bourhis L, Sellge G, et al. Nod1-mediated innate immune recognition of peptidoglycan contributes to the onset of adaptive immunity. *Immunity*. 2007 Apr;26(4):445-59.
- Fukata M, Abreu MT. Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut. *Curr Opin Pharmacol*. 2009 Dec;9(6):680-7. Epub 2009 Oct 12.

- Galmiche A, Rassow J, Doye A, et al. The N-terminal 34 kDa fragment of *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release. *EMBO J* 2000;19:6361-6370.
- Girardin SE, Tournebize R, Mavris M, et al. CARD4/Nod1 mediates NF-kappaB and JNK activation by invasive *Shigella flexneri*. *EMBO Rep*. 2001 Aug;2(8):736-42.
- Girardin SE, Boneca IG, Carneiro LA, et al. Nod1 detects a unique muropeptide from gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*. 2003 Jun 6;300(5625):1584-7.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. 1977 Jul; *J. Gen. Virol.* 36 (1): 59-74.
- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):512-9.
- Gumucio DL, Diaz A, Schaner P, et al. Fire and ICE: the role of pyrin domain-containing proteins in inflammation and apoptosis. *Clin Exp Rheumatol*. 2002 Jul-Aug;20(4 Suppl 26):S45-53.
- Gutierrez O, Pipaon C, Inohara N, et al. Induction of Nod2 in myelomonocytic and intestinal epithelial cells via nuclear factor-kappa B activation. *J Biol Chem*. 2002 Nov 1;277(44):41701-5.
- Hasegawa M, Fujimoto Y, Lucas PC, et al. A critical role of RICK/RIP2 polyubiquitination in Nod-induced NF-kappaB activation. *EMBO J*. 2008 Jan 23;27(2):373-83.
- Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, et al. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology*. 2002 Jun;122(7):1987-2000.
- Herrera V, Parsonnet J. *Helicobacter pylori* and gastric adenocarcinoma. *Clin Microbiol Infect*. 2009 Nov;15(11):971-6.
- Hofner P, Gyulai Z, Kiss ZF, et al. Genetic polymorphisms of NOD1 and IL-8, but not polymorphisms of TLR4 genes, are associated with *Helicobacter pylori*-induced duodenal ulcer and gastritis. *Helicobacter*. 2007 Apr;12(2):124-31.
- Hohenberger P, Gretschel S. Gastric cancer. *Lancet* 2003 Jul 26;362(9380):305-15.
- Houlston RS, Peto J. The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene*. 2004 Aug 23;23(38):6471-6.
- Huebner C, Ferguson LR, Han DY, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain containing 1 (NOD1) haplotypes and single nucleotide polymorphisms modify susceptibility to inflammatory bowel diseases in a New Zealand caucasian population: a case-control study. *BMC Res Notes*. 2009 Mar 27;2:52.
- Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, et al. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2005/2006 - Häufigkeiten und Trends. Robert Koch-Institut; Auflage: 7. 2010.
- Hysi P, Kabesch M, Moffatt MF, et al. NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma. *Hum Mol Genet*. 2005 Apr 1;14(7):935-41.
- IARC Working Group. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some industrial chemicals. Lyon, 15-22 February 1994. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 1994; 60: 1-560.
- Ilver D, Arnqvist A, Ogren J, et al. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 1998;279:373-377
- Inohara N, Koseki T, del Peso L, et al. Nod1, an Apaf-1-like activator of caspase-9 and nuclear factor-kappaB. *J Biol Chem*. 1999 May 21;274(21):14560-7.

- Janeway CA Jr, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216
- Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology*, 5th edition. New York, USA: Garland Science, 2001: Chapter 2
- Jasperson KW, Burt RW. APC-Associated Polyposis Conditions. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. *GeneReviews* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.1998 Dec 18 [updated 2011 Oct 27].
- Kamangar F, Cheng C, Abnet CC, Rabkin CS. Interleukin-1B polymorphisms and gastric cancer risk--a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006 Oct;15(10):1920-8.
- Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J. Amer Statist Assn* 1958; 53:457-481.
- Kara B, Akkiz H, Doran F, et al. The significance of E266K polymorphism in the NOD1 gene on *Helicobacter pylori* infection: an effective force on pathogenesis? *Clin Exp Med.* 2010 Jun;10(2):107-12. Epub 2009 Oct 31.
- Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med.* 2008 May 8;358(19):2039-49.
- Krüll M, Klucken AC, Wuppermann FN, et al. Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol.* 1999 Apr 15;162(8):4834-41.
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4(7):1073-81.
- Kutikhin AG, Yuzhalin AE. Inherited variation in pattern recognition receptors and cancer: dangerous liaisons? *Cancer Manag Res.* 2012;4:31-8. Epub 2012 Feb 16.
- Laurén P. The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Path Microbiol Immunol Scand* 1965; 64: pp. 31-49.
- Lavelle EC, Murphy C, O'Neill LA, Creagh EM. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol.* 2010 Jan;3(1):17-28.
- Lee WH, Boyer TG. BRCA1 and BRCA2 in breast cancer. *Lancet.* 2001 Dec;358 Suppl:S5.
- Lee CH, Wu CL, Shiau AL. Toll-like receptor 4 signaling promotes tumor growth. *J Immunother.* 2010 Jan;33(1):73-82.
- Mann HB, Whitney DR. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other. *Annals of Mathematical Statistics* 1947; 18: 50-60.
- Manolio TA. Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N Engl J Med.* 2010 Jul 8;363(2):166-76.
- Mantel N. Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration. *Cancer Chemotherapy Reports* 1966; 50 (3): 163-70.
- Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet.* 1984 Jun 16;1(8390):1311-5.
- Masumoto J, Yang K, Varambally S, et al. Nod1 acts as an intracellular receptor to stimulate chemokine production and neutrophil recruitment in vivo. *J Exp Med.* 2006 Jan 23;203(1):203-13.

- Mayer R. Gastrointestinal Tract Cancer. In: Harrison's Principles of Internal Medicine. Anthony Fauci et al. Band 1, New York, 2008 S. 571–573
- Mbulaiteye SM, Gold BD, Pfeiffer RM, et al. H. Pylori-infection and antibody immune response in a rural Tanzanian population. *Infect Agent Cancer* 2006 Sep 14;1:3.
- Medzhitov R, Janeway CA Jr. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. *Semin Immunol.* 1998 Oct;10(5):351-3.
- Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev.* 2000 Feb;173:89-97. Review.
- Mezhir JJ, Tang LH, Coit DG. Neoadjuvant therapy of locally advanced gastric cancer. *J Surg Oncol.* 2010 Mar 15;101(4):305-14.
- Michelsen KS, Arditi M. Toll-like receptors and innate immunity in gut homeostasis and pathology. *Curr Opin Hematol.* 2007 Jan 14(1):48-54.
- Miehlke S, Kirsch C, Agha-Amiri K, et al. The *Helicobacter pylori vacA s1, m1* genotype and *cagA* is associated with gastric carcinoma in Germany. *Int J Cancer.* 2000 Aug 1;87(3):322-7.
- Mills SE. *Histology for pathologists.* 3rd ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2007: 598-601.
- Mocellin S, Rossi CR, Pilati P, Nitti D. Tumor necrosis factor, cancer and anticancer therapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005 Feb;16(1):35-53. Epub 2004 Dec 19.
- Molnar T, Hofner P, Nagy F, et al. NOD1 gene E266K polymorphism is associated with disease susceptibility but not with disease phenotype or NOD2/CARD15 in Hungarian patients with Crohn's disease. *Dig Liver Dis.* 2007 Dec;39(12):1064-70.
- Mülhardt C. Real-time quantitative PCR. In: Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics.* 5. Auflage München, Deutschland: Elsevier GmbH, 2006:105-110
- Mülhardt C. Expressionssysteme. In: Mülhardt C. *Der Experimentator Molekularbiologie/Genomics.* 5. Auflage München, Deutschland: Elsevier GmbH, 2006:235-245.
- Muñoz N, Bosch FX. HPV and cervical neoplasia: review of case-control and cohort studies. *IARC Sci Publ.* 1992;(119):251-61.
- Nagase H, Nakamura Y. Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat.* 1993;2(6):425-34.
- Namath A, Patterson AJ. Genetic polymorphisms in sepsis. *Crit Care Clin.* 2009 Oct;25(4):835-56, x..
- Opitz B, Püschel A, Schmeck B, et al. Nucleotide-binding oligomerization domain proteins are innate immune receptors for internalized *Streptococcus pneumoniae*. *J Biol Chem.* 2004 Aug 27;279(35):36426-32.
- Opitz B, Förster S, Hocke AC, et al. Nod1-mediated endothelial cell activation by *Chlamydomonas pneumoniae*. *Circ Res.* 2005 Feb 18;96(3):319-26.
- Opitz B, Püschel A, Beermann W, et al. *Listeria monocytogenes* activated p38 MAPK and induced IL-8 secretion in a nucleotide-binding oligomerization domain 1-dependent manner in endothelial cells. *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):484-90.
- Parsonnet, J. *Helicobacter pylori*: the size of the problem. *Gut.* 1998 Jul; 43 Suppl 1: S6–S9.

- Peek RM Jr, Blaser MJ. *Helicobacter pylori* and gastrointestinal tract adenocarcinomas. *Nat Rev Cancer*. 2002 Jan;2(1):28-37.
- Prinz C, Schöniger M, Rad R, et al. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Res*. 2001 Mar 1; 61(5): 1903-1909.
- Radtke AL, O'Riordan MX. Intracellular innate resistance to bacterial pathogens. *Cell Microbiol*. 2006 Nov;8(11):1720-9.
- Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*. 2004 Jul 23;118(2):229-41.
- Robert Koch-Institut (Hrsg.) (2010) Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland. Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes. RKI, Berlin
- Rosenstiel P, Hellmig S, Hampe J, et al. Influence of polymorphisms in the NOD1/CARD4 and NOD2/CARD15 genes on the clinical outcome of *Helicobacter pylori* infection. *Cell Microbiol*. 2006 Jul;8(7):1188-98.
- Rosin MP, Anwar WA, Ward AJ. Inflammation, chromosomal instability, and cancer: the schistosomiasis model. *Cancer Res*. 1994 Apr 1;54(7 Suppl):1929s-1933s.
- Sayers EW, Barrett T, Benson DA, et al. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 2010 Nov 21.
- Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis*. 2010 Jan;31(1):37-49. Epub 2009 Dec 2.
- Schwarz JM, Rödelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010 Aug;7(8):575-6.
- Seher C, Thierfelder W, Dortschy R. *Helicobacter pylori*-Prävalenz in der deutschen Bevölkerung. *Gesundheitswesen* 2000; 62: 598-603
- Sherlock S. Viruses and hepatocellular carcinoma. *Gut*. 1994 Jun;35(6):828-32.
- Sobin LH, Wittekind C (eds). UICC: TNM classification of malignant tumors, 5th edition, New York, Wiley, 1997.
- Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature*. 1990 Dec 20-27;348(6303):747-9.
- Suerbaum S, Michetti P. *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med*. 2002 Oct 10;347(15):1175-86.
- Sugimoto M, Yamaoka Y, Furuta T. Influence of interleukin polymorphisms on development of gastric cancer and peptic ulcer. *World J Gastroenterol*. 2010 Mar 14;16(10):1188-200.
- Szabo I, Brutsche S, Tombola F, et al. Formation of anion-selective channels in the cell plasma membrane by the toxin VacA of *Helicobacter pylori* is required for its biological activity. *EMBO J* 1999;18:5517-5527.
- Tanabe T, Ishige I, Suzuki Y, et al. Sarcoidosis and NOD1 variation with impaired recognition of intracellular *Propionibacterium acnes*. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Sep;1762(9):794-801.
- Taylor DN, Blaser MJ. The epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Epidemiol Rev*. 1991;13:42-59.

- van Heel DA, Ghosh S, Butler M, et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur J Immunol*. 2005 Aug;35(8):2471-6.
- Viala J, Chaput C, Boneca IG, et al. Nod1 responds to peptidoglycan delivered by *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol*. 2004 Nov;5(11):1166-74.
- Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ*. 2003 Jan;10(1):45-65.
- Wang ET, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. 2008 Nov 27;456(7221):470-6.
- Wang J, Pan HF, Hu YT, Zhu Y, He Q. Polymorphism of IL-8 in 251 allele and gastric cancer susceptibility: a meta-analysis. *Dig Dis Sci*. 2010 Jul;55(7):1818-23.
- Wilcoxon F. Individual comparisons by ranking methods. *Biometrics Bulletin* 1945; 1:80–83.
- Wolin MJ, Miller TL. Carbohydrate fermentation. In: *Human intestinal microflora in health and disease*. Hentges, D.J. (Ed.) Academic Press Inc., New York, USA 1983
- Wu WS. The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 2006; 25:695-705.
- Xue H, Lin B, An J, et al. Interleukin-10-819 promoter polymorphism in association with gastric cancer risk. *BMC Cancer*. 2012 Mar 21;12(1):102.
- Yoo NJ, Park WS, Kim SY, et al. Nod1, a CARD protein, enhances pro-interleukin-1beta processing through the interaction with pro-caspase-1. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Dec 13;299(4):652-8.
- Zilbauer M, Dorrell N, Elmi A, et al. A major role for intestinal epithelial nucleotide oligomerization domain 1 (NOD1) in eliciting host bactericidal immune response to *Campylobacter jejuni*. *Cell Microbiol*. 2007 Oct;9(10):2404-16.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Am Zustandekommen dieser Dissertation waren zahlreiche Kolleginnen und Kollegen beteiligt. Folgenden Personen möchte ich ganz besonders danken:

Oliver Kumpf

für seine gute Betreuung im Allgemeinen und für die Hilfe bei der Handhabung der unfassbar grossen Patientendatenbank im Speziellen.

Fränzi Creutzburg

für die gute Anleitung im Labor und die freundschaftliche Zusammenarbeit.

Diana Woellner

für die wichtigen technischen Tipps und für die gute Stimmung im Labor.

Djin-Ye Oh

für ihre Hilfe bei der Optimierung der LightCycler PCR..

Gunthard Stübs

für seine Hilfsbereitschaft bei Fragen zu allen wissenschaftlichen Themen.

Dominik Seelow

für die Beratung in genetischen Fragen und fürs Korrekturlesen.

und vor allem

Ralf R. Schumann

dafür, dass er meine Begeisterung für das angeborene Immunsystem geweckt und es verstanden hat, mich nach Fehlschlägen immer wieder zu motivieren.

8.2 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

8.3 Eidesstattliche Erklärung

„Ich, Evelyn Regina Seelow, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des SNP rs2075820 bei Entstehung und Verlauf des Magenkarzinoms und seine Auswirkung auf die Funktion des NOD1-Rezeptors“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift