

Aus dem Medizinischen Institut für Umwelthygiene
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. Gerhard Winneke
Abteilung für Experimentelle Toxikologie
Leiter: Prof. Dr. Josef Abel

**Untersuchung zur Häufigkeit von Polymorphismen des
Cytochrom P450 1A1 und des Cytochrom P450 1B1 bei
kolorektalen Karzinomen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von:

Cornelia Jonkmanns

2001

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger
Dekan

Referent: Prof. Dr. Josef Abel
Korreferentin: Univ.-Prof. Dr. Regine Kahl

Meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	3
1. Einleitung	5
1.1. Chemische Kanzerogenese	5
1.2. Kolorektale Karzinome	7
1.3. Cytochrom P450	9
1.3.1. Fremdstoffmetabolisierende Enzymsysteme	9
1.3.2. Cytochrom P450 1A1 und 1B1 – Substrate, Induktoren und Inhibitoren	10
1.3.3. Cytochrom P450 1A1 und 1B1 – Polymorphismen	12
1.4. Fragestellung und Ziel der Arbeit	14
2. Methoden	15
2.1. DNA-Isolierung aus Vollblut	15
2.2. Oligonukleotidsynthese für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	16
2.3. PCR-Primersequenzen	16
2.4. Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	17
2.5. Durchführung des Restriktionsverdau	18
2.5.1. Restriktionsverdau mit <i>Msp1</i>	18
2.5.2. Restriktionsverdau mit <i>Hind2</i>	18
2.5.3. Restriktionsverdau mit <i>Bfr1</i>	19
2.6. Patientenkollektive	20
2.6.1. Das Kontrollkollektiv	20
2.6.2. Das Patientenkollektiv	20
2.7. Statistische Auswertung	22
3. Ergebnisse	23
3.1. Ergebnisse zur Methodik	23
3.1.1. Identifikation der Polymorphismen	23

3.2. Häufigkeiten des Genotyps und Allelfrequenzen in den Kollektiven	26
3.2.1. Verteilung des <i>Msp1</i> Polymorphismus in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der kolorektalen Karzinome	26
3.2.2. Verteilung des IVA Polymorphismus in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der kolorektalen Karzinome	27
3.2.3. Verteilung des <i>Bfr1</i> Polymorphismus in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der kolorektalen Karzinome	28
3.2.4. Genotyphäufigkeiten der verschiedenen Polymorphismen	30
4. Diskussion	31
4.1. Cytochrom P450 1A1 und 1B1 Polymorphismen – Suszeptibilität für kolorektale Karzinome	31
4.2. Heterozyklische Amine und andere Umweltkanzerogene und ihre Rolle bei der Entstehung kolorektaler Karzinome	35
4.3. Heterozyklische Amine im Rahmen des Kochprozesses	39
4.4. Kolorektale Karzinome und Ernährungsgewohnheiten	40
4.5. Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme und Suszeptibilität für Karzinomerkrankungen	42
4.6. Phänotypische Bedeutung der Polymorphismen von CYP 1A1 und 1B1	44
4.7. Ausblick	45
5. Zusammenfassung	46
6. Materialien	47
6.1. Geräte und Chemikalien	47
6.1.1. Geräte	47
6.1.2. Verbrauchsmaterial und Zubehör	47
6.1.3. Chemikalien und Enzyme	48
6.2. Kits	48
6.3. Lösungen und Puffer	48
6.4. Chemikalien für die Oligonukleotidsynthese	48
7. Referenzen	50

Abkürzungen

AáC	2-Amino-9 <i>H</i> -pyrido[2,3 <i>b</i>]indol
Ah-Rezeptor	Aryl Hydrocarbon Rezeptor
AHH	Aryl Hydrocarbon Hydroxylase
anti-BPDE-DNA	(+)-r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy- 7,8,9,10-tetrahydrobenzo[<i>a</i>]pyrene
ARNT	Aryl Hydrocarbon Rezeptor Nuclear Translocator
CYP	Cytochrom P450
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRE	Dioxin Responsive Element
E2	17â-Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FME	Fremdstoffmetabolisierende Enzyme
FMO	Flavinhaltige Monooxygenasen
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
Glu-P1	2-Amino-6-methyldipyrido-[1,2- <i>a</i> :3'2'- <i>d</i>]imidazole
Glu-P-2	2-Aminodipyrido[1,2- <i>a</i> :3'2'- <i>d</i>]imidazole
GST	Glutathion S-Transferase
HA	Heterozyklische Amine
IQ	2-Amino-3,8-dimethylimidazol[4,5- <i>f</i>]quinolin
IVA	Isoleucin-Valin-Austausch
MAO	Monoaminoxidasen
MeIAáC	2-Amino-3-methyl-9 <i>H</i> -pyrido[2,3- <i>b</i>]indole
MeIQ	2-Amino-3,4-dimethyl-imidazo[4,5- <i>f</i>]quinoline
MeIQx	2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5- <i>f</i>]quinoxaline
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
MW	Molekulargewicht
NAT	N-Acetyltransferase
NDMA	N-Nitrosodimethylamine
OD	Optische Dichte

OR	Odds Ratio
PAH	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PhIP q	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- <i>b</i>]pyridine
RFLP	Restriktions Fragment Längen Polymorphismus
RNA	Ribonucleinsäure
ST	Sulfotransferasen
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
Trp-P-1	3-Amino-1,4-dimethyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indole
Trp-P-2	3-Amino-1-methyl-5 <i>H</i> -pyrido[4,3- <i>b</i>]indole
UGT	UDP-Glucuronosyltransferasen
wt	Wildtyp
vt	varianter Typ

1 Einleitung

1.1 Chemische Kanzerogenese

Unter chemischer Kanzerogenese wird die Entstehung bösartiger Tumoren durch chemische Noxen verstanden.

Die Geschichte der Erforschung der chemischen Kanzerogenese geht bis auf Paracelsus (1493-1541) zurück, der als Mitursache für den Lungenkrebs von Bergleuten eine chemische Verbindung, das Realgar (As_4S_4) vermutete. In den folgenden Jahrhunderten beschrieben Wissenschaftler viele weitere Zusammenhänge zwischen Krebserkrankungen und exogenen Noxen. Im 20. Jahrhundert begann die experimentelle Krebsforschung, Kanzerogene wurden entdeckt und Tumoren chemisch im Tierversuch induziert.

Die Entstehung und Entwicklung eines Tumors ist bestimmt durch ein Zusammenwirken von individuellen, genetischen und umweltbedingten Faktoren im Sinne einer „Multi-Hit“-Theorie. Dabei spielen angeborene genetische Defekte vor allem bei familiär gehäuften Tumoren eine Rolle. Die Mehrzahl der Krebserkrankungen entsteht jedoch ohne eine familiäre Disposition. Zu erwähnen ist hier die spontane Mutagenese, bei der Mutationen im Laufe des normalen Metabolismus entstehen, die durch Replikation im Genom fixiert werden. Es sind jedoch vor allem eine Vielzahl von Umweltfaktoren wie Viren, ionisierende und ultraviolette Strahlung und die chemischen Substanzen für die Krebsentstehung von Bedeutung.

Die maligne Transformation von Zellen durch chemische Kanzerogene läuft in mehreren Stadien ab:

Der erste Schritt ist die Initiation. Ein chemischer Stoff oder seine Metaboliten treten in Wechselwirkung mit der zellulären DNA und setzen einen genetischen Schaden. Die Zelle befindet sich in einem „prämaligen Zustand“, der noch durch Reparaturmechanismen kompensiert werden kann. Die Zelle wird durch umgebende Normalzellen unter Kontrolle gehalten.

Als Zweites folgt die Promotion. Initiierte Zellen proliferieren und der Genschaden amplifiziert sich in den Tochterzellen. Dieser Schritt scheint ebenfalls noch reversibel zu sein.

Im Laufe der Progression geht die Zelle irreversibel in einen neoplastischen Zustand über. Die klonale Expansion lässt einen malignen Tumor entstehen. Die Latenzzeit zwischen Kanzerogenkontakt und der Manifestation eines malignen Tumors kann Jahre bis Jahrzehnte dauern.

Bei der Metastasierung wird angenommen, dass auf der Oberfläche der Zellen Differenzierungsantigene verloren gehen und der Zellverband gelöst wird. Es entstehen Tochtergeschwülste.

Tabelle 1.1 zeigt die wichtigsten chemischen kanzerogenen Noxen.

Tabelle 1.1: Bekannte chemische Kanzerogene beim Menschen und beim Tier

Chemische Kanzerogene	Beispielstoffe	Organsysteme
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	Benzo(a)pyren, 3-Methylcholanthren, 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen	systemische Tumoren, Hauttumoren
Halogenierte Kohlenwasserstoffe	Vinylchlorid, 1,2-Dichlorethan, 2,3, 7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)	Angiosarkome der Leber, Glioblastome
Nitrosamine	N-Nitroso-dimethylamin, N-Nitroso-methylethylamin, N-Nitroso-pyrrolidin, u.v.a.	Leber-, Ösophagus-, Lungentumoren
Aromatische Amine	Anilin, Phenazetin, 2-Naphthylamin, 2-Acetylaminofluoren, 4-Amino-Biphenyl, 4-Dimethylaminoazobenzol	Harnblasen-, Leber-, Brustdrüsentumoren
Mykotoxine	Aflatoxin B	Lebertumoren
Heterozyklische Amine	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazol[4,5-b]pyridin (PhIP), u.v.a.	Kolon-, Prostatakarzinome

1.2 Kolorektale Karzinome

Mit einer Inzidenz von ca. 30 pro 100.000 Einwohnern ist das kolorektale Karzinom in Deutschland das zweithäufigste Karzinom bei Frauen und Männern. Die geographische Variation ist stark. Während in westlichen Industrieländern die Inzidenz hoch ist und in Osteuropa ansteigt, ist die Inzidenzrate in Entwicklungsländern gering. Die Entstehung scheint stark von Umweltfaktoren abhängig zu sein. Ein Hinweis dafür ist, dass in Regionen mit hoher Einwanderungsrate bei den eingewanderten Populationen die Kolonkarzinom-Inzidenz rasch zunimmt. Rund 90% aller kolorektaler Karzinome treten nach dem 50. Lebensjahre auf.

Ätiologisch sind ca. 10% der kolorektalen Karzinome durch genetische Defekte bedingt. Hier sei vor allem die Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) genannt, die eine obligate Präkanzerose darstellt.

Risikoerkrankungen, welche zusätzlich die Entstehung eines Dickdarmtumors begünstigen, sind langjährige chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, insbesondere die Colitis ulcerosa.

Umweltfaktoren, die das Risiko erhöhen, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken, sind beispielsweise Zigarettenkonsum, Übergewicht, und Ernährungsfaktoren. Insbesondere werden hier vermehrter Verzehr von rotem Fleisch und heterozyklische Amine, die durch Kochen und Braten entstehen, diskutiert. Zusätzlich von Bedeutung sind die gesteigerte Aufnahme von ungesättigten Fettsäuren sowie geringer Verzehr von Früchten und Gemüse.

Molekularpathologisch existiert für die Entstehung dieses Karzinomtyps ein Tumorprogressions-Modell. In Abbildung 1.1 wird die Folge vom Normalgewebe über Adenom bis hin zum Karzinom verursacht durch eine Häufung von genetischen Veränderungen beschrieben. Morphologisch resultiert daraus die Adenom/Dysplasie-Karzinom-Sequenz, das heißt, dass aus normaler Schleimhaut benigne Adenome und daraus Karzinome entstehen.

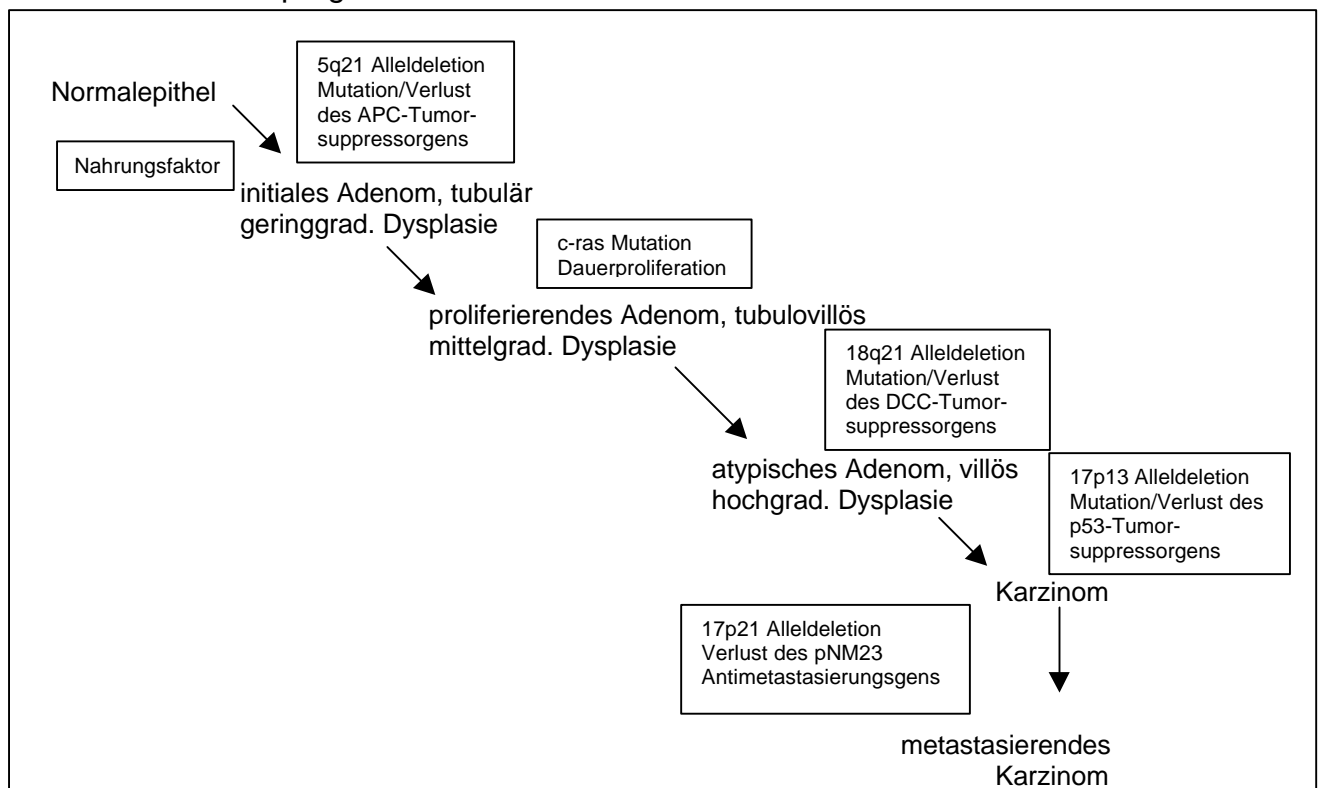
Histologisch sind die kolorektalen Karzinome in der Regel Adenokarzinome von unterschiedlichem Differenzierungsgrad, selten schleimbildend.

Etwa 60% der Karzinome sind im Rektum lokalisiert, 20% im Sigmakolon und 20% im restlichen Kolon. In 5% der Fälle findet sich ein multizentrisches Auftreten. Die Metastasierung erfolgt per continuitatem ins angrenzende perikolische/perirektale Fettgewebe, selten ergibt sich eine Organinfiltration. Es existieren drei lymphogene Metastasenstrassen: paraaortal, parakolisch in der Beckenwand und beim Rektumkarzinom inguinal. Die hämatogene Streuung bevorzugt die Leber und die Lunge, dann erst die andere Organe (Kaskadentheorie).

Die Symptome der Patienten sind uncharakteristisch. Frühe Zeichen sind Blutbeimengungen im Stuhl und eine Änderung der Stuhlgewohnheiten wie die paradoxe Diarrhoe. Später kommen Ileuserscheinungen, Gewichtsverlust und chronische Anämie hinzu.

Dank vielfältiger Therapieoptionen wie der chirurgischen Intervention und der (neo-) adjuvanten Radio- und Chemotherapie sind die Überlebensraten abhängig vom Stadium der Erkrankungen gut.

Abb. 1.1: Tumorprogressions-Modell



1.3 Cytochrom P450

1.3.1 Fremdstoffmetabolisierende Enzymsysteme

Die fremdstoffmetabolisierenden Enzymsysteme, ihre Substrate und Polymorphismen beschäftigen in den letzten Jahren die Wissenschaft und Forschung mit wachsendem Interesse.

Prinzipiell wird der Fremdstoffmetabolismus in zwei Phasen eingeteilt. Dabei geht man davon aus, dass eine wichtige Funktion darin besteht, lipophile, renal schwer ausscheidbare Substanzen in hydrophile, nierengängige zu verwandeln. Phase 1 Enzyme metabolisieren apolare zu polaren Stoffe, indem sie funktionelle Gruppen hinzufügen oder demaskieren. Wichtige Mitglieder der Gruppe der Phase 1 Enzyme sind die Cytochrom P450 abhängigen Monooxygenasen, auf die im Speziellen eingegangen werden soll, die flavinhaltigen Monooxygenasen (FMO), Monoaminoxidasen (MAO), Dehydrogenasen, Reduktasen (z.B. NAD(P)H-Chinon-Oxidoreduktase), Hydrolasen und Prostaglandin-H-Synthasen. Im zweiten Schritt konjugieren nun Phase 2 Enzyme große endogene hydrophile Moleküle an die veränderten Fremdstoffe, ihre Wasserlöslichkeit wird weiter erhöht und sie können renal ausgeschieden werden. Vertreter dieser Enzymgruppe sind die Glutathion-S-Transferasen (GST), UDP-Glucuronosyltransferasen (UGT), Sulfotransferasen (ST), Acetyltransferasen und Methyltransferasen.

Zum ersten Mal erschien der Begriff „Cytochrom P450“ 1962 in der Literatur, ein mikrosomal membrangebundenes Häm-Protein (Omura et al. 1962). Es ist durch seine typische spektrale Absorptionsbande des Kohlenmonoxid-Komplexes in reduziertem Zustand bei 450 nm charakterisiert. Die funktionelle Einheit besteht aus einem Cytochrom P450, einer Reduktase mit nur einer Form pro Spezies und dem Cofaktor NAD(P)H. Nach dreißigjähriger Forschung ist heute Cytochrom P450 der Name einer großen Enzymfamilie mit mehr als 480 charakterisierten Genen (Nelson et al. 1996).

Sie nehmen neben dem Fremdstoffmetabolismus auch am Stoffwechsel der Steroid-Hormone, Eicosanoide, Vitamin D₃ und Retinoide teil (Omura, 1999).

Die fremdstoffmetabolisierenden Cytochrom P450 Enzyme haben eine hohe Variabilität sowohl innerhalb einer als auch unter den Spezies. Dies ist ein

Ergebnis einer Evolution vor 400 Millionen Jahren, einer „Kriegsführung“ zwischen Pflanzen und Tieren (animal-plant-warfare), die auf eine ständige Weiterentwicklung und Anpassung ihrer fremdstoffmetabolisierenden Enzymsysteme während der biologischen Entwicklung angewiesen waren (Gonzales et al., 1990, Lewis et al., 1998).

Nach internationalen Richtlinien werden die einzelnen Cytochrome P450 nach ihrer Sequenzhomologie in Gruppen eingeteilt. Nach „CYP“ als generelle Bezeichnung humaner Cytochrome P450 folgt eine arabische Ziffer, die für die einzelne Familie (mind. 40% Sequenzidentität) steht, dann ein Großbuchstabe zur Kennzeichnung der Subfamilie (mind. 55% Sequenzidentität) und zuletzt eine arabische Ziffer zur Benennung des einzelnen Enzyms.

1.3.2 Cytochrom P450 1A1 und 1B1 – Substrate, Induktoren und Inhibitoren

Die Cytochrom P450 Familie 1 sind fremdstoffmetabolisierende Enzyme.

Das CYP 1A1 ist auf dem langen Arm von Chromosom 15 (15q22-24) lokalisiert (Jaiswal et al. 1985). Es besteht aus sieben Exons und sechs Introns mit einer Länge von insgesamt 5810 bp. Das CYP 1B1 liegt auf dem langen Arm von Chromosom 2 (2p21-22) (Tang et al. 1996). Es enthält drei Exons und zwei Introns. Beide Enzyme werden hauptsächlich in extrahepatischen Geweben exprimiert, im Gegensatz zum CYP 1A2, das nur in der Leber vorkommt.

Die Induktion der Enzymfamilie durch Xenobiotika erfolgt über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-R) auf Chromosom 7 (7p15) (Micka et al., 1997). Dieser dimerisiert mit dem Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor Nuclear Translokator (ARNT) als liganden-aktivierender Transkriptionsfaktor nach Abspaltung von hsp90 und Aktivierung von c-Src, einer Proteinkinase (Enan et al., 1996), bindet an Dioxin-Responsive Elemente (DRE) im Promotor der Gene und kann so die Transkription dieser Gene induzieren.

Die Cytochrome P450 1A1 und 1B1 haben eine überlappende Substratspezifität. 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) ist der stärkste Induktor des CYP 1A1 und gilt daher auch als Modellsubstanz für die Ah-R Induktion. Die halogenierten Dibenzodioxine und Dibenzofurane sind überall in der Umwelt vorhanden. Sie entstehen als Zwischenprodukte bei der Kondensationsreaktion aus Chlorphenol z.B. bei der Herstellung von Pestiziden oder PVC. Sie zeichnen sich durch ihre hohe Persistenz in der Umwelt, ihre Anreicherung im Fettgewebe vieler Säuger aus und besitzen eine tumorpromovierende Wirkung.

Weitere Substrate und Induktoren der CYP 1A1 und 1B1 sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH), deren Referenzsubstanzen Benzo[a]pyren, 3-Methylcholanthren und 7,12-Dimethylbenz(a)anthrazen sind. Sie entstehen beim Erhitzen von organischem Material unter Sauerstoffmangel, z.B. Auto- und Dieselabgase, Zigarettenrauch, Räucher- und Grillwaren, geröstete Malze. Die reaktionsträgen polyzyklischen Aromaten werden durch das CYP450 System zu Epoxiden oxidiert. Als Diolepoxide stellen sie mutagene Verbindungen dar, die irreversibel an DNA und RNA binden und eine Kanzerisierung bewirken. Die einzelnen Enzyme aktivieren die verschiedenen PAH in unterschiedlichem Maße, so dass zum Beispiel die Referenzsubstanz Benzo[a]pyren von CYP 1A1, nicht aber von CYP 1B1 aktiviert wird. Insgesamt spielen beide Enzyme jedoch eine wichtige Rolle bei der Aktivierung dieser Kanzerogengruppe (Shimada et al. 1996).

Auch heterozyklische Amine (HA) werden von den Cytochromen P450 metabolisiert. Sie entstehen beim Erhitzen von Aminosäuren und Proteinen und verhalten sich kanzerogen. Wichtige Substanzen sind hier 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP), 2-Amino-3,8-dimethylimidazol[4,5-f]quinolin (IQ) und 2-Amino-9H-pyrido[2,3-b]indol (AáC). PhIP wird unter anderem zu N₂-OH-PhIP oxidiert, dieses bindet an die DNA und wirkt kanzerogen. Entgegen früherer Annahme zeigen Crofts et al. (1997 und 1998), dass neben CYP 1A2 auch CYP 1A1 und CYP 1B1 eine wichtige Rolle bei der Metabolisierung und demnach auch kanzerogenen Rolle der heterozyklischen Amine, insbesondere des PhIP spielen.

CYP 1A1 und 1B1 nehmen auch am Östrogen-Stoffwechsel teil. Es hat sich gezeigt, dass beide Enzyme die Hydroxylation von 17 β -Estradiol (E2) katalysieren. CYP 1A1 hydroxyliert dabei an der C-2 Position, während CYP1B1 einen 4-hydroxylierten Metaboliten des E2 produziert. Dieser C-4-Metabolit ist an der östrogen-induzierten Karzinogenese der weiblichen Brust beteiligt (Hayes et al. 1996).

Inhibitoren der Enzyme sind einige PAH, diese inhibieren CYP 1A1 und 1B1 nicht unbedingt in gleichem Maße, so können 1-(1-Propynyl)pyrene und 2-(1-propynyl)phenanthrene CYP 1A1 inhibieren, jedoch nicht 1B1.

Für 2-Ethynylpyrene und α -Naphthoflavone(7,8-benzoflavone) gilt dies umgekehrt (Shimada et al. 1998).

1.3.3 Cytochrom P450 1A1 und 1B1 – Polymorphismen

Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme bezeichnen die unterschiedliche Ausprägung der Aktivität eines Enzyms, die monogenetisch kontrolliert ist. Die Abweichung von der Norm muss mehr als 1% der Population betreffen, bei selteneren Ereignissen spricht man von einem Defekt. Es gibt jedoch nicht nur interindividuelle Unterschiede, sondern auch populationsabhängige.

Bei der Frage einer Arzneimitteltoxizität kann ein Polymorphismus von Bedeutung sein. Dort erreicht ein anders ausgeprägtes Gen eine langsamere oder schnellere Metabolisierung des Wirkstoffes und somit wohlmöglich eine Über- oder Unterdosierung. Klassisches Beispiel hierfür ist das Debrisoquin, ein Hochdruckmedikament, dessen pharmakologische Wirkung durch Hydroxylierung beendet wird. Ein Polymorphismus im CYP 2D6 führt zu einer verringerten oder fehlenden Exprimierung des Proteins und somit zu einer langsameren Metabolisierung.

Auch bei der Kanzerogenese beschäftigt sich die Forschung mit Enzym-polymorphismen. Durch den Fremdstoffmetabolismus entstehen intermediär kanzerogene Produkte. Beim Vorhandensein von Enzym-polymorphismen, die zu

einer höheren Aktivität des Enzyms führen, werden mehr krebserzeugende Metabolite erzeugt, denen der menschliche Körper ausgesetzt ist.

In Bezug auf CYP 1A1 sind zwei Polymorphismen bekannt.

1987 wurde ein Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus in der 3' flankierenden Region entdeckt (Spurr et al.). Die Punktmutation liegt 264 Basen „downstream“ des polyA Signals von Exon 7 an Position 6235, markiert einen Übergang von Thymin zu Cytosin (T→C) und ist zugleich eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Msp1*. Kawajiri et al. (1990) identifizierten drei Genotypen: A (Wildtyp wt/wt), B (heterozygoter Typ wt/vt) und C (varianter Typ vt/vt).

Hayashi et al. beschrieben 1991 eine zweite Punktmutation. Sie befindet sich auf Exon 7 auf Position 4889. Adenin wird durch Guanin (A→G) ersetzt. Diese Mutation bewirkt einen Austausch der Aminosäure Isoleucin gegen Valin an Position 462 der Häm-bindenden Region des Enzyms. Diese Region ist essentiell für die katalytische Aktivität des Enzyms. Da kein RFLP besteht, wurde ein Mismatch (siehe auch Kapitel 2) entwickelt, um den Polymorphismus zu detektieren. Auch hier existieren drei Genotypen: A (Wildtyp Ile/Ile), B (heterozygoter Typ Ile/Val) und C (varianter Typ Val/Val).

Auch für das CYP 1B1 sind mehrere Polymorphismen beschrieben worden (Stoilov et al. 1997). Einer von ihnen ist durch eine Punktmutation im Exon 3 des Gens charakterisiert und bewirkt einen Austausch von Cytosin zu Guanin (C→G) auf Position 1640. Diese tauscht Leucin-432 gegen Valin. Fritsche et al. (1999) entwickelten einen RFLP, der ebenfalls mittels eines Mismatches funktioniert und eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Bfr1* schafft.

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Überprüfung, ob polymorphe Enzyme des Fremstoffmetabolismus die Empfindlichkeit für kolorektale Karzinome modulieren. Die Befunde aus dieser Untersuchung könnten eine wichtige Bedeutung zur Prävention des kolorektalen Karzinoms haben.

Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wie ist die Häufigkeit der polymorphen Varianten der Cytochrome P450 1A1 und 1B1 in der kaukasischen Population?
2. Sind polymorphe Varianten dieser Enzyme im Patientenkollektiv mit kolorektalen Karzinomen im Vergleich zum Kontrollkollektiv vermehrt repräsentiert?
3. Sind genetische Varianten dieser Enzyme als Marker für die individuelle Suszeptibilität für Krebserkrankungen, insbesondere kolorektale Tumoren, identifizierbar?

2 Methoden

2.1 DNA-Isolierung aus Vollblut

Mittels des QIAamp Blood Maxi Kit QIAGEN (Hilden, Deutschland, 1997) wurde die DNA aus Vollblut isoliert. Hierzu wurden 5 ml tiefgefrorenes EDTA-Blut aufgetaut und mit 500 µl QIAGEN Protease und 6 ml Lysispuffer AL versetzt. Nach zehnminütiger Inkubation bei 70 °C im Wasserbad kamen 5 ml Ethanol abs. hinzu. Diese Lösung wurde gut gemischt, auf die QIAamp Maxi Column gegeben und bei 3000 Upm 3 min zentrifugiert. Darauf folgten zwei Waschschrirte, zuerst mit 5 ml Puffer AW1, dann mit 5 ml Puffer AW2 mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 5000 Upm für 1 bzw. 15 min. Durch Hinzufügen von 600 µl Puffer AE und fünfminütige Inkubation konnte nun die DNA von der Säule eluiert werden. Dies geschah wiederum durch zehn-minütige Zentrifugation bei 5000 Upm, um das gesamte Eluat zu gewinnen.

Die DNA-Konzentration konnte nun photometrisch bei 260 und 280 nm bestimmt und anhand der Formel

$$C = \frac{OD_{260} \times 50 \times \text{Verdünnung}}{100}$$

berechnet werden.

Die 260/280nm Ratio, als Reinheitskriterium für die DNA, sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.2 Oligonukleotidsynthese für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Zur Herstellung der Oligonukleotide (Primer) für die PCR wurde die von Caruthers et al. (1987) geschilderte Phosphoramidit-Methode angewandt. Dabei wurden bei der Festphasensynthese Säulen mit einer Kapazität von 40 nmol verwendet.

Nach der Methode Atkinson und Smith (1984) wurden die Primer mit konzentriertem, wasserfreiem Ammoniak (99,9% NH₄OH) von der Säule eluiert und die Schutzgruppen an Basen und Phosphorsäureestern durch Inkubation über Nacht bei 56 °C abgespalten.

Mit einer SpeedVac-Apparatur konnte NH₄OH abgedampft, der trockene Rückstand in 300 µl dH₂O gelöst und die Oligonukleotide in EtOH präzipitiert werden. Anschließend wurde die Reinheit der Primer durch PAGE in einem denaturierenden 20prozentigen Polyacrylamidgel getestet. Die getrennten Primer konnten nun im UV-Licht bei 254 nm auf der fluoreszierenden Platte sichtbar gemacht werden.

Durch Messung der Absorption bei 260 nm erfolgte die photometrische Konzentrationsbestimmung. Dabei stimmte eine OD₂₆₀ von 1,0 mit einer Konzentration von 33 µg/ml überein (Sambrook et al., 1989).

2.3 PCR-Primersequenzen

Die Sequenzen der Primer zur Durchführung der PCR sind in Tabelle 2.1 dargestellt.

Tab. 2.1: PCR-Primer

Genlocus	Primersequenz	Fragment -größe	
CYP1A1 3' flankierende Region	<i>Msp1</i> : CAG TGA AGA GGT GTA GCC GCT <i>Msp2</i> : TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT	340 bp	(Hayashi et al., 1991)
CYP1A1 Exon 7	1A1S: GAA CTG CCA CTT CAG CTG TCT 1A1 <i>ASHinc2</i> : GAA AGA CCT CCC AGC GGT CA	187bp	(Oyama et al., 1995)
CYP1B1 Exon 3	1B1P: TAA GAA TTT TGC TCA CTT GC 1B1 <i>Mis</i> : GTT CTC CGG GTT AGG CCA CTT AA	323bp	(Stoilov et al., 1997), (Fritsche et al., 1998)

2.4 Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR zur Amplifizierung der zu untersuchenden Fragmente wurde wie folgt durchgeführt.

Der Reaktionsansatz umfasste ein Volumen von 25 µl und setzte sich zusammen aus:

- 1 µl DNA (100 ng/µl)
- 2,5 µl 10x PCR-Puffer
- 4 µl dNTP-Mix (1,25 mM je Nukleotid)
- je 2,5 µl 5'- und 3'-Primer (je 4 µM)
- 0,25 µl Taq-DNA-Polymerase (5 U/l)
- 12,25 µl DEPC-dH₂O

Um eine mögliche Kontamination der Proben zu vermeiden, wurde neben der Benutzung autoklavierter Materialien die Probenvorbereitung und die PCR in verschiedenen Räumen durchgeführt. Als Kontaminationskontrolle dienten bei jedem PCR-Ansatz Negativkontrollen, das heißt ein Ansatz ohne DNA.

Die PCR selbst wurde im Robo-Cycler durchgeführt, der Verlauf wird aus Tabelle 2 ersichtlich, wobei sich die verschiedenen Reaktionen durch Annealing-Temperatur und die Anzahl der Zyklen (je nach Primerpaar) unterschieden.

Tab. 2: PCR-Bedingungen

	Primerpaar	Zyklen	Temperatur	Zeit
Vorlauf			94 °C	4 min
Denaturierung			94 °C	30 sec
Annealing	CYP1A1 <i>Msp</i> 1/2	35	55 °C	30 sec
	CYP1A1 Ile-Val/1A1ASHinc2	37	62 °C	30 sec
	CYP1B1 P/Mis	35	57 °C	30 sec
Extension			72 °C	30 sec
Nachlauf			72 °C	7 min

2.5 Durchführung des Restriktionsverdau

Die Ausführung wird im Folgenden nach Polymorphismen getrennt beschrieben. Zusätzlich zu jedem Restriktionsverdau wurden jeweils 10 µl der PCR-Produkte mit 2 µl 6x Ladungspuffer versetzt und als unverdaute Kontrollen zusammen mit einem PCR-Molekulargewichtsmarker (50-1000 bp) auf das Agarosegel aufgetragen. Die Banden konnten dann durch eine Ethidiumbromid-Färbung unter UV-Licht sichtbar gemacht werden.

2.5.1 Restriktionsverdau mit *Msp1*

Durch den Restriktionsverdau mit *Msp1* sollte der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) der 3' flankierenden Region des CYP1A1 Gens untersucht werden. Dazu wurde die Methode nach Hayashi et al. (1991) verwendet.

Der Ansatz enthielt bei einem Volumen von 30 µl:

- 10 µl PCR-Produkt
- 2 µl *Msp1* (10 U/µl)
- 3 µl 10x Puffer L
- 15 µl DEPC-H₂O

Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz mit 6 µl Ladungspuffer vermischt und zusammen mit dem unverdauten PCR-Produkt und dem MW-Marker auf ein 2%iges Agarosegel mit 2,5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel aufgetragen.

2.5.2 Restriktionsverdau mit *Hind2*

Der Restriktionsverdau mit *Hind2* ermöglicht die Analyse des RFLP im Exon 7 des CYP1A1. Es wurde nach der Methode von Oyama et al. (1995) vorgegangen.

Der Restriktionsansatz enthielt 25 µl und setzte sich zusammen aus:

- 10 µl PCR-Produkt
- 1 µl *Hind2* (5 U/µl)
- 2,5 µl 10x Puffer M
- 11,5 µl DEPC-H₂O

Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz mit 5 µl Ladungspuffer vermischt und zusammen mit dem unverdauten PCR-Produkt und dem MW-Marker auf ein 2,5%iges Agarosegel mit 2,5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel aufgetragen.

Bei der Entwicklung der Primer, die zur Herstellung des PCR-Fragmentes nötig sind, wurde ein Mismatch angewendet, um eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym zu schaffen. Dies bedeutet, dass in dem Primer eine falsche, nicht dem Genom entsprechende Base eingebaut wurde. Das komplementäre PCR-Produkt unterscheidet sich somit in einer Base vom Original. Diese Unterscheidung aber schafft eine Schnittstelle in der Mutante für das Restriktionsenzym, so dass sich die Fragmente nach dem Verdau unterschiedlich lang darstellen und das mutante Allel sichtbar wird.

2.5.3 Restriktionsverdau mit *Bfr1*

Der *Bfr1*-Restriktionsverdau wurde zur Analyse des RFLP auf Exon 3 des CYP1B1 angewendet. Dabei wurde nach der von Fritsche et al. (1998) beschriebenen Methode vorgegangen.

Der Ansatz hatte folgende Zusammensetzung mit einem Gesamtvolumen von 25 µl:

10 µl PCR-Produkt
0,5 µl *Bfr1* (10 U/µl)
2,5 µl 10x Puffer M
12 µl DEPC-H₂O

Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde der Ansatz mit 5 µl Ladungspuffer vermischt und auf ein 2,5%iges Agarosegel mit 2,5 µl Ethidiumbromid pro 100 ml Gel aufgetragen.

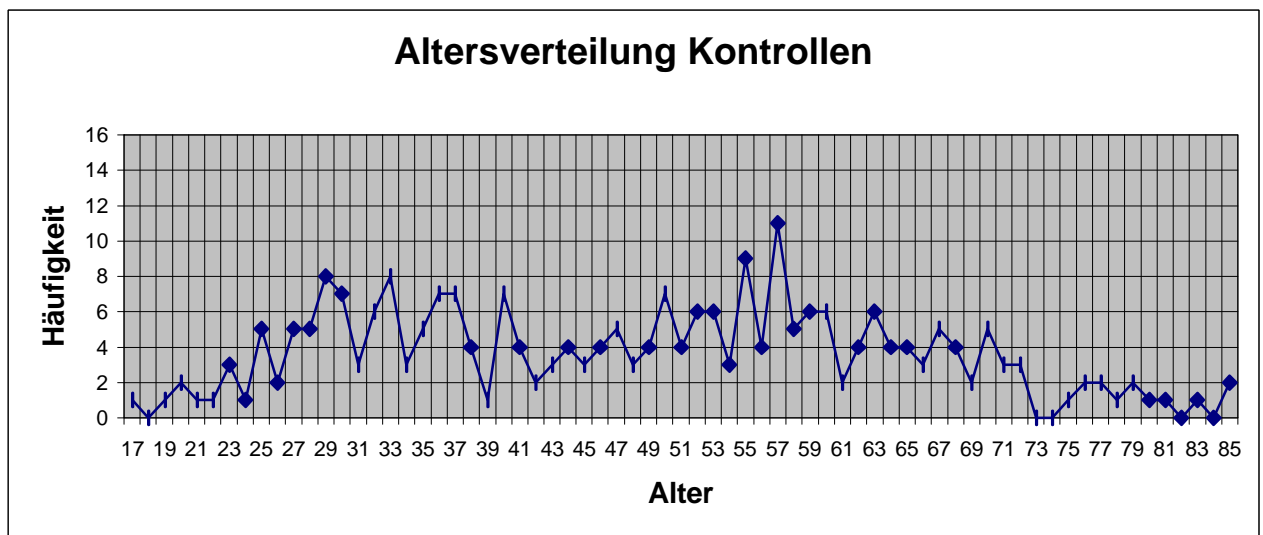
Auch dieser Restriktionsverdau wurde durch ein Mismatch möglich. Die Schnittstelle, an der das Restriktionsenzym schneidet, wurde durch den Basentausch des Primers im Wildtyp eingebaut.

2.6 Patientenkollektive

2.6.1 Das Kontrollkollektiv

Das Kontrollkollektiv umfasste 250 Personen, die nicht an einem kolorektalen Karzinom erkrankt waren. Sie alle wurden an der Poliklinik der Universität Bonn untersucht. Es waren insgesamt 99 Frauen und 151 Männer. Die Personen waren zwischen 17 und 85 Jahren alt, der Mittelwert betrug ca. 48,3 und der Median 49,5 Jahre.

Abb.2.1 Altersverteilung Kontrollen

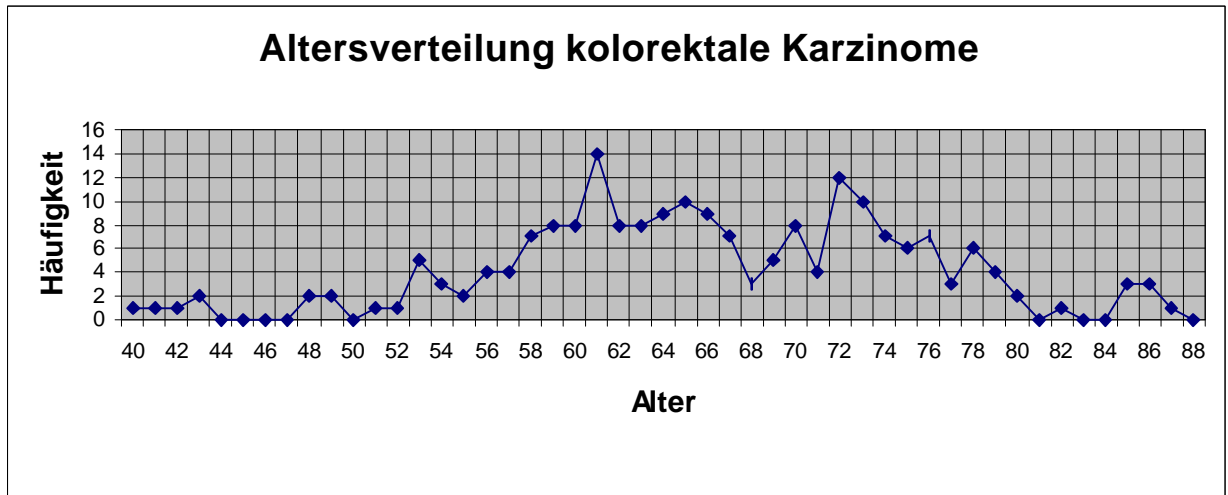


2.6.2 Das Patientenkollektiv

Die Patienten mit kolorektalen Karzinomen stammte aus dem Onkologischen Schwerpunkt der Universitätsklinik Bonn. Die Diagnose wurde histologisch gesichert.

Es wurden insgesamt 202 Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht, davon 87 Frauen und 115 Männer. Die Altersspanne lag zwischen 40 und 87, der Mittelwert bei 66, der Median bei 65,5 Jahren.

Abb. 2.2 Altersverteilung kolorektale Karzinome



Da sich die Häufigkeiten der Polymorphismen regional nicht wesentlich unterscheiden, wurden die Patienten nur nach Krankheitsbildern eingeteilt.

2.7 Statistische Auswertung

Es wurden die Häufigkeitsverteilung, die χ^2 und die p-Werte zur Irrtumswahrscheinlichkeit mit STATISTICA bestimmt. Die Odds Ratios (ORs) wurden folgendermaßen berechnet:

Tab. 3: Vierfeldertafel

	Wildtyp	Mutante
Kontrollen	<i>A</i>	<i>B</i>
Fälle	<i>C</i>	<i>D</i>

$$OR = \frac{A \cdot D}{B \cdot C}$$

dabei entspricht *A* = Zahl der Wildtypen der Kontrollen

B = Zahl der Mutanten der Kontrollen

C = Zahl der Wildtypen der Fälle

D = Zahl der Mutanten der Fälle.

3 Ergebnisse

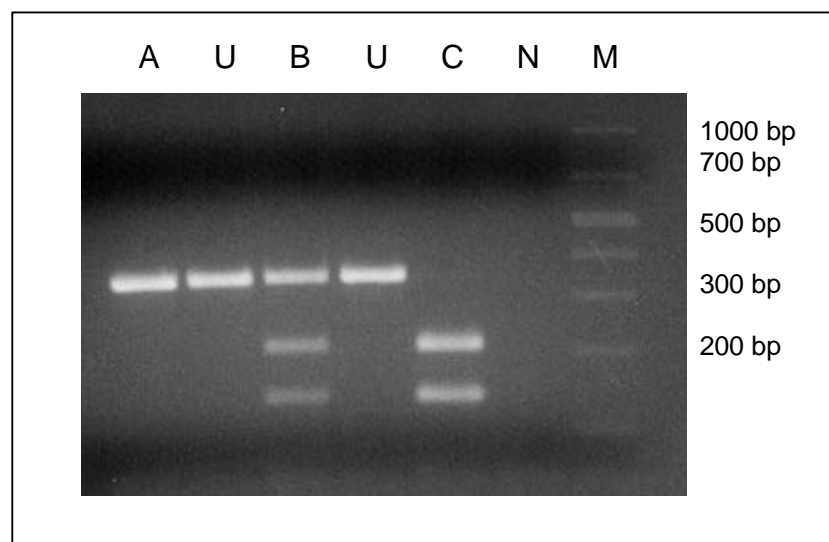
3.1 Ergebnisse zur Methodik

3.1.1 Identifikation der Polymorphismen

Abbildung 3.1 zeigt das Photo eines Agarosegels, auf dem die verschiedenen Genotypen des *Msp1*-Polymorphismus (Wildtyp wt/wt; heterozygoter Typ wt/vt; varianter Typ vt/vt) abgebildet sind. Der Wildtyp und das unverdaute Fragment haben eine Länge von 340 bp. Der Restriktionsverdau mit *Msp1* bewirkt die Teilung in zwei Fragmente von jeweils 200 bp und 140 bp. Bei einem heterozygoten Genotyp, sind drei Fragmente auf dem Gel abgebildet.

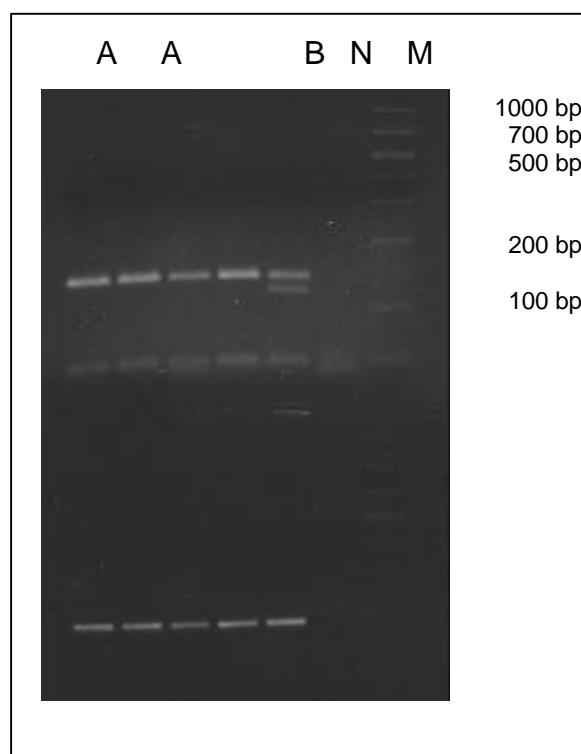
Abb.3.1: Genotypen des *Msp1* Polymorphismus nach Restriktionsverdau mit *Msp1*;

A = Wildtyp, B = heterozygoter Genotyp, C = varianter Genotyp, U = unverdautes Fragment, M = Molekulargewichtsmarker, N = Negativkontrolle



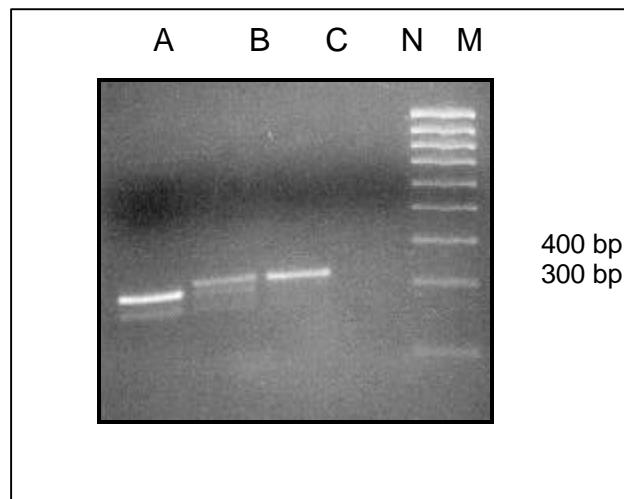
Der Isoleucin-Valin-Austausch wird in Abbildung 3.2 durch die Photographie eines Agarosegels mit den verschiedenen Genotypen (Wildtyp Ile/Ile; heterozygoter Typ Ile/Val; varianter Typ Val/Val) gezeigt. Der Wildtyp hat eine natürliche Schnittstelle für das Restriktionsenzym, es entstehen nach dem Verdau mit *Hind2* zwei Fragmente mit 139 bp bzw. 48 bp Länge. Dies wurde gleichzeitig als Positivkontrolle genutzt. Bei der Mutanten besteht eine weitere Schnittstelle für das Restriktionsenzym, so dass Fragmente mit 120 bp und 19 bp entstehen. Das unverdaute Fragment hat einer Länge von 187 bp. Beim heterozygoten Genotyp sind alle drei Fragmente auf dem Agarosegel zu sehen.

Abb.3.2: Genotypen des IVA nach Restriktionsverdau mit *Hind2*; A = Wildtyp, B = heterozygoter Genotyp, M = Molekulargewichtsmarker, N = Negativkontrolle (nicht abgebildet: C = varianter Genotyp)



In Abbildung 3.3 ist die Photographie eines Agarosegels mit den Genotypen (Wildtyp C/C, heterozygoter Typ C/G und varianter Typ G/G) des *Bfr1*-Polymorphismus dargestellt. Der Wildtyp hat eine Länge von 300 bp. Für den heterozygoten Genotyp ergeben sich zwei Fragmente von 323 bp und 300 bp und die Mutante zeigt ein Fragment mit 323 bp.

Abb 3.3: Genotypen des *Bfr1* nach Restriktionsverdau mit *Bfr1*; A = Wildtyp, B = heterozygoter Typ, C = varianter Genotyp, M = Molekulargewichtsmarker, N = Negativkontrolle



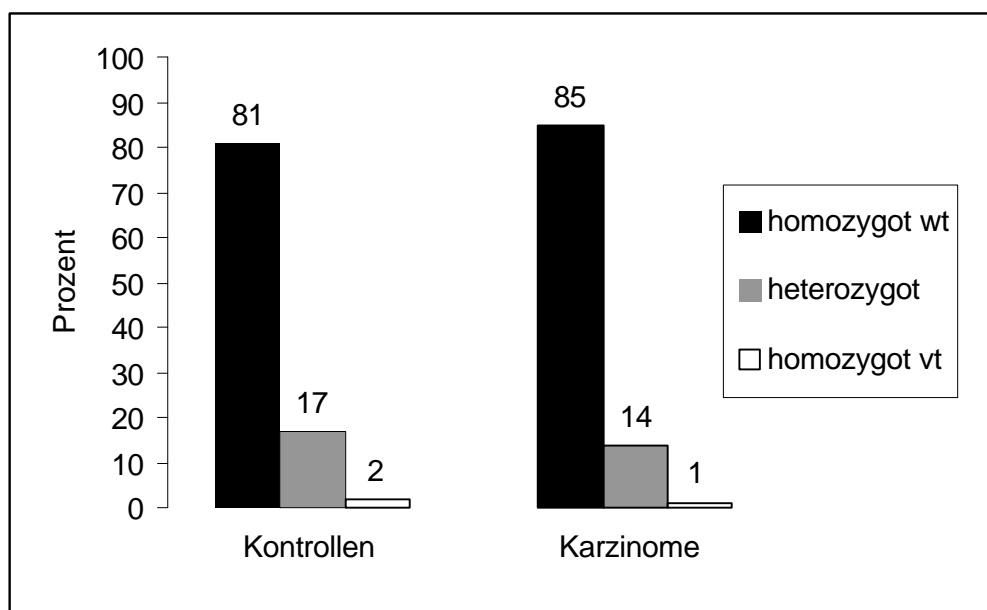
3.2 Häufigkeiten des Genotyps und Allelfrequenzen in den Kollektiven

3.2.1 Verteilung des *Msp1* Polymorphismus in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der kolorektalen Karzinome

Die Kontrollgruppe besteht aus 250 gesunden Individuen, von denen 202 (81%) einen Wildtyp für den *Msp1*-Polymorphismus aufweisen. Auf den heterozygoten Typ entfallen 44 (17%) und auf die homozygote Mutante 4 (2%) der Probanden. Die Allelfrequenzen entsprechen demnach 0,896 für das Wildtyp-Allel und 0,104 für das mutante Allel.

Es wurden insgesamt 202 Patienten mit kolorektalem Karzinom untersucht. Davon zeigen für den *Msp1*-Polymorphismus 171 (85%) eine Wildtyp, 29 (14%) einen heterozygoten Typ und 2 (1%) einen homozygoten Typ für die Mutante. Die Allelfrequenzen berechnen sich entsprechend mit 0,918 für das Wildtyp-Allel und 0,082 für das mutante Allel.

Abb. 3.4: Genotypverteilung des *Msp1* Polymorphismus in kolorektalen Karzinomen und Kontrollen

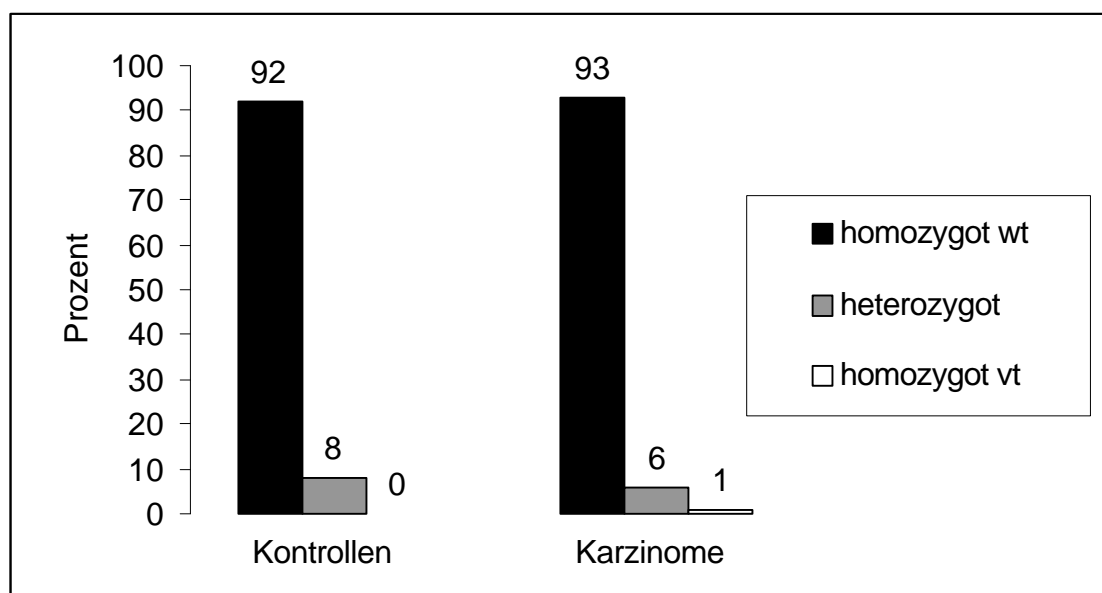


3.2.2 Verteilung des IVA Polymorphismus in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der kolorektalen Karzinome

Auch für den Isoleucin-Valin Austausch wurden 250 Probanden untersucht. Es findet sich 230mal (92%) ein Wildtyp (Ile/Ile), die heterozygote Form (Ile/Val) trat 20mal (8%) auf. Daraus ergeben sich Allelfrequenzen von 0,96 für das Wildtyp-Allel und 0,04 für das mutante Allel.

Für den Isoleucin-Valin-Austausch ergeben sich in der Gruppe der kolorektalen Karzinome folgende Werte: bei 189 (93%) Patienten findet sich ein Wildtyp, bei 12 (6%) ein heterozygoter Typ und bei 1 (1%) Patienten eine Homozygotie für die Mutante. Die Allelfrequenzen betragen 0,956 für das Wildtyp-Allel und 0,035 für das mutante Allel.

Abb. 3.5: Genotypverteilung des IVA in kolorektalen Karzinomen und Kontrollen

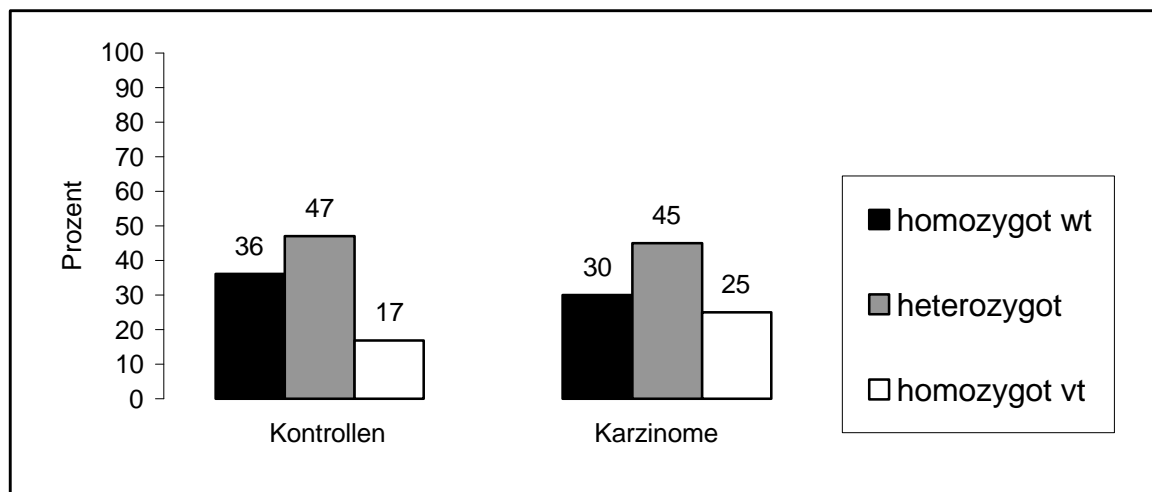


3.2.3 Verteilung des *Bfr1* Polymorphismus in der Kontrollgruppe und in der Gruppe der kolorektalen Karzinome

Die Untersuchung des *Bfr1* Polymorphismus bei 250 gesunden Probanden ergab 90 (36%) Wildtypen, 117 (47%) Heterozygote und 43 (17%) Homozygote für die Mutante. Dementsprechend liegen die Allelfrequenzen bei 0,594 für das Wildtyp- und 0,406 für das mutante Allel.

Auch der *Bfr1*-Polymorphismus wurde bei 202 Patienten mit kolorektalen Karzinomen untersucht. 62 (30%) der Patienten sind Wildtypen, 90 (45%) heterozygote Typen und bei 50 (25%) ergab sich die homozygote Mutante. Für die Allelfrequenz bedeutet das 0,470 für das Wildtyp-Allel und 0,530 für das mutante Allel.

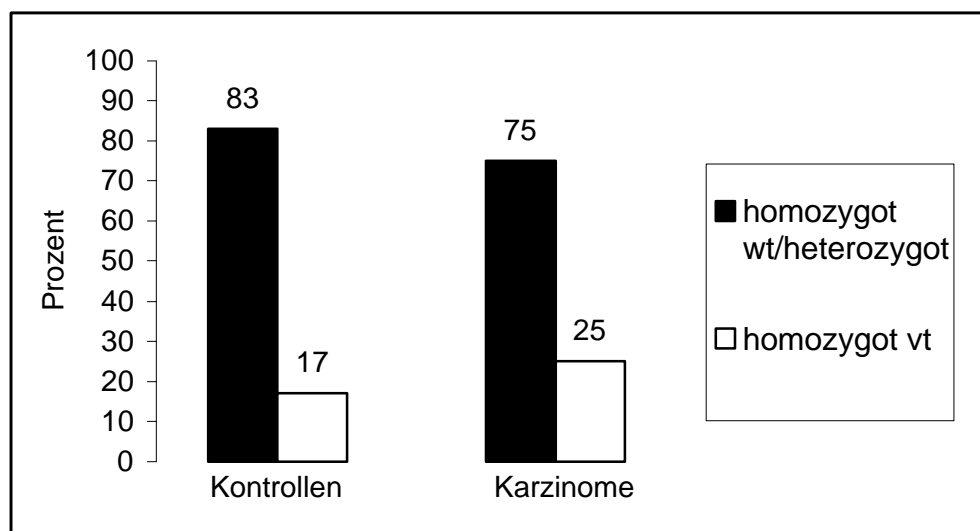
Abb. 3.6: Genotypverteilung des *Bfr1* Polymorphismus in Kontrollen und kolorektalen Karzinomen



Wenn man die Gruppe der homozygot-mutanten Individuen denen der Wildtypen zusammen mit den Heterozygoten gegenüberstellt, ergibt sich folgende Verteilung für den *Bfr1* Polymorphismus:

Von den 250 Kontrollen weisen 207 (83%) entweder einen Wildtyp oder eine Heterozygotie auf, 43 (17%) eine homozygote Mutante. Bei den Patienten mit kolorektalen Karzinomen sind 152 (75%) der Individuen Wildtyp oder heterozygot und 50 (25%) Mutanten.

Abb.3.7: Genotypverteilung des *Bfr1* Polymorphismus in Kontrollen und kolorektalen Karzinomen – Wildtyp/Heterozygote versus varianter Typ



3.2.4 Genotyphäufigkeiten der verschiedenen Polymorphismen

Die Genotyphäufigkeiten der verschiedenen Polymorphismen sind noch einmal in Tabelle 3.1 zusammengetragen.

Es zeigt sich, dass in Bezug auf den *Msp1* Polymorphismus und dem IVA kein signifikant erhöhtes Risiko besteht, an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken.

Demgegenüber finden sich beim *Bfr1* Polymorphismus vermehrt homozyote Mutanten in der Gruppe der Patienten mit kolorektalen Karzinomen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Rechnerisch werden 34 homozygote Mutanten erwartet, tatsächlich sind es 50. Das relative Risiko (Odds ratio) beträgt 1,58, das bedeutet ein 1,58fach erhöhtes Risiko gegenüber Personen mit einem Wildtyp oder einem heterozygoten Typ an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 4,9% ($p=0,049$) ist dieses Ergebnis statistisch signifikant.

Tab. 3.1: Genotypfrequenzen in Kontrollen und kolorektalen Karzinomen

	Kontrollen (n=250)			Kolorektale Karzinome (n=202)			Odds ratio (95%CI)	p-Wert
	wt/wt	wt/vt	vt/vt	wt/wt	wt/vt	vt/vt		
CYP 1A1 <i>Msp1</i>	0,81	0,17	0,02	0,85	0,14	0,01	0,78 (0,47-1,30)	0,285
CYP 1A1 IVA	0,92	0,07	0,01	0,93	0,06	0,01	0,73 (0,35-1,53)	0,878
CYP 1B1 <i>Bfr1</i>	0,36	0,47	0,17	0,30	0,45	0,25	1,58 (1,00-2,50)	0,049

4 Diskussion

4.1 Cytochrom P450 1A1 und 1B1 Polymorphismen - Suszeptibilität für kolorektale Karzinome

Die individuelle Suszeptibilität für Krebserkrankungen resultiert aus einem Zusammenspiel von genetischen Faktoren wie Unterschieden des Metabolismus, der DNA-Reparaturmechanismen, variierenden Expressionen von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen und Ernährungs- und Umweltfaktoren. Viele Kanzerogene erfahren eine metabolische Aktivierung durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme bevor sie an die DNA binden und zu Mutationen führen. Variationen innerhalb dieser individuellen Faktoren spielen eine wichtige Rolle. Diese phänotypischen metabolischen Variationen sind verbunden mit genetischen Polymorphismen. Welche Bedeutung in diesem komplexen Kreis einzelnen Enzym polymorphismen zukommen, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur schwer abgeschätzt werden und ist Gegenstand der gegenwärtigen Forschung (Bartsch et al., 1996).

Bei der Betrachtung der Polymorphismen in Zusammenhang mit den kolorektalen Karzinomen sollte zunächst auf Differenzen in der Häufigkeit zwischen verschiedenen Populationen eingegangen werden.

Populationsspezifische Unterschiede in der Häufigkeit der Enzym polymorphismen sind bekannt. Es fanden sich in Studien mit asiatischen Populationen höhere Allelfrequenzen für den *Msp1* und den Ile/Val Polymorphismus des CYP 1A1 im Vergleich zu europäischen Kollektiven.

Die Tabellen 4.1 und 4.2 geben Übersichten aus der aktuellen Literatur.

Tabelle 4.1: Populationspezifische Unterschiede des CYP1A1 *Msp1*
Polymorphismus in gesunden Kollektiven

Population	n	Allelfrequenz Wildtyp	Allelfrequenz Mutante	Referenz
Deutschland	250	0,896	0,104	eigenes Kollektiv
Japan	135	0,668	0,332	Hayashi et al. 1991
Norwegen	212	0,885	0,115	Tefre et al. 1991
Finnland	242	0,88	0,12	Hirvonen et al. 1992
Deutschland	171	0,927	0,073	Drakoulis et al. 1994
Japan, Hawaii, Kaukasier	47	0,649	0,351	Sivaraman et al. 1994
Japan	160	0,709	0,291	Nakachi et al. 1995
Belgien	81	0,883	0,117	Jacquet et al. 1996
Massachusetts, USA (Kaukasier)	283	0,908	0,092	Xu et al. 1996
Japan	142	0,665	0,335	Sato et al. 1999
China (nur Frauen)	145	0,607	0,393	Huang et al. 1999

Tabelle 4.2: Populationspezifische Unterschiede des CYP1A1 *Ile/Val*
Polymorphismus in gesunden Kollektiven

Population	n	Allelfrequenz Wildtyp	Allelfrequenz Mutante	Referenz
Deutschland	250	0,96	0,04	eigenes Kollektiv
Japan	135	0,753	0,247	Hayashi et al. 1991
Finnland	242	0,95	0,05	Hirvonen et al. 1992
Deutschland	171	0,968	0,032	Drakoulis et al. 1994
Großbritannien	245	0,931	0,069	Cantlay et al. 1995
Japan	358	0,802	0,198	Kawajiri et al. 1995
Japan	160	0,806	0,194	Nakachi et al. 1995
Japan	240	0,798	0,202	Oyama et al.
Japan	185	0,735	0,265	Sugimura et al. 1998
Japan	164	0,799	0,201	Morita et al. 1999
China (nur Frauen)	145	0,734	0,266	Huang et al. 1999

Beim CYP1B1 *Bfr1* Polymorphismus scheint es keine populationspezifischen Unterschiede zu geben, die Datenlage lässt zur Zeit jedoch kein entgültiges Ergebnis zu. In Tab. 4.3 sind die verfügbaren Arbeiten zusammengefasst.

Tabelle 4.3: Populationsspezifische Unterschiede des CYP1B1 *Bfr1* Polymorphismus in gesunden Kollektiven

Population	n	Allelfrequenz Wildtyp	Allelfrequenz Mutante	Referenz
Deutschland	250	0,594	0,406	eigenes Kollektiv
Türken, Kaukasier	70	0,643	0,357	Stoilov et al. 1997
Kaukasier, Afroamerikaner (nur Frauen)	164 59	0,591 0,305	0,409 0,695	Bailey et al 1998
China (nur Frauen)	200	0,462	0,538	Zheng et al. 2000

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Häufigkeit der CYP1A1 *Msp1* und Ile/Val Polymorphismen einer Gruppe von Kaukasiern mit kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu einem Kontrollkollektiv. 1994 veröffentlichten Sivaraman et al. eine Studie, in der zum ersten Mal die Häufigkeiten der CYP1A1 *Msp1* und Ile/Val Polymorphismen bei Patienten mit in situ kolorektalen Karzinomen mit einem Kontrollkollektiv verglichen wurden. Dabei stellten sie in zwei der drei untersuchten ethnischen Gruppen (Japaner und Hawaiianer) signifikante Häufigkeitsunterschiede im Vergleich der Patienten mit kolorektalen Karzinomen und der Kontrollgruppen heraus. In der kaukasischen Gruppe konnte keine signifikante Differenz beschrieben werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Rolle der Enzym polymorphismen bei der Entstehung kolorektaler Tumoren. Zugleich gingen die Autoren auf die Unterschiede zwischen den ethnischen Gruppen ein. Dass bei Kaukasiern kein signifikantes Resultat im Vergleich des CYP1A1 *Msp1* bzw. Ile/Val Polymorphismus erzielt wurde, stimmt mit den hier gefundenen Ergebnissen überein. Es muss jedoch die geringere Frequenz der Genpolymorphismen bei Kaukasiern im Vergleich zu Japanern/Polynesiern insofern berücksichtigt werden, dass dies bei den bestehenden Kollektivgrößen die statistische Aussage limitiert und größere Kollektive notwendig sind, um endgültige Angaben zu treffen.

Eine alternative Erklärung für diese Diskrepanz zwischen kaukasischen und asiatischen Kollektiven gaben Wedlund et al. (1994). Sie halten ein Ungleichgewicht mit einer anderen Mutation, die wichtig für die CYP 1A1 Induktion ist, für möglich, während diese Mutationen in der kaukasischen Population im Gleichgewicht sind.

Die Theorie, dass Polymorphismen fremdstoffmetabolisierende Enzyme die Suszeptibilität für Karzinome, insbesondere kolorektale Tumoren erhöhen, wird durch Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung in Bezug auf den CYP 1B1 *Bfr1* Polymorphismus unterstützt. Es fand sich der Enzym polymorphismus signifikant häufiger bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen als bei Personen in einer gesunden Kontrollgruppe.

Taioli et al. (1995) definierten die Bedeutung der Polymorphismen anders insofern, als dass sie von einer Suszeptibilität nicht für Karzinomerkrankungen sondern für die Effekte der Umwelteinflüsse sprechen. Es bestehe zwar ein erhöhtes Risiko bei Personen mit bekannten Enzym polymorphismen, aber nur dann, wenn sie auch den Kanzerogenen ausgesetzt sind. So sei ein gewisses Maß an Prävention möglich. Ob in der jeweiligen Alltagssituation eine wirkliche Vermeidung der kanzerogenen Stoffe, die zum Teil ubiquitär vorhanden sind, realisierbar ist, sei dahingestellt. Zum anderen muss die Frage gestellt werden, ob eine breite Testung der Bevölkerung und Einteilung in eine „High-“ und „Low-Risk-Group“ zum jetzigen Zeitpunkt praktikabel sind.

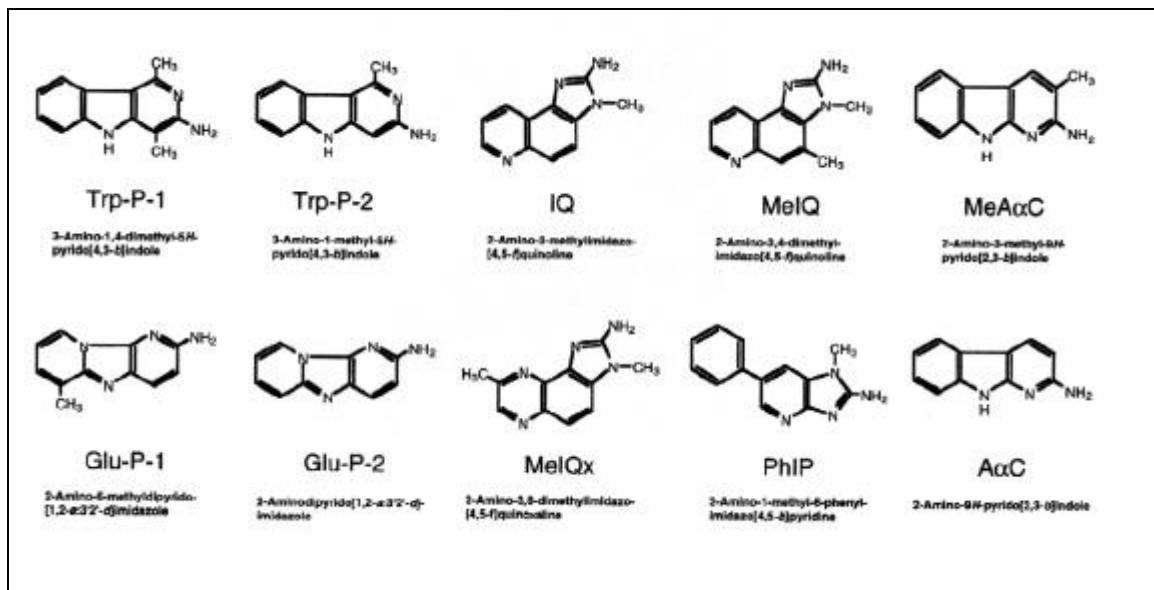
4.2 Heterozyklische Amine und andere Umweltkanzerogene und ihre Rolle bei der Entstehung kolorektaler Karzinome

Die Vorstellung, dass Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme das Risiko an Krebs zu erkranken beeinflussen, stützt sich darauf, dass diese auf den Metabolismus aufgenommener potentieller Kanzerogene Einfluss nehmen. Man geht davon aus, dass sie vermehrt kanzerogene Zwischenmetabolite entstehen lassen und dadurch das Krebsrisiko erhöhen. Zu den wichtigsten Xenobiotika in diesem Zusammenhang gehören die heterozyklischen Amine.

Heterozyklische Amine werden als kanzerogen eingestuft. Sie werden in zwei Gruppen eingeteilt. Der Imidazol-Typ besitzt einer Amino-Gruppe an Position 2 des Imidazol-Ringes, während der Non-Imidazol-Typ eine Amino-Gruppe am Pyridin-Ring aufweist. Sie können durch Nitrite unter sauren Bedingungen getrennt werden. Der Imidazol-Typ behält seine Mutagenität im Gegensatz zum Non-Imidazol-Typ. Studien zeigen, dass hauptsächlich der Imidazol-Typ in Nahrungsmitteln vorhanden ist (Adamson et al. 1996).

Abbildung 4.1 zeigt die Strukturformeln der wichtigsten kanzerogenen heterozyklischen Amine (Nagao, 1999).

Abb. 4.1: Strukturformeln der wichtigsten kanzerogenen heterozyklischen Amine (nach Nagao, 1999)



Felton et al. (1997) nannten die vier wichtigsten Parameter, die das Krebsrisiko durch heterozyklische Amine beeinflussen: Dosis, Metabolismus, karzinogene Potenz und Epidemiologie.

Die Dosis und Epidemiologie hängen im Wesentlichen von den Ernährungsgewohnheiten des Individuums ab, vom konsumierten Lebensmitteltyp, von der Zubereitung und von der Menge. Darauf wird in den nächsten Kapiteln ausführlicher eingegangen. Es wird vermutet, dass die Metabolisierung durch fremdstoffmetabolisierende Enzyme zu kanzerogenen Zwischenprodukten bei menschlichen Individuen im Vergleich zu Nagetieren zu einem größeren genotoxischen Effekt führt. Die karzinogene Potenz der heterozyklischen Amine ist bei Nagern bewiesen. Thorgeirsson et al. (1996) zeigten bei Affen eine Induktion von Lebertumoren durch IQ.

Sasaki et al. (1998) zeigten in ihrer Arbeit eine kolonspezifische Genotoxizität der heterozyklischen Amine Trp-P-2, IQ, MeIQ, MeIQx und PhIP bei Mäusen, denen diese Stoffe intraperitoneal injiziert wurden.

Im Tierversuch verursachten heterozyklische Amine Karzinome insbesondere der Leber und des Darms. Tabelle 4.4 zeigt eine Übersicht (Sugimura, 1997).

Tabelle 4.4: Übersicht über Karzinogenese der HA im Tierversuch (Sugimura, 1997)

Heterozyklisches Amin	Spezies	Konzentration in %	Zielorgane	Publikationsjahr
Trp-P-1	Ratte	0,015	Leber	1985
	Maus	0,02	Leber	1981
Trp-P-2	Ratte	0,01	Leber	1993
	Maus	0,02	Leber, Blase	1981
Glu-P-1	Ratte	0,05	Leber	1984
	Maus	0,05	Leber, Dünn-& Dickdarm ,...	1984
Glu-P-2	Ratte	0,05	Leber, Dünn-& Dickdarm ,...	1984
	Maus	0,05	Leber, Gefäße	1984
AáC	Maus	0,08	Leber, Gefäße	1984
MeAáC	Ratte	0,02/0,01	Leber	1984
	Maus	0,08	Leber, Gefäße	1984
IQ	Ratte	0,03	Leber, Dünn-& Dickdarm ,...	1984
	Maus	0,03	Leber, Haut,...	1984
MeIQ	Ratte	0,03	Dickdarm , Brust, Haut,...	1989
	Maus	0,04/0,01	Leber,...	1986
MeIQx	Ratte	0,04	Leber, Haut,...	1988
	Maus	0,06	Leber, Lunge, Blut	1987
PhIP	Ratte	0,04	Dickdarm , Brust	1991
	Maus	0,04	Lymphgewebe	1989

Fremdstoffe, die kovalent an Basen der DNA binden und als Addukte bezeichnet werden, sind Gegenstand vieler Studien, in denen Krankheitsrisiken in Abhängigkeit von der Exposition abgeschätzt werden sollen. Auch kolonspezifische DNA-Addukte werden betrachtet. Umemoto et al. untersuchten 1994 Kolonmukosa von Neugeborenen, deren Exposition durch Umweltkanzerogene minimal ist, und normale Kolonmukosa von Erwachsenen mit kolorektalen Tumoren. Sie fanden ein mukosaspezifisches Addukt, welches bei den Neugeborenen nicht nachweisbar war und unterstützten so die These der Umweltabhängigkeit der kolorektalen Tumoren. Pfohl-Leszkowicz et al. berichteten 1995, dass signifikant höhere Level von DNA-Addukten in Kolonmukosa von Patienten mit kolorektalen Karzinomen im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden wurden. MeIQx-DNA-Addukte und PhIP-DNA-Addukte wurden in menschlicher Kolonmukosa festgestellt (Totsuka et al. 1996, Friesen et al. 1994).

Nagao fasst in seiner Arbeit von 1999 zusammen, dass das Level der DNA-Addukte jedoch nicht direkt mit der mutagenen Frequenz oder gar der Karzinom-Inzidenz korreliert. Hier müssen noch andere Faktoren wie Zellteilungsrate und spezifische Zellkinetik sowie Zahl der genetischen Veränderungen bis zur Krebsentstehung miteinbezogen werden.

Auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wurden im Hinblick auf die Karzinogenese des Kolons und des Rektums untersucht. Auch sie gehören zu den Substraten der Cytochrome P450 1A1 und 1B1. Die als promutagen eingestufteten Anti-BPDE-DNA Addukte ((+)-r-7,t-8-dihydroxy-t-9,10-oxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene Addukte) wurden von Alexandrov et al. in menschlicher Kolonmukosa entdeckt und als Risikofaktor für Karzinomentstehung gewertet (1996).

Ebenso wurden N-Nitroso-Verbindungen hinsichtlich ihres Risikos zur Entstehung kolorektaler Karzinome betrachtet. Diese finden sich in Nahrungsmitteln wie gepökeltem Fisch oder Fleisch, aber auch nach dem Räuchern oder Grillen über offenem Feuer. In einer Follow-up Studie zeigten Knekt et al. 1999 ein signifikant erhöhtes Risiko in einer Population mit vermehrter Aufnahme von N-Nitrosodimethylamin (NDMA) in Form von gesalzenem bzw. geräuchertem Fisch, nicht signifikant, aber auch erhöht bei Fleisch.

4.3 Heterozyklische Amine im Rahmen des Kochprozesses

Heterozyklische Amine entstehen bei der Pyrolyse (= Zersetzung von Stoffen durch Hitze) insbesondere von Fleisch und Fisch (80%). Die Basis für die mutagene Aktivität von Muskelfleisch ist sein Gehalt an Kreatin und an freien Aminosäuren und Zuckern. Die Menge der entstehenden kanzerogenen Amine ist sehr von der Zubereitungsart der Lebensmittel abhängig. Skog et al. (1995) untersuchten, wie sehr die Temperatur auf die Formation von heterozyklischen Aminen Einfluss nimmt. Sie stellten eindeutig fest, dass insbesondere PhIP-, MeIQx- und DiMeIQx-Entstehung mit der Erhöhung der Kochtemperatur ansteigen und betonten ausdrücklich die Konzentration der Kanzerogene im Pfannrückstand und in der Kruste des Fleisches. Generell entstehen mehr heterozyklische Amine, je länger das Fleisch den Temperaturen ausgesetzt ist. Der Zusatz von Fett wird insofern diskutiert, als dass ab einem gewissen Zeitpunkt des Kochens die Konzentration der heterozyklischen Amine als Folge eines chemischen Effektes zunimmt (Skog et al. 1998).

Die relative mutagene Aktivität der verschiedenen Kochprozesse ist nicht gleich. So entstehen beim Braten und Grillen mehr mutagene Substanzen als beim Dünsten, Schmoren, Sieden oder Pochieren. Mikrowellen-gekochtes Fleisch hat generell niedrige Konzentrationen an heterozyklischen Aminen. Auch die verschiedenen Fleischarten verhalten sich nicht identisch. Huhn- und Rindfleisch zeigten eine höhere Mutagenität als Fisch. Von den verschiedenen heterozyklischen Aminen wird bei der Betrachtung der Risiken durch Ernährung das PhIP hervorgehoben (Layton et al. 1995).

Insgesamt kann festgestellt werden, dass die Aufnahme von heterozyklischen Aminen durch die Nahrung eine Funktion der Kochmethode, des Garzustandes und der Konsumfrequenz ist (Keating et al. 1999).

Obwohl es feststeht, dass heterozyklischen Amine eine kanzerogene Wirkung haben und dass verschiedene Kochprozesse die Konzentration in den Lebensmitteln erhöhen, ist es dennoch schwierig, eine konkrete Risikoabschätzung zu treffen. In „The Lancet“ wurde 1999 eine Arbeit aus Schweden (Augustsson et al.) publiziert, in der in einer epidemiologischen Studie die abgeschätzte tägliche Aufnahme von heterozyklischen Aminen mit verschiedenen Krebserkrankungen, unter anderem kolorektalen Karzinomen, korreliert wurde. Es ergab sich kein signifikantes Ergebnis. Dennoch räumten die Autoren ein erhöhtes Risiko bei Patienten mit sehr hohen Dosen ein. Die Frage, ob die durchschnittliche Ingestion der heterozyklischen Amine im Rahmen der „Western-diet“ zu einem erhöhten Krebsrisiko führt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig beantwortet werden, Schwellenwerte existieren nicht.

4.4 Kolorektale Karzinome und Ernährungsgewohnheiten

Um generell die Kanzerogenität der Xenobiotika beim Menschen abzuschätzen, bedient man sich epidemiologischer Studien. Sie zielen auf die Ernährungsgewohnheiten der Patienten bzw. Probanden ab.

In Übereinstimmungen mit den bisherigen Ausführungen fanden Wissenschaftler heraus, dass ein zunehmendes Risiko für kolorektale Karzinome assoziiert ist mit häufigem Genuss von gebratenem Fleisch. Dabei steigt das Risiko, je dunkler das Fleisch gebraten ist (Schiffman, 1990, Gerhardsson de Verdier et al., 1991). Andere Studien berichten ebenfalls über ein erhöhtes Risiko bei regelmäßigem Fleischkonsum, ohne jedoch explizit auf die Zubereitungsart einzugehen (Young et al. 1988, Benito et al., 1990, Giovannucci et al. 1994, Le Marchand et al. 1997, Hsing et al. 1998).

Zu erwähnen ist, dass nicht alle Untersuchungen diese Ergebnisse unterstützen. Studien aus den USA, Norwegen und Italien kommen zu dem Schluss, dass es keine signifikante Korrelation zwischen der Frequenz und Art des Fleischkonsums und dem Auftreten kolorektaler Karzinome gibt (Lyon et al. 1988, Gaard et al. 1996, Franceschi et al. 1997).

Wilmink (1997) fasst zusammen, dass in einer Meta-Analyse der Anteil der Studien, in der ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome in Zusammenhang mit Fleisch und Fettkonsum gesehen wurden, doppelt so hoch war im Vergleich zu den Arbeiten, die diese Korrelation verneinten. Insgesamt wird es in Zukunft wichtig sein, die für die Kanzerogenese verantwortlichen Faktoren auch in epidemiologischen Studien klarer zu definieren. Große, prospektive Kohorten-Studien sind nötig, um definitive Antworten zu erhalten. Dabei sollten andererseits die allgemeinen, prinzipiellen Muster der Ernährungsgewohnheiten nicht aus den Augen verloren werden.

Denn nicht nur Fleischgenuss, sondern auch Konsum von Gemüse, und Getreiden sind Gegenstand der Betrachtungen. In einer Studie von 1996 fand man eine inverse Korrelation zwischen dem Konsum von Gemüse und Getreiden und dem Auftreten kolorektaler Karzinome (Witte et al.). Dies deckt sich mit anderen Studienergebnissen, so dass festgestellt werden kann, dass der Genuss von Gemüse und Getreide anscheinend protektiv auf die Entstehung kolorektaler Karzinome wirkt (Caygill et al. 1998).

Abschließend sollte die Vielschichtigkeit der Epidemiologie der kolorektalen Tumoren deutlich gemacht werden, denn nicht nur die Ernährungsgewohnheiten gehören dazu. So gibt es auch Anzeichen dafür, dass Adipositas, eine positive Familienanamnese, Obstipation und Einnahme von Laxantien das Risiko zu erkranken erhöhen, während das Risiko durch Einnahme von nicht-steroidalen Antirheumatika und regelmäßige Körperaktivität (gilt nicht für Rektum-Karzinome) verringert werden soll (Thune et al., 1996, Schiff et al. 1997, Ghadirian et al. 1998).

4.5 Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme und Suszeptibilität für Karzinom-erkrankungen

Polymorphismen fremdstoffmetabolisierender Enzyme werden nicht nur im Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen betrachtet. Auch andere Krebserkrankungen sind Gegenstand der Forschung.

Zu Beginn der Vermutungen, dass Polymorphismen der Cytochrome P450 die Suszeptibilität für Karzinome erhöhen können, stand die Betrachtung der Bronchialkarzinome im Zusammenhang mit dem Tabakkonsum. Bartsch et al. (2000) fassten mehr als zwanzig Studien zusammen und kommen zu einem heterogenen Ergebnis. Während frühe japanische Studien signifikante Korrelationen zwischen Enzym polymorphismen des Cytochrom P450 1A1 (*Msp1*, Ile/Val) und der Entstehung von Bronchialkarzinomen beschrieben, blieben die Signifikanzen in Studien mit Kaukasiern weitgehend aus. Als wahrscheinliche Begründung wird auch hier die niedrige Prävalenz der Polymorphismen bei Kaukasiern genannt. In amerikanischen Studien mit gemischter Population ergab sich ein erhöhtes Risiko für Lungenkrebs bei Patienten mit Enzym polymorphismen. Während eine koreanische Studie eine Signifikanz beschrieb, blieb sie überraschenderweise in einer chinesischen Population aus. Ein signifikant erhöhtes Risiko zur Entwicklung von Lungenkrebs fand sich in mehreren Studien durch eine Kombination von Enzym polymorphismen, dem CYP 1A1 *Msp1* oder Ile/Val und dem Phase 2 Enzym Glutathion-S-Transferase GSTM1(0/0).

Bei Kopf-Hals-Tumoren und Ösophaguskarzinomen ergab sich in einigen asiatischen Studien eine signifikante Korrelation mit den genannten CYP 1A1 Polymorphismen. Auch hier ist die Kombination der CYP 1A1 Polymorphismen mit dem GSTM1(0/0) Polymorphismus risikosteigernd.

Zusammengefasst ergibt sich eine Tendenz, welche einen Zusammenhang zwischen CYP 1A1 *Msp1* und Ile/Val Polymorphismen und Bronchialkarzinomen, Kopf-Hals-Tumoren und Ösophaguskarzinomen insbesondere tabakassoziiert vermuten lässt. Diese bedarf der Klärung durch Untersuchungen mit größeren Populationen in der Zukunft.

Karzinome der weiblichen Brust sind ebenfalls im Hinblick auf Polymorphismen des Cytochrom P450 1A1 und 1B1 betrachtet worden, denn diese Enzyme nehmen auch am Östrogenstoffwechsel teil. Es ist nachgewiesen, dass CYP 1B1 und in geringerem Maße auch CYP 1A1 in Brustkrebszellen exprimiert werden. Insbesondere dem CYP 1B1 kommt hier eine Bedeutung zu, da es im Vergleich zu CYP 1A1 vermehrt 17 α -Estradiol an der C4 Position hydroxyliert. Dieser Metabolit ist an der östrogen-induzierten Karzinogenese der weiblichen Brust beteiligt (McKay et al. 1995, Spink et al. 1998). Studien zeigten eine signifikante Korrelation zwischen dem homozygoten *Msp1* Polymorphismus des CYP 1A1 und Brustkrebs bei chinesischen postmenopausalen und bei afro-amerikanischen Frauen, während bei Kaukasierinnen keine Signifikanz bestand (Taioli et al. 1995, Huang et al. 1999). Auch Untersuchungen des CYP 1B1 Polymorphismus zeigten keine einheitlichen Ergebnisse, so dass bei kaukasischen und afroamerikanischen Frauen keine, in einer Studie mit Chinesinnen jedoch eine Signifikanz im Sinne eines erhöhten Brustkrebsrisikos der Patientinnen mit (C/C) Genotyp gefunden wurde (Bailey et al. 1998, Zheng et al. 2000).

Auch andere fremdstoffmetabolisierende Enzyme werden im Hinblick auf ihre Bedeutung für die Suszeptibilität für Karzinomerkrankungen untersucht. Als Beispiel sei hier das Phase 2 Enzym N-Acetyltransferase genannt, das beim Menschen in zwei Formen existiert (NAT1 und NAT2). Die Enzyme sind in ihrer Struktur verwandt, haben jedoch unterschiedliche Substrate. Zum Beispiel acetyliert NAT1 para-Aminobenzoesäure oder para-Aminosalicylsäure, während NAT2 zu seinen Substraten Isoniacid, Procainamid und Dapson zählt. Die Enzymaktivitäten werden durch Kombinationen von sieben Punktmutationen bestimmt, die sich phänotypisch zwischen langsam- und schnellacetylierend unterscheiden. Minchin et al. (1993) wiesen das polymorphe Enzym in menschlichem Kolonepithel nach und zeigten, dass es in der Lage ist, adduktbildende Metabolite von heterozyklischen Aminen zu bilden. Roberts-Thomson et al. (1996) zeigten, dass die Schnellacetylierer ein erhöhtes relatives Risiko zur Adenom- und Karzinomentstehung des Kolons haben.

4.6 Phänotypische Bedeutung der Polymorphismen von CYP 1A1 und 1B1

Die phänotypische Bedeutung der Polymorphismen im Fremdstoffmetabolismus ist im Wesentlichen noch unklar.

Für kaukasische Populationen scheinen die CYP 1A1 Polymorphismen wegen ihrer sehr niedrigen Frequenz einen eher geringen Einfluss zu haben.

Es wird vermutet, dass der *Msp1* Polymorphismus des CYP 1A1 eine erhöhte Induzierbarkeit durch Fremdstoffe oder eine erhöhte katalytische Aktivität besitzt, so dass potentiell mehr kanzerogene Metabolite entstehen könnten (Bartsch et al., 2000).

Der IVA Polymorphismus des CYP 1A1 befindet sich in der häm-bindenden Region des Enzyms und hat eine zweifache Erhöhung der mikrosomalen Enzymaktivität zur Folge. Vermutlich wird zusätzlich die Aktivität der Aryl Hydrocarbon Hydroxylase durch den Aminosäureaustausch verstärkt (Kawajiri et al. 1993). Auch eine Verbindung zu einem anderen funktionellen Polymorphismus mit regulatorischem Einfluss auf die Induktion wird diskutiert (Bartsch et al., 2000).

In einem japanischen Kollektiv konnte gezeigt werden, dass bei Rauchern, die beide CYP 1A1 Polymorphismen aufwiesen und bei denen zusätzlich eine Deletion des GSTM1-Genes vorlag ein neunfach höheres Risiko für Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 im Vergleich zu Rauchern mit dem Wildtyp-Genen besteht (Kawajiri et al., 1996).

Neueste Erkenntnisse hinsichtlich des CYP 1B1 Polymorphismus *Bfr1* ergaben, dass der Austausch Val432 zu Leu mit einem dreifachen Anstieg des K_m Wertes für die 2- und 4-Hydroxylation des Estradiols assoziiert war (Li et al., 2000). Ob der bezeichnete Polymorphismus eine erhöhte Suszeptibilität für den weiblichen Brustkrebs bedingt, ist jedoch unklar.

Metabolismusstudien zeigten, dass Val432Leu mit einer geringen Erhöhung der katalytischen Aktivität im Hinblick auf bestimmte PAH und HA einhergeht (Shimada et al., 1999). Die für die Entstehung kolorektaler und anderer Tumoren wichtigen Prokarzinogene müssen daher noch identifiziert und die Bedeutung des CYP 1B1 Polymorphismus *Bfr1* geklärt werden.

4.7 Ausblick

Das immer wieder geschilderte Problem der zu kleinen Kollektivgrößen verursacht insbesondere im Hinblick auf die kaukasischen Populationen Interpretationsschwierigkeiten und eine Verringerung der Aussagekraft der durchgeführten Studien. Dabei kommt es sicherlich auf die Gewinnung einer entsprechenden Anzahl von Probanden und Patienten an, nicht zu vernachlässigen ist jedoch auch die zeitaufwendige laborchemische Aufarbeitung des Materials.

Einen Blick in die Zukunft werfen Brüning et al. (1999) und Harth et al. (2000), die die Real-time PCR beschreiben. Die Methode verbindet Bearbeitung der Proben und schnelle Analyse der Resultate. Sie basiert auf einer Sonden-Hybridisierung und FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer). Es werden Akkumulationsprodukte während der DNA Amplifikation sichtbar gemacht und Schmelzkurven der amplifizierten Produkte analysiert. Die anschließende Sequenzierung zeigt eine 100 prozentige Identifikationsrate der Light-Cycler-Technik verglichen mit der direkten DNA-Sequenzierung. 32 Proben können in einer Zeit von 60 Minuten komplett analysiert werden. Die Daten wurden zudem verglichen mit der RFLP-Methode. Es zeigten sich eine Abweichung von 5%, die nach weiteren Sequenzierungen durch Fehler (inkomplette Verdauung) der herkömmlichen Methode verursacht waren.

Eine neue Methode, Enzymproteine in verschiedenen Geweben nachzuweisen, entwickelten Tang et al. (1999). Sie erzeugten einen Antikörper, der im Sinne der Immunodetektion CYP 1B1 in mehreren menschlichen Geweben nachweisen konnte. Diese Methode ist hochspezifisch und sensitiv.

Durch diese neuen Verfahren wird es möglich sein, die Erforschung der Enzym polymorphismen in kurzer Zeit schnell voranzutreiben, so dass die vielen noch offenen Fragen hinsichtlich der Bedeutung für das Individuum in der Zukunft sicherlich beantwortet werden können.

5 Zusammenfassung

Die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme der Cytochrom P450 Familie können durch Enzym polymorphismen die Suszeptibilität für Erkrankungen oder gegenüber Chemikalien erhöhen.

Es wurden zwei Polymorphismen des Cytochrom P450 1A1 (*Msp1* und IVA) und ein Polymorphismus des Cytochrom P450 1B1 (*Bfr1*) hinsichtlich ihrer Häufigkeiten bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen verglichen mit einem Kontrollkollektiv untersucht. Dabei wurden die Polymorphismen mittels Genotypisierung mit Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen und der Polymerase-Ketten-Reaktion nachgewiesen.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Bezüglich des *Msp1*-Polymorphismus des CYP 1A1 resultiert in der Kontrollgruppe (n=250) eine Allelfrequenz für das mutante Merkmal von 0,104 und in der Gruppe der Patienten mit kolorektalen Karzinomen (n=202) eine Frequenz von 0,082. Es ergab sich keine Signifikanz hinsichtlich der Häufigkeitsunterschiede.
2. Für den IVA-Polymorphismus des CYP 1A1 wurde in der Kontrollgruppe (n=250) das mutante Allel mit einer Frequenz von 0,04 gefunden, während die Allelfrequenz in der Gruppe der Patienten mit kolorektalen Karzinomen (n=202) 0,035 betrug. Auch hier war die Häufigkeit der Polymorphismen nicht signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe.
3. Der *Bfr1*-Polymorphismus des CYP 1B1 zeigte Allelfrequenzen von 0,594 für das Wildtyp-Allel und 0,406 für das mutante Allel in der Kontrollgruppe (n=250) und Frequenzen von 0,470 bzw. 0,530 in der Gruppe der Patienten mit kolorektalen Karzinomen (n=202). Betrachtet man hier die homozygot-mutanten Individuen in beiden Gruppen, so ergibt sich eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl bei den Patienten mit kolorektalen Karzinomen (p=0,049, OR=1,58).

Die Ergebnisse wurden in Zusammenhang mit der Ingestion von Umweltkanzerogenen im Rahmen der Ernährungsgewohnheiten diskutiert und mit der aktuellen Literatur korreliert.

6 Materialien

6.1 Geräte und Chemikalien

6.1.1 Geräte

Sterile Werkbank	Gelaire BSB6A, Flow Laboratories
Wasser-Deionisierung	Milli-Q, Millipore
Gefrierschrank	UF85-300S, Colora
Wasserbad	Gerhardt Schüttelwasserbad
SW20	
Zentrifuge	Beckman Model J-6B Centrifuge
Tischzentrifugen	Typ 5415 C, Eppendorf
	Typ 5417 R, Eppendorf
Spektrophotometer	GeneQuant II Pharmacia Biotech
Robo Cycler Gradient 40	Stratagene, La Jolla, USA
Inkubationsschrank	Typ B 5060 Ek-CO ₂ , Heraeus
Gelelektrophoresekammer	BioRad
Speed Vac Konzentrator	Bachofer
Thermocycler	OmniGene, Hybaid
DNA-Synthesizer	Model 391, Applied BioSystems

6.1.2 Verbrauchsmaterial und Zubehör

Mikrosedimentationsröhrchen	Sarstedt
Reaktionsgefäße, 1,5ml	Eppendorf
dünnwandige Reaktionsgefäße	Biozym

6.1.3 Chemikalien und Enzyme

Agarose	Biorad
PCR-Molekular Weight Marker MW: 1.000 bp bis 50 bp	USB
Restriktionsenzyme <i>Msp1</i> und <i>Hind2</i>	Boehringer Mannheim
Restriktionsenzym <i>Bfr1</i>	Boehringer Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer Mannheim

6.2 Kits

QIAamp Blood Maxi Kit	Qiagen
-----------------------	--------

6.3 Lösungen und Puffer

für die Agarosegelelektrophorese

10x TBE, pH 8,0	0,9 M Tris
	0,9 M Borsäure
	0,02 M EDTA
6x Ladungspuffer	30% (v/v) Glycerol, 0,2% (w/v) Bromphenolblau, ,2% (w/v) Xylen-Cyanol

6.4 Chemikalien für die Oligonukleotidsynthese

Acetonitril, wasserfrei	Lab-Scan
Aktivator	MWG-Biotech
0,45 M Tetrazol in Acetonitril	
Ammoniumhydroxid, 99,9%	Alkrich
Argon	Messer-Griesheim

Cap-Mix A	MWG-Biotech
THF/Lutidin/Acetanhydrid, 8:1:1	
Cap-Mix B	
10% N-Methylimidazol in THF	
Blockierungsreagenz	MWG-Biotech
3% TCA	
Oxidations-Lösung	MWG-Biotech
0,05 M I ₂ in THF/H ₂ O/Pyridin (7:2:1)	
p-Toluolsulfonsäure	Merck
Phosphoramidite, dA, dC, dT, dG	MWG-Biotech
Polystyrol-Säulen (40 mMol)	Applied-Biosystem
A ^{bz} , G ^{ib} , C ^{ib} , T	

7 Referenzen

- 1) Adamson RH, Thorgeirsson UP, Sugimura T (1996) Extrapolation of heterocyclic amine carcinogenesis data from rodents and nonhuman primates to humans. Arch Toxicol Suppl 18:303-18
- 2) Alexandrov K, Rojas M, Kadlubar FF, Lang NP, Bartsch H (1996) Evidence of *anti*-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa. Carcinogenesis 17:2081-83
- 3) Atkinson T, Smith M (1984) Solid phase synthesis of oligodeoxyribonucleotides by the phosphite-triester method. In: Oligonucleotidesynthesis, a practical approach. IRL-Press, Oxford MJ Gait ed., p 69
- 4) Bailey LR, Roodi N, Dupont WD, Parl FF (1998) Association of cytochrome P450 1B1 (CYP 1B1) polymorphism with steroid receptor status in breast cancer. Cancer Res 58:5038-41
- 5) Bartsch H, Hietanen E (1996) The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure. Environ Health Perspect 3:569-577
- 6) Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K (2000) Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 9:3-28
- 7) Benito E, Obrador A, Stiggelbout A, Bosch FX, Mulet M, Munoz N, Kaldor J (1990) A population-based case-control study of colorectal cancer in Majorca. I. Dietary factors. Int J Cancer 45:69-76
- 8) Brüning T, Abel J, Koch B, Lorenzen K, Harth V, Donat S, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Ko Y (1999) Real-time PCR-analysis of the cytochrome P450 1B1 codon 432-polymorphism. Arch Toxicol 73:427-30

- 9) Cantlay AM, Lamb D, Gillooly M, Norrman J, Morrison D, Smith CAD, Harrison DJ (1995) Association between CYP 1A1 gene polymorphism and susceptibility to emphysema and lung cancer. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 48:M210-14
- 10) Caruthers MH, Barone AD, Beaucage SL, Dodds DR, Fisher EF, McBride LJ, Matteuci M, Stabinsky Z, Tang JY (1987) Chemical synthesis of deoxyoligonucleotides by the phosphoramidite method. *Methods Enzymol* 154:287-313
- 11) Caygill CP, Charlett A, Hill MJ (1998) Relationship between the intake of high-fibre foods and energy and the risk of cancer of the large bowel and breast. *Eur J Cancer Prev* 7 (suppl 2):S11-7
- 12) Crofts FG, Strickland PT, Hayes CL, Sutter TR (1997) Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) by human cytochrome P450 1B1. *Carcinogenesis* 18:1793-8
- 13) Crofts FG, Sutter TR, Strickland PT (1998) Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine by human cytochrome P450 1A1, P450 1A2 and P450 1B1. *Carcinogenesis* 19:1969-1973
- 14) Drakoulis N, Cascobi I, Brockmüller J, Gross CR, Roots I (1994) Polymorphisms in the human CYP 1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region. *Clin Investig* 72:240-248
- 15) Enan E, Matsumura F (1996) Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol* 52:1599-1612

- 16) Felton JS, Malfatti MA, Knize MG, Salmon CP, Hopmans EC, Wu RW (1997) Health risks of heterocyclic amines. *Mutat Res* 376:37-41
- 17) Franceschi S, Favero A, La Vecchia C, Negri E, Conti E, Montella M, Giacosa A, Nanni O, Declari A (1997) Food groups and risk of colorectal cancer in Italy. *Int J Cancer* 72:56-61
- 18) Friesen MD, Kaderlik K, Lind D, Garren L, Bartsch H, Lang N, Kadlubar FF (1994) Analysis of DNA adducts of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine in rat and human tissues by alkaline hydrolysis and gas chromatography/electron capture mass spectrometry: validation by comparison with ³²P-postlabeling. *Chem Res Toxicol* 7:733-739
- 19) Fritsche E (1997) Untersuchung zur Häufigkeit von Polymorphismen des Cytochrom P450 1A1 bei Systemischem Lupus Erythematodes und männlicher Infertilität. Dissertation
- 20) Fritsche E, Brüning T, Jonkmanns C, Ko Y, Bolt HM, Abel J (1999) Detection of cytochrome P450 1B1 Bfr I polymorphism: geotype distribution in healthy German individuals and in patients with colorectal carcinoma. *Pharmacogenetics* 9:405-408
- 21) Gaard M, Tretli S, Løken EB (1996) Dietary factors and risk of colon cancer: a prospective study of 50.535 young Norwegian men and women. *Eur J Cancer Prev* 5:445-54
- 22) Gerhardsson de Verdier M, Hagman U, Peters RK, Steineck G, Övervik E (1991) Meat, cooking methods and colorectal cancer: a case-referent study in Stockholm. *Int J Cancer* 49:520-5

- 23) Ghadirian P, Maisonneuve P, Perret C, Lacroix A, Boyle P (1998) Epidemiology of sociodemographic characteristics, lifestyle, medical history, and colon cancer: a case-control study among French Canadians in Montreal. *Cancer Detect Prev* 22:396-404
- 24) Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, Colditz GA, Ascherio A, Willett WC (1994) Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 54:2390-7
- 25) Gonzales FJ, Nebert DW (1990) Evolution of the P450 gene superfamily: animal-plant 'warfare', molecular drive and human genetic differences in drug oxidation. *Trends Genet* 6:182-186
- 26) Harth V, Donat S, Ko Y, Abel J, Vetter H, Brüning T (2000) NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer. *Arch Toxicol* 73:528-31
- 27) Hayashi S, Watanabe J, Nakachi K, Kawajiri K (1991) Genetic linkage of lung cancer-associated Msp I polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450 1A1 gene. *J Biochem* 110:407-411
- 28) Hayes CL, Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Walker NJ, Sutter TR (1996) 17 β -Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:9776-9781
- 29) Herold G (1998), Kolorektales Karzinom. In: *Innere Medizin*. Eine vorlesungsorientierte Darstellung, p.394-398
- 30) Hirvonen A, Husgafvel-Pursiainen K, Karjalainen A, Anttila S, Vainio H (1992) Point-mutational MspI and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP 1A1 gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1:485-9

- 31) Hsing A, McLaughlin JK, Chow WH, Schuman LM, Chien HT, Gridley G, Bielke E, Wacholder S, Blot WJ (1998) Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. *Int J Cancer* 77:549-53
- 32) Huang CS, Shen CY, Chang KJ, Hsu SM, Chern HD (1999) Cytochrome P450 1A1 polymorphism as a susceptibility factor for breast cancer in postmenopausal Chinese women in Taiwan. *Br J Cancer* 80:1838-43
- 33) Jacquet M, Lambert V, Baudoux E, Muller M, Kremers P, Gielen J (1996) Correlation between P450 CYP 1A1 inducibility, MspI genotype and lung cancer incidence. *Eur J Cancer* 32A:1701-6
- 34) Jaiswal AK, Gonzalez FJ, Nebert DW (1985) Human P₁-450 gene sequence and correlation of mRNA with genetic differences in benzo[a]pyrene metabolism. *Nucleic Acids Res* 13:4503-4520
- 35) Kawajiri K, Eguchi H, Nakachi K, Sekiya T, Yamamoto M (1996) Association of CYP 1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. *Cancer Res* 56:72-76
- 36) Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Yoshii A, Shinoda N, Watanabe J (1990) Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450 1A1 gene. *FEBS* 263:131-133
- 37) Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, Watanabe J, Hayashi S (1993) The CYP 1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit Rev Oncol Hematol* 14:77-87
- 38) Kawajiri K, Watanabe J, Eguchi H, Hayashi S (1995) Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and lung cancer susceptibility. *Pharmacogenetics* 5 Spec No:S70-3
- 39) Keating GA, Layton DW, Felton JS (1999) Factors determining dietary intakes of heterocyclic amines in cooked foods. *Mutat Res* 443:149-56

- 40)Knekt P, Jarvinen R, Dich J, Hakulinen T (1999) Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int J Cancer* 80:852-6
- 41)Layton DW, Bogen KT, Knize MG, Hatch FT, Johnson VM, Felton JS
Cancer risk of heterocyclic amines in cooked foods: an analysis and implications for research. *Carcinogenesis* 16:39-52
- 42)Le Marchand L, Wilkens LR, Hankin JH, Kolonel LN, Lyu LC (1997)
A case-control study of diet and colorectal cancer in a multiethnic population in Hawaii (United States): lipids and foods of animal origin. *Cancer Causes Control* 8:637-48
- 43)Lewis DF, Watson E, Lake BG (1998) Evolution of the cytochrome P450 superfamily: sequence alignments and pharmacogenetics. *Mutat Res* 410:245-270
- 44)Li DN, Seidel A, Pritchard MP, Wolf, CR, Friedberg T (2000)
Polymorphisms in P450 CYP 1B1 affect the conversion of estradiol to the potentially carcinogenic metabolite 4-hydroxyestradiol. *Pharmacogenetics* 10:343-53
- 45)Lyon JL, Mahoney AW (1988) Fried foods and the risk of colon cancer. *Am J Epidemiol* 128:1000-6
- 46)Marquardt H (1994), *Chemische Kanzerogenese*. In: *Lehrbuch der Toxikologie* BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, H. Marquardt, S.G. Schäfer ed., p 124-147
- 47)McKay JA, Melvin WT, Ah-See AK, Ewen SW, Greenlee WF, Marcus CB, Burke MD, Murray GI (1995) Expression of cytochrome P450 CYP 1B1 in breast cancer. *FEBS letters* 374:270-2

- 48) Micka J, Milatovich A, Menon A, Grabowski GA, Puga A, Nebert DW (1997) Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP 1A1 inducibility. *Pharmacogenetics* 7:95-101
- 49) Minchin RF, Kadlubar FF, Ilett KF (1993) Role of acetylation in colorectal cancer. *Mut Res* 290:35-42
- 50) Morita S, Yano M, Tsumjinaka T, Akiyama Y, Taniguchi M, Kaneko K, Miki H, Fujii T, Yoshino K, Kusuoka H, Monden M (1999) Genetic polymorphisms of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to head-and-neck-squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 80:685-8
- 51) Nagao M (1999) A new approach to risk estimation of food-borne carcinogens – heterocyclic amines – based on molecular information. *Mutat Res* 431:3-12
- 52) Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6:1-42
- 53) Oetsch F (1994), Fremstoffmetabolismus. In: *Lehrbuch der Toxikologie* BI Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich, H. Marquardt, S.G. Schäfer ed., p 68-93
- 54) Omura T, Sato, R (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J Biol Chem* 237:1375-76
- 55) Omura T (1999) Forty years of cytochrome P450. *Biochem Biophys Res Commun* 29:690-698

- 56)Oyama T, Mitsudomi T, Kawamoto T, Ogami A, Osaki T, Kodama Y, Yasumoto K (1995) Detection of CYP 1A1 gene polymorphism using designed RFLP and distributions of CYP 1A1 genotypes in Japanese. *Int Arch Occup Environ Health* 67:253-256
- 57)Pfohl-Leszkowicz A, Grosse Y, Carrière V, Cugnenc PH, Berger A, Carnot, F, Beaune P, de Waiers I (1995) High levels of DNA adducts in human colon are associated with colorectal cancer. *Cancer Res* 55:5611-16
- 58)Riede UN et al. (1995) , Chemische Tumorigenese. In: Allgemeine und spezielle Pathologie Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York U.N. Riede, H.E. Schäfer ed., p. 356-357
- 59)Riede UN, Schäfer HE (1995), Neoplastische Läsionen des Dickdarms. In: Allgemeine und spezielle Pathologie Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York U.N. Riede, H.E. Schäfer ed., p.731-734
- 60)Roberts-Thomsen IC, Ryan P, Khoo KK, Hart WJ, McMichael AJ, Butler RN (1996) Diet, acetylator phenotype, and risk of colorectal neoplasia. *Lancet* 347:1372-4
- 61)Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning* 2nd ed. CSHL Press, Cold Spring Harbour
- 62)Sasaki YF, Saga A, Yoshida K, Su YQ, Ohta T, Matsusaka N, Tsuda S (1998) Colon-specific genotoxicity of heterocyclic amines detected by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay of multiple mouse organs. *Mutat Res* 414:9-14
- 63)Sato M, Sato T, Izumo T, amagasa T (1999) Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis* 20:1927-31

- 64) Schiffman MH (1990) Fried foods and the risk of colon cancer. (Letters to the Editor). *Am J Epidemiol* 131:376-8
- 65) Shiff SJ, Rigas B (1997) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and colorectal cancer: evolving concepts of their chemopreventive actions. *Gastroenterology* 113:1992-8
- 66) Shimada T, Hayes CL, Yamazaki H, Amin S, Hecht SS, Guengerich FP, Sutter TR (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res* 56:2979-84
- 67) Shimada T, Yamazaki H, Foroozesh M, Hopkins NE, Alworth WL, Guengerich FP (1998) Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2 and 1B1. *Chem Res Toxicol* 11:1048-1056
- 68) Shimada T, Watanabe J, Kawajiri K, Sutter TR, Guengerich FP, Gillam EM, Inoue K (1999) Catalytic properties of polymorphic human cytochrome P450 1B1 variants. *Carcinogenesis* 20:1607-13
- 69) Sivaraman L, Leatham MP, Yee L, Wilkens LR, Lau AF, Marchand LL (1994) CYP 1A1 Genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer. *Cancer Research* 54:3692-3695
- 70) Skog K, Steineck G, Augustsson K, Jägerstad M (1995) Effect of cooking temperature on the formation of heterocyclic amines in fried meat products and pan residue. *Carcinogenesis* 16:861-7
- 71) Skog KI, Johansson MA, Jägerstad M (1998) Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review of formation, occurrence and intake. *Food Chem Toxicol* 36:879-96

- 72) Spink DC, Spink BC, Cao JQ, DePasquale JA, Pentecost BT, Fasco MJ, Li Y, Sutter TR (1998) Differential expression of CYP 1A1 and CYP 1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells. *Carcinogenesis* 19:291-8
- 73) Spurr NK, Gough AC, Stevenson K, Wolf CR (1987) Msp-1 polymorphism detected with a cDNA probe for the P-450 1 family on chromosome 15. *Nucleic Acids Res* 15:5901
- 74) Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M (1997) Identification of three different truncating mutations in cytochrome P450 1B1 (CYP 1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Molec Genet* 6:641-647
- 75) Sugimura T (1997) Overview of carcinogenic heterocyclic amines. *Mutat Res* 376:211-9
- 76) Sugimura H, Wakai K, Genka K, Nagura K, Igarashi H, Nagayama K, Ohkawa A, Baba S, Morris BJ, Tsugane S, Ohno Y, Gao C, Li Z, Takezaki T, Tajima K, Iwamasa T (1998) Association of Ile 462 Val (Exon7) polymorphism of cytochrome P450 1A1 with lung cancer in the Asian population: further evidence from a case-control study in Okinawa. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:413-7
- 77) Taioli E, Crofts F, Trachman J, Bayo S, Toniolo P, Garte SJ (1995) Radical differences in CYP 1A1 genotype and function. *Toxicol Lett* 77:357-62
- 78) Taioli E, Trachman J, Chen X, Toniolo P, Garte SJ (1995) A CYP 1A1 Restriction Fragment Length Polymorphism is associated with breast cancer in African-American women. *Cancer Res* 55:3757-8

- 79)Tang YM, Wo YYP, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, Greenlee WF (1996) Isolation and characterization of the human cytochrome P450 1B1 gene. *J Biol Chem* 269:13092-13099
- 80)Tang YM, Chen GF, Thompson PA, Lin DX, Lang NP, Kadlubar FF (1999) Development of an antipeptide antibody that binds to the C-terminal region of human CYP 1B1. *Drug metab Dispos* 27:274-80
- 81)Tefre T, Ryberg D, Haugen A, Nebert DW, Skaug V, Brøgger A, Børresen AL (1991) Human CYP 1A1 (cytochrome P₁450) gene: lack of association between the Msp1 restriction fragment length polymorphism and incidence of lung cancer in a Norwegian population. *Pharmacogenetics* 1:20-25
- 82)Thorgeirsson UP, Syderwine EG, Gomez DE, Adamson RH (1996) Dietary heterocyclic amines as potential human carcinogens: experimental data from nonhuman primates. *In Vivo* 10:145-52
- 83)Thune I, Lund E (1996) Physical activity and risk of colorectal cancer in men and women. *Br J Cancer* 73:1134-40
- 84)Totsuka Y, Fukutome K, Takahashi M, Takahashi S, Tada A, Sugimura T, Wakabayashi K (1996) Presence of N²-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (dG-C8-MeIQx) in human. *Carcinogenesis* 17:1029-34
- 85)Umemoto A, Kajikawa A, Tanaka, M, Hamada K, Seraj MJ, Kubota A, Nakayama M, Kinouchi T, Ohnishi, Y, Yamashita K et al. (1994) Presence of mucosa-specific DNA adduct in human colon: possible implication for colorectal cancer. *Carcinogenesis* 15:901-5

- 86)Wedlund PJ, Kimura S, Gonzalez FJ, Nebert DW (1994) 1462V mutation in the human CYP 1A1 gene: lack of correlation with either the Msp1 1.9kb (M2) allele or CYP 1A1 inducibility in a three-generation family of east Mediterranean descent. *Pharmacogenetics* 4:21-6
- 87)Wilmink AB (1997) Overview of the epidemiology of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 40:483-93
- 88)Witte JS, Longnecker MP, Bird CL, Lee ER, Frankl HD Haile RW (1996) Relation of vegetable, fruit, and crain consumption to colorectal adenomatous polyps. *Am J Epidemiol* 144:1015-25
- 89)Xu X, Kelsey KT, Wiencke JK, Wain JC, Christiani DC (1996) Cytochrome P450 CYP 1A1 MspI polymorphism and lung cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 5:687-92
- 90)Young TB, Wolf DA (1988) Case-control study of proximal and distal colon cancer and diet in Wisconsin. *Int J Cancer* 42:467-75
- 91)Zheng W (2000) Genetic polymorphism of cytochrome P 450-1B1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:147-50

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Josef Abel für die Überlassung des Themas und die konstruktiven Anregungen.

Dem Direktor des Medizinischen Instituts für Umwelthygiene Herrn Prof. Dr. Gerhard Winneke danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel.

Frau Prof. Dr. Regine Kahl danke ich für die Übernahme des zweiten Gutachtens.

Bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Toxikologie, insbesondere Sonja Zimmermann, Susanne Donat und Volker Harth, bedanke ich mich für die gute Arbeitsatmosphäre und die tatkräftige Unterstützung.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Ellen Fritsche für ihre ausgezeichnete Betreuung, ich wünsche ihr weiterhin alles Gute in den USA.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Untersuchungen zur Häufigkeit von Polymorphismen des Cytochrom P450 1A1 und des Cytochrom P450 1B1 bei kolorektalen Karzinomen“ selbständig angefertigt habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich habe die vorliegende Dissertation weder in der vorliegenden noch in einer ähnlichen Form bei einer anderen Institution eingereicht.

Düsseldorf, im April 2001

Lebenslauf

Cornelia Jonkmanns
Planetenstr. 44
40223 Düsseldorf

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 23. August 1972
Geburtsort: Dinslaken
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Konfession: römisch-katholisch

Schulbildung:

1979 - 1983 Grundschule an der Gartenstraße in Dinslaken
1983 - 1992 Theodor-Heuss-Gymnasium in Dinslaken,
Abschluß Abitur

Studium:

1992 - 1999 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität (HHU), Düsseldorf
August 1994 Ärztliche Vorprüfung
August 1995 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 1998 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1998-1999 Praktisches Jahr im EVK Düsseldorf und in der Marshfield Clinic, Wisconsin, USA
April 1999 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Mai 1999 - Ärztin im Praktikum am Institut für Diagnostische Radiologie, HHU Düsseldorf
November 2000
Dezember 2000 Weiterführung der Weiterbildung zur Fachärztin für Diagn. Radiologie am Institut für Diagn. Radiologie, HHU Düsseldorf

Düsseldorf, im April 2001

„Untersuchung zur Häufigkeit von Polymorphismen des Cytochrom P450 1A1
und des Cytochrom P450 1B1 bei kolorektalen Karzinomen“

Cornelia Jonkmanns

Zusammenfassung

Die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme der Cytochrom P450 Familie können durch Enzym polymorphismen die Suszeptibilität für Erkrankungen oder gegenüber Chemikalien erhöhen.

Es wurden zwei Polymorphismen des Cytochrom P450 1A1 (*Msp1* und IVA) und ein Polymorphismus des Cytochrom P450 1B1 (*Bfr1*) hinsichtlich ihrer Häufigkeiten bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen verglichen mit einem Kontrollkollektiv untersucht. Dabei wurden die Polymorphismen mittels Genotypisierung mit Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismen und der Polymerase-Ketten-Reaktion nachgewiesen.

Es ergaben sich folgende Ergebnisse:

1. Bezüglich des *Msp1*-Polymorphismus des CYP 1A1 resultiert in der Kontrollgruppe (n=250) eine Allelfrequenz für das mutante Merkmal von 0,104 und in der Gruppe der Patienten mit kolorektalen Karzinomen (n=202) eine Frequenz von 0,082. Es ergab sich keine Signifikanz hinsichtlich der Häufigkeitsunterschiede.
2. Für den IVA-Polymorphismus des CYP 1A1 wurde in der Kontrollgruppe (n=250) das mutante Allel mit einer Frequenz von 0,04 gefunden, während die Allelfrequenz in der Gruppe der Patienten mit kolorektalen Karzinomen (n=202) 0,035 betrug. Auch hier war die Häufigkeit der Polymorphismen nicht signifikant erhöht gegenüber der Kontrollgruppe.
3. Der *Bfr1*-Polymorphismus des CYP 1B1 zeigte Allelfrequenzen von 0,594 für das Wildtyp-Allel und 0,406 für das mutante Allel in der Kontrollgruppe (n=250) und Frequenzen von 0,470 bzw. 0,530 in der Gruppe der Patienten mit kolorektalen Karzinomen (n=202). Betrachtet man hier die homozygot-mutanten Individuen in beiden Gruppen, so ergibt sich eine statistisch signifikant erhöhte Anzahl bei den Patienten mit kolorektalen Karzinomen (p=0,049, OR=1,58).

Die Ergebnisse wurden in Zusammenhang mit der Ingestion von Umweltkanzerogenen im Rahmen der Ernährungsgewohnheiten diskutiert und mit der aktuellen Literatur korreliert.


Prof. Dr. J. Abel