

Aus der
Klinik für Kinder-Onkologie, -Hämatologie und -Immunologie
der Heinrich – Heine - Universität Düsseldorf
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med U. Göbel

**Sind Polymorphismen der biotransformierenden Enzyme
mEh und NAT2
mit hämato-onkologischen Krankheitsbildern
bei pädiatrischen kaukasischen oder asiatischen Patienten
assoziiert?**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich - Heine - Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Nina A. Böhm

2005

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referentin: Priv.-Doz. Dr. U. Dirksen
Korreferent: Priv.-Doz. Dr. J.-S. Krüssel

Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. <u>Einleitung</u>	3
2. <u>Fragestellung</u>	11
3. <u>Patienten, Material und Methoden</u>	12
3.1 <u>DNA-Proben</u>	12
3.1.1 Patienten	
3.1.2 Kontrollen	
3.2 <u>Material</u>	14
3.2.1 Geräte	
3.2.1.1 mEh	
3.2.1.2 NAT2	
3.2.2 Chemikalien	
3.2.2.1 mEh	
3.2.2.2 NAT2	
3.3 <u>Methoden</u>	16
3.3.1 DNA-Isolierung	
3.3.2 <u>Mikrosomale Epoxidhydrolase</u>	16
3.3.2.1 PCR	
3.3.2.2 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus	
3.3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	
3.3.3 <u>N-Acetyltransferase 2</u>	19
3.3.3.1 PCR	
3.3.3.2 Gele	
3.3.3.3 Aufreinigung	
3.3.3.4 Kontrollplasmid	
3.3.3.5 Photometer und SnapShot Rechnung	
3.3.3.6 SnapShot	
3.3.3.7 Elektrophorese	
3.4 <u>Statistik</u>	28
4. <u>Ergebnisse</u>	29
4.1 <u>mEh</u>	
4.2 <u>NAT2</u>	

5.	<u>Diskussion</u>	44
6.	<u>Zusammenfassung</u>	51
7.	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	52
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	53

Danksagung

Lebenslauf

1 Einleitung

Leukämie

Die Leukämie ist eine neoplastische Erkrankung und bedeutet übersetzt „weißes Blut“. Virchow prägte diesen Begriff Mitte des 19. Jahrhunderts. Er berichtete von Erkrankungen des Knochenmarks mit autonomer Zellproliferation.

Ursächlich für akute Leukämien sind maligne Entartungen früher hämatopoetischer Progenitorzellen.

Anfang des 20. Jahrhunderts gelang die Unterteilung in lymphatische und myeloische sowie in akute und chronische Leukämien. Akute Leukämien führen in den meisten Fällen unbehandelt innerhalb weniger Wochen zum Tod.

Akute lymphatische Leukämie =	ALL
Chronische lymphatische Leukämie =	CLL
Akute myeloische Leukämie =	AML
Chronische myeloische Leukämie =	CML

Die lymphatische Leukämie kann aus der B- oder der T-Zellreihe entstehen. Das B-Zell-System, zuständig für die humorale Immunität, hat seine frühe Entwicklung im Knochenmark. Die Ausbildung des T-Zell-Systems findet im Thymus statt. Die malignen Zellen der ALL entsprechen einem bestimmten Reifungsstadium einer lymphoblastischen Vorläuferzelle. Sie büßen die Eigenschaft zu funktionsfähigen Blutzellen heranzureifen ein. Die hämatopoetische Insuffizienz ist die Folge leukämischer Zellanhäufungen, verursacht durch ein defektes Proliferations- und Apoptoseprogramm. Die Therapie akuter Leukämien hat das Ziel, maligne Zellen zu vernichten und die normale Blutbildung wieder aufzubauen (Schneller F, 2003; Behre G, 2003).

Akute lymphatische Leukämien werden zurzeit immunphänotypisch nach der EGIL (Europäische Gruppe zur immunologischen Charakterisierung der Leukämien) mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörpern in die ALL-Subtypen klassifiziert (EGIL, 1995). Es werden Differenzierungsantigene mittels FACS (= Fluorescence-activated cell sorting) intrazellulär oder an der Zelloberfläche färberisch dargestellt. Die verschiedenen Antikörper werden international mit CD-Codes (cluster of differentiation) definiert. Die Leukämiezellen exprimieren abhängig von Zelltyp und Reifungsstadium unterschiedliche Antigene, so dass sie anhand ihres Reaktionsmusters, entsprechend dem physiologischer lymphatischer oder myeloischer Progenitorzellen, klassifiziert werden können (EGIL, 1995).

Strukturelle oder numerische Chromosomenaberrationen liegen bei über 60 % aller an Leukämie erkrankten Kinder vor. Obligate Untersuchungen bei der ALL sind die Zytogenetik und die Molekulargenetik, weil sie zur Ermittlung prognostisch günstiger und ungünstiger Untergruppen führen. Mit einer schlechten Prognose gehen zum Beispiel die Translokationen t(4;11) und t(9;22) (Philadelphia-Chromosom) einher. Das Philadelphia-Chromosom kann molekularbiologisch durch das BCR-ABL-Fusionsgen und die therapeutisch relevante t(4;11) Translokation durch das Fusionstranskript ALL1-AF4 charakterisiert werden (Ludwig WD, 1998). Die Chromosomenanzahl (Diploidie, Hypodiploidie und Hyperdiploidie) stellt einen weiteren wichtigen Prognosefaktor dar.

Die günstige Hyperdiploidie ist bei Kindern mit 25 % wesentlich öfter als bei Erwachsenen zu finden (Schrappe M, 2000).

In Deutschland erkranken pro Jahr ca. 13 von 100000 Kindern (bis einschließlich dem vollendeten 14. Lebensjahr), also insgesamt etwa 1700 Kinder an Krebs. Leukämien repräsentieren ungefähr 35 % aller Krebserkrankungen bei Kindern und stellen damit die häufigste maligne Erkrankung in dieser Altersgruppe dar. Dies bedeutet, dass man von ungefähr 600 leukämischen Neuerkrankungen bei Kindern pro Jahr ausgehen kann (Kaatsch M, 2000).

Die ALL (82 %) ist die häufigste Form der Leukämie im Kindesalter. Es folgen die AML (16 %) und die im Kindesalter sehr seltene CML (3-5 %) (Kaatsch M, 2000). Die CLL kommt bei Kindern nicht vor.

Der Entstehungsmechanismus leukämischer Erkrankungen ist bis heute noch größtenteils ungeklärt. Es gibt jedoch Risikofaktoren, welche das Auftreten einer Leukämie begünstigen können.

1. Ionisierende Strahlung: Dieser Auslöser ist gesichert. Dieses konnte durch die Leukämieinduktion eines heute verbotenen radioaktiven Röntgenmittels (Thorotrast), die Folgen der Atombombenabwürfe von Hiroshima und Nagasaki, welche zu einer altersabhängigen strahleninduzierten Leukämie bei vielen der Überlebenden geführt haben, oder auch durch Sekundärmalignombildung (AML) nach Strahlentherapie gezeigt werden (Kaatsch P, 1995). Radioaktive Strahlung gehört zu den bekannten DNA-schädigenden Mechanismen (Noshchenko AG, 2002).
Aus diesen Gründen kann man die Strahlenbelastung nicht zu einem Hauptverursacher der kindlichen Leukämiefälle machen. Zurzeit spielt in Deutschland die Belastung mit ionisierenden Strahlen keine epidemiologische Rolle (Kaatsch M, 2000).
2. Chemikalien, insbesondere Benzolderivate und Zytostatika (Guenel P, 2002).
3. Virale Infektionen wie z.B. durch das humane T-cell leukemia virus (HTLV) (Dockerty JD, 1999). In Südjapan und der Karibik findet man eine besondere Art der Leukämie, die durch dieses Virus hervorgerufen wird. Weitere wichtige auslösende Faktoren vor allem für die ALL sind vermehrte Virusinfekte bei Kindern (Kinlen LJ, 1997). Früher war die Neuerkrankungsrate kindlicher Leukämien in Ostdeutschland weitaus niedriger als in Westdeutschland, doch mittlerweile hat sich die Inzidenzrate in beiden Teilen des Landes assimiliert. Diese Feststellung intensiviert die pathogenetische Bedeutung des Immunsystems (Kaatsch M, 2000).
4. Hereditäre Faktoren: Patienten mit Syndromen, die mit erhöhter DNA-Brüchigkeit einhergehen, wie dem Down-Syndrom (Trisomie 21) oder einer Fanconi Anämie, erkranken gehäuft an einer Leukämie (Janik-Moszant A, 1998; Shen JJ, 1995). Auch genetische Prädispositionen scheinen eine Rolle zu spielen. Die Konkordanzrate eineiiger Zwillinge liegt bei 25 % (Wiemels JL, 1999). Bei ungefähr 90 % aller kindlichen ALL gelingt der Nachweis klonaler Chromosomenanomalien (Pui CH, 2001). Eine prognostische Rolle spielen vor allem die Hyperdiploidie (DNA-Index >1,16), welche mit einer günstigen

Prognose assoziiert ist, und das BCR/ABL sowie bestimmte MLL-Genrearrangements, die prognostisch ungünstig sind. Kinder mit einer AML weisen in 80-85 % eine klonale Chromosomenanomalie auf (Martinez-Climent JA, 1995).

Die AML wird durch die FAB-(French-American-British) Klassifikation in 8 verschiedene Untergruppen unterteilt (FAB-M0-M7), indem Blut- und Knochenmarksausstriche zytomorphologisch und molekulargenetisch beurteilt werden. Für die Diagnosestellung müssen im Knochenmark mindestens 30 % der kernhaltigen Zellen Blasten sein und mindesten 3 % dieser Blasten müssen in der Peroxidase-Färbung positiv reagieren (Bennett JM, 1985).

Bei 20 % der Kinder mit einer AML beobachtet man eine der Erkrankung vorausgehende Knochenmarksdysfunktion, welche den weiteren Verlauf meist negativ beeinflusst (Wegelius R, 1992; Hamblin T, 1992). Die sekundäre AML entsteht zu etwa 8 % auf dem Boden eines vorbestehenden myelodysplastischen Syndroms oder zu ungefähr 6 % als Zweitmalignom nach Strahlen- oder Chemotherapie (Arthur DC, 1989).

Chromosomale und molekulare Aberrationen führen bei einer AML häufig zu veränderten Transkriptionsfaktorenexpressionen. Transkriptionsfaktoren (spezielle Bindungs-Proteine) entscheiden darüber, ob ein Gen exprimiert wird oder nicht. Der Transkriptionsfaktorkomplex AML1/CBF beta ist bei 30 % aller AML verändert, so dass es dadurch zu einer fehlerhaften Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren kommt. Dies trägt entscheidend zum krankhaften Wachstum leukämischer Zellen bei (Behre G, 1999b; Tenen DG, 1997).

Die Prognose der AML korreliert mit bestimmten chromosomalen Mustern/Anomalien. Am prognostisch günstigsten ist der Nachweis der Translokationen t (8;21) oder t (15;17) oder eine Inversion von Chromosom 16. Zytogenetische Anomalien an den Chromosomen 3q, 5, 7, 11q23 und komplexe Aberrationen weisen auf eine eher schlechte Prognose hin (Zittoun R, 1995; Burnett AK, 1998).

Erworbene aplastische Anämie

Die erworbene aplastische Anämie ist gekennzeichnet durch eine Panzytopenie in der Peripherie und ein leeres Knochenmark (Alter BP, 1993; Young NS, 1999). Häufigste Form im Kindesalter ist die schwere aplastische Anämie. Das klinische Bild entsteht wie bei der ALL durch das Versagen der Knochenmarksfunktion und der damit einhergehenden verminderten Produktion reifer Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten. Dadurch leiden die Patienten unter Abgeschlagenheit, gehäuften Infekten und Blutungen (Young NS, 2002). Die Definition der EAA erfolgt nach den Kriterien von Heimpel und Kubanek sowie Camitta: Verringerung der Zellularität im Knochenmark auf unter 30 %, schwere Zytopenie in mindestens zwei Zellreihen im peripheren Blut (Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten) (Camitta B, 1983).

In Deutschland gibt es 20 Neuerkrankungen pro Jahr. Mit einer Inzidenz von 0,2/100000 gehört die EAA zu den seltenen Erkrankungen (Jahresbericht Kinderkrebsregister Mainz).

Die Ursachen für die EAA sind heterogen und in den meisten Fällen nicht bekannt. Favorisiert werden zwei pathogenetische Mechanismen: Zum einen sind dies Umweltfaktoren (Sharpe WD, 1993; Young N, 1988) und zum anderen die individuelle genetische Prädisposition (Morley A, 1978; Turner DR, 1981). Zu den Umweltfaktoren gehören 1. virale Infekte wie Hepatitisviren, Epstein-Barr-Virus oder Parvovirus B19 (Young NS, 1993; Dilloo D, 1991), 2. ionisierende Strahlen (Fliedner TM, 1986), 3. Medikamente wie Goldsalze, Penicillamin oder Chloramphenicol (Nagao T, 1969) und 4. Chemikalien, zum Beispiel knochenmarktoxische wie Benzol (Snyder R, 1993; Sanchez-Medal L, 1963; Fleming LE, 1993). Diese Ursachen können zu einer DNA-Schädigung bei den hämatopoetischen Vorläufern (Maciejewski JP 1994) oder zu einer Aktivierung autologer immunologischer Mechanismen führen (Frickhofen N, 1990), welche dann in den hämatopoetischen Vorläuferzellen eine DNA-Schädigung bewirkt.

Die Daten für die EAA, welche durch Umweltnoxen ausgelöst wird, sind an Patienten erhoben worden, die einer erheblichen Belastung durch KM-schädigende Noxen ausgesetzt waren. Eine so erhebliche Schadstoffbelastung ist bei Kindern in Deutschland eher nicht zu erwarten, so dass Noxen nur in Zusammenhang mit einer putativen hereditären Suszeptibilität gegen Schadstoffe Krankheit erregend wirken. Die Medikamenten induzierte EAA entsteht zum Teil dosisabhängig (Chemotherapie und/oder Bestrahlung) und zum Teil dosisunabhängig (nur bei Prädisponierten).

Asiaten

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf die ethnischen Unterschiede zwischen der kaukasischen und asiatischen Bevölkerung eingegangen. Die asiatischen Patienten (aus Kirgisistan) besitzen einen anderen Genpool als die Kaukasier aus Deutschland. Bei Asiaten ist die Inzidenz von EAA und AML gegenüber Kaukasiern wesentlich erhöht. Ursächlich könnten dafür eine gesteigerte Schadstoffbelastung der asiatischen Bevölkerung durch den Gebrauch nicht zugelassener Pestizide in Kirgisistan und der divergente genetische Pool sein (Lee KA, 2001; Okada M, 1997).

Kirgisistan, lokalisiert in der südöstlichen Region der ehemaligen Sowjetunion, hat eine umfassende Atomwaffenentwicklungsgeschichte. Historische Landvermessungen, die ursprünglich für geologische Erschließungen gedacht waren, haben angezeigt, dass die relativen Strahlungsvorkommen in Gebieten am „Lake Issyk-Kyol“ (Kirgisische Republik) um den Faktor 10 höher sind als ursprünglich angenommen wurde. Nukleare Tests in China und Uranbergbau in den Bergen, welche den See umgeben, könnten die Ursachen für die Kontaminierungen sein (Hamby DM, 1999).

Mikrosomale Epoxidhydrolase

Die mikrosomale Epoxidhydrolase ist ein Phase-I-Enzym der Biotransformation. Das humane mEh-Gen liegt auf Chromosom 1q42.1 und weist Polymorphismen auf (Hartsfield Jr JK, 1998).

Es wurden bislang fünf strukturell verschiedene Klassen der Epoxidhydrolasen charakterisiert (Beetham JK, 1995). Die mikrosomale Form der Epoxidhydrolase verstoffwechselt vor allem xenobiotische Chemikalien und zeigt eine deutliche Substratspezifität (Papadopoulous D, 1985; Seidegard J, 1986; Fandrich F, 1995). Sie kann sowohl zur Inaktivierung als auch zur Produktion aktivierender Metabolite führen (Wormhoudt LW, 1999). Die mEh wird im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiert (Omiecinski CJ, 1993).

Nur zwei Polymorphismen repräsentieren den genetischen Polymorphismus der Kaukasier, sie betreffen die Aminosäuren an Position 113 und 139 des mEh Proteins. Bei $^{113}\text{T}\rightarrow\text{C}$ (Exon3) kodiert das polymorphe Allel in Exon 3 entweder für Histidin oder Tyrosin. Bei $^{139}\text{A}\rightarrow\text{G}$ (Exon4) kodiert dieser Polymorphismus entweder für Histidin oder Arginin. Die unterschiedlichen Genotypen haben funktionelle Relevanz und führen zu vermehrter oder zu verminderter Aktivität von mEh. Tyrosin ist die prädominante Aminosäure an Position 113 bei der kaukasischen Population, wobei Histidin meistens prädominant an Position 139 ist (Hassett C, 1994 a, b; Gaedigk A, 1994). Diese Zuteilung der Allele steht im Hardy-Weinberger-Gleichgewicht (Omiecinski CJ, 2000).

Es gibt vier verschiedene mEh-Allele, welche durch das Vorhandensein oder die Abwesenheit von zwei Punktmutationen in den Genen entstehen. Eine Exon 3 T zu C Mutation verändert den Tyrosinrest 113 zu Histidin und die Enzymaktivität ist um mindestens 50 % reduziert („*langsames*“ Allel). Die zweite Punktmutation von A zu G in Exon 4 macht aus dem Histidinrest 139 Arginin und produziert eine Enzymaktivität, welche um wenigstens 25 % ansteigt („*schnelles*“ Allel) (Hassett C, 1994; Smith CAD, 1997). Der Wildtyp hat keine dieser Veränderungen. Das seltene Auftreten beider Veränderungen zusammen erzeugt eine Hydrolase mit normaler Aktivität (Smith CAD, 1997).

N-Acetyltransferase 2

Vor über 40 Jahren wurde der NAT-Polymorphismus als erster genetischer Polymorphismus im Medikamentenstoffwechsel gefunden (Weber WW, 1985; Price Evans DA, 1989). Bei Tuberkulosepatienten wurden Unterschiede in der Isoniazidtoxizität auf Polymorphismen in dem N-Acetyltransferasegen zurückgeführt (Hughes DW, 1954). NAT-2 ist ein Phase-II-Enzym der Biotransformation und für die Deaktivierung von Isoniazid zuständig (Evans DAP, 1964; Weber WW, 1979). Mittlerweile konnte die Relevanz der NAT-Polymorphismen für den Abbau vieler Medikamente und Chemikalien gezeigt werden (Weber WW, 1985; Weber WW, 1987). Die N-Acetyltransferase ist unter anderem in die Biotransformation aromatischer Amine involviert. Diese kommen zum Beispiel im Tabakrauch, in der Nahrung und der Umwelt vor (Krajinovic M, 2000).

Das humane NAT2-Gen ist auf Chromosom 8p22 lokalisiert (Blum M, 1990b; Franke S, 1994; Vatsis KP, 1995). Es besitzt keine Introns und beinhaltet 870 Nukleotide, die ein Protein mit 290 Aminosäuren kodieren (Blum M, 1990; Ebisawa T, 1991; Grant DM, 1989; Wormhoudt LW, 1999). Das NAT2-Enzym kommt nur in der Leber und im Darm vor (Grant DM, 1991).

Es sind 26 unterschiedliche Allele von NAT2 bekannt (Vatsis KP, 1995). Einige führen zu einer herabgesetzten Enzymaktivität. Die NAT-Genpolymorphismen manifestieren sich phänotypisch in der Acetylierung von Medikamenten und toxischen Stoffen. Es können *schnelle* und *langsame* Acetylierer klassifiziert werden. Die Enzymaktivität von NAT2 wird durch bestimmte Punktmutationen vermindert, dadurch wird genetisch eine Unterscheidung zwischen *langsamen* und *schnellen* Acetylierern möglich. Das dominante „Wildtyp“-Allel NAT2*4 kann in einen homozygoten und einen heterozygoten schnellen Acetylierer eingeteilt werden (Vatsis KP, 1995). *Schnelle* und *langsame* Acetylierer unterscheiden sich durch das Auftreten von Nebenwirkungen bei Medikamenteneinnahmen und in der Empfänglichkeit gegenüber bestimmten Krankheiten (Roots I, 1992).

Der genetische Polymorphismus von NAT2 wird mit der individuellen Veranlagung zur Krebsentstehung assoziiert. Epidemiologische Studien haben bewiesen, dass *schnelle* NAT2-Acetylierer ein höheres Risiko tragen an einem Kolonkarzinom zu erkranken als *langsame* Acetylierer (Bett KF, 1994; Wohlleb JC, 1990; Lang NP, 1994; Wormhoudt LW, 1999). Im Unterschied dazu haben *schnelle* Acetylierer ein niedrigeres Risiko als *langsame*, an Blasenkrebs zu erkranken (Cartwright RA, 1982; Mommsen S, 1985; Yu MCJ, 1994; Risch A, 1995; Wormhoudt LW, 1999).

Eine neuere Studie zeigt, dass insbesondere das NAT2*5B Allel mit einer höheren Inzidenz an Blasenkrebs einhergeht (Brockmüller J, 1996; Wormhoudt LW, 1999). Die Variabilität bei Kolon- und Blasenkrebs könnte mit der unterschiedlichen Verstoffwechslung von Arylaminen und heterozyklischen Aminen bei *langsamen* und *schnellen* Acetylierern zusammenhängen (Bock K, 1992; Kadlubar FF, 1995). Die Polymorphismen im NAT2 Gen werden auch mit weiteren malignen Erkrankungen assoziiert (Martinez C, 1995; Cascorbi I, 1996; Wormhoudt LW, 1999).

Das Vorkommen des Phänotypen des *langsamen* Acetylierers ist in der Population des Mittleren Ostens groß (zum Beispiel ~70 % bei Ägyptern, Saudi Arabern und

Marokkanern), es wird bei der Hälfte der Kaukasier (~50 % bei Amerikanern, Australiern und Europäern) angetroffen, dagegen ist es niedrig bei den Asiaten (<25 % der Chinesen, Japaner und Koreaner) (Parkinson A. Chapter 6).

Es gibt 7 umfangreich untersuchte genetische Polymorphismen mit einer reduzierten Enzymaktivität und/oder einer wechselhaften Stabilität für das humane NAT2 Gen. In dieser Arbeit wurden die vier wichtigsten Punktmutationen untersucht $^{191}\text{G}\rightarrow\text{A}$, $^{341}\text{T}\rightarrow\text{C}$, $^{590}\text{G}\rightarrow\text{A}$, $^{857}\text{G}\rightarrow\text{A}$ (Hein DW, 1995).

(www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html)

Die Punktmutation in Nukleotid 341, die einen Austausch der Aminosäuren Ile¹¹⁴ zu Thr bewirkt, vermindert die Enzymaktivität für NAT2, ohne aber die Substratbindung oder die Enzymstabilität zu verändern. Diese Mutation wird am häufigsten bei Kaukasiern als Grund für die *langsame* Acetylierung beobachtet, aber nur selten bei Asiaten. Im Unterschied dazu ist bei den Asiaten die Punktmutation im Nukleotid 857 am weitesten verbreitet. Diese reduziert die Stabilität von NAT2 (Parkinson A. Chapter 6).

Biotransformation

Täglich ist der menschliche Körper schädlichen Fremdstoffen ausgesetzt. Diese exogenen Noxen setzen sich zusammen aus Giften, Medikamenten, Flavonoiden, ionisierende Strahlen und anderen Umweltnoxen, welche nicht einfach vom Körper ausgeschieden werden können (Rossi AM, 1999). Im Laufe der Evolution hat sich ein komplexes biologisches System aus Entgiftungsenzymen zur Elimination körpereigener und körperfremder Xenobiotika entwickelt (Wormhoudt LW, 1999). Die Leber beinhaltet die größte Quelle an diesen biotransformierenden Enzymen. Des Weiteren findet man diese in der Haut, Nasenschleimhaut, Lunge, Auge und Gastrointestinaltrakt. Dies lässt sich dadurch erklären, dass diese Organe den häufigsten Kontakt mit Fremdstoffen haben. Es gibt aber noch reichlich andere Gewebe wie zum Beispiel die Nieren und die Plazenta, in denen die biotransformierenden Enzyme vorkommen (Gram TE, 1980; Farrell GC, 1987; Krishna DR, 1994). In der Leber sowie in den meisten anderen Organen liegen die Enzyme im endoplasmatischen Retikulum (Mikrosomen) oder im Zytoplasma (Zytosol) und eher weniger in den Mitochondrien und den Nuklei (Farrell GC, 1987; Krishna DR, 1994).

Die Abläufe der Biotransformation werden in eine Phase-I und eine Phase-II aufgeteilt. In der ersten Phase verändern sich die Stoffe durch entweder Hydroxylierung, Oxidation oder Reduktion (Hayes J, 1995). In der Regel sind dies lipophile Verbindungen, welche über die Lunge, den Magen-Darm-Trakt oder die Haut in den Körper gelangen, in stärker hydrophile Metabolite umgewandelt und dadurch für die Nieren (kleinere Molmasse unter 300) oder die Gallenflüssigkeit (größere Molmassen über 300) ausscheidungsfähig werden (Hayes J, 1995; Krishna DR, 1994; Farrell GC, 1987). Ohne die Biotransformation würden lipophile Xenobiotika nur sehr langsam vom Körper ausgeschieden werden, so dass sie schließlich den Organismus überfluten und damit schädigen würden. Zu den Phase-I-Enzymen gehören die mikrosomale Epoxidhydrolase und die Cytochrom P450-Monooxygenasen.

Daran folgt in der zweiten Phase eine Konjugation mit einem physiologisch vorkommenden Stoffwechselprodukt wie z.B. Kopplung an Sulfat oder Glycin mit Hilfe der N-Acetyltransferasen oder Glutathion-S-Transferasen. Durch die Phase-II der Biotransformation werden die Stoffe hydrophil. Die zweite Phase muss nicht immer der ersten Phase folgen. Es gibt Stoffwechselfvorgänge wie zum Beispiel den von Morphin, welcher direkt die Phase-II durchläuft und an Glucuronsäure gekoppelt wird. Heroin im Unterschied dazu muss aber vorher die erste Phase durchlaufen, um dann in der zweiten Phase überhaupt weiter verstoffwechselt werden zu können. Generell geht die Phase-II nie der Phase-I voraus, aber es gibt natürlich auch zu dieser Regel Ausnahmen. Chemische Reaktion und Konjugation können aber auch einzeln und völlig unabhängig voneinander ablaufen (Parkinson A. Chapter 6).

Biotransformierende Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel von Xenobiotika. Die Enzyme können entweder aktivierend (Giftung) oder inaktivierend (Entgiftung) agieren (Wormhoudt LW, 1999). Es existieren zahlreiche Untersuchungen, die auf eine Verbindung zwischen bestimmten Entgiftungsreaktionen und der Entstehung verschiedener Krankheiten hinweisen wie zum Beispiel beim Kolonkarzinom (Smits K, 2003), Parkinson-Syndrom (Rahbar A, 1999) und beim Harnblasenkarzinom (Harries L, 1997). Dabei spielt anscheinend die individuelle Befähigung Noxen aus dem Körper zu eliminieren eine Rolle in der Ätiologie und Exazerbation von Krankheiten. Entscheidend für die Entstehung von Krankheiten sind außerdem die verschiedenen Polymorphismen der biotransformierenden Enzyme. Bei der MEh wurden Korrelationen zweier Polymorphismen mit einigen schwerwiegenden Erkrankungen festgestellt wie zum Beispiel dem hepatozellulären Karzinom (Mc Glynn KA, 1995) und dem Ovarialkarzinom (Lancaster JM, 1996).

Der NAT2-Polymorphismus unterscheidet zwischen *schnellen* und *langsamen* Acetylierern. Kolonkarzinome scheinen häufiger bei *schnellen* Acetylierern aufzutreten, wo hingegen Blasenkrebs eher bei *langsamen* Acetylierern beobachtet wird (Brockmöller J, 1998; Lang NP, 1994; Roberts-Thomson JC, 1996).

In dieser Arbeit wurden die Polymorphismen zweier Enzyme der Biotransformation untersucht, zum einen die mikrosomale Epoxidhydrolase (Phase-I-Enzym) und zum anderen die N-Acetyltransferase 2 (Phase-II-Enzym).

2 Fragestellung

Sind Polymorphismen der biotransformierenden Enzyme mEh und NAT2 mit hämato-onkologischen Krankheitsbildern bei pädiatrischen kaukasischen oder asiatischen Patienten assoziiert?

3 Patienten, Material und Methoden

3.1 DNA-Proben

3.1.1 Patienten

Tabelle 1: Diagnosen der Patienten

1a
Kaukasier

ALL	3
C-ALL	25
T-ALL	16
prä B-ALL	20
AML	9
CML	4
EAA	84
Rest *	30
AML/ALL	1
C-ALL/AML	1
N=	193

NP	215
----	-----

1b
Asiaten

ALL	18
ONL	1
ANL	8
AML	7
AA	6
EAA	5
Rest	5
C-ALL	1
CML	2
N =	53

NP	18
----	----

*Rest = Lymphome 9 (davon sind 4 T-Zell-Lymphome, 2 B-Zell-Lymphome, 2 NHL, 1 M. Hodgkin)
Tumore 21 (davon sind 5 Neuroblastome, 2 Ewing-Sarkome, 4 Medulloblastome)

Kaukasier

288 Düsseldorfer-Patienten-Proben wurden untersucht. Die Blutproben der an Leukämie oder an anderen malignen Erkrankungen leidenden Kinder wurden von der pädiatrischen Klinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf sowie der „EAA-94“-Studie der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) aus ganz Deutschland zur Verfügung gestellt.

Von 288 Proben brachten 213 auswertbare Ergebnisse. 20 der 213 Proben blieben ohne Diagnose und waren daher für die Statistik nicht verwertbar. Somit konnten 193 Proben mit verschiedenen Leukämietypen und anderen malignen Erkrankungen in die Endauswertung aufgenommen werden.

Ein Teil der mEh Versuche wurde in Kooperation mit Dr. med. K. Asadi Moghaddam durchgeführt und bereits veröffentlicht (Dirksen U, 2004).

Tabelle 1a zeigt, dass der Anteil an lymphatischen Leukämien bei Kindern mit 25 C-ALL, 16 T-ALL, 20 prä B-ALL und 3 ALL sehr viel größer ist als der myeloischer

Leukämien mit 9 AML und 4 CML. Zwei pädiatrische Patienten wiesen biphänotypische Leukämien auf, zum einen AML/ALL und zum anderen C-ALL/AML. 84/193 waren Proben von an aplastischer Anämie Erkrankten.

Asiaten

Das Patientenblut der asiatischen Bevölkerung stammte aus dem Kyrghyz Medical Institute (Bischkek, Kirgisistan). Von den 151 bearbeiteten Proben konnten wegen Alteration des Materials auf langen Transportwegen nur 72 ausgewertet werden.

Bei den kirgisischen Patienten verteilten sich die Proben diagnostisch auf 18 ALL, 7 AML, 2 CML, 1 ONL (AML), 8 ANL (ALL) und 11 aplastische Anämien, davon 6 AA und 5 EAA (Tabelle 1b).

Bischkek wurde in die Untersuchung mit aufgenommen, da es in Kirgisistan auffallend häufig an akuten myeloischen Leukämien erkrankte Kinder gibt.

3.1.2 Kontrollen

215 kaukasische Kontrollen und 18 asiatische Kontrollen aus Bischkek.

Für die Kontrollgruppe aus Düsseldorf konnten 215 von 225 untersuchten Proben ausgewertet werden. Der größte Teil der kaukasischen Kontrollgruppe stammte von gesunden Medizinstudenten der HHU. Als Kontrollen stand außerdem das Nabelschnurblut gesunder Neugeborener zur Verfügung sowie von Geschwistern von Kindern, die sich in der Kinderklinik einer Behandlung unterzogen.

Die Kontrollgruppe der asiatischen Bevölkerung wurde ebenfalls aus dem Kyrghyz Medical Institute (Bischkek, Kirgisistan) zugesandt. Die Kontrollgruppe war zwar sehr klein, da die erzielten Ergebnisse aber hervorragend mit Resultaten größerer Studien übereinstimmten, wurden sie in die Gesamtwertung integriert (Huang W-Y, 2005).

Bei der NAT2 Untersuchung wählten wir nur eine kleine Kontrollgruppe aus, diese stimmte aber in den prozentualen Verhältnissen mit größeren Kontrollgruppen aus der Literatur überein (Garte S, 2001).

3.2 Material

3.2.1 Geräte

3.2.1.1 mEh

Heizblock für die Polymerasekettenreaktion (PCR) und Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP)

Trio Thermoblock (Biometra Cyclers, Göttingen, Deutschland)

3.2.1.2 NAT2

Sequenzierer

ABI Prism 310 Genetic Analyzer Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)

Heizblock (Snapshot Reaktionen)

Eppendorf Mastercycler Gradient (Hamburg; Deutschland)

Gene Amp PCR System 2700 Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)

3.2.2 Chemikalien

3.2.2.1 mEh

Primer

3´mEh Exon3	AATCTTAGTCTTGAAGTGACGGT
5´mEh Exon3	CTTGTGCTCTGTCCTTCCCATCCC
3´mEh Exon4	AACACCGGGCCCACCCTTGGC
5´mEh Exon4	GGGGTGCCAGAGCCTGACCGT

mEh Primer MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland)

Alle Primer wurden vor ihrer Verwendung zu einer Konzentration von 10pmol/µl verdünnt und anschließend aliquotiert.

Enzyme

Aspl
Rsal
Expand High Fidelity PCR System
Taq DNA-Polymerase

Roche (Mannheim, Deutschland)
GibcoBRL (Karlsruhe, Deutschland)
Roche (Mannheim, Deutschland)
Qiagen (Ratingen, Deutschland)

3.3 Methoden

- mEh: PCR, RLFP, Agarosegel-Elektrophorese
- NAT2:PCR, Gel, Aufreinigung, Kontrollplasmid, Photometrie, SNaPShot, Elektrophorese

3.3.1 Isolierung genomischer DNA mit dem Qiagen Blood Kit

Die in dieser Arbeit beschriebene DNA-Isolierung wurde modifiziert und weicht daher von den Herstellerangaben teilweise ab.

In ein 1,5ml Eppendorf-Reaktionsgefäß wurden 400µl Blut, entweder aus einer Knochenmarksbiopsie, einer peripheren Vene oder einer Nabelschnur stammend, 50µl Protease, welche bei 4C° aufbewahrt wurde, und 400µl AL-Puffer pipettiert. Zur Lyse der Zellbestandteile folgte eine 10-minütige Inkubation des Gemisches in einem 70C° Wasserbad.

Es wurden anschließend 420µl 96 % ETOH hinzugemischt. Danach wurden die Proben in 2 Schritten auf eine Qiamp Säule gegeben. Zwischendurch wurde jeweils 1 Minute lang mit maximaler Umdrehungszahl zentrifugiert.

Nach Verwerfung des Eluats musste die Qiamp Säule zweimal mit je 500µl AW-Puffer gewaschen und jeweils anschließend 1 Minute bei 14000 Umdrehungen zentrifugiert werden. Nach der letzten Zentrifugation wurden 100µl AE-Puffer, der auf 70C° vorgeheizt worden war, auf die Säule pipettiert, diese 5 Minuten bei 70C° inkubiert und dann ein letztes Mal bei höchster Stufe zentrifugiert. Die DNA wurde bei -20°C in 0,5ml Tubes aufbewahrt.

3.3.2 Mikrosomale Epoxidhydrolase

3.3.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR wurde nach einer Methode von Mulis und Faloona 1987 entwickelt, mit dem Zweck definierte DNA-Abschnitte beliebig oft kopieren zu können. Wichtig ist die hitzestabile Taq-Polymerase, die im Verlauf der PCR den komplementären DNA Strang synthetisiert.

Es gibt 3 Hauptschritte bei der PCR, welche beliebig oft, meistens aber 30- bis 40-mal wiederholt werden.

1. Denaturierung bei ca. 94C°:
Die doppelsträngige DNA wird während der Denaturierung in die jeweiligen Einzelstränge gespalten.
2. Annealing bei ca. 54C°:
Die hinzugefügten Primer kreisen umher und heften sich jeweils an die zu ihnen passenden Zielsequenzen der Einzelstrang-DNA.

3. Extension bei ca. 72C°:

Im 3. Schritt wird der komplementäre Strang durch die Taq-Polymerase synthetisiert. 72C° ist eine optimale Arbeitstemperatur für die Polymerase, welche ein hitzestabiles Enzym, isoliert aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus*, ist (Chien A, 1976; Sakai RK, 1988). Durch ihre Hitzebeständigkeit braucht man nicht nach jedem Zyklus neue Polymerase hinzuzufügen, sondern kann viele Zyklen automatisch hintereinander ablaufen lassen.

Die Primer, welche sich vorher an die DNA gebunden hatten, werden nun verlängert und zwar von 5' in 3' Richtung, denn das Template wird in 3' zu 5' Richtung gelesen. Die Basen werden komplementär zur Template-Schablone addiert.

Für die Amplifikation von Exon 3 und Exon 4 wurden die gleichen Reaktionsansätze mit entsprechend anderen Primern (siehe 3.2.2.1) verwendet.

mEh PCR

genomische DNA	2,5 µl	
H ₂ O	11,97 µl	
10 x PCR Puffer	2,5 µl	(1 mM)
Q- Puffer	5,0 µl	
dNTP	0,38 µl	(0,15 mM je dNTP)
Primer (20 µM)	1,25 µl	(1 µM)
Taq-Polymerase	0,15 µl	(1,5 U)
Gesamtvolumen	25 µl	

Tabelle 2: PCR-Zyklen für mEh

2a

Exon 3

94°C	4'	
94°C	10"	35
60°C	30"	Zyklen
72°C	45"	
72°C	7'	
4°C	unendlich	

2b

Exon 4

95°C	5'	
93°C	1'	30
63°C	1'	Zyklen
72°C	1'	
72°C	7'	
4°C	unendlich	

3.3.2.2 Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus

Die durch PCR vervielfältigte DNA wird durch den Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus in definierte Fragmente geteilt. Restriktionsenzyme spalten die DNA an ganz bestimmten, meist palindromischen Sequenzen. Anschließend kann die Länge der Fragmente mittels Gelelektrophorese kontrolliert werden (Nicholl D, 1995).

Wird eine Base durch eine Mutation in einer solchen Erkennungssequenz verändert, können entweder neue Restriktionsschnittstellen entstehen oder aber das bestimmte Restriktionsenzym spaltet an dieser Stelle gar nicht mehr.

Bei der mEh können die Polymorphismen in Exon 3 und Exon 4 diagnostiziert werden. Über den Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus wird bei Exon 3 die Erkennungssequenz GACACCGTC des Enzyms Asp I in GATACCGTC geändert und bei Exon 4 erfolgt ein Tausch von GTAC des Enzyms Rsa I in ATAC. Das Enzym kann die eigentliche Sequenz nicht mehr erkennen und das charakteristische Restriktionsmuster wird verändert.

Für die Analyse von RFLP wurden zu 10µl des PCR-Produktes 2µl 10x-Puffer, 7,7µl nukleasefreies Wasser und entweder 0,3µl Asp I (Exon 3) oder Rsa I (Exon 4) hinzugefügt. Das Gemisch wurde 60 Minuten bei 37°C in einem Eppendorfgefäß inkubiert.

3.3.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Die Ergebnisse des RFLP wurden mittels Gelelektrophorese visualisiert. Die Konzentration des Gels entscheidet über den Basenpaarbereich, welcher besonders deutlich aufgetrennt wird. Um den Bereich von Exon 3 und Exon 4 und deren Fragmente nach Restriktionsverdau um 200 bp auftrennen zu können, wurde ein höher konzentriertes Gel mit einer 2%igen Agarosekonzentration verwendet. Die Agarose wurde in 1xTAE Puffer aufgekocht. Zu 100 ml flüssigem Gel wurden 2µl Ethidiumbromid pipettiert, um die DNA-Banden unter UV-Strahlung sichtbar machen zu können. Das flüssige und heiße Gel wurde anschließend in Gelkammern gegossen und durch eine 20-minütige Abkühlung erhärtet.

Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden konnten, wurde zu den RFLP-Produkten im Verhältnis von 1:6 ein Proben-Puffer hinzugefügt. Bei Exon 3 erfolgte die elektrophoretische Auftrennung bei 80 V und 60 Minuten und bei Exon 4 bei 80 V und nur 40 Minuten. Als Kontrolle lief in jedem Gel ein 1kbp Kontrollpuffer mit. Zum einen wurden die Banden so besser ablesbar und zum anderen hatte man eine ständige Kontrolle, wie weit das Gel bisher gelaufen war. Am Ende wurde unter UV-Strahlung ein Foto zu Dokumentations-Zwecken angefertigt.

3.3.3 N-Acetyltransferase 2

Übersicht der SNaPshot Methode

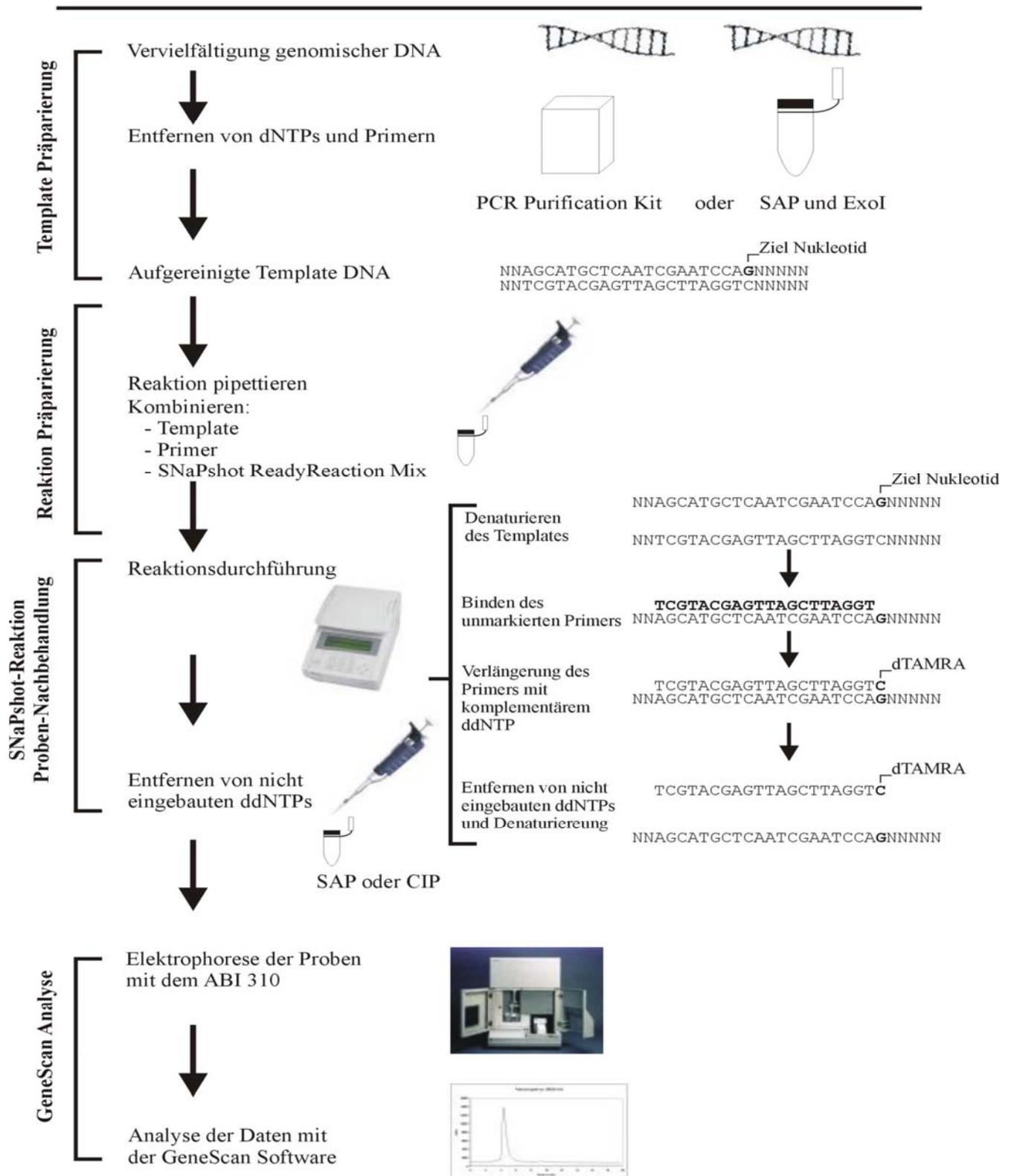


Abb. 1: „Overview of the Procedure“-Protokoll aus: ABI Prism SNaPshot ddNTP (<http://www.appliedbiosystems.com>)

Die nachfolgende Methode wurde im Rahmen der experimentellen Arbeiten für diese Dissertation etabliert. Es werden daher im Folgenden die wichtigsten Vorversuche skizziert:

Die einzelnen Arbeitsschritte für NAT2 wurden in mehreren Versuchsreihen optimiert.

Es wurden für die letztendliche Datengenerierung nur Patienten und Kontrollproben verwendet, die auch schon bei der mEh-Bearbeitung eindeutige Ergebnisse geliefert hatten.

3.3.3.1 PCR

Zum Ablauf und Aufbau einer PCR siehe 3.3.2.1

Die PCR für NAT2 wurde im Laufe der verschiedenen Versuchsmodifizierungen für folgende Faktoren optimiert.

- Die Primerkonzentration wurde modifiziert.
- Das Verhältnis von Primer zu Template wurde zu Gunsten des Templates erhöht, damit alle Primer aufgebraucht werden konnten. Blieben dennoch Primer übrig, wurden diese später durch die Exonuklease I und SAP verdaut bzw. dephosphoryliert, damit sie an einer nachfolgenden Reaktion nicht mehr teilnehmen konnten.
- Die Q-Solution (ursprünglich 10µl auf 50µl Gesamtvolumen) wurde im Gegensatz zu den Versuchsanleitungen der Firma Qiagen herausgelassen.
- Die Menge des Templates wurde verdoppelt.
- Die Konzentration der dNTP's wurde verdünnt (von der ursprünglich vorgesehenen Konzentration 0,5µl dNTPs (Qiagen 10 mM je dNTP) wurden bei der endgültigen PCR-Version 1µl bei einer Verdünnung von: 1 Volumen dNTP-Lösung +7 Volumen HPLC H₂O → (1,25 mM je dNTP) eingesetzt).

PCR Endversion

10x Puffer	5µl
Q-Solution	weglassen
Taq-Pol	0,1µl (5U/µl, Qiagen)
Primer1	1µl 5 pmol Primer 1 (1+3 verdünnen von 20 pmol/µl)
Primer2	1µl 5 pmol Primer 2 (1+3 verdünnen von 20 pmol/µl)
Template	2µl (KPN 10ng/µl) → 4µl genomische DNA
dNTPs	1µl
H ₂ O (HPLC)	(Auffüllung auf 50 µl)
Gesamtvolumen	50µl

Tabelle 3: PCR-Zyklen für NAT2

C°	Min	
95°C	5'	
95°C	1'	34 Zyklen
60°C	1'	
72°C	1'	
72°C	10'	
4°C	unendlich	

Nach mehreren Versuchsreihen wurde die Annealing-Temperatur auf 60°C festgelegt.

PCR-Produkt aufreinigen: Qiagen PCR-Purifikation Kit
Eluat (50-65 µl) enthält das Template für die SNaPshot Reaktion

3.3.3.2 Gele

25µl der PCR wurden auf ein Agarosegel aufgetragen (siehe dazu auch 3.3.4) um zu überprüfen, ob wirklich amplifizierte DNA in der Probe vorhanden war. Hierzu wurde das PCR-Produkt vorher im Verhältnis von 1:6 mit Proben-Puffer vermischt. Bei 80 V lief das Gel 1 Stunde.

3.3.3.3 Aufreinigung (QIAquick PCR Purification Kit Protocol)

Der Purification Kit von Qiagen reinigt Einzel- oder Doppelstrang-PCR-Produkte zwischen 100 bp und 10 kb auf. Diese werden von Primern, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen befreit.

Zu einem Volumen des PCR-Produktes wird die 5-fache Menge an Puffer PB hinzugefügt, um eine optimale Salzkonzentration und einen pH-Wert unter 7,5 herzustellen. Dies bewirkt eine besonders gute Absorption an die Membranen der Aufreinigungssäulen. Diese Aufreinigungssäulen (QIAquick spin columns) enthalten eine Membran aus Siliciumdioxid-Gel mit einem selektiven Bindungsvermögen für Nukleinsäuren. Diese Membran ermöglicht ein Herauswaschen der Verunreinigungen. Die Aufreinigungssäule wird in ein 2ml Sammelgefäß platziert. Das Gemisch aus PCR-Produkt und Puffer wird nun auf die Säule gegeben und 30-60 Sekunden lang zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und durch Zugabe von 750 µl Puffer PE auf die Säule und anschließender 30-60 Sekunden Zentrifugation wird die Säule gewaschen. Erneutes Verwerfen des Überstands. Dieser Vorgang wird ein zweites Mal wiederholt.

Um das nun gereinigte Eluat zu erhalten, werden 50µl Puffer EB (10mM Tris-Cl, ph 8,5) auf die Aufreinigungssäule pipettiert und anschließend 1 Minute zentrifugiert. Nach den ersten Testläufen ergab sich das Problem, dass sich zu unterschiedlichen Zeitpunkten unerwünschte Hintergrundsignale darstellten. Deswegen wurden im Rahmen der Methodenetablierung die Proben mit dem Qiagen Kit aufgereinigt. Die Ursachen dieser Hintergrundsignale konnten zum einen ein Überschuss an Primern aus der PCR Reaktion und zum anderen ein Überschuss an dNTP's aus der PCR-Reaktion sein.

Bei den Primern müsste das Signal aber für die verschiedenen Längen der Primer unterscheidbar sein und die Signale müssten dann aber auch den Primern zuzuordnen sein.

Durch einen Überschuss an dNTP's in der PCR könnten Nukleotide in die SNaPshot Reaktion mitgeschleppt worden sein, welche dort zu einer Verlängerung des SNaPshot Primers führten, so dass mehr als ein Signal erschien. Aber diese Signale müssten auch zuzuordnen sein.

Auf Grund der Unterschiede in den Größen der gekoppelten Farbstoffe bei den ddNTP's können Signale, die gleichzeitig laufen sollen, durchaus zu unterschiedlichen Zeiten detektiert werden → dies ist wichtig für die Heterozygoten.

Problemlösung:

Statt der Aufreinigung der PCR-Produkte über die Qiagen-Säulen wurde nun direkt mit einem Aliquot der PCR-Reaktion (4 µl) ein SAP/Exo I Verdau durchgeführt.

Die shrimp alkaline phosphatase dephosphoryliert DNA (auch Nukleotide) und ist zu 100% hitzeinkativierbar (im Gegensatz zur CIP). Die Exonuklease I sorgt für einen Verdau von Einzelstrang-DNA und zerstört somit die überschüssigen Primer aus der PCR.

Der Vorteil lag darin, dass zum einen kein weiterer Verbrauch an Säulen stattfand und zum anderen weniger Zeit benötigt wurde.

Für jeden µl aus der PCR-Reaktion sollten 0,5 Units von jedem Enzym eingesetzt werden. Empfohlen waren 4 µl aus dem PCR-Ansatz und die Verwendung von SAP Puffer schien egal zu sein (SNaPshot Handbuch).

4µl	PCR-Reaktion	→	4µl
(4x0,5U=2U)	SAP	→	2µl
(4x0,5U=2U)	Exo I	→	0,2µl
	Deionisiertes H ₂ O	→	6µl

3.3.3.4 Kontrollplasmid

Um Fehlerquellen auszuschließen, wurde ein Kontrollplasmid erstellt. Mit diesem wurden die unterschiedlichen Primer in verschiedensten Konzentrationen ausgetestet. Dieses Kontrollplasmid lief anschließend bei jeder Versuchsreihe mit. Es war die Kontrolle, ob die einzelnen Schritte erfolgreich abgelaufen waren. Bei fehlenden Signalen in der Endauswertung konnte somit festgestellt werden, ob ein Nichtgelingen an den Proben an sich lag oder an der Versuchsreihe. Das Kontrollplasmid besaß eine definierte Menge an DNA und sollte deswegen immer das gleiche Ergebnis liefern.

Nimmt man 0,5-4 µl einer typischen DNA Probe (10-20 ng/µl) bei einer Größe von 400-1000 bp, so erhält man ein Verhältnis von Insert zu Vektor für die TOPO Klonierung, welches optimal ist.

Bei unseren Analysen wurden 4µl einer DNA-Probe verwendet, welche vorher schon bei den mEh- Versuchen klare und eindeutige Banden gezeigt hatte.

4µl PCR-Produkt

1µl pCR-TOPO Vektor (Clontech Kit)

5µl Reaktionsansatz

Der Reaktionsansatz wurde vorsichtig vermischt und anschließend bei Raumtemperatur (25°C) inkubiert. Wichtig war, dass es nicht mehr als 5 Minuten waren, weil sonst die Transformationsrate gesunken wäre. Durch die Zugabe von 1 µl 6x TOPO Cloning Stop wurde die Dissoziation der Topoisomerase gefördert. Es folgte ein 10 Sekunden langes Mischen. Bis zur Transformation wurde die Probe auf Eis gelagert.

Transformation

2µl der TOPO Klonierungsreaktion wurden in ein Eppendorfgefäß mit One Shot Bakterien (chemisch kompetente Bakterien) pipettiert und sanft vermischt. Anschließend wurde das Eppendorfgefäß 30 Minuten auf Eis gelagert. Daraufhin folgte ein 30-Sekunden-Hitzeschock bei 42°C und weiteres Inkubieren auf Eis für 2 Minuten. 250 µl SOC Medium wurden bei Raumtemperatur hinzugemischt und 30 Minuten bei 37°C in einem Bakterienschüttler (180 UpM) inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 50 µl Bakteriensuspension auf einer LB-Agarplatte mit 100 µg/ml Ampicillin zur Selektion ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Analyse der Kolonien wurden 10 von der Platte gepickt und in 1,5 ml LB-Medium 16 Stunden wachsen gelassen.

Die 10 gepickten Klone wurden dann mit dem Mini Prep Kit von Qiagen (Plasmid Purification) bearbeitet und Plasmid-DNA gewonnen.

Eine Kontroll-PCR folgte und nach einem positiven Bandennachweis konnte die Probe mit dem Maxi Prep Kit (Qiagen Plasmid Maxi Kit) weiterbearbeitet werden.

Anschließend wurde die Plasmid-DNA sequenziert. Es musste geprüft werden, ob die vier zu untersuchenden Basen auch wirklich in der Plasmid-DNA enthalten waren.

3.3.3.5 Photometer und SNaPshot Rechnung

Die Berechnung der DNA-Menge erfolgte nach einer festgelegten Formel, welche als Programm im Computer gespeichert wurde. Nachdem die DNA mit Hilfe eines Photometers bei 260 und 280 nm quantifiziert wurde, konnte die weitere Berechnung stattfinden.

DNA-Quantifizierung mit Photometer	= Eppi, 280 μ l H ₂ O + 20 μ l Eluat (Verdünnungsfaktor 15)
DNA-Konzentration (C) in ng/ μ l	= $A_{260nm} * 50 \mu\text{g/ml}$ (oder ng/ μ l) * Verdünnungsfaktor
Molekulargewicht (MW) des PCR-Template in Da	= Anzahl der Basenpaare (bp) * 650 Da/bp
Umrechnung ng/ μ l in pmol/ μ l	= $10^3 / \text{MW (Da)} * C \text{ (ng/\mul)}$

Durch die Umrechnung von ng/ μ l in pmol/ μ l konnte die PCR-Produktmenge bestimmt werden, die jeweils für die weiteren Schritte pipettiert werden sollte. Es fand noch eine weitere Umrechnung der pmol/ μ l Menge in μ l/0,15 pmol statt, weil dies die benötigte Konzentration darstellte.

Nach mehreren Versuchsreihen wurde klar, dass es reichen würde, nach der PCR ein Kontrollgel laufen zu lassen, um eine erfolgreiche PCR zu dokumentieren und dadurch wurde die photometrische DNA-Bestimmung unnötig.

3.3.3.6 SNaPshot

SNaPshot

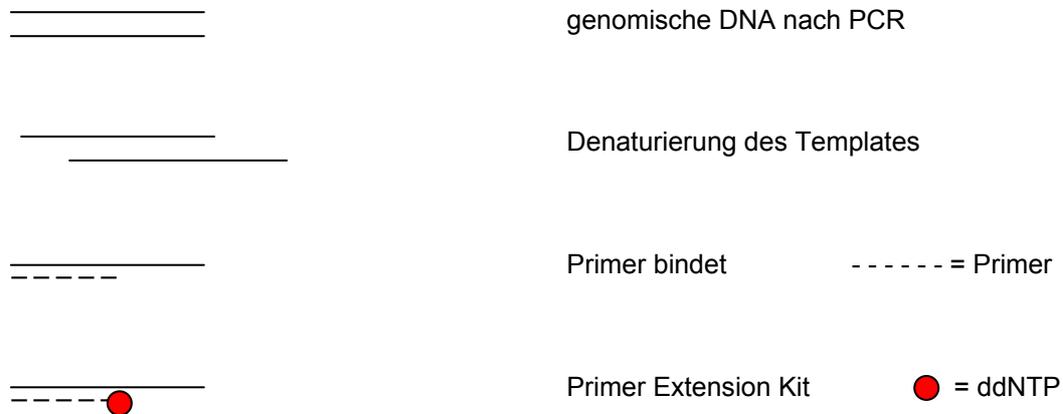


Abb. 2: SNaPshot ddNTP Primerbindung

Die aufgereinigten PCR-Produkte mussten nun weiterbearbeitet werden, bevor sie in den Genetic Analyzer platziert werden konnten. Das Kontrollplasmid diente zur Testung von 3 verschiedenen Wegen, wie die Proben zukünftig behandelt werden sollten.

Im Laufe der Austestungen wurden die einzelnen Dosierungen, Temperaturen und Verdauzeiten verändert und weichen daher teilweise von der „ABI Prism SNaPshot ddNTP Extension Kit Quick Reference Card“ ab.

1. Das Kontrollplasmid galt als Template für die SNaPshot Reaktion

SNaPshot

SNaPshot Ready Reaction Premix	5 μ l
Primer (0,15 pmol/ μ l)	1 μ l
Template (0,15 pmol/ μ l)	2 μ l
HPLC H ₂ O	2 μ l

2. PCR aufgereinigt

Template Menge = 4 μ l Eluat PCR-Aufreinigung
Primer Menge = 0,15 pmol

SNaPshot:

SNaPshot Ready Reaction Premix	5 μ l
Primer (0,15 pmol/ μ l)	1 μ l
Template (PCR-Aufreinigung)	4 μ l

PCR

10x Puffer	5 µl	
Taq-Pol	0,1 µl (5U/µl, Qiagen)	
Primer1	5 pmol Primer 1	
Primer2	5 pmol Primer 2	
Template	2 µl KPN 10ng/µl	
dNTPs	A) 1 µl und B) 2 µl	=> (1µl reichte)
<u>H₂O (HPLC)</u>	<u>(auf 50 µl Auffüllen)</u>	
	50µl	

3. PCR/SAP/Exo I

SAP/Exo Behandlung:

PCR Reaktion	8 µl	
2 U SAP	2 µl	
2 U Exo I	0,2 µl	(1+4 verdünnen → also 1µl nehmen)
Deionisiertes H ₂ O	10 µl	

37°C	1 Stunde
72°C	20 Minuten

SNaPshot:

SNaPshot Ready Reaction Premix	5 µl
Primer (0,15 pmol/µl)	1 µl
Template (SAP/Exo Behandlung)	4 µl

Voraussichtliche Ergebnisse:

1. muss sauberes Signal geben (ist die positive Kontrolle)
2. kann mehrere Signale ergeben
3. sollte sauberes Signal ergeben

Verdünnung der Primer von 100 pmol/µl auf 0,15 pmol/µl:

100 pmol/µl

→ 10 µl + 990 µl H₂O → 1 pmol/µl

→ 15 µl + 85 µl H₂O → 0,15 pmol/µl

SNaPshot Reaktion

Die MicroAmp-Eppendorfgefäße (jeweiliges Volumen 10µl) wurden in einen 9600 Thermocycler gestellt.

Tabelle 4: SNaPshot Reaktionsablauf

C°	Sec	
96°C	20	25
50°C	10	Zyklen
60°C	30	
4°C	unendlich	

Post-Extension-Behandlung:

Anschließend wurde zu den 10µl der SNaPshot-Reaktion 0,5 U SAP (shrimp alkaline phosphatase) hinzupipettiert und dann bei 37°C eine Stunde lang inkubiert. In den darauf folgenden 20 Minuten wurde das Enzym bei 72°C wieder deaktiviert.

37°C 1 Stunde

72°C 20 Minuten

4°C unendlich

Probenvorbereitung für ABIPrism310

Bevor die Proben nun in den Analyzer konnten, musste noch eine letzte Vorbereitung getroffen werden. In die benötigten Röhrchen kamen 15 µl deionisiertes Formamid und 3 µl der SNaPshot Reaktions-Probe. Dann wurde das Gemisch kurz gevortext. Die Denaturierung der Proben geschah während der 15 Minuten bei 95°C. Anschließend verblieben die Röhrchen auf Eis, bis sie in den Analyzer platziert wurden.

15 µl deionisiertes Formamid

3 µl SNaPshot Reaktion

vortexen

95°C 15 Minuten

Lagerung bei 4°C (auf Eis stellen)

3.3.3.7 Elektrophorese in dem ABI Prism 310 Genetic Analyzer

Um die einzelnen Punktmutationen nun sichtbar zu machen, wurden die bei 4°C gekühlten Proben schließlich in den Analyzer gestellt. Eine GeneScan E Matrix wurde vor dem ersten Lauf erstellt, damit am Ende bei der Auswertung jede mögliche Base, eine andere Farbe zeigte (A= grün, C= schwarz, G= blau, T= rot) und somit das Ablesen der Ergebnisse vereinfacht wurde.

Zur Analyse der Daten verwendeten wir das „GeneScan Module POP4 (1mL) E. Hier wurde eine kurze Kapillare benötigt.

3.4 Statistische Methoden

Die Analyse der mEh-Daten wurde mittels des Programms SPSS 9.0 und der Unterstützung von Herrn Dr. sc. math. Willers, Universitätsrechenzentrum Düsseldorf, durchgeführt. Als statistisch signifikant angesehen wurde ein P-Wert $<0,05$. Zu den angewendeten Tests gehörten der Chi-Quadrat-Test nach Pearson, der Student's T-Test, der Fisher-Exakt-Test, die Odds Ratio und Multivarianzanalysen.

Die NAT2 Untersuchungsergebnisse wurden nur deskriptiv ausgewertet, da die Probenanzahl für eine statistische Auswertung nicht groß genug war.

4 Ergebnisse

4.1 Mikrosomale Epoxidhydrolase

Die vier verschiedenen mEh-Allele entstehen durch die An- oder Abwesenheit zweier Punktmutationen in den Genen.

Exon 3

T→C Mutation = Tyrosin 113 →Histidin
Enzymaktivität um mindestens 50 % reduziert („langsames“ Allel)

Exon 4

A→G Mutation = Histidin 139 →Arginin
Enzymaktivität steigt um wenigstens 25 % an („schnelles“ Allel)

(Hassett C, 1994; Smith CAD, 1997)

Der Wildtyp hat keine dieser Veränderungen. Das seltene Auftreten beider Veränderungen zusammen erzeugt eine Hydrolase mit normaler Aktivität (Smith CAD, 1997).

Genotyp

Exon 3

Wt	= Tyrosin 113	231bp
Mutant	= Histidin 113	209/22bp
Heterozygot	= Tyrosin 113 + Histidin113	

Exon 4

Wt	= Histidin 139	295/62bp
Mutant	= Arginin 139	174/121/62bp
Heterozygot	= Histidin 139 + Arginin139	

Phänotyp

<i>Normal</i>	= *wt Ex3 + wt Ex4	und	*het Ex3 + het Ex4
<i>Schnell</i>	= *wt Ex3 + mutant Ex4	und	*wt Ex3 + het Ex4
<i>Langsam</i>	= *het Ex3+ wt Ex4		
<i>Sehr langsam</i>	= *mutant Ex3		

Kaukasier

Tabelle 5: mEh-Genotypenverteilung in den kaukasischen Patienten- und Kontrollgruppen

5a

		Ex3		
		<i>wild</i>	<i>het</i>	<i>mutant</i>
ALL	3	2	1	0
C-ALL	25	9	13	3
T-ALL	16	9	4	3
prä B-ALL	20	7	11	2
AML	9	2	7	0
CML	4	1	2	1
EAA	84	43	29	12
Rest *	30	17	11	2
AML/ALL	1	0	0	1
C-ALL/AML	1	1	0	0
<i>n</i> =	127	57	58	12
NP	215	91	102	22

5b

	Ex4		
	<i>wild</i>	<i>het</i>	<i>mutant</i>
	1	2	0
	16	9	0
	12	4	0
	10	10	0
	6	3	0
	3	1	0
	56	27	1
	20	10	0
	1	0	0
	1	0	0
	79	47	1
	139	71	5

Tabelle 6: Verteilung der wahrscheinlichen mEh-Phänotypen in den kaukasischen Patienten- und Kontrollgruppen

		<i>normal</i>	<i>schnell</i>	<i>langsam</i>	<i>sehr langsam</i>
ALL	3	0	2	1	0
C-ALL	25	9	4	9	3
T-ALL	16	9	1	3	3
prä B-ALL	20	7	4	7	2
AML	9	5	0	4	0
CML	4	2	0	1	1
EAA	84	37	14	21	12
Rest *	30	11	8	9	2
AML/ALL	1	0	0	0	1
C-ALL/AML	1	1	0	0	0
<i>n</i> =	127	54	23	38	12
NP	215	78	42	73	22

*Rest = Lymphome 9 (davon sind 4 T-Zell-Lymphome, 2 B-Zell-Lymphome, 2 NHL, 1 M. Hodgkin)
Tumore 21 (davon sind 5 Neuroblastome, 2 Ewing-Sarkome, 4 Medulloblastome)

In Tabelle 5 und 6 wird deutlich, dass bei den untersuchten Proben lymphatische Leukämien sehr viel häufiger auftraten als myeloische. Teilweise mussten Proben mehrfach der PCR und dem RFLP unterzogen werden, weil entweder die Probe nur für Exon 3 oder nur für Exon 4 eine eindeutige Bande auf den Gelen zeigte.

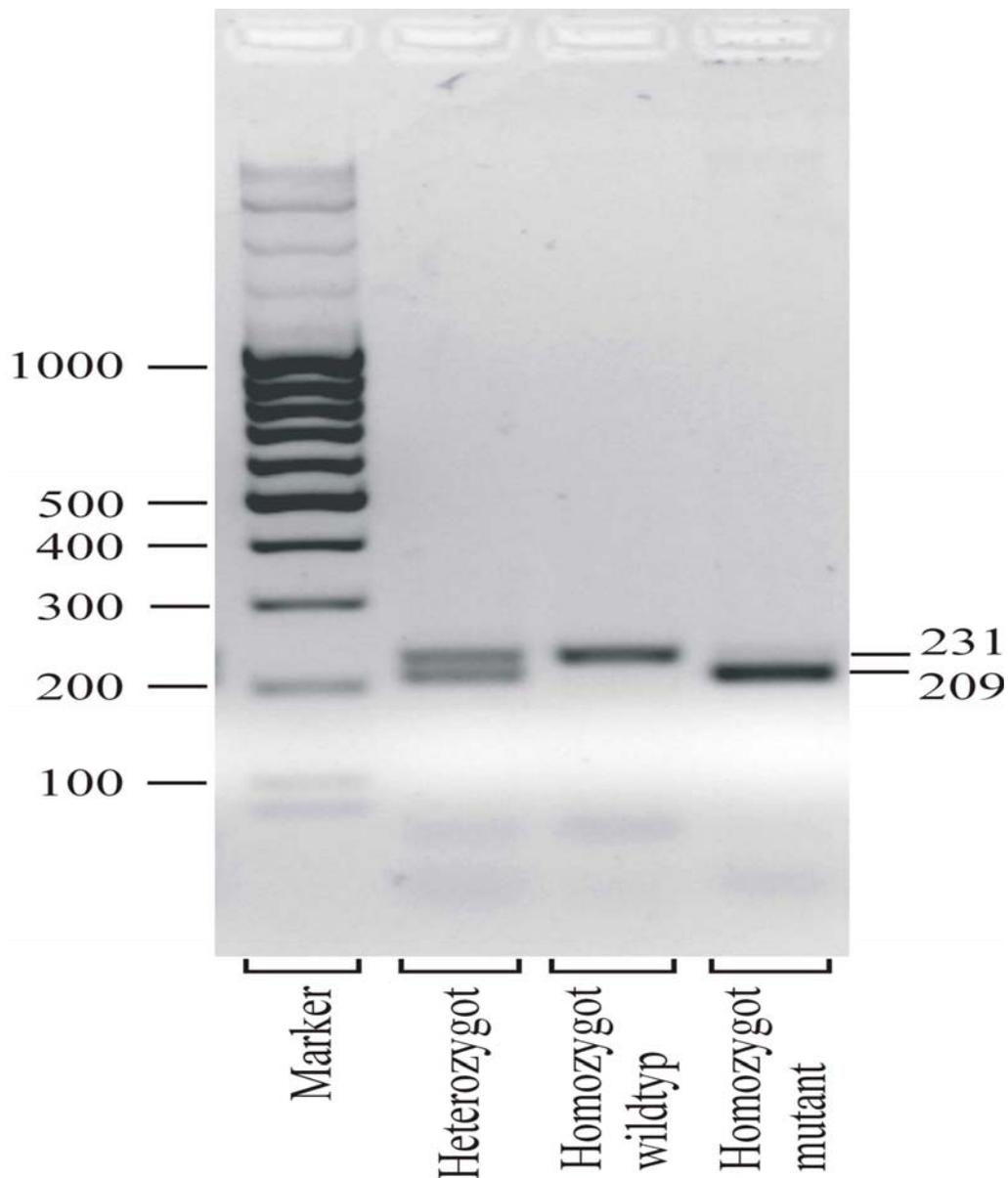


Abb. 3: Exon 3 Polymorphismen der PCR-RFLP Analysen, Elektrophoresegel

Exon 3

Homozygot wildtyp = Tyrosin 113	231bp
Homozygot mutant = Histidin 113	209/22bp
Heterozygot = Tyrosin 113 + Histidin113	231/209/22bp

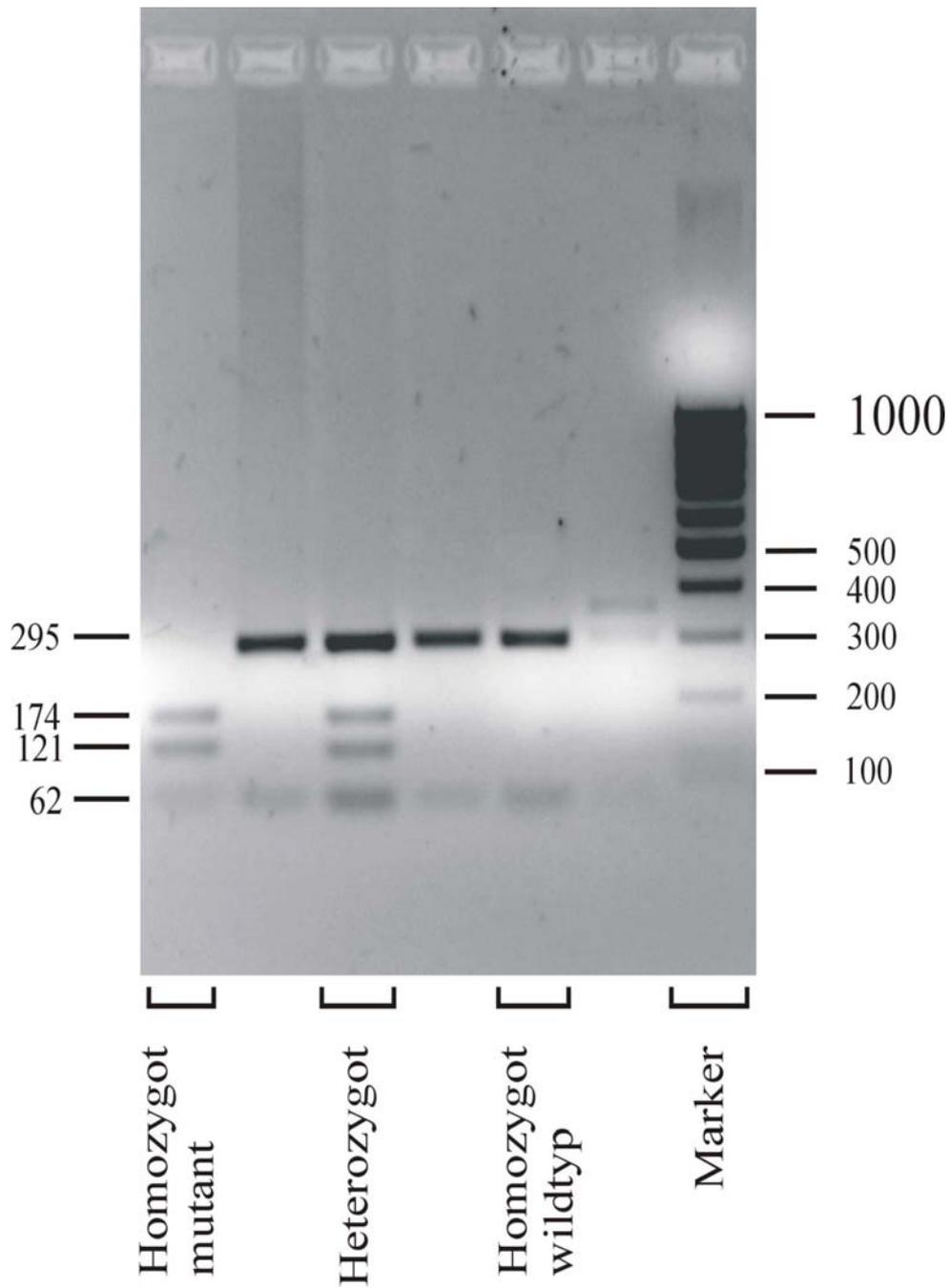


Abb. 4: Exon 4 Polymorphismen der PCR-RFLP Analysen, Elektrophoresegel

Exon 4

Homozygot wildtyp = Histidin 139

Homozygot mutant = Arginin 139

Heterozygot = Histidin 139 + Arginin139

295/62bp

174/121/62bp

295/174/121/62bp

Um größere Gruppen zu erhalten, wurden die einzelnen Leukämie-Untergruppen zusammengefasst.

ALL+ C-ALL+ prä B-ALL= ALL (sie besitzen alle die gleichen Vorläuferzellen)
 T-ALL= T-ALL
 AML+ CML= Myeloische Leukämie
 EAA= Erworbene aplastische Anämien
 AML/ALL= seltener Einzelfall, deshalb gesondert betrachtet
 C-ALL/AML= seltener Einzelfall, deshalb gesondert betrachtet
 Rest= 9 Lymphome: 4 T-Zell-Lymphome, 2 B-Zell-Lymphome, 2 NHL, 1 M. Hodgkin
 21 Tumore: unter anderem 5 Neuroblastome, 2 Ewing-Sarkome, 4 Medulloblastome
 NP= Gesunde Kontrollgruppe

Die „Rest-Gruppe“ wurde nicht mehr in die weiteren statistischen Berechnungen einbezogen, da sie zu viele kleine Untergruppen aufwies.

Tabelle 7: Verteilung der mEh-Genotypen in den kaukasischen Patienten- und Kontrollgruppen mit statistischen Auswertungen

					1	2	3
					OR (95% CI) für Homozygot mutant	Allelfrequenz mutant	OR (95% CI) Träger eines Mutanten Allels
Ex3		<i>wild</i>	<i>heterozygot</i>	<i>mutant</i>			
ALL	48	18(37%)	25(52%)	5(10%)	1,9 (0,6-5,6)	0,4	1,3 (0,8-2,1)
T-ALL	16	9(56%)	4(25%)	3(19%)	3,7 (0,9-14,8)	0,3	1,0 (0,5-2,2)
AML+CML	13	3(23%)	9(69%)	1(8%)	1,3 (0,2-11,2)	0,4	1,7 (0,7-3,7)
EAA	84	43(51%)	29(35%)	12(14%)	2,7 (1,2-6,2)	0,3	1,0 (0,7-1,5)
NP	215	91(43%)	102(48%)	22(10%)	1,0 *	0,3	1,0 *
Ex4		<i>wild</i>	<i>heterozygot</i>	<i>mutant</i>			
ALL	48	27(56%)	21(44%)	0	***	0,2	1,2 (0,7-2,1)
T-ALL	16	12(75%)	4(25%)	0	***	0,1	0,6 (0,2-1,8)
AML+CML	13	9(69%)	4(31%)	0	***	0,2	0,8 (0,3-2,3)
EAA	84	56(67%)	27(32%)	1(1%)	0,5 (0,1-4,4)	0,2	0,9 (0,6-1,4)
NP	215	139(65%)	71(33%)	5(2%)	1,0 *	0,2	1,0 *

*Referenzgruppe

1
 2= (2*mutant+ 1* het) durch 2*n
 3= 2*mutant+ het auf 2*wild+ het
 ***= nicht relevant, da mutant= 0

Tabelle 7 zeigt, dass in Exon 3 das Verhältnis der NP Wildtyp-/Heterozygoten Gruppen fast gleich (43 % zu 48 %) war, doch bei Exon 4 gab es einen deutlichen Unterschied von 139/215 (65 %) wild zu 71/215 (33 %) heterozygot mutant.

Die Patientengruppen stellten prozentual die gleiche Anzahl von Exon 3 Wildtyp wie die Kontrollpersonen (siehe Tabelle 7). In der myeloischen Leukämiegruppe gab es nur 3/13 (23 %) Wildtyp-Allele. AML/CML zeigte dementsprechend in der heterozygoten mutant Spalte eine Anhäufung von 69 %, wo hingegen dieser Anteil in allen anderen Patientengruppen nur zwischen 25-52 % und bei der NP-Gruppe bei 48 % lag.

Für Exon 4 waren nur 5 Kontrollpersonen homozygot mutant für Arg/Arg 139 sowie nur 1 EAA-Patient. Die prozentuale Wildtyp- und Heterozygotenverteilung für Exon 4 stellte sich für die Patienten- und Kontrollgruppe annähernd gleich dar. Die ALL-Gruppe wies 21/48 (44 %) Heterozygote für Exon 4 auf und die T-ALL-Gruppe nur 2/16 (25 %).

Die *mutante* Allelfrequenz blieb für Exon 3 zwischen 0,3 und 0,4. Für Exon 4 lag sie bei 0,1-0,2. Es unterschied sich weder die Häufigkeit für homozygote noch die gesamte Häufigkeit der Mutationsträger signifikant zwischen den Patienten- und der Kontrollgruppe. Für Exon 3 waren die OR teilweise deutlich >1,0 und dies bedeutet, dass der Besitz eines mutanten Allels einen Risikofaktor für Leukämie und EAA darstellen könnte. Doch obwohl die OR 3,7 für T-ALL (Exon 3) war, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe.

Tabelle 8: Verteilung der wahrscheinlichen mEh-Phänotypen in den kaukasischen Patienten- und Kontrollgruppen mit statistischen Auswertungen

		<i>normal</i> §	<i>schnell</i>	<i>langsam</i>	<i>sehr langsam</i>	Odds ratio (95% CI) Sehr Langsam vs alle anderen Phänotypen
ALL	48	16(33%)	10(21%)	17(35%)	5(10%)	0,98 (0,4-2,7)
T-ALL	16	9(56%)	1(6%)	3(19%)	3(19%)	0,5 (0,1-1,9)
AML+CML	13	7(54%)	0	5(39%)	1(8%)	1,4 (0,2-11,0)
EAA	84	37(44%)	14(17%)	21(25%)	12(14%)	0,7 (0,3-1,5)
NP	215	78(37%)	42(20%)	73(34%)	22(10%)	1,0 *

§ *Normal* = keine Mutation in den Genen oder heterozygot für Exon 3 und 4; *schnell*= mindestens eine schnelle Mutation (Exon 4) und keine Exon 3 Mutation; *langsam*= ein langsames (Exon 3) Allel; *sehr langsam*= zwei langsame Allele (*Smith CAD, 1997*)

In der Kontrollgruppe der Tabelle 8 trat das *normale* Allel fast doppelt so häufig wie das *schnelle* und annähernd 4-mal so oft wie das *sehr langsame* Allel auf. Dies war auch in der ALL-Gruppe der Fall.

In der EAA-Gruppe war das Verhältnis von *normaler* mEPHX-Aktivität zu den anderen Geschwindigkeiten ungefähr genauso verteilt wie bei der Kontrollgruppe, nur dass die *normalen* Acetylierer einen Anteil von 44 % einnahmen. Die T-ALL-Gruppe hatte eine deutliche Mehrheit mit 56 % bei den Enzymen mit *normaler* Aktivität und nur 6 % bei den *schnellen* Allelen. Hier waren die *langsamen* und *sehr langsamen* Allele mit je 19 % vertreten. Bei den myeloischen Leukämien besaß kein Patient den *schnellen*, aber 39 % den *langsamen* und 54 % den *normalen* Phänotyp.

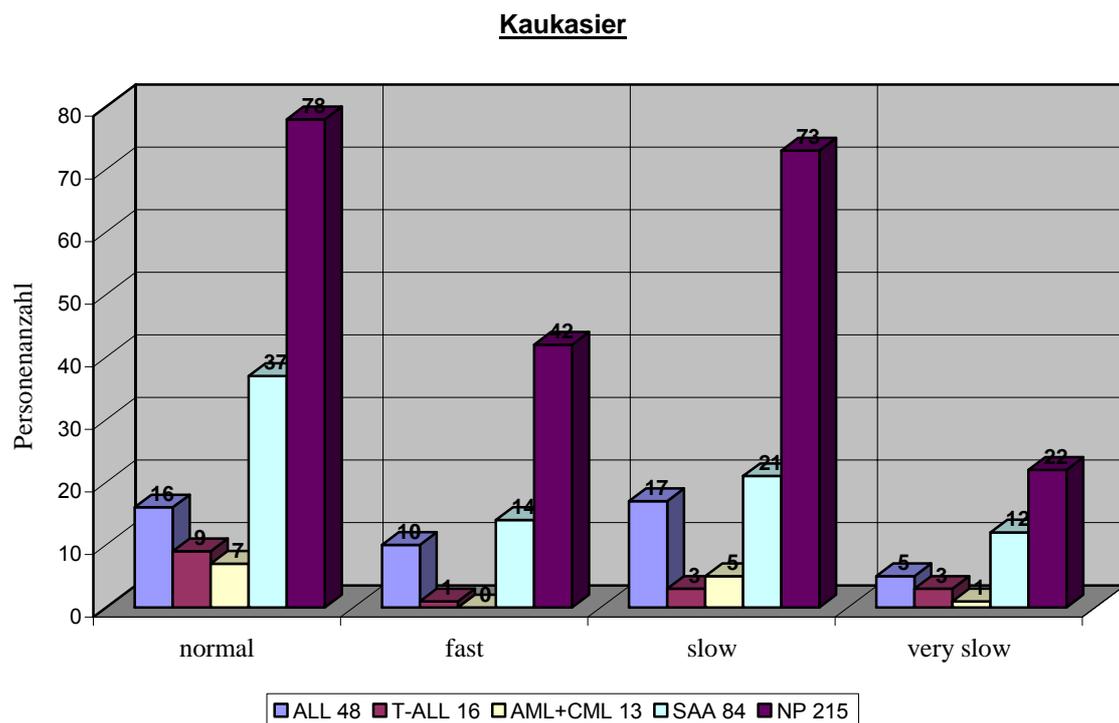


Abb. 5: Kaukasische Phänotypenverteilung

Die Häufigkeitsverteilungen der mEh Genotypen und der damit wahrscheinlichen Phänotypen für die Patientengruppen unterschieden sich prozentual kaum von der Kontrollgruppe und waren nicht signifikant. Die OR waren in den meisten Patientengruppen knapp <1,0 und damit stellte der *sehr langsame* Phänotyp eher keinen Risikofaktor für die Entstehung hämato-onkologischer Erkrankungen dar.

Unter den untersuchten Proben waren die zweier biphänotypischer Leukämiepatienten aufgetreten (Tabellen 5 und 6), zum einen AML/ALL und zum anderen C-ALL/AML. Der Patient mit der AML/ALL hatte eine biphänotypische ALL mit Expression von myeloischen und T-Zellantigenen und war phänotypisch ein *sehr langsamer* Acetylierer. Der Patient mit der C-ALL/AML hatte eine bilineale akute Leukämie mit C-ALL Blasten und monozytären Blasten und acetylierte mit *normaler* Geschwindigkeit.

Asiaten

Das Untersuchungsmaterial aus Bischkek (Kirgisistan) wurde uns in regelmäßigen Abständen geschickt. Anfangs haben wir die DNA aus Blut oder KM-Proben selbst extrahiert, später wurden uns direkt die DNA-Proben geschickt, wahrscheinlich wegen des langen Transportes waren leider viele Proben unbrauchbar.

Tabelle 9: mEh-Genotypenverteilung in den asiatischen Patienten- und Kontrollgruppen

9a

		Ex3		
		<i>wild</i>	<i>het</i>	<i>mutant</i>
ALL	18	11	7	0
ONL	1	0	1	0
ANL	8	3	5	0
AML	7	0	6	1
AA	6	5	1	0
EAA	5	2	2	1
Rest	5	1	3	1
C-ALL	1	1	0	0
CML	2	1	1	0
<i>n</i> =	53	24	26	3
NP	18	12	4	2

9b

		Ex4		
		<i>wild</i>	<i>het</i>	<i>mutant</i>
		17	1	0
		1	0	0
		7	1	0
		6	1	0
		5	1	0
		3	2	0
		4	1	0
		1	0	0
		2	0	0
		46	7	0
		15	2	1

Tabelle 10: Verteilung der wahrscheinlichen mEh-Phänotypen in den asiatischen Patienten- und Kontrollgruppen

		<i>normal</i>	<i>fast</i>	<i>slow</i>	<i>very slow</i>
ALL	18	10	1	6	1
ONL	1	0	0	1	0
ANL	8	2	1	5	0
AML	7	1	0	5	1
AA	6	4	1	1	0
EAA	5	4	0	0	1
Rest	5	2	0	2	1
C-ALL	1	1	0	0	0
CML	2	1	0	1	0
<i>n</i> =	53	25	3	21	4
NP	18	10	2	4	2

Die einzelnen leukämischen Untergruppen der Tabellen 9 und 10 wurden zu größeren Gruppen in den nachfolgenden Tabellen zusammengefasst, damit bessere prozentuale Aussagen getroffen werden konnten.

Leukämien= ALL+ ONL+ ANL+ AML+ Rest+ C-ALL+ CML

LSA= Leukämien+ EAA/ AA

NP= gesunde Kontrollgruppe aus Bischkek

Tabelle 11: Verteilung der mEh-Genotypen in den asiatischen Patienten- und Kontrollgruppen mit statistischen Auswertungen

					1	2	3
					OR (95% CI) für Homozygot mutant	Allelfrequenz mutant	OR (95% CI) Träger eines Mutanten Allels
		wild	heterozygot	mutant			
Ex3							
Leukämie	42	17(41%)	23(55%)	2(5%)	0,4 (0,1-3,1)	0,3	1,7 (0,7-4,1)
LSA	53	24(45%)	26(49%)	3(6%)	0,5 (0,1-3,1)	0,3	1,5 (0,6-3,7)
NP	18	12(67%)	4(22%)	2(11%)	1,0*	0,2	1,0*
Ex4							
		wild	heterozygot	mutant			
Leukämie	42	38(90%)	4(10%)	0	***	0,05	0,4 (0,1-1,7)
LSA	53	46(87%)	7(13%)	0	***	0,07	0,6 (0,2-2,1)
NP	18	15(83%)	2(11%)	1(6%)	1,0*	0,11	1,0*

*Referenzgruppe

1

2= (2*mutant+ 1* het) durch 2*n

3= 2*mutant+ het auf 2*wild+ het

***= nicht relevant, da mutant= 0

MEh-Genpolymorphismen wurden bei 53 Patienten und 18 gesunden Probanden aus Bischkek untersucht. Für Exon 3 zeigte sich kein wesentlicher Unterschied zwischen der Leukämie- 17/42 (41 %) und der LSA-Gruppe 24/53 (45 %) bezogen auf den Wildtyp Tyr/Tyr113. In der gesunden Kontrollgruppe waren es dagegen 12/18 (67 %). Dadurch ergab sich ein anderes Verteilungsmuster in der Heterozygotengruppe. Heterozygot für Exon 3 waren 23/42 (55 %) der Leukämiekranken und 26/53 (49 %) der LSA-Patienten, aber nur 4/18 (22 %) der Kontrollpersonen. Homozygot für die Mutation His/His113 waren 2/42 (5 %) der Leukämie-Patienten, 3/53 (6 %) der LSA-Gruppe und 2/18 (11 %) der Kontrollpersonen.

Bei Exon 4 hatten 15/18 (83 %) der Kontrollen den homozygoten Wildtyp-Genotyp. In der LSA-Gruppe waren es 46/53 (87 %) und in der Leukämiegruppe 38/42 (90 %). Die Verteilung der Heterozygoten Tyr/His113 innerhalb der 3 Gruppen lag zwischen 10 % und 13 %. Nur eine Kontrollperson war homozygot für die Mutation His/His113. Deshalb konnte für die Patienten auch keine OR für homozygot mutant berechnet werden. Die statistischen Auswertungen waren nicht signifikant.

Tabelle 12: mEh-Phänotypen der asiatischen Patienten- und Kontrollgruppen

		<i>normal</i> §	<i>schnell</i>	<i>langsam</i>	<i>sehr langsam</i>	Odds ratio (95% CI) Sehr Langsam vs alle anderen Phänotypen
Leukämie	42	17(41%)	2(5%)	20(48%)	3(7%)	0,6 (0,9-4,0)
LSA	53	25(47%)	3(6%)	21(40%)	4(8%)	0,7 (0,1-3,9)
NP	18	10(56%)	2(11%)	4(22%)	2(11%)	1,0*

§ *Normal* = keine Mutation in den Genen oder heterozygot für Exon 3 und 4; *schnell* = mindestens eine schnelle Mutation (Exon 4) und keine Exon 3 Mutation; *langsam* = ein langsames (Exon 3) Allel; *sehr langsam* = zwei langsame Allele (*Smith CAD, 1997*)

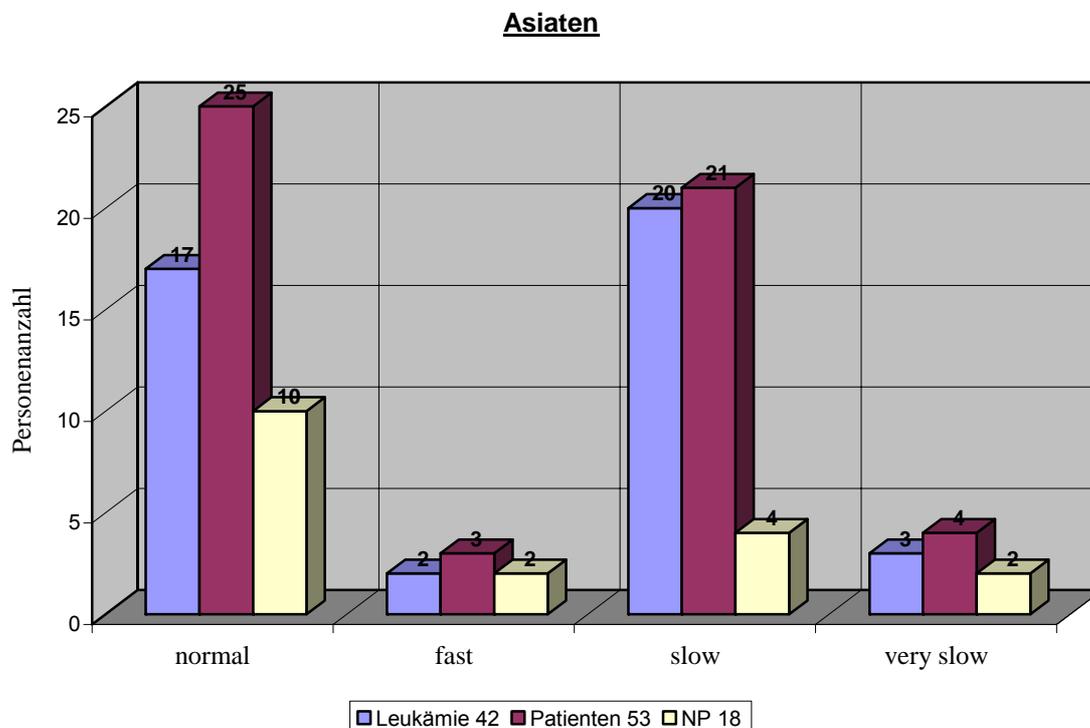


Abb. 6: Asiatische Phänotypenverteilung

Für die Phänotypenverteilung in Tabelle 12 und Abbildung 6 ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei zu untersuchenden Gruppen. Die OR deutete eher auf eine protektive Funktion des *sehr langsamen* Phänotypen als auf einen Risikofaktor für die Entstehung hämato-onkologischer Erkrankungen hin.

Der *normale* mEPHX Phänotyp besaß einen Anteil von 41-56 % innerhalb der Gruppen. Den *schnellen* Phänotyp wiesen 2/42 (5 %) der Leukämiepatienten, 3/53 (6 %) der LSA-Gruppe und 2/18 (11 %) der Kontrollgruppe auf. *Langsam* waren 20/42 (48 %) und 21/53 (40 %) der erkrankten Probanden, aber nur 4/18 (22 %) der Kontrollpersonen. *Sehr langsame* Phänotypen zeigten zwischen 7 und 11 % der Patienten- und Kontrollgruppen.

Ethnische Unterschiede

Die ethnischen Gruppen von Kaukasiern und Asiaten unterschieden sich nur geringfügig. Die Daten wurden deskriptiv ausgewertet. Bei den Normalpersonen wurde der Wildtyp Tyr/Tyr 113 bei 91/215 (43 %) Kaukasiern und bei 12/18 (67 %) Asiaten nachgewiesen. Heterozygot für Exon 3 waren 102/215 (48 %) der kaukasischen Kontrollpersonen und nur 4/18 (22 %) der asiatischen. Die homozygote Mutationshäufigkeit für Exon 3 war mit 11 und 12 % in etwa gleich.

Für Exon 4 waren die kaukasischen Patienten und Kontrollpersonen zu ca. 66 % homozygot für den WT His/His139, bei den Kirgisen bis 90 %. Dementsprechend veränderte sich auch die Heterozygotenverteilung. Bei den Kaukasiern zwischen 25 und 33 % und bei den Asiaten nur 10-13 %. Aber homozygoter Mutationsträger Arg/Arg139 waren nur ein kaukasischer Patient und 5 kaukasische Kontrollpersonen sowie eine asiatische Kontrollperson.

Die Analyse der Phänotypen zeigte jedoch den *schnellen* mEPHX Phänotyp häufiger bei der kaukasischen Patienten- und Kontrollgruppe als bei den Asiaten.

4.2 N-Acetyltransferase 2

Die Enzymaktivität von NAT2 wird durch bestimmte Punktmutationen vermindert, dadurch wird phänotypisch eine Unterscheidung zwischen *langsamen* und *schnellen* Acetylierern möglich. Das dominante „Wildtyp“-Allel NAT2*4 kann in einen homozygoten und einen heterozygoten *schnellen* Acetylierer eingeteilt werden (Vatsis KP, 1995).

Tabelle 13: Punktmutationen der 19 Leukämiepatienten und der 25 Kontrollen

Diagnose	Pr 191	Pr 341	Pr 590	Pr 857	NAT2*	NAT2*	2 het. Mut.
wt	G	T	G	G	4	4	
KPN	G	C	G	G	5D	5D	
Leukämie	G	T	G	G	4	4	
Leukämie	G	T	G	G	4	4	
Leukämie	G	T	G	G	4	4	
Leukämie	G	T / C	G	G	4	5D	
Leukämie	G	T / C	G	G	4	5D	
Leukämie	G	T / C	G	G	4	5D	
Leukämie	G	C	G	G	5D	5D	
Leukämie	G	C	G	G	5D	5D	
Leukämie	G	C	G	G	5D	5D	
Leukämie	G	T	G / A	G	4	6	
Leukämie	G	T	G / A	G	4	6	
Leukämie	G	T	G / A	G	4	6	
Leukämie	G	T	G / A	G	4	6	
Leukämie	G	T	G / A	G	4	6	
Leukämie	G	T	G / A	G	4	6	
Leukämie	G	T	A	G	6	6	
Leukämie	G	T	A	G	6	6	
Leukämie	G	T / C	G / A	G			*
NP	G	T	G	G	4	4	
NP	G	T / C	G	G	4	5D	
NP	G	T / C	G	G	4	5D	
NP	G	T / C	G	G	4	5D	
NP	G	T / C	G	G	4	5D	
NP	G	T / C	G	G	4	5D	
NP	G	T / C	G	G	4	5D	
NP	G	T / C	G	G	4	5D	
NP	G	T / C	G	G	4	5D	
NP	G	T / C	G	G	4	5D	
NP	G	C	G	G	5D	5D	
NP	G	C	G	G	5D	5D	
NP	G	C	G	G	5D	5D	
NP	G	C	G	G	5D	5D	
NP	G	C	G	G	5D	5D	
NP	G	T	G / A	G	4	6	
NP	G	T	A	G	6	6	
NP	G	T	A	G	6	6	
NP	G	T / C	G / A	G			*
NP	G	T	G / A	G / A !!!			*
NP	G	T / C	G / A	G			*
NP	G	T / C	G / A	G			*
NP	G	T / C	G / A	G			*
NP	G	T / C	G / A	G			*
NP	G	T / C	G / A	G			*

Tabelle 14: NAT2-Punktmutationen und ihre Allele

Allele	Positionen				
	191	341	590	857	
NAT2*4	G	T	G	G	=Wildtyp
NAT2*5D	G	C	G	G	
NAT2*5E	G	C	A	G	
NAT2*6	G	T	A	G	
NAT2*7	G	T	G	A	
NAT2*14	A	T/C	G/A	G	

(www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html)

	<u>Basenpaare</u>	<u>Aminosäurenwechsel</u>
191	G→A	Arg → Gln
341	T→C	Ile → Thr
590	G→A	Arg → Gln
857	G→A	Gly → Glu

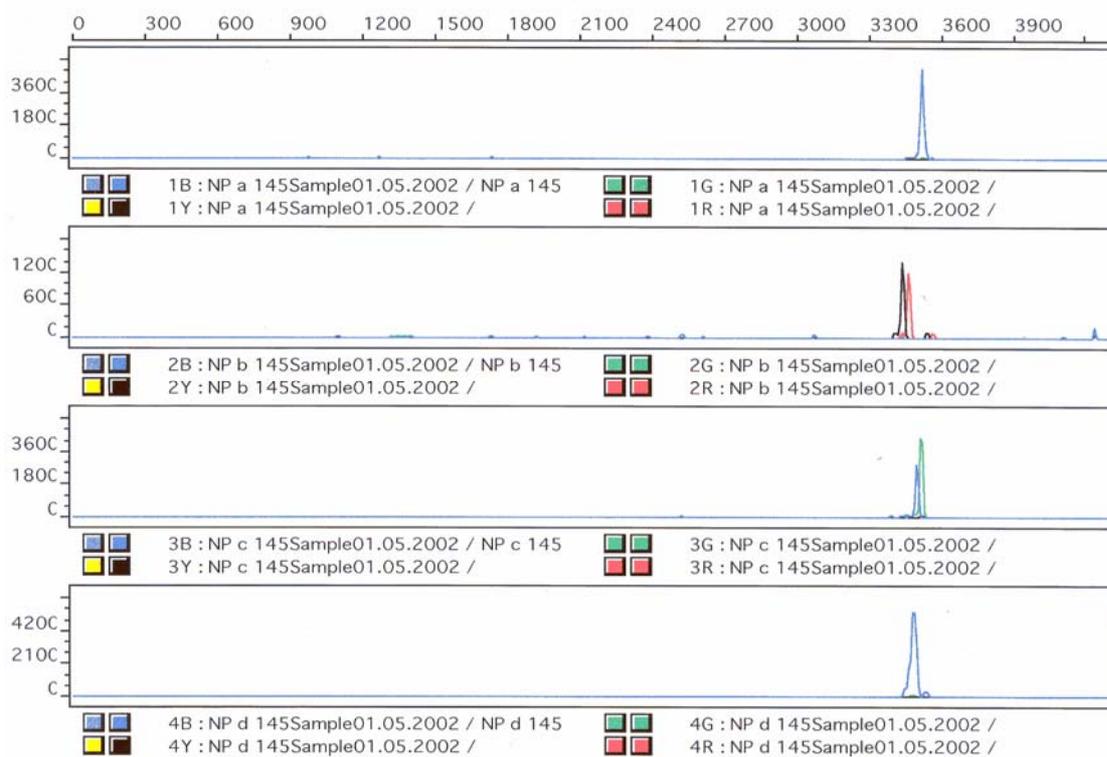


Abb. 8: NAT2 Signale

- Abb.: 1. Zeile Wildtyp (homozygot)
 2. und 3. Zeile heterozygote Typen mit zwei Signalen
 4. Zeile homozygoter Typ

Es gelang keine weitere Aufspaltung innerhalb der NAT2*6 Gruppe in A, B, C, D oder E, weil hierfür die möglichen Nukleotidwechsel auch an den Stellen 111, 282 und 803 benötigt werden und in dieser Arbeit nur 4 Polymorphismen untersucht wurden (www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html).

NAT2*5 D konnte eindeutig klassifiziert werden, weil dies nur eine einzige Mutation an 341 hat. Es wurden keine weiteren Mutationen untersucht, die einer Einteilung in eine der anderen NAT2*5 Klassen entsprechen würde. Zur Vereinfachung wird im Folgenden nur von NAT2*5 gesprochen.

In dieser Arbeit war keine Mutation an 191 G→A feststellbar. Dieser Polymorphismus ist wahrscheinlich auf die afrikanische Population beschränkt (Zhou W, 2002).

NAT2*4 ist der Wildtyp und acetyliert bei *normaler* oder *schneller* Geschwindigkeit. NAT2*5 und NAT2*6 *verlangsamen* die Enzymfunktion (Vatsis KP, 1995).

Schnelle Acetylierer sind homozygot oder heterozygot für das dominante NAT2*4 Wildtyp Allel, wohingegen die *langsamen* Acetylierer unterschiedlichste Kombinationen der vielen verschiedenen rezessiven Allele tragen (Aynacioglu AS, 2001).

Die jeweiligen Allele sind nicht einzeln untersucht worden, deswegen konnte bei einer Person, welche 2 heterozygote Polymorphismen besitzt, keine genaue Einordnung in eine bestimmte NAT2*-Gruppe erfolgen. In der folgenden Tabelle wurden die Personen berücksichtigt, die entweder 1 heterozygote Mutation, 1 heterozygote Mutation plus 1 homozygote Mutation oder 2 homozygote Polymorphismen aufwiesen.

Tabelle 15: NAT2-Genotypenverteilung in der Patienten- und der Kontrollgruppe

		*4/*4	*4/*5	*4/*6	*5/*5	*6/*6
Patienten	18*	3 (16,7%)	3 (16,7%)	6 (33,4%)	4 (22,3%)	2 (11,1%)
NP	18**	1 (5,6%)	9 (50,0%)	1 (5,6%)	5 (27,8%)	2 (11,1%)

*Eigentlich nach Tab. 13 Patienten= 19, aber nur n= 18 mit entweder 1 heterozygoten Mutation, 1 heterozygoten Mutation plus 1 homozygoten Mutation oder 2 homozygote Mutationen

**Eigentlich nach Tab. 13 NP= 25, aber nur n= 18 mit entweder 1 heterozygoten Mutation, 1 heterozygoten Mutation plus 1 homozygoten Mutation oder 2 homozygote Mutationen

Der homozygote Wildtyp *4/*4 konnte in 3/18 (16,7 %) Leukämiepatienten und in 1/18 (5,6 %) Kontrollpersonen nachgewiesen werden (Tabelle 15).

Bei den Patienten acetylierten 12 Kinder (3x*4/*4, 3x*4/*5, 6x*4/*6) mit *schneller* Geschwindigkeit und 11 Kontrollpersonen. Die Verteilungen für *5/*5 und *6/*6 waren in beiden Gruppen annähernd gleich.

In dieser Arbeit wurde eine neue Methode etabliert, mit deren Hilfe Punktmutationen von NAT2 bildlich darstellbar sind. Es konnte ein gut funktionierender Assay aufgebaut werden, dessen Durchführbarkeit an mehreren Proben überprüft wurde. Die Ergebnisse stimmen in den prozentualen Verhältnissen mit größeren Kontrollgruppen aus der Literatur überein (Garte S, 2001).

Tabelle 16: Phänotypenverteilung

Anzahl der <i>schnellen</i> Allele	Acetylierungsstatus	Patienten (%)	NP (%)
keine	langsam	6 (33,4%)	7 (38,9%)
1	schnell (heterozygot)	9 (50,0%)	10 (55,6%)
2	schnell (homozygot)	3 (16,7%)	1 (5,6%)

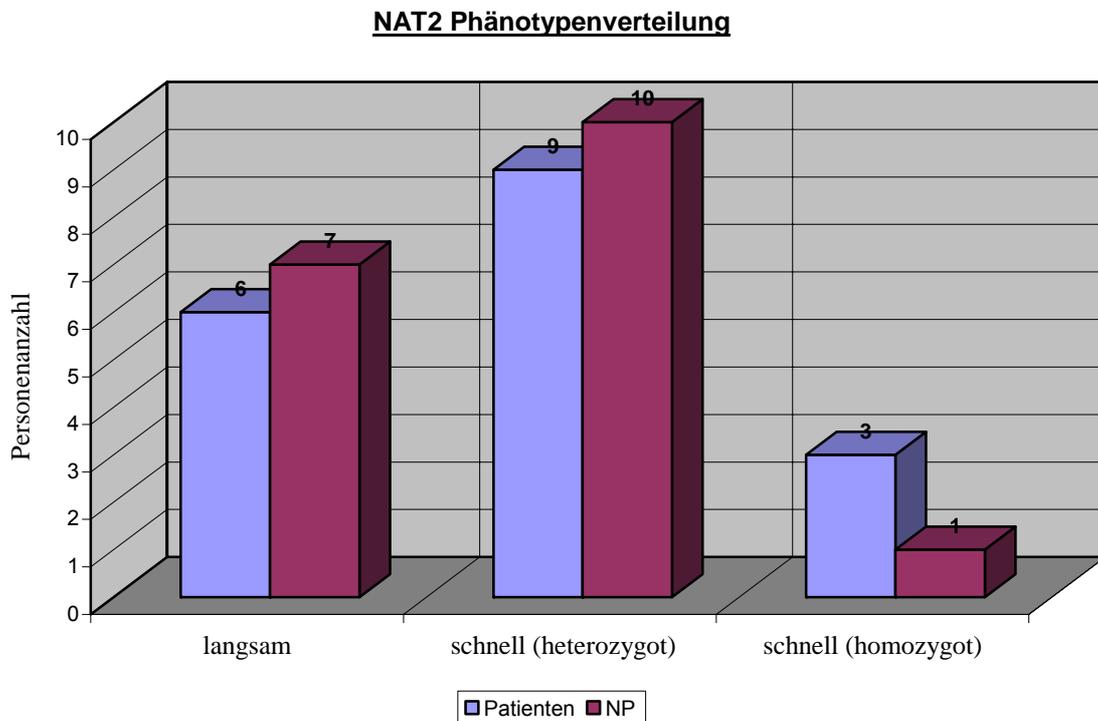


Abb. 7: NAT2 Phänotypenverteilung

Tabelle 16 und Abbildung 7 zeigen die Verteilung der möglichen Phänotypen für NAT2.

Die Anzahl der *langsamen* Acetylierer war annähernd gleich für die Patienten- (33,4 %) und die Kontrollgruppe (38,9 %). Homozygote *Schnell*-Acetylierer wurden bei den Patienten häufiger (16,7 %) als bei den Gesunden (5,6 %) gefunden.

5 Diskussion

Der Entstehungsmechanismus hämato-onkologischer Erkrankungen ist noch weitgehend ungeklärt. Die Ätiologie scheint sehr mannigfaltig zu sein. Zu den bekannten Ursachen für Leukämien und aplastische Anämien im Kindesalter gehören ionisierende Strahlen (Fliedner TM, 1986; Noshchenko AG, 2002; Champlin R, 1989), die heutzutage vornehmlich als iatrogene, therapeutische Maßnahmen von Bedeutung sind (Kaletsch U, 1999), verschiedene Chemikalien wie Benzol und andere (Guenel P, 2002; Sharpe WD, 1993), Medikamente (Nagao T, 1969; Lewis CN, 1952) und Viren (Dockerty JD, 1999; Young NS, 1993). Da es in Deutschland nicht zu einer übermäßigen Exposition gegenüber diesen Noxen kommt, spielen bei den kaukasischen Patienten eher Expositionen gegenüber Tabakrauch, Toxine in der Nahrung, Baumaterialien, Autoabgase sowie Chemikalien in der Kleidung eine Rolle, wiewohl diese in der Regel nicht die Konzentrationen erreichen, die in epidemiologischen Studien zur Pathogenese der hämato-onkologischen Erkrankungen eruiert wurden. Daher spielen die verschiedenen Polymorphismen der biotransformierenden Enzyme eine wichtige Rolle in der Ursachenforschung für hämato-onkologische Erkrankungen.

Kinder und Jugendliche sind wahrscheinlich einer größeren Bedrohung durch toxische Umwelteinflüsse ausgesetzt als Erwachsene, zum einen auf Grund der unterschiedlichen Exposition und/oder der physiologischen Unreife (Krajinovic M, 2000).

Die durch biotransformierende Enzyme katalysierten Entgiftungsvorgänge des Körpers scheinen ein weiterer wichtiger ätiologischer Faktor hämato-onkologischer Erkrankungen zu sein. Bei Kindern ist die Detoxifizierungskapazität von Schadstoffen noch nicht so gut ausgereift wie bei einem Erwachsenen. Des Weiteren führen individuelle Unterschiede in der Expression biotransformierender Enzyme zu einer unterschiedlich starken Prädisposition gegenüber Xenobiotika und deren schädlicher Wirkung. In dieser Arbeit wurden deshalb verschiedene Polymorphismen der biotransformierenden Enzyme mEh (Phase-I) und NAT2 (Phase-II) bei pädiatrischen Patienten mit kaukasischer oder asiatischer Herkunft auf einen Zusammenhang mit hämato-onkologischen Krankheitsbildern untersucht.

Es gibt ethnische und geographische Differenzen für die Inzidenz verschiedener Erkrankungen. So erkranken Menschen afrikanischer Herkunft weniger an Ewing-Sarkomen. Des Weiteren gilt als gesichert, dass bei Kindern in Nigeria und Uganda vor allem maligne Burkitt-Lymphome neu auftreten (Stiller CA, 1996). Interessant für diese Arbeit ist die erheblich höhere Inzidenz von EAA und AML bei Asiaten gegenüber Kaukasiern. Die Ursache könnte in der erhöhten Schadstoffbelastung liegen und/oder an genetisch fixierten Differenzen in der Metabolisierung exogener Noxen, wie nicht zugelassene Pestizide, Uranbergbau und nukleare Tests der Chinesen (Lee KA, 2001; Okada M, 1997; Hamby DM, 1999).

Mikrosomale Epoxidhydrolase

Die mEh gehört zu den Phase-I Enzymen der Biotransformation und metabolisiert in erster Linie xenobiotische Epoxide, ist aber auch an der Bioaktivierung kanzerogener polyaromatischer Hydrocarbone beteiligt (Shou M, 1996). Die mEh ist besonders wichtig für die Detoxifikation zyklischer Kohlenwasserstoffe, da diese häufig reaktive Epoxide bilden (Moody DE, 1991; Snyder R, 1993).

Zwei Polymorphismen der mEh sind besonders interessant, da durch ihre Punktmutationen zum einen bei Exon 3 (Tyrosin¹¹³ wird zu Histidin¹¹³) ein funktionell „*langsames*“ Enzym entsteht, die Enzymaktivität reduziert sich um 50 %, und zum anderen zeigt Exon 4 bei seiner Punktmutation eine Veränderung von Histidin¹³⁹ zu Arginin¹³⁹. Dadurch wird ein „*schnelleres*“ Enzym (Aktivität plus 25 %) produziert (Hassett C, 1994; Smith CAD, 1997).

Die zwei wichtigsten Polymorphismen beeinflussen die Aminosäuren an Position 113 und 139 im mEh Protein. Wormhoudt et al. (1999) zeigten, dass 36,2 % der Kaukasier homozygot für Tyrosin¹¹³ (Wildtyp), 7,6 % homozygot für Histidin¹¹³ und 56 % heterozygot für diese Aminosäuren sind. Des Weiteren sind bei Exon 4 58,7 % homozygot für Histidin¹³⁹ (Wildtyp), 4,6 % homozygot für Arginin¹³⁹ und 36,7 % heterozygot. Diese Ergebnisse entsprechen unseren Untersuchungen in der Kontrollgruppe.

Diese zwei Polymorphismen sind besonders bekannt, weil man zwischen ihnen und mehreren Krebserkrankungen einen Zusammenhang finden konnte. In verschiedenen Studien wurde bereits eine Korrelation der verschiedenen mEh Genotypen mit einigen schwerwiegenden Erkrankungen bestätigt, so bei hepatozellulären Karzinomen (Mc Glynn KA, 1995), Ovarialkarzinomen (Lancaster JM, 1996) und einigen Lungenerkrankungen (Smith CAD, 1997).

Bei einer Untersuchung von 131 kaukasischen COPD Patienten und 262 Kontrollen wurde eine signifikante Korrelation zwischen Personen mit homozygot mutanten His/His 113 Allelen (Exon 3) und dem Risiko an einer COPD zu erkranken festgestellt (Park JY, 2005).

Es besteht kein Zweifel daran, dass die mEh Polymorphismen eine bedeutende Rolle in der Entgiftung potentiell toxischer oder kanzerogener Stoffe spielen. MEh hydrolysiert Epoxide wie polyzyklische Kohlenwasserstoffe, dies ist normalerweise ein detoxifizierender Schritt, unter Umständen können die Zwischenprodukte der Hydrolyse hoch toxisch und mutagen werden. Daher spielt mEh sowohl eine Rolle in der Detoxifikation als auch in der Bioaktivierung von Prokarzinogenen. Die jeweilige Rolle könnte von verschiedenen Umwelteinflüssen abhängen (Hasset C, 1994).

Omicinski et al. (2000) wiesen auf Grund ihrer Untersuchungen darauf hin, dass die strukturellen Unterschiede der genetischen mEh Varianten vielleicht doch nur einen mäßigen Einfluss auf die spezifische Enzymaktivität *in vivo* haben.

Der Zusammenhang von mEh-Genpolymorphismen und Karzinomhäufigkeiten zeigt für einige Krebsarten und in unterschiedlichen ethnischen Gruppen widersprüchliche Ergebnisse. Das Tragen des Tyr-Allels von Exon 3 gilt als Risikofaktor einen

malignen Tumor zu entwickeln. Dieser Zusammenhang wurde explizit für das Ovarialkarzinom (Lancaster JM, 1996), Oropharyngealkarzinom (Amador AG, 2002) und eine akute Leukämie (Lebailly P, 2002) gezeigt. Das Tragen des His-Allels ist mit einem erhöhten Risiko an einem Kolon-, Leber- oder Zervixkarzinom zu erkranken assoziiert (Harrison DJ, 1999; Tiemersma EW, 2001; Sierra-Torres CH, 2003). Interessant ist der Einfluss der Polymorphismen bei Tabakkonsumenten. Nach Zhou et al. (2001) stellt der His-homozygote Genotyp einen Risikofaktor für Nichtraucher, aber einen protektiven Faktor für starke Raucher dar.

Es lässt sich vermuten, dass besonders das Zusammenspiel mehrerer genetischer Polymorphismen biotransformierender Enzyme einen toxischen Effekt auf den Fremdstoffmetabolismus hat und damit ein Risikofaktor für die Entstehung hämato-onkologischer Erkrankungen im Kindesalter sein könnte.

In dieser Arbeit zeigten sich für die kaukasische Bevölkerung keine signifikanten Unterschiede in der mEh-Genotypen- und mEh-Phänotypenverteilung. Die Phänotypen der kaukasischen Kontrollgruppe entsprachen prozentual den Ergebnissen von Smith et al. (The Lancet 1997). Eine Ausnahme bildete der *sehr langsame* Phänotyp, dieser trat bei unseren Untersuchungen bei 22/215 (10 %) der gesunden Personen auf und bei Smith et al. (The Lancet 1997) bei 11/203 (5 %). Der Phänotyp der *sehr langsamen* Acetylierer wird durch den homozygoten Mutanttyp bei Exon 3 bestimmt.

Bei der T-ALL waren bei unseren Untersuchungen 19 % homozygot mutant für His/His 113, doch nur 10 % der Kontrollpersonen. Das Gleiche galt auch für die Verteilung der wahrscheinlichen Phänotypen. Ursächlich könnte eine genetische Prädisposition sein, dass die *sehr langsamen* Acetylierer eher an einer T-ALL erkranken, aber statistisch wurde keine signifikante Korrelation festgestellt. Hier könnte die Ursache auch die weitaus geringere Probenzahl der Patienten mit T-ALL gegenüber den Kontrollpersonen sein.

Die ALL und die Kontrollgruppe unterschieden sich in dieser Arbeit kaum in der wahrscheinlichen Phänotypenverteilung. Nach unseren Untersuchungen stellt der mEh-Polymorphismus keinen Risikofaktor für die Entwicklung einer ALL dar.

In der T-ALL und der AML/CML Gruppe fanden wir prozentual mehr *normale* Acetylierer als in den ALL, EAA und NP Gruppen. Dies mag zum einen an der geringeren Fallzahl gelegen haben, könnte aber zum anderen auch auf eine andere mEh-Aktivitätsverteilung bei diesen Formen der Leukämie hinweisen. Interessanterweise zeigten die T-ALL- und AML/CML-Gruppen eine besonders geringe Anzahl an *schnellen* Enzymaktivitäten. In der Gruppe der myeloischen Leukämie fand sich kein Patient mit einem *schnellen* Phänotyp.

Der hohe prozentuale Anteil an *langsamen* Acetylierern in der AML/CML-Gruppe wurde durch die 69 % der myeloischen Leukämiepatienten bedingt, welche heterozygot mutant für Exon 3 waren. Hier könnte ein genetischer Zusammenhang vorliegen. Individuen mit einer *langsamen* mEPHX Aktivität scheinen auch anfälliger für eine COPD oder ein Emphysem zu sein (Smith CAD, 1997).

Es sind weitere Untersuchungen nötig, um genauere Aussagen bezüglich eines Zusammenhangs zwischen mEh-Polymorphismen und hämato-onkologischen Erkrankungen bei Kindern machen zu können.

In dieser Arbeit wurde analysiert, ob es eine signifikant andere Verteilung der mEh Geno- und Phänotypen bei Kaukasiern und Asiaten gibt. Dies konnte mit unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden. Die asiatische Kontrollgruppe war zwar klein, aber da die erzielten Ergebnisse mit Resultaten größerer Studien übereinstimmen, waren sie repräsentativ und wurden in die Gesamtwertung integriert (Huang W-Y, 2005).

Es wurde eine deskriptive Analyse durchgeführt. Die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen mEh-Allele zeigten keine hochsignifikanten ethnischen Unterschiede. Allerdings präsentierte sich eine deutliche Differenz für die Expression des wt Tyr/Tyr113 (Exon 3). Dieser wurde zu 67 % in der asiatischen und nur zu 43 % in der kaukasischen Kontrollgruppe nachgewiesen.

In den asiatischen Gruppen wurde der wt His/His 139 für Exon 4 in 83-90 % der Fälle nachgewiesen. Nur 10-13 % der Asiaten waren heterozygot für His/Arg 139 und bei den Kaukasiern zwischen 25 und 44 %.

Die genotypischen Verteilungsunterschiede könnten an der geringen kirgisischen Fallzahl liegen oder aber einen genetisch bedingten Unterschied in der Häufigkeitsverteilung der mEh-Allele darstellen. Die Phänotypenverteilung zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Kaukasiern und Asiaten. Es lässt sich aber vermuten, dass der phänotypisch *sehr langsame* Acetylierer (His/His 113 für Exon 3) keine Ursache für das vermehrte Auftreten einer EAA oder AML in der asiatischen Bevölkerung darstellt, da er in beiden ethnischen Gruppen annähernd gleich häufig vorkam. Der *schnelle* Phänotyp trat in den kaukasischen Patienten- und Kontrollgruppen mit bis zu 21 % weitaus häufiger auf als in den kirgisischen Gruppen mit nur maximal 11 %. Dies weist auch auf einen genetischen Unterschied zwischen den Bevölkerungsgruppen hin.

Unsere Untersuchungen geben Anlass, Patientendaten weiter zu erfassen und eine mögliche Signifikanz in der Geno- und Phänotypenverteilung bei Kaukasiern und Asiaten genauer zu bestimmen.

N-Acetyltransferase 2

NAT2 ist ein Phase-II-Enzym des Fremdstoffmetabolismus, welches vor allem an dem Stoffwechsel aromatischer Amine (z.B. in Tabakrauch) beteiligt ist und dessen Polymorphismus seit den 50er Jahren untersucht wird. Durch bestimmte Punktmutationen wird die Enzymaktivität von NAT2 vermindert, so dass man phänotypisch *langsame* (*slow*) und *schnelle* (*fast*) Acetylierer unterscheiden kann. Das dominante Wild-Typ-Allel (*4) codiert für den *schnellen* NAT2-Acetylierer, so dass dieser in einen *homozygot schnellen* und einen *heterozygot schnellen* Acetylierer eingeteilt werden kann.

Das Ziel der NAT2-Arbeit war, eine neue Methode zu etablieren, mit deren Hilfe Punktmutationen von NAT2 bildlich darstellbar sind. Es konnte ein gut funktionierender Assay aufgebaut werden, dessen Durchführbarkeit an 19 Leukämieproben und 25 Kontrollproben überprüft wurde. Die Ergebnisse stimmen in den prozentualen Verhältnissen mit größeren Kontrollgruppen aus der Literatur überein (Garte S, 2001). Unsere Proben waren zuvor schon von uns für die mEH Untersuchungen verwendet worden.

In dieser Arbeit sind vier der am häufigsten vorkommenden NAT2 Allele auf ihre Polymorphismen untersucht worden. NAT2*5, NAT2*6, NAT2*7 und NAT2*14 gehören zu den Allelen mit niedriger Enzymaktivität.

Für die Auswertungen wurden die Kinder, welche homozygot für die NAT2*4 Allele oder heterozygot für NAT2*4 in Kombination mit einem Allel mit niedriger Aktivität waren, als *schnelle* Acetylierer klassifiziert. Personen mit Allelen mit geringer Enzymaktivität stellten die Gruppe der *langsamen* Acetylierer dar (Vatsis KP, 1995).

Die Punktmutation in dem Nukleotid 341, welche die Aminosäure Ile¹¹⁴→Thr umwandelt, vermindert die Enzymaktivität für NAT2, ohne aber die Substratbindung oder die Enzymstabilität zu verändern. Diese Mutation wird am häufigsten bei den Kaukasiern als Grund für die *langsame* Acetylierung beobachtet, wird aber selten bei Asiaten gefunden. Im Unterschied dazu ist bei den Asiaten am weitesten die Punktmutation im Nukleotid 857 verbreitet. Diese reduziert die Stabilität von NAT2 (Parkinson A. Chapter 6).

Brocton et al. zeigten, dass NAT2*5B (Punktmutation Nukleotid 341) eines der am häufigsten vorkommenden Allele innerhalb verschiedener europäischer Populationen ist (Brocton N, 2000). Die Punktmutation in Nukleotid 341 (T→C dadurch Ile→Thr) konnten wir auch sehr häufig finden (siehe Tabelle 13). Vier der kaukasischen Leukämiepatienten waren heterozygot mutant und genauso viele homozygot mutant für diese Mutation. In der Kontrollgruppe zeigten sich 15/25 heterozygot (T/C) und 5/25 homozygot mutant.

Bei unseren Analysen konnte NAT2*5 nicht weiter in A-F klassifiziert werden, da die dafür nötigen Mutationen bei 341 T→C, 481 C→T und 803 A→G nicht untersucht worden sind. Das NAT2*5 Allel trat wie bereits erwähnt in unseren Analysen besonders häufig auf, bei 7/18 Patienten und bei 14/18 Kontrollpersonen (siehe Tabelle 15).

Die NAT2 spielt eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel aromatischer Amine, einer Klasse von kanzerogenen Substanzen, die unter anderem im Zigarettenrauch und in Nahrungsmitteln vorkommen. Die NAT2 kann dabei sowohl toxifizierend wie detoxifizierend wirken, je nach Art des aromatischen Amins und der Anwesenheit anderer Enzyme.

Von der NAT2 sind 26 verschiedene Allele bekannt (Vatsis KP, 1995), wovon einige zu stark reduzierter Enzymaktivität führen. Individuen können sowohl phänotypisch (anhand der Umsetzungsrate von Koffein oder bestimmten Arzneimitteln) wie auch genotypisch (anhand genetischer Analysen) in *schnelle* und *langsame* Acetylierer eingeteilt werden, welche in den europäischen Populationen je zu etwa 50 % vertreten sind. Unter den Asiaten gibt es nur 1 % *langsame* Acetylierer, der Rest besteht aus *schnellen* Acetylierern.

Eine Gesamtanalyse von 18 einzelnen Studien ergab, dass Blasenkrebs bei *langsamen* Acetylierern 1,3-mal häufiger auftritt als bei *schnellen* Acetylierern (Brockmöller J, 1998). Kolonkrebs scheint dagegen bei *schnellen* Acetylierern häufiger vorzukommen als bei *langsamen* Acetylierern (Lang NP, 1994; Roberts-Thomson JC, 1996). In einigen Untersuchungen wurde ein derartiger Zusammenhang nur für bestimmte Untergruppen gefunden, zum Beispiel für Raucher oder Personen, die viel Fleisch konsumieren (Welfare MR, 1997).

Der *schnelle* NAT2 Acetylierer-Genotyp besitzt bei Nichtrauchern ein reduziertes Risiko an Lungenkrebs zu erkranken, bei starken Rauchern hingegen ein erhöhtes Risiko. Zhou et al. waren im Jahr 2002 die ersten, welche einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen den NAT2-Genotypen und der Anzahl von „pack-years“ bei Rauchern herstellen konnten. Kehlkopfkrebs tritt bei *schnellen* Acetylierern häufiger auf als bei *langsamen* (Henning S, 1999).

Krajinovic et al. (2000) untersuchten eine mögliche Korrelation zwischen den NAT2-Genotypen und kindlicher ALL. *Langsame* NAT2-Acetylierer hatten ein erhöhtes Risiko eine ALL zu entwickeln, vor allem durch die Überexpression von NAT2*5C und *7B. Es wurde ferner ein selteneres Vorkommen des NAT2*4 Allels in der Patientengruppe beobachtet, welches die Überlegung einer protektiven Aufgabe dieses Allel zuließ.

Unsere Daten wurden wegen der geringen Fallzahl deskriptiv ausgewertet. Der homozygote NAT2*4-Typ wurde in unseren Untersuchungen häufiger bei den Patienten (16,7 %) als bei den Kontrollpersonen (5,6 %) gefunden. Dies mag aber an der geringen Fallzahl liegen. Phänotypisch waren 66 % der von uns analysierten Leukämiepatienten und 61 % der Kontrollgruppe *schnelle* Acetylierer (siehe Tabelle 16). Die Verteilung der Phänotypen erbrachte bei uns keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Patienten- und Kontrollgruppe wiesen ungefähr gleich viel *langsame* Acetylierer auf. Nur die homozygot-*schnellen* Acetylierer waren bei den erkrankten Kindern mit 16,7 % öfter als bei den gesunden Personen mit 5,6 % vertreten.

Ladero et al. zeigten im Jahr 2002 dass 67 % ihrer untersuchten Magenkrebs-Patienten und nur 46 % der Kontrollgruppe *schnell* verstoffwechseln. Sie konnten darstellen, dass der Besitz von ein oder zwei *schnell*-acetylierenden Allelen ein Risikofaktor für die Entstehung eines Adenokarzinoms des Magens ist. Hier bestehen

aber wiederum ethnische Unterschiede, denn Katoh et al. fanden im Jahr 2000 keine besondere Häufung an *schnellen* Acetylierern. Dies mag daran liegen, dass in Japan mehr als 90 % der Bevölkerung den Phänotyp des *schnellen* Acetylierers besitzen.

In unseren Untersuchungen wurde keine Mutation an 191 G→A festgestellt. Dies deckt sich mit den Analysen anderer Arbeiten, dass dieser Polymorphismus normalerweise auf die afrikanische Population beschränkt ist und damit bei Kaukasiern nicht vorkommt (Zhou W, 2002).

Im Gegensatz zu einigen anderen Arbeiten sind hier die jeweiligen Allele nicht einzeln untersucht worden. Personen mit zwei heterozygoten Polymorphismen konnten daher nicht genauer in eine bestimmte NAT2*-Gruppe eingeordnet werden. In der Ergebnistabelle wurden aus diesem Grund nur die Personen berücksichtigt, die entweder 1 heterozygote Mutation, 1 heterozygote Mutation plus 1 homozygote Mutation oder 2 homozygote Polymorphismen aufwiesen.

Es sind weitere Untersuchungen nötig, um eine Korrelation zwischen den NAT2 Genotypen und kindlichen Leukämien zu erfassen.

6 Zusammenfassung

Unter den hämatologischen Erkrankungen stellt die Leukämie die häufigste maligne Erkrankung im Kindesalter dar, während die erworbene aplastische Anämie selten ist. Beiden Erkrankungen gemeinsam ist die multifaktorielle Ätiologie mit zum Teil bekannten Risikofaktoren wie ionisierende Strahlung, Chemikalien, virale Infekte und Medikamente. Diese ätiologisch bedeutsamen exogenen Noxen werden im menschlichen Organismus durch biotransformierende Enzyme abgebaut. Störungen der Biotransformation können das Entstehen hämato-onkologischer Erkrankungen begünstigen.

In der Biotransformation werden zwei Phasen unterschieden: In der Phase-I werden Fremdstoffe hydrolysiert, oxidiert oder reduziert. In der Phase-II werden die Substrate konjugiert und so in der Regel zu hydrophilen Substanzen abgebaut. Die vorliegende Arbeit untersucht, ob Polymorphismen der biotransformierenden Enzyme mEh (Phase-I) und NAT2 (Phase-II) mit hämato-onkologischen Krankheitsbildern bei pädiatrischen kaukasischen oder asiatischen Patienten assoziiert sind.

Eine signifikant unterschiedliche mEh-Geno- und Phänotypenverteilung bei Kaukasiern und Asiaten konnte nicht gezeigt werden, aber ein tendenzieller Unterschied in der kaukasischen T-ALL- und der AML/CML-Gruppe mit prozentual mehr *normalen* Acetylierern und einer besonders geringen Anzahl an *schnellen* Enzymaktivitäten gegenüber der Kontrollgruppe. Die AML/CML-Patienten zeigten einen hohen Anteil an *langsamen* Acetylierern.

Asiaten haben eine höhere Inzidenz von EAA und AML als Kaukasier, da sie einen anderen Genpool tragen und höheren Schadstoffbelastungen ausgesetzt sind.

In unserer asiatischen Kontrollgruppe trugen 67 % den Wildtyp Tyr/Tyr 113 (Exon 3), bei den Kaukasiern nur 43 %. Für Exon 4 hatten 83-90 % der Asiaten den Wildtyp-Genotyp, wodurch nur 10-13 % der Asiaten heterozygot für Tyr/His 113 waren und in der kaukasischen Gruppe 25-44 %. Möglicherweise liegt dies an der geringen kirgisischen Fallzahl oder aber an einer genetisch bedingten Differenz der mEh-Allelverteilung. Der *schnell acetylierende* mEPHX Phänotyp trat bei der kaukasischen Patienten- und Kontrollgruppe öfter auf als bei den Asiaten. Der mEh-Polymorphismus stellt somit keinen Risikofaktor für die Entstehung einer Leukämie dar.

Für die Analyse der NAT2-Polymorphismen wurde in dieser Arbeit eine neue Methode etabliert. Die Daten wurden wegen der geringen Fallzahl deskriptiv ausgewertet. Patienten- und Kontrollgruppe wiesen ungefähr gleich viel *langsame* Acetylierer auf. Die homozygot *schnellen* Acetylierer traten bei den Patienten mit 16,7 % deutlich häufiger als bei den Gesunden (5,6 %) auf.

Weitere Analysen werden zeigen, ob diese vorläufigen Ergebnisse bei der Untersuchung einer höheren Fallzahl signifikant sind.

7 Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
ANL	Akute nicht-lymphatische Leukämie
Arg	Arginin
Bp	Basenpaare
C-ALL	Common akute lymphatische Leukämie
CLL	Chronische lymphatische Leukämie
CML	Chronische myeloische Leukämie
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonucleinacid (= DNS)
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleotid
EAA	Erworbene aplastische Anämie
G	Guanin
GPHO	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
Het	Heterozygot
His	Histidin
Hom	Homozygot
Kb	Kilobasen
KPN	Kontrollplasmid N
Ile	Isoleucin
mEh	Mikrosomale Epoxidhydrolase
Mut	Mutant
NAT2	N-Acetyltransferase 2
ONL	ALL unbekanntem Typs
OR	Odds Ratio
PCR	Polymerasekettenreaktion
Prä-B-ALL	akute lymphatische Leukämie vom B- Zelltyp
Rest	Verschiedene maligne Tumore (genauer unter 3.1.1)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpoly- morphismus
T-ALL	akute lymphatische Leukämie vom T-Zelltyp
Taq-Pol	Taq Polymerase
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
U	Unit
Wt	Wildtyp

8 Literaturverzeichnis

1. Alter BP, Young NS, Nathan DG, Oski FA (eds.): The bone marrow failure syndromes: Hematology of infancy and childhood. Philadelphia, Saunders, S. 216, 1993
2. Amador AG, Righi PD, Radpour S, Everett ET, Weisberger E, Langer M, Eckert GJ, Christen AG, Campbell S Jr, Summerlin DJ, Reynolds N, Hartsfield JK Jr.: Polymorphisms of xenobiotic metabolizing genes in oropharyngeal carcinoma. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.*, 93: 440-445, 2002
3. Arthur DC, Berger R, Golomb HM, Swansbury GJ, Reeves BR, Alimena G, Van den Berghe H, Bloomfield CD, de la Chapelle A, Dewald GW et al.: The Clinical significance of karyotype in acute myelogenous leukaemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 40: 203-216, 1989
4. Aynacioglu AS, Bozkurt A, Nacak M, Kortunay S, Tunc R, Dincel A, Kayaalp SO: N-acetyltransferase polymorphism in patients with Behcet's disease. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2001 Nov; 57(9): 659-62.
5. Beetham JK, Grant D, Arand M: Gene evolution of epoxide hydrolases and recommended nomenclature. *DNA Cell Biol* 1995; 14: 61-71, 1995
6. Behre G, Ch. v. Schilling, MANUAL; Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome S.17; 2003 by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München
7. Behre G, Zhang P, Zhang D-E, Tenen DG: Analysis of the modulation of transcriptional activity in myelopoiesis and leukemogenesis. *Methods* 17: 231, 1999b
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C: Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med* 103: 602-625, 1985
9. Bett KF, Ingram DM, Carpenter DS, Teitel CH, Lang NP, Kadlubar FF, and Minchin RF: Expression of monomorphic and polymorphic N-acetyltransferase in human colon. *Biochem. Pharmacol.* 47: 914-917, 1994
10. Blum M, Grant DM, McBride W, Heim M, Meyer UA: Human arylamine N-acetyltransferase genes: isolation, chromosomal localization and functional expression. *DNA Cell Biol.* 9: 193-203, 1990
11. Bock KW: Metabolic polymorphisms affecting activation of toxic and mutagenic arylamines. *Trends Pharmacol Sci.* 1992 Jun; 13(6): 223-6.
12. Brockmüller J, Cascorbi I, Kerb R, Sachse C, Roots I: Polymorphisms in xenobiotic conjugation and disease predisposition. *Toxicol Lett*; 102-103: 173-183, 1998
13. Brockmüller J, Cascorbi I, Kerb R, Roots I: Combined analyses of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res.* 56: 3915-3925, 1996
14. Brocton N, Little J, Sharp L and Cotton SC: N-Acetyltransferase polymorphism and colorectal cancer. *Am. J. Epidemiol.* 9: 846-861, 2000
15. Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RMF, Hann JM, Rees JKH, Gray RG, Wheatley K: Randomised comparison of addition of autologous bone marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukemia in first remission: results of MRC-AML 10 trial. *The Lancet* 351: 700, 1998

16. Camitta B. et al., Antithoracic duct Lymphocyte Globulin Therapy of severe Aplastic Anemia. *Blood* 62 (4) 1983, 883-888
17. Cartwright RA, Glashan RW, Rogers HJ, Ahmad RA, Barham-Hall D, Higgins E, Kahn MA: Role of N-acetyltransferase phenotypes in bladder carcinogenesis: a pharmacogenetic epidemiological approach to bladder cancer. *Lancet* III 1982: 842-5.
18. Cascorbi I, Brockmüller J: Homozygous rapid arylamine N-acetyltransferase (NAT2) genotype as susceptibility factor for lung cancer. *Cancer Res.* 56: 3961-3966, 1996
19. Champlin R: (Bone marrow aplasia due to radiation accidents: pathophysiology, assessment and treatment. *Baillieres Clin Haematol* 1989; 2: 69-82)
20. Chien A, Edgar DB, Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol.* 1976 Sep; 127(3): 1550-7.
21. Dilloo D, Josting A, Göbel U: CMV-associated bone marrow suppression: the role of CMV infection in modulation of interleukin-6 production in vitro. *Eur J Pediatr.* 150: 716-721, 1991
22. Dirksen U, Asadi Moghadam K, Mambetova C, Esser C, Führer M, Burdach S: Glutathione S Transferase Theta 1 Gene (GSTT1) null genotype is associated with an increased risk for acquired aplastic anemia in children. *Pediatric Research* 55 (3) 466-471, 2004
23. Dockerty JD et al.: Infections, vaccinations and the risk of childhood leukemia. *Br J Cancer* 80, (1999), 1483
24. Ebisawa T, Deguchi T: Structure and restriction fragment length polymorphism of genes for human liver arylamine N-acetyltransferases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 177: 1252-1257, 1991
25. European Group for the Immunological Characterization of Leukemia (EGIL), Bene MC, Castoldi G, Knapp W et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. *Leukemia* 9: 1783, 1995
26. Evans DAP, White TA: human acetylation polymorphism. *J. Lab. Clin. Med.* 63: 394-403, 1964
27. Fandrich F, Degiuli B, Vogel-Bindel U, Arand M, Oesch F: Induction of rat liver microsomal epoxide hydrolase by its endogenous substrate 16 alpha, 17 alpha-epoxyestra- 1,3,5-trien-3-ol. *Xenobiotica*; 25: 239-244. 1995
28. Farrell GC: Drug metabolism in extrahepatic diseases. *Pharmacol. Ther* 1987; 35: 375-404.
29. Fleming LE, Timmeny W: Aplastic anemia and pesticides. An etiologic association? (see comments) *Journal of Occupational Medicine* 35: 1106-1116, 1993
30. Fliedner TM, Nothdurft W, Calvo W: The development of radiation late effects to the bone marrow after single and chronic exposure. *Int J Radiat Biol* 49: 35-46, 1986
31. Franke S, Klawitz I, Schnakenberg E, Rommel B, Van de Ven W, Bullerdiek J, Schloot W: Isolation and mapping of a cosmid clone containing the human NAT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 1994: 199, 52-55 1994
32. Frickhofen N, Liu JM, Young NS: Etiologic mechanisms of hematopoietic failure. *Am J Pediatr Hematol Oncol* 12: 385-395, 1990

33. Gaedigk A, Spielberg SP, Grant DM: Characterization of the microsomal epoxide hydrolase gene in patients with anticonvulsant adverse drug reactions. *Pharmacogenetics* 1994; 4: 142-153. 1994
34. Garte S, Gaspari L, Alexandrie A-K, Ambrosone C et al.: Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev*, 10, 1239-1248, 2001
35. Göbel, U, Jürgens H. *Der Kinderarzt* 1986
36. Gram TE (ed.): *Extrahepatic Metabolism of Drugs and Other Foreign Compounds*. New York : Spektrum, 1980, S. 1-601
37. Grant DM, Beer M, Blum M, Meyer UA: Monomorphic and polymorphic human arylamine N-acetyltransferases: a comparison of liver isozymes and expressed products of two cloned genes. *Mol. Pharmacol.* 39: 184-191, 1991
38. Grant DM, Blum M, Demierre A, Meyer UA: Nucleotide sequence of an intronless gene for human arylamine N-acetyltransferase relates to polymorphic drug acetylation. *Nucl. Acids Res.* 17: 3978, 1989
39. Guenel P, Imbernon E, Chevalter A: Leukemia in relation to occupational exposures to benzene and other agents: A case control study nested in a cohort of gas and electric utility workers, *Am. J. Ind. Med.* 42 (2), S. 87-97, 2002
40. Jahresbericht 2000 des Kinderkrebsregisters Mainz, <http://www.Kinderkrebsregister.de>
41. Hamblin T: The treatment of acute myeloid leukemia preceded by the myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* 1992; 16(1): 101-8. 1992
42. Hamby DM, Tynybekov A: A screening assessment of external radiation levels on the shore of lake Issyk-Kyol in the Kyrhyz republic, *Health Phys.* (US) 77 (4), S. 427-430, 1999
43. Hartsfield JK, Sutcliffe MJ, Everett ET, Hassett C, Omiecinski CJ, Saari JA: Assignment1 of microsomal epoxide hydrolase (EPHX1) to human chromosome 1q42.1 by in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*; 83 (1-2): 44-5, 1998
44. Harries L, Stubbins M, Forman D, Howard G, Wolf C: Identification of genetic polymorphisms at the Glutathione S- Transferase pi locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer, *Carcinogenesis* 18 (4), S. 641-644, 1997
45. Harrison DJ, Hubbard AL, MacMillan J, Wyllie AH, Smith CA: Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphism and susceptibility to colon cancer. *Br J Cancer*, 79: 168-171, 1999
46. Hassett C, Robinson KB, Beck NB, Omiecinski CJ: The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1), complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics* 23: 433-442, 1994
47. Hassett C, Aicher L, Sidhu JS, Omiecinski CJ: Human microsomal epoxide hydrolase: genetic polymorphism and functional expression in vitro of amino acid variants. *Hum. Mol. Genet.* 3: 421-428, 1994a
48. Hayes J, Pulford D: The Glutathione S- Transferase Supergene Family: regulation of GST* and the Contribution of the Isoenzymes to Cancer Chemoprotection and Drug Resistance, *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30 (6), S. 445-600, 1995
49. Hein DW, Doll MA, Rustan TD and Ferguson RJ: Metabolic activation of N-hydroxyarylamines and N-hydroxyarylamides by 16 recombinant human NAT2 allozymes: effects of 7 specific NAT2 nucleic acid substitutions. *Cancer Res.* 1995 Aug 15; 55(16): 3531-6.

50. Henning S, Cascorbi I, Munchow B, Jahnke V, Roots I: Association of arylamine N-acetyltransferase NAT1 and NAT2 genotypes to laryngeal cancer risk. *Pharmacogenetics*, 9: 103-111, 1999.
51. Henze G, Muller-Wehrich S, Langermann HJ, Odenwald E, Riehm H: Childhood B-cell lymphomas and leukemias. Improvement of prognosis by a therapy developed for B-neoplasms by the BFM study group. *Onkologie* 1984 Aug; 7 (4): 205-8.
52. Huang W-Y, Chatterjee N, Chanock S et al.: Microsomal Epoxide hydrolase polymorphisms and risk for advanced colorectal adenoma. *Cancer Epidemiol Biom Prev*; 14 (1), 2005.
53. Hughes HB, Biehl JP, Jones AP, and Schmidt LH: Metabolism of Isoniazid in man as related to the occurrence of peripheral neuritis. *Am. Rev. Res. Dis.* 70: 266-273, 1954
54. Janik-Moszant A, Bubala H, Stojewska M et al.: Acute lymphoblastic leukemia in children with Fanconi anemia. *Wiad Lek (Poland)* 51 (4), S. 285-288, 1998
55. Kaatsch M, 2000, Jahresbericht 1999, Lindner OHG Mainz
56. Kaatsch P, Michaelis J, Second neoplasms after malignant diseases in childhood. *Klin Padiatr* 207, 158, 1995
57. Kadlubar FF, Badawi AF: Genetic susceptibility and carcinogen-DNA adduct formation in human urinary bladder carcinogenesis. *Toxicol. Lett.* 1995 Dec; 82-83: 627-32
58. Kaletsch U, Kaatsch P, Meinert R, Schüz J, Czarwinski R: Childhood cancer and residential radon exposure-results of a population-based case-control study in Lower Saxony (Germany), *Radiat. Environ. Biophys.* 38, S. 211-215, 1999
59. Katoh T, Boissy R, Nagata N, Kitawa K, Kuroda Y, Itoh H, Kawamoto T, Bell DA: Inherited polymorphism in the N-acetyltransferase 1 (NAT1) and 2 (NAT2) genes and susceptibility to gastric and colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer* 85: 46-49, 2000
60. Kinlen LJ: High contact paternal occupation, infection and childhood leukemia: five studies of unusual population-mixing of adults. *Br J Cancer* 76: 1539-1545, 1997
61. Krajcinovic Maja; *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000
62. Krishna DR, Klotz U: Extrahepatic metabolism of drugs in humans. *Clin Pharmacokinet* 1994; 26: 144-160
63. Lancaster JM, Brownlee HA, Bell DA, Futreal PA, Marks JR, Berchut A, Wiseman RW, Taylor JA: Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer. *Mol Carcinog* 17: 160-162, 1996
64. Lang NP, Butler MA, Massengill J, Lawson M, Stotts RC, Hauer-Jensen M, Kadlubar FF: Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol. Biomark. Prevent* 1994 Dec; 3(8): 675-82.
65. Lebailly P, Willett EV, Moorman AV, Roman E, Cartwright R, Morgan GJ, Wild CP: Genetic polymorphisms in microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to adult acute myeloid leukaemia with defined cytogenetic abnormalities. *Br J Haematol*, 116: 587-594, 2002
66. Lee KA, Kim SH, Woo HY, Hong YJ, Cho HC: Increased frequencies of Glutathione S-transferase (GSTM1 and GSTT1) gene deletions in Korean patients with acquired aplastic anemia. *Blood* 98 (12), S. 3483-3485, 2001

67. Lewis, CN, LE Putnam, FD Hendricks, I Kelan, and H Welch: Chloramphenicol (chloromycetin) in relation to blood dyscrasias with observations on other drugs: a special study. *Antibiotic Chemother.* 1952; 2: 601-609
68. Ludwig WD, Rieder H, Bartram CR et al.: Immunophenotype and genotype features, clinical characteristics and treatment outcome of adult pro-B acute lymphoblastic leukaemia; results of the German multicenter trials GMALL 03/87 and 04/89. *Blood* 92: 1898, 1998.
69. Maciejewski JP, Hibbs JR, Anderson S, Young NS: Bone marrow and peripheral blood lymphocyte phenotype in patients with bone marrow failure. *Exp Hematol* 22: 1102-1110, 1994
70. Martinez C, Agundez JAG, Olivera M, Martin R, Ladero JM, Beitez J: Lung cancer and mutations at the polymorphic NAT2 gene locus. *Pharmacogenetics*, 5: 207-214, 1995
71. Martinez-Climent JA, Lane NJ, Rubin CM, Morgan E, Johnstone HS, Mick R, Murphy SB, Vardiman JW, Larson RA, Le Beau MM: Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid leukemia de novo. *Leukemia.* 1995 Jan; 9(1): 95-101
72. Mc Glynn KA, Rosvold EA, Lustbader ED, Hu Y, Clapper ML, Zhou T, Wild CP, Xia XL, Baffoe Bonnie A, Ofori Adjei D: Susceptibility to hepatocarcinoma is associated with genetic variability in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci* 92: 2384-2387, 1995
73. Mommsen S, Barfod NM, Aagaard J: N-Acetyltransferase phenotypes in the urinary bladder carcinogenesis of a low-risk population. *Carcinogenesis* 1985 Feb; 6(2): 199-201
74. Moody DE, Montgomery KA, Ashour MB, Hammock BD: Effects of environmentally encountered epoxides on mouse liver epoxide-metabolizing enzymes. *Biochem Pharmacol* 1991; 41: 1625-1637
75. Morley A, Trainor K, Seshradi R, Sorelli J: Is aplastic anemia due to abnormality of DNA? *Lancet* 8: 9-11, 1978
76. Mullis KB, Faloona F: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155, S. 335, 1987
77. Nagao T, Maurer AM: Concordance for drug induced aplastic anemia in identical twins. *N Engl J Med* 218: 7-11, 1969
78. Nicholl D, Windl O, de Silva R: Inherited Creutzfeldt-Jakob disease in a British family associated with a novel 144 base pair insertion of the prion protein gene. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 58: 65-69. 1995
79. Noshchenko AG, Zamostyan P, Bondar O, Drozdora V: Radiation-induced leukemia risk among those aged 0-20 at the time of the Chernobyl accident: a case control study in Ukraine. *Int J Cancer* 99 (4), S. 609-618, 2002
80. Okada M, Okamoto T, Wada H, Tademoto Y, Kakishita E: Glutathione S transferase theta gene (GSTT1) defect in Japanese patients with myelodysplastic syndromes. *Int J Hematol* 66: 393-395, 1997
81. Omiecinski CJ, Hassett C, Hosagrahara V: Epoxide-hydrolase-polymorphism and role in toxicology. *Toxicology Letters* 2000, 112-113: 365-370
82. Papadopoulos D, Seidegard J, Georgellis A, Rydstrom J: Subcellular distribution, catalytic properties and partial purification of epoxide hydrolase in the human adrenal gland. *Chem Biol Interact*: 55: 249-260, 1985

83. Park JY, Chen L, Wadhwa N, Tockman MS: Polymorphisms for microsomal epoxide hydrolase and genetic susceptibility to COPD. *Int J Mol Med.* 2005 Mar; 15(3): 443-8
84. Parkinson A: Chapter 6 Biotransformation of xenobiotics, S. 172, Casarett and Doull's, *Toxicology: The Basic Science of Poisons* by Curtis D. Klaassen
85. Pui CH et al., Review: International childhood acute leukaemia workshop. *Leukaemia* 15, 707-715, 2001
86. Price Evans DA: N-Acetyltransferase. *Pharmac. Ther.* 42, 157, 1989
87. Rahbar A, Kempkes M, Müller T, Reich S, Welter FL, Meves S, Przuntek H, Bolt HM, Kuhn W: Glutathione S-Transferase polymorphism in Parkinson's Disease. *J neural Transm.* 107 (3), 331-334, 1999
88. Risch A, Wallace DM, Bathers S, Sim E: Slow N-acetylation genotype is a susceptibility factor in occupational and smoking related bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* 1995 Feb; 4(2): 231-6
89. Roberts-Thomson JC, Ryan P, Khoo KK, Hart WJ, McMichael AJ, Butler RN: Diet, acetylator phenotype and risk of colorectal neoplasia. *Lancet*, 347: 1372-1374, 1996
90. Roots I, Drakoulis N, Brockmöller J: Polymorphic enzymes and cancer risk: concepts, methodology and data review. In: *Pharmacogenetics of Drug Metabolism.* Kalow E (ed). Pergamon, New York, S. 815-841, 1992
91. Rossi AM, Guarnieri C, Rovesti S, Gobba E, Ghittori S, Vivoli G, Barale R: Genetic polymorphism influence variability in benzene metabolism in humans. *Pharmacogenetics* 9, S. 445-458, 1999
92. Sakai RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Ehrlich HA: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase, *Science* 230, S. 1350, 1988
93. Sanchez-Medal L, Castanedo JP, Garcia-Rodas F: Insecticides and aplastic anemia. *N Engl Med* 269: 1365-1370, 1963
94. Schneller F, MANUAL; Leukämien, myelodysplastische und myeloproliferative Syndrome S.49; 2003 by Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München
95. Schrappe M, Reiter A, Ludwig WD, Harbott J, Zimmermann M, Hiddemann W, Niemeyer Ch, Henze G, Feldges A, Zintl F, Kornhuber B, Ritter J, Welte K, Gadner H, Riehm HJ: Improved outcome in childhood acute lymphoblastic despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL-BFM 90. *Blood* 95: 3310-3322, 2000
96. Seidegard J, De Pierre JW, Guenther TM, Oesch F: The effects of metyrapone, chalcone epoxide, benzil, clotrimazol and related compounds on the activity of microsomal epoxide hydrolase in situ, in purified form and in reconstituted systems towards different substrates. *Eur J Biochem* 159: 415-423, 1986
97. Sharpe WD: Benzene, artificial leather and aplastic anemia: Newark, 1916-1928. *Bull N Y Acad Med* 1993; 69: 47-60
98. Shen JJ et al.: Cytogenetic and molecular studies of Down syndrome individuals with leukemia. *Am J Hum Gene* 56, 915, 1995
99. Shou M, Gonzales, FJ, Gelboin HV: Stereoselektive epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbon by cDNA-expressed cytochromes P450 1A1, 1A2, and epoxide hydrolase. *Biochemistry* 35, 15807-15813, 1996

100. Sierra-Torres CH, Au WW, Arrastia CD, Cajas-Salazar N, Robazetti SC, Payne DA, Tying SK: Polymorphisms for chemical metabolizing genes and risk for cervical neoplasia. *Environ Mol Mutagen*, 41: 69-76, 2003
101. Smith Christopher AD, Harrison DJ: Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *The Lancet* 350: 630-633, 1997
102. Smits K, Gaspari L, Strange R: Interaction between smoking, GST M1 deletion and colorectal cancer: results from the GSEC study. *Biomarkers* 8 (3-4), 299-310, 2003
103. Snyder R, Witz G, Goldstein BD: The toxicology of benzene. *Environmental Health Perspectives* 100: 172-181, 1993
104. Snyder R, Chepiga T, Yang CS, Thomas H, Platt K, Oesch F: Benzene metabolism by reconstituted cytochromes P450 2B1 and 2E1 and its modulation by cytochrome b5, microsomal epoxide hydrolase, and glutathione transferases: evidence for an important role of microsomal epoxide hydrolase in the formation of hydroquinone. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993; 122: 172-181
105. Stiller CA, Parkin DM: Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. *Br Med Bull.* 52(4): 682-703, 1996
106. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang D-E: Transcription factors, normal myeloid development and leukemia. *Blood* 90: 489, 1997
107. Tiemersma EW, Omer RE, Bunschoten A, van't Veer P, Kok FJ, Idris MO, Kadaru AM, Fedail SS, Kampman E: Role of genetic polymorphism of glutathione-S-transferase T1 and microsomal epoxide hydrolase in aflatoxin-associated hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10: 785-791, 2001
108. Turner DR, Morley AA, Seshardi RS: Lymphocyte DNA in aplastic anemia. *BR J Haematol* 48: 207-215, 1981
109. Vatsis KP, Weber WW, Bell DA, Dupret JM, Evans DA, Grant DM, Hein DW, Linb HJ, Meyer UA, Relling MV, Sim E, Suzuki T, Tamazoe Y: Nomenclature for N-acetyltransferases. *Pharmacogenetics* 5: 1-7, 1995
110. Weber WW, Hein DW: N-acetylation pharmacogenetics. *Pharmacol. Rev.* 37: 25-79, 1985
111. Weber WW, Hein DW: Clinical pharmacokinetics of isoniazid. *Clin. Pharmacokinet.* 4. 401-422, 1979
112. Weber WW: *The Acetylator genes and drug response*. New York: Oxford University Press, 1987
113. Wegelius R: Bone marrow dysfunctions preceding acute leukemia in children: A clinical study. *Leuk Res.* 1992; 16(1): 71-6
114. Welfare MR, Cooper J, Bassendine MF, Daly AK: Relationship between acetylator status, smoking, and diet and colorectal cancer risk in the north-east of England. *Carcinogenesis.* 1997 Jul; 18(7): 1351-4, 1997
115. Wiemels JL, Cazzaniga G, Daniotti M: Prenatal origin of acute lymphoblastic leukaemia in children. *Lancet* 354: 1499-1503, 1999
116. Wohlleb JC, Hunter CF, Blass B, Kadlubar FF, Chu DZ, Lang NP: Aromatic amine acetyltransferase as a marker for colorectal cancer: environmental and demographic associations. *Int. J. Cancer* 1990 Jul 15; 46(1): 22-30
117. Wormhoudt LW, JN Commandeur, NP Vermeulen: Genetic polymorphisms of human N-acetyltransferase, Cytochrome P450, Glutathione S-Transferase, and Epoxide Hydrolase Enzymes: Relevance to xenobiotic metabolism and toxicity. *Critical Reviews in Toxicology* 29: S. 59-124., 1999

118. www.louisville.edu/medschool/pharmacology/NAT.html
119. Young NS: Acquired aplastic anemia. *Ann Intern Med* 136 (7), S.534-546, 2002
120. Young N: Drugs and Chemicals as agents of bone marrow failure, in Testa N, C. GR (eds.), *Hematopoiesis*, New York, Marcel Dekker, S. 141, 1988
121. Young NS, Mortimer: Viruses and bone marrow failure. *Blood* 63: 75-80, 1993
122. Young NS: Acquired Aplastic Anemia, *JAMA* 282: 271-278, 1999
123. Yu MC, Skipper PL, Taghizadeh K, Tannenbaum SR, Chan KK, Henderson B, Ross RK: Acetylator phenotype, aminobiphenyl-hemoglobin adduct levels and bladder cancer risk in white, black and Asian men in Los Angeles, California. *J. Natl. Canc. Inst.* 86: 712-716, 1994
124. Zhou W, Liu G, Thurston SW, Xu LL, Miller DP, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC: Genetic polymorphisms in N-acetyltransferase-2 and microsomal epoxide hydrolase, cumulative cigarette smoking, and lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002 Jan; 11(1): 15-21
125. Zhou W, Thurston SW, Liu G, Xu LL, Miller DP, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC: The interaction between microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and cumulative cigarette smoking un different histological subtypes of lung cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10: 461-466, 2001
126. Zittoun R, Mandelli F, Willemze R, de Witte Th, Labar B, Resegotti L, Leoni F, Damasio E, Visani G, Papa G, Caronia F, Hayat M, Stryckmans P, Rotoli B, Leoni P, Peetermans M, Dardenne M, Vegna ML, Petti MC, Solbu G, Suci S: Autologous and allogeneic bone marrow transplantation versus intensive chemotherapy in acute myelogenous leukaemia. *N Engl J Med* 332: 217-223, 1995

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med U. Göbel für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. med. U. Dirksen durchführen zu können.

Meinen besonderen Dank möchte ich Frau PD Dr. med. U. Dirksen für die Bereitstellung des Themas, die stets vorhandene Diskussionsbereitschaft und für ihre engagierte Betreuung bei der Niederschrift der Arbeit aussprechen. Sie stand mir immer mit Ideen und Anregungen zur Seite.

Herrn Dr. rer. nat. C. Bury möchte ich sehr für die tatkräftige Unterstützung bei den experimentellen Arbeiten im Labor danken.

Ein besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. rer. nat. O. Feyen für seine stete Hilfsbereitschaft und seine wertvollen Ratschläge.

Herrn Dr. sc. math. R. Willers vom Universitätsrechenzentrum danke ich für seine Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Meinen lieben Eltern, meiner Großmutter sowie meiner Schwester möchte ich von Herzen für ihre uneingeschränkte Unterstützung während des Studiums und der Promotion danken. Ihnen ist diese Arbeit in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Böhm, Nina Andrea
Geburtsdatum: 19.12.1977
Geburtsort: Sydney, Australien
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1984-1988 Ev. Grundschule, Brehmschule, Düsseldorf
1988-1994 Goethe-Gymnasium mit ehem. Rethel-Gymnasium,
Düsseldorf
1994-1995 Abbotsholme School in Rocester, Uttoxeter, Staffs., U.K.
(Boarding School)
1995-1997 Mataré-Gymnasium, Meerbusch mit Abschluss Abitur

Hochschulbildung:

10/1997 Beginn des humanmedizinischen Studiums an der
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
03/2000 Physikum
03/2001 1.Staatsexamen
08/2003 2.Staatsexamen
10/2003-09/2004 Praktisches Jahr im Gerresheimer Krankenhaus, Düsseldorf
11/2004 3.Staatsexamen
Seit 06/2005 Assistenzärztin in der Frauenklinik der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf