

Aus der Abteilung für Gastroenterologie

der Medizinischen Fakultät

Charité- Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

**Die Rolle der EPHX1-Y113H bei entzündlichen
Pankreaserkrankungen und dem
Pankreaskarzinom**

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr.med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sebastian Chr. Strunck

aus Neuss

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. J. Ockenga
 2. Prof. Dr. med. T. F. Greten
 3. Prof. Dr. med. R. Somasundaram

Datum der Promotion: 17. Oktober. 2007

Zusammenfassung

Die Umwandlung von exogenen und endogenen hydrophoben Substraten in hydrophile und somit renal eliminierbare Stoffe ist eine der Hauptaufgaben der Biotransformation. Dieselbe ist in Phase I und Phase II Reaktionen aufgeteilt, deren metabolische Aktivität einer genetisch beeinflussten starken interindividuellen und interethnischen Varianz unterliegt. Bei genetisch bedingter enzymatischer Funktionsdeviation innerhalb dieses Systems kann daraus resultierender erhöhter oxidativer Streß sein zyto- und genotoxisches Potential entwickeln.

Die mikrosomale Epoxid Hydrolase (EPHX) ist ein Enzym der Phase II, das aus der Phase I hervorgegangene hochreaktive Epoxide zu wasserlöslichen Transdihydrodiol-Derivaten umwandelt und somit neutralisiert. Eine Mutation in den Genen, die die Enzyme dieses Detoxifikationssystems kodieren, könnten somit als genetischer Risikofaktor die Genese einer chronischen Pankreatitis oder eines Pankreaskarzinoms kofaktoriell beeinflussen, insbesondere da diese Pankreaserkrankungen mit exogenen Noxen assoziiert sind.

Um eine valide Aussage bezüglich der Verteilung des Genotypes bei Patienten versus Normalbevölkerung zu erzielen ist eine große Fallzahl notwendig. Daher haben wir in einer multizentrisch durchgeführten Studie ein Gesamtstudienkollektiv von 1999 Fällen mit pankreatischen Erkrankungen und gesunden Kontrollen analysiert, um die Verteilung des EPHX-Genotyps zu untersuchen. Die DNA-Proben wurden mittels polymerase chain reaction (PCR) und einer Schmelzkurvenanalyse mithilfe von fluorescence resonance energy transfer (FRET) Sonden und einem LightCycler untersucht.

Tabelle I: Gesamtstudienkollektiv (N=1999)

		EPXH1 Genotyp		
		T/T	T/C	C/C
Akute Pankreatitis	N (%)	82 (45%)	83 (46%)	16 (9%)
Alkoholische chronische Pankreatitis	N (%)	184 (54%)	133 (39%)	24 (7%)
Idiopathische chronische Pankreatitis	N (%)	200 (46%)	187 (43%)	44 (10%)
Pankreaskarzinom	N (%)	167 (45%)	164 (45%)	36 (10%)
Kontrollen	N (%)	108 (44%)	112 (46%)	24 (10%)

Das Studienkollektiv setzt sich zusammen aus 367 Patienten mit einem Pankreaskarzinom, 341 mit einer alkoholtoxischen chronischen Pankreatitis, 431 mit idiopathischer chronischer Pankreatitis, 181 mit akuter Pankreatitis und 679 Kontrollen mit demselben ethnischen Hintergrund (white caucasian). Es zeigt sich, dass bei Patienten mit einer alkoholisch chronischen Pankreatitis (ACP) der EPHX1-Y113H Polymorphismus signifikant im Vergleich zu den Kontrollen häufiger war ($p < 0,006$). Bei den ACP fand sich das Tyr 113 Allel mit einer Allelhäufigkeit von 0,74 zu 0,68 bei den Kontrollen. Dieses entspricht einem korrespondierenden risk ratio von 1,21 (95%CI, 1,06-1,37).

Es gab keinen signifikanten Häufigkeitsunterschied im Tyr 113 Allel in den anderen Pankreasgruppen (AP:0,68; ICP:0,68; Ca:0,68; Kontrolle:0,68).

Zur Erhebung phänotypischer Merkmale bzw. weiterer Risikofaktoren wurde ein Subkollektiv von N=385 analysiert.

Dieses kaukasische Studienkollektiv (N=385) besteht aus 53 Patienten mit einer chronischen Pankreatitis (CP), aus 88 mit einem Adenokarzinom des Pankreas und aus 244 gesunden Kontrollen. Die in der Gesamtgruppe gesehene Assoziation zwischen Genotyp und ACP konnte in dieser kleinen Fallzahl nicht nachgewiesen werden.

Es finden sich jedoch erwartungsgemäß signifikant verteilte phänotypische Merkmale. Raucher sind bei Patienten mit einer chronischen Pankreatitis mit $p=0,003$ signifikant

häufiger vertreten. Pankreasverkalkungen und Pseudozysten sind krankheitsspezifisch und erwartungsgemäß mit jeweils $p < 0,001$ mit der chronischen Pankreatitis assoziiert. Es stellte sich heraus, dass die Karzinompatienten bei Erstdiagnosestellung und Homozygotie signifikant ($p = 0,017$) jünger waren ($52,7 \pm 12$ vs. 60 ± 12 Jahre). Ebenso zeigte sich, dass homozygote Karzinompatienten signifikant mehr Alkohol pro Woche zu sich genommen haben ($p < 0,001$). Bezogen auf Funktion und Eigenschaft der EPHX erscheinen diese Zahlen z.T. widersprüchlich. Der signifikant geringere Alkoholkonsum bei CP und Homozygotie ($p = 0,003$) könnte auf eine proinflammatorische Wirkung der Mutation hinweisen.

Der in unserer Studie beobachtete moderate Zusammenhang zwischen dem EPHX1-Y113H Polymorphismus und dem Auftreten einer alkoholischen chronischen Pankreatitis unterstützt die Hypothese der Interaktion zwischen genetischer Suszeptibilität und exogenen (Risiko-) Faktoren in der Genese der chronischen Pankreatitis. In unserer Untersuchung haben wir nur ein Phase I-/Phase II-Gen untersucht, jedoch darf spekuliert werden, dass die Kombination mehrerer genetisch determinierter Enzymaktivitäten eine wesentliche Rolle in der Detoxifizierungsleistung des einzelnen Individuums spielt. Um diese Zusammenhänge statistisch sicher aufzuklären, bedarf es jedoch noch größerer Fallzahlen.

Abstract

Turning hydrophob exogen and endogen substrates into hydrophil substances, thus prepared for renal passage, is one of the major functions of the biotransformation. It can be divided into Phase I and Phase II reactions, whose metabolic activity underlies a wide ranged diversity, influenced by genetic interindividual and interethnic variations. In case of a genetically caused functional deviation of this system, a resulting increased oxidative stress can develop its cyto- and genotoxic potential.

The microsomale epoxide hydrolase is a phase II enzyme, which turns highly reactive epoxides from phase I into water soluble Transdihydrodiol derivates thus neutralising the substances. A mutation of the genes encoding for this detoxification system could therefore be a genetic co-risk-factor in the genesis of a chronic pancreatitis or pancreas carcinoma, especially because these diseases are associated with exogen substrates.

In order to get a valid message concerning the distribution of the genotype of the patients versus the genotypic frequency in the normal population a high number of cases was needed. Therefore we examined within our multicentric study an overall collective of 1999 cases. The DNA was examined with polymerase chain reaction (PCR) procedure and a melting curve analysis with the help of fluorescence resonance energy transfer (FRET) probes and a light cycler.

The study-collective consists out of 367 patients with pancreatic carcinoma, 341 with an alcoholic chronic pancreatitis, 431 with idiopathic pancreatitis, 181 with acute pancreatitis and 679 controls with the same ethnic background (white Caucasian). The study shows that only patients with an alcoholic chronic pancreatitis (ACP) have a significant increase of the EPHX-Y113H polymorphism compared to the control group ($p < 0,006$). The Tyr 113 allele could be found with a frequency of 0,74 within the ACP compared to the control group with a frequency of 0,68. This results in a corresponding risk ratio of 1,21 (95%CI, 1,06-1,37). There was no significant accumulation of the Tyr 113 allele in the other pancreas groups (AP:0,68; ICP:0,68; Ca: 0,68; controls: 0,68).

Tabelle II: Genotype according pancreatic diseases (N=1999)

		EPXH1 Genotype		
		T/T	T/C	C/C
Acute pancreatitis	N (%)	82 (45%)	83 (46%)	16 (9%)
Alcoholic chronic pancreatitis	N (%)	184 (54%)	133 (39%)	24 (7%)
Idiopathic chronic pancreatitis	N (%)	200 (46%)	187 (43%)	44 (10%)
Pancreas-Carcinoma	N (%)	167 (45%)	164 (45%)	36 (10%)
Controls	N (%)	108 (44%)	112 (46%)	24 (10%)

To raise phenotypic expressions and/or further risk factors we analysed a subcollective of N=385.

This white Caucasian study-collective (N=385) consists out of 53 patients with a chronic pancreatitis (CP), out of 88 with an adenocarcinoma of the pancreas and out of 244

healthy controls. The association of an ACP and the genotype which was seen in the big study-collective could not be found in this small group.

A number of expected significant distributions of phenotypic expressions could be found though. Smokers are significantly more frequent within the patients with chronic pancreatitis ($p=0,003$). Pancreascalifications and pseudocysts are typical for a chronic pancreatitis and therefore significantly increased ($p<0,001$).

It turned out, that the patients with a carcinoma and an homocytot genotype were significantly younger ($p<0,017$; $52,7\pm 12$ vs. 60 ± 11 ys). Homocytot carcinoma patients drink according to the small collective significantly more alcohol per week ($p<0,001$). Considering the function and the characteristics of the EPHX system these numbers appear partially contradictory. The significant lower alcohol consume in the homocytot chronic pancreatitis group ($p<0,003$) could be a hint to the proinflammatory effect of the mutation.

The seen moderate synergy between the EPHX1-Y113H polymorphism and the incidence of an alcoholic chronic pancreatitis underlines the hypothesis of an interaction between a genetic susceptibility and an exogen (risk-) factor in the genesis of chronic pancreatitis. In our study we did only examine one phase I-/phase II-gen, but it can be speculated, that a combination of multiple genetically determined enzyme-activities play a major role in the ability of detoxification of every single individual. In order to proof these synergies statistically reliable, even bigger study-collectives are needed.

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	3
ABSTRACT	5
INHALTSVERZEICHNIS	8
TABELLENVERZEICHNIS	9
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	9
WIDMUNG	9
1 EINLEITUNG	10
1.1 DIE AKUTE PANKREATITIS	10
1.2 DIE CHRONISCHE PANKREATITIS	11
1.2.1 Epidemiologie	11
1.2.2 Pathogenese und Pathophysiologie der CP	11
1.3 DAS PANKREASKARZINOM	12
1.3.1 Epidemiologie	12
1.3.2 Pathogenese und Pathophysiologie	12
1.4 DIE ALLGEMEINE ROLLE VON PHASE I UND PHASE II REAKTIONEN	13
1.5 FRAGESTELLUNG UND HYPOTHESE	15
2 MATERIAL UND METHODEN	16
2.1 MATERIAL UND GERÄTE	16
2.1.1 Material	16
2.1.2 Geräte	16
2.2 METHODEN	16
2.2.1 Patientenrekrutierung	16
2.2.2 DNA-Extraktion	18
2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)	19
2.2.4 Schmelzkurvenanalyse	19
3 STATISTIK	21
4 RESULTATE	21
4.1 EPHX1 GENOTYP UND PANKREASERKRANKUNG	21
4.2 ERGEBNISSE DES BERLINER PATIENTENKOLLEKTIVES	22
4.3 INTERAKTION ZWISCHEN EXOGENEN FAKTOREN UND GENOTYP	24
4.4 PANKREATISCHES PHÄNOTYP-GENOTYP VERHÄLTNIS	25
4.5 EXTRAPANKREATISCHES PHÄNOTYP-GENOTYP VERHÄLTNIS	26
5 DISKUSSION	29
5.1 ZIELSETZUNG DER EIGENEN STUDIE UND EINE WEITERE MÖGLICHKEIT	31
5.2 DIE MIKROSOMALE EPOXID HYDROLASE (EPHX)	31
5.3 KONKLUSION	36
LITERATURVERZEICHNIS	37
ANHANG	44
EINVERSTÄNDNISERKLÄRUNG	49
DANKSAGUNG	51
CURRICULUM VITAE	52
EIDESSTÄTTLICHE ERKLÄRUNG	54

Tabellenverzeichnis

TABELLE I: GESAMTSTUDIENKOLLEKTIV (N=1999).....	4
TABELLE II: GENOTYPE ACCORDING PANCREATIC DISEASES (N=1999).....	6
TABELLE III: GESAMTSTUDIENKOLLEKTIV (N=1999)	22
TABELLE IV: GRUNDCHARAKTERISTIKA DER PATIENTEN MIT PANKREASERKRANKUNGEN	23
TABELLE V: HÄUFIGKEIT DES EPHX-Y113H POLYMORPHISMUS.....	23
TABELLE VI: SPEZIELLE RISIKOFAKTOREN UND ONSET BEI CA-PATIENTEN.....	25
TABELLE VII: SPEZIELLE RISIKOFAKTOREN UND ONSET BEI CP-PATIENTEN	25
TABELLE VIII: HOMOGENITÄTSVERGLEICH BEZOGEN AUF DIE PHÄNOTYPEN ZWISCHEN DEN GRUPPEN	26
TABELLE IX: HOMOGENITÄTSVERGLEICH EXTRAPANKREATISCHER PHÄNOTYPEN	26
TABELLE X: GENOTYPEN GEGEN EXTRAPANKREATISCHE PHÄNOTYPEN	27
TABELLE XI: GENOTYPISCHE VERTEILUNG BEZOGEN AUF PHÄNOTYPISCHE MERKMALE	28
TABELLE XII: LITERATURÜBERSICHT ÜBER UNTERSUCHUNGEN VON VARIANTEN IN GENEN DER PHASE I UND PHASE II ENZYME BEI PATIENTEN MIT PANKREASERKRANKUNGEN.....	30
Tabelle XIII: Polymorphismen der EPHX bei einer Auswahl verschiedener Erkrankungen UND DEREN EFFEKT	33

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG I : SCHEMA PHASE I / II METABOLISMUS.....	15
ABBILDUNG II : SCHEMA DNA-EXTRAKTION.....	18
ABBILDUNG III: SCHMELZKURVENANALYSE	20
ABBILDUNG IV: RELATIVE VERTEILUNG DER GENOTYPEN IN DEN GRUPPEN.....	24

Widmung

Für meine Eltern.

1 Einleitung

Die Bauchspeicheldrüse ist ein retroperitoneal gelegenes Organ mit einer Länge von 15 bis 23 cm und einem Gewicht von 70 bis 150 g. Paul Langerhans beschrieb im Jahr 1869 erstmalig eine Einteilung in einen exokrinen und endokrinen Anteil. Die endokrinen Anteile des Organs werden auch als die Langerhansschen Inseln bezeichnet. In den Inselzellen werden als Hauptvertreter der Blutglukoseregulation Insulin, Glukagon und Somatostatin produziert. Der exokrine Anteil ist in den Azini gruppiert und wird hauptsächlich über die Vagusaktivität, und die Mediatoren Cholezystokinin und Sekretin moduliert. Die Sekretionsmenge kann bis zu zwei Litern am Tag betragen. Neben den Enzymen Lipase und Amylase werden auch proteolytische Enzyme sezerniert (vorwiegend Endo- und Exopeptidasen).

Meistdiskutierte Pankreaserkrankungen sind die akute Pankreatitis, die chronische Pankreatitis und das Pankreaskarzinom.

1.1 Die akute Pankreatitis

Der akuten Pankreatitis liegt meist eine biliär induzierte Entzündung zugrunde (40%), gefolgt von toxischen Genesen¹. Diese kann mit einer Störung der endokrinen und exokrinen Funktion einhergehen, heilt jedoch größtenteils ohne Defekt ab. Durch diesen Prozess können aber auch Pseudozysten entstehen, die abhängig von ihrer Größe, in aller Regel keine klinische Symptomatik verursachen². Die Epidemiologie der akuten Pankreatitis zeigt 15 bis 20 Erkrankte pro 100.000 Einwohner. Während bei den Männern ein Alkoholabusus ätiologisch diskutiert wird, ist es bei den Frauen häufiger eine akute biliäre Pankreatitis. Daraus ergibt sich eine typische Altersverteilung von dem 20. bis 40. Lebensjahr bei den Männern und zwischen dem fünften und sechsten Lebensjahrzehnt bei den Frauen³. Seltener Ursachen wie z.B. medikamentös-toxische Einflüsse, Infekte oder mechanische Behinderung des Sekretflusses machen ca. zehn Prozent der akuten Pankreatitiden aus. Bei weiteren 10-20 Prozent der AP spricht man von einer idiopathischen Pankreatitis, bei der man keine Ursache eruieren kann. Dieselbe Größenordnung von zehn bis zwanzig Prozent idiopathischer Erkrankungen findet sich bei Patienten mit chronischer Pankreatitis.

1.2 Die Chronische Pankreatitis

1.2.1 Epidemiologie

Im Vergleich zur akuten Pankreatitis zeichnet sich die chronische Pankreatitis durch einen zumeist progredienten Verlauf aus, der häufig in einer funktionellen Insuffizienz des Organs endet. Morphologisch ist im Verlauf bis zum Terminalstadium eine zunehmende Fibrosierung des Pankreasgewebes charakterisierend⁴. Häufig fallen in bildgebenden Verfahren ausgedehnte Verkalkungen auf, welche das fortgeschrittene Stadium einer chronisch kalzifizierenden Pankreatitis belegen⁵. Höhergradige Stadien einer chronischen Pankreatitis gehen einher mit einer zunehmenden Reduktion der exokrinen und endokrinen Funktion, die dann häufig durch eine Substitutionstherapie ausgeglichen werden muß. Klinisch werden die Patienten in der Regel durch gürtelförmige Oberbauchschmerzen, einer Steatorrhö und daraus resultierendem Malabsorptionssyndrom auffällig. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 6 auf 100.000 mit einem Häufungsgipfel zwischen dem 45 bis 54 Lebensjahr.

1.2.2 Pathogenese und Pathophysiologie der CP

Die in westlichen Industrienationen häufigste Ursache für eine chronische Pankreatitis ist ein erhöhter Alkoholkonsum (75-90%)⁶. Das Risiko eine chronische Pankreatitis durch kontinuierlichen Alkoholkonsum zu entwickeln zeigt eine logarithmische Beziehung zur täglich zugeführten Alkoholmenge. Als kritische Schwelle wurden bei Frauen eine Menge von 280 g/Woche, bei Männern von 560 g/Woche Alkohol über einen Zeitraum von fünf bis fünfzehn Jahren kontinuierlichen Konsums ermittelt. Hierbei ist die Quantität, nicht die Qualität des Alkohols ausschlaggebend⁷. Dafür spricht, dass eine vorrausgegangene alkoholbedingte akute Pankreatitis für die Genese einer CP prädisponierende Funktion haben kann⁵. Rauchen ist ein weiterer wesentlicher Kofaktor in der Genese der CP. Weitere Kofaktoren für die Progression einer CP sind protein- und fettreiche Ernährung und ein Mangel an Spurenelementen (Kupfer, Selen, Zink)^{6,7}. Der genaue Pathomechanismus, warum erhöhter Alkoholkonsum zu einer chronischen Pankreatitis führt ist weiterhin ungeklärt. Eine mittlerweile veraltete tierexperimentell untersuchte Hypothese besagte, dass eine mögliche Sekretionsveränderungen der Bauchspeicheldrüse begünstigende Funktion haben könnte. So würde in diesem Falle das Sekret eindicken und zu einer sekundären Obstruktion der Pankreasgänge führen⁸.

Diese Hypothese ist nach aktueller Lehrmeinung jedoch überholt. Eine Alternativhypothese besagt, dass eine alkoholvermittelte Autoaktivierung proteolytischer Enzyme zu Zelluntergang, Fibrose und Gangvernarbungen führt⁹. Eine Aktivitätsinduktion der Phase I Enzyme z.B. des Cytochrom P450 Systems ist bekannt. Da nur 5 bis maximal 10% der Patienten die einen Alkoholabusus betreiben eine chronische Pankreatitis entwickeln, steht weiterhin die Frage im Raum wieso die Verteilung der Risikofaktoren in so unterschiedlicher Menge zu dem gleichen Krankheitsbild führen. Die Theorie einer genetisch bedingten erhöhten Empfindlichkeit des Pankreasgewebes auf Noxen zu untersuchen, ist das Ziel unserer Studie gewesen.

1.3 Das Pankreaskarzinom

1.3.1 Epidemiologie

Maligne Pankreastumore gehen in 90 % der Fälle vom duktalem Gängepithel aus. Dieses Karzinom hat häufig eine infauste Prognose bei Diagnosestellung, da es oftmals klinisch erst sehr spät symptomatisch wird. Die mittlere Überlebensdauer nach Diagnosestellung wird in gängigen Textbüchern mit drei bis sechs Monaten angegeben. Andere maligne Tumoren des Pankreas sind das Papillenkarzinom, das durch seine Lokalisation eine frühere klinische Symptomatik verursacht, sowie endokrine Tumoren mit deutlich besseren Prognosen. Die in einem Großteil der Fälle ausgedehnte Metastasierung gibt einer chirurgischen Intervention selten Chancen auf Besserung. Die Inzidenz des Pankreaskarzinoms mit 4-7 auf 100.000 Einwohner ist zwischen dem 60.–80. Lebensjahr die höchste, wobei Männer ein erhöhtes Risiko haben. Insgesamt steigt durch die Häufung im höheren Lebensalter auch die Inzidenz der Erkrankung in den westlichen Industrienationen, da die Menschen hier in aller Regel durch die Möglichkeiten moderner Medizin älter werden.

1.3.2 Pathogenese und Pathophysiologie

Zu den bekanntesten Risikofaktoren ein Pankreaskarzinom zu entwickeln zählen das Rauchen, fettreiche Ernährung (Adipositas und Diabetes), eine langbestehende chronische Pankreatitis^{10,11}, sowie eine vorbestehende alkoholtoxische chronische Pankreatitis¹², als auch die Exposition zu polyaromatischen Kohlenwasserstoffen. Es

konnte kein Zusammenhang zu erhöhtem Kaffee- oder Alkoholkonsum gefunden werden.

Im Tierversuch konnten durch Langzeitbehandlungen mit Karzinogenen wie Azaserin und Nitrosaminen Pankreaskarzinome induziert werden. Diese Noxen fungieren unter Umständen auch beim Menschen als Kofaktoren, wofür das Auftreten des Pankreaskarzinoms als Alterserkrankung u.U. durch langjährige Akkumulation spricht. Doch auch hier kann man aufgrund von epidemiologischen Daten annehmen, dass die Empfindlichkeit des Pankreasgewebes wie auch bei der CP durch genetische Faktoren beeinflusst wird.

Da sowohl das Karzinom als auch die chronische Pankreatitis ein ähnliches Risikoprofil aufweisen, wurden beide Kollektive in dieser Studie untersucht.

1.4 Die allgemeine Rolle von Phase I und Phase II Reaktionen

Die Umwandlung toxischer Substanzen in wasserlösliche Verbindungen, die renal ausgeschieden werden können, ist ein grundlegendes Prinzip beim Abbau von Fremdstoffen. Hierbei unterscheidet man Phase-I- und Phase-II-Reaktionen. Die Aktivität vieler Phase-I- und Phase-II-Enzyme ist genetisch beeinflusst und kann schwächer und stärker ausgeprägt sein. Genetische Polymorphismen sind für die starken interindividuellen Unterschiede im Metabolismus von Fremdstoffen verantwortlich. Die Phase-I-Enzyme der Cytochrom-P450-Familie sind für den Abbau der meisten Arzneimittel sowie toxischer Fremdstoffe essentiell. Die Phase-II-Enzyme spielen eine wichtige Rolle in der Biotransformation von aromatischen und heterozyklischen Aminen und Hydrazinen, die als Medikamente und in der Umwelt vorkommen. Genetische Polymorphismen der Enzyme des Fremdstoffmetabolismus sind für eine veränderte Expression und Aktivität der betroffenen Genprodukte verantwortlich und können das Krebsrisiko und das Risiko für Arzneimittelnebenwirkungen beeinflussen. Ein Zusammenhang einer EPHX-Mutationen und verschiedenen teils malignen Erkrankungen wurde in einer Reihe von Studien untersucht, so wurde 1996 ein signifikanter Zusammenhang mit Ovarialkarzinomen¹³, 1997 mit der Genese von Lungenemphysemen¹⁴, 1998 zu Lungenkrebs¹⁵, 1999 zu Colonkarzinomen¹⁶ und 2000 zu Oro-, Pharynx- und Larynxkarzinomen¹⁷, sowie im Jahr 2001 zur Praeklampsie¹⁸ gefunden. Ebenso konnte ein proinflammatorischer Effekt der

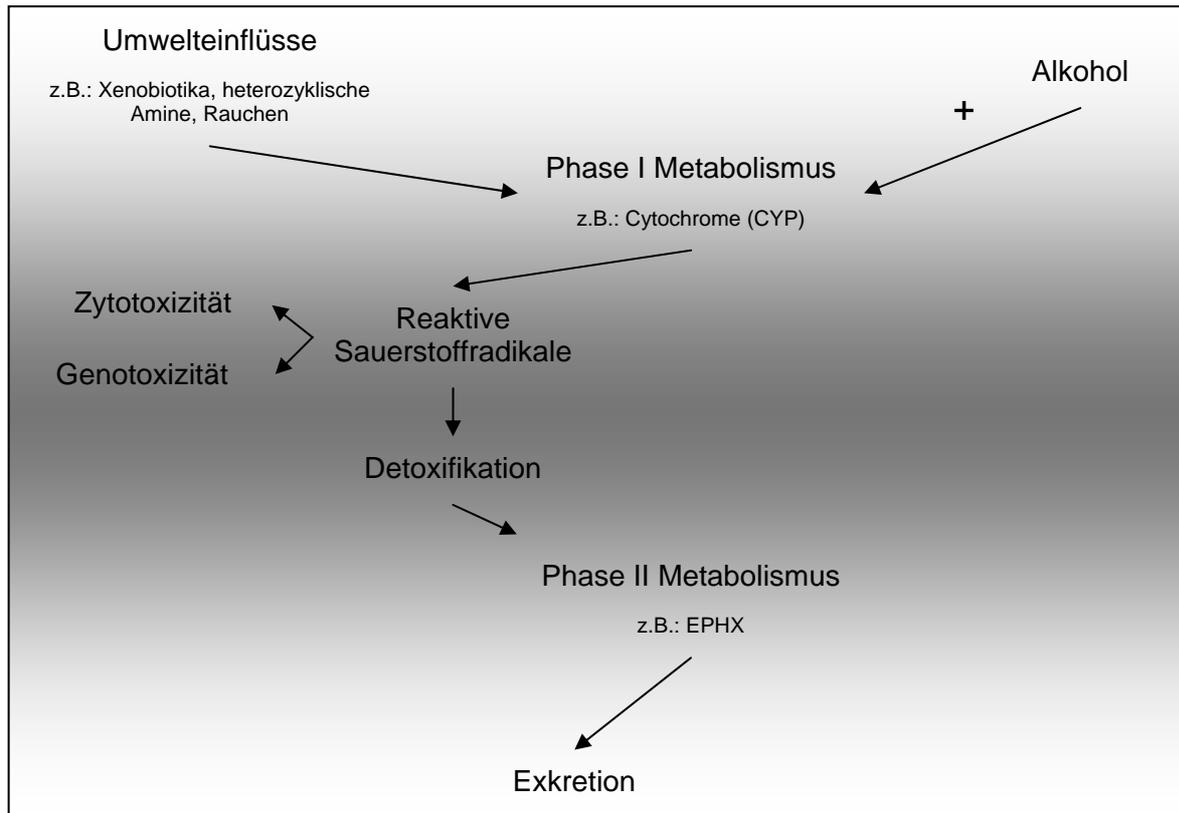
EPHX-Mutation bezogen auf die Genese eines Morbus Crohn¹⁹ in einer Studie aus dem Jahre 2002 nachgewiesen werden.

Die Häufigkeitsverteilungen der Allele der Gene, die Phase-I- und Phase-II-Enzyme kodieren, sind für viele Populationen bekannt; sie zeigen eine große interethnische Varianz. In den für diese Enzyme codierenden Genen wurden schon zahlreiche Polymorphismen beschrieben, die dazu führen, dass entweder eine gesteigerte, oder verminderte Enzymaktivität zu verzeichnen ist. Solche Polymorphismen können die Entstehung von Krankheiten beeinflussen.

Die mikrosomale Epoxid Hydrolase spielt eine große Rolle in extrahepatischen Detoxifizierungsprozessen der Phase II. Die durch das Cytochrom P 450 modifizierten Xenobiotika werden zwischenzeitlich zu hochreaktiven Epoxiden modifiziert, die sich an zelluläre Bestandteile binden können und damit eine Gewebsschädigung verursachen. Die Detoxifizierung von Epoxiden kann durch Konjugation mit Glutathion, katalysiert durch die Glutathion-S-Transferase, oder durch Hydratation zu wasserlöslichen Transdihydrodiol-Derivaten durch die Epoxid-Hydrolase geschehen²⁰. Das auf Chromosom 1Q42.1 lokalisierte Gen²¹ kodiert für zwei Formen der Epoxid-Hydrolase. Einerseits die mikrosomale Epoxid Hydrolase (EPHX1) und die lösliche Epoxid-Hydrolase (EPHX2)²², wobei sich unsere Studie mit dem häufigsten EPHX1-Polymorphismus (Y113H) beschäftigt.

Liegt eine Funktionseinschränkung dieses Enzyms vor, kann der zyto- und genotoxische Stress ansteigen.

Abbildung I : Schema Phase I / II Metabolismus



1.5 Fragestellung und Hypothese

- Ist der Polymorphismus EPHX1-Y113H mit einem höheren Risiko für eine chronische Pankreatitis assoziiert?
- Ist EPHX1-Y113H mit einem höheren Risiko für ein Pankreaskarzinom assoziiert?
- Hat der Genotyp des EPHX Gens einen Einfluss auf den Verlauf der Erkrankung?
- Wie sind typische Risikofaktoren innerhalb des Patientenkollektives verteilt?

2 Material und Methoden

2.1 Material und Geräte

2.1.1 Material

High-Yield-Kit	Genovision
Oligonukleotide	TIB MOLBIOL, Berlin
AmpliTaq Gold DNA-Polymerase	Perkin Elmer, Überlingen
GeneAmp 10x PCR-Puffer, MgCl ₂ , dNTPs	Perkin Elmer, Überlingen
Bayol F	Serva, Heidelberg
PCR-Gefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
LightCycler-Kapillaren	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.2 Geräte

GenoM48 (DNA-Extraktion)	Genovision
T3 Thermocycler (PCR)	Biometra
LightCycler (Schmelzkurvenanalyse)	Roche Diagnostics
LightCycler-Zentrifuge	Roche Diagnostics
Vortex	IKA

2.2 Methoden

2.2.1 Patientenrekrutierung

Einschlusskriterien für diese Studie waren die untersuchten Grunderkrankungen, Alter und Risikoprofil stellten kein Ausschlusskriterium dar.

Die Patienten des großen Studienkollektives (N=1999) wurden multizentrisch erhoben sowohl durch unsere Studiengruppe (Studienkollektiv N=385) an der Charité Berlin, sowie durch die Studiengruppe Prof.Dr.H.Schulz (Universitätsklinik Magdeburg) und der Studiengruppe um Prof.Dr.V.Keim (Universitätsklinik Leipzig).

Die repräsentative Subgruppe von Patienten der Charité (N=385) wurden sowohl stationär, als auch im Rahmen der gastroenterologischen Sprechstunde des Campus

Mitte für die Studie gewonnen. Der Großteil der Patientengruppe mit Karzinom wurde innerhalb der hämatologisch/onkologischen Sprechstunde des Campus Rudolf Virchow Klinikum akquiriert.

Die Kontrollgruppe bestand aus Blut von gesunden Probanden ohne anamnestische Hinweise auf Pankreaserkrankungen.

Die Patienten, die an der Charité untersucht wurden, sind prospektiv mithilfe eines standardisierten Fragebogens (siehe Anhang) phänotypisiert und in eine Access-Datenbank erfasst worden. Fehlende Angaben wurden mit Hilfe der Patientenakten ergänzt.

Der Fragebogen deckte Angaben zu Alkohol-, Zigaretten-, Drogen-, Medikamentenkonsum/-abusus ab. Ferner wurden klinische Angaben gesammelt, wie Datum der Erstdiagnose, ERCP-Klassifizierung, Initialschub und Inzidenzen der Pankreatitis, Parenchym-Verkalkungen, Pseudozysten, Pankreasgang- und Gallengangsdilatation, exokrine Pankreasinsuffizienz, Pankreasenzymsubstitution, Diabetes mellitus und Insulinsubstitution, das Bestehen von chronischen Schmerzen und deren Therapie, weiterer Komplikationen (Gallengangstenose, Milzvenenthrombose,...), pankreasbedingte OP und Körpergewichtsverlauf über die letzten sechs Monate, PAVK, KHK, COPD, Malignomen (Plattenepithel-Ca, Pankreas-Ca, Bronchial-Ca, Colon-Ca, HCC), Leberleiden und die krankheitsspezifische Familienanamnese erhoben.

Anhand der Anamnese und der phänotypische Merkmale wurden die Patientenuntergruppen definiert. Als Patienten mit einer alkoholisch chronischen Pankreatitis wurden Probanden definiert, die über einen längeren Zeitraum hinweg (Jahre) mindestens 60 g Alkohol/Tag zu sich genommen haben und bei denen andere Ursachen einer chronischen Pankreatitis nicht eruiert werden konnten. Die idiopathische chronische Pankreatitis wurde definiert durch mindesten drei rezidivierende Pankreatitiden bzw. Patienten mit einer chronischen Pankreatitis ohne Hinweis auf einen chronisch gesteigerten Alkoholkonsum (> 20 g/Tag) oder einer anderen Ursache für eine Pankreatitis.

Die Entnahme venösen Blutes erfolgte nach Aufklärung und Zustimmung der Patienten. Für die DNA Extraktion wurden jeweils 10 ml venöses EDTA Blut dem Patienten entnommen, das dann bei -24°C zwischengelagert wurde.

Sowohl die Probanden der Kontrollgruppe, wie auch die Patienten waren alle weiße Kaukasier und entstammten dem gleichen Umfeld.

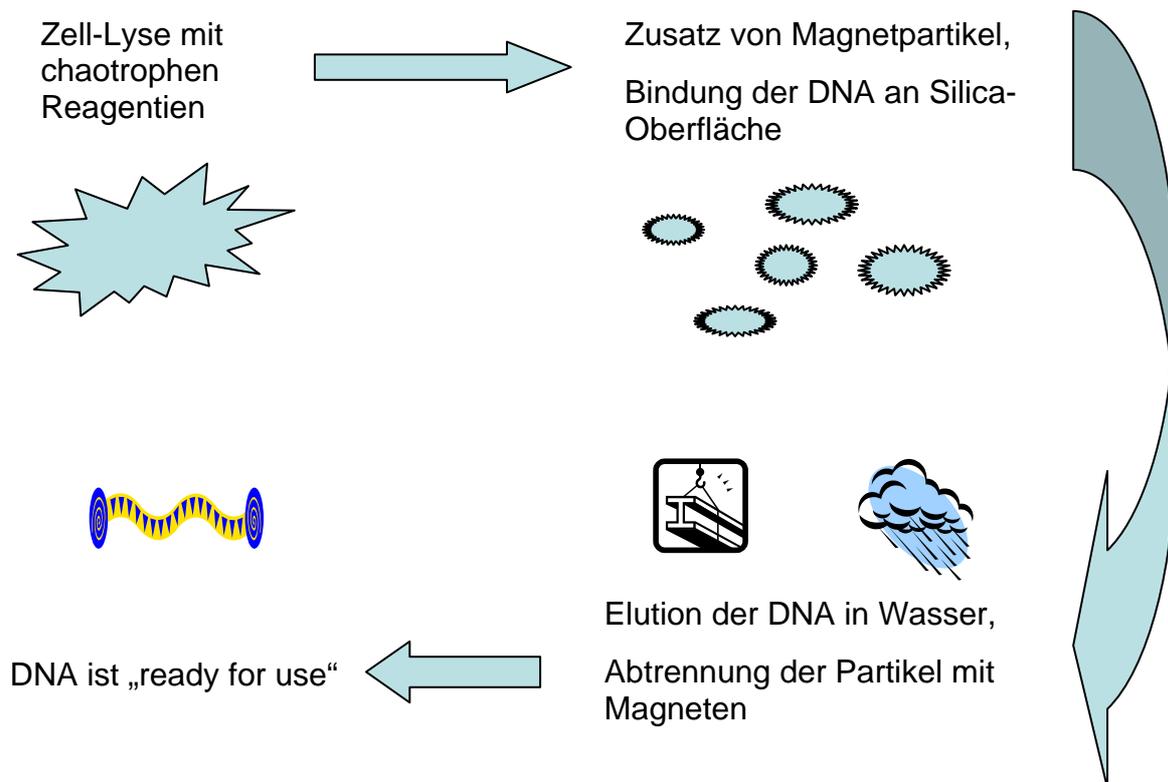
Die vorliegende Studie wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt.

Alle Patienten wurden über die wissenschaftlichen Ziele und die Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen aufgeklärt und dieses auch schriftlich dokumentiert (siehe Anhang).

2.2.2 DNA-Extraktion

Die DNA-Extraktion wurde mithilfe eines Roboters GenoM-48 (Fa. Genovision, Wien) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf der Bindung der DNA an Silica-Oberflächen von magnetischen Beads in Gegenwart einer chaotrophen Lösung.

Abbildung II : Schema DNA-Extraktion



Da ein Probenvolumen von 150 µl angesetzt wurde, ist ein High-Yield-Kit verwendet worden.

2.2.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine von Mullis et al. (1987) entwickelte in vitro-Technik, bei der definierte DNA-Abschnitte enzymatisch vervielfältigt werden können. Anfang und Ende des zu amplifizierenden Abschnitts werden durch komplementäre bzw. umgekehrt komplementäre, einzelsträngige Primer definiert, die sich an die 5'-Enden der Ziel-DNA anlagern. Durch zyklische Temperaturveränderung wird die DNA denaturiert, was eine Anlagerung der Primer ermöglicht (Annealing). Durch die Aktivität der DNA Polymerase wird der Primerstrang verlängert (Extension) und somit die Ziel-DNA kopiert. Durch die Wiederholung der Zyklen kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung der Zielsequenz.

Der PCR-Reaktionsansatz enthielt 2,8 µl Puffer (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 500 mM KCl; 15 mM MgCl₂, 0,1 % Gelatine), 400 µM Desoxynukleotidtriphosphate (in äquimolaren Mengen jedes dNTP), je 0,1 µM Primer, 0,75 U DNA-Polymerase (AmpliTaq Gold) und 3 µl genomische DNA in einem Gesamtvolumen von 28 µl. Der PCR-Ansatz wurde mit einem Tropfen Öl (Bayol F) überschichtet, um Verdunstung zu vermeiden. Die PCR wurde in einem automatisierten Thermocycler (T3 Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initial erfolgte eine Denaturierung der DNA für 12 min bei 95°C. Anschließend folgten 48 Zyklen Denaturierung für 20 s bei 95°C, Anlagerung der Primer (Annealing) für 40 s bei 56°C, Elongation für 90 s bei 72°C und eine abschließende Extension für 2 min bei 72°C.

Die verwendeten Primer wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) hergestellt. Die Primer zur Amplifikation der Ziel-DNA des EPHX-Gens wurden anhand der publizierten Nukleotidsequenz synthetisiert. Folgende Oligonukleotide wurden für die PCR eingesetzt: 5-GAT CGA TAA GTT CCG TTT CAC C-3 und 5-GGC TGG CGT TTT GCA AAC AT-3.

2.2.4 Schmelzkurvenanalyse

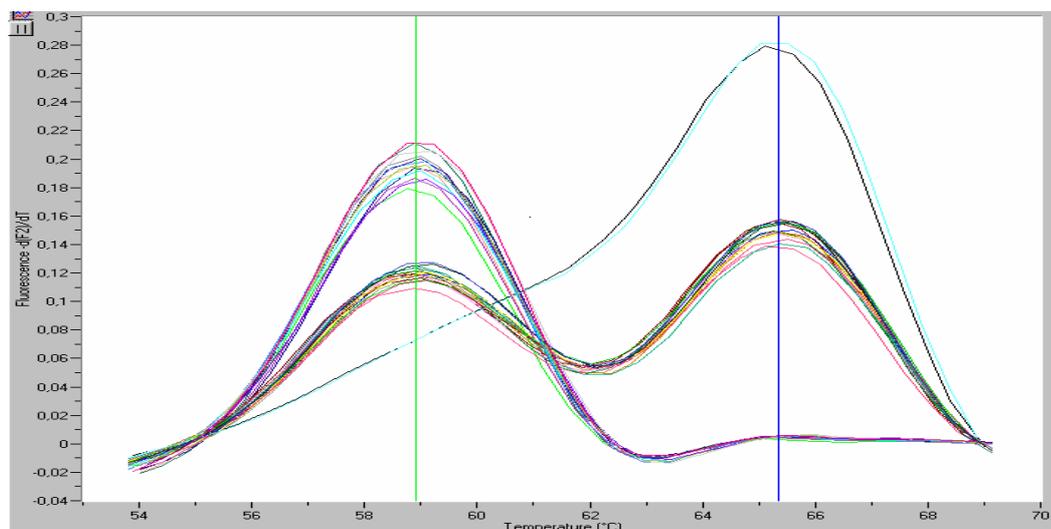
Nach der Amplifikation des gewünschten PCR-Produktes wurde dieses mit zwei fluoreszenzmarkierten FRET-Proben-Paaren hybridisiert. Die Sequenz der Sensorsonden war komplementär zur Sequenz des zu untersuchenden Polymorphismus, so dass der Komplex zwischen Sensorsonde und mutiertem Allel stabiler war als der Komplex zwischen Sensorsonde und Wildtyp. Bei Vorliegen des

gesuchten Polymorphismus entstand eine allelspezifische Schmelzkurve, deren Schmelztemperatur höher war als die des Wildtyps, da die Sensorsonden eine Basen-Fehlpaarung zu dem Wildtyp aufwiesen. Würde unter der Sonde eine andere Mutation als die nachzuweisende liegen, würde das Vorhandensein von 2 Basen-Fehlpaarungen in einer weiteren Schmelzpunkterniedrigung resultieren.

Die FRET-Sonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) anhand der publizierten Nukleotidsequenz synthetisiert. Für die Detektion der Variation wurde eine fluoreszenzmarkierte Sensorsonde verwendet und eine mit LC 640-markierte Ankersonde (LC: LightCycler Red; ph: Phosphat): 5-GAA TTT GAC TGG AAG AAG CAG GTG GAG A—FL und LC Red640-TCT CAA CAG ACA CCC TCA CTT CAA GA—PH.

4,5 µl PCR-Produkt wurden in LightCycler-Kapillaren (Roche, Mannheim) mit 2,0 µl Sondenmix versetzt. Der Sondenmix bestand aus 180 µl aqua bidest, 13 µl FL-Sonde und 16 µl LC 640-Ankersonde (Sondenkonzentration jeweils 10 µM). Die Kapillaren wurden mit einem Kunststoffdeckel verschlossen und 20 Sekunden bei 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Schmelzkurvenanalyse im LightCycler unter folgenden Bedingungen: Initiale Denaturierung bei 95°C für 60 s (Rampe: 20°C/s), Abkühlen auf 45°C für 10 s (Rampe: 20°C/s), Schmelzkurvenanalyse mit Temperaturerhöhung auf 75°C (Rampe: 0,05°C/s) und erneutes Abkühlen auf 40°C für 2 s (Rampe: 20°C/s). Die Aufzeichnung und Auswertung der Schmelzkurven erfolgte computergesteuert (Roche Molecular Biochemicals Version 3.5).

Abbildung III: Schmelzkurvenanalyse



3 Statistik

Der Chi-square oder der Fisher's exact test wurden für diskrete Variablen benutzt. P-Werte (zweiseitig) mit Werten unter 0,05 wurden als signifikant gewertet. Der T-Test oder Mann-Whitney's Rang-Summen Test wurden bei unpaarigen Daten genutzt. Der Kruskal-Wallis Test wurde für den Vergleich mehrerer Gruppen nichtparametrischer unpaariger Daten genutzt.

Alle statistischen Auswertungen wurden mittels SPSS/PC+ V12.0 software (SPSS, Chicago, USA) durchgeführt. Das relative risk ratio (RR) wurde mithilfe des Programms EpiCalc berechnet.

4 Resultate

4.1 EPHX1 Genotyp und Pankreaserkrankung

Das Studienkollektiv von 1999 Fällen setzt sich zusammen aus 367 Patienten mit einem Pankreaskarzinom, 341 mit einer alkoholtoxischen chronischen Pankreatitis, 431 mit idiopathischer chronischer Pankreatitis, 181 mit akuter Pankreatitis und 679 Kontrollen mit demselben ethnischen Hintergrund (white Caucasian). Innerhalb dieses großen Studienkollektives zeigt sich das Tyr 113 Allel mit einem korrespondierenden risk ratio von 1,21 (95%CI, 1,06-1,37) signifikant häufiger ($p < 0,006$) in der Gruppe der alkoholische chronischen Pankreatitiden versus der Kontrollpopulation. Hier zeigt sich Tyr 113 Allel des EPHX-Y113H Polymorphismus mit einer Häufigkeit von 0,74 zu 0,68 bei den Kontrollen. Andere Pankreatitiden zeigten keine signifikanten Unterschiede (AP:0,68; ICP:0,68; Ca:0,68; Kontrolle:0,68).

Tabelle III: Gesamtstudienkollektiv (N=1999)

		EPXH1 Genotype		
		T/T	T/C	C/C
Akute Pankreatitis	N (%)	82 (45%)	83 (46%)	16 (9%)
Alkoholische chronische Pankreatitis	N (%)	184 (54%)	133 (39%)	24 (7%)
Idiopathische chronische Pankreatitis	N (%)	200 (46%)	187 (43%)	44 (10%)
Pankreaskarzinom	N (%)	167 (45%)	164 (45%)	36 (10%)
Kontrollen	N (%)	108 (44%)	112 (46%)	24 (10%)

4.2 Ergebnisse des Berliner Patientenkollektives

Das von uns weiterführend phänotypisch analysierte kaukasische Studienkollektiv (N=385) besteht aus 53 CP-Patienten, aus 88 Ca-Patienten und aus 244 gesunden Kontrollen

Die Gruppen wurden zuerst untereinander in Bezug auf die Genotypen untersucht, wobei die Verteilung eher zufällige Unterschiede ($p=0,485$ nach Pearson) aufzeigt. Danach wurden sie paarweise gegeneinander untersucht, wobei keines Signifikanzniveau erreichte (CA zu CP $p=0,834$; CA und CP vs. Kontrollen $p=0,212$). Auf die Zusammenfassung der Gene und Prüfung zu den Gruppen wurde aufgrund einer dann notwendigen Adjustierung des Signifikanzniveaus nach Bonferoni verzichtet. Nun wurde der Zusammenhang von Genotyp zu anderen Variablen und phänotypischen Charakteristika untersucht. Dafür wurde zuerst eine Homogenitätsprüfung zwischen den Ca- und CP-Kollektiven durchgeführt. Wenn sich die Gruppen bezogen auf die Variable als homogen verteilt erwiesen, so wurden die Gruppen zusammengefasst und statistisch zur Mutation (homo-/heterozygot/Wildtyp) untersucht.

Tabelle IV: Grundcharakteristika der Patienten mit Pankreaserkrankungen

	Gesamt		Ca			CP			Signifikanz (p < 0,05)
	abs.	%	abs.	Zeilen %	% von Ca	abs.	Zeilen %	% von CP	
Gesamt	141		88	62,4		53	37,6		
männlich	90	63,8	56	62,2	63,6	34	37,8	64,2	
weiblich	51	36,2	32	62,7	36,4	19	37,3	35,8	
Raucher	93	66,0	50	53,8	56,8	43	46,2	81,1	p=0,003
Nichtraucher	48	34,0	38	79,2	43,2	10	20,8	18,9	
Alkohol (>60g/d)	37	26,2	12	32,4	13,6	25	67,6	47,2	p<0,001
	MW	SD	MW	SD		MW	SD		
Alter bei ED	52,6	14,4	59,8	10,9		40,6	11,2		p<0,001
BMI	23,7	5,1	23,6	4,0		23,9	6,6		
Zigaretten/d (nur Raucher)	24,5	13,3	24,6	12,1		24,3	14,8		

Raucher sind bei CP mit $p=0,003$ signifikant häufiger vertreten. Ebenso sind Patienten mit einem Alkoholkonsum $>60\text{g/d}$ mit $p<0,001$ bei den CP häufiger. CP-Patienten sind mit $p<0,001$ signifikant jünger als die Gruppe der Ca.

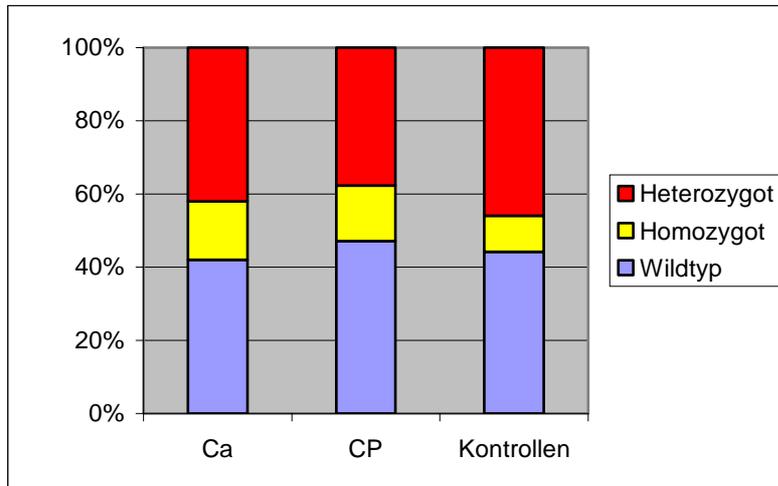
Tabelle V: Häufigkeit des EPHX-Y113H Polymorphismus

Mutation	Gesamt		Ca		CP		Kontrollen	
	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
Wildtyp	170	44,2	37	42,0	25	47,2	108	44,3
Homozygot	46	11,9	14	15,9	8	15,1	24	9,8
Heterozygot	169	43,9	37	42,0	20	37,7	112	45,9
Gesamt	385	100	88	100	53	100	244	100

Die Genotypen sind nicht signifikant verteilt mit $p=0,49$.

In dem von uns wildtypisch charakterisierten Subkollektiv fand sich im Gegensatz zu der großen Kohorte von 1999 Fällen kein Unterschied in der Verteilung des Genotyps bezüglich der Ätiologie der Pankreaserkrankungen.

Abbildung IV: Relative Verteilung der Genotypen in den Gruppen



Die Genotypen sind nicht signifikant verteilt mit $p=0,49$.

4.3 Interaktion zwischen exogenen Faktoren und Genotyp

Um die Interaktion zwischen den Genotypen der EPHX1-Y113H und den exogenen Faktoren, wie Zigaretten- oder Alkoholkonsum, als auch den Einfluß des Genotyps auf das Entstehungsalter der Erkrankung zu untersuchen, wurden diese Faktoren dem Genotyp gegenübergestellt (Tab. IV, Tab. V). Hier fand sich ein deutlich jüngeres Alter bei Erstdiagnose für Patienten mit einem homozygoten Genotyp. Dieser Effekt konnte allerdings für die chronische Pankreatitis nicht beobachtet werden. Weiterhin hatten Patienten mit einer chronische Pankreatitis und einem homozygoten Genotyp einen scheinbar geringeren durchschnittlichen Alkoholkonsum als die Patienten mit Wildtyp und Heterozygotie. Dieses lässt vermuten, dass hier weniger exogene Noxen notwendig sind, um eine Pankreaserkrankung zu induzieren.

Tabelle VI: Spezielle Risikofaktoren und Onset bei Ca-Patienten

	Gesamt		Wildtyp		Homozygot		Heterozygot		Signifikanz (p < 0,05)
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
Alter bei ED (Jahre)	59,8	10,9	60,0	11,2	52,7	12,4	62,5	8,9	p=0,017
Zigaretten/d	24,6	12,1	21,7	10,9	29,6	14,6	24,5	11,4	
Alkohol (g/Woche)	239,4	478,1	127,3	155,3	659,3	1034,0	192,6	241,7	p=0,001

Die Karzinompatienten sind bei Erstdiagnose und Homozygotie signifikant jünger (p=0,017). Der durchschnittliche Alkoholkonsum in g/Woche ist bei Homozygotie ebenfalls signifikant erhöht mit p=0,001.

Tabelle VII: Spezielle Risikofaktoren und Onset bei CP-Patienten

	Gesamt		Wildtyp		Homozygot		Heterozygot		Signifikanz (p < 0,05)
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
Alter bei ED (Jahre)	40,6	11,2	40,5	10,5	44,8	13,7	38,9	11,1	
Zigaretten/d	24,3	14,8	26,2	15,2	19,0	2,2	23,5	16,8	
Alkohol (g/Woche)	1038,0	1323,7	1658,3	1552,4	244,4	431,7	580,2	831,0	p= 0,003

Der durchschnittlich Alkoholkonsum bei CP und Homozygotie ist signifikant niedriger (p=0,003).

4.4 Pankreatisches Phänotyp-Genotyp Verhältnis

In den folgenden Homogenitätstabellen wird die Inzidenz der Phänotypen zwischen Karzinompatienten und Pankreatitispatienten gegenübergestellt. Hier zeigen sich jedoch nur erwartungsgemäß krankheitsspezifische Signifikanzen. So sind Pankreasverkalkungen und Pseudozysten signifikant häufiger bei der CP. Chronische Schmerzen und Pankreas-OPs sind bei der malignen Erkrankung signifikant erhöht, ebenso wie die Dauer der Erkrankung signifikant erniedrigt ist.

Tabelle VIII: Homogenitätsvergleich bezogen auf die Phänotypen zwischen den Gruppen

	Gesamt (N=141)		Ca (N=88)			CP (N=53)			Signifikanz (p < 0,05)
	abs. („ja“)	%	abs.	Zeilen %	% von Ca	abs.	Zeilen %	% von CP	
Pankreasverkalkungen	25	17,7	3	12,0	3,4	22	88,0	41,5	p < 0,001
Pseudozysten	23	16,3	2	8,7	2,3	21	91,3	39,6	p < 0,001
Pankreasgang-erweiterungen	36	25,5	19	52,8	21,6	17	47,2	32,1	
Gallengang-erweiterungen	18	12,8	10	55,6	11,4	8	44,4	15,1	
Diabetes mellitus	51	36,2	28	54,9	31,8	23	45,1	43,4	
Insulin-substitution	41	29,1	28	68,3	31,8	13	31,7	24,5	
Pankreasenzym-substitution	89	63,1	53	59,6	60,2	36	40,4	67,9	
Chronische Schmerzen	44	31,4	34	77,3	38,6	10	22,7	19,2	p=0,029
Pankreas-OP	64	45,4	46	71,9	52,3	18	28,1	34	p=0,026
	MW	SD	MW	SD		MW	SD		
BMI (kg/m²)	23,7	5,0	23,6	4,0		23,9	6,6		
Dauer der Erkrankung (Jahre)	5,3	7,4	1,8	3,3		11,2	8,6		p<0,001

Zahlen beziehen sich auf Merkmal vorhanden bzw. „ja“. Pankreasverkalkungen und Pseudozysten sind signifikant häufiger bei CP (p<0,001). Chronische Schmerzen (p=0,029) und eine Pankreas-OP (p=0,026) sind signifikant häufiger bei Karzinompatienten.

Tabelle IX: Homogenitätsvergleich extrapankreatischer Phänotypen

	Gesamt (N=141)		Ca (N=88)			CP (N=53)			Signifikanz (p < 0,05)
	abs. („ja“)	%	abs.	Zeilen %	% von Ca	abs.	Zeilen %	% von CP	
Hepatopathie	56	39,7	33	58,9	37,5	23	41,1	43,4	
PAVK	13	9,2	5	38,5	5,7	8	61,5	15,1	
KHK	6	4,3	6	100	6,8	0	0	0	
COPD	10	7,1	3	30,0	3,4	7	70,0	13,2	p=0,034

Zahlen beziehen sich auf Merkmal vorhanden bzw. „ja“. CP-Patienten leiden mit p=0,034 signifikant häufiger an einer COPD.

4.5 Extrapankreatisches Phänotyp-Genotyp Verhältnis

Da die Epoxid-Hydrolase in verschiedenen Organen expremiert wird, haben wir ferner untersucht, inwieweit Hepatopathien, peripher arteriovenöse Verschlusserkrankungen (Arteriosklerose), koronare Herzerkrankungen und chronisch obstruktive Lungenerkrankungen mit dem Vorliegen eines bestimmten Genotyps des EPHX1-Y113H assoziiert sind. Hierzu sind erst einmal die Verteilung dieser extrapancreatischen Erkrankungen auf das Pankreaskarzinom und die chronische Pankreatitis beschrieben. Hier fand sich nur ein Zusammenhang, dass das Vorliegen einer COPD häufiger bei Patienten mit chronischer Pankreatitis zu finden sind. Dieses könnte u.a. mit einem höheren Nikotinabusus in Verbindung stehen. Eine Assoziation zwischen extrapancreatischen Erkrankungen und einem bestimmten Genotyp ließen sich nicht nachweisen (Tab.XI).

Tabelle X: Genotypen gegen extrapancreatische Phänotypen

	Gesamt (N=141)		Wildtyp		Homozygot		Heterozygot		Signifikanz (p < 0,05)
	abs. („ja“)	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	
Hepatopathie	56	39,7	19	33,9	12	21,4	25	44,6	
PAVK	13	9,2	5	38,5	0	0	8	61,5	
KHK	6	4,3	2	33,3	1	16,7	3	50,0	
COPD	10	7,1	5	50,0	2	20,0	3	30,0	

Zahlen beziehen sich auf Merkmal vorhanden bzw. „ja“. Keine Signifikanz bei CA und CP zusammen gegen Genotyp.

Ferner überprüften wir, inwieweit das Vorliegen eines bestimmten Genotyps mit klassischen pankreatischen Komplikationen wie Verkalkungen, Pseudozystenbildung, Pankreasgangerweiterungen, Entwicklung eines Diabetes mellitus oder einer exokrinen Pankreasinsuffizienz assoziiert war. Zwischen allen diesen Faktoren und einem bestimmten Genotyp ließ sich keine signifikante Assoziation darstellen. Es fand sich allerdings eine Assoziation zwischen einem höheren BMI und einem homozygoten Genotyp.

Tabelle XI: Genotypische Verteilung bezogen auf phänotypische Merkmale

	Gesamt (N=141)		Wildtyp		Homozygot		Heterozygot		Signifikanz (p < 0,05)
	abs. („ja“)	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	
Pankreas- verkalkungen	25	17,7	13	52,0	4	16,0	8	32,0	
Pseudozysten	23	16,3	12	52,2	2	8,7	9	39,1	
Pankreasgang- erweiterungen	36	25,5	14	38,9	5	13,9	17	47,2	
Gallengang- erweiterungen	18	12,8	6	33,3	4	22,2	8	44,5	
Diabetes mellitus	51	36,2	28	54,9	6	11,8	17	33,3	
Insulin- substitution	41	29,1	23	56,1	6	14,6	12	29,3	
Pankreasenzym- substitution	89	63,1	42	47,2	14	15,7	33	37,1	
Chronische Schmerzen	44	31,4	19	43,2	6	13,6	19	43,2	
Pankreas-OP	64	45,4	28	43,8	12	18,7	24	37,5	
	MW	SD	MW	SD	MW	SD	MW	SD	
BMI (kg/m²)	23,7	5,0	23,2	4,7	26,7	7,5	23,2	3,8	p=0,019
Dauer der Erkrankung (Jahre)	5,3	7,4	5,3	7,0	7,1	10,6	4,7	6,2	

Zahlen beziehen sich auf Merkmal vorhanden bzw. „ja“. Der BMI ist in beiden Gruppen zusammengenommen bei Homozygotie mit p=0,019 signifikant höher.

5 Diskussion

Eine Assoziation zwischen chronischem und exzessivem Alkoholkonsum und einer akuten sowie chronischen Pankreatitis ist in diversen Studien bereits untersucht worden. Genetische Mutationen in gewebeprotektiven Enzymsystemen in Kombination mit Umweltinteraktionen (exogene Noxen) scheinen für die Ausprägung einer Pankreatitis von wachsender Bedeutung zu sein. So sind genetische Polymorphismen der Glutathion S-Transferasen Familie (GST) mit einer erhöhten Suszeptibilität des Pankreas in Bezug auf eine Erkrankung des Organs vergesellschaftet²³. Bartsch et al. haben eine moderat erhöhte Suszeptibilität aufgrund eines GSTM1 Polymorphismus proklamiert²⁴, was allerdings durch Frenzer et al.²⁵ sowie Schneider et al.²⁶ nicht bestätigt werden konnte. Rahman et al. publizierte kürzlich eine Arbeit, welche den GSTT1 null Genotyp als protektiv gegenüber schweren akuten alkoholischen Pankreatitiden beschreibt²⁷. Diese Studie konnte bisher in anderen Populationen jedoch nicht reproduziert werden und korreliert eher mit akuten, als mit chronischen Pankreatitiden. Genau widersprüchliche Ergebnisse wurden von Polymorphismen der detoxifizierenden Aldehyd-Dehydrogenase-1 (ALDH2) und der alkoholischen Pankreatitis gefunden. So haben Kimura et al. einen förderlichen Effekt eines genetischen Polymorphismus des ALDH2-Gens und dem Risiko eine chronische Pankreatitis zu entwickeln gefunden (japanisches Studienkollektiv)²⁸. Dieser Effekt konnte nicht durch Maruyama et al. (japanisches Studienkollektiv)²⁹ sowie Frenzer et al. (kaukasisches Studienkollektiv)²⁵ nachvollzogen werden. Die bisher publizierten Arbeiten hierzu sind in Tabelle XII zusammengefasst.

Tabelle XII: Literaturübersicht über Untersuchungen von Varianten in Genen der Phase I und Phase II Enzyme bei Patienten mit Pankreaserkrankungen

Mutation	N (Patienten/Kontrollen)	Aussage und Auswirkung auf Krankheit	Ref
Akute Pankreatitis			
Catalase C 260T	320/263	I	27
GST P1	320/263	I	27
GSTT 1A	320/263	II bei schwerer AP	27
GSTT M1	320/263	I	27
Manganese Supperoxid Dismutase Ala	320/263	I	27
Chronische Pankreatitis			
Cyp450 2E1	185/200	I	30
GSTM 1AB	195/78	II	24
GSTM 1B	195/78	II	24
GSTM 1	185/200	I	30
GSTT 1A	122/245	II	31
Alkoholische Chronische Pankreatitis			
GSTM	142/261	I	32
GSTA	142/261	I	32
GSTM 1null	142/261	III	32
GSTP	142/261	I	32
GSTT	142/261	I	32
GSTT 1A	122/245	I	31
Idiopathische Chronische Panreatitis			
GSTT 1A	122/245	II	31
GSTT 1	185/200	I	30
N-Acetyltransferase NAT 2	195/78	I	24
NADPH Quinone Oxidoreduktase NQO1	195/78	I	24
Pankreas-Karzinom			
CYP1A1	149/146	I	33
CYP1A1 m1	309/964	I	34
CYP1A1 m2	309/964	I	34
CYP1A1 m4	309/964	I	34
GSTM 1AB	195/78	II	24
GSTM 1B	195/78	II	24
GSTM 1	149/146	I	33
GSTM 1	309/964	I	34
GSTT 1	149/146	I	33
GSTT 1null	309/964	II bei schweren Rauchern	34
NADPH Quinone Oxidoreduktase NQO1	195/78	I	24

I: keine Assoziation zwischen Mutation und Phänotyp; II: signifikante Assoziation zwischen Mutation und Phänotyp (mögl. induktiver Effekt); III: signifikant erniedrigte Mutationsfrequenz (mögl. protektiver Effekt); GSTx : Mutation des Glutathion-S-Transferase Systems; CYP450x : Mutation des Cytochrom P450 Systems; NADPHx: Mutation des Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinucleotid-Phosphat Systems

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie fanden wir Hinweise, dass eine moderate Assoziation zwischen dem Vorliegen des EPHX1-Y113H-Genotyps und dem Auftreten einer alkoholischen chronischen Pankreatitis besteht. Diese Assoziation konnte nicht nachgewiesen werden für andere Pankreaserkrankungen wie das Pankreaskarzinom, die idiopathische Pankreatitis, oder die akute Pankreatitis. Anhand des phänotypisch analysierten kleineren Studienkollektivs von N=385 zeigt sich ein jüngeres Durchschnittsalter der Patienten mit Pankreaskarzinom und homozygotem Genotyp, als auch ein geringerer Alkoholkonsum bei Patienten mit chronischer Pankreatitis und homozygotem Genotyp. Diese unterstützt die Rolle des Phase II-Enzyms Epoxid-Hydrolase in der Risikomodifikation der Entstehung von Pankreaserkrankungen.

5.1 Zielsetzung der eigenen Studie und eine weitere Möglichkeit

Da eine Dysbalance zwischen zytotoxischen sowie genotoxischen Metaboliten und detoxifizierenden Prozessen eine Auswirkung auf die Entwicklung einer chronischen Pankreatitis oder eines Pankreaskarzinoms haben kann, war das Ziel dieser Studie herauszufinden, ob sich ein funktioneller Polymorphismus der mikrosomalen Epoxid Hydrolase in seiner Häufung bei Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollen unterscheidet. Ein Zusammenhang zwischen Mutationen der EPHX und diversen malignen Erkrankungen (Ovarial-; Larynx-; Lungen- und hepatozelluläres Karzinom) wurden bereits in anderen Studien beschrieben^{13,15,19,35}.

Bezugnehmend auf Literaturdatenbanken wurde noch keine Studie zu einem EPHX1-Y113H Polymorphismus in Zusammenhang mit Pankreaserkrankungen durchgeführt.

5.2 Die mikrosomale Epoxid Hydrolase

Die mikrosomale Epoxid Hydrolase spielt eine große Rolle in extrahepatischen Detoxifizierungsprozessen der Phase II. Die durch das Cytochrom P450 modifizierten Xenobiotika werden zwischenzeitlich zu hochreaktiven Epoxiden modifiziert, die sich an zelluläre Bestandteile binden können und damit eine Gewebsschädigung verursachen. Die Detoxifizierung von Epoxiden kann durch Konjugation mit Glutathion, katalysiert durch die Glutathion-S-Transferase, oder durch Hydratation zu wasserlöslichen Transdihydrodiol-Derivaten durch die Epoxid-Hydrolase geschehen²⁰. Das auf

Chromosom 1Q42.1 lokalisierte Gen²¹ kodiert für zwei Formen der Epoxid-Hydrolase. Einerseits die mikrosomale Epoxid Hydrolase (EPHX1) und die lösliche Epoxid-Hydrolase (EPHX2)²², wobei sich unsere Studie mit dem häufigsten EPHX1-Polymorphismus (Y113H) beschäftigt. Hasset C. et al. sequenzierte 1994 das komplette EPHX1 Gen. Das primäre nukleäre Transkript hat eine Länge von 20.271 Nukleotiden und besteht aus 9 Exons, getrennt durch 8 Introns mit einem schwachen Core Promotor³⁶. Die meisten Studien, wie auch unsere, konzentrieren sich auf den gängigsten genetischen Polymorphismus in Exon 3^{15,16,22,37,38}. Diese genetischen Polymorphismen sind für Aminosäuresubstitutionen in dem korrespondieren Enzym verantwortlich, was wiederum die Funktion der Hydrolase beeinflusst.

Es ist allerdings bemerkenswert, dass die Enzymaktivität in unterschiedlichen Gewebstypen und innerhalb der Bevölkerung auch beim Wildtyp großen interindividuellen Schwankungsbreiten unterliegt, was möglicherweise auch durch genetische Multivarianz und unterschiedliche Umwelteinflüsse mitbedingt wird. Mit unterschiedlichen Umwelteinflüssen sind externe Risikofaktoren, sowie oxidativer Streß gemeint.

Zu den bereits gesicherten Risikofaktoren von Pankreaserkrankungen gehören das Rauchen und der Alkoholkonsum, die u.a. zu einer akuten bzw. chronischen Pankreatitis führen können^{6,39-41}. Ebenso ist das Rauchen ein anerkannter Risikofaktor für das Pankreaskarzinom, wie auch eine fleisch- und energiereiche Ernährung^{6,11,40,42}, oder eine berufliche Tätigkeit als Chemiarbeiter, Reinigungskräfte oder Frisör, die mit den oben genannten Risikofaktoren die Gemeinsamkeit haben, dass sie alle eine erhöhte Exposition gegenüber heterozyklischen Aminen haben^{11,43-45}. Diese bergen ein ausgeprägtes zyto- und genotoxisches Potential in sich. Wenn ein wichtiges Detoxifizierungssystem wie die EPHX1 -als ein Bestandteil der Phase II der Biotransformation- nicht oder nur verlangsamt funktioniert, akkumulieren sich hochreaktive Intermediate, die konstant aus den Phase I Reaktionen hervorgehen. Die akkumulierten freien Radikale können nicht mehr in ausreichendem Maße neutralisiert werden und stellen nun einen oxidativen Stress für die Zelle dar, der seinerseits zyto- und genotoxisch wirkt. Das dieses Potential bei Trägern dieser Mutation in Kombination mit „Lifestyle“-Faktoren einen additiven Effekt bezüglich einer proinflammatorischen evtl. malignitätsträchtigen Wirkung hat erscheint logisch. Dieser Prozess ist nicht alleine auf das Pankreas beschränkt, er findet sich vielmehr ubiquitär im Organismus. Ein

Zusammenhang von EPHX-Mutationen und verschieden teils malignen Erkrankungen wurde in einer Reihe von Studien untersucht, so wurde 1996 ein signifikanter Zusammenhang mit Ovarialkarzinomen¹³, 1997 mit der Genese von Lungenemphysemen¹⁴, 1998 zu Lungenkrebs¹⁵, 1999 zu Colonkarzinomen¹⁶ und 2000 zu Oro-, Pharynx- und Larynxkarzinomen¹⁷, sowie im Jahr 2001 zur Praeklampsie¹⁸ gefunden. Eine neuere Publikation zu diesem Thema aus dem Jahre 2002, hat eine EPHX-Mutation mit der Genese eines Morbus Crohn¹⁹ in positive Korrelation gebracht. Arbeiten betreffend eines Einflusses der Epoxid-Hydrolase-Polymorphismen auf die Entstehung von Pankreaserkrankungen liegen zurzeit nicht vor.

Tabelle XIII: Polymorphismen der EPHX bei einer Auswahl verschiedener Erkrankungen und deren Effekt

Erkrankung	EPHX1				EPHX2		Ref
	Exon 3 (slow metabolizer)		Exon 4 (fast metabolizer)				
	N (Pat/Kont)	Aussage	N (Pat/Kont)	Aussage	N (Pat/Kont)	Aussage	
Lungenemphysem	162/203	I					14
Asthma	162/203	I					14
Lungenkarzinom			110/119	I			46
Ösophaguskarzinom	145/352	II					47
Hepatozelluläres Karzinom HCC					231/256	I	48
Fulminanter Verlauf bei Hepatitis B					231/256	I	48
Hepatozelluläres Karzinom HCC bei Hepatitis C	394/99	I					49
Fulminanter Verlauf bei Hepatitis C (Zirrhose)	394/99	I					49

I: signifikante Assoziation zwischen Mutation und Phänotyp (mögl. induktiver Effekt)

II: signifikant erniedrigte Mutationsfrequenz (mögl. protektiver Effekt)

In unserer Studie zeigte sich, dass nur bei Patienten mit einer ACP der EPHX-Y113H-Polymorphismus signifikant häufiger im Vergleich zu den Kontrollen verteilt war ($p < 0,006$, Tab I). Bei den alkoholischen CP war das Tyr 113 Allel häufiger, als in den Kontrollen mit einer Allelhäufigkeit von 0,74 zu 0,68 und einem korrespondierenden risk ratio von 1,21 (95%CI, 1,06-1,37). Es gab keinen signifikanten Häufigkeitsunterschied im Tyr 113 Allel in den anderen Pankreasgruppen (AP:0,68; ICP:0,68; Ca:0,68; Kontrolle:0,68; Tab I).

Ebenfalls eine positive Assoziation zwischen einem Phase-II Enzym, der Uridinphosphat-5-Glucoronosyltransferase (UGT) und der Entstehung einer chronischen Pankreatitis und einem Pankreaskarzinom wurde 2002 von Ockenga et al. beschrieben⁵⁰. Die UGTs sind wichtige Faktoren innerhalb des Phase II-Metabolismus. In dieser Arbeit wurde das UGT-1A7-Gen untersucht, welches primär die Detoxifizierung von aromatischen Hydrocarbonen und heterozyklischen Aminen katalysiert, die im Zigarettenrauch oder bei der Zubereitung von Fleisch entstehen können. Allerdings konnte der von Ockenga et al beobachtete Zusammenhang zwischen drei Missmatchmutationen, die mit einer Reduktion der katalytischen Aktivität verbunden sind und den Pankreaserkrankungen in einer weiteren Arbeit von Witt et al. aus dem Jahre 2005 nicht bestätigt werden⁵¹.

Das von uns phänotypisch differenzierter untersuchte Studienkollektiv (N=385) besteht aus 53 Patienten mit einer alkoholischen chronischen Pankreatitis (CP), aus 88 mit einem Adenokarzinom des Pankreas und aus 244 gesunden Kontrollen (Tab.II). Die Tyr113 Mutation ist bei chronischer alkoholischen Pankreatitis und Pankreaskarzinom mit $p=0,485$ im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verteilt (Tab.III).

Die Diskrepanz zu den Ergebnissen der zuvor beschriebenen Studiengruppe ist wahrscheinlich durch die kleinere Fallzahl erklärt. Alternativ sind aber auch regional differierende genetische Verteilungsmuster zu diskutieren.

Bereits angesprochene bekannte Risiken eine CP zu entwickeln sind sowohl der gesteigerte Alkoholkonsum^{7,52}, als auch das Zigarettenrauchen^{53,54}, die beide als unabhängige Risikofaktoren gelten⁶. Der von diesen Faktoren ausgeübte oxidative Streß steht in positiver Korrelation mit der Pathogenese einer CP⁵⁵. In unserer phänotypisch analysierten Gruppe von N=385 zeigte sich, dass die CP-Patienten mit einem homozygoten Genotyp innerhalb ihrer Gruppe interessanterweise signifikant weniger ($p=0,003$; Tab.V) Alkohol pro Woche zu sich nehmen. Dieses könnte auf eine

proinflammatorische Eigenschaft des funktionsgeminderten EPHX-Systems auf das Pankreas hindeuten. Die These einer erhöhten Anfälligkeit in Bezug auf Inflammation des Organs bei Exposition mit oxidativem Stress für EPHX-Mutanten konnte für eine andere chronische Entzündung (M.Crohn) 2002 von DJ de Jong et al. positiv mit EPHX bereits bestätigt werden. Aufgrund unserer Daten könnte man dieses nun auch für die chronische Pankreatitis annehmen. Zigarettenkonsum ist klar mit einer pankreatischen Karzinogenese vergesellschaftet, wohingegen der Zusammenhang mit hohem Alkoholkonsum nicht eindeutig hergestellt werden konnte^{6,43,56}. Protektive Eigenschaften der untersuchten EPHX-Mutation bezüglich des invasiven Ovarialkarzinoms vom endometrialen Subtyp³⁵ und des Adenokarzinom der Lunge³⁸ wurden bereits beschrieben. Das signifikant jüngere onset des Karzinoms bei Homozygotie für das Tyr 113 Allel ($p=0,017$; Tab.IV) kann für eine karzinogene Wirkung des Alkohols am Pankreas sprechen. Bei der Altersverteilung bezogen auf die Genotypen fällt in unserer phänotypisch analysierten Studie von $N=385$ auf, dass die Homozygoten in der Gruppe der Ca signifikant jünger bei ED sind ($p<0,017$; Tab.IV). Dies lässt auf einen bereits zuvor diskutierten möglichen induktiven Effekt des mutierten Genotyps schließen. 2002 wurde von Lee et al. in einer Metaanalyse mit 2078 Fällen und 3081 Kontrollen eine protektive Eigenschaft der EPHX-Mutante bei Lungenkarzinomen entdeckt³⁸. Zuvor fanden Spurdle et al. 2001 ebenfalls einen protektiven Effekt für das invasive Ovarialkarzinom vom endometrialen Subtyp heraus³⁵.

Hierbei ist zu beachten, dass es sich um jeweils unterschiedliche Organe, sowie unterschiedliche potentiell karzinogene Substrate handelt, die es zu metabolisieren gilt. Ein Zusammenhang zwischen der Ausprägung der Erkrankung im Sinne von Organdestruktionen (Pankreaspseudozysten, Pankreasgangerweiterungen, Pankreasverkalkungen etc.) bei chronischer Pankreatitis und Genotyp haben wir nicht festgestellt. Auch wenn man die Rate der Operationen als Maß der Schwere der chronischen Pankreatitis annimmt, war diese nicht mit dem Genotyp assoziiert. Demnach finden wir zwar eine moderate Risikoerhöhung eine chronische alkoholische Pankreatitis zu entwickeln, jedoch können wir keinen Effekt des Genotyps auf den Krankheitsverlauf feststellen. In der Literatur gibt es Hinweise, dass Polymorphismen im EPHX1-Gen mit einer höheren Neigung zu Hepatitiden bzw. einem schlechteren Verlauf von Hepatitiden assoziiert sind^{37,57}. Auch für Lungenerkrankungen und die Entwicklung

von Arteriosklerose gibt es Hinweise zu einer Assoziation mit dem EPHX1-Genotyp¹⁴. In der von uns untersuchten Gruppe konnten wir jedoch diese These nicht bestätigen.

5.3 Konklusion

Der in unserer Studie beobachtete moderate Zusammenhang zwischen dem EPHX1-Y113H-Polymorphismus und dem Auftreten einer alkoholischen chronischen Pankreatitis unterstützt die Hypothese der Interaktion zwischen genetischer Suszeptibilität und exogenen (Risiko-) Faktoren in der Genese der chronischen Pankreatitis. In unserer Untersuchung haben wir nur ein Phase I-/Phase II-Gen untersucht, jedoch darf spekuliert werden, dass die Kombination mehrerer genetisch determinierter Enzymaktivitäten eine wesentliche Rolle in der Detoxifizierungsleistung des einzelnen Individuums spielt. Um diese Zusammenhänge statistisch sicher aufzuklären, bedarf es jedoch noch größerer Fallzahlen.

Literaturverzeichnis

1. Etemad B, Whitcomb DC. Chronic pancreatitis: diagnosis, classification, and new genetic developments. *Gastroenterology* 2001; 120:682-707.
2. Lankisch PG, Burchard-Reckert S, Petersen M, Lehnick D, Schirren CA, Kohler H, Stockmann F, Peiper HJ, Creutzfeldt W. Morbidity and mortality in 602 patients with acute pancreatitis seen between the years 1980-1994. *Z Gastroenterol* 1996; 34:371-7.
3. Gullo L, Migliori M, Olah A, Farkas G, Levy P, Arvanitakis C, Lankisch P, Beger H. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas* 2002; 24:223-7.
4. Haber PS, Keogh GW, Apte MV, Moran CS, Stewart NL, Crawford DH, Pirola RC, McCaughan GW, Ramm GA, Wilson JS. Activation of pancreatic stellate cells in human and experimental pancreatic fibrosis. *Am J Pathol* 1999; 155:1087-95.
5. Ammann RW, Heitz PU, Kloppel G. Course of alcoholic chronic pancreatitis: a prospective clinicomorphological long-term study. *Gastroenterology* 1996; 111:224-31.
6. Talamini G, Bassi C, Falconi M, Sartori N, Salvia R, Rigo L, Castagnini A, Di F, V, Frulloni L, Bovo P, Vaona B, Angelini G, Vantini I, Cavallini G, Pederzoli P. Alcohol and smoking as risk factors in chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Dig Dis Sci* 1999; 44:1303-11.
7. Durbec JP, Sarles H. Multicenter survey of the etiology of pancreatic diseases. Relationship between the relative risk of developing chronic pancreatitis and alcohol, protein and lipid consumption. *Digestion* 1978; 18:337-50.
8. Li HS, Deng XY, Thompson BS, Zhang JY, Wood PG, Eagon PK, Whitcomb DC. Chronic ethanol consumption induces gene expression of pancreatic monitor peptide, but not SPINK1/PSTI-56, in rats. *Pancreas* 2001; 23:117-24.
9. Eerens I, Vanbeckevoort D, Vansteenbergen W, Van Hoe L. Autoimmune pancreatitis associated with primary sclerosing cholangitis: MR imaging findings. *Eur Radiol* 2001; 11:1401-4.

10. Talamini G, Falconi M, Bassi C, Sartori N, Salvia R, Caldiron E, Frulloni L, Di F, V, Vaona B, Bovo P, Vantini I, Pederzoli P, Cavallini G. Incidence of cancer in the course of chronic pancreatitis. *Am J Gastroenterol* 1999; 94:1253-60.
11. Silverman DT, Dunn JA, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Brown LM, Greenberg RS, Hayes RB, Swanson GM, . Cigarette smoking and pancreas cancer: a case-control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:1510-6.
12. Malka D, Hammel P, Maire F, Rufat P, Madeira I, Pessione F, Levy P, Ruszniewski P. Risk of pancreatic adenocarcinoma in chronic pancreatitis. *Gut* 2002 Dec ;51 (6):849 -52 2002; 51:849-52.
13. Lancaster JM, Brownlee HA, Bell DA, Futreal PA, Marks JR, Berchuck A, Wiseman RW, Taylor JA. Microsomal epoxide hydrolase polymorphism as a risk factor for ovarian cancer. *Mol Carcinog* 1996; 17:160-2.
14. Smith CA, Harrison DJ. Association between polymorphism in gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to emphysema. *Lancet* 1997; 350:630-3.
15. Benhamou S, Reinikainen M, Bouchardy C, Dayer P, Hirvonen A. Association between lung cancer and microsomal epoxide hydrolase genotypes. *Cancer Res* 1998; 58:5291-3.
16. Harrison DJ, Hubbard AL, MacMillan J, Wyllie AH, Smith CA. Microsomal epoxide hydrolase gene polymorphism and susceptibility to colon cancer. *Br J Cancer* 1999; 79:168-71.
17. Jourenkova-Mironova N, Mitrunen K, Bouchardy C, Dayer P, Benhamou S, Hirvonen A. High-activity microsomal epoxide hydrolase genotypes and the risk of oral, pharynx, and larynx cancers. *Cancer Res* 2000 Feb 1;60 (3):534 -6 2000; 60:534-6.
18. Zusterzeel PL, Peters WH, Visser W, Hermsen KJ, Roelofs HM, Steegers EA. A polymorphism in the gene for microsomal epoxide hydrolase is associated with pre-eclampsia. *J Med Genet* 2001 Apr;38 (4):234 -7 2001; 38:234-7.
19. D J de Jong EMJvdLAvSHMJRWHPHJN. Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes in Crohn's disease: association with microsomal epoxide hydrolase. *gutjnl* 2002;

Gut 2003;52:547–551.

20. Seidegard J, Ekstrom G. The role of human glutathione transferases and epoxide hydrolases in the metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect* 1997; 105 Suppl 4:791-9.
21. Hartsfield JK, Jr., 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* 1998; 83:44-5.
22. Farin FM, Janssen P, Quigley S, Abbott D, Hassett C, Smith-Weller T, Franklin GM, Swanson PD, Longstreth WT, Jr., Omiecinski CJ, Checkoway H. Genetic polymorphisms of microsomal and soluble epoxide hydrolase and the risk of Parkinson's disease. *Pharmacogenetics* 2001 Nov ;11(8):703 -8 2001; 11:703-8.
23. Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1995; 30:445-600.
24. Bartsch H, Malaveille C, Lowenfels AB, Maisonneuve P, Hautefeuille A, Boyle P. Genetic polymorphism of N-acetyltransferases, glutathione S-transferase M1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase in relation to malignant and benign pancreatic disease risk. The International Pancreatic Disease Study Group. *Eur J Cancer Prev* 1998; 7:215-23.
25. Frenzer A, Butler WJ, Norton ID, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC, Ryan P, Roberts-Thomson IC. Polymorphism in alcohol-metabolizing enzymes, glutathione S- transferases and apolipoprotein E and susceptibility to alcohol-induced cirrhosis and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; 17:177-82.
26. Schneider A, Togel S, Barmada MM, Whitcomb DC. Genetic analysis of the glutathione s-transferase genes MGST1, GSTM3, GSTT1, and GSTM1 in patients with hereditary pancreatitis. *J Gastroenterol* 2004 Aug ;39 (8):783 -7 2004; 39:783-7.
27. Rahman SH, Ibrahim K, Larvin M, Kingsnorth A, McMahon MJ. Association of antioxidant enzyme gene polymorphisms and glutathione status with severe acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2004 May ;126 (5):1312 -22 2004;

126:1312-22.

28. Kimura S, Okabayashi Y, Inushima K, Kochi T, Yutsudo Y, Kasuga M. Alcohol and aldehyde dehydrogenase polymorphisms in Japanese patients with alcohol-induced chronic pancreatitis. *Dig Dis Sci* 2000 Oct ;45 (10):2013 -7 2000; 45:2013-7.
29. Maruyama K, Takahashi H, Matsushita S, Nakano M, Harada H, Otsuki M, Ogawa M, Suda K, Baba T, Honma T, Moroboshi T, Matsuno M. Genotypes of alcohol-metabolizing enzymes in relation to alcoholic chronic pancreatitis in Japan. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23:85S-91S.
30. Frenzer A, Butler WJ, Norton ID, Wilson JS, Apte MV, Pirola RC, Ryan P, Roberts-Thomson IC. Polymorphism in alcohol-metabolizing enzymes, glutathione S-transferases and apolipoprotein E and susceptibility to alcohol-induced cirrhosis and chronic pancreatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2002 Feb ;17(2):177 -82 2002; 17:177-82.
31. Rahman SH, Nanny C, Ibrahim K, O'Reilly D, Larvin M, Kingsnorth AJ, McMahon MJ. Genetic polymorphisms of GSTT1, GSTM1, GSTP1, MnSOD, and catalase in nonhereditary chronic pancreatitis: evidence of xenobiotic stress and impaired antioxidant capacity. *Dig Dis Sci* 2005 Jul ;50 (7):1376 -83 2005; 50:1376-83.
32. Verlaan M, Te Morsche RH, Roelofs HM, Laheij RJ, Jansen JB, Peters WH, Drenth JP. Glutathione S-transferase Mu null genotype affords protection against alcohol induced chronic pancreatitis. *Am J Med Genet A* 2003 Jul 1;120 (1):34 -9 2003; 120:34-9.
33. Liu G, Ghadirian P, Vesprini D, Hamel N, Paradis AJ, Lal G, Gallinger S, Narod SA, Foulkes WD. Polymorphisms in GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 and risk of pancreatic adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2000 May ;82 (10):1646 -9 2000; 82:1646-9.
34. Duell EJ, Holly EA, Bracci PM, Liu M, Wiencke JK, Kelsey KT. A population-based, case-control study of polymorphisms in carcinogen-metabolizing genes, smoking, and pancreatic adenocarcinoma risk. *J Natl Cancer Inst* 2002 Feb 20 ;94 (4):297 -306 2002; 94:297-306.
35. Spurdle AB, Purdie DM, Webb PM, Chen X, Green A, Chenevix-Trench G. The microsomal epoxide hydrolase Tyr113His polymorphism: association with risk of

- ovarian cancer. *Mol Carcinog* 2001 Jan ;30 (1):71 -8 2001; 30:71-8.
36. Hassett C, Robinson KB, Beck NB, Omiecinski CJ. The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1): complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics* 1994; 23:433-42.
 37. Wong NA, Rae F, Bathgate A, Smith CA, Harrison DJ. Polymorphisms of the gene for microsomal epoxide hydrolase and susceptibility to alcoholic liver disease and hepatocellular carcinoma in a Caucasian population. *Toxicol Lett* 2000 Apr 10;115 (1):17-22 2000; 115:17-22.
 38. Lee WJ, Brennan P, Boffetta P, London SJ, Benhamou S, Rannug A, To-Figueras J, Ingelman-Sundberg M, Shields P, Gaspari L, Taioli E. Microsomal epoxide hydrolase polymorphisms and lung cancer risk: a quantitative review. *Biomarkers* 2002 May -Jun ;7 (3):230 -41 2002; 7:230-41.
 39. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Cavallini G, Ammann RW, Lankisch PG, Andersen JR, DiMagno EP, Andren-Sandberg A, Domellof L, Di F, V, . Prognosis of chronic pancreatitis: an international multicenter study. International Pancreatitis Study Group. *Am J Gastroenterol* 1994; 89:1467-71.
 40. Lowenfels AB, Maisonneuve P, Whitcomb DC, Lerch MM, DiMagno EP. Cigarette smoking as a risk factor for pancreatic cancer in patients with hereditary pancreatitis. *JAMA* 2001; 286:169-70.
 41. Hartwig W, Werner J, Ryschich E, Mayer H, Schmidt J, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Cigarette smoke enhances ethanol-induced pancreatic injury. *Pancreas* 2000; 21:272-8.
 42. DiMagno, E. P., Reber, H. A., and Tempero, M. A. AGA Technical Review on the Epidemiology, Diagnosis and Treatment of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Gastroenterology* 117[6], 1464-1484. 1999. Ref Type: Journal (Full)
 43. Silverman DT, Brown LM, Hoover RN, Schiffman M, Lillemoe KD, Schoenberg JB, Swanson GM, Hayes RB, Greenberg RS, Benichou J, . Alcohol and pancreatic cancer in blacks and whites in the United States. *Cancer Res* 1995; 55:4899-905.
 44. Silverman DT, Swanson CA, Gridley G, Wacholder S, Greenberg RS, Brown LM, Hayes RB, Swanson GM, Schoenberg JB, Pottern LM, Schwartz AG, Fraumeni JF, Jr., Hoover RN. Dietary and nutritional factors and pancreatic cancer: a case-

- control study based on direct interviews. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1710-9.
45. Falk RT, Pickle LW, Fontham ET, Correa P, Morse A, Chen V, Fraumeni JJ, Jr. Occupation and pancreatic cancer risk in Louisiana. *Am J Ind Med* 1990; 18:565-76.
 46. Cajas-Salazar N, Au WW, Zwischenberger JB, Sierra-Torres CH, Salama SA, Alpard SK, Tyring SK. Effect of epoxide hydrolase polymorphisms on chromosome aberrations and risk for lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 2003 Sep ;145 (2):97 -102 2003; 145:97-102.
 47. Lin YC, Wu DC, Lee JM, Hsu HK, Kao EL, Yang CH, Wu MT. The association between microsomal epoxide hydrolase genotypes and esophageal squamous-cell-carcinoma in Taiwan: interaction between areca chewing and smoking. *Cancer Lett* 2006 Jun 18 ;237 (2):281 -8 Epub 2005 Jul 18 2006; 237:281-8.
 48. McGlynn KA, Hunter K, LeVoyer T, Roush J, Wise P, Michielli RA, Shen FM, Evans AA, London WT, Buetow KH. Susceptibility to aflatoxin B1-related primary hepatocellular carcinoma in mice and humans. *Cancer Res* 2003 Aug 1;63 (15):4594 -601 2003; 63:4594-601.
 49. Sonzogni L, Silvestri L, De Silvestri A, Gritti C, Foti L, Zavaglia C, Bottelli R, Mondelli MU, Civardi E, Silini EM. Polymorphisms of microsomal epoxide hydrolase gene and severity of HCV-related liver disease. *Hepatology* 2002 Jul ;36 (1):195 -201 2002; 36:195-201.
 50. Ockenga J, Vogel A, Teich N, Keim V, Manns MP, Strassburg CP. UDP glucuronosyltransferase (UGT1A7) gene polymorphisms increase the risk of chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Gastroenterology* 2003 Jun ;124 (7):1802 -8 2003; 124:1802-8.
 51. Verlaan M, Drenth JP, Truninger K, Koudova M, Schulz HU, Bargetzi M, Kunzli B, Friess H, Cerny M, Kage A, Landt O, Te Morsche RH, Rosendahl J, Luck W, Nickel R, Halangk J, Becker M, Macek M, Jr., Jansen JB, Witt H. Polymorphisms of UDP-glucuronosyltransferase 1A7 are not involved in pancreatic diseases. *J Med Genet* 2005 Oct ;42 (10):e62 2005; 42:e62.
 52. Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y. Associations of alcohol drinking and nutrient intake with chronic pancreatitis: findings from a case-control study in Japan. *Am J Gastroenterol* 2001; 96:2622-7.

53. Bourliere M, Barthet M, Berthezene P, Durbec JP, Sarles H. Is tobacco a risk factor for chronic pancreatitis and alcoholic cirrhosis? *Gut* 1991; 32:1392-5.
54. Lin Y, Tamakoshi A, Hayakawa T, Ogawa M, Ohno Y. Cigarette smoking as a risk factor for chronic pancreatitis: a case-control study in Japan. Research Committee on Intractable Pancreatic Diseases. *Pancreas* 2000; 21:109-14.
55. Szuster-Ciesielska A, Daniluk J, Kandefler-Szerszen M. Oxidative stress in blood of patients with alcohol-related pancreatitis. *Pancreas* 2001; 22:261-6.
56. Silverman DT. Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews. *Teratog Carcinog Mutagen* 2001; 21:7-25.
57. McGlynn KA, Rosvold EA, Lustbader ED, Hu Y, Clapper ML, Zhou T, Wild CP, Xia XL, Baffoe-Bonnie A, Ofori-Adjei D. Susceptibility to hepatocellular carcinoma is associated with genetic variation in the enzymatic detoxification of aflatoxin B1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92:2384-7.

Anhang



UNIVERSITÄTSKLINIKUM · MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER HUMBOLDT-
UNIVERSITÄT ZU BERLIN

Fragebogen für eine medizinisch-wissenschaftliche Studie zur differenzierten
Genese einer chronisch entzündlichen oder bösartigen

Bauchspeicheldrüsenerkrankung

Betreuender Doktorvater: PD OA Dr. J. Ockenga

Doktorand: Sebastian Chr. Strunck

Geschlecht: m / w

ID:

Name:

Datum:

Vorname:

Klinik:

Geb.-Dat.:

Datum ED:

Wieviel Alkohol hat der Patient max/d zu sich genommen?

Wann war das?

Wieviel Alkohol hat der Patient min/d zu sich genommen?

Wann war das?

Seit wann ist der Patient C2 abstinent?

Ist der Patient Raucher?

Ja / Nein / k.A.

Wann war der Rauchbeginn?

Was raucht der Patient?

Zigarette / Zigarre / Pfeife

Wieviel raucht der Patient max/d?

Wann war das?

Wieviel raucht der Patient min/?

Wann war das?

Wieviel raucht der Patient aktuell?

Nimmt der Patient andere Drogen?	Ja / Nein / k.A.
Besteht oder bestand ein Medikamenten-Abusus?	Ja / Nein / k.A.
Wurde eine ERCP durchgeführt?	Ja / Nein / k.A.
ERCP-Klassifizierung nach Cambridge	I / II / III / IV
Wann war der erste akute Schub der chronischen Pankreatitis?	
Wieviele akute Schübe waren es insgesamt?	
Wieviele akute Schübe waren es in den letzten 12 Monaten?	
Bestehen Verkalkungen des Pankreas-Parenchyms?	Ja / Nein / k.A.
Seit wann bestehen die Verkalkungen?	
Bestehen oder bestanden Pseudozysten?	Ja / Nein / k.A.
Seit wann bestehen die Pseudozysten?	
Wie wurden diese therapiert?	Endoskopisch / OP
Bestehen Pankreasgängerweiterungen?	Ja / Nein / k.A.
Seit wann bestehen diese Erweiterungen?	
Wie wurden diese therapiert?	Endoskopisch / OP
Bestehen Gallengängerweiterungen?	
Seit wann bestehen diese Erweiterungen?	
Wie wurden diese therapiert?	Endoskopisch / OP
Besteht eine exokrine Pankreasinsuffizienz?	Ja / Nein / k.A.
Seit wann besteht diese?	
Wie wurde diese diagnostiziert?	Klinisch Sekretin-Pankreozymin-Test indirekter exokriner Pankreastest



Wird eine Pankreasenzymsubstitution durchgeführt?	Ja / Nein / k.A.
Seit wann?	
Täglich Dosis?	
U/d?	
Besteht ein Diabetes mellitus?	Ja / Nein / k.A.
Seit wann besteht der D.m.?	
Ist der D.m. insulinpflichtig?	Ja / Nein / k.A.
Seit wann?	
Wieviele Einheiten täglich?	
Bestehen chronische Schmerzen?	Ja / Nein / k.A.
Seit wann?	
Wie werden diese behandelt?	NSAR / niedrigpotente Opiate / höherpotente Opiate / andere
Schmerz-Memo:	
Bestehen Komplikationen der chronischen Pankreatitis?	Keine Komplikationen Gallengangsstenose Pseudozyste Milzvenenthrombose Sonstiges
War eine pankreasbedingte OP notwendig?	Ja / Nein / k.A.
Was wurde wann operiert?	Zyste Gangerweiterung Stenose wg. Schmerzen sonstiges



UNIVERSITÄTSKLINIKUM · MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER HUMBOLDT-
UNIVERSITÄT ZU BERLIN

Körpergröße des Patienten?

Maximales Körpergewicht:

Wann bestand das max. KG?

Minimales Körpergewicht?

Wann bestand das min. KG?

Wie hoch ist das aktuelle Körpergewicht?

Seit wann besteht das aktuelle KG?

Wie hoch war es vor 6 Monaten?

Wie hoch war es vor 3 Monaten?

Hat der Patient eine	PAVK?	Ja / Nein / k.A.
	KHK?	Ja / Nein / k.A.
	COPD?	Ja / Nein / k.A.

Besteht ein Malignom?	Ja / Nein / k.A.
	Plattenepithel-Ca
	Pankreas-Ca
	Bronchial-Ca
	Colon-Ca
	HCC
	Andere

Diagnosen Memo:



UNIVERSITÄTSKLINIKUM · MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER HUMBOLDT-
UNIVERSITÄT ZU BERLIN

Besteht ein Leberleiden? Ja / Nein / k.A.

Seit wann?

Haben oder hatten Verwandte eine Pankreaserkrankung? Ja / Nein / k.A.

Welcher möglichen Genese war die Erkrankung beim Vater? Unklar / C2 / Raucher

Mutter? Unklar / C2 / Raucher

Sohn? Unklar / C2 / Raucher

Tochter? Unklar / C2 / Raucher

Schwester? Unklar / C2 / Raucher

Bruder? Unklar / C2 / Raucher

Besteht der EPHX-Y113H Polymorphismus? WT / Homozygot / Heterozygot

Berlin, den

Unterschrift des Patienten:

Unterschrift des Untersuchers:

Einverständniserklärung



UNIVERSITÄTSKLINIKUM · MEDIZINISCHE FAKULTÄT DER HUMBOLDT-
UNIVERSITÄT ZU BERLIN

Zum molekularbiologischen Nachweis von Risikofaktoren Pankreas-Karzinom und chronische Pankreatitis

Hiermit erkläre ich mich einverstanden, dass von mir entnommenes Blut auf genetische Veränderungen untersucht wird, welche mit der Entstehung des Pankreas-Karzinoms und der Bauchspeicheldrüsenentzündung (*Pankreatitis*) verbunden sind.

Desweiteren erkläre ich, dass ich Gelegenheit zu einem ausführlichen *Beratungsgespräch* (Humangenetiker, Gastroenterologe) hatte, bei dem mir die Möglichkeiten und die Grenzen des Gentestes erläutert wurden. Insbesondere ist mir bekannt, dass es derzeit mehrere genetische Veränderungen gibt, die mit der bei mir vorliegenden Erkrankung verbunden sind.

Mir ist bekannt, dass dieser Gentest im Rahmen eines *Forschungsprojektes* durchgeführt wird. Aussagen zu möglichen Folgen oder weiteren Gesundheitsrisiken können insofern nur begrenzt gemacht werden. Darüber hinaus können Veränderungen gefunden werden, die möglicherweise keinerlei Bedeutung für die Erkrankung besitzen. Finden sich jedoch die bereits bekannten genetischen Veränderungen, so können diese sowohl für mich als auch für meine Familienangehörigen *wesentliche Bedeutung* besitzen. Ich willige ein, dass mein genetisches Material auch für die Untersuchung weiterer, bisher unbekannter *genetischer Risikofaktoren* verwendet werden kann.

Alle Angaben, die ich im Beratungsgespräch gemacht habe als auch sämtliche Ergebnisse der

Untersuchung unterliegen der *ärztlichen Schweigepflicht*. Sie werden nur mit meiner Zustimmung an meine Familieangehörigen bzw. deren behandelnde Ärzte, jedoch nicht an Dritte weitergegeben.

Ich versichere, dass ich im Beratungsgespräch umfassend über die Möglichkeiten und Grenzen des Testes informiert wurde und keine weiteren Fragen habe. Ich stimme insbesondere zu, dass ein Teil des Untersuchungsmaterials aufbewahrt wird, um die Ergebnisse überprüfen zu können und als wichtige Quelle für weitere *genetische Forschung* auf dem Gebiet der Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse zu dienen.

Diese Einwilligung kann ich *jederzeit* widerrufen.

Name _____ Vorname _____ geb. _____

Straße _____ PLZ, Wohnort _____

Ort, Datum _____ Unterschrift _____

Arzt (Stempel / Unterschrift) _____

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. J. Ockenga danke ich für seine überaus engagierte, fachlich überragende und persönliche Betreuung über den gesamten Zeitraum hinweg vom Projektentwurf bis zur Einreichung.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. med. H. Witt und seinem Forschungsteam für die hervorragende fachliche und technische Unterstützung.

Der rechtsmedizinischen Abteilung der Charité CCM danke ich für die unkomplizierte Möglichkeit zur Nutzung des GenoM48.

Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Sebastian Chr. Strunck, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema „Die Rolle der EPHX1-Y113H bei entzündlichen Pankreaserkrankungen und dem Pankreaskarzinom“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift