

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der
Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Genvarianten des Cytochrom P450 1A1 als
Suszeptibilitätsfaktoren für kolorektale Karzinome**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Michael Thomae
aus Bukarest

Dekanin: Prof. Dr. Annette Grüters-Kieslich

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. I. Roots

2. Prof. Dr. med. J. Brockmüller

3. Priv.-Doz. Dr. med. H.-D. Orzechowski

Datum der Promotion: 03.09.2010

Meiner Familie

Abstrakt

Die Entwicklung kolorektaler Karzinome wird in hohem Maße durch umweltbedingte Faktoren beeinflusst. Cytochrom P450 1A1 (CYP1A1) spielt eine Schlüsselrolle in der chemischen Kanzerogenese, da es u.a. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe zu kanzerogenen Metaboliten umsetzt. Diese Arbeit analysiert, wie häufig sieben Varianten des CYP1A1 (v1-v7) bei Kolonkarzinompatienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe vorkommen und ob sich für Träger bestimmter Varianten ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome ableiten lässt. Darüber hinaus wurde in einer stratifizierten Analyse untersucht, ob Tabakrauch unter dem Einfluss genetischer Varianten einen zusätzlichen Risikofaktor darstellt. Hierfür wurden die Patienten entsprechend der Dauer und Intensität des Zigarettenkonsums den Gruppen RI (1-39 Packungsjahre, n=48), RII (39 bis 59 Packungsjahre, n=26) und RIII (über 59 Packungsjahre, n=22) zugeteilt.

Das Fallkollektiv umfasst 285 russische Kolonkarzinompatienten, das Kontrollkollektiv 270 nicht am Kolonkarzinom erkrankte Individuen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben SNPs (v1, v2, v3, v4, v5, v6, v7) mittels PCR-RLFP identifiziert, die den Allelen (H0, *2A, *2B, *3, *4, *1D, *1E) zugeordnet werden.

In der allelbasierten Analyse war das Allel *1D in der Kolonkarzinomgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe *unterrepräsentiert* ($p=0,02$), das Allel *1E war in der Rauchergruppe RI *überrepräsentiert* ($p=0,05$). In der genotypenbasierten Analyse war der Genotyp H0/H0 (homozygoter Wildtyp) in der Kolonkarzinomgruppe *überrepräsentiert* (OR 1,42; 95% CI (1,1-1,8), $p=0,006$) und der Genotyp H0/*1D *unterrepräsentiert* (OR 0,72; 95% CI (0,58-0,89), $p=0,03$). Der homozygote Genotyp *1D/*1D zeigte eine noch stärker ausgeprägte protektive Tendenz (OR 0,54; 95% CI (0,32-0,93, $p=0,03$)). Insgesamt wurde für Träger des Allels *1D ein signifikant vermindertes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms festgestellt (OR 0,69; 95% CI 0,55-0,87, $p=0,001$).

In der Raucher-Subgruppenanalyse waren die Genotypen H0/*1E ($p=0,03$) und H0/*2A ($p=0,05$) in der Rauchergruppe RI *überrepräsentiert*.

Es konnte festgestellt werden, dass genetische Varianten von CYP 4501A1 Einfluss auf die Suszeptibilität für kolorektale Karzinome ausüben: Träger des Allels *1D haben ein geringeres Risiko, an kolorektalen Karzinomen zu erkranken. Träger der Genotypen H0/*1E und H0/*2A scheinen ein erhöhtes Risiko zu haben, wenn sie Raucher sind.

Abstract

The development of colorectal carcinoma is strongly influenced by environmental factors. Cytochrome P 450 1A1 (CYP1A1) plays a key role in chemical carcinogenesis by activating carcinogenic substances like polycyclic aromatic hydrocarbons. This study compares the frequencies of seven polymorphic variants of CYP 4501A1 (v1-v7) in colorectal cancer patients and in control patients and analyses, whether carriers of definite variants are at a higher cancer risk. Additionally, we analysed the role of CYP1A1 variants as risk factors in relation to tobacco use. To assess dose effects, we contrasted non-smokers with smokers with 1-39 pack-years of smoking (RI, n=48), smokers with 39-59 pack-years of smoking (RII, n=26), and smokers with more than 59 pack-years of smoking (RIII, n=22).

We examined a total of 285 colorectal carcinoma patients of Russian origin and 270 healthy individuals. Subjects were genotyped for seven single nucleotide polymorphisms (v1, v2, v3, v4, v5, v6, v7) using PCR-RLFP. These SNPs are allocated to the alleles *H0, *2A, *2B, *3, *4, *1D, *1E.

The CYP1A1*1D allele was *underrepresented* in the colorectal carcinoma group ($p=0.02$), *1E was *overrepresented* in the smoker group RI ($p=0.05$).

Genotype analysis revealed that H0/H0 (homozygote wildtype) was *overrepresented* in colorectal carcinoma patients (OR 1.42; 95% CI (1.1-1.8), $p=0.006$) whereas the genotype H0/*1D was *underrepresented* in this group (0.72; 95% CI (0.58-0.89), $p=0.03$). The protective effect of the homozygote genotype *1D/*1D was even stronger (OR 0.54; 95% CI (0.32-0.93, $p=0.03$)). A significant reduction of colorectal carcinoma risk was found for carriers of the *1D-allele (OR 0,69; 95% CI 0,55-0,87, $p=0,001$).

The smoker sub-group analysis identified the genotypes H0/*1E ($p=0.03$) and H0/*2A ($p=0.05$) as *overrepresented* in the smoker group RI.

These findings suggest that genetic variants of CYP1A1 modify the risk of colorectal cancer. Carriers of the allele *1D are at a reduced risk for colorectal carcinoma, whereas smokers carrying the genotypes H0/*2A and H0/*1E seem to be at a higher risk.

Inhaltsverzeichnis:

1	Einleitung.....	8
1.1	Das Cytochrom P450-System	13
1.1.1	Cytochrom P450 1A1.....	13
1.1.2	CYP 1A1 - genetische Varianten	14
1.2	Fragestellung der Arbeit	17
2	Material und Methoden.....	18
2.1	Patienten	18
2.2	Material	20
2.2.1	Geräte	20
2.2.2	Chemikalien und Substanzen	20
2.3	Methoden	23
2.3.1	DNA-Extraktion aus Vollblut.....	23
2.3.2	Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	23
2.3.3	Analyse genetischer Varianten mittels PCR-RFLP.....	24
2.4	Reaktionsdurchführung	25
2.4.1	Verwendete Primer	25
2.4.2	Restriktionsverdau mit <i>MspI</i> (v1/v3).....	25
2.4.3	Restriktionsverdau mit <i>BsrDI</i> und <i>BsaI</i> (v2/v4).....	26
2.4.4	Restriktionsverdau mit <i>HhaI</i> (v5).....	27
2.4.5	Restriktionsverdau mit <i>BsiI</i> und <i>NcoI</i> (v6/v7).....	28
2.5	Statistische Auswertung	30
3	Ergebnisse.....	31
3.1	Ergebnisse der CYP1A1-Genotypisierung	31
3.1.1	Häufigkeiten der CYP1A1-Varianten und -Allele bei Kolonkarzinompatienten und Kontrollen.....	31
3.1.2	Häufigkeiten der CYP1A1-Genotypen bei Kolonkarzinompatienten und Kontrollen.....	34
3.1.3	Subgruppenanalyse: Häufigkeiten von CYP1A1-Varianten, -Allelen und -Genotypen in der Kontrollgruppe im Vergleich zum entsprechend Raucherstatus stratifizierten Patientenkollektiv	36

3.2	Signifikanzverteilung in den untersuchten Gruppen	42
3.3	Ermittlung des OR für Träger der Genotypen H0/H0, H0/*1D und *1D/*1D	43
4	Diskussion.....	45
4.1	Frequenz der CYP1A1-Varianten und Allele in der Kontrollgruppe	45
4.2	Studiendesign.....	47
4.3	Individuelle Suszeptibilität für kolorektale Karzinome	49
4.3.1	Funktionelle Evaluation genetischer Varianten des CYP1A1	50
4.3.2	Rauchen, CYP1A1 und Kanzerogenese	52
4.3.3	Genetische Varianten des CYP1A1 und interindividuelle Variabilität von DNA-Addukten.....	54
4.3.4	Genetische Varianten des CYP1A1 und kolorektale Karzinome	56
4.4	Ausblick.....	59
5	Zusammenfassung.....	60
6	Literatur	62
7	Danksagung	71
8	Lebenslauf	72
9	Erklärung	73

Abkürzungsverzeichnis:

95% C.I. 95%	Konfidenzintervall
Ah-Rezeptor	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor
ALL	Akute lymphatische Leukämie
ARNT	Aryl Hydrocarbon Rezeptor Nuclear Translocator
BSA	Bovines Serumalbumin
B[a]P	Benzo[a]pyren
CYP1A1	Cytochrom P450 1A1 (Enzym)
<i>CYP1A1</i>	Cytochrom P450 1A1 (Gen)
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FME	Fremdstoffmetabolisierende Enzyme
GIT	Gastrointestinaltrakt
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Heterozyklische Amine
mRNA	messenger Ribonucleinsäure
NAT	N-Acetyltransferase
OR	Odds Ratio
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PhIP	q 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus
RNA	Ribonucleinsäure
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
Taq	Thermophilus aquaticus
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin
UGT	UDP-Glucuronosyltransferase
wt	Wildtyp
v	Variante

1 Einleitung

Das Kolonkarzinom zählt zu den häufigsten Krebserkrankungen weltweit (World Health Organisation 2006). In Deutschland ist es mit ca. 70.000 Neuerkrankungen jährlich die zweithäufigste Tumorerkrankung bei beiden Geschlechtern (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland 2006; World Health Organisation 2006). Der Altersgipfel liegt bei Männern im Mittel bei 69 Jahren, bei Frauen bei 75 Jahren. Die Prognose ist abhängig vom Stadium der Erkrankung, die 5-Jahres-Überlebensraten betragen ca. 40-60%.

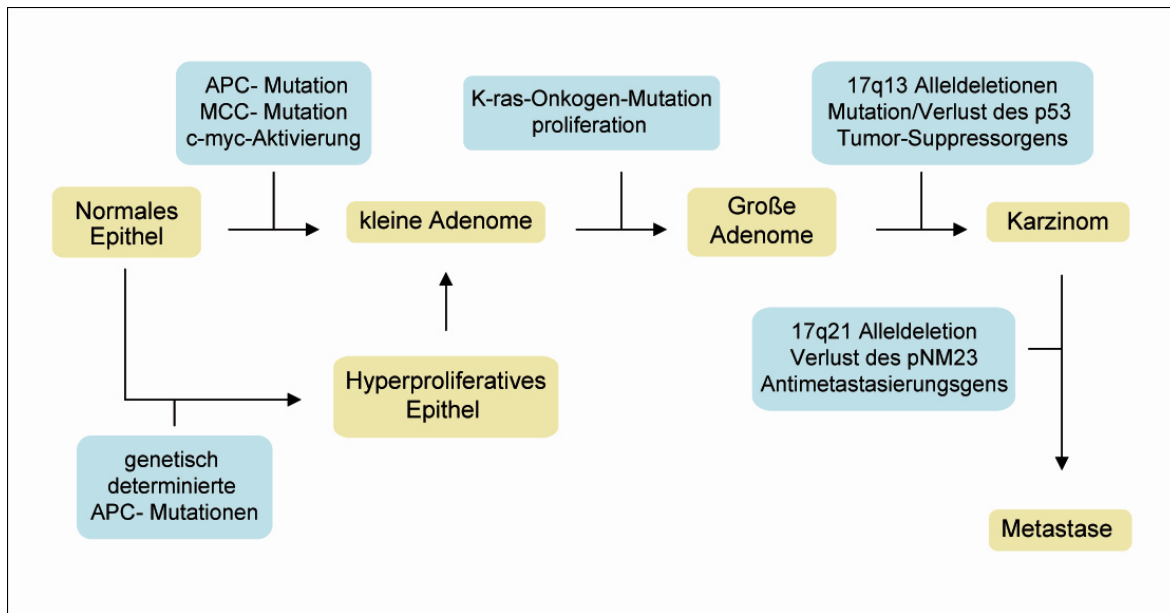
Ätiologisch werden hereditäre und nicht-hereditäre kolorektale Karzinome unterschieden. Das Hereditäre non-polypöse kolorektale Karzinom (HNPCC) und die Familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) machen ca. 10-15% aller kolorektalen Karzinome aus und sind genetisch bedingt (HNPCC) bzw. treten familiär gehäuft auf (FAP) (de la Chapelle 2004). Bei der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) bestehen genetische Alterationen am APC-Gen, die über eine Hyperproliferation normalen Gewebes zur Entstehung von Adenomen führen. Der HNPCC liegen Mutationen der Keimbahn zugrunde, die häufig mit einer Mikrosatelliteninstabilität einhergehen.

Bei dem überwiegenden Teil (ca. 85%) handelt es sich jedoch um sporadische kolorektale Karzinome (de la Chapelle 2004), die sich vor dem Hintergrund eines multifaktoriellen Zusammenspiels unterschiedlicher umweltbedingter und genetischer Faktoren aus einem zunächst gutartigen Adenom in mehreren, aufeinander folgenden Schritten entwickeln, wie in Abb.1 illustriert.

Charakteristisch für das kolorektale Karzinom ist die stufenweise Akkumulation genetischer Alterationen, die über eine chromosomale Instabilität zur Aktivierung von Onkogenen und zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen. Morphologisch vollzieht sich hierbei eine Entwicklung vom gesunden Gewebe über die Bildung gutartiger Adenome hin zu deren maligner Entartung (Beggs and Hodgson 2008).

Der Übergang einer gesunden Zelle in eine Krebszelle umfasst die Phase der Initiation, der Promotion und der Progression. In der Initiationsphase entsteht ein durch chemische Stoffe oder deren Metaboliten induzierter Schaden an der DNA. Dieser wird bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben, kann jedoch von zellulären Reparaturmechanismen noch kompensiert werden.

Abb. 1: Tumorprogressionsmodell (Adenom-Karzinom-Sequenz)



Quelle: Thiemes Innere Medizin, Abb. 3.79, S 604, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1999.

In der Promotionsphase wird vorwiegend das Zellwachstum stimuliert. Initiierte Zellen unterliegen einer verstärkten Proliferationsaktivität. Dieser Prozess ist zunächst noch reversibel und bedarf einer monatelangen Persistenz, um die initiierte Zelle zu einem präneoplastischen Herd umzuwandeln.

Durch Initiation und Promotion entstehen zunächst gutartige Tumoren. Deren Umwandlung in maligne Tumoren wird als Progression bezeichnet. Dieser Prozess erstreckt sich meistens über Jahre und ist mit weiteren genomischen Mutationen und einem zunehmenden Metastasierungspotential assoziiert.

Eine zentrale Rolle in der Initiation kolorektaler Karzinome nimmt das APC-Tumorsuppressorgens ein (Beggs and Hodgson 2008). Das durch das APC-Gen kodierte Protein interagiert mit regulativen Faktoren der Zellfunktion, wie dem β -Cathenin und der *Wnt*-Signaltransduktion. Mutationen im APC-Gen verursachen eine übermäßige β -Cathenin-Akkumulation an der Basis von Dickdarmkrypten, was zu einer permanenten Stimulation der *Wnt*-Signalkaskade führt. Dies hat eine pathologische Hyperproliferation von gesundem Kolonepithel zur Folge. Die häufigste Mutation am APC-Gen ist eine Punktmutation mit Ausbildung eines falschen Stop-Codons, das zur Kodierung eines inkompletten Proteins führt. APC-Mutationen werden in allen Stadien der Kanzerogenese des Kolons gefunden, was ein Beleg dafür ist, dass diese Mutationen sehr früh im Prozess der Entartung auftreten.

Das Onkogen K-ras spielt innerhalb der Adenom-Karzinom-Sequenz eine wichtige Rolle (Beggs and Hodgson 2008). Es kodiert das Protein ras p21, welches in die Signaltransduktion der zellulären Differenzierung involviert ist. Mutationen führen zu einem funktionellen Defekt des Proteins ras p21 an dessen GTP-Bindungsdomäne, was über ein gestörtes Feedback zur permanenten Stimulation von ras p21 führt und damit eine unkontrollierte zelluläre Proliferation zur Folge hat.

Mutationen des K-ras-Onkogens wurden beispielweise von Rashid et al. (1999) an einem Fallkollektiv von 60 Patienten, in ca. 35-42% der insgesamt über 200 untersuchten kolorektalen Adenome und Karzinome gefunden. Dabei scheint ein Bezug zur Größe der Adenome zu bestehen, denn in kleinen Adenomen wurden kaum K-ras-, aber über 80% APC-Mutationen nachgewiesen. Dies legt den Schluß nahe, dass K-ras-Mutationen alleine wahrscheinlich nicht in der Lage sind, Krebs auszulösen.

Die dritte Stufe der Entartung innerhalb der Adenom-Karzinom-Sequenz wird durch Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 eingeleitet. P53 blockiert die Zellproliferation bei Vorliegen von genomischen Schäden und kann sowohl DNA-Reparaturmechanismen initiieren als auch, bei unzureichender Wiederherstellung, die Apoptose der betroffenen Zellen einleiten. Eine durch Punktmutationen und Deletionen ausgelöste funktionelle Inaktivierung des p53-Gens wurde in der Arbeit von Darmon et al. (1994) mittels eines monoklonalen Antikörpers, der die Akkumulation schadhafter P53-Proteine detektierte, nachgewiesen. Dabei konnte diese Inaktivierung an 24% der kolorektalen Adenome, und an 65% aller kolorektalen Adenokarzinome beobachtet werden.

Darüber hinaus sind u.a. auch Mutationen des BRAF-Gens und der CpG-Insel-Methylierungsphänotyp (CIMP) für die Entstehung kolorektaler Karzinome von Bedeutung (Beggs and Hodgson 2008).

Viele humankanzerogene Substanzen sind chemisch den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH), halogenierten Kohlenwasserstoffen, Nitrosaminen, heterozyklischen Aminen oder Mykotoxinen zuzuordnen (Wogan et al. 2004). Heterozyklische Amine, eine Untergruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, gehören zu den wichtigsten Kanzerogenen, die mit der Nahrung dem Organismus zugeführt werden. Sie entstehen, wenn Fleischprodukte bei der Zubereitung längere Zeit über 180°C erhitzt werden. An der Oberfläche von gegrilltem Fleisch werden außerdem polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe freigesetzt.

Obwohl der Beweis einer Beziehung zwischen dem Konsum von Fleischprodukten und der Genese kolorektaler Karzinome noch aussteht, haben mehrere epidemiologische Studien eindeutig eine Assoziation zwischen dem Konsum von durchgebratenem Fleisch und kolorektalen Karzinomen festgestellt (Le Marchand et al. 1997).

Le Marchand et al. (1996) haben dies von einer populationsspezifischen Warte aus analysiert. Sie untersuchten dabei an ethnisch unterschiedlichen Kollektiven die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms unter Erfassung der Ernährungsgewohnheiten. Emigranten aus Ländern mit einer niedrigen Kolonkarzinominzidenz (z. B. aus dem panasiatischen Raum) entwickelten innerhalb einer Generation die Erkrankungswahrscheinlichkeit der Bevölkerung des neuen Heimatlandes. Dabei wurde auch eine Anpassung der Ernährungsgewohnheiten beobachtet.

Die mit der Nahrung zugeführten Kanzerogene sind jedoch nur ein Faktor in der komplexen Genese kolorektaler Karzinome. Bereits in älteren Studien zeigte sich, dass die chemische Kanzerogenese im engen Zusammenhang mit den Enzymen des Fremdstoffmetabolismus betrachtet werden muss und dass die Aktivität sowohl von Phase-I- als auch von Phase-II-Enzymen die interindividuelle Suszeptibilität gegenüber Karzinomen beeinflusst (Shields et al. 1993). Je nachdem, ob die Substanz bereits als Kanzerogen in den Körper gelangt und dort enzymatisch detoxifiziert wird oder ob sie erst im Körper durch Biotransformation ihre kanzerogene Potenz erlangt, erhält die genetisch variable Aktivität der an diesen Prozessen beteiligten Enzyme einen anderen Stellenwert (Wogan et al. 2004).

Das individuelle Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms ergibt sich aus dem Zusammenwirken von genetischen und umweltbedingten Faktoren. Bei einer Reihe von Phase-II-Enzymen (z. B. Glutathion-S-Transferase, N-Acetyl-Transferase) wurde bereits untersucht, inwieweit genetische Varianten mit verminderter Aktivität bei Individuen, die verstärkt Umweltgiften ausgesetzt waren, mit der Entwicklung kolorektaler Karzinome assoziiert sind (Kiyohara 2000). Beispiele für chemische Substanzen, die z.B. über die Nahrung aufgenommen werden sind die Nitrosamine, die Heterozyklischen Amine und die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH).

PAH sind Umweltgifte, die bei der Verbrennung organischen Materials anfallen. Sie können dem Organismus über eine berufsbedingte Exposition, wie z.B. im Kohlebergbau, oder auch über die Ingestion von zubereitetem Fleisch und über Tabakrauch zugeführt werden. PAH entfalten ihr kanzerogenes Potential erst nach metabolischer Umwandlung durch CYP1A1. Gleichzeitig sind PAH potente CYP1A1-

Induktoren, sie können die eigene Verstoffwechslung durch Erhöhung der CYP1A1-Expression um ein Mehrfaches steigern. Benzo[a]pyren, die Referenzsubstanz der PAH, wird über CYP1A1 zum reaktionsfreudigen, elektrophilen Metaboliten Benzo[a]pyren-Dihydrodiolepoxid umgesetzt (Androutsopoulos et al. 2009). Dieser bildet mittels kovalenter Bindungen DNA-Addukte, welche genomische Mutationen verursachen und konsekutiv zu Krebs führen.

In mehreren In-vitro-Studien wurde nachgewiesen, dass unter den untersuchten genetischen Varianten von CYP1A1 teilweise erhebliche Unterschiede bezüglich deren metabolischen Aktivität und Kapazität zur Umwandlung von Benzo[a]pyren in Benzo[a]pyren-Dihydrodiolepoxid bestehen (Schwarz et al. 2001).

Sinha et al. (2005) wiesen eine Assoziation zwischen der Aufnahme von Benzo[a]pyren über die Nahrung und der Entwicklung von kolorektalen Adenomen nach. Das Kolon zählt neben der Lunge zu den Geweben mit der höchsten CYP1A1-Expression (Thelen and Dressman 2009). In diesem Sinne erschiene es nachvollziehbar, dass die höhere metabolische Aktivität einer entsprechenden CYP1A1-Variante unter einer durchschnittlichen Exposition die individuelle Empfindlichkeit des Organismus für kolorektale Karzinome erhöhte, während eine genetische Variante, die zu einer geringeren CYP1A1-Aktivität führt, eine protektive Wirkung ausüben könnte.

1.1 Das Cytochrom P450-System

1.1.1 Cytochrom P450 1A1

Cytochrom P4501A1 (CYP1A1) ist ein mikrosomales Enzym des Fremdstoffmetabolismus. Es wird vorwiegend im extrahepatischen Gewebe, wie z.B. in der Lunge, der Brust und dem Gastrointestinaltrakt, exprimiert (McLemore et al. 1990; Shimada et al. 1992; Sanyal et al. 1994). Das zweite zur Familie 1A gehörende Enzym, CYP1A2, findet sich dagegen nur in der Leber (Nelson et al. 1996). Sowohl CYP1A1 als auch CYP1A2 unterliegen der Kontrolle des Ah-Locus (Swanson and Bradfield 1993). Die Induktion dieser Enzyme durch bestimmte Substanzgruppen, wie z.B. polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, erfolgt über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-R) (Micka et al. 1997). Weitere Induktoren der CYP-1-Transkription sind Substanzen aus der Gruppe der Tetrachlordibenzodioxine (TCDD) und der heterozyklischen Amine (Rendic 2002).

CYP1A1 gilt aufgrund seiner besonderen Rolle in der Metabolisierung von Benzo[a]pyren, der Referenzsubstanz der PAH, als ein Schlüsselenzym der chemischen Kanzerogenese (Bartsch et al. 2000). Es katalysiert die Umsetzung von B[a]P zu Diolepiden, Chinonen und Phenolen (Pelkonen and Nebert 1982). Diese haben eine unterschiedliche Wertigkeit für den Organismus. Die Phenole werden als Metaboliten der Detoxifikation betrachtet, sie können von Phase-II-Enzymen konjugiert und anschließend eliminiert werden. Die Chinone sind in der Lage, DNA-Addukte zu bilden, diesen wird jedoch kein Krankheitswert zugeschrieben (Shimada 2006). Für die Kanzerogenese von Bedeutung ist jedoch die Bildung von Diolepiden.

B[a]P wird in der ersten Stufe seiner Umsetzung von CYP1A1 zu B[a]P-7,8-Epoxid oxydiert. In der zweiten Stufe wird das gebildete B[a]P-7,8-Epoxid über Epoxid-Hydroxylase (EH) zu B[a]P(-)-*trans*-7,8-diol hydrolysiert, welches über eine CYP1A1-katalysierte stereoselektive Oxydation an Position 9 und 10 zu den optisch aktiven Tetrolen *r*-7,*t*-8-dihydroxy-*t*-9,10-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydro-Benzopyren (DE1) und *r*-7,*t*-8-dihydroxy-*c*-9,10-Epoxy-7,8,9,10-Tetrahydro-Benzopyren (DE2) umgesetzt wird (Conney et al. 1994; Shou et al. 1996). DE1 und DE2 bilden spezifische DNA-Addukte, welche über Schäden an „mutational hotspots“ in regulativen Genen, wie z.B. dem P53-Gen, zu unkontrolliertem Zellwachstum führen können (Phillips et al. 1988; Bartsch and Hietanen 1996). Eine lineare Korrelation zwischen der Menge gebildeter Addukte, der Exposition mit PAH und der Expression von CYP1A1 ist mehrfach beschrieben worden

(Bartsch 1996).

1.1.2 CYP 1A1 - genetische Varianten

Das CYP4501A1-Gen liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 15 (15q22-24). Es besteht aus sieben Exons und sechs Introns und weist eine Länge von 6311 Basenpaaren auf (Jaiswal et al. 1985). Die bislang untersuchten genetischen Varianten des CYP1A1 weisen zum Teil deutliche Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung bei unterschiedlichen Populationen auf. (Crofts et al. 1993).

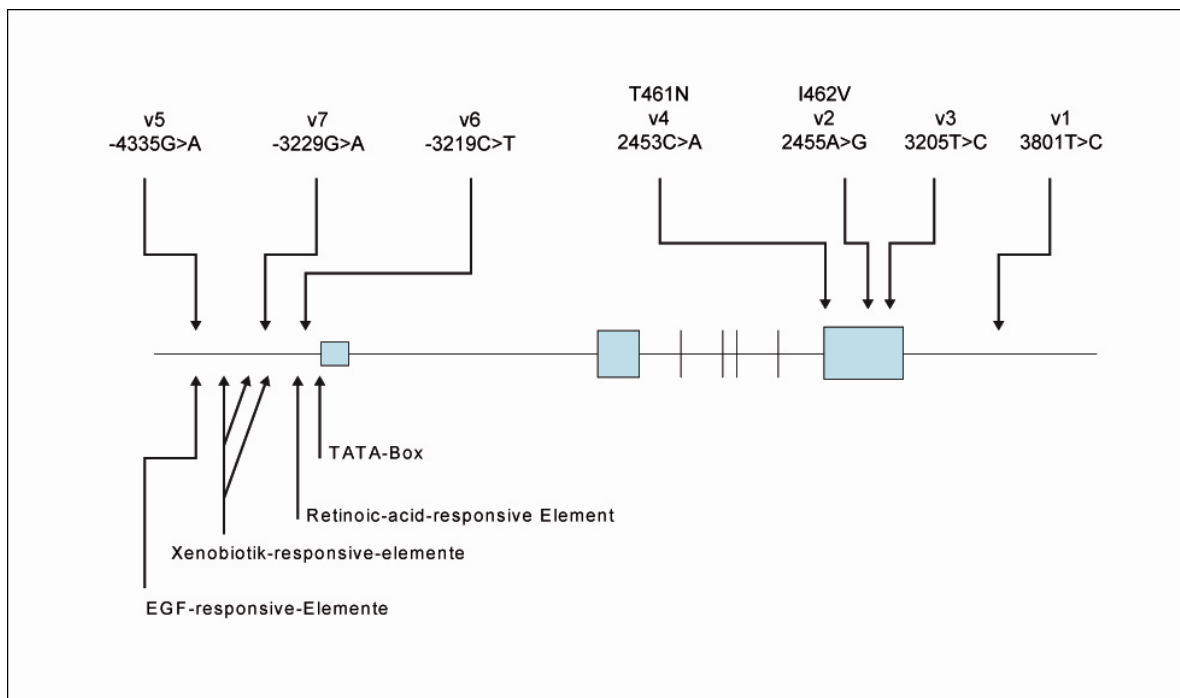
Bei der Variante v1 handelt es sich um einen Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus, welcher 1987 in der 3' flankierenden Region, downstream von Exon 7, entdeckt wurde (Spurr et al. 1987): in Position 3801 findet sich bei der Variante Cytosin anstelle von Thymin, gleichzeitig ist diese Position Schnittstelle für das Restriktionsenzym *MspI*. (Kawajiri et al. 1990). Die Variante v1 wurde in Studien mit japanischen Patienten als Risikofaktor für Plattenepithelkarzinome der Lunge und der Mundhöhle unter Tabakexposition beschrieben (Kawajiri et al. 1993; Kihara et al. 1995; Tanimoto et al. 1999). Drakoulis et al. konnten bei Kaukasiern keinen Zusammenhang zwischen der Variante v1 und einem erhöhten Risiko für Lungenkarzinome feststellen. Dies wurde in einer weiteren Arbeit, welches ein Fallkollektiv von 638 kaukasischen Patienten umfasste, bestätigt (Timofeeva et al. 2009). Zhuo et al. (2009a) kommen in einer Metaanalyse zu dem Ergebnis, dass die Variante v1 bei Kaukasiern, nicht aber bei Asiaten das Risiko für Larynxkarzinome erhöht.

Eine zweite Variante, welche die Substitution von Adenin durch Guanin (A• G) zur Folge hat, findet sich in Position 2455 im Exon 7 des CYP1A1-Gens (Hayashi et al. 1991). Diese Variante bewirkt einen Austausch der Aminosäure Isoleucin gegen Valin in Position 462 der Häm-bindenden Region. In einer Studie mit japanischen und einer weiteren mit brasilianischen Patienten erwies sich die Variante v2 als Risikofaktor für Lungenkarzinome (Kawajiri et al. 1996; Sugimura et al. 1998). Zhou et al. (2009b) kommen in einer Metaanalyse zum Schluß, dass Träger der v2-Variante ein erhöhtes Risiko für Ösophaguskarzinome haben, wenn sie Asiaten sind. Grandó et al. (2009) fanden eine Assoziation mit Blasenkrebs. Surekha et al. (2009) stellten unter indischen Frauen eine Korrelation zwischen der Variante v2 und einem erhöhten Risiko für Brustkrebs fest. Weiterhin wurde in einer umfassenden Metaanalyse festgestellt, dass

die Variante v2 unter Rauchern mit einem erhöhten Risiko für Oral- und Pharynxkarzinome assoziiert ist (Varela-Lema et al. 2008).

Ein weiterer *MspI*-Polymorphismus (v3) wurde bisher nur bei Afroamerikaner nachgewiesen (Crofts et al. 1993). Die Variante v4 (2453 C• A), die eine Substitution der Aminosäuren Threonin durch Asparagin bewirkt, wurde 1996 von Cascorbi et al. beschrieben. Zwei Publikationen zu kolorektalen Karzinomen stellen die Möglichkeit zur Diskussion, dass die Variante v4 einen protektiven Effekt ausübt (Landi et al. 2005; Little et al. 2006).

Abb. 2: Positionen der untersuchten genetischen Varianten auf *CYP1A1*



Quelle: Gaikovitch, E., Genotyping of the polymorphic drug metabolizing enzymes cytochrome P450 2D6 and 1A1, and N-acetyltransferase in a Russian sample. Dissertation, 2003

Drei weitere Punktmutationen sind in der Promotorregion von *CYP1A1* beschrieben worden (siehe Abb. 2): v5 in Position -4335G• A, v6 in Position -3219C• T und v7 in Position -3229G• A (Cascorbi et al. 1996; Smart and Daly 2000; Gaikovitch et al. 2003). Die Variante v5 wurde bislang noch nicht in epidemiologischen Untersuchungen berücksichtigt und bislang erst in diesem Kollektiv von Gaikovitch et al. (2003) zuvor beschrieben. Die Varianten v6 und v7 wurden von Landi et al. (2004) in Zusammenhang mit kolorektalen Karzinomen untersucht. Die Analyse der

Häufigkeitsverteilung zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede für diese Varianten.

Auf dem Nachweis der Varianten v1-v7 beruht die Definition des *Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature Committee* von 8 Allelen (siehe Tab. 1). Die Allele *1D und *1E wurden erstmals von Gaikovitch et al. (2003) definiert. Die Allele *1C, *2C und *3 wurden in diesem Fallkollektiv nicht nachgewiesen.

Tab. 1: CYP1A1-Allele: Punktmutationen und Allelzuordnung des CYP1A1-Gens

v1 3801 T>C	v2 2455 A>G	v3 3205 T>C	v4 2453 C>A	v5 -4335 G>A	v6 -3219 C>T	v7 -3229 G>A	Allel
T	A	T	C	G	C	G	<i>H0</i>
T	A	T	C	G	T	G	<i>*1B</i>
T	A	T	C	G	C	A	<i>*1C</i>
T	A	T	C	A	C	G	<i>*1D</i>
T	A	T	C	A	C	A	<i>*1E</i>
C	A	T	C	G	C	G	<i>*2A</i>
C	G	T	C	G	C	G	<i>*2B</i>
T	G	T	C	G	C	G	<i>*2C</i>
T	A	C	C	G	C	G	<i>*3</i>
T	A	T	A	G	C	G	<i>*4</i>

1.2 Fragestellung der Arbeit

Die Exposition gegenüber krebserregenden Substanzen ist ein Risikofaktor für die Entstehung von Kolonkarzinomen. Cytochrom P4501A1 spielt eine Schlüsselrolle in der chemischen Kanzerogenese, da es unter anderem polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe zu kanzerogenen Metaboliten umsetzt. Im CYP1A1-Gen sind Varianten bekannt, welche Auswirkungen auf die CYP1A1-Enzymaktivität haben. Es ist zu vermuten, dass diese genetisch bedingte Variation der Enzymaktivität die individuelle Suszeptibilität für Kolonkarzinome moduliert. Ein gehäuftes Auftreten der Varianten v1 und v2 konnte z.B. in epidemiologischen Studien bei Lungenkarzinompatienten nachgewiesen werden (Le Marchand, Guo et al. 2003; Vineis, Veglia et al. 2003).

Diese Arbeit untersucht, ob sich ein Zusammenhang herstellen lässt zwischen den CYP1A1-Varianten v1-v7 und dem Auftreten kolorektaler Karzinome. Zu diesem Zweck wurden die Frequenzen der Varianten bei kaukasischen Patienten mit histologisch nachgewiesenen kolorektalen Karzinomen ermittelt und mit den Frequenzen verglichen, die in einem Kontrollkollektiv gesunder Personen erhoben wurden. Zusätzlich sollte die Frage geklärt werden, ob sich ggf. unter Schadstoffexposition Unterschiede darstellen. Als Modell für die Schadstoffexposition wurde Zigarettenrauchen gewählt.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die Proben wurden im europäischen Teil Russlands, Voronesh, in lokalen onkologischen Zentren und Krankenhäusern entnommen. Alle Studienteilnehmer wurden über den Zweck und den Inhalt der Studie aufgeklärt und es wurde eine schriftliche Einverständniserklärung zur weiteren Verwendung der Proben eingeholt. Zusätzlich wurden aktuelles und früheres Rauchverhalten, Ernährungsgewohnheiten und der aktuelle BMI der Studienteilnehmer dokumentiert. Die Genehmigung zur Durchführung der Studie von Seiten der Nationalen Ethikkommission Moskau liegt vor.

Das Fallkollektiv besteht aus 285 Patienten (137 Männer, 148 Frauen), bei denen zum Zeitpunkt der Aufnahme in das Studienkollektiv ein histologisch gesichertes Kolonkarzinom vorgelegen hat. Die Altersspanne liegt zwischen 29 und 85 Jahren, der Median beträgt 62 Jahre.

Von den Kolonkarzinompatienten waren 189 (66,3%) Nichtraucher. Die Rauchergruppe (Raucher gesamt) umfasste 96 Patienten (33,7%). Die Gruppe der Kolonkarzinompatienten wurde entsprechend der Expositionsdauer mit Zigarettenrauch wie folgt stratifiziert: RI mit einem Expositionszeitraum von 1-39 Packungsjahren (n=48), RII mit einem Expositionszeitraum von 39 bis 59 Packungsjahren (n=26) und RIII mit einer Expositionszeit von über 59 Packungsjahren (n=22).

Das Kontrollkollektiv besteht aus 270 Patienten (131 Männer und 139 Frauen). Sie wurden aus dem Eisenbahn-Krankenhaus in Voronesh rekrutiert und waren zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Studie nachweislich nicht an einem Kolonkarzinom erkrankt. Die Altersspanne liegt hier zwischen 30 und 85 Jahren, der Median beträgt 62 Jahre.

Tab. 2: Demographische Daten der untersuchten Kollektive

Kollektiv		n	Alter		Raucher	BMI
			(Jahre)	Median		
Fallgruppe n=285	Männer	137	29-85	62	N=96 (33,7%)	25,7
	Frauen	148	37-82	62		
Kontrollgruppe n=270	Männer	131	30-85	62	N=107 (39,6%)	27,2
	Frauen	139	37-83	62		

2.2 Material

2.2.1 Geräte

Der experimentelle Teil der Arbeit ist im Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie an der Charité - Universitätsmedizin, Berlin, durchgeführt worden.

Tab. 4: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Thermocycler Gene-Amp PCR 9600	Perkin Elmer / Applied Biosystems
Thermocycler Gene-Amp PCR 9700	Perkin Elmer/ Applied Biosystems
Videosystem Eagle Eye II	Stratagene, La Jolla, USA
Inkubationsofen OV 11	Biometra, Göttingen
Inkubationskammer OV3	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge GS-SR	Thermo Fisher Sc., Waltham, USA
Gelelektrophoresekammer GE D3	Protrans, Ketsch am Rhein
Elektrophorese Stromversorgung Phero-stab 500	Biotec Fischer, Reiskirchen
Magnetrührer Maxi HP 1P	Vario-Mag, Oberschleißheim
Spektrophotometer Modell Biophotometer	Eppendorf, Hamburg

2.2.2 Chemikalien und Substanzen

Folgende Chemikalien und Substanzen wurden zur DNA-Extraktion und molekulargenetischen Analyse verwendet.

Tab. 5: Zur Analyse verwendete Substanzen und Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
DNA-Polymerase <i>Ampli-Taq</i> TM 10x PCR Pufferlösung 25 mM MgCl ₂	Perkin Elmer, Waltham, USA
2-Desoxynucleotide: dGTP, dTTP dATP, dCTP	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme <i>Msp</i> I, Reg. #R0106 <i>Bsr</i> DI, Reg. #R0574 <i>Bsa</i> I, Reg. #R0535 <i>Hha</i> I, Reg. #R0139 <i>Nco</i> I, Reg. #R0193 <i>Bsa</i> II, Reg. #R0555	New England Biolabs, Ipswich, USA
DNA Oligonukleotiden (PCR Primer) M3F (v.), P80 (r.) M2F (v.), M2R (r.) Hha-F (v.), Hha-R (r.) 1A1-M5F (v.), 1A1-M5R (r.)	TIB Molbiol, Berlin
Basenmarker 100 bp, 1kb	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Marker V und Marker VI	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Agarose UltraPURE	Gibco BRL, Invitrogen, Karlsruhe
Agarose Nusieve	Biozym, Hessisch-Oldendorf

Material und Methoden

Tab. 6: Verwendete Pufferlösungen

Lösungen	Zusammensetzung
Lysepuffer	NH ₄ Cl (155 mM), KHCO ₃ (10 mM), EDTA (0,1 mM); pH 8,0
TEN-Puffer	Tris/HCl (20 mM), EDTA (2 mM), NaCl (30 mM); pH 7,5
20% SDS	2 mg Natriumdodecylsulfat in 100 mg H ₂ O
Phenol	Phenol/Chloroform/Wasser (Perkin Elmer)
Chloroform	Chloroform, Isoamyl-Alkohol (49:1)
Natriumazetat	40,8 g CH ₃ COONa (3 M) ad 100 ml H ₂ O; pH 5,5
TE-Puffer	Tris-HCl (10 mM), EDTA (1 mM) ad 100 ml H ₂ O; pH 8,0
TBE-Puffer	Tris (90 mm/l), Borsäure (90 mm/l), EDTA (2,5 mm/l), pH 8,0 - 8,3

Tab. 7: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
PCR Reaktionsgefäße	Thermo-Fast 96, ABgene, S-F, USA
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

2.3 Methoden

2.3.1 DNA-Extraktion aus Vollblut

Die DNA wurde aus Leukozyten nach der Phenol/Chloroform-Methode extrahiert. Dabei wurde das Zellsediment in 10 ml TEN-Puffer suspendiert, mit 100 µl (10 mg/ml) Proteinase-K-Lösung und 0,5 ml (200 mg/l) Na-Dodecylsulfatlösung versetzt und anschließend bei 37°C über Nacht inkubiert. Zur Ausfällung der Proteine wurden 5 ml Chloroform/Phenollösung zugesetzt und zentrifugiert. Zur Eliminierung der Lipidbestandteile wurde die obere, wässrige Phase abpipettiert, nochmals mit 1,5 ml Chloroform versetzt und zentrifugiert. Danach folgte die DNA-Präzipitation. 2 ml des Überstands wurden mit 6 ml 96%-igem Ethanol und 100 µl 3M Natriumacetat (pH 5,8) überpipettiert und zentrifugiert, woraufhin die ausgefällte DNA schließlich am Boden der Gefäße haftete. Der Überstand wurde dekantiert, anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 3 ml 70%-igem Ethanol gewaschen und wiederum zentrifugiert. Zum Trocknen und zur Ausdünstung des Alkohols wurden die Proben 30 min lang auf Zellstoffpapier gelegt. Anschließend wurde die DNA in 10 mmol/l Tris-Puffer und 1 mmol/l EDTA-Puffer (pH 8,0) resuspendiert und in Eppendorf-Reaktionsbehälter umgefüllt. Diese wurden dann bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die DNA-Konzentration wurde mittels eines Spektrophotometers bestimmt.

2.3.2 Durchführung der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Das Funktionsprinzip der PCR besteht in der exponentiellen Vervielfältigung eines zu untersuchenden Genabschnittes. Das PCR-Produkt kann dann zur Untersuchung von genomischen Varianten genutzt werden. Die PCR umfasst drei Schritte, welche konsekutiv hintereinander und in komplementären Abschnitten der eingesetzten DNA-Proben ablaufen.

Im ersten Schritt wird die DNA bei 95°C denaturiert. Im folgenden Schritt (Annealing), der bei Temperaturen zwischen 50°C und 72°C stattfindet, hybridisieren die Primer an komplementären Abschnitten der eingesetzten DNA-Proben. Während der dritten Phase (Extension), welche bei 72°C stattfindet, erfolgt die Polymerisation des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. In den nun folgenden Erhitzungszyklen werden die neu gebildeten Amplifikate, ebenso wie die eingesetzten DNA-Proben, erneut als Matrix in den Prozess eingeführt. Es erfolgt eine exponentielle Vervielfältigung des zu

amplifizierenden DNA-Abschnittes in den folgenden Reaktionszyklen. Nach 25 bis 35 Zyklen liegt genügend Material zur weiteren Analyse vor.

2.3.3 Analyse genetischer Varianten mittels PCR-RFLP

Zur Analyse der untersuchten genetischen Polymorphismen des *CYP1A1*-Gens kam die PCR-RFLP-(Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus)Technik zum Einsatz. Das PCR-Produkt wird mithilfe von Restriktionsendonukleasen verdaut. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die DNA an einem bestimmten Punkt schneiden können. Abhängig von der Erkennungssequenz der Basenpaare werden zur Untersuchung verschiedener Loci spezifische Restriktionsendonukleasen verwendet. Als Verdau zeigen sich dann Fragmente unterschiedlicher Länge, welche dem Genotyp des untersuchten Individuums entsprechen. Auf diese Weise werden Restriktions-Fragment-Polymorphismen detektiert und identifiziert.

Der Verdau wird mit Ladungspuffer, samt unverdaulichem PCR-Produkt als Negativkontrolle und einem PCR-Molekulargewichtsmarker (50-1000 bp), auf ein 2,5%-iges Agarosegel aufgetragen und zur Detektion in die Gel-Elektrophorese eingebracht. Dort verbleibt es unter 80 V Spannung zwischen 60 und 75 min. Anschließend werden die Proben mit 1 mg/l Ethidiumbromid eingefärbt, was dazu führt, dass unter UV-Licht die Banden sichtbar werden und nun mithilfe des Eagle-Eye dokumentiert werden können.

2.4 Reaktionsdurchführung

2.4.1 Verwendete Primer

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Primer und deren entsprechende Nucleotidensequenz.

Tab. 3: Verwendete Primer

Primer	Fragmentlänge (bp)	Sequenz
M3F	899	5`- GGCTGAGCAATCTGACCCTA
P80	-	5`- TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT
M2F	204	5`- CTGTCTCCCTCTGGTTACAGGAAGC
M2R	-	5`- TCCCACCCGTTGCAGCAGGATAGCC
Hha-F	157	5`- TGGGGCATATTA TCTTGTCTCCTT
Hha-R	-	5`- CGGCCTCGTGCATTGCAGAAATA
1A1-M5F	284	5`- GAACCTCAGTCAGCTAGTCGCCC
1A1-M5R	-	5`- AGAGAGGGTACGGGAAGCTC

2.4.2 Restriktionsverdau mit *MspI* (v1/v3)

Hierbei sollte der Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus (RFLP) der 3`-flankierenden Region des CYP1A1-Gens untersucht und Varianten v1 und v3 erfasst werden. Dabei wurde ein 899 bp Fragment mit Hilfe des M3F-Vorwärts- und des P80-Rückwärtsprimers amplifiziert. Der PCR-Ansatz enthielt 2,5 µg PCR-Pufferlösung, 2,5 µl 2 mmol/l dNTPs, 0,5 µl von je einem Primer und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase, 2,4 µl 25 mmol/l MgCl₂ und 100 ng genomische DNA.

Die Amplifikation wurde durch Denaturierung bei 95°C für 2 min eingeleitet, dann fortgeführt unter 35 Erhitzungszyklen bei 63°C für jeweils 30 sec, dann bei 72°C für 1 min und einem siebenminütigen Nachlauf bei 72°C belassen.

Der Verdau wurde mit dem Restriktionsenzym *MspI* angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

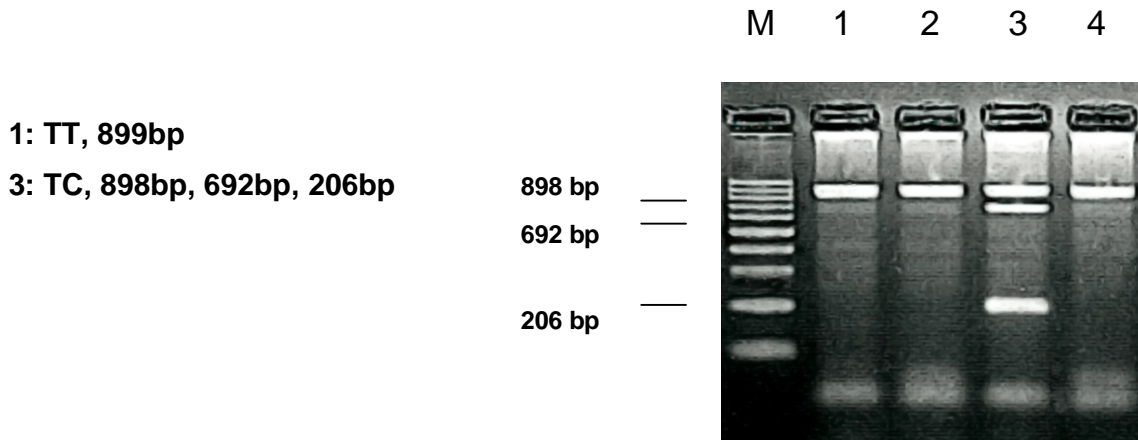


Abb. 3: 3% Agarose-Gelelektrophorese; *MspI*-Verdau eines 898 bp Fragmentes mit Variante v1. Die Fragmente wurden mit 1 mg/l Ethidiumbromid angefärbt

2.4.3 Restriktionsverdau mit *BsrD1* und *Bsal* (v2/v4)

Zur Erfassung der Varianten v2 und v4 wurde ein 204 bp Fragment mithilfe der Primer M2F und M2R amplifiziert. Der PCR-Ansatz umfasste 50 µl und enthielt:

5 µl PCR-Puffer, 5 µl 2 mol/l dNTPs, 4,8 µl 25 mmol/l MgCl₂, 1 µl eines jeden Primers, 1U *Taq*-Polymerase, 35,4 µl H₂O und 100 ng genomische DNA.

Die PCR-Reaktionsbedingungen waren dieselben wie bei der Untersuchung der Varianten v1/v3. Der Verdau wurde mit den Restriktionsenzymen *BsrD1* und *Bsal* (Restriktions-Fragment-Längen-Abschnitte siehe Tab. 2) angesetzt. *BsrD1* wurde dabei zur Detektion von v2 und *Bsal* zur Detektion von v4 verwendet.

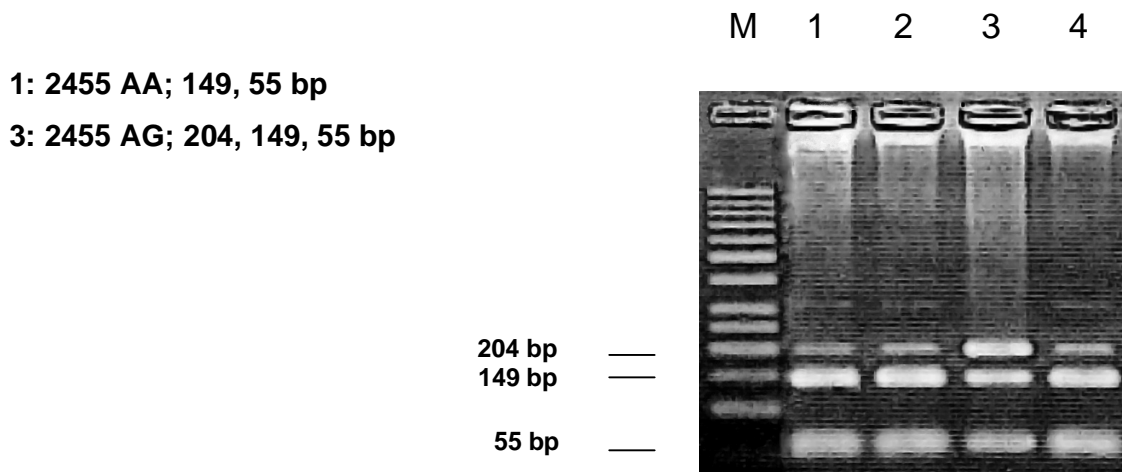


Abb. 4: *BsrD1*-Verdau eines 204 bp Fragmentes mit v2-Allel in Pos. 3

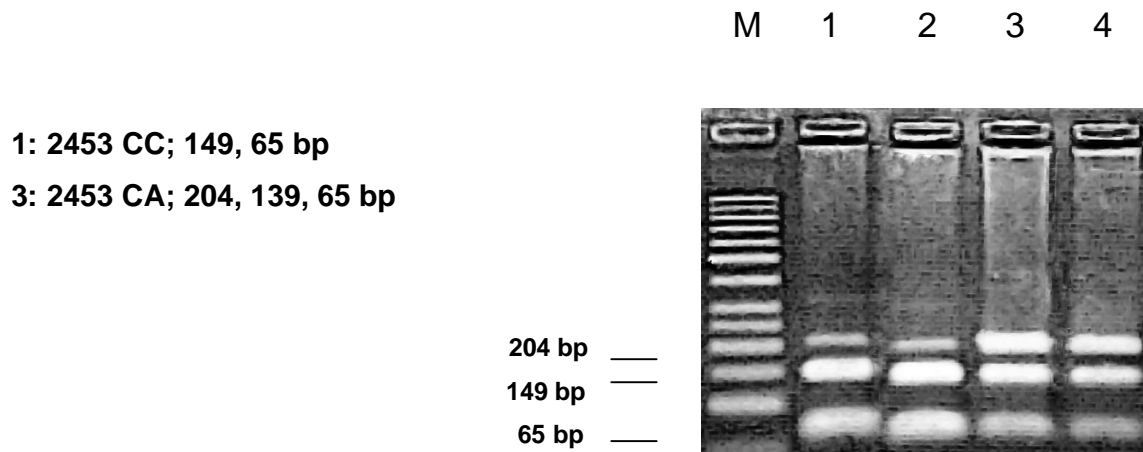


Abb. 5: *Bsal*-Verdau eines 204 bp Fragmentes mit v4 in Pos. 3.

2.4.4 Restriktionsverdau mit *HhaI* (v5)

Die Untersuchung der Variante v5 wurde unter Verwendung der Primer Hha-F und Hha-R durchgeführt. In der PCR resultierte daraus die Amplifikation eines 157 bp Fragmentes, welches dann mit dem Restriktionsenzym *HhaI* verdaut wurde.

Der PCR-Ansatz enthielt: 2,5 µl PCR-Puffer, 2,5 µl 2 mmol/l dNTPs, 1 µl eines jeden Primers, 0,5 U *Taq*-Polymerase, 2 µl 25 mmol/l MgCl₂, 15,9 µl H₂O und 50 ng genomischer DNA.

Die PCR-Bedingungen waren wie folgt:

- Initiale Denaturation 2,00 min bei 94°C,
- 35 Zyklen für 20 sec bei 94°C,
- dann für 10 sec bei 55°C,
- 40 sec bei 72°C
- 7 min bei 72°C im Nachlauf.
- Der Verdau mit *HhaI* wurde anschließend für 2 h bei 37°C inkubiert.

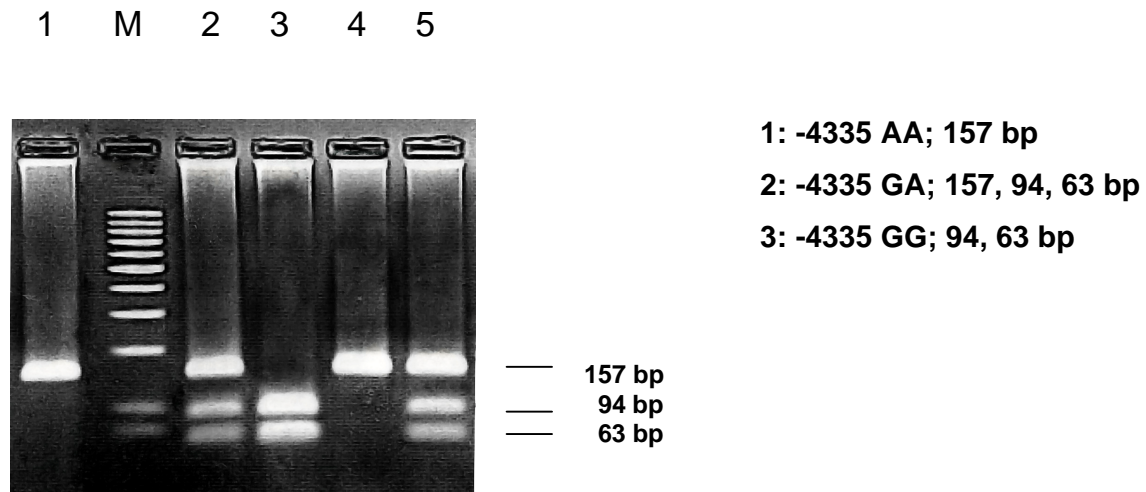


Abb. 6: *HhaI*-Verdau eines 157 bp Fragmentes mit heterozygoter Variante In Pos. 2 und 5; homozygote Variante von v5 in Pos.1 und 4. In Pos. 3 findet man den Wildtyp.

2.4.5 Restriktionsverdau mit *BsI* und *NcoI* (v6/v7)

Zur Untersuchung der Varianten v6 und v7 wurde ein 284 bp Fragment verwendet. Dieses Fragment wurde mit Hilfe der Primer 1A1 M5F und 1A1 M5R amplifiziert.

Der PCR-Ansatz enthielt 50 μ l und hatte folgende Zusammensetzung:

5 μ l PCR-Puffer, 5 μ l 2 mmol/l dNTPs, 1 μ l eines jeden Primers, 1 U *Taq*-Polymerase, 4 μ l 25 MgCl₂, 33,8 μ l H₂O und 100 ng genomische DNA.

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- Initiale Denaturation bei 94°C für 2 min
- 35 Zyklen bei 94°C für 30 sec
- 60°C für 1 min
- 72°C für 30 sec
- 7 min Nachlauf bei 72°C

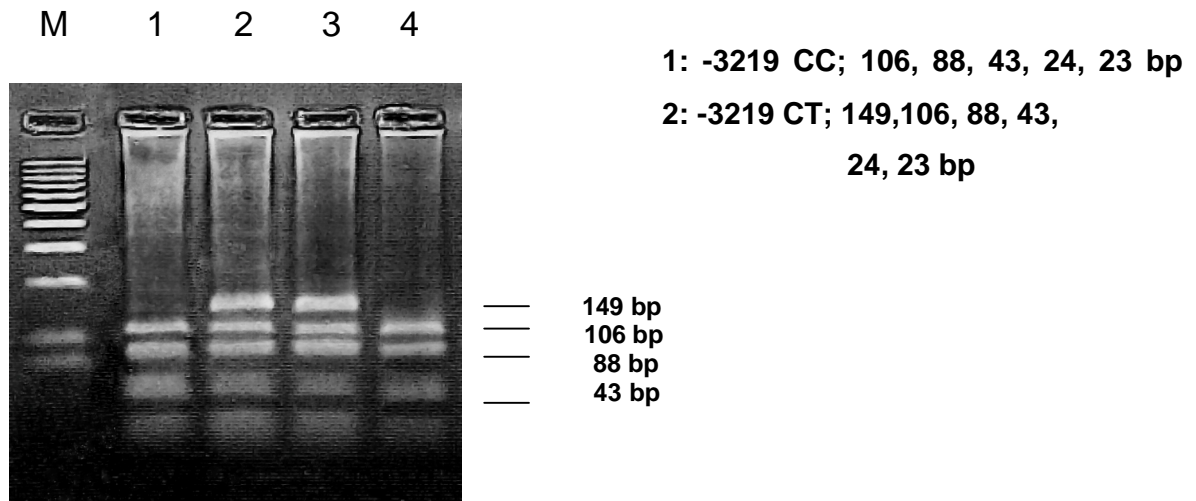


Abb. 7: *BspI*-Verdau eines 284 bp Fragmentes. In Pos. 1 und 4 findet sich der Wildtyp; in Pos. 2 und 3 sieht man die heterozygote Variante von v6.

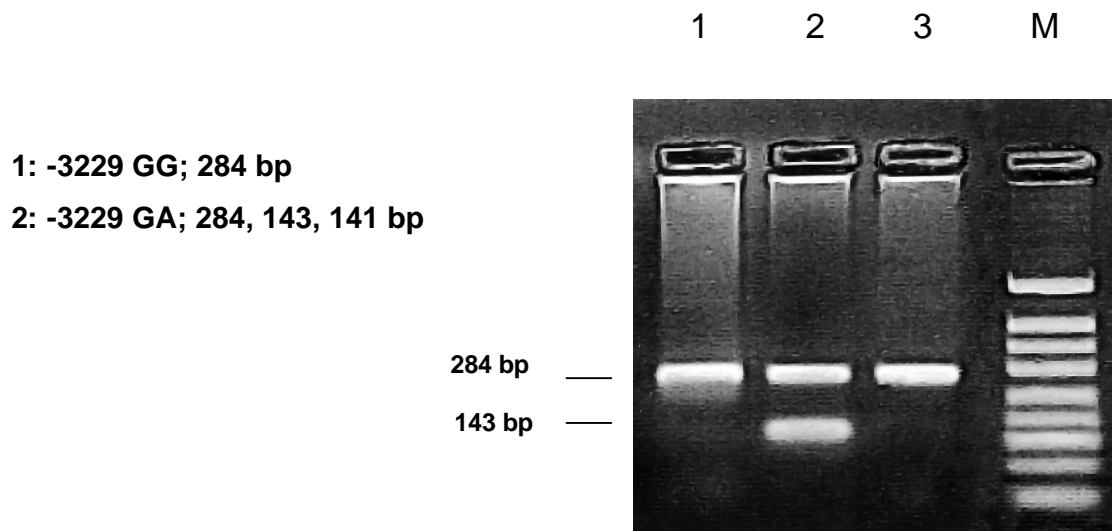


Abb. 8: *NcoI*-Verdau eines 284 bp Fragmentes. In Pos. 1 befindet sich der Wildtyp, in Pos. 2 die heterozygote Variante der Variante v7. Die Fragmente wurden mit 1 mg/l Ethidiumbromid angefärbt.

2.5 Statistische Auswertung

Alle Patientendaten wurden elektronisch als Excel-Datei gespeichert. Die Daten wurden transferiert und unter Verwendung von SPSS 10.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*; Inc., USA) für Windows ausgewertet. Die Häufigkeitsverteilung der untersuchten Varianten, Allele und Genotypen zwischen den untersuchten Gruppen wurden, unter Berücksichtigung des Konfidenzintervalls (95%), mit dem χ^2 -Test (exakt, 2-seitig) analysiert. Als Signifikanzniveau wurde ein α -Fehler von 5% gewählt.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnisse der CYP1A1-Genotypisierung

3.1.1 Häufigkeiten der CYP1A1-Varianten und -Allele bei Kolonkarzinompatienten und Kontrollen

Die häufigste Variante war in beiden Kollektiven v5 (-4335G>A). Ihre Frequenz betrug 27,9% bei Kolonkarzinompatienten und 33,5% bei Kontrollen. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist statistisch grenzwertig signifikant ($p=0,07$, 2-seitige Signifikanz).

Die Varianten v1, v2, v4, v6 und v7 traten mit Frequenzen zwischen 1,6% und 9,1% auf. Statistisch signifikante Unterschiede gab es zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe nicht. Die Variante v3 wurde in keinem der Kollektiven gefunden.

Das CYP1A1-Allel H0 war sowohl bei Kolonkarzinompatienten (56,8%) als auch bei Kontrollen (50,0%) am häufigsten, der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist statistisch nicht signifikant. Es folgte das Allel *1D mit einer Frequenz von 24,6% bei Kolonkarzinompatienten und 31,1% bei Kontrollen; hier erwies sich der Unterschied zwischen den Gruppen als signifikant ($p=0,02$, 2-seitige Signifikanz).

Die Allele *1B, *1E, *2A, *2B und *4 hatten in beiden Kollektiven Frequenzen zwischen 1,6% und 5,7%, ohne dass signifikante Unterschiede zwischen beiden Gruppen auftraten. Das Allel *3 wurde bei keinem Studienteilnehmer gefunden.

Tab. 7 zeigt die bei Kolonkarzinompatienten und Kontrollen ermittelten Frequenzen für Varianten und Allele.

Abb. 9 zeigt die Verteilung der CYP1A1-Allele H0 und *1D in der Gruppe der Kolonkarzinompatienten und in der Kontrollgruppe.

Ergebnisse

Allele	Varianten und Nucleotidposition							Kolonkarzinompat.		Kontrollen	
	v1 3801T>C	v2 2455A>G	v3 3205T>C	v4 2453C>A	v5 -4335G>A	v6 -3219C>T	v7 -3229G>A	n	% 95%C.I.	n	% 95%C.I.
H0	T	A	T	C	G	C	G	324	56,8 52,7-60,8	270	50,0 45,8-54,2
*1B	T	A	T	C	G	T	G	26	4,6 3,1-6,6	29	5,4 3,8-7,6
*1D	T	A	T	C	A	C	G	140	24,6 21,2-28,2	168	31,1 27,4-35,1
*1E	T	A	T	C	A	C	A	19	3,3 2,2-5,1	13	2,4 1,4-4,1
*2A	C	A	T	C	G	C	G	26	4,5 3,1-6,6	31	5,7 4,1-8,0
*2B	C	G	T	C	G	C	G	26	4,6 3,1-6,6	16	3,0 1,8-4,8
*3	T	A	C	C	G	C	G	0	0,0 0,0-0,6	0	0,0 0,0-0,7
*4	T	A	T	A	G	C	G	9	1,6 0,9-3,0	13	2,4 1,4-4,1
								570	100,0	540	100,0
Kolon- Ca. (n)	52	26	0	9	159	26	19				
% 95%C.I.	9,1 7,0-11,8	4,6 3,1-6,6	0,0	1,6 0,8-3,0	27,9 24,4-31,7	4,6 3,1-6,6	3,3 2,2-5,1				
Kontr. (n)	44	16	0	13	181	29	13				
% 95%C.I.	8,1 6,1-10,8	3,0 1,8-4,8	0,0	2,4 1,4-4,1	33,5 29,7-37,6	5,4 3,8-7,6	2,4 1,4-4,1				

Tab. 7: Häufigkeitsverteilung der Varianten und der zugeordneten Allele des CYP1A1 in den untersuchten Kollektiven

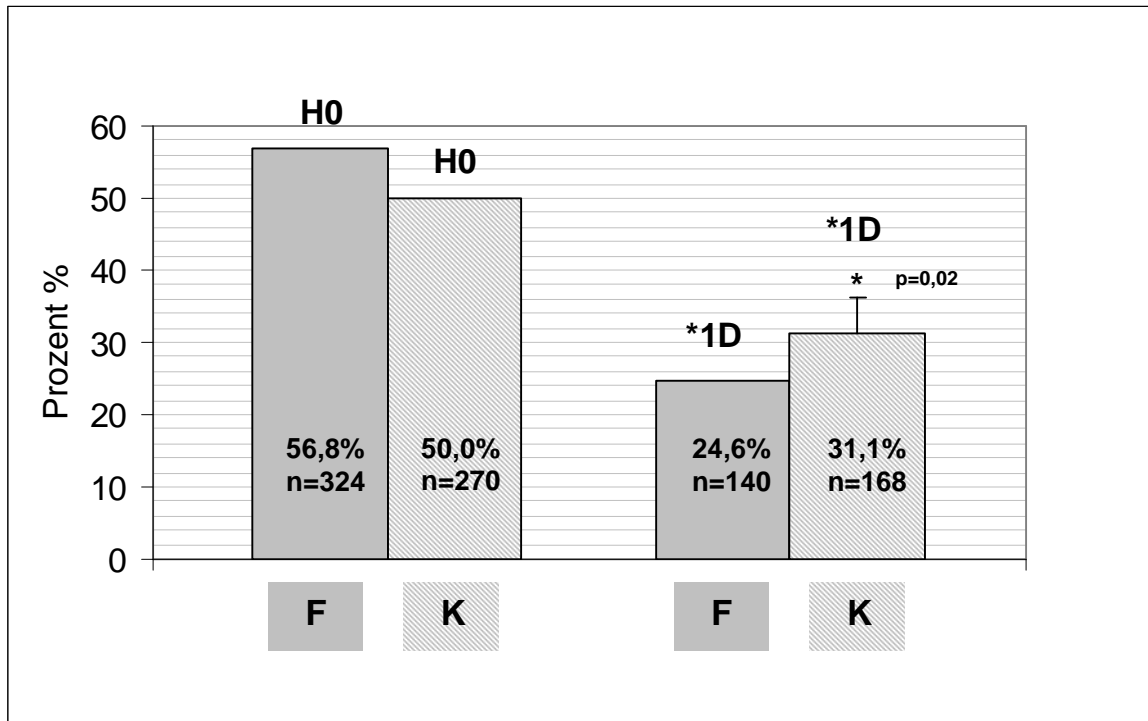


Abb.9: Häufigkeitsverteilung der Allele H0 und *1D in der Fallgruppe und in der Kontrollgruppe. Die Prozentangabe bezieht sich auf die Gesamtzahl der Allele in den untersuchten Gruppen (Fallgruppe n=570; Kontrollgruppe n=540). Auswertung mittels χ^2 - Test, genau, 2-seitige Signifikanz.

Legende: F=Fallgruppe; K=Kontrollgruppe

3.1.2 Häufigkeiten der CYP1A1-Genotypen bei Kolonkarzinompatienten und Kontrollen

Genotyp	Kolon-Karzinom n	% 95%C.I.	Kontrollen n	% 95%C.I.	<i>p</i> 2-seitige Signifikanz
H0/H0	95	33,3 28,1-39,0	61	22,6 18,0-28,0	<i>0,006</i>
H0/*1B	17	6,0 3,8-9,3	18	6,7 4,3-10,3	<i>n.s.</i>
H0/*1D	73	25,6 20,9-31,0	92	34,1 28,7-39,9	<i>0,03</i>
H0/*1E	11	3,9 2,2-6,8	7	2,6 1,3-5,2	<i>n.s.</i>
H0/*2A	11	3,9 2,2-6,8	13	4,8 2,9-8,1	<i>n.s.</i>
H0/*2B	19	6,7 4,3-10,2	11	4,1 2,3-7,1	<i>n.s.</i>
H0/*4	3	1,1 0,4-3,0	7	2,6 1,3-5,2	<i>n.s.</i>
*1B/*1B	1	0,35 0,1-1,9	1	0,4 0,1-2,0	<i>n.s.</i>
*1B/*1D	5	1,75 0,7-4,0	4	1,5 0,6-3,7	<i>n.s.</i>
*1B/*1E	1	0,35 0,1-1,9	0	0,0 0,0-1,3	<i>n.s.</i>
*1B/*2A	1	0,35 0,1-1,9	2	0,8 0,2-2,6	<i>n.s.</i>
*1B/*2B	0	0,0	2	0,8 0,2-2,6	<i>n.s.</i>
*1B/*4	0	0,0 0,0-1,3	1	0,4 0,1-2,0	<i>n.s.</i>
*1D/*1D	18	6,3 4,0-9,8	26	9,6 6,7-13,7	<i>n.s.</i>
*1D/*1E	4	1,4 0,5-3,5	4	1,5 0,6-3,7	<i>n.s.</i>
*1D/*2A	13	4,6 2,7-7,6	9	3,3 1,8-6,2	<i>n.s.</i>
*1D/*2B	5	1,75 0,7-4,0	2	0,8 0,2-2,6	<i>n.s.</i>
*1D/*4	4	1,4 0,5-3,5	5	1,85 0,9-4,3	<i>n.s.</i>
*1E/*2A	1	0,35 0,1-1,9	2	0,8 0,2-2,6	<i>n.s.</i>
*1E/*2B	1	0,35 0,1-1,9	0	0,0 0,0-1,3	<i>n.s.</i>
*1E/*4	1	0,35 0,1-1,9	0	0,0 0,0-1,3	<i>n.s.</i>
*2A/*2A	0	0,0 0,0-1,3	2	0,8 0,2-2,6	<i>n.s.</i>
*2A/*2B	0	0,0 0,0-1,3	1	0,4 0,1-2,0	<i>n.s.</i>
*2B/*4	1	0,35 0,1-1,9	0	0,0 0,0-1,3	<i>n.s.</i>
n	285	100,0	270	100,0	

Tab. 8: Häufigkeitsverteilung der CYP1A1-Genotypen in der Gruppe der Kolonkarzinompatienten und in der Kontrollgruppe. Die grau markierten Felder markieren eine statistische Signifikanz in der Analyse zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe.

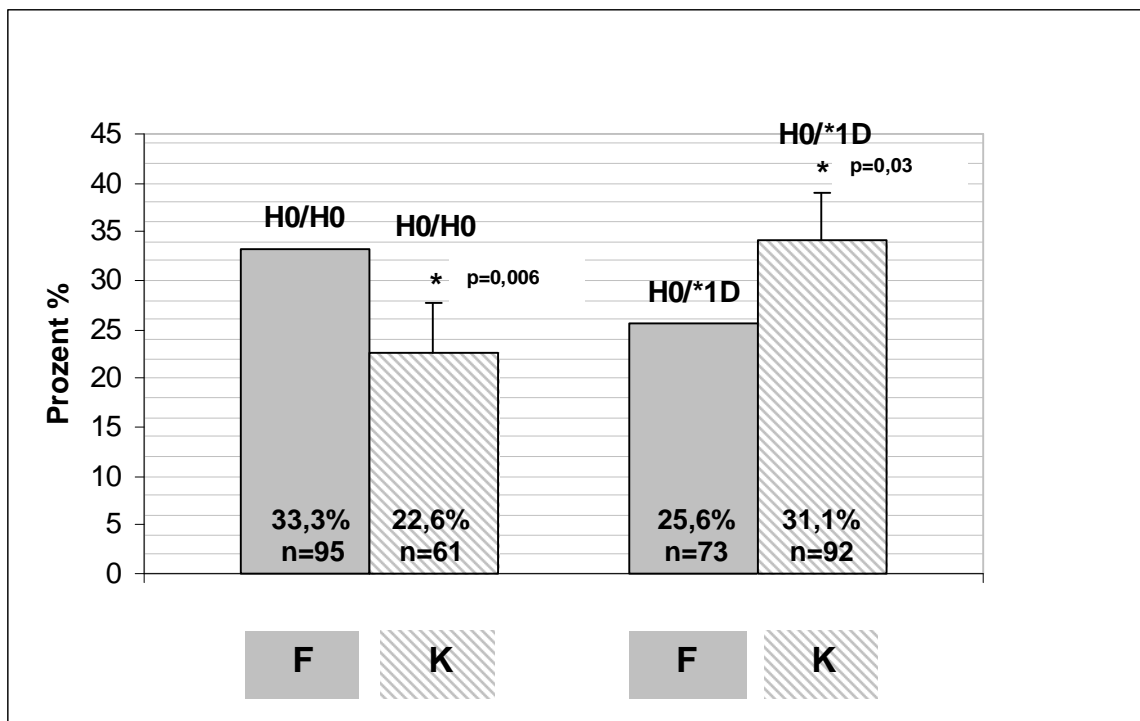


Abb.10: Häufigkeitsverteilung der Genotypen H0/H0 und H0/*1D in der Fall- und in der Kontrollgruppe. Die Prozentangaben beziehen sich auf die Gesamtzahl der Genotypen in den untersuchten Gruppen. Auswertung mittels χ^2 -Test, genau, 2-seitige Signifikanz.

Legende: F=Fallgruppe; K=Kontrollgruppe

Der häufigste Genotyp im Fallkollektiv war H0/H0. Dessen Frequenz betrug 33,3%. Im Kontrollkollektiv wurde eine Frequenz von 22,6% ermittelt. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen ist statistisch signifikant ($p=0,006$, 2-seitige Signifikanz). Es folgte der Genotyp H0/*1D mit einer Frequenz von 25,6% im Fallkollektiv und 31,1% im Kontrollkollektiv. Auch hier ist der Unterschied zwischen beiden Gruppen statistisch signifikant ($p=0,03$, 2-seitige Signifikanz).

Die Genotypen H0/*1B, H0/*1E, H0/*2A, H0/*2B, H0/*4, *1B/*1B, *1B/*1D, *1B/*1E, *1B/*2A, *1B/*2B, *1B/*4, *1D/*1D, *1D/*1E, *1D/*2A, *1D/*2B, *1D/*4, *1E/*2A, *1E/*2B, *1E/*4, *2A/*2A, *2A/*2B und *2B/*4 traten mit Frequenzen zwischen 0,0% und 9,6% auf. Statistisch signifikante Unterschiede gab es dabei zwischen der Fall- und der Kontrollgruppe nicht.

Tab. 8 zeigt die bei Kolonkarzinompatienten und Kontrollen ermittelten Frequenzen der CYP1A1-Genotypen.

Abb. 10 zeigt die Verteilung der CYP1A1-Genotypen H0/H0 und H0/*1D in der Gruppe der Kolonkarzinompatienten und der Kontrollgruppe.

3.1.3 Subgruppenanalyse: Häufigkeiten von CYP1A1-Varianten, -Allelen und -Genotypen in der Kontrollgruppe im Vergleich zum entsprechend Raucherstatus stratifizierten Patientenkollektiv

In der Subgruppenanalyse wurden die ermittelten Häufigkeiten der CYP1A1-Varianten und -Allele im nach Raucherstatus stratifizierten Patientenkollektiv mit denen der Kontrollgruppe verglichen. Die erste Ebene der Stratifizierung umfasste die Gruppe der Nichtraucher und die Gesamtgruppe der Raucher, die den Kontrollen gegenübergestellt wurden. In der nächsten Ebene wurden die ermittelten Häufigkeiten in der Raucherstratifizierung mit der Kontrollgruppe verglichen. In den Tabellen 9, 10 und 11 sind die ermittelten Häufigkeiten der CYP1A1-Varianten bzw. -Allele bzw. -Genotypen im stratifizierten Patientenkollektiv den Werten der Kontrollgruppe gegenübergestellt. Es wurden die im Folgenden aufgeführten statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den Patientengruppen beobachtet.

Varianten: Die häufigste Variante in allen Untergruppen war **v5** (-4335G>A). Ihre Frequenz betrug in der Nichtrauchergruppe 27,8%, in der Kontrollgruppe 33,5%. Der Unterschied ist statistisch grenzwertig signifikant ($p=0,07$, 2-seitige Signifikanz).

Die Variante **v2** (2455A>G) zeigte in der Nichtrauchergruppe eine Frequenz von 5,6%, in der Kontrollgruppe von 3,0% ($p=0,05$, 2-seitige Signifikanz).

In der Analyse der Raucherstratifizierung hatte die Variante **v7** (-3229G>A) eine Häufigkeit von 6,3% in der Rauchergruppe RI und von 2,4% in der Kontrollgruppe ($p=0,02$, 2-seitige Signifikanz).

Die Varianten v1, v4 und v6 traten mit Frequenzen zwischen 0,0% und 10,4% in den untersuchten Untergruppen auf, statistisch signifikante Unterschiede wurden zwischen Fall- und Kontrollgruppe nicht ermittelt.

Allele: Das CYP1A1-Allel ***1D** hatte in der Nichtrauchergruppe eine Frequenz von 24,9% und in der Kontrollgruppe eine Frequenz von 31,1%. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen ist statistisch signifikant ($p=0,02$, 2-seitige Signifikanz). In der Raucherstratifizierung des Patientenkollektivs wurde für ***1D** in der Rauchergruppe RI eine Frequenz von 21,9% ermittelt, in der Kontrollgruppe betrug die Frequenz 31,1%; der Unterschied zwischen den Gruppen ist grenzwertig signifikant ($p=0,06$, 2-seitige Signifikanz).

Ergebnisse

Das Allel ***1E** trat in der Rauchergruppe R_i mit einer Häufigkeit von 6,3%, in der Kontrollgruppe mit einer solchen von 2,4% auf (p=0,05, 2-seitige Signifikanz).

Die Allele H0, ***1B**, ***2A**, ***2B** und ***4** hatten in allen Untergruppen Frequenzen zwischen 0,0% und 57,9%, statistisch signifikante Unterschiede gab es zwischen den jeweiligen Untergruppen und der Kontrollgruppe nicht.

Variante	Kontrollen	Kolonkarzinompatienten				
		Nicht-raucher	Raucher-gesamt	Raucher-gruppe I	Raucher-Gruppe II	Raucher-Gruppe III
v1	8,1% 6,1-10,8 n=44	9,5% 7,0-12,9 n=36	8,3% 5,2-13,1 n=16	10,4% 5,8-18,1 n=10	3,8% 1,2-13,0 n=2	9,1% 3,7-21,2 n=4
v2	3,0% 1,8-4,8 n=16	5,6% 3,7-8,3 n=21	2,6% 1,1-5,9 n=5	3,1% 1,1-8,8 n=3	3,8% 1,2-13,0 n=2	0,0% 0,0-7,8 n=0
v4	2,4% 1,4-4,1 n=13	0,8% 0,3-2,3 n=3	3,1% 1,5-6,6 n=6	2,1% 0,6-7,3 n=2	3,8% 1,2-13,0 n=2	4,5% 1,4-14,1 n=2
v5	33,5% 29,7-37,6 n=181	27,8% 23,5-32,5 n=105	28,1% 22,2-34,1 n=54	27,1% 19,2-36,8 n=26	30,8% 19,9-44,3 n=16	22,7% 12,9-37,1 n=10
v6	5,4% 3,8-7,6 n=29	4,0% 2,4-6,4 n=15	5,2% 2,9-9,3 n=10	5,2% 2,3-11,6 n=5	5,8% 2,1-15,7 n=3	4,5% 1,4-14,1 n=2
v7	2,4% 1,4-4,1 n=13	2,9 % 1,5-4,9% n=11	4,2% 2,2-8,0 n=8	6,3% 3,0-13,0 n=6	1,9% 0,5-10,1 n=1	2,3% 0,5-11,8 n=1
n	270	189	96	48	26	22

Tab. 9: Häufigkeiten der CYP1A1-Varianten v1-v7 in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Subgruppe der Nichtraucher und der Stratifizierung der Rauchergruppen der Kolonkarzinompatienten. Die mit einem grauen Balken markierten Varianten wiesen statistisch relevante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. In Tab. 12, Seite 42 werden alle Varianten aufgeführt, die in der statistischen Testung eine Signifikanz im Vergleich zur Kontrollgruppe erreichten.

Allel	Kontrollen	Kolonkarzinompatienten				
		Nicht-raucher	Raucher-gesamt	Raucher-gruppe I	Raucher-Gruppe II	Raucher-Gruppe III
H0	50,0% 45,8-54,2 n=270	57,9% 52,9-62,8 n=219	54,7% 47,6-61,6 n=105	54,2% 44,2-63,8 n=52	55,8% 42,3-68,4 n=29	54,5% 40,0-68,3 n=24
*1B	5,4% 3,8-7,6 n=29	4,0% 2,4-6,4 n=15	5,7% 3,3-10,0 n=11	5,2% 2,3-11,6 n=5	5,8% 2,1-15,7 n=3	6,8% 2,5-18,3 n=3
*1D	31,1% 27,4-35,1 n=168	24,9% 20,8-29,5 n=94	24,0% 18,4-30,5 n=46	21,9% 14,8-31,2 n=21	28,8% 18,3-42,3 n=15	22,7% 12,9-37,1 n=10
*1E	2,4% 1,4-4,1 n=13	2,9% 1,5-4,9 n=11	4,2% 2,2-8,0 n=8	6,3% 3,0-13,0 n=6	1,9% 0,5-10,1 N=1	2,3% 0,5-11,8 n=1
*2A	5,7% 4,1-8,0 n=31	4,0% 2,5-6,4 n=15	5,7% 3,3-10,0 n=11	7,3% 3,6-14,3 n=7	0,0% 0,0-6,7 n=0	9,1% 3,7-21,2 n=4
*2B	3,0% 1,8-4,8 n=16	5,6% 3,7-8,3 n=21	2,6% 2,3-11,6 n=5	3,1% 1,1-8,8 n=3	3,8% 1,2-13,0 n=2	0,0% 0,1-7,9 n=0
*4	2,4% 1,4-4,1 n=13	0,8% 0,3-2,3 n=3	3,1% 1,5-6,6 n=6	2,1% 0,6-7,3 n=2	3,8% 1,2-13,0 n=2	4,5% 1,4-15,1 n=2
n	540	378	192	96	52	44

Tab. 10: Häufigkeitsverteilung der untersuchten CYP1A1-Allele in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Nichtrauchergruppe und in der Raucherstratifizierung der Kolonkarzinompatienten. Die mit einem grauen Balken markierten Varianten wiesen statistisch relevante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. In Tab. 12, Seite 42 werden alle Allele aufgeführt, die in der statistischen Auswertung signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe erreichten, aufgeführt.

Genotypen: Der Genotyp **H0/H0** war, entsprechend der Gesamtgruppe der Kolonkarzinompatienten, der häufigste Genotyp in den Untergruppen. Dieser trat in der Nichtrauchergruppe mit einer Frequenz von 36,0% und in der Rauchergruppe RI mit einer Frequenz von 29,2% auf. In der Kontrollgruppe zeigte dieser Genotyp eine Frequenz von 22,5%. Hier wurden statistisch signifikante Unterschiede zwischen Nichtrauchergruppe ($p=0,002$, 2-seitige Signifikanz) und Kontrollgruppe und zwischen Rauchergruppe RI ($p=0,01$, 2-seitige Signifikanz) und Kontrollgruppe ermittelt.

In der Häufigkeit folgt der Genotyp **H0/*1D** mit einer Frequenz von 23,8% in der Nichtrauchergruppe und 20,8% in der Rauchergruppe RI. In der Kontrollgruppe betrug die Frequenz 34,1%. Auch hier bestand ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Nichtraucher- und Kontrollgruppe ($p=0,02$, 2-seitige Signifikanz), während der Unterschied zwischen der Rauchergruppe RI und der Kontrollgruppe eine statistisch grenzwertige Signifikanz ($p=0,07$, 2-seitige Signifikanz) zeigte.

Der Genotyp **H0/*1E** trat in der Rauchergruppe RI mit einer Frequenz von 8,3%, in der Kontrollgruppe mit 2,4% auf ($p=0,05$, 2-seitige Signifikanz).

Auch beim Genotypen **H0/*2A**, für den Frequenzen von 6,3% in der Rauchergruppe RI bzw. von 5,7% in der Kontrollgruppe ermittelt wurden, zeigte sich zwischen diesen beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied ($p=0,05$, 2-seitige Signifikanz).

Die CYP1A1-Genotypen H0/*1B, H0/*2B, H0/*4, *1B/*1B, *1B/*1D, *1B/*1E, *1B/*2A, *1B/*2B, *1B/*4, *1D/*1D, *1D/*1E, *1D/*2A, *1D/*2B, *1D/*4, *1E/*2A, *1E/*2B, *1E/*4, *2A/*2A, *2A/*2B und *2B/*4 traten mit Frequenzen zwischen 0,0% und 7,9% auf. Statistisch signifikante Unterschiede gab es zwischen den jeweiligen Untergruppen und der Kontrollgruppe nicht.

Ergebnisse

Genotyp	Kontrollen	Nichtraucher	Raucher gesamt	Raucher- gruppe I	Raucher- Gruppe II	Raucher- Gruppe III
H0/H0	22,6% 18,0-28,0 n=61	36,0% 29,5-43,0 n=68	28,1% 20,1-37,9 n=27	29,2% 18,3-43,3 n=14	26,9% 13,8-46,2 n=7	27,3% 13,2-43,4 n=6
H0/*1B	6,7% 4,3-10,3 n=18	5,8% 3,3-10,1 n=11	6,3% 3,0-13,0 n=6	6,3% 2,3-16,9 n=3	7,7% 2,3-24,3 n=2	4,5% 1,0-21,9 n=1
H0/*1D	34,1% 28,7-39,9 n=92	23,8% 18,3-30,4 n=45	29,2% 21,0-39,0 n=28	20,8% 11,8-34,3 n=10	42,3% 25,5-61,2 n=11	31,8% 16,4-52,9 n=7
H0/*1E	2,6% 1,3-5,2 n=7	3,7% 1,8-7,4 n=7	4,2% 1,7-10,2 n=4	8,3% 3,4-19,6 n=4	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
H0/*2A	4,8% 2,9-8,1 n=13	2,6% 1,1-6,0 n=5	6,3% 3,0-13,0 n=6	6,3% 2,3-16,9 n=3	0,0% 0,0-12,7 n=0	13,6% 5,0-33,6 n=3
H0/*2B	4,1% 2,3-7,1 n=11	7,9% 4,9-12,7 n=15	4,2% 1,7-10,2 n=4	6,3% 2,3-16,9 n=3	3,8% 0,9-19,0 n=1	0,0% 0,1-14,8 n=0
H0/*4	2,6% 1,3-5,2 n=7	0,0% 0,0-1,9 n=0	3,1% 1,1-8,8 n=3	2,1% 0,5-10,1 n=1	3,8% 0,9-19,0 n=1	4,5% 1,0-21,9 n=1
*1B/*1B	0,4% 0,1-2,0 n=1	0,0% 0,0-1,9 n=0	1,0% 0,3-5,6 n=1	0,0% 0,0-7,2 n=0	0,0% 0,0-12,7 n=0	4,5% 1,0-21,9 n=1
*1B/*1D	1,5% 0,6-3,7 n=4	1,6% 0,6-4,5 n=3	2,1% 0,6-7,3 n=2	2,1% 0,5-10,1 n=1	3,8% 0,9-19,0 n=1	0,0% 0,1-14,8 n=0
*1B/*1E	0,0% 0,0-1,3 n=0	0,5% 0,1-2,9 n=1	0,0% 0,0-3,7 n=0	0,0% 0,0-7,2 n=0	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
*1B/*2A	0,8% 0,2-2,6 n=2	0,0% 0,0-1,9 n=0	1,0% 0,3-5,6 n=1	2,1% 0,5-10,1 n=1	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
*1B/*2B	0,8% 0,2-2,6 n=2	0,0% 0,0-1,9 n=0	0,0% 0,0-3,7 n=0	0,0% 0,0-7,2 n=0	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
*1B/*4	0,4% 0,1-2,0 n=1	0,0% 0,0-1,9 n=0	0,0% 0,0-3,7 n=0	0,0% 0,0-7,2 n=0	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
*1D/*1D	9,6% 6,7-13,7 n=26	7,4% 4,5-12,1 n=14	4,2% 1,7-10,2 n=4	6,3% 2,3-16,9 n=3	3,8% 0,9-19,0 n=1	0,0% 0,1-14,8 n=0
*1D/*1E	1,5% 0,6-3,7 n=4	1,1% 0,3-3,8 n=2	2,1% 0,6-7,3 n=2	2,1% 0,5-10,1 n=1	0,0% 0,0-12,7 n=0	4,5% 1,0-21,9 n=1
*1D/*2A	3,3% 1,8-6,2 n=9	4,8% 2,5-8,8 n=9	4,2% 1,7-10,2 n=4	6,3% 2,3-16,9 n=3	0,0% 0,0-12,7 n=0	4,5% 1,0-21,9 n=1
*1D/*2B	0,8% 0,2-2,6 n=2	2,6% 1,1-6,0 n=5	0,0% 0,0-3,7 n=0	0,0% 0,0-7,2 n=0	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
*1D/*4	1,85% 0,9-4,3 n=5	1,1% 0,3-3,8 n=2	2,1% 0,6-7,3 n=2	0,0% 0,0-7,2 n=0	3,8% 0,9-19,0 n=1	4,5% 1,0-21,9 n=1

Ergebnisse

Genotyp	Kontrollen	Nichtraucher	Raucher gesamt	Raucher- gruppe I	Raucher- Gruppe II	Raucher- Gruppe III
*1E/*2A	0,8% 0,2-2,6 n=2	0,5% 0,1-2,9 n=1	0,0% 0,0-3,7 n=0	0,0% 0,0-7,2 n=0	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
*1E/*2B	0,0% 0,0-1,3 n=0	0,0% 0,0-1,9 n=0	1,0% 0,3-5,6 n=1	0,0% 0,0-7,2 n=0	3,8% 0,9-19,0 n=1	0,0% 0,1-14,8 n=0
*1E/*4	0,0% 0,0-1,3 n=0	0,0% 0,0-1,9 n=0	1,0% 0,3-5,6 n=1	2,1% 0,5-10,1 n=1	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
*2A/*2A	0,8% 0,2-2,6 n=2	0,0% 0,0-1,9 n=0	0,0% 0,0-3,7 n=0	0,0% 0,0-7,2 n=0	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
*2A/*2B	0,4% 0,1-2,0 n=1	0,0% 0,0-1,9 n=0	0,0% 0,0-3,7 n=0	0,0% 0,0-7,2 n=0	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
*2B/*4	0,0% 0,0-1,3 n=0	0,5% 0,1-2,9 n=1	0,0% 0,0-3,7 n=0	0,0% 0,0-7,2 n=0	0,0% 0,0-12,7 n=0	0,0% 0,1-14,8 n=0
n	270	189	96	48	26	22

Tab. 11: Häufigkeitsverteilung der Genotypen in den Untergruppen der Kolonkarzinompatienten. Die mit einem grauen Balken markierten Varianten weisen statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. In Tab. 12, Seite 42 werden alle Genotypen aufgeführt, die in der statistischen Auswertung einen Signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe erreichten, aufgeführt.

3.2 Signifikanzverteilung in den untersuchten Gruppen

Kolonkarzinompatienten								
	Gesamt	p ¹	Nicht-raucher	p	Raucher-gesamt	p	Raucher-gruppe I	p
v2	4,6% 3,1-6,6 n=26	0,2	5,6% 3,7-8,3 n=21	0,05	2,6% 1,1-5,9 n=5	0,8	3,1% 1,1-8,8 n=3	1,0
v5	27,9% 24,4-31,7 n=159	0,07	27,8% 23,5-32,5 n=105	0,07	28,1% 22,2-34,9 n=54	0,34	27,1% 19,2-36,8 n=26	0,35
v7	3,3% 2,2-5,1 n=19	0,29	2,9% 1,5-4,9 n=11	0,67	4,2% 2,2-8,0 n=8	0,13	6,3% 3,0-13,0 n=6	0,02
H0	56,8% 52,7-60,8 n=324	0,41	57,9% 47,6-61,6 n=219	0,5	54,7% 47,6-61,6 n=105	0,47	54,2% 44,2-63,8 n=52	0,853
*1D	24,6% 21,2-28,2 n=140	0,02	24,9% 20,8-29,5 n=94	0,04	23,9% 18,4-30,5 n=46	0,15	21,9% 14,8-31,2 n=21	0,06
*1E	3,3% 2,2-5,1 n=19	0,4	2,9% 1,5-4,9 n=11	0,7	4,2% 2,2-8,0 n=8	0,3	6,3% 3,0-13,0 n=6	0,05
H0/H0	33,3% 28,1-39,0 n=95	0,006	36,0% 29,5-43,0 n=68	0,002	28,1% 20,1-37,9 n=27	0,33	29,2% 18,3-43,3 n=14	0,01
H0/*1D	25,6% 20,9-31,0 n=73	0,03	23,8% 18,3-30,4 n=45	0,02	29,2% 21,0-39,0 n=28	0,45	20,8% 11,8-34,3 n=10	0,07
H0/*1E	3,9% 2,2-6,8 n=11	0,48	3,7% 1,8-7,4 n=7	0,6	4,2% 1,7-10,2 n=4	0,45	8,3% 3,4-19,6 n=4	0,03
H0/*2A	3,9% 2,2-6,8 n=11	0,68	2,6% 1,1-6,0 n=5	0,3	6,3% 3,0-13,0 n=6	0,6	6,3% 2,3-16,9 n=3	0,05

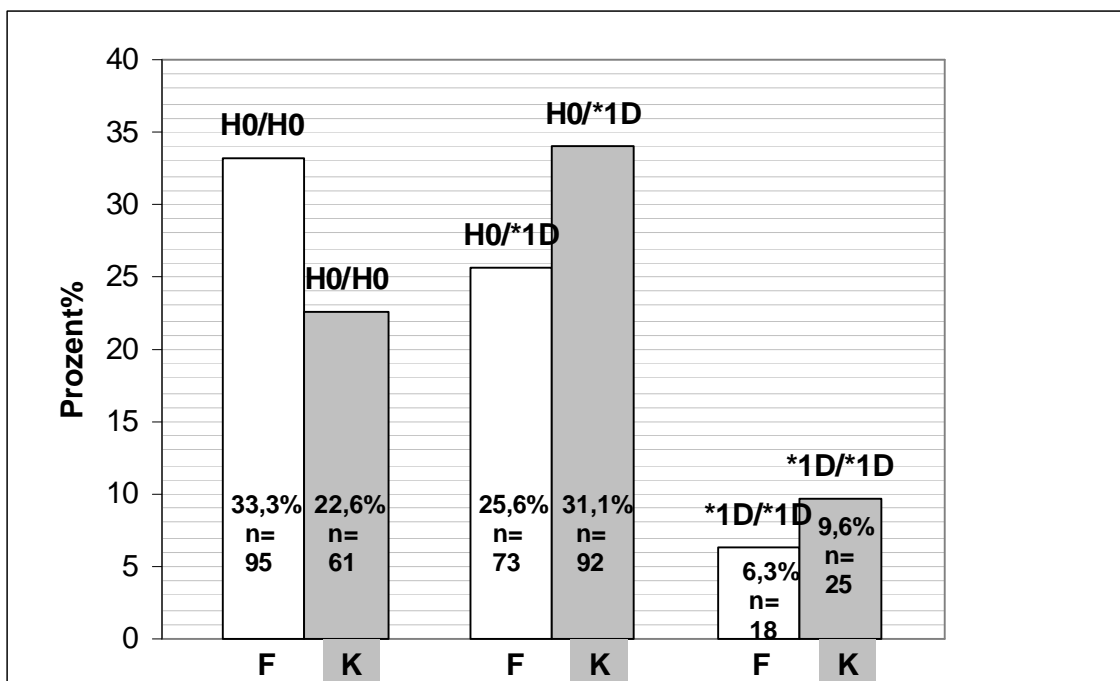
Tab.12: Ausgewählte CYP1A1-Varianten, Allele und Genotypen der Fallgruppe, die in der Auswertung statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich zum Kontrollkollektiv offenbarten.

¹ P-Wert: exakt, 2-seitige Signifikanz

3.3 Ermittlung des OR für Träger der Genotypen H0/H0, H0/*1D und *1D/*1D

Die vorangehende Analyse zeigt, dass in dieser Untersuchung Kolonkarzinompatienten häufiger Träger des HO-Allels und seltener Träger des *1D-Allels waren als Kontrollen. Das HO-Allel könnte einen negativen Einfluß auf das Karzinomrisiko haben, während das *1D-Allel schützend zu wirken scheint. Diese Hypothese wird durch die Berechnung des relativen Risikos bestätigt. Danach haben Träger des Genotyps H0/H0 ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms (OR 1,42; 95% CI 1,1-1,8) und Träger des Genotyps H0/*1D ein erniedrigtes (OR 0,72; 95% CI 0,58-0,89). Bei homozygotem Vorliegen des Allels *1D (Genotyp *1D/*1D) zeigt sich ein weiter akzentuierter protektiver Effekt von *1D (OR 0,54; 95% CI 0,32-0,93).

Abb.11: Risikoevaluation für die Genotypen H0/H0, H0/*1D und *1D/*1D



Aufgrund dieser Ergebnisse wurden beide Gruppen von *1D-Tragenden Individuen zusammengelegt und in Hinblick auf ein zu erwartendes Risiko für Träger Allels *1D ausgewertet. Dies ist erlaubt weil beide Untergruppen eine statistische Signifikanz aufwiesen. Hierbei wurde eine signifikante Risikoreduktion für ein kolorektales Karzinom festgestellt (OR 0,69; 95% CI 0,55-0,87).

Diese Beobachtung läßt darauf schließen, dass sich das Allel *1D bei heterozygotem Vorliegen gegenüber dem Allel H0 dominant verhält. Bei homozygotem Auftreten von *1D wird der beobachtete Effekt noch deutlicher, jedoch stellt das Ausmaß der Merkmalsausprägung keine so große Abweichung wie zwischen den Genotypen H0/H0 und H0/*1D dar. Träger des Allels *1D haben auch bei heterozygotem Vorliegen dieses Allels gegenüber Trägern jeder anderen Kombination von CYP1A1-Allelen ein niedrigeres Risiko für ein kolorektales Karzinom.

Die phänotypische Ausprägung des Allels *1D wird somit durch das Dominanzmodell sehr gut beschrieben.

4 Diskussion

4.1 Frequenz der CYP1A1-Varianten und Allele in der Kontrollgruppe

CYP1A1 unterliegt einer breiten interethnischen Variation. Die ermittelten Frequenzen der Varianten v1, v2 und v4 in der Kontrollgruppe fügen sich homogen in eine Reihe von Publikationen ein, welche die Häufigkeit des Auftretens dieser Varianten in weiteren europäischen Populationen untersucht haben (siehe Tabelle 7). Die für Afrikaner spezifische Variante v3 wurde in der Kontrollgruppe nicht identifiziert.

Die Variante v5 ist bislang nur von Gaikovitch et al. (2003) am diesem Kollektiv untersucht worden. Die dabei bestimmte Frequenz dieses SNPs steht in Einklang mit der in dieser Arbeit ermittelten Häufigkeit in der Kontrollgruppe.

Die Varianten v6 und v7 sind bisher erst in drei Publikationen aus Spanien, Deutschland und England berücksichtigt worden (Smart and Daly 2000; Gaikovitch et al. 2003; Landi et al. 2005). Die in dieser Arbeit ermittelten Frequenzen der Varianten v6 und v7 sind im Wesentlichen konkordant mit den o.g. Publikationen. Im Fall der Variante v7 scheint jedoch eine gewisse intraeuropäische Varianz zu bestehen.

Tab.8: Interethnische Variationen im Auftreten der Varianten

Population	n	Variantenfrequenz (%)							Ref.
		v1	v2	v3	v4	v5	v6	v7	
Kontrollgruppe	270	8,1%	3,0%	0,0%	2,4%	33,5%	5,4%	2,4%	
Deutschland	880	7,7%	2,8%	0,0%	3,0%	-	-	-	(Cascorbi et al. 1996)
Russland	290	9,7%	5,0%	0,0%	2,5%	25,8%	6,0%	2,9%	(Gaikovitch et al. 2003)
Polen	324	6,6%	2,2%	0,0%	2,0%	-	-	-	(Mrozikiewicz et al. 1997)
England	30	-	-	-	-	-	5,0%	7,0%	(Smart and Daly 2000)
Spanien	377	12,0%	4,4%	-	3,9%	-	1,0%	10,4%	(Landi et al. 2005)
Türkei	271	18,1%	8,9%	0,0%	5,7%	-	-	-	(Aynacioglu et al. 1998)

Diskussion

Chile	96	23,1%	32,2%	-	-	-	-	-	(Quinones et al. 1999)
Japan	39	30,8%	17,9%	0,0%	0,0%	-	-	-	(Inoue et al. 2000)

Die in dieser Arbeit ermittelten Allelfrequenzen des CYP1A1-Gens im russischen Kontrollkollektiv entsprechen den bislang bei Kaukasiern ermittelten Frequenzen (Tab. 8). Zu den am häufigsten untersuchten Allelen des CYP1A1-Gens zählen die Allele *2A, *2B und *4. Das Allel *2A weist in kaukasischen Populationen eine niedrigere Frequenz als in asiatischen, afrikanischen und lateinamerikanischen Populationen auf. Das Allel *2B kommt häufiger bei Lateinamerikanern vor, bei Afrikanern wurde es nicht nachgewiesen (Quinones et al. 1999; Garte et al. 2001). Das Allel *3 ist spezifisch für Afrikaner und wurde in dieser Studie im Kontrollkollektiv nicht identifiziert. Die Allele *1D, *1B und *1E sind bislang nur von Gaikovitch et al. (2003) an diesem Patientenkollektiv untersucht worden.

Tab.9: Interethnische Variationen der Allelfrequenz des CYP1A1

Population	n	Allelfrequenz (%)							Ref.
		*2A	*2B	*3	*4	*1D	*1B	*1E	
Kontrollgruppe	270	5,7%	3,0%	0,0%	2,4%	31,1%	5,4%	2,4%	
Polen	324	4,5%	2,2%	0,0%	2,0%	-	-	-	(Mrozikiewicz et al. 1997)
Russland	290	4,7%	5,0%	0,0%	2,5%	26,0%	6,0%	2,9%	(Gaikovitch et al. 2003)
Türkei	271	18,1%	8,9%	0,0%	5,7%	-	-	-	(Aynacioglu et al. 1998)
Chile	174	25,0%	33,0%	-	-	-	-	-	(Quinones et al. 2001)
Brasilien	405	-	16,2%	-	6,9%	-	-	-	(Amorim et al. 2004)
Afro-amerikaner	539	24,0%	3,0%	8,0%	-	-	-	-	(Garte 1998)
Afrika	116	24,0%	0,0%	13,0%	-	-	-	-	(Crofts et al. 1993)

4.2 Studiendesign

Die vorliegende Studie ist ein krankenhausbasierte Fallkontrollstudie. Es wurde untersucht, wie häufig verschiedene CYP1A1-Genotypen unter an Kolonkarzinom erkrankten Patienten auftraten. Als einzige Expositionsvariable wurde das Rauchverhalten in die Analyse einbezogen. Auf eine Auswertung bezüglich anderer Variablen wurde aufgrund der im Folgenden dargestellten Erwägungen verzichtet.

Die Durchsicht der aktuellen Literatur zur Entstehung des Kolonkarzinoms offenbart eine große Bandbreite an Studiendesigns und untersuchten Variablen (Ishibe et al. 2000; Butler et al. 2001; Slattery et al. 2004; Hou et al. 2005; Sinha et al. 2005).

Wahrscheinlich ist es auch auf diese Unterschiede im Studienaufbau zurückzuführen, dass die Ergebnisse nicht alle in die gleiche Richtung weisen. Dies gilt vor allem, wenn die Variable „Ernährung“ untersucht wurde. Wie schwierig es ist, von Studienteilnehmern valide Daten über das Essverhalten zu bekommen, zeigt die Publikation von Cantwell et al. (2004). Die Autoren überprüften, inwieweit die Angaben, die die Probanden über ihren Fleischkonsum im zurückliegenden Jahr aus dem Gedächtnis in einem Ernährungsfragebogen machten, mit ihren Eintragungen in einem Ernährungstagebuch übereinstimmten. Dabei stellte sich heraus, dass die Probanden sowohl bezüglich der Art des verzehrten Fleisches (weiß oder rot) als auch der Zubereitung erhebliche Erinnerungsdefizite hatten. Cantwell et al. hatten die Studienteilnehmer vorher ausführlich über die verschiedenen Fleischarten und Zubereitungsmethoden informiert, sie waren ihnen beim Verzehr bekannt. Dennoch lieferten die Fragebögen kein verlässliches Bild der Verzehrsgewohnheiten. Aus diesem Befund kann man schließen, wie zuverlässig die Angaben sind, die nicht geschulte Patienten über ihre Eßgewohnheiten der letzten 5-10 Jahre machen.

Darüber hinaus zeigten Sinha et al. (2005), dass hinsichtlich der Risikoquantifizierung des Fleischkonsums zusätzlich eine präzise Analyse der Zubereitungsmethodik notwendig ist, um valide Ergebnisse zu erzielen.

Die Erfassung der Exposition mit Tabakprodukten (Zigaretten) erlaubt in höherem Maße die Ermittlung von validen Daten. Ein „recall-bias“, der bei der Analyse der Ernährungsgewohnheiten beobachtet wird, ist für die Evaluation der Exposition mit Tabak nicht beschrieben. In ihrer Publikation wiesen Gorber et al. (2009) nach, dass die Erhebung des Tabakkonsums mittels standardisierter Fragebögen weitestgehend durch

die Bestimmung der Cotinin-Konzentration im Urin, der ein Surrogatparameter für die Exposition mit Tabakprodukten darstellt, gedeckt wird.

4.3 Individuelle Suszeptibilität für kolorektale Karzinome

Epidemiologische Studien belegen, dass ca. 80-90 % aller Karzinomerkrankungen auf die Exposition mit umweltassoziierten Faktoren zurückzuführen sind (Bartsch and Hietanen 1996). Zu diesen gehören neben der Exposition mit energiereicher Strahlung und der Aufnahme von Umweltgiften auch der Konsum von Tabak und Ernährungsgewohnheiten. Die Suszeptibilität für die Entwicklung eines Karzinoms unterliegt einer großen intraindividuellen Varianz. Diese resultiert aus einer Vielzahl unterschiedlicher und individueller Einzelfaktoren. Als ein zentraler Faktor wird die individuelle Konstitution fremdstoffmetabolisierender Enzymsysteme angesehen. Diese sind für die biologische Aktivierung der meisten Humankanzerogene verantwortlich. Darüber hinaus werden auch Alterationen der DNA-Reparaturmechanismen, der Expression von Protoonkogenen und von Tumorsuppressorgenen als Suszeptibilitätsfaktoren betrachtet (Bartsch and Hietanen 1996).

CYP1A1 ist für die biologische Aktivierung mehrerer für die Genese kolorektaler Karzinome wichtiger Gruppen von Umweltgiften zuständig. Hierzu gehören heterozyklische Amine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Beide Substanzgruppen werden während der Pyrolyse von Proteinen gebildet. Heterozyklische Amine fallen vermehrt beim Braten von Fleisch an. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe entstehen hauptsächlich unter direktem Kontakt mit Feuer, wie z.B. beim Grillen von Fleisch. Zusätzlich stellt der Konsum von Tabakprodukten eine weitere Quelle von PAH dar. Sowohl heterozyklische Amine als auch PAH wurden tierexperimentell als kanzerogen klassifiziert. Sasaki *et al.* (1998) wiesen bei Mäusen eine kolonspezifische Toxizität der heterozyklischen Amine Trp-P-2 (3-Amino-1-Methyl-5H-Pyrido[4,3-b]Indol), MeIQ (2-Amino-3,4-Dimethylimidazo[4,5-f]Quinolin, MeIQx (2-Amino-3,8-Dimethylimidazo[4,5-f]Quinoxalin) und PhiP (2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-b]Pyridin) nach. Ein zentrales Merkmal der chemischen Kanzerogenese stellt die Bildung von DNA-Addukten dar (Bartsch, Rojas et al. 1999). Diese führen über Mutationen im DNA-Strang zur Bildung bösartiger Zellen. Alexandrov et al. (1996) fanden spezifische BPDE-DNA-Addukte in der Mukosa von Kolonkarzinompatienten.

An diesem Punkt stellt sich die Frage, ob die verschiedenen genetischen Varianten von CYP1A1 durch Modifikation des Metabolismus von HA und PAH über das Krebsrisiko des jeweiligen Trägers mit bestimmen. Um diese Frage zu beantworten,

muß man wissen a) inwieweit die verschiedenen Varianten die CYP1A1-Aktivität überhaupt verändern und b) welche CYP1A1-Reaktionsprodukte bei der Krebsentstehung eine Rolle spielen.

Die metabolische Aktivität und Induzierbarkeit einzelner CYP1A1-Varianten wurde in In-vivo- und In-vitro-Versuchsreihen von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht. Die Ergebnisse sind im folgenden Abschnitt dargestellt. Dann wird in Kapitel 4.3.2 die Verbindung zwischen CYP1A1, dem Konsum von Tabakprodukten und der Krebsentstehung diskutiert. Das Lungenkarzinom bietet sich hier als Beispiel an, da die einzelnen Stufen seiner Entstehung bekannt und die beim Rauchen entstehenden spezifischen Addukte identifiziert sind. Kapitel 4.3.3 schildert, was man derzeit über die Bildung von DNA-Addukten unter verschiedenen CYP1A1-Varianten weiß.

4.3.1 Funktionelle Evaluation genetischer Varianten des CYP1A1

Erste Hinweise auf eine genetische Variante des CYP1A1, die mit einer veränderten Aktivität einhergeht, fanden Kellermann et al. (1973). An mitogen stimulierten Lymphozyten ließ sich eine erhöhte Induzierbarkeit dieser Enzymvariante nachweisen.

Kontrollierte In-vitro-Untersuchungen zur Aktivitätsbestimmung genetischer Varianten des CYP1A1 wurden später von der Arbeitsgruppe um Hayashi, Kawajiri und Watanabe (1991) mittels der Expression von CYP1A1-cDNA in Hefemikrosomen durchgeführt. Hiermit wurde ein Vergleich der metabolischen Aktivität zwischen Varianten des CYP1A1 ermöglicht. In dieser Analyse wurde eine ca. 1,5-fache Aktivitätserhöhung der Variante v1 im Vergleich zum Wildtyp ermittelt. Darüber hinaus wurde unter B[a]P-Exposition ein erhöhter metabolischer Umsatz durch die Variante v1 festgestellt.

Cosma et al. (1993) untersuchten mit dem 7-Ethoxyresorufin-O-Deethylase-Assay (EROD-Assay) die CYP1A1-Aktivität in Lymphozyten, die verschiedene CYP1A1-Varianten exprimierten. Der EROD-Assay misst über die CYP1A1-katalysierte oxidative Desalkylierung die Stärke der Induktion von CYP1A1. Nach Stimulation mit 3-Methylcholanthren zeigten Lymphozyten, welche die Variante 2 exprimierten, eine höhere Induzierbarkeit des Enzyms. Die metabolischen Aktivität der untersuchten Varianten wurde nicht bestimmt.

Auch Crofts et al. (1994) untersuchten in stimulierten Lymphozyten Genexpression und enzymatische Aktivität der Varianten v1 und v2 im Vergleich zum Wildtyp. Die Variante v1 zeigte anhand der untersuchten Parameter keinen Unterschied zum

Wildtyp. Bei der Analyse des Allels *2B, welches die Varianten v1 und v2 gemeinsam trägt, zeigte sich eine verstärkte Induzierbarkeit des Enzyms. Das allein durch v2 kodierte Enzym wies insgesamt eine höhere Induzierbarkeit und eine höhere metabolische Aktivität auf, selbst bei heterozygoter Expression wurde eine Enzymaktivität gemessen, die dreimal so hoch war wie beim homozygoten Wildtyp.

Kiyohara et al. (1996) konnten diese Ergebnisse teilweise bestätigen. Auch sie stellten mittels EROD-Aktivitätsmessung an stimulierten Lymphozyten eine höhere Induzierbarkeit für das durch v2 kodierte Enzym fest, fanden jedoch keine erhöhte Aktivität bei dem durch das Allel *2B kodierten Enzym.

Persson et al. (1997) exprimierten cDNA in Hefezellen und verglichen die enzymkinetischen Eigenschaften der CYP1A1-Variante v2 und des Wildtyps. Dabei wurden im Gegensatz zu den Arbeiten der bereits genannten Autoren nur unwesentliche Unterschiede im EROD-Assay und der 3-Hydroxylierung von B[a]P festgestellt.

Auch Zhang et al. (1996) kamen zu einem ähnlichen Ergebnis. Mittels eines konstruierten Plasmids wurde cDNA der Varianten v2 und des Wildtyps in Stämmen des Bakteriums *Escherichia coli* exprimiert. In der Kinetikanalyse und der Analyse des Umsatzes von B[a]P konnten keine signifikanten Unterschiede dieser Enzymvarianten festgestellt werden. Die metabolische Aktivität des durch die Variante v2 kodierten Enzyms war sogar deutlich geringer als die des wildtypkodierten.

Schwarz et al. (2001) führten die bislang umfangreichste Arbeit zum CYP1A1-katalysierten Metabolismus von B[a]P durch. Hierbei wurde gereinigtes CYP1A1 in einem mit Baculovirus inokulierten Insektenzellsystem exprimiert. Dieser Versuchsansatz ermöglichte eine präzise Analyse des metabolischen Umsatzes der untersuchten CYP1A1-Varianten. Darüber hinaus wurden erstmals die Produkte dieser Reaktion variantenspezifisch analysiert. CYP1A1 metabolisiert B[a]P sowohl zu Phenolen als auch zu Dihydrodiolen. Eine Differenzierung der metabolischen Zwischenprodukte ist notwendig, da Phenole eine Zwischenstufe auf dem Wege zur B[a]P-Detoxifizierung darstellen und nur die Bildung von Dihydrodiolen zur Toxifizierung führt (Shimada 2006).

Die jeweilige Enzymvariante wurde mit verschiedenen hohen Konzentrationen von B[a]P und 7,8-diol-B[a]P inkubiert. Mittels HPLC wurden die in den entsprechenden Reaktionen umgesetzten Metaboliten identifiziert und quantifiziert. Die katalytische

Effizienz der jeweiligen Variante wurde als Verhältnis von Metabolisierungsgeschwindigkeit (V_{max}) zu kinetischem Umsatz (K_m) definiert. Untersucht wurden der Wildtyp und die Varianten v2 und v4.

Die Kinetikanalyse ergab eine höhere Aktivität für das durch die Variante v4 kodierte Enzym (22,2 nmol/min/nmol CYP) im Vergleich zu dem der Variante v2 (19,6 nmol/min/nmol CYP) und zu dem des Wildtypallels (16,0 nmol/min/nmol CYP). Die metabolische Kapazität war beim wildtypkodierten Enzym am höchsten (1,14 pmol/min/pmol CYP für die Bildung von 3-OH-Phenolen; 0,41 pmol/min/pmol CYP für die Bildung von 7,8-diol), beim Enzym der Variante v4 deutlich niedriger (0,65 pmol/min/pmol CYP bzw. 0,36 pmol/min/pmol CYP) und beim Enzym der Variante v2 nur noch knapp halb so hoch (0,60 pmol/min/pmol CYP bzw. 0,18 pmol/min/pmol CYP). Aus diesen Ergebnissen wurde das Verhältnis der Bildungskapazität von Dihydrodiolen und Phenolen für die untersuchten CYP1A1-Varianten errechnet. Für den Wildtyp und die Variante v2 ergaben sich ähnliche Werte (Wildtyp 0,28; v2 0,36), während das durch die Variante v4 kodierte Enzym mit einem Wert von 0,54 die höchste metabolische Kapazität zur Bildung von Dihydrodiolen zeigte.

Die Frage nach der Induzierbarkeit der untersuchten genetischen Varianten wurde in dieser Arbeit nicht gestellt. Eine Arbeit von Daly et al. (2000) scheint jedoch darauf hinzuweisen, dass die Regulation der Transkription und die Induzierbarkeit von CYP1A1 mit der Aktivität des Ah-Rezeptors verknüpft sind und nur in geringerem Maße durch genetische Varianten beeinflusst werden.

4.3.2 Rauchen, CYP1A1 und Kanzerogenese

Die im Tabakrauch enthaltenen Kanzerogene sind am weitesten verbreitet (Hecht 1999). Rauchen kann als Modell der experimentellen chemischen Kanzerogenese verstanden werden. Zahlreiche Untersuchungen belegen die Verbindung zwischen der Entstehung von Neoplasmen und dem Rauchverhalten (Phillips 2002), wobei nicht nur direkt exponierte Organe und Gewebe, wie beispielsweise Lunge, Ösophagus und Larynx, sondern auch ferne Gewebe, wie Zervix und Kolon, betroffen sind (Giovannucci 2001; Botteri et al. 2008; Gandini et al. 2008). Tabakrauch enthält mehr als 60 unterschiedliche kanzerogene Substanzen. Zu den für den Menschen wichtigsten Kanzerogengruppen zählen die Nitrosamine (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-

butanon (NNK)) und die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (Benzo[a]pyren). Diese spielen in der Initiation der Kanzerogenese eine zentrale Rolle.

Viele Kanzerogene bedürfen einer metabolischen Aktivierung zum Erlangen ihres kanzerogenen Potentials. Benzo[a]pyren, die Referenzsubstanz der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, wird über CYP1A1 bioaktiviert und verstärkt durch dessen Induktion ihren eigenen Metabolismus (Kap. 1.2). In einer 2005 veröffentlichten Arbeit wiesen Wolf et al. eine zweihundertfache Erhöhung der CYP1A1-mRNA-Expression in kultivierten Blasenepithelzellen von Schweinen nach der Exposition mit 5 µM B[a]P nach.

Die Bioaktivierung von B[a]P ist komplex und führt zur Bildung des ultimalen genotoxischen B[a]P 7,8-diol-9,10-epoxid (DE2) (Shou et al. 1996). Diolepoxide bilden N2-Desoxyguanosin-Addukte (Hecht 2003). Diese PAH-spezifischen DNA-Addukte wiesen in den Lungen von Krebskranken höhere Konzentrationen als bei Nichtrauchern auf (Bartsch et al. 2000). In einigen, jedoch nicht in allen Fällen, war eine höhere Adduktbildung auch mit einer erhöhten CYP1A1-Expression verbunden.

DNA-Addukte werden mit der Postlabeling-Analyse nachgewiesen. DNA wird hierbei einem Verdau unterzogen, in dem durch Addukte geschädigte Nucleotide enzymatisch mit ³²P-Orthophosphat markiert werden. Für spezifische Adduktstrukturen gibt es spezielle Assays. Allerdings ist der Nachweis unspezifischer DNA-Addukte, der sogenannten diagonalen radioaktiven Zonen (DRZ), erfolgreicher. Diese entstehen unter dem Einfluss von Tabakrauch, also unter einer Mixtur unterschiedlicher Kanzerogene. Dabei ist für das individuelle Krebsrisiko nicht nur die Tatsache des Entstehens von Addukten von Bedeutung, sondern auch deren Menge und Lebensdauer (Hecht 2003). Der Organismus verfügt nämlich über eine Reihe potenter DNA-Reparaturmechanismen, die den Fortbestand von Schäden an der DNA in einem gewissen Umfang verhindern können. Zu diesen gehört beispielsweise das Enzym O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), das durch Methylierung direkte Schäden an den Basen beheben und die Addukte entfernen kann. Genetische Varianten in DNA-Reparaturmechanismen sind Gegenstand laufender Forschung (Goode et al. 2002). Bei Versagen der Reparaturmechanismen, z.B. aufgrund hoher DNA-Adduktspiegel, oder der Persistenz von Schäden in der DNA-Replikationsphase kann es einerseits zu Apoptose und Chromosomeninstabilitäten, andererseits zum Einbau falscher Basen und somit zu Mutationen kommen (Osada and Takahashi 2002).

Bei Rauchern ist das DNA-Addukt-Niveau signifikant höher als bei Nichtrauchern (Hecht 2003). Besonders gefährdete Bereiche, sogenannte „mutational hotspots“, liegen auf dem p53-Gen und dem K-ras-Gen. Das p53-Tumorsuppressor-Gen nimmt regulative Aufgaben innerhalb des Zellzyklus wahr. Zu den typischen Schäden B[a]P-spezifischer DNA-Addukte zählen G>T Mutationen. Für tabakinduzierte Lungenkarzinome konnte ein spezifisches Schädigungsmuster identifiziert werden. Dieses weist die höchsten Adduktfrequenzen an 5 bestimmten Loci des p53-Gens (Codon 157, 158, 245, 248 und 273) auf (Pfeifer et al. 2002). In verschiedenen Studien wurde festgestellt, dass die Adduktspiegel bei Tabakrauch-exponierten Individuen unterschiedlich hoch sind (Pfeifer et al. 2002). Man kann davon ausgehen, dass die individuelle Suszeptibilität für die Entwicklung einer Krebserkrankung mit dem individuellen DNA-Adduktspiegel korreliert. Weiterhin wurde im Tierversuch nachgewiesen, dass Mäuse, bei denen die DNA-Adduktbildung unterbunden wurde, keine Karzinome entwickelten (Pfeifer et al. 2002). Eine weitere Arbeit konnte nachweisen, dass die Hemmung von CYP1A1 mit Resveratrol die Adduktbildung vollständig unterband (Berge et al. 2004). Somit ist die Verbindung zwischen der Bildung von DNA-Addukten und der Entwicklung von Karzinomen bewiesen.

4.3.3 Genetische Varianten des CYP1A1 und interindividuelle Variabilität von DNA-Addukten

Die Bedeutung, die genetische Varianten des CYP1A1 für die interindividuelle Varianz der DNA-Adduktbildung haben, wurde in verschiedenen Arbeiten untersucht. Dahinter stand auch die Frage, ob CYP1A1-Varianten als Biomarker der Kanzerogenese verwendet werden könnten. In den meisten Untersuchungen wurde ein ³²P-Postlabelling-Assay verwendet, um in Lymphozyten die Raten PAH-spezifischer Addukte zu bestimmen.

Schoket et al. (2001) untersuchten an zwei PAH-exponierten Kollektiven, inwieweit genetische Varianten von CYP1A1 und dem Phase-II-Enzym GSTM1 Einfluss auf die DNA-Adduktmenge haben. Eine Studiengruppe rekrutierte sich aus Stahlarbeitern, die berufsbedingt polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen exponiert war. Die zweite Gruppe bestand vorwiegend aus Lungenkarzinompatienten, die entweder noch rauchten oder sehr lange geraucht hatten. Die Analyse zeigte, dass keine der untersuchten CYP-Varianten und deren Kombination mit GSTM1 mit einer signifikant

höheren Menge an DNA-Addukten bei den jeweiligen Individuen einherging. Einzig im Lungengewebe von heterozygoten Trägern der Variante v2 wurde eine um 34% höhere Menge an DNA-Addukten als bei Trägern der Wildtypvariante nachgewiesen (11,4 Addukte/10⁸ Nukleotide; 8,5 Addukte/10⁸ Nukleotide). Allerdings erlaubte die Gruppengröße keine weitere Beurteilung dieses Ergebnisses.

Butikievicz et al. (1998) konnten bei Individuen, welche eine Kombination von *GSTM1-null* mit heterozygotem Vorliegen der Variante v2 aufwiesen, signifikant erhöhte DNA-Adduktspiegel nachweisen.

Mooney et al. (1997) stellten bei rauchenden Trägern der Variante v2 mehr als doppelt so hohe DNA-Adduktspiegel wie beim Wildtyp fest.

Pastorelli et al. (1998) wiesen unter Verwendung der Flüssiggaschromatographie an Hämoglobin, Serumalbumin und DNA spezifische BPDE-Addukte bei Lungenkarzinompatienten nach. Im Vergleich zum Wildtyp war bei homozygoten Trägern der Varianten v1 und v2 die Konzentration an DNA-Addukten höher, der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant. Andererseits waren unter den Patienten ohne Adduktbildung auch keine Träger von genetischen CYP1A1-Varianten. Dies spricht indirekt für einen Zusammenhang zwischen Varianten des CYP1A1 und einer erhöhten Suszeptibilität für Raucher.

Rojas et al. (2000) untersuchten die Bildung B[a]P-spezifischer BPDE-DNA-Addukte an zwei Studienkollektiven, nämlich 89 Kokereiarbeitern mit unterschiedlicher PAH-Exposition und 44 Kraftwerkerarbeitern, die am Arbeitsplatz keiner PAH-Belastung ausgesetzt waren. Die Versuchsteilnehmer wurden bezüglich ausgesuchter genetischer Varianten der Enzyme CYP1A1, *GSTM1* und *GSTT1* genotypisiert. Außerdem wurde das Rauchverhalten in die Analyse einbezogen: die Kokereiarbeiter waren überwiegend Raucher und Ex-Raucher, die Kraftwerkerarbeiter waren alle Raucher. Die BPDE-DNA-Addukte wurden mittels HPLC und eines fluorimetrischen Assays quantifiziert.

Bei den Kokereiarbeitern konnte für die DNA-Adduktspiegel ein deutlich höherer mittlerer Wert festgestellt werden (2,0 bzw. 0,8 Addukte/10⁸ Nukleotide) als bei den Kraftwerkerarbeitern. Bei rauchenden Kokereiarbeitern war der Unterschied zu der (ebenfalls rauchenden) Gruppe von Kraftwerkerarbeitern noch größer (2,6 bzw. 0,8 Addukte/10⁸ Nukleotide).

Die Analyse der genetischen Varianten offenbarte für das heterozygote Vorliegen der Varianten v1 und v2 eine Verdoppelung der Adduktraten im Vergleich zum Wildtyp (2,5 bzw. 1,3 Addukte/10⁸ Nukleotide). Ein homozygoter Träger der Variante v1 (Genotyp

*2A/*2A) zeigte eine Adduktrate von 44 Addukte/10⁸ Nukleotide. In Kombination mit GSTM1 ließen sich noch deutlichere Effekte nachweisen. Während Träger der Kombination CYP1A1 *1/*1-GSTM1 keine Adduktbildung aufwiesen, wurde bei Träger der Kombination CYP1A1 *1/*1-GSTM1 *0/*0 eine Adduktrate von 1,3 Addukte/10⁸ Nukleotide gemessen. Die Kombination mit der höchsten Adduktrate zeigte sich für CYP1A1 *2A/*2A-GSTM1 *0/*0 mit 44 Addukten/10⁸ Nukleotiden.

Diese Ergebnisse deuten insgesamt auf eine Modulation der BPDE-Adduktbildung durch genetische Varianten des CYP1A1 hin. Eine konkrete Abschätzung des Karzinomrisikos lässt sich jedoch daraus zu diesem Zeitpunkt noch nicht ableiten.

4.3.4 Genetische Varianten des CYP1A1 und kolorektale Karzinome

In mehreren Assoziationsstudien mit Fall-Kontroll-Studienmodell wurde die Häufigkeitsverteilung genetischer Varianten von CYP1A1 bei Kolonkarzinompatienten untersucht (Kawajiri et al. 1993; Sivaraman et al. 1994; Inoue et al. 2000; Ishibe et al. 2000; Kiss et al. 2000; Butler et al. 2001; Sachse et al. 2002; Ye and Parry 2002; de Jong et al. 2003; Slattery et al. 2004; Chen et al. 2005; Chen et al. 2005; Hou et al. 2005; Huber et al. 2005; Landi et al. 2005; Murtaugh et al. 2005; Fan et al. 2006; Little et al. 2006; Pereira Serafim et al. 2008; Kobayashi et al. 2009).

Acht Studien mit kaukasischen Teilnehmern fanden keine Assoziation der Varianten v1 und v2 mit einem gehäuften Auftreten kolorektaler Karzinome (Ishibe et al. 2000; Butler et al. 2001; Ye and Parry 2002; Slattery et al. 2004; Huber et al. 2005; Landi et al. 2005; Murtaugh et al. 2005; Little et al. 2006). Einzig Kiss *et al.* (2000) und Sachse *et al.* (2002) wiesen bei Trägern der homozygoten Variante v2 bzw. des v2-tragenden Allels *2C in einem englischen bzw. einem ungarischen Kollektiven eine erhöhte Suszeptibilität für kolorektale Karzinome nach.

Sachse et al. (2002) führten hierbei als einzige eine allelbasierte Untersuchung durch. Die Arbeit von Sachse *et al.* stellt neben der hier vorliegenden Arbeit die einzige Arbeit dar, in der eine Genotypisierung durchgeführt wurde.

Landi et al. (2005) fanden in einer Studie, die den Einfluß genetischer Varianten in einer Reihe von Phase-I- und Phase-II-Enzymen untersuchte und 377 Patienten mit kolorektalen Karzinomen und 326 Kontrollen einschloß, dass Träger der Variante v4 ein geringeres Karzinomrisiko hatten. Little et al. (2006) kamen zum gleichen Ergebnis: auch in ihrer Studie mit 264 Fällen und 408 Kontrollen erwies sich die Variante v4 als

protektiver Faktor. Ein Zusammenhang mit dem Rauchverhalten zeigte sich in der zuletzt genannten Untersuchung nicht. Die Analyse der Häufigkeitsverteilung der Varianten v6 und v7 konnte weder eine erhöhte noch eine erniedrigte Suszeptibilität für kolorektale Karzinome feststellen. Hierbei ist jedoch keine Risikoabschätzung zusätzlicher Expositionsfaktoren, wie z.B. Tabakkonsum, durchgeführt worden.

In drei Untersuchungen an chinesischen Kollektiven fanden Fan *et al.* (2006) und Chen *et al.* (2005) einen protektiven Effekt der Variante v1. Allerdings zeigte die Variante v1 in den untersuchten Kollektiven Häufigkeiten von 31,85%-39,9%. Eine Risikoabschätzung von Expositionsfaktoren ist in diesen Arbeiten nicht weiter durchgeführt worden (Chen *et al.* 2005; Chen *et al.* 2005; Fan *et al.* 2006).

Sivaraman *et al.* (1994) fanden bei Japanern und Hawaiianern, die homozygote Träger der Varianten v1 oder v2 waren, eine erhöhte Suszeptibilität für das Kolonkarzinom. Inoue *et al.* (2000) führten eine Untersuchung zum Risiko kolorektaler Adenome und Varianten des CYP1A1 an einem japanischen Kollektiv durch. Hier erwies sich die Variante v1 im Trend als protektiv. Die Analyse des Rauchverhaltens als möglichem Risikofaktor stellte eine Korrelation zwischen der Variante v1 und der Entwicklung von Adenomen fest. Ebenfalls bei japanischen Patienten untersuchten Kobayashi *et al.* (2009) den Zusammenhang zwischen genetischen Polymorphismen von NAT2, CYP1A1 und CYP1A2 und dem Auftreten von kolorektalen Karzinomen in einer Fall-Kontroll-Studie. In dieser Studie versuchten die Autoren die Aufnahme heterozyklischer Amine der Versuchsteilnehmer zu quantifizieren. Unter den untersuchten Varianten war auch die Variante v2. In dieser Studie zeigte sich kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Variante v2 und dem Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln.

Pereira-Serafim *et al.* (2008) analysierten in einer Fall-Kontroll-Studie den Zusammenhang zwischen der Variante v2 und dem Risiko für kolorektale Karzinome an einem brasilianischen Kollektiv. Hier wurde ein gehäuftes Auftreten dieser Variante im Fallkollektiv festgestellt. Darüber hinaus wurde bei Trägern der Variante v2 unter Tabakexposition ein erhöhtes Risiko für kolorektale Karzinome nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig das Allel *1D bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass das Allel *1D einen protektiven Effekt hat, Träger dieses Allels haben ein signifikant niedrigeres Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Das Allel *1D wies im untersuchten Kollektiv die höchste Penetranz auf, die bislang für eine genetische Variante des CYP1A1 bei

Kaukasiern beschrieben wurde. Aufgrund der hohen Allelfrequenz von 31,1% ist von einer klinischen Bedeutung dieses Allels auszugehen.

Es ist nicht bekannt, welchen Einfluß das Allel *1D auf die CYP1A1-Funktion hat, *In-vitro*-Analysen mit dem Genprodukt wurden bisher nicht durchgeführt. Anhand der bereits publizierten Literatur ist jedoch zu vermuten, dass das Enzym eine niedrigere Metabolisierungskapazität als das Produkt des Wildtypallels hat (Schwarz, Kisselev et al. 2001). Dies könnte dazu führen, dass über die B[a]P-Toxifizierung weniger DNA-Addukte entstehen, wodurch das Krebsrisiko reduziert wird.

4.4 Ausblick

Die Aussagekraft epidemiologischer Studien ist besonders abhängig von entsprechend großen Fallzahlen. Schon bei der Aufspaltung der untersuchten Kollektive in Genotypen stößt man bei der statistischen Auswertung an natürliche Grenzen. Ungleich größere Studienpopulationen wären notwendig, um eine gleichwertige Auswertung selten auftretender Genotypen zu gewährleisten. Allerdings kann eine epidemiologisch ausgerichtete Arbeit nur das Ziel verfolgen, Hypothesen zu testen und Trends zu identifizieren. In Bezug auf das Wildtypallel (H0) und das Allel *1D wurden in der vorliegenden Arbeit klare Trends gefunden, die durch ergänzende Studien bestätigt werden müssen.

Zunächst sollten an weiteren kaukasischen Fallkollektiven populationsgenetische Analysen der Frequenz von CYP1A1 *1D zur Bestätigung der hohen Penetranz dieses Allels bei Kaukasiern erfolgen. Weiterhin böte es sich an, die Bildung von DNA-Addukten mittels HPLC oder ³²P-Postlabelling-Assays bei CYP1A1*1D-Trägern zu analysieren und der von homozygoten Wildtypallelträgern gegenüberzustellen. Anhand solcher Daten ließe sich eine Vorstellung darüber gewinnen, wie groß der Einfluß des *1D-Allels – mit und ohne Schadstoffeinwirkung – auf molekulargenetischer Basis ist.

Das kolorektale Karzinom entsteht – wie fast alle Malignome – aus dem komplexen Zusammenspiel einer Vielzahl von Umwelteinflüssen mit der individuellen genetischen Ausstattung des Individuums. Sieht man von dem eher seltenen Fall ab, dass das Individuum einem starken Kanzerogen ausgesetzt ist, ist die Entwicklung eines Karzinoms in der Regel das Ergebnis des Vorhandenseins vieler ungünstiger genetischer Varianten, von denen jede einzelne nur eine niedrige Penetranz hat. Darauf ist zurückzuführen, dass Assoziationsstudien, die einzelne Varianten betrachten, häufig zu widersprüchlichen Ergebnissen kommen. Erst wenn die Mehrzahl der ungünstigen genetischen Konstellationen bekannt ist, wird es gelingen, das individuelle Krebsrisiko zuverlässig einzuschätzen und besonders gefährdeten Menschen eine intensivere Prophylaxe zukommen zu lassen. In Anbetracht der fast unüberschaubar erscheinenden Zahl von Komponenten, deren potentielle Mitwirkung an der Krebsentstehung untersucht werden muß, stehen wir vor einer gewaltigen Aufgabe. Die vorliegende Arbeit wollte einen Beitrag dazu leisten, diesem Ziel näherzukommen.

5 Zusammenfassung

Genetische Varianten fremdstoffmetabolisierender Enzyme können die Empfindlichkeit des Organismus für Umweltgifte erhöhen. CYP1A1 setzt polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe zu kanzerogenen Di-epoxiden um und ist deshalb ein Schlüsselenzym der chemischen Kanzerogenese. Verschiedene In-vitro-Versuchsreihen haben gezeigt, dass einzelne CYP1A1-Varianten abweichende enzymkinetische Eigenschaften zeigen können. Daraus leitete sich die Frage ab, ob genetische Varianten des CYP1A1 die Entwicklung kolorektaler Karzinome modulieren und spezifische Varianten als Suszeptibilitätsmarker für kolorektale Karzinome angesehen werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden 285 Patienten mit histologisch nachgewiesenem kolorektalen Karzinom und 270 Kontrollpersonen bezüglich sieben genetischer Varianten von CYP1A1 (v1-v7) mittels der Methode des Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus und der Polymerasekettenreaktion genotypisiert. Entsprechend ihrer Raucheranamnese wurden die Patienten für die Subgruppenanalyse den Gruppen RI (1-39 Packungsjahre, n=48), RII (39 bis 59 Packungsjahre, n=26) und RIII (über 59 Packungsjahre, n=22) zugeteilt.

Die allelbasierte Analyse ergab, dass

- das Allel *1D in der Gruppe der Kolonkarzinompatienten seltener vertreten war als in der Kontrollgruppe ($p=0,02$);
- das Allel *1E häufiger in der Gruppe der leicht exponierten Raucher (RI) auftrat ($p=0,03$).

Die genotypenbasierte Analyse ergab, dass

- der Genotyp H0/H0 (homozygoter Wildtyp) mit einem erhöhten Risiko für das Kolonkarzinom assoziiert ist: OR 1,42; 95% CI (1,1-1,8), $p=0,006$;
- der Genotyp H0/*1D mit einem erniedrigten Risiko für das kolorektale Karzinom assoziiert ist: OR 0,72; 95% CI (0,58-0,89), $p=0,03$;

- der Genotyp **1D/*1D* mit einem stärker ausgeprägten protektiven Effekt im Vergleich zum Genotyp *H0/*1D* verbunden ist: OR 0,54; 95% CI (0,32-0,93), $p=0,03$.
- Das für Träger des Allels **1D* ein erniedrigtes Risiko für ein kolorektales Karzinom besteht: OR 0,69; 95% CI (0,55-0,87), $p=0,001$.
- das Allel **1D* sich dominant gegenüber dem Allel *H0* verhält;
- der Genotyp *H0/*2A* bei Rauchern der Gruppe RI mit einem erhöhten Risiko für das Kolonkarzinom verbunden ist ($p=0,05$);
- der Genotyp *H0/*1E* bei Rauchern der Gruppe RI mit einem erhöhten Risiko für das Kolonkarzinom verbunden ist ($p=0,03$).

Da die Untergruppen bei der Raucherstratifizierung relativ klein waren, können die entsprechenden Ergebnisse nur als Trend gewertet werden.

Das Allel **1D* wurde in dieser Studie erstmalig im Rahmen einer Assoziationsstudie zum kolorektalen Karzinom untersucht. Es zeigte die höchste Allelfrequenz, die bislang bei Kaukasiern für ein CYP1A1-Allel nachgewiesen wurde (31,1%). CYP1A1 **1D* erwies sich als protektiver Faktor. Träger dieses Allels haben ein signifikant niedrigeres Risiko ein kolorektales Karzinom zu entwickeln.

6 Literatur

- Alexandrov, K., M. Rojas, et al. (1996). "Evidence of anti-benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct formation in human colon mucosa." Carcinogenesis **17**(9): 2081-3.
- Amorim, L. M., P. F. Lotsch, et al. (2004). "Analysis of CYP1A1 exon 7 polymorphisms by PCR-SSCP in a Brazilian population and description of two novel gene variations." Mutat Res **547**(1-2): 35-40.
- Androutsopoulos, V. P., A. M. Tsatsakis, et al. (2009). "Cytochrome P450 CYP1A1: wider roles in cancer progression and prevention." BMC Cancer **9**: 187.
- Aynacioglu, A. S., I. Cascorbi, et al. (1998). "High frequency of CYP1A1 mutations in a Turkish population." Arch Toxicol **72**(4): 215-8.
- Bartsch, H. (1996). "DNA adducts in human carcinogenesis: etiological relevance and structure-activity relationship." Mutat Res **340**(2-3): 67-79.
- Bartsch, H. and E. Hietanen (1996). "The role of individual susceptibility in cancer burden related to environmental exposure." Environ Health Perspect **104 Suppl 3**: 569-77.
- Bartsch, H., U. Nair, et al. (2000). "Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**(1): 3-28.
- Bartsch, H., M. Rojas, et al. (1999). "Genetic cancer susceptibility and DNA adducts: studies in smokers, tobacco chewers, and coke oven workers." Cancer Detect Prev **23**(6): 445-53.
- Beggs, A. D. and S. V. Hodgson (2008). "The genomics of colorectal cancer: state of the art." Curr Genomics **9**(1): 1-10.
- Berge, G., S. Ovrebo, et al. (2004). "Resveratrol inhibits benzo[a]pyrene-DNA adduct formation in human bronchial epithelial cells." Br J Cancer **91**(2): 333-8.
- Botteri, E., S. Iodice, et al. (2008). "Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis." Gastroenterology **134**(2): 388-95.
- Butkiewicz, D., E. Grzybowska, et al. (1998). "Modulation of DNA adduct levels in human mononuclear white blood cells and granulocytes by CYP1A1 CYP2D6 and GSTM1 genetic polymorphisms." Mutat Res **415**(1-2): 97-108.
- Butler, W. J., P. Ryan, et al. (2001). "Metabolic genotypes and risk for colorectal cancer." J Gastroenterol Hepatol **16**(6): 631-5.

- Cantwell, M., B. Mittl, et al. (2004). "Relative validity of a food frequency questionnaire with a meat-cooking and heterocyclic amine module." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **13**(2): 293-8.
- Cascorbi, I., J. Brockmoller, et al. (1996). "A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility." Cancer Res **56**(21): 4965-9.
- Chen, K., Q. T. Jiang, et al. (2005). "Relationship between metabolic enzyme polymorphism and colorectal cancer." World J Gastroenterol **11**(3): 331-5.
- Chen, K., M. J. Jin, et al. (2005). "[A case-control study on the association between genetic polymorphisms of metabolic enzymes and the risk of colorectal cancer]." Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi **26**(9): 659-64.
- Conney, A. H., R. L. Chang, et al. (1994). "Studies on the metabolism of benzo[a]pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite." Drug Metab Rev **26**(1-2): 125-63.
- Cosma, G., F. Crofts, et al. (1993). "Relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene." J Toxicol Environ Health **40**(2-3): 309-16.
- Crofts, F., G. N. Cosma, et al. (1993). "A novel CYP1A1 gene polymorphism in African-Americans." Carcinogenesis **14**(9): 1729-31.
- Crofts, F., E. Taioli, et al. (1994). "Functional significance of different human CYP1A1 genotypes." Carcinogenesis **15**(12): 2961-3.
- Darmon, E., K. R. Cleary, et al. (1994). "Immunohistochemical analysis of p53 overexpression in human colonic tumors." Cancer Detect Prev **18**(3): 187-95.
- de Jong, D. J., E. M. van der Logt, et al. (2003). "Genetic polymorphisms in biotransformation enzymes in Crohn's disease: association with microsomal epoxide hydrolase." Gut **52**(4): 547-51.
- de la Chapelle, A. (2004). "Genetic predisposition to colorectal cancer." Nat Rev Cancer **4**(10): 769-80.
- Drakoulis, N., I. Cascorbi, et al. (1994). "Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3'-flanking region." Clin Investig **72**(3): 240-8.
- Fan, C. H., M. J. Jin, et al. (2006). "[Association between genetic polymorphisms of metabolic enzymes and susceptibility of colorectal cancer]." Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi **40**(1): 13-7.

- Gaikovitch, E. A., I. Cascorbi, et al. (2003). "Polymorphisms of drug-metabolizing enzymes CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP1A1, NAT2 and of P-glycoprotein in a Russian population." Eur J Clin Pharmacol **59**(4): 303-12.
- Gandini, S., E. Botteri, et al. (2008). "Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis." Int J Cancer **122**(1): 155-64.
- Garte, S. (1998). "The role of ethnicity in cancer susceptibility gene polymorphisms: the example of CYP1A1." Carcinogenesis **19**(8): 1329-32.
- Garte, S., L. Gaspari, et al. (2001). "Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(12): 1239-48.
- Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland, G. (2006). Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends.
- Giovannucci, E. (2001). "An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **10**(7): 725-31.
- Goode, E. L., A. M. Dunning, et al. (2002). "Effect of germ-line genetic variation on breast cancer survival in a population-based study." Cancer Res **62**(11): 3052-7.
- Gorber, S. C., S. Schofield-Hurwitz, et al. (2009). "The accuracy of self-reported smoking: a systematic review of the relationship between self-reported and cotinine-assessed smoking status." Nicotine Tob Res **11**(1): 12-24.
- Grando, J. P., H. Kuasne, et al. (2009). "Association between polymorphisms in the biometabolism genes CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 in bladder cancer." Clin Exp Med **9**(1): 21-8.
- Hayashi, S., J. Watanabe, et al. (1991). "Genetic linkage of lung cancer-associated Mspl polymorphisms with amino acid replacement in the heme binding region of the human cytochrome P450IA1 gene." J Biochem (Tokyo) **110**(3): 407-11.
- Hayashi, S., Watanabe, J., Kawajiri, K. (1991). Expression of two types of CYP1A1 cDNAs in yeast cells. . Tokyo: Proceedings of the Japanese Biochemical Society, 64th. Annual Meeting.
- Hecht, S. S. (1999). "Tobacco smoke carcinogens and lung cancer." J Natl Cancer Inst **91**(14): 1194-210.
- Hecht, S. S. (2003). "Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer." Nat Rev Cancer **3**(10): 733-44.

- Hou, L., N. Chatterjee, et al. (2005). "CYP1A1 Val462 and NQO1 Ser187 polymorphisms, cigarette use, and risk for colorectal adenoma." Carcinogenesis **26**(6): 1122-8.
- Huber, A., E. K. Bentz, et al. (2005). "Ten polymorphisms of estrogen-metabolizing genes and a family history of colon cancer--an association study of multiple gene-gene interactions." J Soc Gynecol Investig **12**(7): e51-4.
- Inoue, H., C. Kiyohara, et al. (2000). "Cigarette smoking, CYP1A1 MspI and GSTM1 genotypes, and colorectal adenomas." Cancer Res **60**(14): 3749-52.
- Inoue, K., T. Asao, et al. (2000). "Ethnic-related differences in the frequency distribution of genetic polymorphisms in the CYP1A1 and CYP1B1 genes in Japanese and Caucasian populations." Xenobiotica **30**(3): 285-95.
- Ishibe, N., M. Stampfer, et al. (2000). "A prospective study of cytochrome P450 1A1 polymorphisms and colorectal cancer risk in men." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **9**(8): 855-6.
- Jaiswal, A. K., F. J. Gonzalez, et al. (1985). "Human P1-450 gene sequence and correlation of mRNA with genetic differences in benzo[a]pyrene metabolism." Nucleic Acids Res **13**(12): 4503-20.
- Kawajiri, K., H. Eguchi, et al. (1996). "Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer." Cancer Res **56**(1): 72-6.
- Kawajiri, K., K. Nakachi, et al. (1993). "The CYP1A1 gene and cancer susceptibility." Crit Rev Oncol Hematol **14**(1): 77-87.
- Kawajiri, K., K. Nakachi, et al. (1990). "Identification of genetically high risk individuals to lung cancer by DNA polymorphisms of the cytochrome P450IA1 gene." FEBS Lett **263**(1): 131-3.
- Kellermann, G., M. Luyten-Kellermann, et al. (1973). "Genetic variation of aryl hydrocarbon hydroxylase in human lymphocytes." Am J Hum Genet **25**(3): 327-31.
- Kihara, M., M. Kihara, et al. (1995). "Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of CYP1A1 and GSTM1 gene polymorphisms in a Japanese population." Carcinogenesis **16**(10): 2331-6.
- Kiss, I., J. Sandor, et al. (2000). "Colorectal cancer risk in relation to genetic polymorphism of cytochrome P450 1A1, 2E1, and glutathione-S-transferase M1 enzymes." Anticancer Res **20**(1B): 519-22.
- Kiyohara, C. (2000). "Genetic polymorphism of enzymes involved in xenobiotic metabolism and the risk of colorectal cancer." J Epidemiol **10**(5): 349-60.

- Kiyohara, C., T. Hirohata, et al. (1996). "The relationship between aryl hydrocarbon hydroxylase and polymorphisms of the CYP1A1 gene." Jpn J Cancer Res **87**(1): 18-24.
- Kobayashi, M., T. Otani, et al. (2009). "Association between dietary heterocyclic amine levels, genetic polymorphisms of NAT2, CYP1A1, and CYP1A2 and risk of colorectal cancer: A hospital-based case-control study in Japan." Scand J Gastroenterol: 1-8.
- Landi, S., F. Gemignani, et al. (2005). "A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of colorectal cancer." Pharmacogenet Genomics **15**(8): 535-46.
- Le Marchand, L., C. Guo, et al. (2003). "Pooled analysis of the CYP1A1 exon 7 polymorphism and lung cancer (United States)." Cancer Causes Control **14**(4): 339-46.
- Le Marchand, L., L. R. Wilkens, et al. (1997). "Associations of sedentary lifestyle, obesity, smoking, alcohol use, and diabetes with the risk of colorectal cancer." Cancer Res **57**(21): 4787-94.
- Le Marchand, L., L. P. Zhao, et al. (1996). "Family history and risk of colorectal cancer in the multiethnic population of Hawaii." Am J Epidemiol **144**(12): 1122-8.
- Little, J., L. Sharp, et al. (2006). "Colorectal cancer and genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1: a case-control study in the Grampian region of Scotland." Int J Cancer **119**(9): 2155-64.
- McLemore, T. L., S. Adelberg, et al. (1990). "Expression of CYP1A1 gene in patients with lung cancer: evidence for cigarette smoke-induced gene expression in normal lung tissue and for altered gene regulation in primary pulmonary carcinomas." J Natl Cancer Inst **82**(16): 1333-9.
- Micka, J., A. Milatovich, et al. (1997). "Human Ah receptor (AHR) gene: localization to 7p15 and suggestive correlation of polymorphism with CYP1A1 inducibility." Pharmacogenetics **7**(2): 95-101.
- Mooney, L. A., D. A. Bell, et al. (1997). "Contribution of genetic and nutritional factors to DNA damage in heavy smokers." Carcinogenesis **18**(3): 503-9.
- Mrozikiewicz, P. M., I. Cascorbi, et al. (1997). "CYP1A1 mutations 4887A, 4889G, 5639C and 6235C in the Polish population and their allelic linkage, determined by peptide nucleic acid-mediated PCR clamping." Pharmacogenetics **7**(4): 303-7.
- Murtaugh, M. A., C. Sweeney, et al. (2005). "The CYP1A1 genotype may alter the association of meat consumption patterns and preparation with the risk of colorectal cancer in men and women." J Nutr **135**(2): 179-86.

- Nelson, D. R., L. Koymans, et al. (1996). "P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature." Pharmacogenetics **6**(1): 1-42.
- Osada, H. and T. Takahashi (2002). "Genetic alterations of multiple tumor suppressors and oncogenes in the carcinogenesis and progression of lung cancer." Oncogene **21**(48): 7421-34.
- Pastorelli, R., M. Guanci, et al. (1998). "Impact of inherited polymorphisms in glutathione S-transferase M1, microsomal epoxide hydrolase, cytochrome P450 enzymes on DNA, and blood protein adducts of benzo(a)pyrene-diolepoxide." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(8): 703-9.
- Pelkonen, O. and D. W. Nebert (1982). "Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: etiologic role in carcinogenesis." Pharmacol Rev **34**(2): 189-222.
- Pereira Serafim, P. V., I. D. Cotrim Guerreiro da Silva, et al. (2008). "Relationship between genetic polymorphism of CYP1A1 at codon 462 (Ile462Val) in colorectal cancer." Int J Biol Markers **23**(1): 18-23.
- Persson, I., I. Johansson, et al. (1997). "In vitro kinetics of two human CYP1A1 variant enzymes suggested to be associated with interindividual differences in cancer susceptibility." Biochem Biophys Res Commun **231**(1): 227-30.
- Pfeifer, G. P., M. F. Denissenko, et al. (2002). "Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers." Oncogene **21**(48): 7435-51.
- Phillips, D. H. (2002). "Smoking-related DNA and protein adducts in human tissues." Carcinogenesis **23**(12): 1979-2004.
- Phillips, D. H., A. Hewer, et al. (1988). "Correlation of DNA adduct levels in human lung with cigarette smoking." Nature **336**(6201): 790-2.
- Quinones, L., F. Berthou, et al. (1999). "Ethnic susceptibility to lung cancer: differences in CYP2E1, CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms between French Caucasian and Chilean populations." Cancer Lett **141**(1-2): 167-71.
- Quinones, L., D. Lucas, et al. (2001). "CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 genetic polymorphisms. The effect of single and combined genotypes on lung cancer susceptibility in Chilean people." Cancer Lett **174**(1): 35-44.
- Rashid, A., M. Zahurak, et al. (1999). "Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas." Gut **44**(6): 826-33.

- Rendic, S. (2002). "Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data." Drug Metab Rev **34**(1-2): 83-448.
- Rojas, M., I. Cascorbi, et al. (2000). "Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism." Carcinogenesis **21**(1): 35-41.
- Sachse, C., G. Smith, et al. (2002). "A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer." Carcinogenesis **23**(11): 1839-49.
- Sanyal, M. K., Y. L. Li, et al. (1994). "Metabolism of polynuclear aromatic hydrocarbon in human term placenta influenced by cigarette smoke exposure." Reprod Toxicol **8**(5): 411-8.
- Sasaki, Y. F., A. Saga, et al. (1998). "Colon-specific genotoxicity of heterocyclic amines detected by the modified alkaline single cell gel electrophoresis assay of multiple mouse organs." Mutat Res **414**(1-3): 9-14.
- Schoket, B., G. Papp, et al. (2001). "Impact of metabolic genotypes on levels of biomarkers of genotoxic exposure." Mutat Res **482**(1-2): 57-69.
- Schwarz, D., P. Kisselev, et al. (2001). "Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants." Carcinogenesis **22**(3): 453-9.
- Shields, P. G., E. D. Bowman, et al. (1993). "Polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in human lung and cancer susceptibility genes." Cancer Res **53**(15): 3486-92.
- Shimada, T. (2006). "Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons." Drug Metab Pharmacokinet **21**(4): 257-76.
- Shimada, T., C. H. Yun, et al. (1992). "Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens." Mol Pharmacol **41**(5): 856-64.
- Shou, M., F. J. Gonzalez, et al. (1996). "Stereoselective epoxidation and hydration at the K-region of polycyclic aromatic hydrocarbons by cDNA-expressed cytochromes P450 1A1, 1A2, and epoxide hydrolase." Biochemistry **35**(49): 15807-13.
- Sinha, R., M. Kulldorff, et al. (2005). "Dietary benzo[a]pyrene intake and risk of colorectal adenoma." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(8): 2030-4.

- Sinha, R., U. Peters, et al. (2005). "Meat, meat cooking methods and preservation, and risk for colorectal adenoma." Cancer Res **65**(17): 8034-41.
- Sivaraman, L., M. P. Leatham, et al. (1994). "CYP1A1 genetic polymorphisms and in situ colorectal cancer." Cancer Res **54**(14): 3692-5.
- Slattery, M. L., W. Samowitz, et al. (2004). "CYP1A1, cigarette smoking, and colon and rectal cancer." Am J Epidemiol **160**(9): 842-52.
- Smart, J. and A. K. Daly (2000). "Variation in induced CYP1A1 levels: relationship to CYP1A1, Ah receptor and GSTM1 polymorphisms." Pharmacogenetics **10**(1): 11-24.
- Spurr, N. K., A. C. Gough, et al. (1987). "Msp-1 polymorphism detected with a cDNA probe for the P-450 I family on chromosome 15." Nucleic Acids Res **15**(14): 5901.
- Sugimura, H., K. Wakai, et al. (1998). "Association of Ile462Val (Exon 7) polymorphism of cytochrome P450 IA1 with lung cancer in the Asian population: further evidence from a case-control study in Okinawa." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **7**(5): 413-7.
- Surekha, D., K. Sailaja, et al. (2009). "Association of CYP1A1*2 polymorphisms with breast cancer risk: a case control study." Indian J Med Sci **63**(1): 13-20.
- Swanson, H. I. and C. A. Bradfield (1993). "The AH-receptor: genetics, structure and function." Pharmacogenetics **3**(5): 213-30.
- Tanimoto, K., S. Hayashi, et al. (1999). "Polymorphisms of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose." Oral Oncol **35**(2): 191-6.
- Thelen, K. and J. B. Dressman (2009). "Cytochrome P450-mediated metabolism in the human gut wall." J Pharm Pharmacol **61**(5): 541-58.
- Timofeeva, M. N., S. Kropp, et al. (2009). "CYP450 polymorphisms as risk factors for early-onset lung cancer: gender-specific differences." Carcinogenesis **30**(7): 1161-9.
- Varela-Lema, L., E. Taioli, et al. (2008). "Meta-analysis and pooled analysis of GSTM1 and CYP1A1 polymorphisms and oral and pharyngeal cancers: a HuGE-GSEC review." Genet Med **10**(6): 369-84.
- Vineis, P., F. Veglia, et al. (2003). "CYP1A1 T3801 C polymorphism and lung cancer: a pooled analysis of 2451 cases and 3358 controls." Int J Cancer **104**(5): 650-7.

- Wogan, G. N., S. S. Hecht, et al. (2004). "Environmental and chemical carcinogenesis." Semin Cancer Biol **14**(6): 473-86.
- Wolf, A., A. Kutz, et al. (2005). "The effect of benzo(a)pyrene on porcine urinary bladder epithelial cells analyzed for the expression of selected genes and cellular toxicological endpoints." Toxicology **207**(2): 255-69.
- World Health Organisation, W. (2006). Facts about Cancer.
- Ye, Z. and J. M. Parry (2002). "Genetic polymorphisms in the cytochrome P450 1A1, glutathione S-transferase M1 and T1, and susceptibility to colon cancer." Teratog Carcinog Mutagen **22**(5): 385-92.
- Zhang, Z. Y., M. J. Fasco, et al. (1996). "Characterization of purified human recombinant cytochrome P4501A1-Ile462 and -Val462: assessment of a role for the rare allele in carcinogenesis." Cancer Res **56**(17): 3926-33.
- Zhuo, W. L., Y. Wang, et al. (2009). "Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 and laryngeal cancer risk: evidence-based meta-analyses." J Cancer Res Clin Oncol **135**(8): 1081-90.
- Zhuo, W. L., Y. S. Zhang, et al. (2009). "Association studies of CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms with esophageal cancer risk: evidence-based meta-analyses." Arch Med Res **40**(3): 169-79.

7 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Gabriele Laschinski für die gründliche und intensive Betreuung meiner Arbeit. Weiterhin möchte ich mich für die investierte Zeit und die konstante Unterstützung in der Umsetzung der Arbeit bedanken.

Herrn Prof. Dr. Roots danke ich für die Überlassung des Themas und für die fortwährende und über die Arbeit hinausgehende Unterstützung, die mir seinerseits zuteil wurde.

Herrn Dr. Goldammer danke ich für seine umfassende Betreuung während des praktischen Teiles, der Auswertung und der ersten Niederschrift der Arbeit. Der intensive Kontakt verbunden mit zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen hat mein Verständnis für Wissenschaftliche Fragestellungen nachhaltig beeinflusst und bereichert.

Für die technische Unterstützung im Labor während der Durchführung des praktischen Teiles möchte ich mich herzlich bei Frau Maszynski bedanken.

Für die immer angenehme Arbeitsatmosphäre und die netten Gespräche im Labor möchte ich bei Frau Anspach, Dr. S. Bauer, Frau C. Buch, Dr. J. Flügge, Frau Dr. I. Mai, Frau P. Pietsch, Frau B. Schwaneberg, Frau S. Sohi und bei all den weiteren Doktoranden und Wissenschaftlern bedanken.

Meiner Kollegin Dr. med. Juliane Bolbrinker möchte ich für ihre spontane Unterstützung bei der Auswertung der Daten und für die zahlreichen Anfragen während der gemeinsamen Arbeit bedanken.

Mein Dank außerdem an meine Familie und an meine Freunde, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.

8 Lebenslauf

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

9 Erklärung

„Ich, Michael Thomae, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Genetische Varianten des Cytochrom P 450 1A1 als Suszeptibilitätsfaktor für kolorektale Karzinome“ 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: 20.07.2009

Unterschrift: