

**Assoziation des Cytochrom P450 1B1
Codon 432-Polymorphismus
mit somatischen p53- und k-ras-Mutationen
beim kolorektalen Karzinom**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Tim Philip Redlich
Lüneburg

2010

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. med. T. Neuhaus
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Brossart

Tag der Mündlichen Prüfung: 09. April 2010

St. Vincenz Krankenhaus, Limburg
in Kooperation mit
der Medizinischen Klinik III, Bonn
Direktor: Prof. Dr. Brossart
ehemals:
mit der Medizinischen Universitäts-Poliklinik, Bonn
Direktor: Prof. Dr. H. Vetter

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	9
1.1 Kolorektales Karzinom	9
1.1.1 Risikofaktoren	10
1.2 Kanzerogenese	11
1.3 Zellzyklus	15
1.4 Onkogene	16
1.5 Tumorsuppressorgene	17
1.6 p53	18
1.6.1 Gen	19
1.6.2 Protein	19
1.6.3 Funktion	22
1.6.4 Mutation	23
1.7 k-ras	25
1.7.1 Funktion	25
1.7.2 Mutation	27
1.8 Fremdstoffmetabolismus	28
1.8.1 Cytochrom P450-Enzymsystem	30
1.8.2 CYP1B1	32
1.10 Zielsetzung der Arbeit	36
2. Material und Methoden	39
2.1 Studiengruppe und Probenmaterial	39
2.2 DNS-Extraktion	39
2.3 Polymerase-Kettenreaktion	40
2.4 Primer Test	44
2.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	44
2.7 Sequenzierung	46
2.8 Mutationsanalyse	48
2.9 Klonierung	51
2.9.1 Transformation	52
2.9.2 Herstellung der Agarplatten	53
2.9.3 Beurteilung der Kolonien	53
2.9.4 Polymerase-Kettenreaktion	54
2.10 Primer	56
2.11 Genotyp-Analyse des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus	57
2.12 Statistische Auswertung	58
2.13 Verwendete Geräte und Materialien	59
3. Ergebnisse	61
3.1 Genotyp-Verteilung des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus	61
3.2 Genotyp-Verteilung des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus bei Rauchern	61
3.3 Genotyp-Verteilung des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus bei Kolonkarzinom-Patienten	62

3.4	Assoziation des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus mit somatischen p53-Mutationen in CRC-Gewebeproben in Abhängigkeit des Raucherstatus.....	63
3.5	Assoziation des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus mit somatischen k-ras-Mutationen in CRC-Gewebeproben in Abhängigkeit des Raucherstatus.....	72
4.	Diskussion.....	79
4.1	Bedeutung des Risikofaktors Rauchen.....	82
4.2	Assoziation des Codon 432-Polymorphismus mit p53- und k-ras- Mutationen	85
4.3	Polymorphe Enzyme und p53-Mutationen.....	85
4.4	Mutationsspektrum von p53 und k-ras.....	87
4.5	Einfluss der Ernährungsfaktoren auf die Genese von CRC.....	88
5.	Zusammenfassung.....	90
6.	Literaturverzeichnis.....	92
7.	Danksagung.....	104

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
APC	Adenomatöse Polyposis Coli
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ASS	Acetylsalicylsäure
ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATP	Adenosintriphosphat
BCL2	B-cell lymphoma 2
bp	Basepairs
BRAF	B-rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma
BRCA	Breast Cancer
CDK	Cyclin-dependend kinase
CIN	Chromosomal instability
CO	Kohlenmonoxid
CRC	Kolorektales Karzinom
CYP1B1	Cytochrom P450 1B1
DCC	Deleted in Colorectal Cancer
DNS/DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DRE	Dioxin Responsive Element
E.Coli	Escherichia coli
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FMS	McDonough Strain von Feline Sarcoma Virus
GSTM1	Glutathion-S-Transferase M1
H ₂ O	Wasser
HaMSV	Harvey Strain of Murine Sarcoma Virus
HCD	Highly Conserved Domains
HCL	Salzsäure
HNPCC	Hereditäres nichtpolypöses Kolonkarzinomsyndrom
HPV	Humanes Papilloma Virus
Hsp	Heat shock protein
HWS	Halbwertszeit
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LED	Light Emitted Diode
LOH	Loss of Heterozygosity
Mdm2	Murine Double Minute
MEH	Mikrosomale Epoxid-Hydrolase
MSI	Microsatellite Instability
min	Minute
MMR	Mismatch repair system
m-RNA	Messenger-RNA
mt	Mutante

NADPH	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NGF	Nerve Growth Factor
NLS	Nuclear Localisation Signals
OR	Odds Ratio
PAA	Polyacrylamid
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	p53 Binding Site
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
Rb-Gen	Retinoblastomgen
RFLP	Restriktion-Fragmentlängen-Polymorphismus
RNS/RNA	Ribonukleinsäure
SER	Samtenes endoplasmatisches Retikulum
S-Phase	Synthesephase
Taq-Polymerase	Thermostabile Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TCDD	2,3,7,8 Tetrachlordibenzo-p-dioxin
TS	Tumorsupressor
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
USA	United States of Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vmax	Maximalgeschwindigkeit
W	Watt
WAF1/Cip1	Regulatorgen der CDK-Aktivität, Genprodukt p21
wt	Wildtyp
X-GAL	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-?-D-Galaktopyranosid

1. Einleitung

1.1 Kolorektales Karzinom

Krebserkrankungen stellen in den Industrienationen neben den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die Haupttodesursache dar. Nach Lungenkrebs bei Männern und Brustkrebs bei Frauen ist das kolorektale Karzinom (CRC) das zweithäufigste Karzinom. 9 % aller Malignomtodesfälle sind auf CRC zurückzuführen. Der Anteil der CRC an der Gesamtkrebsmortalität beträgt bei Männern etwa 12 % und bei Frauen etwa 14 % (Ahlquist et al., 2000). Die Zahl der Neuerkrankungen wird in Deutschland für beide Geschlechter jeweils auf etwas über 35000 geschätzt (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., 2006).

Unter dem Begriff kolorektales Karzinom werden das Malignom des Kolons sowie des Rektums zusammengefasst. Als makroskopische Grenzlinie gilt eine Distanz von 16 cm zwischen aboralem Tumorrand und Anokutanlinie. Über 60 % der kolorektalen Karzinome finden sich im Rektum. Weitere 20 % sitzen im Sigmoid, wobei sich ca. 70 % der Karzinome im sigmorektalen Übergang befinden und somit digital-rektal sowie rektoskopisch erfassbar sind. Histologisch handelt es sich zu über 95 % um Adenokarzinome, bei den übrigen 5 % handelt es sich um Plattenepithelkarzinome des Analkanals, Leiomyosarkome, maligne Melanome sowie maligne Karzinoide. In dieser Arbeit wird ausschließlich auf Adenokarzinome Bezug genommen.

Obwohl das Kolonkarzinom streng genommen vom Rektumkarzinom zu trennen ist, wird aufgrund der Nomenklatur des CRC eine Zusammenfassung beider Karzinome vorgenommen. Die Trennung der beiden Formen liegt erst wenige Jahre zurück, so dass auch heute noch in großen Studien vom CRC als Einheit gesprochen wird (Herold, 2001).

Darmkrebs ist für die Forschung interessant, da er sich häufig über gut charakterisierte morphologische Stadien hinweg entwickelt. Angefangen mit dem Polypen über das Adenom hin zum Karzinom (innerhalb von 10 – 15 Jahren) folgt diese Entwicklung dem multi-hit-Modell der Krebsentstehung durch Akkumulation verschiedener genetischer Veränderungen.

Dank der fortschreitenden Entschlüsselung der zellulären Signaltransduktion konnten neue Zielstrukturen für antineoplastische Therapieansätze erarbeitet werden, die in Ergänzung zur Chemotherapie ein verbessertes Langzeitüberleben sichern sollen. Außerdem wird an Screeningmethoden gearbeitet, die eine Risikogenanalyse aus Stuhlproben ermöglichen, da diese eine weitaus höhere Sensitivität als die bisherigen Untersuchungen auf okkultes Blut im Stuhl aufweisen (Mandel et al., 2000).

1.1.1 Risikofaktoren

70 % aller kolorektalen Karzinome treten sporadisch, ohne familiäre Häufung auf. Die meisten der betroffenen Patienten sind über 50 Jahre alt.

Bis zu 25 % der Karzinome werden bei Patienten mit positiver Familienanamnese gefunden, bei weiteren 5-10 % liegen obligate Praekanzerosen wie die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder das Peutz-Jeghers-Syndrom vor.

Folgende potenzielle Auslöser sind bekannt:

a.) Umweltfaktoren:

Für die Entstehung des kolorektalen Karzinoms sind Umweltfaktoren sowie Ernährungsgewohnheiten von entscheidender Bedeutung und Gegenstand zahlreicher Studien. Dies bestätigt die Beobachtung, dass aus einem Land mit niedriger Prävalenz in Länder mit hoher Prävalenz immigrierte Menschen das Risiko des Gastlandes annehmen, sobald sich ihr Lebensstil adaptiert hat, d.h. in der zweiten oder dritten Generation (Herold, 2001).

Wird rotes Fleisch bei hohen Temperaturen gegrillt, entstehen schädliche aromatische Amine (de Verdier und Longnecker, 1992). Bei gleichzeitigem Verzehr tierischer Fette und von Nahrung mit niedrigem Pflanzenfaseranteil führt dies zu intestinaler Stase. Damit erhöht sich die Kontaktzeit einer potenziellen Noxe mit der Darmmukosa, was zu Schleimhautveränderungen führen kann. Des Weiteren gelten langes Sitzen und Bewegungsmangel als Risikofaktoren für die Entwicklung eines CRC (Longnecker et al., 1995). Ebenso sind bestimmte Bakterienprodukte wie Desoxycholsäure und Lithocholsäure als kanzerogen bekannt.

Protektiv wirkt der regelmäßige Konsum von Acetylsalicylsäure (ASS) (Thun et al., 1991), die regelmäßige Einnahme oraler Kontrazeptiva bzw. eine Hormonersatztherapie

(Calle et al., 1995) sowie eine ausgewogene Ernährung mit Früchten, Gemüse, Milch, Vitamin C und Folsäure. Diese Stoffe sind vermutlich in der Lage, die Inzidenz des CRC zu senken, wenngleich die epidemiologischen Daten diesbezüglich nicht einheitlich sind. Die Auswirkungen der beruflichen Exposition gegenüber verschiedenen potenziell karzinogenen Noxen werden zur Zeit noch untersucht.

b.) Genetische Faktoren:

Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) ist als obligate Praekanzerosen für ca. 1 % aller kolorektalen Karzinome verantwortlich. Eine positive Familienanamnese erhöht das individuelle Risiko an Darmkrebs zu erkranken ebenso wie das Vorhandensein des hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinomsyndroms (HNPCC). Dieses zeigt sich bei ca. 5 % aller CRC (Anwar et al., 2000).

c.) Risikoerkrankungen:

Alle Erkrankungen, die eine andauernde Entzündungsreaktion des Darmepithels hervorrufen, müssen als potenziell kanzerogen eingestuft werden. Besonders zu nennen sind hier aufgrund der relativen hohen Inzidenz bei jungen Menschen die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und M. Crohn (Mellekjær et al., 1995, Tanaka et al., 2000).

Des Weiteren spielt Zigarettenkonsum eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Malignoms. Alkoholkonsum hingegen scheint die Darmkrebsentstehung nicht wesentlich zu beeinflussen. Es kann eventuell als sogenanntes Kokarzinogen gewertet werden (La Vecchia et al., 1994).

1.2 Kanzerogenese

Somatische Mutationen treten unvermeidlich in jedem Individuum auf. Typische Mutationsraten beim Menschen betragen 10^{-5} bis 10^{-7} pro Gen und Generation, ohne dass daraus eine unmittelbare Bedrohung für den Organismus entsteht. Dies ist erst der Fall, sobald die Mutation eine Proliferation einer Zelle verursacht, die normalerweise nicht replizieren würde, so dass ein Klon mutierter Zellen entsteht.

Eine mutierte Zelle kommt nur dann zur Ausprägung, wenn sie sich dadurch einen Proliferationsvorteil (bzw. Reproduktionsvorteil) verschafft hat. Hierfür müssen höhere Kontrollmechanismen umgangen werden, die die Aufgabe haben, diese veränderte Zelle zu eliminieren. Krebs entsteht als logische Folge am Ende einer Zellevolution, wenn es

dem Organismus nicht gelingt, diese Weiterentwicklung zu verhindern. Einer der Kontrollmechanismen wird Apoptose genannt. Hierbei leitet der Körper die sofortige Elimination einer Zelle ein, die er als potenziell maligne erkannt hat.

Damit eine Zelle maligne entartet, bedarf es mindestens sechs verschiedener Mutationen. Bei einer natürlichen Mutationsrate von 10^{-6} ist es sehr unwahrscheinlich, dass ein Mensch in seiner Lebenszeit eine maligne Entartung erlebt (Loeb, 1991). Es sei denn:

1. Die Zellproliferation wird durch eine Mutation gesteigert.
2. Es gibt Mutationen, die die Genomstabilität verringern und so eine erhöhte Mutationsrate bedingen.

Für den ersten Fall sind die Onkogene verantwortlich, weil sie aktiv die Zellproliferation fördern.

Beim zweiten Fall spielen Tumorsuppressorgene eine wichtige Rolle, da sie die Zellproliferation hemmen. Dieser Hemmmechanismus kann durch eine Mutation der Tumorsuppressorgene aufgehoben werden.

Aktuell sind drei Wege der Kanzerogenese für das CRC bekannt:

a. CIN (chromosomal instability pathway)

Hier wird eine stufenweise Veränderung einer gutartigen Mukosazelle in eine maligne Zelle in Form der Adenom-Karzinom-Sequenz beschrieben. Wesentlich hier ist die Mutation der Gene APC, k-ras, DCC und p53.

b. MSI (microsatellite instability)

Diese resultiert aus einer Keimbahnmutation von mismatch-Reparaturgenen, wie es bei HNPCC zu beobachten ist.

c. Methylierung

Die Methylierung von DNS ist ein wesentlicher Schritt der Gentranskription, der sich ubiquitär in den Körperzellen nachweisen lässt. Es finden sich enge Zusammenhänge mit MSI. Nicht nur aus diesem Grund steht dieser Weg im Fokus wissenschaftlichen Interesses.

Im Folgenden wird näher auf die ersten beiden Modelle der Kanzerogenese eingegangen. Im Zusammenhang mit der CIN zeigten Fearon und Vogelstein 1990, dass durch den Kopieverlust des Adenomatösen Polyposis Coli (APC)-Gens auf 5q21

adenomatöse Polypen im Darm entstehen können. Schon diese frühe Läsion muss deshalb als potenziell praekancerös angesehen werden. Damit Darmkrebs entsteht, sind noch weitere Mutationen nötig. Dazu gehören insbesondere Mutationen im k-ras-, Deleted in Colorectal Cancer (DCC)- und p53-Gen.

Eine Mutation im Tumorsuppressorgen APC in einer einzigen Epithelzelle löst Zellteilungen aus, während sich die umgebenden Zellen nicht teilen. Es entsteht eine Wucherung von lokalen, gutartigen (benignen) Tumorzellen, die als Polyp bezeichnet wird. Die Frequenz von Mutationen in APC oder β -catenin in frühen Adenomen wird mit über 80 % angegeben (Takayama et al., 2001). In Karzinomen des Kolons können aberrante Formen von APC in ca. 60 %, in Karzinomen des Rektums sogar in bis zu 82 % nachgewiesen werden (Jass et al., 2002) Durch weitere Mutationen entsteht konstitutiv aktives ras, während die zwei Tumorsuppressorgene DCC und p53 inaktiviert werden. Dadurch entsteht nach insgesamt vier Mutationen eine maligne Zelle. Diese Zelle teilt sich weiter, wobei deren Nachkommen die gewebeumhüllende Basallamina infiltrieren. Einige Tumorzellen brechen in Blutgefäße ein, wodurch sie in andere Körperregionen verteilt werden (Metastasierung). Aufgrund weiterer Mutationen können die Tumorzellen die Blutgefäße wieder verlassen und wachsen dann in anderen Geweben weiter (Vogelstein et al., 1992).

Die Feststellung, dass sich ein CRC über die Adenom-Karzinom-Sequenz entwickelt, wird durch folgende Beobachtungen gestützt:

1. Frühe Karzinome werden häufig bereits in großen adenomatösen Polypen gefunden. Außerdem befinden sich in der Umgebung von kolorektalen Karzinomen überwiegend auch adenomatöse Polypen.
2. Sowohl bei sporadischen wie vererbten Formen von CRC konnten 10-20 Jahre vor der Erstdiagnose der Krebserkrankung bereits Adenome des Darms diagnostiziert werden.
3. Im Tierversuch entwickeln sich Adenome vor Karzinomen, und Karzinome entwickeln sich einheitlich in adenomatösen Geweben.
4. Durch rechtzeitige Entfernung der Darmpolypen konnte die Inzidenz der CRC gesenkt werden (Winawer et al., 1993).

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Tumorgenese von CRC beschäftigt sich mit der Instabilität der Mikrosatelliten (MSI) (Thibodeau et al., 1993). Mikrosatelliten sind

Wiederholungssequenzen von Nukleotiden, die im Genom verteilt vorliegen. Tumore mit MSI zeigen histopathologische Besonderheiten und einen schnellen Übergang von Adenomen zu Karzinomen des proximalen Kolons. Die Karzinome resultieren aus einem Fehler im mismatch repair system (MMR) während der DNS-Replikation (Soreide et al., 2006 und Hoeijmakers, 2001). Durch eine Mutation des MMR werden Basenfehlpaarungen während des Zellzyklus nicht erkannt bzw. ignoriert. Es erfolgt keine Apoptose, sondern die Zelle darf sich weiter teilen. Die Dysfunktion des MMR liegt in einer Keimbahnmutation begründet, welche zum Beispiel beim Lynch-Syndrom oder dem HNPCC zu beobachten ist.

Auch epigenetische Faktoren können den Prozess der Kanzerogenese positiv beeinflussen. Sie wirken als verstärkender Kofaktor (auch Tumorpromotor genannt). Beispielsweise kommt es durch Interaktion von Membranbestandteilen zu autonomem Wachstum, wenn Zellgrenzen wegen des Verlustes der Kontaktinhibition nicht mehr respektiert werden. Der Ausbruch der Zelle aus dem Verband, resultierend aus dem Versagen der Kontrollmechanismen, kann zu unkontrolliertem Wachstum führen, der Tumorpromotion.

Die Folge aus Tumorinitiation und –promotion ist die paraneoplastische Läsion. Bis zur Entstehung eines malignen Tumors sind jedoch noch weitere genetische Veränderungen nötig (Aktivierung von Proto-Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressoren wie z.B. p53) (Kinzler et al., 2002).

Erlangt der Tumor durch spezielle zelluläre Veränderungen die Fähigkeit zur Metastasierung, bezeichnet man dies als Tumorprogression (Riede et al., 1995)

Bei all den oben genannten Aspekten spielt offensichtlich die Gen-Umwelt-Interaktion eine entscheidende Rolle. Gemeint ist damit die Auswirkung der Genalteration auf Zelleigenschaften durch Umweltfaktoren. Die Autoren sind sich einig, dass diese Interaktion vorhanden und an der Tumorentstehung beteiligt ist. Die Beantwortung der Frage, wie dies genau geschieht, ist sehr komplex und aktuell Gegenstand zahlreicher Studien. Folgende Thesen erscheinen dabei wichtig:

A. Krebsgene werden von Generation zu Generation weitergegeben und können maligne Tumoren bedingen (z.B. BRCA-1 Gen).

B. Suszeptibilitätsgene sind vor allem fremdstoffmetabolisierende Enzyme. Hier zeigen sich Genalterationen als polymorphe Varianten besonders häufig (Caporaso und Goldstein, 1995).

1.3 Zellzyklus

Da im folgenden die verschiedenen Phasen des Zellzyklus erwähnt werden, wird er an dieser Stelle kurz erläutert.

Der Zellzyklus beinhaltet die Abfolge von Phasen der Zellreifung und -teilung eukaryoter Zellen. Dieses Geschehen läuft in vier Phasen ab. Abhängig vom Zelltyp und der Entwicklungsphase dauert ein Zyklus 10-20 Stunden.

Die Interphase umfasst G1-, S- und G2-Phase. Bei der G1-Phase handelt es sich um die postmitotische Ruhephase. In dieser diploiden Interphase kommt es zur kontinuierlichen Erhöhung der RNS- und Proteinsynthese. Folgt auf eine G1-Phase keine S-Phase, so bezeichnet man sie als G0-Phase, wobei die Zellen nicht mehr am Zellzyklus teilnehmen, unter bestimmten Voraussetzungen aber reaktivierbar sind. Dies gilt beispielsweise für ausdifferenzierte Hirnnervenzellen. Außerdem treten Zellen in die G0-Phase ein, sobald ihnen mitogene Stimuli fehlen.

Die folgende S-Phase stellt die Synthesephase der Zelle dar. Der DNS-Gehalt der Zelle wird in dieser Zeit verdoppelt (tetraploid).

Die G2-Phase ist eine sehr kurze Ruhephase (praemitotisch) mit nachfolgender Teilung. Hier können Reparaturen an der DNS vorgenommen werden.

Während der M-Phase (Mitose) halbiert die Zelle nun ihren Chromosomensatz und verteilt diesen auf zwei diploide Tochterzellen. Da in dieser Phase der Zellkern aufgelöst und die DNS entwunden und damit frei zugänglich ist, wird diese Zeit als kritisch in Bezug auf Schäden durch einwirkende Noxen angesehen.

Der Durchlauf eines kompletten Zyklus wird als Generationszeit bezeichnet, deren Länge in einzelnen Geweben unterschiedlich ist. G1-, S- und G2-Phase werden zusammengefasst und als Interphase der Mitose gegenübergestellt. In der Mitose, die sich an die G2-Phase anschließt, werden die Chromosomen in mehreren aufeinanderfolgenden Phasen (Pro-, Meta-, Ana- und Telophase) zu gleichen Teilen auf die Tochterzellen verteilt.

1.4 Onkogene

Als Onkogene bezeichnet man Gene, die Proteine kodieren, welche kultivierte Zellen transformieren können. Proto-Onkogene sind die physiologische Form der durch Mutation oder Deregulation entstehenden aktiven Onkogene, die an der Auslösung der Tumorentstehung einen wichtigen Anteil haben. Die Proto-Onkogene kodieren Proteine, die durch Signalübertragungen die Zellvermehrung und das Zellwachstum steuern. Sie sind für die physiologische Zelldifferenzierung unentbehrlich. Dies geschieht über Signalaufnahme im Bereich der Zellmembran, Signalübermittlung im Zytoplasma und Informationsumwandlung im Zellkern. Ihr dominanter Vererbungsmodus bewirkt, dass bereits die Mutation eines Allels eine übermäßige und/oder nicht zyklusgerechte ungebremste Genexpression auslöst. Folglich stellen Onkogene DNS-Sequenzen dar, die z.B. durch Infektion (über Viren) oder Transfektion (künstlich in eine Zelle eingebracht) oder anderweitig aktiviert ein unkontrolliertes Zellwachstum auslösen.

Deswegen sind Proto-Onkogene einer strengen zellulären Kontrolle unterworfen. Exprimiert werden sie nur in Phasen des embryologischen, adaptiven oder regenerativen Wachstums. Die Veränderung des Proto-Onkogens kann zur Aktivierung und somit zur Bildung von Onkoproteinen führen. Hierfür bedarf es mindestens dreier Schritte:

1. Punktmutationen innerhalb des Proto-Onkogens bewirken, dass das Genprodukt konstitutiv aktiv ist.
2. Durch örtlich begrenzte Verdopplung eines DNS-Abschnittes (Genamplifikation) unter Einschluss eines Proto-Onkogens wird das davon kodierte Protein überexprimiert.
3. Nach chromosomaler Translokation wird ein an der Wachstumsregulation beteiligtes Gen durch einen anderen Promotor gesteuert, so dass die Expression des Genproduktes nicht mehr dem Bedarf entspricht. Dieses wird als Phase der Deregulation bezeichnet.

Das aus Punktmutationen resultierende Onkoprotein unterscheidet sich geringfügig von seiner physiologischen Form. Im Gegensatz dazu werden durch die beiden weiteren Mechanismen Onkogene erzeugt, deren Produkte mit dem normalen Protein identisch sind. Die krebsauslösende Wirkung beruht darauf, dass das Onkoprotein entweder in

einer Zelle exprimiert wird, in der es normalerweise fehlt, oder dass der Gehalt an diesem Protein in der Zelle höher als normal ist.

Durch Expression von Genprodukten in Form von Wachstumsfaktoren (z.B. PDGF), Wachstumsfaktorrezeptoren, transmembranöser Signalübertragung oder tyrosinspezifischer Proteinkinasen entfalten Onkoproteine ihre Wirkung. Ebenso spielen sie in Form von G-Proteinen, Transkriptions- und Replikationsfaktoren eine Rolle (Hanahan und Weinberg, 2000).

Da die Produkte der meisten Proto-Onkogene für den physiologischen Stoffwechsel von Zellen benötigt werden, sind diese Gene im Verlauf der Evolution hoch konservativ geworden. Das bedeutet, dass eine Veränderung des kodierenden Gens nicht akzeptiert wird, was in der zugehörigen Zelle zum Zelltod durch Apoptose führt.

Die Produkte zellulärer Onkogene lassen sich auf der Grundlage ihrer drei wesentlichen biochemischen Wirkungsmechanismen einteilen:

- a. Phosphorylierung von Proteinen eines Signalweges,
- b. Signaltransduktion von GTPasen,
- c. Wirkung als nukleäres Protein im Zellkern bei der Kontrolle von DNS-Replikation im Zellzyklus.

1.5 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene stellen eine Gruppe von rezessiven Genen dar, die unter physiologischen Bedingungen die Zellvermehrung unterbrechen bzw. den Zellzyklus verzögern. Sie sorgen somit für die Zeit, die die Zelle zur Differenzierung benötigt. Man bezeichnet diese Gruppe auch als rezessive Onkogene oder Anti-Onkogene. Beide Allele des Gens müssen von einer Mutation betroffen sein, um diesen Mechanismus außer Kraft zu setzen. Dies wird als Two-Hit-Hypothese bezeichnet (Knudson, 1971). Dieser Theorie zur Folge findet die erste Veränderung auf Keimbahnebene (erbliche Tumore) statt. Die Mutation des einen Allels wird an alle dieser Keimbahn entstammenden Zellen weitergegeben. Der zweite Schlag erfolgt auf somatischer Ebene und schaltet das zweite Allel aus, was als Loss of heterozygosity (LOH) bezeichnet wird. Hiervon ist dann nur eine einzelne Zelle betroffen. Diese ist unter Umständen nun aber in der Lage, sich unkontrolliert zu vermehren, da das betroffene Gen durch diese Veränderungen einen Funktionsverlust erlitten hat.

Bei sporadischen Mutationen finden beide Schläge auf somatischer Ebene statt. Dadurch zeigen die Zellen unkontrollierte Vermehrung und Proliferation ohne ausreichende Differenzierung. Es gibt kein Maß für den Zeitraum, in dem die beiden Mutationen stattfinden müssen.

Knudson zog für seine Betrachtungen das Retinoblastom heran. Dieser maligne Augentumor zeigt hereditäre und sporadische Formen. Bei der hereditären Form ist die erste Mutation (Verlust des Segmentes 14 auf dem langen Arms des Chromosoms 13) bereits in einem Allel aller Körperzellen vorhanden, während sich bei den sporadischen Fällen zwei Mutationen in einer Retinazelle ereignen müssen, damit diese entartet. Das Gen kodiert physiologisch ein Protein (pRB110) mit tumorsuppressiver Wirkung, indem es den Übergang von der G1 in die S-Phase steuert. Ungehemmtes Tumorwachstum ist die Folge einer Mutation. Dass zum Auslösen der familiären Form nur noch eine somatische Mutation für das Auftreten der Erkrankung von Nöten ist, erklärt, warum der Tumor bereits in jungen Jahren und fast immer beidseitig auftritt.

Da es zweier somatischer Mutationen in einer Retinazelle bedarf, um ein sporadisches Retinoblastom auszulösen, ist erklärbar, dass diese Fälle in der Regel in einem späteren Lebensalter auftreten und zumeist auf ein Auge beschränkt bleiben.

Gleiches gilt auch für die erblich bedingte Prädisposition zur Entwicklung von Brustkrebs im Zusammenhang mit dem Tumorsuppressorgen BRCA1. Frauen mit einem mutierten BRCA1-Gen entwickeln bis zum Alter von 50 Jahren mit einer Wahrscheinlichkeit von 69 % Brustkrebs, bei Trägerinnen von zwei nicht mutierten BRCA1-Genen beträgt dieses 2 %.

Alterationen von Tumorsuppressorgen können somit autonomes Zellwachstum induzieren.

1.6 p53

P53 wurde erstmals 1979 in Simian virus 40-(SV-40) transformierten Zellen beschrieben (Lane und Crawford, 1979). Es stellte sich heraus, dass p53 in einigen Tumorzellen zwar onkogene Eigenschaften besaß, in normalen Zellen hingegen die Tumorgenese positiv unterdrückte. Loss of heterogosity-Tests (LOH) bestätigten p53 als Tumorsuppressor-Gen (TS-Gen). Das Bild von p53 als TS-Gen wird dadurch vervollständigt, dass sich bei Familien mit dem dominant vererbten Li-Fraumeni-

Syndrom konstitutionelle p53-Mutationen finden (Malkin,1994). Betroffene Familienmitglieder leiden an multiplen Primärtumoren (Sarkomen von Weichteilen und Knochen sowie Tumoren von Brust, Hirn und Nebennierenrinde).

Das TS-Protein p53 (TP53), dessen Namen in seinem Molekulargewicht von 53.000 Dalton begründet liegt, wird vom TS-Gen kodiert. Nach Lane et al. (1992) handelt es sich um den wichtigsten Kontrolleur des Zellzyklus, den so genannten Hüter des Genoms. Seine zentrale Aufgabe besteht in der Erhaltung der Integrität des Genoms und der Erkennung und Beseitigung von Schäden an der DNS. Es überwacht die Proliferation und fördert die Differenzierung.

Der Verlust des p53-Gens wird meist im fortgeschrittenen Tumorstadium beobachtet. Die Mutation oder der Verlust von p53 ist vermutlich die häufigste einzelne genetische Veränderung bei Krebs (Prives und Hall, 1999).

Es ist verantwortlich für drei wesentliche Aufgaben: Zellzykluskontrolle, Apoptose und Erhalt der genetischen Stabilität.

1.6.1 Gen

Kartiert ist das TS53-Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 17 in Region 1 Band 3 (17p13) (Mc Bride et al.,1985, und van Tuinen et al., 1987) und erstreckt sich über eine Länge von 20 kb. Es besteht aus 11 Exons und 10 Introns. Exon 1 ist nicht-kodierend. Das 2,8 kb Transkript wird in ein 53-kD nukleäres Phosphorprotein mit 393 Aminosäuren translatiert (Vogelstein und Kinzler,1994). Elemente der Genregulation befinden sich in den Promotorregionen und in den Intronsequenzen. Vermutlich bildet das nicht-kodierende erste Exon eine stabilisierende Haarnadelstruktur, wodurch p53 in der Lage ist, den Transkriptionsvorgang zu kontrollieren. Die m-RNA ist in allen Geweben nachweisbar, in besonders hohen Konzentrationen in Thymus und Milz.

1.6.2 Protein

Das Genprodukt des TS53-Gens stellt ein 393 Aminosäuren langes Phosphorprotein dar. Dieses enthält fünf konservative, während der Entwicklung erhalten gebliebene Domänen, die essentiell für die normale Funktion sind. Sie werden als highly conserved

domains bezeichnet (HCD I-V) (Cadwell und Zambetti, 2001). Das Protein besitzt eine zentrale Region von Aminosäuren (zwischen 100 bis 300), die die DNS-Bindungsstellen beinhaltet. Das Kernstück wird vom C-terminalen Ende sowie dem N-terminalen Ende flankiert, letzteres enthält ein starkes transkriptionsaktivierendes Signal und ist häufig von Mutationen betroffen. Hier findet sich ebenfalls die Bindungsstelle für das zelluläre Onkoprotein murine double minute 2 (Mdm2) (Abb.1) (Chen et al., 1993).

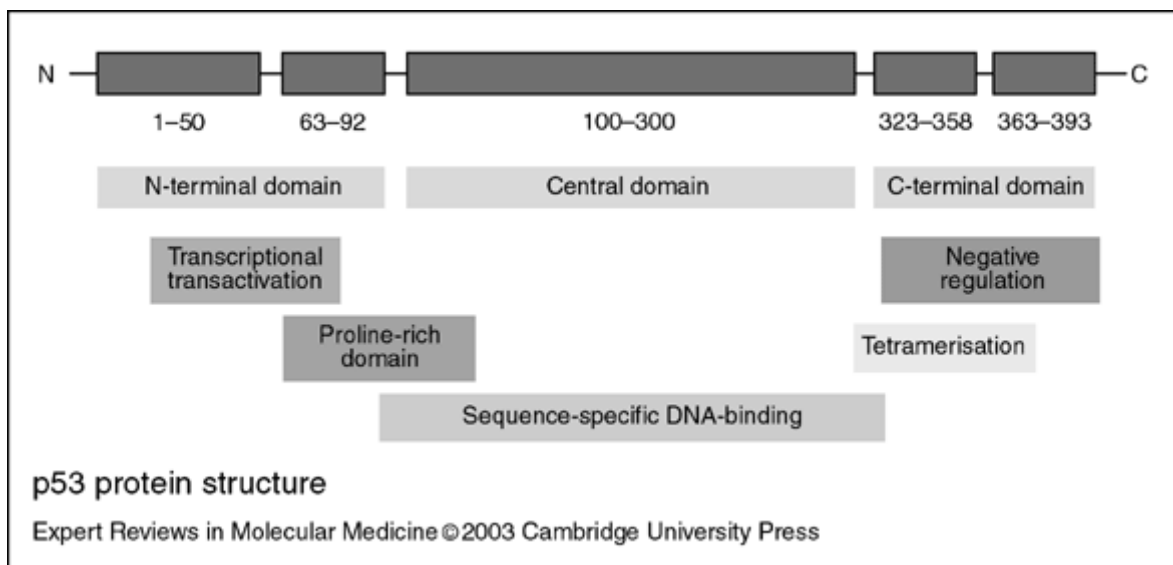


Abb.1: Die Struktur des menschlichen p53-Proteins. Aus: „Expert Reviews in Molecular Medicine 2003 Cambridge University Press“

Die Struktur des Proteins scheint einheitlich zu sein. Im Wesentlichen besteht es aus einem „beta-sandwich“ und drei Schleifen. Die ersten beiden Schleifen binden an die DNS, während die dritte die zweite stabilisiert. Vogelstein und Kinzler erarbeiteten 1992, dass das Wesentliche der Proteinstruktur die Korrelation zu den Mutationsdaten darstellt. Die in mutierten Krebszellen gefundenen missense Mutationen befinden sich zu zwei Dritteln in einer der drei DNS-Schleifen.

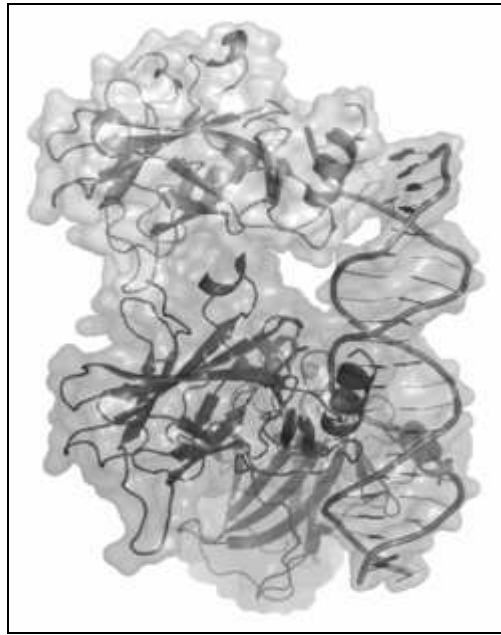


Abb 2.: Die Struktur des menschlichen p53 Proteins, an Desoxyribonukleinsäure gebunden. Aus: „Protein Data Base (PDB 2009)“.

TP53 stellt einen Transkriptionsfaktor dar, der unter normalen Umständen nicht aktiviert ist und mit Hilfe des Mdm2-Proteins in einer Halbwertszeit von 20 Minuten bis zwei Stunden rasch abgebaut wird. Dies erschwert den labortechnischen Nachweis unter normalen Umständen. In Zellen jedoch, die durch äußere Einflüsse (z.B. Röntgenstrahlung oder UV-Licht) geschädigt wurden, kommt es zu einem messbaren intranukleären Konzentrationsanstieg von TP53. Ebenso ist der Nachweis in entsprechend transformierten Zellen erfolgreich, da hier ein stabilisiertes Protein mit einer längeren Halbwertszeit (HWZ) exprimiert wird. Die Zelle mit der geschädigten DNS aktiviert die Apoptose, indem sie p53 mittels spezifischer Checkpoint-Kinasen wie Ataxia telangiectasia mutated Kinasen (ATM) und anderen DNS-abhängigen Protein-Kinasen phosphoryliert (Mills, 2005).

Das C-terminale Ende von TP53 kann ohne Sequenzspezifität an beschädigte, einzelsträngige DNS oder an kurze Fehlpaarungen binden. In der Folge wird die sequenzspezifische Bindungsaktivität der zentralen Domäne aktiviert und die Transkription verschiedener Zielgene induziert. Zudem befinden sich am carboxy-terminalen Ende drei „nuclear localisation signals“ (NLS I-III), die den Transfer des Proteins in den Zellkern sicherstellen. Mutationen in diesem Bereich führen dazu, dass TP53 im Zytoplasma der Zelle akkumuliert. Weiterhin postulierten Vogelstein und Kinzler

ein Modell, in dem TP53 als ein Tetramer an einer 3´gelegenen spezifischen DNS-Region, der TP53 binding site (PBS) bindet und die Expression von abwärts gelegenen Genen aktiviert, die Wachstum und/oder Invasion verhindern.

1.6.3 Funktion

Unter normalen Umständen ist das Gen inaktiv. Die Zelle kann den Zellzyklus regelrecht durchlaufen. Wird ein DNS-Schaden erkannt, wird p53 mittels Checkpoint-Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert. Das hierdurch aktivierte Protein stimuliert die Transkription des Gens, das für das Cyclin-dependend Kinase (CDK)-Inhibitorprotein p21 codiert und aktiviert. Es bindet an den CDK-Cyclin-Komplex der G1-Phase und inaktiviert ihn, so dass der Zellzyklus in der G1-Phase anhält und die S-Phase nicht durchläuft. Die Zelle wird in der G1- oder G2-Phase arretiert, womit sie Zeit für Reparaturmechanismen erhält, bevor schadhafte DNS repliziert werden kann. Ist die Reparatur erfolgreich, so setzt die Zelle den normalen Zellzyklus mit der S-Phase fort. Ansonsten setzt die Apoptose ein. Dies kann durch Downregulation des Proto-Onkogens b-cell lymphoma 2 (BCL2) oder durch Aktivierung des pro-apoptotischen BAX Gens (Kofaktor von p53) erfolgen (Sherr, 1996).

Nach Caelles et al.,1994 hat das Gen p53 nicht die Aufgabe, die Apoptose selbst einzuleiten, sondern es unterdrückt die für das Überleben der Zelle notwendigen Gene. Unter regulären Bedingungen ist das Gen p53 mit seinem Inhibitor assoziiert. Fuchs et al. fanden 1998 heraus, dass C-Jun N-terminale Kinase (JNK) ein Mdm2- unabhängiger Regulator der p53 Stabilität in physiologisch arbeitenden Zellen ist. JNK dient der zellulären Weiterleitung von Reizen, insbesondere von Stresssignalen wie beispielsweise nach UV-Bestrahlung einer Zelle. Zelluläre Angriffspunkte der JNK sind das antiapoptotische BCL2, welches inaktiviert wird, sowie proapoptotische Faktoren wie BAX, welche aktiviert werden.

Eine mutierte Form von p53 kann seine zentrale Aufgabe nicht erfüllen. Die Zelle teilt sich trotz eines DNS-Schadens weiter. Es kommt nicht zur Apoptose, und in der Folge kann es durch multiplizierte Schäden zur Tumorentstehung kommen. Sowohl auf genetischer Ebene durch LOH als auch auf Proteinebene durch Komplexbildung mit exogenen Noxen und endogenen Onkoproteinen ist die Tumorgenese möglich. Die

Inaktivierung von p53 durch eine einzelne Punktmutation an einem Allel kann auch ohne LOH erfolgen. Das mutierte Protein kann innerhalb einer Zelle an das Wildtyp-Protein (wt) binden und tumorigene Eigenschaften auslösen, indem es die physiologische Wirkung des wt-Proteins blockiert.

1.6.4 Mutation

Bei etwa der Hälfte aller Tumoren sind somatische Mutationen im p53-Gen nachweisbar. Eine Keimbahnmutation führt zu einer schweren Krankheit mit drastisch erhöhter Disposition für das Auftreten zahlreicher bösartiger Tumoren, welche als Li-Fraumeni-Syndrom bezeichnet wird.

Mutationen treten bevorzugt in den sequenzspezifischen DNS-bindenden Bereichen auf. Sechs hochkonservative Aminosäuren sind besonders häufig von Mutationen betroffen: Arginin an Position 175, 248, 249, 273 und 282 sowie Glycin an Position 245. Die meisten Mutationen resultieren aus Substitutionen von Basen (missense), die im Protein zum Austausch einer Aminosäure führen. Doch auch Insertionen und Deletionen kommen vor.

Zusammengefasst werden etwa 90 % aller Mutationen in den Exons 5 bis 8 (Codon 126 bis 307) gefunden. Hierbei sind die Mutationen in so genannten Hotspots konzentriert. Diese betreffen in erster Linie die hoch konservativen Bereiche HCD II bis V. Hier erfolgt die spezifische DNS-Bindung (Hollstein et al., 1991).

Vogelstein und Kinzler postulierten 1992 fünf Mechanismen zur Inaktivierung von p53. Der erste (übliche) Weg führt über die Bindung des Tetramers an die PBS zur Expression von Genen, die Wachstum und/oder Invasion verhindern. Sind ein oder beide Allele von p53 mutiert, kommt es nicht mehr zur Ausbildung des Tetramers und somit zur geringeren Expression von wachstumshemmenden Genen. Die zweite Form ist durch Nonsense- oder Splice-Varianten gegeben. Hierbei kann durch Verkürzung des Proteins keine Oligomerisation mehr erfolgen.

Beim Kolonkarzinom finden sich vor allem missense Mutationen, die einen dominant negativen Effekt haben (dritter Mechanismus). Unter missense Mutationen versteht man die Substitution der „richtigen“ Base der DNS durch eine andere, was zum Austausch einer Aminosäure auf Proteinebene führen kann. Somit wird die Anzahl der aktiven

Tetramere deutlich reduziert. Nach Harris und Hollstein (1993) sind 80 % der p53-Mutationen missense Mutationen.

Der vierte Mechanismus, bei dem p53 in die Onkogenese involviert ist, wird überwiegend beim Zervixkarzinom gefunden. Hier wird das Protein E6 durch HPV (meistens Typ 16 und 18) exprimiert, was zur Inaktivität von p53 führt.

Letztendlich kann die Überexpression vom Mdm2-Protein durch Bindung an p53 dessen transkriptionsaktivierende Funktionen blockieren und somit dessen Funktionsverlust am Wildtyp (wt) von p53 herbeiführen (Oliner et al., 1992). Mdm2 hilft in seiner physiologischen Funktion beim Abbau des p53-Proteins in einer Halbwertszeit kleiner zwei Stunden.

Shieh et al. konnten 1997 nachweisen, dass bei DNS-Schäden das ser15 phosphoryliert wird, wodurch die Interaktion zum negativen Regulator von p53, dem Onkoprotein Mdm2, vermindert wird. Somit entstand die These der normalen p53-Aktivierung durch DNS-Schädigung. Unter regulären Bedingungen ist p53 an seinen Inhibitor gebunden. Bei Eintritt eines DNS-Schadens wird es an ser15 phosphoryliert, was zu einer Konformationsänderung führt, die es Mdm2 nicht mehr ermöglicht, an p53 zu binden. Normalerweise bindet Mdm2 an eine N-terminale Sequenz von p53, wodurch dessen Fähigkeit unterdrückt wird, die Transkription von p21 und weiteren Genen zu aktivieren. Gleichzeitig wird nach Bindung von Mdm2 der Abbau von p53 beschleunigt. Mdm2 hemmt demnach die p53-abhängige Arretierung des Zellzyklus und verhindert den Zelltod. Nach der ATM-abhängigen Phosphorylierung von p53, die beispielsweise nach Gamma-Bestrahlung erfolgt, wird Mdm2 von p53 abgelöst und damit gleichzeitig p53 stabilisiert. Da die Transkription des Gens Mdm2 durch p53 aktiviert wird, besteht zwischen Mdm2 und p53 eine selbstregulierende Rückkopplungsschleife, die unter normalen Umständen eine überschießende Aktivität von p53 verhindert. Der erhöhte Mdm2-Spiegel in Tumorzellen erniedrigt den Gehalt an aktiven p53 und verhindert damit die p53-abhängige Arretierung des Zellzyklus nach Bestrahlung (Shieh et al., 1997).

Beim kolorektalen Karzinom fällt die Überexpression von mutiertem p53 auf, während die Adenome des Kolons völlig frei von mutierten p53 Genen sind.

Die Untersuchung von Basaliomen und Plattenepithelkarzinomen der Haut brachte den direkten Zusammenhang von UV-Licht als schädigende Noxe zu Tage. Ausschließlich bei diesen Karzinomen kann ein CC- zu TT-Doppel-Basen-Tausch (Brash et al., 1991)

beobachtet werden. Somit hinterlässt das einwirkende Mutagen eine Art Fingerabdruck in Form seines Mutationsspektrums.

1.7 k-ras

Heute sind drei ras Onkogene (h-ras, k-ras und n-ras) bekannt. Sie kodieren alle 21-kd-Proteine, welche als p21 bezeichnet werden. K-ras befindet sich auf Chromosom 12. Die genaue Lokalisation lautet 12p12.1 (Popescu et al., 1985).

Das zelluläre Onkogen k-ras wurde 1982 von Weinberg in die Gruppe der ras-Familie eingeordnet. K-ras ist mit seiner Länge von 30 kb weitaus länger als h-ras oder n-ras und sehr viel häufiger in maligne Prozesse involviert. Es kann in mutierter Form in etwa 50 % der sporadischen CRCs sowie in über 50 % der Adenome des Kolons, welche größer als ein Zentimeter sind, nachgewiesen werden (Takayama et al., 2001). Schon 1982 fand Pulciani transformierte k-ras Gene in insgesamt acht verschiedenen Karzinomen und Sarkomen.

Giehl konnte 2005 und Miranda 2006 belegen, dass k-ras eine wesentliche Rolle bei der Tumorinvasion und Metastasierung spielt.

1.7.1 Funktion

Ras unterstützt die Signalausendung von der Zelloberfläche zu anderen Zellbereichen. Es spielt eine Rolle, sobald z.B. Rezeptortyrosinkinasen an den Kern signalisieren, um Zellproliferation oder -differenzierung durch Änderung der Genexpression anzuregen. Heute ist bekannt, dass ungefähr 30 % der Tumoren des Menschen eine hyperaktive ras-Mutation aufweisen (Alberts, 2001).

Das ras-Gen gehört zur Familie der Onkogene. Es kodiert GTP-bindende Membranproteine, die an der Kopplung von Wachstumsfaktorrezeptoren mit Effektorproteinen der Zelle beteiligt sind. Durch Mutation kann es seine GTPase-Aktivität verlieren. Dies reicht aus, damit der Mechanismus der Signalabschaltung in der Zellaktivierungskette nicht mehr funktioniert (Abb.3).

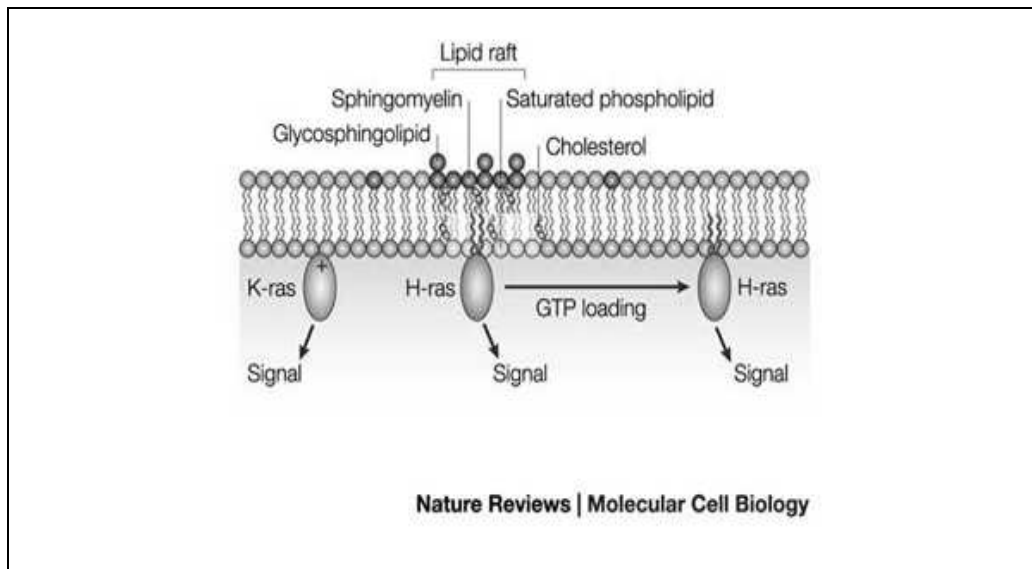


Abb. 3: Guanosin triphosphat-bindendes Membranprotein (ras). Aus: "Nature Reviews, Molecular Cell Biology, 2004".

Es handelt sich beim ras-Protein um ein kleines intrazelluläres Signalprotein, das an der zytosomatischen Seite der Zellmembran liegt. Es wird durch eine Rezeptortyrosinkinase aktiviert. Nahezu alle Rezeptortyrosinkinasen werden an ras-Proteine gekoppelt. Es handelt sich überwiegend um Wachstumsfaktoren, wie z.B. Blutplättchenwachstumsfaktoren wie PDGF, die die Zellproliferation bei der Wundheilung vermitteln oder der Nervenwachstumsfaktor NGF, der das Absterben bestimmter Neurone im sich entwickelnden Nervensystem verhindert.

Das ras-Protein ist ein aus einer Untereinheit bestehendes GTP-bindendes Protein. Es pendelt zwischen zwei Konformationszuständen: aktiv und inaktiv. Hält es GTP gebunden, so ist es aktiv. Nach einer bestimmten Zeit hydrolysiert das GTP zu GDP und schaltet sich somit selbst ab. Wird das ras-Gen aktiviert, setzt es eine Phosphorylierungskaskade in Gang, die das Signal von der Zellmembran in den Zellkern trägt. Die letzte Proteinkinase der Kaskade phosphoryliert bestimmte Genregulatorproteine. So wird auf die Regulation der Gentranskription Einfluss genommen. Dies ist entscheidend für Proliferation, Überleben und Differenzierung der Zelle. Wird ras experimentell mittels Antikörpern ausgeschaltet und danach Wachstumsfaktoren ausgesetzt, so bleibt eine Zellantwort aus. Ras ist also eine unentbehrliche Komponente der intrazellulären Signalübertragung (Alberts, 2001).

1.7.2 Mutation

Bei der gesamten ras-Familie reicht bereits eine einzelne Punktmutation in einer wichtigen funktionellen DNS-Domäne aus, um das physiologische Proto-Onkogen in ein transformationsaktives Onkogen umzuwandeln. Diese Domänen sind in Codon 12, 13 und 61 anzutreffen.

Bei einigen Tumoren findet man spezifische Punktmutationen in ras-Genen. Diese führen zu Aminosäuresubstitutionen, die die GTP-ase-Aktivität des ras-Proteins vermindern. Eine überschießende zelluläre Antwort auf ein Rezeptorsignal ist die Folge (Strachan und Read, 1996).

Bei Lungentumoren fanden Rodenhuis et al. 1987 in der Hälfte aller Adenokarzinome eine spezifische Punktmutation in Codon 12. Yanez et al. fanden ebenfalls 1987 in einem Viertel aller Kolonkarzinome eine Mutation von k-ras in Codon 12, während sie keine einzige an Position 61 nachweisen konnten. Sie beschrieben fünf von allen sechs möglichen Basensubstitutionen in den maligne transformierten Geweben. Burmer und Loeb konnten 1989 mutierte k-ras-Gene sowohl in prämaligen Adenomen des Kolons als auch in Karzinomen nachweisen, auch hier überwiegend in Codon 12. Zum Teil war die identische Mutation im Adenom wie auch im Karzinom zu finden, überwiegend an der ersten Position von Codon 12. Man darf also davon ausgehen, dass eine k-ras-Mutation einen elementaren Schritt bei der Entstehung von Kolontumoren darstellt.

Ebenfalls 1987 konnten Liu et al. eine neue Mutation des k-ras-Gens in Codon 13 bei einem präleukämischen Patienten nachweisen.

Sidransky et al. gelang 1992 in acht von neun Fällen der Mutationsnachweis von k-ras in Stuhlproben von Patienten mit kolorektalem Karzinom. Durch diese Erkenntnisse sollte die Möglichkeit von nicht-invasiven Massen-Screening-Untersuchungen herbeigeführt werden. Da positive Ergebnisse sowohl bei benignen als auch bei malignen Neoplasien auftraten, ist die Screeningmethode bis heute klinisch nicht relevant (Imperiale et al., 2004).

Verschiedene Studien belegen zusammenfassend, dass ungefähr 40 % von primären kolorektalen Adenokarzinomen eine mutierte Form von k-ras in Codon 12, 13 oder 61 tragen.

Hayashi et al. beschäftigten sich 1996 mit der Frage der geographischen Verteilung der verschiedenen Mutationen und ob Umwelteinflüsse bei der Kanzerogenese eine Rolle spielen. Er fand seine These bestätigt, dass karzinogene Umwelteinflüsse einer bestimmten Region in Zusammenhang mit der Suszeptibilität eines bestimmten Gewebes eine spezifische DNS-Läsion triggern. Es zeigte sich in Proben von CRC aus Amerika und Japan eine überwiegende Transversion der Base Guanin hin zu Adenin, die er auf alkylierende Substanzen zurückführte. Weiterhin machte er polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe und heterocyclische Amine für das Auftreten von Guanin- hin zu Thymidin-Substitutionen bei französischen und jugoslawischen Patienten verantwortlich.

Otori et al. konnten 1997 die These der Adenom-Karzinom-Sequenz untermauern, indem sie in 47 % von benignen hyperplastischen Darmpolypen sowie Adenomen Mutationen des k-ras-Gens in Codon 12 und 13 nachwiesen. Somit muss eine prä-maligne Läsion in einigen Fällen angenommen werden.

Zwischen dem histopathologischen Stadium und der Art der k-ras-Mutation kann allerdings weder ein Zusammenhang noch ein prognostisches Kriterium abgeleitet werden (Andreyev et al., 1997).

2001 stellten Zhang et al. eine neue Rolle des k-ras-Gens vor. Zhang erkannte im Tierversuch, dass der Wildtyp von k-ras Tumorsuppressor-Aktivität zeigt, die er regelmäßig im Laufe der Tumorgenese des Lungenkarzinoms verliert. Der Verlust des k-ras-Wildtyps ist als typisch für die Entstehung von Lungentumoren anzusehen.

Rajagopalan et al. beschäftigten sich 2002 mit den Mutationen von rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma (BRAF) und k-ras in CRC. Bei RAF handelt es sich um eine Gruppe von Proteinkinasen. BRAF wurde kürzlich als potentes Onkogen identifiziert. Sie fanden in ihren Studien starke Hinweise darauf, dass BRAF und k-ras äquivalent in ihren kanzerogenen Effekten sind. Beide Gene scheinen in einem ähnlichen Stadium der Tumorentstehung zu entarten: nach der Initiation, aber vor der malignen Transformation.

1.8 Fremdstoffmetabolismus

Dem Organismus werden Tag für Tag verschiedenste Fremdstoffe zugeführt. Zu nennen sind vor allem Nahrung, Umweltgifte und Pharmaka. Die Aufgabe des fremdstoff-

metabolisierenden Systems liegt darin, diese Stoffe zu verstoffwecheln und in unschädlicher Form auszuscheiden.

Kanzerogene Substanzen verursachen Schäden unterschiedlichster Art im Organismus mit zum Teil dramatischen Folgen. Dieselbe Noxe kann bei unterschiedlichen Individuen einer Art völlig verschiedene Wirkungen hervorrufen. Dies ist in erster Linie durch eine differente Enzymausstattung der einzelnen Menschen bedingt. Für die Homöostase des Organismus sind im Wesentlichen eine Reihe von Enzymen des fremdstoffmetabolisierenden Systems und des DNS-Reparaturmechanismus verantwortlich. Weitere individuelle Faktoren werden als Suszeptibilitätsfaktoren bezeichnet und sind aktuell Gegenstand weitreichender Forschungen auf dem Gebiet der molekularen Epidemiologie. Erfasst werden hierbei die Folgen für den einzelnen Organismus, nachdem es zum Kontakt mit einer Noxe kam. Außerdem sind die Faktoren zu berücksichtigen, die angeboren sind oder erworben wurden und das Entstehen von Krebserkrankungen gegebenenfalls fördern. Es gibt also kein einheitliches Krebsrisiko für jeden Menschen. Vielmehr ist es das Ziel der Epidemiologie, das individuelle Krebsrisiko eines einzelnen Organismus zu bestimmen. Mit diesen Erkenntnissen könnte jedes untersuchte Individuum Prävention betreiben, indem es seine eigenen spezifischen Risikofaktoren minimiert.

Die Suszeptibilitätsfaktoren umfassen u.a. Enzyme, die für die Metabolisierung von Fremdstoffen zuständig sind. Hierbei handelt es sich um das so genannte Fremdstoffmetabolisierende System (FME). Diese Enzyme liegen in vielen unterschiedlichen Formen vor. Sobald sich in einer abgrenzbaren Population mehrere stabile Formen eines Enzyms befinden, welches die selben Vorgänge katalysiert, die sich aber durch eine Mutation voneinander unterscheiden, spricht man ab einer Häufigkeit von 1 % von einem Polymorphismus.

Lipophile Substanzen reichern sich im Körper aufgrund ihrer physikochemischen Eigenschaften an. Ihre Exkretion ist nur möglich, wenn sie derart verändert werden, dass sie wasserlöslich sind. So können sie mit dem Urin ausgeschieden werden und nicht mehr im Körper akkumulieren. Während der Evolution haben sich Enzymsysteme entwickelt, die eine Polarisierung von Fremdstoffen bewirken und damit ihre Ausscheidung erleichtern.

Generell bedient sich der Körper zweierlei Reaktionen, um lipophile in hydrophile Stoffe umzuwandeln (Biotransformation) und auszuscheiden:

1. **Phase-I-Reaktion:** Hierunter versteht man die Oxidation, Reduktion und die Hydrolyse lipophiler Substanzen. Diese Reaktionen dienen dem Freilegen funktioneller Gruppen (Funktionalisierungsreaktion), das heißt der Einführung funktioneller Gruppen, die den Angriffspunkt für die Phase-II-Reaktionen darstellen.

2. **Phase-II-Reaktion:** Hier werden Substanzen, die in der Phase I die entsprechenden funktionellen Gruppen erhalten haben, an verschiedene niedermolekulare Stoffe gebunden. Diese Konjugation erhöht die Wasserlöslichkeit und fördert die Exkretion des Schadstoffes über Niere und Leber.

1.8.1 Cytochrom P450-Enzysystem

Chemische Karzinogene unterscheiden sich in ihrer Struktur erheblich voneinander und weisen keine gemeinsamen chemischen Merkmale auf. Da es sich bei vielen Karzinogenen um ausgesprochen stabile und kaum reaktionsfähige, wasserunlösliche Verbindungen handelt, konnte ihre potente karzinogene Wirkung zunächst nicht erklärt werden. Bei einigen Verbindungen bedarf es erst der Aktivierung durch bestimmte Stoffwechselreaktionen. Ironischerweise erfolgt diese Stoffwechselaktivierung von einigen Karzinogenen durch Enzyme, die den Körper eigentlich entgiften sollen, wie beispielsweise das Cytochrom P450 Enzysystem (Lodish et al., 1993).

Das Saftene Endoplasmatische Retikulum (SER) der Leber beherbergt unter anderem das Enzysystem für Lipidsynthese und -transport sowie das stark oxidativ wirksame Cytochrom P450, welches sich auch in der Nebenniere in besonders hoher Konzentration findet. Durch Oxidation entgiftet dieses Enzym Fremdstoffe wie Pestizide und Drogen (z.B. Barbiturate), indem fettlösliche Stoffe in wasserlösliche umgewandelt werden, damit sie renal ausgeschieden werden können. Die Überfunktion einer derartigen Oxidationsleistung kann allerdings auch nachteilige Folgen haben. So führen Gaben von Phenobarbital zur Hypertrophie des SER und zur Induktion der dort befindlichen Enzyme. Wird dem Organismus nachfolgend z.B. Benzpyren, ein an sich harmloses Produkt, zugeführt, wird dieses durch Oxidation in ein potentes Karzinogen umgesetzt (Hirsch-Kauffmann und Schweiger, 1992).

Cytochrom P450 gehört zu den Monooxygenasen oder mischfunktionellen Hydroxylasen. Diese zeichnen sich dadurch aus, dass ein Sauerstoffatom von molekularem Sauerstoff unter Bildung einer Hydroxylgruppe in das Substrat eingebaut wird. Das zweite Atom dient der Wasserbildung durch Reduzierung. Die Monooxygenasen bilden eine der größten bekannten Enzymfamilien. Sie katalysieren die Hydroxylierung der verschiedensten Fremdstoffe, der so genannten Xenobiotica. Sie stellen Vertreter der ersten Phase der Detoxifikation dar.

Das Cytochrom P450 spielt für die biochemische Aktivierung des Sauerstoffs bei vielen Reaktionen eine Rolle. Es handelt sich strukturell um ein CO-empfindliches Hämoprotein, welches in der Fe^{3+} -Form ein Sauerstoffmolekül aufnehmen kann. Neben $\text{NADPH} + \text{H}^+$ als Wasserstoffdonator trägt das Cytochrom P450 noch ein FMN/FAD-Flavoprotein zur intermediären Elektronenübertragung. Da die Hämgruppe mit hoher Affinität auch CO binden kann und dann einen Komplex mit einem charakteristischen Absorptionsspektrum bei 450nm bildet, erhielt es den Namen Cytochrom P450.

Das Protein P450 weist nur ein einziges Transmembransegment auf und enthält eine interne, nicht abspaltbare Signalankersequenz am N-Terminus. Die räumliche Orientierung ist N=Lumen, C=Cytosol des ER. Diese Ausrichtung wird durch die verschiedenen Ladungen der Aminosäuren des Proteins und den Anteil an hydrophilen, bzw. hydrophoben Eigenschaften bewirkt. Das N-terminale Ende wirkt zudem als Stopp-Transfer-Sequenz, indem es die weitere Einschleusung der entstehenden Polypeptidkette in das ER-Lumen verhindert.

Im Laufe der Evolution musste sich der Organismus immer wieder an neuartige Substrate und potenzielle Noxen adaptieren. Daher ist zu verstehen, dass das fremdstoffmetabolisierende System eine außerordentlich umfangreiche Gruppe an Enzymen darstellt. Die Nomenklatur stellt nach dem Stamm „Cyp“ die Familie durch eine Ziffer dar. Der darauf folgende Buchstabe benennt die Unterfamilie und eine weitere Ziffer das einzelne Enzym.

Im Wesentlichen unterscheiden sich die Enzyme der Familie durch Substratspezifität, Expressionsmuster in verschiedenen Geweben und die Induzierbarkeit durch verschiedene chemische und pharmakologisch verwendete Stoffe (Nelson et al., 1996).

1.8.2 CYP1B1

Die CYP1-Genfamilie ist unterteilt in die Unterfamilien CYP1A und CYP1B. Die CYP1A-Unterfamilie beherbergt ihrerseits zwei Gene (CYP1A1 und CYP1A2). Bei CYP1B ist bis dato nur CYP1B1 als solitäre Unterfamilie bekannt. Es enthält drei Exone und ist auf Chromosom 2 lokalisiert (2p21-22) (Tang et al.,1996).

Allen CYP1-Genen gemeinsam ist ein nicht-kodierendes erstes Exon. Die gesamte kodierende Sequenz von CYP1B1 ist somit in Exon 2 und 3 enthalten. In Exon 3 ist die funktionell bedeutsame Häm-Bindungsregion kodiert (Stoilov et al.,1997).

Der Wildtyp (wt) des durch CYP1B1 kodierten Enzyms weist in Codon 432 das Basentriplett CTG auf. Dieses Triplett kodiert für die Aminosäure Leucin. Der Wildtyp wird deshalb als „Leu“ (C) bezeichnet. Findet nun eine einzelne Punktmutation an Codon 432 statt, die das Cytosin (CTG) durch Guanin (G) ersetzt, kodiert das neue Codon für die Aminosäure Valin. Betrachtet man beide Allele, so sind die Genotypen wt/wt neben wt/mt und mt/mt existent.

Die molekularen Grundlagen der Enzyminduktion sind für CYP1A am besten untersucht. Diesen Grundlagen folgt CYP1B1 in weitem Umfang, weshalb der Mechanismus hier vorgestellt werden soll. Die Cytochrome P450 1A1 und 1B1 zeigen eine überlappende Substratspezifität. Ihre Substrate und Induktoren sind unter anderem auch die polyaromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), die beim Erhitzen von organischem Material unter Ausschluss von Sauerstoff entstehen, so z.B. in Tabakrauch, Autoabgasen und beim Grillen von Fleisch. Die Enzyme der FME metabolisieren die PAK zu Epoxiden, die irreversibel an DNS und RNS binden können. In dieser Form haben die Intermediärprodukte kanzerogene Wirkung.

CYP1A1 und CYP1B1 kommen überwiegend in extrahepatischen Geweben (Dünndarm, Kolon, Rektum) vor. Grundsätzlich erfolgt die Induktion der Enzyme über den zytosolischen Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-R), der zunächst von hsp90-Proteinen (heat shock protein) maskiert ist. Einer der stärksten Induktoren des Ah-R ist Dioxin. Die Bindung zwischen Ah-R und dem Induktor führt zur Dissoziation der hsp90-Proteine und zur Translokation mit dem ARNT-Komplex (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) in den Kern. Dort bindet der Rezeptor-Ligand-Komplex an eine

Kontrollregion des CYP1A-Gens, was zu einer verstärkten Transkription führt (Enan und Matsumura, 1996).

Unterschieden werden zwei Klassen von Induktoren, die an den Ah-Rezeptor binden: TCDD (2,3,7,8 Tetrachlordibenzo-p-dioxin) und chlorfreie Polyaromaten. Die endogene Funktion des Ah-Rezeptors ist bisher nicht bekannt. Wird der Rezeptor aktiviert, so induziert er die Expression verschiedener Zielgene, wie z.B. CYP1B1 (Vineis und Malats, 1999).

Der Ah-Rezeptor ist somit in der Lage, Toxizität positiv und negativ zu beeinflussen. Während er im Zuge der Phase-I-Reaktion eigentlich die Aufgabe hat, die Akkumulation von Noxen im Organismus zu verhindern, kann die Toxizität einer Noxe auch beträchtlich zunehmen, was als Giftung bezeichnet wird.

So führt Dioxin zu einer massiven Induktion von CYP1A, wird aber selbst nicht metabolisiert. Es entsteht beispielsweise bei der Pestizidherstellung als „Verunreinigung“. Prominentestes Beispiel ist der Giftstoff agent orange, welches in Vietnam zur Entlaubung eingesetzt wurde. Unter der hohen Dioxinverunreinigung leidet die Bevölkerung Vietnams noch heute.

Ebenso metabolisieren CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 heterozyklische Amine, die durch Denaturierung von Proteinen entstehen. Als eine wichtige Leitsubstanz dieser Gruppe wird 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazol(4,5-b)pyridin (PhIP) gesehen, welches Genomschäden verursachen kann, also kanzerogen wirkt. Crofts et al. zeigten 1998, dass die oben genannten Cytochrome eine entscheidende Rolle bei der Metabolisierung der heterozyklischen Amine spielen.

Im Hinblick auf die Kanzerogenese sind die Polymorphismen der FME besonders interessant, da intermediär kanzerogene Metabolite entstehen können, die durch den Enzym-Wildtyp zügig abgebaut und unschädlich gemacht werden. Eine polymorphe Enzymvariante ist dazu gegebenenfalls nur langsamer oder gar nicht in der Lage. Andererseits kann eine erhöhte Enzymaktivität aber auch dazu führen, dass wesentlich mehr schädigende Intermediate in der Zelle vorliegen als beim Wildtyp und somit kanzerogen wirken.

Als Beispiel für Enzyminduktion dient die Betrachtung von CYP1A1 bei Rauchern. Studien zeigen, dass bei Nichtrauchern CYP1A1 pulmonal nicht nachweisbar ist, bei Rauchern aber in der Lunge exprimiert wird. Bei diesen zeigen ca. 21 % eine stärkere

Induktion durch PAK als die übrigen Raucher. Auch die Aktivität von CYP1A2 ist individuell sehr unterschiedlich. Betrachtet man die weiße Bevölkerung als Kollektiv, so ist bei 20 % eine geringere Aktivität der Enzyme zu verzeichnen als bei der Mehrheit. Das Ausmaß der Enzyminduktion scheint gewebespezifisch zu sein und auch von der Art des Tabaks abzuhängen. Interessant ist, dass auch die passive Aufnahme von Tabakrauch zu einer Enzyminduktion führt. Bei Personen, die das Rauchen aufgegeben haben, kann nach mehreren Monaten der Abstinenz ein Rückgang der Enzyminduktion verzeichnet werden.

Es sind weitere medizinisch relevante Substanzen bekannt, welche über die Biotransformation gegiftet anstatt abgebaut werden.

Benz(a)pyren beispielsweise ist ein ubiquitär vorhandener Schadstoff, der im Rahmen von Verbrennungsprozessen entsteht und dem Organismus in größeren Mengen durch Tabakrauch oder gegrillte Lebensmittel zugeführt werden kann. Die Reaktionen des Fremdstoffmetabolismus führen zu einer Bioaktivierung, und es entstehen Metabolite mit kanzerogenen Eigenschaften. Der erste Schritt der Verstoffwechslung ist die Epoxidation zum Benz(a)pyren-7,8-Epoxid. Eine mikrosomale Epoxid-Hydroxylase (mEH) katalysiert die Hydrolyse zum Dihydrodiol. Schließlich entsteht in einer Oxidationsreaktion, die auch durch CYP1B1 katalysiert wird, die endgültig kanzerogene Dialepoxid-Form (Hasler et al., 1999).

Inhaltsstoffe des Zigarettenrauchs werden u.a. über CYP1B1 in DNS-reaktive Metabolite transformiert, die dann kanzerogen wirken. Die individuelle Suszeptibilität erscheint abhängig vom Genotyp der Enzymausstattung des Organismus. Das Risiko für Kopf-Hals-Tumore steigt bei Nachweis einer Schwäche des GSTM1-Genotypen. Die GSTM1 ist ein polymorphes fremdstoffmetabolisierendes Enzym der Phase-II-Reaktionen, deren Substrat u.a. hoch reaktive Metaboliten polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe sind. In der Bevölkerung finden sich GSTM1-negative und -positive Genotypen. Einige CYP1A1/GSTM1 0/0 Genotypen scheinen laut einer Studie bei Rauchern eine Prädisposition für Lungen- und Oesophagustumoren darzustellen (Bartsch et al., 2000). Weiterhin hat CYP1B1 vermutlich einen Einfluss auf die Entwicklung von Tumoren der Brust, indem es die Oxidation von 17-beta-Östradiol zum kanzerogenen Metaboliten 4-OH-Östradiol katalysiert (Li et al., 2000; Bailey et al., 1998).

Li et al. beschreiben weiterhin vier Polymorphismen von CYP1B1, die im Wesentlichen jedoch für Enzymvarianten kodieren, die entweder funktionslos sind oder aber für Enzyme, die mit dem Austausch von Basen ohne Veränderung der Funktion oder der Kinetik des originalen CYP1B1 einhergehen (Tab.1).

Lokalisation	Codon	Wildtyp	Allelfrequenz wt	Mutante	Allelfrequenz mt	Effekt
Exon 2	48	CGG	0,71 ^a	GGG	0,29	Arg 48- Gly
Exon 2	119	GCC	0,71 ^a	TCC	0,29	Ala 119 –Ser
Exon 3	432	CTG	0,60 ^b	GTG	0,40	Leu 432 - Val
Exon 3	453	AAC	0,76 ^a	AGC	0,24	Asn 453- Ser

Tab. 1: Cytochrom P450 1B1-Polymorphismen

^a Allelfrequenzen nach Stoilov et al.,1998 (100 gesunde Individuen türkischer und britischer Abstammung)

^b Allelfrequenzen nach Bruning et al., 1999 (300 gesunde Individuen deutscher Abstammung)

wt Wildtyp

mt Mutante

Landi untersuchte in einer Studie Patienten mit kolorektalem Karzinom mit single nucleotid polymorphism (SNP`s) der Phase-I- und II-Reaktionen. Er fand heraus, dass polymorphe Varianten von CYP1B1 und CYP1A1 eine Rolle bei der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms spielen (Landi et al., 2005).

1.9 Assoziation von Tabakkonsum zu Veränderungen in p53 und k-ras

Der Konsum von Tabak ist eine statistisch gut zu erfassende „Ernährungsgewohnheit“ mit hohem kanzerogenem Potenzial, wie durch zahlreiche Studien bewiesen werden konnte.

Neben dem Bronchialkarzinom zeichnet sich Tabakkonsum beispielsweise verantwortlich für die Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (De Stefani et al., 1993) und des Oesophaguskarzinoms (Brown et al., 2001; Wu et al., 2001).

Das Vorliegen einer Mutation von p53 gilt nachweislich als Risikofaktor für die Genese einer Tumorerkrankung (Attardi et al., 1999). Mutationen des Tumorsuppressor-Gens p53 sind bei über 52 verschiedenen Krebsarten beschrieben worden (Greenblatt et al.,

1994; Hollstein et al., 1991). So auch beim CRC, an dessen Ätiologie auch der Tabakkonsum beteiligt zu sein scheint.

Ähnliches gilt für das Proto-Onkogen k-ras. Wie bereits dargelegt kann in den unterschiedlichsten menschlichen Tumoren eine Mutation von k-ras bereits in einem sehr frühen Stadium nachgewiesen werden (Arber et al., 2000), wovon v.a. Zellen des Gastrointestinal- und Respirationstraktes betroffen sind (Keohavong et al., 2001).

Bei der Betrachtung der Mutationen von p53 und k-ras als Einzelereignis konnte nachgewiesen werden, dass weitere biologische Schlüsselprozesse die Tumorentstehung negativ triggern können (Hanahan und Weinberg, 2000). Bei Nachweis von Mutationen in beiden Genen in einem Zellverband tritt rasch ein unkontrolliertes Zellwachstum auf. Bezeichnet wird dies als synergistisch-onkogener Effekt (McMurray et al., 2008).

1.10 Zielsetzung der Arbeit

Der Organismus des Menschen ist im Laufe der Evolution einer Vielzahl unterschiedlicher Stoffe mit potenziell schädlichen Eigenschaften ausgesetzt. Der Körper muss auf diese zahlreichen Stoffe reagieren können, um keinen Schaden zu nehmen. Noxen dürfen im Körper nicht akkumulieren, sondern müssen -nach entsprechenden chemischen Reaktionen- entweder zügig ausgeschieden oder in ungefährliche Metabolite umgewandelt werden. Beide Aufgaben übernehmen die Enzyme des fremdstoffmetabolisierenden Systems. Die Ausstattung an diesen Enzymen unterscheidet sich jedoch von Mensch zu Mensch, nicht zuletzt bedingt durch Polymorphismen.

Nicht alle polymorphen Enzymvarianten können ihre Aufgabe zur Entgiftung des Körpers erfüllen. Im Gegenteil kann ein mutiertes Enzym auch zur Giftung von primär unschädlichen Substanzen führen. Aus diesen Betrachtungen ergibt sich, dass die individuelle Enzymausstattung eines Organismus auch ein individuelles Risiko hinsichtlich der Krebsentstehung birgt, sei es im Sinne einer Risikosteigerung oder einer -reduktion.

Diese Arbeit soll feststellen, ob polymorphe Varianten von CYP1B1, das zur Familie der fremdstoffmetabolisierenden Enzyme gehört, bei Patienten mit chronischem

Tabakkonsum die Frequenz von somatischen p53- und k-ras-Mutationen in Bezug auf die Entstehung von kolorektalen Karzinomen beeinflussen.

Liegt eine polymorphe Variante eines Enzyms vor, so ist gegebenenfalls dessen katalytische Eigenschaft verändert. Der Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante kann einen direkten Einfluss auf die Qualität und Quantität der durch Metabolisierung hervorgegangenen Substanzen haben, die nach Fremdstoffexposition im Organismus anfallen. Diese Metabolite können den Körper nach dem Gesetz der Dosis- und Zeitabhängigkeit in unterschiedlichem Umfang schädigen. Wirkt eine Noxe auf zentrale Enzyme wie Tumorsuppressorgene oder Proto-Onkogene ein, können daraus Zellschädigungen entstehen. Beispiele hierfür sind p53 und k-ras, die im physiologischen Zustand für die Homöostase von Zelldifferenzierung und -vermehrung zuständig sind. Unkontrolliertes, undifferenziertes Zellwachstum – also die Entstehung eines Tumors – kann die Folge sein.

Es ist bekannt, dass somatische p53- und k-ras-Mutationen durch chronischen Nikotinkonsum induziert werden können. Eine mutierte Variante von TP53 kann seine zentrale Aufgabe nicht erfüllen. Die Zelle teilt sich trotz eines DNS-Schadens weiter. Die geschädigte Zelle wird nicht eliminiert. In der Folge kann es durch multiplizierte Schäden zur Tumorentstehung kommen. Eine Aktivierung des Proto-Onkogens k-ras fördert ebenfalls die Entstehung von autonomem Zellwachstum.

Erfasst wurden die Ernährungsgewohnheiten, Alter, Geschlecht sowie der Raucherstatus der untersuchten Personen. Betrachtet wird das Risiko eines Patienten an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken. Diese Betrachtung erfolgt in Abhängigkeit des Genotypen von CYP1B1 (Wildtyp oder Mutante). Hierzu liegt die Genotypanalyse von CYP1B1 jedes Patienten vor, die von einer anderen Arbeitsgruppe ausgewertet wurde (Brüning et al.,1999; Fritsche et al.,1999). Weiterer Bestandteil der Arbeit ist eine p53- und k-ras-Mutationsanalyse der aus Karzinomgewebe des erkrankten Patienten gewonnenen DNS.

Bei p53 finden sich ca. 90 % der Mutationen in den Genabschnitten, die als Exon 5, 6, 7 und 8 bezeichnet werden. Bei k-ras finden sich die relevanten Mutationen in Codon 12, 13 und 61. Diese Genabschnitte wurden daraufhin der Mutationsanalyse unterzogen.

Es gilt zu klären, ob bei Vorliegen einer polymorphen Variante von CYP1B1 auch eine erhöhte Mutationsrate für p53 und k-ras vorliegt. Eine positive Korrelation bedeutet,

dass Menschen, die spezifischen Noxen ausgesetzt sind, aufgrund ihrer polymorphen Enzymausstattung auch einem erhöhtem Risiko unterliegen, an einem fremdstoff-induzierten Kolonkarzinom zu erkranken.

Eine Genotypanalyse wichtiger Suszeptibilitätsfaktoren ist mit Hilfe der real-time-PCR als Screeninguntersuchung möglich. Damit besteht die Möglichkeit ein individuelles Risikoprofil für Menschen in Abhängigkeit ihres Genotypen des P450-Metabolismus zu erstellen.

2. Material und Methoden

2.1 Studiengruppe und Probenmaterial

Das Gesamtkollektiv an Patienten, die für diese Arbeit ausgewertet werden, umfasst insgesamt 324 Personen mit histopathologisch gesichertem kolorektalen Karzinom. Von diesen Patienten liegt der CYP1B1-Status vor.

Bei 106 Patienten konnte DNS aus dem Tumorgewebe zur Mutationsanalyse bezüglich p53 und k-ras extrahiert werden. 58 der Patienten sind männlich und 48 weiblich. Das Durchschnittsalter der untersuchten Individuen liegt bei 61,6 Jahren zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Eine Kontrollgruppe ist nicht vorhanden.

Die Gewebeproben der Patienten wurden von 1991 bis 2000 in der Pathologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn sowie beim Institut für Pathologie Prof. Dr. Bollmann, Bonn-Duisdorf gesammelt. Es handelt sich um in Paraffin fixierte Gewebeblöcke des operativ entfernten Tumorgewebes.

Alle Studienteilnehmer haben ihr Einverständnis gegeben und einen Fragebogen beantwortet. Dieser Fragebogen gibt Auskunft über Herkunft, Ernährungsgewohnheiten, Nikotin- und Alkoholkonsum, berufliche Exposition gegenüber Noxen sowie ihre medizinische Anamnese.

Die Studie ist von der Ethik-Kommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn genehmigt worden.

2.2 DNS-Extraktion

Es stehen 133 in Paraffin gegossene und fixierte Blöcke mit dem operativ entfernten Tumorgewebe aus Kolon und Rektum zur Mutationsanalyse von p53 und k-ras zur Verfügung. Die Isolierung der Gewebe-DNS wird nach einem Protokoll von Weirich et al., 1997 unter Zuhilfenahme eines DNS-Extraktionskits der Firma Qiagen Hilden, durchgeführt (Weirich et al., 1997; QiaAmp Tissue Kit).

Im ersten Schritt werden vom Paraffinblock mit dem Tumorgewebe 10 µm Schnitte mittels Mikrotom angefertigt und auf einen Objektträger geladen (Größe: 1-2 cm² bei einer Dicke von 10 µm). Diese werden über Nacht bei 48 °C im Inkubator getrocknet. Am

daraufliegenden Tag werden die Präparate durch Xylol und eine absteigende Alkoholreihe entparaffiniert. Der Karzinombereich wird nach Kontrolle unter dem Mikroskop markiert und anschließend mit einem sterilen Skalpell vom Objektträger gelöst und in einen Puffer überführt (Buffer ATL 130 µl). Eine mikroskopische Kontrolle stellt sicher, dass die nicht karzinomatös veränderten Gewebeanteile nicht mit in die Extraktion einfließen. So erhält man ein reines DNS-Extrakt aus Karzinomzellen. Nach Zugabe einer Proteinase werden die Zellen innerhalb der 12-stündigen Inkubation lysiert (Proteinase K, 15 µl). Der Zellverdau ist ausreichend, sobald die Lösung eine homogene Trübung aufweist. Unter Hinzugabe eines weiteren Puffers (Buffer AL 145 µl) wird die Lösung 10 min bei 70 °C inkubiert. Zuletzt wird dem Gemisch Ethanol hinzugefügt, um die Lysereaktion zu stoppen (Ethanol 96 %, 155 µl). Das gesamte Gemisch wird dann auf eine Säule mit entsprechendem Sammelgefäß pipettiert und in eine Zentrifuge verbracht. Die erste Zentrifugation dient dazu, die freie DNS in der Säule zu binden (1 min bei 12000 U/min). Nun wird der Säule Waschpuffer hinzugegeben, um die DNS in der Säule zu reinigen (AW Buffer). Nötig sind zwei Reinigungsschritte mit jeweils 400 µl Waschpuffer und anschließende Zentrifugation (1 min bei 8000 U/min und 1 min bei 12000 U/min). Nun kann die Säule in ein steriles Eppendorf-Tube überführt werden. Nach der Zugabe von 10 mM Tris/HCl wird ein letztes Mal fünf Minuten inkubiert und die DNS durch Zentrifugation aus der Säule ausgewaschen (1 min bei 8000 U/min; Tris/HCl pH 9, 70 °C). Der Gehalt an extrahierter DNS wird nun photometrisch bestimmt (OD 260, 280).

2.3 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion handelt es sich um ein Verfahren der Gentechnologie, mit der selektiv bestimmte DNS-Abschnitte amplifiziert werden, also um eine Vervielfältigungstechnik. Ziel ist die selektive DNS-Neusynthese von zwischen zwei synthetischen Oligonukleotiden gelegenen DNS-Sequenzen mittels DNS-Polymerase. Dieses wird nur dann erreicht, wenn die Sequenzen beider Enden des zu vervielfältigenden Abschnittes bekannt sind. Ausgehend von sehr geringen Mengen DNS können durch exponentielle Anreicherung nach mehrmaliger Wiederholung des

Vorgangs die DNS-Abschnitte auf Spezialmedien sichtbar gemacht oder für andere genetische Zwecke verwendet werden.

Genomische DNS wird mit einem Restriktionsenzym in große Fragmente gespalten und anschließend durch Hitze in Einzelstränge denaturiert. Von entscheidender Bedeutung ist die Spezifität, die durch Hybridisierung der Starter-Oligonukleotide an die denaturierten DNS-Stränge erzielt wird. Zwei synthetische Oligonucleotide (so genannte Primer, ca. 20 bp lang), die zu den 3'-Enden beider DNS-Stränge komplementär sind, werden in großem Überschuss zu der denaturierten DNS gegeben und die Temperatur auf 50-60 °C gesenkt. Dabei bleibt die genomische DNS denaturiert, weil die komplementären Stränge in zu geringer Konzentration vorliegen, um während der Inkubationsdauer aufeinander zu treffen. Die spezifischen Oligonukleotide, die in sehr hoher Konzentration vorhanden sind, hybridisieren mit ihren komplementären Sequenzen an der genomischen DNS. Die Oligonukleotide dienen als Primer für die Synthese des DNS-Stranges, die nach Zugabe der Oligonukleotide und einer temperaturresistenten DNS-Polymerase beginnt. Diese Taq-Polymerase kann die Primer, die sie als Startpunkt nutzt, bei Temperaturen bis zu 72 °C verlängern. Die optimale Temperatur für die Hybridisierung der Primer ist wesentlich von ihrer Basenzusammensetzung abhängig und muss nach einer speziellen Formel errechnet werden. Das Temperaturoptimum liegt für die in dieser Arbeit genutzten Primer zwischen 50 und 58 °C (Tab. 2a und b: Annealing-Temperatur).

Exon	Denaturierung	Zyklus-denaturierung	Annealing	Zyklus-extension	Extension
5	94 °C 7 min	94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 1,5 min	72 °C 20 min
6	94 °C 7 min	94 °C 1 min	50 °C 1 min	72 °C 1,5 min	72 °C 20 min
7	94 °C 7 min	94 °C 1 min	57 °C 1 min	72 °C 1,5 min	72 °C 20 min
8	94 °C 7 min	94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 1,5 min	72 °C 20 min

Tab. 2a: Polymerase-Kettenreaktion Temperaturprofil, Amplifikation p53: Exon 5 bis 8

Exon	Denaturierung	Zyklus-Denaturierung	Annealing	Zyklus-Extension	Extension
1	94 °C 7 min	94 °C 1 min	58 °C 1 min	72 °C 1,5 min	72 °C 20 min

Tab. 2b: Polymerase-Kettenreaktion: Temperaturprofil, Amplifikation k-ras

Nach Beendigung der Synthese wird das gesamte Gemisch bis auf 95 °C erhitzt, um die neu gebildeten Doppelstränge zu schmelzen. Das Substrat für die Neusynthese der DNS bilden die im Überschuss zugegebenen freien Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP`s), die sich an die Matrize der zu amplifizierenden DNS anlagern. Wird die Temperatur wieder verringert, so findet eine neue Syntheserunde statt, da die Primer weiterhin im Überschuss vorhanden sind. In wiederholten Zyklen aus Synthese (Abkühlung) und Schmelzen (Erhitzen) wird die gewünschte Sequenz amplifiziert. In jeder Runde verdoppelt sich die Anzahl der Kopien von der zwischen den Primern synthetisierten Sequenz. Diese Zyklen können ca. 45mal durchlaufen werden. Ein Thermocycler (Perkin Elmer 480) erzeugt die für die einzelnen Schritte notwendigen Temperaturen. Der Reaktionsansatz enthält die extrahierte DNS, freie Nukleotide, Primer und die thermostabile Taq-Polymerase in einer geeigneten Pufferlösung.

In dieser Arbeit gilt es, die Gene p53 und k-ras zu amplifizieren. Bezüglich p53 werden vor allem die Exons 5-8 betrachtet, da hier ca. 90 % aller Mutationen zu finden sind. Bei der Amplifikation von k-ras ist darauf zu achten, dass die Codons 12, 13 und 61 durch die Primer abgedeckt werden, da auch hier mit über 90 % Wahrscheinlichkeit die Mutationsereignisse anzutreffen sind.

Im ersten Arbeitsschritt wird ein Premix hergestellt, welches aus folgenden Komponenten besteht:

- 5,0 µl PCR-Puffer
- 32,8 µl H₂O
- 2,0 µl verdünnte Template DNS
- 5,0 µl DMSO

Jedem Reaktionsansatz wird eine Negativkontrolle hinzugefügt, um zu verhindern, dass eine akzidentelle Verunreinigung amplifiziert wird. Diese Negativkontrolle enthält sämtliche benötigte Komponenten außer der DNS. Der Premix wird von Mineralöl bedeckt, um ihn auch bei hohen Temperaturen nicht verdampfen zu lassen. Anschließend wird wieder 30 Minuten bei 95 °C denaturiert. Damit wird die Spezifität und Sensitivität der Reaktion erhöht.

Der zweite Reaktionsansatz besteht aus den folgenden Substraten:

- 1,0 µl 3`-Primer (10 pmol)
- 1,0 µl 5`-Primer (10 pmol)
- 1,0 µl je dNTP (10 mmol/l)
- 2,5 U Taq-Polymerase

Nachzulesen sind die Sequenzen der verwendeten Primer in den Tabellen 4a und 4b. Am Ende der Inkubation wird der zweite Reaktionsansatz dem ersten hinzugefügt. Die Amplifikation der DNS kann nun im Thermo-Cycler mit dem ersten der 45 Zyklen beginnen. Zu beachten ist, dass jedes Exon ein für sich spezifisches Temperaturprofil benötigt (siehe Tabelle 2). Nach Durchlauf der 45 Zyklen folgt ein abschließender Extensionsschritt von 20 Minuten bei 72 °C. Dieser dient zur nochmaligen Amplifikation aller vorhandener DNS-Stränge zur Ergebnisoptimierung.

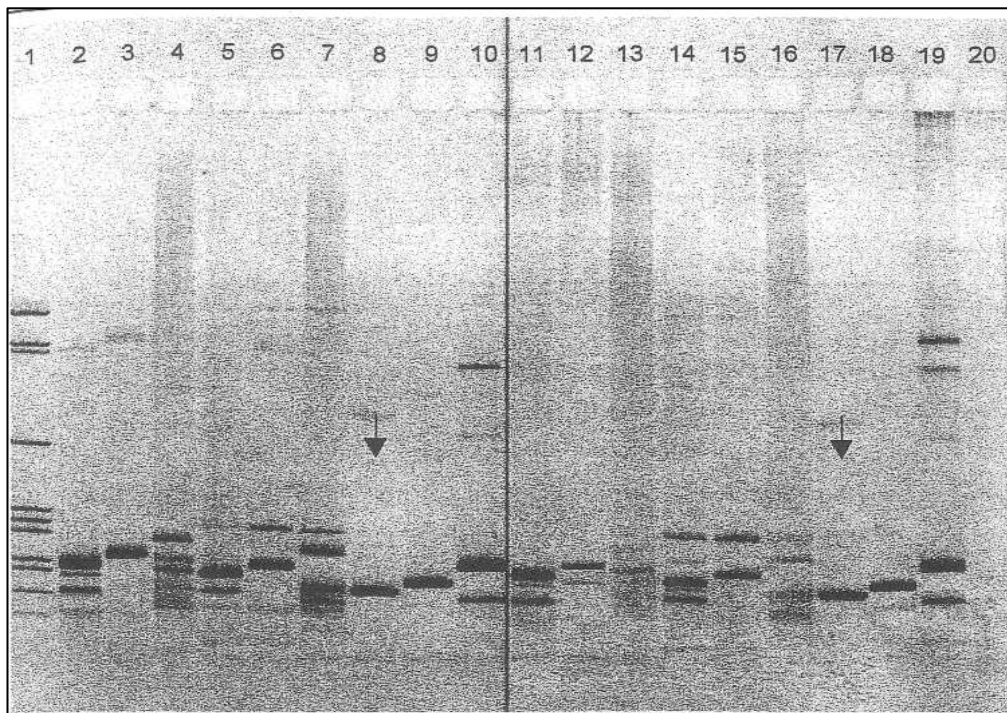


Abb. 4a: Primer-Test, p53, Exon 6: Bahn 1: Desoxyribonukleinsäure-Längenstandard: Hae III-verdaute ϕ X-174-RF DNS (Abstufung von oben nach unten: 1358, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72), Bahn 20: Negativkontrolle, Bahn 2-10 (Testprobe A) und 11-19 (Testprobe B): Polymerase-kettenreaktion mit verschiedenen Primerkombinationen, Bahn 8 und 17: Polymerase-Ketteraktion-Produkt optimal = Primer wurden bei den nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Silbergel
Testprobe A und B entspricht unterschiedlicher Desoxyribonukleinsäure, die als Matritze für die Primertests verwendet wurde.

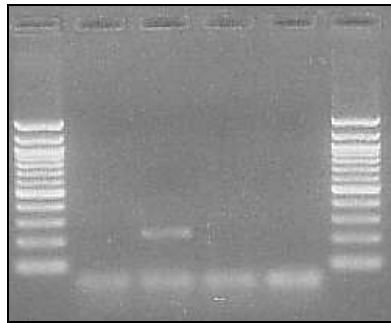


Abb. 4b: Primer-Test, k-ras, Bahn 1 und 6: Desoxyribonukleinsäure-Längenstandard: Hae III-verdaute ϕ X-174-RF DNS (Abstufung s. Abb 4a), Bahn 5: Negativkontrolle, Bahn 1-3 Testprobe: Polymerase-Kettenreaktion mit verschiedenen Primerkombinationen, Bahn 3: Polymerase-Kettenreaktion-Produkt optimal = Primer wurden bei den nachfolgenden Untersuchungen eingesetzt. Agarosegel

2.4 Primer Test

Um den höchstmöglichen Grad an Spezifität, Qualität und Quantität bei der PCR zu erreichen, werden in Vorversuchen verschiedene Primer getestet. Mit ihnen wird der Wirkungsgrad der PCR und somit die Grundlage der gesamten Arbeit maßgeblich beeinflusst. Für jedes einzelne Exon werden verschiedene 3`- und 5`-Primer getestet. Wichtig bei der Primerwahl ist, dass sie stabil sein müssen und spezifisch nur einmal auf der gesamten DNS vorkommen. Erreicht werden diese Kriterien, indem man die Länge der Primer zwischen 20 bis 25 bp wählt sowie durch einen hohen Anteil an G-C-Dreifach-Wasserstoffbrückenbindungen. Die Auswertung erfolgt durch Analyse der sich anschließenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Dort werden die Größe, Spezifität und Quantität des PCR-Produktes abgelesen (Abb. 4a und b).

2.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Durch die Gelelektrophorese lassen sich die DNS-Fragmente verschiedener Größen voneinander trennen. Die Trennung erfolgt nach Fragmentgröße, so dass sich auch Molekülgrößen von unbekannter DNS oder RNS bestimmen lassen, indem man zum Vergleich das Bandenmuster von Molekülen bekannter Größe heranzieht. Kleinere Moleküle können im Vergleich zu größeren Nukleinsäuremolekülen die Gelmatrix schneller durchwandern. Die Auflösung der Gelelektrophorese ist so genau, dass sich

einzelsträngige, bis etwa 500 Nukleotide lange DNS-Moleküle voneinander trennen lassen, deren Länge sich nur um ein Nukleotid unterschied.

Verwendung findet das CleanGel DNS-HP 15 %. Das trockene Gel muss zunächst in einem Puffer (DELECT-Buffer) rehydriert werden. Um eine möglichst gleichmäßige Bewässerung zu gewährleisten, wird das Gel auf einem Horizontalschüttler rehydriert und danach auf die gekühlte Thermoplatte (15 °C) des Elektrophorese-Gerätes aufgebracht. Die Probestaschen werden mit 6,5 µl PCR-Produkt befüllt. Dann können die Elektrodenstreifen aufgelegt und die Kammer verschlossen werden. In der ersten Kammer des Gels befindet sich stets der DNS-Längenstandard (Hae III-verdaute ϕ X-174-RF DNS), in der letzten Kammer die Negativkontrolle.

Die verwendeten Parameter des Elektrophorese-Gerätes sind der Tab. 3 zu entnehmen.

Spannung (V)	Stromstärke (mA)	Leistung (W)	Zeit (min)
250	22	10	20
425	30	26	50
525	30	26	20

Tab. 3: Parameter der Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.6 Silberfärbung

Um die in Banden aufgetrennten Nukleinsäuren sichtbar zu machen, müssen sie auf dem Gel eingefärbt werden. Vorgegangen wird nach dem Protokoll von Merril et al., 1981, welches 1991 von Bassam modifiziert wurde (Tab. 4), um eine höhere Sensitivität und Kontrastierung zu erreichen (Abb. 5).

1. Fixierung	15 % Ethanol, 5 % Eisessig, 45 min
2. Spülung	H ₂ O, 3 x 10 min
3. Silberfärbung	0,1 % AgNO ₃ + 200 µl Formaldehyd 37 %, 45 min
4. Spülung	H ₂ O, 20 sek.
5. Entwicklung	2,5 % Na ₂ CO ₃ + 200 µl Na-Thiosulfat 2 % + + 200 µl Formaldehyd 37 %, 5 min
6. Stopp-Lösung	2 % Glycin, 0,5 % Na ₂ -EDTA-Salz, 20 min
7. Imprägnierung	5 % Glycerin, 15 min
8. Trocknen	Luft

Tab. 4: Silberfärbung nach Merril und Bassam

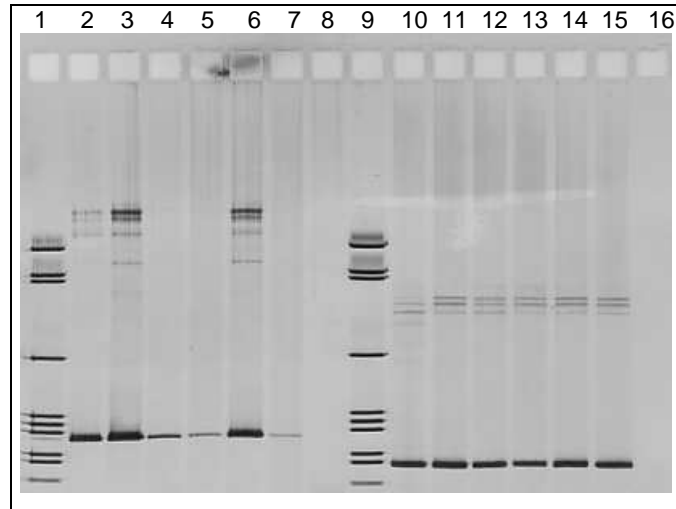


Abb. 5: Polyacrylamid-Gel nach Silberfärbung, Exon 5 und 6: Bahn 1 und 9: Desoxyrebonukleinsäure-Längenstandard: Hae III-verdaute ϕ X-174-RF DNS, Bahn 8 und 16: Negativkontrolle, Bahn 2-7 Polymerase-Kettenreaktion-Produkt Exon 5, Bahn 10-15: Polymerase-Kettenreaktion-Produkt Exon 6

2.7 Sequenzierung

Nachdem anhand der Gelelektrophorese sichergestellt ist, dass der gewünschte Genabschnitt amplifiziert wurde, kann das PCR-Produkt sequenziert werden. Diese Arbeiten werden in gleichen Teilen von der Firma Qiagen in Hilden und der Firma Imogen in Bonn geleistet. Vorgegangen wird nach der Kettenabbruchmethode von Sanger und Coulson 1977 (Abb.6) (Didesoxysequenziermethode).

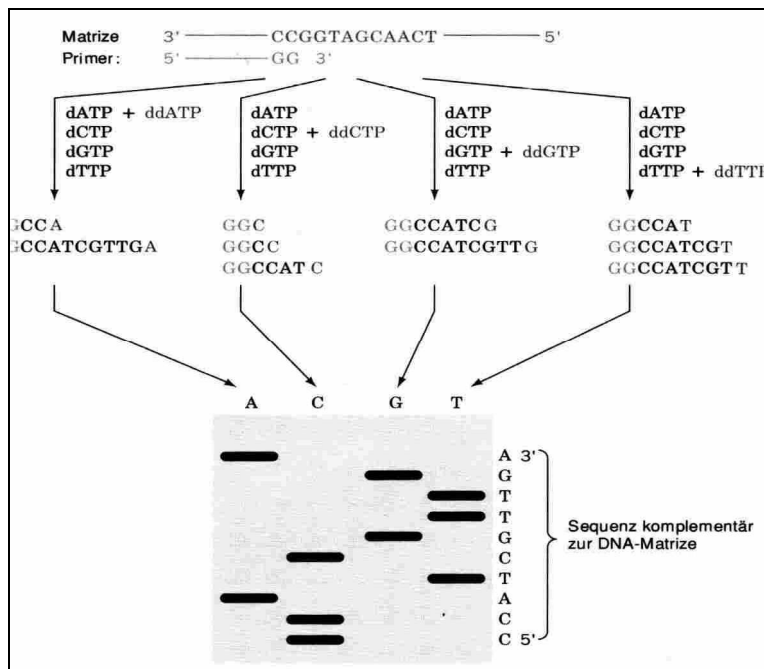


Abb. 6: Kettenabbruchmethode nach Sanger zur Sequenzierung von Desoxyribonucleinsäure-Fragmenten. Aus: „D. Voet, J.G. Voet, C.W. Pratt: Lehrbuch der Biochemie, Wiley-VCH, 2002“

Die zu sequenzierende, einzelsträngige DNS dient bei dieser Methode als Matrize für die DNS-Synthese *in vitro*. Sie wird mit einem synthetisch hergestellten 5'-endmarkierten Oligodesoxynucleotid als Primer versehen. Um die Konzentration der zu sequenzierenden PCR-Produkte zu erhöhen, müssen die DNS-Fragmente über einen M13-Vektor zunächst kloniert werden. Ebenso wird eine thermostabile Taq-Polymerase benötigt. Es werden vier verschiedene Polymerisationsreaktionen durchgeführt, in denen zusätzlich zu den in höheren Konzentrationen vorliegenden Desoxyribonucleotidtriphosphaten (dNTP-Moleküle) jeweils eine der vier ddNTP-Arten in geringer Konzentration vorhanden ist, die ihrerseits mit jeweils unterschiedlichen spezifischen Fluoreszenzfarbstoffen markiert wurde. Bei jeder Reaktion werden die ddNTP-Moleküle zufällig anstelle der entsprechenden dNTP-Moleküle eingebaut. Der Einbau eines solchen ddNTP-Moleküls führt zum Abbruch der Polymerisation, da keine 3'-Hydroxylgruppe für die Verknüpfung mit dem nächsten Nucleotid mehr zur Verfügung steht. Da sich im Reaktionsgemisch auch dNTP's befinden, kommt es nicht immer an der gleichen Stelle zum Kettenabbruch und bei einem geeigneten Verhältnis von dNTP

zu ddNTP entstehen viele DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge. Alle vier Ansätze mit ihren Fragmentgemischen werden gleichzeitig gelelektrophoretisch aufgetrennt und die getrennten Fragmente anschließend autoradiographisch sichtbar gemacht. Die Sequenz der DNS-Matrize lässt sich direkt aus dieser Autoradiographie ablesen, da jede dNTP durch seine Farbstoffmarkierung erkennbar wird.

2.8 Mutationsanalyse

Mit Hilfe der originären, im Internet auffindbaren Basensequenz der Gene p53 und k-ras (NCBI BLAST 2 SEQUENCES) können die Basensequenzen der zu analysierenden Fragmente mit dem Wildtyp (Abb.7) verglichen werden. Somit werden Mutationen erkannt, bei denen es zu einem Basenaustausch (Abb. 8 und 9) gekommen ist.

Weiter werden alle Sequenzierungsdaten per Hand durchgemustert, da eine Base nicht nur durch eine andere ersetzt werden kann, sondern auch die gleiche Base zur Ausprägung kommt, aber eine andere Base im Reaktionsgemisch an dieser Stelle in einer geringeren Konzentration vorhanden ist.

Frameshift-Mutationen können anhand dieser beiden Methoden allerdings nicht ausgewertet werden, da im PCR-Produkt zwei verschieden lange Fragmente enthalten sind. Somit sind im Elektropherogramm zwei unterschiedliche Frequenzmuster überlagert vorhanden (Abb.10). In diesem Fall muss die Rekombinanten-DNS-Technik zur Anwendung gebracht werden (siehe 2.9). Diese Methode dient dazu, DNS-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzutrennen. Nach der Trennung kann dann wiederum nach der Kettenabbruchmethode nach Sanger die Sequenzierung der isolierten Mutanten vorgenommen werden.

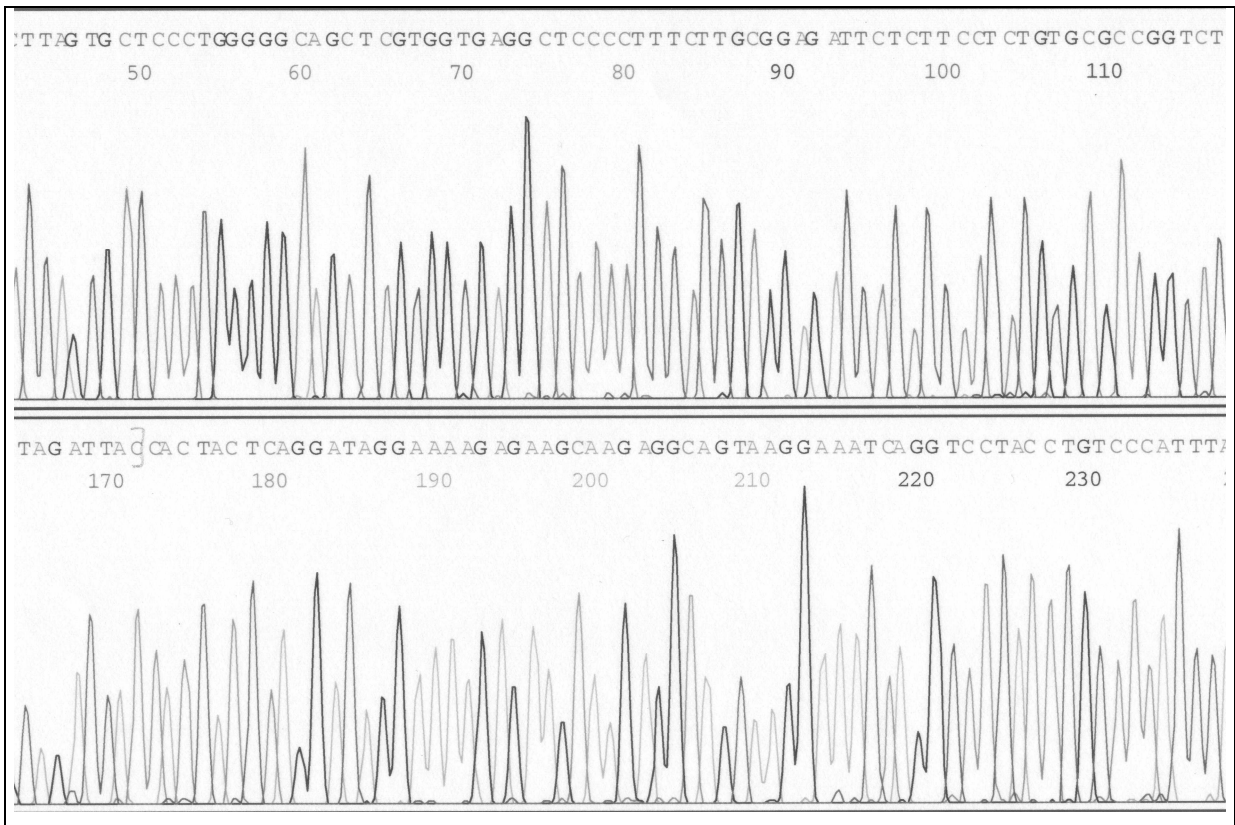


Abb.7: Elektropherogramm: p53 Exon 8 Wildtyp

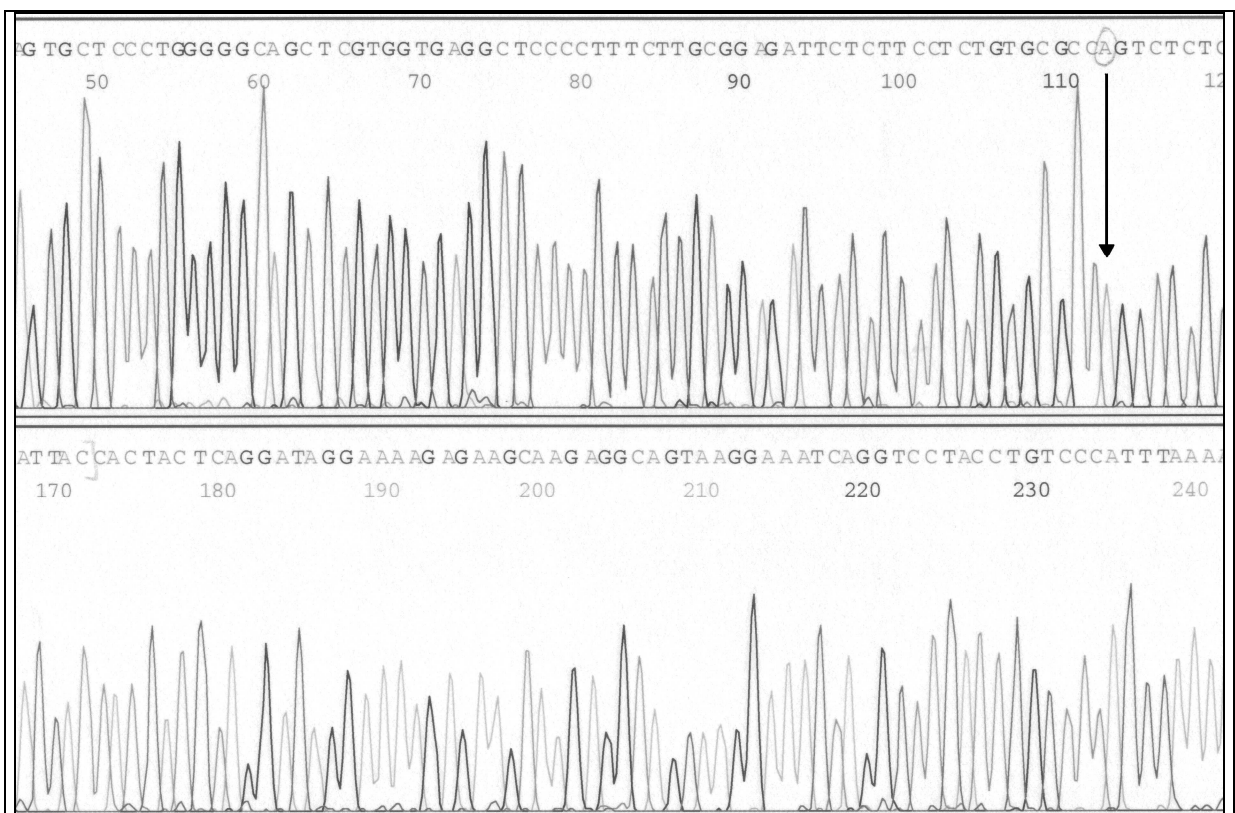


Abb.8: Elektropherogramm: p53 Exon 8 Mutante (Punktmutation/Transversion: Basenaustausch G zu A)

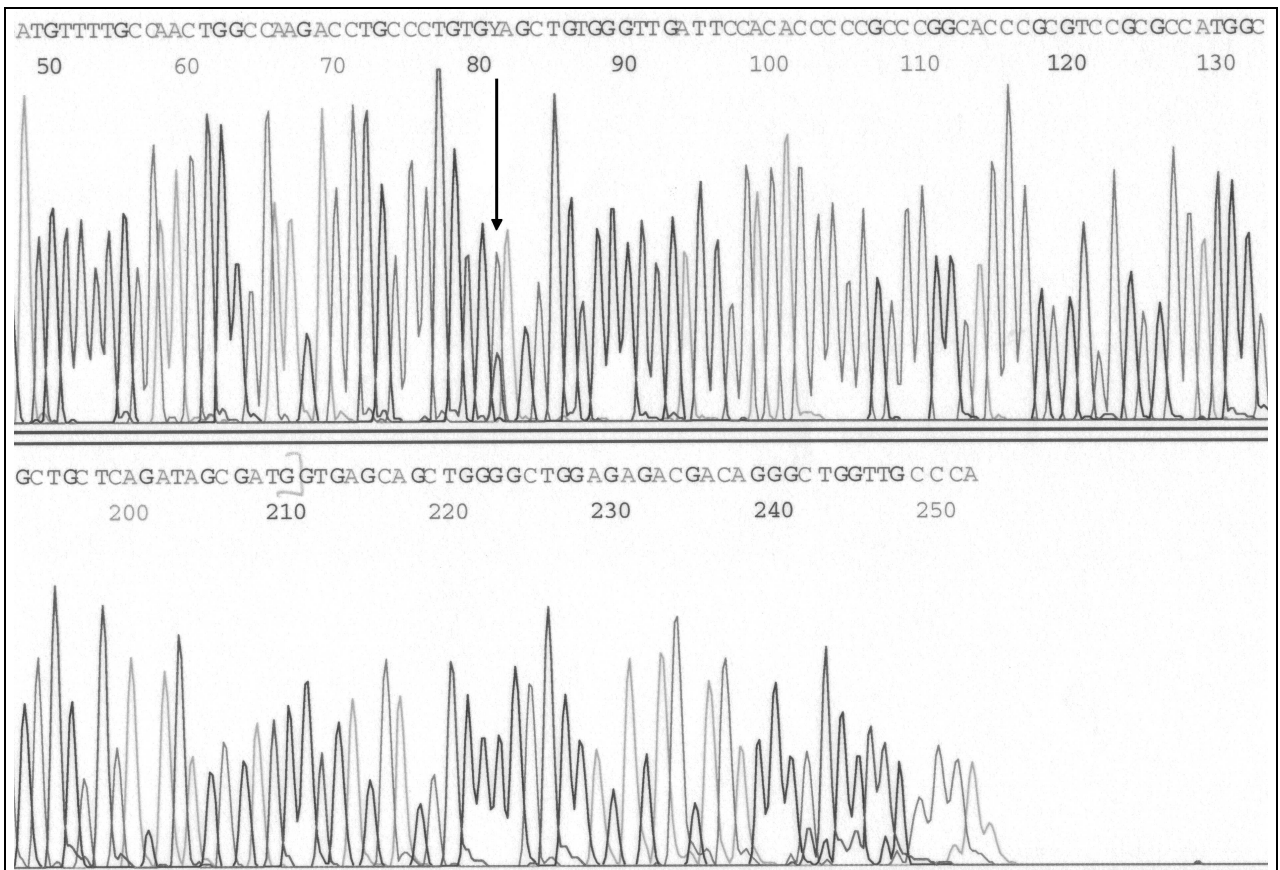


Abb.9: Elektropherogramm p53 Exon 5 Mutante (Punktmutation: 2 Basen vorhanden)

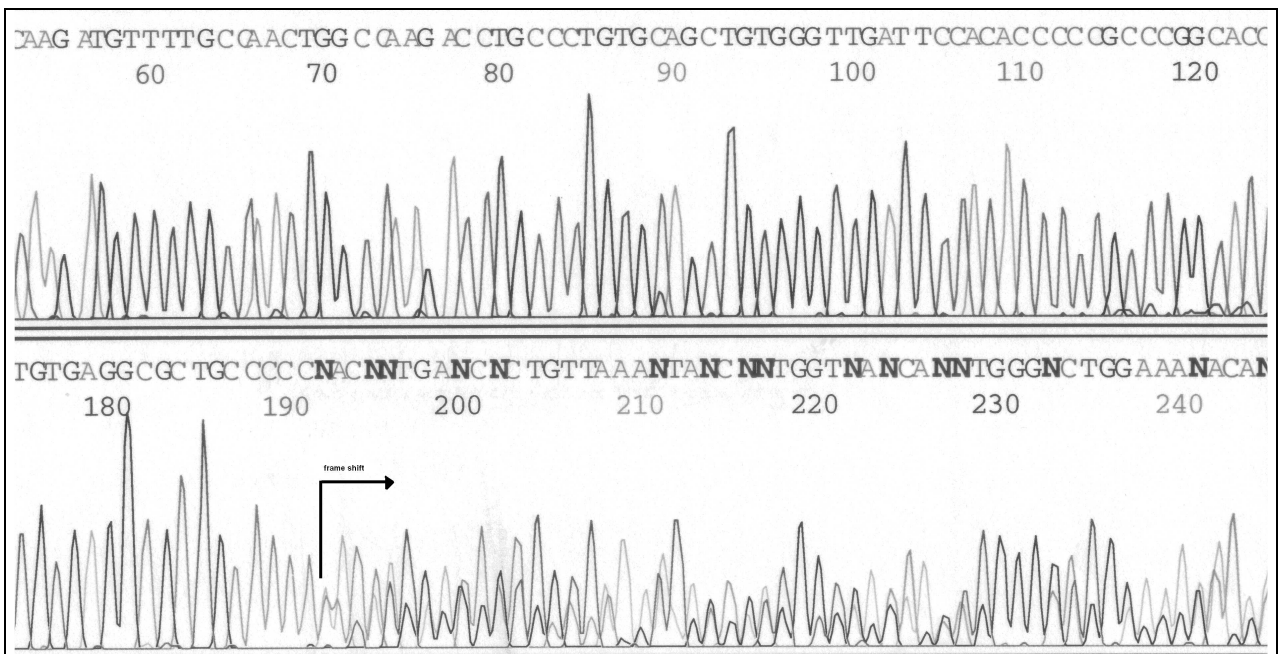


Abb.10: Elektropherogramm p53 Exon 5 Mutante (frame shift)

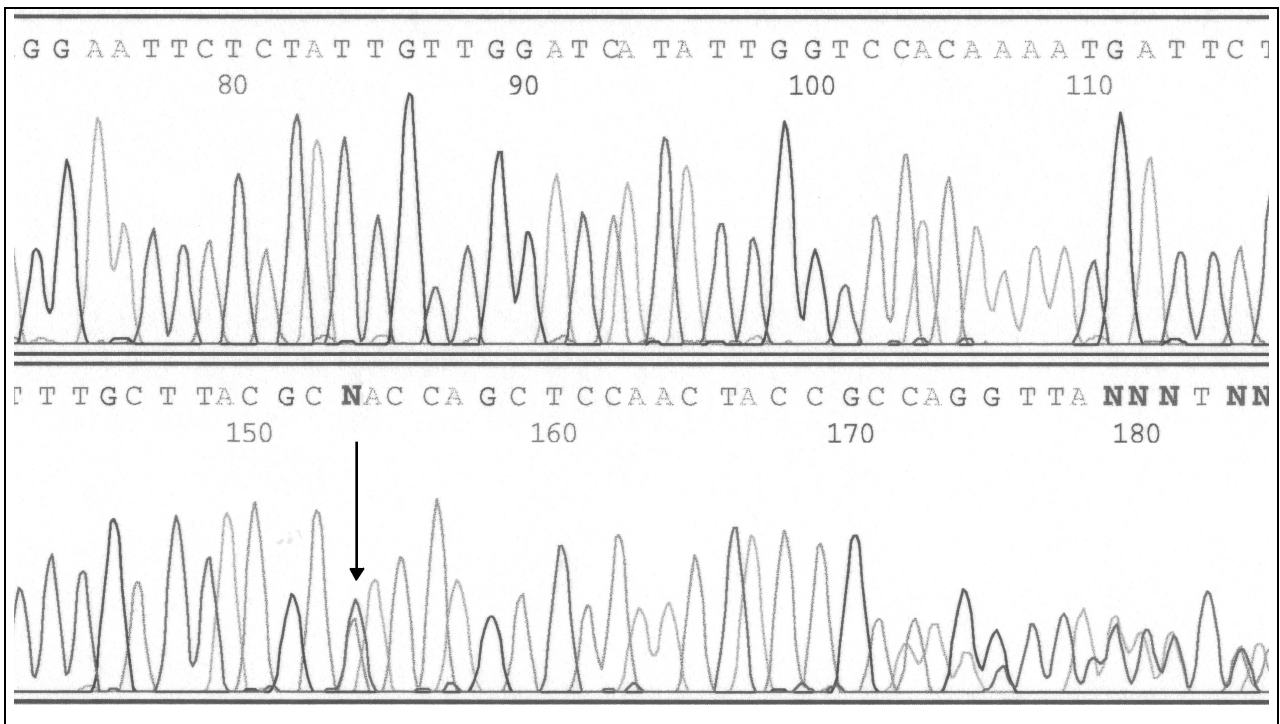


Abb.11: Elektropherogramm k-ras Mutante Codon 13 (Punktmutation: Basenaustausch)

2.9 Klonierung

Einige PCR-Produkte müssen kloniert werden, da die Art ihrer Mutation der direkten Sequenzanalyse entsprechend der Methode nach Sanger nicht zugänglich ist. Ziel ist es, Deletionen oder Insertionen nachzuweisen.

Wesentlich bei der DNS-Rekombinationstechnik ist die Herstellung einer großen Anzahl identischer DNS-Moleküle. Das gewünschte DNS-Fragment wird über normale 3'-5' Phosphodiesterbindungen mit einem Vektor-DNS-Molekül verbunden. Dieser Vektor wird nach dem Einschleusen in eine Wirtszelle repliziert. Überträgt man das rekombinierte DNS-Molekül, das aus Vektor und eingebautem DNS-Fragment besteht in eine Wirtszelle, so werden die beiden Elemente gemeinsam repliziert. Verwendung findet ein Kit der Firma Invitrogen (TOPO TA Cloning). Grundlage des Kit ist ein 3,9kb langer, linealisierter Plasmid-Vektor (pCR 2.1 TOPO), der mit einem Ampicillin-Resistenz-Gen und dem lacZ-Gen ausgestattet ist. Bei dem lacZ-Gen handelt es sich um eines von drei Strukturgenen des lac-Operons. Es kodiert für das Enzym beta-Galaktosidase, das die Hydrolyse von Lactose zu Glucose und Galaktose katalysiert. Der Klonierungsvektor selbst hat „klebrige“ Enden (sticky ends). Am 3' Ende befinden

sich Thymidin-Überhänge. Außerdem ist eine Topoisomerase kovalent gebunden. Da die Taq-Polymerase die Eigenschaft hat, amplifizierte DNS-Fragmente mit 3'-Desoxyadenosin-Enden zu versehen, können diese leicht an die Thymidin-Überhänge des Vektors binden.

Für den Einbau der Träger-DNS werden 2 µl PCR-Produkt, 1 µl pCR-TOPO Vektor (10 ng Plasmid/µl) und 1 µl H₂O in ein Eppendorf-Gefäß pipettiert. Der Reaktionsansatz wird fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf Eis gegeben (TOPO Cloning-Reaktion).

2.9.1 Transformation

Der Begriff Transformation wird genutzt, um die genetische Veränderung einer Zelle zu beschreiben, die durch die Aufnahme und Expression fremder DNS unabhängig von dem daran beteiligten Mechanismus entsteht. Mit Hilfe der Transformation können Plasmidvektoren in E.coli-Stämme übertragen und dort exprimiert werden. Der Vektor selbst muss ein Selektionsgen (meist ein Resistenzgen) besitzen, um für die DNS-Klonierung brauchbar zu sein. Die Selektion transformierter Zellen ist entscheidend für die DNS-Klonierung durch Plasmidvektoren, da die Transformation von E.coli mit isolierter Plasmid-DNS ineffizient ist. Zudem bleibt ein Plasmid ohne Selektionsdruck (Antibiotikum) möglicherweise nicht in den Zellen erhalten. Zwei Arten von Vektoren kommen häufig zur Anwendung: E.coli-Plasmidvektoren und Vektoren mit dem Bakteriophagen λ . Plasmidvektoren werden in den Wirtszellen repliziert. Als Empfängerzellen dienen in dieser Arbeit kompetente E.coli-Stämme für die Transformation. Sie vermehren zusammen mit ihrer eigenen DNS auch die eingebrachten DNS-Fragmente.

Normale E.coli-Zellen können keine Plasmid-DNS aus dem Medium aufnehmen. Dazu werden die Zellen hohen Konzentrationen zweiwertiger Kationen (CaCl₂) ausgesetzt. Dadurch werden sie für die Aufnahme von Fremd-DNS durchlässig. Dies ist jedoch nur bei ca. 1 von 10000 Zellen der Fall. Diese Zellen werden nun über den Selektionsdruckfaktor Antibiotikum aus der Zellmasse herausgefiltert. Nur die Zellen, die mit dem Plasmid auch die Antibiotikumresistenz erworben haben, bilden Kolonien.

Für den Zweck der Untersuchungen wurden die E.coli-Zellen vorsichtig mit 2 µl beta-Mercaptoethanol (0,5 M) vermischt und dann nach Zugabe von 2 µl TOPO-Cloning-Reaktion 30 min auf Eis inkubiert. Dadurch wird die DNS gebunden und bei kurzem Erhitzen auf 42 °C in die Zellen aufgenommen. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur werden 250 µl SOC Medium zugegeben (30 min, 37 °C). 200 µl von diesem Gemisch werden auf einer vorgewärmten und präparierten Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.9.2 Herstellung der Agarplatten

Für das Wachstum der E.coli-Stämme wird ihnen ein Minimalnährmedium angeboten. Glukose dient als einziger Kohlenhydratlieferant und liefert durch Verstoffwechslung ATP. Ammonium dient als Stickstoffquelle zur Herstellung von z.B. Aminosäuren. Auch verschiedene Salze und Spurenelemente sind vorhanden. E.coli kann in Kulturschalen auf Agar, einem halbfesten Nährboden aus pflanzlichen Polysacchariden, gezüchtet werden. Hier findet ein LB-Medium Verwendung. Trypton dient als Aminosäurequelle bei einem pH-Wert von 7,0. Es besteht aus Hefeextrakt und Kochsalz. Die Kulturmedien werden autoklaviert und anschließend mit 50 µg/ml Ampicillin beimpft. Dann werden 40 µl IPTG (100 mM) und Xgal (40 mg/ml) aufgestrichen. IPTG ist ein Induktor der lac-Gene und dafür verantwortlich, dass die lacZ-Expression nicht unterdrückt wird. Xgal wird als Substrat der beta-Galaktosidase enzymatisch gespalten, wobei ein dunkelblaues Produkt entsteht.

2.9.3 Beurteilung der Kolonien

Nach dem Aufbringen der E.coli-Stämme auf den Nährboden wird die Agarplatte über Nacht bebrütet. Ist am nächsten Tag visuell eine Koloniebildung erkennbar, so ist dies der Beweis der Transformation der E.coli-Zellen, denn die ampicillinsensiblen Ausgangszellen können auf dem Nährboden nicht wachsen. Auch die Farbe der Kolonien spielt eine Rolle. Wurde das gewünschte PCR-Produkt im lacZ-Operon aufgenommen, verändern die Kolonien ihre Farbe. Damit ist die erfolgte Rekombination sichtbar. Ebenso sind anhand ihrer Farbe die Kolonien nachweisbar, die nicht

rekombinante Zellen enthalten, da sie X-Gal als Substrat verwenden konnten und blau erscheinen. Jetzt können die makroskopisch erkennbaren rekombinanten Klone weiterverwendet werden. Sie werden auf ein ampicillinhaltiges LB-Medium aufgebracht. Später werden zehn Kolonien entnommen, und vier Stunden inkubiert. Man entnimmt 5 µl der Bakteriensuspension und vermischt diese mit 15 µl H₂O. Um freie DNS zu erhalten, werden die Zellen zerstört, indem sie bei 100 °C gesiedet werden.

2.9.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Bakteriensuspension dient in der nachfolgenden PCR als Matritze. Der weitere Reaktionsansatz enthält:

- 5,0 µl 10x PCR-Puffer
- 1,0 µl je dNTP (10 mmol/l)
- 28,0 µl H₂O
- 5,0 µl DMSO
- 0,5 µl TMAC
- 1,0 µl 5`-Primer (10 pmol)
- 1,0 µl 3`-Primer (10 pmol)
- 1,25 U Taq-Polymerase
- 5,0 µl der gekochten Bakteriensuspension

Die PCR wird mit 30 Zyklen durchgeführt. Das Temperaturprofil ist in Tab. 5, die genutzten Primer sind in Tab. 6 angegeben.

Denaturierung	ZyklusDenaturierung	Annealing	Zyklus-Extension	Extension
94 °C 7 min	94 °C 1 min	60 °C 1 min	72 °C 1 min	72 °C 10 min

Tab.5: Polymerase-Kettenreaktion:Temperaturprofil, Amplifikation der klonierten DNS-Fragmente

2.9.5 Agarose-Gel

Die amplifizierten DNS-Fragmente müssen im Anschluss kontrolliert werden. Hierzu wird die Technik der Gelelektrophorese genutzt, mit der man die Trennung unterschiedlich großer DNS-Fragmente erreicht. Zuerst wird ein 1,5 %iges Gel aus geschmolzener

Agarose hergestellt. Dafür werden 3,75 g Agarose in 250 ml 1xTA-Puffer gelöst und aufgeköcht. Nachdem die Lösung auf Körperwärme abgekühlt ist, wird ihr 25 µl des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid hinzugefügt. Anschließend wird das Gel in eine Form gegossen, die regelmäßige Taschen enthält, um die PCR-Proben aufzunehmen. Durch Aushärten der Agarose bildet sich eine Gelmatrix aus langen, miteinander verflochtenen Polymerketten. Die Ausdehnung der dazwischen liegenden Kanäle hängt von der Konzentration des Gels ab. Da die Porengröße bei Agarosegelen verhältnismäßig groß ist, werden DNS-Fragmente zwischen 500 bp bis 20 kb aufgetrennt. Das ausgehärtete Gel wird in eine horizontale Elektrophoresekammer verbracht, die mit 1xTA-Laufpuffer gefüllt ist. Den DNS-Fragment-Gemischen wird noch jeweils 2 µl Gelloading-Buffer untergemischt und anschließend in die Taschen des Gels pipettiert. Der Fortschritt der Elektrophorese wird anhand des gefärbten Puffers verfolgt (1,5 Stunden bei 70 Volt). DNS-Fragmente wandern zum positiv geladenen Pol mit einer Geschwindigkeit, die umgekehrt proportional ihrer Größe ist. So entstehen Banden, die durch den Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid nachweisbar sind. Dazu betrachtet man das Gel auf einem Transluminator unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (Abb. 12). Die in die DNS-Doppelhelix eingebrachten Anteile des Farbstoffes zeigen die Position der Bande (amplifizierte DNS) an. Als Längenstandard verwendet man auch hier die Hae III-verdaute ϕ X-174-RF DNS. Nach dem Fotografieren des Gels können jeweils vier geeignete Proben der Firma MWG-Biotech Ebersberg mit der Bitte um Sequenzierung zugesandt werden.

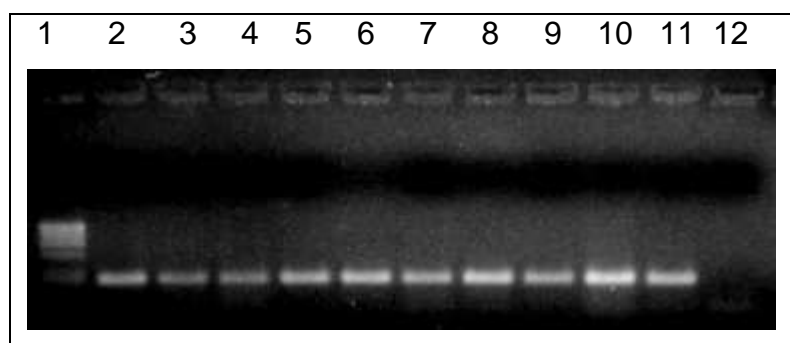


Abb.12: Agarosegel, klonierte Desoxyribonukleinsäure-Fragmente: Exon 6 (407bp), Bahn 1: Desoxyribonukleinsäure-Längenstandard (Hae III-verdaute ϕ X-174-RF DNS), Bahn 2-11: Polymerasen-Kettenreaktion-Produkte, Bahn 12: Negativkontrolle

2.10 Primer

Exon	Name	Lokalisation	Sequenz	Fragmentgröße (bp)
5	5`-1	12983 – 13006	5`-GCCGTGTTCCAGTTGCTTTATCTG-3`	298
	3`-B	13280 – 13260	5`-TGGGCAACCAGCCCTGTCGTC-3`	
6	5`-C	13301 – 13319	5`-CCTCACTGATTGCTCTTAG-3`	186
	3`-2	13486 – 13467	5`-CACTGACAACCACCCTTAAC-3`	
7	5`-6	13974 – 13993	5`-CATCTTGGGCCTGTGTTATC-3`	292
	3`-6	14265 – 14243	5`-GAGTGGGAGCAGTAAGGAGATTC-3`	
8	5`-8	14373 – 14394	5`-GGAGCCTGGTTTTTTAAATGGG-3`	308
	3`-9	14680 – 14659	5`-CTAGGAAAGAGGCAAGGAAAGG-3`	

Tab.6: Polymerase-Kettenreaktion-Primer (Amplifikation der Tumorgewebe-Desoxyribonukleinsäure). Sequenz des humanen p53: GenBank, Rozemuller EH, Accession-No. U94788

DNS-Fragment	Name	Lokalisation	Sequenz	Fragmentgröße (bp)
1	RAS 5`-20	170 – 189	5`-GGCCTGCTGAAAATGACTG-3`	235
	RAS 3`-23	404 - 385	5`-CAGTCCTCATGTACTGGTCC-3`	

Tab.7: Polymerase-Kettenreaktion-Primer (Amplifikation der Tumorgewebe-Desoxyribonukleinsäure). Sequenz des humanen k-ras: NCBI NM_004985 gi:15718760

Exon	Name	Lokalisation	Sequenz
5	2428	13001 - 13020	5`-TATCTGTTCACCTTGTGCCCT-3`
6	2930	13302 – 13319	5`-CTCACTGATTGCTCTTAG-3`
	2485	13468 – 13445	5`-ACCCCTCCTCCCAGAGACCCCAGT-3`
7	2931	13976 – 13993	5`-TCTTGGGCCTGTGTTATC-3`
	2666	14199 – 14180	5`-GAAATCGGTAAGAGGTGGGC-3`
8	2575	14650 – 14627	5`-GTGAATCTGAGGCATAACTGCACC-3`

Tab.8: Sequenzier-Primer

Sequenz des humanen p53: GenBank, Rozemuller EH, Accession-No. U94788

Name	Sequenz
M13 Forward AP	5`-CACATCCCCCTTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGC-3`
M13 Reverse AP	5`-CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCACG-3`

Tab.9: Polymerase-Kettenreaktion-Primer (Amplifikation von klonierten Desoxyribonukleinsäure-Fragmenten)

2.11 Genotyp-Analyse des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus

In einem weiteren Arbeitsschritt wird eine Genotyp-Analyse des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus bei Kolonkarzinom-Patienten erstellt. Die Ergebnisse liegen für 319 Kolonkarzinom-Patienten und 300 Kontrollpersonen vor. Zur Analyse findet ein Light-Cycler® Verwendung, der die Durchführung der real-time-PCR-Technik ermöglicht. Diese Technik kombiniert die klassische PCR mit einem Fluoreszenzphotometer. Das Gerät erzeugt ein Lichtsignal, das während des Ablaufes der PCR direkt proportional der Menge der neu amplifizierten DNS ist. Dieses Lichtsignal wird kontinuierlich gemessen, womit die Detektion der PCR-Produkte möglich ist. Die Technik wird aus diesem Grund als real-time-PCR bezeichnet. Um eine Mutationsanalyse durchführen zu können, wird die Darstellung der sequenzabhängigen Schmelzkurven betrachtet.

Die Technik des Light-Cyclers® arbeitet mit markierten Oligonukleotid-Sonden. Diese Nukleotide müssen in ihrer Basensequenz mit dem Bereich auf der DNS übereinstimmen, der für die Mutationsanalyse interessant ist. In diesem Bereich werden die Sonden mit der DNS hybridisieren. Beide Sonden verstehen sich als „Anfang und Ende“ und sind völlig unabhängig voneinander. Die mit Fluoreszin markierte Donorsonde wird von einer LED angestrahlt und emittiert daraufhin eine spezifische Strahlung mit etwas größerer Wellenlänge. Die zweite Oligonukleotid-Sonde wird als Akzeptorsonde bezeichnet. Sie hält an ihrem 5`-Ende den Farbstoff Light-Cycler-Red gebunden. Diese Sonde wird von der Donorsonde angeregt, ebenfalls ein Fluoreszenzlicht zu emittieren. Das gelingt nur, wenn der maximale Abstand beider Sonden nur einige wenige Nukleotide (maximal fünf Basen) beträgt. Das emittierte Licht wird von einem Photometer aufgefangen und gemessen. Dieser Ablauf wird als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet. Somit ist es möglich, anhand der Menge des emittierten Light-Cycler-Red-Fluoreszenzlichtes abzuleiten, wie viele neue Amplifikate entstanden sind. Sobald die PCR beendet ist, erfolgt der wesentliche Schritt der Light-Cycler-Technik: Die Darstellung der Schmelzkurve. Hierzu werden die PCR-Produkte in kleinen Temperaturschritten erhitzt und nach jeder Erhöhung die Strahlung des weiterhin emittierten Fluoreszenzlichtes gemessen. Mit der Steigerung der Temperatur wird erreicht, dass sich die Oligonukleotidsonden von der DNS-Vorlage ablösen. Dieser Temperaturbereich ist für jede Sonde charakteristisch. Sobald sich die Sonden lösen, können sie kein Licht mehr emittieren, da sie nun in freier

Form vorliegen. Sie halten nicht mehr den maximal fünf Basen langen Abstand zwischen den beiden Sonden, der benötigt wird, damit die Donorsonde die Akzeptorsonde in einen angeregten Zustand versetzt. Es kommt zu einem sprunghaften Abfall der gemessenen Fluoreszenz. Stimmen die Sonden mit allen ihren Basen mit der DNS-Vorlage zu 100 % überein (Wildtyp), an der sie hybridisieren, so ergibt sich ein spezifischer Temperaturwert, bei dem sich die Sonden lösen. Befindet sich eine vom Wildtyp abweichende Base im Bereich, der von den Sonden überspannt wird (Mutante), so fällt die Abschmelztemperatur geringer aus. Damit ist es möglich, am Verlauf der Schmelzkurve zu entscheiden, ob in dem durch Sonden markierten Bereich eine Mutation vorliegt. Es ist allerdings nicht möglich zu sagen, welche Base im speziellen abgewandelt ist. Es ist also nur die Unterscheidung zwischen Wildtyp und Mutante möglich. Die Schmelzkurve wird graphisch so aufbereitet, dass an dem Punkt der Sondenablösung von der DNS-Vorlage ein Peak zu sehen ist. Hierfür erfolgt die Darstellung nach ihrer Differenzierung ($-dF/dT$).

Ist der Genotyp der mutierten Probe homozygot, so wird die Temperaturkurve einen einzigen Peak anzeigen. Handelt es sich um eine heterozygot mutierte Probe, so werden zwei Peaks sichtbar.

Dank dieser Technik kann in kürzester Zeit der genetischen Wildtyp von der Mutante unterschieden werden. Gleichzeitig ist zu erkennen, ob die Mutante homozygot oder heterozygot mutiert ist.

2.12 Statistische Auswertung

Betrachtet werden soll der Zusammenhang zwischen dem Genotyp und bestimmten Faktoren des Patientengutes. Hierzu dient die Berechnung der Odds ratios und Konfidenzintervalle, die über nichtkonditionale logistische Regressionen ermittelt werden, die Alter und Geschlecht berücksichtigen. Um die Unterschiede in der Verteilung der p53- und k-ras-Mutationen zwischen den verschiedenen Patientengruppen darzustellen, dient Fisher's exakter Test. Die Statistik-Software SAS Version 6.12 wurde für sämtliche Berechnungen herangezogen.

2.13 Verwendete Geräte und Materialien

AmpliTaq DNS-Polymerase	Perkin Elmer, Frankfurt
CleanGel DNS-HP 15 %	ETC, Kirchentellinsfurt
Delect Buffer Kit	ETC, Kirchentellinsfurt
GeneAmp dNTP`s	Perkin Elmer, Frankfurt
φX-174_RF DNS Hae III DIGEST	Pharmacia, Freiburg
Fragmente 1358, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, und 72 bp	
P53-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg
K-ras-Primer	MWG-Biotech, Ebersberg
QiAmp Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Thermal Cycler 480	Perkin Elmer, Frankfurt
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe

Puffer und Lösungen

10x PCR-Puffer	100 mM Tris-HCl 500 mM KCl 15 mM MgCl ₂ 0,01 % Gelatine pH 8,3
SOC-Medium	2 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 10 mM NaCl 2,5 mM KCl 10 mM MgCl ₂ 10 mM MgSO ₄ 20 mM Glucose
LB-Agar	1,0 % Trypton 0,5 % Hefeextrakt 1,0 % NaCl 50 µl/ml Ampicillin pH 7,0

Gelloading-Buffer	0,25 %	Bromphenolblau
	0,25 %	Xylenxyanol
	30 %	Glycerol
1x TA-Puffer	40 mM	Trizma Base
	20 mM	Eisessig
	1 mM	EDTA
	pH 8,5	
Agarose-Gel	3,75 g	Agarose
	250 ml	1xTA-Puffer
	25 µl	Ethidiumbromid

3. Ergebnisse

3.1 Genotyp-Verteilung des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus

Das Ergebnis der Genotyp-Verteilung des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus (Tab.10) umfasst 324 Kolonkarzinom-Patienten und 300 Kontrollpersonen. In der Patientengruppe wird der Wildtyp C (Leu/Leu bzw. wt/wt) in 30,86 % (100 Patienten) der Fälle gefunden, in der Kontrollgruppe hingegen zu 36,33 %. In der Patientengruppe zeigen 47,84 % (155 Personen) heterozygote Varianten von CYP1B1 CG (Leu/Val bzw. wt/mt), was in der Kontrollgruppe zu 46,0 % der Fall ist. An homozygoten Mutationen G (Val/Val bzw. mt/mt) finden sich in der Patientengruppe 21,30 % (69 Personen), in der Kontrollgruppe 17,67 %. Die Frequenz der polymorphen CYP1B1-Genotypen ist in der CRC-Gruppe also erhöht (+5,47 %). Dementsprechend kann folgende Aussage getroffen werden: OR:1,1561; 95 % CI: 0,7644-1,7487 (Tab. 10). Allerdings erreichen die Ergebnisse kein statistisch signifikantes Ausmaß.

Das Genotyp-Muster bei den gesunden Individuen entspricht der Verteilung, die für gesunde Kaukasier beschrieben ist (Fritsche et al.;1999).

	Kontrollgruppe (n=300)			CRC-Patienten (n=324)			Odds Ratio (95 % CI)	p-Wert
	wt/wt	wt/mt	mt/mt	wt/wt	wt/mt	mt/mt		
CYP1B1 Leu432Val	36,33	46,0	17,67	30,86	47,84	21,30	1,1561(0,7644-1,7487) ^a	0,492

Tab.10: Genotypverteilung des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus bei Kolonkarzinom-Patienten und Kontrollindividuen

^a wt/wt-Genotyp gegen wt/mt- und mt/mt-Genotyp

Die Odds Ratios und Konfidenzintervalle wurden mit (unbedingter) logistischer Regression berechnet. Es wurde nach Alter (quadratisch) und Geschlecht adjustiert.

wt: Wildtyp, mt: Mutante, n: Fallzahl, CI: Konfidenzintervall

3.2 Genotyp-Verteilung des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus bei Rauchern

In der Gruppe der Kolonkarzinom-Patienten rauchen 197 Personen, während in der Kontrollgruppe 177 Individuen rauchen. Bei den rauchenden CRC-Patienten weisen 28,93 % den Wildtyp von CYP1B1 auf, während 48,22 % die heterozygote und 22,84 %

die homozygote polymorphe Variante tragen (Tab.11). Somit kann keine statistisch signifikant erhöhte Frequenz polymorpher Allele von CYP1B1 nachgewiesen werden. In der Tendenz jedoch steigt die Frequenz der vom Wildtyp abweichenden Formen des CYP1B1-Polymorphismus bei den rauchenden Patienten gegenüber den Rauchern der Kontrollgruppe dezent an. In der Kontrollgruppe findet man den Wildtyp zu 3,27 % häufiger, während die polymorphen Varianten um 3,27 % seltener zu finden sind als bei den rauchenden Patienten. Dementsprechend beträgt die OR 1,0904; CI:95 % 0,6311-1,8840 (Tab. 11).

	Kontrollen (n=177)			CRC-Patienten (n=197)			Odds Ratio (95 % CI)	p-Wert
	wt/wt	wt/mt	mt/mt	wt/wt	wt/mt	mt/mt		
CYP1B1 Leu432Val	32,2	49,15	18,64	28,93	48,22	22,84	1,0904 (0,6311–1,8840) ^a	0,756

Tab.11: Genotypverteilung des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus bei Rauchern und Kontrollindividuen

^a wt/wt-Genotyp gegen wt/mt- und mt/mt-Genotyp

Die Odds Ratios und Konfidenzintervalle wurden mit (unbedingter) logistischer Regression berechnet. Es wurde nach Alter (quadratisch) und Geschlecht adjustiert.

wt: Wildtyp, mt: Mutante, n: Fallzahl, CI: Konfidenzintervall

3.3 Genotyp-Verteilung des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus bei Kolonkarzinom-Patienten

Weitere Analysen betreffen die Genotyp-Verteilung bei Kolonkarzinom-Patienten in Abhängigkeit von ihrem Raucherstatus. In dieser Gruppe befinden sich 197 Raucher, die einer Gruppenstärke von 127 Nichtrauchern gegenüberstehen (Tab.12). Während schon bei nicht rauchenden Patienten zu 18,90 % der mutierte Genotyp CYP1B1 (Val/Val) nachweisbar ist, erhöht sich dieser Wert bei den Rauchern geringfügig auf 22,84 % (+3,58 %). In der Tendenz, aber ohne Signifikanz, findet eine Verschiebung der Frequenz der polymorphen Varianten von CYP1B1 hin zu den Rauchern statt (+4,93 %). Die Odds Ratio beträgt: 1,0732; 95 % CI 0,6303-1,8275 (Tab. 12).

	Nichtraucher (n=127)			Raucher (n=197)			Odds Ratio (95 % CI)	p-Wert
	wt/wt	wt/mt	mt/mt	wt/wt	wt/mt	mt/mt		
CYP1B1 Leu432Val	33.86	47.24	18.90	28.93	48.22	22.84	1,0732 (0,6303- 1,8275) ^a	0,795

Tab.12: Genotypverteilung des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus bei Kolonkarzinom-Patienten in Abhängigkeit des Raucherstatus

^a wt/wt-Genotyp gegen wt/mt- und mt/mt-Genotyp

Die Odds Ratios und Konfidenzintervalle wurden mit (unbedingter) logistischer Regression berechnet. Es wurde nach Alter (quadratisch) und Geschlecht adjustiert.

wt: Wildtyp, mt: Mutante, n: Fallzahl, CI: Konfidenzintervall

3.4 Assoziation des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus mit somatischen p53-Mutationen in CRC-Gewebeproben in Abhängigkeit des Raucherstatus

Für die Analyse der somatischen p53-Mutationen stehen insgesamt 110 Patienten zur Verfügung, deren Tumormaterial aufgearbeitet wurde. In dieser Gruppe rauchen 66 Individuen, während es sich bei 40 Personen um Nichtraucher handelt. Von den übrigen vier Patienten ist der Raucherstatus nicht bekannt, weshalb diese analytisch nicht berücksichtigt werden können. Insgesamt kann in 59 Fällen eine genotypische Mutation des p53-Gens im Tumorgewebe nachgewiesen werden. 47 Fälle sind genotypisch für das p53-Gen als Wildtyp anzusehen. Die Mutationen finden sich zu 66,1 % (in 39 Fällen) bei den Rauchern und in nur 33,9 % (in 20 Fällen) in der nichtrauchenden Patientengruppe. Die mutierte Form des p53-Gens ist somit im Kollektiv der Raucher häufiger als bei den Nichtrauchern nachweisbar (Tab. 13 und 14).

Bei den Nichtrauchern wird ein Zusammenhang zwischen den polymorphen Allelen von CYP1B1 und der Frequenz somatischer p53-Mutationen nachgewiesen. Bereits der Genotyp CG (Leu/Val) ist im Vergleich zum Wildtyp C (Leu/Leu) von CYP1B1 mit einem 2,18-fach erhöhtem Risiko für eine Mutation im p53-Gen assoziiert (OR: 2,1809 (0,4562-10,4251)). Betrachtet man den Genotyp G (Val/Val), steigt das Risiko für eine p53-Mutation sogar auf das 5,2-fache (OR: 5,2048 (0,6967-38,8838)). In der Gruppe der Nichtraucher geht demnach der Aminosäurewechsel von Leucin zu Valin mit einer statistisch signifikant erhöhten Frequenz von p53-Mutationen einher (Tab.13).

Dieser Zusammenhang erreicht in der Gruppe der Raucher keine statistische Signifikanz, was durch die hohe Anzahl von Mutationen in p53 erklärbar ist, die bereits beim Wildtyp C gefunden wurden. Die Summe bzw. die Frequenz der somatischen Mutationen von p53 sind - verglichen mit den Nichtrauchern - bei den Rauchern insgesamt deutlich erhöht. Es kann jedoch keine Korrelation zwischen den untersuchten Allelen von CYP1B1 und der Frequenz an p53-Mutationen in der Rauchergruppe nachgewiesen werden. Lediglich die Gesamtzahl mutierter p53-Gene ist bei den Rauchern erhöht (Tab.14).

	CRC- Patienten Nichtraucher (n=39)		Odds Ratio (95 % CI)	p-Wert
	P53 normal	P53 mutiert		
CYP1B1 Leu432Val wt/wt	9 (50 %)	7 (33.33 %)	1.00 (Referenzkategorie)	
CYP1B1 Leu432Val wt/mt	7 (38.89 %)	8 (38.10 %)	2.1809 (0.4562-10.4251)	0.329
CYP1B1 Leu432Val mt/mt	2 (11.11 %)	6 (28.57 %)	5.2048 (0.6967-38.8838)	0.108
CYP1B1 Leu432Val wt/mt und mt/mt	9 (50 %)	14 (66,57 %)	2.8899 (0.6811-12.2615)	0.150

Tab.:13 Assoziation des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus mit somatischen p53-Mutationen bei Nichtrauchern (Kolonkarzinom-Patienten).

Die Odds Ratios und Konfidenzintervalle wurden mit (unbedingter) logistischer Regression berechnet. Es wurde nach Alter (quadratisch) und Geschlecht adjustiert.
wt: Wildtyp, mt: Mutante, n: Fallzahl, CI: Konfidenzintervall

	CRC- Patienten Raucher (n=65)		Odds Ratio (95 % CI)	p- Wert
	P53 normal	P53 mutiert		
CYP1B1 Leu432Val wt/wt	8 (30.77 %)	13 (33.33 %)	1.00 (Referenzkategorie)	
CYP1B1 Leu432Val wt/mt	11 (42.31 %)	15 (38.46 %)	0.7412 (0.2208-2.4884)	0.628
CYP1B1 Leu432Val mt/mt	7 (26.92 %)	11 (28.21 %)	0.8123 (0.2115-3.1200)	0.762
CYP1B1 Leu432Val wt/mt und mt/mt	18 (69.23 %)	26 (66.67 %)	0.7681 (0.2528- 2.3342)	0.642

Tab. 14: Assoziation des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus mit somatischen p53-Mutationen bei Rauchern (Kolonkarzinom-Patienten)

Die Odds Ratios und Konfidenzintervalle wurden mit (unbedingter) logistischer Regression berechnet. Es wurde nach Alter (quadratisch) und Geschlecht adjustiert.
wt: Wildtyp, mt: Mutante, n: Fallzahl, CI: Konfidenzintervall

Bei den Rauchern können insgesamt 79 von 113 Mutationen in den einzelnen Exons der Gewebeproben nachgewiesen werden. Dieses hohe Ergebnis erklärt sich durch Mehrfachmutationen in dem p53-Gen pro Exon. Die Tabelle 15a zeigt deren Verteilung auf die einzelnen Exons. Bei den Nichtrauchern können 34 von 113 Mutationen detektiert werden, deren Verteilung in Abhängigkeit vom Genotyp des CYP1B1 in Tabelle 15b wiedergegeben ist.

Damit ergeben sich Hinweise für den negativen Einfluss des Rauchens auf die Entstehung von CRC an sich, aber ohne Assoziation zu dem CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus.

Raucher: CYP1B1-Genotyp / p53-Mutation					
	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Summe
C	8	4	7	5	24
CG	4	9	4	3	20
G	16	1	8	10	35
Summe	28	14	19	18	79

Tab.15a: Lokalisation der nachgewiesenen p53-Mutationen bei rauchenden Kolonkarzinom-Patienten in Abhängigkeit vom Genotyp des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus
C: Genotyp Leu/Leu, CG: Genotyp Leu/Val, G: Genotyp Val/Val

Nichtraucher: CYP1B1-Genotyp / p53-Mutation					
	Exon 5	Exon 6	Exon 7	Exon 8	Summe
C	3	1	1	5	10
CG	6	5	2	1	14
G	2	4	1	3	10
Summe	11	10	4	9	34

Tab.15b: Lokalisation der nachgewiesenen p53-Mutationen bei nicht-rauchenden Kolonkarzinom-Patienten in Abhängigkeit vom Genotyp des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus
C: Genotyp Leu/Leu, CG: Genotyp Leu/Val, G: Genotyp Val/Val

Absolut gesehen zeigen sich folgende Transversionen für p53-Mutationen:

1x	A > C (0,88 %)	6x	A > G (5,3 %)
2x	A > T (1,8 %)	6x	C > A (5,3 %)
47x	C > T (41,6 %)	34x	G > A (30,01 %)
2x	G > C (1,8 %)	6x	G > T (5,3 %)
1x	T > A (0,8 %)	1x	T > G (0,88 %)

Insgesamt sind 106 Transversionen nachweisbar. Diese hohe Anzahl ist durch Mehrfachmutationen innerhalb der Exons zu erklären. Außerdem liegen zu einem Patienten zum Teil mehrere Gewebeblöcke aus Tumormaterial vor, die aus verschiedenen Regionen des Tumors stammen. Insertionen wurden an dieser Stelle zunächst nicht berücksichtigt.

Unterteilt man die gefundenen Transversionen gemeinsam mit den Insertionen wiederum in Raucher und Nichtraucher, so zeigt sich ein deutliches Ergebnis: Bei den Rauchern werden absolut 79 (69,9 %) Veränderungen festgestellt gegenüber nur absolut 34 (30,1 %) bei den Nichtrauchern.

Teilt man weiterhin die verschiedenen base shifts dem Raucherstatus zu, so ergibt sich folgendes Ergebnis:

Raucher: 3x A>G, 2x A>T, 4x C>A, 1x G>C, 2x G>T, 1x T>A, 1x T>G, 3x Insertionen
36x C>T, 26x G>A ,

Base shifts von A>C, C>G und T>C können nicht nachgewiesen werden.

.

Nichtraucher: 1x A>C, 3x A>G, 2x C>A, 1x G>C, 4x G>T, 4x Insertionen
11x C>T, 8x G>A.

Base shifts A>T, T>A, T>C, C>G und T-G können bei Nichtrauchern nicht nachgewiesen werden.

Hervorzuheben ist die dreifach erhöhte Frequenz von base shifts von Cytosin (C) zu Thymin (T) und von Guanin (G) zu Adenin (A) bei den Rauchern.

Des Weiteren finden sich bei den Rauchern drei Insertionen. Bei den Nichtrauchern fallen vier Insertionen auf. Deletionen können bei keiner der beiden Gruppen nachgewiesen werden.

Vergleicht man den CYP1B1-Polymorphismus mit dem Mutationsspektrum von p53, so kann kein statistisch signifikanter Zusammenhang festgestellt werden.

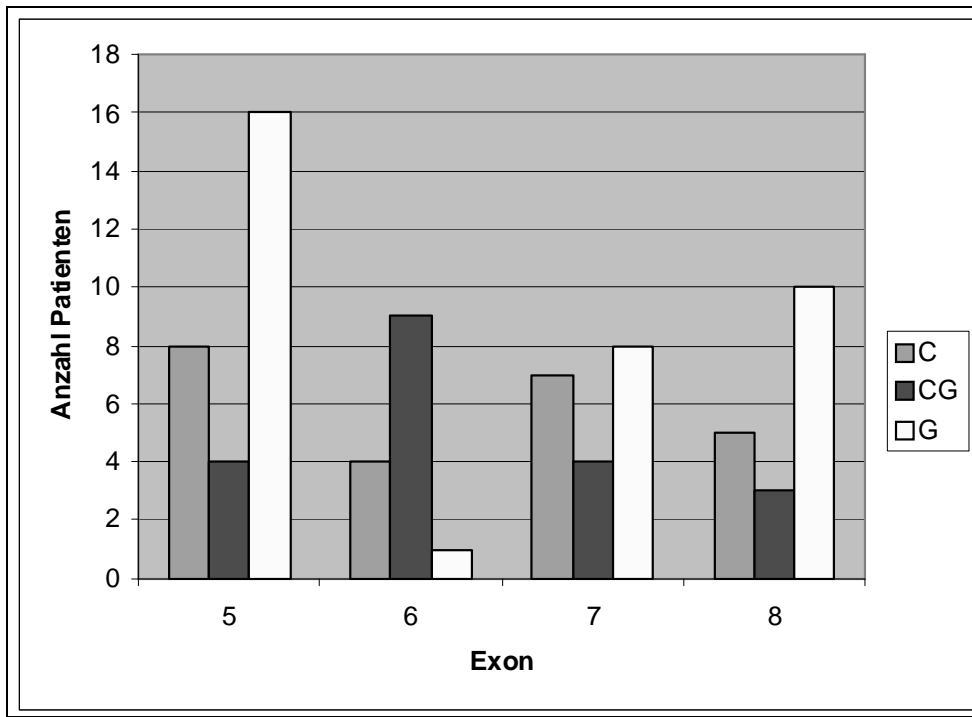


Abb.13a: Lokalisation der nachgewiesenen p53-Mutationen bei Kolonkarzinompatienten in Abhängigkeit vom Genotyp des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus (a: Raucher)
 C: Genotyp Leu/Leu, CG: Genotyp Leu/Val, G: Genotyp Val/Val

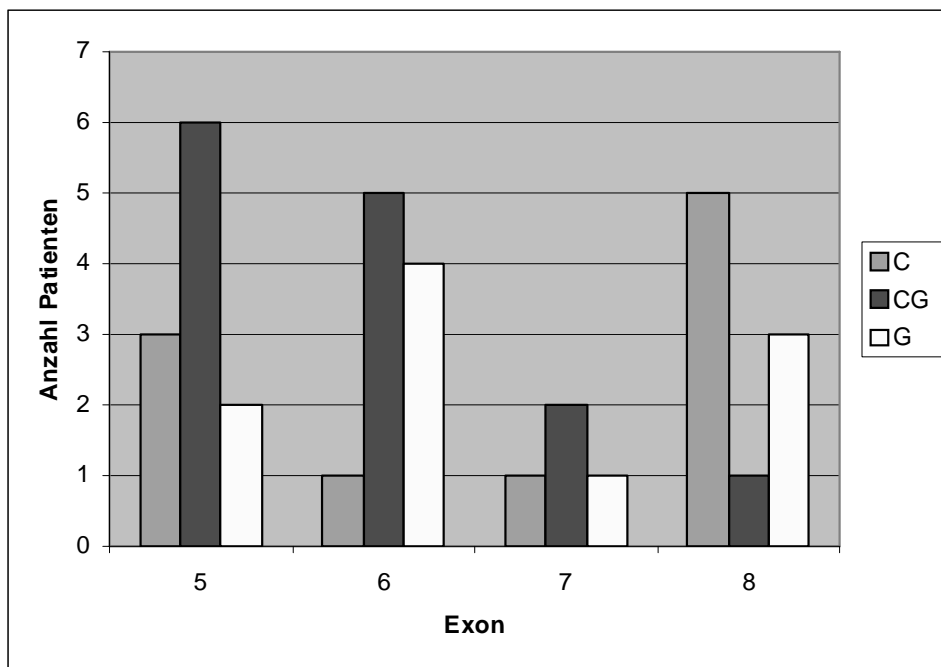


Abb.13b: Lokalisation der nachgewiesenen p53-Mutationen bei Kolonkarzinompatienten in Abhängigkeit vom Genotyp des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus (b: Nichtraucher)
 C: Genotyp Leu/Leu, CG: Genotyp Leu/Val, G: Genotyp Val/Val

						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation
C152	C	56	0	15759 / 97			
C158	C	78	1	5019 / 97			
				5170 / 97			
C162	C/G	75	0	5521 / 95	6	193	193: cat-aat
C170	C	53	0	9063 / 95	8	275	275 : tgt - tat
C173	G	57	2	21344 / 96			
				21344 / 96 II			
				15489 / 96			
C174	C	72	0	20657 / 97			
C175	G	67	3	8331 / 99 III	5	146	146: tgg-tag
					5	149	149 : tcc / tct
					8	282	282 : cgg = tgg
				25402 / 94	5	185	185 : agc > aga
					8	282	282 : cgg = tgg
				25402 / 94 II	8	282	282 : cgg = tgg
C176	C	78	3	5992 / 95	5	141	141 : gcc > acc
					6	195	195 : atc > ttc
C179	C	60	3	3263 / 97	5	158	158 : cgc - tgc
					5	175	175 : cgc = cac
					6	189	189 : gcc > gct
					7	239	239 : aac = aat
					7	241	241 : tcc = ttc
C186	G	73	0	12097 / 96	6	213	213 : cga = cgg
C188	C	74	0	21371 / 96			
C192	C/G	60	0	10957 / 95	5	177	177 : ccc > cct
					7	240	240 : a--gt = acagt
				10957 / 95 II	6	222	222 : ccg > tcg
					7	240	240 : a--gt = acagt
C195	G	62	0	14925 / 94	6	213	213 : cga > cta
				14925 / 94 II	5	154	154 : ggc - tgc
					5	175	175 : cgc - ccc
					6	213	213 : cga > cta
C201	C	76	0	18885 / 99			
C203	G	60	3	20139 / 93	5	175	175 : cgc = cac
					8	297	297 : cac = cat
				22386 / 94	5	175	175 : cgc = cac
				15848 / 99	5	175	175 : cgc = cac
C207	C/G	77	0	15374 / 95			
C209	G	75	3	15334 / 95			
C212	C	85	3	2047 / 95	5	163	163 : tac > tgc
C214	G	53	3	4170 / 96			
						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation

						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation
				4170 / 96 II	7	257	257 : ctg = ttg
C215	C	61	2	4470 / 96			
C216	C/G	73	3	692 / 97			
C219	C/G	74	3	20376 / 97			
				20376 / 97 II	6	194	194 : ctt - ttt
				20376 / 97 III	6	214	214 : cat / cgt
C220	C/G	64	3	16169 / 94	6	196	196 : cga - tga
C221	G	61	0	30097 / 95	6	213	213 : cga - cgg
C224	C	60	3	23829 / 97	8	301	301 : cca > cta
C226	C/G	70	0	18750 / 94	5	175	175 : cgc / cac
C228	C	86	0	12797 / 97	8	273	273 : cgt > cat
C229	G	70	3	2053 / 95	5	175	175 : cgc - cac
					5	168	168 : cac - cat
					5	165	165 : cag - tag
					7	242	242 : tgc = tgt
C231	G	62	3	20319 / 93	5	159	159 : gcc > gtc
					7	252	252 : ctc = ttc
					8	294	294 : gag = aag
					8	282	282 : cgg = tgg
C233	G	80	3	27249 / 94	7	229	229 : tgt = tat
					7	245	245 : ggc = gac
					8	275	275 : tgt - tat
C240	C/G	63	0	19846 / 96			
C241	C/G	40	0	31624 / 95	5	171	171 : gag - gcg
					6	191	191 : cct - act
C245	C/G	61	2	2279 / 97	5	175	175 : cgc > cac
C249	C/G	72	0	19062 / 96	5	127	127 : tcc > tct
					5	175	175 : cgc > cac
					8	306	306 : cga = caa
C259	G	53	0	893 / 98			
C260	C/G	75	0	15321 / 97			
C263	G	72	3	20918 / 93			
C277	C/G	58	3	12656 / 97	5	175	175 : cgc > cac
C284	C/G	67	3	27639 / 96			
C286	C/G	72	0	10382 / 98			
C292	C	61	3	22601 / 95			
C294	G	64	2	15152 / 94			
C298	C	66	0	10811 / 96			
C300	C	72	3	20258 / 98			
C301	C	70	0	30066 / 94	8	289	289 : ctc = ctt
C304	C	52	0	2665 / 96	5	144	144 : cag > tag
C306	G	56	0	12220 / 96	8	286	286 : gaa = taa
C307	C/G	67	3	14608 / 95			
C310	C	61	0	8906 / 97			
						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation

						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation
C311	C/G	64	0	10268 / 94	5	128	128 : cct = tct
C313	G	62	2	3275 / 97	6	197	197 : ata = atg
					8	278	278 : cct = tct
					8	281	281 : gac = gat
C315	C/G	71	2	28881 / 94			
C316	C	74	3	11091 / 94	5	158	158 : cgc > cac
				11091 / 94 II	5	158	158 : cgc - cac
C322	C	64	3	7541 / 99	7	238	238 : tgt - agt
C327	G	59	3	12931 / 95	7	232	232 : atc / agc
C330	C	72	3	15574 / 96			
C332	C/G	59	3	34236 / 93			
C334	C/G	61	3	26280 / 96	5	183	183 : tca > tct
C340	G	79	0	20534 / 95			
C346	G	72	0	18513 / 97	7	231	231 : acc - act
C352	C	56	3	8360 / 95			
C354	G	67	3	23619 / 95			
				23619 / 95 III			
C358	C/G	59	2	20039 / 93	7	248	248 : cgg - cag
C359	C/G	72	3	16361 / 95 II	6	216	216 : ctg = atg
					6	208	208 : gac = aac
C360	C/G	70	3	14139 / 94	7	248	248 : cgg - tgg
C361	C/G	63	0	10490 / 96			
C370	C/G	77	3	22681 / 97	6	206	206 : ttg = tta
					8	267	267 : cgg = cga
C372	G	59	2	15584 / 98			
C373	C	58	3	22987 / 98	8	281	281 : gac > tac
					8	287	287 : gag > gat
C374	G	45	2	29275 / 91	5	184	184 : gat = aat
					8	273	273 : cgt = tgt
				1664 / 94	7	253	253 : acc - atc
				1863 / 94	5	151	151 : ccc - ctc
					7	231	231 : acc > atc
				24081 / 96			
				24415 / 99			
				24415 / 99 II			
C382	C	59	3	32331 / 95	7	259	259 : gac > cac
					8	306	306 : cga / tga
C386	C	57	0	6129 / 98			
				6129 / 98 II			
C387	G	51	2	5306 / 93	5	128	128 : cct = tct
					5	156	156 : cgc - tgc
					5	137	137 : ctg / ttg
				5306 / 93 II			
C388	C/G	58	3	11262 / 97			
C391	C	73	3	29340 / 96	6	218	218 : gtg > atg
						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation

						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation
					8	289	289 : ctc > cta
C392	C/G	60	3	2800 / 96	8	273	273 : cgt - tgt
C396	C	69	3	1155 / 93	5	159	159 : gcc = gtc
					7	250	250 : ccc > ctc
					7	255	255 : atc > att
C397	G	62	3	13390 / 98	5	176	176 : tg- = tgc
C404	C	65	2	10203 / 00			
C408	C	65	0	868 / 98			
C410	C	67	3	18927 / 98	7	233	233 : cac = aac
C412	C/G	59	3	12520 / 98	6	189	189 : gcc / gtc
C418	C	67	3	20661 / 97 II	5	175	175 : cgc / cac
C421	C/G	60	3	24628 / 97			
C423	C	55	0	14137 / 94			
C431	C/G	59	3	10606 / 94			
C432	G	65	0	19128 / 97	8	273	273 : cgt > cat
				4317 / 00			
				338 / 99	8	273	273 : cgt - cat
C433	C/G	50	3	6162 / 93			
C434	G	65	3	31054 / 95			
C436	C	65	3	12556 / 00			
C438	C/G	55	3	14981 / 96	5	176	176 : tgc > tac
C443	C	67	0	2904 / 94	5	158	158 : cgc = cgt
					6	220	220 : tat - tgt
					7	232	232 : atc - att
					8	277	277 : tgt > tat
C451	C/G	72	3	36209 / 97			
C455	C/G	70	2	19132 / 96	6	211	211 : act = act g
					8	267	267 : cgg > cga
C456	C/G	78	0	11941 / 94			
C459	C/G	59	3	8660 / 98	7	248	248 : cgg - tgg
C460	C	55	0	3392 / 96	5	177	177 : ccc = cct
C461	C/G	68	0	10785 / 98	6	213	213 : cga = c t ga
				10785 / 98 II	6	213	213 : cga = c t ga
C471	C/G	59	0	22357 / 96			
				22357 / 96 II			
C472	C/G	64	3	554 / 00	6	203	203 : gtg = gta
					7	248	248 : cgg - cag
C473	C/G	64	0	22739 / 98			
C480	C/G	77	3	6408 / 93			
C482	C	55	3	95 / 98	6	211	211 : act = act c
C483	C	64	0	21686 / 94	8	273	273 : cgt > tgt
C484	G	47	0				
C485	C	45	3				
C291		71		26984 / 93	5	148	148 : gat = aat
						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation

						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation
					7	232	232 : atc = att
C324		75		2375 / 97			
C325		71		4887 / 96			
C329		66		14223 / 98			
				13902 / 98	6	188	188 : ctg / ttg
				25161 / 97	6	195	195 : atc > att
						p53-Mutationen	p53-Mutationen
Nr.	LC-CYP1B1	Alter	Raucher	Nr. Patho Bonn	Exon	Codon	Codon: Art der Mutation

Tab.16: Genotyp des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus in Beziehung zu somatischen p53-Mutationen

C: Wildtyp (Leu/Leu); G: Mutante (Val/Val); C/G: Heterozygotie (Leu/Val), 0=Nichtraucher, 1-3=Raucher (1: starker, 2: mittlerer, 3: Gelegenheitsraucher), LC Light-Cycler®

3.5 Assoziation des CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus mit somatischen k-ras-Mutationen in CRC-Gewebeproben in Abhängigkeit des Raucherstatus

Für die Analyse der somatischen k-ras-Mutationen steht das Tumormaterial von 103 Patienten zur Verfügung. In dem Kollektiv rauchen 61 Individuen, 36 Personen sind Nichtraucher. Von den übrigen Patienten ist der Raucherstatus nicht bekannt, weshalb diese statistisch nicht berücksichtigt werden. Insgesamt kann in 83 Fällen eine genotypische Mutation des k-ras-Gens im Tumorgewebe nachgewiesen werden. 14 Fälle sind genotypisch für das k-ras-Gen als Wildtyp anzusehen. Die Mutationen finden sich in 49 Fällen bei den Rauchern und bei 34 der nicht-rauchenden Patienten. (Tab. 17 und 18). Damit sind numerisch 1,176-fach mehr Mutationen bei den Rauchern nachweisbar. Dies entspricht genau den Ergebnissen, die bei der Mutationsanalyse von p53 gefunden wurden.

In der Gruppe der Nichtraucher kann ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den Mutationsereignissen in k-ras und den polymorphen Varianten von CYP1B1 gefunden werden. Gegenüber der Referenzkategorie C mit dem Wert 1, steigt die Odds Ratio der polymorphen Varianten zusammengenommen auf eine OR von 11,3778 (0,1468-881,7938) an. Der Aminosäurewechsel von Leucin zu Valin geht demnach mit einem 11,3778-fach erhöhten Risiko für eine Mutation in k-ras einher.

Bei den Rauchern ist ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Frequenz somatischer k-ras-Mutationen und den polymorphen Allelen von CYP1B1 nicht nachweisbar. Damit besteht kein erhöhtes Risiko einer k-ras Mutation für einen

Raucher mit einer polymorphen Variante von CYP1B1. Die Gesamtzahl der Mutationsereignisse ist jedoch bei den Rauchern deutlich erhöht. Bereits bei dem Wildtyp C von CYP1B1 finden sich bei den Rauchern 18 Mutationen in k-ras. Dieses steigt bezüglich der polymorphen Variante CG auf 23, bzw. bezüglich der Variante G auf 22 an. Diese Ergebnisse entsprechen genau den Beobachtungen der Mutationsereignisse in p53 (siehe 3.4).

Die Berechnung der Odds Ratio ist aufgrund der hohen Mutationsdichte (85,6 %) in der untersuchten DNS kausal nicht zielführend. Um eine aussagekräftige Berechnung zu gewährleisten, ist die Datenmenge der nichtmutierten k-ras Anteile mit „zwei“ bei den Nichtrauchern zu klein, um statistisch auswertbar zu sein.

Zusammengefasst zeigt sich deutlich der negative Einfluss des Rauchens auf die Entwicklung einer k-ras-Mutation, jedoch ohne Assoziation zu den polymorphen Varianten des Codon 432-Polymorphismus von CYP1B1.

Die Tabellen 19 und 20 zeigen die Verteilung der einzelnen Mutationen auf die entsprechenden Codons 12, 13 und 61 in Abhängigkeit vom Raucherstatus der Patienten. Auffällig ist die hohe Mutationsdichte in Codon 13 bei geringer Anzahl von Mutationen in Codon 12 und 61.

In der Summe zeigt sich in fast jeder DNS-Probe eine Mutation des k-ras Gens. Dies unterstützt die Annahme, dass ein Mutationsereignis in k-ras zeitlich vor einer Mutation in p53 auftritt.

	CRC- Patienten Nichtraucher (n=36)		Odds Ratio ^a (95 % CI)	p-Wert
	k-ras normal	k-ras mutiert		
CYP1B1 Leu432Val wt/wt	1 (50 %)	13 (38.24 %)	Referenzkategorie	
CYP1B1 Leu432Val wt/mt	0 (0 %)	15 (44.12 %)	N.A. ^b	N.A. ^b
CYP1B1 Leu432Val mt/mt	1 (50 %)	6 (17.65 %)	1.8289 (0.0279-120.0524)	0.777
CYP1B1 Leu432Val wt/mt und mt/mt	1 (50 %)	21 (61.76 %)	11.3778 (0.0909-881.7938)	0.273

Tab.17: Assoziation des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus mit somatischen kras-Mutationen bei Nichtrauchern (Kolonkarzinom-Patienten)

^a adjustiert nach Geschlecht, Alter sowie dem quadratischen Effekt des Alters

^b nicht anwendbar aufgrund von Kategorien ohne Probanden

CI: Konfidenzintervall, N.A.: nicht anwendbar, wt: Wildtyp, mt: Mutante, n: Fallzahl

	CRC- Patienten Raucher (n=63)		Odds Ratio ^a (95 % CI)	p-Wert
	k-ras normal	k-ras mutiert		
CYP1B1 Leu432Val wt/wt	3 (25 %)	16 (32.65 %)	Referenzkategorie	
CYP1B1 Leu432Val wt/mt	4 (33.33 %)	22 (44.90 %)	1.0357 (0.1972-5.4383)	0.967
CYP1B1 Leu432Val mt/mt	5 (41.67 %)	11 (22.45 %)	0.4204 (0.0779-2.2692)	0.314
CYP1B1 Leu432Val wt/mt und mt/mt	9 (75 %)	33 (67.35 %)	0.7086 (0.1614-3.1105)	0.648

Tab.18: Assoziation des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus mit somatischen k-ras-Mutationen bei Rauchern (Kolonkarzinom-Patienten)

^a adjustiert nach Geschlecht, Alter sowie dem quadratischen Effekt des Alters

^b nicht anwendbar aufgrund von Kategorien ohne Probanden

CI: Konfidenzintervall, N.A.: nicht anwendbar, wt: Wildtyp, mt: Mutante, n: Fallzahl

Raucher: CYP1B1-Genotyp / k-ras-Mutation				
	Codon 12	Codon 13	Codon 61	Summe
C	0	18	0	18
CG	1	22	0	23
G	0	21	1	22
Summe	1	61	1	63

Tab.19: Lokalisation der nachgewiesenen k-ras Mutationen bei rauchenden Kolonkarzinom-Patienten in Abhängigkeit vom Genotyp des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus
C: Genotyp Leu/Leu, CG: Genotyp Leu/Val, G: Genotyp Val/Val

Nichtraucher: CYP1B1-Genotyp/k-ras-Mutation				
	Codon 12	Codon 13	Codon 61	Summe
C	0	13	0	13
CG	0	17	0	17
G	0	7	0	7
Summe	0	37	0	37

Tab.20: Lokalisation der nachgewiesenen k-ras Mutationen bei nicht-rauchenden Kolonkarzinom-Patienten in Abhängigkeit vom Genotyp des Cytochrom P450 1B1 Codon 432-Polymorphismus

C: Genotyp Leu/Leu, CG: Genotyp Leu/Val, G: Genotyp Val/Val

Die Betrachtung des k-ras-Mutationsspektrums im untersuchten Kollektiv deutet auf keine Assoziation bezogen auf die polymorphen Varianten von CYP1B1 hin, sondern zeigt sich ausgeglichen (Abb. 14). Die erhöhte Anzahl an Mutationsereignissen ist – wie bei p53 – auch hier auf das Vorliegen mehrerer Gewebeblöcke pro Patient zurückzuführen.

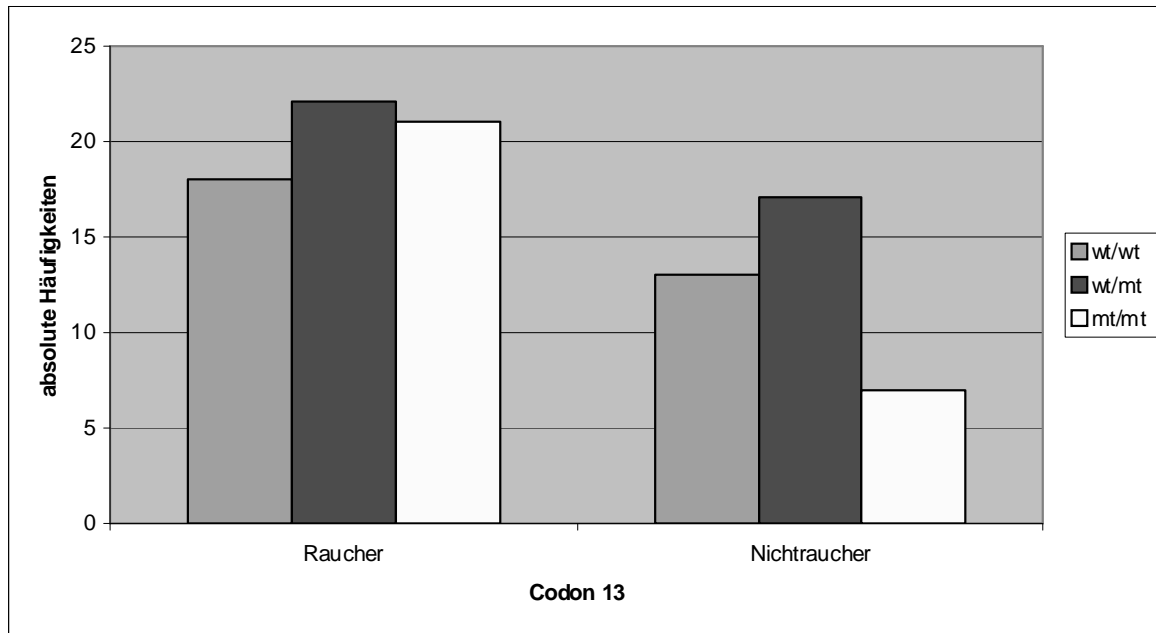


Abb.14: Cytochrom P450 1B1-Genotyp/k-ras-Mutation, wt: Wildtyp, mt: Mutante

LC-CYP1B1	Listen-Nr.	Raucherstatus	Gewebe Nr.	Codon 12	Codon 13	Codon 61
C	152	0	15759 / 97		agc	
C	158	1	5019 / 97		agc	
			5170 / 97		agc	
C/G	162	0	5521 / 95		agc	
C	170	0	9063 / 95		ggc\agc	
G	173	2	21344 / 96			
			21344 / 96 II			
			15489 / 96			
C	174	0	20657 / 97		agc	
G	175	3	8331 / 99 III		ggc\agc	
			25402 / 94		ggc\agc	
			25402 / 94 II		ggc\agc	
C	176	3	5992 / 95			
C	179	3	3263 / 97			
G	186	0	12097 / 96		agc	
C	188	0	21371 / 96		agc	

LC-CYP1B1	Listen-Nr.	Raucherstatus	Gewebe Nr.	Codon 12	Codon 13	Codon 61
C/G	192	0	10957 / 95		ggc\agc	
			10957 / 95 II	x	x	x
G	195	0	14925 / 94		ggc\agc	
			14925 / 94 II	x	x	x
C	201	0	18885 / 99	x	x	x
G	203	3	20139 / 93		agc	
			22386 / 94		agc	
			15848 / 99		agc	
C/G	207	0	15374 / 95		agc	
G	209	3	15334 / 95		ggc\agc	
C	212	3	2047 / 95		ggc\agc	
G	214	3	4170 / 96			
			4170 / 96 II	x	x	x
C	215	2	4470 / 96		agc	
C/G	216	3	692 / 97		ggc\agc	
C/G	219	3	20376 / 97		agc	
			20376 / 97 II	x	x	x
			20376 / 97 III	x	x	x
C/G	220	3	16169 / 94		ggc\agc	
G	221	0	30097 / 95		ggc\agc	
C	224	3	23829 / 97		ggc\agc	
C/G	226	0	18750 / 94		ggc\agc	
C	228	0	12797 / 97		ggc\agc	
G	229	3	2053 / 95			
G	231	3	20319 / 93		agc	
G	233	3	27249 / 94		ggc=agc	
C/G	240	0	19846 / 96		ggc\agc	
C/G	241	0	31624 / 95		agc	
C/G	245	2	2279 / 97			
C/G	249	0	19062 / 96		agc	
G	259	0	893 / 98		ggc\agc	
C/G	260	0	15321 / 97		agc	
G	263	3	20918 / 93		ggc\agc	
C/G	277	3	12656 / 97		ggc\agc	
C/G	284	3	27639 / 96		agc	
C/G	286	0	10382 / 98		agc	
	291		26984 / 93		agc	
C	292	3	22601 / 95		agc	
G	294	2	15152 / 94	x	x	x
C	298	0	10811 / 96		agc	
C	300	3	20258 / 98		agc	
C	301	0	30066 / 94		agc	
C	304	0	2665 / 96		ggc\agc	
G	306	0	12220 / 96		agc	
C/G	307	3	14608 / 95		agc	

LC-CYP1B1	Listen-Nr.	Raucherstatus	Gewebe Nr.	Codon 12	Codon 13	Codon 61
C	310	0	8906 / 97		agc	
C/G	311	0	10268 / 94		agc	
G	313	2	3275 / 97		agc	
C/G	315	2	28881 / 94		ggc\agc	
C	316	3	11091 / 94		agc	
			11091 / 94 II		agc	
C	322	3	7541 / 99		ggc\agc	
	324		2375 / 97		agc	
	325		4887 / 96			
G	327	3	12931 / 95		agc	
	329		14223 / 98			
			13902 / 98			
			25161 / 97		ggc\agc	
C	330	3	15574 / 96		ggc=agc	
C/G	332	3	34236 / 93	ggt-ggc	agc	
C/G	334	3	26280 / 96			
G	340	0	20534 / 95			
G	346	0	18513 / 97	x	x	x
C	352	3	8360 / 95	x	x	x
G	354	3	23619 / 95		ggc\agc	
			23619 / 95 III		ggc\agc	
C/G	358	2	20039 / 93		ggc\agc	
C/G	359	3	16361 / 95 II			
C/G	360	3	14139 / 94		agc	
C/G	361	0	10490 / 96		ggc\agc	
C/G	370	3	22681 / 97		agc	
G	372	2	15584 / 98			
C	373	3	22987 / 98		agc	
G	374	2	29275 / 91		agc	
			1664 / 94		agc	caa-taa
			1863 / 94		agc	
			24081 / 96		agc	
			24415 / 99		agc	
			24415 / 99 II		agc	
C	382	3	32331 / 95		ggc\agc	
C	386	0	6129 / 98		ggc\agc	
			6129 / 98 II	x	x	x
G	387	2	5306 / 93			
			5306 / 93 II	x	x	x
C/G	388	3	11262 / 97		agc	
C	391	3	29340 / 96			
C/G	392	3	2800 / 96		ggc\agc	
C	396	3	1155 / 93		ggc\agc	
G	397	3	13390 / 98		agc	
C	404	2	10203 / 00		ggc\agc	

LC-CYP1B1	Listen-Nr.	Raucherstatus	Gewebe Nr.	Codon 12	Codon 13	Codon 61
C	408	0	868 / 98		agc	
C	410	3	18927 / 98		agc	
C/G	412	3	12520 / 98		agc	
C	418	3	20661 / 97 II		agc	
C/G	421	3	24628 / 97		agc	
C	423	0	14137 / 94	x	x	x
C/G	431	3	10606 / 94		agc	
G	432	0	19128 / 97		ggc\agc	
			4317 / 00	x	x	x
			338 / 99		ggc\agc	
C/G	433	3	6162 / 93		ggc\agc	
G	434	3	31054 / 95		ggc\agc	
C	436	3	12556 / 00		ggc\agc	
C/G	438	3	14981 / 96		agc	
C	443	0	2904 / 94		ggc\agc	
C/G	451	3	36209 / 97		ggc\agc	
C/G	455	2	19132 / 96			
C/G	456	0	11941 / 94		agc	
C/G	459	3	8660 / 98		ggc\agc	
C	460	0	33392 / 96		agc	
C/G	461	0	10785 / 98		ggc\agc	
			10785 / 98 II		ggc\agc	
C/G	471	0	22357 / 96		agc	
			22357 / 96 II		agc	
C/G	472	3	554 / 00		agc	
C/G	473	0	22739 / 98		agc	
C/G	480	3	6408 / 93		ggc\agc	
C	482	3	95 / 98		ggc\agc	
C	483	0	21686 / 94			

Tab. 21: Somatische k-ras Mutationen in Kolonkarzinom-Patienten-Proben

C: Wildtyp (Leu/Leu); G: Mutante (Val/Val); C/G: Heterozygotie (Leu/Val), 0 = Nichtraucher, 1-3= Raucher (1: starker, 2: mittlerer, 3: Gelegenheitsraucher), LC Light-Cycler®, x: Polymerase-Kettenreaktion nicht erfolgreich

4. Diskussion

Ziel der Arbeit ist festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen polymorphen Varianten von CYP1B1 bei Patienten mit CRC und chronischem Tabakkonsum und der Frequenz von somatischen p53- und k-ras-Mutationen gibt.

Im Ergebnis wird nachgewiesen, dass Rauchen zumindest in Bezug auf den CYP1B1 Codon 432-Polymorphismus als Suszeptibilitätsfaktor für die Entstehung von Kolonkarzinomen nicht von entscheidender Bedeutung ist.

Der Tabakkonsum ist eine der entscheidenden und quantitativ hochrangigsten Zivilisationsdrogen der heutigen Zeit. Rauchen von Tabakwaren stellt in Deutschland neben dem Genuss von Alkohol das am häufigsten konsumierte Suchtmittel dar. Statistisch gesehen raucht jeder vierte Deutsche. Der Tabakkonsum ist - wie umfangreich in Studien nachgewiesen - für die Entstehung der unterschiedlichsten Tumoren (mit-)verantwortlich.

Das kolorektale Karzinom ist das zweithäufigste Malignom des Menschen. Der Zusammenhang zum Nikotinkonsum wurde in den letzten Jahren intensiv und kontrovers diskutiert und gilt nach überwiegender Autorenmeinung als nachgewiesen (Greenblatt et al., 1994; Philips, 1983).

Die medizinische Epidemiologie beschäftigt sich mit der Wirkung von Umweltgiften, wie in den Abbauprodukten von Nikotin vorhanden, auf den Organismus. Da es sich beim Tabakkonsum um ein gut quantifizierbares Produkt handelt, ist es als „Ernährungsgewohnheit“ statistisch auswertbar. Der Abbauweg von Nikotin ist an Enzyme des fremdstoffmetabolisierenden Enzymsystems (wie CYP1B1) gekoppelt. Da das FME über Polymorphismen individuelle Besonderheiten aufweisen kann, stellt sich die Frage, ob verschiedene Organismen ein unterschiedlich hohes Erkrankungsrisiko haben. Mittels der aktuellen gentechnischen Nachweismethoden, wie dem Light-Cycler®, sind Massenscreeninguntersuchungen möglich geworden. Somit lassen sich Polymorphismen von CYP1B1 kurzfristig erfassen. Ziel ist die individuelle Risikominimierung bei bekanntem Genotypstatus von CYP1B1, sollte dieser ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für CRC darstellen.

Im Tabakrauch sind eine Vielzahl toxischer Stoffe enthalten, die durch Inhalation bis in die Alveolen gelangen, wie beispielsweise Nikotin, polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK), wie Benz(a)pyren, Nitrosamine, aromatische Amine, Dioxine, Formaldehyd, Acetaldehyd, Blausäure, Benzol und Schwermetalle. Resorbiert werden die Stoffe bereits in der Schleimhaut von Mund, Nase und Rachen. In dieser Region treten die höchsten Konzentrationen an Giftstoffen auf, die die Schleimhaut schädigen und diese über Praekanzerosen bis hin zum malignen Tumor entarten lassen können. Je länger und je mehr Tabakrauch dem Organismus zugeführt wird, desto wahrscheinlicher treten derartige Läsionen auf: Die Gefahr, an einem malignen Tumor zu erkranken, steigt.

Das fremdstoffmetabolisierende Enzymsystem (FME) hat die Aufgabe, die schädlichen Metabolite über den Weg der Biotransformation zu hydroxylieren und damit deren Ausscheidung zu vereinfachen. Nach der Hydroxylierung kann der so veränderte Stoff an stark polare Gruppen gebunden werden, was zu einer erhöhten Wasserlöslichkeit des Reaktionsproduktes führt und dessen Ausscheidung über die Nieren stark vereinfacht. Übernommen wird diese Aufgabe unter anderem vom P450-Enzymsystem, dessen Wirkung jedoch auch zum Nachteil gereichen kann. So ist bekannt, dass einige der stärksten Karzinogene erst in vivo durch das FME zu ihrer kanzerogenen Form metabolisiert und somit für den Organismus schädlich werden.

PAK induzieren Enzyme des Cytochrom P450-Enzymsystems, von dem bis zum heutigen Tage mehr als 150 Isoenzyme beschrieben sind, die in insgesamt 14 Genfamilien zusammengefasst werden. Dieses Enzymsystem hat die Aufgabe, körpereigene und dem Organismus zugeführte Substrate wie Nahrung, Schadstoffe und Arzneimittel abzubauen, zu verstoffwechseln, unschädlich zu machen und auszuscheiden. Zu diesen Enzymen zählen CYP1 – CYP4.

Während für CYP1A1 und CYP1A2 die Rolle der Enzyminduktion durch im Tabakrauch vorhandene Metabolite seit langem bekannt ist, kann für CYP1B1, das als Phase-I-Enzym eine überlappende Substratspezifität aufweist und maßgeblich an der Verstoffwechslung von Schadstoffen, die dem Körper über Tabakrauch zugeführt werden, beteiligt ist, ein ähnliches Wirkspektrum unterstellt werden (Sutter et al., 1994). Besonders interessant sind vorhandene Polymorphismen der FME vor allem dann, wenn die polymorphe Variante andere katalytische Eigenschaften besitzt als der

Wildtyp. Dies kann entweder bedeuten, dass ein Substrat nicht mehr oder mit einer anderen Geschwindigkeit verstoffwechselt werden kann. Ebenso ist aber auch denkbar, dass ein differentes Intermediärprodukt entsteht, welches gegebenenfalls gar nicht verstoffwechselt wird. Diese so entstandenen Intermediärprodukte können ein wesentlich höheres kanzerogenes Potenzial als die Ausgangssubstanz in sich tragen. In diesen Fällen kann es zu einer Akkumulation von schädlichen Metaboliten in der Zelle kommen, die bei hoher Lipidlöslichkeit nur begrenzt ausgeschieden werden können. Je höher die Fettlöslichkeit der Substanzen, desto eher gelangen sie in den Zellkern, wo sie das genetische Material schädigen können. Besonders dramatisch ist eine Schädigung in Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen, da diese maligne Entartungen begünstigen können. In Studien wurde gezeigt, dass genetisch bedingte Abweichungen von Enzymaktivitäten (Polymorphismen) bestimmte maligne Erkrankungen nach sich ziehen. Sie können sogar für diese Erkrankungen prädisponieren.

In dieser Arbeit wird ein Polymorphismus des P450-Enzymsystems untersucht, der den substratspezifischen Teil des Enzyms CYP1B1 betrifft, nämlich das Codon 432. Die zugrunde liegende Punktmutation führt zu einem Aminosäureaustausch (Leu432Val-Polymorphismus) im funktionell bedeutsamen Abschnitt des Enzyms, der zu einer vom Wildtyp abweichenden katalytischen Leistung führen könnte. Liegt ein so verändertes Enzym vor, kann eine reguläre Metabolisierung der Intermediärprodukte gestört sein. Mögliche Folge ist eine Bedrohung der physiologischen Zellfunktion (Stoilov et al., 1997).

Die Gene, die für Enzyme kodieren, die Fremdstoffe metabolisieren sollen, unterliegen einer sehr hohen Variabilität. Diese große Vielfalt an Enzymen ist für den Körper überlebenswichtig. Der Organismus ist gezwungen, sich mit einer sich ständig erhöhenden Anzahl von potenziell schädlichen Stoffen auseinander zu setzen. Die Zahl der krebserregenden Stoffe nimmt vor allem in einer industrialisierten Umgebung immer weiter zu. Alle diese auf den Körper einwirkenden Umweltgifte muss der Organismus metabolisieren und unschädlich machen. Die Leistung des FME muss sich also an immer neue (bislang unbekannt) Stoffe adaptieren, um eine reguläre Zellfunktion gewährleisten zu können.

Im Cytochrom P450 CYP1B1 sind neben dem Codon 432 auch noch weitere Punktmutationen bekannt, z.B. im Codon 453 (Asn-Ser). Dieser Polymorphismus besitzt ähnliche phänotypische Konsequenzen, ist aber bisher kaum weiter untersucht worden, so dass hierzu keine weiteren Ergebnisse vorliegen.

Bei dieser Arbeit finden sich in der Kontrollgruppe folgende Genotyphäufigkeiten: C (wt/wt)= 36,33 %, CG (mt/wt)= 46,0 % und G (mt/mt) =17,67 %. In der Patientengruppe finden sich die Genotypen wie folgt verteilt: C = 30,86 %, CG = 47,84 % und G = 21,30%. Damit zeigt sich ein erhöhtes Auftreten der polymorphen Varianten von CYP1B1 bei den Personen, die an einem kolorektalen Karzinom erkrankt sind, wenngleich dies nicht statistisch signifikant ist. Insgesamt liegt die Häufigkeit für die mutierte Allelfrequenz für CYP1B1 (G=Valin) bei 45,22 %, also um rund 5 % höher als in der Kontrollgruppe mit 40,7 % (Bruning et al., 1999). Bei den untersuchten Probanden handelt es sich ausschließlich um Personen, die in der Rhein-Sieg-Region beheimatet und kaukasischer Abstammung sind. Diese Festlegung ist von Bedeutung, da es zwischen ethnischen Gruppen große Unterschiede bezüglich ihrer genotypischen Ausstattung der FME gibt. Vergleichende Untersuchungen, die die genetischen Unterschiede zwischen verschiedenen Volksgruppen außer Acht lassen, ergeben keine korrekten Ergebnisse.

4.1 Bedeutung des Risikofaktors Rauchen

Betrachtet wird die Analyse der Genotypen des Codon 432-Polymorphismus von CYP1B1 in Bezug auf den Raucherstatus.

Bei näherer Betrachtung der Karzinomgruppe und dem Vergleich mit den Rauchern der Kontrollgruppe, zeigt sich, dass der Wildtyp von CYP1B1 in der Patientengruppe seltener (- 3,2 %) nachgewiesen werden kann. Die polymorphen Formen des Gens werden entsprechend häufiger gefunden. Die Odds Ratio beträgt 1.0904; 95 % CI: 0,6311-1,8840, p 0,756. Damit ist die Frequenz der polymorphen Genotypen insgesamt erhöht, allerdings nicht statistisch signifikant.

Deutlicher wird diese Tendenz bei einem Vergleich zwischen den Rauchern und Nichtrauchern der Patientengruppe. Bei den Rauchern kann vermehrt (+ 4,39 %) die polymorphe Variante von CYP1B1 nachgewiesen werden. Die Wahrscheinlichkeit, bei

den rauchenden Kolonkarzinompatienten den mutierten Genotyp von CYP1B1 (Leu/Val oder Val/Val) anzutreffen, ist insgesamt erhöht, wenn auch wiederum nicht statistisch signifikant.

Diese Ergebnisse könnten Hinweis dafür sein, dass die polymorphe Enzymvariante eine alterierte metabolische Potenz aufweist, und dass daraus resultierend der Konsum von Tabakrauch und den darin enthaltenen Giftstoffen die Entwicklung hin zum Kolonkarzinom begünstigen kann. So können polymorphe Varianten des Wildtyps die anfallenden - zum Teil genotoxischen - Intermediate unter Umständen nicht suffizient metabolisieren. Kommt es hierdurch zur Anreicherung von Intermediärprodukten der aus Tabakrauch abgebauten Fremdstoffe auf zellulärer Ebene, so können diese das Genom der Zelle schädigen. Besonders ungünstig stellt sich eine Mutation in Tumorsuppressor- oder Proto-Onkogenen dar, wodurch die Zelle bei chronischer Belastung mit dem Schadstoff letztendlich maligne entarten kann.

Die Fragestellung, inwieweit Polymorphismen des FME an der Kanzerogenese verschiedener Organe beteiligt bzw. susceptibel sind, ist nur eingeschränkt zu beantworten. Es gibt eine fast unüberschaubare Vielzahl verschiedener Enzyme, die an der Metabolisierung von Schadstoffen beteiligt sind. Ein weiteres Problem besteht in der überlappenden Substratspezifität der beteiligten Enzyme. In den bisherigen Studien wurden zumeist nur einzelne Enzyme, die sich am Substratabbau beteiligen, isoliert betrachtet. Gerade im Hinblick auf die Komplexität der im Organismus ablaufenden Biotransformationswege kann die Betrachtung eines einzelnen Enzyms niemals das gesamte System repräsentieren.

Als logische Konsequenz sollte die Genotyp-Analyse immer mehrere Enzyme eines komplexen Systems vergleichend betrachten. Am Beispiel des CRC würde dies bedeuten, dass Genotypanalysen aller beteiligten Enzyme (wie UDP-Glukuronosyltransferasen, N-Acetyltransferasen, Glutathion-S-Transferasen, Methyltransferasen oder Sulfotransferasen) herangezogen werden müssen.

Solche Betrachtungen wurden beispielsweise im Rahmen von Kopf-Hals-Tumorstudien herangezogen (Ko et al., 2001). Betrachtet wurden die polymorphen Varianten von CYP1A1, CYP1B1, GSTM1, GSTT1 und GSTP1. Der Codon 432-Polymorphismus von CYP1B1 wurde als Suszeptibilitätsfaktor für die Genese von Kopf-Hals-Tumoren gefunden, welche auf chronischen Nikotinkonsum zurückzuführen sind. In Kombination

mit den polymorphen Varianten von GST findet sich ein zu CYP1B1 synergistischer Effekt mit einer Odds Ratio von 24,1 (9,36-70,5) für die Kombination der Genotypen CYP1B1 2*/2* und GSTT1-expressors. Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass die polymorphen Varianten von Enzymen der Phase I bei bestimmten Konstellationen mit polymorphen Enzymen der Phase II ein deutlich erhöhtes Risiko für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren bei Rauchern darstellt. Das individuelle Krebsrisiko wird somit offensichtlich ganz wesentlich durch das Gleichgewicht zwischen Reaktionen der Phase I, die zur Bildung kanzerogener Intermediate beitragen können, und denen der Phase II bestimmt, die für die weitere Entgiftung von Schadstoffen zuständig sind.

Bei Betrachtung sämtlicher an der Metabolisierung von Fremdstoffen beteiligten Enzyme mit all ihren Isoformen und Polymorphismen, werden die komplexen Zusammenhänge der Biotransformation deutlich (Fritsche et al., 1999). Epidemiologische Studien beschränken sich daher auf einige wenige, klar nachvollziehbare Reaktionen der Biotransformation. Und selbst dann sind noch nicht alle Reaktionsschritte im einzelnen nachweisbar.

Die Festlegung auf ein einzelnes zu untersuchendes Substrat macht die Analyse der polymorphen Varianten der FME leichter, erlaubt aber nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die Relevanz des Polymorphismus. Zum Beispiel setzt sich der Schadstoff Tabakrauch aus mehreren Tausend Einzelsubstanzen nach der Verbrennung zusammen. Im Verlauf der Metabolisierung entstehen entsprechend noch weit mehr Intermediärsubstanzen mit unterschiedlichen kanzerogenen und mutagenen Eigenschaften. Diese Komplexität erklärt die Schwierigkeiten molekularepidemiologischer Studien.

Ein wesentlicher Fortschritt für die Genotypanalyse von Enzymen liegt in der Technologie der real-time-PCR mit Hilfe des Light-Cyclers[®]. Diese Technik ermöglicht - im Gegensatz zur sehr zeitaufwändigen normalen PCR über einen Thermo-Cycler - die rasche Analyse einer hohen Anzahl an Untersuchungsproben. Im Ergebnis können die Wildtypen von denen der mutierten Variante eines Enzyms unterschieden werden.

4.2 Assoziation des Codon 432-Polymorphismus mit p53- und k-ras- Mutationen

Neben dem Genotyp wird der Codon 432-Polymorphismus CYP1B1 mit dem Vorkommen somatischer Mutationen des Tumorsuppressorgens p53 und des Onkogens k-ras abgeglichen. Im Ergebnis wird keine statistisch signifikante Korrelation zwischen den polymorphen Formen des Cytochroms CYP1B1 und den somatischen Mutationen von p53 und k-ras bei chronischer Exposition gegenüber Tabakrauch gefunden. In der Tendenz zeigt sich jedoch bei Rauchern eine erhöhte Frequenz mutierter Formen von p53 und k-ras, aber ohne Zusammenhang zu polymorphen Formen von CYP1B1.

Aufgeschlüsselt in Raucher und Nichtraucher kann in der Rauchergruppe eine 1,18-fach höhere Frequenz von mutierten Formen von p53 gegenüber den Nichtrauchern nachgewiesen werden. Eine statistisch signifikante Korrelation der polymorphen Allele von CYP1B1 zu den mutierten Formen von p53 gemessen am Wildtyp für CYP1B1 zeigt sich allerdings nicht. In der Tendenz kann aber festgestellt werden, dass Raucher mit dem Genotyp Val/Val (Mutante) eine minimal höhere Rate an p53-Mutationen aufweisen als die mit dem Genotypen Leu/Val.

Bei der Analyse somatischer Mutationen im k-ras-Gen werden 83 (80,5 %) Mutationen detektiert. 59 % der Mutationen finden sich bei den Rauchern. Ein Zusammenhang zwischen den polymorphen Genotypen von CYP1B1 und der Frequenz von k-ras-Mutationen wird jedoch auch hier nicht nachgewiesen.

4.3 Polymorphe Enzyme und p53-Mutationen

Mit den Zusammenhängen zwischen p53-Mutationen und polymorphen Enzymvarianten des FME setzen sich mehrere Studien der letzten Jahre auseinander.

Ein Beispiel ist der GSTT1 Genotyp der Glutathion-S-Transferase. Ein A-G-Polymorphismus an Position 313 führt zu einem Aminosäureaustausch (Ile105Val) an der substratbindenden Stelle von GSTT1. Insgesamt ist das Krebsrisiko für Träger dieser Genvariante gering. In einigen Populationen ist der Anteil der polymorphen Variante jedoch so zahlreich, dass das individuelle Risiko schlussendlich als hoch einzuschätzen ist. In der Studie gelang der Nachweis, dass bei Brustkrebspatientinnen

die Rate an mutierten Formen von p53 bezüglich BRCA2 deutlich erhöht ist; vorausgesetzt diese Personen verfügen zusätzlich über den polymorphen Genotyp GSTT1-Null (Gudmundsdottir et al., 2001).

Bei der Betrachtung von polymorphen Enzymen der GST und Mutationen in p53 bei Blasentumoren wurde nachgewiesen, dass Individuen mit dem Genotyp GSTM1-negativ signifikant mehr Mutationen bezüglich p53 zeigen als GSTM1-positive Individuen. In der gleichen Studie wurde keine Assoziation zwischen p53-Mutationen und NAT2 gefunden (Ryk et al., 2004).

In einer weiteren Studie bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom konnte gezeigt werden, dass p53-Mutationen assoziiert sind mit polymorphen Varianten von CYP1A1. Die meisten Mutationen betrafen das Exon 8 von p53, wobei überwiegend der Ersatz der Base C durch G zu finden war. In der Studie konnte keine Relation zwischen dem individuellen Genpolymorphismus oder p53-Mutationen und dem rezidivfreien Überleben gefunden werden. Weiterhin zeigten die Analysen, dass die CYP1A1-Polymorphismen bei Individuen mit somatischen p53-Mutationen bei Rauchern über eine Inaktivierung von p53 durch die Aktivität von CYP1A1 gefördert wird (Przygozki et al., 1998).

Gaspar et al. fanden 2002 heraus, dass zwischen den polymorphen Genen der Phase I, der Phase II und dem Mutationsspektrum von p53 bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom keinerlei Zusammenhang nachzuweisen ist. Beim Vergleich von den Phase-I-Enzymen mit dem polymorphen Allel CYP2E1*1A/5B bei Patienten mit einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung konnte hingegen eine sechsfach höhere Frequenz von p53-Mutationen als bei den Kontrollindividuen gefunden werden. Zusätzlich fiel auf, dass Patienten mit dem Genotyp GSTT1-Null und GSTP1 Ile/Val einem vierfach höherem Risiko für eine COPD ausgesetzt sind. Somit zeigten die Ergebnisse eine Suszeptibilität der oben genannten Gene für die COPD. Der Raucherstatus der Patienten war hier allerdings nicht berücksichtigt worden.

Studien, die mögliche Assoziationen zwischen CYP1B1 und p53 und k-ras untersuchen, konnten in der aktuellen Literatur nicht gefunden werden.

4.4 Mutationsspektrum von p53 und k-ras

P53 ist als Gen bekannt, das für die Kanzerogenese verschiedenster Tumoren eine zentrale Rolle einnimmt. In einer Datenbank sind die grundlegenden Mutationen von p53 der verschiedensten Tumoren gesammelt (Hainaut et al., 1998; <http://iarc.fr/p53/homepage.htm>). Aus diesen Daten geht hervor, dass bei ca. 90 % der menschlichen Tumore ein Defekt in der zentralen Kernregion (den hot spots) der Proteine gefunden wird. Da diese hochkonservativen Proteinbereiche eine zentrale Rolle für die physiologische Bedeutung der Enzyme spielt, ist verständlich, dass Mutationen in diesem Bereich schwerwiegende Folgen für die Zelle zur Folge haben können.

Aus den Vorstudien wird abgeleitet, dass die sensiblen Genregionen von p53 in den Exons 5 bis 8 zu erwarten sind. Diese Bereiche werden daher hier der Mutationsanalyse unterzogen. Wie von Hollstein 1991 beschrieben, finden sich auch in der vorliegenden Arbeit ca. 90 % der Mutationen in den Hotspots der hochkonservativen Bereiche HCD II-V zwischen Codon 126 und 307. Aus den Daten ist der negative Faktor des Nikotinkonsums bei Patienten mit Kolonkarzinom abzulesen.

Betrachtet man die Gruppe der Raucher mit Nachweis einer p53-Mutation, so findet sich die insgesamt höchste Frequenz der Mutationen in Exon 5. Der CYP1B1-Genotyp Val/Val (G) ist hierbei besonders häufig nachgewiesen worden. Den Nichtrauchern gegenübergestellt findet sich zwar auch hier die absolut höchste Frequenz an Mutationen in Exon 5, die Verteilung ist mit Ausnahme des Exons 7 jedoch deutlich ausgeglichener. Die absolute Anzahl der gefundenen Mutationen bei p53 ist in der Gruppe der Nichtraucher deutlich geringer (34 Fälle) als bei den Rauchern (79 Fälle). Die höchste Anzahl somatischer p53-Mutationen findet sich bei den polymorphen Genotypen von CYP1B1, ohne jedoch statistische Signifikanz zu erreichen. Diese Ergebnisse zeigen einen grundsätzlichen Zusammenhang der Auswirkungen des Nikotinkonsums auf die Rate somatischer p53-Mutationen, allerdings ohne Abhängigkeit vom CYP1B1-Genotyp. Weitere Studien über die Ernährungsgewohnheiten von Rauchern und Nichtrauchern bei Darmkrebspatienten müssen klären, ob die Nichtraucher zusätzlich andere Noxen zuführen als Raucher. Dieses würde das differente Muster der somatischen p53-Mutationen von Rauchern und Nichtrauchern

erklären. In diesem Zusammenhang ist der Konsum gegrillten Fleisches (hoher Anteil an Nitrosaminen) oder von Alkohol besonders interessant, da diese Stoffe ein erhebliches Risiko für die Kolonkarzinomentstehung beinhalten.

Die Betrachtung der einzelnen Transversionen und Insertionen in den mutierten Genen zeigt bei den Rauchern eine hohe Rate von C>T und G>A-Transversionen, die bei den Nichtrauchern seltener zu finden ist. Diese Beobachtung erklärten Takeshima et al. 1993 mit der Bindung eines kanzerogenen PAK-Metaboliten an die Base Guanosin in den entsprechenden Triplets. Die Rate an Insertionen beträgt bei Rauchern 3,8 % und Nichtrauchern 11,8 %.

Ebenso Gegenstand der Arbeit ist die Mutationsanalyse somatischer k-ras-Mutationen bei Patienten mit CRC. In den bisherigen Studien wurden die Hotspots der Mutationen in den Codons 12,13 und 61 mit einer Häufigkeit von 27-50 % gefunden (Bos et al., 1987 und 1989; Bleeker et al., 2001; Finkelstein et al., 1993; Shaw et al., 1991). In diesen Codons wurden Mutationen gesucht und in 85,6 % der Gewebeproben nachgewiesen. In 59,04 % der Fälle waren Raucher betroffen. Auffällig war vor allem die hohe Anzahl an Mutationen im Codon 13. Hier wurden 97,6 % der Mutationen gefunden, während Exon 12 und 61 nur in jeweils einem Fall mutierte Formen aufwiesen.

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen den polymorphen Varianten von CYP1B1 und dem Mutationsspektrum von p53 und k-ras konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

4.5 Einfluss der Ernährungsfaktoren auf die Genese von CRC

Neben dem Nikotin gibt es eine hohe Assoziation zwischen dem Genuss stark gebratenen roten Fleisches und dem Risiko an einem Kolonkarzinom zu erkranken. Je stärker das Fleisch gebraten ist, desto höher ist das Risiko zu erkranken. Der Grund hierfür liegt in der zunehmenden Konzentration von Nitrosaminen, die sich mit zunehmender Bratzeit entwickeln (Schiffmann und Felton, 1990; de Verdier und Longnecker, 1992). Diese Studien spiegeln die aktuelle wissenschaftliche Lehrmeinung

wieder, wenngleich auch Ergebnisse vorliegen, die einen solchen Zusammenhang nicht erkennen lassen (Franceschi et al., 1997).

Als weitere Risikofaktoren gelten eine ballaststoff- und faserarme einseitige Ernährung (Witte et al., 1996), vorbestehende Obstipation, höheres Lebensalter, eine positive Familienanamnese, Bewegungsmangel (Longnecker et al., 1995), Adipositas, Diabetes mellitus sowie Hypercholesterinämie. Unterschiedlich wird die Rolle des Alkohols zur Zeit diskutiert (La Vecchia et al., 1994). Als protektiv gelten die Einnahme oraler Kontrazeptiva (Calle et al., 1995), Acetylsalicylsäure (Thun et al., 1991), Gemüse, Obst und Sport.

Alle diese Risikofaktoren sollten mit dem Genotypenstatus fremdstoffmetabolisierender Enzyme, wie in dieser Arbeit geschehen, analysiert und korreliert werden, da sie als Ernährungsformen in direktem Zusammenhang zum Fremdstoffmetabolismus stehen.

Die Aufgabe der Epidemiologie besteht darin, diese Zusammenhänge aufzudecken, um in Zukunft individuelle Risikoprofile erstellen zu können, was schlussendlich zu gezielten prophylaktischen Maßnahmen führen soll.

5. Zusammenfassung

Der menschliche Organismus ist Zeit seines Lebens einer unüberschaubaren Vielzahl von Fremdstoffen ausgesetzt. So enthält beispielsweise allein Tabak, das als Hauptverursacher verschiedener Malignome wie dem Bronchial- oder dem kolorektalen Karzinom (CRC) gilt, über 50 kanzerogene Noxen, die zum Teil erst nach der Metabolisierung ihre schädigende Wirkung entfalten.

Ein für die Biotransformation wesentliches Enzymsystem ist die Cytochrom P450-Familie. Dessen wesentliche Aufgabe besteht in der Metabolisierung aufgenommener Substanzen mit dem Ziel, diese in harmloser Form auszuscheiden. Die Zusammensetzung dieser Enzyme variiert von Mensch zu Mensch, nicht zuletzt bedingt durch Polymorphismen. Da mit dem genotypischen Unterschied zum Enzym-Wildtyp auch ein Abweichen der katalytischen Eigenschaften einhergehen kann, ergibt sich im Hinblick auf bestimmte kanzerogene Noxen eine individuelle Belastung. Somit stellen die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme (FME) Suszeptibilitätsfaktoren bei der Genese verschiedener Malignome dar. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es, diesen postulierten Zusammenhang am Beispiel vom Codon 432-Polymorphismus des CYP1B1-Enzyms und der Entstehung des CRC unter Berücksichtigung von chronischem Nikotinkonsum zu untersuchen. Da sowohl das Tumorsuppressorgen p53 als auch das Onkogen k-ras in die Kanzerogenese des CRC involviert sind, fand die Analyse von Mutationen in diesen Genen zusätzlich Eingang in die Auswertung.

Proben von insgesamt 324 CRC-Patienten wurden bearbeitet, hiervon waren 60,8% Raucher. Eine Mutation im Enzym CYP1B1 konnte bei 69,14 % Patienten, davon 70,16 % Raucher, nachgewiesen werden. Während bei 66,1 % der Raucher eine p53-Mutation gefunden wurde, war dies bei nur 33,9 % der Nichtraucher der Fall, jedoch war das um den Faktor 1,18 erhöhte Risiko der Raucher für eine p53-Mutation statistisch nicht signifikant. Auch im Hinblick auf eine Mutation des k-ras-Gens fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Ebenso wenig konnte eine Assoziation zwischen den Mutationen von CYP1B1 und denen von p53 bzw. k-ras gefunden werden. Mithin konnte CYP1B1, wiewohl an der Metabolisierung von im Tabak enthaltenen Noxen beteiligt, nicht als alleiniger Auslöser des CRC bei Rauchern identifiziert werden.

Das negative Ergebnis mag darin begründet liegen, dass andere Faktoren wie die Ernährung wesentlich für die Entstehung des CRC sind. Zudem sind an der Metabolisierung von tabakassoziierten Noxen zahlreiche Enzyme beteiligt. Zukünftige Studien sollten somit, um Zusammenhänge zwischen den FME, dem Nikotinkonsum und der Tumorentstehung aufzeigen zu können, mehrere Enzyme und deren Polymorphismen in Korrelation zu einander auswerten, um dem Ziel der Molekularepidemiologie, ein individuelles Risikoprofil zu erstellen, näher zu kommen.

6. Literaturverzeichnis

Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, Harrington JJ, Mahoney DW, Pierceall WE, Thibodeau SN, Shuber AP. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNS in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000; 119: 1219-1227

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Signalübertragung durch enzymgekoppelte Rezeptoren. In: Alberts B, HRSG. Lehrbuch der molekularen Zellbiologie, 2. korrigierte Auflage, Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, 2001: 542-547

Andreyev HJ, Tilsed JV, Cunningham D, Sampson SA, Norman AR, Schneider HJ, Clarke PA. K-ras mutations in patients with early colorectal cancers. *Gut* 1997; 41: 323-329

Anwar S, Hall C, White J, Deakin M, Farrell W, Elder JB. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: an updated review. *Eur J Surg Oncol* 2000; 26: 635-645

Arber N, Shapira I, Ratan J, Stern B, Hibshoosh H, Moshkowitz M, Gammon M, Fabian I, Halpern Z. Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors. *Gastroenterology* 2000; 118: 1045-1050

Attardi LD, Jacks T. The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. *Cell Mol Life Sci* 1999; 55: 48-63

Bailey LR, Roodi N, Dupont WD, Parl FF. Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphism with steroid receptor status in breast cancer. *Cancer Res* 1998; 58: 5038-5041

Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 3-28

Bassam BJ, Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNS in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* 1991; 196: 80-83

Bleeker WA, Hayes VM, Garrenbld A, Hofstra MW, Verlind E, Hermans J, Poppema S, Buys CH und Plukker TM. Prognostic significance of *K-ras* and *TP53* mutation in the role of adjuvant chemotherapy on survival in patients with Dukes C colon cancer. *Dis Colon Rectum* 2001 ; 44 : 358-363

Bos JL. *Ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 1989; 49: 4682-4689

Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR. Prevalence of *ras* mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-297

Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, Halperin AJ, Ponten J. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 10124-10128

Brown LM, Hoover R, Silverman D, Baris D, Hayes R, Swanson GM, Schoenberg J, Greenberg R, Liff J, Schwartz A, Dosemeci M, Pottern L, Fraumeni JF Jr. Excess incidence of squamous cell esophageal cancer among US Black men: role of social class and other risk factors. *Am J Epidemiol* 2001; 153: 114-122

Bruning T, Abel J, Koch B, Lorenzen K, Harth V, Donat S, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Ko Y. Real-time PCR-analysis of the cytochrome P450 1B1 codon 432-polymorphism. *Arch Toxicol* 1999; 73: 427-430

Burmer GC and Loeb LA. Mutations in the KRAS2 oncogene during progressive stages of human colon carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 2403-2407

Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 2001; 277: 15-30

Caelles C, Helmberg A, Karin M. p53-dependent apoptosis in the absence of transcriptional activation of p53-target genes. *Nature* 1994; 370: 220-223

Calle EE, Miracle-McMahill HL, Thun MJ, Heath CW Jr. Estrogen replacement therapy and risk of fatal colon cancer in a prospective cohort of postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 517-523

Caporaso N, Goldstein A. Cancer genes: single and susceptibility: exposing the difference. *Pharmacogenetics* 1995; 5: 59-63

Chen J, Marechal V, Levine AJ. Mapping of the p53 and mdm-2 interaction domains. *Mol Cell Biol* 1993; 13: 4107-4114

Crofts FG, Sutter TR, Strickland PT. Metabolism of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine by human cytochrome P4501A1, P4501A2 and P4501B1. *Carcinogenesis* 1998; 19: 1969-1973

De Stefani E, Barrios E, Fierro L. Black (air-cured) and blond (flue-cured) tobacco and cancer risk. III: Oesophageal cancer. *Eur J Cancer* 1993; 29A: 763-766

de Verdier MG, Longnecker MP. Eating frequency - a neglected risk factor for colon cancer? *Cancer Causes Control* 1992; 3: 77-81

Enan E, Matsumura F. Identification of c-Src as the integral component of the cytosolic Ah receptor complex, transducing the signal of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) through the protein phosphorylation pathway. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 1599-1612

Fearon ER, Pardoll DM, Itaya T, Golumbek P, Levitsky HI, Simons JW, Karasuyama H, Vogelstein B, Frost P. Interleukin-2 production by tumor cells bypasses T helper function in the generation of an antitumor response. *Cell* 1990; 60: 397-403

Finkelstein SD, Sayegh R, Christensen S und Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behaviour correlates with *Kras-2* mutation type. *Cancer* 1993; 71: 3827-3838

Franceschi S, Favero A, La Vecchia C, Negri E, Conti E, Montella M, Giacosa A, Nanni O, Decarli A. Food groups and risk of colorectal cancer in Italy. *Int J Cancer* 1997; 72: 56-61

Fritsche E, Bruning T, Jonkmanns C, Ko Y, Bolt HM, Abel J. Detection of cytochrome P450 1B1 Bfr I polymorphism: genotype distribution in healthy German individuals and in patients with colorectal carcinoma. *Pharmacogenetics* 1999; 9: 405-408

Fuchs SY, Adler V, Buschmann T, Yin Z, Wu X, Jones SN, Ronai Z. JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev* 1998; 12: 2658-2663

Gaspar PA, Hutz MH, Salzano FM, Hill K, Hurtado AM, Petzl-Erler ML, Tsuneto LT, Weimer TA. Polymorphisms of CYP1a1, CYP2e1, GSTM1, GSTT1, and TP53 genes in Amerindians. *Am J Phys Anthropol* 2002; 119: 249-256

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2006. Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe Saarbrücken 2006

Giehl K. Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biol Chem* 2005; 386: 193

Greenblatt MS, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994; 54: 4855-4878

Gudmundsdottir K, Tryggvadottir L, Eyfjord JE. GSTM1, GSTT1, and GSTP1 genotypes in relation to breast cancer risk and frequency of mutations in the p53 gene. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001; 10: 1169-1173

Hainaut P, Hernandez T, Robinson A, Rodriguez-Tome P, Flores T, Hollstein M, Harris CC, Montesano R. IARC Database of p53 gene mutations in human tumors and cell lines: updated compilation, revised formats and new visualisation tools. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 205-213

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70

Harris CC, Hollstein M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 1993; 329: 1318-1327

Hasler JA. Pharmacogenetics of cytochromes P450. *Mol Aspects Med* 1999; 20: 12-24, 25-137

Hayashi N, Sugai S, Ito I, Nakamori S, Ogawa M, Nakamura Y. Ethnic difference in the pattern of K-ras oncogene mutations in human colorectal cancers. *Hum Mutat* 1996; 8: 258-61

Herold G, Kolorektales Karzinom. In: Herold G, HRSG. *Innere Medizin*. Herold G, 2001: 401-405

Hirsch-Kaufmann MO, Schweiger MA. Zellbiologie. In: Hirsch-Kaufmann MO, Schweiger MA, HRSG. *Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*. Stuttgart- New York: Georg Thieme Verlag, 1992: 34-36

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanism for preventing cancer. *Nature* 2001; 411: 366-374

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253: 49-53

Imperiale TF, Ransohoff,DF, Itzkowitz, SH. Fecal DNS versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 2004; 351: 2704

Jass JR, WhitehallVL,Young J, Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology* 2002; 123: 862-876

Keohavong P, Gao WM, Siegfried JM, Luketich JD, Melhem MF. Topographic analysis of K-ras mutations in histologically normal lung. *Br J Cancer* 2001; 85: 235-241

Kinzler KW, Vogelstein B. Chapter IV; Colorectal Tumors. In: *The genetic basis of cancer*. Mc Graw-Hill New York, USA 2002; 583-612

Ko Y, Abel J, Harth V, Brode P, Antony C, Donat S, Fischer HP, Ortiz-Pallardo ME, Thier R, Sachinidis A, Vetter H, Bolt HM, Herberhold C, Bruning T. Association of CYP1B1 codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of p53 in tumor tissue. *Cancer Res* 2001; 61: 4398-4404

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971; 68: 820-823

Landi S, Gemignani F, Moreno V, Gioia-Patricola L, Chabrier A, Guino E, Navarro M, de Oca J, Capella G, Canzian F; Bellvitge Colorectal Cancer Study Group. A comprehensive analysis of phase I and phase II metabolism gene polymorphisms and risk of colorectal cancer. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15: 535-546

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature* 1979; 278: 261-263

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992; 358: 15-16

La Vecchia C, Negri E, Franceschi S, D'Avanzo B, Boyle P. A case-control study of diabetes mellitus and cancer risk. *Br J Cancer* 1994; 70: 950-953

Li DN, Seidel A, Pritchard MP, Wolf CR, Friedberg T. Polymorphisms in P450 CYP1B1 affect the conversion of estradiol to the potentially carcinogenic metabolite 4-hydroxyestradiol. *Pharmacogenetics* 2000; 10: 343-353

Liu E, Hjelle B, Morgan R, Hecht F, Bishop JM. Mutations of the Kirsten-ras proto-oncogene in human preleukaemia. *Nature* 1987; 330: 186-188

Lodish HF, Kong N. The secretory pathway is normal in dithiothreitol-treated cells, but disulfide-bonded proteins are reduced and reversibly retained in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 1993; 268: 20598-20605

Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991; 51: 3075-3079

Longnecker MP, Gerhardsson le Verdier M, Frumkin H, Carpenter C. A case-control study of physical activity in relation to risk of cancer of the right colon and rectum in men. *Int J Epidemiol* 1995; 24: 42-50

Malkin D. p53 and the Li-Fraumeni syndrome. *Biochim Biophys Acta* 1994; 1198: 197-213

Mandel JS, Church TR, Bond JH, Ederer F, Geisser MS, Mongin SJ, Snover DC. The effect of fecal occult-blood screening on the incidence of colorectal cancer. *N Eng J Med* 2000; 343: 1603-1607

McMurray H, Sampson E, Compitello G, Kinsey C, Newman L, Smith B, Chen SR, Klebanov L, Salzman P, Yakolev A, Land H: synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype. *Nature* 2008; 453: 1112-1116

McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 130-134

Mellemkjaer L, Olsen JH, Frisch M, Johansen C, Gridley G, McLaughlin JK. Cancer in patients with ulcerative colitis. *Int J Cancer*. 1995; 60: 330-333

Merril CR, Dunau ML, Goldman D. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem*. 1981; 110: 201-207

Mills AA. p53: link to the past, bridge to the future. *Genes Dev* 2005; 19: 2091-2099

Miranda E, Destro A, Malesci A. Genetic and epigenetic changes in primary metastatic and nonmetastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2006; 95: 1101

Nelson DR, Koymans L, Kamataki T, Stegeman JJ, Feyereisen R, Waxman DJ, Waterman MR, Gotoh O, Coon MJ, Estabrook RW, Gunsalus IC, Nebert DW. P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 1996; 6: 1-42

Oliner JD, Kinzler KW, Meltzer PS, George DL, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature* 1992; 358: 80-83

Otori K, Oda Y, Sugiyama K, Hasebe T, Mukai K, Fujii T, Tajiri H, Yoshida S, Fukushima S, Esumi H. High frequency of K-ras mutations in human colorectal hyperplastic polyps. *Gut* 1997; 40: 660-663

Philips DH. Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature* 1983, 303: 468-472

Popescu NC, Amsbaugh SC, DiPaolo JA, Tronick SR, Aaronson SA, Swan DC. Chromosomal localization of three human ras genes by in situ molecular hybridization. *Somat Cell Mol Genet* 1985; 11: 149-155

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. *J Pathol* 1999; 187: 112-126

Przygodzki RM, Bennett WP, Guinee DG Jr, Khan MA, Freedman A, Shields PG, Travis WD, Jett JR, Tazelaar H, Pairolero P, Trastek V, Liotta LA, Harris CC, Caporaso NE. p53 mutation spectrum in relation to GSTM1, CYP1A1 and CYP2E1 in surgically treated patients with non-small cell lung cancer. *Pharmacogenetics* 1998; 6: 503-511

Pulciani S, Santos E, Lauver AV, Long LK, Aaronson SA, Barbacid M. Oncogenes in solid human tumours. *Nature* 1982 ; 300: 539-542

Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418: 934

Riede UN, Wiestler OD, Mueller HJ. Störungen des Zellwachstums. In: Riede UN, Schaefer HE, HRSG. *Allgemeine und spezielle Pathologie*, Stuttgart – New York: Georg Thieme Verlag, 1995: 356-357

Rodenhuis S, van de Wetering ML, Mooi WJ, Evers SG, van Zandwijk N, Bos JL. Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1987; 317: 929-935

Ryk C, Berggren P, Kumar R, Hemminki K, Larsson P, Steineck G, Lambert B, Hou SM. Influence of GSTM1, GSTT1, GSTP1 and NAT2 genotypes on the p53 mutational spectrum in bladder tumours. *Int J Cancer* 2005; 113: 761-768

Schiffman MH and Felton JS. Fried foods and the risk of colon cancer. *Am J Epidemiol* 1990; 131: 376-378

Shaw P, Tardy S, Benito E, Obrador A und Costa J. Occurrence of *Ki-ras* and *p53* mutations in primary colorectal tumors. *Oncogene* 1991; 6: 2121-2128

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 1996; 274: 1672-1677

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997; 91: 325-334

Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, Kinzler KW, Levin B, Frost P, Vogelstein B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; 256: 102-105

Soreide K, Janssen EA, Soiland H, Korner H, Baak JP. Microsatellite instability of colorectal cancer. *Br J Surg* 2006; 93: 395-406

Stoilov I, Akarsu AN, Sarfarazi M. Identification of three different truncating mutations in cytochrome P4501B1 (CYP1B1) as the principal cause of primary congenital glaucoma (Buphthalmos) in families linked to the GLC3A locus on chromosome 2p21. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 641-647

Strachan T, Read AP. Die Aktivierung von Protoonkogenen. In: Strachan T, Read AP, HRSG. *Molekulare Humangenetik*, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, 1996: 553-554

Sutter TR, Tang YM, Hayes CL, Wo YY, Jabs EW, Li X, Yin H, Cody CW, Greenlee WF. Complete cDNA sequence of a human dioxin-inducible mRNA identifies a new gene subfamily of cytochrome P450 that maps to chromosome 2. *J Biol Chem* 1994; 269: 13092-13099

Takayama, T, Ohi, M, Hayashi, T. Analysis of k-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001; 121: 599-611

Takehima Y, Seyama T, Bennett WP, Akiyama M, Tokuoka S, Inai K, Mabuchi K, Land CE, Harris CC. p53 mutations in lung cancers from non-smoking atomic-bomb survivors. *Lancet* 1993; 342: 1520-1. Erratum in: *Lancet* 1994; 343: 1302

Tanaka T, Kohno H, Murakami M, Shimada R, Kagami S. Colitis-related rat colon carcinogenesis induced by 1-hydroxy-anthraquinone and methylazoxymethanol acetate. *Oncol Rep* 2000; 7: 501-508

Tang YM, Wo YY, Stewart J, Hawkins AL, Griffin CA, Sutter TR, Greenlee WF. Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J Biol Chem* 1996; 271: 28324-28330

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260: 816-819

Thun MJ, Namboodiri MM, Heath CW Jr. Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N Engl J Med* 1991; 325: 1593-1596

van Tuinen P, Rich DC, Summers KM, Ledbetter DH. Regional mapping panel for human chromosome 17: application to neurofibromatosis type 1. *Genomics* 1987; 1: 374-381

Vineis P and Malats N. Strategic issues in the design and interpretation of studies on metabolic polymorphisms and cancer. *IARC Sci Publ* 1999; 148: 51-61

Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526

Vogelstein B, Kinzler KW. Tumour-suppressor genes. X-rays strike p53 again. *Nature* 1994; 370: 174-175

Weinberg RA. Oncogenes of spontaneous and chemically induced tumors. *Adv Cancer Res* 1982; 36: 149-163

Weirich G, Hornauer MA, Bruning T, Hofler H, Brauch H. Fixed archival tissue. Purify DNS and primers for good PCR yield! *Mol Biotechnol* 1997; 8: 299-301

Winawer SJ, Zauber, AG, Ho MN. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomie. The National Polyp Study Workgroup, *N Engl J Med* 1993; 329: 1977

Witte JS, Longnecker MP, Bird CL, Lee ER, Frankl HD, Haile RW. Relation of vegetable, fruit, and grain consumption to colorectal adenomatous polyps. *Am J Epidemiol* 1996; 144: 1015-1025

Wu AH, Wan P, Bernstein L. A multiethnic population-based study of smoking, alcohol and body size and risk of adenocarcinomas of the stomach and esophagus (United States). *Cancer Causes Control* 2001; 12: 721-732

Yanez L, Groffen J, Valenzuela DM. c-K-ras mutations in human carcinomas occur preferentially in codon 12. *Oncogene* 1987; 1: 315-318

Zhang Z, Wang Y, Vikis HG, Johnson L, Liu G, Li J, Anderson MW, Sills RC, Hong HL, Devereux TR, Jacks T, Guan KL, You M. Wildtype Kras2 can inhibit lung carcinogenesis in mice. *Nat Genet* 2001; 29: 25-33

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei all jenen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Vetter für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit an der Medizinischen Universitäts-Poliklinik Bonn und die guten Arbeitsbedingungen.

Herzlichen Dank an meinen Doktorvater PD. Dr. Neuhaus für das Überlassen des Themas, seine gradlinige, ergebnisorientierte Art sowie für seine vielen Ratschläge, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Herrn Prof. Dr. Fischer und all seinen Mitarbeitern des Instituts für Pathologie der Universität Bonn danke ich für die Unterstützung bei der Asservation der Gewebeproben und deren Aufarbeitung.

Großer Dank gilt Prof. Dr. Bollmann und seinen Kollegen des Inst. Für Pathologie Bonn-Duisdorf für die Bereitstellung weiterer Tumorgewebeproben.

Für die freundliche und entspannte Arbeitsatmosphäre sowie die große Unterstützung bei der Einführung in die Thematik der Arbeit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der wissenschaftlichen Abteilung.

Meiner Frau Astrid, meiner Schwester Karen Lunze und meiner Familie danke ich für ihre unendliche Geduld und über alles Gesagte hinaus.