

**Genexpressionen der Cytochrome P450 1B1 und
2E1 in Abhängigkeit einer PAH-Einwirkung infolge
Rauchens sowie der individuellen Suszeptibilität**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Hadzaad, Bahar
aus Teheran / Iran

Gießen 2009

Aus dem Medizinischen Zentrum für Ökologie
Institut und Poliklinik für Arbeits- und Sozialmedizin
Kommissarischer Leiter: Professor Dr. med. Joachim Schneider
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Professor Dr. med. Joachim Schneider
Gutachter: Professor Dr. med. dent. W.-E. Wetzel

Tag der Disputation: 29.09.2009

Meiner Familie gewidmet

Abkürzungsverzeichnis

Nicht aufgeführt werden gebräuchliche Einheiten, wie SI-Einheiten und die von diesen Einheiten abgeleiteten Maßeinheiten und Potenzen.

ACT- β	β -Actin
Ah-R	Arylhydrocarbon-Rezeptor
B[a]P	Benzo[a]pyren (1,2-Benzpyren) auch 3,4-Benzpyren
B2M	β 2-Mikroglobulin
BMA	Bundesministerium für Arbeit- und Sozialordnung
Bp	Basenpaare
C, L, T, V	Cytosin, Leucin, Thymin, Valin
cDNA	engl.: complementary deoxyribonucleic acid = komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNS)
CT	engl.: threshold cycle = Schwellenwert-Zyklus
CYP	Cytochrom P450
CYP1B1	Cytochrom P450, Familie 1, Subfamilie B, Polypeptid 1
CYP2E1	Cytochrom P450, Familie 2, Subfamilie E, Polypeptid 1
DATP	Desoxyadenosintriphosphat
DCTP	Desoxycytidintriphosphat
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	engl.: deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure (DNS)
DNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
DTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ex-R	Exraucher
FRET	engl.: fluorescence resonance energy transfer = Fluoreszenzresonanzenergietransfer
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
GST	Glutathion-S-Transferase (GSTM1, GSTT1, GSTP1)
HKG	engl.: housekeeping gene = Haushaltsgen
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry

mRNA	engl.: messenger RNA = Boten-RNA
mt	Mutant
NaAc	Natriumacetat
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat besser Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
Nie-R	Nie-Raucher
NR	Nie-Raucher
OD	Engl.: optic density = Optische Dichte
PAH	Engl.: polycyclic aromatic hydrocarbons = Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK)
PBS	Engl.: Phosphate buffered saline = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Engl.: polymerase chain reaction = Polymerase- Kettenreaktion
PJ	Packungsjahre
R	Raucher
RH	Rest-H
RNA	Engl.: ribonucleic acid = Ribonukleinsäure (RNS)
R-OH	Rest-OH
rpm	Engl.: rounds per minute = Umdrehungen pro Minute
RR	relatives Risiko
TCDD	Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin
wt	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	8
1.1. Polyzyklisch Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH).....	8
1.1.1. Vorkommen.....	11
1.1.2. Krebsrisiko und PAH am Arbeitsplatz	12
1.1.3. Aufnahme und Wirkung im menschlichen Organismus.....	13
1.2. Fremdstoffmetabolismus	13
1.2.1. Phase I und II Enzyme	13
1.2.2. Das Cytochrom-P-450-System.....	17
1.2.3. Cytochrom 1B1	20
1.2.4. Cytochrom 2E1	21
2. Fragestellung und Ziel der Arbeit	23
3. Material und Methoden.....	24
3.1. Patientenkollektiv und Kontrollgruppe	24
3.2. Geräte und Materialien.....	25
3.3. Untersuchungen.....	28
3.3.1. Isolierung der DNA.....	28
3.3.2. Isolierung der Gesamt-RNA	28
3.3.3. DNase-Behandlung	29
3.3.4. Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	30
3.3.5. Synthese der cDNA.....	30
3.3.6. Kontroll- PCR und Agarosegelelektrophorese.....	31
3.4. PCR.....	32
3.4.1. Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion.....	32
3.4.2. Qualitative Polymerase-Kettenreaktion	36
3.5. Statistische Auswertung	41
4. Ergebnisse	42
4.1. Kollektivbeschreibung	42
4.1.1. Beschreibung des Gesamtkollektivs	42
4.1.2. Der Polymorphismus Cytochrom P450 1B1 L432V.....	44
4.1.3. Der Polymorphismus Cytochrom 2E1 C1053T.....	45
4.2. Bestimmung der Genexpression	46

4.2.1.	Cytochrom P450 1B1	46
4.2.2.	Cytochrom P450 2E1	52
5.	Diskussion	57
5.1.	Etablierung einer Methode zur Ermittlung der Genexpression	58
5.2.	Beeinflussung der Genexpression von CYP1B1 durch Tabakrauch sowie durch den CYP1B1*3 Polymorphismus.....	60
5.3.	Beeinflussung der Genexpression von CYP2E1 durch Tabakrauch sowie durch den CYP2E1 C1053T Polymorphismus	64
6.	Zusammenfassung	68
7.	Summary	69
8.	Literaturverzeichnis	70
9.	Anhang	80
10.	Erklärung	89
11.	Lebenslauf	90
12.	Danksagung.....	91

1. Einleitung

1. Einleitung

1.1. Polyzyklisch Aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH)

Leben und Gesundheit weiter Teile der arbeitenden Bevölkerung sind durch krebserzeugende Arbeitsstoffe in vielfältiger Weise bedroht. Es steht außer Zweifel, dass in der industriellen und handwerklichen Lebenswirklichkeit eine beträchtliche Anzahl bestimmter Personengruppen bei der Arbeit in besonderem Maße krebserzeugenden Stoffen ausgesetzt sind (Valentin & Essing 1977).

Aus den letzten Jahren liegen über die Zahl als arbeitsbedingt entschädigter Krebserkrankungen zuverlässige Daten der Unfallversicherungsträger vor (Butz 2004), Abb. 1.

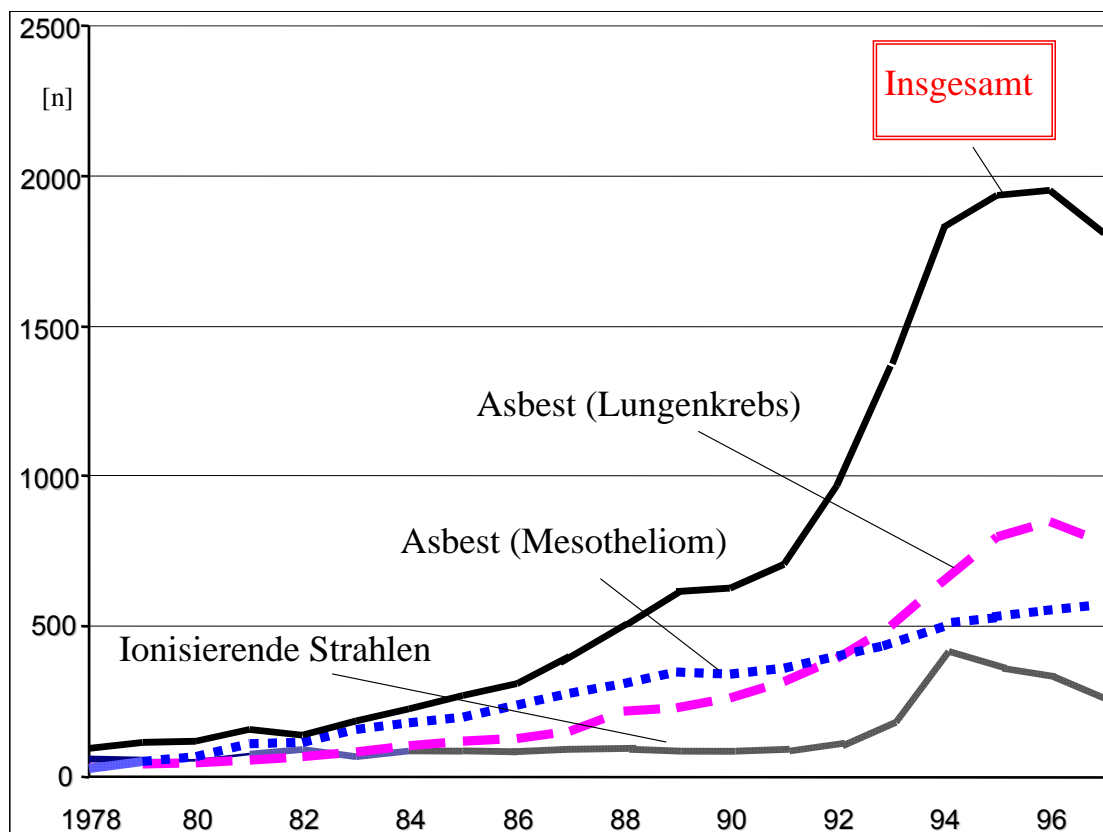


Abb. 1 Anstieg der entschädigten Berufskrebserkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland 1978 – 1997 (seit 1999 einschließlich der neuen Bundesländer)

Seit Anfang der 90er Jahre hat die Zahl der jährlich tödlich verlaufenden Berufserkrankungen diejenige der tödlichen Arbeitsunfälle überschritten (Bundesministerium für Arbeit- und Sozialordnung (BMA) 1999). Nach der amtlichen Statistik des Bundesarbeitsministeriums aus dem Jahr 1998 kam es n=2.040mal

1. Einleitung

aufgrund von Berufskrankheiten zum tödlichen Ausgang. Die Zahl tödlicher Arbeitsunfälle im gleichen Jahr betrug $n=1.278$. Weitestgehend geprägt wird das tödliche Berufskrankheitengeschehen durch die Berufskrebserkrankungen. In den Jahren von 1992 bis 1997 registrierten die gewerblichen Berufsgenossenschaften bereits jede 4. erstmals entschädigungspflichtige Berufskrankheit als Berufskrebserkrankung. Butz (1999) hat anhand von $n=14.337$ ausgewerteten, anerkannt arbeitsbedingten Berufskrebserkrankungen zeigen können, dass der Lungenkrebs mit $n=7.529$ Fällen, einem Anteil von 52,5 % entsprechend, die häufigste Organmanifestation darstellt. An 2. Stelle der Häufigkeitsskala finden sich mit $n=4.775$ Fällen die bösartigen Erkrankungen der Pleura (=33,3 %) in Form des Asbestfaserstaub-verursachten diffusen malignen Pleuramesothelioms. Es folgen die arbeitsbedingt verursachten Tumorerkrankungen der Harnorgane mit $n=767$ (=5,4 %), der inneren Nase mit $n=323$ (=2,3 %) und des blutbildenden Systems mit $n=302$ (=2,1 %). Auf die Organmanifestation des Bauchfellmesothelioms sowie des Kehlkopfkarcinoms entfallen $n=198$ bzw. $n=196$ (=1,4 %) der entschädigten Berufskrebserkrankungen. Die Hauttumoren sowie die Gruppe der übrigen Tumorlokalisationen bilden mit ca. 1 % bzw. 0,3 % das Ende der Häufigkeitsskala. Es besteht somit kein Zweifel an der Tatsache, dass die Atemwege und das Rippenfell aufgrund der arbeitsbedingt inhalativ inkorporierten Humankanzerogene weitaus die häufigste Berufskrebslokalisation darstellen. Aus präventiver Sicht ist die Entwicklung der jährlich neu entschädigten Berufskrebserkrankungen in Deutschland besorgniserregend.

Ätiologisch bedeutsame Risikofaktoren für die Lungenkrebserkrankungen stellen Faktoren wie die Konstitution und Disposition, die individuelle Enzymausstattung, die Immunabwehr, die endokrine Regulation aber auch pulmonale Vorerkrankungen dar. Außerdem zählen zu den Risikofaktoren die Ernährungsgewohnheiten, der Medikamentenverbrauch und insbesondere inhalative Noxen.

Als wichtigste Ursache für den Lungenkrebs wird das Inhalieren von Tabakrauch angesehen. Zu etwa 85% wird das Bronchialkarzinom durch Tabakrauch (Zigarettenrauch) verursacht, ungefähr 8% stellen andere Lungenkrebs erzeugende Karzinogene (z. B. Asbest, Chromate, Arsen, Nickel) dar, etwa 5% werden durch die sog. „Luftverschmutzung“ und etwa 2% durch andere Faktoren verursacht.

1. Einleitung

Im Tabakrauch wurden bisher mehr als 40 Karzinogene identifiziert. Darunter sind die bekanntermaßen Lungenkrebs erzeugenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) mit der Leitkomponente des Benzo[a]pyren, aber auch weitere Humankanzerogene ohne Organotropie auf die Lunge wie N-Nitrosamine, aromatische Amine sowie weitere organische (z. B. Acrylnitril, Benzol) und anorganische (z. B. Arsen, Cadmium, Nickel) Verbindungen.

Das relative Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken, steigt mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten an (s. Abb. 2). Als Maß wird international das Zigaretten-Packungsjahr (pack year) verwendet. Ein Packungsjahr entspricht dem täglichen Konsum von 20 Zigaretten über die Dauer eines Jahres. Nach Einstellen des Rauchens beginnt das Lungenkrebsrisiko zu sinken. Das Niveau des Nie-Rauchers wird allerdings nicht mehr erreicht.

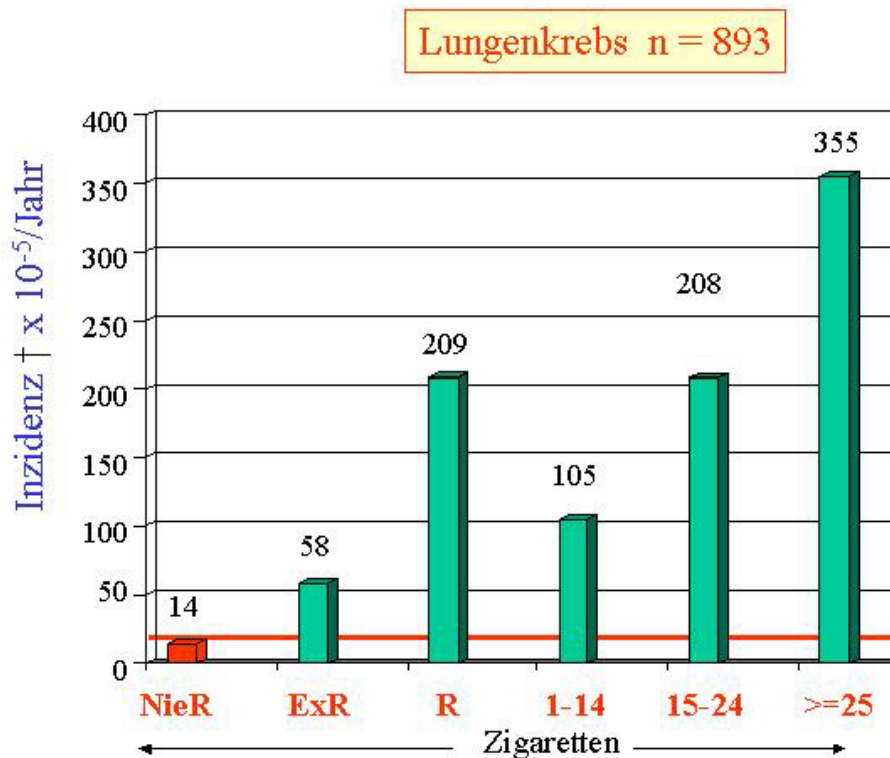


Abb. 2 Mortalität in Abhängigkeit vom Zigarettenkonsum bei 34 439 männlichen Personen innerhalb von 40 Jahren (nach Doll und Peto, 1994)

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren sind weitere für das Berufskrankheitengeschehen wesentliche Erkenntnisfortschritte gewonnen worden. Der ärztliche Sachverständigenbeirat, Sektion Berufskrankheiten, beim Bundesministerium für Arbeit und Sozialordnung hat der Bundesregierung empfohlen, zukünftig Lungenkreberkrankungen auch nach Einwirkung einer kumulativen Dosis von 100 B[a]P-Jahren neu in die Berufskrankheiten-Liste aufzunehmen (Schriftenreihe des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften 1999). Diese Regelung ist nicht mehr begrenzt auf Kokereibetriebe.

Berufskrebserkrankungen stellen somit das Paradigma der industriellen Latenzschäden dar. Für die Prävention folgt, dass die Interventionsstrategien von heute die Minimierung der Erkrankungshäufigkeit bzw. der Sterblichkeit der arbeitenden Bevölkerung von morgen zu intendieren haben. Ein zentrales Anliegen der modernen arbeitsmedizinischen Onkologie ist darüber hinaus das sekundärpräventive Bemühen um die frühestmögliche Diagnose einer entstehenden Berufskrebserkrankung (Woitowitz & Calavrezos 1986, Woitowitz 1986).

1.1.1. Vorkommen

PAH kommen unter anderem in Teer, Rohöl und in Mineralölprodukten vor. Sie werden bei der unvollständigen Verbrennung und thermischen Zersetzung organischer Materialien gebildet. Die Verbrennungsprozesse können natürlichen (z.B. Waldbrände und Vulkanausbrüche) oder anthropogenen (z.B. Heizen, Verkehr, Abfallverbrennung) Ursprungs sein. Des Weiteren konnten PAH in gegrilltem und geräuchertem Fleisch, sowie im Trinkwasser nachgewiesen werden. Besonders im Tabakrauch wurden erhöhte PAH-Werte nachgewiesen, da sie beim Verbrennungsprozess der Zigarette entstehen. Tabakrauch ist ein komplexes Gemisch aus weit mehr als 4000 gas- und partikelförmigen Substanzen (Baker 2007), die zum Teil erst bei der Pyrolyse des Tabaks entstehen (Djordjevic et al. 2000, Hecht 1999). Mindestens 250 der Substanzen im Tabakrauch sind giftig oder krebserzeugend. Zu den giftigen Substanzen gehören beispielsweise Blausäure, Kohlenmonoxid, Toluol und Schwermetalle wie Cadmium und Blei. Mehr als 70 der im Tabakrauch enthaltenen Substanzen sind nachgewiesenermaßen krebserzeugend oder stehen im Verdacht, Krebs zu erzeugen (Hecht 1999). Zu den krebserzeugenden Substanzen gehören in erster Linie die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, die aromatischen Amine und die

1. Einleitung

tabakspezifischen *N*-Nitrosamine. Tab. 1 gibt einen Überblick über ausgewählte toxische und krebserzeugende Substanzen im Tabakrauch, Beispiele für ihre Verwendung oder ihr Vorkommen außerhalb von Tabak sowie ihre toxikologische Bewertung.

Tab. 1 Giftige Substanzen im Tabakrauch (Schaller & Pötschke-Lange 2007)

Auswahl an giftigen Substanzen im Tabakrauch mit hohem Gefährdungspotential		
Substanzen	Beispiele für Verwendung / sonstiges Vorkommen	Toxikologische Bewertung
Aromatische Amine	Zwischenprodukte bei der Farbstoffsynthese	Humankarzinogen (K1)
Arsen	in Rattengift	Humankarzinogen (K1), Übelkeit, Durchfall, Bauchschmerzen, Reizung der Haut und Atemwegsschleimhäute
Benzo[a]pyren vgl. PAH	im Rauch von Öl-, Gas- und Kohleöfen	Humankarzinogen (K1)
Benzol	Lösemittel, Antiklopfmittel in Otto-Kraftstoffen	Humankarzinogen (K1)
Blei	in Batterien, Bleiglas	toxisches Metall, kann Schäden an Gehirn, Nieren, Nervensystem und roten Blutkörperchen hervorrufen
Cadmium	in Batterien, Farben und Lacken, Lötrauchen	krebserzeugend, kann bei Langzeitexposition die Nieren schädigen
Cyanwasserstoff (Blausäure)	in Rattengift, eine der toxischsten Substanzen im Tabakrauch	Kurzzeitexposition kann zu Kopfschmerzen, Schwindel, Erbrechen führen
Formaldehyd	in der Holzverarbeitung, zur Konservierung von Gewebe	Krebserzeugend
Kohlenmonoxid	bei der unvollständigen Verbrennung	neurotoxisch; blockiert den Sauerstofftransport im Blut, schädigt Blutgefäße
<i>N</i> -Nitrosamine	in Gummi	Krebserzeugend
Polonium 210	Neutronenquelle, in Messgeräten	stark radiotoxisch
Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH)	in kohlestämmigen Produkten	Humankarzinogen (K1)

K1: Stoffe, die beim Menschen Krebs erzeugen und bei denen davon auszugehen ist, daß sie einen nennenswerten Beitrag zum Krebsrisiko leisten. Epidemiologische Untersuchungen geben hinreichende Anhaltspunkte für einen Zusammenhang zwischen der Exposition beim Menschen und dem Auftreten von Krebs. Andernfalls können epidemiologische Daten durch Informationen zum Wirkungsmechanismus beim Menschen gestützt werden. (Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung gesundheitlicher Arbeitsstoffe)

1.1.2. Krebsrisiko und PAH am Arbeitsplatz

Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Inhalation von PAH und einem erhöhten Risiko, an Bronchialkarzinom zu erkranken. Es ist schon lange Zeit bekannt, dass PAH in Tierversuchen Karzinome verursachen. Epidemiologische Studien bei Beschäftigten mit hoher Einwirkung von PAH, beispielsweise in

1. Einleitung

Kokereien oder in der Söderberg Elektrolyse eines Aluminiumwerkes, wiesen ein erhöhtes Vorkommen von Bronchialkarzinomen oder Urothelkarzinomen auf (Boffetta et al. 1997, Negri & La Vecchia 2001). Auch tierexperimentell konnte die kanzerogene Potenz von PAH nachgewiesen werden. Als Leitkomponente der PAH gilt das Benzo[a]pyren.

1.1.3. Aufnahme und Wirkung im menschlichen Organismus

PAH werden unter anderem durch das Einatmen von Zigarettenrauch über die Lunge in den menschlichen Organismus aufgenommen. PAH haften sich beim Verbrennungsprozess an kleine Rußpartikel und gelangen so über den Luftweg in die Alveolen der Lungen, wo sie metabolisiert werden. Inhalativ aufgenommene Karzinogene wirken auf die Schleimhäute des Respirationstraktes ein. Als genotoxische Karzinogene kommen neben Rauchen insbesondere kanzerogene Arbeitsstoffe und ionisierende Strahlen in Betracht. Diese führen zur Initiation der Körperzelle und damit zu irreversiblen Schäden der DNS. Die Bedeutung von PAH liegen im kanzerogenen, teratogenen und mutagenen Potential. Durch chemische Veränderung infolge fremdstoffmetabolisierenden Enzymen entwickeln PAH ihr kanzerogenes Potential.

1.2. Fremdstoffmetabolismus

1.2.1. Phase I und II Enzyme

Der Organismus ist ständig chemischen Stoffen ausgesetzt, die zur Gefährdung seiner Gesundheit führen können. Um sich dagegen zu schützen, verfügt er unter anderem über spezielle Enzymsysteme, die diese Fremdstoffe metabolisieren, um deren Ausscheidung zu erleichtern.

Der Fremdstoffmetabolismus wird in drei Phasen eingeteilt, siehe Abb. 3.

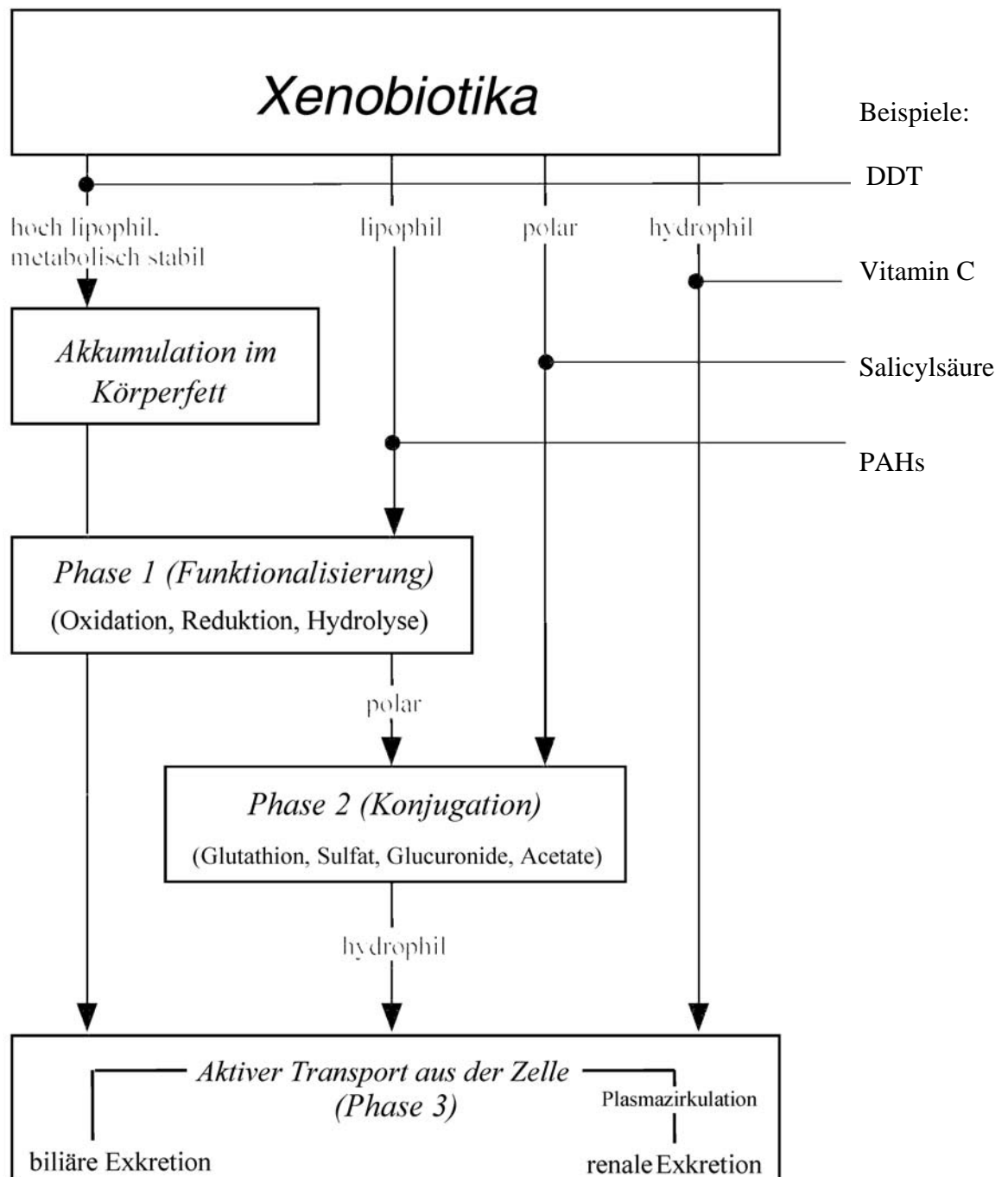


Abb. 3 Fremdstoffmetabolismus nach Schober (Schober 2000)

1. Einleitung

Phase-I-Enzyme dienen der Oxidation, Reduktion und der Hydrolyse lipophiler Substanzen. Diese Reaktionen führen zur Demaskierung bzw. Einführung funktioneller Gruppen wie -OH, -SH, -NH₂ und -COOH. In Phase I werden an dem lipophilen Substrat funktionelle Gruppen eingeführt oder demaskiert. Dadurch kommt es zur Aktivierung von chemisch stabilen Vorstufen zu chemisch reaktiven Zwischenprodukten („Giftung“). Die entstehenden toxischen Metaboliten können an Makromoleküle wie die DNS binden und damit zu Mutationen mit möglicher Folge der Initiation der Kanzerogenese führen (Schwarz & Bock 1998). Durch den veränderten Stoffwechsel toxischer Substanzen kommt es zu einer unterschiedlichen Empfindlichkeit = Suszeptibilität der Individuen auf Gefahrstoffe. Einen Überblick über Phase-I-Enzyme gibt Tab. 2.

Tab. 2 Fremdstoffmetabolismus durch Phase I Enzyme (Idle et al. 1992)

Phase I (Funktionalisierung)	
Reaktion	Enzyme
Oxidation	Cytochrom P450-Monooxygenasen Monoaminoxidasen Alkoholdehydrogenase Epoxid-Hydrolase Aldehyddehydrogenase S- Oxidase Flavinhaltige Monooxygenase
Reduktion	Reduktasen Cytochrom P450 (unter anaeroben Bedingungen)
Hydrolyse	Epoxid-Hydrolasen Esterasen

Phase-II-Enzyme fügen nun im zweiten Schritt hydrophile Moleküle an die veränderten Fremdstoffe an, um ihre Wasserlöslichkeit zu erhöhen und die Ausscheidung über die Nieren zu fördern („Entgiftung“). Zu den wichtigsten Vertretern dieser Enzymgruppe gehören die Glutathion-S-Transferase (GST) und N-Acetyltransferasen. Einen Überblick über diese Gruppe gibt Tab. 3.

1. Einleitung

Tab. 3 Fremdstoffmetabolismus durch Phase II Enzyme (Idle et al. 1992)

Phase II (Konjugation)	
Reaktion	Enzyme
Acetylierung	N-Acetyltransferasen
Glutathionkonjugation	Glutathion-S-Transferasen
Glukuronidierung	UDP-Glukuronyltransferasen
Sulfatierung	Sulfotransferasen
Methylierung	Methyltransferasen
Konjugation mit Aminosäuren	Aminosäuren-N-Acetyltransferasen

Über denselben Mechanismus können Fremdstoffe aus dem Tabakrauch, wie PAH metabolisiert werden.

Fremdstoffmetabolisierende Enzyme werden als eine Gruppe von Genen betrachtet, die die Anfälligkeit auf Umweltfaktoren beeinflussen können (Guengerich 2000). Im Falle des Lungenkrebses wirken sich Polymorphismen der am Stoffwechsel beteiligten Gene in einem höheren Karzinomrisiko für Raucher im Vergleich zu Nie-Rauchern aus. Der genetische Polymorphismus ist also per se nicht ausschlaggebend für ein Malignom, wenn der krebserregende Faktor fehlt (Vineis 2004). Um einen genetischen Polymorphismus handelt es sich, wenn eine Allelvariation in einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent der Bevölkerung vorliegt (Oesch 1994). Die Aktivität eines Gens kann durch einen Polymorphismus erhöht bzw. erniedrigt werden, oder sogar vollständig ausfallen. Der Ausfall der Aktivität eines Gens hat zur Folge, dass keine Enzyme mehr gebildet werden können (Daly 1995).

Die komplexe Beziehung zwischen einem Polymorphismus und einer karzinogenen Dosis (z. B. Tabakrauch) ist durch die Enzyminduktion von Stoffwechselwegen geregelt. PAH-Prokarzinogene können auf diesem Weg zu hoch mutagenen Diol-Epoxiden, Radikale und O-Chinone biotransformieren (Conney 1982, Gelboin 1980, Penning et al. 1999).

Es sind Polymorphismen für eine Reihe von fremdstoffmetabolisierenden Enzymen bekannt, unter anderem auch für Cytochrom P450-Monooxygenasen und für Glutathion-S-Transferasen.

1. Einleitung

1.2.2. Das Cytochrom-P-450-System

Seit den sechziger Jahren wurden die Cytochrom P450 Enzyme (CYP) als vor allem in der Leber gebildete Enzyme beschrieben, die unter anderem PAH metabolisieren. Die Bezeichnung „Cytochrom P450“ wurde eigentlich als temporäre Bezeichnung vorgeschlagen. Es handelt sich um ein gefärbtes Pigment in der Zelle, das in reduziertem Zustand in Verbindung mit Kohlenmonoxid ein Absorptionsmaximum von 450 nm hat (Omura & Sato 1962). Doch diese Bezeichnung blieb bestehen. Ein korrekterer Name wäre „Häm-thiolat-Monooxygenasen“ (Bachschmid et al. 2005), da sie ein Sauerstoffatom auf das Substrat übertragen können. Diese Enzyme sind essentielle Proteine, die in allen Lebewesen nachgewiesen wurden und wahrscheinlich seit 3,5 Milliarden Jahren existieren (Cyanobakterien) (Chang & Kam 1999).

Cytochrom-Enzyme sind bei zellulären Funktionen, wie dem Metabolismus von Eikosanoiden, der Biosynthese von Cholesterin, der Gallensäure, der Steroidsynthese und ihrem Metabolismus, der Synthese und dem Abbau von biogenen Aminen, Vitamin-D-3 Auf- und Abbau und der Hydroxylierung von Retinolsäure sowie anderen Morphogenen beteiligt. Manche Cyp-Enzyme haben bisher noch unbekannte Funktionen (Nelson et al. 2004).

Das allgemeine Reaktionsschema der Cytochrom-P450 Enzyme zeigt Abb. 4:

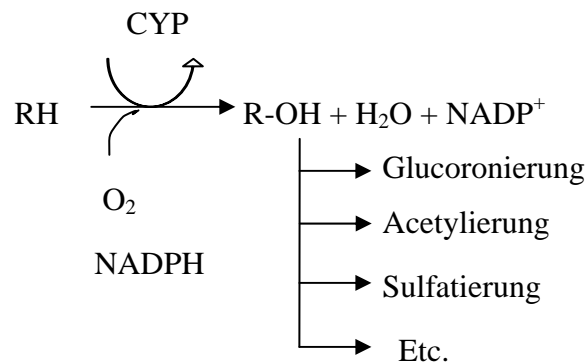


Abb. 4 Enzymatischer Mechanismus:

- Transfer eines Sauerstoffatoms aus molekularem Sauerstoff auf ein Akzeptormolekül
- Das zweite Sauerstoffatom wird unter Verbrauch von NADPH zu Wasser reduziert
- Resultat meist: Epoxidierung, Hydroxylierung, Desalkylierung

Die Cytochrom P450 Enzyme sind nach ihrer Homologie der Aminosäuresequenz in Familien und Subfamilien unterteilt. Proteine, die ungefähr > 40% Sequenzgleichheit

1. Einleitung

haben, gehören zur selben Genfamilie und werden mit einer arabischen Ziffer bezeichnet. Solche mit > 55% Sequenzgleichheit gehören zur selben Unterfamilie und werden mit einem Großbuchstaben unterschieden. Die letzte arabische Ziffer bezeichnet das Isoenzym (Ingelman-Sundberg et al. 2001).

Beispiel:

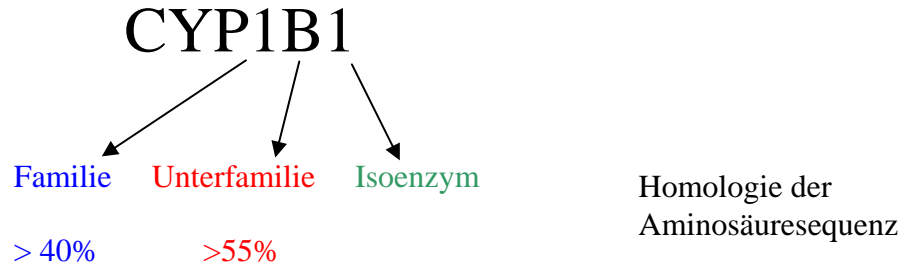


Abb. 5 Nomenklatur der Cytochrom-P450-Enzyme

Mutationen in verschiedenen Cyp-Genen sind für angeborene Stoffwechselstörungen, die zu klinisch bedeutenden Erkrankungen führen können, verantwortlich (Nebert & Russell 2002). Durch das Vorhandensein eines Enzym-Polymorphismus können bei höherer Aktivität des Enzyms mehr kanzerogene Metabolite synthetisiert werden, und damit dem menschlichen Organismus Schaden zufügen.

Abbildung 6 zeigt einen Mechanismus, wie durch die Katalyse eines Cytochrom P450-Enzyms aus Benzo[a]pyren ein kanzerogenes Epoxid werden kann, das die genomische DNA einer Zelle abgreifen kann (Abb. 6).

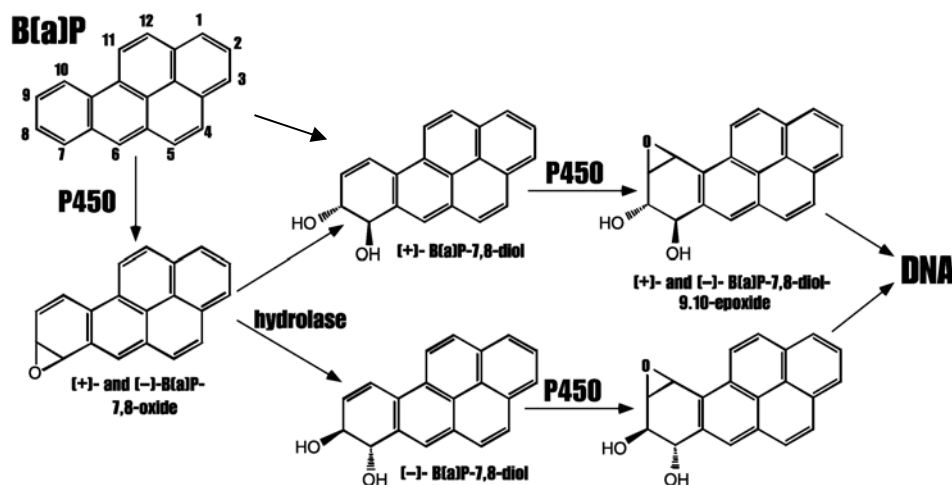


Abb. 6 Metabolische Aktivierung von Benzo[a]pyren durch ein Cytochrom-P450-Enzym und einer Epoxidhydrolase nach Shimada (Shimada & Fujii-Kuriyama 2004).

1. Einleitung

Bis heute ist diese Enzymfamilie auf mehr als 480 charakterisierende Gene angewachsen siehe Tab. 4 (Nelson et al. 1996).

Tab. 4 Funktion von menschlichen Cyp-Enzymen (Nebert & Dalton 2006)

Familie	Anzahl Subfamilien	Substrat/Funktion
CYP1	2	Metabolismus der Eikosanoide, Xenobiotica (PAH) und Medikamente
CYP2	13	Metabolismus der Eikosanoide, Xenobiotica (PAH) und Medikamente
CYP3	1	Metabolismus der Eikosanoide, Xenobiotica (PAH) und Medikamente
CYP4	6	Metabolismus der Eikosanoide, Xenobiotica (PAH) und Medikamente
CYP5	1	Tromboxan A ₂ -Synthase
CYP7	2	Cholesterin und Gallensäure-Synthase
CYP8	2	Prostazyklin-Synthase, Gallensäure-Synthase
CYP11	2	Steroidogenesis
CYP17	1	Steroid 17-Hydroxylase, 17-20-Lyase
CYP19	1	Aromatisierung von Östrogen
CYP20	1	Expression in der Organogenesis
CYP21	1	Steroid 21-Hydroxylase
CYP24	1	Vit D ₃ 24-Hydroxylase
CYP26	3	Hydroxylierung der Retinolsäure
CYP27	3	Gallensäurebiosynthese und Vit D ₃ Hydroxylierung
CYP39	1	24-Hydroxy-cholesterin-7-Hydroxylase
CYP46	1	Cholesterin-24-Hydroxylase im ZNS
CYP51	1	Lanosterol-24-Demethylase

1. Einleitung

1.2.3. Cytochrom 1B1

Das Gen für CYP1B1 liegt auf dem langen Arm von Chromosom 2 (2p21-22) in einem ca. 12 Kilobasen (kb) langen Abschnitt (Tang et al. 1996). Es enthält drei Exons und zwei Introns. Die zugehörige mRNA ist 5,2 kb groß und beginnt am 5'-Ende des 2 Exons. Die sich daraus ergebende Aminosäuresequenz ist 543 Aminosäuren lang (s. Abb. 7) (Murray et al. 2001).

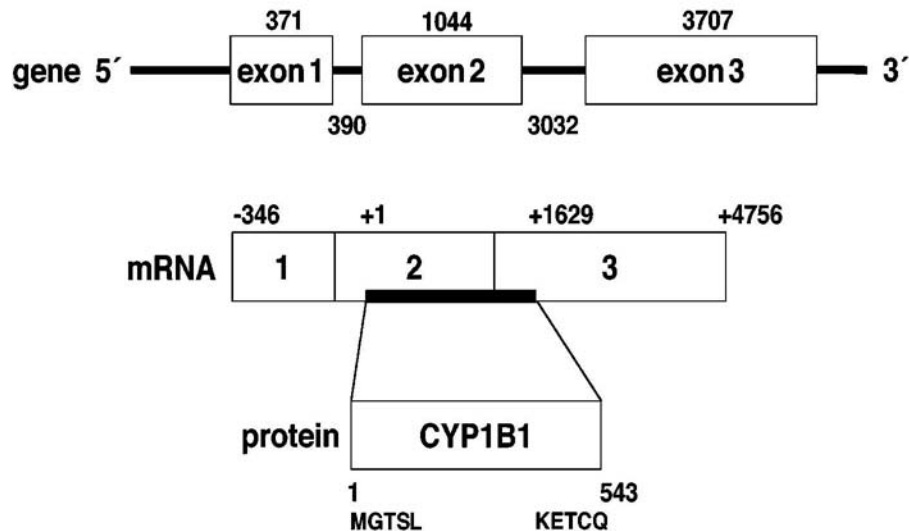


Abb. 7 Struktur des humanen CYP1B1 Gens. CYP1B1 ist auf dem Chromosom 2p21 lokalisiert und umfasst ca. 12 kb genomische DNA. Das Gen enthält 2 Introns und 3 Exons, die sich daraus ergebene mRNA ist 5,2 kb lang. Die Translation beginnt nahe des 5'-Ende von Exon 2 und setzt sich in Exon 3 fort um ein Protein von 543 Aminosäuren zu codieren. Jeweils die fünf ersten N-terminalen und die letzten fünf C-terminalen Aminosäuren sind genannt (Murray et al. 2001).

CYP1B1 oxidiert eine große Anzahl an PAH zu Epoxiden (Guengerich 2000). Damit spielt CYP1B1 eine wichtige Rolle in der Bioaktivierung von Karzinogenen aus dem Tabakrauch.

Daraus entstehende Diolepoxide stellen mutagene Verbindungen dar, die irreversibel an DNA und RNA binden und eine Kanzerisierung bewirken. Benzo[a]pyren wird durch CYP1B1 aktiviert (Shimada et al. 1996). In einer Studie mit V79 Zellen aus chinesischen Hamstern, die CYP1B1 enthielten, wurde die hauptsächliche Formierung von Dibenzo[a,1]pyren 11,12-dihydrodiol-13,14-epoxid aus dem Substrat nachgewiesen und dies in einer höheren Umsatzrate als bei CYP1A1 (Luch et al. 1998).

1. Einleitung

Die CYP1B1 Expression wurde unter anderem im Gefäßendothel nachgewiesen. Inhibitoren für CYP1B1 sind einige PAH, wie 2-Ethylnylpyren und α -Naphthoflavon(7,8-benzoflavon) (Shimada et al. 1998).

Die Induktion durch Fremdstoffe findet über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-R) statt (Spink et al. 2007). So führt Dioxin zu einer 6-fach erhöhten Konzentration für CYP1B1 mRNA und einer 2-fach erhöhten Konzentration an CYP1B1-Protein (Murray et al. 2001). Es wurden große interindividuelle Differenzen in den CYP1B1-Konzentrationen in der menschlichen Lunge gefunden (Kim et al. 2004). Für das CYP1B1 sind ca. 26 Polymorphismen bekannt, die zu einer Enzymstörung oder zu einem vollständigen Funktionsverlust führen können. Einer von ihnen ist ein C→G Polymorphismus im Codon 432. Dadurch wird die Aminosäure Leucin beim Wildtyp durch Valin beim homozygoten Mutanten ausgetauscht (Brüning et al. 1999). Der Polymorphismus wird in Verbindung mit einem erhöhten Risiko für kolorektale Karzinome (Fritsche et al. 1999) und Brustkrebs (Bailey et al. 1998) gebracht.

1.2.4. Cytochrom 2E1

Das Gen für CYP2E1 liegt auf dem langen Arm von Chromosom 10 (10q24.3-qter) (McBride et al. 1987) und enthält neun Exons (Umeno et al. 1988). CYP2E1 metabolisiert verschiedene Karzinogene, wie beispielsweise flüchtige Nitrosamine aus dem Tabakrauch, aber auch Arzneimittel, wie Paracetamol, Chloroxazon und einige Inhalationsanästhetika (Halotan, Isofluran etc.) (Lipp & Schuler 1995). CYP2E1 wird als Isoenzym nicht nur in der Leber sondern auch in anderen Organen, wie der Lunge und dem Gehirn nachgewiesen (Raunio et al. 1995). Die Expression von CYP2E1 wird beispielsweise durch Disulfiram und Diethyl-Dothiocarbamat (Danielson 2002) gehemmt und durch Aceton, Ethanol, (Kessova & Cederbaum 2003) induziert. Dadurch erklärt sich die wichtige Rolle bei der Verstoffwechslung in der Leber (Ladero et al. 1996).

Eine große interindividuelle Variation in der Expression des CYP2E1 Gens wurde bei Menschen festgestellt, was sich wahrscheinlich auf Interaktionen in der Umgebung des Gens zurückführen lässt. CYP2E1 wurde bei Mäusen durch Inhalation von Zigarettenrauch induziert (Villard et al. 1998). Seine Regulierung involviert komplexe transkriptionale wie post-transkriptionale Mechanismen. Das humane CYP2E1 Gen ist funktionell gut konserviert, aber einige polymorphe Allele wurden mit einer geringen Häufigkeit gefunden. In der seitlichen 5' Transkriptions-Region existieren

1. Einleitung

die *RsaI* G₋₁₂₅₉C und *PstI* C₋₁₀₉₁T Polymorphismen. Diese scheinen in einem kompletten „linkage disequilibrium“ zueinander zu stehen (c1 Wildtyp; c2 mutiertes Allel). Die Allele treten homozygot (Referenzgenotyp: c1/c1 Mutant: c2/c2) und heterozygot (Mutant: c1/c2) auf. Für das mutierte Allel c2 ist die mRNA Expression höher als für den Referenzgenotyp c1 (Ladero et al. 1996). Zwar ist die Primärsequenz nicht verändert worden, aber eine gesteigerte Gentranskription wird vermutet (Watanabe et al. 1994). Ein weiterer Polymorphismus ist der *DraI* RFLP durch eine T₋₇₆₆₈A Substitution im Intron 6 des CYP2E1 Gens. Dabei ist C das seltene Allel und D das häufige. Die *RsaI* und die *DraI* scheinen miteinander verbunden zu sein. Das heißt, Individuen, die den *RsaI* Polymorphismus tragen, weisen auch ein mutantes *DraI* Allel auf. Umgekehrt trifft dies nicht zu. Ein weiterer Polymorphismus ist der *MspI* auf dem Intron 6 des CYP2E1 Gens. Hierbei ist das Allel G1 häufiger als das Allel G2 (Uematsu et al. 1991).

2. Fragestellung und Ziel der Arbeit

2. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer Methode, mit der ermittelt werden konnte, inwieweit exogene Faktoren wie PAH im Tabakrauch unter Berücksichtigung eines Genpolymorphismus einen Einfluss auf die Genexpression von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus haben. Die Befunde aus dieser Untersuchung könnten eine wichtige Bedeutung bei der Detektion von Risikopatienten für PAH-induzierte Bronchialkarzinome spielen. Der Zigarettenrauchkonsum kann als Paradigma einer PAH-Einwirkung angesehen werden.

Dabei sollten folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Kann eine Methode etabliert werden, mit der der Einfluss von exogenen Faktoren wie PAH (Tabakrauch) sowie der Einfluss von Genpolymorphismen auf die Genexpression ermittelt werden?
2. Ist die Genexpression der Cytochrome P450 1B1 und 2E1 durch exogene Faktoren wie PAH im Tabakrauch im Vergleich zur Kontrollgruppe (Nierraucher) verändert?
3. Gibt es einen Zusammenhang zwischen dem Genpolymorphismus und der Genexpression der Cytochrome P450 1B1 und 2E1 bei Rauchern und bei Nier Rauchern?

3. Material und Methoden

3. Material und Methoden

3.1. Patientenkollektiv und Kontrollgruppe

Das Probandenkollektiv besteht aus 80 freiwilligen Mitarbeitern des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH und freiwilligen Studenten der Justus-Liebig-Universität Gießen. Nachdem das Votum der Ethikkommission vorlag, erhielten alle Probanden eine schriftliche Aufklärung. Alle haben eine Einverständniserklärung unterzeichnet, dass sie der Blutentnahme und der weiteren, anonymisierten Verarbeitung ihrer Daten zustimmten (s. Anhang). In die Studie wurden 54 Raucher (27 Männer, 27 Frauen) und 26 Kontrollpersonen (8 Männer, 18 Frauen) eingeschlossen. Das Alter der Probanden lag im Median bei 27 Jahren mit einer Spannweite von 16 bis 76 Jahren und einem Mittelwert von 32 Jahren. Der Raucherstatus wurde zum einem kumulativ in Form von Packungsjahren und zum anderen aktuell als täglicher Zigarettenkonsum ermittelt. Ein Packungsjahr entspricht dem Rauchen von 20 Zigaretten täglich über die Dauer eines Jahres. Das aktuelle Rauchverhalten der Probanden wird anhand der angegebenen Anzahl täglich gerauchter Zigaretten ermittelt. Wegen des unterschiedlichen Rauchverhalten wurden zur weiteren Stratifizierung 4 Gruppen gebildet. Zur Gruppe 1 zählen „Genussraucher“ mit 1-7 Zigaretten pro Tag, zur Gruppe 2 mittelstarke Raucher mit 8-13 Zigaretten pro Tag, zur Gruppe 3 starke Raucher mit 14-20 Zigaretten pro Tag und zur Gruppe 4 extrem starke Raucher mit mehr als 20 Zigaretten pro Tag. Diese Angaben geben ergänzend zu den Packungsjahren als kumulative Dosis genaue Informationen über das aktuelle Rauchverhalten, das für die Studie von besonderer Bedeutung ist.

Als Einschlusskriterium galten gesunde

- Raucher und
- Nie-Raucher

Als Ausschlusskriterien wurden festgelegt

- Ex-Raucher
- Personen mit klinisch relevanten Erkrankungen

3. Material und Methoden

3.2. Geräte und Materialien

Geräte

-20°C Gefrierschrank:	Bosch GmbH, Stuttgart
-80°C Gefrierschrank:	Bosch GmbH, Stuttgart
4°C Kühlschrank:	Bosch GmbH, Stuttgart
Alpha DigiDoc:	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Tuttnauer Tischautoklav 2540 EL :	Systemec GmbH Labor-Systemtechnik, Wellenberg
BioPhotometer :	Eppendorf AG; Hamburg
Digitalkamera:	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Elektrophoresenkammer:	Febikon Labortechnik GmbH, Wermelskirchen
Eismaschine (Scotsman® AF 10):	K.B. Catering Ltd, Suffolk, UK
Light Cycler:	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Mastercycler:	Eppendorf AG; Hamburg
Netzgerät Consort E835:	Consort, Tumhout, Belgium
Pipetten:	Gilson Inc., Middleton, USA
Thermoblock:	HCL, Bovenden
Tischzentrifuge:	Hettich, Tuttlingen
Vortexer:	Heidolph, Schwalbach
Waage:	Mettler-Toledo GmbH, Greifensee, Schweiz
Zentrifuge:	Hettich, Tuttlingen

Verbrauchsmaterialien

50ml Falcon® Tubes:	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Butterfly-Kanüle (21 G):	Kabe Labortechnik, Nümbrecht- Elsenroth
Einmalhandschuhe:	NOBA Verbandmittel Danz GmbH u. Co KG, Wetter
Einmalpipetten 10ml:	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Light Cycler Kapillaren:	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim

3. Material und Methoden

Light Cycler Zentrifugen-Adapter:	Roche Diagnostic GmbH, Mannheim
Pipettenspitzen:	Genra Systems, Minneapolis, USA
Reaktionsgefäße:	Eppendorf AG; Hamburg
UV-Küvetten:	Eppendorf AG; Hamburg

Zusammensetzung verwendeter Lösungen

10x PBS (Phosphate buffered saline) (1L):	80,0g NaCl (1,45 M) 2,0g KCl (27 mM) 14,3g Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O (80mM) 2,0g KH ₂ PO ₄ (15mM)
0,1M DTT (Dithio Threitol):	1,5g DTT ad 100 ml H ₂ O

Reagenzien

100 Base-Pair Ladder:	Amersham Bioscience, Buckinghamshire, UK
Absolute™ QPCR SYBR Green Capillary Mixes:	Abgene , Hamburg
Borsäure:	Merck, Darmstadt
Chloroform:	Seelze GmbH, Seelze
dNTP Mix:	Fermentas GmbH, St-Leon-Rot
DTT (Dithio Threitol):	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA (Ethyldiamintetraacetat):	Merck, Darmstadt
Ethanol:	Seelze GmbH, Seelze
Ficoll-Paque® PLUS:	GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden
Hotstar Taq® Plus:	Qiagen GmbH, Hilden
Isopropanol:	Seelze GmbH, Seelze
KCl (Kaliumchlorid):	Merck, Darmstadt
KH ₂ PO ₄ (Kaliumhydrogenphosphat):	Merck, Darmstadt
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid):	Qiagen GmbH, Hilden
NaCl (Natriumchlorid):	Merck, Darmstadt
NaAc (Natriumacetat) :	Merck, Darmstadt

3. Material und Methoden

Na ₂ HPO ₄ (Natriumhydrogenphosphat):	Merck, Darmstadt
NuSieve [®] GTG Agarose :	Cambrex Bio Science Rockland, Maine, USA
Oligo-dT-Primer:	Promega, Frankfurt
PCR Buffer 10x:	Qiagen GmbH, Hilden
PCR-Primer (qualitative PCR):	
CYP1B1	TIB Molbiol, Berlin
CYP2E1	TIB Molbiol, Berlin
β-Aktin	Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA
PCR-Sonden:	TIB Molbiol, Berlin
PCR-Primer (quantitative PCR):	
CYP1B1	MWG-Biotech AG, Ebersberg
CYP2E1	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Phenol:	Sigma-Aldrich, Steinheim
RNAasin:	Promega, Frankfurt
SYBR Safe:	Invitrogen Molecular Probes, Oregon, USA
TRIS:	Roth, Karlsruhe
TRI Reagent [®] :	Sigma-Aldrich, Steinheim
Q-Solution:	Qiagen GmbH, Hilden

Kits

Versagene [™] DNA Purification Kit	Genra Systems, Minneapolis, USA
Light Cycler-Kit: FastStart DNA Master Hybridization Probes	Roche, Mannheim
RNAse-Free DNase SET (DNase & enzymespezifischer RDD Puffer)	Qiagen GmbH, Hilden
AMV Reverse Transcriptase & AMV Reverse Transcriptase Reaktionspuffer:	Promega, Frankfurt

Software

Statistiksoftware SPSS 15.0	SPSS Inc., Chicago, IL, USA
-----------------------------	-----------------------------

3. Material und Methoden

3.3. Untersuchungen

3.3.1. Isolierung der DNA

Für die DNA-Extraktion wurden 3,5ml venöses Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Blut verwendet. Das Blut wurde mit dem Versagene™ DNA-Isolierungs-Kit nach Herstellerangaben behandelt. Zunächst werden 3 ml EDTA-Blut zur Lyse der Erythrozyten mit RBC-Lysis-Solution in ein Reaktionsgefäß gegeben. Die Inkubationszeit beträgt 10 Minuten (min) bei Raumtemperatur. Anschließend wird 1 min bei 2000 Runden pro Minute (rpm) zentrifugiert. Die Leukozyten setzen sich als Pellet ab. Nach Verwerfen des Überstands wird der oben beschriebene Vorgang wiederholt. Das gewonnene Pellet wird anschließend in 400 µl Lösungspuffer gelöst. Nach Zugabe von 700 µl im Kit enthaltenem Bindepuffer kann die Lösung auf die sogenannte Purification-Säule aufgetragen werden. Der Bindepuffer ist nötig, um die DNA in der Membran der Säule zu fixieren. Nachdem das Gemisch für 1 min bei 7000 rpm zentrifugiert wurde, wird das Filtrat verworfen. Nach Zugabe von 200 µl der im Kit enthaltenen Wasch-Lösung werden alle Bestandteile des Lysats mit Ausnahme der DNA durch 2 min Zentrifugieren bei 13.000 rpm aus der Membran gewaschen. Zum Lösen der DNA wird zunächst die Säule in ein neues Reagenzgefäß gebracht. Anschließend werden 100 µl im Kit enthaltene Elutions-Lösung auf die Membran gegeben. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min und Zentrifugation (1 min bei 13.000 rpm) kann die gewonnene DNA bei -20°C gelagert werden.

3.3.2. Isolierung der Gesamt-RNA

Die vorliegende Methode wurde von Helmig et al. dargestellt (Helmig et al. 2009b). Zunächst wurden die Lymphozyten mittels Gradiententrennung aus 10ml EDTA-Blut isoliert. Das mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (1xPBS-Puffer) in einem Verhältnis von 1:1 verdünnte Blut wurde vorsichtig auf einen Sucrosegradienten (20 ml *Ficoll-Paque®PLUS*) geschichtet. Dessen Dichte (1,077g/ml) ist so eingestellt, dass Erythrozytenaggregate und tote Zellen in die Ficollschicht passieren, während Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten sich in der Interphase ansammeln. Die peripheren mononukleären Zellen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten, Natural Killer (NK)-Zellen, Thrombozyten) wurden anschließend von Erythrozyten, Thrombozyten und toten Zellen durch isopyknische Zentrifugation bei 1.000 rpm über 30 min bei 4°C ohne Bremse getrennt. Nach Zentrifugation wurde die lymphozytenhaltige Interphase

3. Material und Methoden

abgenommen und zweimal mit PBS-Puffer bei 1000 rpm für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Isolierung der RNA aus den Lymphozyten mit *TRI Reagent*[®]. Mit diesem Reagenz lassen sich RNA, DNA und Proteine gleichzeitig aus Zellen extrahieren. *TRI Reagent*[®] enthält Guanidiniumisothiocyanat (GITC), welches durch seinen chaotropen Charakter die Zellen lysiert und gleichzeitig RNAsen und sonstige Enzyme deaktiviert. Zusätzlich enthält *TRI Reagent*[®] Phenol, in dem sich DNA und Proteine lösen. Nach Zugabe von 500 µl *TRI Reagent*[®] und 200 µl Chloroform und anschließender Zentrifugation von 15 min bei 14.000 rpm trennt sich das Gemisch in drei Phasen auf. Die RNA ist in der oberen wässrigen Phase enthalten, die genomische DNA in der unteren organischen und in der Interphase. Die Proteine befinden sich in der organischen Phase. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorf Reagenzgefäß gegeben und nach Zugabe von 500 µl Isoamylalkohol/Chloroform (1:100) bei 14.000 rpm für 15 min zentrifugiert. Anschließend wurde die wässrige Phase erneut in ein neues Eppendorf Reagenzgefäß gegeben und die RNA durch Zugabe von Isopropanol in einem Verhältnis von 1:1 nach einer Zentrifugation von 30 min bei 14.000 rpm gefällt. Durch anschließendes Waschen mit 500 µl 70%-igem Ethanol für 10 min bei 14.000 rpm werden Salz- und Isopropanolreste entfernt. Nach dem Trocknen wird das RNA-Pellet in 10 µl RNase-freies Wasser gelöst. Auf diese Weise erhält man die Gesamt-RNA.

3.3.3. DNase-Behandlung

Um sicher zu gehen, dass in der gewonnenen RNA keine DNA mehr vorhanden ist, wird eine DNase-Behandlung durchgeführt.

3. Material und Methoden

Zur DNase-Behandlung erfolgte folgender Ansatz im Reagenzgefäß:

- 2 µl DNase (1 Kunitz unit/µl RNase-Free DNase Set)
- 10 µl enzyspezifischer 10x RDD Puffer
- 2 µl RNAsin (40u/µl)
- 10 µl RNA-Probe
- 76 µl RNase-freies Wasser
- 100 µl

Ein „Kunitz-Unit“ entspricht einer Veränderung der optischen Dichte um 0.001 OD/min bei 260 nm.

Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 65°C im Wasserbad wurden noch einmal 2 µl DNase zu dem Gemisch hinzugegeben und anschließend für weitere 10 min inkubiert. Anschließend wird das Gemisch bis auf ein Volumen von 500 µl mit RNase-freiem Wasser aufgefüllt und mit Isoamyl/Chloroform in einem Verhältnis von 1:1 vermischt. Nach der Zentrifugation von 10 min bei 14.000 rpm erfolgt die Fällung mit 1:10 des Volumens Natriumacetat und Isopropanol in einem Verhältnis von 1:1. Das gewonnene RNA-Pellet wurde in 10 µl RNase-freiem Wasser gelöst.

3.3.4. *Photometrische Konzentrationsbestimmung*

Für die photometrische Bestimmung wurden 2 µl RNA-Lösung mit 198 µl H₂O verdünnt und die Extinktion bei λ=260nm (DNA) und λ=280nm (Proteine) gemessen. Ist der Koeffizient kleiner 1,8 bis 2, ist die Präparation mit Protein, genomischer DNA und/oder aromatischen Substanzen (z.B. Phenol) kontaminiert. In diesem Fall sollte die RNA erneut gereinigt werden. Da die optische Dichte (OD) =1 bei 260nm einer RNA-Konzentration von 40ng/µl entspricht, lässt sich die RNA-Konzentration photometrisch wie folgt bestimmen:

$$\text{Konzentration [ng/µl]} = E_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40$$

3.3.5. *Synthese der cDNA*

Um die mRNA aus der Gesamt-RNA zu erhalten, macht man sich den Poly(A)-Schwanz der mRNA zunutze. Die RNA wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) in cDNA umgeschrieben werden. Die erhaltende cDNA kann als Vorlage in einer anschließenden PCR verwendet werden.

3. Material und Methoden

Für die Synthese der cDNA wird zunächst folgender Ansatz pipettiert:

1µg RNA

H₂O ad 5 µl

Nach einer Denaturierung für 10 min bei 60°C werden je 5 µl des folgenden Ansatzes hinzugegeben:

0,2 µl RNAsin (40u/µl)

1,0 µl oligo-(dT) (500µg/ml)

1,0 µl dNTP Mix (25mM)

0,3 µl AMV Enzym Reverse Transcriptase (10u/µl)

2,0 µl AMV Reverse Transcriptase Reaktionspuffer (5X)

0,5 µl DTT (0,1M)

Die Inkubation erfolgt für eine Stunde bei 37°C und 1 min bei 95°C. Zur Lagerung können die Proben bei -20°C eingefroren werden.

3.3.6. Kontroll- PCR und Agarosegelelektrophorese

Um sicher zu stellen, dass sich in den nun gewonnen Proben ausschließlich RNA befindet, wurde zur Qualitätskontrolle eine PCR mit einem β-Aktin-Primer, welcher eine Intron-überspannende Sequenz amplifiziert (s.Tab. 5), durchgeführt. Folglich entstehen Produkte unterschiedlicher Länge für genomische DNA (233bp) und RNA (124bp). Anschließend wird das PCR- Produkt mittels eines 2%igen *Sybr Green* enthaltenen Agarosegels aufgetrennt und durch langwelliges UV-Licht visualisiert. Wenn in der Gelelektrophorese nur die 124bp Bande erscheint, schließen wir daraus, dass die cDNA Synthese erfolgreich war und die von genomischer DNA freie Probe nun für die quantitative PCR verwendet werden kann.

Tab. 5 β-Aktin Primer

	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'	Annealingtemperatur
ACTβ	GGCACCCAGCACAAATGAAGA	ACTCCTGCTTGCTGATCCAC	63°C

3. Material und Methoden

3.4. PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von selektiven DNA-Sequenzen. Ein sogenannter Zyklus gliedert sich grundsätzlich in drei Abschnitte. Er beginnt mit der Denaturierung, in diesem Abschnitt wird der Reaktionsansatz auf 95°C erhitzt, sodass sich die Wasserstoffbrücken zwischen den Doppelsträngen der DNA in zwei Einzelstränge aufspalten. Im nächsten Abschnitt der Primerhybridisierung lagern sich Primer, komplementäre Oligonukleotide, an die entstandene Matrize an. Die Primer-spezifische Temperatur, bei der sich die Primer an die Ausgangs-DNA anlagern, wird als Annealing Temperatur bezeichnet. Im darauf folgenden Abschnitt, der Extension, werden durch Taq-Polymerasen komplementäre Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP) dATP, dGTP, dCTP und dTTP eingesetzt, bis sich ein neuer DNA-Strang bildet. Die Primer bilden dabei den Startpunkt und bleiben als Teil des neuen Stranges bestehen. Dieser letzte Abschnitt findet bei einer Temperatur von 72°C und bei einer Geschwindigkeit von 75 Nukleotiden pro Sekunde von 5' (an der 5'-Position befindet sich ein Kohlenstoffatom) nach 3' (an der 3'-Position befindet sich eine OH-Gruppe) statt. Das bedeutet, dass sich der DNA-Strang pro Sekunde um 75 Nukleotide verlängert.

Die nun entstandene neue DNA wird im nächsten Zyklus ebenfalls als Matrize zur Amplifizierung verwendet, sodass die Vervielfältigung der Ziel-DNA exponentiell ansteigt.

3.4.1. *Quantitative Real-Time Polymerase Kettenreaktion*

Die quantitative Real-Time PCR basiert auf dem Prinzip der qualitativen PCR, und besteht somit ebenfalls aus der Denaturierungs-, Annealing- und Extensions-Phase. Zusätzlich besteht hier die Möglichkeit der Quantifizierung. Es kann zu jedem Zeitpunkt ermittelt werden, wie groß der Anteil der Probenmenge im Ansatz gewesen ist. Um die Quantifizierung visuell am PC mitverfolgen zu können, werden dem Reaktionsansatz DNA interkalierende Farbstoffe hinzugefügt, die spezifisch an das Reaktionsprodukt binden (Higuchi et al. 1993), (Gibson et al. 1996). Die gemessene Fluoreszenz steigt proportional zur PCR-Produktmenge an und wird nach jedem PCR-Zyklus gemessen (Real-Time). Bei unseren Versuchen kam als DNA interkalierender Farbstoff *Sybr Green* zum Einsatz. Es handelt sich dabei um einen Cyanin-Farbstoff, der an doppelsträngige, jedoch nicht an einzelsträngige DNA bindet (Zipper et al. 2004).

3. Material und Methoden

Der typische Verlauf einer Real-Time PCR lässt sich in drei Phasen einteilen:

- 1) frühe oder background Phase
- 2) Log-Phase (exponentieller Wachstum)
- 3) Plateau-Phase

In der ersten Phase dominieren Hintergrundsignale, die dann von den spezifischen PCR-Amplifikaten übertroffen werden. Diese Stelle wird als Threshold Cycle (CT) bezeichnet und stellt den Beginn der zweiten Phase dar. Er kann auf dem Monitor als steiler Anstieg der Menge an amplifiziertem Produkt verfolgt werden. Im weiteren Verlauf der PCR nimmt die Rate der Vervielfältigung soweit ab, dass es zu einer Plateau-Phase kommt und nur noch ein kleiner, bzw. gar kein Anstieg von Ziel-Substanz zu verzeichnen ist. Die Gründe dafür liegen unter anderem in der thermischen Deaktivierung und abnehmender Konzentration der DNA-Polymerase oder im Verbrauch von Reaktionssubstraten (Kainz 2000).

3.4.1.1. Relative Quantifizierung

Es stehen zwei generelle Quantifizierungsstrategien in der Real-Time PCR zu Verfügung, die absolute und die relative Quantifizierung. In unseren Versuchen kam die relative Quantifizierung zum Einsatz, bei der die Genexpression eines Ziel-Gens auf ein weiteres nicht reguliertes „Housekeeping Gen“ (HKG) bezogen wurde. Dieser Vorgang wird auch Normalisierung genannt. Dabei werden nicht die absoluten Startkopienzahlen oder –konzentrationen bestimmt, sondern die Expression des zu untersuchenden Gens wird auf ein zweites, ubiquitär und homogen exprimiertes HKG bezogen. Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da beispielsweise Fehler in der Real-Time PCR innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Ziel-Gen und das HKG betreffen. Es stehen eine Vielzahl von HKG zur Verfügung. Für die Auswahl eines geeigneten HKG muss seine Expression unter den jeweiligen individuellen experimentellen Bedingungen geprüft werden, da verschiedene Studien gezeigt haben, dass die Expression von HKG aktiv reguliert wird und in unterschiedlichen Zelltypen variieren kann (Giulietti et al. 2001). In dieser Studie wurden als HKG Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) und Beta-2-Mikroglobulin (B2M) verwendet.

3. Material und Methoden

3.4.1.2. $\Delta\Delta\text{CT}$ - Methode

Die Berechnung des Expressionsunterschiedes (Ratio) kann über die sogenannte $\Delta\Delta\text{CT}$ - Methode erfolgen. Der CT (Threshold Cycle) beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt. Im ersten Schritt wurde für jede untersuchte Probe der CT-Wert des HKG vom CT-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert ($\Delta\text{CT} = \text{CT Ziel-Gen} - \text{CT HKG}$). Nach dieser Normierung wird die Differenz zwischen den zu vergleichenden Proben gebildet, der sogenannte $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert. Die relative Expression berechnet sich dann aus $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ (Livak & Schmittgen 2001).

$$\text{CT A}_{\text{GAPDH}} - \text{CT A}_{\text{CYP1B1}} = \Delta\text{CT A} = 0,68$$

$$\text{CT B}_{\text{GAPDH}} - \text{CT B}_{\text{CYP1B1}} = \Delta\text{CT B} = 5,05$$

$$\Delta\text{CT A} - \Delta\text{CT B} = \Delta\Delta\text{CT} = 4,37 \quad 2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = \text{Relative Expression} = 20,7$$

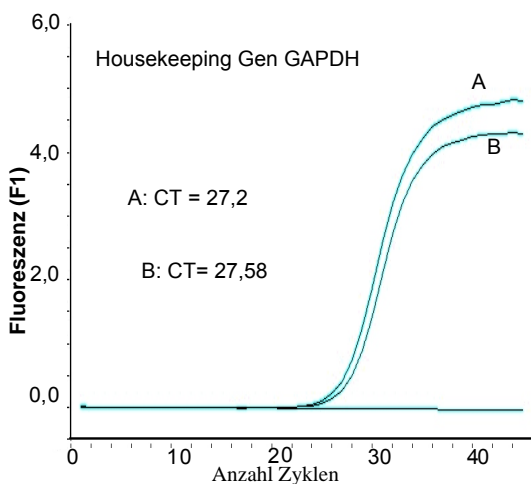


Abb. 8 Relative Expression des House-Keeping Gens GAPDH bei zwei Probanden A bzw. B

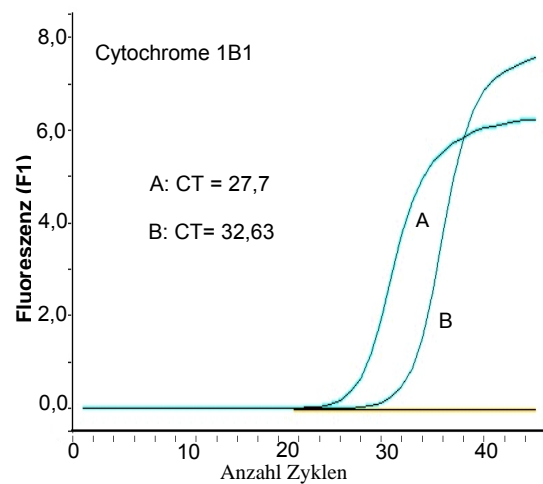


Abb. 9 Relative Expression von CYP1B1 bei zwei Probanden A bzw. B

3. Material und Methoden

3.4.1.3. Erstellung einer Standardkurve

Es wurde von einer cDNA Probe eine Verdünnungsreihe (1:1 bis 1:10000) angefertigt und aus den resultierenden CT-Werten eine Standardkurve erstellt. Dafür wurden die CT-Werte gegen die Konzentration aufgetragen (A und B).

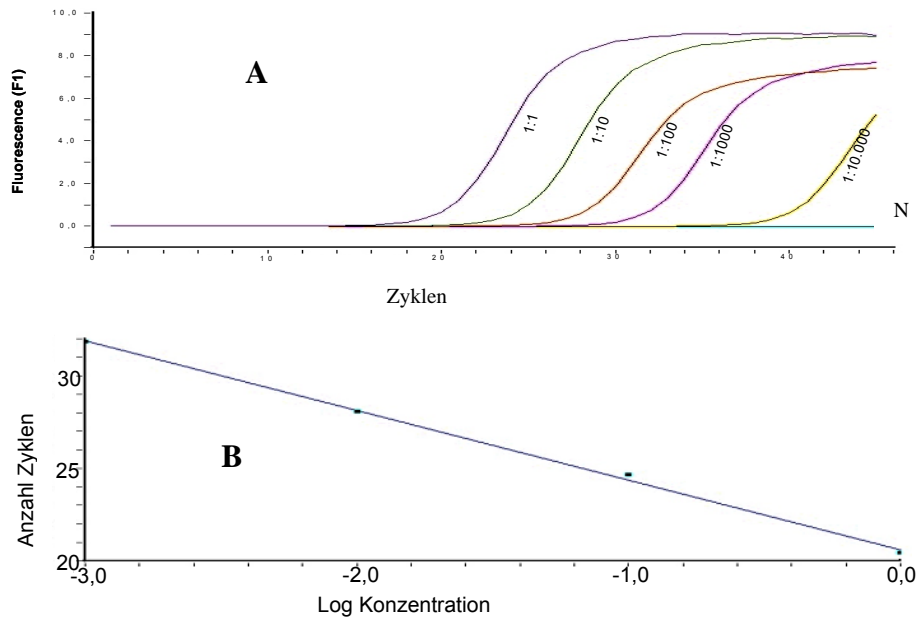


Abb. 10 A/B: Verdünnungsreihe und Standardkurve von CYP1B1

Es wurde eine Verdünnungsreihe einer cDNA mit einer Verdünnung von 1:1 bis 1:10000 angefertigt. A: PCR Verlauf der Verdünnungsreihe, wobei N die Negativkontrolle kennzeichnet. B: Standardkurve von CYP1B1 abgeleitet aus den in A dargestellten Daten. Es ist der Logarithmus (Log) der Konzentration gegen den CT-Wert jeder Probe aufgetragen.

Im Idealfall sollte eine zehnfache Verdünnung eine Erhöhung des CT-Wertes um den Faktor 3,3 ergeben. Die Steigung der Standardkurve wird als Slope bezeichnet, mit der die Effizienz nach folgender Gleichung berechnet werden kann.

$$E = 10^{-1/\text{Slope}}$$

Die Effizienz liegt im Idealfall bei 2, das bedeutet, dass sich pro Zyklus das Produkt um den Faktor 2 vermehrt.

3. Material und Methoden

3.4.1.4. PCR Ansatz und Protokoll zur Quantifizierung der mRNA

Unter sterilen Bedingungen wurde *Absolut™ QPCR SYBR Green Capillary Mix* angesetzt. Das Endvolumen des Ansatzes betrug 20µl/Probe und bestand aus 1x *Absolut™ QPCR SYBR Green Capillary Mix*, HKG-Primer (300nM) bzw. Primer CYP2E1 oder CYP1B1 (600nM) und 2µl cDNA. In jedem Lauf wurde sowohl eine Negativ- als auch eine Positiv-Kontrolle mitgeführt.

Zur Erhöhung der Produktspezifität von CYP1B1 wurde ein Touchdown-Protokoll durchgeführt. Zunächst wurde die Annealingtemperatur schrittweise von 67°C auf 61°C reduziert. Die eigentliche Amplifizierung erfolgte in 45 Zyklen bei 61°C. Abweichend liegt die Annealingtemperatur für CYP2E1 bei 65°C, und wird während der ganzen PCR nicht verändert. Für GAPDH liegt die Annealingtemperatur in 55 Zyklen bei 61°C und für B2M bei 63°C. (detaillierte Protokolle s. Anhang).

Die für die quantitative Real-Time PCR verwendeten Primersequenzen sind in Tab. 6 und Tab. 7 zusammengefasst.

Tab. 6: Primersequenzen der quantitativen PCR für CYP2E1 und CYP1B1

	SP 5'-3'	ASP 5'-3'
CYP2E1 mRNA	CCTACATGGATGCTGTGGTG	TGGGGATGAGGTATCCTCTG
CYP1B1 mRNA	AACCGCAACTTCAGCAACTT	GAGGATAAAGGCGTCCATCA

Tab. 7: Primersequenzen der Housekeeping-Gene

	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
B2M/SH/EX 2	ACTGAATTCACCCCACTGA	CCTCCATGATGATGCTTACA
GAPDH/DE/1	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG

GAPDH = Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

B2M = Beta-2-Mikroglobulin

3.4.2. Qualitative Polymerase-Kettenreaktion

Bei dieser Studie kamen Hybridisierungssonden zum Einsatz. Die Sonden sind Oligonukleotide, die benachbart mit maximal fünf Nukleotide von einander entfernt an die Ziel-DNA binden. Diese Hybridisierungssonden sind mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert (z. B. Fluoreszein, LC Red 640). Die Detektion

3. Material und Methoden

basiert auf dem FRET-Prinzip (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer). Binden die beiden Hybridisierungssonden in räumlicher Nähe der gesuchten Ziel-DNA und regt man gleichzeitig das Fluoreszein der ersten Hybridisierungssonden an, emittiert diese keine Fluoreszenz, sondern überträgt die Energie auf den benachbarten zweiten Fluoreszenzfarbstoff (LC Red 640). Dieser emittiert nun rote Fluoreszenz, deren Intensität in Summe direkt proportional der Menge an Ziel-DNA ist. Die Messung des Signals erfolgt einmal pro Zyklus nach dem Primer Annealing (zu diesem Zeitpunkt sind beide Hybridisation Hybridisierungssonden an die Ziel-DNA gebunden und es erfolgt ein Energietransfer). Ungebundene Hybridisierungssonden geben auf Grund der fehlenden räumlichen Nähe (diffundieren frei in der Lösung) kein Signal ab. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgt durch ein LED über die Spitze der Kapillare, welche als optische Einheit wirkt und die emittierte Fluoreszenz gebündelt nach unten wieder abgibt. Eine Kombination von halbdurchlässigen Spiegeln und wellenlängenspezifischen Filtern leitet die emittierte Fluoreszenzstrahlung zu den drei Photohybriden (530 nm, 640 nm, 710 nm) weiter. Diese wandeln das optische Signal in ein elektrisches Signal um, welches sofort über die serielle Schnittstelle zum PC übermittelt wird. Man kann somit den Verlauf der PCR ohne Zeitverzögerung am Rechner verfolgen und bereits während des PCR - Laufs Aussagen über den Erfolg treffen.

Will man nun mit Hybridisierungssonden Punktmutationen detektieren, nimmt man nach der PCR eine Schmelzkurve auf. Da eine Hybridisierungssonde genau im Bereich der Punktmutation an die Ziel-DNA bindet, schmilzt diese bei Vorhandensein einer Mutation (eine Basenpaarung weniger) bei niedrigerer Temperatur (einige °C) im Vergleich zu einer perfekt passenden Hybridisierungssonden. Handelt es sich um einen Heterozygoten, erhält man zwei Peaks, einen bei niedrigerer Temperatur (Schmelzpunkt des Mutanten) und einen bei höherer Temperatur (Schmelzpunkt des Wildtyps).

3.4.2.1. PCR Ansatz und Protokoll zur Polymorphismenbestimmung

Unter sterilen Bedingungen wurde der *FastStart DNA Master Hybridization Probe-Mix* angesetzt (s. Protokoll). Das Endvolumen des Ansatzes betrug 10µl. In jedem Lauf wurde sowohl eine Negativ- als auch eine Positiv-Kontrolle mitgeführt. Es wurden folgende Enzym polymorphismen untersucht:

3. Material und Methoden

CYP1B1

Die Primer CYP1B1-for und CYP1B1-rev amplifizieren ein 441 Basenpaar langes Fragment des CYP1B1 Gens, welches das 432-Codon beinhaltet. Das Codon 432 beinhaltet wiederum den Polymorphismus **CTG** bzw. **GTG**, die Leucin und Valin codieren. Die fluoreszierende Sonde und die LC-Red640-markierte Sonde binden am Nukleotid 8123-8147 und 8152-8180 (Genbank Nr. U56438). Die zu erwartende Schmelztemperatur für das C-Allel (codiert Leu432) ist daher höher als die Schmelztemperatur für das G-Allel (codiert Val432). Die homozygoten Wildtyp-Proben C/C (CYP1B1*1/*1) ergeben eine einfache Amplitude bei einer Schmelztemperatur von 63,5°C, die homozygoten Mutant-Proben G/G (CYP1B1*3/*3) ergeben eine einfache Amplitude bei einer Schmelztemperatur von 56°C, während die heterozygoten Proben (CYP1B1*1/*3) Anlass zu einer zweigipfligen Amplitude geben. (s. Abb. 11)

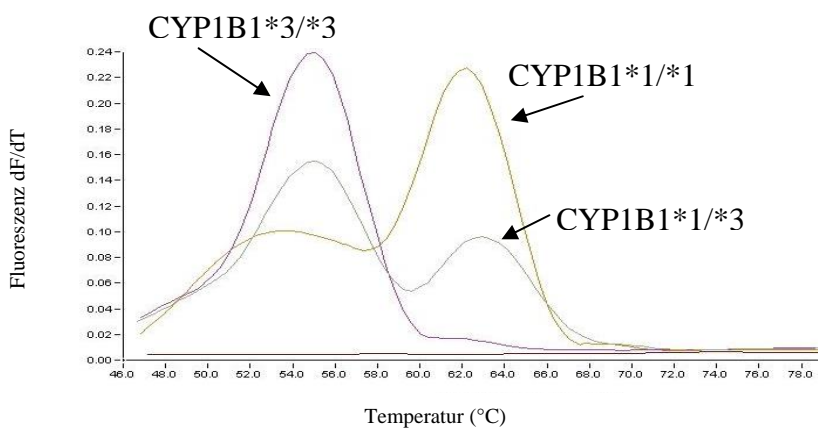


Abb. 11 Darstellung der Schmelzkurve der unterschiedlichen Genotypen für CYP1B1.

Die Annealing Temperatur für CYP1B1 lag in 55 Zyklen bei 59°C. Für die Erstellung der Schmelzkurve wurde die PCR-Temperatur mit einer Temperatur-Steigungs-Rate von 0,1°C/sec langsam von 40°C auf 90°C erhöht (detailliertes PCR Protokoll siehe Anhang).

CYP2E1

Die Primer CYP2E1-for und CYP2E1-rev amplifizieren ein 236 Basenpaar langes Fragment des CYP2E1 Gens, welches den CYP2E1 Polymorphismus C1053T enthält. Bei diesem Polymorphismus handelt es sich um einen Austausch der Nukleinbasen Cytosin gegen Thymin.

3. Material und Methoden

Die fluoreszierende Sonde und die LC-Red640-markierte Sonde binden am Nukleotid 1751-1778 und 1780-1814 (Genbank Nr. J02843). Die zu erwartende Schmelztemperatur für das T-Allel ist höher als die Schmelztemperatur für das C-Allel. Die homozygoten Wildtyp-Proben T/T ($c1/c1$) ergeben eine einfache Amplitude bei einer Schmelztemperatur von 55°C , die homozygoten Mutant-Proben C/C ($c2/c2$) ergeben eine einfache Amplitude bei einer Schmelztemperatur von $47,5^{\circ}\text{C}$, während die heterozygoten Proben ($c1/c2$) Anlass zu einer zwei-gipfligen Amplitude geben (s. Abb. 12).

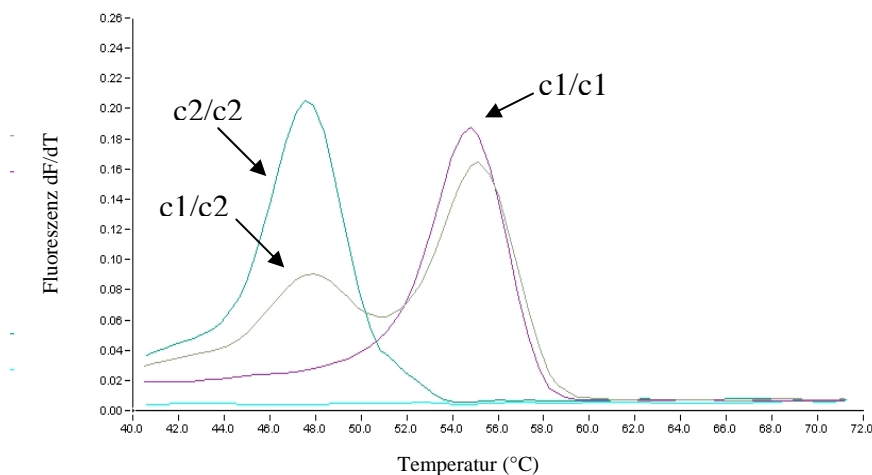


Abb. 12 Darstellung der Schmelzkurve der unterschiedlichen Genotypen für CYP2E1

Die Annealingtemperatur für CYP2E1 lag in 50 Zyklen bei 55°C . Für die Erstellung der Schmelzkurve wurde die PCR-Temperatur mit einer Temperatur-Steigungs-Rate von $0,1^{\circ}\text{C}/\text{sec}$ langsam von 36°C auf 90°C erhöht (detailliertes PCR Protokoll siehe Anhang).

3. Material und Methoden

Bei der Untersuchung der Enzypolymorphismen wurde der Master-Mix nach folgendem Protokoll pipettiert:

Tab. 8 Versuchsprotokoll der qualitativen PCR

	Substanzen					
	for.-Primer [μ M]	rev.-Primer [μ M]	FastStart DNA Master Hybridization Mix (Roche) [μ M]	Sonden [μ M]	DNA [ng]	MgCL [mM]
CYP1B1	0,55	1,1	1,1	0,55	25	3
CYP2E1	0,75	0,75	1	0,5	2	1,2

H₂O ad 10 μ l

Die für die qualitative PCR verwendeten Primer- und Sondensequenzen sind in Tab. 9 bis Tab. 11 zusammengefasst

Tab. 9: Primersequenzen der qualitativen PCR CYP2E1

	SP 5'-3'	ASP 5'-3'
CYP2E1	AGAATGGCATAACTCAAATCC	CAGACCCTCTCCACCTTCTAT

Tab. 10: Primersequenzen der qualitative PCR CYP1B1

	for 5'-3'	rev 5'-3'
CYP1B1	GAAATAAGAATTTTGCTCACTTGC	CTTAGAAAGTTCTTCGCCAATG

Tab. 11: Sondensequenzen

	LC Red-640 5'-3'	FL 5'-3'
CYP2E1	CAACCTATGAATTAAGAACTTCTATATATTGCCAG	TTCATTGTTAATATAAAAGTACAAAATT-FL
CYP1B1	AACTTTGATCCAGCTCGATTCTTGGACAA	ATGACCCACTGAAGTGACCTAACCC-FL

3. Material und Methoden

3.5. Statistische Auswertung

Alle statistischen Analysen wurden mit der Statistiksoftware SPSS 15.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Allel- und Genotypfrequenzen wurden durch direktes Zählen berechnet. Das Hardy-Weinberg Gleichgewicht wurde durch einen χ^2 -Test mit einem Freiheitsgrad ermittelt. Die Ergebnisse werden als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt. Die Mittelwerte in den unterschiedlichen Subpopulationen wurden mit dem Student's t-Test, der univariaten Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von Duncan- und Student-Neumann-Keuls Post hoc Tests sowie dem Mann-Whitney-U-Test analysiert. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4. Ergebnisse

4.1. Kollektivbeschreibung

4.1.1. Beschreibung des Gesamtkollektivs

Das Gesamtkollektiv dieser Studie bestand aus 80 Probanden, 35 Männer und 45 Frauen. Das Durchschnittsalter lag bei 31,4 Jahren (J) mit einer Altersspanne von 16 bis 76 Jahren. Bei den Probanden handelte es sich um 54 Raucher und 26 Nie-Raucher (s. Tab. 12).

Gruppe der Nie-Raucher

Die Gruppe der Nie-Raucher bestand aus 8 Männern und 18 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 28 ($\pm 7,2$) Jahren.

Gruppe der Raucher

Die Gruppe der Raucher bestand aus 27 Männern und 27 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 33,1 ($\pm 15,1$) Jahren.

Bezüglich des aktuellen Rauchverhaltens rauchten 5 Probanden zwischen einer und sieben Zigaretten täglich, 8 Probanden zwischen acht und dreizehn Zigaretten täglich, 34 Probanden zwischen vierzehn und zwanzig Zigaretten täglich und 7 Probanden mehr als zwanzig Zigaretten täglich.

Bezogen auf den kumulativen Rauchkonsum ergab sich ein Mittelwert von 12,9 Packungsjahren (PJ) bei einer Standardabweichung von 18,6 PJ. 48 Probanden hatten einen kumulativen Rauchkonsum von einem bis zwanzig PJ, 4 Probanden hatten einen kumulativen Rauchkonsum von 21 bis 40 PJ und 2 Probanden hatten einen kumulativen Rauchstatus von über 40 PJ.

4. Ergebnisse

Tab. 12 Beschreibung des Kollektivs unter Berücksichtigung des Rauchverhaltens

	Raucher (n = 54)	Nie-Raucher (n = 26)
Geschlecht, n (%)		
Männlich	27 (50,0)	8 (30,76)
Weiblich	27 (50,0)	18 (69,23)
Alter (Jahre)		
Mittelwert (\pm Standardabweichung)	33,1 (\pm 15,1)	28,0 (\pm 7,2)
Median	27	26
Altersspanne	16-76	21-52
Raucherstatus, n (%)		
Aktuelles Rauchverhalten		
1 (1- 7 Zigaretten/ tägl.)	5 (9,3)	-
2 (8- 13 Zigaretten/ tägl.)	8 (14,8)	-
3 (14- 20 Zigaretten/ tägl.)	34 (63,0)	-
4 (>20 Zigaretten/ tägl.)	7 (13,0)	-
Kumulativer Rauchstatus, n (%)		
1-20 Packungsjahre	48 (88,9)	-
21-40 Packungsjahre	4 (7,4)	-
>40 Packungsjahre	2 (3,7)	-
Mittelwert der Packungsjahre (\pm Standardabweichung)	12,9 (\pm 18,6)	

4. Ergebnisse

4.1.2. Der Polymorphismus Cytochrom P450 1B1 L432V

Durch einen Basenaustausch C-G kommt es in Codon 432 zu einem Austausch von Leucin durch Valin.

Bezüglich des Polymorphismus (L432V) im Cytochrom P450 1B1 Gens (CYP1B1) fanden sich im Gesamtkollektiv von 80 Probanden insgesamt n=23 vom homozygoten Wildtypen (CYP1B1*1*1) (davon 10 Männer und 13 Frauen), n=39 Heterozygote (CYP1B1*1*3) (davon 17 Männer und 22 Frauen) und n=18 homozygote Mutanten (CYP1B1*3*3) (davon 8 Männer und 10 Frauen) (s. Tab. 13).

In Bezug auf das Rauchverhalten wurde ebenfalls eine Aufteilung nach Genotypen vorgenommen. Innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher befanden sich 9 Probanden vom homozygoten Wildtyp, 13 heterozygote Probanden und 4 homozygoten Mutanten. Damit betrug die Allelfrequenz bei Nie-Rauchern für den Wildtyp 0,6.

Innerhalb der Gruppe der Raucher befanden sich 14 Probanden vom homozygoten Wildtyp, 26 heterozygote Probanden und 14 homozygoten Mutanten. Damit betrug die Allelfrequenz bei Rauchern für den Wildtyp 0,5.

Tab. 13: Beschreibung des Kollektivs unter Berücksichtigung der Genotypen des Cytochrom P450 1B1

	*1*1	*1*3	*3*3
Genotyp n (% bzgl. Gesamtkollektiv)	23 (28,8)	39 (48,8)	18 (22,5)
Nie-Raucher n (% bzgl. Nie-Raucher)	9 (34,6)	13 (50,0)	4 (15,4)
Raucher n (% bzgl. Raucher)	14 (25,9)	26 (48,1)	14 (25,9)

Die Allelfrequenz wurde nach der folgenden Formel berechnet:

Frequenz wt-Allel *1 (p) = $2WT + H / 2N$

Frequenz mt-Allel *3 (q) = $1-p$

wT = Anzahl homozygoter wt/wt

H = Anzahl Heterozygoter

N = Gesamtzahl der Stichprobe

4. Ergebnisse

4.1.3. Der Polymorphismus Cytochrom 2E1 C1053T

Beim Cytochrom CYP2E1 *RsaI*-Allel handelt es sich um eine Punktmutation an der Stelle 1053, bei der Thymin (Wildtyp) gegen Cytosin (Mutante) ausgetauscht wird. Das Wildtyp tragende Allel wird als c1/c1 bezeichnet, das Polymorphismus tragende Allel wird als c2/c2 bezeichnet.

Bezüglich des Polymorphismus fanden sich im Gesamtkollektiv von 80 Probanden insgesamt n=69 mit den homozygoten Wildtypen (c1/c1) (davon 28 Männer und 41 Frauen), n=11 Heterozygote (c1/c2) (davon 7 Männer und 11 Frauen) und n=0 homozygote Mutanten (c2/c2).

In Bezug auf das Rauchverhalten wurde ebenfalls eine Aufteilung nach Genotypen vorgenommen. Innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher befanden sich 21 Probanden vom homozygoten Wildtyp, 5 heterozygote Probanden und keine homozygoten Mutanten. Damit betrug die Allelfrequenz bei Nie-Rauchern für den Wildtyp 0,9.

Innerhalb der Gruppe der Raucher befanden sich 48 Probanden vom homozygoten Wildtyp, 6 heterozygote Probanden und keine homozygoten Mutanten (s. Tab. 14) Damit betrug die Allelfrequenz bei Rauchern für den Wildtyp 0,94.

Tab. 14 Beschreibung des Gesamtkollektivs unter Berücksichtigung der Genotypen

	c1/c1	c1/c2	c2/c2
Genotyp n (% bzgl. Gesamtkollektiv)	69 (86,3)	11 (13,7)	0 (0)
Nie-Raucher n (% bzgl. Nie-Raucher)	21 (80,8)	5 (19,2)	0 (0)
Raucher n (% bzgl. Raucher)	48 (88,8)	6 (11,1)	0 (0)

4. Ergebnisse

4.2. Bestimmung der Genexpression

Nachdem die Genotypen mittels Schmelzkurvenanalyse und die Quantitative Genexpression mittels LightCycler bestimmt wurden, konnte sowohl die Genexpression in Abhängigkeit des Genotypen, als auch in Abhängigkeit vom Rauchstatus der Probanden analysiert werden.

Um die Varianz der Expressionsergebnisse zu reduzieren, wurde die Genexpression zunächst für die Cytochrome 1B1 und 2E1 sowie für die Housekeeping-Gene GAPDH und B2M bestimmt. Zusätzlich wurden die Werte von GAPDH und B2M addiert und daraus ein Mittelwert gebildet (GAPDH / B2M), sodass eine dritte Bezugsquelle für die Bestimmung der relativen Genexpression entstand. Anschließend wurde die Genexpression von jeweils CYP1B1 und 2E1 mit den Bezugswerten der Housekeeping-Gene in Relation gesetzt und somit die relative Expression bestimmt.

Um mögliche Ausreißer aus der Auswertung auszuschließen, wurde für alle Genexpressions-Werte der Mittelwert plus / minus die doppelte Standardabweichung errechnet. Alle Werte, die innerhalb dieser Spanne lagen, wurden in die Auswertung einbezogen.

4.2.1. Cytochrom P450 1B1

4.2.1.1. Vergleich der Genexpression des Cytochrom P450 1B1 Gens bei Nie-Rauchern und Rauchern

Mit dem Vergleich der Genexpression des Cytochroms P450 1B1 Gen bei Nie-Rauchern und Rauchern soll der Einfluss vom Tabakrauch auf die Genexpression ermittelt werden. Hierfür wurde die Genexpression in einer Gruppe von Nie-Raucher und Rauchern bestimmt. Zum einen wurde die Genexpression in Relation zu dem Housekeeping-Gen B2M und zum anderen zu dem Housekeeping-Gen GAPDH ermittelt. Um eventuelle individuelle Schwankungen der einzelnen Housekeeping-Gen auszugleichen, wurde als dritte Bezugsquelle der Mittelwert aus beiden Housekeeping-Genen verwendet. Daher sind die folgenden Auswertungen immer in Relation zu den drei Bezugsquellen (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH) angegeben.

Entgegen der Erwartung war die relative Genexpression von CYP1B1 für die Gruppe der Nie-Raucher höher als in der Gruppe der Raucher. Am deutlichsten kam dieses Ergebnis in der Auswertungsgruppe zur errechneten Bezugsquelle der Mittelwert aus beiden Housekeeping-Genen B2M/GAPDH zur Geltung. Hier war die Genexpression

4. Ergebnisse

um den Faktor 9,68 (968%) erhöht. In den anderen beiden Auswertungsgruppen konnte diese Tendenz bestätigt werden, jedoch war keines dieser Ergebnisse signifikant (Abb. 13).

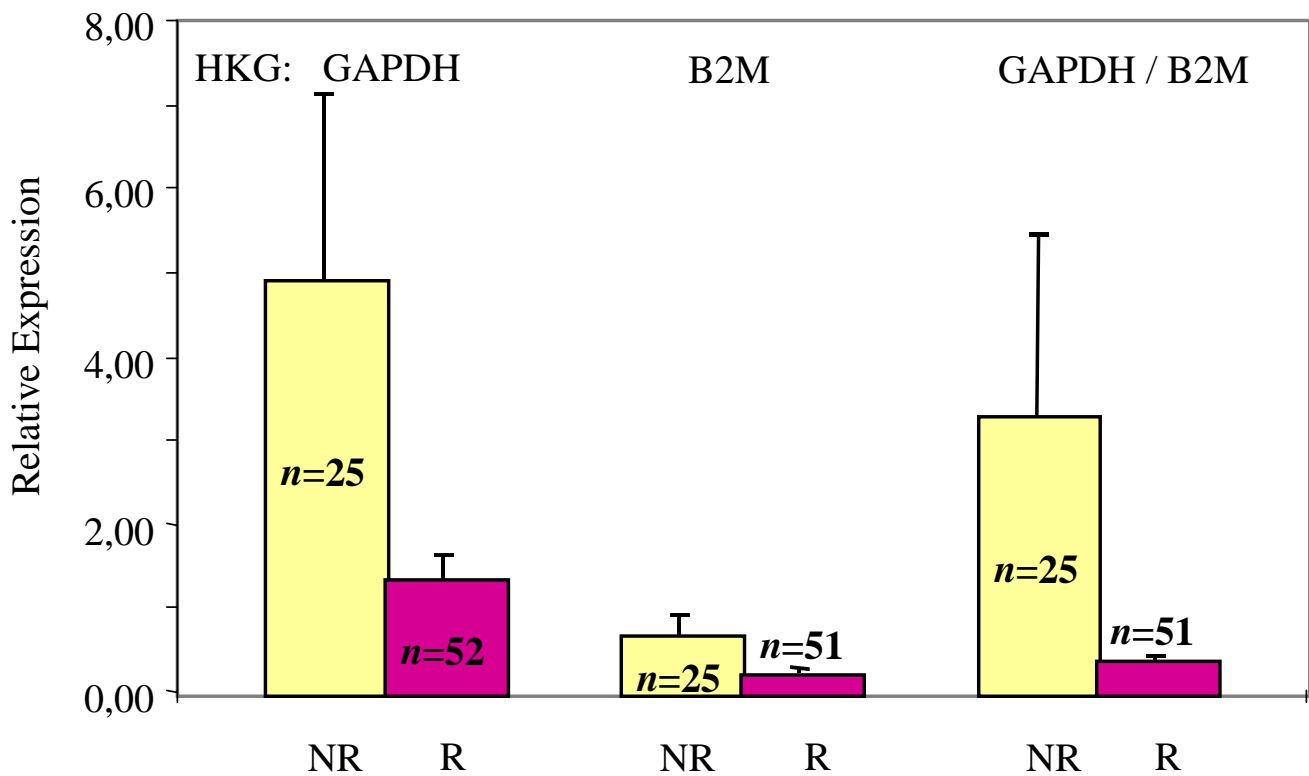


Abb. 13 Dargestellt ist die relative Genexpression von CYP1B1 in der Gruppe der Nie-Raucher (NR) und in der Gruppe der Rauchern (R) bezogen auf die Housekeeping-Gene = HKG (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung.

4. Ergebnisse

4.2.1.2. Vergleich der Genexpression des Cytochrom 1B1 Gens bei den homozygoten Genotypen *1*1 und *3*3 des Polymorphismus L432V

Es soll überprüft werden, ob der Genpolymorphismus L432V einen Einfluss auf die Genexpression des CYP1B1 Gens hat. Hierfür wurde die Genexpression von CYP1B1 der beiden homozygoten Genotypgruppen (*1*1 und *3*3) miteinander verglichen. Wenn der Polymorphismus einen Einfluss auf die Expression des CYP1B1 Gens hat, sollten sich die beiden homozygoten Genotypgruppen hinsichtlich der quantitativen mRNA Expression deutlich voneinander unterscheiden.

Die relative Expression wurde für den homozygoten Genotypen *1*1 (Leucin/Leucin) und den homozygoten Genotypen *3*3 (Valin/Valin) ermittelt. Im Weiteren wird der homozygoten Genotypen *1*1 (Leucin/Leucin) als PM1 und der homozygoten Genotypen *3*3 (Valin/Valin) als PM3 bezeichnet.

Die Auswertung erfolgte, wie oben, beschrieben in Relation zu den Housekeeping-Genen (HKG) als Bezugsquellen (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH).

Dabei stellte sich heraus, dass die relative Genexpression bei den Probanden mit dem Genotyp PM1 wesentlich höher lag als bei Probanden mit dem Genotyp PM3. Am deutlichsten kam dieses Ergebnis in Bezug auf das Housekeeping-Gen B2M zur Geltung. Hier war die relative Expression in der Genotypgruppe PM1 um den Faktor 9,83, bzw. um 983 % ($p=0,055$) höher im Vergleich zu der Genotypgruppe PM3. Auch im Vergleich mit den anderen Bezugsquellen GAPDH und B2M/GAPDH konnte dieses Ergebnis bestätigt werden (s. Abb. 14).

4. Ergebnisse

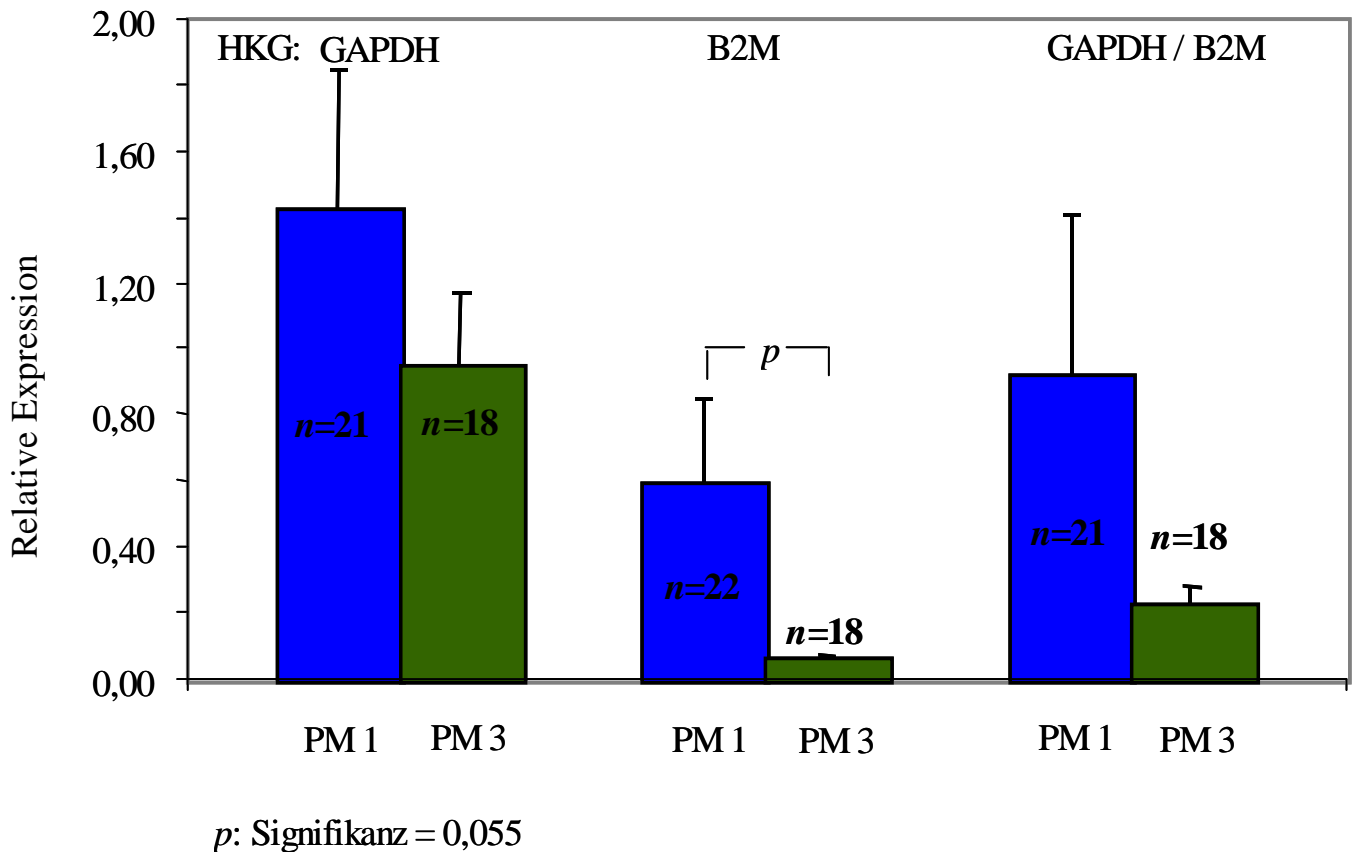


Abb. 14 Dargestellt ist die relative Genexpression von CYP1B1 bei den homozygoten Genotypen *1*1 (PM1) und *3*3 (PM3) des Polymorphismus L432V bezogen auf die Housekeeping-Gene = HKG (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung.

4.2.1.3. Vergleich der Genexpression des Cytochrom 1B1 Gens innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher unter Berücksichtigung der Genotypen

Da bisher sowohl ein Einfluss von Tabakrauch sowie ein Einfluss des Genpolymorphismus L432V auf die Genexpression von CYP1B1 nachgewiesen werden konnte, soll im Folgenden der Einfluss des Polymorphismus genauer untersucht werden. Hierfür wird die Genexpression der beiden homozygoten Genotypgruppen (PM1 und PM3) innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher miteinander verglichen.

Wie bereits in der Gesamtstichprobe war die relative Genexpression der Probanden mit dem Genotyp PM1 auch innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher höher als die der Probanden mit dem Genotyp PM3.

4. Ergebnisse

Am deutlichsten kam dieses Ergebnis in bezug auf das Housekeeping-Gen B2M zur Geltung. Probanden mit dem Genotyp PM1 hatten durchschnittlich ein um den Faktor 20,75, bzw. um 2075 % ($p=0,235$) höhere Genexpression als Probanden mit dem Genotyp PM3. Auch hier konnte im Vergleich mit den anderen Bezugsquellen GAPDH und B2M/GAPDH dieses Ergebnis bestätigt werden. Das Ergebnis war allerdings nicht signifikant (s. Abb. 15).

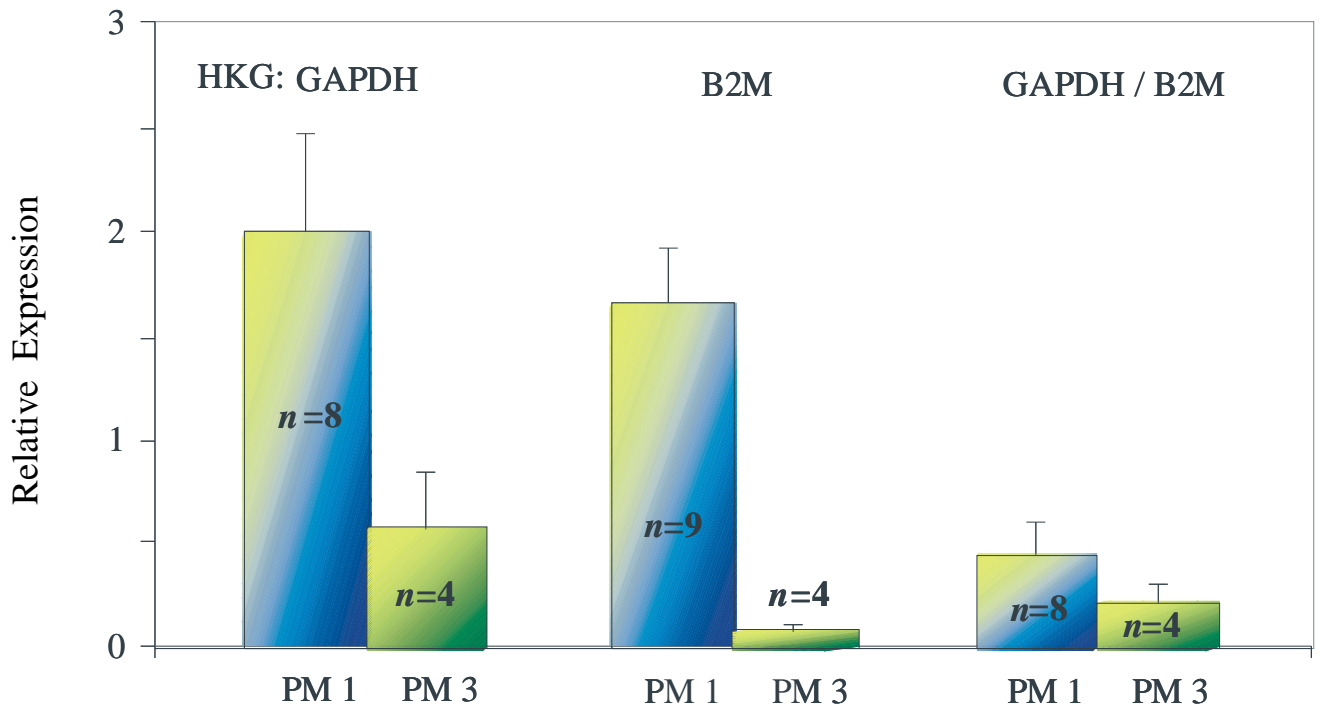


Abb. 15 Dargestellt ist die relative Genexpression von CYP1B1 bei den homozygoten Genotypen *1*1 (PM1) und *3*3 (PM3) des Polymorphismus L432V bezogen auf die Housekeeping-Gene (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH) innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung.

4.2.1.4. Vergleich der Genexpression des Cytochrom 1B1 innerhalb der Gruppe der Raucher unter Berücksichtigung der Genotypen

Wie bereits in der Gruppe der Nie-Raucher soll der Einfluss des Polymorphismus auf die Genexpression von CYP1B1 auch innerhalb der Gruppe der Raucher genauer untersucht werden. Hierfür wurde die Genexpression der beiden homozygoten

4. Ergebnisse

Genotypgruppen (PM1 und PM2) innerhalb der Gruppe der Raucher miteinander verglichen. Wie in der Gruppe der Raucher war die relative Expression der Probanden mit PM1 auch innerhalb der Gruppe der Raucher höher als die der Probanden mit PM3. Am deutlichsten kam dieses Ergebnis bezogen auf GAPDH/B2M zur Geltung. Probanden mit dem Genotyp PM1 hatten durchschnittlich eine um den Faktor 7,45, bzw. um 745 % ($p=0,11$) höhere Genexpression als Probanden mit dem Genotyp PM3. In den anderen beiden Auswertungsgruppen konnte diese Tendenz bestätigt werden, jedoch war keines dieser Ergebnisse signifikant (s. Abb. 16).

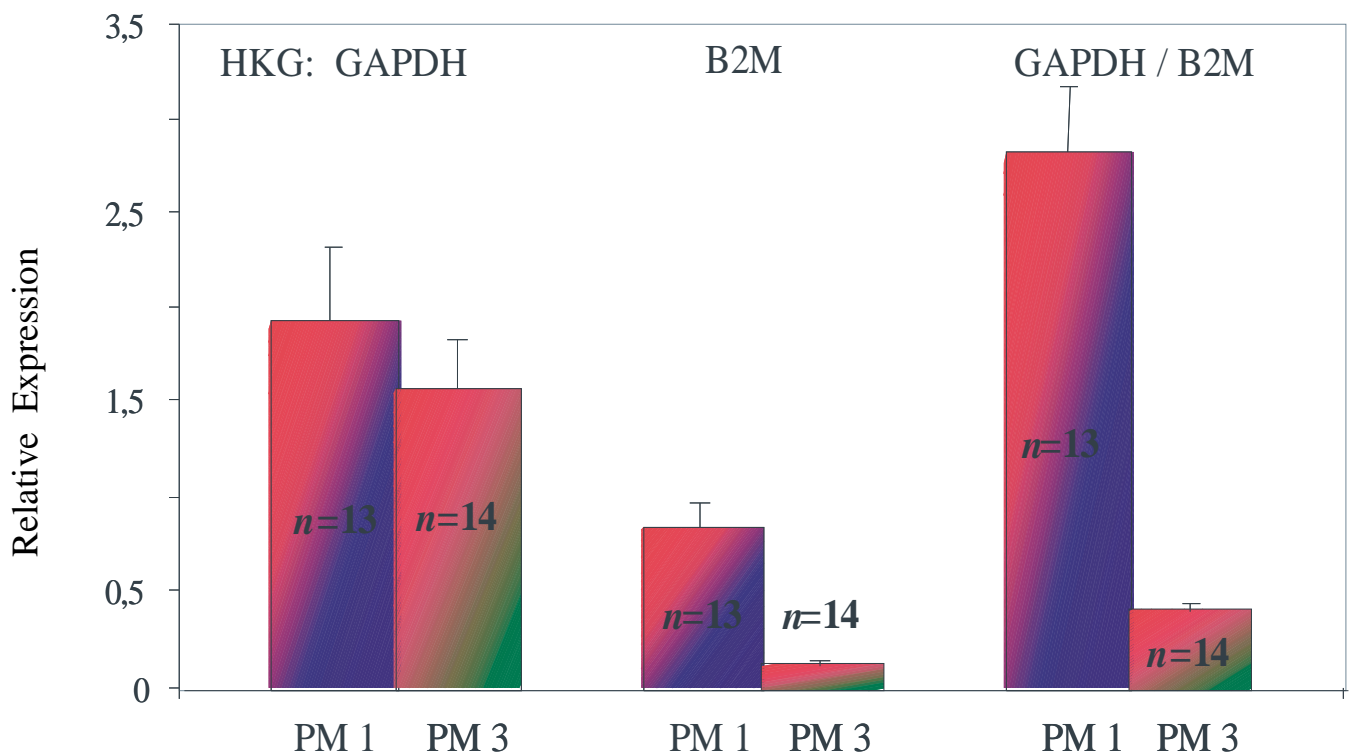


Abb. 16 Dargestellt ist die relative Genexpression von CYP1B1 bei den homozygoten Genotypen *1*1 (PM1) und *3*3 (PM3) des Polymorphismus L432V bezogen auf die Housekeeping-Gene (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH) innerhalb der Gruppe der Raucher. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung.

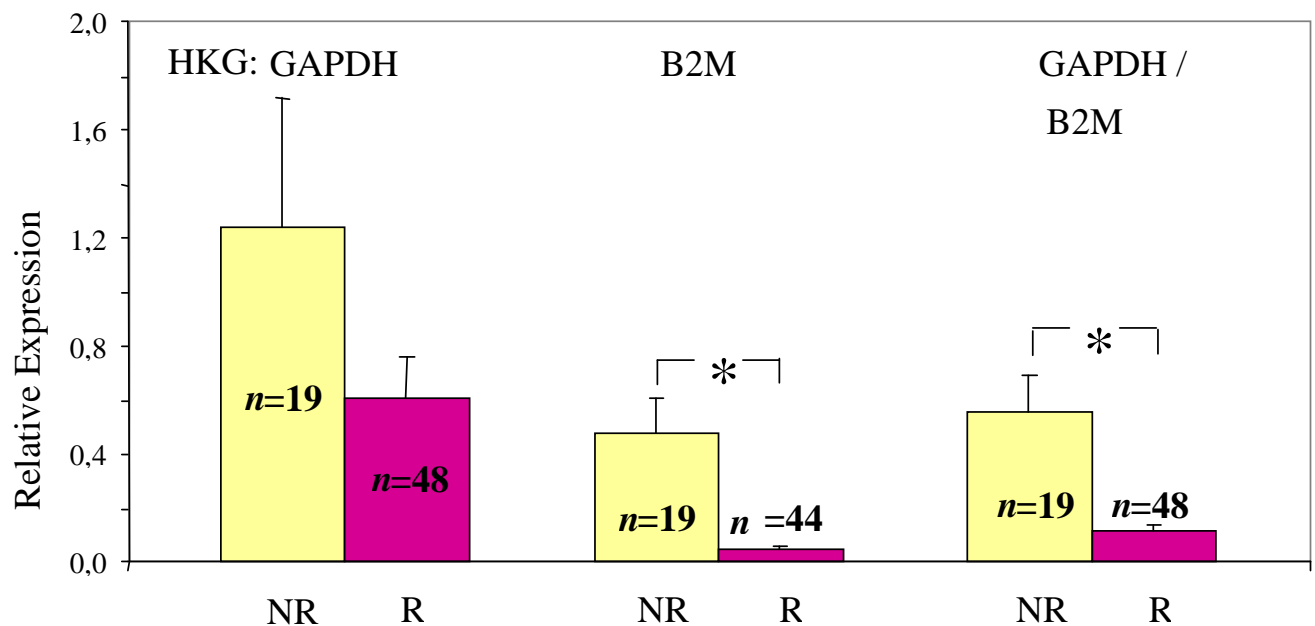
4. Ergebnisse

4.2.2. Cytochrom P450 2E1

4.2.2.1. Vergleich der Genexpression des Cytochroms 2E1 bei Nie-Rauchern und Rauchern

Entsprechend der Untersuchungen für CYP1B1 sollte mit dem Vergleich der Genexpression des Cytochroms 2E1 Gen bei Nie-Rauchern und Rauchern ebenfalls der Einfluss vom Tabakrauch auf die Genexpression ermittelt werden.

Auch hier war die relative Genexpression von CYP2E1 entgegen der Erwartung in der Gruppe der Nie-Raucher höher als in der Gruppe der Raucher. Am deutlichsten kam dieses Ergebnis gegenüber B2M zur Geltung. Bei diesem signifikanten Ergebnis ist die Genexpression um den Faktor 9,06, bzw. um 906 % ($p=0,006$) erhöht. In den anderen beiden Auswertungsgruppen konnte diese Tendenz bestätigt werden, wobei auch in bezug auf GAPDH/B2M ein signifikantes Ergebnis erzielt werden konnte (s. Abb. 17).



*= $p<0,05$

Abb. 17 Dargestellt ist die Relative Genexpression von Cytochroms in der Gruppe der Nie-Raucher (NR) und in der Gruppe der Raucher (R) bezogen auf die Housekeeping-Gene (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung.

4. Ergebnisse

4.2.2.2. Vergleich der Genexpression des Cytochrom 2E1 bei den Genotypen c1/c1 und c1/c3 und des Polymorphismus C1053T

Es soll überprüft werden, ob der Genpolymorphismus C1053T (RsaI) einen Einfluss auf die Genexpression des CYP2E1 Gens hat. Für diesen Polymorphismus konnten in der untersuchten Stichprobe keine homozygote Mutanten (c2/c2) ermittelt werden. Daher wurde im Folgenden die CYP2E1 Genexpression der homozygoten Genotypen (c1/c1) mit der CYP2E1 Genexpression der heterozygoten Gruppe (c1/c2) verglichen.

Im Weiteren wird der homozygote Genotype c1/c1 als PM1 und der heterozygote Genotyp c1/c2 als PM2 bezeichnet. Für die beschriebenen Gruppen wurde jeweils die relative Genexpression ermittelt. Die Auswertung erfolgte auch hier immer in Relation zu den Housekeeping-Genen B2M, GAPDH und B2M/GAPDH.

Es stellte sich heraus, dass die relative Expression der heterozygoten Genotypgruppe PM2 höher lag als die relative Expression der homozygoten Genotypgruppe PM1. Im Vergleich zu GAPDH war das Ergebnis am deutlichsten zu erkennen. Hier lag die relative Expression von PM2 um den Faktor 4,52, bzw. um 452 % ($p=0,087$) höher als für PM1. In den beiden anderen Auswertungsgruppen ist diese Tendenz nur noch schwach erkennbar. Keines der Ergebnisse erzielte Signifikanz (s. Abb. 18).

4. Ergebnisse

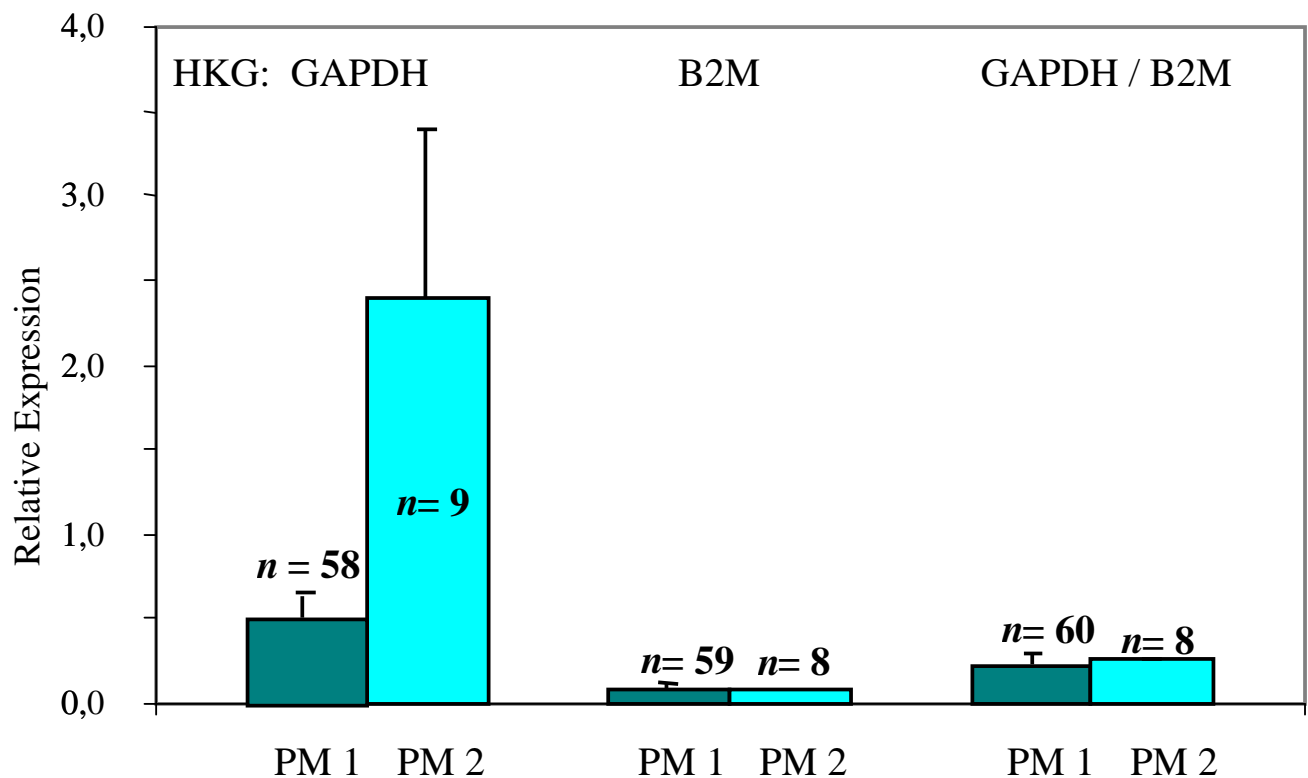


Abb. 18 Dargestellt ist die relative Genexpression von CYP2E1 bei den homozygoten Genotypen *c1/c1* (PM1) und den heterozygoten Genotypen *c1/c2* (PM2) des Polymorphismus C1053T bezogen auf die Housekeeping-Gene (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH). Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung

4.2.2.3. Vergleich der Genexpression des CYP2E1 innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher unter Berücksichtigung der Genotypen

Entsprechend den CYP1B1 Auswertungen wurde auch für das CYP2E1 Gen der Einfluss des Polymorphismus genauer untersucht. Hierfür wurde die Genexpression der beiden Genotypgruppen innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher miteinander verglichen. Wie bereits in der Gesamtstichprobe war die relative Expression der Probanden mit dem Genotyp PM2 auch innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher höher als die der Probanden mit dem Genotyp PM1.

Am deutlichsten kam dieses Ergebnis im Vergleich zu GAPDH zur Geltung. Probanden mit dem heterozygoten Genotyp PM2 hatten durchschnittlich eine um den Faktor 7,31, bzw. um 731 % ($p=0,216$) höhere CYP2E1 Genexpression als Probanden mit dem homozygoten Genotyp PM1. Auch im Vergleich mit den anderen HKGs konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Hier war das Ergebnis ebenfalls ohne Signifikanz (s. Abb. 19).

4. Ergebnisse

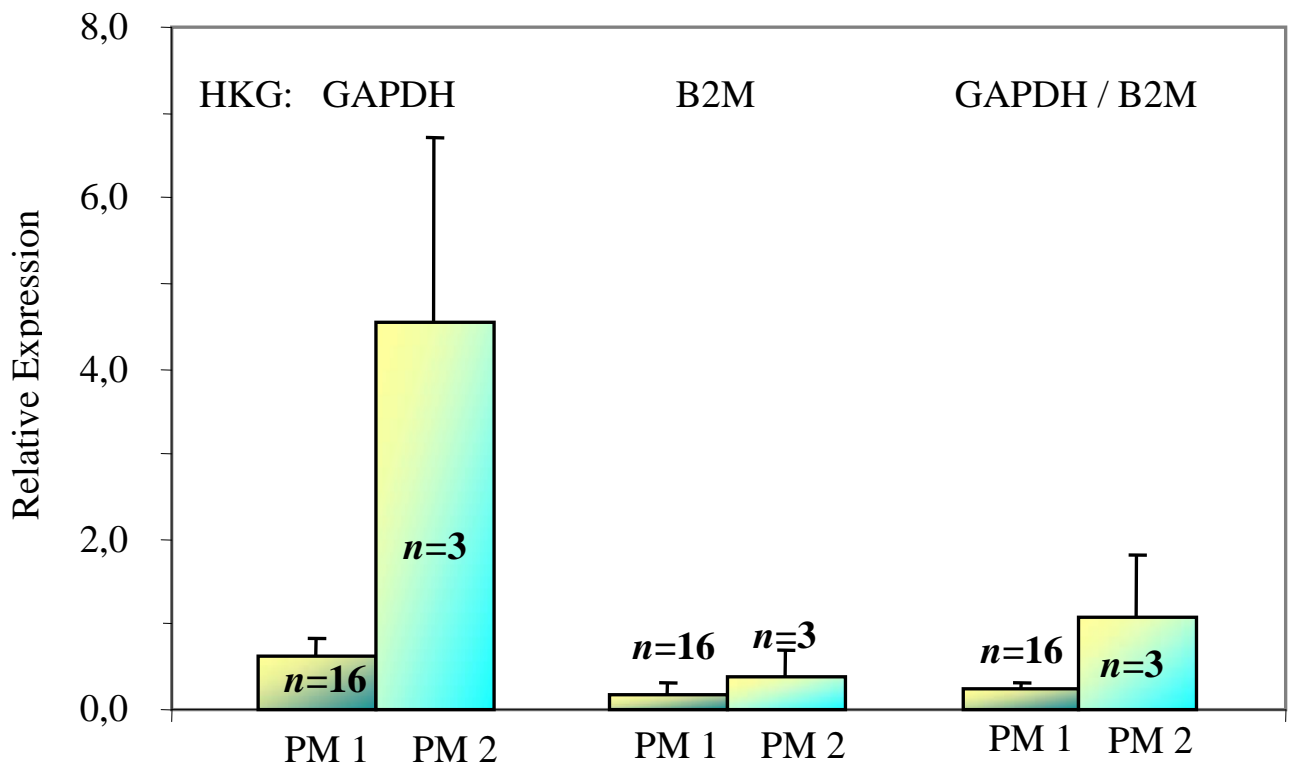


Abb. 19 Dargestellt ist die Relative Genexpression von CYP2E1 bei den homozygoten Genotypen *c1/c1* (PM1) und den heterozygoten Genotypen *c1/c2* (PM2) des Polymorphismus C1053T bezogen auf die Housekeeping-Gene (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH) innerhalb der Gruppe der Nie-Raucher. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung.

4.2.2.4. Vergleich der Genexpression des CYP2E1 innerhalb der Gruppe der Raucher unter Berücksichtigung der Genotypen

Entsprechend der Gruppe der Nie-Raucher soll der Einfluss des Polymorphismus auf die Genexpression auch in der Gruppe der Raucher genauer untersucht werden. Hierfür wurde die Genexpression für den homozygoten Genotypen PM1 und den heterozygoten Genotypen PM2 innerhalb der Gruppe der Raucher miteinander verglichen. Die Tendenz der letzten beiden Auswertungen (s. Abb. 18 und Abb. 19) setzt sich in dieser Untersuchung fort. Auch innerhalb der Gruppe der Raucher ist die relative Genexpression der Genotypgruppe PM2 höher als die relative Genexpression der Genotypgruppe PM1. Das deutlichste Ergebnis lässt sich bezogen auf GAPDH darstellen; hier lag die relative Genexpression der

4. Ergebnisse

Genotypgruppe PM2 um den Faktor 2,66, bzw. um 266 % ($p=0,311$) höher als in der Genotypgruppe für PM1. Mit den beiden anderen Auswertungsgruppen konnte diese Tendenz bestätigt werden, jedoch ohne Signifikanz zu erreichen (s. Abb. 20)

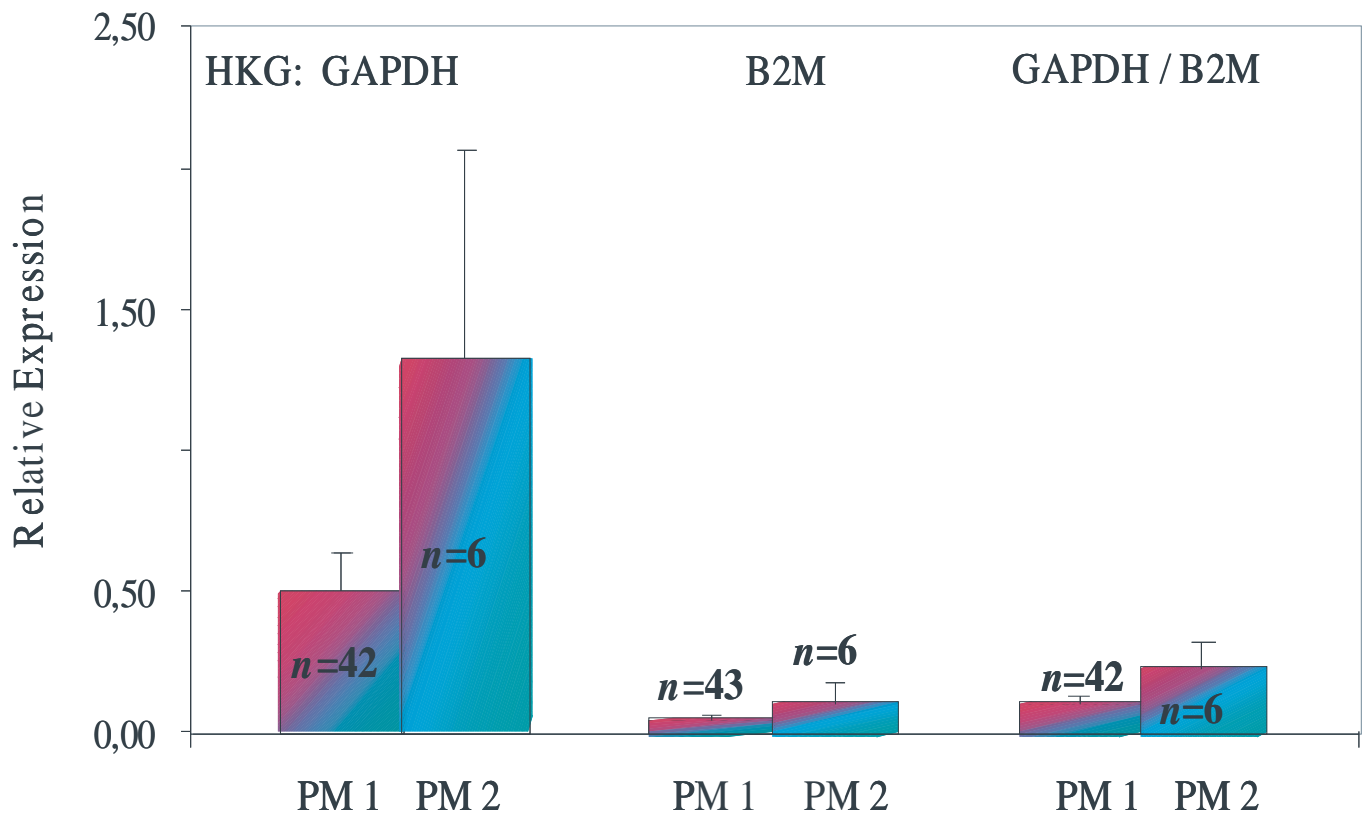


Abb. 20 Dargestellt ist die relative Genexpression von CYP2E1 bei den homozygoten Genotypen $c1/c1$ (PM1) und den heterozygoten Genotypen $c1/c2$ (PM2) des Polymorphismus C1053T bezogen auf die Housekeeping-Gene (B2M, GAPDH, B2M/GAPDH) innerhalb der Gruppe der Raucher. Die Daten zeigen Mittelwert und Standardabweichung.

5. Diskussion

Risikofaktoren für die Lungenkrebserkrankungen stellen Faktoren wie die Konstitution und Disposition, die individuelle Enzymausstattung, Immunabwehr, endokrine Regulation aber auch pulmonale Vorerkrankungen dar. Außerdem zählen zu den Risikofaktoren die Ernährungsgewohnheiten, der Medikamentenverbrauch und schließlich inhalative Noxen, insbesondere am Arbeitsplatz. Die Entstehung und Entwicklung eines malignen Tumors beruht auf dem Zusammenwirken individueller, genetischer und umweltbedingter Faktoren. Neben der spontanen Mutagenese spielen vor allem Umweltfaktoren wie Viren, ionisierende und ultraviolette Strahlung und schließlich chemische Substanzen bei der Kanzerogenese eine Rolle.

Unter den ätiologisch bedeutsamen Risikofaktoren des Lungenkrebses stellt unzweifelhaft das Zigarettenrauchen die wichtigste Ursache dar. Epidemiologische Studien zeigen das Lungenkrebs-Risiko in deutlicher Abhängigkeit von der kumulativ berechneten Anzahl gerauchter Zigaretten. Als Maß wird heute international überwiegend das Zigaretten-Packungsjahr verwendet (= täglicher Konsum von ca. 20 Zigaretten während 365 Tagen eines Jahres). Auch Nie-Raucher unterliegen einem gewissen Lungenkrebs-Risiko aufgrund verschiedener exogener Noxen. Wird das relative Risiko (RR) der Nie-Raucher gleich $RR=1,0$ gesetzt, so lassen sich für Zigarettenraucher in Abhängigkeit von den Packungsjahren klare und signifikante Steigerungen des Lungenkrebs-Risikos aufzeigen. Bei einem kumulativen Zigarettenkonsum von etwa 20 Packungsjahren beträgt das relative Lungenkrebs-Risiko $RR=7,3$, bei 20 bis 40 Packungsjahren $RR=8,3$ und bei Rauchern mit mehr als 40 Packungsjahren $RR=16,2$ (Jöckel et al. 1995). Auch in europaweiten Studien werden vergleichbare Zahlen belegt (Mertens 1997). Hammond et al. (1979) schätzen den prozentualen Anteil der Erkrankungen an Lungenkrebs, der auf das Zigarettenrauchen zurückzuführen ist, auf 83 % für Männer und 43 % für Frauen (Hammond et al. 1979). Zweifellos wird die Bedeutung der Krebsgefährdung am Arbeitsplatz -gerade im Hinblick auf das Lungenkrebs-Risiko- vielfach unterschätzt. Nach Schätzungen (Doll & Peto 1981) ist davon auszugehen, dass 15 % aller Lungentumore bei Männern und 5 % der Lungentumore bei Frauen durch humankanzerogene Gefahrstoffen am Arbeitsplatz verursacht werden.

Die wachsende Zahl arbeitsbedingter Tumore und der prognostizierte Anstieg Asbest-induzierter Erkrankungen in den nächsten 20 Jahren (Coenen & Schenk 1991, Peto et al. 1995) stellt neuartige Anforderungen an Ausmaß und Qualität der

5. Diskussion

arbeitsmedizinischen Sekundärprävention bei Personengruppen, die in der Vergangenheit und fortdauernd humankanzerogenen Arbeitsstoffen exponiert sind. Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1), ein Enzym des Phase I Stoffwechsels zählt zur multigenen Superfamilie von Hämproteinen mit enzymatischer Aktivität. Es ist unter anderem am Metabolismus von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) beteiligt.

CYP1B1 oxidiert eine große Anzahl an PAH zu Epoxiden (Guengerich 2000). Damit spielt CYP1B1 eine wichtige Rolle in der Bioaktivierung von Karzinogenen aus dem Tabakrauch. In einer Studie von Schneider et al. (2004) wurde der Zusammenhang zwischen dem CYP1B1 Leu432Val Polymorphismus und dem Lungenkrebsrisiko bei 446 Krebspatienten und 622 gesunden Probanden in Abhängigkeit zu Ihrem Rauchverhalten untersucht. Dabei wurde bei sehr starken Rauchern (>60 PJ) bei Vorhandensein von mindestens einem mutanten Allel ein signifikant erhöhtes Risiko für Lungenkrebs gefunden (Schneider et al. 2004a). Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung der GSTM1, GSTT1 und GSTP1 Polymorphismen gefunden (Schneider et al. 2004b).

Ziel der Arbeit war die Etablierung einer Methode, mit der ermittelt werden konnte, inwieweit exogene Faktoren (Tabakrauch) unter Berücksichtigung eines Genpolymorphismus einen Einfluss auf die Genexpression von Enzymen des Fremdstoffmetabolismus haben. Die Befunde aus dieser Untersuchung könnten eine wichtige Bedeutung bei der Detektion von Risikopatienten für PAH-induzierte Bronchialkarzinome spielen. Der Zigarettenrauchkonsum kann als Paradigma einer PAH-Einwirkung angesehen werden (Helmig et al. 2008).

5.1. Etablierung einer Methode zur Ermittlung der Genexpression

Eines der Ziele der Arbeit war es, eine Methode zu etablieren, mit der die Genexpression von Cytochromen, die im PAH-Metabolismus eine Rolle spielen, zu messen. Eine verlässliche Methode für die quantitative Messung sollte reproduzierbar und präzise sein. In dieser Studie wurde ein Protokoll zur quantitativen Messung der mRNA von CYP1B1 und CYP2E1 etabliert, welches nur eine kleine Menge mRNA benötigt und eine höhere Sensitivität im Vergleich zu ähnlichen Methoden (beispielsweise Northern Blot) aufweist. Real-Time PCRs bieten im Vergleich zur gel-basierten PCR eine erheblich höhere Sensitivität (Bustin 2002).

5. Diskussion

Die Real-Time PCR mit Sybr-Green ist eine gute und kostengünstige Methode, um einen Überblick über die RNA-Gehalte von Proben zu schaffen. Die Vorteile der Sybr-Green PCR sind, dass Sybr-Green bei der Amplifikation jeder beliebigen Zielsequenz verwendet werden kann. Es ist im Vergleich zur TaqMan Real-Time PCR keine spezifische Sonde notwendig (Probe), die die Kosten der PCR deutlich erhöhen würde. Ein Nachteil der Sybr-Green Methode ist, dass der Fluoreszenzfarbstoff an jede doppelsträngige DNA bindet, also auch an unspezifische PCR-Produkte oder Primer-Dimere. Es besteht die Möglichkeit, dass unspezifische Produkte koamplifiziert werden oder Primerdimer das Messergebnis fälschen. In der vorliegenden Studie wurde durch Optimierung der Primerkonzentrationen sowie durch Kontroll-PCR und Agarosegelelektrophorese diese Gefahr reduziert. Aus finanziellen Gründen wird in vielen Studien auf eine Bestimmung in Duplikaten oder sogar Triplikaten verzichtet. Um einzelne Fehler in der Messung möglichst auszuschließen, wurden in der vorliegenden Studie alle Bestimmungen mindestens in Duplikaten gemessen.

Ein wichtiger Aspekt bei der relativen Quantifizierung ist die Auswahl eines geeigneten internen Standards (Thellin et al. 1999). Das Housekeeping Gen (HKG) sollte konstant exprimiert und das Expressionsniveau nicht durch die Versuchsbedingungen beeinflusst werden (Karge, III et al. 1998, Bustin 2000). Der Vorteil dieses Bezugsmediums ist die Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da beispielsweise Fehler in der Real-Time PCR innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Ziel-Gen und das HKG betreffen.

Verglichen mit anderen quantitativen Real-Time PCR Methoden ermöglicht die in dieser Studie angewandte $\Delta\Delta CT$ -Methode eine schnelle und einfache Auswertung der relativen Änderungen in der Genexpression (Livak & Schmittgen 2001). Kombiniert mit reverser Transkription und Real-Time PCR hat sich die $\Delta\Delta CT$ -Methode als leistungsfähige Methode zur Quantifizierung der Genexpression erwiesen (Murphy et al. 1990, Noonan et al. 1990).

5.2. Beeinflussung der Genexpression von CYP1B1 durch Tabakrauch sowie durch den CYP1B1*3 Polymorphismus

In dieser Studie wurde der Einfluss des CYP1B1 Leu432Val Polymorphismus auf die CYP1B1 mRNA Expression von humanen Leukozyten untersucht. Dafür wurde die mRNA Expression bestimmt und die Leu432Val Genotypen von CYP1B1 bei 80 mitteleuropäischen Freiwilligen ermittelt. Die untersuchte Stichprobe befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht, und die Allelfrequenzen (0,53 für den Wildtyp) der untersuchten Genotypen stimmten mit denen aus der bekannten Literatur überein (Bailey et al. 1998, Bruning et al. 1999, Tang et al. 2000, Ko et al. 2001).

Beim Vergleich der relativen CYP1B1 mRNA Expression zwischen den verschiedenen Genotypen konnten eindeutige Unterschiede ermittelt werden. Die vorliegende Studie konnte zeigen, dass der CYP1B1 *3/*3 Genotyp mit einer verringerten CYP1B1 mRNA Expression im Vergleich zum CYP1B1 *1/*1 Genotyp assoziiert ist. Nachdem die Studienpopulation in die Subpopulationen Raucher und Nie-Raucher aufgeteilt wurde, konnte dieses Ergebnis auch innerhalb dieser Subpopulationen bestätigt werden.

Dieses Ergebnis wird durch eine Studie von Helmig et al. (2009 im Druck) bekräftigt. Dort wurde an einer größeren Population von 365 Probanden gezeigt, dass Probanden ohne das C-Allel (*3/*3) des CYP1B1 Leu432Val Polymorphismus eine signifikant niedrigere CYP1B1 mRNA Expression aufwiesen (Helmig et al. 2009a).

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen fanden Hu et al. 2006 eine signifikant höhere mRNA Expression bei taiwanesischen Arbeitern in einer städtischen Müllverbrennungsanlage, die das CYP1B1*3 Allel (n=9) trugen, im Vergleich zu Arbeitern, die das Wildtypallel besaßen (n=34). Diese Ergebnisse konnten bei Arbeitern, die einer hohen Dosis von PAH und/oder Dioxin ausgesetzt waren, bestätigt werden. Kontrollgruppen oder Arbeiter, die nur einer moderaten Dosis von Schadstoffen ausgesetzt waren, zeigten eine nicht signifikant geringere CYP1B1 mRNA Expression, wenn sie das CYP1B1*3 Allel (n=15 vs. n=48) aufwiesen (Hu et al. 2006). Probanden aus einer Studie von Landi et al. 2005, die heterozygot oder homozygot für das CYP1B1*3 Allel waren, wiesen eine höhere TCDD (2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin) induzierte CYP1B1 mRNA Expression in mitogenbehandelten Lymphozyten im Vergleich zu CYP1B1*1 homozygoten Probanden auf (Landi et al. 2005). Zu beachten ist die teilweise geringe Stichprobengröße dieser Studien und die unterschiedliche Verteilung (121

5. Diskussion

Probanden bei Landi et al. (2005), 112 bei Hu et al. (2006)) des CYP1B1 Polymorphismus zwischen Asiaten und Mitteleuropäern (Tang et al. 2000). Weiterhin ist zu beachten, dass die mitogene Aktivierung der Lymphozyten zur Proliferation anregen. Begleitend dazu wird eine ganze Reihe von Zellsignalkaskaden ausgelöst, welche die Gentranskription erhöhen. Selbst wenn Housekeeping Gene zur Standardisierung eingesetzt werden, können die Expressionswerte von CYP1B1 in mitogenstimulierten Zellen um bis zu 60% höher sein als in unstimulierten Zellen (van Duursen et al. 2005b). In der vorliegenden Studie wurden die Leukozyten nicht mitogen stimuliert.

Van Duursen et al. (2005) fanden keine statistisch bedeutsamen Effekte des CYP1B1 L432V Polymorphismus auf die mRNA Expressionswerte bei der Untersuchung von Lymphozyten von 10 nichtrauchenden Frauen (van Duursen et al. 2005b). Auch bei dem Vergleich der CYP1B1 L432V Polymorphismen von 114 Individuen, die aus einer mit polychlorierten Biphenylen kontaminierten Region in der Slowakei stammten, wurden ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede in der CYP1B1 mRNA Expression gefunden (van Duursen et al. 2005a).

Der genetische Einfluss ist nur ein Faktor, der sich auf das Expressionsmuster von CYP1B1 auswirkt. Weitere Faktoren, wie beispielsweise post-transkriptionelle Mechanismen, können bei der Regulierung von CYP1B1 beteiligt sein (McFadyen et al. 2003). Es liegen derzeit nur sehr spärliche Informationen zum Einfluss des CYP1B1 Leu432Val Polymorphismus auf das Expressionsmuster von CYP1B1 vor. Unsere Arbeit ist die erste, die diesen Polymorphismus an einer größeren Anzahl von Rauchern und Nie-Rauchern untersuchte. Somit können diese Ergebnisse als Grundlage für weitere Untersuchungen in Bezug auf den CYP1B1 Leu432Val Polymorphismus dienen.

Die Genexpression von CYP1B1 im Blut wird durch das Inhalieren von Tabakrauch beeinflusst (Dassi et al. 1998, Port et al. 2004, Willey et al. 1997). In der vorliegenden Studie ließ sich eine Tendenz zu einer verringerten CYP1B1 mRNA Expression der Leukozyten von Rauchern nachweisen, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Bezogen auf die Expression des Housekeeping-Gens B2M war die relative Expression von CYP1B1 für die Gruppe der Nie-Raucher im Vergleich zu der Gruppe der Raucher um den Faktor 9,68, bzw. um 968 % ($p=0,183$) erhöht. Unsere Untersuchungen analysierten den Einfluss des Tabakkonsums auf die

5. Diskussion

Genexpression von CYP1B1 mRNA in menschlichen Leukozyten. Port et al 2004 konnten nachweisen, dass B[a]P aus Tabakrauch die Genexpression von CYP1B1 in Zellen aus Lungengewebe, Mundhöhle und Speiseröhre erhöht (Port et al. 2004). In einer Studie aus dem Jahre 1997 konnte ebenfalls die durch Tabakrauch erhöhte Genexpression von CYP1B1 in Bronchialepithelzellen nachgewiesen werden (Willey et al. 1997). Aus diesen Untersuchungen resultiert, dass die mRNA Expression von CYP1B1 in Bronchialepithelzellen möglicherweise als Marker bei Rauchern dienen könnte. Man könnte erwarten, dass die mRNA Expression von CYP1B1 aus Leukozyten ebenso als Surrogat-Marker geeignet ist. Allerdings zeigt die vorliegende Arbeit, dass in Leukozyten kein signifikanter Unterschied zwischen der mRNA Expression von CYP1B1 bei Rauchern und Nie-Rauchern besteht und somit Leukozyten zu diesem Zwecke als Marker einer PAH-Einwirkung nicht verwendet werden können. Möglicherweise kann dies daran liegen, dass die Leukozyten nicht in direktem Kontakt mit den eingeatmeten PAHs stehen, sondern erst nach einer enzymatischen Umwandlung und Hydrophilisierung.

In weiteren Untersuchungen zum Einfluss von PAHs auf die Genexpression fanden Hanaoka et al. 2002 statistisch eindeutig erhöhte CYP1B1 mRNA Werte im peripheren Blut chinesischer Kokereiarbeiter mit starker PAH Belastung (n=9) im Vergleich zu Arbeitern, deren PAH Belastung niedriger war (n=16) oder gar einer nichtexponierten Kontrollgruppe (n=13) (Hanaoka et al. 2002). Ebenso wurde eine erhöhte mRNA Expressionsrate von CYP1B1 in Leukozyten von Arbeitern einer Müllverbrennungsanlage in Taiwan gefunden (n=77), die oft PAHs und Dioxinen ausgesetzt waren, im Vergleich zu Individuen ohne eine solche Exposition (n=35) (Hu et al. 2006).

Bei der Untersuchung von kultivierten Lymphozyten von 121 Individuen aus Seveso, Italien, die durch einen Chemieunfall TCDD ausgesetzt waren, konnte keine Assoziation zwischen der CYP1B1 mRNA Expression und den TCDD Blutplasmawerten festgestellt werden (Landi et al. 2003). Es ist wichtig zu erwähnen, dass bei dieser Studie die Messung der Blutplasmawerte erst zwanzig Jahre nach der Exposition stattfand. Hierbei ist zu berücksichtigen, dass die Gefahrstoffen nach dieser langen Zeit teilweise abgebaut waren und kaum die aktuell gemessene Genexpression beeinflussten.

5. Diskussion

In einer Population aus der Slowakei, die polychlorierten Bisphenylen (PCB) ausgesetzt war, wurde keine signifikante Korrelation zwischen den PCB Werten und der CYP1B1 mRNA Expression festgestellt (van Duursen et al. 2005a).

Es gilt zu beachten, dass es sich bei diesem Bericht um die Exposition von PCB handelt, die nicht mit Inhaltsstoffen aus dem Tabakrauch vergleichbar ist.

In einer Studie aus dem Jahre 1998 wurde die Genexpression von CYP1B1 von Monozyten aus menschlichem Blut gemessen. In der Studie konnte jedoch kein Unterschied in der Genexpression zwischen 25 Rauchern und 50 Nie-Rauchern ermittelt werden (Dassi et al. 1998).

Bei einer Gruppe Freiwilliger, die eigene Angaben über ihre PAH Belastung machten, wurde ebenfalls keine signifikante Assoziation zwischen der PAH Belastung und der CYP1B1 mRNA Expression gefunden (Tuominen et al. 2003). Zudem wurden von Lin et al. 2003 keinerlei statistisch eindeutige Differenzen bei den Geneexpressionswerten zwischen männlichen Rauchern (n=12) und Nie-Rauchern (n=10) aus Taiwan gefunden (Lin et al. 2003). Die drei genannten Studien, die den Einfluss des Tabakkonsums auf die Expression der CYP1B1 mRNA untersuchten, konnten in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen keinen signifikanten Unterschied zwischen Rauchern und Nie-Rauchern feststellen.

Wie zuvor beschrieben, konnte festgestellt werden, dass der CYP1B1 *3/*3 Genotyp mit einer verringerten CYP1B1 mRNA Expression im Vergleich zum CYP1B1 *1/*1 Genotyp assoziiert ist, vgl. Abb. 18. Nach dieser Feststellung war zu überprüfen, ob diese Ergebnisse eventuell vom Rauchverhalten der Probanden abhängt. Dafür wurde die Genexpression der CYP1B1 mRNA von Rauchern und Nie-Rauchern unabhängig von den Genotypen gemessen. Dabei war die Genexpression der CYP1B1 mRNA von Nie-Rauchern im Vergleich zu Rauchern höher, allerdings ohne Signifikanz. Somit kann gefolgert werden, dass die Genexpression von CYP1B1 mRNA aus menschlichen Leukozyten unabhängig vom Rauchverhalten für den CYP1B1 *3/*3 Genotyp geringer ist als für den CYP1B1 *1/*1 Genotyp.

5.3. Beeinflussung der Genexpression von CYP2E1 durch Tabakrauch sowie durch den CYP2E1 C1053T Polymorphismus

In weiteren Untersuchungen sollte der Einfluss des CYP2E1 C1053T Polymorphismus auf die CYP2E1 mRNA Expression von humanen Lymphozyten untersucht werden. Dafür wurden zunächst die C1053T (*RsaI*) Genotypen von CYP2E1 an 80 mitteleuropäischen Freiwilligen ermittelt, sowie die quantitative mRNA Expression bestimmt. Die untersuchte Stichprobe befand sich im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht und die Allelfrequenzen (0,93 für den Wildtypen) der untersuchten Genotypen stimmten mit denen aus der Literatur überein (Farker et al. 1998, Kato et al. 1992, Omer et al. 2001, Ulusoy et al. 2007).

Der homozygote Mutant (c2/c2) war bei keinem der Probanden zu finden. Für die relative Expression von CYP2E1 mRNA konnte für den heterozygoten Genotypen (c1/c2) eine höhere Genexpression im Vergleich zum Wildtyp (c1/c1) bestimmt werden, allerdings ohne statistische Signifikanz. Dies trat vor allem in Relation zu der Expression des Housekeeping-Gens GAPDH auf (p : Signifikanz = 0,57). Nachdem die Studienpopulation in die Subpopulationen Raucher und Nie-Raucher aufgeteilt worden war, hatte sich die tendenziell erhöhte Genexpression für den heterozygoten Genotypen (c1/c2) im Vergleich zum Wildtyp (c1/c1) sogar verstärkt, allerdings auch hier ohne statistische Signifikanz.

Es wurden bisher in der internationalen Literatur wenige Studien veröffentlicht, in denen die mRNA Genexpression mittels RT-PCR in Abhängigkeit zu den Genotypen des CYP2E1 C1053T Polymorphismus untersucht worden ist.

Eine der wenigen Studien wurde von Liu et al. 2007 veröffentlicht. Sie untersuchten die Assoziation des CYP2E1 C1053T Polymorphismus hinsichtlich der Genexpression von CYP2E1 mRNA. Bei der Genexpression von CYP2E1 wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der Genexpression zwischen den Genotypen (c1/c1, c1/c2, c2/c2) gefunden. Jedoch war die mRNA Expression des heterozygoten Genotypen (c1/c2) bei 33 (Kontroll-Gruppe= 29) und des homozygoten Mutanten (c2/c2) bei 10 (Kontroll-Gruppe= 5) im Vergleich zum Wildtypen (c1/c1) bei 34 (Kontroll-Gruppe= 45) leicht erhöht. Liu et al. fanden in ihrer Studie 15 Probanden vom homozygot mutanten Genotypen (c2/c2) (Liu et al. 2007). In der Literatur gibt es allerdings zahlreiche Studien, in denen der mutante Genotyp (c2/c2) nicht oder nur sehr selten vorkam (Le Marchand et al. 1998, Ulusoy et al. 2007). Der Polymorphismus tritt bei Asiaten im Vergleich zu Europäern häufiger auf (Persson et

5. Diskussion

al. 1993). Daher sind diese Studien hinsichtlich der Polymorphismen nicht direkt miteinander vergleichbar.

Bartsch et al konnten bei Kaukasiern keinen Einfluss der *RsaI*-Genotypen auf die Enzymaktivität in vivo zeigen (Bartsch et al. 2000). In-vitro-Studien der Expression zeigten, dass das mutante Allel c2 mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität verbunden ist (Hayashi et al. 1991, Tsutsumi et al. 1994b, Watanabe et al. 1994). Dieses Ergebnis konnte durch unsere Resultate bestätigt werden. Des Weiteren wird vermutet, dass Individuen mit dem c2 ein erhöhtes Risiko für alkoholbedingte Lebererkrankungen haben. Dieses Risiko geht mit einer höheren CYP2E1 Aktivität einher (Grove et al. 1998, Pirmohamed et al. 1995, Tsutsumi et al. 1994a). Eine Studie über das nasopharyngeale Krebsrisiko in Taiwan fand eine signifikant erhöhte Anfälligkeit für diese Erkrankung bei Nie-Rauchern, die homozygot für das Allel c2 waren (Hildesheim et al. 1997). Populationsstudien konnten die erhöhte CYP2E1 Aktivität bei Vorhandensein des c2 Allels nicht bestätigen, und die Assoziation mit einem erhöhten Risiko für alkoholinduzierte Lebererkrankungen wird daher kontrovers diskutiert (Agundez et al. 1996, Carr et al. 1995, Carriere et al. 1996, Kim & O'Shea 1995, Savolainen et al. 1997).

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es zu bestimmen, inwiefern exogene Faktoren, hier Tabakrauch, einen Einfluss auf die Expression von CYP2E1 haben. In der vorliegenden Studie konnte erstmals festgestellt werden, dass die Expression von CYP2E1 in der Gruppe der Raucher im Vergleich zu der Gruppe der Nie-Raucher signifikant niedriger ist. Die relative Expression lag für die Gruppe der Raucher bei einem Mittelwert von 0,05 und für die Gruppe der Nie-Raucher bei 0,48 jeweils gemessen zum HKG B2M (Signifikanz: $p=0,006$). Daraus resultiert, dass humane Leukozyten als Marker für das Rauchverhalten wenig geeignet sind. Des Weiteren kann man daraus folgern, dass die Genexpression von CYP2E1 mRNA aus Leukozyten bei Rauchern unabhängig vom CYP2E1 C1053T Polymorphismus niedriger ist als bei Nie-Rauchern. Denn wie bereits erwähnt, besteht kein statistisch signifikanter Unterschied in der Höhe der Genexpression zwischen den verschiedenen Genotypen, vgl. Abb. 18.

Die CYP2E1 Expression konnte bereits in menschlichem Blut nachgewiesen werden (Raucy et al. 1997), allerdings gibt es keinerlei Studien, die die Abhängigkeit von Tabakrauch auf die Expression beim Menschen messen.

5. Diskussion

Bezogen auf den Zigarettenrauch konnten Villard et al. 1994 nachweisen, dass die Expression von CYP2E1 in Lungen- und Lebergewebe von Mäusen bis zum 6,8 fachen ansteigt (Villard et al. 1994). Ein weiterer Tierversuch an Mäusen von Seree et al. 1996 ergab ebenfalls eine erhöhte Expression von CYP2E1 aus Nierengewebe (Seree et al. 1996). Die Expressionsrate von CYP2E1 in Gewebe wird zum einen transkriptionell durch die mRNA-Stabilisation und zum anderen post-transkriptionell durch eine erhöhte mRNA Translation und Protein-Stabilisation reguliert. Für Nikotin und Ethanol ist die Induktion von CYP2E1 in der Regel mit erhöhten mRNA Werten assoziiert (Howard et al. 2001). Czekaj et al. 2005 fanden bei der Analyse von Rattengewebe eine dosisabhängige Erhöhung Expression von CYP2E1 durch Tabakrauch in Leber, Niere und Gehirn (Czekaj et al. 2005). Van Vleet et al. 2001 stellten in ihren Untersuchungen fest, dass Nikotin, Cotinin (ein metabolisches Abbauprodukt von Nikotin) sowie wasserlösliche Bestandteile aus Zigaretten-Teer die Aktivität der CYP2E1 Expression aus humanen Mikrosomen hemmen (Van Vleet et al. 2001).

In Untersuchungen von Lucas et al. 1995 & 1999 wurde Chloroxazon, ein Muskelrelaxans, als Substrat für CYP2E1 verwendet. Auf diesem Weg sollte die Aktivität von CYP2E1 gemessen werden. Nach Gegenüberstellung von Rauchern und Nie-Rauchern konnte keine erhöhte Aktivität für das Protein bei Rauchern festgestellt werden. Ethanol jedoch steigerte den Chloroxazon Umsatz um das bis zu Zehnfache (Lucas et al. 1995, Lucas et al. 1999).

Diese widersprüchlichen Aussagen aus den genannten Studien könnten damit zusammenhängen, dass im Tabakrauch nicht nur induzierende Stoffe, wie beispielsweise PAH und Pyridin, sondern auch Inhibitoren wie beispielsweise Kohlenmonoxid (Czekaj et al. 2005) eine Rolle spielen. Verschiedene Bestandteile aus dem Tabakrauch haben demnach unterschiedliche Wirkungen auf die Expression von CYP2E1. Außerdem können die differenten Ergebnisse auch dadurch zu Stande kommen, dass sich die Expression von CYP2E1 im Gewebe und in menschlichen Leukozyten unterscheiden. In der vorliegenden Studie konnte festgestellt werden, dass die Expression von CYP2E1 aus humanen Leukozyten bei Rauchern signifikant niedriger ist als bei Nie-Rauchern. Es wäre interessant, in zukünftigen Studien mit einem größeren Probandenkollektiv zu untersuchen, inwiefern dieses Ergebnis durch die Menge des Tabakkonsums beeinflusst wird.

5. Diskussion

Hierbei interessiert insbesondere der Unterschied in der Höhe der Genexpression in Abhängigkeit zwischen starken Rauchern und Gelegenheitsrauchern.

Schlussfolgernd lassen sich folgende Punkte zusammenfassen:

Es konnte in dieser Studie festgestellt werden, dass der CYP1B1 *3/*3 Genotyp mit einer verringerten CYP1B1 mRNA Expression im Vergleich zum CYP1B1 *1/*1 Genotyp assoziiert ist. Des Weiteren ließ sich eine Tendenz zu einer verringerten CYP1B1 mRNA Expression der Leukozyten von Rauchern nachweisen, allerdings ohne statistische Signifikanz zu erreichen.

Für die relative Expression von CYP2E1 mRNA konnte für den heterozygoten Genotypen (c1/c2) eine höhere Genexpression im Vergleich zum Wildtyp (c1/c1) bestimmt werden, allerdings ohne statistische Signifikanz. Außerdem konnte erstmals festgestellt werden, dass die Expression von CYP2E1 in der Gruppe der Raucher im Vergleich zu der Gruppe der Nie-Raucher signifikant niedriger ist.

6. Zusammenfassung

Cytochrome P450 1B1 (Cyp1B1) und 2E1 (Cyp2E1) sind Phase-1-Enzyme und spielen bei der Aktivierung einer Vielzahl von Karzinogenen eine Rolle. Zusammenhänge zwischen den Cyp1B1 Leu432Val und Cyp2E1 C1053T (*Rsa*I) Polymorphismen und dem Auftreten von Krebserkrankungen sowie der Aktivierung von Enzymen wurden bereits beschrieben. Um die Bedeutung der verschiedenen Allelvariationen von Cyp1B1*3 und Cyp2E1/c2 zu verdeutlichen, wurde aus einem Kollektiv von 80 Probanden, davon 54 Raucher und 26 Nie-Raucher, die quantitative Cyp1B1 und Cyp2E1 mRNA Genexpression in Abhängigkeit zum jeweiligen Polymorphismus bestimmt. Die Bestimmung des Leu432Val Cyp1B1 sowie des C1053T Cyp2E1 Polymorphismus erfolgte mit Real-Time PCR und Schmelzkurvenanalyse. Die quantitative Bestimmung der mRNA Expression von Cyp1B1 sowie Cyp2E1 erfolgte mit Sybr-Green Farbstoff im LightCycler. Die Berechnung der Expression wurde mittels $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode durchgeführt.

Bei dem Vergleich der relativen Cyp1B1 mRNA Expression konnten Unterschiede zwischen den homozygoten Genotypen *1/*1 und *3/*3 (n=22 vs. n=18 ; p=0,055) gefunden werden. Dabei war die mRNA Genexpression des Genotypen *3/*3 niedriger als die von *1/*1, allerdings ohne statistische Signifikanz. Dieses Ergebnis konnte nach der Aufteilung in die Subpopulationen Raucher und Nie-Raucher bestätigt werden. Bei dem Vergleich der relativen Cyp1B1 mRNA Expression zwischen Rauchern und Nie-Rauchern konnte eine höhere Expression für Nie-Raucher festgestellt werden, allerdings ohne statistische Signifikanz. Schlussfolgernd kann festgestellt werden, dass Genotypen des Leu432Val Cyp1B1 mit C-Allel (1/*1 und *1/*3) eine höhere mRNA Expression aufweisen als Genotypen ohne das C-Allel (*3/*3).

Bei dem Vergleich der relativen Cyp2E1 mRNA Expression für den C1053T Cyp2E1 Polymorphismus konnte festgestellt werden, dass die Expression des homozygoten c1/c1 (n=58) niedriger war als die Expression des heterozygoten Genotypen c1/c2 (n=9), allerdings ohne statistische Signifikanz. Ähnliche Ergebnisse ergab auch die Unterteilung in die Subpopulationen der Raucher und Nie-Raucher. Der Vergleich der relativen mRNA Expression bei Rauchern und Nie-Rauchern ergab eine signifikant niedrigere Expression in der Gruppe der Raucher (n=19 vs. n=19, p=0,006).

Die Genexpression der Cyp1B1 sowie der Cyp2E1 mRNA kann daher nicht als Biomarker für Raucher dienen.

7. Summary

7. Summary

Cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) and 2E1 (CYP2E1) phase I enzymes are involved in the activation of a broad spectrum of carcinogens. An association of the Cyp1B1 Leu432Val and Cyp2E1 C1053T (*RsaI*) polymorphism with diverse types of cancer as well as an impact on the catalytic activity of the enzyme are described. To demonstrate the functional impact of the allelic variant Cyp1B1*3 and Cyp2E1/c2 we investigated the quantitative Cyp1B1 mRNA expression in a population of 54 smokers and 26 never-smokers regarding their genotypes. Detection of the Leu432Val polymorphism in exon 3 of the Cyp1B1 gene and C1053T polymorphism in exon *RsaI* of the Cyp2E1 gene was performed by rapid capillary PCR, using melting curve analysis. For quantitative comparison of Cyp1B1 and Cyp2E1 mRNA levels real-time PCR was performed using SYBR-green fluorescence in a LightCycler[®] System. Calculations of expression were done with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method.

Comparing relative Cyp1B1 mRNA expression differences between the two homozygote genotypes *1/*1 and *3/*3 (n=22 vs. n=18 ; p=0,055) could be revealed. The mRNA expression of *3/*3 was lower than of *1/*1 genotype. Similar differences between the genotypes could be also detected within the subgroup smokers and never-smokers. Comparing the relative Cyp1B1 mRNA expression in regards to tobacco smoke exposure a higher expression in the group of never-smokers could be determined, but without any significance. Our results suggest, that genotypes carrying the C-allele (*1/*1 and *1/*3) at Cyp1B1 Leu432Val polymorphism have a higher Cyp1B1 mRNA expression compared to the genotype without the C-allele (*3/*3).

Comparing relative Cyp2E1 mRNA expression, the homozygote genotype c1/c1 (n=58) revealed a lower expression than the heterozygote genotype c1/c2 (n=9), without any statistical significance. Similar differences between the genotypes could be also detected within the subgroup smokers and never-smokers. Comparing the relative Cyp1B1 mRNA expression in regards to tobacco smoke a significant lower expression in the group of smokers (n=19 vs. n=19) could be determined (p= 0,006). Gene expression of Cyp2E1 as well as Cyp1B1 mRNA cannot be used as a biomarker for exposure of tobacco smoke.

8. Literaturverzeichnis

1. Agundez, J., Ladero, J., Diaz-Rubio, M. & Benitez, J. (1996) Rsa I polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus is not related to the risk of alcohol-related severe liver disease. *Liver* **16**, 380-383.
2. Bachschmid, M., Schildknecht, S. & Ullrich, V. (2005) Redox regulation of vascular prostanoid synthesis by the nitric oxide-superoxide system. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **338**, 536-542.
3. Bailey, L. R., Roodi, N., Dupont, W. D. & Parl, F. F. (1998) Association of cytochrome P450 1B1 (CYP1B1) polymorphism with steroid receptor status in breast cancer. *Cancer Res.* **58**, 5038-5041.
4. Baker, RR. (2007) Smoke Chemistry. In *Production, chemistry and technology*. eds. Davis, DL. & Nielsen, MT., Paris: Blackwell Science.
5. Bartsch, H., Nair, U., Risch, A., Rojas, M., Wikman, H. & Alexandrov, K. (2000) Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **9**, 3-28.
6. Boffetta, P., Jourenkova, N. & Gustavsson, P. (1997) Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control* **8**, 444-472.
7. Brüning, T., Abel, J., Koch, B., Lorenzen, K., Harth, V., Donat, S., Sachinidis, A., Vetter, H., Bolt, H. M. & Ko, Y. (1999) Real-time PCR-analysis of the cytochrome P450 1B1 codon 432-polymorphism. *Arch.Toxicol.* **73**, 427-430.
8. Bundesministerium für Arbeit- und Sozialordnung (BMA) (1999) *Arbeitssicherheit '99. Unfallverhütungsbericht Arbeit. Bericht der Bundesregierung über den Stand der Unfallverhütung und das Unfallgeschehen in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1998*. Bonn: Universitäts-Buchdruckerei.
9. Bustin, S. A. (2000) Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J.Mol.Endocrinol.* **25**, 169-193.
10. Bustin, S. A. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J.Mol.Endocrinol.* **29**, 23-39.
11. Butz, M. (2004) *Beruflich verursachte Krebserkrankungen 1978-2003*. Sankt Augustin: Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften.
12. Carr, L. G., Hartleroad, J. Y., Liang, Y., Mendenhall, C., Moritz, T. & Thomasson, H. (1995) Polymorphism at the P450IIE1 locus is not associated with alcoholic liver disease in Caucasian men. *Alcohol Clin.Exp.Res.* **19**, 182-184.

8. Literaturverzeichnis

13. Carriere, V., Berthou, F., Baird, S., Belloc, C., Beaune, P. & de, W., I (1996) Human cytochrome P450 2E1 (CYP2E1): from genotype to phenotype. *Pharmacogenetics* **6**, 203-211.
14. Chang, G. W. & Kam, P. C. (1999) The physiological and pharmacological roles of cytochrome P450 isoenzymes. *Anaesthesia* **54**, 42-50.
15. Coenen, W. & Schenk, H. (1991) Ermittlung differenzierter Vorsorgegruppen bei Asbestexponierten. In *BIA-Report 1/91*. Sankt Augustin.
16. Conney, A. H. (1982) Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res.* **42**, 4875-4917.
17. Czekaj, P., Wiaderkiewicz, A., Florek, E. & Wiaderkiewicz, R. (2005) Tobacco smoke-dependent changes in cytochrome P450 1A1, 1A2, and 2E1 protein expressions in fetuses, newborns, pregnant rats, and human placenta. *Arch.Toxicol.* **79**, 13-24.
18. Daly, A. K. (1995) Molecular basis of polymorphic drug metabolism. *J.Mol.Med.* **73**, 539-553.
19. Danielson, P. B. (2002) The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans. *Curr.Drug Metab* **3**, 561-597.
20. Dassi, C., Signorini, S., Gerthoux, P., Cazzaniga, M. & Brambilla, P. (1998) Cytochrome P450 1B1 mRNA measured in blood mononuclear cells by quantitative reverse transcription-PCR. *Clin.Chem.* **44**, 2416-2421.
21. Djordjevic, M. V., Stellman, S. D. & Zang, E. (2000) Doses of nicotine and lung carcinogens delivered to cigarette smokers. *J.Natl.Cancer Inst.* **92**, 106-111.
22. Doll, R. & Peto, R. (1981) The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. *J.Natl.Cancer Inst.* **66**, 1191-1308.
23. Farker, K., Lehmann, M. H., Kastner, R., Hoffmann, A., Janitzky, V., Schubert, J., Matz, U. & Hofmann, W. (1998) CYP2E1 genotyping in renal cell/urothelial cancer patients in comparison with control populations. *Int.J.Clin.Pharmacol.Ther.* **36**, 463-468.
24. Fritsche, E., Brüning, T., Jonkmanns, C., Ko, Y., Bolt, H. M. & Abel, J. (1999) Detection of cytochrome P450 1B1 Bfr I polymorphism: genotype distribution in healthy German individuals and in patients with colorectal carcinoma. *Pharmacogenetics* **9**, 405-408.
25. Gelboin, H. V. (1980) Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev.* **60**, 1107-1166.
26. Gibson, U. E., Heid, C. A. & Williams, P. M. (1996) A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.* **6**, 995-1001.

8. Literaturverzeichnis

27. Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R. & Mathieu, C. (2001) An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods* **25**, 386-401.
28. Grove, J., Brown, A. S., Daly, A. K., Bassendine, M. F., James, O. F. & Day, C. P. (1998) The RsaI polymorphism of CYP2E1 and susceptibility to alcoholic liver disease in Caucasians: effect on age of presentation and dependence on alcohol dehydrogenase genotype. *Pharmacogenetics* **8**, 335-342.
29. Guengerich, F. P. (2000) Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* **21**, 345-351.
30. Hammond, E. C., Selikoff, I. J. & Seidman, H. (1979) Asbestos exposure, cigarette smoking and death rates. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **330**, 473-490.
31. Hanaoka, T., Yamano, Y., Pan, G., Hara, K., Ichiba, M., Zhang, J., Zhang, S., Liu, T., Li, L., Takahashi, K., Kagawa, J. & Tsugane, S. (2002) Cytochrome P450 1B1 mRNA levels in peripheral blood cells and exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in Chinese coke oven workers. *Sci.Total Environ.* **296**, 27-33.
32. Hayashi, S., Watanabe, J. & Kawajiri, K. (1991) Genetic polymorphisms in the 5'-flanking region change transcriptional regulation of the human cytochrome P450IIE1 gene. *J.Biochem.* **110**, 559-565.
33. Hecht, S. S. (1999) Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J.Natl.Cancer Inst.* **91**, 1194-1210.
34. Helmig, S., Hadzaad, B., Döhrel, J. & Schneider, J. Influence of the Cyp1B1 L432V gene polymorphism and exposure to tobacco smoke on Cyp1B1 mRNA expression in human leucozytes. *Drug.Metab.Dispos.* 2009a.
35. Helmig, S., Hadzaad, B., Döhrel, J. & Schneider, J. (2009b) Relative Quantification of Cytochrome P450 1B1 Gene Expression in Peripheral Leukozytes using LightCycler. *Cancer Genomics Proteomics.* **6**.
36. Helmig, S., Hadzaad, B. & Schneider, J. Cytochrom P450 1B1 Genpolymorphismus L342V ist mit einer Genexpressionssteigerung assoziiert. 48.wissenschaftliche Jahrestagung der Dtsch.Ges.Arbeitsmed.in Hamburg (DGAUM) . 2008.
37. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N.Y.)* **11**, 1026-1030.
38. Hildesheim, A., Anderson, L. M., Chen, C. J., Cheng, Y. J., Brinton, L. A., Daly, A. K., Reed, C. D., Chen, I. H., Caporaso, N. E., Hsu, M. M., Chen, J. Y., Idle, J. R., Hoover, R. N., Yang, C. S. & Chhabra, S. K. (1997) CYP2E1 genetic polymorphisms and risk of nasopharyngeal carcinoma in Taiwan. *J.Natl.Cancer Inst.* **89**, 1207-1212.

8. Literaturverzeichnis

39. Howard, L. A., Micu, A. L., Sellers, E. M. & Tyndale, R. F. (2001) Low doses of nicotine and ethanol induce CYP2E1 and chlorzoxazone metabolism in rat liver. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* **299**, 542-550.
40. Hu, S. W., Chen, C. C., Kuo, C. Y., Lin, W. H. & Lin, P. (2006) Increased cytochrome P4501B1 gene expression in peripheral leukocytes of municipal waste incinerator workers. *Toxicol.Lett.* **160**, 112-120.
41. Idle, J. R., Armstrong, M., Boddy, A. V., Boustead, C., Cholerton, S., Cooper, J., Daly, A. K., Ellis, J., Gregory, W., Hadidi, H. & . (1992) The pharmacogenetics of chemical carcinogenesis. *Pharmacogenetics* **2**, 246-258.
42. Ingelman-Sundberg, M., Oscarson, M., Daly, A. K., Garte, S. & Nebert, D. W. (2001) Human cytochrome P-450 (CYP) genes: a web page for the nomenclature of alleles. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **10**, 1307-1308.
43. Jöckel, K. H., Ahrens, W., Jahn, I., Pohlabeln, H. & Bolm-Audorff, U. (1995) Untersuchungen zu Lungenkrebs und Risiken am Arbeitsplatz (Schlußbericht). In *Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsmedizin*. Berlin: Wirtschaftsverlag NW.
44. Kainz, P. (2000) The PCR plateau phase - towards an understanding of its limitations. *Biochim.Biophys.Acta* **1494**, 23-27.
45. Karge, W. H., III, Schaefer, E. J. & Ordovas, J. M. (1998) Quantification of mRNA by polymerase chain reaction (PCR) using an internal standard and a nonradioactive detection method. *Methods Mol.Biol.* **110**, 43-61.
46. Kato, S., Shields, P. G., Caporaso, N. E., Hoover, R. N., Trump, B. F., Sugimura, H., Weston, A. & Harris, C. C. (1992) Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation, and lung cancer risk. *Cancer Res.* **52**, 6712-6715.
47. Kessova, I. & Cederbaum, A. I. (2003) CYP2E1: biochemistry, toxicology, regulation and function in ethanol-induced liver injury. *Curr.Mol.Med.* **3**, 509-518.
48. Kim, J. H., Sherman, M. E., Curriero, F. C., Guengerich, F. P., Strickland, P. T. & Sutter, T. R. (2004) Expression of cytochromes P450 1A1 and 1B1 in human lung from smokers, non-smokers, and ex-smokers. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **199**, 210-219.
49. Kim, R. B. & O'Shea, D. (1995) Interindividual variability of chlorzoxazone 6-hydroxylation in men and women and its relationship to CYP2E1 genetic polymorphisms. *Clin.Pharmacol.Ther.* **57**, 645-655.
50. Ko, Y., Abel, J., Harth, V., Brode, P., Antony, C., Donat, S., Fischer, H. P., Ortiz-Pallardo, M. E., Thier, R., Sachinidis, A., Vetter, H., Bolt, H. M., Herberhold, C. & Brüning, T. (2001) 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.* **61**, 4398-4404.

8. Literaturverzeichnis

51. Ladero, J. M., Agundez, J. A., Rodriguez-Lescure, A., Diaz-Rubio, M. & Benitez, J. (1996) RsaI polymorphism at the cytochrome P4502E1 locus and risk of hepatocellular carcinoma. *Gut* **39**, 330-333.
52. Landi, M. T., Bergen, A. W., Baccarelli, A., Patterson, D. G., Jr., Grassman, J., Ter Minassian, M., Mocarelli, P., Caporaso, N., Masten, S. A., Pesatori, A. C., Pittman, G. S. & Bell, D. A. (2005) CYP1A1 and CYP1B1 genotypes, haplotypes, and TCDD-induced gene expression in subjects from Seveso, Italy. *Toxicology* **207**, 191-202.
53. Landi, M. T., Bertazzi, P. A., Baccarelli, A., Consonni, D., Masten, S., Lucier, G., Mocarelli, P., Needham, L., Caporaso, N. & Grassman, J. (2003) TCDD-mediated alterations in the AhR-dependent pathway in Seveso, Italy, 20 years after the accident. *Carcinogenesis* **24**, 673-680.
54. Le Marchand, L., Sivaraman, L., Pierce, L., Seifried, A., Lum, A., Wilkens, L. R. & Lau, A. F. (1998) Associations of CYP1A1, GSTM1, and CYP2E1 polymorphisms with lung cancer suggest cell type specificities to tobacco carcinogens. *Cancer Res.* **58**, 4858-4863.
55. Lin, P., Hu, S. W. & Chang, T. H. (2003) Correlation between gene expression of aryl hydrocarbon receptor (AhR), hydrocarbon receptor nuclear translocator (Arnt), cytochromes P4501A1 (CYP1A1) and 1B1 (CYP1B1), and inducibility of CYP1A1 and CYP1B1 in human lymphocytes. *Toxicol.Sci.* **71**, 20-26.
56. Lipp, HP. & Schuler, U. (1995) Die menschlichen Cytochrom-P450-Isoenzyme. *Arzneimitteltherapie* **9**, 272-280.
57. Liu, R., Yin, L. H. & Pu, Y. P. (2007) Association of combined CYP2E1 gene polymorphism with the risk for esophageal squamous cell carcinoma in Huai'an population, China. *Chin Med.J.(Engl.)* **120**, 1797-1802.
58. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402-408.
59. Lucas, D., Ferrara, R., Gonzalez, E., Bodenez, P., Albores, A., Manno, M. & Berthou, F. (1999) Chlorzoxazone, a selective probe for phenotyping CYP2E1 in humans. *Pharmacogenetics* **9**, 377-388.
60. Lucas, D., Menez, C., Girre, C., Berthou, F., Bodenez, P., Joannet, I., Hispard, E., Bardou, L. G. & Menez, J. F. (1995) Cytochrome P450 2E1 genotype and chlorzoxazone metabolism in healthy and alcoholic Caucasian subjects. *Pharmacogenetics* **5**, 298-304.
61. Luch, A., Coffing, S. L., Tang, Y. M., Schneider, A., Soballa, V., Greim, H., Jefcoate, C. R., Seidel, A., Greenlee, W. F., Baird, W. M. & Doehmer, J. (1998) Stable expression of human cytochrome P450 1B1 in V79 Chinese hamster cells and metabolically catalyzed DNA adduct formation of dibenzo[a,l]pyrene. *Chem.Res.Toxicol.* **11**, 686-695.

8. Literaturverzeichnis

62. McBride, O. W., Umeno, M., Gelboin, H. V. & Gonzalez, F. J. (1987) A Taq I polymorphism in the human P450IIE1 gene on chromosome 10 (CYP2E). *Nucleic Acids Res.* **15**, 10071.
63. McFadyen, M. C., Rooney, P. H., Melvin, W. T. & Murray, G. I. (2003) Quantitative analysis of the Ah receptor/cytochrome P450 CYP1B1/CYP1A1 signalling pathway. *Biochem.Pharmacol.* **65**, 1663-1674.
64. Mertens, S. (1997) Lungenkrebsrisiko höher als bisher angenommen - Europaweite Studie vorgestellt. *Dtsch Arztebl* **94**, A-2752.
65. Murphy, L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T. & Bates, S. E. (1990) Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression. *Biochemistry* **29**, 10351-10356.
66. Murray, G. I., Melvin, W. T., Greenlee, W. F. & Burke, M. D. (2001) Regulation, function, and tissue-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* **41**, 297-316.
67. Nebert, D. W. & Dalton, T. P. (2006) The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nat.Rev.Cancer* **6**, 947-960.
68. Nebert, D. W. & Russell, D. W. (2002) Clinical importance of the cytochromes P450. *Lancet* **360**, 1155-1162.
69. Negri, E. & La Vecchia, C. (2001) Epidemiology and prevention of bladder cancer. *Eur.J.Cancer Prev.* **10**, 7-14.
70. Nelson, D. R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J. J., Feyereisen, R., Waxman, D. J., Waterman, M. R., Gotoh, O., Coon, M. J., Estabrook, R. W., Gunsalus, I. C. & Nebert, D. W. (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1-42.
71. Nelson, D. R., Zeldin, D. C., Hoffman, S. M., Maltais, L. J., Wain, H. M. & Nebert, D. W. (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **14**, 1-18.
72. Noonan, K. E., Beck, C., Holzmayer, T. A., Chin, J. E., Wunder, J. S., Andrulis, I. L., Gazdar, A. F., Willman, C. L., Griffith, B., Von Hoff, D. D. & . (1990) Quantitative analysis of MDR1 (multidrug resistance) gene expression in human tumors by polymerase chain reaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**, 7160-7164.
73. Oesch, F. (1994) Fremdstoffmetabolismus. eds. Marquardt, H. & Schäfer, S., pp. 68-93. Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich: BI Wissenschaftsverlag.
74. Omer, B., Ozbek, U., Akkose, A. & Kilic, G. (2001) Genetic polymorphism of cytochrome P450 2E1 in the Turkish population. *Cell Biochem.Funct.* **19**, 273-275.

8. Literaturverzeichnis

75. Omura, T. & Sato, R. (1962) A new cytochrome in liver microsomes. *J.Biol.Chem.* **237**, 1375-1376.
76. Penning, T. M., Burczynski, M. E., Hung, C. F., McCoull, K. D., Palackal, N. T. & Tsuruda, L. S. (1999) Dihydrodiol dehydrogenases and polycyclic aromatic hydrocarbon activation: generation of reactive and redox active o-quinones. *Chem.Res.Toxicol.* **12**, 1-18.
77. Persson, I., Johansson, I., Bergling, H., Dahl, M. L., Seidegard, J., Rylander, R., Rannug, A., Hogberg, J. & Sundberg, M. I. (1993) Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 in a Swedish population. Relationship to incidence of lung cancer. *FEBS Lett.* **319**, 207-211.
78. Peto, J., Hodgson, J. T., Matthews, F. E. & Jones, J. R. (1995) Continuing increase in mesothelioma mortality in Britain. *Lancet* **345**, 535-539.
79. Pirmohamed, M., Kitteringham, N. R., Quest, L. J., Allott, R. L., Green, V. J., Gilmore, I. T. & Park, B. K. (1995) Genetic polymorphism of cytochrome P4502E1 and risk of alcoholic liver disease in Caucasians. *Pharmacogenetics* **5**, 351-357.
80. Port, J. L., Yamaguchi, K., Du, B., De Lorenzo, M., Chang, M., Heerdt, P. M., Kopelovich, L., Marcus, C. B., Altorki, N. K., Subbaramaiah, K. & Dannenberg, A. J. (2004) Tobacco smoke induces CYP1B1 in the aerodigestive tract. *Carcinogenesis* **25**, 2275-2281.
81. Raucy, J. L., Schultz, E. D., Wester, M. R., Arora, S., Johnston, D. E., Omdahl, J. L. & Carpenter, S. P. (1997) Human lymphocyte cytochrome P450 2E1, a putative marker for alcohol-mediated changes in hepatic chlorzoxazone activity. *Drug Metab Dispos.* **25**, 1429-1435.
82. Raunio, H., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Hietanen, E., Hirvonen, A. & Pelkonen, O. (1995) Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility--a review. *Gene* **159**, 113-121.
83. Savolainen, V. T., Pajarinen, J., Perola, M., Penttila, A. & Karhunen, P. J. (1997) Polymorphism in the cytochrome P450 2E1 gene and the risk of alcoholic liver disease. *J.Hepatol.* **26**, 55-61.
84. Schaller, K. & Pötschke-Lange, M. (2007) Gesundheitliche Risiken durch Tabakrauchbelastung in Gastronomiebetrieben. *J.Verbr.Lebensm.* 315-322.
85. Schneider, J., Bernges, U., Philipp, M. & Voitowitz, H. J. (2004a) CYP1A1 and CYP1B1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Cancer Genomics Proteomics* **1**, 189-198.
86. Schneider, J., Bernges, U., Philipp, M. & Voitowitz, H. J. (2004b) GSTM1, GSTT1, and GSTP1 polymorphism and lung cancer risk in relation to tobacco smoking. *Cancer Lett.* **208**, 65-74.
87. Schober, W. Metabolische Aktivierung von Bay- und Fjord-Region enthaltenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen durch

8. Literaturverzeichnis

Cytochrome P450 von Maus, Ratte und Mensch. 1-117. 2000. Technische Universität München, Institut für Toxikologie und Umwelthygiene.

88. Schriftenreihe des Hauptverbandes der gewerblichen Berufsgenossenschaften (1999) *BK-Report II/99 "BaP-Jahre". Berufsgenossenschaftliche Hinweise zur Ermittlung der Benzo(a)pyren-Dosis (BaP-Jahre) mit Bearbeitungshinweisen zur Berufskrankheit "Lungenkrebs durch polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe bei Nachweis der Einwirkung einer kumulativen Dosis von mindestens 100 Benzo(a) pyren-Jahren nach § 9 Abs. 2 SGB VII sowie Bearbeitungshinweisen für die BK-Nummern 4110 und 5102 der Anlage zur Berufskrankheiten-Verordnung (BKV) vom 31.10.1997.* Sankt Augustin.
89. Schwarz, M. & Bock, K. W. (1998) Mechanismen der Entstehung fremdstoffbedingter Krebsformen. In *Tumorerkrankungen*. eds. Ganten, D. & Ruckpaul, K., pp. 27-49. Heidelberg: Springer.
90. Seree, E. M., Villard, P. H., Re, J. L., De Meo, M., Lacarelle, B., Attolini, L., Dumenil, G., Catalin, J., Durand, A. & Barra, Y. (1996) High inducibility of mouse renal CYP2E1 gene by tobacco smoke and its possible effect on DNA single strand breaks. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **219**, 429-434.
91. Shimada, T. & Fujii-Kuriyama, Y. (2004) Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* **95**, 1-6.
92. Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P. & Sutter, T. R. (1996) Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1. *Cancer Res.* **56**, 2979-2984.
93. Shimada, T., Yamazaki, H., Foroozesh, M., Hopkins, N. E., Alworth, W. L. & Guengerich, F. P. (1998) Selectivity of polycyclic inhibitors for human cytochrome P450s 1A1, 1A2, and 1B1. *Chem.Res.Toxicol.* **11**, 1048-1056.
94. Spink, D. C., Wu, S. J., Spink, B. C., Hussain, M. M., Vakharia, D. D., Pentecost, B. T. & Kaminsky, L. S. (2007) Induction of CYP1A1 and CYP1B1 by benzo(k)fluoranthene and benzo(a)pyrene in T-47D human breast cancer cells: Roles of PAH interactions and PAH metabolites. *Toxicol.Appl.Pharmacol.*
95. Tang, Y. M., Green, B. L., Chen, G. F., Thompson, P. A., Lang, N. P., Shinde, A., Lin, D. X., Tan, W., Lyn-Cook, B. D., Hammons, G. J. & Kadlubar, F. F. (2000) Human CYP1B1 Leu432Val gene polymorphism: ethnic distribution in African-Americans, Caucasians and Chinese; oestradiol hydroxylase activity; and distribution in prostate cancer cases and controls. *Pharmacogenetics* **10**, 761-766.
96. Tang, Y. M., Wo, Y. Y., Stewart, J., Hawkins, A. L., Griffin, C. A., Sutter, T. R. & Greenlee, W. F. (1996) Isolation and characterization of the human cytochrome P450 CYP1B1 gene. *J.Biol.Chem.* **271**, 28324-28330.

8. Literaturverzeichnis

97. Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G., Grisar, T., Igout, A. & Heinen, E. (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J.Biotechnol.* **75**, 291-295.
98. Tsutsumi, M., Takada, A. & Wang, J. S. (1994a) Genetic polymorphisms of cytochrome P4502E1 related to the development of alcoholic liver disease. *Gastroenterology* **107**, 1430-1435.
99. Tsutsumi, M., Wang, J. S., Takase, S. & Takada, A. (1994b) Hepatic messenger RNA contents of cytochrome P4502E1 in patients with different P4502E1 genotypes. *Alcohol Alcohol Suppl* **29**, 29-32.
100. Tuominen, R., Warholm, M., Moller, L. & Rannug, A. (2003) Constitutive CYP1B1 mRNA expression in human blood mononuclear cells in relation to gender, genotype, and environmental factors. *Environ.Res.* **93**, 138-148.
101. Uematsu, F., Kikuchi, H., Abe, T., Motomiya, M., Ohmachi, T., Sagami, I. & Watanabe, M. (1991) MspI polymorphism of the human CYP2E gene. *Nucleic Acids Res.* **19**, 5797.
102. Ulusoy, G., Arinc, E. & Adali, O. (2007) Genotype and allele frequencies of polymorphic CYP2E1 in the Turkish population. *Arch.Toxicol.* **81**, 711-718.
103. Umeno, M., McBride, O. W., Yang, C. S., Gelboin, H. V. & Gonzalez, F. J. (1988) Human ethanol-inducible P450IIE1: complete gene sequence, promoter characterization, chromosome mapping, and cDNA-directed expression. *Biochemistry* **27**, 9006-9013.
104. Valentin, H. & Essing, H. G. (1977) [Important occupational diseases and their prevention]. *Fortschr.Med.* **95**, 299-303.
105. van Duursen, M. B., Fernandez, C. R., Kocan, T., Sanderson, J. T., Kieviet, K. & van den, B. M. (2005a) No effect of CYP1B1 Val432Leu polymorphism on CYP1B1 messenger RNA levels in an organochlorine-exposed population in Slovakia. *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **14**, 755-756.
106. van Duursen, M. B., Sanderson, J. T. & van den, B. M. (2005b) Cytochrome P450 1A1 and 1B1 in human blood lymphocytes are not suitable as biomarkers of exposure to dioxin-like compounds: polymorphisms and interindividual variation in expression and inducibility. *Toxicol.Sci.* **85**, 703-712.
107. Van Vleet, T. R., Bombick, D. W. & Coulombe, R. A., Jr. (2001) Inhibition of human cytochrome P450 2E1 by nicotine, cotinine, and aqueous cigarette tar extract in vitro. *Toxicol.Sci.* **64**, 185-191.
108. Villard, P. H., Seree, E., Lacarelle, B., Therene-Fenoglio, M. C., Barra, Y., Attolini, L., Bruguerole, B., Durand, A. & Catalin, J. (1994) Effect of cigarette smoke on hepatic and pulmonary cytochromes P450 in mouse: evidence for CYP2E1 induction in lung. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **202**, 1731-1737.
109. Villard, P. H., Seree, E. M., Re, J. L., De Meo, M., Barra, Y., Attolini, L., Dumenil, G., Catalin, J., Durand, A. & Lacarelle, B. (1998) Effects of tobacco

8. Literaturverzeichnis

- smoke on the gene expression of the Cyp1a, Cyp2b, Cyp2e, and Cyp3a subfamilies in mouse liver and lung: relation to single strand breaks of DNA. *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **148**, 195-204.
110. Vineis, P. (2004) Individual susceptibility to carcinogens. *Oncogene* **23**, 6477-6483.
111. Watanabe, J., Hayashi, S. & Kawajiri, K. (1994) Different regulation and expression of the human CYP2E1 gene due to the RsaI polymorphism in the 5'-flanking region. *J.Biochem.(Tokyo)* **116**, 321-326.
112. Willey, J. C., Coy, E. L., Frampton, M. W., Torres, A., Apostolakos, M. J., Hoehn, G., Schuermann, W. H., Thilly, W. G., Olson, D. E., Hammersley, J. R., Crespi, C. L. & Utell, M. J. (1997) Quantitative RT-PCR measurement of cytochromes p450 1A1, 1B1, and 2B7, microsomal epoxide hydrolase, and NADPH oxidoreductase expression in lung cells of smokers and nonsmokers. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* **17**, 114-124.
113. Voitowitz, H. J. (1986) Berufskrankheitenproblematik aus ärztlicher Sicht. *Med.Sach.* **82**, 142-146.
114. Voitowitz, H. J. & Calavrezos, A. (1986) Krebsgefährdung am Arbeitsplatz - eine interdisziplinäre Herausforderung. *Dtsch.Med.Wschr.* **111**, 513-514.
115. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J. & Vitzthum, F. (2004) Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res.* **32**, e103.

9. Anhang

9. Anhang

Tab. 15 Bedingungen für die quantitative PCR mit GAPDH und B2M

	Temperatur [°C]		Dauer [Sek.]	Zyklen
Vorlauf	GAPDH	95	900	1
	B2M	95	900	1
Denaturierung	GAPDH	95	10	
	B2M	95	10	
Annealing	GAPDH	61	10	55
	B2M	63	10	55
Extension	GAPDH	72	25	
	B2M	72	25	
Absenken der Temperatur	GAPDH	40	10	
	B2M	40	10	
Abkühlen	GAPDH	35	30	1
	B2M	35	30	1

Tab. 16 Bedingungen für die qualitative PCR mit CYP1B1 und CYP2E1

	Temperatur [°C]		Dauer [Sek.]	Zyklen
Vorlauf	CYP1B1	95	300	1
	CYP2E1	95	600	1
Denaturierung	CYP1B1	95	5	
	CYP2E1	95	2	
Annealing	CYP1B1	59	20	55
	CYP2E1	55	10	50
Extension	CYP1B1	72	20	
	CYP2E1	72	35	
Schmelzkurve:	CYP1B1	96	2	1
		40	30	
		90		
	CYP2E1	95	2	1
		36	30	
		90		
Abkühlung	CYP1B1	35	30	1
	CYP2E1	35	30	1

9. Anhang

Tab. 17 Bedingungen für die quantitative PCR mit CYP1B1, CYP2E1

	Temperatur [°C]		Dauer [Sek.]	Zyklen
	CYP1B1	CYP2E1		
Schritt 1:				1
Vorlauf	CYP1B1	95	900	
	CYP2E1	95	900	
Schritt 2				2
Denaturierung	CYP1B1	95	10	
	CYP2E1	95	10	
Annealing	CYP1B1	67	10	
	CYP2E1	65	10	
Extension	CYP1B1	72	25	
	CYP2E1	72	25	
Schritt 3				2
Denaturierung	CYP1B1	95	10	
	CYP2E1	95	10	
Annealing	CYP1B1	65	10	
	CYP2E1	65	10	
Extension	CYP1B1	72	25	
	CYP2E1	72	25	
Schritt 4				2
Denaturierung	CYP1B1	95	10	
	CYP2E1	95	10	
Annealing	CYP1B1	63	10	
	CYP2E1	65		
Extension	CYP1B1	72	25	
	CYP2E1	72	25	
Schritt 5				45
Denaturierung	CYP1B1	95	5	
	CYP2E1	95	10	
Annealing	CYP1B1	61	10	
	CYP2E1	65	10	
Extension	CYP1B1	72	25	
	CYP2E1	72	25	
Schritt 6				1
Denaturierung	CYP1B1	95	0	
	CYP2E1	96	3	
Absenken der Temperatur	CYP1B1	40	10	
	CYP2E1	40	10	
Temperaturerhöhung 0,1 C° / Sek.	CYP1B1	90	0	
	CYP2E1	80	0	
Abkühlen	CYP1B1	35	30	1
	CYP2E1	35	30	

Fragebogen BH 1

Blutentnahme am: ___/___/___ **Beschriftung:** _____
Patienten-Daten: _____ EDTA-Röhrchen
Name: _____ Serum-Röhrchen
Vorname: _____
Geburtstag: ___/___/___ Geschlecht: m ___ w ___

Rauchgewohnheiten:

Anzahl Zigaretten pro Tag _____
Raucher seit wie vielen Jahren _____
Raucherfreie Zeit _____ Sonstige Bemerkung:
Bei Ex Rauchern : wie viele Jahre geraucht ___ Wie viele ___ Päckchen pro Tag
Passives Rauchen _____ - _____
Was wird / wurde geraucht ? Marke / Stärke _____

Rauchverhalten: Ex-Raucher ___ Raucher ___ Nie-Raucher ___
_____ - _____ Rauchdauer: ___ (Jahre) Anzahl: ___ (Zig/Tag)PJ: ___

Ernährungsgewohnheiten:

Obst/ Gemüse: sehr viel___, viel ____, normal ____, wenig ____, sehr wenig ___
Fleisch / Fisch: sehr viel___, viel ____, normal ____, wenig ____, sehr wenig ___
Fast Food: sehr viel___, viel ____, normal ____, wenig ____, sehr wenig ___
Süßigkeiten: sehr viel___, viel ____, normal ____, wenig ____, sehr wenig ___
Nahrungsergänzung (Vit./Mineralst.): _____
Mahlzeiten regelmäßig _____ oder unregelmäßig _____
Figur: schlank __, athletisch.__, normal.__, paar Kilos zu viel.__, mollig.__,

Alkoholkonsum: wie oft? _____ pro Woche,
Wein: _____ Glas
Bier: _____ Glas
Sonstiges wie Schnaps, Whiskey, Digestiva usw.: _____
Sonstige Bemerkung:

9. Anhang

Sportliche Betätigung / Freizeitgestaltung:

Anzahl der Stunden pro Woche: _____, Wie oft pro Woche: _____

Sport regelmäßig: ____ oder unregelmäßig ____

Professionell ____, mit Anleitung ____, ohne Anleitung ____

Welcher Sport wird betrieben: _____

Sonstige Bemerkung:

Hobbygifte: _____

Sonneneinwirkung in Freizeit und Urlaub: _____

Arbeitsplatz:

Beruf: _____

Arbeitszeit in Stunden pro Tag: _____

Gefahrenstoffeinwirkung: _____

Art der Einwirkung: _____

Erkrankungen:

Sind Erkrankungen bekannt: _____. Wenn ja, welche _____

Akut: ____ Chronisch: ____

Gibt es familiär gehäufte Erkrankungen; _____. Wenn ja, welche _____

Krebserkrankungen in der Familie: _____

Einwirkung von Fremdstoffen und genetischen Eigenschaften auf die Aktivität von Enzymen im Hinblick auf Lungenkrebserkrankungen

Aufklärungsbogen und Einwilligungserklärung

Vollständige Bezeichnung des Forschungsvorhabens:

Genexpressionsanalyse fremdstoffmetabolisierender Enzyme u.a. Cytochrom- und Glutathion-S-Transferasen unter dem Einfluss von endogenen und exogenen Faktoren

Verantwortlicher Träger und Leiter des Forschungsvorhabens:

Herr Prof. Dr. Schneider, Frau Dr. Helmig

Proband/in (Name, Vorname):

....., geb. am Teiln.-Nr.
.....

Sehr geehrte Probandin, sehr geehrter Proband,

unsere Arbeitsgruppe ist sehr daran interessiert, neue wissenschaftliche Erkenntnisse in dem oben genannten Forschungsvorhaben zu gewinnen. Wir wären Ihnen daher sehr dankbar, wenn Sie sich zu einer Teilnahme bereit erklären würden. Diese ist selbstverständlich freiwillig, Sie werden in dieses Forschungsvorhaben also nur dann einbezogen, wenn Sie Ihre Einwilligung erklären. Um Sie über das Vorhaben und über die etwaigen Vorteile und Risiken Ihrer Teilnahme zu informieren, wird der verantwortliche Arzt ein ausführliches Gespräch mit Ihnen führen. Vor diesem Gespräch möchten wir Sie bitten, die nachfolgenden Ausführungen zu lesen. Sie können sich dadurch bereits einen eingehenden Überblick verschaffen.

Das Forschungsvorhaben

Worum geht es?

Im Rahmen des Vorhabens ist geplant, bei Ihnen einmalig ca. 20 ml Blut venös (aus dem Arm) zu entnehmen. Aus diesem Blut wird dann im weiteren die RNA und die DNA

9. Anhang

gewonnen, um so eine Aussage über die Aktivität von Enzymen und über die individuellen genetische Eigenschaften machen zu können. Wir wollen herausfinden inwiefern sich die Aktivität von Enzymen durch äußere Einwirkungen z.B. Rauchen ändert und welchen Einfluss genetische Eigenschaften auf die Aktivität dieser Enzyme haben. So kann zukünftig ein individuelles Lungenkrebsrisiko besser abgeschätzt werden und bei der Vorsorge sowie der Diagnosestellung berücksichtigt werden.

Bringt mir die Teilnahme persönliche Vorteile?

Ihre Teilnahme ist mit **keinerlei persönlichen Vorteilen** für Sie verbunden. Ihre Teilnahme ermöglicht uns jedoch den Gewinn neuer Erkenntnisse durch Forschung zum Nutzen zukünftiger Patienten. Mit Ihrer Teilnahme leisten Sie also einen uneigennütigen Beitrag zur Förderung des medizinischen Fortschritts.

Welche Risiken und Belastungen sind zu befürchten?

Das zu untersuchende Blut wird aus einer Vene des Unterarms (V. cubitalis) entnommen. Der kleine Einstich (Punktion) ist in der Regel harmlos und verursacht keine Probleme.

Es ist nicht auszuschließen, dass es im Rahmen der Blutentnahme zur Entstehung von **Hämatomen** (blauen Flecken) an der Entnahmestelle kommen kann.

In sehr seltenen Fällen kann es zu einer **Thrombophlebitis** (Entzündung des Blutgefäßes) kommen.

Eine **verlängerte Blutung** ist nur bei Gerinnungsstörungen oder bei der Einnahme blutverdünnender Medikamente zu befürchten.

Um diese Risiken zu minimieren, werden wir besondere Sorgfaltspflicht walten lassen. Die Blutentnahme wird fachgerecht durchgeführt werden. Vor der Entnahme wird das betroffene Gebiet sorgfältig desinfiziert, um so Infektionen und Entzündungen vorzubeugen. Nach der Entnahme wird mit einem sterilen Tupfer Druck auf die Entnahmestelle ausgeübt werden, um einer Blutung sowie der Entstehung von Hämatomen vorzubeugen.

Bei fachgerechter Blutentnahme sind Risiken und Nebenwirkungen eigentlich selten. Kleinere Blutergüsse (Hämatome) sind zumeist harmlos und verschwinden in der Regel nach kurzer Zeit. Stärkere Blutungen oder Infektionen der Punktionsstelle treten äußerst selten auf. Kreislaufempfindliche oder ängstliche Patienten sollten während der Blutentnahme liegen.

Patienten, die mit gerinnungshemmenden Medikamenten (wie Cumarine oder Heparin) dauerbehandelt werden, sollten vor einer Blutentnahme darauf hinweisen. In diesem Fall ist eine längere Kompressionszeit der Vene nach der Punktion sinnvoll. Bei einigen

9. Anhang

Erkrankungen (z. B. Lähmungen, Hauterkrankungen) sollten Blutentnahmen in den betroffenen Bereichen vermieden werden.

Woran ist noch zu denken?

Ihre persönlichen Daten werden geschützt.

Die Durchführung des Forschungsvorhabens erfordert es, dass von Ihnen personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über Ihre Gesundheit, erhoben, aufgezeichnet und verarbeitet werden. Die erhobenen Daten werden für die **wissenschaftliche Auswertung** des Forschungsvorhabens verwendet, für die **Überwachung** des Forschungsvorhabens durch die zuständigen Überwachungsbehörden sowie für die **Archivierung** der Forschungsergebnisse. Die Verwendung der Daten kann darüber hinaus auch für einen **Antrag auf Zulassung eines Arzneimittels** bei der zuständigen Arzneimittelzulassungsbehörde erforderlich sein oder für eine **Veröffentlichung** der Forschungsergebnisse (beispielsweise in medizinischen Fachzeitschriften).

Die Erhebung, Verarbeitung, Weitergabe und Speicherung der Daten unterliegen strengen **spezialgesetzlichen Bestimmungen**, die restriktiv eingehalten werden. Dementsprechend erfolgt eine Weitergabe und Einsichtnahme Ihrer personenbezogenen Daten nur durch die zuständigen Überwachungsbehörden und durch zur Verschwiegenheit verpflichtete Mitarbeiter der Einrichtung, die die Durchführung des Forschungsvorhabens finanziell fördert. Im übrigen unterliegen Ihre Daten den allgemeinen Bestimmungen des **hessischen Datenschutzgesetzes**. Insbesondere eine Veröffentlichung der Daten in wissenschaftlichen Publikationen erfolgt nur, wenn zuvor jeder Bezug zu Ihrer Person unkenntlich gemacht worden ist, entweder durch **Anonymisierung** oder durch Verwendung eines anderen Namens, also eines **Pseudonyms**.

Ansprechpartner für die Verwaltung Ihrer Daten ist: Frau Dr. Helmig, Institut für Arbeits- und Sozialmedizin, Aulweg 129, 35392 Gießen, Tel.: 06419941315, Fax: 06419941309, email: simone.helmig@arbmed.med.uni-giessen.de

Es besteht Versicherungsschutz.

Um den gesetzlichen Vorgaben zu genügen, wurde für die Studie **rein vorsorglich** eine Versicherung abgeschlossen, die im Interesse der Teilnehmer etwaige Schäden abdeckt. Bitte beachten Sie, dass Sie **bei Auftreten einer Gesundheitsschädigung**, die Folge des Forschungsvorhabens sein könnte, gehalten sind, diesen Schaden dem Versicherer unverzüglich anzuzeigen. In einem solchen Fall sind Sie zudem gehalten, zweckmäßige

9. Anhang

Maßnahme zu treffen, die der Aufklärung der Ursache und des Umfangs des eingetretenen Schadens und der Minderung dieses Schadens dienen. Ausführlichere Informationen hierüber erhalten Sie im Arztgespräch, auch darüber, wie Sie sich verhalten müssen, um Ihren Versicherungsschutz nicht zu gefährden. Auf Wunsch können Sie auch gerne Einsicht in die Versicherungsbedingungen nehmen.

Sie können Ihre Teilnahme jederzeit beenden.

Wenn Sie aus dem Forschungsvorhaben ausscheiden möchten, können Sie Ihre Einwilligung jederzeit und **ohne Angabe von Gründen** widerrufen. Durch den Widerruf entstehen Ihnen **keinerlei Nachteile**.

Zum Zeitpunkt Ihres Widerrufs bereits erhobene **personenbezogene Daten** werden von Ihrem Widerruf jedoch nur dann erfasst, wenn deren weitere Verwendung nicht erforderlich ist. Häufig ist eine solche **weitere Verwendung** der bereits erhobenen Daten jedoch erforderlich, um die **wissenschaftliche Auswertung** des Forschungsvorhabens nicht zu gefährden. Sollten bei Ihrem Ausscheiden aus dem Forschungsvorhaben bereits einzelne Maßnahmen bei Ihnen durchgeführt worden sein, läge eine Löschung der bereits erhobenen Daten auch gar nicht **in Ihrem eigenen Interesse**. Denn sollten im Nachhinein Risiken oder Nebenwirkungen dieser Maßnahmen bekannt werden, können wir Sie nur dann über eine medizinische Nachsorge informieren, wenn uns zu diesem Zeitpunkt Ihre Daten noch vorliegen.

Wir werden daher im Fall eines Widerrufs **unverzüglich prüfen**, ob Ihre Daten aus den genannten Gründen weiter benötigt werden. Sollte dies nicht der Fall sein, werden Ihre Daten je nach den technischen Gegebenheiten umgehend gesperrt, gelöscht oder vernichtet. Andernfalls werden Ihre Daten erst mit Wegfall der genannten längerfristigen Verwendungszwecke gelöscht, unabhängig hiervon jedoch spätestens mit Ablauf der vorgeschriebenen Aufbewahrungsfrist.

Einwilligungserklärung

Ich habe mir anhand des ausgehändigten Aufklärungsbogens einen Überblick über das Forschungsvorhaben verschafft.

Anschließend hat Dr. am um Uhr ein ausführliches Gespräch mit mir geführt. Gegenstand des Gesprächs war insbesondere

- der nähere Inhalt und der praktische Ablauf des Vorhabens, vor allem

.....

die Fragestellung des Projektes.....;

- die Frage, inwieweit Vorteile, Risiken oder Belastungen zu erwarten sind, vor allemdie Blutentnahme betreffend.....;

- Fragen des Daten- und Versicherungsschutzes sowie der Hinweis auf mein jederzeitiges Widerrufsrecht.

Ich hatte Gelegenheit, Fragen zu stellen, und habe eine Kopie der vorliegenden Unterlagen erhalten. Anschließend wurde mir ausreichend Zeit gewährt, um in Ruhe über meine Teilnahme nachzudenken. Derzeit habe ich keine weiteren Fragen.

Mit der Teilnahme an dem Forschungsvorhaben bin ich einverstanden.

Meine Einwilligung umfasst auch die beschriebene Verwendung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere die Erhebung und Verarbeitung von Angaben über meine Gesundheit.

.....

.....
(Ort, Datum)

.....

(Unterschrift Proband/in)

Vielen Dank für Ihre Hilfe! Selbstverständlich werden wir Sie umgehend informieren, falls im Verlauf des Forschungsvorhabens Informationen bekannt werden, die Ihre Bereitschaft zur weiteren Mitwirkung beeinflussen könnten.

.....
(Ort, Datum) (Unterschrift Untersuchungsleiter / Stellvertreter)

10. Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünfte beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zu Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

12. Danksagung

12. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bedanken bei:

meinem Doktorvater

Prof. Dr. med. Joachim Schneider

für die Überlassung des Themas, die nette Betreuung sowie die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Dr. Simone Helmig

für die Einführung in die Molekularbiologie und die ständige unermüdliche Betreuung meiner experimentellen Arbeit.

Frau Johanna Döhrel, Frau Anika Seipp, Frau Monika Philipp-Gehlhaar

für die sehr freundliche und immer hilfsbereite Unterstützung im molekularbiologischen Labor.

Meiner Familie

für die Ermöglichung meines Werdegangs und der jederzeit bereitwillig gewährten Unterstützung während der Anfertigung dieser Arbeit und meines gesamten Studiums.

Meinem Freund Dr. Lutz Harnack

für seine große Hilfe bei computertechnischen Problemen sowie seiner moralischen Unterstützung.