

**Assoziation des *x-ray repair cross-complementing gene 1*
Codon 399-Polymorphismus mit Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinomen**

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

vorgelegt von
Robert Kevin Primke
aus Chicago, USA

2008

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Privatdozent Dr. med. T. Neuhaus
2. Gutachter: Professor Dr. med. N. Wernert

Tag der Mündlichen Prüfung: 29.04.2008

Aus der Medizinischen Universitäts-Poliklinik
Direktor: Prof. Dr. med. H. Vetter

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	07
2	Einleitung	09
2.1	Epidemiologie der Kopf-Hals-Tumoren	09
2.2	Risikofaktoren	10
2.3	Ablauf der Kanzerogenese	12
2.4	Protoonkogene und Tumorsuppressorgene	13
2.5	Reparatur von DNA-Schäden	14
2.6	Suszeptibilitätsfaktoren	15
2.7	<i>XRCC1</i>	16
2.7.1	Das Gen	16
2.7.2	Funktion des Proteins	17
2.7.3	Mutation	19
2.7.4	Die SNPs von <i>XRCC1</i>	20
2.7.5	Genetikstudien	22
2.8	Zielsetzung der Arbeit	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Studienkollektiv und Probenmaterial	25
3.2	Konventionelle PCR	25
3.3	Primer-Test	26
3.4	Real-Time-PCR-Technik	27
3.4.1	Mutationsanalyse	29
3.5	Gelelektrophorese	30
3.6	Sequenzierung	31
3.7	Genotyp-Analysen	32
3.8	Statistische Auswertungen	32
4	Ergebnisse	33
4.1	Genotypverteilung des <i>XRCC1</i> Codon 399-Polymorphismus unter den Kontrollen und Fällen der Head-Neck-Studie	33
4.2	Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Raucherstatus	34

Inhaltsverzeichnis (Fortsetzung)

4.3	Genotypverteilung bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen	36
4.4	Abbildungen Genotypverteilungen	37
5	Diskussion	39
5.1	Verteilung des <i>XRCC1</i> Codon 399-Polymorphismus unter Kontrollen und Patienten	41
5.2	Bedeutung des Risikofaktors Rauchen	46
5.3	Anmerkungen zur Head-Neck-Studie	47
6	Zusammenfassung	50
7	Literaturverzeichnis	52
8	Danksagung	61

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen:

A	Adenin
AP	Apurin/ Apyrimidin
APE1	AP Endonuklease
ARCAGE	Alcohol related cancers and genetic susceptibility in Europe
Arg	Arginin
BER	base-excision repair
BRCT I	breast cancer susceptibility protein-1
C	Cytosin
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DNA	Desoxynucleinacid
dNTP	Desoxnukleosidtriphosphat
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
Gln	Glutamin
G-Phase	Gap-Phase
His	Histidin
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
IARC	International Agency for Research on Cancer
kDA	kiloDalton
KI	Konfidenzintervall
Lig3	DNA-Ligase III
LOH	Loss of heterozygosity

Mt	Mutante
NER	nucleotide-excision repair
NLS	nuclear localisation signal
OR	Odds Ratio
PARP1	Poly-ADP-Ribose Polymerase-1
PCR	polymerase chain reaction
Pol β	DNA-Polymerase β
PNK	Polynukleotidkinase
RB-Gen	Retinoblastom-Gen
s	Sekunden
SNP	single nucleotide polymorphism
S-Phase	DNA-Synthese-Phase
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
Trp	Tryptophan
Wt	Wildtyp
XRCC1	x-ray repair cross-complementing gene 1

2 Einleitung

2.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Tumoren

In den Industrienationen gehört Krebs heute nach den Herz-Kreislaufkrankungen zu den häufigsten Todesursachen. Nach den Zahlen des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden starben in Deutschland im Jahr 2005 396.622 Menschen an Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems, während 216.928 Menschen bösartigen Neubildungen erlagen (Statistisches Bundesamt, 2007b). Da die Mortalität bei Kreislaufkrankungen weiter abnimmt bei gleichzeitigem Zuwachs der Mortalitätsraten bei den malignen Neoplasien, ist damit zu rechnen, dass in 15-20 Jahren Krebs die häufigste Todesursache sein wird (Becker und Warendorf, 1998).

Kopf-Hals-Tumore machen 6% aller Malignome aus. Sie rangieren damit an achter Stelle der Krebserkrankungen weltweit und sind in den Entwicklungsländern sogar die sechsthäufigste Krebsart (Jemal et al., 2006; Parkin et al., 2005). Sie stellen in der EU die vierthäufigste Krebserkrankung dar. In den 15 Staaten der EU erkrankten jährlich ca. 80.000 Menschen an Tumoren der oberen Luft- und Speisewege, ca. 40.000 versterben daran, und die Inzidenz dieser Krebserkrankung steigt weiter an. Trotz Verbesserungen in der Diagnostik und Therapie in den letzten 20 Jahren ist die 5-Jahres-Überlebensrate mit ca. 50% weiterhin sehr gering (Biolchini et al., 2005; Hardisson, 2003). Dabei sind das Erkrankungsalter, der Allgemeinzustand und der Lymphknotenstatus die ausschlaggebenden Faktoren für die Prognose der Patienten. Männer sind vier- bis fünfmal häufiger betroffen als Frauen, wobei deren Anteil aufgrund ihres zunehmenden Tabakkonsums in den letzten Jahren ansteigt (Lampert und Burger, 2004). Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen der fünften und sechsten Lebensdekade.

Die anatomischen Regionen, in denen das Kopf-Hals-Karzinom auftritt, sind neben Lippe, Mundhöhle, großer Speicheldrüse und Pharynx auch der Larynx sowie der zervikale Ösophagus. Mehr als 95% der Neoplasien sind gut bis mäßig differenzierte Plattenepithelkarzinome (Hardisson, 2003). Deshalb wird in dieser Arbeit der in der englischsprachigen Literatur benutzte Terminus „head and neck squamous cell carcinoma“ (HNSCC) verwendet. Diese Malignome neigen sowohl zur Lymphknoten- als auch zur Fernmetastasierung. Einzige Ausnahme bilden die Tumore der Speicheldrüsen, bei denen es sich überwiegend um pleomorphe Adenome, adenoid-zystische Karzinome und Mukoepidermoidkarzinome handelt (Hussey et al., 1991).

2.2 Risikofaktoren

Die Entstehung von Krebserkrankungen ist multifaktoriell. In der Ätiologie von Kopf-Hals-Tumoren spielen exogene Noxen eine wesentliche Rolle, wobei Tabak eines der bedeutendsten Kanzerogene ist. Im Tabakrauch sind zwischen 50 bis 60 kanzerogene Stoffe enthalten (Hecht 2003). Chronischer Nikotinabusus wirkt besonders durch die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe mutagen (National Center for Chronic Disease Prevention and Health, 1994). Bereits der orale Genuss von Tabak in Form von Kautabak stellt ein Risiko dar (Probst et al., 2000). Raucher erkranken an malignen Neoplasien des Mundes und des Rachens bis zu sechsmal häufiger als Nichtraucher.

Zudem wird dem Konsum besonders hochprozentiger Spirituosen eine kanzerogene Potenz zugesprochen. Alkohol scheint als eine Art Lösungsmittel für andere Kanzerogene zu fungieren oder möglicherweise generiert und exazerbiert es eine bestehende Entzündung, wodurch eine Vielzahl reaktiver Oxydantien entstehen (Boffetta und Hashibe, 2006; Wight und Ogden, 1998). Somit erleichtert es scheinbar auch den kanzerogenen Stoffen des Tabaks, in das gesunde Gewebe der oralen Mukosa einzudringen (Peters et al., 2006). Studien, die Tabak- und Alkoholkonsum gemeinsam untersuchen, zeigen, dass sich durch die Kombination der beiden Faktoren das Risiko für die Entstehung einer Neoplasie addiert (Synkanzerogenese). Gemeinsam sind sie für 75-90% der Kopf-Hals-Tumoren verantwortlich (Huang et al., 2005; Tuyns et al., 1988; Sankaranarayanan et al., 1998). Die genauen kanzerogenen Mechanismen sind jedoch noch unklar (Huang et al., 2005).

Nach den Daten des Statistischen Bundesamtes raucht jeder dritte Erwachsene und jeder Zehnte stark. Es gibt zwar noch mehr männliche Raucher, aber während das Rauchverhalten der Männer seit Mitte der 1980er Jahre leicht rückläufig ist, nimmt es bei Frauen zu. (Statistisches Bundesamt, 2007a). Jede sechste Frau und jeder dritte Mann in Deutschland konsumieren Alkohol in Mengen, die mit einem erhöhten Gesundheitsrisiko einhergehen. Der unterschiedliche Umgang mit diesen beiden Noxen verdeutlicht, warum Männer häufiger erkranken als Frauen (Ragin et al., 2007).

Eine weitere entscheidende Säule bei der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren ist die genetische Disposition (Sturgis et al., 1999). Die Relevanz der genetischen Komponente wird besonders dann deutlich, wenn man bedenkt, dass nur ein relativ geringer Anteil der Raucher tatsächlich ein Kopf-Hals-Karzinom entwickelt, obwohl Tabak das wohl wichtigste Mutagen in der Kanzerogenese dieser Neoplasie ist (Landis et al., 1998).

Unterstrichen wird dies dadurch, dass bei Untersuchungen in Familien von Patienten mit einem Kopf-Hals-Tumor festgestellt wurde, dass deren Verwandte ersten Grades ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung von Kopf-Hals-Tumoren haben (Shi et al., 2000).

Des Weiteren gibt es eine Vielzahl anderer Komponenten, die bei der Genese von HNSCC eine Rolle spielen, deren Einfluss jedoch von untergeordneter Bedeutung zu sein scheint. So gelten mangelhafte Mund- und Zahnhygiene als Kofaktoren, die eine maligne Entartung begünstigen. Dies kommt vorrangig bei der Entstehung des Mundhöhlenkarzinoms zum Tragen (Maier et al., 1993).

Eine einseitige Ernährungsweise stellt einen weiteren Risikofaktor dar. Besonders der geringe Verzehr von frischem Obst und Gemüse ist hierbei entscheidend. In epidemiologischen Studien ist festgestellt worden, dass regelmäßiger Konsum von Vitamin C in Form von Zitrusfrüchten hingegen protektiv wirkt (Esteve et al., 1996; Kjaerheim et al., 1998). Ähnlich wie Vitamin C verfügen auch Vitamin E, Carotin und pflanzliche Öle mit einem hohen Anteil an mehrfach ungesättigten Fettsäuren über eine solch schützende Funktion (Suzuki et al., 2006). Der vermutete Mechanismus dieser antikanzerogenen Aktivität beinhaltet antioxidante Eigenschaften, Aktivierung von Kanzerogen-entgiftenden-Enzymen (carcinogene-detoxifying enzymes) und die Inhibition von Tumorzellproliferation (McCullough und Giovannucci, 2004).

Andere epidemiologische Studien deuten auf eine Risikoerhöhung für HNSCC bei beruflicher Exposition gegenüber bestimmten inhalativen Schadstoffen und Arbeitsstoffen hin. Shangina et al. stellte ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Hypopharynx- und Larynxkarzinome fest bei der Exposition gegenüber Kohlenstaub, Stahlstaub, Hartmetallstaub und chlorierten Verbindungen (Shangina et al., 2006). Die Exposition in der Baubranche, insbesondere gegenüber Asbest und Zementstäuben, sowie gegenüber Kühlschmierprodukten, Steinkohle- und Teerprodukten spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Karzinome der oberen Luftwege (Maier et al., 1990; Wong et al., 2003). Auch die berufliche Exposition gegenüber Holzstäuben stellt eine Risikoerhöhung für Tumore des Kopf-Hals-Bereiches dar (Demers et al., 1995).

Daneben gelten die Präkanzerosen Leukoplakie, Erythroplakie und Pachydermie im Larynx als Risikofaktoren mit einem erhöhten Entartungsrisiko. Desgleichen muss eine Epithelveränderung auf dem Boden einer chronischen Laryngitis als prädisponierender Faktor für ein Larynxkarzinom angesehen werden (Probst et al., 2000).

Außerdem können DNA-Viren onkogen wirken. Bei den Epstein-Barr- und Papillomaviren vermutet man eine ätiologische Beteiligung. Ihre genaue Rolle bei der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren ist jedoch derzeit noch nicht geklärt (Kleist et al., 2004; Mao und Hong, 2004).

2.3 Ablauf der Kanzerogenese

Die Ätiologie von Karzinomen beruht auf aggressiven und unkontrollierten Wachstums- und Teilungsvorgängen von entarteten Zellen. Dabei ist die pathologische Veränderung nur einer Körperzelle ausreichend, um die Tumorentstehung zu induzieren (monoklonales Wachstum). Die Entartung einer Zelle kann bedingt sein durch die Einwirkung von chemischen oder physikalischen Noxen als auch durch spontane Mutation. Bei einigen malignen Neoplasien spielt ferner die genetische Prädisposition eine wichtige Rolle. Zudem werden virale Infektionen für die Entartung einer Zelle verantwortlich gemacht.

Das Mehrstufenmodell von Shields und Harris beschreibt die vierstufige Entwicklung der Krebsentstehung durch Chemikalien und andere Kanzerogene (Shields und Harris, 1991).

Am Anfang der Kanzerogenese steht die *Initiation*, in der die gesunde Körperzelle in die Tumovorläuferzelle übergeht. Grund dafür ist die irreversible Schädigung der DNA durch ein genotoxisches Kanzerogen. Solange es noch nicht zu einer Übertragung auf die Tochterzelle gekommen ist, kann der Schaden von zellulären Reparaturmechanismen behoben werden. Sonst sind die dadurch entstehenden Mutationen in der Lage, Onkogene zu aktivieren und/ oder Tumorsuppressorgene zu inaktivieren. Beide Mechanismen spielen bei der Ätiologie von malignen Neoplasien eine wichtige Rolle.

Die Initiation hängt linear von der Dosis der schädigenden chemischen, ionisierenden oder viralen Noxe ab. Komplette Kanzerogene können die Zielzelle ohne Mithilfe weiterer Kofaktoren (Kokanzerogene oder Promotoren) maligne transformieren. Bei der Synkanzerogenese wird die Tumorauslösung durch gleichzeitiges oder aufeinanderfolgendes Einwirken mindestens zweier kanzerogener Stoffe verstärkt. Dabei addiert sich die Wirkung von inkompletten und kompletten oder zwei kompletten Kanzerogenen. Dies ist insbesondere dadurch möglich, dass beide krebserregende Stoffe im gleichen Organ den Tumor auslösen können.

Die *Latenzzeit* beschreibt die schrittweise Transformation einer somatischen Zelle zu einem Karzinom. Diese Entwicklung kann bis zu 20 Jahren dauern.

Während der *Promotion* findet die Etablierung des Genschadens in den Tochterzellen durch Proliferation initiiertter Zellen statt. Außerdem gibt es nicht-genotoxische Kanzerogene (epigenetische Faktoren), die als Kofaktoren die Wirkung von schwachen Kanzerogenen verstärken. Diese Noxen bezeichnet man als Tumorpromotoren, welche die Kanzerogenese zwar nicht auslösen, aber entscheidend vorantreiben können. Nach vorheriger Initiation kann dadurch die Latenzzeit verkürzt werden.

In der *Progressionsphase* kommt es schließlich zur irreversiblen Proliferation pathologisch veränderter Zellklone, was auch makroskopisch sichtbar ist. Im weiteren Verlauf dieses Abschnitts erfolgt die Ausbreitung und Metastasierung der Tumorzellen (Riede, 1995).

2.4 Protoonkogene und Tumorsuppressorgene

Zelluläre Wachstums- und Differenzierungsvorgänge unterliegen der Kontrolle von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen. Die eigentliche Funktion der zellulären Onkogene ist die Regulierung und Differenzierung des Zellwachstums. Durch Mutation oder Fehlregulation der Allele ändern sie ihre Funktion und können eine Tumorentstehung induzieren. In Abhängigkeit davon, für welches Protein sie kodieren, kommt es in der Folge zur gestörten Synthese von Wachstumsfaktoren, Wachstums-Rezeptoren oder Signalproteinen.

Da die Protoonkogene dominant wirksam sind, wird bereits durch Mutation in einem Allel eine Überexpression der Genprodukte ausgelöst. Ursachen, die die Aktivierung von Onkogenen begünstigen, sind Punktmutationen, Deletionen, chromosomale Translokationen und Genamplifikationen (Lepeniev, 2000).

Während man im Rahmen der alterierten Onkogene in nur einem Allel von der „one-hit“-Hypothese spricht, sind bei der Mutation der Tumorsuppressorgene Veränderungen in beiden Allelen notwendig („two-hit“-Hypothese).

Unter physiologischen Bedingungen inhibieren die rezessiven Anti-Onkogene Proliferationsvorgänge, unterbrechen den Zellzyklus und fördern dadurch die Zelldifferenzierung. Erst durch die Alteration beider Allele werden die Tumorsuppressorgene inaktiviert und es findet kein kontrolliertes Zellwachstum mehr statt. Der bekannteste Vertreter eines Tumorsuppressorgens ist p53. Der humane Tumorsuppressor p53 reagiert auf einen DNA-Schaden, indem er den Zellzyklus in der G1- oder G2-Phase anhält, bis der Schaden behoben ist. Ist keine Korrektur möglich, kann p53 Zielzellen aktivieren, die die Apoptose auslösen (Crowe et al., 2002)

Alfred Knudson erklärte die „two-hit“-Hypothese anhand der Entstehung des erblichen Retinoblastoms (Knudson, 1971). Dieses Karzinom manifestiert sich bei Kindern, bei denen das Chromosom 13q14 pathologisch verändert ist. Bei Patienten dieses seltenen malignen Augentumors findet die erste Mutation („hit“) auf Keimzellebene statt, so dass alle Körperzellen diese Genomveränderung aufweisen. Dieser so genannten konstitutionellen Mutation steht die somatische Mutation gegenüber, bei der nur eine Körperzelle betroffen ist. Es kommt jedoch noch nicht zur Tumorentstehung, da die Patienten weiterhin über ein funktionstüchtiges Retinoblastom-Gen (RB-Gen) verfügen. Der Zeitraum bis zur Muta-

tion des noch intakten Tumorsuppressorallels kann sehr groß sein. Aufgrund des zweiten Ereignisses kommt es zum Heterozygotie-Verlust (LOH), wodurch schließlich der Funktionsausfall des Retinoblastom-Gens erfolgt. Autonomes, unkontrolliertes Zellwachstum ist die Folge. Im Gegensatz dazu entwickelt sich die sporadische Form des Tumors erst, nachdem zwei separate Ereignisse in derselben Zelle beide Kopien des RB-Gens untüchtig gemacht haben.

Die „two-hit“-Hypothese gilt für alle Tumordispositionserkrankungen, die durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen bedingt sind. So findet sie z.B. auch bei der Ätiologie von familiären Melanomen, familiärer Polyposis coli und Wilms-Tumoren ihre Anwendung.

2.5 Reparatur von DNA-Schäden

In den meisten Zellen wird die DNA regelmäßig durch endogene oder exogene Noxen geschädigt. Dadurch treten im Rahmen der Replikation der DNA häufig somatische Mutationen auf. Ein nicht korrigierter Schaden kann in Apoptose (programmierter Zelltod) oder unreguliertem Zellwachstum resultieren. Wird der DNA-Defekt erkannt, besitzt die Zelle verschiedene Möglichkeiten, damit es nicht zur Replikation der geschädigten DNA kommt. Auf zellulärer Ebene können Checkpoints aktiviert werden, die den Zellzyklus anhalten, die Transkription kann zur Kompensation des Defektes hochgefahren werden oder der Zelltod wird eingeleitet (Vispe et al., 2000).

Die eukaryote Zelle verfügt außerdem über ein komplexes DNA-Reparatursystem, welches Schäden erkennt und beseitigt. Dadurch wird die Häufigkeit von Mutationen auf ein gewisses Maß begrenzt, und die Replikation kann somit wie geplant ablaufen. Die Reparatur bedarf der Verfügbarkeit einer Vielzahl von funktionstüchtigen Enzymen. Dadurch wird die genetische Integrität gewahrt und ein kanzeröses Zellwachstum verhindert (Goode et al., 2002).

Es gibt verschiedene Mechanismen der DNA-Reparatur, die spezifisch jeweils einen bestimmten DNA-Schaden beheben. So agiert die Basen-Exzisions-Reparatur (BER, base-excision repair) an kleinen DNA-Läsionen, an denen einzelne Basen durch Oxidantien oder alkylierende Substanzen geschädigt sind. Eine DNA-Glykosylase trennt die betroffene Base aus dem DNA-Strang heraus, wodurch eine abasische Stelle entsteht (Vidal et al., 2001). Diese DNA-Abschnitte stellen ein sehr hohes Mutationsrisiko für die Zelle dar, denn bei jeder Replikation kann an einer basenfreien Stelle ein beliebiges Nukleotid eingebaut werden. Mit Hilfe einer Endonuklease, die den abasischen Abschnitt entfernt, wird der Schaden behoben. Die Lücke wird durch eine DNA-Polymerase verschlossen und durch

eine Ligase schließlich versiegelt (Knippers, 1997).

Wenn es zum Einbau falscher Nukleotide kommt, wird die Geometrie der DNA verändert. Zudem kommt es in solch einem Fall häufiger zur Lösung der Wasserstoffbrücken des Nukleotids im Matrizenstrang. Das erkennt die 3`-5`-Exonuklease, die ebenfalls zur Ausstattung der eukaryonten Zelle gehört. Nach Erkennung sorgt das Enzym für die Entfernung der geschädigten DNA. Anschließend wird wieder mit Hilfe einer DNA-Polymerase ein neuer DNA-Strang synthetisiert. Dieser Vorgang wird unter dem Begriff des nucleotide-excision repair (Nukleotid-Exzisions-Reparatur, NER) zusammengefasst.

Gelingt die Entfernung eines falsch eingebauten Nukleotids nicht, kommt es zu Falschpaarungen (Mismatches) in der replizierten DNA. Auch Insertionen oder Deletionen können für Mismatches verantwortlich sein. In diesem Fall bindet das Mismatch-Reparatur-Protein hMSH2 an die Stelle mit der falsch gepaarten Base (Passarge, 2004). Der betroffene DNA-Strang wird von der Helikase II aufgetrennt und die Exonuklease I entfernt die falsche Base. DNA mit der richtigen Basenpaarung wird von der DNA-Polymerase III synthetisiert und eingesetzt. Als letzter Schritt der postreplikativen Reparatur schließt eine Ligase die letzte Phosphodiester-Bindung.

Doppelstrangbrüche in der DNA können durch Fehler in der Replikation oder durch Einflüsse exogener Noxen wie ionisierende Strahlen hervorgerufen werden. Die Korrektur solcher Schäden ist weitaus komplizierter, da kein komplementärer Strang für die neu zu synthetisierende DNA vorliegt (Khanna und Jackson, 2001). Eine Möglichkeit der Reparatur ist die homologe Rekombination. Dabei wird die betroffene DNA herausgetrennt und die neuen 3`-Enden lagern sich an ein Nachbarmolekül mit unbeschädigter DNA. Ein Proteinkomplex repariert schließlich den Doppelstrang-Bruch durch homologe Rekombination mit Hilfe aktivierter Enzyme (Goode et al., 2002).

Doppelstrangdefekte, die nicht durch homologe Rekombination behoben werden können, korrigiert die eukaryonte Zelle durch Ligatur der beiden intakten Enden. Dafür ist wiederum eine Vielzahl von Proteinen notwendig.

2.6 Suszeptibilitätsfaktoren

Die Schäden und Folgen für den menschlichen Organismus, die durch kanzerogene Substanzen verursacht werden, hängen auch von individuellen Faktoren ab. Diese werden als Suszeptibilitätsfaktoren bezeichnet, bedingt durch eine unterschiedliche Enzymausstattung des DNA-Reparatursystems und des fremstoffmetabolisierenden Systems. Die molekulare Epidemiologie untersucht sowohl die Folgen einer Exposition gegenüber Kanzerogenen

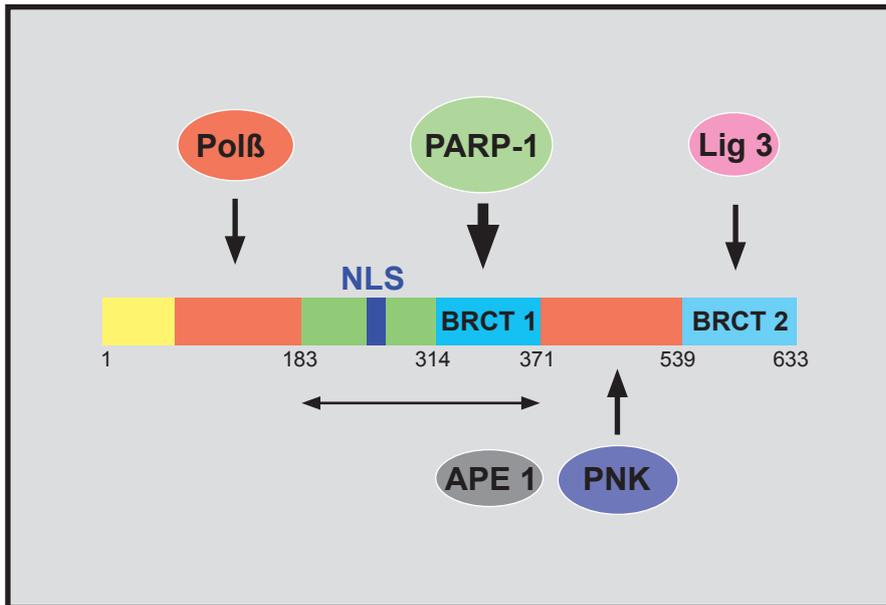
als auch angeborene und erworbene Faktoren, die zum Auftreten von Krebserkrankungen prädisponieren. Das Ziel ist die Erstellung eines individuellen Risikoprofils, welches für die Krebs-Prävention von großer praktischer Relevanz ist. So können Mutationen in den Genen, die für die Nukleotid-Exzisions Reparatur verantwortlich sind, z.B. gehäuft Xeroderma pigmentosum hervorrufen. Patienten mit dieser Krankheit neigen bei erhöhter Sonnenlicht-Exposition zur Bildung eines Basalzell-Karzinoms (Tuteja und Tuteja, 2001). Individuen mit Mutationen in den Enzymen der Mismatch-Reparatur besitzen ein gesteigertes Risiko für die Entstehung eines erblichen nicht-polypösen Kolonkarzinoms (Peltomaki, 2001). Mutationen in BRCA1 und BRCA2 können ebenfalls für eine Tumorentstehung verantwortlich sein. Diese Gene wirken bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen mit, und ihr Ausfall geht mit einem erhöhtem Risiko für Brustkrebs einher (Venkitaraman, 2002).

Die Enzyme des DNA-Reparatursystems gehören aufgrund ihrer polymorphen Varianten zu den angeborenen Suszeptibilitätsfaktoren. Unterschiede an den einzelnen Basenpaaren bezeichnet man als „single nucleotide polymorphism“ oder SNP. Die Unterscheidung zwischen Mutationen durch Nukleotidaustausch und Polymorphismus ist Definitionssache. Als Polymorphismen bezeichnet man Variationen in Nukleotidsequenzen mit Häufigkeiten von 1% und mehr innerhalb einer Population. Einige Millionen SNPs sind inzwischen identifiziert und teilweise kartiert worden (www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP).

2.7 XRCC1

2.7.1 Das Gen

Das humane *x-ray repair cross-complementing gene 1* (*XRCC1*) gehört zu den Reparaturenzymen der eukaryonten Zelle. Im menschlichen Genom ist es auf dem langen Arm des 19. Chromosoms lokalisiert (19q13.2-q13.3) (Dunphy et al., 1992) und es setzt sich aus 17 Exonen zusammen (Shen et al., 1998). *XRCC1* kodiert für ein Protein bestehend aus 633 Aminosäuren und seine molekulare Masse beträgt 69,5kDa (Caldecott et al., 1994). Es liegt in enger Nachbarschaft zu anderen Reparaturenzymen wie *ERCC1*, *ERCC2*, *DNA-Ligase 1* und der *Polynukleotidkinase* (Thompson et al., 1990).

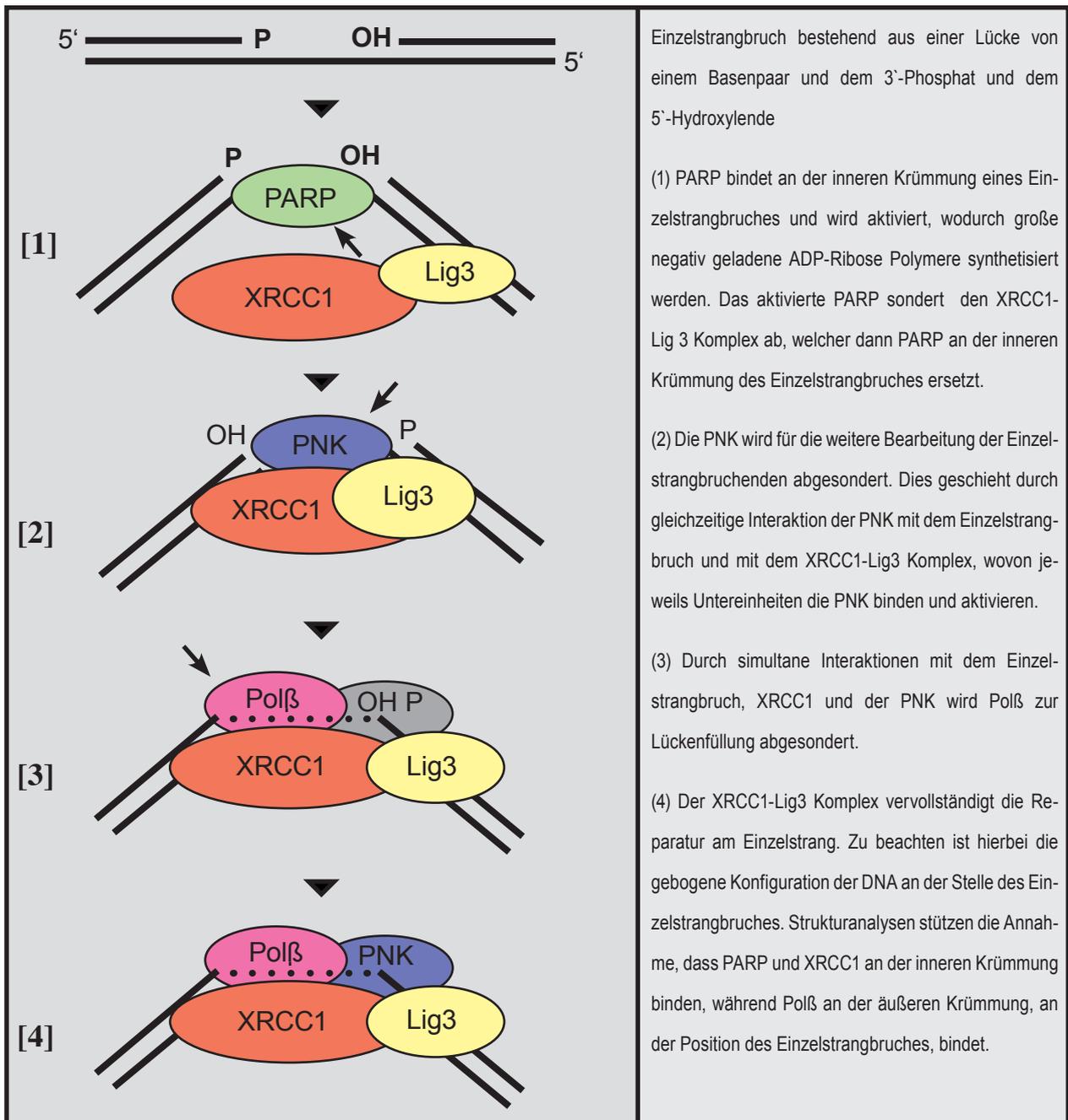


Pol β : DNA-Polymerase β ; NLS: nuclear localisation signal; BRCT 1/2: breast cancer susceptibility protein-1/2;
 PARP-1: Poly-ADP-Ribose Polymerase-1; Lig 3: DNA-Ligase III; APE 1: AP Endonuklease; PNK: Polynukleotidkinase

Abbildung: 1: schematische Darstellung von XRCC1 sowie der Protein-Protein Interaktionen, die durch XRCC1 gesteuert werden (Huber et al., 2004)

2.7.2 Funktion des Proteins

Die genaue Funktion dieses DNA-Reparaturenzyms konnte bisher noch nicht geklärt werden und ist Bestandteil der aktuellen Forschung. Zurzeit wird XRCC1 selbst jedoch keine enzymatische Reparaturfunktion zugesprochen, sondern es dient durch Bindung mit anderen Reparaturenzymen als eine Art Stützprotein (scaffold protein) bei der Exzisionsreparatur von Basen im Rahmen von Einzelstrangbrüchen. Durch die Bindung mit der DNA-Polymerase β (Pol β), der DNA-Ligase III (Lig3), der Polynukleotid Kinase (PNK), der AP Endonuklease (APE1) und der Poly(ADP-Ribose) Polymerase1 (PARP-1) katalysiert es Reparaturprozesse (Kubota und Horiuchi, 2003; Sobti et al., 2007).



P: Phosphatende; OH: Hydroxylende; PARP: Poly-ADP-Ribose Polymerase-1; XRCC 1: x-ray repair cross-complementing gene 1; Lig 3: DNA-Ligase III; PNK: Polynukleotidkinase; Polβ: DNA-Polymerase β

Abbildung 2: schematische Illustration einer Einzelstrangkorrrektur, die durch XRCC1 dirigiert wird (Whitehouse et al., 2001)

Mit dem stickstoffhaltigen Ende des XRCC1-Proteins interagiert es mit der DNA-Polymerase β (Pol β), während das kohlenstoffhaltige Ende der BRCT-II Domäne (breast cancer susceptibility protein-1) mit der DNA-Ligase III, welche DNA-Lücken detektieren kann, eine Bindung eingeht. Bei Vorliegen von Einzelstrangbrüchen stimuliert XRCC1 konzentrationsabhängig die beiden Enzyme durch direkte Wechselwirkung im Sinne eines Multien-

zymkomplexes (Sturgis et al., 1999; Yang et al., 2007).

XRCC1 geht zudem eine Bindung mit der Polynukleotid-Kinase (PNK) ein, was eine wichtige Bedeutung für die Reparatur von Einzelstrangbrüchen hat. Hierbei finden sich häufig veränderte Endgruppen, an die 3`-Hydroxyl- und 5`-Phosphatgruppen gesetzt werden müssen, um den problemlosen Ablauf einer Einzelstrangkorektur zu gewährleisten. Diese Aufgabe wird der Polynukleotid Kinase zuteil, die über 3`-DNA-Phosphatase-Aktivität und über 5`-DNA-Kinase-Aktivität verfügt (Whitehouse et al., 2001).

Die Interaktion zwischen XRCC1 und der menschlichen AP Endonuklease 1 (AP1) ist ebenfalls wichtig für die Reparatur von DNA-Defekten. Abasische Abschnitte gehören zu den häufigsten Schäden an der DNA und können schwerwiegende Folgen für die Zelle haben, da sie sowohl genotoxisch als auch sehr mutagen sind. Sie entstehen durch Oxidantien, ionisierende Strahlung oder auch spontan (bis zu 10^4 / Zelle/ Tag) (Vidal et al., 2001). Nach der Detektion einer abasischen Stelle dockt die AP Endonuklease 1 an den betroffenen Abschnitt der DNA an, und das 5`-Zucker-Phosphat-Ende wird herausgetrennt. In Zusammenarbeit mit der DNA-Polymerase β wird an das 3`-Ende der entstandenen Lücke ein Nukleotid eingeführt. Die DNA-Ligase versiegelt daraufhin den Abschnitt (Kubota et al., 1996; Sobti et al. 2007).

Die zentrale BRCT-I Domäne bindet mit der Poly (ADP-Ribose) Polymerase (PARP-1)(Lee et al., 2001). Genaue Erkenntnisse liegen zu diesem Enzym nicht vor und Hypothesen werden zurzeit kontrovers diskutiert. Man weiß, dass PARP ein Zinkfinger enthaltendes Enzym ist, dass ebenfalls DNA-Einzelstrangbrüche detektiert und schnell an die beschädigten DNA-Abschnitte bindet (Duell et al., 2000). Es ist ebenfalls an Basen-Exzisions-Reparaturen beteiligt und kann zudem den programmierten Zelltod einleiten. Außerdem vermutet man eine Beteiligung des Enzyms bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen, da PARP in der Lage ist, auch diese zu binden. Der genaue Reparaturmechanismus bedarf jedoch weiterer Untersuchungen.

Als ein Koordinatorprotein scheint XRCC1 die verschiedenen Enzyme nicht nur zusammen zu bringen, sondern scheint auch die Korrektur von Einzelstrangbrüchen zu dirigieren (Masson et al., 1998; Whitehouse et al., 2001). Neben anderen Proteinen ist XRCC1 auch an der Korrektur von Doppelstrangbrüchen beteiligt (Zienolddiny et al., 2006)

2.7.3 Mutation

Polymorphismen in DNA-Reparatur-Enzymen können die Funktion des Proteins verändern, wodurch eventuell ein Schaden an der DNA nicht mehr behoben werden kann. Die fehlende

Möglichkeit der Korrektur führt zu genetischer Instabilität, was letztlich zur Apoptose oder zu malignen Entartung der Zelle führen kann.

Zellen, denen das *XRCC1* Gen ganz fehlt, sind hypersensitiv gegenüber ionisierender Strahlung (1,7-fach), hydrogenen Peroxiden (2-fach), Camptothecin (3-fach) und alkylierenden Substanzen (10-fach) (Whitehouse et al., 2001). Dadurch kommt es häufiger zu Chromosomenaberrationen, Translokationen, Punktmutationen und Deletionen. Die Frequenz von Schwesterchromatidaustauschen ist wesentlich erhöht (Thompson et al., 1990).

Bei Zelllinien, die im *XRCC1* Gen Mutationen aufweisen, findet man eine achtfach geringere Anzahl von Einzelstrangbruchreparaturen (Caldecott, 2003). Auch die Zahl der Doppelstrangreparaturen ist in diesen Zellen vermindert. Shen et al. (1998) vermutete, dass ein Aminosäure-Austausch in der BRCT-Region von *XRCC1* die Funktionalität des Proteins zerstört. Lunn et al. (1999) fanden anhand ihrer Studie heraus, dass das 399Gln Allel mit einem höheren Spiegel an Aflatoxin B1-DNA-Addukten verbunden war. Unter rauchenden Individuen konnten Duell et al. (2000) mit Hilfe ihrer Arbeit zeigen, dass die homozygote Mutation vermehrt Schwesterchromatid-Austausche vorwies. Spitz et al. (2003) nahm auf Grund seiner Untersuchungen an, dass eine Mutation in einem DNA-Reparaturenzym die DNA-Reparaturkapazität wesentlich beeinflusst, und dies in der Folge mit einem erhöhten Kanzerogenese-Risiko verbunden ist.

2.7.4 Die SNPs von *XRCC1*

Insgesamt sind zurzeit 37 SNPs für *XRCC1* identifiziert und/oder bestätigt worden, wobei 14 für einen Aminosäureaustausch kodieren und vier eine Allelfrequenz von 3% oder mehr haben. Drei SNPs sind in einer Vielzahl epidemiologischer Studien untersucht worden. Sie befinden sich an den Codons Arg194Trp, Arg280His und Arg399Gln (Ladiges et al., 2003).

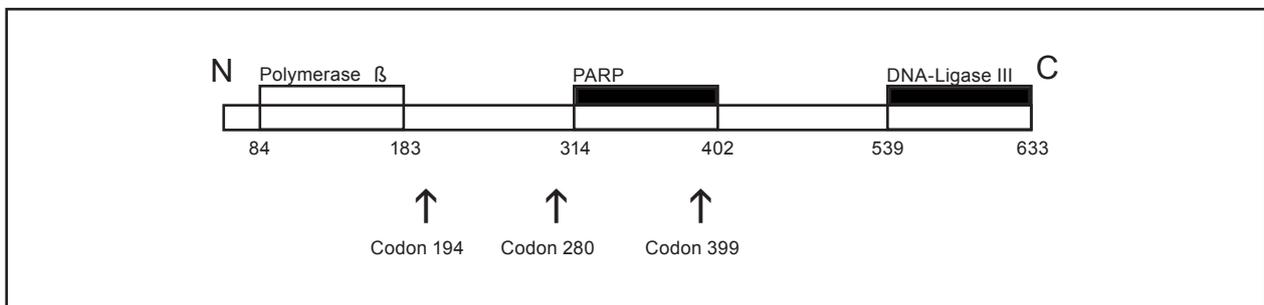
Tabelle 1 zeigt die Lokalisation der einzelnen Polymorphismen im *XRCC 1* Gen und den sich ergebenden Aminosäureaustausch.

Nomenklatur des Polymorphismus (Codon)	Lokalisation	Genetische Position*	Identifikationsnummer des National Cancer Institutes	Veränderungen der DNA-Sequenz	Aminosäure Austausch
XRCC1 194	Exon 6	26304	rs1799782	C → T	Arg → Trp
XRCC1 280	Exon 9	27466	rs25489	G → A	Arg → His
XRCC1 399	Exon 10	28152	rs25487	G → A	Arg → Gln

XRCC1: x-ray repair cross-complementing gene 1; C: Cytosin; T: Thymin; G: Guanin; A: Adenin; Arg: Arginin; Trp: Tryptophan; His: Histidin; Gln: Glutamin

Tabelle 1: Lokalisation der einzelnen Polymorphismen im XRCC 1 Gen, den sich ergebenden Aminosäureaustausch und die XRCC1 Nomenklatur (Gene Bank acc.no.L34079)

Der Polymorphismus des Codons 194 und 280 ist zwischen der Bindungsstelle der DNA-Polymerase und der PARP-1 lokalisiert. Die veränderte Aminosäure des Codons 399 befindet sich an der PARP-1-Bindungsstelle innerhalb der BRCT1-Domäne (Lee et al., 2001).



PARP: Poly-ADP-Ribose Polymerase; N: Stickstoff; C: Kohlenstoff

Abbildung 3: schematische Abbildung von XRCC1 und die Protein-Protein Interaktionen; die Pfeile zeigen auf die Lokalisationen der Polymorphismen innerhalb des Proteins (Lee et al., 2001)

XRCC 1 interagiert mit seinem stickstoffhaltigen Ende mit der Polymerase β , PARP-1, und mit der DNA-Ligase III im Bereich des kohlenstoffhaltigen Endes (Lee et al., 2001). Die Untersuchungen zu dieser Arbeit befassten sich mit dem Codon 399-Polymorphismus. Wie eine Vielzahl anderer SNPs wurde auch dieser Polymorphismus vom *National Cancer Institute* im SNP500Database katalogisiert und mit der Identifikationsnummer rs25487 versehen. Die Ergebnisse resultieren aus der Sequenzanalyse einer Population bestehend aus 102 Individuen unterschiedlicher ethnischer Abstammung. Der durch den Polymorphismus bedingte Aminosäureaustausch ist ebenfalls angegeben.

dbSNP ID: rs25487	
SNP500Cancer ID:	XRCC1-01
Gen:	XRCC1
SNP Region:	<u>Ex10-4A>G</u>
Aminosäureaustausch:	Q399R

SNP: Single Nucleotid Polymorphism; XRCC1: x-ray repair cross-complementing gene 1; A: Adenin; G: Guanin; Q: Glutamin; R: Arginin; Ex10: Exon 10

Tabelle 2: Identifikation des XRCC1 Codon 399-Polymorphismus im SNP500 Database des National Cancer Institute (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/snplist.cfm>)

In der folgenden Tabelle ist die umgebende Sequenz des *XRCC1* Codon 399-Polymorphismus dargestellt. Beim genetischen Polymorphismus gibt es für ein Gen mehrere Zustandsformen (Allele). Ist die Base Guanin an der markierten Stelle gebunden, wird der Referenzgenotyp (Wildtyp) mit der Aminosäure Arginin expremiert. Wird Adenin anstelle des Guanin in die Genstruktur einbezogen, entsteht die Aminosäure Glutamin. Der G/C-Gehalt liegt bei 56%. (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/snplist.cfm>).

GTGCTGGACTGTCACCGCATGCGTCGGCGGCTGCCCTCCC(A/G)GAGGTAA GGCCTCACACGCCAACCCTGCTCCTTATCCTGTGCTGGGCAATGCCAGGAAT
--

G: Guanin; T: Thymin; C: Cytosin; A: Adenin

Tabelle 3: umgebende Basensequenz des XRCC1 Codon 399-Polymorphismus

2.7.5 Genetikstudien

Man unterscheidet generell die Genome-Screenings (Kopplungsstudien/„Linkage“ Analyse) von den Candidate Gene Studies (= Kandidaten-Genstudien).

Genome-Screenings dienen zum Aufdecken von chromosomalen Regionen, die mit einer genetisch komplexen Krankheit assoziiert sein können. Hierbei werden Familien mit betroffenen Individuen (in der Regel Familien mit mindestens zwei betroffenen Individuen sowie deren Eltern, so genannten „affected sib pairs“) rekrutiert, klinisch phänotypisiert und deren DNA auf irgendeine chromosomale Region untersucht, die mit der Erkrankung vererbt wird (Linkage Mapping). Bei diesem statistischen Verfahren wird überprüft, ob das vermutete Krankheitsgen und eine Markierung auf einem Chromosom gemeinsam vererbt werden. Denn je näher eine solche Markierung an einem Krankheitsgen liegt, um so geringer ist die Wahrscheinlichkeit, dass es bei einer genetischen Rekombination zur Trennung der Beiden kommt. Mit Genome-Screenings können Gene auf Chromosomen lokalisiert werden.

Bei diesem Ansatz, der der Methodik bei monogenen Erkrankungen ähnelt, werden die Familien unabhängig von Hypothesen über die Krankheitsursache/Pathophysiologie der Erkrankung untersucht. Allerdings braucht man genau wie bei den Kandidaten-Genstudien eine genaue Definition des Phänotyps.

Die Kandidaten-Genstudien basieren dagegen auf vorbekannten Erkenntnissen über die Pathophysiologie der Erkrankungen und evaluieren die Assoziation von Polymorphismen innerhalb dieser bereits bekannten linkage Regionen. Demnach handelt es sich bei unseren Untersuchungen um eine Kandidatengenstudie, die den Einfluss des Polymorphismus im *XRCC1* Gens und der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen analysiert.

2.8 Zielsetzung der Arbeit

Die Exposition gegenüber kanzerogen wirkenden Stoffen in der Umwelt, individuelle DNA-Defekte und genetische Prädisposition zählen zu den Faktoren, die die Kanzerogenese eines Kopf-Hals-Karzinoms (HNSCC) erheblich beeinflussen. Polymorphismen in fremdstoff-metabolisierenden Enzymen, die in der Folge eine veränderte Funktion des Enzyms bedingen, zählen zu den individuellen Risikofaktoren. Mit der vorliegenden Kandidaten-Genstudie soll untersucht werden, ob sich auch Polymorphismen in Reparaturenzymen auf die Genese einer Neoplasie auswirken.

XRCC1 zählt zu den Reparaturenzymen, die bei der Basenexzisionsreparatur entscheidend mitwirken. Als Stützprotein geht es Bindungen mit diversen Enzymen ein, die die Korrektur eines DNA-Defektes bei Einzelstrangbrüchen bestimmend vorantreiben können. Nach hetero- und homozygoter Mutation kann die Funktion des Enzyms beeinträchtigt sein.

Grundlage für die vorliegende Arbeit war eine Genotyp-Analyse des *XRCC1* Codon 399-Polymorphismus, da aus einer Vielzahl von Studien besonders für diese Region des Reparaturenzyms eine erhöhte Allelfrequenz bekannt ist. Mit Hilfe dieser Fall-Kontroll-Studie soll durchleuchtet werden, ob der Codon 399-Polymorphismus im *XRCC1* Gen als potentieller Marker für die HNSCC Suszeptibilität zu betrachten ist.

Ferner kann die chronische Exposition gegenüber Schadstoffen die Entstehung von Polymorphismen in der DNA begünstigen. Davon können ebenfalls Reparaturenzyme betroffen sein, die für die Korrektur von DNA-Defekten auf zellulärer Ebene verantwortlich sind. Aus einem Einzelstrangbruch kann so ein Doppelstrangbruch werden. Eine mögliche Folge ist die Apoptose. Es kann jedoch auch zu einer Entartung der Zelle kommen, womit das Risiko für das Individuum steigt, einen malignen Tumor zu entwickeln.

Tabak zählt zu den wichtigsten kanzerogenen Schadstoffen. Vor dem Hintergrund dieser Tatsache soll diese Arbeit zeigen, dass die Häufigkeit des Polymorphismus im Codon 399 des *XRCC1* Gens bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen nach dauerhaftem Tabakkonsum erhöht ist. Hierfür lag eine detaillierte Anamnese aller Studienteilnehmer vor, aus der hervorging, welche Individuen kanzerogenen Fremdstoffen exponiert waren.

Mit der Kenntnis des Genotyps in einem Gen, der als potentieller Marker für die HNSCC Suszeptibilität dienen könnte, und einer möglichen Exposition gegenüber einem kanzerogenen Schadstoff, wäre somit die Definition von besonders gefährdeten Individuen möglich. Dies könnte einerseits für ein besseres Verständnis der Kanzerogenese sorgen und hätte andererseits auch eine zentrale Bedeutung bei der Prävention und der individuellen Risikoberatung.

3. Material und Methoden

3.1 Studienkollektiv und Probenmaterial

Das Patientenkollektiv bestand aus insgesamt 277 Individuen. Das Durchschnittsalter der 221 männlichen Teilnehmer lag bei 59,7 Jahren, das der 56 weiblichen bei ebenfalls 59,7 Jahren. Bei allen Patienten lag ein histologisch gesichertes Kopf-Hals-Karzinom vor.

Ihr wurde eine Kontrollgruppe bestehend aus 290 gesunden Individuen gegenüber gestellt. Die 170 männlichen Teilnehmer hatten ein Durchschnittsalter von 46,7 Jahren. Die 120 weiblichen Teilnehmer waren mit 48,0 Jahren nur unwesentlich älter.

Im Zeitraum von 1996 bis 1999 waren die Blut- und Gewebeproben des untersuchten Kollektivs an der HNO-Klinik sowie an der Medizinischen Poliklinik der Universität in Bonn und am Institut für Umwelthygiene der Universität Düsseldorf gesammelt worden.

Die 567 Probanden waren alle deutschstämmig, nicht miteinander verwandt und ethnisch den Kaukasiern zuzurechnen. Die Studienteilnehmer hatten eine Einverständniserklärung abgegeben und einen Fragebogen bearbeitet, der ihre Herkunft, die medizinische und berufliche Anamnese sowie Raucherstatus und –anamnese berücksichtigte. In dieser Studie hatte per definitionem ein Raucher während seines Lebens über mindestens vier Jahre fünf oder mehr Zigaretten (oder Zigarren oder Pfeifen) pro Tag geraucht. Nichtraucher hatten nie zuvor geraucht oder weniger als ein Paket Zigaretten pro Jahr.

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

3.2 Konventionelle PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) ist eine seit Mitte der 80er Jahren etablierte in-vitro-Technik, um selektiv bestimmte DNA-Abschnitte in großer Zahl amplifizieren zu können. Durch die Vervielfachung kleinster DNA-Mengen ist es möglich, diese auf Polymorphismen und Mutationen zu analysieren, ohne zeitaufwendige Klonierung und Identifizierung der zu untersuchenden DNA-Sequenzen.

Das Ausgangsmaterial für eine PCR besteht aus der zu amplifizierenden DNA, zwei maschinell synthetisierten Oligonukleotiden, die als Primer für die DNA-Synthese dienen, DNA-Polymerase und freien Nukleotid-Bausteinen (Desoxynucleosidtriphosphate/dNTP). Damit die Primer (Länge ca. 20 Basenpaare) an den beiden 3`Enden komplementär binden können, ist die Kenntnis der Sequenz an dieser Stelle Voraussetzung. Die DNA wird

durch eine gereinigte thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* (Taq) synthetisiert. Die Taq-Polymerase besitzt keine 5`-3`-Exonukleaseaktivität, wodurch verhindert werden soll, dass die neusynthetisierten Stränge von den Polymerasen partiell wieder abgebaut werden. Die PCR besteht aus 30 bis 45 sich wiederholenden Zyklen. Jeder Abschnitt unterteilt sich in drei Phasen:

In der ersten Phase wird die DNA für ungefähr 10 Minuten bei ca. 95°C denaturiert (Denaturierung).

In der zweiten Phase folgt eine Abkühlung auf 50 bis 65°C. Zu diesem Zeitpunkt heften sich die sense- und antisense-Primer als Startpunkt der nun folgenden DNA-Synthese an die Einzelstränge an (Annealing). Die Hybridisierungstemperatur hängt von der Basenzusammensetzung der Primer ab.

In der dritten Phase folgt bei 72°C die durch die Taq-Polymerase gesteuerte DNA-Synthese. Diese verlängert die Primer durch Anheften freier dNTPs an die 3`-OH-Enden (Polymerisation).

An den letzten Zyklus schließt sich die Phase der Extension von 10 Minuten Dauer bei 72°C an. Die Ziel-DNA kann auf diese Weise auf 10^5 Exemplare vervielfältigt werden.

Im Reaktionsansatz waren folgende Bestandteile enthalten:

- 292,0 µl aqua dest.
- 40,0 µl 10xPCR-Puffer
- 4,0 µl je dNTP
- 8,0 µl 5`Primer
- 8,0 µl 3`Primer
- 4,0 µl Taq-Polymerase
- 2,0 µl Template DNA

Die Negativkontrolle, die jeder PCR hinzugefügt wurde, enthielt anstelle der Template-DNA die gleiche Menge aqua destillata.

3.3 Primer-Test

In Vorversuchen sind PCR Primer-Tests durchgeführt worden, um qualitativ hochwertige PCR-Produkte zu gewährleisten. Diverse 3`und 5`-Primer sind dabei in unterschiedlichen

Kombinationen getestet worden. Anschließend folgte eine Agarose-Gelelektrophorese (Polyacrylamid-Gelelektrophorese), bei der die Qualität der Amplifikation bewertet wurde.

In Tabelle 4 sind die Sequenzen der schlussendlich eingesetzten PCR-Primer und Hybridisierungssonden der Mutation im Exon 10 des *XRCC1* Gens aufgeführt.

Forward Primer	Sensor
5'-TgggAggCCgCATCgT3'	5'-CTgCCCTCCCgAAGgTAAg X 3'
Reverse Primer	Anchor
5'-ggCAggCCCCAgTCTgA	5'-LC Red640-CCTCACACgCCAACCCTgCTCCTT p 3'

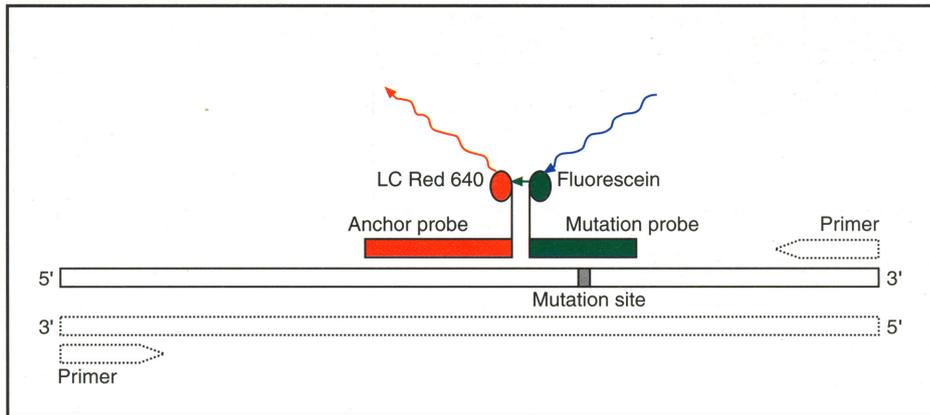
T: Thymin; g: Guanin; A: Adenin; C: Cytosin; LC Red 640: Light-Cycler® Red 640

Tabelle 4: Sequenzen der PCR-Primer und Hybridisierungssonden der Mutation im Exon 10 des *XRCC1* Gens

3.4 Real-Time-PCR Technik

Für diese Arbeit wurde zur Analyse des *XRCC1* Codon 399-Polymorphismus der Light-Cycler® der Firma Roche (Mannheim) verwendet. Dessen Funktionsprinzip ist die Kombination eines PCR-Cyclers mit einem Fluoreszenzphotometer. Durch die Verwendung kleiner Reaktionsansätze und Glaskapillaren sind eine schnelle Temperaturänderung und damit eine Verkürzung der Reaktionszeiten möglich. Der zweite Vorteil der Glaskapillaren ist die photometrische Bestimmung der amplifizierten DNA-Menge während eines Zyklus. Die Generierung und Messung eines Lichtsignals, das während der PCR proportional mit der Menge des Amplikats ansteigt, ermöglicht die on-line Detektion von PCR-Produkten („Real-Time-PCR“). Gleichzeitig kann im Anschluss an die PCR eine Mutationsanalyse durch Darstellung der sequenzabhängigen Schmelztemperaturen erfolgen, ohne dass eine Gelelektrophorese notwendig ist (Brüning et al., 1999; Ko et al., 2000).

Den Proben wurden neben Genfragment-spezifischen Primern auch zusätzlich zwei Oligonukleotidsonden hinzugefügt. Deren Sequenz wurde dabei so gewählt, dass sie im Bereich der zu untersuchenden Genmutation hybridisieren. Eine der Sonden ist an ihrem 3'Ende mit Fluorescein markiert (Detektionssonde), während die Ankersonde an ihrem 5'Ende mit Light-Cycler®-Red 640 (LC-640) oder 705 (LC-705) gekennzeichnet ist.



LC Red 640: Light-Cycler® Red 640

Abbildung 4: schematische Darstellung der Detektion einer Ein-Punkt-Mutation

Das Ziel ist, dass die beiden Oligonukleotidsonden innerhalb des amplifizierten Genfragments maximal 1 bis 5 Basenpaare voneinander entfernt hybridisieren. Das Fluorescein in der Detektionssonde (= Donorsonde) wird durch die Emissionsdiode des Light Cyclers® (470 nm) zur Fluoreszenz angeregt. Dadurch wird grünes Licht emittiert, welches die Fluorophore LC-640 bzw. LC-705 in der Akzeptorsonde (=Ankersonde) zur Emission von rotem Licht (Wellenlänge 640 bzw. 705 nm) anregt. Dieser Vorgang wird unter dem Begriff Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) zusammengefasst. Voraussetzung dafür, dass FRET stattfinden kann, ist, dass sich die beiden Sonden in unmittelbarer Nähe zueinander befinden. Aus diesem Grunde erfolgt die Messung am Ende der Annealing-Phase eines jeden PCR-Zyklus. Die Emission des roten Lichtes ist proportional zur Menge des PCR-Produktes und wird jeweils in dem entsprechenden Kanal des Light Cyclers® gemessen. Nach stattgefundenem Messvorgang werden die beiden Hybridisierungssonden in der Extensionsphase des PCR-Zyklus von der Taq-Polymerase verdrängt.

Zur Analyse des Codon 399-Polymorphismus des *XRCC1* Gens wurden Wildtyp-spezifische Sonden verwendet.

Sowohl der für diese Arbeit verwendete Light-Cycler® als auch der Light-Cycler® DNA Master Hybridisation Probes Kit stammen von der Firma Roche in Mannheim, Deutschland.

Die Firma *TIB MOLBIOL* (Berlin) war für die Herstellung der Hybridisierungssonden und der PCR-Primer zuständig.

Der Reaktionsansatz enthielt pro Kapillare 2 µl verdünnte DNA (25 µg/µl) und 18 µl Master Mix, der sich aus folgenden Ingredienzien zusammensetzte:

- 2,4 µl MgCl₂, (4 mM)
- 1,0 µl 3'- Primer und 5'- Primer (20 pM)
- 1,0 µl FL-Sonde und LC-Sonde (1 pM)
- 2,0 µl DNA Master Hybridisation Mix (Roche, Mannheim)
- 9,6 µl H₂O

Jeder PCR wurde als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA hinzugefügt. Diese Probe enthielt stattdessen H₂O.

Die folgende Tabelle zeigt das durchschnittliche PCR-Temperaturprofil.

	1. Denaturierung	2. Denaturierung	3. Annealing	4. Extension
Zieltemperatur	95°C	95°C	55°C	72°C
Gehaltene Zeit	120 s	3 s	10 s	25 s

C: Celsius; s: Sekunden

Tabelle 5: PCR-Temperaturprofil

In jedem Durchgang wurden 45 PCR-Zyklen (Phasen 2 bis 4) durchgeführt.

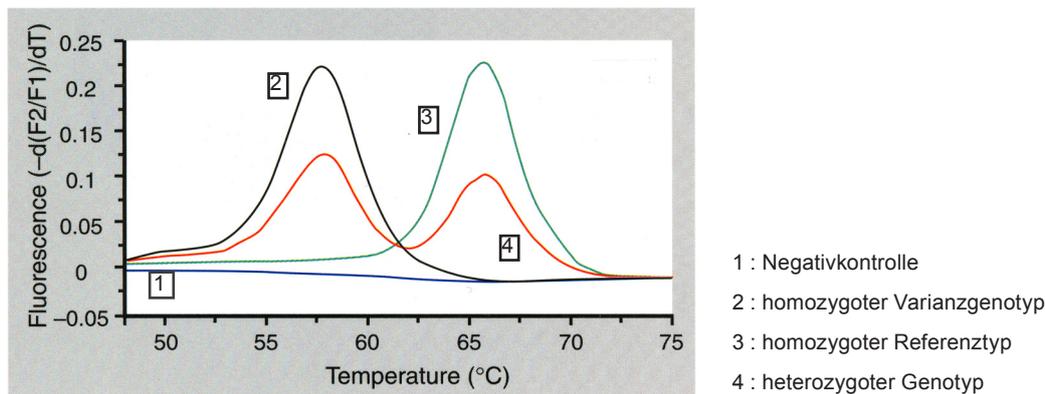
Anhand der Bestimmung der Schmelzkurven nach der PCR erfolgte die Differenzierung der Allele. Diese folgten einer Denaturierungsphase von 20 s bei 95°C bei einer Starttemperatur von 45°C und einer Endtemperatur von 80°C mit einem Temperaturanstieg von 0,2°C pro Sekunde.

3.4.1 Mutationsanalyse

Im Anschluss an die PCR folgt die graphische Darstellung der Schmelztemperatur (melting temperature), bei welcher sich die Hybridisierungssonden von dem Amplifikat lösen. Die Temperatur der Probegefäße wird ausgehend von einem geringen Ausgangswert schrittweise erhöht und in Abhängigkeit zur gemessenen Fluoreszenz in einer Kurve dargestellt. Liegen die Oligonukleotidsonden in freier Form vor, kann der FRET nicht mehr stattfinden. Deshalb kommt es zu einem starken Abfall der Fluoreszenz, wenn bei Erreichen einer bestimmten Temperatur sich die Sonden vom DNA-Strang ablösen. Der Temperaturpunkt der Sondenablösung wird in der Grafik als Peak gekennzeichnet.

Ist die Sequenz einer Sonde nicht absolut komplementär zu der des Amplifikats, dann löst sich die hierdurch weniger vollständige Hybridisierung schon bei niedrigeren Temperaturen, so dass anhand der spezifischen Schmelzpunkte eine Identifizierung des Genotyps möglich ist.

Bei einer wildtypspezifischen Sonde besitzt der Wildtyp einen höheren Schmelzpunkt als die Mutante, bei einer mutationsspezifischen Sonde verhält es sich genau umgekehrt. Bei Heterozygotie findet sich eine zweigipflige Schmelzkurve.



C: Celsius

Abbildung 5: Grafische Darstellung der Genotyp spezifischen Schmelzpunkte

Die Analyse der Schmelzpunkte wurde durchgeführt unter der Verwendung von Light-Cycler Software, Version 3.

Die Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe des Light-Cyclers® erlaubt eine schnelle und zuverlässige Detektion einer Punktmutation. Die übliche Mutationsanalyse mittels PCR und sich anschließendem Restriktionsverdau (RFLP) ist deutlich arbeitsintensiver. Mit der Real-Time-PCR entfällt die Notwendigkeit, einen Restriktionsverdau und eine Gelelektrophorese durchzuführen, so dass die PCR mit dem Light-Cycler® innerhalb von zwei Stunden durchgeführt und ausgewertet werden kann.

3.5 Gelelektrophorese

Die Überprüfung der Ergebnisse der Real-Time-PCR erfolgte durch eine konventionelle PCR mit anschließender Gelelektrophorese der PCR-Produkte.

Es wurde ein 1,5%-Agarosegel wie folgt angesetzt:

Durch Aufkochen in der Mikrowelle für 4 Minuten wurden 3,75 g Agarose in 1xTA-Puffer

gelöst. Das Konglomerat wurde unter Rühren abgekühlt und 25 µl Ethidiumbromid wurden als Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt. Danach wurde das erhärtete Gel in eine mit 1xTA-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gesetzt. Nach Zentrifugieren von je 18 µl der PCR-Produkte mit 2 µl des Gelloading-Puffers wurde dieses Gemisch in die Probestaschen des Gels pipettiert. Ferner wurde ein DNA-Längenstandard mit 2 µl des gefärbten Gelloading-Puffers in eine Kammer gefüllt. Die Negativkontrolle enthielt 18 µl aqua destillata und 2 µl des Gelloading-Puffers. Die Gelelektrophorese wurde bei 70V über 90 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurden die DNA-Banden mittels eines Transilluminators bei 254 nm Wellenlänge sichtbar gemacht und mit einer MP4-Polaroid-Kamera abfotografiert.

Sequenziert wurden je zwei Proben, die sich in der Schmelzpunktanalyse als homozygot für den Wildtyp, eine Mutation oder als heterozygot erwiesen hatten.

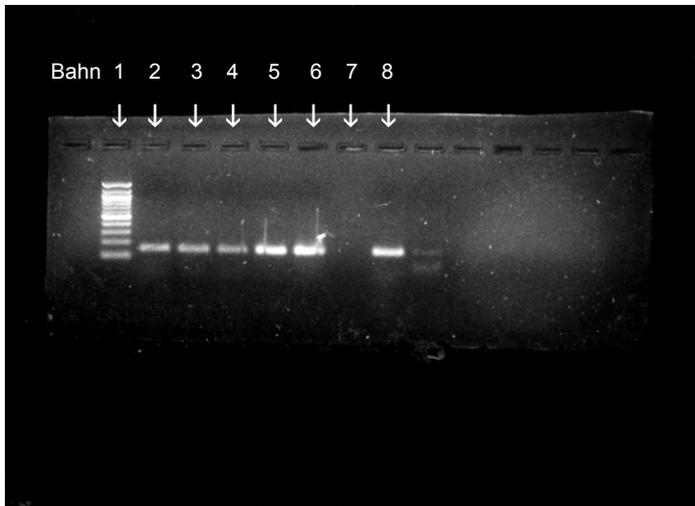


Abbildung 6: Agarosegel mit Darstellung der klonierten DNA-Fragmente von Exon 10 des XRCC1 Gens: Bahn 1: DNA-Längenstandard, Bahn 2-6 und 8: PCR-Produkte, Bahn 7: Negativkontrolle

3.6 Sequenzierung

Die Firma Qiagen in Hilden sequenzierte die PCR-Produkte nach der von Frederick Sanger entwickelten Didesoxymethode bzw. Kettenabbruch-Synthese (Sanger et al., 1977).

Um die Synthese des Komplementärstranges gewährleisten zu können, werden dem Konglomerat die thermostabile DNA-Polymerase, kurze Starter-Oligonukleotide, die vier Desoxynukleotide (dNTPs) und Didesoxynukleotide (ddNTPs) beigemischt. Letztere sind je nach Base mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Zudem fehlt den ddNTPs an der C3-Position des Zuckers eine Hydroxylgruppe, welche für die Bindung zum nächsten Nukleotid benötigt wird. Ihre Funktion besteht darin, dass sie zwar in die wachsende Poly-

nukleotidkette eingebaut werden, jedoch induzieren sie durch die fehlende 3'-OH Gruppe einen Kettenabbruch. Der DNA-Polymerase ist eine DNA-Verlängerung nicht möglich. Da die ddNTPs zufällig eingebaut werden, bricht die DNA-Synthese an verschiedenen Stellen ab. Dadurch entstehen viele DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die jedoch spezifisch auf einer bestimmten Base (und damit Farbe) enden.

Nach einer Elektrophorese in einem Polyacrylamid-Gel wird die eigentliche Sequenzanalyse durchgeführt. Die Polynukleotide sind durch das eingebaute ddNTP mit einem der vier Farbstoffe gekennzeichnet und wandern entsprechend ihrer Molekülgröße im elektrischen Feld. Die dabei eingebauten Didesoxynukleotide werden dann durch einen Laserstrahl angeregt und emittieren infolge der Fluoreszenz-Markierung Licht verschiedener Farbe und Wellenlänge. Jeder Farbstoff repräsentiert eine der vier Nukleinbasen. Auf die Basensequenz der unbekanntenen/zu untersuchenden DNA kann durch Entschlüsselung des Farbmusters rückgeschlossen werden.

3.7 Genotyp-Analysen

Um die Basensequenz der analysierten Proben mit der des Wildtyps vergleichen zu können, wurde das Computer-Programm „DNAsis“ verwendet. Dadurch konnten Mutationen, bei denen es zu einem Basenaustausch gekommen war, ermittelt werden.

3.8 Statistische Auswertungen

Statistische Analysen wurden mit dem Programmpaket SAS Version 9.2.1 durchgeführt. Die Risikoschätzung für die Entwicklung eines Kopf-Hals-Karzinoms wurden als Odds Ratios (OR) und 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) berechnet. Die Polymorphismen wurden als potentielle Risikofaktoren anhand logistischer Regression untersucht. Hierfür wurden Odds Ratio-Schätzungen, adjustiert nach Alter, Alter^2 als stetige Variablen, Raucherstatus und Geschlecht als kategorielle Variable. Als Minor-Allel wurde das Allel mit einer geringen Allelfrequenz bezeichnet und die Minor-Allelfrequenz sowie ein 95%-Konfidenzintervall für diese Häufigkeit anhand der Binomialverteilung berechnet. Für die Auswahl des besten Modells, insbesondere die quadratische Adjustierung nach Alter, wurde die Güte der Modelle anhand des Likelihood-Quotienten-Test verglichen und das jeweils beste Modell ausgewählt (Kreinbrock und Schach, 2004). Exakte Tests auf Hardy-Weinberg-Equilibrium für den Polymorphismus wurden durchgeführt und die Verteilungen mit Einträgen in internationalen Datenbanken verglichen.

4 Ergebnisse

4.1 Genotypverteilung des *XRCC1* Codon 399-Polymorphismus unter den Kontrollen und Fällen der Head-Neck-Studie

Diese Studie untersuchte einen SNP an einem Gesamtkollektiv bestehend aus insgesamt 285 Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom und 295 Kontrollindividuen.

In der Gruppe der rekrutierten Fälle konnte die DNA von 277 (97,1 %) und in der Gruppe der Kontrollindividuen die DNA von 290 (98,3 %) Personen erfolgreich genotypisiert werden. Eine misslungene Genotypisierung ist auf verschiedene Faktoren zurückzuführen. So konnte aus dem Blut einiger Teilnehmer DNA nicht erfolgreich isoliert werden bzw. die Menge der extrahierten DNA war zu gering oder die Probe lieferte auch bei mehrmaliger Wiederholung des Reaktionsansatzes mit der Methode der Real-Time-PCR kein auswertbares Ergebnis.

Das Durchschnittsalter der Patientengruppe (59,7 Jahre) war um mehr als zehn Jahre höher als das der Kontrollgruppe (Frauen 48,0, Männer 46,7 Jahre). Bei fast gleicher Anzahl untersuchter Personen in beiden Kollektiven (277 Patienten zu 290 Kontrollindividuen) gab es in der Population der Kontrollen mehr als doppelt so viele weibliche Individuen (120) wie in der Patientengruppe (56).

Zunächst wurde die Genotypverteilung des *XRCC1* Codon 399-Polymorphismus im Gesamtkollektiv der 567 Individuen analysiert. In der Kontrollgruppe war am stärksten der Wildtyp mit 47,6% vorhanden. Im Kollektiv der Patienten machte der Wildtyp nur 35,4% der Fälle aus. Dafür trat bei der Gruppe der Fälle häufiger die heterozygote Mutante (54,9%) als bei den Kontrollen (40,7%) auf. 11,7% des Kontrollkollektivs wiesen die homozygote Mutante auf. Bei den Individuen der Patienten war die homozygote Mutante mit 9,7% der Fälle in nahezu ähnlichem Ausmaß vertreten.

Während in dieser Studie heterozygote und homozygote Mutante gemeinsam fast zwei Drittel der Fälle bei den Patienten ausmachten (64,6%), fand sich die hetero- und homozygote Mutation nur in der Hälfte der Fälle der gesunden Individuen (52,4%). In der Gruppierung des Minor-Allels A wurden die mutierten Allele zusammengefasst. Hier zeigte sich, dass mit 36,7% das mutierte Allel häufiger bei den Patienten gefunden wurde als bei dem Kontrollkollektiv (32,1%). Ferner wurde der exakte Test auf das Hardy-Weinberg-Equilibrium durchgeführt. Dieser zeigte, dass die Genotypenhäufigkeiten der Kontrollen aus dieser Population den genetischen Regeln des Hardy-Weinberg-Gleichgewichts (<http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl>) entsprachen (p-Wert 0,280).

Die Ergebnisse sind der Tabelle 6 zu entnehmen. Die Konfidenzintervalle (KI) werden zum 5%-Niveau angegeben.

	Fall - Kontroll - Status					
	Kontrollen n=290		Fälle n=277		OR ¹	(95%-KI) ²
	N	%	N	%		
XRCC1 Codon 399 (Arg → Gln)						
GG	138	47.6	98	35.4	1	
AG	118	40.7	152	54.9	1.51	(1.01-2.29)
AA	34	11.7	27	9.7	1.05	(0.55-2.03)
AG+AA	152	52.4	179	64.6	1.42	(0.96-2.09)
Minor-Allel A						
N	186	32.1	206	36.7	1.16	(0.87-154) ³
% (95% - KI)	(28.3-36.0)		(32.7-40.8)			
Exakter Test auf HWE (p-Wert)	0.280		0.005			

¹ Odds Ratio (bestimmt durch die logische Regression, adjustiert nach Alter, Alter x Alter und Geschlecht); ² Konfidenzintervall nach Wald; ³ Referenzgruppe: Major-Allel G; XRCC1: x-ray repair cross-complementing gene 1; n/N: Anzahl der Individuen; Arg: Arginin; Gln: Glutamin; GG: Guanin-Guanin, Wildtyp; AG: Adenin-Guanin, heterozygotes Allelpaar der Mutation; AA: Adenin-Adenin, homozygotes Allelpaar der Mutation; HWE: Hardy-Weinberg-Equilibrium

Tabelle 6: Genotypverteilung des XRCC1 Codon 399-Polymorphismus unter den Kontrollen und Fällen der Head-Neck-Studie

Die Odds Ratio Schätzung für das heterozygote Allelpaar der Mutation lag bei 1,51 (KI: 1,01 – 2,29) und war damit signifikant erhöht. Für das homozygote Allelpaar der Mutation ergab sich eine Odds Ratio Schätzung von 1,05 (KI: 0,55 – 2,03). Die homozygote Mutation besitzt anhand unserer Daten somit keine signifikant erhöhte Erkrankungswahrscheinlichkeit. Für beide Mutationen zusammen betrug sie 1,42 bei einem KI: 0,96 – 2,09. Es findet sich ebenfalls keine statistische Signifikanz.

Der Genotyp allein ist nicht für die Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms verantwortlich.

4.2 Genotypverteilung in Abhängigkeit vom Raucherstatus

Aus dem Kontrollkollektiv wurden 173 Personen den Rauchern zugeordnet. In nahezu identischer Stärke waren die Raucher in der HNSCC-Gruppe repräsentiert (172 Patienten).

In der Patientengruppe der Raucher fand sich eine deutliche Anzahl an heterozygoten Mutanten (58,1% der Fälle). Die homozygote Mutante war zwar nur mit 10,5% bei den Patienten vertreten, allerdings machten beide Genotypen zusammen mehr als zwei Drittel der Fälle in der HNSCC-Gruppe aus (68,6%). Das mutierte Allel kam in dem Kollektiv zu 39,5% vor.

Dagegen machte bei den gesunden rauchenden Individuen zahlenmäßig der Wildtyp den größten Anteil mit 46,2% aus, gefolgt von der heterozygoten Mutante mit 39,9% der Fälle. Die homozygote Mutante kam auf 13,9%. In der Gruppe der Mutationen (hetero- und homozygote) kamen beide auf etwas mehr als die Hälfte der Fälle mit 53,8%. Betrachtet auf der Basis der mutierten Allele fanden sich diese bei den Kontrollen in 33,8% der Fälle.

Raucher						
	Kontrollen	n=173	Fälle	n=172		
	N	%	N	%	OR ¹	(95% - KI) ²
XRCC1 Codon 399 (Arg → Gln)						
GG	80	46.2	54	31.4	1	
AG	69	39.9	100	58.1	2.03	(1.21 - 3.42)
AA	24	13.9	18	10.5	1.27	(0.57 - 2.86)
AG + AA	93	53.8	118	68.6	1.86	(1.12 - 3.06)
A	117	33.8	136	39.5	1.32	1.32 (0.93 - 1.88) ³

¹ Odds Ratio (bestimmt durch die logische Regression, adjustiert nach Alter, Alter x Alter und Geschlecht); ² Konfidenzintervall nach Wald;

³ Referenzgruppe: Major-Allel G; XRCC1: x-ray repair cross-complementing gene 1; n/N: Anzahl der Individuen; Arg: Arginin; Gln: Glutamin; GG: Guanin-Guanin, Wildtyp; AG: Adenin-Guanin, heterozygotes Allelpaar der Mutation; AA: Adenin-Adenin, homozygotes Allelpaar der Mutation; A: Adenin

Tabelle 7: Genotypverteilung des XRCC1 Codon 399-Polymorphismus der Raucher in der Head-Neck-Studie

Wie Tabelle 7 zu entnehmen ist, zeigt sich innerhalb des Kollektivs der Raucher, dass die Odds Ratio für Patienten mit der heterozygoten Mutante als Genotyp signifikant erhöht ist (OR: 2,03; KI: 1,21 – 3,42). Patienten mit der homozygoten Mutante weisen in dieser Studie keine signifikant erhöhte Odds Ratio auf. Es ist lediglich eine Tendenz erkennbar (OR: 1,27; KI: 0,57 – 2,86).

Die gemeinsame Odds Ratio-Schätzung für beide Mutanten (hetero- und homozygote) innerhalb des Patientenkollektivs der Raucher ist ebenfalls signifikant erhöht (OR: 1,86; KI: 1,12 – 3,06).

Bezüglich der mutierten Allele lässt sich wieder nur eine Tendenz ableiten (OR: 1,32; KI: 0,93 – 1,88).

Das Risiko an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken ist für Individuen mit positiver Raucheranamnese und dem Genotyp AG signifikant erhöht.

4.3 Genotypverteilung bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom

Von den 277 Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom zählten 105 Individuen zu den Nichtrauchern. 172 Patienten wiesen eine positive Raucheranamnese auf, womit diese Gruppe um mehr als 60% größer war.

Unter den Nichtrauchern war die heterozygote Mutante mit 49,5% am stärksten vertreten. 41,9% der Individuen wiesen in dieser Fraktion den Wildtyp auf. Das mutierte Allel fand sich bei 33,3% der Nichtraucher. Unter den Rauchern war die heterozygote Mutante mit 58% ebenfalls die am stärksten vertretene Fraktion. Der Wildtyp hatte unter den Patienten mit positiver Raucheranamnese einen Anteil von 31,4%. Das mutierte Allel war in der Gruppe der Raucher mit 39,5% repräsentiert. Die homozygote Mutante war bei Rauchern und Nichtrauchern zu fast gleichen Anteilen vertreten (8,6% zu 10,5%).

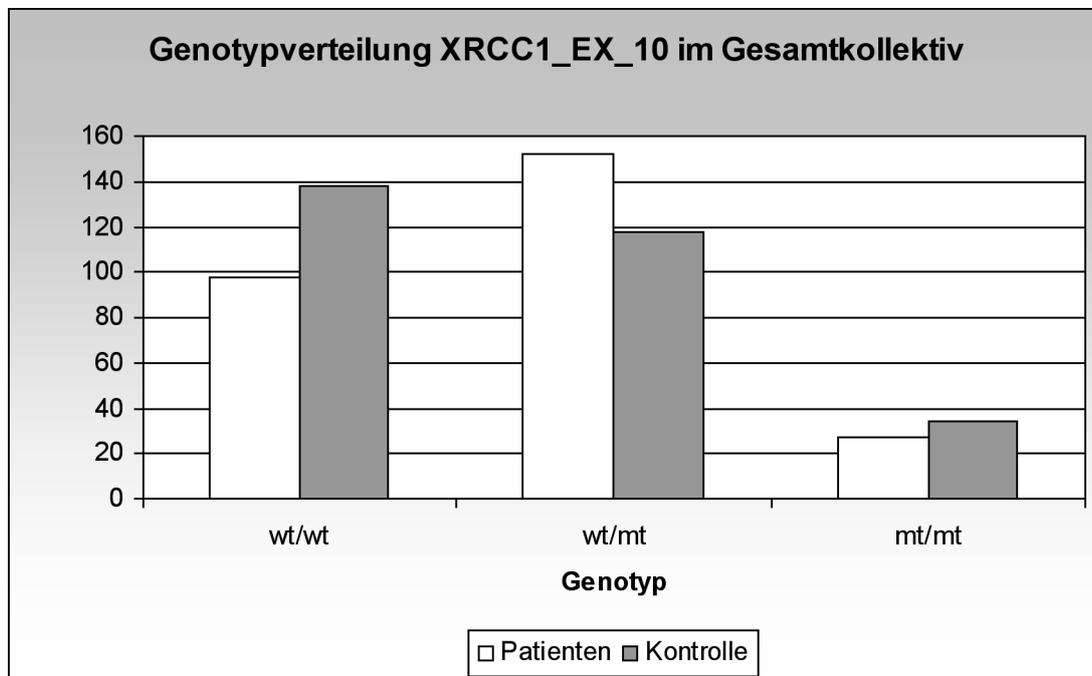
	Fälle				OR ¹	(95%-KI) ²
	Nichtraucher n=105		Raucher n=172			
	N	%	N	%		
XRCC1 Codon 399 (Arg → Gln)						
GG	44	41.9	54	31.4	1	
AG	52	49.5	100	58.1	1.44	(0.85-2.47)
AA	9	8.6	18	10.5	1.60	(0.64-4.00)
AG+AA	61	58.1	118	68.6	1.47	(0.87-2.46)
A	70	33.3	136	39.5	1.27	(0.89-1.83) ³

¹ Odds Ratio (bestimmt durch die logische Regression, adjustiert nach Alter, Alter x Alter und Geschlecht); ² Konfidenzintervall nach Wald; ³ Referenzgruppe: Major-Allel G; XRCC1: x-ray repair cross-complementing gene 1; n/N: Anzahl der Individuen; Arg: Arginin; Gln: Glutamin; GG: Guanin-Guanin, Wildtyp; AG: Adenin-Guanin, heterozygotes Allelpaar der Mutation; AA: Adenin-Adenin, homozygotes Allelpaar der Mutation; A: Adenin

Tabelle 8: Genotypverteilung des XRCC1 Codon 399-Polymorphismus für die Patienten getrennt nach Raucher und Nichtraucher

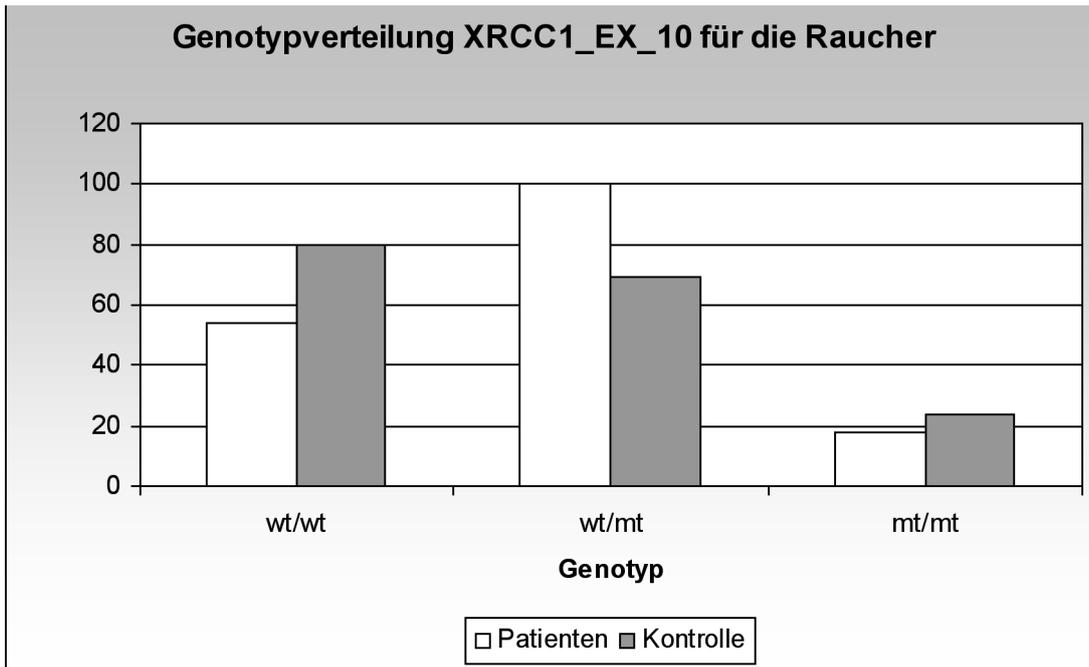
Gleichwohl der Odds Ratio Schätzer für kein Allelpaar signifikant erhöht ist, lässt sich trotzdem feststellen, dass sich unter den Rauchern mit nahezu 70% (68,6%) die hetero- und homozygote Mutante sehr viel häufiger findet als bei den Nichtrauchern (58,1%). Bei dieser Betrachtung muss des Weiteren bedacht werden, dass in der vorliegenden Studie die Raucher auch zahlenmäßig stärker vertreten sind.

4.4 Abbildungen Genotypverteilungen



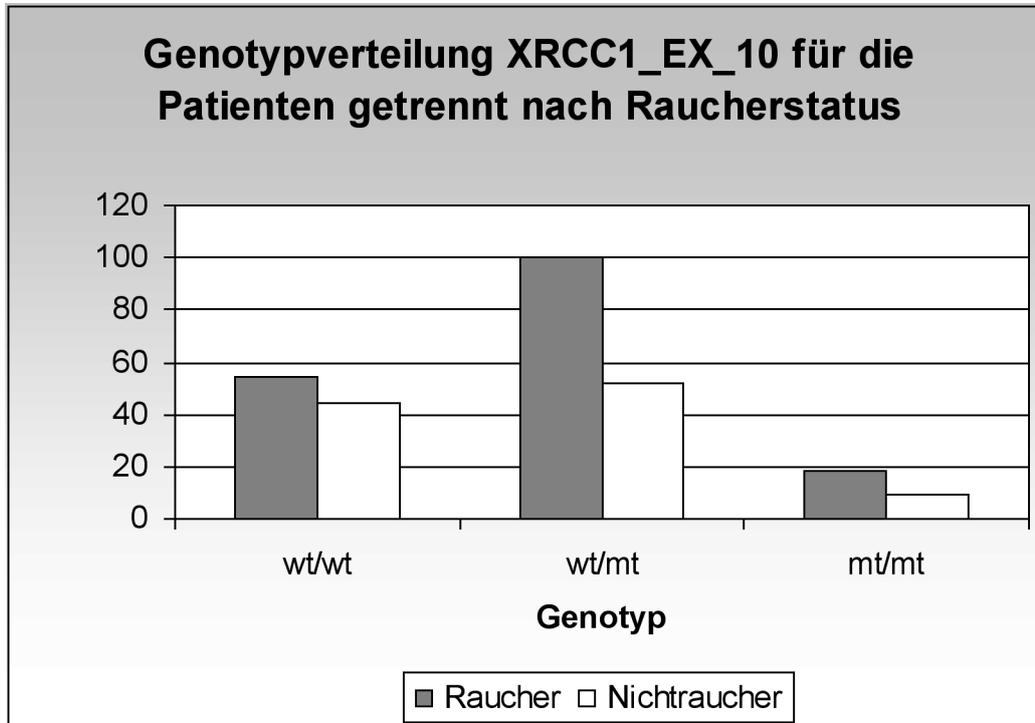
XRCC1 EX 10: x-ray repair cross-complementing gene 1 Exon 10; wt/wt Wildtyp; wt/mt heterozygotes Allelpaar der Mutation; mt/mt: homozygotes Allelpaar der Mutation

Abbildung 7: Genotypverteilung des Exon 10 im XRCC1 Gen innerhalb des Gesamtkollektivs der Head-Neck-Studie



XRCC1 EX 10: x-ray repair cross-complementing gene 1 Exon 10; wt/wt Wildtyp; wt/mt heterozygotes Allelpaar der Mutation; mt/mt: homozygotes Allelpaar der Mutation

Abbildung 8: Genotypverteilung des Exon 10 im XRCC1 Gen innerhalb des Kollektivs der Raucher



XRCC1 EX 10: x-ray repair cross-complementing gene 1 Exon 10; wt/wt Wildtyp; wt/mt heterozygotes Allelpaar der Mutation; mt/mt: homozygotes Allelpaar der Mutation

Abbildung 9: Genotypverteilung des Exon 10 im XRCC1 Gens für die Patienten getrennt nach Raucher und Nichtraucher

5 Diskussion

Die Synthese von DNA erfordert ein streng koordiniertes Zusammenwirken vieler Proteine. Wichtige Enzyme für diesen Prozess sind Polymerasen für die Synthese, Helikasen zur Trennung der beiden Stränge für die Bildung der Replikationsgabel, Primasen für den Beginn an der richtigen Stelle, Initiationsproteine zur Erkennung der Replikationsstelle, sowie Proteine zur Wiederherstellung der Doppelhelix. Fehler bei der Replikation sind jedoch unvermeidbar. Um die DNA vor der Genmutation und der Initiierung der Kanzerogenese zu schützen, hat sich durch die Evolution ein breites Spektrum an DNA-Reparatur-Genen entwickelt. Ein vielfältiges DNA-Reparatursystem ist fundamental für die Wahrung der genetischen Integrität, um das Erbgut der Zelle vor Replikationsfehlern, Noxen der Umwelt und kumulativen Effekten des Alters zu schützen. Mehr als 130 Gene sind bekannt, die in die Reparatur verschiedenster DNA-Schäden involviert sind (Popanda et al., 2004).

XRCC1 ist auf dem Chromosom 19q13.2 lokalisiert und interagiert mit der Polynukleotid Kinase, der DNA-Polymerase β und der DNA-Ligase III. Diese vier Proteine arbeiten in einem Multienzymkomplex zusammen, und gemeinsam sind sie für die Reparatur von Einzelstrangbrüchen verantwortlich, die besonders durch freie Oxidantien (reactive oxygen species) und ionisierende Strahlung hervorgerufen wurden. Damit hat es einen wichtigen Anteil an der Wahrung der genetischen Stabilität (Thompson et al., 1990; Whitehouse et al., 2001). Die Basen-Exzisions-Reparatur (BER) ist eine weitere Möglichkeit der Zelle, defekte DNA zu korrigieren. Bei der BER wird der DNA-Schaden, der durch spontane und induzierte Alkylantien oder Oxidantien entstanden ist, erkannt und repariert (Barnes et al., 1993). Auch daran ist *XRCC1* indirekt beteiligt.

Durch den kompletten oder teilweisen Ausfall dieses Enzyms wird die betroffene Zelle hypersensitiv gegenüber Schädigungen durch Methylierung, Oxidation oder Reduktion von Basen sowie Schädigungen durch ionisierende Strahlung. In der Folge kommt es gehäuft zu Chromosomentranslokationen, Deletionen und Schwesterchromatidaustauschen (Thompson und West, 2000).

Eine langsamere oder gar nicht stattfindende Korrektur von DNA-Schäden kann Mutationen in Tumorsuppressorgenen und Proto-Onkogenen verursachen, wodurch die Voraussetzung für autonome Zellproliferation geschaffen ist. Polymorphismen in Reparaturenzymen haben somit im Rahmen von Kanzerogenese-Prozessen eine besondere Bedeutung, da die polymorphen Varianten meist vom Wildtyp abweichende katalytische Eigenschaften aufweisen. Prinzipiell hängen Art und Ausmaß der vom Wildtyp abweichenden Eigenschaften einer polymorphen Enzymvariante von der Lage und vom Typ der zugrunde liegenden Mutation

ab. Während Genalterationen nicht-kodierender Genabschnitte meist ohne Konsequenz für die Zelle bleiben, kommt es bei Punktmutationen, die den kodierenden Bereich eines Gens betreffen, in der Regel zu einem Aminosäureaustausch. Als Folge gehen sie oft mit veränderten enzymatischen Eigenschaften einher. Deletionen in diesen Genbereichen führen meist dazu, dass eine katalytisch inaktive Form synthetisiert wird oder als Nullvariante keine Proteinsynthese erfolgt.

Im Jahre 1998 identifizierte die Arbeitsgruppe um Shen et al. drei kodierende Polymorphismen im *XRCC1* Gen (Shen et al., 1998). Sie sind seit ihrer Entdeckung bereits mehrfach Gegenstand von Studien gewesen. Am Codon 194 kommt es zum Aminosäureaustausch von Tryptophan für Arginin und am Codon 280 Histidin für Arginin. Im Codon 399 des Wildtyps kodiert das Basentriplett für die Aminosäure Arginin. Nach der Punktmutation wird im Basentriplett der Mutation die Base Guanin durch die Base Adenin ersetzt. Das hat zur Folge, dass dieses Basentriplett nun für die Aminosäure Glutamin kodiert (Shen et al., 1998). Die genauen funktionellen Effekte von den drei am meisten untersuchten Polymorphismen des *XRCC1* Gens sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird diskutiert, ob der Aminosäureaustausch die Funktion des Proteins verändert. In der Konsequenz könnten solch funktionellen Unterschiede Einfluss haben auf die Initiation und/ oder das Fortschreiten der Kanzerogenese. Die besondere Bedeutung des Codon 399 liegt darin begründet, dass es innerhalb der zentralen BRCT-Domäne von *XRCC1* lokalisiert ist. Diese Domäne enthält die Bindungsstelle für die Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP-1), ein Detektor für Einzelstrangbrüche (Masson et al., 1998). Bei Fehlen von PARP-1 ist die Rate von Einzelstrangbruch-Korrekturen um das Zwei- bis Dreifache vermindert (Mani et al., 2004). Aus den Untersuchungen von Duell et al. (2000) geht hervor, dass die Frequenz von Schwesterchromatidaustauschen bei Trägern der homozygoten Mutation des Exons 10 (Codon 399) deutlich höher lag als bei den homozygoten Trägern des Arg Allels.

In der Arbeit von Berwick und Vineis stellten die Autoren heraus, dass eine defizitäre DNA-Reparatur-Kapazität und das Auftreten von Karzinomen miteinander assoziiert sind und somit Studien, die sich mit interindividueller DNA-Variabilität befassen, zum Verständnis der Kanzerogenese entscheidend beitragen (Berwick und Vineis, 2000). Aber die Kenntnis des Polymorphismus in einem DNA Abschnitt oder in einem Reparaturenzym ist nicht nur wichtig für das Verständnis der Genese eines Karzinoms. Da Therapieansätze von malignen Erkrankungen häufig auf der Induzierung von DNA-Schäden basieren, ist es für den Behandlungserfolg, die Toxizität einer Behandlungsmaßnahme und damit für die Überlebensrate ebenfalls wichtig, den Polymorphismus in Reparaturmechanismen zu kennen (Goode et al., 2002).

5.1 Verteilung des XRCC1 Codon 399-Polymorphismus unter Kontrollen und Patienten

Das Risiko ein HNSCC zu entwickeln, wird auf den Einfluss diverser Faktoren zurückgeführt. Besonders chronischer Tabakkonsum, aber auch Alkoholkonsum, Fehlernährung, verminderte Aufnahme von Obst und Gemüse sind begünstigende Faktoren für die Genese eines Tumors im Kopf-Hals-Bereich. Andere Studien zeigten außerdem, dass auch die genetische Suszeptibilität, also die persönliche Empfindsamkeit, eine wichtige Rolle in der Ätiologie eines Kopf-Hals-Karzinoms spielt (Landis et al., 1998). Denn gleichwohl Tabak und Alkoholkonsum die entscheidendsten Risikofaktoren sind, so erkrankt doch letztlich nur eine kleine Fraktion der rauchenden Individuen tatsächlich an einer Neoplasie im oberen Aero-Digestivtrakt (Norppa, 2003).

Die Allelfrequenz variiert in Bevölkerungen verschiedener ethnischer Gruppen. Um Vergleiche mit anderen Studienergebnissen anstellen zu können, muss diese Tatsache berücksichtigt werden. In der *SNP500* Database des *National Cancer Institute* können die Verteilungen der Allelfrequenzen eingesehen werden (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/snplist.cfm>). Sie sind dort nach jeweiliger ethnischer Abstammung für gesunde Individuen eingeteilt.

SNP500Cancer ID: XRCC1-01						
Subpopulations	Genotypic			passed <i>HWE?</i>	Allelic	
	AA	AG	GG		A	G
<u>Total Completed</u>	15/102 (0.147)	42/102 (0.412)	45/102 (0.441)	-	72/204 (0.353)	132/202 (0.647)
<u>Afr/Afr American</u>	1/24 (0.042)	3/24 (0.125)	20/24 (0.833)	passed	5/48 (0.104)	43/48 (0.896)
<u>Caucasian</u>	6/31 (0.194)	17/31 (0.548)	8/31 (0.258)	passed	29/62 (0.468)	33/62 (0.532)
<u>Hispanic</u>	1/23 (0.043)	13/23 (0.565)	9/23 (0.391)	passed	15/46 (0.326)	31/46 (0.674)
Pacific Rim	7/24 (0.292)	9/24 (0.375)	8/24 (0.333)	passed	23/48 (0.479)	25/48 (0.521)

XRCC1: x-ray repair cross-complementing 1; GG: Guanin-Guanin; AG: Adenin-Guanin; AA: Adenin-Adenin; HWE: Hardy-Weinberg-Equilibrium; A: Adenin; G: Guanin

Tabelle 9: Genotypverteilung von 102 anonymen Individuen des SNP500 Database (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/snplist.cfm>)

Wie Tabelle 9 zu entnehmen ist, findet sich unter den Kaukasiern zu 25,8% die GG Genotyp-Variante von *XRCC1*. Der heterozygote Genotyp AG wird mit 54,8% und der homozygote Genotyp AA wird mit 19,4% angegeben. In der vorliegenden Arbeit, bei der alle Teilnehmer aus dem nordrhein-westfälischen Raum stammten und ethnisch somit ebenfalls den Kaukasiern zuzuordnen waren, konnte unter den Kontrollindividuen ein anderes Allelfrequenzmuster ausgemacht werden. Der Wildtyp GG fand sich bei 47,6% der Kontrollen, die heterozygote Variante machte 40,7% der Kontrollindividuen aus und die homozygote Mutante war mit 11,7% vertreten. Dieses Verteilungsmuster ist fast identisch mit dem des Gesamtkollektivs. Es gibt unterschiedliche Gründe dafür, dass es zu diesen diskordanten Ergebnissen kommen kann. Die *SNP500* Database gilt zwar als einzig validierte Datenquelle, allerdings muss kritisch angemerkt werden, dass die ethnische Gruppe der Kaukasier nur durch 31 Individuen repräsentiert ist. Das von uns untersuchte Kollektiv umfasst hingegen 290 Probanden. Außerdem werden bei der *SNP500* Database keine Angaben bezüglich Alter und Geschlecht der Individuen gemacht, Variablen, die in die Berechnungen der vorliegenden Arbeit einbezogen wurden.

Dass die Daten dieser Fall-Kontroll-Studie als repräsentativ einzustufen sind, verdeutlicht die Tatsache, dass die Allelfrequenz mit denen von häufig zitierten Arbeiten im Zusammenhang mit Kopf-Hals-Karzinomen nahezu übereinstimmen. So lagen die Allelfrequenzen des Minor Allels A in der vorliegenden Studie bei 32,1%, die bei Sturgis et al (1999) bei 34,1%, bei Lunn et al. (1999) bei 37% und bei Divine et al. (2001) bei 32%. In der Literatur gibt es diverse Studien mit einem nahezu identischen Genotyp-Verteilungsmuster (Lee et al., 2001; Tae et al., 2004; Xing et al., 2002; Yu et al., 2004).

Die These, dass der Polymorphismus im Codon 399 ein signifikanter Risikofaktor für die Genese eines Kopf-Hals-Karzinoms ist, war durch die Daten dieser Kandidaten-Gen-Studie nicht nachzuweisen. Es konnte anhand der Untersuchungen gezeigt werden, dass zwar mit dem Genotyp der heterozygoten Mutante (AG) ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko für ein Kopf-Hals-Karzinom einhergeht (OR: 1,51; 95%-KI: 1,01 – 2,29). Der homozygote Genotyp (AA) wies allerdings nur ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auf, was jedoch nicht von statistischer Signifikanz war (OR: 1,05; 95%-KI: 0,55 – 2,03). Unter Zusammenführung beider Gruppen (hetero- und homozygoter Mutationen) fanden sich ähnliche Ergebnisse (OR: 1,42; 95%-KI: 0,96 – 2,09). Auch hier waren die Daten nicht von statistischer Signifikanz.

Somit ist der Genotyp allein nicht für die Genese eines Kopf-Hals-Karzinoms verantwortlich zu machen.

Diese Daten harmonisieren mit den Ergebnissen der Arbeit der türkischen Arbeitsgruppe um Demokan et al. (2005). In dieser Studie wurden neben dem Polymorphismus Arg399Gln auch der Polymorphismus Arg194Trp (Exon 6) untersucht. Beide Mutationen stellten jeweils kein erhöhtes Risiko für die Kanzerogenese eines Kopf-Hals-Karzinoms dar. Die Verteilung der Allele differierte nicht signifikant zwischen Patienten und Kontrollen. Es wurde lediglich ein signifikantes Erkrankungsrisiko für die homozygote Mutante des Exon 6 unter den Rauchern ausgemacht.

In den osteuropäischen Staaten stellt das HNSCC ebenfalls ein ernstes medizinisches und soziales Problem dar, weshalb sich eine Vielzahl von Studien mit der Untersuchung der Genese befasst. Als Beispiel seien die Morbiditäts- und Mortalitätsraten von Larynxkarzinomen in Ungarn und Polen genannt, welche zu den höchsten Raten im weltweiten Vergleich zählen (Bray und Boffetta, 2000; Zatonski et al., 1991). In einer Kohortenstudie aus Polen versuchten Gajicka et al (2005) die Genotypvarianten ausfindig zu machen, die mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Larynxkarzinome einhergehen. Dabei beobachtete er die Genotypverteilung von fünf Polymorphismen in drei verschiedenen DNA-Reparaturgenen (*XPD*, *XRCC1* und *XRCC3*). Dafür setzte er Lymphozyten von ca. 300 Patienten und Lymphozyten einer Kontrollgruppe ähnlicher Größe DNA-Läsionen-induzierenden Substanzen aus (Bleomycin oder S9-aktivierte Benzo(a)pyrene). Nur zwei Allele des *XPD* Gens waren unter den Erkrankten mit einem Larynxkarzinom überrepräsentiert. Für die weiteren Polymorphismen (darunter eben auch *XRCC1*) konnte kein signifikanter Unterschied in der Verteilung des Genotyps unter Patienten und Kontrollen ausgemacht werden.

In Portugal untersuchte die Arbeitsgruppe von Varzim et al. (2003) in einer Fall-Kontroll-Studie im Jahr 2003 ebenfalls den Zusammenhang von *XRCC1* und *CYP1A1* Polymorphismen und der Entstehung von Larynxkarzinomen. Das Kollektiv war mit 88 HNSCC Patienten und 178 Kontrollindividuen deutlich kleiner als das von uns untersuchte Kollektiv. Die Häufigkeitsverteilung der Allele betreffend Arg399Gln (Codon 399) in der Gruppe der Kontrollen unterschied sich allerdings nur geringfügig von den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung. Zudem untersuchte die Arbeitsgruppe auch die Kombination eines Polymorphismus im *CYP1A1* Gen mit einer Mutation von *XRCC1* im Exon 6. Dabei zeigte sich eine signifikant höhere Häufigkeit in der Gruppe der Patienten.

Bei der Fall-Kontroll-Studie aus den Vereinigten Staaten von Sturgis et al. (1999) wurden die Polymorphismen am Codon 194 und Codon 399 des *XRCC1*-Gens bei HNSCC-Patienten untersucht. Nach logistischen Regressionen konnte anhand ihrer Daten gezeigt werden, dass der Codon 194 Polymorphismus kein statistisch signifikanter Risikofaktor für die Entwicklung eines Kopf-Hals-Karzinoms war. Es zeigten sich jedoch statistisch signifikante Unterschiede bei der Analyse der unterschiedlichen Lokalisationen bei HNSCC. Der CC-

Genotyp (Wildtyp) des *XRCC1* Codon 194 konnte als Risikogenotyp betreffend der oralen und pharyngealen Tumoren identifiziert werden (OR 2,46; KI: 1,22-4,97). Bezüglich der laryngealen Karzinome galt der Wildtyp nicht als Genotyp mit erhöhtem Risiko. Nach der logistischen Regressionsanalyse für den Codon 399-Polymorphismus fand sich für die homozygote Mutation ein erhöhtes, aber kein statistisch signifikantes Erkrankungsrisiko (adjustierte OR: 1,59; KI: 0,97 – 2,61). Für orale und pharyngeale Neoplasien traf dies ebenfalls zu (OR: 1,41; KI: 0,80 – 2,48). Unterteilt nach einzelnen Subgruppen zeigte sich jedoch eine bedeutende Gen-Umwelt-Interaktion. Für die Raucher galt, dass der Codon 399-Polymorphismus ein signifikant erhöhtes Erkrankungsrisiko darstellt (adjustierte OR: 3,18; KI: 1,28 – 7,94). Die Kombination beider Polymorphismen ergab unter den Patienten mit oralen oder pharyngealen Karzinomen eine OR von 3,22 (KI: 1,33 – 7,81), also ein additives Risiko. Aus den Ergebnissen schlussfolgerte die Arbeitsgruppe, dass der Genotyp alleine nicht als Risikofaktor für die Genese eines Karzinoms gewertet werden kann. Die Wahrscheinlichkeit eine Neoplasie zu entwickeln ändert sich allerdings, wenn der Organismus zusätzlichen Kanzerogenen ausgesetzt ist und damit die Zahl der DNA-Schädigungen steigt.

Die Arbeit von Tae et al. (2004) befasst sich mit 147 Patienten und 168 Kontrollindividuen, die im Zeitraum zwischen 1997 und 2001 am Hanyang Universitätskrankenhaus in Korea untersucht wurden. Es wurden ebenfalls die Polymorphismen Arg194Trp (Exon 6), Arg280His (Exon 9) und Arg399Gln (Exon 10) im Zusammenhang mit der Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen analysiert. Die Resultate waren konkordant mit unseren Daten. Laut ihren Ergebnissen fand sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Polymorphismus Arg399Gln und dem Risiko für ein Kopf-Hals-Karzinom. Für den Codon 280-Polymorphismus traf das Gleiche zu. Für die Mutation Arg194Trp konnte herausgearbeitet werden, dass es sich hierbei um ein Risikoallel handelt, welches für die Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms eine entscheidende Rolle spielt.

Olshan et al. (2002) belegten ebenfalls anhand ihrer Daten, dass der Arg399Gln Polymorphismus mit einem verminderten Erkrankungsrisiko assoziiert war, gleichwohl ihre Ergebnisse nicht von statistischer Signifikanz waren (OR: 0,6; KI: 0,4 – 1,1).

Mousumi et al. (2005) befassten sich mit einem möglichen erhöhten Leukoplakierisiko, sollte eine Mutation im *XRCC1* (Codon 194, 280 und 399) und/ oder *XRCC3* (Codon 241) Gen vorliegen. Die Leukoplakie gilt als wichtiger Risikofaktor, da sich 80% der oralen Präkanzerosen zu einer manifesten Neoplasie entwickeln (Shiu und Chen, 2004). Aber die Polymorphismen in allen Codons führten nicht zu einem erhöhten Risiko für Leukoplakie oder Krebs. Dies konnte für die Polymorphismen einzeln als auch in Kombination nachgewiesen werden (Mousumi et al., 2005). Ferner konnte die Arbeitsgruppe um Qiao et al. keinen Einfluss des Codon 399-Polymorphismus auf die DNA-Reparatur-Kapazität feststellen (Qiao

et al., 2002).

Die Datenlage in der Literatur bezüglich der Eigenschaften der Gln399 Variante ist jedoch sehr divergent. So befasste sich die US-amerikanische Studie von Huang et al. (2005) mit Polymorphismen in den vier DNA-Reparatur-Genen *MGMT*, *XRCC1*, *XPB*, *XRCC3*. Vereint wurden drei Fall-Kontroll-Studien, die sich mit Kollektiven aus Washington State, North Carolina und Puerto Rico befassten. Insgesamt waren es 555 Fälle und 792 Kontrollen, wobei 77% der Fälle und 88% der Kontrollen ethnisch den Kaukasiern zuzurechnen waren. Für alle drei Studien wurde bezüglich *XRCC1* ein übereinstimmendes Ergebnis erzielt. Die homozygote Variante des *XRCC1* Gln399 besitzt laut dieser Daten überraschenderweise einen protektiven Einfluss auf die Entwicklung eines Kopf-Hals-Karzinoms. Zudem waren die Daten von statistischer Signifikanz (OR, 0,56; KI, 0,32-0,94). Für *XPB* und *XRCC3* hingegen konnte kein Risiko assoziiert werden, was die Vermutung aufkommen lässt, dass nur bestimmte DNA-Reparaturenzyme Einfluss auf die Ätiologie eines Kopf-Hals-Karzinoms haben. Auch in einer indischen Studie von Sobti et al. (2007) konnte bei der Untersuchung eines Kollektivs bestehend aus 120 Patienten und 160 Kontrollindividuen gezeigt werden, dass sich der *XRCC1* Codon 399 Gln/Gln Genotyp protektiv auf die Genese eines Kopf-Hals-Karzinoms auswirkt. Die Ergebnisse waren ebenfalls von statistischer Signifikanz (OR: 0,31; KI: 0,12 - 0,78).

Aus anderen Untersuchungen ging hervor, dass die Mutation im *XRCC1* Gen eine schädigende Wirkung hat. So konnte durch einige Arbeiten gezeigt werden, dass es durch den *XRCC1* (Arg399Gln) Polymorphismus zu einer gesteigerten genetischen Empfindlichkeit für die Entwicklung von Ösophagus- (Yu et al., 2004), Lungen- (Ratnasinghe et al., 2001) und Kolon-Karzinome (Abdel-Rahman et al., 2000) kommt. Duell et al. und Lunn et al. beschrieben in ihren Arbeiten, dass diese Variante mit einem Übermaß an DNA-Schäden einhergeht (Duell et al., 2000; Lunn et al., 1999). Während Hsieh et al. (2003) anhand seiner Ergebnisse der Mutation ein vermehrtes Aufkommen von p53 Mutation zuordnete, belegte die Arbeitsgruppe um Hu et al. (2001) eine verminderte DNA-Reparatur-Kapazität für die Gln399 Variante. Geisler et al. (2005) behauptete anhand seiner Ergebnisse, dass der *XRCC1* 399Gln Genotyp als prädiktiver Marker für das Auftreten eines Kopf-Hals-Karzinoms und die Überlebensrate verwendet werden könnte.

Obwohl die Studienergebnisse zum Teil unterschiedlich sind, gibt es offensichtlich doch einen Zusammenhang zwischen der Mutation in DNA-Reparaturgenen und der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen. In der Zusammenschau der Studien scheint die Rolle des Polymorphismus im Codon 399 des *XRCC1* Gens bei Kopf-Hals-Karzinomen noch nicht hinreichend geklärt zu sein.

5.2 Bedeutung des Risikofaktors Rauchen

Durch die Einwirkung von Kanzerogenen wie Tabak oder Alkohol kann die DNA-Reparaturkapazität beeinträchtigt sein und dadurch einen negativen Effekt auf die Funktion des Enzyms haben. Das individuelle Risiko Krebs zu entwickeln wird dadurch beeinflusst. Unter Verwendung welcher Mechanismen die Kanzerogene des Tabaks auf die Entstehung von Head-Neck-Tumoren einwirken, ist zurzeit nicht vollständig geklärt. In in-vitro-Versuchen konnte bewiesen werden, dass Produkte des Tabakrauches einen direkten DNA-Schaden induzieren und die Korrektur verhindern können (Yu et al., 2004). Die wichtigsten kanzerogen wirkenden Inhaltsstoffe im Rauch des Tabaks sind polyaromatische Kohlenwasserstoffe, heterozyklische Kohlenwasserstoffe, N-Nitrosamine, aromatische Amine, Aldehyde und flüchtige Kanzerogene. Dabei stellen die polyaromatischen Kohlenwasserstoffe Vorboten von chemischen Verbindungen dar, die das Entartungsrisiko erhöhen. Die meisten dieser Verbindungen benötigen die metabolische Aktivierung durch die Cytochrom P450-Phase I Enzyme, um sich zu kompletten Kanzerogenen zu entwickeln. Einer der ersten Schritte im Rahmen der Kanzerogenese eines HNSCC ist deshalb, eine Verbindung zwischen diesen reaktiven Zwischenprodukten und der DNA der Mukosazellen zu induzieren (Sryfter et al., 1994; Varzim et al., 2003).

Unter Berücksichtigung des Raucherstatus hoben wir in unserer Genotyp-Analyse die Bedeutung der spezifischen Tabakrauch-Kanzerogene und des Faktors Exposition bei der Genese von HNSCC hervor. Im Vergleich zur Kontrollgruppe hatten rauchende Patienten eines Kopf-Hals-Tumors ein signifikant erhöhtes Risiko, gleichzeitig auch Träger der heterozygoten Mutation des *XRCC1* Codon 399-Polymorphismus zu sein (OR: 2,03; 95%-KI: 1,21 – 3,42). Allerdings traf dies nicht für die homozygote Mutation zu (OR: 1,27; 95%-KI: 0,57 – 2,86). Die gemeinsame Odds Ratio Schätzung für beide Mutanten (hetero- und homozygote) innerhalb des Patientenkollektivs der Raucher war zwar signifikant erhöht (OR: 1,86; 95%-KI: 1,12 – 3,06), allerdings ist die gemeinsame Odds Ratio Schätzung wahrscheinlich durch die Werte der heterozygoten Mutanten beeinflusst.

Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der bereits zitierten Arbeitsgruppen um Varzim et al. (2003) und Huang et al. (2005). Bei beiden Studien konnte kein Zusammenhang zwischen der Entstehung von HNSCC bei Rauchern oder Nichtrauchern und dem Auftreten von Mutationen im *XRCC1* Gen Codon 399 gezeigt werden.

Eine deutsche Arbeitsgruppe untersuchte die Genotypverteilung für *GSTM1* (*GSTM1*-Null und *GSTM1*-Positiv), *CYP1A1* (Ile462Val), *XPD* (Lys751Gln), *XRCC1* (Arg399Gln) und *XRCC3* (Thr241Val) unter 52 Nichtrauchern und 51 Rauchern. Aber weder für den Codon 399-Polymorphismus noch für die anderen Polymorphismen fand sich ein Unterschied

in der Verteilung innerhalb der Gruppe der Raucher und Nichtraucher (Hoffmann et al., 2005).

In einer Studie bezüglich der Kanzerogenese von Blasenkrebs wurde dem Polymorphismus ein protektiver Einfluss zugesprochen. Auch bei dieser Untersuchung kam es nicht zu einer signifikanten Interaktion mit Tabakkonsum (Stern et al., 2001).

Aber auch bezüglich der Wirkung von Tabakkonsum finden sich in der Literatur kontroverse Ergebnisse. So kamen Sturgis et al. bei ihren Untersuchungen zu dem Resultat, dass Raucher mit dem Polymorphismus am Codon 399 ein erhöhtes Erkrankungsrisiko haben (Sturgis et al., 1999). Die Arbeitsgruppe um Yu et al. (2004) kam bei ihren Analysen an einem Kollektiv bestehend aus 135 Patienten mit Ösophaguskarzinomen und 152 gesunden Kontrollindividuen zu dem Ergebnis, dass Raucher mit der homozygoten Mutation am Codon 399 ein 4,2-faches Risiko besitzen, ein Ösophagus-Karzinom zu entwickeln (OR: 4,20; 95% CI: 2,37 – 7,44).

Die individuelle Suszeptibilität für Karzinome, die durch Tabakkonsum beeinflusst werden, scheint von der genetischen Kapazität abzuhängen, die die spezifischen Tabak-Kanzergene aktivieren (Varzim et al., 2003).

5.3 Anmerkungen zur Head-Neck-Studie

Diese zum Teil divergierenden Resultate zwischen den verschiedenen Studien können durch die unterschiedliche Studienkollektivgröße (study power), dem „sampling design“ der Studien sowie durch die unterschiedlich genaue Definition des Phänotyps bedingt sein. Der Oberbegriff des HNSCC umfasst verschiedene Karzinome, die zwar anatomisch gesehen im gleichen Bereich liegen, jedoch spielen sicherlich einzelne Risikofaktoren bei den verschiedenen Neoplasien eine unterschiedlich starke Rolle. Der Oberbegriff ist also als nicht ganz unproblematisch zu werten. Als Beispiel sei die Arbeit von Sturgis et al. genannt, in der man in Abhängigkeit von der Neoplasie zu einem unterschiedlichen Ergebnissen kommt (Sturgis et al., 1999). Derselbe SNP kann für die jeweiligen Karzinome der Head-Neck-Gruppe unterschiedlich wichtig sein. Um die Genotyp-Phänotyp-Beziehung zu untersuchen, ist deshalb eine genaue und klare Definition des Phänotyps unverzichtbar. Aber auch genauere Lebensumstände wie Beruf und Ernährung, denen eine Bedeutung bezüglich des individuellen Risikos zugeschrieben wird, werden meist nicht deutlich.

Der Effekt der *XRCC1* Variante hat in Abhängigkeit von Typ und Intensität der DNA-schädigenden Substanz einen unterschiedlich starken Einfluss auf die DNA-Reparatur-Kapazität. Art und Menge des Tabaks wurden in einigen Arbeiten nicht spezifiziert. Auch der mögliche

Konsum von Alkohol wurde zum Teil weder quantitativ noch qualitativ erfasst. Da aber sowohl dem Genuss von Tabak als auch dem Konsum von Alkohol eine dosisabhängige kausale Wirkung bei der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren zugesprochen wurde, ist dies jedoch sehr entscheidend. Additiv erhöhen diese Faktoren das Risiko für die Entartung einer Zelle.

Häufig waren die untersuchten Kollektive nur sehr klein, so dass die Schätzungen sehr labil waren. Bei einigen SNPs kann die Untersuchung innerhalb eines kleinen Kollektivs einen falsch positiven Zusammenhang anzeigen und die Ergebnisse sind somit nur mit Einschränkungen interpretierbar. Mit zunehmender Zahl der teilnehmenden Individuen steigt deshalb auch die Aussagekraft einer Studie. Zudem stammten die untersuchten Kollektive häufig aus verschiedenen geografischen Regionen. Da die ethnischen Gruppen jedoch über ein divergentes Allelfrequenzmuster verfügen, lassen sich die Ergebnisse auch nicht untereinander vergleichen. Alternativ kann es sich bei einigen Ergebnissen um Zufallsbefunde handeln, die nicht repräsentativ sind.

Auch unsere Studie war einigen Fehlerquellen ausgesetzt. So war der Status des Rauchers nicht sehr genau definiert. Eine Angabe der „pack-years“ oder eine genauere Quantifizierung der gerauchten Zigaretten würde den Vergleich mit anderen Studienergebnissen einfacher machen. Auf Grund von falschen Angaben bezüglich der konsumierten Zigaretten kann es bei unserer Einteilung in Raucher und Nichtraucher leicht zu einer Missklassifikation kommen. Ferner wurden auch bei unserer Studie keine Aussagen bezüglich des Lebensstils (Konsum von Alkohol, Beruf und Ernährung) gemacht, der die individuelle Suszeptibilität stark beeinflusst. Besonders in Hinblick auf die potenzierende Wirkung des Alkohols bei der Kanzerogenese wäre dies sicherlich interessant gewesen. Zudem ist es fraglich, inwieweit ein Kollektiv aus nahezu 300 Patienten und nahezu 300 Kontrollindividuen tatsächlich repräsentativ ist.

Unsere Daten legen die Vermutung nahe, dass der Gln399-Polymorphismus im XRCC1 Enzym die Funktion nicht signifikant verändert. Dafür kann es verschiedene Gründe geben. Unter Umständen wird bei Zellen mit einer verminderten DNA-Reparatur-Kapazität eher die Apoptose als die Korrektur eingeleitet, wenn es sich um einen beträchtlichen DNA-Schaden handelt. Möglich ist zudem, dass dies die Zelle noch an anderer Stelle kompensiert. Treffen jedoch zwei Polymorphismen aufeinander, ändert sich gegebenenfalls die Situation. Als Beispiel seien die Ergebnisse von Varzim et al. (2003) und Bingtao et al. (2004) genannt. Die Kombination von zwei Polymorphismen führte in diesen Untersuchungen zu einer signifikant höheren Häufigkeit der Erkrankung in der Gruppe der Patienten. Möglicherweise sollten künftige Analysen stets zwei oder mehr Polymorphismen, die unterschiedliche Mechanismen der DNA-Reparatur betreffen, untersuchen. Die Daten könnten dann einzeln

und kombiniert ausgewertet werden.

Molekularbiologische Untersuchungen besitzen häufig nur eine schwach signifikante Aussagekraft, da die Studien meist klein sind. Da sie größtenteils nur Teilaspekte untersuchen, kann das multifaktorielle Gesamtbild der Kanzerogenese nicht wirklich erfasst werden. Weitere Aufschlüsse wird deshalb sicherlich die von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC, Lyon) in Auftrag gebrachte multizentrische ARCAGE-Studie (Alcohol related cancers and genetic susceptibility in Europe) bringen. An dieser bisher größten Fall-Kontroll-Studie bezüglich Kopf-Hals-Karzinomen nahmen zwischen dem 1. Januar 2002 bis zum 1. Dezember 2006 2347 Patienten und 2254 Kontrollen aus neun verschiedenen europäischen Ländern (Frankreich, England, Spanien, Irland, Deutschland, Griechenland, Tschechien, Norwegen, Italien, Estland und Schottland) teil. Bei dem Kollektiv sollten sowohl durch Interviews Daten der unterschiedlichen Lebensstile und Ernährungsformen erfragt als auch 166 SNPs auf 51 verschiedenen Genen untersucht werden. Die Studie soll Gene identifizieren, die das Risiko für Kopf-Hals-Karzinome beeinflussen und diese hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit Lebensstilfaktoren – insbesondere Nikotin und Alkoholenuss – analysieren. Deshalb handelt es sich um Gene, die mit der Metabolisierung von Alkohol und Tabakrauch zusammenhängen, die mit Nikotinabhängigkeit in Verbindung stehen sowie um Tumorsuppressor- und DNA-Reparaturgene. Dadurch kann einerseits das Verständnis des kanzerogenen Prozesses verbessert werden, andererseits könnte die Identifizierung von genetischen Polymorphismen, die bei der Entstehung von Krebs eine wichtige Rolle spielen, dazu beitragen, Personen mit einem extrem erhöhten Erkrankungsrisiko zu identifizieren. Aus den Ergebnissen ließen sich in der Folge spezifische Präventionsansätze entwickeln.

6. Zusammenfassung

Kopf-Hals-Karzinome (HNSCC) stellen ein großes, weltweit verbreitetes Gesundheitsproblem dar. Trotz Verbesserungen in der Behandlung dieser Neoplasie bleibt die Prävention das primäre Ziel. Voraussetzung zur Realisierung dieses Vorhabens ist die Identifizierung der spezifischen Agenzien und Mechanismen, die die Kanzerogenese entscheidend beeinflussen. Bekanntermaßen zählen Tabak- und Alkoholkonsum aufgrund ihrer DNA-schädigenden Wirkung zu den wichtigsten Noxen im Hinblick auf die Entwicklung eines HNSCC, jedoch scheinen auch bestimmte genetische Faktoren hier Einfluss zu nehmen.

So spielen DNA-Reparaturmechanismen eine tragende Rolle, um die genetische Integrität zu wahren und das Erbgut vor Mutationen, Replikationsfehlern und schädigenden Umwelteinflüssen zu schützen. XRCC1 ist ein solches DNA-Reparaturenzym, das bei der Basenexzisionsreparatur und der Korrektur von Einzelstrangbrüchen entscheidend mitwirkt. Polymorphismen in Reparaturenzymen wie dem XRCC1 und eine damit unter Umständen einhergehende eingeschränkte Funktionalität können die interindividuelle Empfindlichkeit für die Genese eines Kopf-Hals-Karzinoms beeinflussen und sind somit mögliche Marker für die HNSCC Suszeptibilität.

Für unsere Arbeit wurden 277 Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen und 290 Kontrollpersonen untersucht. Anhand dieser Fall-Kontroll-Studie sollte geprüft werden, inwiefern der XRCC1 Codon 399-Polymorphismus unter Berücksichtigung des Raucherstatus Auswirkung auf das Risiko für die Entwicklung eines Kopf-Hals-Karzinoms besitzt. Der analysierte Polymorphismus betrifft das Exon 10, wo aufgrund einer Punktmutation im Codon 399 im Protein die Aminosäure Arginin durch Glutamin ersetzt wird. Zur Genotypisierung des XRCC1 Codon 399-Polymorphismus wurde die Light-Cycler® Real-Time-PCR Technik verwendet.

Anhand unserer Ergebnisse konnten wir nachweisen, dass Träger der heterozygoten Mutation (AG) ein signifikant erhöhtes Risiko hatten, ein Kopf-Hals-Karzinomen zu entwickeln (OR: 1,51; 95%-KI: 1,01 – 2,29). Für die homozygote Mutation im Codon 399 (AA) traf dies allerdings nicht zu; für die Träger dieses Genotyps fand sich zwar ein erhöhtes Erkrankungsrisiko, allerdings war dies nicht von statistischer Signifikanz (OR: 1,05; 95%-KI: 0,55 – 2,03).

Weiterhin konnten wir mittels unserer Daten zeigen, dass Individuen mit positiver Raucheranamnese und mit dem Genotyp der heterozygoten Mutation ein zweifach erhöhtes Risiko haben, an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken (OR: 2,03; 95%-KI: 1,21 – 3,42). Aber für die Raucher, die die homozygote Mutation vorweisen, fand sich ein Erkrankungsrisiko, welches nicht statistisch signifikant erhöht war (OR: 1,27; 95%-KI: 0,57 – 2,86).

Unsere Ergebnisse gaben somit Hinweise für ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für den *XRCC1* Codon 399-Polymorphismus, jedoch bedarf es weiterer epidemiologischer Studien auch unter Einbeziehung von Polymorphismen anderer Reparaturenzyme, um klinische relevante, individuelle Risikoprofile erstellen zu können.

7. Literaturverzeichnis

Abdel-Rahman SZ, Soliman A, Bondy M. Inheritance of the 194Trp and the 399 Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett* 2000; 159: 79-86

Barnes DE, Lindahl T, Sedgwick B. DNA repair: review. *Curr Opin Cell Biol* 1993; 5: 424-433

Becker N, Wahrendorf J. *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland / Atlas of Cancer Mortality in the Federal Republic of Germany 1981-1990*. Springer Verlag 1998

Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 874-897

Bingtao H, Haijan W, Kaixin Z, Yi L, Xiaoping C, Gangqiao Z. Identification of genetic variants in base excision repair pathway and their associations with risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 4378-4384

Biolchini F, Pollastri G, Figurelli S, Chiarini L. Carcinogen metabolism, DNA damage repair and oral head and neck squamocellular carcinoma (HNSCC). *Minerva Stomatol* 2005; 54: 404-414

Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol* 2006; 7: 149-156

Bray BP, Boffetta P. Projections of alcohol- and tobacco-related cancer mortality in Central Europe. *Int J Cancer* 2000; 87: 122-128

Brüning T, Abel J, Koch B, Harth V, Donat S, Sachinidis A. Real-time PCR-analysis of the cytochrome P450 1B1 codon 432-polymorphism. *Arch Toxicology* 1999; 73:427-430.

Caldecott KW, McKeown CK, Tucker JD, Ljungquist S, Thompson LH. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 68-76

Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair* 2003; 2: 955-969

Crowe DL, Hacia JG, Hsieh CL, Sinha UK, Rice DH. Molecular pathology of head and neck cancer. *Histol Histopathol* 2002; 17: 909-914

- Demers PA, Boffetta P, Kogevinas M, Blair A, Miller BA, Robinson CF. Pooled reanalysis of cancer mortality among five cohorts of workers in wood related industries. *Scand J Work Environ Health* 1995; 21: 179-190
- Demokan S, Demir D, Suoglu Y, Kiyak E, Akar U, Dalay N. Polymorphisms of the XRCC1 DNA Repair Gene in Head and Neck Cancer. *Pathol Oncol Res* 2005; 11: 22-25
- Divine KK, Gilliland FD, Crowell RE, Stidley CA, Bocklage TJ, Cook DL. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat. Res* 2001; 461: 273-278
- Duell EJ, Wiencke JK, Cheng TJ, Varkonyi A, Zuo ZF, Ashok TdS. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis* 2000; 21: 965-971
- Dunphy EJ, Beckett MA, Thompson LH, Weichselbaum RR. Expression of the Polymorphic Human DNA Repair Gene XRCC1 Does Not Correlate with Radiosensitivity in the Cells of Human Head and Neck Tumor Cell Lines. *Radiat Res* 1992; 130: 166-170
- Esteve J, Riboli E, Pequignot G, Terracini B, Merletti F, Crosignani P. Diet and cancers of the larynx and hypopharynx: the IARC multi-center study in southwestern Europe. *Cancer Causes Control* 1996; 7: 240-252
- Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskula-Sztul R, Wierzbicka M, Szyfter W, Szyfter K. Reduced DNA Repair Capacity in Laryngeal Cancer Subjects. A comparison of Phenotypic and Genotypic Results. *Adv Otorhinolaryngol* 2005; 62: 25-37
- Geisler SA, Olshan AF, Cai J, Weissler M, Smith J, and Bell D. Glutathione S-transferase polymorphisms and survival from head and neck cancer. *Head Neck*, 2005; 27: 232-242
- Goode EL, Ulrich CM, Potter JD. Polymorphisms in DNA Repair Genes and Associations with Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1513-1530
- Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamos cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003; 260:502-508
- Hecht S. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer: the role of the DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 733-744
- Hoffmann H, Isner C, Högel J, Speit G. Genetic polymorphisms and the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutagenesis* 2005; 20: 359-364

Hsieh L, Chien H, Chen I. The XRCC1 399Gln polymorphism and the frequency of p53 mutations in Taiwanese oral squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 22: 439-443

Hu JJ, Smith TR, Miller MS, Mohrenweiser HW, Golden A, Case LD. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis* 2001; 22: 917-922

Huang WY, Olshan AF, Schwartz SM, Berndt SI, Chen C, Llica V. Selected Genetic Polymorphisms in MGMT, XRCC1, XPD, and XRCC3 and Risk of Head and Neck Cancer: A Pooled Analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1747-1753

Huber A, Bai P, de Murcia J, De Murcia G. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair* 2004; 3: 1103-1108

Hussey DH, Latourette HB, Panje WR. Head and neck cancer: an analysis of the incidence, patterns of treatment, and survival at the University of Iowa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991; 4: 2-16

Institut für Humangenetik der Technischen Universität München, 2007: Tests for deviation from Hardy-Weinberg Equilibrium. <http://ihg.gsf.de/cgi-bin/hw/hwa2.pl> (09.11.2005)

Jemal A, Siegel R, Ward E. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-130

Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001; 27: 247-254

Kjaerheim K, Gaard M, Andersen A. The role of alcohol, tobacco, and dietary factors in upper aerogastric tract cancer: a prospective study of 10,900 Norwegian men. *Cancer Causes Control* 1998; 9: 99-108

Kleist B, Bankau A, Lorenz G, Jager B, Poetsch M. Different risk factors in basaloid and common squamous head and neck cancer. *Laryngoscope* 2004; 114: 1063-1068

Knippers R. *Molekulare Genetik*. Thieme Verlag 1997: 235-256

Knudson AJ. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823

Ko Y, Abel J, Harth V, Bröde P, Antony CA, Donat S. Association of CYP1B1 Codon 432 mutant allele in head and neck squamous cell cancer is reflected by somatic mutations of p53 in tumor tissue. *Cancer Res* 2001; 61: 4398-4404

Kreinbrock L, Schach S. Epidemiologische Methoden. Spektrum Akademischer Verlag 2004

Kubota Y, Horiuchi S. Independent roles of XRCC1's two BRCT motifs in recovery from methylation damage. *DNA Repair* 2003; 2: 407-415

Kubota Y, Nash RA, Klungland A, Schar P, Barnes DE, Lindahl T. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein. *EMBO J* 1996; 15: 6662-6670

Ladiges W, Wiley J, MacAuley A. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1 and age-related disease. *Mech Ageing Dev* 2003; 124: 27-32

Lampert T, Burger M. Rauchgewohnheiten in Deutschland-Ergebnisse des telefonischen Bundes-Gesundheitssurveys 2003. *Das Gesundheitswesen* 2004; 66: 511-517

Landis SH, Murray T, Bolden S, Wigo PA. Cancer statistics 1998. *CA Cancer J Clin*, 1998; 48: 6-29

Lee JM, Lee YC, Yang SY, Yang PW, Luh SP, Lee CJ et. Genetic polymorphisms of XRCC1 and the risk of the esophageal cancer. *Int J Cancer* 2001; 95: 240-246

Lepenies J. Genetische Ursachen der Tumorentstehung. In: Bühling KJ, Lepenies J, Witt K, Seiffert K, HRSG Allgemeine und spezielle Pathologie: Urban und Fischer 2000: 93-95

Lunn R, Langlois R, Hsieh L, Thompson C, Bell D. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res* 1999; 29: 2557-2561

Maier H, de Vries N, Weidauer H. Occupation and cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. *HNO* 1990; 38: 271-278

Maier H, Zöller J, Herrmann A, Kreiss M, Heller W-D. Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngol. Head Neck Surg* 1993; 108: 655-661

Mani RS, Karimi-Busheri F, Fanta M, Caldecott KW, Cass CE, Weinfeld M. Biophysical Characterization of Human XRCC1 and Its Binding to Damaged and Undamaged DNA. *Biochemistry* 2004; 43: 16505-16514

Mao L, Hong WK. How does human papillomavirus contribute to head and neck cancer development? *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 978-980

Masson M, Niedergang C, Schreiber V, Muller S, Menissier-De Murcia J, De Murcia J. XRCC1 is specifically associated with poly (ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 3563-3571

McCullough ML und Giovannucci EL. Diet and Cancer Prevention. *Oncogene* 2004; 23: 6349-6364

Mousumi M, Nilabja S, Ranjan Rashmi P, Bidyut R. Increased risk of oral leukoplakia and cancer among mixed tobacco users carrying XRCC1 variant haplotypes and cancer among smokers carrying two risk genotypes: one on each of two loci GSTM3 and XRCC1 (Codon 280). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 2106-2112

National Cancer Institute, 2007: Cancer Genome Anatomy Project, SNP500 Cancer Database. <http://snp500cancer.nci.nih.gov/snplist.cfm> (09.06.2004)

National Center for Chronic Disease Prevention and Health, Office of Smoking and Health. Promotion, centers for disease control and prevention. Cigarette smoking among adults - United States, 1993. *Mortal Wkly Rep* 1994; 43: 925-930

Norppa H. Genetic susceptibility, biomarker responses and cancer. *Mutat Res* 2003; 544: 339-348

Nurse P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. *Cell* 2000; 100: 71-78

Olshan AF, Watson MA, Weissler MC, Bell DA. XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Lett* 2002; 178: 181-186

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimate of the worldwide incidence of eighteen major cancers in 1985. *Int J Cancer* 1993; 54: 594-606

Passarge E. Reparatur von DNA-Schäden. In: Passarge E, HRSG. Taschenatlas der Genetik: Thieme Verlag 2004: 82-83

Peltomaki P. Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 735-740

Peters ES, McClean MD, Marsit CJ, LUCKETT B, Kelsey KT. Glutathione S-Transferase Polymorphisms and the Synergy of Alcohol and Tobacco in Oral, Pharyngeal and Laryngeal Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 2196-2202

- Popanda O, Schattenberg T, Phong C. Specific combinations of DNA repair gene variants and increased risk for non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2433-2441
- Probst R, Grevers G, Iro H. Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. Georg Thieme Verlag, 2000: 370-375
- Qiao Y, Spitz M, Guo Z. Rapid assessment of repair of ultraviolet DNA damage with a modified host-cell reactivation assay using a luciferase reporter gene and correlation with polymorphisms of DNA repair genes in normal human lymphocytes. *Mut Res* 2002; 209: 165-174
- Ratnasinghe D, Yao S, Tangrea J. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 119-123
- Riede UN, Schaefer HE. Allgemeine und spezielle Pathologie. Thieme Verlag 1995: 346-367
- Sanger F, Nicklen S, Coulsen AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Sci USA* 1977; 74: 5463-5467
- Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferley J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. *Anticancer Res* 1998; 18: 4779-4786
- Shangina O, Brennan P, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Fabianova E, Fletcher T. Occupational exposure and Laryngeal and hypopharyngeal cancer risk in central and eastern Europe. *Am J Epidemiol* 2006; 164: 367-375
- Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser HW. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58: 604-608
- Shi QL, Xu DH, Sun CS, Li LS. Study on family aggregation of esophageal cancer in Linzhou. *Chin J Prev Med* 2000; 34: 269-270
- Shields P, Harris C. Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. *JAMA* 1991; 266: 681-687
- Shiu M, Chen T. Impact of betel quid, tobacco and alcohol on three-stage disease natural history of oral leukoplakia and cancer: implication for prevention of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 39-45

- Sobti RC, Singh J, Kaur P, Pachouri SS, Siddiqui EA. XRCC1 codon 399 and ERCC2 codon 751 polymorphism, smoking, and drinking and risk of esophageal squamous cell carcinoma in a North Indian population. *Cancer Genet Cytogenet* 2007; 175: 91-97
- Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 689-698
- Sryfter K, Hemminkin D, Sryfter W. Aromatic DNA adducts in larynx biopsies and leucocytes. *Carcinogenesis* 1994; 15: 2195-2199
- Statistisches Bundesamt Deutschland, 2007a: Tabak und Alkoholkonsum. <http://www.destatis.de/jetspeed/portal/cms/sites/destatis/internet/de/content/statistiken/gesundheit/gesundheitszustandrisiken/tabellen/content75/rauchverhalten.psmI> (11.09.2006)
- Statistisches Bundesamt Deutschland, 2007b: Todesursachen in Deutschland. <http://www-ec.destatis.de/csp/shop/sfg/bpm.html.cms.cbroker.cls?cmspath=struktur,sfgsuergebnis.csp> (19.3.2007)
- Stern MC, Umbach DM, van Gils CH, Lunn RM, Taylor JA. DNA repair XRCC1 polymorphism, smoking and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 125-131
- Sturgis E, Castillo E, Li L, Zheng R, Eicher S, Clayman G. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2125-2129
- Suzuki T, Wakai K, Matsuo K, Hirose K, Ito H. Effect of dietary antioxidants and risk of oral, pharyngeal and laryngeal squamous cell carcinoma according to smoking and drinking habits. *Cancer Sci* 2006; 97: 760-767
- Tae K, Lee HS, Park BJ, Park CW, Kim KR, Cho HY. Association of DNA Repair Gene XRCC1 Polymorphisms with Head and Neck Cancer in Korean Population. *Int J Cancer* 2004; 111: 805-808
- Thompson LH, Brookman KW, Jones NJ, Allen SA, Carrano AV. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand breaks and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6160-6171
- Thompson LH, West MG. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mut Res* 2000; 459: 1-18
- Tuteja N, Tuteja R. Unraveling DNA repair in human: molecular mechanisms and consequences of repair defect. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2001; 36: 261-290

Tuyns A, Esteve J, Raymond L, Berrino F, Benhamou E, Blanchet F. Cancer of the Larynx/ hypopharynx, tobacco and alcohol: IARC international casecontrol study in Turin and Varese (Italy), Zaragoza and Navarra (Spain), Geneva (Switzerland) and Calvados (France). *Int J Cancer* 1988; 41: 483-491

Varzim G, Monteiro E, Silva R, Fernandes J, Lopes C. CYP1A1 and XRCC1 gene polymorphisms in SCC of the larynx. *Eur J Cancer Prev* 2003; 12: 495-499

Venkitaraman AR. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* 2002; 108: 171-182

Vidal AE, Boiteux S, Hickson ID, Radicella JP. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *The EMBO Journal* 2001; 20: 6530-6539

Vispe S, Yung TM, Ritchot J, Seriszawa H, Satoh MS. A cellular defense pathway regulating transcription through poly(ADP-ribosyl)ation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 9886-9891

Whitehouse CJ, Taylor RM, Thistlethwaite A, Zhang H, Karimi-Busheri F, Lasko DD. XRCC1 Stimulates Human Polynukleotide Kinase Activity at Damaged DNA Termini and Accelerates DNA Single-Strand Break Repair. *Cell* 2001; 104: 107-117

Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer-a review. *Oral Oncology* 1998; 34: 441-447

Wong RH, Wang JD, Hsieh LL, Cheng TJ. XRCC1, CYP2E1 and ALDH2 genetic polymorphisms and sister chromatid exchange frequency alterations amongst vinyl chloride monomer-exposed polyvinyl chloride workers. *Arch Toxicol* 2003; 77: 433-440

Xing D, Qi J, Miao X, Lu W, Tan W, Lin D. Polymorphisms of DNA repair gens XRCC1 and XPD and their associations with risk of sophageal squamous cell carcinoma in a Chinese population. *Int. J. Cancer* 2002; 100:600-605

Yang ZH, Du B, Wei YS, Zhang JH, Zhou B. Genetic Polymorphisms of the DNA Repair Gene and Risk of Nasoparyngeal Carcinoma. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 491-496

Yu HP, Zhang XY, Wang XL, Shi LY, Li YY, Li F. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and esophageal cancer risk. *Cancer Detect Prev* 2004; 28: 194-199

Zatonski W, Becher H, Lissowska J, Wahrendorf J. Tobacco, alcohol, and diet in the etiology of laryngeal cancer: A population-based case-control study. *Cancer Causes Control* 1991; 2: 3-10

Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27: 560-567

8. Danksagung

Ich danke allen, die mich bei der Fertigstellung dieses Projektes unterstützt haben.

Herrn Professor Dr. med. Hans Vetter danke ich für die Möglichkeit, an seiner Klinik diese Arbeit durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privat-Dozent Dr. med. Thomas Neuhaus für die Überlassung des Themas und für die fachliche sowie engagierte Betreuung dieser Arbeit, die wesentlich zum Gelingen beigetragen hat.

Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. med. Yon-Dschun Ko, Herrn Dr. med. Volker Hardt sowie Herrn Manfred Kremers für ihre kompetente Unterstützung.

Ferner sei Frau Silke Schöneborn, Frau Elisabeth Grünewald und Herrn Dr. med. Viktor Janzen gedankt, die mir bei den labordiagnostischen Untersuchungen sehr behilflich waren.

Meine Anerkennung gilt ebenfalls Frau Sylvia Rabstein für ihre Hilfe bei den statistischen Auswertungen.

Meinen Brüdern Dietmar und Daniel sowie Mette Besuden sei herzlichst für ihre Freundschaft und ihre außerordentliche Unterstützung gedankt.

Bedanken möchte ich mich insbesondere bei meiner Ehefrau Sandra, die mir stets mit konstruktivem Rat, guter Laune, unermüdlicher Geduld und liebevollem Verständnis zur Seite stand. Sie und meine Tochter Laura haben mich bei der Fertigstellung der Arbeit sehr motiviert.

Vor allem möchte ich mich aber bei meinen Eltern Barbara und Martin Primke bedanken, die meinen persönlichen und beruflichen Werdegang in allen Lebensphasen bedingungslos und engagiert begleitet haben. Ich danke ihnen für ihre Hilfe bei der Lösung kleiner und großer Probleme.