

**Zusammenhang zwischen *x-ray repair cross-complementing Gene 1*
Polymorphismen in Exon 6 und Exon 9
und der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen**

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

vorgelegt von
Mette Marie Besuden
aus Berlin
2008

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät Bonn

1. Gutachter: Herr Privatdozent Dr. med. Thomas Neuhaus
2. Gutachter: Herr Professor Dr. med. Hans-Peter Fischer

Tag der Mündlichen Prüfung: 23.10.2008

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Bonn

Direktor: Herr Professor Dr. med. Hans Vetter

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn unter http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert.

Für Susanne

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	7
1 Einleitung	9
1.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome	10
1.2 Risikofaktoren	11
2 Genetik	
2.1 Karzinogenese	15
2.2 DNA-Reparaturmechanismen	17
3 <i>X-ray repair cross-complementing Gene 1</i>	
3.1 Gen	19
3.2 XRCC1- Proteinstruktur	20
3.3 Funktion des Genprodukts	21
3.4 Funktionelle Relevanz der Mutation	24
4 Zielsetzung der Arbeit	27
5 Material und Methoden	
5.1 Studienkollektiv	28
5.2 Konventionelle PCR	29
5.3 Real-Time PCR-Technik und Mutationsanalyse	30
5.4 Primertest	32
5.5 Gelelektrophorese	33
5.6 Sequenzierung	34

5.7	Genotyp-Analyse	34
5.8	Statistische Auswertungen	35
6	Ergebnisse	
6.1	Genotypverteilung des <i>XRCC1</i> Exon 6 Codon 194 Polymorphismus	36
6.1.1	<i>XRCC1</i> Exon 6 Polymorphismus - Genotypverteilung bei Rauchern	37
6.1.2	<i>XRCC1</i> Exon 6 Polymorphismus - Genotypverteilung bei HNSCC-Patienten	38
6.2	Genotypverteilung des <i>XRCC1</i> Exon 9 Codon 280 Polymorphismus	38
6.2.1	<i>XRCC1</i> Exon 9 Polymorphismus - Genotypverteilung bei Rauchern	40
6.2.2	<i>XRCC1</i> Exon 9 Polymorphismus - Genotypverteilung bei HNSCC-Patienten	40
7	Diskussion	42
7.1	Auswirkungen des <i>XRCC1</i> Exon 6 Codon 194 Polymorphismus	44
7.2	Auswirkungen des <i>XRCC1</i> Exon 9 Codon 280 Polymorphismus	47
7.3	Bedeutung des Risikofaktors Rauchen	49
7.4	Funktionelle Konsequenzen der Mutation	51
7.5	Kombination von Risikogenotypen	54
7.6	Stellenwert der vorliegenden Studie	55
8	Zusammenfassung	57
9	Literaturverzeichnis	59
	Danksagung	74

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

95%-KI	95%-Konfidenzintervall
A	Adenin
AP	Apurin/Apyrimidin
APE 1	AP-Endonuklease 1
aqua dest.	aqua destillata
Arg	Arginin
BER	Basenexzisionsreparatur
BRCT 1/2	breast cancer susceptibility protein-Terminal 1/2
C	Cytosin
ddNTP	Didesoxynukleotitriphosphat
DNA	Desoxynucleinacid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DSBR	Doppelstrangbruchreparatur
EBV	Epstein-Barr-Virus
EGF	epidermal growth factor
FME	Fremdstoff-metabolisierende Enzyme
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
Gln	Glutamin
G-Phase	Gap-Phase
His	Histidin
HNSCC	head and neck squamous cell carcinoma
hOGG 1	humane 8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase 1
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HSV	Herpes simplex-Virus
HWE	Hardy-Weinberg-Equilibrium
kDA	kiloDalton
LOH	loss of heterozygosity

Mt	Mutante
N	Stickstoff
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
NHEJ	non-homologous end-joining defective
OR	Odds Ratio
PARP-1	Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1
PCR	Polymerase chain reaction
PNK	Polynukleotidkinase
Pol delta	Polymerase delta
s	Sekunde
SCE	sister chromatid exchange
SNP	single nucleotid polymorphism
S-Phase	DNA-Synthese-Phase
SSBR	single strand break repair
T	Thymin
Taq	Thermophilus aquaticus
TGF	transforming growth factor
Trp	Tryptophan
Wt	Wildtyp
XRCC1	x-ray repair cross-complementing gene 1

1 Einleitung

Krebserkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen und verzeichnen weltweit eine Zunahme der Inzidenz (World Health Organization, 2006). Im Jahr 2005 waren laut Angaben der World Health Organization (WHO) 13% (7,6 Mio) aller Todesfälle auf Krebserkrankungen zurückzuführen. In den Industrienationen rangieren bösartige Neubildungen bereits an zweiter Stelle der Todesursachen hinter Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems. Die Zahlen des Statistischen Bundesamtes in Wiesbaden zeigen auch für Deutschland eine Zunahme der krebsbedingten Sterbefälle/100.000 Einwohner von 201,1 im Jahr 1980 auf 263,6 im Jahr 2006 (Statistisches Bundesamt, 2008).

Ungefähr 6% aller Tumorpatienten weltweit leiden an Plattenepithelzellkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (Head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) (Parkin et al., 2005). Die Inzidenz in der Bundesrepublik liegt bei jährlich ca. 50 Neuerkrankungen/100.000 Einwohner (Deutsches Krebsforschungszentrum 2004, Lang et al., 2002) mit steigender Tendenz. Trotz verbesserter Therapien durch Fortschritte in den beteiligten Fachgebieten Chirurgie, Onkologie und Strahlentherapie lassen sich bis heute keine zufriedenstellenden Ergebnisse die Langzeitprognose betreffend erzielen. Die 5-Jahresüberlebensraten von ca. 50% zählen immer noch zu den geringsten im Vergleich mit anderen Tumorerkrankungen (Biolchini et al., 2005; Hardisson et al., 2002). Betrachtet man unterschiedliche Ethnizitäten in verschiedenen Ländern, so zeigen sich 5-Jahresüberlebensraten zwischen 39,5% für Afro-Amerikaner und 61,8% für Kaukasier (Ragin et al., 2005).

Wie bei den meisten Malignomen hängt auch bei HNSCC die Prognose entscheidend von dem Erkrankungsstadium bei Diagnosestellung ab. Leider liegt bei dem Großteil der Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose bereits ein fortgeschrittenes Stadium vor. In frühen Phasen der Erkrankung kommt es meist nur zu geringer Symptomatik, die Beschwerden werden banalisiert und führen somit zu einer verspäteten Diagnose. Dies berücksichtigend wird deutlich, wie wichtig die Erforschung von Krankheitsfaktoren auf molekularer Ebene ist, um auf diesem Wege individuellere Risikoprofile mit dem Ziel der Prävention erstellen zu können.

DNA-Reparatursysteme sind von fundamentaler Wichtigkeit in Bezug auf die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität im Fall von Replikationsfehlern, schädigenden Umwelteinflüssen und kumulativen Irritationen durch den Alterungsprozeß. Da nicht korrigierte Schädigungen der DNA in unkontrollierte Zellproliferation zu münden vermögen, könnte die dauerhafte Schädigung von Reparaturenzymen für ein erhöhtes Krebsrisiko mitverantwortlich sein.

Neben genetischen Suszeptibilitätsfaktoren spielt jedoch vor allem die individuelle Belastung mit bereits bekannten Risikofaktoren eine herausragende Rolle.

So ist das Rauchen von Tabak für ca. 30% aller Krebstodesfälle in den entwickelten Ländern (Vineis et al., 2004) und für ca. 4-5 Mio. Tote durch Krebs- und andere Erkrankungen (vaskuläre, respiratorische Erkrankungen) im Jahr weltweit verantwortlich.

1.1 Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome

Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches machen weltweit 6% der soliden Tumore aus (Hardisson, 2003), in mehr als 90% handelt es sich dabei um Plattenepithelzellkarzinome. Es zeigt sich ein deutlicher Unterschied zwischen der Häufigkeit in den Industrienationen und dem Auftreten von HNSCC in Entwicklungsländern. Unter den verschiedenen Krebserkrankungen rangiert HNSCC weltweit an achter (Ragin et al., 2007), in den Entwicklungsländern jedoch bereits an sechster Stelle (Parkin et al., 2005, Jemal et al., 2006).

Tumoren der Lippe, des Mundbodens und des Kehlkopf-Rachenbereichs gehören in Deutschland zu den seltenen Tumorerkrankungen. Bei Männern verzeichnete das Statistische Bundesamt 9,0 Sterbefälle/100.000 Einwohner, Frauen hingegen verstarben zu einem deutlich geringeren Anteil von 2,6/100.000 Einwohnern an bösartigen Neubildungen im Bereich der Lippe, Mundhöhle oder des Pharynx (Statistisches Bundesamt, 2006).

Unter den HNSCC ist Kehlkopfkrebs in Deutschland der häufigste bösartige Tumor. Nach Zahlen des Robert-Koch-Instituts (2007) erkrankten jährlich ca. 2800 Männer und 450 Frauen an einem Kehlkopfkarcinom, das Erkrankungsalter liegt im Mittel um das 64.

Lebensjahr und damit ca. 5 bis 7 Jahre vor dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen.

Bei Betrachtung der Entwicklung der Sterblichkeit an bösartigen Neubildungen des Kopf-Hals-Bereiches zeigt sich, dass diese zu Beginn der 1950er Jahre noch deutlich niedriger lag und etwa seit Mitte der 1960er bis in die 1980er Jahre einen Anstieg verzeichnete. Dieser Trend ist nach Angaben des Robert-Koch-Instituts (RKI) jedoch seit Beginn der 1990er Jahre wieder rückläufig. Diese Daten beziehen sich vor allen Dingen auf das männliche Geschlecht. Bei Frauen ist die Sterblichkeitsrate insgesamt deutlich niedriger, die Neuerkrankungs- und Sterberaten sind laut RKI weitgehend gleich geblieben (Robert-Koch-Institut, 2004 a und b).

1.2 Risikofaktoren

Plattenepithelkarzinome des oberen Aero-Digestiv-Traktes entwickeln sich durch eine Serie von mittlerweile klinisch und histopathologisch gut definierten Stadien. Einer Vielzahl von endogenen und exogenen Faktoren wird eine direkt oder indirekte kanzerogene Wirkung zugeschrieben (Abb. 1). Dabei stellen Alkohol und Tabak die beiden Hauptdeterminanten in der Genese dieser Tumorerkrankungen dar (Li et al., 2007). Je nach Lokalisation des Malignoms fallen die Risikofaktoren unterschiedlich ins Gewicht, da die anatomischen Wege für inhalative Noxen und die Aufnahme fester und flüssiger Nahrungsmittel aboral der Epiglottis getrennt sind. Grundsätzlich ist für beide Noxen von einer klaren Dosis-Wirkungsbeziehung auszugehen (Spitz et al., 1999).

Hauptverantwortlich als Karzinogene sind verschiedene Inhaltsstoffe des Tabakrauchs wie polyaromatische und heterozyklische Kohlenwasserstoffe, N-Nitrosamine, aromatische Amine, Aldehyde, anorganische Bestandteile und radioaktive Elemente. Eine Exposition gegenüber diesen Faktoren führt zu einem Anstieg von DNA-Schäden in der Zelle in Form einer nicht-linearen Dosis-Wirkungsbeziehung (Van Schooten et al., 1997). Viele der im Tabakrauch enthaltenen Karzinogene werden durch Phase-I-Reaktion-vermittelndes Cytochrom P450 (CYP450) in reaktive Metaboliten umgewandelt. Bleibt die Inaktivierung dieser Metaboliten aus, so binden sie an DNA,

bilden DNA-Addukte und führen zur oxidativen oder alkylierenden Schädigung der DNA (Zienolddiny et al., 2006, Geisler et al., 2005). Die genomische Integrität kann jedoch durch DNA-Reparaturmechanismen wieder hergestellt werden.

Das Rauchen von Tabak mindert zusätzlich die Wirksamkeit von Bestrahlungs- und Chemotherapie. So konnte die Arbeitsgruppe von Onoda 2001 zeigen, dass Nikotin durch Inhibition der induzierten Apoptose den Zelltod verhindert. Dies geschieht über Interaktion mit einer Signalkaskade, die genauen Mechanismen dieser Interaktion sind jedoch noch nicht aufgeklärt.

Ebenso wird dem regelmäßigen Konsum von Alkohol, insbesondere von hochprozentigen alkoholischen Getränken, bei diesen Tumorlokalisationen eine direkte karzinogene Wirkung zugesprochen. Die Mechanismen beruhen auf der Entstehung reaktiver Sauerstoff-Radikale, Lipidperoxidation und Acetaldehyden (Brooks, 1997; Bofetta und Hashibe, 2006). Auch die Anwendung von alkoholhaltigen Mundspülungen steht in engem Zusammenhang mit der Inzidenz von Karzinomen der Mundhöhle, da die Mukosa bei regelmäßiger Anwendung von ethanolhaltigen Mundspülungen hohen Alkoholkonzentrationen ausgesetzt wird (Winn et al., 1999). Desweiteren fungiert Alkohol als Kokarzinogen, die Penetration anderer Noxen durch die Zellwand wird erleichtert und führt somit zu einer erhöhten Schadstoffkonzentration im gesamten Epithelverband. Peters et al. beschrieben 2006 eine additive Wirkung der beiden Hauptrisikofaktoren Tabak und Alkohol. Diese Synkarzinogenese zeigt sich auch in der Leber, wo verschiedene mischfunktionelle Oxydasen gehemmt werden, deren Aufgabe in der Entgiftung von Karzinogenen besteht (Peters, 2006).

Wie bei vielen anderen Tumoren kann auch im Falle der HNSCC die Ernährung die Kanzerogenese modulieren. Vitamine, wie z.B. die Retinoide, Vitamin A und C sowie pflanzliche Öle mit hohem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren besitzen über antioxidative Eigenschaften und Aktivierung von Kanzerogen-entgiftenden Enzymen eine protektive Wirkung (Spitz et al., 1999; McCullough und Giovannucci, 2004). Es gibt Hinweise auf die Modulation der Reparatur oxidativer DNA-Schäden durch bestimmte Nahrungsbestandteile. Chen et al. konnten 2000 zeigen, dass in vitro mit Ascorbinsäure und alpha-Tocopherol behandelte Maus-Monozyten mit einer Zunahme der Basenexzisionsreparatur-(BER-)Aktivität reagierten. In einer großen Fall-Kontroll-Studie demonstrierten Suzuki et al. 2006, dass durch einen erhöhten Konsum von

Antioxidantien, hier Carotine, Vitamin C und E, ein gewisser protektiver Effekt gegen HNSCC erreicht werden konnte. Diese Ergebnisse bestätigten sich auch in der Gruppe der Raucher und bei Personen mit erhöhtem Alkoholkonsum.

Die Bedeutung von Papillomen und viralen Infektionen ist noch nicht hinreichend geklärt. Vermutet wird eine ätiologische Beteiligung von Eppstein-Barr-Viren (EBV) (Hildesheim und Levine, 1993). Darüberhinaus konnte im Tumorgewebe von HNSCC DNA-Material von Papilloma- und Herpes-simplex-Viren nachgewiesen werden. Eine Meta-Analyse von Kreimer et al. aus dem Jahre 2006 zeigte eine Prävalenz von 25,9% von humanen Papillomaviren (HPV) in Gewebeproben von Patienten mit HNSCC, dabei handelte es sich in erster Linie um HPV16 und HPV18. Die unterschiedlichen Entitäten des HNSCC zeigten eine unterschiedliche Prävalenz von HPV im Biopsiematerial (Hobbs et al., 2006). In einer Meta-Analyse wurde deutlich, dass der stärkste Zusammenhang zwischen HPV16-Infektionen und HNSCC in der Gruppe der tonsillären Karzinome besteht. Eine schwächere Korrelation zeigte sich in der Gruppe der oropharyngealen Tumore und die geringste Assoziation betraf die Gruppe der oralen sowie laryngealen Tumore. Nach aktuellem Wissensstand ist jedoch noch offen, ob es sich um einen kausalen Zusammenhang oder ein Epiphänomen handelt.

Die beruflich bedingte Schadstoff-Exposition in Holz-, Metall- und Mineralfaser-verarbeitenden Industriezweigen zeigt eine positive Korrelation mit dem Entstehen von Krebserkrankungen (Maier et al., 1991).

Bei der Beurteilung des individuellen Krebsrisikos muss außerdem die genetische Suszeptibilität beachtet werden. Polymorphismen in Genen, die für Enzyme des Schadstoffmetabolismus oder Reparaturmechanismus kodieren, können die Auswirkungen einer Schadstoff-Exposition durch Aktivierung oder Entgiftung von Noxen beeinflussen. Dadurch entstehen unterschiedliche individuelle Sensibilitäten gegenüber Fremdstoffen und schädigenden Umwelteinflüssen. Jedweder Faktor, der die Absorption, Verteilung oder Akkumulation des Schadstoffs im Gewebe beeinflusst, hat Auswirkungen auf die Suszeptibilität des jeweiligen Organismus gegenüber Karzinogenen (Spitz et al., 1999).

Gut untersucht wurde bereits der Zusammenhang zwischen Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* und dem Auftreten von HNSCC. Hier zeigt sich in 40-80% der Fälle eine *p53*-Mutation (Greenblatt et al., 1994; Weber et al., 2002).

Die individuell unterschiedliche Antwort auf mutagene Aktivität der exogen zugeführten Karzinogene, die *mutagen sensitivity*, bestimmt das Ausmaß der bleibenden Schädigung der zellulären DNA. Die Tatsache, dass nur ein geringer Teil der Raucher in ihrem Leben an einem Kopf-Hals-Karzinom erkrankt, obwohl Tabak eines der Hauptmutagene darstellt, zeigt die komplexe Abhängigkeit von exogenen Noxen und genetischer Variabilität. Diese Komplexität wird sowohl in der individuellen Suszeptibilität als auch in der inter-individuell unterschiedlichen Antwort auf therapeutische Maßnahmen deutlich.

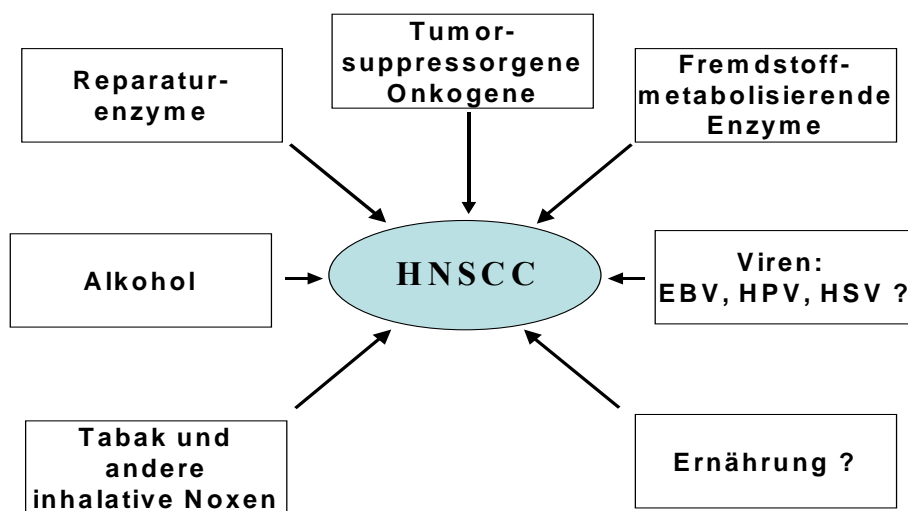


Abbildung 1: Schematische Darstellung verschiedener Faktoren mit unterschiedlichem Einfluss auf die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC)

Abk.: EBV – Epstein-Barr-Virus, HPV – humanes Papillomavirus, HSV – Herpes simplex Virus)

2 Genetik

2.1 Karzinogenese

Die Entstehung maligner Tumore ist ein mehrstufiger Prozess und lässt sich schematisch in vier verschiedene Phasen einteilen.

In der Phase der Initiation kommt es zur Schädigung der DNA einer Zelle. Die Art der Schädigung umfasst spontane Mutationen und Schädigungen infolge Einwirkung exogener Kanzerogene oder derer DNA-toxischer Metabolite. Sofern das endogene Reparatursystem der Zelle intakt ist, kann zu diesem Zeitpunkt der DNA-Schaden noch korrigiert werden.

Bei Ausbleiben der Reparaturvorgänge wird die Mutation im nächsten Zellzyklus in der DNA der Tochterzelle etabliert. Dieser Vorgang wird als Promotion des malignen Geschehens bezeichnet.

Die nun folgende Phase entspricht der Latenzphase der ruhenden Zelle. Tritt die transformierte Zelle erneut in den Zellzyklus ein, erfolgt der irreversible Übergang in einen neoplastischen Zustand. Durch unkontrollierten Proliferationsdruck kommt es zur klonalen Expansion.

Im weiteren Verlauf verliert die veränderte Zelle ihre Oberflächendifferenzierung, die Kontaktinhibition ist ausgeschaltet und damit wird die Lösung der Zelle aus dem Zellverband möglich. Durch Absiedelung solcher Zellen in fremdem Gewebe entstehen Metastasen.

In gesunden Zellen werden Zellproliferation und –differenzierung durch Genprodukte von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen reguliert. Dazu zählen verschiedene Wachstumsfaktoren, tyrosinspezifische Proteinkinasen und Transkriptions- sowie Replikationsfaktoren.

Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Aktivierung von Onkogenen führen über die oben genannten Schritte zur klonalen Expansion einer Zelle. Die Folge sind zunächst Dysplasie oder prä-maligne Veränderungen. Durch weitere genetische Veränderung kommt es zur Entstehung eines Carcinoma in situ. Invasives Wachstumsverhalten der maligne transformierten Zellklone führt zu weiterer Progression der Erkrankung.

Dabei ist die Summation und nicht zwingend die Reihenfolge der einzelnen Vorgänge ausschlaggebend (Califano et al., 1996).

Durch die dominante Wirkung der Protoonkogene kommt es bereits durch Alteration eines Allels zu unkontrolliertem Zellwachstum und Proliferationsvorgängen („One Hit“-Hypothese) (Knudson et al., 1985). Durch Mutation werden die Protoonkogene zu Onkogenen, es resultiert eine Überexpression der Onkoproteine und damit werden wichtige Steuerungsmechanismen der Zelldifferenzierung gehemmt.

Tumorsuppressorgene sind im Gegensatz dazu rezessive Gene. Solange ein Allel intakt ist, bleiben Wachstumskontrolle und Zelldifferenzierung intakt („Two-hit“-Hypothese) (Knudson et al., 1985). Erfolgt bereits in der Keimzelle die erste Mutation in einem Tumorsuppressorgen, so wird diese Mutation in allen Körperzellen etabliert. Man spricht dann von einer konstitutionellen Mutation, so dass im Folgenden durch die Alteration des zweiten Allels die betreffende Zelle einem ungebremsten Proliferationsdruck unterliegt. Eine Mutation im *p53*-Tumorsuppressorgen gehört zu den häufigsten Mutationen bei Krebserkrankungen des Menschen (Greenblatt et al., 1994).

Die Karzinogenese der Kopf-Hals-Karzinome ist nach heutigen Erkenntnissen moduliert durch Mutationen in verschiedenen Genen und deren Expression, insbesondere Gene betreffend, die für Proliferation, Apoptose, Angiogenese und Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich sind (Crowe et al., 2002). Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen und Aktivierung von Onkogenen sind ebenfalls Teile dieses Geschehens.

Im Zusammenhang mit der Entstehung von HNSCC sind genetische Alterationen für drei Signalkaskaden relativ gut beschrieben: diese betreffen das *p53*-Tumorsuppressorgen, den epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (epidermal growth factor receptor, EGFR) und den Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitor *p16*. Veränderungen an diesen Genorten führen zu dramatischen phänotypischen Veränderungen und können somit als kritische Ereignisse in der Krankheitsentstehung angesehen werden.

Kashiwazaki et al. haben bereits 1997 gezeigt, dass in 79% der Fälle mit HNSCC eine *p53*-Mutation vorliegt. Eine Überexpression des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (epidermal growth factor receptor, EGFR) und Inaktivierung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors *p16* bei Patienten mit HNSCC wurde von Crowe et al. (2002) beschrieben.

Das epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor-Gen (*EGFR*-Gen) kodiert für transmembranäre Rezeptoren für epidermal growth factor (EGF) und transforming growth factor α (TGF α). Durch Bindung der Liganden an der extrazellulären Domäne des Rezeptors wird die zytoplasmatische Tyrosinkinase aktiviert (Schlessinger, 2000). In vielen epithelialen Krebsarten, darunter HNSCC, zeigt sich eine Überexpression von *EGFR*, seinen Liganden oder beidem (Reiss et al., 1991). Alterationen oder homozygote Deletionen des *p16*-Tumorsuppressorgens werden ebenfalls häufig in HNSCC detektiert (Olshan et al., 1997).

2.2 DNA-Reparaturmechanismen

Die Reparatur von DNA-Schäden kann in vier verschiedene Formen unterteilt werden: Basenexzisionsreparatur (BER), Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Mismatch-Reparatur (MMR) und Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) (Friedberg, 2005).

Die Aufgabe der Reparaturenzyme beginnt beim Monitoring der DNA, um Schäden im Erbgut, die durch multiple Vorgänge entstehen können, zu erkennen. Die DNA-Schädigung ist meist Folge einer Kombination endogener Faktoren, wie spontaner Mutationen durch fehlerhafte DNA-Replikation, und exogener Faktoren, beispielsweise Einwirkungen reaktiver Oxidantien, ionisierender Strahlung und zytotoxischer Substanzen wie Tabak und Alkohol (siehe auch Kap. 1.2.).

Die Genauigkeit der DNA-Synthese wird durch zwei Enzyme maßgeblich beeinflusst. Die erste Kontrolle erfolgt bei der Auswahl des passenden Nukleotids durch die DNA-Polymerase. Kommt es trotzdem zu einem Falscheinbau, so wird die 3'-5'-Exonuklease aktiviert, die bereits eine intrareplikative Korrekturlesefunktion besitzt und die fehlerhafte Base wieder entfernt (Knippers, 1997).

Bei der postreplikativen Reparatur greifen je nach Schädigung unterschiedliche Mechanismen. Die sogenannte Mismatch-Reparatur (MMR) bezeichnet die Korrektur falsch eingebauter Basen und erfolgt durch einen Enzymkomplex bestehend aus Helikase II, die den DNA-Strang an der markierten Stelle aufschneidet, Exonuklease I

zur Entfernung der falschen Nukleotide, Polymerase III und einer Ligase, mit deren Hilfe die richtigen Nukleotide angelagert und wieder zu einem Strang verknüpft werden.

Spontane Mutagenese kann auf hydrolytischen Depurinierungen beruhen, infolge der Trennung der glykosidischen Bindung zwischen Purin-Basen und der Desoxyribose. Der Phosphat-Zucker-Strang bleibt bestehen. Hydrolytische Deaminierung führt zu Apurin/Apyrimidin-Stellen (AP-Stellen). Abasische DNA-Abschnitte stellen Vorläufer für somatische Mutationen dar, die von speziellen Apurin/Apyrimidin (AP)-Endonukleasen repariert werden. Nach der Strangöffnung durch die Endonukleasen wird der basenfreie Desoxyribose-Phosphatrest von einer Phosphodiesterase entfernt. Ein Komplex aus DNA-Polymerase und Ligase bindet eine neue Base und verknüpft den Strang wieder zu einer vollständigen Doppelhelix.

Die Basenexzisionsreparatur (BER) funktioniert nach dem bereits bekannten Prinzip der Entfernung des geschädigten Abschnitts durch eine Helikase sowie Reparatur-Synthese mit Hilfe einer Polymerase und einer Ligase. Dieser Reparaturmechanismus ist vornehmlich für die Entfernung von oxidativ geschädigten Basen zuständig und kann in fünf aufeinander folgende Schritte unterteilt werden (Tudek et al., 2006). Zunächst erfolgt die Exzision der geschädigten Base durch spezifische DNA-Glycosylasen, es entsteht ein apurinischer/apyrimidinischer Abschnitt des DNA-Stranges. Danach kommt es zum Aufschneiden des AP-Stranges durch eine AP-Endonuklease und zum Entfernen von chemischen Gruppen, die die Neusynthese des Stranges inhibieren. In der Folge wird das neue korrekte Nukleotid eingepasst und schließlich durch die Ligase wieder zu einer stabilen Doppelhelix verbunden (Knippers, 1997).

Ultraviolettes Licht und andere Noxen wie Benzo(a)pyren führen zu chemischen Verbindungen gegenüberliegender Thymin- und/oder Cytosin-Basen. Diese Verknüpfungen, sogenannte *bulky adducts*, führen zu einer Deformation der Doppelstrangstruktur und verhindern somit die DNA-Replikation. Diese Schädigung wird durch eine Nukleotidexzisionsreparatur (NER) behoben. Das Prinzip der Reparatur ähnelt dem der BER. Der deformierte DNA-Strang wird durch eine Helikase aufgeschnitten und der betroffene Abschnitt mit ca. 20 umgebenden Nukleotiden durch spezifische Endonukleasen entfernt. Eine DNA-Polymerase synthetisiert einen neuen korrespondierenden DNA-Abschnitt, der zuletzt von einer Ligase wieder zu einer intakten Doppelhelix verknüpft wird (Yang, 2008).

Ionisierende Strahlung hat weitreichende Schädigung der DNA zur Folge. Es kommt zu DNA-Strangbrüchen, kovalenten Bindungen zwischen Nukleotiden (*cross links*), sowie zur Zerstörung oder Strukturveränderungen von DNA-Basen. Auf diese Schädigung der DNA reagiert die Zelle mit verschiedenen Mechanismen. Entweder führt die Endonuklease III Einzelstrangbrüche ein, auf die eine normale Reparatursynthese folgt, oder es kommt zur sogenannten SOS-Antwort. Dabei wird die Zellteilung blockiert und vermehrt Faktoren der Exzisionsreparatur exprimiert. Die Replikation läuft jedoch über DNA-Schäden hinweg, was eine gesteigerte Mutationsrate zur Folge hat.

Bleibt die Reparatur der entstandenen DNA-Schäden aus, so werden diese im nächsten Zellzyklus transkribiert und es kommt zur Gen-Mutation und Instabilität des Genoms. Jede einzelne Mutation kann die maligne Transformation der Zelle bedeuten und im Sinne einer klonalen Expansion zur Tumorentstehung führen (Knippers, 1997).

3 *X-ray repair cross-complementing Gene 1*

3.1 Gen

Das humane *x-ray repair cross-complementing gene 1* (XRCC1-Gen) wurde 1990 auf dem langen Arm des Chromosoms 19 (q13.2-13.3) in enger Nachbarschaft zu anderen Reparaturgenen (*ERCC1*, *ERCC2*, DNA-Ligase I und Polynukleotidkinase) entdeckt (Thompson et al., 1990, Ladiges et al., 2003). Es beinhaltet 17 Exone und umfaßt 33 kb (Thompson und West, 2000). Die genaue Funktionsweise des Genprodukts ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Eine der Hauptfunktionen von XRCC1 besteht in der Aktivierung verschiedener Enzymkomplexe im Rahmen der Einzelstrangbruch-Reparatur und der Basenexzisionsreparatur .

3.2 XRCC1 Proteinstruktur

Das Protein hat die Größe von 633 Aminosäuren (69,5 kDa) (Thompson et al., 1990). Bei geringen Protein-Konzentrationen liegt es als Monomer (Abbildung 2), bei höheren Konzentrationen als ein Dimer vor (Mani et al., 2004).

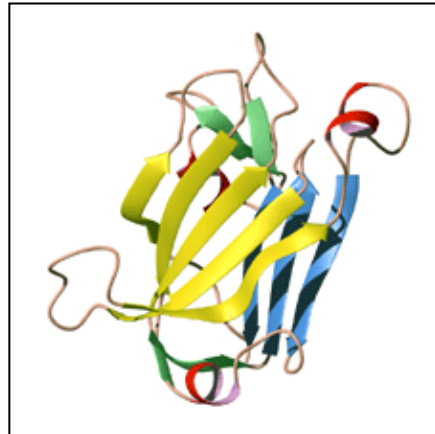


Abbildung 2: N-terminale DNA-binding-Domäne von x-ray repair cross-complementing gene 1 (*XRCC1*) (nach Marintchev et al., 1999)

Die Bildung von Multienzymkomplexen im Rahmen der DNA-Reparatur erfolgt über drei verschiedene interaktive Domänen (Loizou et al., 2004) (Abbildung 3). Im Bereich des N-terminalen Endes erfolgt die Bindung der Polymerase β (Pol β) sowie der zu reparierenden DNA-Abschnitte (Marintchev et al., 1999). Desweiteren sind zwei *breast cancer susceptibility protein terminal* (*BRCT*)-Domänen bekannt, über die ebenfalls eine Proteininteraktion vermittelt wird (Ladiges et al., 2006). Über *BRCT 1* kommt es zur Bindung von Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1 (PARP-1), während *BRCT 2* die Bindungsstelle für Ligase III (Lig III) darstellt. Im Bereich zwischen dem N-terminalen Ende und *BRCT 1* werden Bindungsstellen für weitere Enzyme, darunter die humane 8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase 1 (hOGG1) und AP-Exonukleasen (APE 1), vermutet (Marsin et al., 2003).

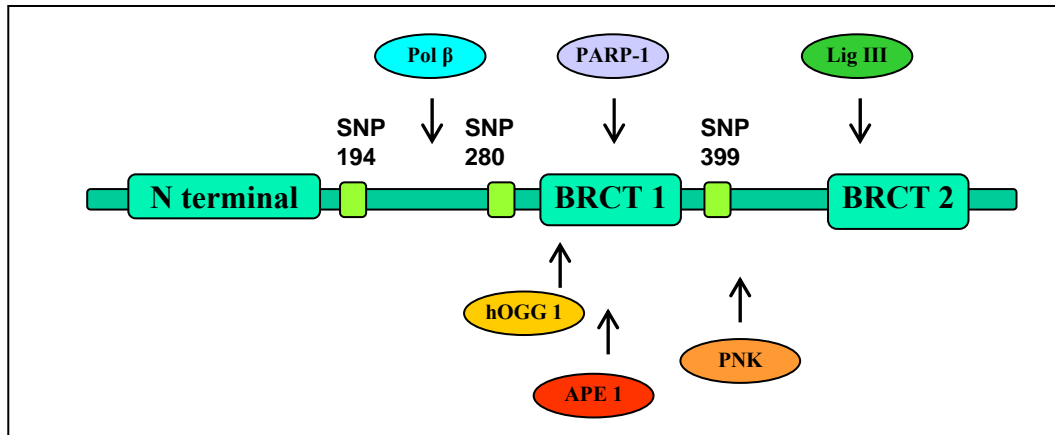


Abbildung 3: Lokalisationen der single-nucleotid-Polymorphismen (SNP) der Codons 194, 280 und 399 des *XRCC1*-Gens sowie der Bindungsstellen der Interaktionspartner, modifiziert nach Loizou et al., 2004

Abk.: APE 1 – Apurin/Apyrimdin-Endonuklease 1, BRCT 1/2 - breast cancer susceptibility protein 1/2, hOGG 1 - humane 8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase 1, Lig III – Ligase III, PARP 1 - Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1, PNK – Polynukleotidkinase, Pol β – Polymerase β

3.3 Funktion des Genprodukts

Das Produkt des *XRCC1*-Gens ist ein Enzym, das durch Proteininteraktionen die Reparatur von Einzelstrangbrüchen (*single strand break*, SSB) katalysiert (Okano et al., 2005). Im Rahmen der BER wird das *XRCC1*-Protein durch verschiedene DNA-Glycosylasen, beispielsweise hOGG1, an der beschädigten Stelle der DNA rekrutiert (Marsin et al., 2003) und verbleibt dort bis zum Ende der BER. Es spielt damit eine wichtige Rolle für die genetische Stabilität (Abbildung 4).

Bei Vorliegen von Einzelstrangbrüchen stimuliert *XRCC1* konzentrationsabhängig die Enzyme DNA Ligase III α (Lig III α) und DNA-Polymerase β durch direkte Wechselwirkung im Sinne eines Multienzymkomplexes (Sturgis et al., 1999; Whitehouse et al., 2001).

Die Bindung der geschädigten DNA und der DNA-Polymerase β erfolgt im Bereich des N-terminalen Endes (Kubota et al., 2003). Dort befindet sich eine *BRCT-2*-Domäne (breast cancer susceptibility protein-1 homology C-terminal). Es konnte gezeigt werden, dass *XRCC1* mit der DNA Ligase III α am COOH-terminalen Ende eine feste Bindung

eingeht und somit direkt für die Stabilität der DNA Ligase III α verantwortlich ist (Caldecott et al., 1995; Taylor et al., 2000; Tudek et al., 2006; Whitehouse und Taylor, 2001).

Einzelstrangbrüche entstehen entweder direkt durch Einbau falscher Basen im Rahmen der Basenexzisionsreparatur oder indirekt durch Einwirkung ionisierender Strahlung, freier Radikale, alkylierender Agenzien oder Peroxide. Die freien Enden der Einzelstrangbrüche weisen häufig veränderte Endgruppen auf. An diesen Endgruppen müssen zunächst 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatgruppen wiederhergestellt werden, um den ungestörten Ablauf der Einzelstrangbruch-Reparatur (single strand break repair, SSBR) zu gewährleisten. Dieser Schritt erfolgt durch eine Polynukleotid-Kinase mit 3'-DNA-Phosphatase-Aktivität und 5'-DNA-Kinase-Aktivität.

Whitehouse und Taylor et al. haben 2001 gezeigt, dass XRCC1 auch mit der Polynukleotid-Kinase interagiert und somit insbesondere für die Einleitung der SSBR Bedeutung hat. Die Arbeitsgruppe von Mani et al. konnte 2007 zeigen, dass die Interaktion von XRCC1 und der Polynukleotid-Kinase (PNK) auf zwei Vorgängen beruht. Zunächst unterstützt XRCC1 die PNK in der Unterscheidung zwischen Strangbrüchen mit 5'-OH-terminalem Ende und 5'-Phosphatgruppen. Desweiteren wird die PNK-Aktivität durch Anwesenheit von XRCC1 stimuliert, indem die PNK von dem phosphorylierten DNA-Produkt entfernt wird.

Ein weiterer Interaktionspartner von XRCC1 ist die humane AP-Endonuklease 1 (APE1) (Vidal et al., 2001), die für die Entfernung und Wiederherstellung von abasischen DNA-Abschnitten verantwortlich ist. So erleichtert XRCC1 den Austausch der DNA-Glycosylase mit der AP-Endonuclease am beschädigten Substrat und erhöht somit die Exzisionsrate von modifizierten Basen (Tudek et al., 2006). XRCC1 ist also gleichermaßen Koordinator und Initiator der Reparatur von abasischen DNA-Abschnitten.

Die Relevanz von XRCC1 für die Reparatur von DNA-Schäden wächst mit sinkender Aktivität eines der vier wichtigsten Enzyme dieses Vorgangs (Whitehouse und Taylor, 2001).

Poly-ADP-Ribose-Phosphatase 1 (PARP-1) ist ein Protein, dessen Funktion als Nick-Sensor für die genetische Stabilität und damit für die Widerstandsfähigkeit der Zelle gegenüber toxischen Einflüssen wie ionisierender Strahlung und alkylierenden

Substanzen von hoher Relevanz ist (Mennissier de Murcia et al., 2003). Darüber hinaus kann PARP-1 den programmierten Zelltod einleiten. Das Enzym bindet schnell an beschädigte DNA-Abschnitte.

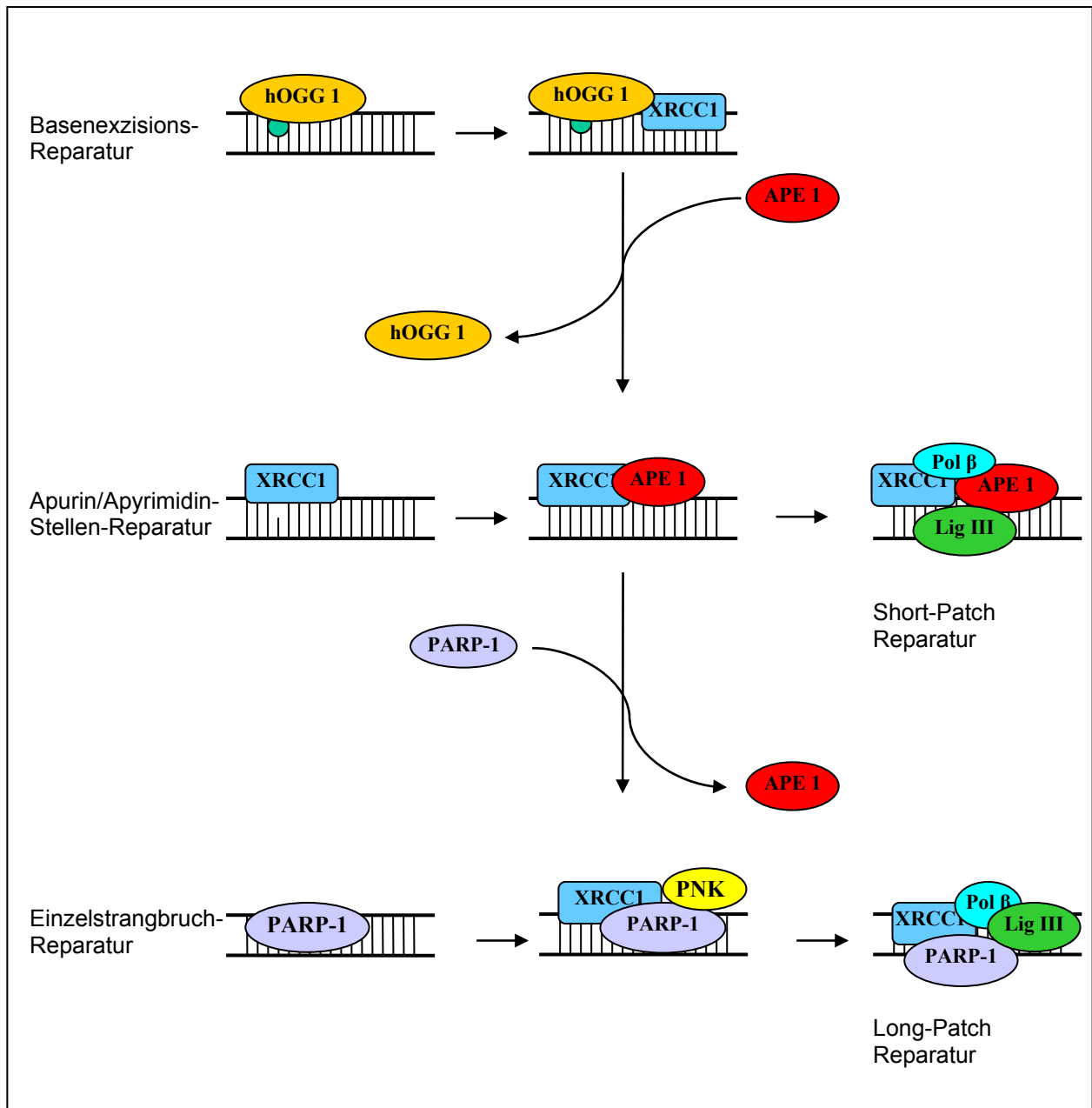


Abbildung 4: Schematische Darstellung der beteiligten Enzyme und ihrer Interaktionen bei Basenexzisions-Reparatur und Einzelstrangbruchreparatur (Erklärung im Text), modifiziert nach Marsin et al., 2003

Abk.: APE 1 – Apurin/Apyrimidin-Endonuklease 1, BRCT ½ - breast cancer susceptibility protein 1/2, hOGG 1 - humane 8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase 1, Lig III – Ligase III, PARP 1 - Poly-ADP-Ribose-Polymerase-1, PNK – Polynukleotidkinase, Pol β – Polymerase β, XRCC1 – x-ray repair cross-complementing gene 1

Über die Interaktion zwischen PARP-1 und XRCC1 gibt es verschiedene Hypothesen. So vermuten die Arbeitsgruppen von Caldecott et al. (2003) und Amé et al. (2004), dass PARP-1 durch die schnelle Bindung an schadhafte DNA-Abschnitte XRCC1 stimuliert und damit die Reparatur einleitet. Andere Vermutungen gehen dahin, dass PARP-1 eine Rolle in der späteren BER des betreffenden Abschnitts spielt. Beispielsweise wird angenommen, dass durch PARP-1 abasische Abschnitte wiederhergestellt werden. (Caldecott et al., 2003).

Neben der zentralen Rolle, die XRCC1 im Rahmen der SSBR innehat, gibt es Hinweise für eine Beteiligung des Enzyms bei der Reparatur von Doppelstrangbrüchen (double strand break repair, DSBR) (Ikejima et al., 1990). Man vermutet eine mögliche Funktion von PARP-1 als Rückversicherung während der DSBR durch Rekrutierung von XRCC1 und anderen Proteinen der SSBR. Die Bindung von PARP-1 an XRCC1 erfolgt im zentralen Bereich der BRCT-1-Domäne des XRCC1-Enzyms (Curtin, 2005). Es wird weiterer Studien bedürfen, um die Überlappung dieser beiden Reparaturmechanismen genauer zu beleuchten.

3.4 Funktionelle Relevanz der Mutation

Für das *XRCC1*-Gen sind acht nonsynonyme Single-Nucleotid-Polymorphismen beschrieben, die drei häufigsten betreffen die Codons 399, 194 und 280 in absteigender Prävalenz in der Bevölkerung (Ladiges et al., 2006).

Die Lokalisation der *XRCC1* Codons 194 (Exon 6) und 280 (Exon 9) betrifft die Stelle des Enzyms, die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (Abbildung 2). Die beiden Exone liegen dicht beieinander und trennen die Bindungsstellen für DNA-Polymerase β und Poly-ADP-Ribose-Polymerase 1 (Shen et al., 1998). Durch Mutation in den betreffenden Genabschnitten kommt es infolge des Einbaus falscher Aminosäuren zu einer Gestaltänderung des Proteins XRCC1 und damit zu einer veränderten Affinität zu den Reaktionspartnern. Daraus resultiert die Annahme einer reduzierten Reparaturkapazität des betreffenden Enzyms (Tuimala et al., 2002).

Zelllinien, die im *XRCC1*-Gen Mutationen aufweisen, erwiesen sich als besonders sensibel gegenüber Genotoxinen wie Alkylantien oder ionisierender Strahlung (Brem und Hall, 2005). Durch den kompletten oder teilweisen Ausfall des Enzyms wird die betroffene Zelle hypersensitiv gegenüber Schädigung durch Methylierung, Oxidation oder Reduktion von Basen sowie Schädigung durch ionisierende Strahlung. Als Folge dieser Vorgänge kommt es zu Chromosomentranslokationen und Deletionen (Thompson et al., 2000). Betroffene Zellen weisen eine acht- bis zehnfach geringere Zahl von Einzelstrangbruchreparaturen (SSBR) auf (Caldecott et al., 2003; Thompson et al., 1990).

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die homozygote Deletion des *XRCC1*-Gens embryonal ist. Es entsteht eine extreme Instabilität des Genoms und die Folge ist ein sehr früher Arrest der Embryogenese (Tebbs et al., 1999).

Die Arbeitsgruppe von Tebbs et al. konnte jedoch zeigen, dass eine deutliche Reduktion der *XRCC1*-Aktivität auf unter 10% der Norm zwar eine Destabilisierung des Proteinkomplexes mit Ligase III bedeutete, diese im Mausmodell jedoch noch für eine gesunde Entwicklung ausreichte.

Ein Mangel an *XRCC1* führt zu gehäuftem Auftreten von spontanen Chromosomenaberrationen, Translokationen, Punktmutationen und Deletionen. Die Frequenz von Schwesterchromatidaustauschen (sister chromatid exchange, SCE) ist deutlich erhöht (Lei et al., 2002; Duell et al., 2000). Dies ist eine der zentralen Ursachen für genetische Instabilität gegenüber den eingangs genannten Faktoren.

Desweiteren gibt es Hinweise für die Notwendigkeit von *XRCC1* zur Behebung von Schäden und Strangbrüchen im Bereich der Replikationsgabel. Es konnte gezeigt werden, dass auch die Rate von Doppelstrangbruchreparaturen in *XRCC1*-depletierten Zellen vermindert ist. Da jedoch die Replikation der DNA durch Doppelstrangbrüche (double strand break, DSB) gestört ist, entstehen keine größeren Schäden im Sinne einer fehlerhaften Enzymproduktion. Das Auftreten von Doppelstrangbrüchen an der Replikationsgabel hingegen führt zu Problemen in Abwesenheit von *XRCC1*. Damit ergibt sich durch die Mutation von *XRCC1* eine zweifache Belastung und Replikationsstörung der Zelle: Es kommt zu vermehrtem Auftreten von SCE (Tebbs et al., 2003; Wong et al., 2003) und Einzelstrangbrüchen, und es gelangen mehr Zellen mit

diesen Defekten in den Replikationszyklus. Die Folge ist eine fehlerhafte, ausbleibende oder stark verlangsamte Replikation der Zelle.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde den bekannten Polymorphismen des Codons 194 (Arg → Trp) im Exon 6 und des Codons 280 (Arg → His) im Exon 9 (Wilson et al, 1998) in verschiedenen Studien eine Bedeutung bei der Karzinogenese zugesprochen (Nomenklatur siehe Tabelle 1).

Tabelle 1: Internationale *XRCC1*-Nomenklatur

<i>XRCC1</i>-Gen	Exon 6	Exon 9
Codon	194	280
Basenaustausch	C → T	G → A
Aminosäurenaustausch	Arg → Trp	Arg → His

Abk.: A – Adenin, Arg – Arginin, C – Cytosin, G – Guanin, His – Histidin, T – Thymin, Trp – Tryptophan, *XRCC1* – x-ray repair cross-complementing gene 1

4 Zielsetzung der Arbeit

Bei Vergleichen der Zahl der Raucher in Deutschland und den Inzidenzzahlen für Kopf-Hals-Karzinome und Plattenepithelkarzinome der Lunge liegt die Vermutung nahe, dass individuelle Unterschiede in der genetischen Suszeptibilität existieren müssen, die dafür verantwortlich sind, dass lediglich ein Teil der exponierten Personen im Laufe ihres Lebens auch tatsächlich eine Tumorerkrankung entwickelt.

In verschiedenen Studien wurde das relative Risiko für Personen mit HNSCC-Patienten in der Familie untersucht. Diese Unterschiede lassen sich nur in geringer Zahl auf Polymorphismen in FME zurückführen (Olshan et al., 2000). Im Rahmen der vorliegenden Kandidatengen-Studie soll nun gezeigt werden, ob Polymorphismen in Reparaturenzymen weitere Hinweise auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber schädigenden Noxen bei betroffenen und exponierten Personen geben können.

Unter der Vorstellung, dass Mutationen in Genen, die für Reparatursysteme kodieren, zu funktionellen Ausfällen führen, liegt die Vermutung nahe, dass durch solche Polymorphismen die genetische Stabilität der Zelle beeinträchtigt wird. Darauf basiert die Hypothese, dass die betroffenen Zellen in einer signifikant höheren Rate maligne entarten. Kommen zu den geschätzten 10.000 Fällen von spontanen Nukleotidschäden täglich noch weitere DNA-Schäden durch bestimmte Risikofaktoren wie Rauchen oder Alkoholkonsum hinzu, so wären die Folgen für den betroffenen Organismus nach Ausfall seiner Reparatursysteme fatal.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit zwei der bekannten Single-Nucleotid-Polymorphismen (SNP) im *XRCC1*-Gen und untersucht einen etwaigen Zusammenhang dieser Polymorphismen und der Entstehung von HNSCC.

Die Integration häufig auftretender Polymorphismen bestimmter Reparaturenzyme als intrinsische Risikofaktoren und exogen zugeführter Risikofaktoren soll die Ursachen und Mechanismen der Tumorentstehung genauer beleuchten und helfen, Risikogruppen von besonders gefährdeten Individuen zu definieren. Dadurch würde die Prävention und eventuell auch die Therapie von HNSCC und anderen Karzinomerkrankungen individuell gestaltbar und effizienter. Die Identifizierung von zentralen molekularen Alterationen könnte für eine zukünftige Gentherapie neue Angriffspunkte erschließen (Weber et al., 2007).

5 Material und Methoden

5.1 Studienkollektiv

Für die vorliegende Fall-Kontroll-Studie wurden Blutproben von 312 Patienten mit histologisch gesichertem Plattenepithelzellkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs gewonnen. Davon konnten aufgrund ungenügender DNA-Konzentration oder nicht-auswertbarem Ergebnis nach mehrfacher Wiederholung der real-time-PCR jedoch nur 281 Proben analysiert werden.

Die Gruppe der Fälle bestand aus 251 Männern mit einem durchschnittlichen Alter von 59,7 Jahren und 61 Frauen mit einem durchschnittlichen Alter von 59,7 Jahren. Die Gruppe der 300 gesunden Kontrollpersonen setzte sich aus 176 männlichen Probanden mit einem Durchschnittsalter von 46,7 Jahren und 124 weiblichen Probandinnen mit einem Durchschnittsalter von 48,0 Jahren zusammen, davon standen leider nur 295 Proben für die Mutationsanalyse zur Verfügung. Alle Studienteilnehmer waren Kaukasier.

Die Proben wurden zwischen 1996 und 1998 in der Medizinischen Poliklinik und der HNO-Klinik der Universität Bonn sowie im Institut für Umwelthygiene der Universität Düsseldorf gesammelt.

Der Phänotyp der Probanden wurde mittels eines standardisierten Fragebogens charakterisiert, in dem Daten zu Herkunft, Beruf, Gesundheitsstatus und Raucheranamnese erhoben wurden. Dabei wurde unterschieden zwischen Rauchern und Nichtrauchern. Als Raucher wurde eine Person definiert, die für mindestens vier Jahre täglich fünf oder mehr Zigaretten, Zigarren oder Pfeifen geraucht hat oder anhaltend raucht. Nichtraucher waren Personen, die niemals oder weniger als ein pack year geraucht haben.

Die Studie erfolgte mit Genehmigung der Ethik-Kommission der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

5.2 Konventionelle PCR

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode, die seit Mitte der 1980er Jahre für die gezielte Amplifizierung und qualitative Analyse von DNA-Abschnitten zur Anwendung kommt (Mullis et al., 1986). Mit Hilfe der PCR ist der Nachweis kleinster Mengen spezifischer DNA-Sequenzen möglich.

Das Prinzip beruht auf enzymatischer Vermehrung des zu untersuchenden DNA-Abschnitts zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind. Voraussetzung für die Durchführung ist die Kenntnis der Nukleotid-Sequenzen beiderseits des Zielbereiches sowie die Verfügbarkeit entsprechender Oligonukleotid-Primer.

Diese Primer (Länge ca. 20 Basenpaare) wird zusammen mit freien Nukleotid-Bausteinen, den Desoxynukleotidphosphaten (dNTP) im Überschuss zu isolierter DNA gegeben. Das Gemisch wird zunächst für 10 min auf ca. 95°C erhitzt, wobei die enthaltene komplementäre DNA denaturiert wird. Bei der Hybridisierungstemperatur, die abhängig von der Zusammensetzung der verwendeten Primer ist und hier ca. 60°C für eine Minute beträgt, erfolgt die Hybridisierung der sense- und antisense-Primer als Startpunkt der nun folgenden DNA-Synthese. Die im Gemisch enthaltene Taq-DNA-Polymerase, eine thermostabile, aus Bakterien gewonnene DNA-Polymerase, heftet dabei Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert neue Komplementärstränge bei einer Temperatur von 72°C (1,5 min). Das Gemisch wird wieder auf 95°C erhitzt und die entstandenen Synthese-Produkte werden denaturiert. Es folgt einer neuer Zyklus mit Hybridisierung der Primer und Neusynthese des Komplementärstranges. Durch 40malige Wiederholung dieses Zyklus – Denaturierung, Hybridisierung, DNA-Synthese – wird die betreffende DNA-Sequenz um das Millionenfache amplifiziert. Im Anschluss an den letzten Zyklus erfolgt die Phase der Extension von 10 min bei 72°C und eine cooling-Phase bei 4°C.

Bei jeder PCR wird außerdem ein Reaktionsgemisch als Negativkontrolle zugefügt, bei der die gegebene Menge template-DNA durch die äquivalente Menge aqua dest. ersetzt wird.

5.3 Real-Time-PCR-Technik und Mutationsanalyse

Die Analyse der Polymorphismen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels Light-Cycler® gestützter Real-Time-PCR durchgeführt. Dieses Verfahren ermöglicht eine schnelle Analyse durch Kombination von rapid-cycle-PCR und real-time-monitoring durch Amplifikation der Einzelproben und Online-Detektion von Schmelzkurven mit Hilfe allelspezifischer fluoreszierender Hybridisierungssonden und eines Fluoreszenzphotometers (Brüning et al., 1999; Harth et al., 2000; Ko et al., 2000).

Den Einzelproben wurden Genfragment-spezifische Primer, ein 3'- und ein 5'-Primer zugegeben sowie zwei Hybridisierungssonden, die ebenfalls eine Sequenzspezifität aufweisen. In der vorliegenden Arbeit wurden mutationsspezifische Sonden verwendet. Die Detektionssonde (mutation probe) ist an ihrem 3'-Ende mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluorescein markiert und hybridisiert direkt im Bereich des zu untersuchenden Genabschnitts, die Ankersonde (anchor probe) ist an dem 5'-Ende mit Light-Cycler-Red 640® (LC 640) oder 705® (LC 705), ebenfalls fluoreszierenden Farbstoffen, markiert.

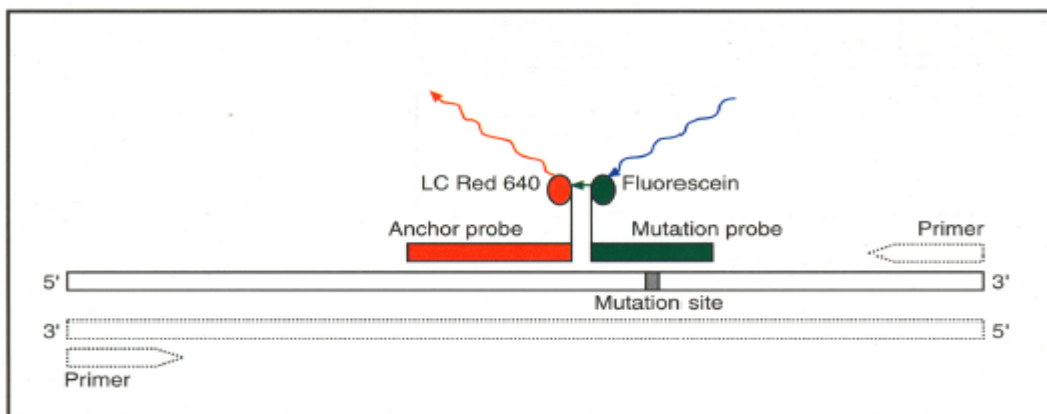


Abbildung 5: Darstellung der Detektion einer Punktmutation mittels Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET), nach Roche Applied Science (Erklärung im Text).

Abk.: LC Red 640 – Light-Cycler Red 640®

Die Sequenz der Sonden wurde so gewählt, dass die Hybridisierung innerhalb des amplifizierten DNA-Abschnitts mit einem Abstand von höchstens ein bis fünf Basenpaaren erfolgt, da die Messung der Fluoreszenz auf einem sogenannten Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) beruht: Das Fluorescein der

Donorsonde wird von der Emissionsdiode des Light-Cyclers® (470 nm) zur Emission von grünem Licht angeregt. Dadurch wird der Farbstoff der Ankersonde (Akzeptorsonde) zur Emission von rotem Licht (640 nm bzw. 705 nm) angeregt.

Die Voraussetzung für die gegenseitige Anregung ist die unmittelbare Nähe der beiden Hybridisierungssonden zueinander. Gemessen wird die Emission des roten Lichts am Ende der Annealing-Phase in jedem PCR-Zyklus (Abbildung 5).

Das emittierte rote Licht der Ankersonde verhält sich dabei proportional zur Menge des PCR-Produkts.

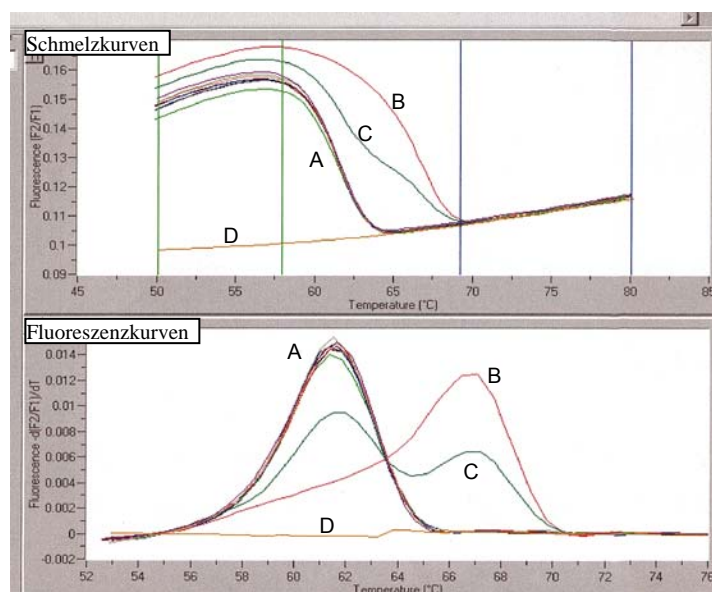


Abbildung 6: Real-Time PCR, grafische Darstellung der genotyp-spezifischen Schmelz- und Fluoreszenzkurven

A – eingipflige Schmelz- und Fluoreszenzkurven der homozygoten Wildtypen; B – eingipflige Schmelz- und Fluoreszenzkurve der homozygoten Mutante; C – zweigipflige Schmelz- und Fluoreszenzkurve der heterozygoten Mutante; D – Negativkontrolle

An jeden PCR-Zyklus schließt sich die Messung der Schmelztemperatur an, bei welcher sich die Hybridisierungssonden von dem Amplifikat lösen. Die Schmelztemperatur ist abhängig von der Homologie zu dem fraglichen Genabschnitt. Liegt also bei Verwendung einer mutationsspezifischen Sonde ein heterogener Genotyp wt/mt vor, so wird sich die Sonde zunächst von dem Wildtyp-Allel und erst bei einer höheren Temperatur von dem Allel mit der Punktmutation lösen, es entsteht eine zweigipflige Fluoreszenzkurve. Bei homozygoten DNA-Proben erhält man eingipflige

Fluoreszenzkurven, deren Maxima bei homozygoten Proben des Genotyps mt/mt über denen des Genotyps wt/wt liegen (Abbildung 6).

Für diese Arbeit wurde ein Light-Cycler® der Firma Roche, Mannheim, verwendet sowie hybridisation probes® und Light-Cycler DNA master hybridisation probes kit®, ebenfalls Firma Roche, Mannheim.

5.4 Primertest

Die für die Real-Time PCR verwendeten Primer wurden durch mehrere Vorversuche ermittelt. Damit wurden die Voraussetzungen für eine bestmögliche Qualität der PCR-Produkte geschaffen. Die Auswertung der Primertests erfolgte mittels PCR und nachfolgender Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese. Die eingesetzten PCR-Primer und Hybridisierungssonden wurden von der Firma TIB Molbiol, Berlin, hergestellt (siehe Tabellen 2 und 3).

Die PCR-Produkte wurden von der Firma Quiagen, Hilden, sequenziert.

Tabelle 2: Sequenzen der verwendeten PCR-Primer und Hybridisierungssonden der Mutation im Exon 6 des XRCC1-Gens

Forward Primer	Sensor
5'- CCgTgTgAAggAggAggATgA-3'	5'-TgTCTTgTTgATCCAgCTgAAgAAg X 3'
Reverse Primer	Anchor
5'- TACCCTCAgACCCACgAgTCTA-3'	5'-LCRed640-AgCCCCCggCCTCAgAgAgTTg p 3'

Abk.: A – Adenin; C – Cytosin, g – Guanin; T – Thymin; LCRed640 – LightCycler Red 640®

Tabelle 3: Sequenzen der verwendeten PCR-Primer und Hybridisierungssonden der Mutation im Exon 9 des XRCC1-Gens

Forward Primer	Sensor
5'- gCTggggCCTggATTg-3'	5'- TgCCAgCTCCA ACTCATACTCC X 3'
Reverse Primer	Anchor
5'- gTCTgggCTCggTgCCTT-3'	5'-LCRed640-CCACAgCCCCAgTCCCTgCCC p 3'

Abk.: A – Adenin; C – Cytosin, g – Guanin; T – Thymin; LCRed640 – LightCycler Red 640®

5.5 Gelelektrophorese

Mit Hilfe einer konventionellen PCR und nachfolgender Gelelektrophorese der PCR-Produkte wurden in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse der realtime-PCR kontrolliert. Zu diesem Zweck wurde ein 1,5%iges Agarosegel wie folgt angefertigt:

3,75 g Agarose wurde durch Aufkochen in 1×TA-Puffer gelöst. Nach Abkühlen dieses Ansatzes wurde 25 µl Ethidiumbromid als Fluoreszenzfarbstoff hinzugefügt. Nach Erhärten des Gels in einer Form wurde es in eine mit 1×TA-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingebracht. Im Folgenden wurden je 18 µl der PCR-Produkte mit 2 µl eines Gelloading-Puffers zentrifugiert und in die Probenaschen des Gels pipettiert. Zusätzlich wurde ein DNA-Längenstandard mit ebenfalls 2 µl des gefärbten Gelloading-Puffers in eine Kammer eingebracht sowie eine Negativkontrolle mit 18 µl aqua dest. Nach Ablauf der Elektrophorese (90 min, 70 V) konnte das Gel auf einem Transilluminator betrachtet werden. Durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm wurden die DNA-Fragmente sichtbar gemacht und mit einer MP4-Polaroid-Kamera dokumentiert (Abbildung 7).

Im Anschluss wurden je zwei homozygote, heterozygote und zwei Wildtypen ausgewählt und zur Sequenzierung versandt.

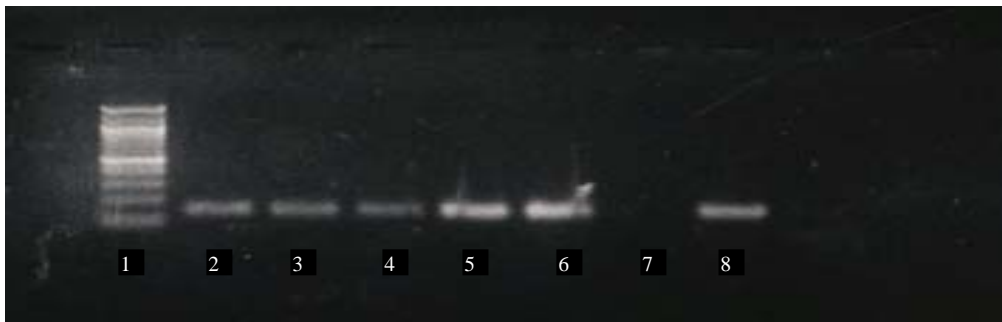


Abbildung 7: Gelelektrophorese nach konventioneller PCR (polymerase chain reaction)

Bande 1 – Längenstandard, Banden 2 – 5 und 8 – PCR-Produkte, Bande 7 - Negativkontrolle

5.6 Sequenzierung

Die Sequenzierung der PCR-Produkte inklusive der Primer und Sequenzierprimer erfolgte durch die Firma Quiagen, Hilden, unter Verwendung der biochemischen Didesoxy- oder Kettenabbruchmethode nach Frederick Sanger (Sanger et al., 1977).

Bei dieser Methode wird die zu untersuchende DNA in die DNA eines Bakteriophagen, den M13-Vektor, eingebracht. Infizierte Bakterien werden kloniert, wodurch einzelsträngige DNA-Ringe entstehen. Diese kodierenden Einzelstrangringe werden mit Hilfe eines geeigneten Primers hybridisiert, der am 3'-Ende des eingefügten DNA-Abschnitts bindet. Danach erfolgt die in-vitro-DNA-Synthese unter Zuhilfenahme einer DNA-Polymerase. Außerdem sind in dem Reaktionsgemisch dNTP und geringe Mengen Didesoxynukleotidphosphate (ddNTP) enthalten. Bei Einbau von ddNTP kommt es zum Kettenabbruch, da ihnen die 3'-OH-Gruppe fehlt, so dass kein weiterer Baustein gebunden werden kann. Das Resultat dieser Reaktion sind dementsprechend viele DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Für die Sequenzierung werden vier getrennte Reaktionen durchgeführt, die jeweils eines der vier ddNTP enthalten. Nach der Denaturierung der Syntheseprodukte werden die vier Produkte nebeneinander auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese erfolgt die Auftrennung der Fragmente entsprechend ihrer Länge. Nach Sichtbarmachen durch eine geeignete Färbemethode werden die Syntheseprodukte dargestellt und können somit ausgewertet werden. Dazu liest man die Reihenfolge der Fragmente in den Spuren von unten nach oben ab und erhält anhand der Spuren direkt die Nukleotid-Sequenz.

5.7 Genotyp-Analyse

Nach Erhalt der Sequenzierungsergebnisse wurden die Basensequenzen der analysierten Proben (Abbildungen 8 und 9) mit der des Wildtyps verglichen. Dieser Vergleich erfolgte mit Hilfe des PC-Programms DNAsis.

```
AGAAGGTGACAGTGACCAAGCTTGGCCAGTTCCGTGTGAAGGAGGAGGATGA
GAGCGCCAACTCTCTGAGGCCGGGGGCTCTTTCTTCAGC(C/T)GGATCAA
CAAGACATCCCAGGTGAGCTCGGACAACCTGGGTCCTAGTGAGTAGGGTT
```

Abbildung 8: Basenfolge im Bereich des *XRCC1* Exon 6 Codon 194 Polymorphismus

Quelle: http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm?both_snp_id=XRCC1-03

Abk.: A – Adenin; C – Cytosin, G – Guanin; T - Thymin

```
CTGCTGGGTCTGAGGGAGGAGGGGCTGGGGGTTGACCCCAGTGGTGCTAAC
CTAATCTACCTTTGTCTTCTCCAGTGCCAGCTCCAACCTC(A/G)TACCCCA
GCCACAGCCCCAGTCCCTGCCCGAGCACAGGGGGCAGTGACAGGCAACCCC
```

Abbildung 9: Basenfolge im Bereich des *XRCC1* Exon 9 Codon 280 Polymorphismus

Quelle: http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm?both_snp_id=XRCC1-02

Abk.: A – Adenin; C – Cytosin, G – Guanin; T - Thymin

5.8 Statistische Auswertung

Zur Beantwortung der Frage nach signifikanten Zusammenhängen zwischen Genotyp und Phänotyp, bezogen auf die Erkrankung an HNSCC, wurden 95%-Konfidenzintervalle (95%-KI) nach Wald und Odds Ratios (OR) berechnet. Die Angaben der Odds Ratios wurden adjustiert für Alter, Alter² als stetige Variablen und Geschlecht sowie Raucherstatus als kategorielle Variablen. Die Güte des Modellparameters wurde mit dem Likelihood-Quotienten-Test überprüft (Kreienbrock et al., 2004). Alle Berechnungen erfolgten mit Hilfe der Software SAS 9.2.1.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Allelfrequenzen für beide Polymorphismen wurden mit Hilfe der US-amerikanischen Single Nucleotid Polymorphism Datenbank (SNP Database) des National Institute of Health (<http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.>) mit der Normalverteilung in der kaukasischen Bevölkerung verglichen und mit Hilfe exakter Tests auf Hardy-Weinberg-Equilibrium (HWE) überprüft.

6 Ergebnisse

6.1 Genotypverteilung des *XRCC1* Exon 6 Codon 194 Polymorphismus

Die Analyse der Genotypverteilung des *XRCC1* Exon 6 Codon 194 Polymorphismus zeigte in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen (n = 295) den Genotyp wt/wt (CC) mit einer Häufigkeit von 86,4% (n = 255). Eine ähnliche Häufigkeit von 87,2% (245 Personen) fand sich in der Gruppe der HNSCC-Patienten (n = 281). Auch die Verteilung der heterozygoten Mutationen (wt/mt CT) zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen. So fand sich in 12,9% der Kontrollgruppe und in 12,5% der Patientengruppe eine heterozygote Mutation. Die Häufigkeit einer homozygoten Mutation mit dem Genotyp mt/mt (TT) war in beiden Gruppen < 1%. In der Gruppe der HNSCC-Patienten fand sich in einem Fall eine homozygote Mutation (0,4%), in der Kontrollgruppe trat diese Mutation in zwei Fällen auf (0,7%). Das entspricht einer Allelhäufigkeit des mutanten Allels von 7,1% in der Kontrollgruppe und 6,6% in der Gruppe der Fälle.

Tabelle 4: Verteilung des *XRCC1* Exon 6 Codon 194 Polymorphismus bei HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollen

<i>XRCC1</i> Ex 6 (Arg → Trp)	Fall-Kontroll-Status				OR ¹	(95% - KI) ²
	Kontrollen n=295		Fälle n=281			
	N	%	N	%		
CC	255	86.4	245	87.2	1	
CT	38	12.9	35	12.5	1.22	(0.67 - 2.21)
TT	2	0.7	1	0.4	0.35	(0.03 - 4.12)
CT+TT	40	13.6	36	12.8	1.14	(0.64 - 2.03)
Minor Allel T	42	7,1	37	6,6	1.14	(0.64 - 2.04) ³
% (95% - KI)	7.1 (5.2 – 9.5)		6.6 (4.7 – 9.0)			

¹Odds Ratio (bestimmt durch die logistische Regression, adjustiert nach Alter, Alter*Alter und Geschlecht)

²Konfidenzintervall nach Wald

³Referenzgruppe: Major-Allel C

Abk.: A – Adenin; Arg – Arginin; C – Cytosin, T – Thymin; Trp - Tryptophan

Damit besteht in der Verteilung der Genotypen kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der gesunden Kontrollen und der Fälle (Odds Ratio (OR): 1,14, 95%-KI:

0,64-2,04). Es zeigt sich ein Genotyp-Muster, das in beiden Gruppen der beschriebenen Verteilung für gesunde Kaukasier entspricht (Hardy-Weinberg-Equilibrium $p = 1$ in der Kontrollgruppe) (Tabelle 4).

6.1.1 XRCC1 Exon 6 Polymorphismus - Genotypverteilung bei Rauchern

Bei Betrachtung der Genotyp-Verteilung des *XRCC1* Exon 6 bei Rauchern in beiden Gruppen (jeweils 175 Individuen in Kontroll- und Patientengruppe) findet sich lediglich in der Kontrollgruppe in einem Fall eine homozygote Mutation (0,6%). Die Anzahl der heterozygoten Genotypen ist in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen mit 26 (14,9%) ebenfalls höher als in der Gruppe der HNSCC-Patienten, dort fanden sich 19 (10,9%) heterozygote Genotypen. Der Wildtyp fand sich in 84,6% der Fälle der gesunden Individuen und in 89,1% der Patientengruppe. Damit zeigt sich eine etwas höhere Rate an Mutationen in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Es ergibt sich eine Allelhäufigkeit des mutanten Allels von 8,0% in der Kontrollgruppe und 5,4% in der Fallgruppe, die Unterschiede erweisen sich jedoch als nicht signifikant (OR: 0,74; 95%-KI: 0,36-1,54) (siehe Tabelle 5).

Tabelle 5: Verteilung des *XRCC1* Exon 6 Codon 194 Polymorphismus der Raucher

<i>XRCC1</i> Ex 6 (Arg → Trp)	Raucher				OR ¹	(95% - KI) ²
	Kontrolle n=175		Fälle n=175			
	N	%	N	%		
CC	148	84.6	156	89.1	1	
CT	26	14.9	19	10.9	0.79	(0.38 - 1.68)
TT	1	0.6	-	-	-	-
CT+TT	27	15.4	19	10.9	0.737	(0.35 - 1.54)
TT	28	8.0	19	5.4	0.741	(0.36 - 1.54) ³

¹ Odds Ratio (bestimmt durch die logistische Regression, adjustiert nach Alter, Alter*Alter und Geschlecht)

² Konfidenzintervall nach Wald

³ Referenzgruppe: Major-Allel C

Abk.: A – Adenin; Arg – Arginin; C – Cytosin, T – Thymin; Trp – Tryptophan

6.1.2 XRCC1 Exon 6 Polymorphismus - Genotypverteilung bei HNSCC-Patienten

In der Gruppe der erkrankten Personen, insgesamt 281 Personen, waren 106 Nichtraucher und 175 Raucher. Bei der Analyse der Allelfrequenzen bestätigen sich die Ergebnisse der vorbeschriebenen Stratifizierungen. Eine heterozygote Mutation des XRCC1 Exon 6 Polymorphismus fand sich in der Nichtraucher-Gruppe in 15,1%, in der Raucher-Gruppe in 10,9%. Das entspricht einer OR von 0,67 und einem 95%-KI von 0,32 - 1,40 und ist somit nicht signifikant. Die einzige homozygote Mutation trat in der Gruppe der Nichtraucher auf, dies entspricht einer Häufigkeit von 0,9%. Es ergab sich eine Allelfrequenz des mutanten Allels von 8,5% in der Gruppe der Nichtraucher und 5,4% in der Gruppe der Raucher (siehe 6.1.1.). Daraus ergibt sich eine OR von 0,64 und ein 95%-KI von 0,32 – 1,28 und somit auch in dieser Analyse keine Signifikanz (siehe Tabelle 6).

Tabelle 6: Verteilung des XRCC1 Exon 6 Codon 194 Polymorphismus bei Patienten

XRCC1 Ex 6 (Arg → Trp)	Fälle				OR ¹	(95% - KI) ²
	Nichtraucher n=106		Raucher n=175			
	N	%	N	%		
CC	89	84.0	156	89.1	1	
CT	16	15.1	19	10.9	0.67	(0.32 - 1.40)
TT	1	0.9	-	-	-	-
CT+TT	17	16.0	19	10.9	0.65	(0.31 – 1.33)
TT	18	8.5	19	5.4	0.64	(0.32 - 1.28) ³

¹ Odds Ratio (bestimmt durch die logistische Regression, adjustiert nach Alter und Geschlecht)

² Konfidenzintervall nach Wald

³ Referenzgruppe: Major-Allel C

Abk.: A – Adenin; Arg – Arginin; C – Cytosin, T – Thymin; Trp - Tryptophan

6.2 Genotypverteilung des XRCC1 Exon 9 Codon 280 Polymorphismus

Die Analyse des Genotyp-Musters bei Exon 9 Codon 280 zeigte in 281 Individuen der Patientengruppe und 294 Fällen des gesunden Kontrollkollektivs auswertbare

Ergebnisse. So wurde der Wildtyp GG (wt/wt) in 90,7% der Fälle des Patientenkollektivs gefunden, in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen in 89,8% der Fälle. Betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der Mutationen zeigten sich in der Kontrollgruppe 30 heterozygote Genotypen (10,2%), in der Patientengruppe eine etwas geringere Anzahl an heterozygoten Mutationen von 25 Fällen (8,9%). Eine homozygote Mutation fand sich lediglich in einem Fall in der Gruppe der HNSCC-Patienten, in der Gruppe der gesunden Kontrollindividuen trat diese Mutation nicht auf. Insgesamt zeigte sich eine diskret höhere Frequenz an mutierten Genotypen in der Gruppe der gesunden Kontrollen mit einer Allelhäufigkeit des mutierten Allels von 10,2%. In der Gruppe der Patienten trat das mutierte Allel mit einer Häufigkeit von 4,8% auf. Diese Unterschiede waren jedoch nicht von statistisch signifikantem Ausmaß (OR: 1,29, 95%KI: 0,66 – 1,57) (siehe Tabelle 7). Die Genotyp-Verteilung entspricht für die Gruppe der Fälle sowie für die Gruppe der gesunden Kontrollen der beschriebenen Verteilung für gesunde Kaukasier (HWE $p = 1$ in der Kontrollgruppe).

Tabelle 7: Verteilung des *XRCC1* Exon 9 Codon 280 Polymorphismus bei HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollen

<i>XRCC1</i> Ex 9 (Arg → His)	Fall - Kontroll - Status				OR¹	(95% - KI)²
	Kontrollen n=294		Fälle n=281			
	N	%	N	%		
GG	264	89.8	255	90.7	1	
AG	30	10.2	25	8.9	1.23	(0.61 – 2.46)
AA	-	-	1	0.4	-	-
AG +AA	30	10.2	26	9.3	1.26	(0.64 – 2.52)
Minor Allel A	30	5.1	27	4.8	1.29	(0.66 – 2.50) ³
% (95% - KI)	(3.5 – 7.2)		(3.2 – 7.9)			

¹ Odds Ratio (bestimmt durch die logistische Regression, adjustiert nach Alter, Alter*Alter und Geschlecht)

² Konfidenzintervall nach Wald

³ Referenzgruppe: Major-Allel G

Abk.: A – Adenin; Arg – Arginin; G – Guanin; His – Histidin

6.2.1. XRCC1 Exon 9 Polymorphismus - Genotypverteilung bei Rauchern

In der Gruppe der HNSCC-Patienten waren 176 Raucher, in der Gruppe der gesunden Kontrollindividuen fanden sich 175 Raucher. Beim Vergleich der Genotypverteilung in beiden Gruppen zeigte sich folgendes Genotypmuster: In keiner der beiden Gruppen fand sich eine homozygote Mutation des XRCC1 Exon 9 Polymorphismus. Der Genotyp GA (wt/mt) zeigte sich bei 13 Individuen der Patientengruppe (7,4%) und bei 19 Personen der Kontrollgruppe (9,7%). Die Frequenz des Wildtyps GG betrug in der Gruppe der gesunden Individuen 158 (90,3%) und in der Patientengruppe 163 (92,6%). Die gering höhere Frequenz des mutanten Allels in der Kontrollgruppe von 4,9% im Gegensatz zur Fallgruppe mit einer Häufigkeit von 3,7% zeigte keine statistische Signifikanz (OR: 0,75; 95-KI: 0,32 – 1,76) (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Verteilung des XRCC1 Exon 9 Codon 280 Polymorphismus bei Rauchern

XRCC1 Ex 9 (Arg → His)	Raucher				OR ¹	(95% - KI) ²
	Kontrollen n=175		Fälle n=176			
	N	%	N	%		
GG	158	90.3	163	92.6	1	
AG	17	9.7	13	7.4	0.74	(0.31 – 1.77)
AA	-	-	-	-	-	-
AG+AA	17	9.7	13	7.4		(0.31 – 1.77)
AA	17	4.9	13	3.7	0.75	(0.32 - 1.76) ³

¹ Odds Ratio (bestimmt durch die logistische Regression, adjustiert nach Alter, Alter*Alter und Geschlecht)

² Konfidenzintervall nach Wald

³ Referenzgruppe: Major-Allel G

Abk.: A – Adenin; Arg – Arginin; G – Guanin; His – Histidin

6.2.2 XRCC1 Exon 9 Polymorphismus - Genotypverteilung bei HNSCC-Patienten

In der Gruppe der HNSCC-Patienten fanden sich 105 Nichtraucher und 172 Raucher. Der homozygote Wildtyp (GG) des XRCC1 Exon 9 Polymorphismus fand sich in der Gruppe der Nichtraucher bei 92 Individuen, das entspricht 87,6% und in der Gruppe der

Raucher bei 92,6%. Der Genotyp mit heterozygoter Mutation (AG) trat in der Gruppe der Nichtraucher bei 12 Personen (11,4%) und in der Gruppe der Raucher bei 13 Personen (7,4%) auf. Rechnerisch ergibt sich damit eine OR von 0,64 und ein 95%-KI von 0,27 – 1,49, die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant. Eine homozygote Mutation (AA) fand sich nur bei einem Individuum der Nichtrauchergruppe. Bei der Betrachtung der Allelhäufigkeiten des mutanten Allels ergibt sich somit eine Häufigkeit von 6,7% in der Nichtraucher-Gruppe und 3,7% in der Gruppe der Raucher. Aufgrund des relativ kleinen Kollektivs sind jedoch auch diese Unterschiede nicht als statistisch signifikant einstuftbar (OR 0,54; 95%-KI 0,24 – 1,20) (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Verteilung des XRCC1 Exon 9 Codon 280 Polymorphismus bei Patienten

XRCC1 Ex 9 (Arg → His)	HNSCC-Patienten				OR ¹	(95% - KI) ²
	Nichtraucher n=105		Raucher n=172			
	N	%	N	%		
GG	92	87.6	163	92.6	1	
AG	12	11.4	13	7.4	0.64	(0.27 – 1.49)
AA	1	1.0	-	-	-	-
AG+AA	13	12.4	13	7.4	0.58	(0.25 – 1.33)
AA	14	6.7	13	3.7	0.54	(0.24 – 1.20) ³

¹ Odds Ratio (bestimmt durch die logistische Regression, adjustiert nach Alter und Geschlecht)

² Konfidenzintervall nach Wald

³ Referenzgruppe: Major-Allel G

Abk.: A – Adenin; Arg – Arginin; G – Guanin; His – Histidin

7 Diskussion

Die genomische Stabilität ist Grundlage für gesundes Zellwachstum und Zellteilung. Replikation von DNA und RNA sind hochkomplexe Vorgänge, die die zelluläre Aktivität, Wachstum und Vermehrung sicherstellen. Fehler während der Replikation erfordern eine schnelle und sichere Korrektur, um spezifische Eigenschaften der jeweiligen Zelle zu erhalten. Durch fehlerhafte DNA-Synthese oder Schädigung der DNA aufgrund von Einwirkungen exogener Noxen droht die maligne Transformation einer Zelle. Daher verfügt jede Zelle über ein vielfältiges System zur Erkennung und Korrektur von DNA-Schäden. Reparaturenzymen kommt somit eine zentrale Stellung zur Wahrung der genetischen Integrität zu und die Erforschung der unterschiedlichen Reparaturmechanismen ist von großer Bedeutung für das Verständnis von Krebserkrankungen.

XRCC1 war das erste humane Gen der Einzelstrangbruchreparatur, dessen Genotyp aufgeklärt werden konnte (Thompson et al., 1990, Thompson und West, 2000).

Von den acht in der Literatur beschriebenen SNPs des *XRCC1*-Gens kommen lediglich die Polymorphismen des Exon 10 und Exon 6 mit einer hohen Frequenz in der Bevölkerung vor, in etwas geringerer Frequenz der Polymorphismus des Exon 9 (Ladiges et al., 2006) (Tabelle 10).

Über die funktionellen Ausfälle, die durch diese Polymorphismen entstehen, ist jedoch noch wenig bekannt. Unter der Vorstellung, eine Mutation in den beschriebenen Exonen führe zu einer veränderten Aminosäuresequenz und damit zu einer Strukturänderung des Proteins führt, sind Auswirkungen dieser Mutationen auf die DNA-Reparatur in der Zelle zu vermuten (Tuimala et al., 2002).

Die Aufgaben des *XRCC1*-Gens sind mittlerweile relativ gut beschrieben. Sie umfassen wichtige Steuerungsfunktionen innerhalb der DNA-Reparaturmechanismen, sowohl die Basen-Exzisions-Reparatur als auch die DNA-Doppelstrangbruch-Reparatur betreffend. *XRCC1* ist vor allem als Initiator des Multienzymkomplexes zur Einleitung der Reparatur essenziell. Die von uns untersuchten Exone 6 und 9 liegen zwischen den Bindungsstellen für die DNA Polymerase β und PARP-1 (Thompson et al., 2000). Es liegt die Erwartung nahe, dass eine geänderte Faltstruktur zu veränderten Affinitäten der Bindungspartner führt. In dem vorliegenden Fall würde daraus eine verminderte

Tabelle 10: Übersicht der Fall-Kontroll-Studien zu Assoziation der *XRCC1*-Polymorphismen Arg194Trp und Arg280His und unterschiedlichen Krebserkrankungen

Studie	Kollektiv Fälle/Kontrollen Land	Erkrankung	Ergebnis
Cho et al., 2003	375/327 Taiwan	Nasopharyngeale Tumore	signifikant erhöhtes Risiko für Träger der mutanten Variante des Arg280His-Polymorphismus
De Ruyck et al., 2007	110/110 Kaukasier	Lungenkarzinom	signifikant reduziertes Risiko bei Vorliegen des Arg194Trp oder Arg280His Polymorphismus
Demokan et al., 2005	95/98 Türkei	Bronchialkarzinom	signifikant erhöhtes Risiko für Raucher mit Arg/Trp- oder Trp/Trp-Genotyp
Lee et al., 2001	105/264 Taiwan	Ösophageales Plattenepithelzellkarzinom	keine Änderung des Erkrankungsrisikos für Träger der mutanten Varianten der Arg194Trp und Arg280His-Polymorphismen
Majumder et al., 2005	507/348 Indien	HNSCC	isoliertes Vorliegen der mutierten Varianten der Exone 6 und 9 führt nicht zu gesteigertem Risiko, bei Kombination von Risikogenotypen im <i>GSTP1</i> -Gen signifikant gesteigertes Risiko
Olshan et al., 2002	162/186 USA	HNSCC	gering erhöhtes Risiko für Träger der Arg194Trp-Variante
Ratnasingh et al., 2001	108/216 China	Lungenkarzinom	Träger der Arg280His Variante zeigten ein erhöhtes Risiko als Träger des Wildtyps. Träger der Arg194Trp-Variante mit erhöhtem Alkohol-Konsum schienen ein geringeres Risiko als Träger der Wildtyp-Genotyps aufzuweisen.
Sak et al., 2007	547/579 Großbritannien	Blasenkarzinom	Kein Zusammenhang von <i>XRCC1</i> -Polymorphismen, gering erhöhtes Risiko für Träger der Arg280His Variante
Stern et al., 2007	310/1176 Singapor	Kolorektales Karzinom	194 Arg/Arg Genotyp nicht assoziiert mit verändertem Erkrankungsrisiko bei Rauchern. Träger der mutanten Variante zeigten ein signifikant erhöhtes Risiko.
Sturgis et al., 1999	203/424 USA	HNSCC	Wildtyp signifikanter Risikogenotyp für orale und pharyngeale Tumore, keine Signifikanz für laryngeale Tumoren; Addition des Risikos bei gleichzeitigem Vorliegen der homozygoten Mutante im <i>XRCC1</i> Exon 10 Gln/Gln
Tae et al., 2004	147/168 Korea	HNSCC	hoch signifikante Häufung der mutanten Variante des Arg194Trp-Polymorphismus bei HNSCC-Patienten, keine signifikante Assoziation mit dem Arg280His-Polymorphismus
Varzim et al., 2003	88/17 Portugal	Laryngeales Plattenepithelkarzinom	keine signifikante Häufung bei Tabakrauch-assoziiertem laryngealen Plattenepithelkarzinom
Vogel et al., 2003	269/256 Dänemark	Bronchialkarzinom	keine signifikante Häufung des Arg280His-Polymorphismus
Xing et al., 2002	433/524 China	Ösophageales Plattenepithelzellkarzinom	Signifikant erhöhtes Risiko für Träger des Arg194Trp-Polymorphismus
Yang et al., 2007	156/168 China	Nasopharyngeale Tumore	erhöhtes Risiko für nasopharyngeale Tumore bei Vorliegen der mutanten Variante des Arg194Trp-Polymorphismus, keine Assoziation mit Arg280His-Polymorphismus
Yu et al., 2004	120/160 China	Plattenepithelzellkarzinom des Ösophagus	keine signifikante Häufung

Abk.: Arg – Arginin; His – Histidin; HNSCC – head neck squamous cell carcinoma, Gln – Glutamin; Trp – Tryptophan, *XRCC1* – x-ray repair cross-complementing gene 1

Reaktionsgeschwindigkeit des Multienzymkomplexes resultieren und schließlich eine reduzierte Reparaturkapazität der Zelle (Tuimala et al., 2002). Als natürliche Folge einer Beeinträchtigung der Reparaturmechanismen wird eine größere Schädigung der DNA erwartet, damit verbunden eine gewisse Instabilität des Erbgutes. In Abhängigkeit von dem Ort der DNA-Schädigung kommt es zum Ausfall bestimmter Kontrollmechanismen, die erwartete Folge ist eine erhöhte Suszeptibilität der Zelle gegenüber Umweltgiften und anderen toxischen Substanzen, woraus wiederum ein gesteigertes Risiko der malignen Entartung der betroffenen Zelle resultiert.

7.1 Auswirkungen des *XRCC1* Exon 6 Codon 194 Polymorphismus

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Relevanz des Exon 6 Polymorphismus des Reparaturgens *XRCC1* für die Genese von Kopf-Hals-Karzinomen nicht nachgewiesen werden. Die Annahme, eine Mutation in einem der bekannten zentralen Systeme der DNA-Reparatur würde zu einer erhöhten Instabilität des Genoms führen und damit als Faktor der genetischen Suszeptibilität für die Karzinogenese von Bedeutung sein, konnte von unserer Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden.

Damit sind unsere Ergebnisse betreffend *XRCC1* Exon 6 Arg194Trp kongruent mit denen von Olshan et al. (2002). Unsere Daten zeigen eine Häufigkeit des Wildtyps (Arg/Arg) von 87,2% bei der Gruppe der Patienten, in der Gruppe der gesunden Kontrollindividuen trat dieser Genotyp in 86,4% der Fälle auf. Die Arbeitsgruppe von Olshan fand den Wildtyp bei 83,7% der Patienten und 83,8% der Kontrollen. Heterozygote Mutanten mit dem Genotyp Arg/Trp traten bei uns mit einer Häufigkeit von 12,5% in der Patientengruppe und von 12,9% im Kontrollkollektiv auf. In der Studie von Olshan fanden sich Werte von 16,3% der Fälle und 16,2% der Kontrollen. Homozygote Mutationen fanden sich weder im Patienten- noch im Kontrollkollektiv der Olshan-Arbeitsgruppe. In unseren Kollektiven traten homozygote Mutationen mit dem Genotyp Trp/Trp mit einer Häufigkeit von 0,36% in der Gruppe der Patienten und 0,68% in der Gruppe der Kontrollen auf.

Die Arbeitsgruppe von Varzim et al. untersuchte in einer Fall-Kontroll-Studie im Jahr 2003 ebenfalls den Zusammenhang von *XRCC1*-Polymorphismen und der Entstehung von HNSCC. Die Häufigkeitsverteilung der Allele betreffend Exon 6 unterschied sich nur geringfügig von den Ergebnissen unserer Untersuchung.

Hingegen konnten Yang et al. 2007 zeigen, dass Patienten, die an einem nasopharyngealen Karzinom erkrankt waren, signifikant häufiger Träger des *XRCC1* Exon 6 Polymorphismus Arg/Trp oder Trp/Trp waren (OR 1,8; 95%-KI 1,29 – 2,59).

Auch eine von der Arbeitsgruppe um Xing et al. 2002 in China durchgeführte Fall-Kontroll-Studie mit Plattenepithelzellkarzinomen des Ösophagus zeigte deutlich abweichende Allelfrequenzen im *XRCC1*-Gen Exon 6 im Vergleich zu den von uns erhobenen Daten. Es fand sich bei 49,4% der gesunden Probanden bzw. 48,7% der erkrankten Personen die Wildtyp-Variante Arg/Arg. Die heterozygote Variante trat bei 43,5% der Kontrollen und bei 37,9% der Patienten auf; die homozygote Mutation fand sich bei 7,1% der Individuen der Kontrollgruppe und bei 13,4% der Patienten. Diese Allelfrequenzen sind kongruent mit jenen in der SNP500Cancer-Datenbank des National Cancer Instituts für den pazifischen Raum. Es zeigte sich eine statistisch signifikante Häufung des varianten Allels in der Gruppe der Patienten ($p=0,003$); Träger des Trp/Trp-Genotyps hätten nach diesen Daten ein zweifach erhöhtes Risiko an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken. Die Arbeitsgruppe postulierte demnach die mutante Form als Risikogenotyp und stützte damit Daten vorheriger Studien, die ebendiese Variante des Trp-Allels im *XRCC1*-Gen Exon 6 als Risikoallel für die Entwicklung unterschiedlicher Krebserkrankungen (Mamma-, Prostata- und Colorectal-Karzinome) identifizierten (Xing et al., 2002).

In einer kleinen Fall-Kontroll-Studie mit 95 Patienten und 98 Kontrollen untersuchten Demokan et al. (2005) die Zusammenhänge von Mutationen in zwei der bekannten Exone des *XRCC1*-Gens. Sie fanden eine relative Häufung der mutanten Genotypen Arg/Trp oder Trp/Trp des Exon 6 in der Gruppe der Patienten, dieser Trend war jedoch nicht statistisch signifikant ($p=0,12$; OR 1,92; 95%-KI 0,83-4,43). Die Schlussfolgerung, dass *XRCC1* und BER in der Karzinogenese von HNSCC keine Rolle spielen, scheint aufgrund der Datenlage etwas übereilt.

In einer weiteren Fall-Kontroll-Studie mit koreanischen HNSCC-Patienten und gesunden Kontrollen zeigte sich bei Tae et al. (2004) demgegenüber, dass eine Mutation im

XRCC1-Gen Exon 6 194 Arg/Trp hoch signifikant mit einem gesteigerten Risiko an HNSCC zu erkranken assoziiert sei ($p = 0,0005$; OR 2,61; 95%-KI 1,53-4,46). Möglicherweise sind die von Tae et al. gefundenen deutlich höheren Allelfrequenzen (43,3% heterozygote und 7,5% homozygote Mutanten in der Gruppe der Fälle und 26,9% heterozygote und 3,5% homozygote Mutanten in der Gruppe der Kontrollen) für die varianten Polymorphismen einer der Gründe für die Divergenz der Ergebnisse im Vergleich zur vorliegenden Arbeit.

In einer Fall-Kontroll-Studie mit HNSCC-Patienten aus demselben Jahr untersuchten auch Sturgis et al. (2004) zwei der identifizierten *XRCC1*-Polymorphismen und ihren Einfluss auf die Entstehung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich. Sturgis et al. identifizierten *XRCC1* Exon 6 Arg/Arg als Risikogenotyp hinsichtlich der Erkrankung an Kopf-Hals-Karzinomen. In den publizierten Daten stellte sich die heterozygote Mutation zunächst als protektiv heraus, die Daten waren aber nicht statistisch signifikant.

Es zeigten sich in der genannten Studie jedoch statistisch signifikante Unterschiede bei der Analyse der unterschiedlichen Lokalisationen bei HNSCC. Der homozygote Wildtyp des *XRCC1* Exon 6 Arg/Arg stellte sich als Risikogenotyp für die oralen und pharyngealen, nicht jedoch die laryngealen Tumoren betreffend heraus (OR 2,46; KI 1,22-4,97). Leider liegen für das Kollektiv der vorliegenden Arbeit keine präzisen Angaben zu der Lokalisation des jeweiligen Primärtumors vor, so dass eine genauere Analyse dahingehend nicht durchgeführt werden konnte. Gleichzeitig beschrieben Sturgis et al. für *XRCC1* Exon 10 die homozygote Mutation als Risikogenotyp, wobei sich im Falle des Vorliegens beider Polymorphismen die Risiken addieren.

Dabei zeigte sich jedoch eine bedeutende Gen-Umwelt-Interaktion. Der Genotyp allein stellt nach Angaben von Sturgis et al. noch keinen signifikanten Risikofaktor dar. Erst durch Exposition des Organismus gegenüber zusätzlichen Karzinogenen steigt die Zahl der DNA-Schädigungen, in der Folge führt die verminderte Reparaturkapazität zu einem deutlich erhöhten Krebsrisiko.

Gegensätzliche Ergebnisse, hier Ösophaguskarzinome betreffend, wurden von Lee et al. (2001) beschrieben, in deren Fall-Kontroll-Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Genotypverteilung von *XRCC1* Exon 6 zwischen der Gruppe der Patienten und der Gruppe der Kontrollindividuen gezeigt werden konnten.

Diese Daten wurden von Goode et al. gestützt, die 2002 in einem Review 15 Studien über Polymorphismen im *XRCC1*-Gen und deren Assoziation mit dem Auftreten unterschiedlicher Krebserkrankungen (Blasen-, Brust-, Ösophagus-, Bronchial-, Magen-Karzinome, HNSCC und Melanomen) untersuchten.

Betreffend Exon 6 Arg194Trp zeigten die meisten der von Goode et al. untersuchten Studien konsistente Ergebnisse, dabei stellte sich in sechs Studien die Mutation als protektiver Genotyp bezüglich der genannten Krebserkrankungen dar. Bei vier Studien zeigte sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich dieses Polymorphismus.

In einer aktuellen belgischen Studie von De Ruyck et al. (2007) wiesen die gefundenen Allelfrequenzen des *XRCC1* Codon 194 Polymorphismus ebenfalls auf eine protektive Beeinflussung des Trägers bezüglich der Entwicklung eines Lungenkarzinoms hin ($p = 0,024$; OR 0,32; 95%-KI 0,12 – 0,86).

7.2 Auswirkungen des *XRCC1* Exon 9 Codon 280 Polymorphismus

Bezüglich des Polymorphismus des *XRCC1*-Gens im Codon 280 konnten von unserer Arbeitsgruppe keine Unterschiede für das Risiko der Entwicklung eines HNSCC beschrieben werden. Die Häufigkeit des Minor-Allels war in der Gruppe der Fälle und Kontrollen etwa gleich (4,8% der Fälle vs. 5,1% der Kontrollen). Der untersuchte Polymorphismus ist unseren Daten zufolge weder Risikogenotyp noch protektiv. Damit decken sich unsere Ergebnisse mit dem Großteil der hierzu publizierten Studien.

Tae et al. (2004) und Yang et al. (2007) kamen in ihren Arbeiten über den Zusammenhang von *XRCC1*-Gen Polymorphismen und dem Auftreten von HNSCC bzw. nasopharyngealen Karzinomen zu den gleichen Ergebnissen, signifikante Unterschiede in Abhängigkeit des Codon 280-Polymorphismus zeigten sich nicht.

Für ihre Untersuchung über den Zusammenhang von Polymorphismen im *XRCC1*-Gen und der Entstehung von Karzinomen lagen der Arbeitsgruppe um Goode et al. (2002) lediglich vier Studien mit jeweils relativ kleinen Studienkollektiven vor, die den Polymorphismus des Exon 9 Arg280His analysierten. HNSCC wurde in diesen Studien nicht untersucht; das Risiko für Blasen-, Ösophagus- und nicht-kleinzellige

Bronchialkarzinome schien nicht erhöht. Eine Studie zeigte eine statistisch signifikante Interaktion zwischen der Mutation und Alkoholkonsum und dadurch erhöhtes Risiko, an einem Lungenkarzinom zu erkranken.

Gleiches zeigten die Ergebnisse Ösophaguskarzinome betreffend von Lee et al. (2001), in deren Fall-Kontroll-Studie keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der Genotypverteilung von *XRCC1* Exon 9 zwischen der Gruppe der Patienten und der Gruppe der Kontrollindividuen auftraten. Auch die Stratifizierung nach Raucherstatus und Alkoholkonsum hatte nicht die Identifizierung bestimmter Risikoallele zur Folge.

Hsieh et al. (2003) identifizierten hingegen die Wildtyp-Variante Arg/Arg des Polymorphismus von Exon 9 Codon 280 als Risikogenotyp für nasopharyngeale Karzinome. Sie beschrieben ein zweifach erhöhtes Risiko für die Träger dieser varianten Form, an einem oralen Plattenepithelzell-Karzinom zu erkranken.

Betreffend der Genotyp-Verteilung von *XRCC1* Exon 9 Arg280His liegt eine Studie von Ratnasinghe et al. (2001) vor, in der Bronchialkarzinom-Patienten und gesunde Kontrollpersonen untersucht wurden. In dieser Studie wurden chinesische Minenarbeiter mit Karzinomen der Lunge nach Risikofaktoren wie Rauchen, Alkohol und kumulativer Radon- und Arsen-Exposition befragt und nach Alter und Geschlecht mit gesunden Kontrollpersonen gematcht. Die Ergebnisse waren insofern verblüffend, als dass sie einen protektiven Effekt für den *XRCC1* Arg194Trp Genotyp zeigten, der jedoch statistisch nicht signifikant war (OR 0,7; 95%-KI 0,4-1,2). Im Gegensatz dazu zeigte sich ein höheres Krebsrisiko für den *XRCC1* Arg280His Genotyp (OR 1,8; 95%-KI 1,0-3,4). Ratnasinghe et al. diskutierten in ihrer Arbeit eine gesteigerte Reparaturkapazität der Arg194Trp Variante und, verbunden damit, ein reduziertes Lungenkrebsrisiko. Bezogen auf HNSCC und den Polymorphismus Arg194Trp konnte diese Hypothese in der vorliegenden Arbeit nicht unterstützt werden.

Konsistent mit den Ergebnissen von Ratnasinghe et al. zeigten sich unsere Resultate bezogen auf die Exon 9 Arg280His Variante. In dem von uns untersuchten Kollektiv fand sich lediglich in der Gruppe der Patienten in einem Fall der Genotyp His/His (homozygote Mutation), keine der gesunden Kontrollen wies diesen Genotyp auf. Bei Ratnasinghe et al. fanden sich drei Patienten mit His/His-Genotyp, unter den gesunden Kontrollindividuen trat keine homozygote Mutation auf.

Loizidou et al. (2007) untersuchten Polymorphismen verschiedener Reparaturgene in einer Fall-Kontroll-Studie mit 1109 Brustkrebspatientinnen und 1177 gesunden Probandinnen. Sie identifizierten den *XRCC1* Exon 9 Codon 280 Polymorphismus als Risikogenotyp ($p = 0,03$; OR 4,68, 95%-KI 1,01 – 21,7) und fanden ein vier- bis fünffach erhöhtes Brustkrebsrisiko für die Trägerinnen dieser Mutation. Einschränkend sei hier erwähnt, dass bezüglich der Genotypfrequenz eine signifikante Abweichung vom HWE beschrieben wurde ($p < 0,05$). Aufgrund der insgesamt geringen Häufigkeit der Mutante in der Bevölkerung wurde diese Abweichung jedoch als zufälliges Ergebnis bewertet. Unter den gesunden Kontrollen fanden sich lediglich zwei Probandinnen mit dem His/His-Genotyp, in der Gruppe der Patientinnen trat diese Mutante neunmal auf.

Nach Daten der bereits erwähnten Studie von Tuimala et al. (2002) zeigte sich, dass Zellen mit hetero- oder homozygotem Genotyp des Exon 9 nach Behandlung mit Bleomycin als Induktor für oxidative Schäden und Strangbrüche signifikant mehr Chromatid-Brüche aufwiesen als die homozygoten Wildtypen. Die Autoren vermuteten eine herabgesetzte Affinität des strukturell veränderten *XRCC1*-Enzyms zu oxidativ geschädigten DNA-Abschnitten und daraus resultierend eine verminderte DNA-Reparaturkapazität.

Eine signifikant reduzierte Häufigkeit von Lungenkarzinomen unter Trägern des Arg/His Genotyps des *XRCC1* Exon 9 Polymorphismus fanden De Ruyck et al. (2007) in ihrer Fall-Kontroll-Studie unter Patienten mit histologisch gesichertem Lungenkarzinom. Sie untersuchten 110 Patienten und 350 gesunde Kontrollen und sahen ihre Daten gestützt durch Ergebnisse der Studien zur funktionellen Relevanz von Tuimala et al. (2004) und Wang et al. (2003).

7.3 Bedeutung des Risikofaktors Rauchen

Tabakrauch enthält eine Vielzahl von genotoxischen Karzinogenen, die teilweise metabolisch aktiviert oder inaktiviert werden. In zahlreichen Studien wurden Assoziationen von Tabakrauch-Exposition, dem Vorliegen von Polymorphismen in fremdstoffmetabolisierenden Enzymen und Reparaturenzymen und der Entwicklung von

Krebserkrankungen untersucht. Steht die kanzerogene Wirkung von Tabakrauch auch außer Frage, so ist doch die Frage nach einer individuellen Suszeptibilität gegenüber diesen Toxinen nicht leicht zu beantworten, eine klare Assoziation mit Polymorphismen in Reparaturenzymen wurde bislang nicht beschrieben (Iarmarcovai et al., 2007).

Diesbezüglich werden die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung von der Literatur in der Mehrzahl gestützt. Für den Polymorphismus des Exon 6 konnten wir in der Gruppe der Raucher keine signifikanten Unterschiede der Allelhäufigkeit zwischen Patienten und gesunden Probanden feststellen (OR 0,74; 95%-KI 0,36 – 1,54). Ähnliches lässt sich für unsere Ergebnisse bezüglich des Polymorphismus des Exon 9 zeigen (OR 0,75; 95%-KI 0,32 – 1,76).

Die bereits zitierte Arbeit von Varzim et al. (2003) konnte ebenso keinen Zusammenhang zwischen der Entstehung von HNSCC bei Rauchern oder Nichtrauchern und dem Auftreten von Mutationen im *XRCC1*-Gen Exon 6 zeigen.

Der Zusammenhang von Rauchverhalten und drei der bekannten Polymorphismen des *XRCC1*-Gens wurde von Majumder et al. (2005) in einer indischen Fall-Kontroll-Studie untersucht. Auch hier zeigte sich der isolierte Polymorphismus des Exon 6 im *XRCC1*-Gen als nicht statistisch signifikant im Zusammenhang mit der Entstehung von oralen Leukoplakien (Präkanzerosen) oder HNSCC bei Rauchern oder Konsumenten von anderen Tabak-haltigen Produkten (Kautabak, Betelblätter etc.). In der Gruppe der nicht rauchenden Konsumenten von Kautabak und Betelblättern stellte sich hingegen die Arg/His bzw. His/His-Variante des Codon 280 Polymorphismus als Risikogenotyp hinsichtlich der Entstehung oraler Leukoplakien heraus (OR 2,4; 95%-KI 1,0 – 5,7).

In der Untergruppe der Raucher zeigten sich bei Demokan et al. (2005) die heterozygoten oder homozygoten Mutanten als statistisch signifikante Risikogenotypen bezüglich der Entwicklung von HNSCC. Dabei stellt sich wie in der vorliegenden Arbeit das Problem, dass die Phänotypen nicht präziser beschrieben sind, eine genauere Definition des Status "Raucher" wird aus den veröffentlichten Daten nicht ersichtlich.

Die Interaktion von Polymorphismen in verschiedenen Reparaturgenen und Rauchen als exogenem Risikofaktor wurde von Stern et al. (2007) in einer chinesischen Fall-Kontroll-Studie untersucht. Isoliert betrachtet konnte *XRCC1* Codon Arg194Trp nicht als Risikogenotyp identifiziert werden. Im Zusammenhang mit dem Raucherstatus zeigte

sich jedoch für Träger des Genotyps Arg/Trp oder Trp/Trp ein signifikant erhöhtes Risiko an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken ($p = 0,005$; OR 1,6; 95%-KI 1,0 – 2,5).

Eine grenzwertige Evidenz (OR 1,5; 95%-KI 0,98 – 2,28) für den Zusammenhang des Codon 280 Polymorphismus und einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Blasenkarzinomen zeigte sich in einer britischen Studie von Sak et al. (2007). Dieser Trend verstärkte sich in der Subgruppe der Raucher ($p = 0,09$; OR 2,51; 95%-KI 0,87 – 7,31), eine statistische Signifikanz konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

Zu einer gegensätzlichen Interpretation ihrer Ergebnisse kommt die Studiengruppe De Ruyck et al. (2007), die die mutante Form der *XRCC1*-Polymorphismen im Codon 194 und Codon 280 als protektiven Genotyp identifizierte ($p = 0,024$ bzw. $p = 0,028$). Insbesondere das Fehlen dieser Mutationen in der Gruppe der Tabakrauch-exponierten Patienten wird von den Autoren als Hinweis für die gesteigerte Reparaturkapazität dieser Varianten gedeutet.

7.4 Funktionelle Konsequenzen der Mutation

Einig sind sich alle Autoren über die dringende Notwendigkeit der Anwesenheit von *XRCC1*, um die verschiedenen Reparaturmechanismen zu orchestrieren und zu koordinieren. Durch ionisierende Strahlung oder andere exogene Noxen verursachte Schädigungen der DNA, wie oxidative Schädigung oder Strangbrüche, werden vornehmlich durch BER behoben (Hu et al., 2001). Das Wissen über die Aktivität von *XRCC1* als Katalysator des Reparaturmechanismus legt die Vermutung nahe, dass auch durch einen partiellen Ausfall dieses Enzyms die Zelle an genetischer Stabilität einbüßt und somit anfälliger wird für Noxen oder andere schädigende Einflüsse. Die dauerhafte Zerstörung der DNA wäre die Folge.

Die inkonsistenten Daten der unterschiedlichen Studien (Tabelle 11) bezüglich des Zusammenhangs von Mutationen im *XRCC1*-Gen lassen jedoch Fragen zur funktionellen Relevanz dieser Polymorphismen offen.

Im Mausmodell zeigt sich die Abwesenheit von *XRCC1*-Aktivität als embryolethal (Ratnasinghe et al., 2001). Daher muss angenommen werden, dass die beschriebenen

humanen SNP des *XRCC1*-Gens nicht den kompletten Ausfall des Genprodukts zur Folge haben.

Zienolddiny et al. (2006) untersuchten den Gehalt an polyzyklischen aromatischen Hydrocarbon-DNA-Addukten in gesunden Zellen an nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom erkrankter Personen. Dabei zeigte sich ein signifikant häufigeres Vorkommen des *XRCC1*-Polymorphismus Exon 6 Arg194Trp bei Personen mit höheren Konzentrationen von DNA-Addukten (≥ 12 DNA-Addukte/ 10^8 Nukleotide). Lag hingegen ein Polymorphismus im Exon 9 oder 10 vor, so zeigten sich niedrigere Konzentrationen (≤ 12 DNA-Addukte/ 10^8 Nukleotide). Die Häufung der DNA-Schädigung wurde auf eine verminderte Reparatur-Kapazität im Bereich der BER zurückgeführt. Inwieweit diese Ergebnisse auch funktionelle Relevanz haben bleibt fraglich, da sich in Bezug auf die beschriebenen Polymorphismen des *XRCC1*-Gens und das Auftreten eines nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms keine signifikanten Unterschiede zeigten. Die von Zienolddiny et al. untersuchten Polymorphismen von Genen der Doppelstrangbruchreparatur (DSBR) zeigten keine statistisch signifikante Assoziation mit dem Auftreten von DNA-Addukten.

Sturgis et al. haben 1999 in ihrer Arbeit mit EBV-transformierten lymphoblastoiden Zelllinien gezeigt, dass durch eine Mutation im *XRCC1*-Gen die Kapazität der Reparaturmechanismen nicht signifikant reduziert wurde. Bei der Untersuchung von Zelllinien von Patienten mit HNSCC fanden sie keine signifikant erniedrigte Rate an Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) oder Mismatch-Reparatur (MMR). In Kontrast dazu konnten sie jedoch an frischen Lymphozyten von Patienten und gesunden Kontrollpersonen deutliche Unterschiede zeigen, so dass Sturgis et al. von einer Beeinflussung der genetischen Suszeptibilität durch Mutation in DNA-Reparatursystemen sprechen.

Hu et al. (2001) befassten sich mit den Auswirkungen von Polymorphismen im *XRCC1*-Gen auf die mitotische Aktivität einer Zelle. Hierbei konnte jedoch für den Exon 6 Codon 194 Polymorphismus keine erhöhte Suszeptibilität gegenüber ionisierender Strahlung festgestellt werden.

Die Untersuchungen an Lymphozyten aus peripherem Blut gesunder Kaukasier zeigten in der gleichen Arbeit verminderte Level von chromosomalen Aberrationen bei Individuen mit dem varianten Genotyp für *XRCC1* Codon 194 und Codon 280. Die

Arbeitsgruppe postulierte eine verbesserte Reparaturaktivität und infolge dessen erhöhte genomische Stabilität durch den Einfluss der beschriebenen Mutanten.

Diese Ergebnisse stehen jedoch im Kontrast zu der früheren Untersuchung von Tuimala et al. (2002), in der sie bei Trägern des *XRCC1* Exon 9 Codon 280 Polymorphismus eine signifikante Häufung von Schwesterchromatidaustauschen beobachteten und diese Ergebnisse auf eine verminderte Reparaturkapazität der Zellen zurückführten.

Tabelle 11: Übersicht der Studien zur funktionellen Relevanz einer Mutation im *XRCC1*-Gen

Studie	Material	Ergebnis
Brem und Hall, 2005	humane Brustkrebszellen	Reduktion des <i>XRCC1</i> -Proteingehaltes führt zu verminderter Einzelstrangbruchreparatur
Mani et al., 2007	rekombinante humane Polynukleotidkinase (hPNK) und <i>XRCC1</i>	<i>XRCC1</i> steigert die Kapazität der hPNK durch verbesserte Diskriminierung zwischen DNA-Strangbrüchen mit 5'-COOH- und 5'Ph-Ende sowie Dissoziation der hPNK vom phosphorylierten DNA-Produkt
Marsin et al., 2003	rekombinante hPNK, hOGG1, APE1 und <i>XRCC1</i>	Funktionelle und direkte Interaktion von <i>XRCC1</i> mit APE1 und hOGG1. Stimulation der Glycosylaseaktivität, Beschleunigung des Gesamtprozesses.
Takanami et al., 2005	Hamster Ovarialzellen (<i>XRCC1</i> defizient)	Arg280His Variante führt zu signifikant höherer Sensitivität gegenüber zytotoxischen Substanzen (hier Methylmethansulfat, MMS) als bei Vorliegen des Wildtyps oder Arg194Trp-Genotyps. Daraus resultierend verminderte BER und SSBR-Kapazität
Tebbs et al., 1999	<i>XRCC1</i> -knockout Mausembryos	Mutante Embryonen zeigten erhöhte Level von DNA-Strangbrüchen und embryonalen Arrest
Tebbs et al., 2003	<i>XRCC1</i> -knockout Mausembryos	Erhöhte Apoptose und DNA-Brüche bei <i>XRCC1</i> -defizienten Mausembryos. Destabilisierung der DNA Ligase III. Bei Restaktivität von <i>XRCC1</i> Entwicklung von gesunden, fertilen Mäusen.
Tuimala et al., 2004	Lymphozyten aus peripherem Blut gesunder Kaukasier	<i>XRCC1</i> Exone 6 und 9 verursachen keine signifikante Veränderung der SCE, etwas verminderte Level von Chromosomenbrüchen
Zienolddiny et al., 2006	343 Patienten/413 Kontrollen Norwegen	Exon 6 Arg194Trp Polymorphismus: höhere Konzentration von DNA-Addukten bei Patienten; Exon 9 Arg280His Polymorphismus: signifikant niedrigere Konzentration von DNA-Addukten bei Patienten

Abk.: Arg – Arginin; APE 1 – Apurin/Apyrimidin-Endonuklease 1; BER – Basenexzisionsreparatur; His – Histidin; hOGG1 – humane 8-Oxoguanin-DNA-Glycosylase 1; hPNK – humane Polynukleotidkinase; SCE – sister chromatid exchange; SSBR – single strand break repair; Trp – Tryptophan; *XRCC1* – x-ray repair cross-complementing gene 1

7.5 Kombinationen von Risikogenotypen

Durch die Komplexität der humanen DNA-Reparaturmechanismen scheint die Zelle auf den Ausfall einzelner Bausteine dieser Pfade vorbereitet zu sein. So konnte die Arbeitsgruppe um Varzim et al. zeigen, dass erst beim Ausfall zusätzlicher Reparaturenzyme, hier XRCC1 und CYP1A1, ein signifikanter Zusammenhang zwischen bestimmten Polymorphismen und der Entstehung von Zigarettenrauch-assoziiertem HNSCC besteht. Die verschiedenen Systeme sind offensichtlich so gestaltet, dass der Ausfall eines Elements auf anderer Ebene kompensiert werden kann (Yu et al., 1999, Sossou et al., 2005).

So wäre zu erklären, dass es durch eine Beeinträchtigung der Funktion von XRCC1 zwar zu einem erhöhten Gehalt an geschädigter DNA in einer Zelle kommt, dass diese Akkumulation jedoch entweder von anderen Reparatursystemen abgefangen werden kann oder die Apoptose der betroffenen Zelle einleitet.

Eine Analyse der Arbeitsgruppe von Popanda et al. aus dem Jahre 2004 zeigte ebenfalls die Bedeutsamkeit der Untersuchung von Kombinationen von Polymorphismen bekannter Reparaturgene, die in dieselben DNA-Reparaturmechanismen involviert sind. Untersucht wurden in einer Krankenhaus-basierten Fall-Kontroll-Studie mit an einem nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom erkrankten Personen und tumorfreien Kontrollen unter anderem Gene der BER, hier *APE1* 148 Glu/Glu und *XRCC1* 399 Gln/Gln. Es zeigte sich ein gering vermindertes Risiko für die Entwicklung eines Bronchialkarzinoms bei Vorliegen der beiden varianten Allele, insbesondere in der Subgruppe der Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom. Die Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant. Die zu diesen Polymorphismen vorliegenden Studien zeigen keine konsistenten Ergebnisse. Dies wurde von den Autoren zum Teil auf die unterschiedliche Studienpopulation und unterschiedliche Allelfrequenzen zurückgeführt. Es zeigt aber auch, dass das Potenzial eines Polymorphismus die Reparaturkapazität zu beeinträchtigen, nicht in jedem Fall eine funktionelle Relevanz bezüglich des Krebsrisikos darstellt. Möglicherweise stehen der Zelle andere Abwehrmechanismen zur Verfügung.

Im Rahmen der von Yang et al. (2007) durchgeführten Fall-Kontroll-Studie zeigte eine Kombinationsanalyse, dass Träger der beiden identifizierten Risikogenotypen *XRCC1*

Codon 194 Arg/Trp oder Trp/Trp und XPD Codon 751 Lys/Lys ein signifikant erhöhtes Risiko haben, an einem nasopharyngealen Karzinom zu erkranken (OR 2,71; 95% KI 1,34 – 5,48).

Hsieh et al. konnten 2003 zeigen, dass es eine signifikante Korrelation zwischen der homozygoten Mutation im *XRCC1* Exon 10 Arg399Gln Polymorphismus und dem gehäuften Auftreten der mittlerweile gut beschriebenen Mutation des p53-Gens gibt. Die Arbeitsgruppe untersuchte die drei bekannten Polymorphismen der Exone 6, 9 und 10, statistische Signifikanz konnte lediglich für den Polymorphismus im Exon 10 beschrieben werden.

Bei Kombination mit anderen Risikogenotypen, hier Mutationen im *hOGG1*-Gen, addierten sich nach deren Ergebnissen die Risiken. Bei Vorliegen eines einzelnen Risikogenotyps liegt nach den Ergebnissen von Hsieh et al. (2003) ein zweifach erhöhtes Risiko vor, das sich bei zweien der in der genannten Studie beschriebenen Risikogenotypen auf ein dreifaches Risiko erhöht.

7.6 Stellenwert der vorliegenden Studie

Insgesamt stellt sich die Frage nach den Ursachen für die Divergenz der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und einiger der zitierten Studien. Ein möglicher Grund ist die relativ geringe Häufigkeit der mutanten Allele beider Polymorphismen in der untersuchten Population. Eine niedrige Prävalenz der SNP erfordert Untersuchungen eines großen Kollektivs, um statistisch valide und reproduzierbare Daten zu erhalten. Den meisten Studien ist jedoch eine kleine Studienkollektivgröße, also eine geringe *study power* gemein, die eine Interpretation der Ergebnisse erschwert.

Die Risikogruppen sind unterschiedlich und teilweise nicht eindeutig definiert, so fehlen auch in der vorliegenden Arbeit präzise Informationen zu dem Rauchverhalten der Probanden und der Lokalisation der Tumore. Insbesondere das Fehlen der Angabe von pack years erschwert die Interpretation und den Vergleich mit den Daten bereits publizierter Studien. Aber auch genauere Lebensumstände wie Beruf und Ernährung, denen eine Bedeutung bezüglich des individuellen Risikos zugeschrieben wird, werden

meist nicht deutlich. Es lässt sich jedoch vermuten, dass die beschriebenen Kollektive aus Korea, Indien, der Türkei, Portugal, Polen, den USA etc. divergierende Lebensbedingungen und Ernährungsgewohnheiten haben. Aufgrund der Annahme, dass das HNSCC zu den multifaktoriell bedingten Erkrankungen mit einer deutlichen Gen-Umwelt-Interaktion gehört, ist auch diesbezüglich eine eingeschränkte Vergleichbarkeit der einzelnen Studien anzunehmen. Wünschenswert wären demnach größere multifaktorielle Analysen.

Unabhängig davon ist die funktionelle Relevanz eines Ausfalls des *XRCC1*-Gens bezüglich der Entstehung von HNSCC selbst bei signifikanter Korrelation noch nicht hinreichend geklärt. Die vorliegende sowie die zitierten Kandidatengen-Studien müssten durch weiterführende Untersuchungen bezüglich der funktionellen Auswirkungen der Polymorphismen in den Reparaturgenen ergänzt werden. In der Folge wäre eine Erstellung von individuellen Risikoprofilen und daraus resultierend die Entwicklung von individualisierten Präventions- und Früherkennungsprogrammen möglich.

8 Zusammenfassung

Weltweit ist eine Zunahme der Kopf-Hals-Karzinome zu verzeichnen, deren Prognose trotz großer Fortschritte in der Therapie in den letzten Jahren weiterhin schlecht ist. Prävention und Früherkennung kommen daher eine enorme Bedeutung zu.

Voraussetzung dafür ist jedoch die genaue Kenntnis der exogenen und endogenen Faktoren, die maßgeblich an der Krankheitsentstehung beteiligt sind. Bezüglich der karzinogenen Noxen wurden Tabak und Alkohol als hauptverantwortliche Mutagene identifiziert. Die Tatsache, dass nur ein kleiner Teil der Raucher an einem Kopf-Hals-Karzinom erkrankt, wirft die Frage nach genetischen Ursachen auf.

Bei der Wahrung der genomischen Stabilität kommt den DNA-Reparaturmechanismen und den daran beteiligten Genen eine entscheidende Rolle zu. Mutationen in Reparaturgenen könnten somit eine Veränderung der individuellen genetischen Suszeptibilität verursachen.

Eines dieser Reparaturgene ist *XRCC1*. Das Genprodukt stellt als Initiator eines Multienzymkomplexes im Rahmen der Basenexzisionsreparatur und bei der Korrektur von Einzelstrangbrüchen eine zentrale Schaltstelle dar und ist daher für die Stabilität des Erbgutes von großer Wichtigkeit. Einige der bekannten *XRCC1*-Polymorphismen haben einen Aminosäureaustausch im Bereich von Protein-Protein-Interaktionsstellen zur Folge, eine veränderte Funktionalität des Enzyms und dadurch eine beeinträchtigte Reparaturkapazität der Zelle wäre denkbar.

In der vorliegenden Untersuchung wurden Genotypen von 281 Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom und 295 gesunden Kontrollen hinsichtlich der *XRCC1*-Polymorphismen der Codons Arg194Trp und Arg280His analysiert. Unter Berücksichtigung des Raucherstatus wurde der Frage nachgegangen, inwieweit diese Polymorphismen das individuelle Risiko der Erkrankung an HNSCC modulieren.

Die Daten unserer Untersuchung führten jedoch nicht zur Identifizierung eines Risikogenotyps, signifikante Unterschiede konnten weder für den *XRCC1* Codon 194 Polymorphismus (OR 1,14; 95%-KI 0,64–2,04), noch für den *XRCC1* Codon 280 Polymorphismus (OR 1,29; 95%-KI 0,66–1,57) nachgewiesen werden. Auch die Stratifizierung nach Raucherstatus führte für keinen der untersuchten Polymorphismen zu einer signifikanten Änderung des Erkrankungsrisikos.

Der Ausfall eines einzelnen Reparaturgens scheint nach unseren Daten keine Auswirkungen auf die genomische Stabilität der Zelle zu haben, durch andere Reparaturmechanismen kann die Zelle den Schaden offenbar kompensieren.

Weitere Studien zur funktionellen Relevanz von Mutationen und Kombinationen von Polymorphismen unterschiedlicher Reparatur- und fremdstoffmetabolisierender Gene scheinen erforderlich, um die Hintergründe der Kanzerogenese von HNSCC aufzuklären.

9 Literaturverzeichnis

Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. *BioEssays* 2004; 26: 882-893.

Biolchini F, Pollastri G, Figurelli S, Chiarini L. Carcinogen metabolism. DNA damage repair and oral head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Minerva Stomatol* 2005; 54: 405-414.

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

Braakhuis BJ, Tabor M, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A Genetic explanation of slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 2003; 63: 1727-1730.

Brem R, Hall J. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 2512-2520.

Brooks PJ. DNA damage, DNA repair and alcohol toxicity: a review. *Alcohol Clin Exp Res* 1997; 21: 1073-1082.

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

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

Califano JA, Sidransky D. Molecular Biology of Head and Neck Cancer. In: Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, eds. *Head and Neck Cancer - A multidisciplinary approach*. New York; Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999: 3-21.

Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 1996; 56: 2488-2492.

Califano J, Leong PL, Koch WM, Eisenberger CF, Sidransky D, Westra W. Second esophageal tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma: an assessment of clonal relationships. *Clin Cancer Res* 1999; 5: 1862-1867.

Chen-Lei Y, Hwang SJ, Chang CC, Kuo HW, Lou JC, Chang MJW, Cheng TJ. Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene XRCC1 in smokers. *Mutat Res* 2002; 519: 93-101.

Chen KH, Srivastava DK, Singhal RK, Jacob S, Ahmed AE, Wilson SH. Modulation of base excision repair by low density lipoprotein, oxidized low density lipoprotein and antioxidants in mouse monocytes. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1017-1022.

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

Curtin, NJ. PARP inhibitors for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* 2005; 7: 1-20.

David-Beabes GL, London SJ. Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer* 2001; 34: 333-339.

De Ryuck K, Szaumkessel M, De Rudder I, Dehoorne A, Vral A, Claes K, Velghe A, Van Meerbeeck J, Thierens H. Polymorphisms in base-excision repair and nucleotide-excision repair genes in relation to lung cancer risk. *Mutat Res* 2007; 631: 101-110.

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.

Deutsches Krebsforschungszentrum, 2004: Lippe, Mundhöhle, Rachen.

http://www.dkfz.de/epi/home_d/programm/ag/Praevent/krebshom/main/deutsch/rechts.html (Zugriffsdatum: 17.12.2004).

Deutsches Krebsforschungszentrum, 2007: Krebsatlas. <http://www.dkfz-heidelberg.de/de/krebsatlas/gesamt/organ.html> (Zugriffsdatum: 03.10.2007)

Duell EJ, Wiencke JK, Cheng T-J, Varkonyi A, Zuo F, Ashok TDS, Mark EJ, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2* and the 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.

Friedberg EC. Suffering in silence: the tolerance of DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 943-953.

Fronhoffs S, Brüning T, Ortiz-Pallardó ME, Bröde P, Koch B, Harth V, Sachinidis A, Bolt HM, Herberhold C, Vetter H, Ko Y. Real-time PCR analysis of the N-acetyltransferase NAT1 allele *3, *4, *10, *11, *14 and *17 polymorphism in squamous cell cancer of head and neck. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1405-1412.

Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskula-Sztul R, Wierzbicka M, Szyfter W, Szyfter K. Reduced DNA repair capacity in laryngeal cancer subjects. *Adv Otorhinolaryngol* 2005; 62: 25-37.

Geisler SA, Olshan AF, Cai J, Weissler MC, Smith J, 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. Review Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002; 11: 1513-1530.

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

Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otolaryngol* 2003; 260: 502-508.

Harth V, Donat S, Ko Y, Abel J, Vetter H, Brüning T. NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 codon 609 polymorphism and its association to colorectal cancer. *Arch Toxicol* 1999; 73: 528-531.

Harth V, Brüning T, Abel J, Berg I, Sachinidis A, Bolt HM, Vetter H, Ko Y. Real-time genotyping of cytochrome P4501A1 A4889G and T6235C polymorphisms. *Mol Cell Probes* 2001; 15: 93-97.

Hildesheim A, Levine PH. Etiology of nasopharyngeal carcinoma: a review. *Epidemiol Rev* 1993; 15: 466-485.

Hobbs CGL, Sterne JAC, Bailey M, Heydermann RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* 2006; 31: 259-266

Hsieh LL, Chien HT, Chen IH, Liao CT, Wang HM, Jung SM, Wang PF, Chang JTC, Chen MC, Cheng AJ. The *XRCC1* 399Gln polymorphism and the frequency of p53 mutations in Taiwanese oral squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 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, Channock SJ, Fraumeni JF, Hayes Richard B. Selected Genetic Polymorphisms in *MGMT*, *XRCC1*, *XPB* and *XRCC3* and risk of head and neck cancer: A pooled analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14: 1747-1753.

Hussey DH, Latourette HB, Panje WR. Head and neck cancer: An analysis of the incidence, patterns of treatment, and the survival at the University of Iowa. *Head Neck Cancer* 2003; 100: 2-16.

Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsiere T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. *Mutat Res* 2007.

http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6T2G-4PYGW5N-1&_user=10&_rdoc=1&_fmt=&_orig=search&_sort=d&view=c&_acct=C000050221&_version=1&_urlVersion=0&_userid=10&md5=6fa9d7ab4659a8e544fd571fac360dac
(Zugriffsdatum 04.02.2008)

Ikejima M, Nogouchi S, Yamashita R, Ogura T, Sugimura T, Gill D, Miwa M. The zinc finger of human poly(ADP-ribose) polymerase are differentially required for the recognition of DNA breaks and the consequent enzyme activation. Other structures recognize intact DNA. *J Biol Chem* 1990; 265: 21907-21913.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C et al. Cancer Statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006; 56: 106-130

Kashiwazaki H, Tonoki H, Tada M, Chiba I, Shindoh M, Totsuka Y et al. High frequency of p53 mutations in human oral epithelial dysplasia and primary squamous cell carcinoma detected by yeast functional assay. *Oncogene* 1997; 15: 2667-2674

Knippers R. Molekulare Genetik. 7., durchgesehene und korrigierte Auflage ed. Stuttgart; New York: Georg Thieme Verlag, 1997.

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

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

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 14: 467-475

Kubota Y, Horiuchi S. Independent roles of XRCC1's two different 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 β and the XRCC1 protein. *EMBO J* 2004; 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.

Ladiges W. Mouse models of *XRCC1* DNA repair polymorphisms and cancer. *Oncogene* 2006; 25: 1612-1619.

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

Lei YC, Hwang SJ, Chang CC, Kuo HW, Luo JC, Chang MJW, Cheng TJ. Effects on sister chromatid exchange frequency of polymorphisms in DNA repair gene *XRCC1* in smokers. *Mutat Res* 2002; 519: 93-101.

Li C, Hu Z, Lu J, Wang LE, El-Naggar AK, Sturgis EM, Spitz M, Wei Q. Genetic polymorphisms in DNA base-excision repair genes *ADPRT*, *XRCC1*, *APE1* and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Am Cancer Soc* 2007; 110: 867-875.

Loizidou MA, Michael T, Neuhausen SL, Newbold RF, Marcou Y, Karkouri E et al. Genetic polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC2* and *XRCC3* and risk of breast cancer in Cyprus. *Breast Cancer Res Treat*. In press.

Loizou JI, El-Khamisy SF, Zlatanou A, Moore DJ, Chan DW, Qin J, Sarno S, Meggio F, Pinna LA, Caldecott KW. The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks. *Cell* 2004; 117: 17-28.

Maier H, Dietz A, Gewelke V, Heller WD. Occupational exposure to hazardous substances and risk of cancer in the area of mouth cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx. A case-control study. *Laryngorhinootol* 1991; 70: 93-98.

Majumder M, Sikdar N, Paul RR, Roy B. 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.

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.

Mani RS, Fanta M, Karimi-Busheri F, Silver E, Virgen CA, Caldecott KW et al. *XRCC1* stimulates polynucleotide kinase by enhancing its damage discrimination and displacement from DNA-repair intermediates. *J Biol Chem* 2007, 282: 28004-28013.

Marintchev A, Mullen MA, Maciejewski MW, Pan B, Gryk MR, Mullen GP. Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. *Nat Struct Biol* 1999; 6: 805-806.

Marsin S, Vidal AE, Sossou M, Ménissier de Murcia J, Le Page F, Boiteux S, de Murcia G, Radicella JP. Role of XRCC1 in the Coordination and Stimulation of Oxidative DNA Damage Repair Initiated by the DNA Glycosylase hOOG1. *J Biol Chem* 2003; 278: 44068-44074.

McCallough M, Giovannucci E. Diet and Cancer Prevention. *Oncogene* 2004; 23: 6349-6364.

Ménissier de Murcia J, Ricoul M, Tartier L, Niedergang C, Huber A, Dantzer F, Schreiber V, Amé JC, Dierich A, LeMeur A, Sabatier L, Chambon P, de Murcia G. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosomal stability and embryonic development in mouse. *EMBO J* 2003; 22: 2255-2263.

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Biotechnology* 1986; 24: 17-27

National Cancer Institute, 2005: SNP 500 Cancer genome anatomy project. http://snp500cancer.nci.nih.gov/snp.cfm?both_snp_id=XRCC1
(Zugriffsdatum:13.08.2005)

Okano S, Lan L, Tomkinson AE, Yasui A. Translocation of XRCC1 and DNA ligase IIIa from centrosomes to chromosomes in response to DNA damage in mitotic human cells. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 422-429.

Olshan AF, Weissler MC, Pei H, Conway K, Anderson S, Fried DB et al. Alterations of the p16 gene in head and neck cancer: frequency and association with p53, PRAD-1, and HPV. *Oncogene* 1997; 14: 811-814.

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

Onoda N, Nehmi A, Weiner D, Mujumdar S, Christen R, Los G. Nicotine affects the signaling of the death pathway, reducing the response of the head and neck cancer cell lines to DNA damaging agents. *Head Neck* 2001; 23: 860-870.

Ortiz-Pallardó ME, Zhou H, Fischer HP, Neuhaus T, Sachinidis A, Vetter H, Brüning T, Ko Y. Rapid analysis of alpha1-antitrypsin PiZ genotype by a real-time PCR approach. *J Mol Med* 2000; 78: 212-216.

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

Peters E, McClean M, Marsit C, LUCKETT B, Kelsey K. 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 CT, Butkiewicz D, Risch A, Edler L, Kayser K, Dienemann H, Schulz V, Drings P, Bartsch H, Schmezer P. Specific combinations of DNA repair gene variants and increased risk for non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* 2004; 25: 2433-2441.

Ragin CCR, Modugno F, Gollin SM. The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human Papillomavirus. *J Dent Res* 2007; 86: 104-114.

Ratnasinghe D, Yao SX, Tangrea JA, Qiao YL, Andersen MR, Barrett MJ, Giffen CA, Erozan Y, Tockman MS, Taylor PR. Polymorphisms of the DNA repair gene *XRCC1* and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10: 119-123.

Reiss M, Stash EB, Vellucci VF. Activation of the autocrine transforming growth factor alpha pathway in human squamous cell carcinoma cells. *Cancer Res* 1991; 51: 6254-6262.

Robert-Koch-Institut, 2004a: Kehlkopfkrebs.

http://www.rki.de/cIn_049/nn_203956/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Broschuere/kid2006,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/kid2006pdf (Zugriffsdatum: 03.10.2007)

Robert-Koch-Institut, 2004b: Mund und Rachen.

http://www.rki.de/cIn_049/nn_203956/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/Broschuere/kid2006,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/kid2006pdf (Zugriffsdatum: 03.10.2007)

Sak SC, Barrett JH, Paul AB, Bishop DT, Kiltie AE. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms and bladder cancer risk. *BioMed Central Genetics* 2007; 8(13):1-8.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 2000;103: 211-225.

Shen MR, Jones IM, Mohrenweiser H. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58: 604-608.

Shen M, Hung RJ, Brennan P, Malaveille C, Donato F, Placidi D, Carta A, Hautefeuille A, Boffetta P, Porru S. Polymorphisms of the DNA repair genes *XRCC1*, *XRCC3*, *XPB*, interaction with environmental exposures and bladder cancer risk in a case-control study in northern Italy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 1234-1240.

Sossou M, Flohr-Beckhaus C, Schulz I, Daboussi F, Epe B, Radicella JP. APE1 overexpression in *XRCC1*-deficient cells complements the defective repair of oxidative

single strand breaks but increases genomic instability. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 298-306.

Spitz M, Trizna Z. Molecular epidemiology and genetic predisposition for head and neck cancer. In: Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, editors. *Head and neck cancer, a multidisciplinary approach*. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven, 1999: 11-21.

Statistisches Bundesamt Deutschland, 2006: Todesursachen in Deutschland. http://www.gbe-bund.de/gbe10/ergebnisse.prc_tab?fid=10565&suchstring=&query_id=&sprache=D&fund_typ=TXT&methode=&vt=&verwandte=1&page_ret=0&seite=1&p_lfd_nr=33&p_news=&p_sprachkz=D&p_uid=gast&p_aid=59603372&hlp_nr=2&p_janein=J
(Zugriffsdatum: 27.01.2008)

Steinberg BM. Viral etiology of head and neck cancer. In: Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, editors. *Head and neck cancer, a multidisciplinary approach*. Philadelphia, New York: Lippincott-Raven, 1999:35-47.

Stern MC, Conti DV, Siegmund KD, Corral R, Yuan J-M, Koh W-P, Y MC. DNA repair single-nucleotide polymorphism in colorectal cancer and their role as modifiers of the effect of cigarette smoking and alcohol in the Singapore Chinese health study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16: 2363-2372.

Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, Strom SS, Spitz MS, Wei Q. Polymorphisms of DNA repair gene *XRCC1* in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 1999; 20: 2125-2129.

Sturgis EM, Clayman GL, Guan Y, Guo Z, Wei Q. DNA repair in lymphoblastoid cell lines from patients with head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1999; 125: 185-190.

Suzuki T, Wakai K, Matsuo K, Hirose K, Ito H, Kuriki K et al. 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.

Tabor M, Brakenhoff RH, van Houten VMM, Kummer JA, Snel MHJ, Snijders PJF, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJM. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: Biological and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 1523-1532.

Tae K, Lee HS, Park BJ, Park CW, Kim KR, Cho HY, Kim LH, Park BL, Shin HD. Association of DNA repair gene *XRCC1* Polymorphisms with head and neck cancer in Korean population. *Int J Cancer* 2004; 111: 805-808.

Takanami T, Nakamura J, Kubota Y, Horiuchi S. The Arg280His polymorphism in *x-ray repair cross-complementing gene 1* impairs DNA repair ability. *Mutat Res* 2005; 582: 135-145.

Tebbs RS, Flannery ML, Meneses JJ, Hartmann A, Tucker JD, Thompson LH, Cleaver JE, Pedersen RA. Requirement for the *XRCC1* DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev Biol* 1999; 208: 513-529.

Tebbs RS, Thompson LH, Cleaver JE. Rescue of *XRCC1* knockout mouse embryo lethality by transgene-complementation. *DNA Repair* 2003; 2: 1405-1417.

Thompson LH, Brookman KW, Jones NJ, Allen SA, Carrano AV. Molecular cloning of the human *XRCC1* gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol* 1990; 10: 6160-6171.

Thompson LH, West MG. *XRCC1* keeps DNA from getting stranded. *Mutat Res* 2000; 459: 1-18.

Tudek B, Swoboda M, Kowalsczyk P, Olinsky R. Modulation of oxidative DNA Damage Repair by the Diet, Inflammation and Neoplastic Transformation. *J Physiol Pharmacol* 2006; 57: 33-49.

Tuimala J, Szekely G, Gundy S, Hirvonen A, Norppa H. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: role in mutagen sensitivity. *Carcinogenesis* 2002; 23: 1003-1008.

Tuimala J, Szekely G, Wikman H, Järventaus H, Hirvonen A, Gundy S, Norppa H. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. *Mut Res* 2004; 554: 319-333.

Van Schooten FJ, Godschalk RW, Breedijk A, Maas LM, Kriek E. 32P-postlabeling of aromatic DNA adducts in white blood cells and alveolar macrophages of smokers: saturation at high exposures. *Mutat Res* 1997; 378: 65-75.

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

Vidal AE, Radicella. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J* 2001; 20: 6530-6539.

Vineis P, Alavanja M, Buffler P, Fontham E, Franceschi S, Gao YT et al. Tobacco and cancer: Recent epidemiological evidence. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 99-106.

Weber A, Tannapfel A, Wittekind C, Bootz F. Carcinogen-Induced Site-Specific Mutagenesis and genetic susceptibility in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Onkologie* 2002; 25: 8-13.

Weber A, Dietz A, Tischoff I, Tannapfel A. Epigenetik in der Entstehung von Plattenepithelzellkarzinomen des Kopf-Halses - mögliche neue Therapieoptionen? *Laryngorhinootologie* 2007; 86: 9-13.

Wernert N, Justen HP, Rothe M, Behrens P, Dreschers S, Neuhaus T, Florin A, Sachinidis A, Vetter H, Ko Y. The Ets 1 transcription factor is upregulated during inflammatory angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Mol Med* 2002; 80: 258-266.

Whitehouse CJ, Taylor Richard M, Thistlethwaite A, Zhang H, Karimi-Busheri F, Lasko DD, Weinfeld M, Caldecott KW. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell* 2001; 104: 107-117.

Wilson SH, Mullen GP. Non-conservative amino acid substitution variants exists at polymorphic frequencies in DNA repair gene in healthy humans. *Cancer Res* 1998; 58: 604-608.

Winn DM, Blot WJ, Mc Laughlin JK. Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1991; 51: 3044.

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.

World Health Organization, 2006: Cancer fact sheet. <http://www.who.int/topics/en/> (Zugriffdatum: 28.01.08)

World Health Organization, 2007: Cardiovascular diseases fact sheet. <http://www.who.int/topics/en/> (Zugriffdatum: 28.01.08)

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

Yang W. Structure and mechanism for DNA lesion recognition. *Cell Res* 2008; 18: 184-197.

Yang ZH, Du B, Wei YS, Zhang JH, Zhou B, Liang WB et al. Genetic polymorphisms of the DNA repair gene and risk of nasopharyngeal carcinoma. *DNA Cell Biol* 2007; 26: 491-496.

Yu HP, Zhang XY, Wang XL, Shi LY, Li YY, Li F, Su YH, Wang YJ, Lu B, Sun X, Lu WH, Xu SQ. DNA repair gene *XRCC1* polymorphisms, smoking and esophageal cancer risk. *Cancer Det Prev* 2004; 28: 194-199.

Yu Z, Chen BN, Brackley ME, Glickman BW. Human DNA repair system: an overview. *Environ Mol Mutagen* 1999; 33: 3-20.

Zhou W, Liu G, Miller DP, Thurston SW, Xu LL, Wain JC, Lynch TJ, Su L, Christiani DC. Polymorphisms in the DNA repair genes *XRCC1* and *ERCC2*, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 359-365.

Zienolddiny S, Campa D, Lind H, Ryberg D, Skaug V, Stangeland L, Phillips DH, Canzian F, Haugen A. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small lung cancer. *Carcinogenesis* 2006; 27: 560-567.

Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Hans Vetter für die Möglichkeit, an seiner Klinik diese Arbeit durchführen zu können und Herrn Privatdozent Dr. med. Thomas Neuhaus für die Überlassung des Themas, für sein Interesse an dieser Arbeit und für seine Bereitschaft zur Übernahme des Promotionsverfahrens.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. Yon-Dschun Ko und Herrn Dr. med. Volker Hardt für die engagierte fachliche Unterstützung im Labor sowie in der Phase der schriftlichen Niederlegung der Ergebnisse bedanken.

Während der Zeit der labordiagnostischen Untersuchungen wurde ich insbesondere von Frau Silke Schöneborn, Frau Elisabeth Grünewald (MTA) sowie Herrn Dr. med. Viktor Janzen unterstützt, dafür sei herzlich gedankt.

Für die wertvolle Hilfe und Erläuterungen bei der statistischen Auswertung danke ich Frau Sylvia Rabstein.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Robert Primke, der mir nicht nur im Labor jede notwendige Unterstützung gegeben hat und Herrn Dr. med. Thomas Fries für die kritische Durchsicht des Manuskripts.

Ich danke meinem Partner Torben Christensen für seine Geduld und seinen Glauben in dieses Projekt und für seine Freundschaft und Liebe in der Zeit, in der ein Großteil dieser Arbeit entstanden ist.

Ich danke meinen Schwestern Lise und Philine Besuden für ihre Liebe, ihre Freundschaft und ihre bedingungslose Unterstützung bei allen kleinen und großen Problemen.

Meinem Vater Axel Besuden danke ich für seine Liebe und Anerkennung und dafür, dass er mir meine Ausbildung möglich gemacht hat.

Ich danke meiner Mutter Susanne Besuden für alles was war und alles was bleibt.

Frankfurt, im Juni 2008