

## 4 Diskussion

In dieser Genotypisierungsstudie wurden neun Polymorphismen in DNA-Reparaturenzymen im Hinblick auf eine mögliche Assoziation mit der Entstehung von Larynxkarzinomen untersucht. Keine der untersuchten Genvarianten in PCNA, ERCC1, XPF und XPC war für sich genommen statistisch signifikant mit dem Vorkommen von Larynxkarzinomen assoziiert. Demnach waren die Träger einer der Genvarianten durch diese allein weder prädisponiert, an Kehlkopfkrebs zu erkranken, noch besaßen sie einen protektiven Faktor, der ihr Erkrankungsrisiko statistisch signifikant minderte. Die Varianten T<sub>26729</sub>C in Exon 10 und G<sub>30258</sub>A in Exon 11 von XPF traten weder im Patienten- noch im Kontrollkollektiv auf.

Bei Betrachtung in Zusammenhang mit weiteren individuellen Faktoren zeigte sich jedoch erstmals die Bedeutung der Poly-AT-Variante in XPC als modulierender Risikofaktor für Patienten, die anders als die Mehrheit der Larynxkarzinompatienten verhältnismäßig wenig geraucht oder Alkohol getrunken hatten. Es konnte nachgewiesen werden, dass Träger mindestens eines PAT+-Allels, die weniger als 30 Packungsjahre aufwiesen, eine signifikant erhöhte Sensitivität gegenüber der Erkrankung an Larynxkarzinomen besitzen (OR 2,91; p=0,011). Eine ebenfalls signifikanter Unterschied konnte auch bei Patienten aufgezeigt werden, die nur gelegentlich Alkohol getrunken hatten und Träger mindestens eines PAT+-Allels waren (OR 6,76; p=0,006).

Diese Ergebnisse zeigten neue Aspekte zu denen vorausgegangener Studien auf und sollen nachfolgend im Einzelnen diskutiert werden. Entscheidende Teile stehen in Einklang mit den Ausführungen von Preston (Preston, 1996). Dieser hatte im Zusammenhang mit interindividuellen Unterschieden bei Erkrankungsrisiken zwei Klassen von Genvarianten definiert: Der ersten Klasse gehören seltene Genvarianten mit hoher Penetranz an, die die Suszeptibilität erhöhen, d.h. mit einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber Krebserkrankungen einhergehen, ohne dass äußere Faktoren offensichtlich dazu beigetragen hätten. Der zweiten Klasse hingegen gehören Genvarianten an, die relativ häufig vorkommen, jedoch eine niedrigere Penetranz haben. Sie modulieren die individuelle Sensitivität, d.h. sie erhöhen das Krebsrisiko nur dann, wenn zusätzlich weitere äußere Risikofaktoren vorliegen. Bei dieser zweiten Klasse bedarf es also der Interaktion mit anderen individuellen Risikofaktoren oder der Kombination mehrerer Genvarianten, um das individuelle Risiko für die Erkrankung an Krebs zu erhöhen (de Boer, 2002). Vor diesem Hintergrund wird im Abschnitt 4.3 der Einfluss der untersuchten Genvarianten auf die Entstehung von Larynxkarzinomen im Zusammenhang mit weiteren Risikofaktoren im Einzelnen diskutiert.

#### 4.1 Charakteristika von Patienten- und Kontrollgruppe

Die Gruppe der Larynxkarzinompatienten entsprach in ihrer Altersstruktur, der Geschlechterverteilung und der Verteilung der Tumorlokalisationen im Wesentlichen den Fallgruppen anderer epidemiologischer Studien (Bidoli et al., 2003; Henning et al., 1999; Maier und Tisch, 1997) und den Angaben des Krebsregisters des Saarlandes zur Epidemiologie des Larynxkarzinoms (Bertz, 2004). Auch der für dieses Patientenkollektiv typische stark ausgeprägte Genussmittelkonsum konnte in der vorliegenden Studie beobachtet werden. Der Anteil an Nichtrauchern in der Fallgruppe (6,1%) und der Anteil derer, die nach eigenen Angaben niemals Alkohol tranken (8,2%), war jedoch etwas höher als in der richtungweisenden Heidelberger Fall-Kontroll-Studie zur Epidemiologie des Kehlkopfkarcinoms (Maier und Tisch, 1997). Auffallend hoch war im Gegensatz zu dieser Studie sowie zu den Ergebnissen von Henning et al. und Maier und Tisch der Anteil der Nichttrinker bei Bidoli et al. (25,8%). Der Grund hierfür liegt in der Art der Stratifizierung, die Bidoli et al. zur näheren Untersuchung des Alkoholkonsums anwandten: Alle Patienten, die weniger als 4 alkoholische Getränke pro Tag konsumierten, fielen hier in eine Kategorie, so daß nicht strikt zwischen Alkoholabstinenz und geringem Alkoholkonsum unterschieden wurde. In Tabelle 39 werden die wesentlichen Charakteristika der Fallgruppe der vorliegenden Arbeit denen der Larynxkarzinomkollektive anderer Autoren gegenübergestellt.

Tabelle 39: Vergleich der Fallgruppe mit den Patientenkollektiven anderer epidemiologischer Studien.

	vorliegende Arbeit	(Henning et al., 1999)	(Maier und Tisch, 1997)	(Bidoli et al., 2003)
<b>Geschlecht</b>				
männlich (%)	91,5	90,6	100 <sup>a</sup>	90,7
weiblich (%)	8,5	9,4	-	9,3
<b>Altersmedian (Jahre)</b>	61	61	58	61
<b>Raucherstatus</b>				
Nichtraucher (%)	6,1	5,1	4,3	3,6
<b>Alkoholkonsum</b>				
Nichttrinker (%)	8,2	5,1	4,4	25,8
<b>Tumorlokalisation</b>				
glottisch (%)	67,5	73,3	33,0	74
supraglottisch (%)	23,7	24,3	32,9	
subglottisch (%)	1,7	2,4	34,1	<sup>b</sup>
übrige (%)	7,1	-		<sup>b</sup>

<sup>a</sup>nur Männer in die Studie eingeschlossen. <sup>b</sup>nähere Angaben fehlen.

Die Charakteristika der Kontrollgruppe wichen in einigen Punkten von denen der Fallgruppe ab. Dies lag darin begründet, dass es nur zum Teil gelang, Patienten zu finden, die ungefähr gleichen Alters waren wie die Kehlkopfkrebspatienten, bereits ähnlich viel Tabak und Alkohol konsumiert hatten und trotzdem gesund waren bzw. noch nicht an einem Malignom erkrankt waren. Folglich lag der Anteil der Tabak- bzw. Alkoholkonsumenten in der Kontrollgruppe signifikant unter dem der Larynxkarzinompatienten und der Altersmedian der Kontrollpatienten war deutlich höher als in der Fallgruppe. Da sich diese Differenzen zwischen Fall- und Kontrollgruppe mithilfe der heute verfügbaren Statistik-Software berücksichtigen lassen, wurde darauf verzichtet, die in ihren Eigenschaften nicht vollständig mit der Fallgruppe übereinstimmende Kontrollgruppe durch eine möglicherweise selektionierte andere Gruppe zu ersetzen (Matthias et al., 1998). Alle beobachteten Genotyp-Frequenzen im Kontrollkollektiv wurden mit den nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz erwarteten Frequenzen verglichen. Da sich keinerlei signifikante Unterschiede ergaben und sich alle Genotypfrequenzen im Hardy-Weinberg-Equilibrium befanden, wurde davon ausgegangen, dass das Kontrollkollektiv in dieser Hinsicht repräsentativ war.

## **4.2 Einfluss der Genvarianten in PCNA, ERCC1, XPF und XPC auf die Entwicklung von Larynxkarzinomen**

### **4.2.1 PCNA**

Die Polymorphismen in Intron 1 von PCNA traten in dieser Studie mit einer Allelfrequenz von 0,11 unter den Fällen bzw. 0,13 unter den Kontrollen auf. Die Allelfrequenz war damit sowohl unter den Larynxkarzinompatienten als auch unter den Kontrollen etwas höher als unter den in der Literatur beschriebenen Kontrollen (0,09), Melanom- (0,09), Brustkrebs- (0,03) und Lungenkrebspatienten (0,07) (Ma et al., 2000). Da zwischen den untersuchten Kollektiven der vorliegenden Arbeit und der Studie von Ma et al. (Population aus Schweden und Finnland) keine wesentlichen ethnischen Unterschiede bestehen, sind die Abweichungen in den Allelfrequenzen am ehesten auf die unterschiedliche Größe der untersuchten Kollektive zurückzuführen.

Die beiden hier untersuchten Genvarianten standen in komplettem Kopplungsungleichgewicht zueinander, d.h. alle Patienten und Kontrollen waren immer an beiden Loci gleichzeitig entweder homozygot für den Referenztyp, heterozygot oder homozygot für die Variante. Diese Ergebnisse standen in Einklang mit denen von Ma und Mitarbeitern. Diese hatten herausgefunden, dass die beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Varianten und 4 weitere Polymorphismen in

Intron 1 und 4 von PCNA immer gleichzeitig auftreten. Da die 6 SNPs in regulatorisch wichtigen Regionen für die Genexpression von PCNA liegen (Alder et al., 1992; Chang et al., 1990; Ottavio et al., 1990), war eine mögliche Assoziation dieser gemeinsam auftretenden Varianten mit einer erhöhten Sensitivität oder Suszeptibilität für Krebserkrankungen wahrscheinlich. In der Literatur lagen diesbezüglich wenig Daten vor und die Untersuchungskollektive in einer Assoziationsstudie zu Haut-, Brust- und Lungenkrebs waren relativ klein (n=37, n=118, n=100) (Ma et al., 2000).

In der vorliegenden Genotypisierungsstudie konnte nun an einem Kollektiv von 295 Patienten und 179 Kontrollen gezeigt werden, dass die Varianten C<sub>1661</sub>G und C<sub>1684</sub>A in Intron 1 von PCNA keine eigenständigen Risikofaktoren für die Erkrankung an Larynxkarzinomen sind.

#### 4.2.2 ERCC1

Die Genvariante in Exon 4 der Exonuklease ERCC1 trat in dieser Studie mit einer erstaunlich hohen Allelfrequenz von 0,35 unter den Larynxkarzinompatienten und 0,33 unter den Kontrollen auf. Ähnlich hohe Genfrequenzen (0,39 bzw. 0,35) waren bereits bei der Untersuchung sehr viel kleinerer Kollektive gesunder Patienten (Ford et al., 2000; Yin et al., 2002) beobachtet worden. In einer Fall-Kontroll-Studie, die den Zusammenhang verschiedener DNA-Reparaturenzyme mit dem Auftreten von Blasenkarzinomen untersuchte, zeigten sich Frequenzen des selteneren Allels von 0,39 unter den Kontrollen und 0,36 unter den Fällen, ohne dass dieser Unterschied statistisch signifikant war (Matullo et al., 2005).

Es ist bemerkenswert, dass offensichtlich klare ethnische Unterschiede hinsichtlich der Allelfrequenz dieses Polymorphismus in verschiedenen Populationen bestehen. Anders als in der vorliegenden Arbeit und in den oben genannten vergleichbaren Studien, die ausschließlich Kaukasier in die Kollektive einschlossen, untersuchten Yin und Mitarbeiter eine asiatische Population aus Nordost-China und stellten eine deutlich höhere Frequenz der Genvariante fest (0,79) (Yin et al., 2005).

Funktionelle Studien hatten eine Reduktion der mRNA-Transkriptionsrate um 50% bei Zelllinien nachgewiesen, die Träger dieser Genvariante waren. Dies hatte Anlass zu der Überlegung gegeben, dass dieser ungewöhnlich häufig auftretende Polymorphismus möglicherweise Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des DNA-Reparaturenzyms ERCC1 haben und damit ein Zusammenhang zwischen dessen Frequenz und dem Auftreten von Karzinomen bestehen könnte. In einer früheren Genotypisierungsstudie wurde die Variante bereits auf eine mögliche

Assoziation zum Auftreten von Basalzellkarzinomen untersucht. Es war jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang gefunden worden (Yin et al., 2002; Yin et al., 2003).

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass offenbar auch keine Assoziation zwischen dem Auftreten der Genvariante A<sub>19007</sub>G in Exon 4 von ERCC1 und der Erkrankung an Larynxkarzinomen besteht. Auch in Zusammenhang mit weiteren individuellen Faktoren war kein statistisch signifikanter Einfluss auf das Kehlkopfkrebsrisiko nachweisbar. Damit kann – was die Erkrankung an Larynxkarzinomen angeht – der zweite Teil der oben angeführten Hypothese widerlegt werden. Da in dieser Studie keine funktionellen Untersuchungen zur DNA-Reparaturkapazität durchgeführt wurden, kann keine Aussage darüber gemacht werden, inwieweit sich dieser Polymorphismus unabhängig davon auf die Funktionsfähigkeit des DNA-Reparaturenzyms ERCC1 auswirkt.

Die Frequenz des Allels A der Genvariante ERCC1 C<sub>8092</sub>A im Larynxkarzinomkollektiv war in dieser Studie höher (0,24) als im Kontrollkollektiv (0,22) (OR 1,08; 95%-VB [0,79-1,47]; p=0,691). Eine ähnlich hohe Allelfrequenz hatten schon Chen und Mitarbeiter festgestellt (0,27), die zudem für homozygote Träger des Referenztyps (CC) ein erhöhtes Erkrankungsrisiko für Oligoastrozytome nachwiesen (OR 4,4; 95%-VB [1,6-12,2]) (Chen et al., 2000). Dies legte die Vermutung nahe, dass dieser in der 3'-nichttranslatierten Region von ERCC1 liegende Polymorphismus – z.B. durch Beeinflussung der mRNA-Transkriptionsrate – auch zur Entstehung anderer Krebsarten prädisponieren könnte. Diese Hypothese wurde durch eine weitere Studie von Sturgis und Mitarbeitern gestützt, die die Assoziation des Polymorphismus zur Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich untersucht hatten (Sturgis et al., 2002). In deren Kollektiv von 313 Erkrankten waren auch erstmals 59 Larynxkarzinompatienten eingeschlossen. Die Arbeitsgruppe konnte ein grenzwertiges, jedoch nicht statistisch signifikant erhöhtes Risiko für Träger des homozygoten Referenztyps (CC) nachweisen, an Plattenepithelkarzinomen von Kopf oder Hals zu erkranken (OR 1,15; 95%-VB [0,84-1,59]) (Sturgis et al., 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung belegen eindeutig, dass weder Allel A noch Allel C für sich genommen das Kehlkopfkrebsrisiko erhöhen. Der homozygote Referenztyp (CC) trat – anders als bei Chen und Mitarbeitern – sogar seltener unter den Fällen (0,58) als unter den Kontrollen (0,61) auf, ohne dass dieser Unterschied statistisch signifikant war. Auch die beiden anderen Genotypen waren in Larynxkarzinom- und Kontrollkollektiv ähnlich verteilt und sind demnach keine eigenständigen Risikofaktoren für die Entstehung von Larynxkarzinomen.

Möglicherweise liegen die Unterschiede zwischen den Ergebnissen der vorangegangenen Studien zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit in den deutlich geringeren Fallzahlen und der Einbeziehung anderer Tumorlokalisationen begründet. Das Oligoastrozytom stellt eine völlig andere Tumorentität dar und ist nicht mit den beim Larynxkarzinom im Vordergrund stehenden Risikofaktoren Tabak- und Alkoholkonsum assoziiert. In der Studie von Sturgis et al. wurden 313 Patienten mit Tumoren im Kopf- und Halsbereich untersucht, ohne dass eine Subgruppenanalyse erfolgte, die die verschiedenen Tumorlokalisationen und damit die in der Gesamtgruppe enthaltenen 59 Larynxkarzinompatienten separat berücksichtigte (Sturgis et al., 2002). Die Ergebnisse für die Gesamtgruppe sind also nicht auf das Larynxkarzinom übertragbar und damit auch nicht gänzlich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbar.

#### 4.2.3 XPF(ERCC4)

In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig vier bereits identifizierte Polymorphismen in den kodierenden Abschnitten des DNA-Reparaturenzyms XPF(ERCC4) auf Assoziationen zu Larynxkarzinomen untersucht. Die Varianten G<sub>17103</sub>A in Exon 8 und G<sub>30147</sub>A in Exon 11 von XPF(ERCC4) traten in dieser Studie mit Allelfrequenzen von 0,06 bzw. 0,01 im Larynxkarzinomkollektiv und 0,06 bzw. 0,02 im Kontrollkollektiv auf. Diese Frequenzen entsprachen fast gänzlich den Ergebnissen von Smith und Mitarbeitern (Smith et al., 2003b) und in etwa denen von der Arbeitsgruppe um Fan, die allerdings für die Variante G<sub>17103</sub>A eine deutlich höhere Frequenz angab (0,11) (Fan et al., 1999). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die bedeutend kleinere Fallzahl jener Studie. Erst kürzlich hatten Smith und Mitarbeiter die Variante G<sub>17103</sub>A mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko für homozygote Träger der Variante in Verbindung gebracht und Anlass zu der Vermutung gegeben, der Polymorphismus könnte auch mit anderen Krebsarten assoziiert sein.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten jedoch, dass weder G<sub>17103</sub>A noch die Variante G<sub>30147</sub>A in XPF statistisch signifikant mit der Erkrankung an Larynxkarzinomen assoziiert ist. Zwar sind die vorliegende Arbeit und die Studie von Smith und Mitarbeitern in Aufbau, Fallzahl und Population vergleichbar, es wurden jedoch zwei sehr unterschiedliche Tumorentitäten untersucht, bei denen jeweils andere zusätzliche Risikofaktoren im Vordergrund stehen. Hierin könnte der Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen Genotyp und Erkrankungsrisiko liegen.

Die beiden anderen untersuchten Varianten in XPF(ERCC4) (T<sub>26729</sub>C und G<sub>30258</sub>A) traten in unseren Patientenkollektiven nicht auf. Von mehreren Untersuchern beobachtet und in der

SNP-Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* dokumentierte Allelfrequenzen zwischen 0,01 und 0,29 (National Center for Biotechnology Information, 2006a; National Center for Biotechnology Information, 2006b) konnten von uns nicht bestätigt werden. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz könnte in den ethnischen Unterschieden beider Untersuchungskollektive begründet liegen.

#### 4.2.4 XPC

Die Poly-AT-Genvariante in Intron 9 von XPC trat unter den Larynxkarzinompatienten mit einer Frequenz von 0,44 nur geringfügig häufiger auf als unter den Kontrollen (0,43) ( $p=0,946$ ). Ähnliche Genfrequenzen waren bereits bei nichtkrebskranken Patientenkollektiven beobachtet worden (Khan et al., 2000). Auch die Genotypenverteilung des PAT-Polymorphismus war in Larynxkarzinom- und Kontrollkollektiv sehr ähnlich ( $p=0,712$ ).

Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu denen von Shen und Mitarbeitern, die ein signifikant erhöhtes Risiko für die Erkrankung an Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich für Träger des PAT+-Allels unter 287 Patienten festgestellt hatten ( $p=0,007$ ). Sowohl die heterozygoten (PAT+/PAT-) als auch die homozygoten Träger des PAT+-Allels (PAT+/PAT+) hatten signifikant erhöhte Erkrankungsrisiken (ORs 1,44 und 1,85; 95%-VB [1,01-2,05] und [1,12-3,05]). Allerdings ist anzumerken, dass diese Aussage nach der Stratifizierung nach Tumorlokalisationen nur noch für Plattenepithelkarzinome des Pharynx und der Mundhöhle aufrecht erhalten werden konnte, nicht jedoch für die Larynxkarzinome. Dies wurde auf die geringe Fallzahl der Larynxkarzinompatienten ( $n=60$ ) in der Studie zurückgeführt (Shen et al., 2001). Auch mit der Erkrankung an Lungenkrebs – einer weiteren Tabakrauch-assoziierten Krebserkrankung – wurde die Poly-AT-Variante in Verbindung gebracht (Marín et al., 2004). Die Ergebnisse von Shen und Mitarbeitern und Marín und Mitarbeiter gaben u. a. den Anlass dazu, die Häufigkeitsverteilung der Genvariante in dem für die DNA-Reparatur höchst bedeutsamen Enzym XPC an einem erheblich größeren Kollektiv von Larynxkarzinompatienten zu untersuchen.

Durch die vorliegende Genotypisierungsstudie konnte an einem deutlich größeren Patientenkollektiv belegt werden, dass die Poly-AT-Variante in XPC nicht als selbstständiger Risikofaktor für Kehlkopfkrebs gewertet werden kann.

Dieses Ergebnis bestätigt die Ergebnisse von Shen und Mitarbeitern dahingehend, dass auch in deren Untersuchung die Poly-AT-Variante in XPC nicht mit einem erhöhten Malignomrisiko in der Subgruppe der Larynxkarzinompatienten assoziiert war.



Tabelle 40: Allelfrequenzen der untersuchten Polymorphismen in der vorliegenden Arbeit und in Studien anderer Autoren

Genvariante	vorliegende Arbeit	Studien anderer Autoren			
	Allelfrequenz <sup>a</sup> Fälle/Kontrollen	Allelfrequenz	Fallzahl	Patientenkollektiv	Referenz
PCNA C <sub>1661</sub> G/ C <sub>1684</sub> A	<b>0,11/0,13</b>	0,09	177	Kaukasier	(Ma et al., 2000)
ERCC1 A <sub>19007</sub> G	<b>0,35/0,33</b>	0,46	12	Kaukasier	(Shen et al., 1998)
		0,39	80	93% Kaukasier, keine weiteren Angaben	(Ford et al., 2000)
		0,35	107	US-amerik. Kaukasier	(Yin et al., 2002)
		0,50	20	Kaukasier (Psoriasispatienten)	(Yin et al., 2003)
		0,79	<sup>b</sup>	Chinesen	(Yin et al., 2005)
		0,39	317	Kauskasier	(Matullo et al., 2005)
ERCC1 C <sub>8092</sub> A	<b>0,24/0,22</b>	0,04	12	Kaukasier	(Shen et al., 1998)
		0,27	159	Weißer	(Chen et al., 2000)
		0,25	313	Weißer	(Sturgis et al., 2002)
XPF(ERCC4) G <sub>17103</sub> A	<b>0,06/0,06</b>	0,11	32	überwiegend Kaukasier, keine weiteren Angaben	(Fan et al., 1999)
		0,06	36	24 Gesunde, 12 Lungenkrebspatienten	(Mohrenweiser et al., 2002)
		0,06	268	Kaukasierinnen	(Smith et al., 2003b)
		0,08	253	Kaukasierinnen (Brustkrebspatientinnen)	
XPF(ERCC4) A <sub>30147</sub> G	<b>0,01/0,02</b>	0,016	32	überwiegend Kaukasier, keine weiteren Angaben	(Fan et al., 1999)
		0,03	317	Kauskasier (Blasenkarzinompatienten)	(Matullo et al., 2005)
		0,03	317	Kaukasier	
XPC Poly-AT	<b>0,44/0,43</b>	0,44	156	Kaukasier (gutartige dermatolog. Diagnosen)	(Khan et al., 2000)
		0,30	294	weiße US-Amerikaner	(Shen et al., 2001)
		0,28	178	Afroamerikaner	
		0,29	103	Hispanoamerikaner	
		0,35	119	Chinesen	
0,38	102	weiße US-Amerikaner	(Qiao et al., 2002b)		

<sup>a</sup>Zur besseren Vergleichbarkeit wurden Allelfrequenzen auf zwei Dezimalstellen gerundet. <sup>b</sup>Keine Angabe.

### 4.3 Einfluss der Genvarianten auf die Entstehung von Larynxkarzinomen in Zusammenhang mit weiteren individuellen Risikofaktoren

Vor dem Hintergrund der multifaktoriellen Genese von Krebserkrankungen des Larynx wurde der Einfluss der Genvarianten in Zusammenhang mit weiteren individuellen Risikofaktoren der Krebspatienten untersucht. Dabei ergab sich eine Reihe interessanter Befunde.



### 4.3.1 Tabakkonsum

Der Zusammenhang zwischen Menge und Dauer von Tabakkonsum und dem Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, wurde bereits durch viele epidemiologische Studien belegt (Koufman und Burke, 1997; Maier et al., 1992b). Auch in unserem Patientenkollektiv waren 93,9% der Larynxkarzinompatienten Raucher, 63,1% der Erkrankten waren starke oder sehr starke Raucher mit 30-50 bzw. mehr als 50 Packungsjahren.

Gerade jedoch bei den verhältnismäßig wenig rauchenden Larynxkarzinompatienten (<30 PJ) konnte interessanterweise in dieser Studie eine statistisch signifikante Überrepräsentation des Poly-AT-Allels in XPC im Vergleich zu den wenig rauchenden Kontrollen nachgewiesen werden ( $p=0,021$ ). Das Risiko für Raucher mit weniger als 30 Packungsjahren, die Träger mindestens eines PAT+-Allels waren, an Kehlkopfkrebs zu erkranken, war deutlich höher als für diejenigen, die homozygot für den Referenztyp waren (OR 2,91; 95%-VB [1,32-6,46]).

Andere Arbeitsgruppen hatten diese Genvariante bereits mit Lungenkrebs (Marín et al., 2004) und Karzinomen von Kopf und Hals in Verbindung gebracht (Shen et al., 2001). Sowohl Marín und Mitarbeiter als auch Shen und Mitarbeiter konnten in ihren Fall-Kontroll-Studien erhöhte Erkrankungsrisiken unter anderem für diejenigen Träger des PAT+-Allels nachweisen, die das Rauchen bereits aufgegeben, insgesamt also verhältnismäßig wenig Tabak konsumiert hatten, während dies für weiterhin Rauchende nicht der Fall war (Marín et al., 2004; Shen et al., 2001). Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den oben beschriebenen Ergebnissen dieser Studie.

Qiao und Mitarbeiter stellten schon vor einiger Zeit verminderte DNA-Reparaturkapazitäten bei Trägern des PAT+-Allels fest (Qiao et al., 2002a; Qiao et al., 2002b). Eine funktionelle Erklärung hierfür bieten die Untersuchungen von Khan und Mitarbeitern: Die Poly-AT-Insertions/Deletions-Variante steht mit einem SNP in Exon 15 und einem weiteren SNP in Intron 11 von XPC im Kopplungsungleichgewicht (Khan et al., 2002). Letzterer liegt an einer Splice-Akzeptorstelle und führt zu vermehrter Deletion von Exon 12 und in der Folge zur Synthese einer Isoform des Enzyms, die verminderte Reparaturaktivität aufweist. Der von Khan und Mitarbeitern beschriebene Haplotyp war im Rahmen anderer Studien bereits mit verminderten DNA-Reparaturkapazitäten in Verbindung gebracht worden (Qiao et al., 2002a; Qiao et al., 2002b).

Die Ergebnisse dieser Studie, zusammengenommen mit den funktionellen Erklärungen für die herabgesetzte Reparaturaktivität bei Trägern des PAT+-Allels, lassen den Schluss zu, dass die Poly-AT-Variante in Intron 9 von XPC mit erhöhter Sensitivität gegenüber Larynxkarzinomen

gerade bei Wenigrauchern assoziiert ist, während dies für Nichtraucher bzw. starke Raucher nicht der Fall ist. Ein mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass durch die chronische Inhalation von Tabakrauch eine gesteigerte Transkription von DNA-Reparaturenzymen induziert wird und dadurch die DNA-Reparaturkapazität ansteigt (Shen et al., 2003). Unterschiede in der DNA-Reparaturkapazität, bedingt durch verschiedene PAT-Genotypen, könnten dadurch bei stärkeren Rauchern aufgehoben oder sogar ins Gegenteil verkehrt werden (Marín et al., 2004). Dies würde auch erklären, warum in den Gruppen der starken und sehr starken Raucher dieser Studie keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit des PAT<sup>+</sup>-Allels zu beobachten waren. Da auch keiner der anderen untersuchten Polymorphismen in diesen Untergruppen signifikant seltener oder häufiger vorkam, liegt die Vermutung nahe, dass die Erkrankung hier durch übermäßiges Einwirken von Karzinogenen unabhängig von einem Risiko-Genotypen oder protektiven Genotypen entstand.

Eine weitere mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Kehlkopfrisiken bei Nichtrauchern bzw. starken Raucher gegenüber der Gruppe der Wenigraucher könnte in der endlichen Kapazität des jeweiligen Reparaturenzyms liegen. Es ist denkbar, dass bei starken Rauchern die Kapazität des Enzyms durch die Menge auftretender Noxen sowohl bei Vorliegen wie auch bei Nichtvorhandensein der Variante überschritten ist. Die Entstehung eines Larynxkarzinoms wäre dann unabhängig vom Genotyp. Bei Nichtrauchern tritt die Noxe nicht auf und das Reparaturenzym tritt nicht in Aktion, so dass auch hier die Krebsentstehung unabhängig vom Genotyp ist. Nur bei mäßiger Schadstoffexposition bestünde eine Beziehung zwischen Enzymaktivität und Krebsentstehung, da hier das Individuum mit normaler Enzymaktivität die entstandenen DNA-Schäden noch weitgehend reparieren kann, der Träger einer Genvariante, die in einer möglicherweise geringeren Enzymaktivität resultiert, jedoch nicht.

#### 4.3.2 Alkoholkonsum

Alkohol wird nach Tabakrauch als zweitwichtigster exogener Risikofaktor für die Erkrankung an Larynxkarzinomen angesehen. Ethanol führt neben anderen DNA-Schädigungen über die Metabolisierung zu Acetaldehyd zur Bildung von 1,N<sup>2</sup>-Propano-2'-Deoxyguanosin-Addukten (1,N<sup>2</sup>-PdG) (Brooks und Theruvathu, 2005). Die Beseitigung dieser DNA-Addukte erfolgt unter anderem mithilfe des NER-Reparatursystems. Die in dieser Studie untersuchten DNA-Reparaturenzym polymorphismen könnten demnach Einfluss auf die Reparatur dieser alkoholinduzierten DNA-Schäden nehmen und damit das Kehlkopfkrebsrisiko bei gleichzeitig vorhandenem Alkoholkonsum modulieren.

In der Gruppe der Larynxkarzinompatienten waren in dieser Untersuchung deutlich mehr Alkoholkonsumenten als unter den Kontrollen und auch der Anteil derer, die starken Alkoholkonsum angaben, war wesentlich höher. Die in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum aufgestellten Vergleiche zwischen Fall- und Kontrollgruppe sind in dieser Studie jedoch vor dem Hintergrund zu sehen, daß wegen zum Teil unvollständiger Dokumentation des Alkoholkonsums in der Kontrollgruppe nicht alle Patienten in diesen Teil der Untersuchung miteinbezogen werden konnten und die Anzahl der Kontrollpatienten hier dementsprechend klein ist.

Es zeigte sich schon bei dem Vergleich von Krebskranken und Kontrollen in der Gruppe aller Alkoholkonsumenten, dass die Allelfrequenz der Variante in Intron 9 von XPC (PAT+-Allel) unter den Kehlkopfkrebspatienten wesentlich höher war (0,44) als unter den Kontrollen (0,26;  $p=0,05$ ). Bei genauerer Betrachtung der Trinkgewohnheiten wurde deutlich, dass sich dieser Unterschied interessanterweise besonders in der Gruppe bestätigte, die angab, nur gelegentlich bzw. wenig Alkohol zu konsumieren (Gruppe I): In diesem Kollektiv waren die Träger mindestens eines PAT+-Allels unter den Krebspatienten signifikant überrepräsentiert ( $p=0,006$ ).

Ein anderes Ergebnis ergab sich für die Gruppe all derer, die mäßigen bis sehr starken Alkoholkonsum angaben (Gruppen II und III): Hier unterschied sich die Genotypenverteilung der Poly-AT-Variante in beiden Gruppen nicht signifikant und die Allelfrequenz des PAT+-Allels war unter den Larynxkarzinompatienten sogar etwas niedriger (0,41) als unter den Kontrollen (0,43). Auch in der Gruppe aller Nichttrinker war die Genotypenverteilung in Fall- und Kontrollgruppe sehr ähnlich.

Nach den Ergebnissen dieser Studie erhöht sich also das Kehlkopfkrebsrisiko gerade für diejenigen Träger des PAT+-Allels, die zusätzlich gelegentlich oder nur in geringem Maße Alkohol konsumieren, während Alkoholabstinenz oder mäßiger bis starker Alkoholkonsum das Erkrankungsrisiko bei Trägern der Poly-AT-Variante in XPC nicht zu verändern scheint. Diese Ergebnisse sind zwar statistisch signifikant, bei jedoch sehr kleinen Fallzahlen in dieser Untergruppe sollten sie in weiteren Studien an größeren Kollektiven überprüft werden.

Diese Aussage steht keinesfalls im Widerspruch zu der allgemein anerkannten Tatsache, dass Alkoholkonsum in dosisabhängiger Weise das relative Erkrankungsrisiko steigert (Altieri et al., 2005) und einen der beiden Hauptrisikofaktoren für die Erkrankung an Kehlkopfkrebs darstellt. Im Gegenteil wird deutlich, dass – ähnlich wie bei den starken und sehr starken Rauchern (siehe Abschnitt 4.3.1) – in der Gruppe der mäßigen bis sehr starken Alkoholkonsumenten die Erkrankung unabhängig von den hier untersuchten Genvarianten entsteht.

Wie bei den starken Rauchern könnte auch hier die Kapazität des jeweiligen Reparaturenzyms durch übermäßig einwirkende Noxen in der Gruppe der Patienten, die in hohem Maße Alkohol konsumieren, überschritten sein, unabhängig davon, ob die Genvariante vorliegt oder nicht. Dann wäre auch hier die Krebsentstehung unabhängig vom Genotyp. Ebenso wenig wirkte sich der Genotyp bei den alkoholabstinenten Patienten auf die Entstehung eines Larynxkarzinoms aus, da hier das Reparaturenzym nicht in Aktion träte. Analog zu den Ergebnissen bei den mäßigen Rauchern bestünde dann auch hier nur bei mäßigem Alkoholkonsum ein Zusammenhang zwischen Genotyp und Krebsentstehung, weil Individuen mit normaler Reparaturkapazität entstehende DNA-Schäden noch reparieren könnten, die Träger einer Genvariante jedoch möglicherweise nicht.

#### 4.3.3 Geschlecht

In Übereinstimmung mit anderen Fall-Kontroll-Studien (Ramroth et al., 2004; Varzim et al., 2003) und epidemiologischen Daten zum Larynxkarzinom (Koufman und Burke, 1997; Licitra et al., 2003) überwog auch in dieser Studie der Anteil der Männer unter den Kehlkopfkrebspatienten deutlich den der Frauen. Nur 25 (8,5%) der 295 Kehlkopfkrebspatienten waren weiblichen Geschlechts. Mögliche Ursachen für diese Ungleichverteilung könnten durch unterschiedliches Verhalten bei Tabak- und Alkoholkonsum bedingt sein oder in unterschiedlicher beruflicher Schadstoffbelastung begründet liegen.

Hinsichtlich der untersuchten Genvarianten waren unter den Männern die Häufigkeitsverteilungen bei Kehlkopfkrebspatienten und Kontrollen sehr ähnlich. Auch in der Gruppe der Frauen waren die Unterschiede zwischen Karzinompatientinnen und Kontrollen unwesentlich. Weder bei Frauen noch bei Männern wird demnach das geschlechtsspezifisch primär unterschiedliche Erkrankungsrisiko (siehe Abschnitt 1.1) zusätzlich durch eine der untersuchten Genvarianten moduliert.

#### 4.3.4 Alter

Die meisten Larynxkarzinompatienten erkranken um das 63. Lebensjahr herum. Nur sehr selten wird Kehlkopfkrebs bei Patienten diagnostiziert, die jünger als 45 Jahre alt sind (siehe Abschnitt 1.1). Dies warf die Frage auf, ob Patienten, die bereits früh erkranken, eine besondere genetische Disposition gegenüber Larynxkarzinomen haben könnten und sich das Risiko, an Kehlkopfkrebs zu erkranken, für Träger der untersuchten DNA-Reparaturenzym polymorphismen in verschiedenen Altersklassen unterscheidet. Hinweise hierauf gaben bereits Fall-Kontroll-Studien, die eine signifikant erhöhte Bleomycin- und Benz[*a*]pyren-induzierte

Mutagensensitivität (Schantz et al., 1989; Wu et al., 1998) und verminderte DNA-Reparaturkapazitäten (Cheng et al., 1998) bei Larynxkarzinompatienten besonders jüngeren Alters festgestellt hatten.

In der Gruppe der Patienten und Kontrollen, die jünger als 45 Jahre alt waren, zeigten sich jedoch nur geringfügige Unterschiede in der Häufigkeit der untersuchten Polymorphismen. Die Polymorphismen in Intron 1 von PCNA traten zwar häufiger unter den Kontrollpatienten als unter den Fällen auf, dieser Unterschied konnte jedoch nur als Trend gewertet werden und war nicht statistisch signifikant ( $p=0,06$ ). Die Vermutung, dass eine der untersuchten Genvarianten für das Auftreten von Larynxkarzinomen besonders im jüngeren Alter mitverantwortlich sein könnte, wurde durch diese Studie nicht bestätigt. Auch in den Gruppen der Patienten mittleren (>45-65 Jahre) bzw. höheren Alters (>65 Jahre) wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollgruppe festgestellt.

#### 4.3.5 Berufliche Schadstoffexposition

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass die berufliche Exposition gegenüber bestimmten Schadstoffen zur Erkrankung an Larynxkarzinomen führen kann. Insbesondere Tischler, Schlosser, Werkzeugmacher, Drucker, Hütten-, Gießerei- und Chemiarbeiter und in besonderem Maße Bauarbeiter haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko (Maier et al., 1992c; Maier und Tisch, 1997; Maier et al., 1999). Zu den Stoffen, die nachweislich in dosis- und zeitabhängiger Weise das Kehlkopfkrebsrisiko steigern, gehören unter anderem Zement-, Fichtenholz-, Asbest- und verschiedene Metallstäube sowie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Lacke und Farben, Dieseldämpfe und Senfgas (Maier und Tisch, 1997).

In der vorliegenden Studie waren 38,3% der Larynxkarzinompatienten beruflich Schadstoffen ausgesetzt. Keine der hier untersuchten Genvarianten trat jedoch signifikant häufiger oder seltener bei den schadstoffexponierten Kehlkopfkrebspatienten auf als bei denen, die keine Schadstoffbelastung aufwiesen. Es scheint, dass die DNA-Reparaturenzymvarianten das durch die Schadstoffbelastung primär schon erhöhte Kehlkopfkrebsrisiko (Maier et al., 2002) nicht zusätzlich beeinflussen. Allerdings ist anzumerken, dass keine gesonderte Aufschlüsselung nach unterschiedlichen Schadstoffen erfolgte und auch eine eventuell vorhandene außerberufliche Exposition nicht berücksichtigt wurde.

#### 4.3.6 Tumorlokalisation

Wie erwartet traten im Patientenkollektiv die glottischen Karzinome mit einem Anteil von 67,5% am häufigsten auf, gefolgt von den supra-/epiglottischen (23,7%) und den subglottischen Karzinomen (1,7%). Bei 7,1% der Patienten waren mehrere Ebenen befallen. Bei der Gewichtung verschiedener ätiologischer Faktoren muss zwischen den unterschiedlichen anatomischen Lokalisationen des Larynxkarzinoms unterschieden werden. So dominiert z.B. Tabakrauch als Risikofaktor für die Erkrankung an glottischen Larynxkarzinomen, während Alkohol bedeutsamer für supraglottische Karzinome ist (Licitra et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit waren bei den subglottischen Karzinomen die Genvarianten C<sub>1661</sub>G und C<sub>1684</sub>A in PCNA, A<sub>30147</sub>G in XPF und Poly-AT in XPC im Vergleich zu den übrigen Larynxkarzinomen signifikant überrepräsentiert. Es wäre demnach denkbar, dass diese Polymorphismen gerade bei der Entstehung von subglottischen Karzinomen eine Rolle spielen könnten. Diese Vermutung wäre an einem größeren Kollektiv von Patienten mit subglottischen Larynxkarzinomen zu überprüfen.

In der Gruppe der glottischen Karzinome waren deutlich mehr Heterozygote für die beiden Varianten PCNA C<sub>1661</sub>G und C<sub>1684</sub>A als in der Gruppe der übrigen Larynxkarzinome. Auf der anderen Seite waren unter den Patienten mit glottischen Karzinomen wesentlich weniger für die Varianten Homozygote als bei den anderen Kehlkopfkrebspatienten, während sich die Allelfrequenzen nur unbedeutend unterschieden. Man kann deshalb nicht von einer eindeutigen Über- oder Unterrepräsentation der beiden PCNA-Varianten in der Gruppe der glottischen Karzinome sprechen und es bedarf der Überprüfung in größeren Unterkollektiven.

Bei der bevorzugten Entstehung von supraglottischen Larynxkarzinomen bzw. mehrere Ebenen betreffenden Karzinomen scheinen die hier untersuchten Genvarianten keine Rolle zu spielen.

#### 4.3.7 Tumorstadium

47,8% der Larynxkarzinome waren bei Diagnosestellung schon weit fortgeschritten (UICC-Stadien III und IV). Keine der untersuchten Genvarianten war jedoch im Unterkollektiv der weit fortgeschrittenen Kehlkopftumoren signifikant über- oder unterrepräsentiert. Dasselbe galt für die weniger fortgeschrittenen Larynxkarzinome.

Die Hypothese, die untersuchten Polymorphismen könnten das Tumorstadium und damit im weitesten Sinne die Ausbreitungstendenz der Larynxkarzinome beeinflussen, kann durch die vorliegende Studie nicht untermauert werden.

#### 4.4 Haplotypanalyse

Haplotypen sind Kombinationen von Allelen innerhalb von bestimmten Abschnitten eines Chromosomenstranges. Um bei Assoziationsanalysen, bei denen viele SNPs untersucht werden, zusätzlich mögliche Assoziationen von Kombinationen dieser SNPs mit Erkrankungen untersuchen zu können, wird mehr und mehr das Augenmerk auf Haplotypen gelegt (Heid et al., 2005). Da bei den in dieser Arbeit angewandten Genotypisierungsmethoden nicht unterschieden werden konnte, welches Allel des jeweils untersuchten SNPs auf welchem der beiden Chromosomen lag, konnten auch bei der Untersuchung mehrerer auf einem Chromosom liegenden SNPs keine Rückschlüsse auf die Kombination der aufeinander folgenden Allele auf einem Chromosomenstrang gezogen werden. Um mögliche Haplotypen zu identifizieren, die sich aus der Kombination der Allele mehrerer SNPs ergaben, musste man sich deshalb mathematischer Modelle bedienen (siehe Abschnitt 2.3).

Die Haplotypen, die sich aus der Haplotypenanalyse für die SNPs in ERCC1 und XPF ergaben, waren in Fall- und Kontrollkollektiv sehr ähnlich verteilt. Offenbar nehmen die hier untersuchten Kombinationen von Polymorphismen in ERCC1 und XPF keinen Einfluss auf die Entstehung von Larynxkarzinomen. Da die hier untersuchten Haplotypen von SNPs in ERCC1 und XPF in dieser Kombination bisher keine Erwähnung in der Literatur fanden, ist ein Vergleich mit bereits vorhandenen Daten zur Zeit noch nicht möglich.

#### 4.5 Erbliche Polymorphismen in DNA-Reparaturenzymen in Zusammenhang mit variabler DNA-Reparaturkapazität

Bei der Untersuchung von genetischen Polymorphismen in DNA-Reparaturenzymen stellt sich immer wieder die Frage, inwieweit sich diese – meist punktuellen – Veränderungen der Gensequenz auf die Funktionsfähigkeit des entsprechenden Proteins oder einer ganzen Enzymkaskade auswirken und welche biologischen Folgen sich daraus für den Gesamtorganismus ergeben.

Das detaillierte Verständnis der funktionellen Zusammenhänge zwischen genotypischer Variabilität von DNA-Reparaturenzymen, phänotypisch unterschiedlicher DNA-Reparaturkapazität und individuell gesteigerter Empfindlichkeit gegenüber Krebserkrankungen stellt eine große Herausforderung für zukünftige Forschung auf diesem Gebiet dar. Genotypisierungsstudien, die – wie die vorliegende Arbeit – Assoziationen zwischen Genvariationen in DNA-Reparaturenzymen und einzelnen Tumorentitäten untersuchen, bilden erste wichtige Schritte auf diesem Weg.



Bei der Entstehung von Larynxkarzinomen handelt es sich – wie bei anderen Krebsarten auch – um ein multifaktorielles Geschehen. Zahlreiche bereits bekannte exogene Risikofaktoren spielen bei der Karzinogenese eine Rolle und erhöhen das Erkrankungsrisiko bei gleichzeitigem Auftreten zum Teil überadditiv. Auch das endogene Risiko, also die genetische Prädisposition, setzt sich aus einer Vielzahl von verschiedenen genetischen Risikofaktoren zusammen und nimmt schließlich im Zusammenspiel mit den exogenen Risikofaktoren Einfluß auf die Entstehung von Kehlkopfkrebs. Die Identifizierung dieser einzelnen genetischen Risikofaktoren ist Ziel zahlreicher Assoziationsstudien. Bei der Durchführung und Auswertung dieser Studien sind einige grundsätzliche Probleme wie ethnische Unterschiede, unzureichende Fallzahlen, noch nicht identifizierte Störfaktoren oder unentdeckte genetische Verknüpfungen zu berücksichtigen, die die Verwertbarkeit und Aussagekraft der Ergebnisse teilweise einschränken. Es bedarf also einer ganzen Anzahl sorgfältig geplanter Assoziationsstudien, um die Komplexität des genetischen Risikos besser zu verstehen.

Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte vielleicht ein kleiner Beitrag zur Erforschung des genetischen Risikos für die Erkrankung an Larynxkarzinomen geleistet werden. Einschränkend ist jedoch zu bemerken, dass die wesentlichen Aussagen dieser Studie aus der Subgruppenanalyse entstanden, die – besonders im Falle der Gruppe, die nur wenig Alkohol konsumierte – auf relativ kleinen Fallzahlen in den jeweiligen Subgruppen basierte. Dies lag unter anderem an fehlenden oder ungenauen Angaben zum Alkoholkonsumverhalten in der Kontrollgruppe. Eine Untermauerung der hier gemachten Aussagen durch weitere Studien mit größeren Fallzahlen auch in den entsprechenden Subgruppen wäre wünschenswert.

Bei im Vergleich zu bisherigen Untersuchungen akzeptabler Größe der Patientengruppe erscheint zum anderen die deutlich geringere Anzahl der Kontrollpatienten kritikwürdig. Auch die abweichende Altersstruktur und der insgesamt mäßigere Tabak- und Alkoholkonsum der Kontrollgruppe könnten Störfaktoren dargestellt haben. Diese ergaben sich aus der Schwierigkeit, Patienten zu finden, die bereits ähnlich viel Tabak und Alkohol konsumiert hatten wie die Larynxkarzinompatienten. Eine Bestätigung durch weitere Studien mit entsprechend größeren – nach Geschlecht, Alter, Alkohol- und Tabakkonsum gematchten – Kollektiven oder einer großen Bevölkerungsstichprobe als Kontrollgruppe wäre sinnvoll.

Ausblickend auf die Zukunft bleibt zu hoffen, dass dem kleinen Beitrag zur Identifikation genetischer Risikofaktoren, der durch die vorliegende Arbeit geleistet werden konnte, noch viele weitere Beiträge folgen werden. Möglicherweise werden diese es künftig erlauben, individuelle Risikoprofile bezüglich verschiedener Krebserkrankungen zu erstellen.