

Aus dem
Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Polymorphismen der DNA-Reparaturenzyme XRCC1 und XPD als Risikofaktoren für das Larynxkarzinom

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Ute Diemut Johanna Rexroth
aus Marburg

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. I. Roots
2. Prof. Dr. rer. nat. R. Schäfer
3. Prof. Dr. med. J. Brockmöller

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Larynxkarzinom	1
1.2	Genetische Variabilität und Krebsentstehung	3
1.3	Basen-Exzisionsreparatur	6
1.4	Nucleotid-Exzisionsreparatur	13
1.5	Wissenschaftliche Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Ein-/Ausschlusskriterien und Einteilung der Kollektive	19
2.2	DNA-Analyse	22
2.3	Statistische Auswertung	31
3	Ergebnisse	34
3.1	Demographischer Vergleich der Kollektive	34
3.2	Unterteilung der Patientengruppe	35
3.3	Analyse der Häufigkeitsverteilungen	36
4	Diskussion	50
4.1	Diskussion der Ergebnisse für XRCC1	50
4.2	Diskussion der Ergebnisse für XPD	59
4.3	Gen-Kombinationen	64
5	Zusammenfassung	68

Tabellenverzeichnis

1.1	Varianten des XRCC1-Gens	11
1.2	Häufige Polymorphismen von XRCC1	11
1.3	Varianten des XPD-Gens	16
1.4	Häufige Polymorphismen von XPD	16
2.1	UICC-Stadieneinteilung des Larynxkarzinoms	20
2.2	WHO-Klassifikation Larynxkarzinome	21
2.3	XRCC1 Polymorphismen Methodenüberblick	32
2.4	XPD Polymorphismen Methodenüberblick	33
3.1	Demographische Eigenschaften des Untersuchungskollektivs	34
3.2	Genotypenhäufigkeiten der XRCC1-Polymorphismen	36
3.3	Häufigkeiten der XRCC1-SNPs, dominantes und rezessives Modell	37
3.4	XRCC1-Varianten stratifiziert nach Alter	38
3.5	XRCC1-Varianten stratifiziert nach Geschlecht	38
3.6	XRCC1-Varianten stratifiziert nach Nikotinkonsum	39
3.7	XRCC1-Varianten stratifiziert nach Alkoholkonsum	40
3.8	Genotypenhäufigkeiten der XPD-Polymorphismen	41
3.9	Häufigkeiten der XPD-SNPs, dominantes und rezessives Modell	42
3.10	XPD-Varianten stratifiziert nach Geschlecht	42
3.11	XPD-Varianten stratifiziert nach Alter	43
3.12	XPD-Varianten stratifiziert nach Nikotinkonsum	44
3.13	XPD-Varianten stratifiziert nach Alkoholkonsum	44
3.14	Genotypen und Tumorlokalisation	45
3.15	Genotypen und Tumorstaging	46
3.16	Genotypen und Schadstoffexposition	47
3.17	Haplotypenanalyse XRCC1	48
3.18	Haplotypenanalyse XPD	49
4.1	Allelfrequenzen der XRCC1-SNPs	51
4.2	Allelfrequenzen der XPD-SNPs	60

Abbildungsverzeichnis

1.1	Inzidenz des Larynxkarzinoms	2
1.2	DNA-Schäden und Reparatur	5
1.3	Basenexzisionsreparatur	8
1.4	XRCC1 Gen- und Proteinstruktur	9
1.5	Nukleotid-Exzisionsreparatur	14
1.6	XPD Gen- und Proteinstruktur	15
2.1	XRCC1 194-RFLP	25
2.2	XRCC1 280-RFLP	26
2.3	XRCC1 399-RFLP	28
2.4	XPD 199/312-Doppel-RFLP	29
2.5	XPD 751-RFLP	31

1 Einleitung

Das Larynxkarzinom ist mit etwa 2% aller bösartigen Neubildungen in Mitteleuropa eine relativ seltene Tumorerkrankung. Sie führt allerdings in Deutschland zu etwa 1000 Todesfällen pro Jahr. Hauptursache für seine Entstehung sind Tabak- und Alkoholkonsum. Da nur ein Teil der Raucher Karzinome entwickelt, sind neben der krebserzeugenden Wirkung von Fremdstoffen noch andere, individuelle Faktoren von Bedeutung, die zur malignen Entartung von Zellen führen. Eine dieser Variablen können genetische Polymorphismen sein, die in Kombination mit Tabak- oder Alkoholexposition oder auch in Kombination untereinander die Krebsentstehung begünstigen. Die Identifizierung solcher Polymorphismen könnte eine gezielte Prävention bei genetisch besonders gefährdeten Personen ermöglichen.

Neben Enzymen der Biotransformation und der Zellzykluskontrolle hat insbesondere die Effizienz der DNA-Reparatur Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit der Krebsentstehung. Nucleotid- und Basenexzisionsreparatur sind Teilsysteme der DNA-Reparatur, die durch chemische Karzinogene bedingte Schäden beseitigen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Bedeutung von Polymorphismen wichtiger Strukturabschnitte der DNA-Reparaturenzyme XRCC1 und XPD in einer Krankenhaus basierten Fall-Kontroll-Studie an Larynxkarzinompatienten.

1.1 Das Larynxkarzinom

Das Larynxkarzinom ist eine bösartige Tumorerkrankung, die hauptsächlich Männer in höherem Alter betrifft. Mit 2-2,5% aller bösartigen Neubildungen ist es zwar in Mitteleuropa insgesamt relativ selten, stellt aber immerhin 40-50% aller malignen Tumoren in Kopf-Hals-Bereich (Kaanders, 1997). Im Durchschnitt erkranken in Deutschland jährlich 8 pro 100.000 Männer bzw. 1,5 pro 100.000 Frauen. Der Altersgipfel liegt zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Nach ihrem Entstehungsort wird zwischen supraglottischen (33%), glottischen (65%) und subglottischen (2%) Karzinomen unterschieden. Abbildung 1.1 zeigt die Inzidenz des Larynxkarzinoms auf Basis des Krebsregisters Saarland.

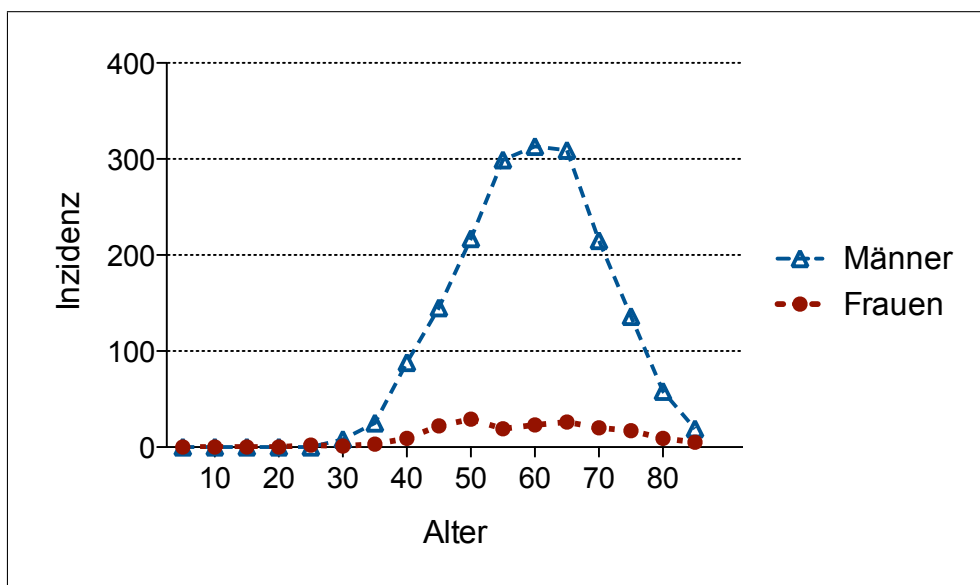


Abbildung 1.1: Inzidenz des Larynxkarzinoms laut Saarlandkrebsregister

In der Literatur werden sowohl exogene als auch endogene Faktoren diskutiert, die Einfluss auf die Entstehung des Larynxkarzinoms haben (Almadori *et al.*, 2004). Hierbei weist das Rauchen von Zigaretten und Zigarren das größte Risikopotential auf (Cattaruzza *et al.*, 1996; Guo *et al.*, 1995; Maier & Tisch, 1997; Pelucchi *et al.*, 2008).

50-80% der Patienten sind starke Raucher (> 60 Packungsjahre). Das relative Risiko steigt dadurch bis auf das 23,4-fache (Maier *et al.*, 1992). Es nimmt nach Beendigung der Exposition wieder ab und erreicht nach ca. 10jähriger Abstinenz das Niveau von Nichtrauchern (Shapiro *et al.*, 2000). Nichtraucher erkranken nicht nur seltener als Raucher, sie sind auch durchschnittlich bei Diagnosestellung 10 Jahre älter und haben aufgrund der zumeist glottischen Lokalisation eine bessere Prognose (Agudelo *et al.*, 1997).

Alkohol ist ebenfalls ein unabhängiger Risikofaktor. Bei nicht rauchenden Alkoholkernern ist das Risiko, an Karzinomen von Mund, Pharynx und Supraglottis zu erkranken, 9,2 mal höher als bei nicht rauchenden Nicht-Trinkern (Schlecht *et al.*, 1999). Der Epilarynx, der mit Speise und Getränken in Kontakt kommt, wird durch Alkohol stärker geschädigt als der Endolarynx (Esteve *et al.*, 1996). Weitere Noxen sind Asbest, organische und anorganische Lösungsmittel, Nickelverbindungen und Chromate. In Frankreich konnte eine 4-fach höhere Inzidenz von Larynxkarzinomen gezeigt werden, wenn die Patienten beruflich Formaldehyd ausgesetzt waren (Laforest *et al.*, 2000). Eine umfang-

reiche Studie zeigte auch in der Türkei für Arbeiter in schadstoffbelasteten Berufen ein besonders hohes Risiko, an supraglottischen Larynxkarzinomen zu erkranken (Elci *et al.*, 2001). Ob eine Reduktion des durch Rauch- und Trinkverhalten entstandenen Risikos durch Verzehr von Gemüse und Früchten, bzw. die Einnahme von Vitaminpräparaten, erzielt werden kann, ist umstritten (De Stefani *et al.*, 2000; Esteve *et al.*, 1996; Riboli *et al.*, 1996). Insgesamt erhöht eine niedrige sozio-ökonomische Stellung verbunden mit schlechter Schul- und Berufsausbildung das Risiko (Maier & Tisch, 1997). Dies ist wahrscheinlich auf eine Parallelität zu beruflicher Schadstoffexposition in schlechter bezahlten Berufen und vitaminarmer Kost, Alkohol- und Tabakkonsum zurückzuführen. Darauf deutet auch das vermehrte Auftreten von Fällen in den ärmeren Ländern Zentraleuropas hin (Bray *et al.*, 2000).

Neben den äußeren Einflüssen spielen auch endogene Faktoren eine Rolle. Frauen erkranken erst in einem höheren Alter. Ihre Erkrankungswahrscheinlichkeit beträgt nur 20% der der Männer. Doch die Anzahl der Patientinnen ist steigend. Ursächlich kann der zunehmende Zigarettenkonsum der weiblichen Bevölkerung sein. Während männliche Patienten häufiger an glottischen Larynxkarzinomen erkranken, entwickeln Frauen eher supraglottische Karzinome. Die Geschlechter unterscheiden sich auch in Komorbidität, Symptomschwere und TNM-Status bei der Erstdiagnose (Kokoska *et al.*, 1995). Ein weiterer Hinweis auf die Relevanz der genetischen Suszeptibilität ist die Tatsache, dass unabhängig vom Geschlecht Afrikaner ein 1,4mal größeres Risiko als Kaukasier haben, am Larynxkarzinom zu erkranken (Kaanders, 1997).

1.2 Genetische Variabilität und Krebsentstehung

Viele Krebspatienten waren Noxen exponiert, aber nicht alle Exponierten entwickeln Karzinome. Diese individuellen Unterschiede deuten auf eine Beteiligung des eigenen Körpers hin, d.h. auf eine unterschiedliche genetische Suszeptibilität. Erbliche Mutationen in speziellen Genen führen zu einem exzessiven Anstieg der Krebsmorbidity in den betroffenen Familien. Solche Mutationen sind aber nur für einen sehr kleinen Anteil der Krebserkrankungen verantwortlich. Die meisten Karzinome entstehen ohne direkt erkennbaren genetischen Zusammenhang. Auch in der gesunden Bevölkerung kommen Variationen von Genen vor, am häufigsten sind Einzelnukleotidpolymorphismen (Single Nucleotide Polymorphisms, SNP). Sie führen meist nicht zu einem kompletten Funktionsverlust, können aber eine Funktionsänderung des Proteins bewirken und so das

individuelle Krebsrisiko modifizieren. An der Krebsentstehung können SNPs in Enzymen unterschiedlicher Stoffwechselwege beteiligt sein (Brockmoller *et al.*, 2000; Hiyama *et al.*, 2008). Darunter fallen Enzyme des Fremdstoffmetabolismus, die Noxen giften oder entgiften (Wiencke, 2002). Es konnte bereits eine Assoziation zwischen langsamem Acetyliererstatus (NAT2*5B) und Blasenkrebs bei starken Rauchern und ein Zusammenhang zwischen Glutathion-S-Transferase-M1 (GSTM1)-Defizienz bei Nichtrauchern und Blasenkrebs nachgewiesen werden (Brockmoller *et al.*, 1996).

1.2.1 Chemische Karzinogenese

Die Krebsentstehung selbst ist ein mehrstufiger Prozess, der beim Menschen viele Jahre bis Jahrzehnte dauern kann. Am Anfang steht die Initiation, unter der man die Umwandlung einer normalen Zelle in einen prägmalignen Zustand versteht. Ursache ist eine Mutation der DNA, ausgelöst durch Schäden, die durch chemische, physikalische oder biologische Kanzerogene verursacht wurden. Die Initiation ist nicht reversibel, es wird aber eine unkontrollierte Vermehrung der Zelle durch den Zellverband verhindert. Diese Regulation geht in der Promotion verloren. Die Zelle beginnt sich klonal zu vermehren. Es entsteht ein gutartiges Gebilde, beispielsweise ein Polyp. Im weiteren Verlauf der Krebsentstehung geht auch der gutartige Charakter durch Progression verloren. Der Differenzierungsgrad der Zelle nimmt ab, es treten invasives Wachstum und Metastasierung auf (Marquardt, 1994).

Initiation, Promotion und Progression können durch chemische Karzinogene bewirkt werden. Chemische Karzinogene sind exogenen Ursprungs oder entstehen endogen im Zellstoffwechsel. Tabak ist der zentrale exogene Faktor bei der Entstehung von Karzinomen der Lunge und des Kopf-Hals-Bereichs. In mindestens elf Organen kann Krebs durch Rauchen ausgelöst werden. Kein anderes Karzinogen wirkt auf so viele Organsysteme. In Zigarettenrauch wurden ca. 4000 verschiedene chemische Substanzen nachgewiesen. Zu ihnen zählen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine und aromatische Amine. Diese Stoffe verursachen an der DNA u.a. Einzel- und Doppelstrangbrüche und gehen durch Bildung von Addukten Verbindungen mit der DNA ein (DeMarini, 2004).

Verschiedene Enzyme, die bei der Verstoffwechslung von Noxen eine Rolle spielen, wurden bereits bezüglich der Häufigkeit genetischer Varianten in Larynxkarzinom-Patientenkollektiven untersucht. Ein Polymorphismus in Cytochrom P450 1A1 wurde

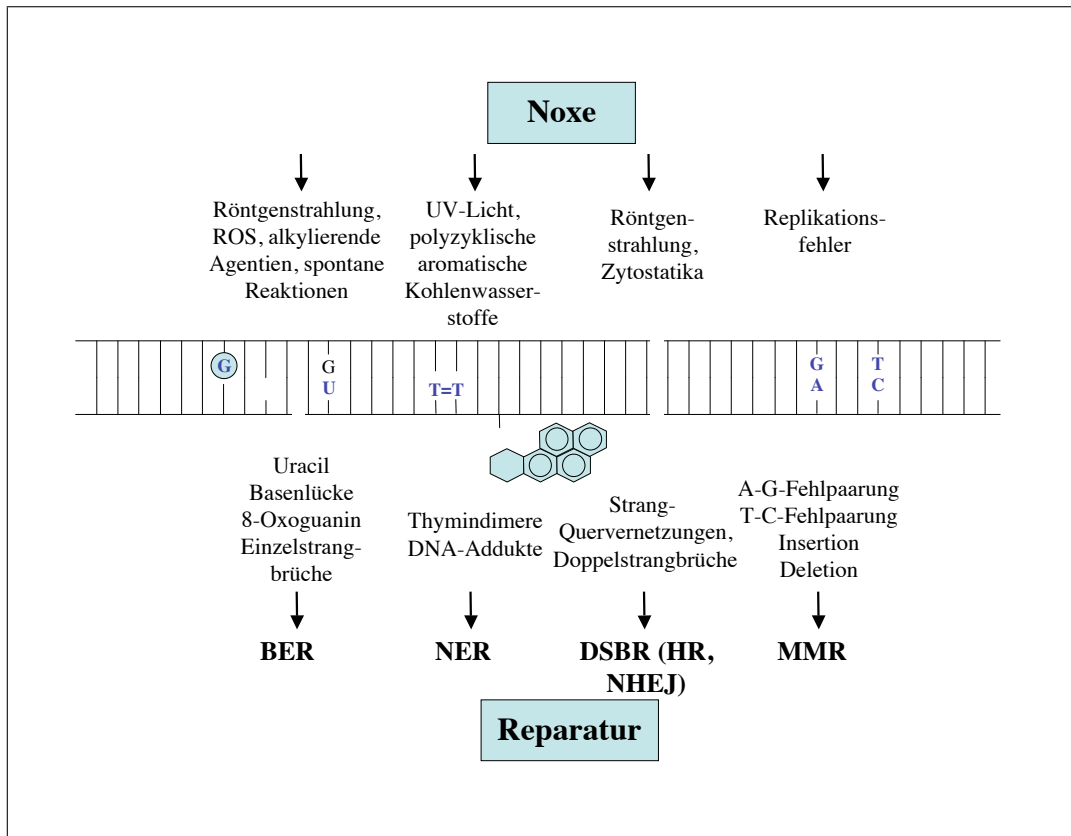


Abbildung 1.2: DNA-Schäden und Reparatur

Exogene und endogene Noxen wie Strahlung, chemische Substanzen oder Replikationsfehler führen zu Veränderungen (z.B. Basenfehlpaarung, Thymidindimere, Strangbrüche, DNA-Addukte) an der DNA. Hauptreparaturmechanismen sind Basenexzisionsreparatur (BER), Nukleotidexzisionsreparatur (NER), Doppelstrangbruchreparatur (DSBR), bestehend aus homologer Rekombination und nichthomologer Endverbindung (HR/NHEJ), und Mismatchreparatur (MMR) (Hoeijmakers, 2001).

als von Rauch- und Trinkgewohnheiten unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung eines Larynxkarzinoms identifiziert (Park *et al.*, 1997; Varzim *et al.*, 2003). Die Expression von Cytochrom P450 2C9 und Cytochrom P450 2C10 unterliegt interindividuellen Variationen um den Faktor 10. Sie aktivieren den polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoff Benzo(a)pyren zu 9-Hydroxy BP, welches Addukte mit der DNA bildet. Diese sind in Geweben von Rauchern signifikant erhöht (Badawi *et al.*, 1996). GST (Glutathion-S-Transferase) und UGT 1A7 (UDP-Glucuronyltransferase) entgiften u.a. einige Schadstoffe des Zigarettenrauches. Untersuchungen haben gezeigt, dass orolaryngeale Karzinome 3,7mal häufiger bei Patienten auftreten, die eine weniger aktive Variante des Enzyms UGT 1A7 tragen (Zheng *et al.*, 2001). Auch bei Koreanern, die defizienzcodierende GSTM1- und T1-Varianten tragen, konnte eine signifikante Erhöhung des Risikos, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, festgestellt werden (Hong *et al.*, 2000). Das Enzym NAT2 (Arylamin-N-Acetyltransferase) entgiftet aromatische Amine. Henning *et al.* konnten zeigen, dass der NAT2*4/*4-Haplotyp mit einem signifikant erhöhten Risiko für Larynxkarzinome behaftet ist (Henning *et al.*, 1999).

Zur Beseitigung von DNA-Schäden stehen der Zelle mehrere Reparatursysteme zur Verfügung. Die wichtigsten Reaktionswege sind: 1.) Nucleotid-Exzisionsreparatur (NER), 2.) Basen-Exzisions-Reparatur (BER), 3.) Doppelstrangbruch-Reparatur (DSBR) und 4.) Mismatch-Repair (MMR) (Hoeijmakers 2001) (Abbildung 1.2). Zur DSBR gehören die homologe Rekombination (HR) und nicht-homologe Endverbindung (NHEJ). Werden Schäden nicht repariert, können Zellzyklusunterbrechungen mit Transkriptions- und Replikationsstop, Apoptose oder Krebsentstehung durch Mutationen die Folge sein. Da die DNA-Reparatur Schäden, die an der DNA entstanden sind, rückgängig machen kann, bevor es zur Initiation kommt, stehen Polymorphismen von DNA-Reparaturenzymen mit negativer Auswirkung auf die Enzymaktivität unter dem Verdacht, die Krebsentstehung zu begünstigen (Kiyohara *et al.*, 2006).

1.3 Basen-Exzisionsreparatur

Die Basen-Exzisionsreparatur (BER) repariert Schäden an der DNA, die spontan oder durch den Angriff reaktiver chemischer Verbindungen (Superoxide und andere freie Radikale) entstehen (Henning *et al.*, 1999). DNA-Schäden können Basenveränderungen, Strangbrüche und Basenlücken sein, die Transkription und Replikation behindern oder Mutationen erzeugen. Der Ablauf wird schematisch in Abbildung 1.3 gezeigt. Die BER

entfernt hauptsächlich endogen erzeugte Schäden und ist ein essentieller Mechanismus der Zelle (Tudek, 2007). Offenbar ist ein Ausfall der BER für den Organismus letal, da es im Gegensatz zu anderen DNA-Reparaturmechanismen keine bekannten genetischen Syndrome gibt, die auf Störungen der BER beruhen (Hakem, 2008).

1.3.1 XRCC1 - X-ray repair cross-complementing gene 1

Im Zuge der BER entstehen Strangbrüche und abasische Stellen (AP), die ihrerseits hochtoxische Läsionen sind. Um diese suffizient zu korrigieren, muss der gesamte Vorgang koordiniert ablaufen (Scharer, 2003). Die zentrale Rolle in dieser Koordination wird XRCC1 zugeschrieben (Marsin *et al.*, 2003).

1982 wurde von Thompson eine Zelllinie aus Ovarien chinesischer Hamster kultiviert (CHO EM9), die eine um ein Vielfaches erhöhte Sensitivität gegenüber alkylierenden Agentien (z.B. Ethylmethansulfonat = EMS) und Röntgenstrahlen zeigte (Thompson *et al.*, 1982). Phänotypisch zeichneten sich diese Varianten dadurch aus, dass es nach Exposition mit alkylierenden Agentien zu einer größeren Anzahl von Chromosomen-Aberrationen kam, bedingt durch eine verzögerte Reparatur von Einzelstrangbrüchen (SSBR). Dies führte zu einem früheren Zelltod (Carrano *et al.*, 1986). Außerdem fand man bei CHO EM9-Zellen eine größere Anzahl von Schwesterchromatid-Austauschen (SCE) als in ursprünglichen Hamsteroovarienzellen sowie eine verminderte Effizienz der Homologen Rekombination (HR) (Hoy *et al.*, 1987). 1990 gelang das Klonen eines Gens, das als cDNA in die Zellen eingebracht die Defekte fast vollständig normalisierte (Caldcott *et al.*, 1992; Thompson *et al.*, 1990). Dieses Gen wurde X-ray repair cross-complementing gene 1 (XRCC1) genannt. XRCC1 ist das zentrale Protein der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen (Thompson & West, 2000). Zusammen mit Lig3 verschließt XRCC1 am Ende der BER den Bruch im Phosphatgerüst. Es beeinflusst *in vitro* die Länge des ersetzten Stückes. Zusammen mit Pol β scheint es die defekte DNA-Stelle zu umschließen und so einen Schutz vor dem zellulären Milieu zu schaffen. Jedoch besitzt es keine bekannte eigene Enzymaktivität. Stattdessen stimuliert oder inhibiert es durch Protein-Protein-Wechselwirkungen die Aktivität der anderen Enzyme (Dantzer *et al.*, 2000; Lavrik *et al.*, 2001; Prasad *et al.*, 2001). Die Aufgabe von XRCC1 ist vergleichbar mit der eines Baugerüsts, indem es die anderen Komponenten des Reparaturvorgangs heranzieht und moduliert. Es ist in der Lage, verschiedene Faktoren (Lig3,

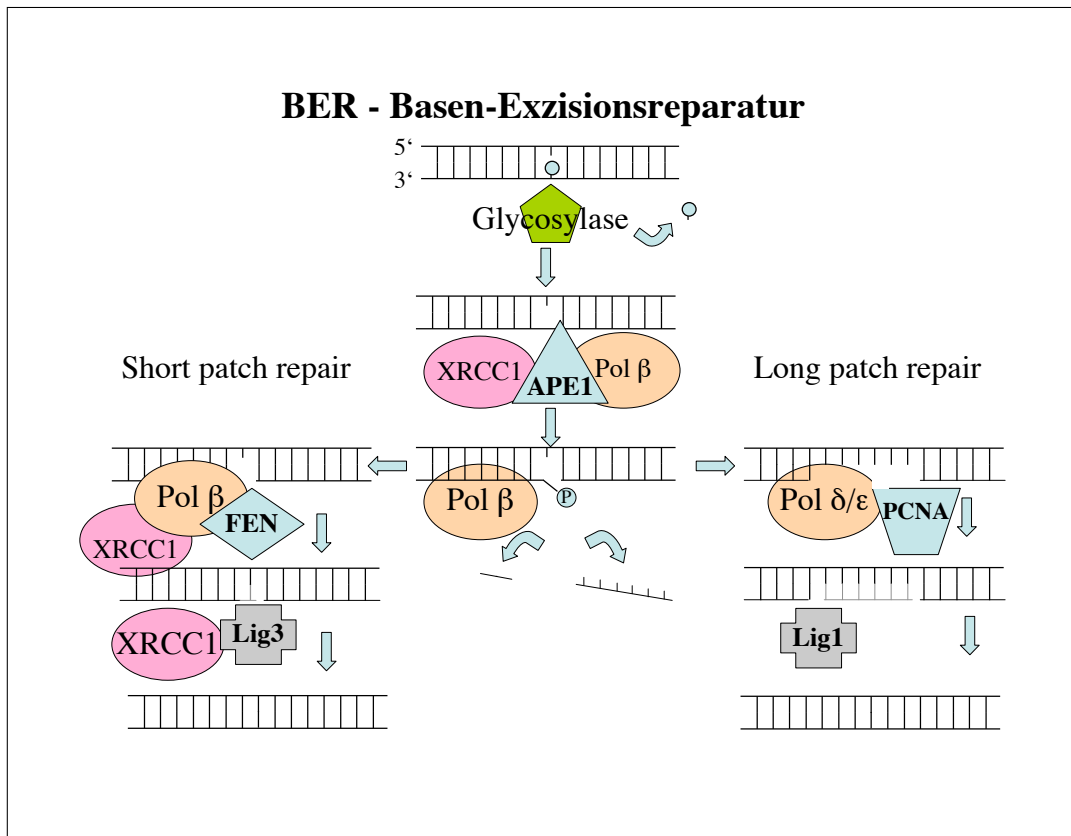


Abbildung 1.3: Basenexzisionsreparatur

DNA-Glycosylasen erkennen und exzidieren Fehler unter Erhalt des Phosphatgerüsts. Es bleibt eine Lücke (AP = abasische Stelle). AP-Endonukleasen (zB. APE 1) schneiden in 5'-Richtung und interagieren mit XRCC1 und Polβ (DNA-Polymeraseβ), die das Phosphatgerüst der AP-Stelle schneidet und die Polymerisation durch den Polβ/FEN1-Komplex (Short-Patch-Repair-Pfad) und die Ligation durch einen Komplex aus Lig3 und XRCC1 ermöglicht. Im Long-Patch-Repair-Pfad werden 5-7 Basenpaare entfernt. Die Polymerisation erfolgt über den Polδ/PCNA-Komplex. Abschließend Ligation der Enden (Lig1) (Goode et al., 2002).

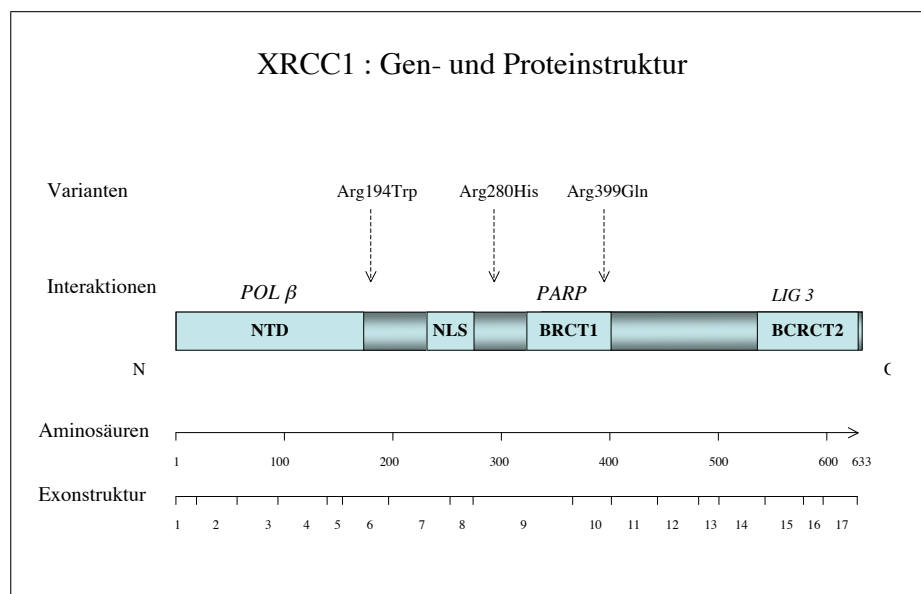


Abbildung 1.4: XRCC1 Gen- und Proteinstruktur

Das *XRCC1*-Gen (33052bp) enthält 17 Exons (1899nt), die das Protein kodieren (633 Aminosäuren, 69,5kDa). Interaktionspartner sind u.a. Pol β , PARP und Lig3. Bindungsstellen sind u.a. NTD (N-terminal domain, AS 1-183), BRCT-I- (AS 317-403) und BRCT-II-Domänen (AS 540-529). Pfeile zeigen die Lokalisation der Varianten (Goode *et al.*, 2002).

PARP-1, PARP-2, Pol β , PNKP) zu stabilisieren und die Geschwindigkeit des Prozesses zu erhöhen (Vidal *et al.*, 2001).

Das menschliche *XRCC1*-Gen wurde 1989 in der Nachbarschaft anderer DNA-Reparaturenzym-Gene (u.a. *ERCC1* und *ERCC2* = *XPB*) auf dem q-Arm des Chromosom 19 (19q13.2) lokalisiert (Mohrenweiser *et al.*, 1989). Man konnte zeigen, dass bei der oben erwähnten Zelllinie (CHO-EM9) eine Rastermutation zum vollständigen Funktionsverlust des Proteins *XRCC1* geführt hatte (Shen *et al.*, 1998a). Bei Mäusen bewirkt der Verlust des *XRCC1*-Gens embryonalen Zelltod (Tebbs *et al.*, 1999). *XRCC1* wurde bislang bei Säugetieren, aber auch bei *Drosophila melanogaster* und der Pflanze *Arabidopsis thaliana* (Ackerschmalwand) gefunden. Beim Vergleich der Gene zeigte sich in vielen Regionen eine große Einheitlichkeit, dies spricht für die evolutionäre Bedeutung von *XRCC1* (Lamerdin *et al.*, 1995). Abbildung 1.4 zeigt schematisch die Gen- und Proteinstruktur von *XRCC1*. Der insgesamt 33052 Basenpaare umfassende Bereich des Gens enthält 17 Exons (1899nt). Sie kodieren für das 633 Aminosäuren lange und 69,5 kDa schwere Protein *XRCC1*.

Inzwischen ist es gelungen, in diesem Protein verschiedene Domänen zu identifizieren, die dem XRCC1-Protein Interaktionen mit anderen Proteinen ermöglichen. Marinchev *et al.* (1999) haben die Proteinstruktur am Aminoterminus mittels Kernspinresonanz dargestellt. Die Bindungsstelle für DNA-Einzelstrangbrüche und Pol β findet sich zwischen AS 1 und 183 (N-terminal domain = NTD) (Marinchev *et al.*, 1999). Weitere Regionen, denen das Interesse der Forschung gilt, sind die BRCT-I- (AS 317-403) und BRCT-II-Domänen (AS 540-529). Im BRCT-I-Bereich interagiert XRCC1 mit PARP 1 und PARP 2. PARP ist ein Zinkfinger-enthaltendes Enzym, das DNA-Strangbrüche identifiziert und ebenfalls in den Vorgang der BER involviert ist. Im BRCT-II Bereich liegt die Bindungsstelle mit DNA-Polymerase- β (Pol β). Die Interaktion von XRCC1 mit der Polynukleotidkinase (PNK) findet über die Linker-II-Region statt und dient der Einzelstrangbruch-Reparatur. Eine NLS-Sequenz (nuclear localisation signal) liegt zwischen diesen in AS 239-266. Sie stellt sicher, dass das Protein nach der Translation in den Zellkern kommt.

Mehrere SNPs dieses Gens sind bekannt, von denen sich viele in Exons befinden (Mohrenweiser *et al.*, 2002) (siehe auch Tabelle 1.1). Die häufigsten dieser Varianten sind in Tabelle 1.2 aufgezeigt.

In Exon 6 des Gens findet sich im Kodon 194 eine Basen-Transition von C nach T. Diese hat eine Veränderung der Aminosäure von Arginin nach Tryptophan zur Folge. In Exon 9 gibt es im Kodon 280 die Transition von G nach A, die ihrerseits eine Veränderung von Arginin nach Histidin bewirkt. Auch in Exon 10 im Kodon 399 wird Arginin ersetzt, diesmal durch Glutamin, aufgrund einer Transition von G nach A.

Wie in der Literatur üblich werden im Folgenden die Polymorphismen nach dem jeweiligen Aminosäureaustausch benannt.

Ein Einfluss dieser Varianten auf die Krebsentstehung ist wahrscheinlich, da es sich um nicht konservative Aminosäure-Austausche handelt (non-synonymus SNP), die Variante also andere physikalisch-chemische Eigenschaften als der Wildtyp besitzt. Sie könnten über eine Veränderung der Proteinstruktur zu einer gestörten Interaktion mit den o.g. Enzymen führen und so die Effizienz der DNA-Reparatur in BER und SSBR verändern.

Die SNPs der Kodons 194 und 280 liegen im Bereich der Linker-I-Domäne, die zwischen den Interaktionsstellen von XRCC1 mit Pol β und PARP liegt. Der Aminosäureaustausch an Position 399 liegt im Bereich der BRCT-I-Domäne und somit in der evolutionär bewahrten Interaktionsstelle mit PARP.

Exon	Kodon	Wildtyp	Variante	Allelfrequenz	cDNA Sequenz 3' ==> 5'
3	72	Val	Ala	< 0,1	GCTGG(T/C)GGATC
5	161	Pro	Leu	< 0,01	GGCCC(C/T)GTCCC
5	173	Phe	Leu	< 0,01	CAGTT(C/G)CGTGT
6	194	Arg	Trp	0,06 - 0,25	TCAGC(C/T)GGATC
9	280	Arg	His	< 0,1	AACTC(G/A)TACCC
9	309	Pro	Ser	< 0,1	GACGA(C/T)CCCGA
10	399	Arg	Gln	0,3 - 0,4	CTCCC(G/A)ACGAA
15	560	Arg	Trp	< 0,05	AGCGG(C/T)GGAAA
16	576	Tyr	Ser	< 0,05	GGACT(A/C)TATGA

Tabelle 1.1: Varianten des XRCC1-Gens

XRCC1-Polymorphismus: Position und Basentausch, Gen-ID: 7515, MIM: 194360					
Arg 194 Trp	C ==> T	(Transition in Exon 6, rs1799782)			
Arg 280 His	G ==> A	(Transition in Exon 9, rs25489)			
Arg 399 Gln	G ==> A	(Transition in Exon 10, rs25487)			

Tabelle 1.2: Häufige Polymorphismen von XRCC1

Experimentell erzeugte Aminosäureaustausche in der BRCT-I-Region von XRCC1 haben die Effizienz der Einzelstrangbruch-Reparatur deutlich verschlechtert (Taylor *et al.*, 2002).

194Trp und 280His kommen in der kaukasischen Bevölkerung selten (<10%), 399Gln dagegen häufig vor (30-40%). Untersuchungen an asiatischen und afkanischen Kollektiven weisen auf deutliche ethnische Unterschiede in der Häufigkeit der SNPs hin (Mathonnet *et al.*, 2003). Bei amerikanischen Einwanderern aus dem südchinesischen Volk der Hmong kommt der 194Trp-Polymorphismus z.B. mit 37% wesentlich häufiger vor als bei Kaukasiern (Kiffmeyer *et al.*, 2004).

In phänotypischen Studien konnte ein Einfluss auf die DNA Reparaturkapazität (DRC) gezeigt werden. Diese Untersuchungen zeigen, dass 399Gln, besonders, wenn es homozygot vorliegt, die DRC verschlechtert. So haben Träger eines 399Gln-Allels eher messbare Mengen von DNA-Addukten (Lunn *et al.*, 1999; Matullo *et al.*, 2001b), weisen unter Schadstoffbelastung mehr Chromosomenbrüche und SCEs auf (Abdel-Rahman & El-Zein, 2000; Duell *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2003), haben mehr p53-Mutationen (Hsieh

et al., 2003; Li *et al.*, 2003) und eine Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (Hu *et al.*, 2001).

Eine Verbesserung der DRC wurde hingegen für 194Trp und 280His beschrieben (Tumimala *et al.*, 2004). Die Variante 194Trp führte zum Beispiel bei In-vitro-Experimenten unter Schadstoffexposition zu signifikant weniger Chromosomenbrüchen (Wang *et al.*, 2003).

Es wurde bereits mehrfach ein möglicher Zusammenhang zwischen den Varianten des XRCC1-Gens und der Wahrscheinlichkeit, an Zigarettenrauch-induziertem Krebs zu erkranken, diskutiert. Die inkoherenten Ergebnisse klinischer Studien widersprechen den klaren Zusammenhängen, die bei In-vitro-Studien gefunden wurden (Goode *et al.*, 2002).

399Gln scheint für leichte Raucher ein Risikofaktor für Lungenkrebs zu sein, für starke Raucher wurden aber eher protektive Eigenschaften beobachtet. Andere Studien konnten keine Assoziation zwischen XRCC1-Polymorphismen und Krebserkrankungen feststellen (Butkiewicz *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2003; Rybicki *et al.*, 2004; Shu *et al.*, 2003; Varzim *et al.*, 2003).

In einer Fall-Kontroll-Studie von Sturgis an Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (SCCHN) wurde für homozygote Träger der Variante 194Trp ein geringeres und für 399Gln ein erhöhtes Risiko für das Entwickeln eines Karzinoms beobachtet. Eine Kombination der Genotypen 194Trp und 399Arg zeigte aber ein erhöhtes Risiko (Sturgis *et al.*, 1999). Eine andere Studie zeigte den gegenteiligen Effekt. Hier wurde die 194Trp-Variante als Risikofaktor, 399Gln hingegen als protektiver Faktor beschrieben (Olshan *et al.*, 2002), was im Widerspruch zu den Funktionsassays steht. Gleiches gilt für das Ergebnis von Lee *et al.*, die bei Alkohol-Konsumenten für die homozygoten Wildtyp 399Arg/Arg ein signifikant erhöhtes Risiko fanden, an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken (Lee *et al.*, 2001).

Die bisher in epidemiologischen Studien erhobenen Ergebnisse fallen also unterschiedlich aus. Insgesamt wurde aber die 399Gln-Variante häufiger als Risikofaktor und die 194Trp-Variante häufiger als protektiv beschrieben, was den In-vitro-Beobachtungen entspricht. Die 280His-Variante wurde selten untersucht; hier fanden sich Hinweise auf eine ungünstige Beeinflussung des Lungen- und Brustkrebsrisikos (Moullan *et al.*, 2003; Ratnasinghe *et al.*, 2001).

1.4 Nucleotid-Exzisionsreparatur

Die Nucleotid-Exzisionsreparatur (NER) dient der Entfernung von Schäden an der DNA, die durch exogene Agentien entstanden sind. Sie erkennt und repariert unterschiedliche, z.B. durch durch Zytostatika oder Zigarettenrauch verursachte Schäden an der DNA (Hoeijmakers, 2001). Es werden zwei Wege unterschieden: ein schneller, transkriptionsabhängiger (TCR) und ein langsamer, transkriptionsunabhängiger (Global Genome Repair - GGR). TCR findet in Regionen des Genoms statt, die oft transkribiert werden und ist von erheblich größerer Bedeutung (Balajee & Bohr, 2000). Abbildung 1.5 zeigt schematisch den Ablauf der NER.

1.4.1 XPD - Xeroderma pigmentosum Group D

Xeroderma pigmentosum Group D (XPD), wird auch ERCC2 (Excision repair cross complementing 2) genannt. Das Enzym ist mit seiner ATP-abhängigen 5'–3'–Helikaseaktivität an der Transkription und an der NER beteiligt. Außerdem spielt es eine Rolle bei der Apoptose-Aktivierung durch die Interaktion zwischen p53 und TFIIH und trägt dadurch zur Entfernung kranker Zellen bei (Wang *et al.*, 1996). Mutationen im XPD-Gen können DNA-Reparatur- und Transkriptionsdefekte begünstigen. Die entstehenden Krankheitsbilder Xeroderma pigmentosum, Cockayne-Syndrom und Trichothiodystrophie gehen mit geistiger Retardierung, Skelettanomalien und unreifer sexueller Entwicklung einher. Bei Patienten mit Xeroderma pigmentosum liegt ein hohes Hautkrebsrisiko vor, das auf einer erniedrigten DNA-Reparaturkapazität beruht (Coin *et al.*, 1999; Kraemer *et al.*, 1994).

XPD ist Teil von TFIIH, einem aus neun Untereinheiten bestehenden Komplex, der an NER, Transkription und Zellzykluskontrolle beteiligt ist (Coin *et al.*, 1998; Keriell *et al.*, 2002). Es interagiert mit über 18 Reparaturenzymen und Transkriptionsfaktoren. Für die Interaktionen sind zwei Domänen verantwortlich: DEXDc (AS 8-280) und HELIC (AS 542-686). Das XPD-Gen umfasst insgesamt 54300 Basenpaare, besteht aus 23 Exons (2400nt) und ist wie XRCC1 und ERCC1 auf dem q-Arm von Chromosom 19 lokalisiert (19q13.3). Es codiert für das 760 Aminosäuren lange und 86,9 kDa schwere Protein XPD, wie in Abbildung 1.6 veranschaulicht (Benhamou & Sarasin, 2002). Fast 100 Mutationen wurden in diesem Gen lokalisiert. Die meisten davon sind Punktmutationen, was nahelegt, dass die volle Länge des Proteins für die Funktion gebraucht wird (Itin *et al.*, 2001). Viele dieser Mutationen sind am C-Terminus des Proteins loka-

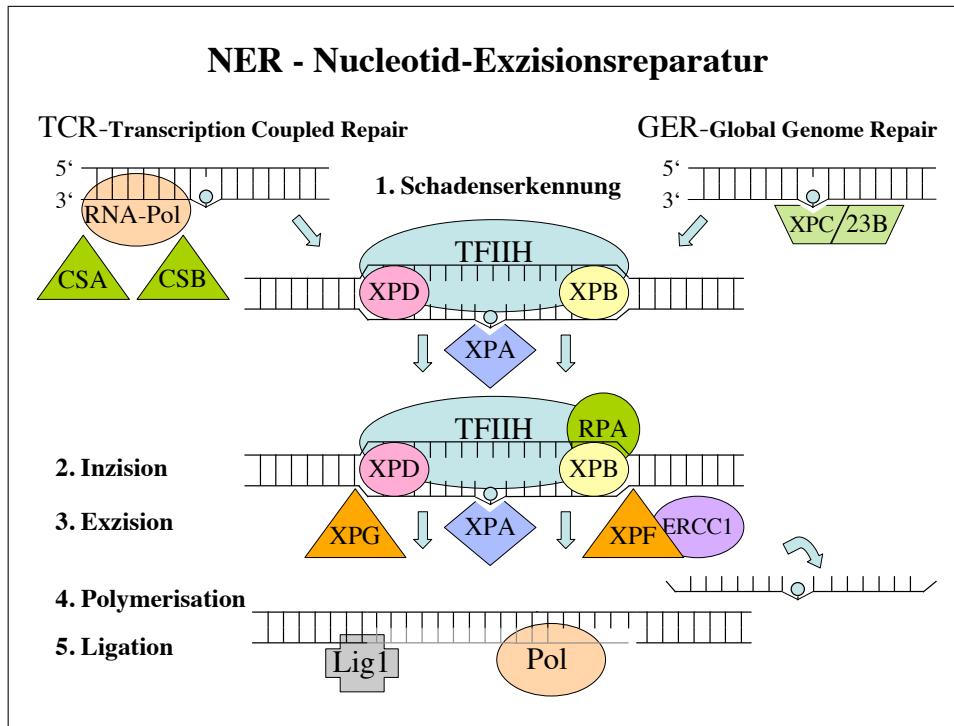


Abbildung 1.5: Nukleotid-Exzisionsreparatur

Bei der Global Genome Repair (GGR) erkennen XPC und hHR23B den Schaden. In der Transcription Coupled Repair (TCR) wird der Schaden während der Transkription durch Blockade der DNA-Polymerase erkannt. CSB und CSA entfernen die RNA-Polymerase. XPB und XPD (Untereinheiten von TFIIH) denaturieren den DNA-Doppelstrang lokal mittels DNA-Helikase-Aktivität. RPA bindet an den intakten Einzelstrang und stabilisiert, während XPA an die einzelne geschädigte Base bindet. XPG schneidet den geschädigten Strang in 3'-Richtung, ERCC1-XPF schneidet ca. 27-30 Basenpaare entfernt in 5'-Richtung. DNA-Polymerasen und PCNA, RPA und RFC schließen die Lücke. DNA-Ligase I verschließt die Enden kovalent (Friedberg, 2001).

lisiert, der Domäne zur Interaktion mit p44 (Coin *et al.*, 1998). Die sechs in kodierenden Regionen gelegenen Polymorphismen, die einen Aminosäureaustausch bewirken, zeigt Tabelle 1.3. In Exon 8 liegt im Kodon 199 eine Transversion von C nach G vor, die einen Aminosäureaustausch von Isoleucin nach Methionin bewirkt. Der Basenaustausch von G nach A im Kodon 312 entfernt die saure Aminosäure Asparaginsäure und liegt in einer bei Wirbeltieren (Mensch, Hamster, Maus, Fisch) evolutionär bewahrten Region des Proteins (Butkiewicz *et al.*, 2001).

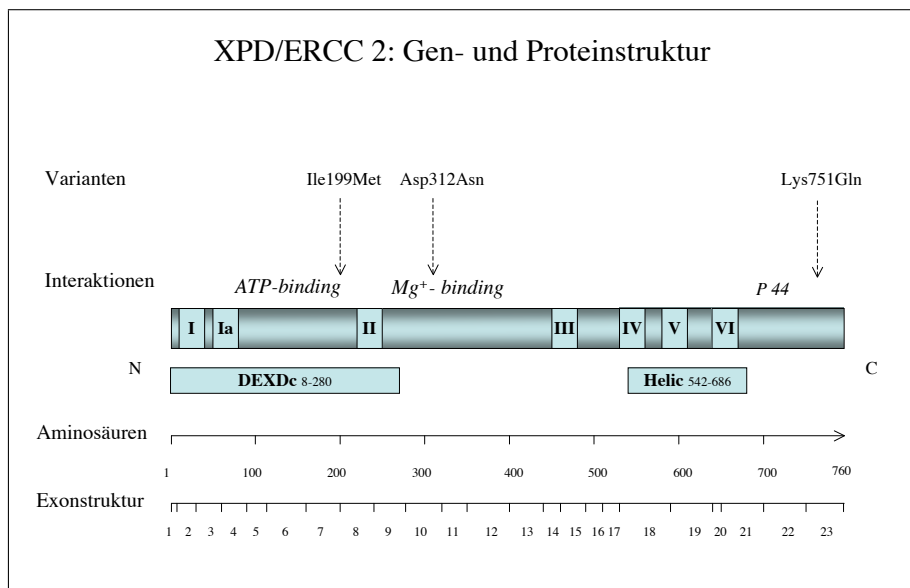


Abbildung 1.6: XPD Gen- und Proteinstruktur

Das XPD Gen (54300bp) enthält 23 Exons (2400nt) die das Protein (760 Aminosäuren, 86,9kDa) kodieren. Die Domänen DEXDc (AS 8-280) und HELIC (AS 542-686) dienen der Interaktion mit anderen Proteinen. Dargestellt sind außerdem die 7 Helikase-Untereinheiten (I-VI) und die Lokalisation der Varianten (Benhamou & Sarasin, 2002).

In Kodon 751 liegt ein Basenaustausch von G nach A vor, dieser verändert die elektrischen Eigenschaften der Aminosäure durch Tausch von Lysin gegen Gycin. Dieser Aminosäureaustausch liegt an einer wichtigen Stelle, nämlich der Interaktionsdomäne zwischen XPD-Protein und seinem Helikaseaktivator p44-Protein innerhalb des TFIIH-Komplexes (Coin *et al.*, 1998). Theoretisch sollte er also für die XPD-Aktivität wichtig sein, auch wenn er keiner ausgeprägten evolutionären Bewahrung unterliegt (Clarkson & Wood, 2005).

1 Einleitung

Exon	Kodon	Wildtyp	Variante	Allelfrequenz	cDNA Sequenz 3' ==> 5'
8	199	Ile	Met	0,01	TCAAT(C/G)CTGCA
8	201	His	Tyr	0,01	TCCTG(C/T)ATGCC
10	312	Asp	Asn	0,40	TGCCC(G/A)ACGAA
20	616	Arg	Pro	0,01	CGGGC(G/C)GGCCG
23	751	Lys	Gln	0,32	CGCTG(A/C)AGAGG

Tabelle 1.3: Varianten des XPD-Gens

Tabelle 1.4 zeigt mit 199Met, 312Asn und 751Gln diejenigen Polymorphismen von XPD, die aufgrund ihrer Häufigkeit und ihrer Lokalisation am ehesten Einfluss auf die Krebsentstehung nehmen können. Sowohl 312Asn als auch 751Gln sind in der kaukasischen Bevölkerung mit 35-40% häufig. Der Polymorphismus im Kodon 199Met kommt mit einer Allelhäufigkeit < 4% seltener vor (Mohrenweiser *et al.*, 2002).

XPD-Polymorphismus: Position und Basentausch, Gen-ID: 2068, MIM: 126340			
Ile 199 Met	C ==> G	(Transversion in Exon 8, rs1799791)	
Asp 312 Asn	G ==> A	(Transition in Exon 10, rs1799793)	
Lys 751 Gln	A ==> C	(Transversion in Exon 23, rs13181)	

Tabelle 1.4: Häufige Polymorphismen von XPD

In biologischen Funktionstests war der homozygote XPD 751Lys Wildtyp mit einer verminderten DNA-Reparaturkapazität von Röntgenstrahlen induzierten DNA-Schäden verknüpft (Lunn *et al.*, 2000). Eine Assoziation zwischen diesem Allel und einer größeren Zahl von UVC-induzierten DNA-Strangbrüchen konnte auch an Lymphozyten von Psoriasispatienten unter Anwendung des Comet-Assays festgestellt werden (Moller *et al.*, 2000). Dieser Test misst die initiale Rate von NER-Einschnitten in Läsionen, beweist aber nicht deren fehlerfreie Reparatur. Beide Studien wurden an kleinen Kollektiven durchgeführt, was ihre Aussagekraft einschränkt. An größeren Kollektiven fanden andere Studien den gegenteiligen Effekt. Hier hatte der Wildtyp 751Lys verglichen mit der selteneren Variante 751Gln eine bessere DRC. Die unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf der unterschiedlichen methodischen Herangehensweise beruhen. Im Host Cell Reaktivations Assay (HCR) wurden BPDE-behandelte (Spitz *et al.*, 2001) oder UV-behandelten

Plasmide benutzt, um Schäden an der DNA zu erzeugen und deren Reparatur zu messen (Qiao *et al.*, 2002). Eine schlechtere Funktion der Variante gegenüber dem Wildtyp wurde von Matullo *et al.* beobachtet, die in peripheren Lymphozyten von Nichtrauchern mit homozygoten 751Gln Wildtyp höhere Adduktlevel fanden (Matullo *et al.*, 2001a). Bei Kombination der Allele wurde die beste DRC in Zellen mit beiden Wildtypen, die schlechteste in Zellen mit mindestens zwei Varianten beobachtet (Spitz *et al.*, 2001). Grundsätzlich können phänotypische Tests die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Krebserkrankungen vorhersagen (Berwick & Vineis, 2000).

Bislang wurden epidemiologische Studien durchgeführt, die in erster Linie Zusammenhänge zwischen XPD und Haut- und Krebserkrankungen zum Thema hatten. Der Hauptfokus lag dabei auf dem Lungenkarzinom. Die Ergebnisse fielen heterogen aus. Die 312Asn Variante zeigte in einer Studie an 96 Lungenkrebs-Patienten einen protektiven Effekt, wenn sie mit dem Wildtyp verglichen wurde (Butkiewicz *et al.*, 2001). In einer anderen, größeren Studie war es mit einem höheren Karzinomrisiko behaftet (Zhou *et al.*, 2002). An einem chinesischen Kollektiv konnte die Risikoerhöhung bestätigt werden, wobei für die Subgruppe der Plattenepithelkarzinome ein besonders hohes Risiko vorlag (Liang *et al.*, 2003). In weiteren Studien unterschied sich die Verteilung der Genotypen zwischen Fällen und Kontrollen nicht (Spitz *et al.*, 2001).

Betrachtet man den 751Gln-Polymorphismus, so führte die homozygote Variante bei Chinesen zu einem erhöhten Risiko, an einem Lungenkarzinom zu erkranken (Liang *et al.*, 2003). Andere Arbeitsgruppen konnten bezüglich dieses SNPs keine Effekte nachweisen (David-Beabes *et al.*, 2001). Dieser Widerspruch zeigte sich auch für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich. In einer Arbeit war die Variante XPD 751Gln mit einem höheren Risiko für SCCHN (Squamous cell carcinoma of the head and neck = Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereiches) (Sturgis *et al.*, 2000) assoziiert. Zwei Jahre später fanden ebenfalls Sturgis *et al.* für Träger des Wildtyps ein grenzwertig erhöhtes Risiko, an einem Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches zu erkranken (Sturgis *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Individuen, die zwei oder mehr variante Allele tragen, ein höheres Risiko für Lungenkrebs (Spitz *et al.*, 2001) und SCCHN (Sturgis *et al.*, 2002) haben.

1.5 Wissenschaftliche Zielsetzung

Unterschiede in der Kapazität von DNA-Reparaturenzymen der Nucleotid- oder Basenexzisionsreparatur sind Ursachen für die individuelle Reaktion auf mutagene Noxen. Genetische Polymorphismen der DNA-Reparaturenzyme können zu einer veränderten DNA-Reparaturkapazität führen. In der vorliegenden Arbeit werden genetische Polymorphismen der DNA-Reparaturenzyme XRCC1 und XPD untersucht. Alle in dieser Studie untersuchten Basenaustausche in den Kodons 194, 280 und 399 von XRCC1 und 199, 312 und 751 von XPD resultieren in einem Aminosäureaustausch im Protein. Diese Aminosäureaustausche liegen in strukturell wichtigen und teils evolutionär bewahrten Regionen des Proteins, so dass eine Einflußnahme auf die Funktion nahe liegt. Phänotypische Studien haben für einige der untersuchten Varianten einen Einfluß auf die DNA-Reparaturkapazität gezeigt. Mit der vorliegenden Untersuchung soll überprüft werden, ob diese Polymorphismen einen Einfluss auf das Erkrankungsrisiko für ein Larynxkarzinom nehmen.

2 Material und Methoden

2.1 Ein-/Ausschlusskriterien und Einteilung der Kollektive

In der vorliegenden krankenhausbasierten Fall-Kontroll-Studie wurde DNA von 295 Larynxkarzinompatienten untersucht, die zwischen Februar 1995 und Juli 2001 Patienten der HNO-Poliklinik der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte und Campus Virchow-Klinikum waren. Als Kontrollen dienten 350 Patienten, die während desselben Zeitraumes aufgrund nichtmaligner Erkrankungen in der Charité behandelt wurden. Diese Proben sind für eine Arbeit über die Assoziation zwischen Polymorphismen der schadstoffmetabolisierenden Enzyme NAT I und NAT II und dem Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, zusammengestellt worden (Henning *et al.*, 1999). Den Studienteilnehmern wurden 10 ml Blut abgenommen, das der Extraktion von Leukozyten-DNA und den nachfolgenden Genotypisierungen diente.

Um die Einheitlichkeit des Fall-Kollektivs zu erhöhen, wurden nur Patienten in die Studie eingeschlossen, die älter als 18 Jahre und deutscher Abstammung waren, bei denen die Diagnose eines Plattenepithelkarzinoms des Larynx (supraglottisch, glottisch oder subglottisch) histologisch gesichert war und deren Diagnosestellung höchstens fünf Jahre zurücklag. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Charité genehmigt.

Anhand eines standardisierten Fragebogens wurde bei den Larynxkarzinompatienten Angaben zu Alter, Geschlecht, Berufstätigkeiten und Schadstoffbelastungen, Rauchgewohnheiten, Alkoholkonsum, Familienanamnese von Tumorerkrankungen sowie Klassifikation des Tumors erhoben. Der Zigarettenkonsum wurde in Packungsjahren angegeben (1 PJ = täglicher Konsum von 20 Zigaretten über ein Jahr). Nur, wer noch nie in seinem Leben geraucht hatte, wurde als Nichtraucher eingestuft. Unter die Kategorie "Leichte Raucher" fielen Patienten mit 1-25 PJ, "Mittelstarke Raucher" mit 25-50 PJ, "Starke Raucher" mit mehr als 50 PJ. Die Patienten wurden bezüglich ihrer Trinkgewohnheiten in 4 Kategorien eingeteilt: Nichttrinker (Gruppe 0), gelegentlich Alkohol Konsumierende (Gruppe 1), mäßiger Alkoholgenuss (Gruppe 2), täglich starker Alkoholkonsum (Gruppe 3). Aufgrund der subjektiven Einschätzung der Patienten und aus Ermangelung an

objektivierbaren Anhaltspunkten war eine genauere Quantifizierung (z.B. in Gramm Alkohol/Tag) nicht möglich.

Durch zahlreiche frühere epidemiologische Studien ist bekannt, dass es für Berufe mit Schadstoffexposition ein gesteigertes Risiko gibt, an einem Larynxkarzinom zu erkranken. Eine höhere Inzidenz wurde bei Arbeitern in der Chemie-, Glas-, Porzellan- und Quarzindustrie und Land- und Forstwirtschaft sowie bei Schlossern, Werkzeugmachern, Maurern, Tischlern, Maschinisten, Druckern, Kraftfahrern, Hütten- und Gießarbeitern und bei Angestellten des Hotel- und Gaststättenwesens beobachtet (Maier & Tisch, 1997). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Patienten in der vorliegenden Studie nach ihren Berufen in Gruppen mit und ohne Schadstoffexposition eingeteilt. Bei allen Kontrollpatienten lagen Daten zu Alter, Geschlecht und Tabakkonsum (PJ) vor, Angaben zu Risikoberufen und Schadstoffexposition wurden nicht erhoben. Angaben zu Trinkgewohnheiten konnten nur von etwa der Hälfte der Kontrollen erhoben werden.

Anhand der histologischen Befunde und anhand der TNM-Klassifikation wurde die Tumoreinteilung nach WHO-Kriterien und die Stadieneinteilung nach UICC vorgenommen (siehe Tabelle 2.1 und 2.2). Neben Lokalisation wurden auch Größe, Ausbreitungsgrad, Lymphknotenstatus und Metastasierung in die Datensammlung aufgenommen. Die Lokalisation des Tumors wurde anhand der anatomischen Gegebenheiten als supraglottisch, subglottisch und glottisch bezeichnet. Die Bezeichnungen folgen der Definition von Jahnke (1995).

Für die Fernmetastasierung galt: M0 - keine Fernmetastasen, M1 - Fernmetastasen vorhanden, MX - Fernmetastasen nicht bestimmbar. Für die Lymphknotenbeteiligung galten die N-Kategorien. N0 - Keine regionalen Lymphknotenmetastasen. N1 - Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten <3 cm. N2a - Metastase in solitärem ipsilateralem Lymphknoten >3 und <6 cm. N2b - Multiple ipsilaterale Lymphknotenmetastasen. N2c - Bilaterale oder kontralaterale Lymphknotenmetastasen. N3 - Lymphknotenmetastasen >6 cm.

UICC-Stadium	0	I	II	III		IV		
T-Kategorie	Tis	T1	T2	T3	T1-3	T4	T1-4	T1-4
N-Kategorie	N0	N0	N0	N0	N1	-	N2-3	N1-3
M-Kategorie	M0	M0	M0	M0	M0	-	M0	M1

Tabelle 2.1: UICC-Stadieneinteilung des Larynxkarzinoms

TNM-Grad	Supraglottisch	Glottisch	Subglottisch
Tis	Präinvasives Karzinom (carcinoma in situ)		
T1	Supraglottis	Tumor beschränkt auf: Glottis Subglottis	
T1a	-	Stimmrippen normal beweglich Befall einer Stimmlippe	
T1b	-	Befall beider Stimmrippen	
T2	Tumor infiltriert mehr als einen Unterbezirk des Supraglenks oder Glottis, mit normaler Stimmbandbeweglichkeit	Tumor mit Übergang auf die Subglottis oder die Supraglottis, bei normaler oder eingeschränkter Stimmbandbeweglichkeit	
T3	Tumor beschränkt auf Larynx mit Stimmbandfixation und/oder Tumor mit Infiltration des Postkrikoidbezirkes, der medialen Wand des Recessus piriformis oder des präepiglottischen Gewebes	Tumor beschränkt auf den Larynx mit Fixation einer oder beider Stimmbänder	
T4	Tumor infiltriert durch den Schildknorpel und/oder breitet sich auf andere Gewebe außerhalb des Larynx aus	Tumor mit Einbruch in den Schildknorpel oder andere Gewebe ausserhalb des Larynx, wie Oropharynx oder Weichteile des Halses	
TX	Tumorstatus unbekannt		

Tabelle 2.2: WHO-Klassifikation Larynxkarzinome

2.2 DNA-Analyse

2.2.1 DNA-Extraktion

Die für die Genotypisierungen benötigte DNA wurde aus Vollblut gewonnen. Dabei wurden die vor dem Jahr 2000 gesammelten Proben nach der Methode von Sambrook *et al.* (1989) extrahiert. Die später gesammelten Proben, bzw. diejenigen, bei denen eine Nachextraktion erforderlich wurde, wurden mit dem Magna-Pure LC-System der Firma Roche/Mannheim extrahiert, einem vollautomatischen System zur DNA-Gewinnung aus Vollblut. Alle DNA-Proben wiesen eine DNA-Konzentration von 30 ng/ μ l auf. Die Proben wurden bis zur späteren Analyse bei 4 °C gelagert.

2.2.2 Genotypisierung

Die Identifikation der Polymorphismen gelang mit Hilfe der Amplifikation durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR), durch Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen-Analyse (RFLP) und Auftrennung der Fragmente mit Agarose-Gelelektrophorese.

Bei der Amplifikation der jeweiligen DNA-Fragmente wurden klassische Polymerase-Kettenreaktionen angewandt. Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine Methode zur exponentiellen Amplifikation genetischen Materials. Theoretisch reicht ein Molekül der Ursprungs-DNA aus. Voraussetzung hierfür ist die Anwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase, die aus hitzeadaptierten Bakterien (*Thermophilus aquaticus* = Taq-Polymerase) isoliert werden kann. Wie im Organismus bei der DNA-Reduplikation benötigt dieses Enzym auch *in vitro* Oligonucleotidsequenzen als Startpunkte, die mit der Einzelstrang-DNA hybridisieren. Diese Oligonucleotidsequenzen (Primer) ermöglichen die Vervielfältigung des genau definierten Stückes, das zwischen den beiden Primern liegt, wenn ein Primer mit dem Codestrang, der andere mit dem codogenen Strang der DNA hybridisiert. Dabei dient einer der Primer als Forwärts- (forward), der andere als Rückwärtsprimer (reverse). Sie müssen jeweils zwischen 5 und 20 Basenpaare lang und zu den Sequenzen, an die sie binden sollen, komplementär sein. Die PCR verläuft in mehreren Schritten: Zunächst wird die Doppelstrang-DNA bei ca. 95 °C getrennt (Denaturierung). Dann erfolgt eine Abkühlung auf ca. 65-75 °C, damit sich die Primer an die ihnen komplementären Sequenzen anlagern können (Annealing). Nun wird zum Temperaturoptimum der Polymerase erhitzt (ca. 72 °C), damit diese sich anlagert und aus den zur Verfügung gestellten Desoxyribonucleotidbasen Adenosin, Guanin, Cytosin und

Thymin (dNTPs) neue DNA synthetisiert (Elongation). Nach wenigen Minuten wird die Reaktionsmischung erneut erhitzt, um eine Denaturierung der neugebildeten DNA von den Muttersträngen zu erzielen. Das Procedere wird nun 25-35 Mal wiederholt. Schon ab dem dritten Zyklus entstehen neue DNA-Stränge von exakt der Länge, die von den beiden Primern eingeschlossen wird. Am Ende der Reaktion ist dieses DNA-Fragment je nach Zykluszahl n^{25} - n^{35} Mal vorhanden.

2.2.2.1 Material für die PCR

Reagentien Taq-DNA-Polymerase (Biotherm), Desoxynucleotide (dNTP, dGTP, dTTP, dATP, dCTP), Puffer 10 X (Biotherm), Oligonucleotidprimer (TIB-Molbiol, Berlin), 50 mMol $MgCl_2$, 25 mMol (Biotherm), DMSO.

Geräte und Pipetten Eppendorf, Finnpipetten Labsystems, Impact v. Matrix, Spitzen Sarstedt und Eppendorf.

Zentrifugen 5415C Eppendorf, Mini Centrifuge C-1200 National Labnet Co., GS-6R Centrifuge Beckman, Vortex Reax 2000 Heidolph, VF 2 Ika Labortechnik, Thermomixer 5436 Eppendorf.

Cycler Perkin Elmer, Weiterstadt PE Biosystems GeneAmp PCR System 9700.

2.2.2.2 Material für die RFLP

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die in vivo Zellen vor Fremd-DNA (viraler bzw. Phagen-DNA) schützen, indem sie diese an bestimmten, palindromischen Sequenzen schneiden. Gibt es in einer solchen Sequenz eine Mutation, fällt die Schnittstelle weg. Auf diese Weise kann auch eine neue Schnittstelle entstehen. Aus verschiedenen Bakterien konnten bislang diverse Restriktionsendonukleasen isoliert werden.

Reagentien Restriktionsendonucleasen: Pvu II, Mbo I, Sty I (New England Biolabs, Beverley, MA, USA), Mbo II, Nci I, Rsa I (Fermentas), NE-Puffer 2, 3, 4 (New England Biolabs, Beverley, MA, USA), Tango-Puffer (Fermentas), BSA (25%).

Geräte Biometra OV3 Brutschrank

2.2.2.3 Material für die Elektrophorese

Für die Elektrophorese werden aus Agarose und Pufferlösungen (z.B. TRIS-Acetat oder TRIS-Borat, 50-100 mMol, pH 7,4, mit 1 mMol EDTA) Gele hergestellt. An diese Gele werden in den Elektrophoresekammern elektrische Felder verschiedener Stärke angelegt. Die mit Restriktionsenzymen verdauten DNA-Proben werden auf die Gele aufgetragen. In Anwesenheit des Elektrophoresepuffers ist die DNA negativ geladen, so dass sie sich im elektrischen Feld zum Pluspol bewegt.

Je nach Größe der Fragmente bewegt sich die DNA unterschiedlich schnell, da das Gel eine Diffusionsbarriere darstellt. Kleine Fragmente wandern sehr schnell, große kaum, da die Mobilität eines DNA-Fragmentes im Agarosegel proportional zum Logarithmus seiner Molmasse ist. Als Marker lässt man Fragmentgemische definierter Größen mitlaufen. Auf diese Weise kann man Aussagen über Größen von Fragmenten und somit Existenzen von Schnittstellen treffen.

Die Anfärbung der DNA erfolgte entweder mit Ethidiumbromid, welches in die DNA interkaliert, oder mit anderen Farbstoffen, wie Cyber Green oder Cyber Gold. Hierbei bilden sich fluoreszierende Komplexe, die bei einer Bestrahlung mit Licht von 245nm Wellenlänge die größte Empfindlichkeit haben.

Reagentien Agarose (NuSieve, Ultra PURE, Qualex Gold Agarose), Elektrophoresepuffer mit und ohne Ethidiumbromid, Biozym Cyber(sybr)green/Gold, Puffer 1, DNA-Marker, Längenstandards: Hpa II, Marker V, 100 bp-Marker.

Geräte Waage Owlabor VEB Wägetechnik Rapido Betrieb der VEB Kombinat Nagema, Magnetprüher RCT basic Ika Labortechnik, Mikrowelle Dimension 4 Panasonic, Protrans Kammern, Pharmacia Electrophoresis Power Supply EPS 600, Hoefer Scientific Instruments Red Rocker, Digitale Bildverarbeitung Stratagene Eagle Eye II.

2.2.3 PCR-RFLP-Tests für XRCC1-Polymorphismen

2.2.3.1 XRCC1 194Trp

PCR-Ansatz Zur Identifikation des ersten Polymorphismus im XRCC1-Gen wurde ein 485 bp langes Fragment in Exon 6 amplifiziert. Dort findet sich eine Transition von C nach T. Für die Amplifikation wurden je 1 µl DNA-Probe mit 2,5 µl Puffer, 2,5 µl dNTPs, je 0,7 µl Primer F und R, 1,3 µl MgCl₂ (25 mMol), 0,15 µl Taq-Polymerase

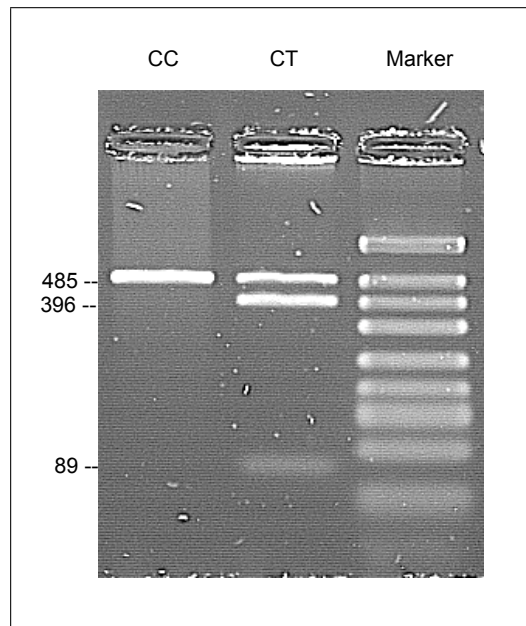


Abbildung 2.1: XRCC1 194-RFLP

und 17,15 μl H_2O gemischt (Gesamtvolumen 26 μl), zentrifugiert und unter folgenden Bedingungen im Cycler in einem 3-Schritte-Temperaturprogramm amplifiziert:

Cycler-Programm Temp. 1: 94°C 2 min; Temp. 2: 94°C 30 sec; Temp. 3: 61°C 35 sec; Temp. 4: 72°C 30 sec; Temp. 5: 72°C 7 min; 30 Zyklen.

PCR-Kontrolle Zur Kontrolle des Amplifikats wurden 7 μl des PCR-Produktes mit 10 μl Laufpuffer in 1% Ethidiumbromid-Agarose-Gel aufgetragen. Es liefen 4,5 μl Marker V bei 80 V 60 Minuten mit.

Verdau und Elektrophorese Anschließend wurden 12,5 μl des PCR-Produktes mit 9,4 μl H_2O , 2,5 μl NE Puffer 2 und 0,6 μl Pvu II zu einem Gesamtvolumen von 25 μl gemischt, zentrifugiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Pvu II schneidet das 485 bp-Fragment des Wildtyps gar nicht, bei der 26304-Variante entsteht eine Schnittstelle, so dass das Fragment in ein 396 bp und ein 89 bp langes Stück zerschnitten wird. Um die Fragmente zu trennen, wurden 25 μl Verdau mit 10 μl Laufpuffer gemischt und unter einer Spannung von 100 V 50 Minuten, dann unter einer Spannung von 80 V 75 Minuten

in 3% Agarosegel aufgetrennt. Als Größenvergleich diente 4,5 µl Marker V. Die DNA-Banden wurden mit dem Eagleeye sichtbar gemacht, photographiert und ausgewertet.

2.2.3.2 XRCC1 280His

PCR-Ansatz Zur Amplifikation des zweiten Polymorphismus im XRCC1 Gen, der in Exon 9 gelegen ist (Transition G ==> A), wurde ein 861 bp-Fragment amplifiziert. Je 1,5 µl Proben-DNA wurden 2,0 µl Puffer (Biotherm), 2,0 µl dNTPs, 0,5 µl Primer F (siehe Tabelle 2.5), 0,5 µl Primer R (siehe Tabelle 2.5), 0,2 µl Biotherm Taq-Polymerase, 1,2 µl MgCl₂ (25 mMol), 13,6 µl H₂O zu einem Mastermix mit dem Gesamtvolumen von 21,5 µl gemischt, zentrifugiert und im Cyclyer amplifiziert.

Cyclyer-Programm Temp. 1: 94°C 2 min; Temp. 2: 94°C 40 sec; Temp. 3: 68°C 40 sec; Temp. 4: 72°C 2 min; Temp. 5: 72°C 7 min; 30 Zyklen.

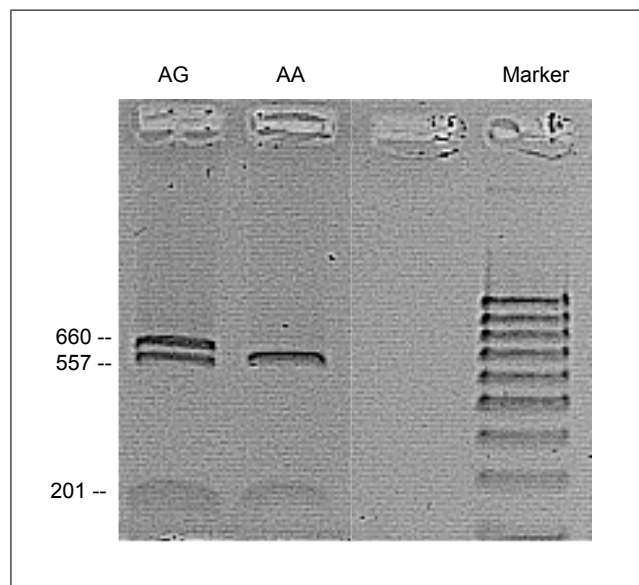


Abbildung 2.2: XRCC1 280-RFLP

PCR-Kontrolle Zur Kontrolle des Amplifikats wurden 7 µl des PCR-Produktes mit 10 µl Laufpuffer in 2,5% Agarose-Gel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Es liefen 4,5 µl 100 bp-Marker bei 120 V 40 Minuten mit.

Verdau und Elektrophorese Anschließend wurden 10 µl des PCR-Produktes mit 7,5 µl H₂O, 2,0 µl NE-Puffer 4 und 0,5 µl Pvu I zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt, zentrifugiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Das Fragment besitzt eine invariante Schnittstelle. Die A-Variante verliert eine Schnittstelle der Restriktionsendonuclease, so dass in der homozygoten Variante zwei Fragmente der Längen 660 bp und 201 bp entstehen, beim Wildtyp (GG) aber drei Fragmente der Längen 597 bp, 201 bp und 63 bp. Um die Fragmente zu trennen, wurden 20 µl Verdau mit 10 µl Laufpuffer gemischt und unter einer Spannung von 120 V 70 Minuten in 2,5% Agarosegel aufgetrennt. Als Größenvergleich diente 7,5 µl Hpa II-Marker. Die DNA-Banden wurden mit dem Eagle Eye sichtbar gemacht und photographiert.

2.2.3.3 XRCC1 Arg399

PCR-Ansatz Der dritte untersuchte Polymorphismus des XRCC1-Gens liegt in Exon 10 (Transition von G nach A). Um ihn zu identifizieren, wurde ein 871 bp langes Fragment amplifiziert. 2,5 µl Puffer (Biotherm) wurden mit 2,5 µl dNTPs, 0,7 µl Primer F, 0,7 µl Primer R, 0,15 µl Biotherm Taq Polymerase, 1,9 µl MgCl₂ (25 mMol) und 16,55 µl H₂O zu 25 µl Gesamtvolumen gemischt und 1 µl Proben-DNA zugeführt.

Cycler-Programm Temp. 1: 94°C 2 min; Temp. 2: 94°C 30 sec; Temp. 3: 61°C 35 sec; Temp. 4: 72°C 30 sec; Temp. 5: 72°C 7 min; 30 Zyklen.

PCR-Kontrolle Die PCR-Kontrolle erfolgte bei 80 V in 60 Minuten. 7 µl PCR-Produkt und 10 µl Laufpuffer wurden auf 1% Agarosegel aufgetragen; mit 4,5 µl 100 bp-Marker wurde die Fragmentlänge überprüft.

Verdau und Elektrophorese Die Restriktionsendonuclease Nci 1 schneidet das bei der PCR entstandene 871 bp lange Fragment des Arg/Arg-Wildtyps an zwei, in der Gln/Gln-Variante aber nur an einer Stelle. Die Schnittstelle nach 278 bp ist invariant und dient somit als Kontrolle. 12,5 µl PCR-Produkt, 9,4 µl H₂O, 2,5 µl NE Puffer 4 wurden mit 0,6 µl Nci 1 in einem Gesamtvolumen von 25 µl bei 37°C über Nacht inkubiert und danach in 3%igem Agarosegel mit 10 µl Laufpuffer 60 Minuten bei 120 V laufen gelassen. Als Längenvergleich dienten 4,5 µl 100 bp-Marker.

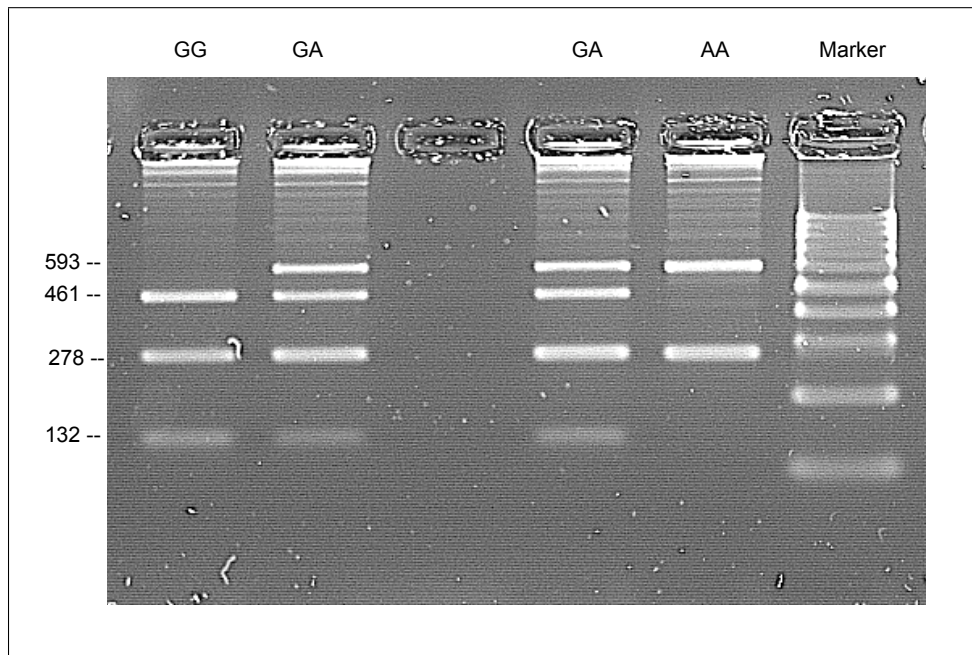


Abbildung 2.3: XRCC1 399-RFLP

2.2.4 PCR-RFLP-Tests für XPD-Polymorphismen

2.2.4.1 XPD 199Met + 312Asn

PCR-Ansatz Zur Identifizierung dieser beiden Polymorphismen wurde ein Doppelverdau durchgeführt. Ein 757 bp langes Fragment, das die Lokalisationen beider Polymorphismen enthielt, wurde amplifiziert. Für den Mastermix wurden je 0,5 µl Probe, 2,0 µl 10 X-Puffer (Biotherm), 2,0 µl dNTPs, 0,5 µl Primer XPD 22872 F (siehe Tabelle 2.6), 0,5 µl Primer XPD 23952R, 0,2 µl Biotherm Taq-Polymerase, 1,0 µl MgCl₂ (50 mMol), 3,0 µl DMSO (als adjuvantes Detergens) und 10,8 µl H₂O zu 20,5 µl Gesamtvolumen zusammengefügt und mit folgendem Cyclyer-Programm bearbeitet.

Cyclyer-Programm Temp. 1: 94°C 2 min; Temp. 2: 96°C 25 sec; Temp. 3: 69°C 25 sec; Temp. 4: 72°C 1 min; Temp. 5: 72°C 7 min; 30 Zyklen.

PCR-Kontrolle Um zu kontrollieren, ob eine Vervielfältigung stattfand, wurden 7 µl PCR-Produkt mit 10 µl Laufpuffer in 1% Agarosegel bei 120 V 30 min in der Elektro-

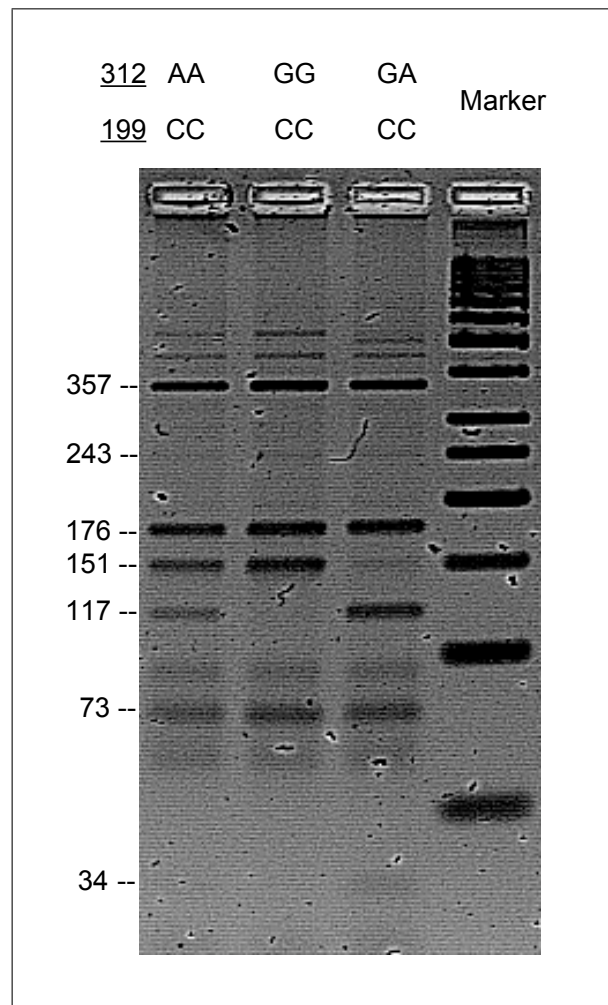


Abbildung 2.4: XPD 199/312-Doppel-RFLP

phoresekammer laufen gelassen. Die Fragmentgröße wurde mittels des mitgelaufenen Hpa II-Markers (4,5 μ l) ermittelt.

Doppelverdau und Elektrophorese Da beide Polymorphismen innerhalb des amplifizierten Abschnittes lagen, konnte ein Doppelverdau durchgeführt werden. Durch die Mutation von C nach G entfällt im Kodon 199 die Schnittstelle für das Enzym Mbo I. Im Kodon 312 hingegen entsteht durch die Mutation von G nach A eine neue Schnittstelle für das Enzym Sty I. Es bilden sich charakteristische Bandenmuster für jedwede Kombination von Wildtyp199/Wildtyp312 bis Variante199/Variante312. Für den Verdau wurden 10 μ l PCR-Produkt mit 6,9 μ l H₂O, 2 μ l NE-Puffer 3, 0,5 μ l Mbo I (5000 U/ml), 0,4 μ l Sty I (10000 U/ml) und 0,2 μ l BSA (25%) jeweils zu einem Gesamtvolumen von 20 μ l vereinigt, gemischt und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die Trennung der Fragmente erfolgte am nächsten Tag, als 25 μ l Verdau mit 10 μ l Laufpuffer in einem 3% Agarosegel bei 120 V für 80 Minuten im elektrischen Feld liefen. Als Längenmaßstab war z.B. 4,5 μ l Hpa II Marker geeignet.

2.2.4.2 XPD 751Gln

PCR-Ansatz Für den dritten SNP im XPD-Gen, dem in Exon 23 gelegenen XPD 751Gln-Polymorphismus, wurde ein 734 bp langes Fragment amplifiziert. Als Mastermix wurden 2,0 μ l Puffer (Biotherm), 2,0 μ l dNTPs, 0,5 μ l Primer XPD 35844 F, 0,5 μ l Primer XPD 36560 R, 0,2 μ l Biotherm Taq Polymerase und 1,0 μ l MgCl₂ (50 mMol) mit 13,8 μ l H₂O zu 20 μ l Gesamtvolumen gemischt. 0,5 μ l Proben-DNA wurden zugefügt und bei folgendem Cycler-Programm vervielfältigt.

Cycler-Programm Temp. 1: 94°C 2 min; Temp. 2: 96°C 25 sec; Temp. 3: 66°C 25 sec; Temp. 4: 72°C 1 min; Temp. 5: 72°C 7 min; 30 Zyklen.

PCR-Kontrolle 7 μ l des PCR-Produktes wurden mit 10 μ l Laufpuffer in 1% Agarose bei 120 V 30 Minuten laufen gelassen, wobei 4,5 μ l 100 bp-Marker als Längenstandard dienten. Verdau und Elektrophorese 12,5 μ l PCR-Produkt wurden mit 9,4 μ l H₂O, 2,5 μ l NE Puffer 2 und 0,6 μ l Mbo II bei einem Gesamtvolumen von 25 μ l bei 37 °C über Nacht inkubiert. Durch den Basenaustausch ist in der Variante eine Schnittstelle der Restriktionsendonuclease Mbo II weggefallen. Am folgenden Tag wurden 25 μ l Verdau mit 10 μ l

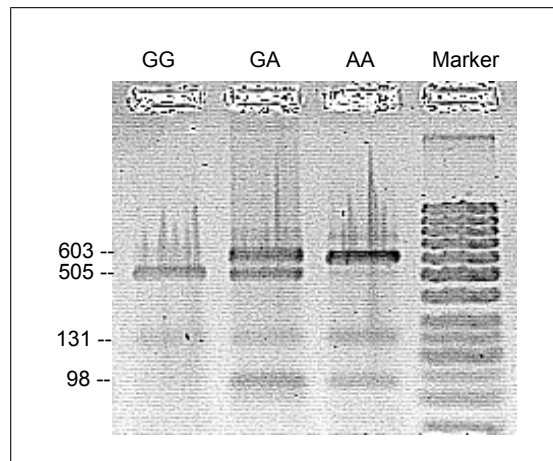


Abbildung 2.5: XPD 751-RFLP

Laufpuffer 80 min bei 120 V in 3% Agarosegel laufen gelassen, um die Teilfragmente zu trennen; 4,5 μ l Marker V dienten als Längenvergleich.

2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse wurde mit SPSS 11.0 durchgeführt. Anhand des Hardy-Weinberg-Gesetzes wurde bestimmt, ob die tatsächlichen Allelfrequenzen den erwarteten Allelfrequenzen entsprachen. Die Frequenzen wurden mittels Chi-Quadrat-Test oder bei kleinen Stichprobengrößen mittels exaktem Fisher-Test auf statistische Signifikanz geprüft. Die Haplotypenanalysen wurden mittels PHASE 2.1 (Stephens *et al.*, 2001) durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde bei beiden Analysen ein alpha-Fehler von $<0,05$ festgelegt.

XRCC1 Methodenüberblick	
XRCC1 194	
Basentausch	Arg 194 Trp, C ==> T (Transition Exon 6)
Fragmentlänge	485 bp
Primer	Primer F: 5'- GCC AGG GCC CCT CCT TCA A Primer R: 5'- TAC CCT CAG ACC CAC GAG T
Restriktionsenzyme	Pvu II
Erkennungssequenz	5'- CAG/CTG -3'
Fragmentlängen	wt CC 485 bp, hz CT 485/396/89 bp, mut TT 396/89 bp
Referenz	Sturgis et al. 1999
XRCC1 280	
Basentausch	Arg 280 His, G ==> A (Transition Exon 9)
Fragmentlänge	861 bp
Primer	Primer 27405F: 5' - TTG ACC CCC AGT GGT GCT AA Primer 28274R: 5' - CGC TGG GAC CAC CTG TGT T
Restriktionsenzyme	Pvu I
Erkennungssequenz	CGAT CGGC TAGC
Fragmentlängen	Invariante Schnittstelle: 201, wt AA 597/63, hz AG 660/597/63, mut AA 660
Referenz	Lee et al. 2001, Lunn et al., 1999
XRCC1 399	
Basentausch	Arg 399 Gln G ==> A (Transition Exon 10)
Fragmentlänge	871 bp
Primer	Primer F: 5' - CAA GTA CAG CCA GGT CCT AG Primer R : 5' - CCT TCC CTC ATC TGG AGT AC
Restriktionsenzyme	Nci I
Erkennungssequenz	CC SGGGGS CC
Fragmentlängen	Invariante Schnittstelle: 278 bp, wt GG 461/132 bp, hz AG 593/461/132 bp, mut AA 539 bp
Referenz	Sturgis et al., 1999

Tabelle 2.3: XRCC1 Polymorphismen Methodenüberblick

XPD Methodenüberblick	
XPD 199 und XPD 312	
Basentausch	Ile199Met, C==>G, Transversion in Exon 8 Asp312Asn, G==>A, Transition in Exon 10 (Doppelverdauer)
Fragmentlänge	757 bp
Primer	Primer 22872F: 5'-CTG TTG GTG GGT GCC CGT ATC TGT TGG TCT Primer 23952R: 5'-TAA TAT CCG GGC TAC CCC TGC AGC ACT TCC T
Restriktionsenzyme	Mbo I (199), Sty I (312)
Erkennungssequenz	GATCCTAG C CATATGGGATATC C
Fragmentlängen	Kontrollschnitt: 357 bp Polymorphismus 199: wt CC 176/73 bp, hz CG 249/176/73 bp, mut GG 249 bp Polymorphismus 312: wt GG 151 bp, hz GA 151/117/34 bp, mut AA 117/34 bp
Referenz	R.M.Lunn et al. 2000
XPD 751	
Basentausch	Lys751Gln, A==>C: Transversion in Exon 23
Fragmentlänge	734 bp
Primer	Primer 35844F : 5' - CCT CTC CCT TTC CTC TGT TC Primer 36560R : 5' - CAG GTG AGG GGG ACA TCT
Restriktionsenzyme	Mbo II
Erkennungssequenz	5' -GAAGA(N)8 -3'
Fragmentlängen	Kontrollschnitt: 131 bp, wt AA 505/98 bp, hz AC 603/505/98 bp, mut CC 603 bp
Referenz	R.M.Lunn et al. 2000

Tabelle 2.4: XPD Polymorphismen Methodenüberblick

3 Ergebnisse

3.1 Demographischer Vergleich der Kollektive

Für die vorliegende Analyse wurden zwischen 1995 und 2001 insgesamt 295 Patienten (270 Männer, 25 Frauen) mit einem Plattenepithelkarzinom des Larynx in die Studie eingeschlossen. In der Kontrollgruppe wurden insgesamt 350 Personen (289 Männer, 61 Frauen) untersucht, die nicht an einer Krebserkrankung litten. Die Eigenschaften dieser beiden Kollektive fasst Tabelle 3.1 zusammen.

	Larynxkollektiv (n=295)	Kontrollkollektiv (n=350)	χ^2	p-Wert
Alterstratifizierung				
<50	35,9% (106)	46,9% (164)	9,14	0,010
50 – 70	56,9% (168)	45,1% (158)		
>70	7,1% (21)	8,0% (28)		
Geschlecht				
Männlich	91,5% (270)	82,6% (289)	11,1	0,001
Weiblich	8,5% (25)	17,4% (61)		
Raucherstatus				
Raucher	93,9% (277)	48,3% (181)	138,4	<0,001
Nichtraucher	6,1% (18)	51,7% (169)		
Alkoholkonsum				
Ja	89,4% (262)	67,8% (99)	31,2	<0,001
Nein	10,6% (31)	32,1% (47)		
Keine Angabe	– (2)	– (204)		

Tabelle 3.1: Demographische Eigenschaften des Untersuchungskollektivs

Das Patientenkollektiv war im Mittel 61,3 Jahre alt (Standardabweichung $\pm 11,1$), die Kontrollen $63,2 \pm 12,2$. Die Geschlechterverteilung betrug etwa 9:1 (m:w) in der Gruppe

der Larynxkarzinom-Patienten und 8:2 bei den Kontrollen. Der Nichtraucheranteil der Kontrollen lag mit 48,3% deutlich höher im Vergleich zur Patientengruppe (6,1%).

Auch hinsichtlich des Alkoholkonsums unterschieden sich Patienten und Kontrollen deutlich voneinander. 10,6% (31) Larynxkarzinompatienten gaben an, gar keinen Alkohol zu trinken, 45,7% (134) Patienten tranken laut eigenen Angaben geringe Mengen Alkohol, 15,7% (46) Patienten konsumierten mäßige Mengen und 28,0% (82) gaben einen starken Alkoholkonsum an. Unter den Kontrollen tranken 32,2% (47) keinen, 33,6% (49) wenig, 24,0% (35) häufig und 10,0% (15) viel Alkohol. Diese Unterschiede zwischen den Kontrollpersonen und den Tumor-Patienten waren statistisch signifikant. Um für diese Unterschiede zu adjustieren wurden im Anschluss an die allgemeinen Vergleich der Genotypenhäufigkeiten, die Analysen auch in den entsprechend stratifizierten Subgruppen durchgeführt.

3.2 Unterteilung der Patientengruppe

Von den Larynxkarzinompatienten hatten 199 ein glottisches Karzinom, 70 ein supraglottisches Karzinom und 5 ein primär subglottisches Karzinom. In 21 Fällen war mehr als eine Ebene betroffen. Die Larynxkarzinome wurden in 2 Fällen (0,7%) als Tcis, in 83 Fällen (28,1%) als T1-Tumoren diagnostiziert, in 71 Fällen (24,1%) lagen T2-Tumoren, in 56 Fällen (19,0%) T3-Tumoren und in 59 Fällen (20%) T4-Tumoren vor. Hinsichtlich des Tumorstaging gemäß UICC-Stadieneinteilung wurden 141 Patienten (47,8%) als UICC 0-II eingestuft. UICC III-IV lag in 131 Fällen (44,4%) vor. Bei 23 (7,8%) waren keine Angaben zum Tumorstaging verfügbar.

3.3 Analyse der Häufigkeitsverteilungen

3.3.1 Häufigkeitsverteilung der XRCC1-Genotypen

Im XRCC1-Gen wurden SNPs in den Positionen 194, 280 und 399 analysiert. Die homozygote Variante His/His für den XRCC1-SNP 280 kam bei den untersuchten Larynxkarzinompatienten nicht vor, in der Kontrollgruppe trat er nur einmal (0,3%) auf. Wie in Tabelle 3.2 zu sehen ist, zeigen die Häufigkeitsverteilungen der verschiedenen Genotypen des XRCC1-Gens keine deutlichen Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollen. Die statistische Analyse mittels Chi-Quadrat-Test ergab für keinen der hier untersuchten SNPs einen signifikanten Unterschied.

	Wildtyp	Heterozygot	Variante	χ^2
XRCC1 194	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	
Patienten	87,1% (257)	12,2% (36)	0,7% (2)	0,873
Kontrollen	85,8% (290)	13,3% (45)	0,9% (3)	
XRCC1 280	Arg/Arg	Arg/His	His/His	
Patienten	89,7% (260)	10,3 % (30)	0 % (0)	0,508
Kontrollen	91,0% (304)	8,7% (29)	0,3% (1)	
XRCC1 399	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	
Patienten	44,9% (132)	42,9% (126)	12,2% (36)	0,954
Kontrollen	44,5% (150)	42,4% (143)	13,1% (44)	

Tabelle 3.2: Genotypenhäufigkeiten der XRCC1-Polymorphismen

Für die Berechnung des relativen Risikos mittels Odds-Ratio in einer 4-Felder-Tafel wurden nach dem rezessiven Modell jeweils der häufigere Genotyp (Wildtyp) und der heterozygote Genotyp zusammengefasst und der selteneren Variante gegenübergestellt. Für keinen der drei XRCC1-SNPs konnten signifikante Unterschiede zwischen Fall- und Kontrollkollektiv gefunden werden. Auch nach Anwendung des dominanten Modells mit Zusammenfassung von Heterozygoten und Variante fanden sich keine Unterschiede (Tabelle 3.3).

3 Ergebnisse

Polymorphismus	Larynx-CA (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
Rezessives Modell					
194 Trp/Trp	0,7% (2)	0,9% (3)	0,76	0,13 – 4,60	1,000
280 His/His	0% (0)	0,3% (1)	-	-	-
399 Gln/Gln	12,2% (36)	13,1% (44)	0,93	0,58 – 1,49	0,811
Dominantes Modell					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	12,9% (38)	14,2% (48)	0,89	0,57 – 1,41	0,644
280 Arg/His+His/His	10,3% (30)	9,0% (30)	1,17	0,69 – 1,99	0,588
399 Arg/Gln+Gln/Gln	55,1% (162)	55,5% (187)	0,98	0,72 – 1,35	0,934

Tabelle 3.3: Häufigkeiten der XRCC1-SNPs, dominantes und rezessives Modell

3.3.1.1 Subgruppenanalysen

Neben der Gruppenanalyse auf unterschiedliche Genotyphäufigkeiten zwischen Patienten und Kontrollen insgesamt wurden verschiedene Subgruppenanalysen durchgeführt. Es wurde mittels dominantem Modell auf Unterschiede der Genotypenhäufigkeiten zwischen Larynxkarzinompatienten und Kontrollkollektiv stratifiziert nach Alter, Geschlecht und Nikotin- bzw. Alkoholkonsum getestet. Die Altersstratifizierung erfolgte in drei Gruppen (<50 Jahre, 50-70 Jahre und >70 Jahre). In keiner der drei Altersgruppen zeigte sich für Träger des varianten Alleles ein statistisch signifikant erhöhtes oder verringertes Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, wie aus Tabelle 3.4 zu entnehmen.

Ebenso zeigten sich zwischen Männern und Frauen keine deutlichen Unterschiede im Erkrankungsrisiko für die verschiedenen Genotypen. Tabelle 3.6. zeigt die Ergebnisse der Analysen für Männer und Frauen. Da Frauen jedoch unabhängig von ihrem Genotyp seltener an einem Larynxkarzinom erkranken, ist die Gruppe der Patientinnen insgesamt sehr klein.

Auch in der Unterteilung nach Nikotinkonsum (Raucher/Nichtraucher), beziehungsweise in der Stratifizierung nach Menge des Nikotinkonsums (3 Gruppen: 1 = <25 PJ, 2 = 25-50 PJ, 3 = >50 PJ), wurden ähnliche Häufigkeitsverteilungen der Genotypen im Patienten- und Kontrollkollektiv gefunden. Für Träger des Allels His in Kodon 280 wurde bei Nichtrauchern mit einer OR=3,3 (CI 0,95-11,48) ein Hinweis für ein erhöhtes Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, ermittelt. Dieses Ergebnis ist allerdings

3 Ergebnisse

Variante	Larynx-Ca (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
<50 Jahre					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	15,2% (7)	16,7% (10)	0,89	0,31 – 2,57	1,000
280 Arg/His+His/His	11,6% (5)	11,9% (7)	0,98	0,29 – 3,32	1,000
399 Arg/Gln+Gln/Gln	39,1% (18)	56,1% (32)	0,50	0,23 – 1,11	0,113
50-70 Jahre					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	10,7% (21)	15,3% (27)	0,66	0,36 – 1,22	0,216
280 Arg/His+His/His	10,8% (21)	8,5% (15)	1,29	0,65 – 2,60	0,488
399 Arg/Gln+Gln/Gln	60,2% (118)	54,7% (98)	1,25	0,83 – 1,89	0,297
>70 Jahre					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	19,2% (10)	10,9% (11)	1,95	0,77 – 4,94	0,214
280 Arg/His+His/His	10,7% (4)	8,1% (8)	0,95	0,27 – 3,31	1,000
399 Arg/Gln+Gln/Gln	50,0% (26)	56,4% (57)	0,77	0,40 – 1,51	0,495

Tabelle 3.4: XRCC1-Varianten stratifiziert nach Alter

Variante	Larynx-Ca (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
Männer					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	12,6% (34)	15,7% (44)	0,78	0,48 – 1,26	0,329
280 Arg/His+His/His	10,9% (29)	8,7% (24)	1,29	0,73 – 2,29	0,389
399 Arg/Gln+Gln/Gln	55,0% (148)	55,2% (155)	0,99	0,71 – 1,39	1,000
Frauen					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	16% (4)	7,0% (4)	2,52	0,58 – 11,03	0,239
280 Arg/His+His/His	4% (1)	10,5% (6)	0,35	0,04 – 3,1	0,431
399 Arg/Gln+Gln/Gln	56,0% (14)	57,1% (32)	0,96	0,37 – 2,47	1,000

Tabelle 3.5: XRCC1-Varianten stratifiziert nach Geschlecht

3 Ergebnisse

Variante	Larynx-Ca (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
Nichtraucher					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	11,1% (2)	13,1% (22)	0,83	0,18 – 3,86	1,000
280 Arg/His+His/His	22,2% (4)	8,0% (13)	3,30	0,95 – 11,48	0,071
399 Arg/Gln+Gln/Gln	50,0% (9)	53,9% (98)	0,85	0,32 – 2,26	0,807
<25 PJ					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	15,1% (13)	11,6% (10)	1,35	0,56 – 3,28	0,655
280 Arg/His+His/His	6,0% (5)	11,2% (10)	0,50	0,16 – 1,53	0,283
399 Arg/Gln+Gln/Gln	60,5% (52)	59,5% (50)	1,04	0,56 – 1,92	1,000
25-50 PJ					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	11,9% (16)	21,7% (13)	0,49	0,22 – 1,10	0,086
280 Arg/His+His/His	13,7% (18)	8,8% (5)	1,66	0,58 – 4,71	0,469
399 Arg/Gln+Gln/Gln	51,1% (68)	55,7% (34)	0,831	0,45 – 1,53	0,643
>50 PJ					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	12,3% (7)	12,5% (3)	0,98	0,23 – 4,16	1,000
280 Arg/His+His/His	5,3% (3)	8,0% (2)	0,64	0,10 – 4,08	0,638
399 Arg/Gln+Gln/Gln	57,9% (33)	51,9% (14)	1,27	0,51 – 3,20	0,643

Tabelle 3.6: XRCC1-Varianten stratifiziert nach Nikotinkonsum

aufgrund der kleinen Stichprobengröße mit $p=0,071$ im exakten Test nach Fisher nicht signifikant.

Die Gruppe der nichtrauchenden Larynxkarzinompatienten, die dieses Allel tragen, ist mit 4 Personen sehr klein. Für Träger der anderen varianten Allele konnte in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum keine Veränderung des Risikos an einem Larynxkarzinom zu erkranken gefunden werden (siehe Tabelle 3.6). Auch im direkten Vergleich zwischen allen Rauchern und allen Nichtrauchern ergab sich für keinen der XRCC1-Polymorphismen ein signifikanter Unterschied im Erkrankungsrisiko.

In einer weiteren Subgruppenanalyse wurden die Personen, die Alkoholkonsum angeben, denjenigen gegenübergestellt, die Alkoholkonsum verneint hatten. In beiden Subgruppen konnten ähnliche Genotypenhäufigkeiten ermittelt werden. Die selteneren Allele kamen bei Larynxkarzinompatienten und Kontrollen in beiden Subgruppen jeweils etwa gleich häufig vor (siehe Tabelle 3.7). Allerdings lagen nur bei einem Teil der Kontrollen Angaben über den Alkoholkonsum vor, so dass dem Patientenkollektiv in dieser Analyse ein kleineres Kontrollkollektiv ($n=148$) gegenübergestellt wurde.

3 Ergebnisse

Variante	Larynx-Ca (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
Kein Alkoholkonsum					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	12,9% (4)	18,6% (8)	0,65	0,18 – 2,38	0,750
280 Arg/His+His/His	16,7% (5)	8,7% (4)	2,1	0,52 – 8,56	0,306
399 Arg/Gln+Gln/Gln	51,6% (16)	50,0% (23)	1,07	0,43 – 2,65	1,000
Alkoholkonsum					
194 Arg/Trp+Trp/Trp	13,0% (34)	17,4% (16)	0,71	0,37 – 1,36	0,300
280 Arg/His+His/His	9,3% (24)	14,6% (14)	0,60	0,30 – 1,22	0,177
399 Arg/Gln+Gln/Gln	55,2% (144)	54,9% (50)	1,01	0,63 – 1,63	1,000

Tabelle 3.7: XRCC1-Varianten stratifiziert nach Alkoholkonsum

Der Alkoholkonsum wurde nach den Angaben der Patienten weiter stratifiziert. Es wurde nach den Angaben der Befragten unterschieden zwischen geringem, mäßigem und starkem Alkoholkonsum. Auch in diesen Subgruppen gab es bei den Trägern des jeweils selteneren (varianten) Allels etwa gleich viele Patienten und Kontrollen (diese Ergebnisse sind nicht tabellarisch dargestellt). Demnach konnte für diese Allelträger auch in den nach Alkoholkonsum qualitativ und quantitativ stratifizierten Subgruppen kein erhöhtes oder erniedrigtes Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, ermittelt werden.

In allen Subgruppen wurden auch Analysen jeweils nach dem additiven Modell und nach dem rezessiven Modell durchgeführt, ohne dass statistisch signifikante Unterschiede ermittelt worden wären.

Zusammengefasst ergaben sich auch in der Subgruppenanalyse für keinen der drei XRCC1-SNPs im Chi-Quadrat-Test signifikante Unterschiede in der Verteilung der Genotypen.

3.3.2 Häufigkeitsverteilung der XPD-Genotypen

Im XPD-Gen wurden Punktmutationen in Positionen 199, 312 und 751 untersucht. Tabelle 3.8 zeigt die Häufigkeitsverteilung der Genotypen nach dem additiven Modell. In Position 199 wurde lediglich der Wildtyp Ile/Ile gefunden. Die Variante Met konnte weder im Patienten- noch im Kontrollkollektiv nachgewiesen werden und wird deswegen im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Bei XPD-312 kam der Wildtyp Asp/Asp in 39,6% der Fälle und 41,1% der Kontrolle vor. Heterozygote Asp/Asn fanden sich bei 45,7% (Larynxkarzinom) und 43,6% (Kontrollpatienten). Bei 14,7% der Karzinompatienten war die homozygote Variante Asn/Asn vertreten gegenüber 15,3% bei den Kontrollen. In Position 751 kam Lys/Lys bei 33,4% der Larynxkarzinompatienten und 36,2% der Kontrollen vor. 50,9% der Larynxkarzinompatienten bzw. 48,2% der Kontrollen waren heterozygot. Homozygot für die Variante Gln/Gln waren 15,7% der Fälle und 15,6% der Kontrollen. Wie aus Tabelle 3.8 ersichtlich, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

	Wildtyp	Heterozygot	Variante	χ^2
199	Ile/Ile	Ile/Met	Met/Met	
Patienten	100% (294)	0% (0)	0% (0)	
Kontrollen	100% (313)	0% (0)	0% (0)	-
312	Asp/Asp	Asp/Asn	Asn/Asn	
Patienten	39,6% (116)	45,7% (134)	14,7% (43)	0,873
Kontrollen	41,1% (129)	43,6% (137)	15,3% (48)	
751	Lys/Lys	Lys/Gln	Gln/Gln	
Patienten	33,4% (96)	50,9% (146)	15,7% (45)	0,759
Kontrollen	36,2% (123)	48,2% (164)	15,6% (53)	

Tabelle 3.8: Genotypenhäufigkeiten der XPD-Polymorphismen

Wie bei XRCC1 wurden auch bei den XPD-SNPs zur Berechnung der Odds-Ratio die Heterozygoten einmal zu dem häufigeren Genotyp (rezessives Modell) und einmal zur selteneren Variante (dominantes Modell) zugerechnet. Nach beiden Verfahren ergab sich für keinen der hier untersuchten SNPs ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.9.

3 Ergebnisse

Polymorphismus	Larynx-CA (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
Rezessives Modell					
312 Asn/Asn	14,7% (43)	15,3% (48)	0,95	0,61 – 1,49	0,910
751 Gln/Gln	15,7% (45)	15,6% (53)	1,01	0,65 – 1,55	1,000
Dominantes Modell					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	60,4% (177)	58,9% (185)	1,06	0,77 – 1,47	0,741
399 Arg/Gln+Gln/Gln	66,6% (191)	63,8% (217)	1,13	0,81 – 1,57	0,502

Tabelle 3.9: Häufigkeiten der XPD-SNPs, dominantes und rezessives Modell

3.3.2.1 Subgruppenanalysen

Auch für XPD wurde mittels dominantem Modell auf Unterschiede der Genotypenhäufigkeiten zwischen Larynxkarzinompatienten und Kontrollkollektiv stratifiziert nach Alter, Geschlecht, Nikotin- und Alkoholkonsum getestet.

Weder weibliche noch männliche Träger der varianten Allele von XPD 312 und XPD 751 hatten ein von homozygoten Wildtypallelträgern abweichendes Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken (Tabelle 3.10).

Variante	Larynx-Ca (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
Männer					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	59,1% (159)	57,8% (149)	1,06	0,75 – 1,50	0,791
751 Lys/Gln+Gln/Gln	65,4% (172)	62,9% (176)	1,12	0,79 – 1,59	0,591
Frauen					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	75,0% (18)	64,3% (36)	1,67	0,57 – 4,88	0,439
751 Lys/Gln+Gln/Gln	79,2% (19)	68,3% (41)	1,76	0,57 – 5,43	0,426

Tabelle 3.10: XPD-Varianten stratifiziert nach Geschlecht

Auch in den verschiedenen Altersgruppen (<50 Jahre, 50-70 Jahre und >70 Jahre) kamen die varianten Allele bei Larynxkarzinompatienten und im Kontrollkollektiv jeweils in ähnlichen Häufigkeiten vor. Wie Tabelle 3.11 zeigt, konnten hier ebenfalls keine signifikanten Unterschiede gefunden werden.

Aufgrund des starken Einflusses von Nikotinkonsum auf die Wahrscheinlichkeit, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, wurden die Nichtraucher separat betrachtet. Auch

3 Ergebnisse

Variante	Larynx-Ca (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
<50 Jahre					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	63,0% (29)	55,9% (33)	1,34	0,61 – 2,96	0,550
751 Lys/Gln+Gln/Gln	68,9% (31)	64,4% (38)	1,22	0,54 – 2,80	0,679
50-70 Jahre					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	60,2% (118)	57,4% (93)	1,12	0,74 – 1,71	0,666
751 Lys/Gln+Gln/Gln	66,3% (126)	63,8% (113)	1,12	0,73 – 1,71	0,662
>70 Jahre					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	58,8% (30)	63,4% (29)	0,82	0,41 – 1,66	0,596
751 Lys/Gln+Gln/Gln	65,4% (34)	63,5% (66)	1,09	0,54 – 2,18	0,861

Tabelle 3.11: XPD-Varianten stratifiziert nach Alter

hier zeigten sich ähnliche Häufigkeiten der Allele. Die große Gruppe der Raucher wurde weiter unterteilt nach der Menge des Nikotinkonsums (<25 PJ, 25-50 PJ, >50 PJ). In keiner dieser Subgruppen konnte für heterozygote und homozygote Genvarianten ein verringertes oder erhöhtes Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, gefunden werden (Tabelle 3.12).

Bei den Personen, die Alkoholkonsum verneinten, zeigte sich sowohl für Träger von XPD 312Asn als auch für Träger von XPD 751Gln erhöhte Risiken, an einem Larynxkarzinom zu erkranken. Für die Variante 312Asn fanden wir ein 2,7-fach erhöhtes Risiko (OR=2,67; CI=1,01-7,02), für Träger der Variante in Kodon 751 ein 2,5-fach erhöhtes Risiko (OR=2,51; CI=0,92-6,84). Beide Ergebnisse sind jedoch mit $p=0,061$, bzw. $p=0,91$ im exakten Test nach Fisher statistisch nicht signifikant (Tabelle 3.13). Bei den Patienten mit Alkoholkonsum wurden keine Veränderungen des Risikos in Abhängigkeit von den genetischen Polymorphismen gefunden.

Zusammenfassend zeigen sich in den Analysen nach Geschlecht und Alter, Nikotinkonsum und Alkoholkonsum keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Verteilung der Varianten zwischen Kontroll- und Fallkollektiv. Somit konnte auch in den Subgruppen für die Träger des jeweils selteneren Allels von XPD 312 und XPD 751 kein statistisch signifikant erhöhtes oder erniedrigtes relatives Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, ermittelt werden.

3 Ergebnisse

Variante	Larynx-Ca (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
Nichtraucher					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	66,6% (12)	61,9% (96)	1,23	0,44 – 3,45	0,801
751 Lys/Gln+Gln/Gln	61,1% (11)	63,5% (106)	0,90	0,33 – 2,46	1,000
<25 PJ					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	58,8% (50)	53,8% (43)	1,23	0,66 – 2,28	0,533
751 Lys/Gln+Gln/Gln	70,9% (61)	67,0% (59)	1,20	0,63 – 2,28	0,625
25-50 PJ					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	57,1% (76)	61,4% (35)	0,84	0,44 – 1,58	0,632
751 Lys/Gln+Gln/Gln	64,8% (83)	63,3% (38)	1,07	0,56 – 2,02	0,871
>50 PJ					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	68,4% (39)	50,0% (11)	2,17	0,79 – 5,92	0,192
751 Lys/Gln+Gln/Gln	65,5% (36)	56,0% (14)	1,50	0,57 – 3,91	0,461

Tabelle 3.12: XPD-Varianten stratifiziert nach Nikotinkonsum

Variante	Larynx-Ca (n)	Kontrollen (n)	OR	95%-CI	p-Wert
Kein Alkoholkonsum					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	71,0% (22)	47,8% (48)	2,67	1,01 – 7,02	0,061
751 Lys/Gln+Gln/Gln	72,4% (21)	51,1% (23)	2,51	0,92 – 6,84	0,091
Alkoholkonsum					
312 Asp/Asn+Asn/Asn	59,2% (154)	58,8% (47)	1,02	0,61 – 1,70	1,000
751 Lys/Gln+Gln/Gln	65,6% (168)	61,5% (58)	1,20	0,74 – 1,95	0,532

Tabelle 3.13: XPD-Varianten stratifiziert nach Alkoholkonsum

3.3.3 Genvariationen und Tumoreigenschaften

Um mögliche Einflüsse der SNPs auf die Tumorlokalisierung und die Tumorausdehnung zu untersuchen, wurde innerhalb des Patientenkollektivs nach Tumorlokalisierung und Staging zum Zeitpunkt der Diagnosestellung stratifiziert. Dabei wurden die Genotypen in den jeweiligen Subgruppen einander gegenübergestellt.

	Wildtyp	Heterozygot	Variante	p-Wert
XRCC1 194				
Supra- bzw. epiglottisch	Arg/Arg 91,4% (64)	Arg/Trp 8,6% (6)	Trp/Trp 0% (0)	0,849
Glottisch	85,4% (170)	13,6% (27)	1,0% (2)	
Subglottisch	80,0% (4)	20,0% (1)	0% (0)	
Mehr als eine Ebene betroffen	90,5% (19)	9,5% (2)	0% (0)	
XRCC1 280				
Supra- bzw. epiglottisch	Arg/Arg 89,9 % (62)	Arg/His 10,7% (7)	His/His 0% (0)	0,374
Glottisch	88,7% (173)	11,3% (22)	0% (0)	
Subglottisch	80,0% (4)	20,0% (1)	0% (0)	
Mehr als eine Ebene betroffen	100,0% (21)	0% (0)	0% (0)	
XRCC1 399				
Supra- bzw. epiglottisch	Arg/Arg 45,7% (32)	Arg/Gln 47,5% (32)	Gln/Gln 8,6% (6)	0,664
Glottisch	45,7% (91)	41,2% (82)	13,1% (26)	
Subglottisch	60,0% (3)	20,0% (1)	20,0% (1)	
Mehr als eine Ebene betroffen	30,0% (6)	55,0% (11)	15,0% (3)	
XPD 312				
Supra- bzw. epiglottisch	Asp/Asp 38,6% (27)	Asp/Asn 48,6% (34)	Asn/Asn 12,9% (9)	0,984
Glottisch	40,6% (80)	44,7% (88)	14,7% (29)	
Subglottisch	40,0% (2)	40,0% (2)	20,0% (1)	
Mehr als eine Ebene betroffen	33,3% (7)	47,6% (10)	19,05 (4)	
XPD 751				
Supra- bzw. epiglottisch	Lys/Lys 30,4% (21)	Lys/Gln 58,0% (40)	Gln/Gln 11,6% (8)	0,647
Glottisch	34,7% (67)	48,7% (94)	16,6% (32)	
Subglottisch	40,0% (2)	60,0% (3)	0% (0)	
Mehr als eine Ebene betroffen	30,0% (6)	45,0% (9)	25,0% (5)	

Tabelle 3.14: Genotypen und Tumorlokalisierung

Bezüglich der Tumorlokalisierung wurde zwischen supra- bzw. epiglottisch, glottisch, subglottisch lokalisierten Tumoren und Tumoren, die mehr als eine Ebene tangierten, un-

terschieden, da die Exposition gegenüber den Noxen des Zigarettenrauches von der Lokalisation des Epithels abhängt. Somit könnten Veränderungen der DNA-Reparaturkapazität das Risiko, an einem Larynxkarzinom mit spezieller Lokalisation zu erkranken, modifizieren. Glottische Tumoren waren im Kollektiv der Larynxkarzinompatienten am häufigsten vertreten. Sowohl die Genotypen der XRCC1-Polymorphismen in Kodon 194, 280 und 399 als auch diejenigen der XPD-Polymorphismen 312 und 751 kamen jedoch in allen vier Tumorlokalisationen mit ähnlicher Häufigkeitsverteilung vor (Tabelle 3.14).

Unter der Vorstellung, dass Veränderungen der DNA-Reparatur einen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Fortschreitens eines Tumors haben könnten, wurden die Tumoren nach dem Staging zum Zeitpunkt der Diagnosestellung in UICC 0-II und UICC III-IV unterteilt. Die homozygote Variante XPD 312 kam bei den fortgeschrittenen Tumoren häufiger als bei den begrenzten Tumoren vor (17% vs. 9%). Der Unterschied in der Verteilung der Genotypen war jedoch nicht signifikant ($p=0,098$). In beiden Gruppen konnte sonst eine ähnliche Verteilung der Genotypen ermittelt werden. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.15.

	Wildtyp	Heterozygot	Variante	p-Wert
XRCC1 194	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	0,627
UICC 0-II	87,2% (123)	12,1% (17)	0,7% (1)	
UICC III-IV	87,8% (115)	12,2% (16)	0% (0)	
XRCC1 280	Arg/Arg	Arg/His	His/His	0,215
UICC 0-II	87,8% (122)	12,2% (17)	0% (0)	
UICC III-IV	93,0% (119)	7,0% (9)	0% (0)	
XRCC1 399	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	0,531
UICC 0-II	46,1% (65)	42,6% (60)	11,3% (16)	
UICC III-IV	40,0% (52)	45,4% (59)	14,6% (19)	
XPD 312	Asp/Asp	Asp/Asn	Asn/Asn	0,098
UICC 0-II	45,3% (63)	45,3% (63)	9,4% (13)	
UICC III-IV	36,6% (48)	45,8% (60)	17,6% (23)	
XPD 751	Lys/Lys	Lys/Gln	Gln/Gln	0,292
UICC 0-II	37,5% (51)	50,7% (69)	11,8% (16)	
UICC III-IV	31,3% (40)	50,5% (65)	18,0% (23)	

Tabelle 3.15: Genotypen und Tumorstaging

3.3.4 Zusammenhang mit Schadstoffexposition

Innerhalb des Larxnkxkarzinomkollektivs wurden Daten zur beruflichen Schadstoffexposition erhoben. Alle Patienten, die eine berufliche Schadstoffexposition angegeben hatten, wurden den Patienten ohne diese Exposition gegenübergestellt. Es konnte für keine der untersuchten Genvariationen ein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Genotypen gefunden werden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.16 zusammengefasst.

Wildtyp	Heterozygot	Variante	p-Wert	
XRCC1 194	Arg/Arg	Arg/Trp	Trp/Trp	
Nicht schadstoffexponiert	86,5% (154)	12,4% (22)	1,1% (2)	0,511
Schadstoffexponiert	88,5% (100)	11,5% (13)	0% (0)	
XRCC1 280	Arg/Arg	Arg/His	His/His	
Nicht schadstoffexponiert	89,7% (157)	10,3% (18)	0% (0)	1,000
Schadstoffexponiert	89,2% (99)	10,8% (12)	0% (0)	
XRCC1 399	Arg/Arg	Arg/Gln	Gln/Gln	
Nicht schadstoffexponiert	42,1% (75)	44,9% (80)	12,9% (23)	0,598
Schadstoffexponiert	48,2% (54)	40,2% (45)	11,6% (16)	
XPB 312	Asp/Asp	Asp/Asn	Asn/Asn	
Nicht schadstoffexponiert	37,5% (66)	48,9% (86)	13,6% (24)	0,386
Schadstoffexponiert	42,5% (48)	40,7% (46)	16,8% (19)	
XPB 751	Lys/Lys	Lys/Gln	Gln/Gln	
Nicht schadstoffexponiert	33,5% (58)	52,6% (91)	13,9% (24)	0,491
Schadstoffexponiert	32,7% (36)	48,2% (53)	19,1% (21)	

Tabelle 3.16: Genotypen und Schadstoffexposition

3.3.5 Haplotypenanalyse für XRCC1

Um zu überprüfen, ob die Haplotypen bei Fällen und Kontrollen unterschiedlich verteilt sind, wurde mittels PHASE 2.1 eine Haploypenanalyse durchgeführt. Tabelle 3.17 zeigt die prozentualen Häufigkeiten der Haplotypen bei den Fällen und bei den Kontrollen. Ebenfalls angegeben ist der jeweilige Standardfehler. Die Kombination der drei Wildtypen 194Arg, 280Arg und 399Arg kommt erwartungsgemäss mit 53,2% am häufigsten vor. Die Kombinationen, in denen die Variante 280His enthalten ist, kommen entsprechend der geringen Häufigkeit dieses SNPs bei Fällen und Kontrollen sehr selten vor. Die Kombination der potenziellen Risiko-Allele XRCC1 194Arg/280His/399Gln kommt weder bei Fällen noch bei Kontrollen vor. Mit $p=0,53$ sind die Haplotypen bei Fällen und Kontrollen nicht statistisch signifikant unterschiedlich verteilt.

Haplotypen 194/280/399	Insgesamt	Kontrollen	Fälle
	Proz. Häufigkeiten (Standardfehler)	Proz. Häufigkeiten (Standardfehler)	Proz. Häufigkeiten (Standardfehler)
Arg/Arg/Arg	54,2 % ($\pm 0,3$)	54,5% ($\pm 0,2$)	53,9% ($\pm 0,4$)
Arg/Arg/Gln	33,9% ($\pm 0,2$)	33,7% ($\pm 0,1$)	34,1% ($\pm 0,3$)
Arg/His/Arg	4,7% ($\pm 0,2$)	5,1% ($\pm 0,1$)	4,3% ($\pm 0,3$)
Arg/His/Gln	0%	0%	0%
Trp/Arg/Arg	7,0% ($\pm 0,2$)	6,7% ($\pm 0,1$)	7,3% ($\pm 0,3$)
Trp/Arg/Gln	0,0% ($\pm 0,0$)	0%	0%
Trp/His/Gln	0,2% ($\pm 0,1$)	0,1% ($\pm 0,1$)	0,3% ($\pm 0,2$)

p-Wert Fälle vs. Kontrollen: 0,53

Tabelle 3.17: Haplotypenanalyse XRCC1

3.3.6 Haplotypenanalyse für XPD

In der Haplotypenanalyse der XPD-Allele mittels PHASE 2.1 wurden die Wahrscheinlichkeiten des gemeinsamen Vorkommens der Allele auf einem Chromosom errechnet. Da XPD 199 konstant war, ergaben sich nur vier Kombinationen (Tabelle 3.18). Die Wildtypkombination 199Ile/312Asp/751Lys war mit 52,6% mit der größten Wahrscheinlichkeit vertreten. Die Kombination der Risiko-Allel XPD 312Asn/751Gln folgt mit 30,6%. Eine unterschiedliche Verteilung zwischen Fall- und Kontrollkollektiv lag nicht vor ($p=0,81$).

Haplotypen	Insgesamt	Kontrollen	Fälle
	Proz. Häufigkeiten (Standardfehler)	Proz. Häufigkeiten (Standardfehler)	Proz. Häufigkeiten (Standardfehler)
CGA (Ile/Asp/Lys)	52,6% ($\pm 0,3$)	51,9% ($\pm 0,4$)	53,1% ($\pm 0,4$)
CGC (Ile/Asp/Gln)	9,7% ($\pm 0,3$)	10,5% ($\pm 0,4$)	9,1% ($\pm 0,5$)
CAA (Ile/Asn/Lys)	7,1% ($\pm 0,3$)	7,0% ($\pm 0,4$)	7,1% ($\pm 0,5$)
CAC (Ile/Asn/Gln)	30,6% ($\pm 0,3$)	30,5% ($\pm 0,4$)	30,7% ($\pm 0,5$)
p-Wert Fälle vs. Kontrollen: 0,81			

Tabelle 3.18: Haplotypenanalyse XPD

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit hat an einem großen Kollektiv (295 Karzinompatienten, 350 Kontrollen) untersucht, ob angeborene Variationen der DNA-Reparaturenzyme XRCC1 und XPD einen Einfluss auf das Risiko haben, an einem Larynxkarzinom zu erkranken. In dieser Studie konnte für keinen der untersuchten XRCC1-SNPs (194Trp, 280His, 399Gln) bzw. XPD-SNPs (199Met, 312Asn, 751Gln) eine Assoziation mit dem Risiko an einem Larynxkarzinom zu erkranken gezeigt werden.

4.1 Diskussion der Ergebnisse für XRCC1

Es fanden sich bei XRCC1 keine signifikanten Unterschiede in den Allelfrequenzen und der Verteilung der Genotypen zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv. Auch in den Subgruppenanalysen mit Fokussierung auf Alter, Geschlecht, Nikotinkonsum und Alkoholkonsum waren keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Patienten- und Kontrollkollektiv feststellbar. Darüber hinaus erwiesen sich die Polymorphismen in dieser Untersuchung als irrelevant hinsichtlich der Tumorlokalisierung und dem Staging zum Zeitpunkt der Diagnosestellung. Damit stehen diese Ergebnisse im Gegensatz zu vielen in vorangegangenen Studien gewonnenen Ergebnissen. Die bisherige Literatur zu diesem Thema zeigt jedoch kein einheitliches Bild. Zum Teil werden den einzelnen Genvariationen protektive Eigenschaften zugeschrieben, zum anderen wird über ein erhöhtes Risiko, an einem Karzinom zu erkranken, berichtet. Einige Studien stellen keine Unterschiede hinsichtlich der Suszeptibilität für Krebserkrankungen fest und entsprechen somit unseren Ergebnissen. Im Folgenden sollen die hier gewonnenen Ergebnisse vor dem Hintergrund der Literatur diskutiert werden.

4.1.1 Allelfrequenzen der XRCC1-SNPs

Die im Fallkollektiv und bei den Kontrollen gefundenen Allelfrequenzen wurden mit den in der Literatur für größere Kontrollkollektive beschriebenen Allelfrequenzen der SNPs verglichen. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4.1.

4 Diskussion

Allelfrequenzen	Ethnie	Fallzahlen	Referenz
XRCC1 194Trp			
0,07	Kaukasier	295	Patienten dieser Studie
0,08	Kaukasier	338	Kontrollen dieser Studie
0,09	Kaukasier	198	(Stern <i>et al.</i> , 2001)
0,07	Kaukasier	381	(Sturgis <i>et al.</i> , 1999)
0,06	Kaukasier	169	(Lunn <i>et al.</i> , 1999)
0,07	Kaukasier	234	(Duell <i>et al.</i> , 2001)
0,05	Kaukasier	96	(Butkiewicz <i>et al.</i> , 2001)
0,06	Kaukasier	463	(David-Beabes & London, 2001)
0,06	Afroamerikaner	166	(Duell <i>et al.</i> , 2001)
0,08	Afroamerikaner	247	(David-Beabes & London, 2001)
0,35	Asiaten (Chinesen)	166	(Shen <i>et al.</i> , 2000)
0,33	Asiaten (Koreaner)	172	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
0,34	Asiaten (Chinesen)	216	(Ratnasinghe <i>et al.</i> , 2001)
XRCC1 280His			
0,05	Kaukasier	290	Patienten dieser Studie
0,05	Kaukasier	334	Kontrollen dieser Studie
0,04	Kaukasier	198	(Stern <i>et al.</i> , 2001)
0,05	Kaukasier	96	(Butkiewicz <i>et al.</i> , 2001)
0,10	Asiaten (Koreaner)	172	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
0,07	Asiaten (Chinesen)	216	(Ratnasinghe <i>et al.</i> , 2001)
XRCC1 399Gln			
0,37	Kaukasier	294	Patienten dieser Studie
0,34	Kaukasier	337	Kontrollen dieser Studie
0,36	Kaukasier	198	(Stern <i>et al.</i> , 2001)
0,34	Kaukasier	380	(Sturgis <i>et al.</i> , 1999)
0,36	Kaukasier	381	(Duell <i>et al.</i> , 2001)
0,37	Kaukasier	169	(Lunn <i>et al.</i> , 1999)
0,35	Kaukasier	96	(Butkiewicz <i>et al.</i> , 2001)
0,36	Kaukasier	461	(David-Beabes & London, 2001)
0,18	Afroamerikaner	247	(David-Beabes & London, 2001)
0,15	Afroamerikaner	13	(Stern <i>et al.</i> , 2001)
0,14	Afroamerikaner	266	(Duell <i>et al.</i> , 2001)
0,25	Asiaten (Koreaner)	172	(Lee <i>et al.</i> , 2002)
0,24	Asiaten (Chinesen)	216	(Ratnasinghe <i>et al.</i> , 2001)
0,26	Asiaten (Chinesen)	166	(Shen <i>et al.</i> , 2000)

Tabelle 4.1: Allelfrequenzen der XRCC1-SNPs

Die in dieser Studie gefundenen Allelfrequenzen liegen in einem Bereich, der auch von anderen Arbeitsgruppen für Kaukasier beobachtet wurde. Bei Betrachtung der Allelfrequenzen fällt auf, dass deutliche Unterschiede zwischen den Ethnien bestehen. XRCC1 194Trp kommt bei Kaukasiern (0,05-0,09) und Afroamerikanern (0,06-0,08) ähnlich häufig vor. In asiatischen Kollektiven (Chinesen/Koreanern) ist es jedoch etwa fünf Mal so häufig (0,33-0,35). Auch 280His kommt bei Chinesen und Koreanern häufiger (0,07-0,10) vor als bei Kaukasiern (0,04-0,05). XRCC1 399Gln hingegen ist bei Kaukasiern wesentlich häufiger (0,34-0,37) als bei Asiaten (Chinesen/Koreaner) (0,24-0,26). Bei Afroamerikanern (0,14-0,18) ist es noch seltener zu finden.

4.1.1.1 XRCC1-194

Der Aminosäureaustausch Arg>Trp in Kodon 194 wurde als Risikofaktor für Krebserkrankungen diskutiert, da er sich in der Linkerregion befindet, die die DNA-Polymerase- β -Domäne von der Poly(ADP-ribose)polymerase-Domäne trennt. Somit ist dieser nicht konservative Aminosäureaustausch in einer strategisch wichtigen Position des Proteins gelegen. Tatsächlich ist eine höhere DNA-Reparaturkapazität für 194Trp belegt. Das Allel 194Trp war in einer Studie an peripheren Lymphozyten gesunder Kaukasier mit einer geringeren Häufigkeit von Chromosomenbrüchen assoziiert (Tuimala *et al.*, 2004). Wang *et al.* konnten zeigen, dass der Wildtyp 194Arg unter Exposition mit Bleomycin oder BDPE (Benzo(a)pyren-Diol-Epoxid) mit signifikant mehr Chromosomenbrüchen assoziiert war als die 194Trp-Variante (Wang *et al.*, 2003).

Diese *in vitro* gewonnenen Ergebnisse wurden in epidemiologischen Studien überprüft und konnten bestätigt werden. Sturgis *et al.* beobachteten in einer Fall-Kontroll-Studie an kaukasischen Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich für homozygote Träger des Wildtyps 194Arg/Arg ein erhöhtes Risiko (OR=1,3; CI=0,8-2,3). Das Risiko, im Bereich des Pharynx oder der Mundhöhle ein Karzinom zu entwickeln, wurde mit OR=2,5 (CI=1,2-4,9) angegeben (Sturgis *et al.*, 1999). In einer weiteren Studie an 334 Lungenkrebspatienten und 704 Kontrollen wurde bei Afroamerikanern für Heterozygote (194Trp/Arg) ebenfalls ein protektiver Einfluss im Vergleich zu 194Arg/Arg festgestellt (OR=0,4; CI=0,2-0,9) (David-Beabes & London, 2001). Eine Studie an chinesischen Minenarbeitern beschrieb für Träger von 194Trp unter Alkoholkonsumenten ein tendenziell geringeres Lungenkarzinomrisiko (Ratnasinghe *et al.*, 2001). In einer weiteren chinesischen Studie zeigte sich für Träger der 194Trp-Variante ein signifikant geringeres

Risiko, am Magenkarzinom zu erkranken (OR=0,5; CI=0,3-0,9) (Shen *et al.*, 2000). Han *et al.* zeigten eine gering signifikante Erniedrigung des Risikos für Brustkrebs bei Frauen, die 194Trp tragen (Han *et al.*, 2003), und bestätigten damit eine 2001 von Duell *et al.* gemachte Beobachtung (Duell *et al.*, 2001).

Neben den protektiven Eigenschaften, die die eingangs erwähnten phänotypischen Erkenntnisse bestätigen, wurden in epidemiologischen Studien auch gegenteilige Effekte gesehen. In einer Studie mit 98 kaukasischen Patienten wurde die 194Trp-Variante als (nicht signifikanter) Risikofaktor für die Entwicklung eines SCCHN-Karzinoms beschrieben (Olshan *et al.*, 2002). Chen *et al.* fanden in China, dass die 194Trp-Variante mit einem grenzwertig erhöhten Risiko vernüpft war, an Lungenkrebs zu erkranken (Chen *et al.*, 2002). Abdel-Rahan zeigte bei ägyptischen Trägern der Variante 194Trp ein erhöhtes Risiko, an kolorektalem Krebs zu erkranken (OR=2,56; CI=0,73-9,4) (Abdel-Rahman *et al.*, 2000). Bei kaukasischen Trägerinnen mindestens eines Allels von 194Trp wurde ein erhöhtes Risiko (OR=1,60; CI=0,89-2,97) für Brustkrebs beobachtet (Smith *et al.*, 2003). Diese Ergebnisse waren allerdings nicht signifikant.

Die Relevanz von XRCC1 194Trp als Risikofaktor oder als protektiver Faktor für die Entwicklung von Karzinomen wird in vielen Untersuchungen nicht bestätigt. Varzim *et al.* konnten bei kaukasischen Larynxkarzinompatienten weder protektive noch negative Zusammenhänge finden, was durch die vorliegende Arbeit bestätigt wird (Varzim *et al.*, 2003). Auch für Ösophaguskarzinome, Lungenkrebs, Magenkrebs und Blasenkrebs konnte in weiteren Studien kein signifikanter Unterschied gefunden werden (Butkiewicz *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2001, 2002; Sanyal *et al.*, 2004; Stern *et al.*, 2001).

Man kann somit feststellen, daß bezüglich einer Assoziation von XRCC1 194Trp mit der Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches bei kaukasischen Patienten widersprüchliche Ergebnisse vorliegen. Es konnten sowohl ein geringeres als auch ein erhöhtes Risiko gezeigt werden. Für die Entwicklung eines Larynxkarzinoms scheint dieser Polymorphismus laut derzeitiger Studienlage irrelevant zu sein, was durch unsere Ergebnisse bestätigt wird.

Die Ergebnisse bezüglich anderer Tumoren sind ebenfalls heterogen. Insgesamt wurde jedoch für Träger des Trp-Allels eher ein protektiver Einfluss auf Krebserkrankungen gesehen, wie die Metaanalyse von Hu *et al.* zeigt, die die Ergebnisse von 38 Fall-Kontroll-Studien zusammen-fasst (Hu *et al.*, 2005). Die meisten der zugrundeliegenden Untersuchungen wurden jedoch an Asiaten durchgeführt, bei denen das Trp-Allel viel häufiger als bei Kaukasiern vorkommt (siehe oben).

4.1.1.2 XRCC1-280

XRCC1 280His ist ein in allen Kollektiven relativ seltenes Allel und war bisher eher selten Forschungsgegenstand. Der aus dem Basentausch G>A resultierende Aminosäureaustausch Arg>His in Kodon 280 ist wie XRCC1 194Trp in der Linkerregion zwischen der DNA-Polymerase- β -Domäne und der Poly(ADP-ribose)polymerase-Domäne gelegen. Phänotypische Untersuchungen zur Relevanz fanden bei His-Trägern eine größere Instabilität der Chromosomen (Kiuru *et al.*, 2005). Eine andere Studie konnte keinen Einfluss auf Chromosomenaberrationen zeigen (Tuimala *et al.*, 2004). In epidemiologischen Studien wurde der Variante ein erhöhtes Risiko für das Lungenkarzinom (NSCLC) (OR=1,8; CI=1,0-3,4) und ein erhöhtes Brustkrebsrisiko (OR=1,8; CI=1,07-3,05) zugeschrieben (Moullan *et al.*, 2003; Ratnasinghe *et al.*, 2001). Kein signifikantes Risiko wurde für ALL, Blasenkrebs und das Ösophaguskarzinom beobachtet (Joseph *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2001; Stern *et al.*, 2001). Eine taiwanesishe Studie zeigte auch für Nasopharynxkarzinome kein erhöhtes Risiko (Cho *et al.*, 2003). In der Metaanalyse von Hu wurde bei 1688 Krebspatienten und 2129 Kontrollen für Träger des His-Allels ein signifikant erhöhtes Risiko gefunden, an einem Larynxkarzinom zu erkranken (Hu *et al.*, 2005). Für Kaukasier lagen bislang keine Ergebnisse bezüglich des Larynxkarzinoms vor.

In der vorliegenden Studie wurde für Träger des varianten Allels in Kodon 280 (280His) bei Nichtrauchern mit einer OR=3,3 (CI 0,95-11,48) ein erhöhtes Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, ermittelt. Dieses Ergebnis ist allerdings statistisch nicht signifikant ($p=0,071$), da aufgrund der Seltenheit des varianten Allels und der wenigen Nichtraucher unter den Larynxkarzinompatienten diese Untergruppe von Patienten sehr klein war ($n=4$). Um dieses Ergebnis zu prüfen, sind Studien mit mehr Teilnehmern notwendig, damit diese Untergruppe ausreichend groß wird. Die vorliegenden Ergebnisse entsprechen den in Taiwan gewonnenen Erkenntnissen, die eine epidemiologische Relevanz des Polymorphismus für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich eher in Frage stellen.

4.1.1.3 XRCC1-399

Eine Assoziation dieses Polymorphismus zu Krebserkrankungen wurde bislang am ausgiebigsten diskutiert. Sie wurde theoretisch angenommen, weil sich die Arg>Gln Substitution in Kodon 399 im C-terminalen Ende der PARP-Interaktions-Domäne in der BRCT-1 Region befindet. PARP interagiert mit XRCC1 durch seinen N-terminalen

Zinkfinger-Komplex. Da der 399Gln-Polymorphismus also in einer Region von XRCC1 liegt, die biologisch wichtige Domänen enthält, könnte das Tragen dieser Variante zu einer verminderten DNA-Reparaturkapazität führen (Lunn *et al.*, 1999). Der Polymorphismus könnte zu Veränderungen in der PARP-bindenden-Stelle führen.

In phänotypischen Studien konnte tatsächlich ein Einfluss auf die DNA-Reparaturkapazität gezeigt werden, obwohl der direkte Einfluss der Polymorphismen im XRCC1-Gen auf die Funktion des Proteins noch ungeklärt ist. In diesen Studien wurden Lymphozyten in der Zellkultur diversen Noxen ausgesetzt und dann das Ausmaß der DNA-Schädigung gemessen. Einheitlich wurde die Variante XRCC1 399Gln im Vergleich zum Wildtyp als DRC-verschlechternd beschrieben. Funktionsassays zeigten, dass Frauen, die 399Gln tragen, eher detektierbare Mengen an Aflatoxin B1-DNA (AFB1-DNA) aufweisen als diejenigen, die für den Wildtyp Arg/Arg homozygot sind (Lunn *et al.*, 1999). Lunn *et al.* konnten auch beobachten, dass Träger mindestens eines 399Gln-Allels eine höhere Wahrscheinlichkeit dafür hatten, messbare Mengen von AFB1-DNA-Addukten zu zeigen (Lunn *et al.*, 1999). Auch Matullo *et al.* fanden bei Nichtrauchern mit dem 399Gln-Allel mehr DNA-Addukte (Matullo *et al.*, 2001b). Unter Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE)-Belastung entstanden in 399Gln-Zellen mehr Chromosomenbrüche (Wang *et al.*, 2003), wenn auch keine direkte Erhöhung der BPDE-DNA-Addukte nachweisbar war (Pastorelli *et al.*, 2002). Nach Exposition mit Nitrosamin 4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), was hauptsächlich in Tabak vorkommt, zeigen Zellen mit dem 399Arg Wildtyp eine geringere Anzahl von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) als Zellen mit 399Gln-Genotyp (Abdel-Rahman & El-Zein, 2000).

In Lymphozytenassays beobachten, dass Zellen von gesunden Rauchern, die homozygot für das 399Gln Allel waren, etwas mehr SCE aufwiesen als Zellen von 399Arg homozygoten Individuen. Darüberhinaus fanden sich Hinweise für einen Gen-Dosis-Effekt für 399Gln und DNA-Addukte (Duell *et al.*, 2000). Taiwanische Patienten mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle (Oral squamous cell carcinoma = OSCC), die homozygot für die Variante 399Gln waren, hatten deutlich mehr p53-Mutationen als andere (Hsieh *et al.*, 2003). Des weiteren zeigte sich bei französischen Arbeitern der Vinylchlorid-Industrie ein Gen-Dosis-Zusammenhang zwischen p53-Mutationen und 399Gln (Li *et al.*, 2003). Das 399Gln-Allel bewirkt auch eine Hypersensitivität gegenüber ionisierender Strahlung (Hu *et al.*, 2001), die vermehrt zu Karzinomen führt (Au *et al.*, 2003). Alle diese Untersuchungen zeigen, dass die Variante 399Gln, besonders, wenn sie homozygot vorliegt, die DRC verschlechtert. Diese in der Zellkultur gewonnene Erkenntnisse wur-

den in epidemiologischen Studien an Kollektiven von Karzinompatienten überprüft und konnten häufig bestätigt werden.

In einer Fall-Kontroll-Studie von Sturgis et al. an 203 kaukasischen Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich und 424 Kontrollen zeigte sich für die 399Gln-Träger ein erhöhtes Risiko (OR=1,6; CI=0,9-2,6) (Sturgis *et al.*, 1999). Das Risiko für Raucher betrug sogar das 3,2-fache (OR=3,2; CI=1,3-7,9). Als Risikofaktor wurde 399Gln auch für das Bronchialkarzinom beschrieben: Divine et al. konnten zeigen, dass der XRCC1-399Gln-Polymorphismus das Risiko, an einem Adenokarzinom der Lunge zu erkranken, um das 2,5-fache (OR=2,5; CI=1,1-5,8) erhöht (Divine *et al.*, 2001). Bei Kaukasiern wuchs die Signifikanz unter Berücksichtigung von Alter und Rauchgewohnheiten auf OR=3,25 (CI=1,2-10,7). Park et al. untersuchten in ihrer Studie die Häufigkeit der XRCC1-399Gln-Genotypen bei 192 männlichen, rauchenden Lungenkrebspatienten und 135 gesunden Kontrollen. Ein signifikanter Zusammenhang ergab sich zwischen dem Vorkommen von Plattenepithelkarzinomen der Lunge und homozygoten Trägern der 399Gln-Variante (OR=3,3; CI=1,2-9,2). Bei den untersuchten Patienten mit relativ geringem Zigarettenkonsum (<40 PJ) fiel die Signifikanz mit OR=5,8 (CI=1,5-22,7) am größten aus (Park *et al.*, 2002). Auch als Risikofaktor für die kindliche ALL (Joseph *et al.*, 2005) und als unabhängiger Risikofaktor für Magen- und Kolonkarzinom spielen Polymorphismen im XRCC1-Gen eine Rolle: Abdel-Rahan zeigte bei ägyptischen Trägern der 399Gln-Variante ein erhöhtes Risiko, frühzeitig an kolorektalem Krebs zu erkranken (OR=3,98; CI=1,5-10,6). Interessanter Weise war die Assoziation umso stärker ausgeprägt, je jünger die Patienten bei Diagnosestellung waren (Abdel-Rahman & El-Zein, 2000).

Es wurden auch gegenteilige Effekte beobachtet. Zhou et al. fanden 2003 in einer großen Studie an 1091 kaukasischen Lungenkarzinompatienten und 1240 Kontrollen einen Zusammenhang zwischen Rauchgewohnheiten, Polymorphismen von DNA-Reparaturenzymen und dem Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken: XRCC1 399Gln zeigte zwar eine Risikoerhöhung bei Nichtrauchern (OR=2,4; CI=1,2-5,0), jedoch eine Risikoverringerung bei starken Rauchern (Zhou *et al.*, 2003). Dieser Zusammenhang wurde in einer weiteren Untersuchung bestätigt: In einer Studie an 334 Patienten und 704 Kontrollen wurde für 399 Gln/Gln ein - wenn auch nicht statistisch signifikanter - Hinweis dafür gefunden, dass es sich um einen protektiven Faktor für starke Raucher sowohl kaukasischer wie afroamerikanischer Abstammung handelt (David-Beabes & London, 2001). Eine weitere Studie mit 98 kaukasischen SCCHN-Patienten identifizierte 399Gln

als schwach protektiven Faktor (OR=0,6; CI=0,4-1,1) (Olshan *et al.*, 2002). Für Patienten mit Ösophaguskarzinomen wurde unter Berücksichtigung der Schadstoffexposition bei Alkohol-Konsumenten für die häufigere Variante 399Arg/Arg ein signifikant erhöhtes Risiko gefunden, an einem Ösophaguskarzinom zu erkranken (OR=2,78; CI=1,15-6,67) (Lee *et al.*, 2001).

Auch für AML-Patienten und Hautkrebspatienten konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit mindestens eines 399Gln-Allels protektive Effekte hat (AML: OR=0,44; CI=0,20-0,93) (Seedhouse *et al.*, 2002), (BCC: OR=0,7; CI=0,4-1,0; SCC: OR=0,6; CI=0,3-0,9) (Nelson *et al.*, 2002), was im deutlichen Widerspruch zu den phänotypischen Beobachtungen steht. Varzim *et al.* konnten in einem Kollektiv kaukasischer SCCHN-Patienten weder protektive noch risikoerhöhende Effekte erkennen (Varzim *et al.*, 2003), diese Befunde entsprechen somit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (OR für Arg/Gln und Gln/Gln: 1,07; CI=0,43-2,65). Weitere Studien zeigten ebenfalls keine Signifikanz für die Entwicklung eines Lungenkarzinoms, weder bei Kaukasiern (Butkiewicz *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007), noch bei asiatischen Lungenkrebspatienten (Chen *et al.*, 2002; Ratnasinghe *et al.*, 2001). Auch für Prostatakarzinome (Rybicki *et al.*, 2004) und Brustkrebs (Shu *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 2003) wurde kein Zusammenhang zwischen der XRCC1 399-Variante und dem Risiko, am jeweiligen Krebs zu erkranken, gefunden. Duell *et al.* fanden einen interessanten Unterschied zwischen afroamerikanischen und kaukasischen Brustkrebspatientinnen: Für Afroamerikanerinnen stellt demnach das Tragen eines 399Gln-Allels einen signifikanten Risikofaktor für Brustkrebs dar (OR=1,7; CI=1,1-2,4), nicht aber für kaukasische Patientinnen (OR=1,0; CI=0,8-1,4) (Duell *et al.*, 2001). Betrachtet man nur Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, so wurden diese in vier anderen Studien untersucht. Die oben erwähnte Arbeit von Olshan *et al.* war die einzige, die für die Variante Gln/Gln einen signifikant protektiven Effekt beschrieb Olshan *et al.* (2002). In der Metaanalyse von Hu *et al.* (Hu *et al.*, 2005) stellte sich Gln/Gln insgesamt als ein schwacher, wenn auch nicht signifikanter, Risikofaktor (OR 1,18; CI 0,81-1,58) dar.

Die bisher in epidemiologischen Studien erhobenen Ergebnisse fallen also unterschiedlich aus. Insgesamt wurde die 399Gln-Variante häufiger als schädlich, die 194Trp-Variante häufiger als protektiv beschrieben. Die 280His-Variante wurde seltener untersucht. In den vorangegangenen Studien stellte sie sich aber als irrelevant oder als Risikofaktor heraus. In den meisten epidemiologischen Studien wurden keine signifikanten Ergebnisse gewonnen. Dies entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit. Der vorliegenden Studie

zufolge hat keines der untersuchten varianten Allele von XRCC1, weder 194Trp, noch 280His noch 399Gln, einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Entwicklung eines Larynxkarzinoms.

Die Unterschiede zu den Ergebnissen anderer Autoren können u.a. in der Auswahl der Patienten begründet sein. Bei den anderen epidemiologischen Studien wurden selten isolierte Kollektive von Larynxkarzinompatienten untersucht. In den Kollektiven der SCCHN-Patienten sind Plattenepithelkarzinome aller Regionen des Kopf-Hals-Bereiches zusammengefasst. In der getrennten Auswertung der SCCHN nach Lokalisation des Tumors fand Surgis ein erhöhtes Risiko für Pharynxkarzinome. Zwar können alle Tumoren von DNA-schädigenden Agentien verursacht werden, die verschiedenen Gewebe sind Noxen aber unterschiedlich stark ausgesetzt, das Epithel des Larynx möglicherweise weniger als das Epithel des Oropharynx. Auch sind andere Risikofaktoren bei Tumoren unterschiedlichen Ursprungsgewebes von unterschiedlichem Gewicht. Und auch wenn sich die exogenen Risikofaktoren gleichen, müssen die genetischen Risikofaktoren zur Entwicklung von Karzinomen nicht identisch sein. Die Heterogenität der Ergebnisse legt nahe, dass die hier untersuchten genetischen Polymorphismen von XRCC1 einzeln eher irrelevant als Risikofaktor für das Larynxkarzinom in der kaukasischen Bevölkerung sind. Insgesamt tritt die genetische Prädisposition hinter den umweltbedingten Risiken zurück. Der Risikofaktor Nikotinkonsum steht im Vordergrund.

Die Unterschiede in den Ergebnissen beruhen auch auf den unterschiedlichen untersuchten Ethnien. Wie oben dargestellt, gibt es bezüglich der Häufigkeiten der SNPs beträchtliche ethnische Unterschiede. Viele der epidemiologischen Studien wurden mit asiatischen (chinesischen/koreanischen) Kollektiven gemacht. Die dort gewonnenen Ergebnisse lassen sich nicht auf Kaukasier übertragen, da sich schon die Allelfrequenzen in der gesunden Bevölkerung beträchtlich unterscheiden (siehe oben). Den Studien aus den USA liegen meist Mischpopulationen aus kaukasischen, afroamerikanischen und Patienten mit südamerikanischer Herkunft zugrunde. Bei getrennter Analyse werden die untersuchten Kollektive dann klein und Probleme hinsichtlich der statistischen Auswertbarkeit treten auf. In den Subgruppenanalysen werden die Fallzahlen zum Teil zu gering, um Einflüsse - besonders der seltenen Polymorphismen - statistisch aussagefähig zu untersuchen.

4.2 Diskussion der Ergebnisse für XPD

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen den XPD/ERCC2-SNPs in Position 199, 312 und 751 und dem Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, gezeigt werden. Auch in den Subgruppenanalysen nach Alter, Geschlecht, Nikotin- und Alkoholkonsum sowie Tumorlokalisierung und -Staging lagen keine statistisch signifikant unterschiedlichen Verteilungen der Genotypen vor.

Wie im Kapitel 1.2.1 der Einleitung erläutert, ist XPD ein zentrales Protein im Pathway der Nucleotid-Exzisionsreparatur, die wiederum Tabakrauch-induzierte Schäden der DNA beseitigt. Es wurde bereits mehrfach in Studien versucht, einen Zusammenhang zwischen den häufigsten Polymorphismen dieses Gens und der Wahrscheinlichkeit, an Tabakrauch-induzierten Tumoren zu erkranken, herzustellen. Allein 18 Studien untersuchen den Zusammenhang zwischen den XPD-Varianten 312/751 und der Wahrscheinlichkeit, an Lungenkrebs zu erkranken (Kiyohara & Yoshimasu, 2007). Diese Studien sind zu widersprüchlichen Ergebnissen gelangt.

4.2.1 Allelfrequenzen der XPD-SNPs

Die in dem Kontrollkollektiv gefundenen Allelfrequenzen wurden mit in der Literatur veröffentlichten Allelhäufigkeiten in Kontrollkollektiven verglichen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.2 zusammengestellt. Auffällig sind auch hier die deutlichen Unterschiede je nach untersuchter Ethnie. Die in dieser Studie gefundenen Allelfrequenzen sind mit denen vergleichbar, die von anderen Autoren in kaukasischen Kollektiven gefunden wurden.

Der Polymorphismus am Kodon 199 wurde weder bei Patienten noch bei Kontrollen nachgewiesen. Er ist aufgrund seiner Seltenheit wenig untersucht. Die veröffentlichten Frequenzen liegen bei 0,00-0,04 (Butkiewicz *et al.*, 2001; Shen *et al.*, 1998b). Wie in den Voruntersuchungen sind die Polymorphismen in Position 312 und 751 häufig und liegen wie in anderen größeren Kollektiven für 312Gln bei 0,38 (Patienten) bzw. 0,37 (Kontrollen). Für Kaukasier wurden Werte zwischen 0,33-0,44 angegeben. Dies spricht dafür, dass unser Kollektiv repräsentativ ist.

Ebenso entsprechen die für XPD 751Gln ermittelten Frequenzen (0,40 für Kontrollen) denen der Literatur. Hier wurden Häufigkeiten des selteneren Allels zwischen 0,34 und 0,42 ermittelt.

Allelfrequenzen	Ethnie	Fallzahlen	Referenz
XPD 199Met			
0,0	Kaukasier	293	Patienten dieser Studie
0,0	Kaukasier	314	Kontrollen dieser Studie
0,0	Kaukasier	31	(Lunn <i>et al.</i> , 2000)
0,0	Kaukasier	96	(Butkiewicz <i>et al.</i> , 2001)
XPD 312Asn			
0,38	Kaukasier	293	Patienten dieser Studie
0,37	Kaukasier	314	Kontrollen dieser Studie
0,33	Kaukasier	313	(Sturgis <i>et al.</i> , 2002)
0,38	Kaukasier	118	(Vogel <i>et al.</i> , 2001)
0,44	Kaukasier	96	(Butkiewicz <i>et al.</i> , 2001)
0,33	Kaukasier	1240	(Zhou <i>et al.</i> , 2002)
0,37	Kaukasier	162	(Hou <i>et al.</i> , 2002)
0,36	Kaukasier	211	(Winsey <i>et al.</i> , 2000)
XPD 751Gln			
0,41	Kaukasier	287	Patienten dieser Studie
0,40	Kaukasier	314	Kontrollen dieser Studie
0,42	Kaukasier	79	(Matullo <i>et al.</i> , 2001a)
0,42	Kaukasier	96	(Butkiewicz <i>et al.</i> , 2001)
0,35	Kaukasier	687	(David-Beabes & London, 2001)
0,37	Kaukasier	1240	(Zhou <i>et al.</i> , 2002)
0,37	Kaukasier	162	(Hou <i>et al.</i> , 2002)
0,34	Kaukasier	496	(Sturgis <i>et al.</i> , 2000)
0,40	Kaukasier	211	(Winsey <i>et al.</i> , 2000)
0,36	Kaukasier	118	(Vogel <i>et al.</i> , 2001)
0,25	Afroamerikaner	234	(David-Beabes & London, 2001)
0,06	Asiaten (Koreaner)	163	(Park <i>et al.</i> , 2002)
0,09	Asiaten (Chinesen)	1020	(Liang <i>et al.</i> , 2003)

Tabelle 4.2: Allelfrequenzen der XPD-SNPs

4.2.1.1 XPD-199

Der Aminosäureaustausch von Isoleucin gegen Methionin in Kodon 199 basiert auf einer C nach G-Transversion im Gen. Dieser SNP ist sehr selten und konnte in dieser Arbeit weder im Patienten- noch im Kontrollkollektiv nachgewiesen werden: Es fanden sich weder homozygote noch heterozygote Allelträger. Auch in den vorliegenden Arbeiten aus der Literatur war dieser Polymorphismus extrem selten (Butkiewicz *et al.*, 2001). Eine Assoziation zu Erkrankungen, insbesondere zu Krebserkrankungen, wurde bislang nicht nachgewiesen.

4.2.1.2 XPD-312

Dieser SNP in Exon 10 (G ==> A) sorgt für einen Austausch von Asparaginsäure gegen Asparagin im Protein. Er ist mit etwa 40% in der kaukasischen Bevölkerung häufig vertreten. Dieser Genabschnitt ist bei Wirbeltieren evolutionär bewahrt: Mensch, Maus, Hamster und Fisch haben Asparaginsäure an der selben Stelle des Proteins (Butkiewicz *et al.*, 2001). Asparaginsäure scheint in dem Bereich des Proteins notwendig zu sein, denn diejenigen Spezies, die nicht in Position 312 Asparaginsäure haben, tragen es in Position 313.

Im Host Cell Reaktion Assay (HCR) zeigten Träger des varianten Allels eine verringerte DRC nach BPDE-Exposition (Spitz *et al.*, 2001) und nach UV-Exposition (Qiao *et al.*, 2002). Das sich aus diesen Beobachtungen ergebende Risiko zur Entwicklung von Karzinomen konnte in vorangegangenen epidemiologischen Arbeiten bestätigt werden. Das variante Allel zeigte sich als Risikofaktor für Lungenkrebs (OR=1,5; CI=1,1-2,0) (Zhou *et al.*, 2002). Dabei ergab sich besonders für Nichtraucher eine erhöhte Gefährdung (OR=3,4; CI=1,9-6,0), was auch in einer anderen Studie auffiel (OR=2,6; CI=1,1-6,8) (Hou *et al.*, 2002). Eine chinesische Studie fand an einem sehr umfangreichen Kollektiv heraus, dass homozygote Träger des varianten Allels ein deutlich erhöhtes Risiko hatten, an einem Lungenkarzinom zu erkranken (OR=10,3; CI=1,29-82,5). Für Plattenepithelkarzinome wuchs das Erkrankungsrisiko auf das 20-fache (OR=20,5; CI=2,25-179,05) (Liang *et al.*, 2003). In einer anderen Studie wurde die Interaktion zwischen Genotyp und Tabakrauchexposition genauer analysiert. Dabei konnte bestätigt werden, dass mit der Variante Asn assoziierte Lungenkrebsrisiko mit steigender Tabakrauchexposition abnahm (Zhou *et al.*, 2002). Gegenteilige Ergebnisse wurden von Butkiewicz *et al.* gewonnen. In ihrer Studie aus dem Jahr 2002 hatten homozygote Träger des Wildtyps

312Asp/Asp ein 1,9-fach erhöhtes Risiko, an einem NSCLC zu erkranken (Butkiewicz *et al.*, 2001).

Diese Ergebnisse konnten wir für das Larynxkarzinom nicht bestätigen. Es fand sich keine unterschiedliche Verteilung der Genotypen. Damit entsprechen unsere Ergebnisse anderen Studien an Lungenkrebspatienten und SCCHN-Patienten, in denen sich die Verteilung der Genotypen zwischen Fällen und Kontrollen auch nicht signifikant unterschied (Matullo *et al.*, 2006; Misra *et al.*, 2003; Popanda *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2005; Spitz *et al.*, 2001; Sturgis *et al.*, 2002; Vogel *et al.*, 2004; Zienolddiny *et al.*, 2006). In der Metaanalyse von Kiyohara, in der die Ergebnisse vieler epidemiologischer Studien zusammen betrachtet werden, wird für den Polymorphismus insgesamt kein signifikanter Zusammenhang zum Risiko, an einem Lungenkrebs zu erkranken, hergestellt (Kiyohara & Yoshimasu, 2007). In unserer Subgruppenanalyse fanden wir keinen Zusammenhang mit dem Rauchverhalten, jedoch einen angedeuteten Zusammenhang mit dem Alkoholkonsum. Bei den Personen, die Alkoholkonsum verneinten, fand sich für Asn-Träger ein 2,7-fach erhöhtes Risiko (OR=2,67; CI=1,01-7,02, p=0,061), an einem Larynxkarzinom zu erkranken. Da die meisten Larynxkarzinompatienten jedoch Alkohol zu sich nahmen und nur bei einem Teil der Kontrollen Angaben zum Alkoholkonsum vorlagen, war diese Gruppe sehr klein, je 22 Fälle und Kontrollen (71% vs 47%). Für die Variante XPD 312Asn trat noch ein anderer Zusammenhang auf: Sie kam homozygot bei fortgeschrittenen Tumoren häufiger als bei lokal begrenzten Tumoren vor. Die Patienten waren je nach Ausdehnung des Tumors zum Zeitpunkt der Diagnosestellung eingeteilt worden: Bei 141 Patienten (47,8%) war der Tumor in einem frühen Stadium diagnostiziert worden (UICC 0-II), bei 131 Patienten (44,4%) lag zu diesem Zeitpunkt schon ein fortgeschrittenes Tumorleiden vor (UICC II-IV). Von diesen Patienten waren 23 homozygot für XPD 312Asn, bei den Frühstadien nur 13 (17,6% vs. 9,4%). XPD 312Asn könnte, wenn es homozygot vorliegt, die DNA-Reparatur verschlechtern, und somit ein schnelles Fortschreiten des Tumors begünstigen. Der Unterschied in der Verteilung der Genotypen war jedoch nicht signifikant (p=0,098). Ein derartiger Zusammenhang ist bislang in anderen Studien nicht beschrieben worden.

4.2.1.3 XPD-751

Die Variante in Kodon 751 führt in der Domäne zur Interaktion mit p44 am C-Terminus des Proteins mit dem Austausch von Lysin gegen Glutamin eine Aminosäure mit anderen elektrischen Eigenschaften ein (Coin *et al.*, 1998).

Phänotypische Untersuchungen haben den Wildtyp als Risikogenotyp identifiziert. Der homozygote Wildtyp XPD 751Lys/Lys war mit einer verminderten Effektivität bei der Reparatur von Röntgenstrahlen-induzierten DNA-Schäden verknüpft (Lunn *et al.*, 2000). Andere Arbeitsgruppen haben den Comet-Assay an Lymphozyten von 40 Psoriasispatienten mit oder ohne BCC angewandt und stellten fest, dass das 751Lys-Allel mit einer größeren Zahl an UVC-induzierten Strangbrüchen assoziiert war (Moller *et al.*, 2000). Die Zahl der SCE und der Aflatoxin-DNA-Addukte wurde in Lymphozytenassays nicht beeinflusst (Duell *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu fanden Studien an größeren Kollektiven von gesunden Individuen, dass die DRC nach BPDE- oder UV-Exposition bei Trägern der Variante 751Gln verglichen mit dem Wildtyp verringert waren (Qiao *et al.*, 2002; Spitz *et al.*, 2001).

Aufgrund dieser *in vitro* gewonnenen Ergebnisse wurde der 751Gln-Polymorphismus in molekulargenetischen epidemiologischen Studien intensiv beleuchtet, jedoch ohne dass eindeutige oder signifikante Ergebnisse gewonnen werden konnten. Grundlage der Untersuchungen waren neben Zigarettenrauch-assoziierten Tumoren vor allem Hauttumoren. Hinweise auf Assoziationen gab es in beide Richtungen. In einer chinesischen Studie zeigte sich ein geringeres Lungenkrebs-Risiko für homozygote Träger der Variante Gln im Vergleich zum Lys-Wildtyp, was den phänotypischen Erkenntnissen entspricht (Shen *et al.*, 2005). Andererseits führte die homozygote Variante (Gln/Gln) zu einem grenzwertig höheren Risiko für SCCHN (OR=1,55; CI=0,96-2,52) (Sturgis *et al.*, 2000). Eine Erhöhung des Risikos für Lungentumoren wurde in zwei Studien bei Nichtrauchern für das Gln-Allel festgestellt (Hou *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2002). Die Studie von Zhou u.a. ist aufgrund ihrer hohen Fallzahl erwähnenswert. Es wurden 1092 Lungenkarzinom-Patienten und 1240 Kontrollen eingeschlossen. Das hier gefundene Risiko war mit einer Odds-Ratio von 2,0 (CI=1,1-3,4) bei Nichtrauchern signifikant erhöht. Wie in der vorliegenden Arbeit wurde in mehreren Arbeiten keine Assoziation zum Lungenkarzinom beschrieben (Butkiewicz *et al.*, 2001; David-Beabes *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2002; Spitz *et al.*, 2001). Auch bei Blasenkrebs- und Hautkrebskollektiven fehlte eine Verbindung (Matullo *et al.*, 2001a; Vogel *et al.*, 2001; Winsey *et al.*, 2000). In der Metaanalyse

von Kiyohara wurde ein insgesamt erhöhtes Lungenkrebs-Risiko für homozygote Träger der Variante Gln festgestellt (OR=1,3; CI=1,14-1,49) (Kiyohara & Yoshimasu, 2007). Diese Analyse umfasst allerdings Arbeiten an verschiedenen Ethnien. In der vorliegenden Arbeit fand sich für XPD 751Gln eine (wenn auch nicht signifikante) Assoziation bei verneintem Alkoholkonsum (OR=2,51; CI=0,92-6,84; $p=0,091$), was auch für XPD 312Asn beobachtet wurde. Dass Träger des varianten Allels ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Larynxkarzinom haben, wenn sie keinen Alkohol trinken, entspricht in gewisser Weise den vorangegangenen Studien, die gerade für nicht- oder wenigrauchende Variantenträger ein erhöhtes Risiko sahen. Wenn die Hypothese zutrifft, dass die genetischen Varianten zu einer Schwächung der DNA-Reparaturkapazität führen, käme dies bei diesen Menschen vor allem bei geringer Schadstoffbelastung zum Tragen, wenn Träger von Wildtypallelen entstandene Schäden noch ausgleichen können. Hohe Schadstoffbelastung dagegen führt jedes Reparatursystem an seine Grenze, auch das genetisch nicht modifizierte. Auch hier wären jedoch große populationsbasierte Studien mit gering exponierten Karzinompatienten von Nöten, um eine Assoziation zu belegen.

4.3 Gen-Kombinationen

Mittels Haplotypenanalyse wurden die Häufigkeiten der Allelkombinationen auf den Chromosomen geschätzt.

Die häufigste Kombination auf dem XRCC1-Gen ist 194Arg/280Arg/399Arg mit insgesamt 54,2%. Die Kombination der potenziellen Risiko-Allele 194Arg/280His/399Gln kam weder bei Fällen noch bei Kontrollen vor. Fälle und Kontrollen unterscheiden sich in den Häufigkeiten der Haplotypen nicht ($p=0,53$).

In der oben erwähnten Fall-Kontroll-Studie von Sturgis u.a. zeigte die Kombination der Genotypen XRCC1 194Arg/Arg und 399Gln/Gln - besonders bei Rauchern und Alkohol-Konsumenten - ein erhöhtes Risiko für SCCHN (Sturgis *et al.*, 1999). In einer chinesischen Studie ergab sich für Träger der XRCC1-194Trp-Variante ein signifikant geringeres Risiko, am Magenkarzinom zu erkranken. Die Kombination zwischen 194Trp/Trp und 399Arg/Gln bzw. Gln/Gln erbrachte jedoch mit OR=1,73 (CI=1,12-2,69) ein signifikant höheres Risiko, an Magenkarzinom (besonders Kardiakarzinom) zu erkranken (Shen *et al.*, 2000). In einer koreanischen Studie konnten zunächst keine Assoziationen zwischen einem der drei XRCC1-Polymorphismen und einem Risiko für Magenkrebs gezeigt werden. Erst Auswertungen, die auf Haplotypen basieren, deu-

teten auf Risiken hin (Lee *et al.*, 2002). Diese zeigten für die XRCC1-Kombination 194Trp/280Arg/399Arg ein geringeres (OR=0,65; CI=0,43-0,99), für Träger der Wildtyp-Kombination 194Arg/280Arg/399Arg allerdings ein größeres Risiko (OR=1,57; CI=0,93-2,65). Eine weitere Studie hat die Kombination der Varianten 194Trp und 399Gln als einen signifikanten Risikofaktor für kindliche ALL beschrieben (OR=4,41; CI=1,83-10,61) (Joseph *et al.*, 2005).

Auch die Häufigkeiten der Haplotypen von XPD wurden in der vorliegenden Arbeit mittels Haplotypenanalyse ermittelt. Da das Allel 199 invariant vorlag, fanden wir nur 4 verschiedene Kombinationen. Die Wildtyp-Kombination 199Ile/312Asp/751Lys lag mit insgesamt 52,6% am häufigsten vor. Unterschiede zwischen dem Fall- und dem Kontrollkollektiv traten nicht auf. Die vermutete Risiko-Kombination 199Ile/312Asn/751Gln kam bei Fällen und bei Kontrollen mit 30,7% bzw. 30,5% ebenfalls gleich häufig vor. Vorangegangene Studien hatten den gemeinsamen Effekt der XPD-Polymorphismen untersucht. Wenn man die XPD 312/751-Allele kombinierte, wurde phänotypisch die beste DRC in Zellen von Individuen mit beiden Wildtypen, die schlechteste in Zellen mit mindestens zwei Varianten beobachtet. Der gemeinsame Effekt dieser zwei Polymorphismen fand sich auch epidemiologisch, da sich ein höheres Risiko für Lungenkrebs bei Individuen zeigte, die zwei oder mehr Variantenallele trugen (Spitz *et al.*, 2001). Diesen Zusammenhang fanden auch Zhou *et al.* (Zhou *et al.*, 2002), die bei Nichtrauchern mit beiden Risikoallelen ein 2,6fach erhöhtes Lungenkrebsrisiko beobachteten (OR=2,56, CI=1,3-5,0).

In der vorliegenden Studie wurde auf Subgruppenanalysen der Haplotypen bezüglich Nikotin- und Alkoholkonsum verzichtet, da die betreffenden Stichproben zu klein für statistisch aussagekräftige Auswertungen geworden wären. Die hier gewonnene Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Zusammenhänge zwischen den Haplotypen und dem Risiko der Entstehung eines Larynxkarzinoms, sollte es sie geben, zu gering sind, um in einem Kollektiv von 295 Patienten statistisch sicher nachgewiesen zu werden.

Die SNPs im XRCC1-Gen und XPD-Gen wurden mehrfach in Kombination untereinander untersucht. Smith *et al.* beobachteten 2003 bei amerikanischen Trägerinnen mindestens eines Alleles von 194Trp ein erhöhtes Risiko (OR=1,60; CI=0,89-2,97), an Brustkrebs zu erkranken, besonders, wenn dieses Allel in Kombination mit SNPs anderer DNA-Reparaturenzyme (XRCC3 und XPF) vorlag (Smith *et al.*, 2003). Laut einer Untersuchung von Rybicki u.a. an Blutsverwandten von Prostatakarzinom-Patienten existiert kein Zusammenhang zwischen der XRCC1 399-Variante und dem Risiko, an Pro-

statakarzinom zu erkranken. Zusammen mit XPD 312Asn/Asn konnte allerdings für Heterozygote (399Arg/Gln) ein schwach protektiver Effekt gezeigt werden (Rybicki *et al.*, 2004). Auch für Lungentumoren erhöhte die Kombination der vermuteten Risiko-Allele XRCC1 399Gln/Gln, XPD 312Asn/Asn und XPD 751Gln/Gln das Risiko bei Nichtrauchern mit einer OR von 5,2 (CI=1,7-16,6) (Zhou *et al.*, 2003). Eine taiwanesische Studie zeigte für XRCC1 280His bei Nasopharynxkarzinomen kein signifikantes Risiko. Kombinierte man 280His mit anderen Polymorphismen in Genen der DNA-Reparatur und des Schadstoffmetabolismus (hOGG1 und CYP2E1), ergab sich aber ein hochsignifikantes Risiko (OR=25; CI=3,5-177) (Cho *et al.*, 2003).

Auch die genübergreifenden Analysen fallen also heterogen aus. Risikobehaftet scheinen Konstellationen zu sein, wenn sowohl Enzyme des Schadstoffmetabolismus als auch verschiedene DNA-Reparaturenzyme betroffen sind und darüberhinaus eine relevante Schadstoffexposition auftritt. Für solche Analysen sind allerdings sehr umfangreiche Kollektive notwendig, besonders, wenn die entsprechenden SNPs selten vorliegen.

Die phänotypischen Analysen, die DNA-Schädigungen nach Schadstoffexposition in der Zellkulturen von erkrankten Personen (Lymphozyten oder Tumorgewebe) messen und mit den Ergebnissen bei gesunden Kontrollen vergleichen, zeigen in der Regel deutliche Zusammenhänge zwischen verminderter DNA-Reparaturkapazität und Tumorerkrankungen. Nachteil dieser Untersuchungen ist der große Aufwand und die dadurch bedingten kleinen Fallzahlen. Die benutzten Assays messen die DNA-Reparaturkapazität zudem nur indirekt und stellen das Ergebnis aller tätig gewordenen Reparaturprozesse dar. Da es aber Überschneidungen zwischen den Regelkreisen gibt und an jedem viele unterschiedliche Proteine beteiligt sind, ist es schwierig, Funktionseinschränkungen einzelnen SNPs zuzuordnen. Dass in der Bevölkerung häufige Polymorphismen der DNA-Reparaturgene einen starken Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit der Krebsentstehung haben, ist unwahrscheinlich, andernfalls hätten die zahlreichen in dieser Hinsicht durchgeführten epidemiologischen molekulargenetischen Studien zu einheitlichen Ergebnissen geführt. Kommen mehrere ungünstige Varianten zusammen, könnte das Risiko einer Funktionseinschränkung des Reparatursystems und damit das Risiko einer Krebserkrankung jedoch ansteigen, besonders wenn die Schadstoffexposition mit berücksichtigt wird. Große populationsbasierte Studien, die das Zusammenwirken unterschiedlicher DNA-Reparaturenzyme beleuchten, könnten hier Klarheit schaffen.

Insgesamt scheint die individuelle Analyse der untersuchten SNPs zur Abschätzung des Erkrankungsrisikos und daraus resultierend zur gezielten Prävention von Krebser-

krankungen (z.B. durch das Vermeiden von Noxen bei Hochrisikopatienten) derzeit nicht sinnvoll.

Die Variationen der DNA-Reparaturenzyme sind eher als Prädiktoren für das Ansprechen von Therapien ins Fokus des Interesses gerückt. Für XRCC1 zeigte sich ein Zusammenhang zu den Ansprechraten auf Strahlentherapie bei Brustkrebs: Patientinnen, die 194Trp und 399Gln trugen, waren eher sensibel für Radiatio (Moullan *et al.*, 2003). Auch das Ansprechen auf eine Cisplatin-enthaltende Chemotherapie bei Patienten mit kolorektalem Karzinom scheint mit SNPs der DNA-Reparaturenzyme assoziiert. Träger des Wildtyps XPD 751Lys/Lys reagierten besser auf Chemotherapie und hatten entsprechend ein signifikant längeres Überleben als Träger mindestens eines varianten Allels (Park *et al.*, 2001). Die Analyse von Polymorphismen der DNA-Reparaturenzyme könnte in Zukunft für die Therapiewahl bei Patienten mit Tumorleiden eine Rolle spielen und so unter Umständen manchem Patienten eine anstrengende und erfolglose Therapie ersparen.

5 Zusammenfassung

Das Larynxkarzinom ist eine komplexe Erkrankung, für die sowohl Umweltfaktoren als auch genetische Faktoren ursächlich sind. Ziel dieser Arbeit war herauszufinden, ob zwischen dem Vorliegen genetischer Polymorphismen der DNA-Reparaturenzyme XRCC1 und XPD und der Wahrscheinlichkeit eines Larynxkarzinoms eine Assoziation besteht. Da die Enzyme XRCC1 und XPD tragende Rollen in der Beseitigung von schadstoffinduzierten DNA-Schäden in den Reparaturmechanismen von NER und BER innehaben und häufig ein Zusammenhang zwischen Nikotin- und Alkoholkonsum und der Entstehung eines Larynxkarzinoms belegt werden konnte, erfuhren die Risikofaktoren Rauchen und Alkoholkonsum eine besondere Berücksichtigung.

Von den zahlreichen bekannten genetischen Varianten der Enzyme wurden diejenigen SNPs ausgewählt, die sowohl in der kaukasischen Bevölkerung häufig vorkommen, als auch in Exons lokalisiert sind und hier nicht konservative Aminosäure-Austausche in funktionell wichtigen Positionen der Proteine bewirken. Es wurden die XRCC1 SNPs 194Trp, 280His und 399Gln bzw. die XPD SNPs 199Ile, 312Asn und 751Gln untersucht. Für einige dieser Varianten waren bereits Assoziationen mit malignen Erkrankungen beobachtet worden. Zu Beginn dieser Untersuchung lagen jedoch keine Studien vor, die Zusammenhänge zwischen dem Auftreten eines Larynxkarzinoms und den untersuchten Polymorphismen beinhalteten.

Die Häufigkeiten der Polymorphismen wurden in einem Kollektiv von 295 Larynxkarzinompatienten und 350 Kontrollen bestimmt. Bei den Larynxkarzinompatienten lag die histologisch gesicherte Diagnose eines supraglottischen, glottischen oder subglottischen Larynxkarzinoms vor. Die Kontrollpatienten hatten weder ein bekanntes Larynxkarzinom noch eine andere maligne Erkrankung. Alle Patienten waren kaukasischer Abstammung. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR und RFLP nach DNA-Extraktion aus Leukozyten.

Die gefundenen Allelhäufigkeiten lagen alle in einem Bereich, der auch von anderen Autoren bei kaukasischen Kontrollen beobachtet wurde. Für keinen der untersuchten Polymorphismen fanden sich signifikante Unterschiede in der Häufigkeit der Allelfrequenzen

in der Kontroll- und in der Patientengruppe. Im Hinblick auf die Genotypenverteilung stellten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede dar. Auch die Analyse nach dem rezessiven und nach dem dominanten Vererbungsmodell deckte keine signifikanten Unterschiede auf.

Die Stratifizierungen nach Alter, Geschlecht und Rauchgewohnheiten erbrachte ebenfalls keinen statistisch signifikanten Hinweis darauf, dass einer der untersuchten Polymorphismen in diesen Subgruppen das Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken, erhöht oder vermindert. Lediglich für die Varianten XPD 199Asn und XPD 751Gln zeigte sich bei Patienten, die Alkoholkonsum verneinten, ein statistisch nicht signifikanter Trend in Richtung auf ein erhöhtes Risiko. Bezüglich Tumorlokalisation (supraglottisch, glottisch, subglottisch) und Tumorausdehnung war kein Zusammenhang mit den untersuchten Polymorphismen ersichtlich. Auch die Haplotypanalyse ergab keine statistisch signifikante Abweichung der Haplotypen-Wahrscheinlichkeiten zwischen Fall- und Kontrollkollektiv.

Zusammenfassend ergaben sich in dieser Untersuchung keine Hinweise auf eine Assoziation der untersuchten Varianten von XRCC1 und XPD mit dem Risiko, an einem Larynxkarzinom zu erkranken.

Literaturverzeichnis

- Abdel-Rahman, S. Z., & El-Zein, R. A. 2000. The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett*, **159**(1), 63–71.
- Abdel-Rahman, S. Z., Soliman, A. S., Bondy, M. L., Omar, S., El-Badawy, S. A., Khaled, H. M., Seifeldin, I. A., & Levin, B. 2000. Inheritance of the 194Trp and the 399Gln variant alleles of the DNA repair gene XRCC1 are associated with increased risk of early-onset colorectal carcinoma in Egypt. *Cancer Lett*, **159**(1), 79–86.
- Agudelo, D, Quer, M, León, X, Díez, S, & Burgués, J. 1997. Laryngeal carcinoma in patients without a history of tobacco and alcohol use. *Head Neck*, **19**(3), 200–4.
- Almadori, G., Bussu, F., Cadoni, G., Galli, J., Rigante, M., Artuso, A., & Maurizi, M. 2004. Multistep laryngeal carcinogenesis helps our understanding of the field cancerisation phenomenon: a review. *Eur J Cancer*, **40**(16), 2383–8.
- Au, W. W., Salama, S. A., & Sierra-Torres, C. H. 2003. Functional characterization of polymorphisms in DNA repair genes using cytogenetic challenge assays. *Environ Health Perspect*, **111**(15), 1843–50.
- Badawi, A. F., Stern, S. J., Lang, N. P., & Kadlubar, F. F. 1996. Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Prog Clin Biol Res*, **395**, 109–40.
- Balajee, A. S., & Bohr, V. A. 2000. Genomic heterogeneity of nucleotide excision repair. *Gene*, **250**(1-2), 15–30.
- Benhamou, S., & Sarasin, A. 2002. ERCC2/XPD gene polymorphisms and cancer risk. *Mutagenesis*, **17**(6), 463–9.
- Berwick, M., & Vineis, P. 2000. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst*, **92**(11), 874–97.

- Bray, I., Brennan, P., & Boffetta, P. 2000. Projections of alcohol- and tobacco-related cancer mortality in Central Europe. *Int J Cancer*, **87**(1), 122–8.
- Brockmoller, J., Cascorbi, I., Kerb, R., & Roots, I. 1996. Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferases M1 and T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. *Cancer Res*, **56**(17), 3915–25.
- Brockmoller, J., Cascorbi, I., Henning, S., Meisel, C., & Roots, I. 2000. Molecular genetics of cancer susceptibility. *Pharmacology*, **61**(3), 212–27.
- Butkiewicz, D., Rusin, M., Enewold, L., Shields, P. G., Chorazy, M., & Harris, C. C. 2001. Genetic polymorphisms in DNA repair genes and risk of lung cancer. *Carcinogenesis*, **22**(4), 593–7.
- Caldecott, K. W., Tucker, J. D., & Thompson, L. H. 1992. Construction of human XRCC1 minigenes that fully correct the CHO DNA repair mutant EM9. *Nucleic Acids Res*, **20**(17), 4575–9.
- Carrano, A. V., Minkler, J. L., Dillehay, L. E., & Thompson, L. H. 1986. Incorporated bromodeoxyuridine enhances the sister-chromatid exchange and chromosomal aberration frequencies in an EMS-sensitive Chinese hamster cell line. *Mutat Res*, **162**(2), 233–9.
- Cattaruzza, M. S., Maisonneuve, P., & Boyle, P. 1996. Epidemiology of laryngeal cancer. *Eur J Cancer B Oral Oncol*, **32B**(5), 293–305.
- Chen, S., Tang, D., Xue, K., Xu, L., Ma, G., Hsu, Y., & Cho, S. S. 2002. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of lung cancer in a Chinese population. *Carcinogenesis*, **23**(8), 1321–5.
- Cho, E. Y., Hildesheim, A., Chen, C. J., Hsu, M. M., Chen, I. H., Mittl, B. F., Levine, P. H., Liu, M. Y., Chen, J. Y., Brinton, L. A., Cheng, Y. J., & Yang, C. S. 2003. Nasopharyngeal carcinoma and genetic polymorphisms of DNA repair enzymes XRCC1 and hOGG1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**(10), 1100–4.
- Clarkson, S. G., & Wood, R. D. 2005. Polymorphisms in the human XPD gene, DNA repair capacity and cancer susceptibility: An appraisal. *DNA Repair (Amst)*.

- Coin, F., Marinoni, J. C., Rodolfo, C., Fribourg, S., Pedrini, A. M., & Egly, J. M. 1998. Mutations in the XPD helicase gene result in XP and TTD phenotypes, preventing interaction between XPD and the p44 subunit of TFIIH. *Nat Genet*, **20**(2), 184–8.
- Coin, F., Bergmann, E., Tremeau-Bravard, A., & Egly, J. M. 1999. Mutations in XPB and XPD helicases found in xeroderma pigmentosum patients impair the transcription function of TFIIH. *Embo J*, **18**(5), 1357–66.
- Dantzer, F., de La Rubia, G., Menissier-De Murcia, J., Hostomsky, Z., de Murcia, G., & Schreiber, V. 2000. Base excision repair is impaired in mammalian cells lacking Poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Biochemistry*, **39**(25), 7559–69.
- David-Beabes, G. L., & London, S. J. 2001. Genetic polymorphism of XRCC1 and lung cancer risk among African-Americans and Caucasians. *Lung Cancer*, **34**(3), 333–9.
- David-Beabes, G. L., Lunn, R. M., & London, S. J. 2001. No association between the XPD polymorphism or the XRCC3 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**(8), 911–2.
- De Stefani, E., Boffetta, P., Oreggia, F., Brennan, P., Ronco, A., Deneo-Pellegrini, H., & Mendilaharsu, M. 2000. Plant foods and risk of laryngeal cancer: A case-control study in Uruguay. *Int J Cancer*, **87**(1), 129–32.
- DeMarini, D. M. 2004. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res*, **567**(2-3), 447–74.
- Divine, K. K., Gilliland, F. D., Crowell, R. E., Stidley, C. A., Bocklage, T. J., Cook, D. L., & Belinsky, S. A. 2001. The XRCC1 399 glutamine allele is a risk factor for adenocarcinoma of the lung. *Mutat Res*, **461**(4), 273–8.
- Duell, E. J., Wiencke, J. K., Cheng, T. J., Varkonyi, A., Zuo, Z. F., Ashok, T. D., Mark, E. J., Wain, J. C., Christiani, D. C., & Kelsey, K. T. 2000. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2 and biomarkers of DNA damage in human blood mononuclear cells. *Carcinogenesis*, **21**(5), 965–71.
- Duell, E. J., Millikan, R. C., Pittman, G. S., Winkel, S., Lunn, R. M., Tse, C. K., Eaton, A., Mohrenweiser, H. W., Newman, B., & Bell, D. A. 2001. Polymorphisms in the

- DNA repair gene XRCC1 and breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**(3), 217–22.
- Elci, O. C., Dosemeci, M., & Blair, A. 2001. Occupation and the risk of laryngeal cancer in Turkey. *Scand J Work Environ Health*, **27**(4), 233–9.
- Esteve, J., Riboli, E., Pequignot, G., Terracini, B., Merletti, F., Crosignani, P., Ascunce, N., Zubiri, L., Blanchet, F., Raymond, L., Repetto, F., & Tuyns, A. J. 1996. Diet and cancers of the larynx and hypopharynx: the IARC multi-center study in southwestern Europe. *Cancer Causes Control*, **7**(2), 240–52.
- Friedberg, E. C. 2001. How nucleotide excision repair protects against cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**(1), 22–33.
- Goode, E. L., Ulrich, C. M., & Potter, J. D. 2002. Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**(12), 1513–30.
- Guo, X., Cheng, M., & Fei, S. 1995. A case-control study of the etiology of laryngeal cancer in Liaoning Province. *Chin Med J (Engl)*, **108**(5), 347–50.
- Hakem, Razqallah. 2008. DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO Journal*, **27**(4), 589–605.
- Han, J., Hankinson, S. E., De Vivo, I., Spiegelman, D., Tamimi, R. M., Mohrenweiser, H. W., Colditz, G. A., & Hunter, D. J. 2003. A prospective study of XRCC1 haplotypes and their interaction with plasma carotenoids on breast cancer risk. *Cancer Res*, **63**(23), 8536–41.
- Henning, S., Cascorbi, I., Munchow, B., Jahnke, V., & Roots, I. 1999. Association of arylamine N-acetyltransferases NAT1 and NAT2 genotypes to laryngeal cancer risk. *Pharmacogenetics*, **9**(1), 103–11.
- Hiyama, Toru, Yoshihara, Masaharu, Tanaka, Shinji, & Chayama, Kazuaki. 2008. Genetic polymorphisms and head and neck cancer risk (Review). *Int J Oncol*, **32**(5), 945–73.
- Hoeijmakers, J. H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, **411**(6835), 366–74.

- Hong, Y. J., Lee, J. K., Lee, G. H., & Hong, S. I. 2000. Influence of glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes on larynx cancer risk among Korean smokers. *Clin Chem Lab Med*, **38**(9), 917–9.
- Hou, S. M., Falt, S., Angelini, S., Yang, K., Nyberg, F., Lambert, B., & Hemminki, K. 2002. The XPD variant alleles are associated with increased aromatic DNA adduct level and lung cancer risk. *Carcinogenesis*, **23**(4), 599–603.
- Hoy, C. A., Fuscoe, J. C., & Thompson, L. H. 1987. Recombination and ligation of transfected DNA in CHO mutant EM9, which has high levels of sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol*, **7**(5), 2007–11.
- Hsieh, L. L., Chien, H. T., Chen, I. H., Liao, C. T., Wang, H. M., Jung, S. M., Wang, P. F., Chang, J. T., Chen, M. C., & Cheng, A. J. 2003. The XRCC1 399Gln polymorphism and the frequency of p53 mutations in Taiwanese oral squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**(5), 439–43.
- Hu, J. J., Smith, T. R., Miller, M. S., Mohrenweiser, H. W., Golden, A., & Case, L. D. 2001. Amino acid substitution variants of APE1 and XRCC1 genes associated with ionizing radiation sensitivity. *Carcinogenesis*, **22**(6), 917–22.
- Hu, Z., Ma, H., Chen, F., Wei, Q., & Shen, H. 2005. XRCC1 polymorphisms and cancer risk: a meta-analysis of 38 case-control studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **14**(7), 1810–8.
- Itin, P. H., Sarasin, A., & Pittelkow, M. R. 2001. Trichothiodystrophy: update on the sulfur-deficient brittle hair syndromes. *J Am Acad Dermatol*, **44**(6), 891–920; quiz 921–4.
- Jahnke, V. 1995. *Bösartige Tumoren des Larynx*. Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis. Georg Thieme Verlag.
- Joseph, T., Kusumakumary, P., Chacko, P., Abraham, A., & Pillai, M. R. 2005. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Lett*, **217**(1), 17–24.
- Kaanders, JH; Lenartz; Pop, L et al. 1997. *Larynxkarzinom*. Kompendium Internistische Onkologie Springer-Verlag.

- Keriel, A., Stary, A., Sarasin, A., Rochette-Egly, C., & Egly, J. M. 2002. XPD mutations prevent TFIIH-dependent transactivation by nuclear receptors and phosphorylation of RARalpha. *Cell*, **109**(1), 125–35.
- Kiffmeyer, W. R., Langer, E., Davies, S. M., Envall, J., Robison, L. L., & Ross, J. A. 2004. Genetic polymorphisms in the Hmong population: implications for cancer etiology and survival. *Cancer*, **100**(2), 411–7.
- Kiuru, A., Lindholm, C., Heilimo, I., Ceppi, M., Koivistoinen, A., Ilus, T., Hirvonen, A., Norppa, H., & Salomaa, S. 2005. Influence of DNA repair gene polymorphisms on the yield of chromosomal aberrations. *Environ Mol Mutagen*, **46**(3), 198–205.
- Kiyohara, C., & Yoshimasu, K. 2007. Genetic polymorphisms in the nucleotide excision repair pathway and lung cancer risk: a meta-analysis. *Int J Med Sci*, **4**(2), 59–71.
- Kiyohara, Chikako, Takayama, Koichi, & Nakanishi, Yoichi. 2006. Association of genetic polymorphisms in the base excision repair pathway with lung cancer risk: a meta-analysis. *Lung Cancer*, **54**(3), 267–83.
- Kokoska, M. S., Piccirillo, J. F., & Haughey, B. H. 1995. Gender differences in cancer of the larynx. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, **104**(6), 419–24.
- Kraemer, K. H., Levy, D. D., Parris, C. N., Gozukara, E. M., Moriwaki, S., Adelberg, S., & Seidman, M. M. 1994. Xeroderma pigmentosum and related disorders: examining the linkage between defective DNA repair and cancer. *J Invest Dermatol*, **103**(5 Suppl), 96S–101S.
- Laforest, L., Luce, D., Goldberg, P., Begin, D., Gerin, M., Demers, P. A., Brugere, J., & Leclerc, A. 2000. Laryngeal and hypopharyngeal cancers and occupational exposure to formaldehyde and various dusts: a case-control study in France. *Occup Environ Med*, **57**(11), 767–73.
- Lamerdin, J. E., Montgomery, M. A., Stilwagen, S. A., Scheidecker, L. K., Tebbs, R. S., Brookman, K. W., Thompson, L. H., & Carrano, A. V. 1995. Genomic sequence comparison of the human and mouse XRCC1 DNA repair gene regions. *Genomics*, **25**(2), 547–54.

- Lavrik, O. I., Prasad, R., Sobol, R. W., Horton, J. K., Ackerman, E. J., & Wilson, S. H. 2001. Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair. *J Biol Chem*, **276**(27), 25541–8.
- Lee, J. M., Lee, Y. C., Yang, S. Y., Yang, P. W., Luh, S. P., Lee, C. J., Chen, C. J., & Wu, M. T. 2001. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of the esophageal cancer. *Int J Cancer*, **95**(4), 240–6.
- Lee, S. G., Kim, B., Choi, J., Kim, C., Lee, I., & Song, K. 2002. Genetic polymorphisms of XRCC1 and risk of gastric cancer. *Cancer Lett*, **187**(1-2), 53–60.
- Li, C., Hu, Z., Lu, J., Liu, Z., Wang, L. E., El-Naggar, A. K., Sturgis, E. M., Spitz, M. R., & Wei, Q. 2007. Genetic polymorphisms in DNA base-excision repair genes ADPRT, XRCC1, and APE1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer*, **110**(4), 867–75.
- Li, Y., Marion, M. J., Rundle, A., & Brandt-Rauf, P. W. 2003. A common polymorphism in XRCC1 as a biomarker of susceptibility for chemically induced genetic damage. *Biomarkers*, **8**(5), 408–14.
- Liang, G., Xing, D., Miao, X., Tan, W., Yu, C., Lu, W., & Lin, D. 2003. Sequence variations in the DNA repair gene XPD and risk of lung cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*, **105**(5), 669–73.
- Lunn, R. M., Langlois, R. G., Hsieh, L. L., Thompson, C. L., & Bell, D. A. 1999. XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. *Cancer Res*, **59**(11), 2557–61.
- Lunn, R. M., Helzlsouer, K. J., Parshad, R., Umbach, D. M., Harris, E. L., Sanford, K. K., & Bell, D. A. 2000. XPD polymorphisms: effects on DNA repair proficiency. *Carcinogenesis*, **21**(4), 551–5.
- Maier, H., & Tisch, M. 1997. Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study. *Acta Otolaryngol Suppl*, **527**, 160–4.
- Maier, H., Dietz, A., Gewelke, U., Heller, W. D., & Weidauer, H. 1992. Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Investig*, **70**(3-4), 320–7.

- Marintchev, A., Mullen, M. A., Maciejewski, M. W., Pan, B., Gryk, M. R., & Mullen, G. P. 1999. Solution structure of the single-strand break repair protein XRCC1 N-terminal domain. *Nat Struct Biol*, **6**(9), 884–93.
- Marquardt, H. und Schäffer, S. G. 1994. *Lehrbuch der Toxikologie*. Hamburg: B.I. Wissenschaftsverlag.
- Marsin, Stéphanie, Vidal, Antonio E, Sossou, Marguerite, Ménissier-de Murcia, Josiane, Le Page, Florence, Boiteux, Serge, de Murcia, Gilbert, & Radicella, J Pablo. 2003. Role of XRCC1 in the coordination and stimulation of oxidative DNA damage repair initiated by the DNA glycosylase hOGG1. *J Biol Chem*, **278**(45), 44068–74.
- Mathonnet, G., Labuda, D., Meloche, C., Wambach, T., Krajinovic, M., & Sinnett, D. 2003. Variable continental distribution of polymorphisms in the coding regions of DNA-repair genes. *J Hum Genet*, **48**(12), 659–64.
- Matullo, G., Guarrera, S., Carturan, S., Peluso, M., Malaveille, C., Davico, L., Piazza, A., & Vineis, P. 2001a. DNA repair gene polymorphisms, bulky DNA adducts in white blood cells and bladder cancer in a case-control study. *Int J Cancer*, **92**(4), 562–7.
- Matullo, G., Palli, D., Peluso, M., Guarrera, S., Carturan, S., Celentano, E., Krogh, V., Munnia, A., Tumino, R., Polidoro, S., Piazza, A., & Vineis, P. 2001b. XRCC1, XRCC3, XPD gene polymorphisms, smoking and (32)P-DNA adducts in a sample of healthy subjects. *Carcinogenesis*, **22**(9), 1437–45.
- Matullo, G., Dunning, A. M., Guarrera, S., Baynes, C., Polidoro, S., Garte, S., Autrup, H., Malaveille, C., Peluso, M., Airolidi, L., Veglia, F., Gormally, E., Hoek, G., Krzyzanowski, M., Overvad, K., Raaschou-Nielsen, O., Clavel-Chapelon, F., Linseisen, J., Boeing, H., Trichopoulou, A., Palli, D., Krogh, V., Tumino, R., Panico, S., Bueno-De-Mesquita, H. B., Peeters, P. H., Lund, E., Pera, G., Martinez, C., Dorronsoro, M., Barricarte, A., Tormo, M. J., Quiros, J. R., Day, N. E., Key, T. J., Saracci, R., Kaaks, R., Riboli, E., & Vineis, P. 2006. DNA repair polymorphisms and cancer risk in non-smokers in a cohort study. *Carcinogenesis*, **27**(5), 997–1007.
- Misra, R. R., Ratnasinghe, D., Tangrea, J. A., Virtamo, J., Andersen, M. R., Barrett, M., Taylor, P. R., & Albanes, D. 2003. Polymorphisms in the DNA repair genes XPD,

- XRCC1, XRCC3, and APE/ref-1, and the risk of lung cancer among male smokers in Finland. *Cancer Lett*, **191**(2), 171–8.
- Mohrenweiser, H. W., Carrano, A. V., Fertitta, A., Perry, B., Thompson, L. H., Tucker, J. D., & Weber, C. A. 1989. Refined mapping of the three DNA repair genes, ERCC1, ERCC2, and XRCC1, on human chromosome 19. *Cytogenet Cell Genet*, **52**(1-2), 11–4.
- Mohrenweiser, H. W., Xi, T., Vazquez-Matias, J., & Jones, I. M. 2002. Identification of 127 amino acid substitution variants in screening 37 DNA repair genes in humans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **11**(10 Pt 1), 1054–64.
- Moller, P., Wallin, H., Dybdahl, M., Frentz, G., & Nexø, B. A. 2000. Psoriasis patients with basal cell carcinoma have more repair-mediated DNA strand-breaks after UVC damage in lymphocytes than psoriasis patients without basal cell carcinoma. *Cancer Lett*, **151**(2), 187–92.
- Moullan, N., Cox, D. G., Angele, S., Romestaing, P., Gerard, J. P., & Hall, J. 2003. Polymorphisms in the DNA repair gene XRCC1, breast cancer risk, and response to radiotherapy. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**(11 Pt 1), 1168–74.
- Nelson, H. H., Kelsey, K. T., Mott, L. A., & Karagas, M. R. 2002. The XRCC1 Arg399Gln polymorphism, sunburn, and non-melanoma skin cancer: evidence of gene-environment interaction. *Cancer Res*, **62**(1), 152–5.
- Olshan, A. F., Watson, M. A., Weissler, M. C., & Bell, D. A. 2002. XRCC1 polymorphisms and head and neck cancer. *Cancer Lett*, **178**(2), 181–6.
- Park, D. J., Stoehlmacher, J., Zhang, W., Tsao-Wei, D. D., Groshen, S., & Lenz, H. J. 2001. A Xeroderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res*, **61**(24), 8654–8.
- Park, J. Y., Muscat, J. E., Ren, Q., Schantz, S. P., Harwick, R. D., Stern, J. C., Pike, V., Richie, J. P., Jr., & Lazarus, P. 1997. CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **6**(10), 791–7.
- Park, J. Y., Lee, S. Y., Jeon, H. S., Park, S. H., Bae, N. C., Lee, E. B., Cha, S. I., Park, J. H., Kam, S., Kim, I. S., & Jung, T. H. 2002. Lys751Gln polymorphism in the DNA repair gene XPD and risk of primary lung cancer. *Lung Cancer*, **36**(1), 15–6.

- Pastorelli, R., Cerri, A., Mezzetti, M., Consonni, E., & Airoldi, L. 2002. Effect of DNA repair gene polymorphisms on BPDE-DNA adducts in human lymphocytes. *Int J Cancer*, **100**(1), 9–13.
- Pelucchi, Claudio, Gallus, Silvano, Garavello, Werner, Bosetti, Cristina, & La Vecchia, Carlo. 2008. Alcohol and tobacco use, and cancer risk for upper aerodigestive tract and liver. *Eur J Cancer Prev*, **17**(4), 340–4.
- Popanda, O., Schattenberg, T., Phong, C. T., Butkiewicz, D., Risch, A., Edler, L., Kayser, K., Dienemann, H., Schulz, V., Drings, P., Bartsch, H., & Schmezer, P. 2004. Specific combinations of DNA repair gene variants and increased risk for non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, **25**(12), 2433–41.
- Prasad, R., Lavrik, O. I., Kim, S. J., Kedar, P., Yang, X. P., Vande Berg, B. J., & Wilson, S. H. 2001. DNA polymerase beta -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis. *J Biol Chem*, **276**(35), 32411–4.
- Qiao, Y., Spitz, M. R., Shen, H., Guo, Z., Shete, S., Hedayati, M., Grossman, L., Mohrenweiser, H., & Wei, Q. 2002. Modulation of repair of ultraviolet damage in the host-cell reactivation assay by polymorphic XPC and XPD/ERCC2 genotypes. *Carcinogenesis*, **23**(2), 295–9.
- Ratnasinghe, D., Yao, S. X., Tangrea, J. A., Qiao, Y. L., Andersen, M. R., Barrett, M. J., Giffen, C. A., Erozan, Y., Tockman, M. S., & Taylor, P. R. 2001. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**(2), 119–23.
- Riboli, E., Kaaks, R., & Esteve, J. 1996. Nutrition and laryngeal cancer. *Cancer Causes Control*, **7**(1), 147–56.
- Rybicki, B. A., Conti, D. V., Moreira, A., Cicek, M., Casey, G., & Witte, J. S. 2004. DNA repair gene XRCC1 and XPD polymorphisms and risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13**(1), 23–9.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York 2nd ed. edn. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

- Sanyal, S., Festa, F., Sakano, S., Zhang, Z., Steineck, G., Norming, U., Wijkstrom, H., Larsson, P., Kumar, R., & Hemminki, K. 2004. Polymorphisms in DNA repair and metabolic genes in bladder cancer. *Carcinogenesis*, **25**(5), 729–34.
- Scharer, O. D. 2003. Chemistry and biology of DNA repair. *Angew Chem Int Ed Engl*, **42**(26), 2946–74.
- Schlecht, N. F., Franco, E. L., Pintos, J., Negassa, A., Kowalski, L. P., Oliveira, B. V., & Curado, M. P. 1999. Interaction between tobacco and alcohol consumption and the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Am J Epidemiol*, **150**(11), 1129–37.
- Seedhouse, C., Bainton, R., Lewis, M., Harding, A., Russell, N., & Das-Gupta, E. 2002. The genotype distribution of the XRCC1 gene indicates a role for base excision repair in the development of therapy-related acute myeloblastic leukemia. *Blood*, **100**(10), 3761–6.
- Shapiro, J. A., Jacobs, E. J., & Thun, M. J. 2000. Cigar smoking in men and risk of death from tobacco-related cancers. *J Natl Cancer Inst*, **92**(4), 333–7.
- Shen, H., Xu, Y., Qian, Y., Yu, R., Qin, Y., Zhou, L., Wang, X., Spitz, M. R., & Wei, Q. 2000. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Int J Cancer*, **88**(4), 601–6.
- Shen, M., Berndt, S. I., Rothman, N., Demarini, D. M., Mumford, J. L., He, X., Bonner, M. R., Tian, L., Yeager, M., Welch, R., Chanock, S., Zheng, T., Caporaso, N., & Lan, Q. 2005. Polymorphisms in the DNA nucleotide excision repair genes and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Int J Cancer*, **116**(5), 768–73.
- Shen, M. R., Zdzienicka, M. Z., Mohrenweiser, H., Thompson, L. H., & Thelen, M. P. 1998a. Mutations in hamster single-strand break repair gene XRCC1 causing defective DNA repair. *Nucleic Acids Res*, **26**(4), 1032–7.
- Shen, M. R., Jones, I. M., & Mohrenweiser, H. 1998b. Nonconservative amino acid substitution variants exist at polymorphic frequency in DNA repair genes in healthy humans. *Cancer Res*, **58**(4), 604–8.

- Shu, X. O., Cai, Q., Gao, Y. T., Wen, W., Jin, F., & Zheng, W. 2003. A population-based case-control study of the Arg399Gln polymorphism in DNA repair gene XRCC1 and risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**(12), 1462–7.
- Smith, T. R., Levine, E. A., Perrier, N. D., Miller, M. S., Freimanis, R. I., Lohman, K., Case, L. D., Xu, J., Mohrenweiser, H. W., & Hu, J. J. 2003. DNA-repair genetic polymorphisms and breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**(11 Pt 1), 1200–4.
- Spitz, M. R., Wu, X., Wang, Y., Wang, L. E., Shete, S., Amos, C. I., Guo, Z., Lei, L., Mohrenweiser, H., & Wei, Q. 2001. Modulation of nucleotide excision repair capacity by XPD polymorphisms in lung cancer patients. *Cancer Res*, **61**(4), 1354–7.
- Stephens, M, Smith, N J, & Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet*, **68**(4), 978–89.
- Stern, M. C., Umbach, D. M., van Gils, C. H., Lunn, R. M., & Taylor, J. A. 2001. DNA repair gene XRCC1 polymorphisms, smoking, and bladder cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **10**(2), 125–31.
- Sturgis, E. M., Castillo, E. J., Li, L., Zheng, R., Eicher, S. A., Clayman, G. L., Strom, S. S., Spitz, M. R., & Wei, Q. 1999. Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*, **20**(11), 2125–9.
- Sturgis, E. M., Zheng, R., Li, L., Castillo, E. J., Eicher, S. A., Chen, M., Strom, S. S., Spitz, M. R., & Wei, Q. 2000. XPD/ERCC2 polymorphisms and risk of head and neck cancer: a case-control analysis. *Carcinogenesis*, **21**(12), 2219–23.
- Sturgis, E. M., Dahlstrom, K. R., Spitz, M. R., & Wei, Q. 2002. DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **128**(9), 1084–8.
- Taylor, R. M., Thistlethwaite, A., & Caldecott, K. W. 2002. Central role for the XRCC1 BRCT I domain in mammalian DNA single-strand break repair. *Mol Cell Biol*, **22**(8), 2556–63.
- Tebbs, R. S., Flannery, M. L., Meneses, J. J., Hartmann, A., Tucker, J. D., Thompson, L. H., Cleaver, J. E., & Pedersen, R. A. 1999. Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development. *Dev Biol*, **208**(2), 513–29.

- Thompson, L. H., & West, M. G. 2000. XRCC1 keeps DNA from getting stranded. *Mutat Res*, **459**(1), 1–18.
- Thompson, L. H., Brookman, K. W., Dillehay, L. E., Carrano, A. V., Mazrimas, J. A., Mooney, C. L., & Minkler, J. L. 1982. A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange. *Mutat Res*, **95**(2-3), 427–40.
- Thompson, L. H., Brookman, K. W., Jones, N. J., Allen, S. A., & Carrano, A. V. 1990. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange. *Mol Cell Biol*, **10**(12), 6160–71.
- Tudek, Barbara. 2007. Base excision repair modulation as a risk factor for human cancers. *Mol Aspects Med*, **28**(3-4), 258–75.
- Tuimala, J., Szekely, G., Wikman, H., Jarventaus, H., Hirvonen, A., Gundy, S., & Norppa, H. 2004. Genetic polymorphisms of DNA repair and xenobiotic-metabolizing enzymes: effects on levels of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations. *Mutat Res*, **554**(1-2), 319–33.
- Varzim, G., Monteiro, E., Silva, R. A., Fernandes, J., & Lopes, C. 2003. CYP1A1 and XRCC1 gene polymorphisms in SCC of the larynx. *Eur J Cancer Prev*, **12**(6), 495–9.
- Vidal, A. E., Boiteux, S., Hickson, I. D., & Radicella, J. P. 2001. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *Embo J*, **20**(22), 6530–9.
- Vogel, U., Hedayati, M., Dybdahl, M., Grossman, L., & Nexø, B. A. 2001. Polymorphisms of the DNA repair gene XPD: correlations with risk of basal cell carcinoma revisited. *Carcinogenesis*, **22**(6), 899–904.
- Vogel, U., Laros, I., Jacobsen, N. R., Thomsen, B. L., Bak, H., Olsen, A., Bukowy, Z., Wallin, H., Overvad, K., Tjønneland, A., Nexø, B. A., & Raaschou-Nielsen, O. 2004. Two regions in chromosome 19q13.2-3 are associated with risk of lung cancer. *Mutat Res*, **546**(1-2), 65–74.
- Wang, X. W., Vermeulen, W., Coursen, J. D., Gibson, M., Lupold, S. E., Forrester, K., Xu, G., Elmore, L., Yeh, H., Hoeijmakers, J. H., & Harris, C. C. 1996. The XPB and

- XPD DNA helicases are components of the p53-mediated apoptosis pathway. *Genes Dev*, **10**(10), 1219–32.
- Wang, Y., Spitz, M. R., Zhu, Y., Dong, Q., Shete, S., & Wu, X. 2003. From genotype to phenotype: correlating XRCC1 polymorphisms with mutagen sensitivity. *DNA Repair (Amst)*, **2**(8), 901–8.
- Wiencke, J. K. 2002. DNA adduct burden and tobacco carcinogenesis. *Oncogene*, **21**(48), 7376–91.
- Winsey, S. L., Haldar, N. A., Marsh, H. P., Bunce, M., Marshall, S. E., Harris, A. L., Wojnarowska, F., & Welsh, K. I. 2000. A variant within the DNA repair gene XRCC3 is associated with the development of melanoma skin cancer. *Cancer Res*, **60**(20), 5612–6.
- Zheng, Z., Park, J. Y., Guillemette, C., Schantz, S. P., & Lazarus, P. 2001. Tobacco carcinogen-detoxifying enzyme UGT1A7 and its association with orolaryngeal cancer risk. *J Natl Cancer Inst*, **93**(18), 1411–8.
- Zhou, W., Liu, G., Miller, D. P., Thurston, S. W., Xu, L. L., Wain, J. C., Lynch, T. J., Su, L., & Christiani, D. C. 2002. Gene-environment interaction for the ERCC2 polymorphisms and cumulative cigarette smoking exposure in lung cancer. *Cancer Res*, **62**(5), 1377–81.
- Zhou, W., Liu, G., Miller, D. P., Thurston, S. W., Xu, L. L., Wain, J. C., Lynch, T. J., Su, L., & Christiani, D. C. 2003. Polymorphisms in the DNA repair genes XRCC1 and ERCC2, smoking, and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **12**(4), 359–65.
- Zienolddiny, S., Campa, D., Lind, H., Ryberg, D., Skaug, V., Stangeland, L., Phillips, D. H., Canzian, F., & Haugen, A. 2006. Polymorphisms of DNA repair genes and risk of non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis*, **27**(3), 560–7.

Abkürzungsverzeichnis

AFB1-DNA	Aflatoxin-B1-DNA-Addukte
BCC	Basalzell-Karzinom
BER	Basenexzisionsreparatur
BPDE-DNA	Benzo(a)pyren-Diolepoxid-DNA
BSA	Rinderserumalbumin
CHO EM9	Chinese hamster ovary cells EM9
CYP1A1/2E1	Cytochrom P450 1A1/2E1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRC	DNA-Reparaturkapazität
DSBR	Doppelstrangbruch-Reparatur
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonat
ERCC	Excision repair cross-complementing
GGR	Global Genome Repair
GST	Glutathion-S-Transferase
HCR	Host cell reaction assay
HELIC	Helicase-Domäne
Lig1-3	DNA-Ligase 1-3
MMR	Mismatch-Repair
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Nicht-homologe Endverbindung
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
NTD	N-terminale Domäne
OR	Odds-Ratio
PARP-1/2	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1/2
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNKP	Polynukleotid-Kinase/Phosphatase
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismen
SCCHN	Plattenepithelkarzinom des Kopf-Halsbereiches
SCE	Schwesterchromosomenaustausch
SSBR	Einzelstrangbruch-Reparatur
TCR	Transkriptionsabhängige Reparatur
XP	Xeroderma pigmentosum
XRCC1	X-ray repair cross-complementing gene 1

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ivar Roots danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Brockmüller danke ich für die Idee, für die Hilfe bei der Literaturrecherche und bei der Erarbeitung theoretischer Grundlagen des Themas.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Mark Goldammer für die ständige Hilfe bei allen Problemen, die sich im Labor stellten. Er war immer ansprechbar und von grenzenloser Geduld.

Frau Dr. Gabriele Laschinski danke ich für die Zeit, die sie sich bei der Besprechung des strukturellen und inhaltlichen Aufbaus der Arbeit und die Durchsicht des Manuskriptes nahm.

Besonders danke ich Herrn Dr. Andreas Johne für die konstruktive und aufbauende Beratung beim Verfassen des Textes. Ebenfalls danke ich Herrn Dr. Werner Terhalle, der bei den Fragen der statistischen Auswertung kompetent mit Rat und Tat zu Hilfe stand.

Frau Heidemarie Maszynski und den anderen MTA danke ich für die freundliche Atmosphäre und die Ordnung, die sie im Labor gehalten haben, ohne die ein Arbeiten überhaupt nicht möglich gewesen wäre.

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Ute Rexroth, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema "Polymorphismen der DNA-Reparaturenzyme XRCC1 und XPD als Risikofaktor für das Larynxkarzinom" selbst verfasst habe, keine anderen als die angegebenen Quellen bzw. Hilfsmittel benutzt und die Arbeit ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe, und dass die Arbeit auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt.

Berlin, den 12.10.2009

Ute Rexroth