Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde

Campus Virchow-Klinikum

Direktor: Prof. Dr. med. V. Jahnke

Medizinische Fakultät Charité der

Humboldt-Universität zu Berlin

Molekularbiologische Untersuchungen zum Einfluß genetischer Wirtsfaktoren auf das Erkrankungsrisiko und den Krankheitsverlauf von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich

Der Medizinischen Fakultät

Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

als HABILITATIONSSCHRIFT

zur Erlangung der venia legendi

vorgelegt

von

Dr. med. Christoph Matthias

Berlin 1999

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Professor Volker Jahnke, der mir die Möglichkeit zu dieser Arbeit gab, sie durch Anregungen und Diskussionen förderte und großzügig unterstützte und mir gleichzeitig die nötige wissenschaftliche Freiheit gewährt hat.

Ganz besonders danken möchte ich auch Herrn Professor Richard Strange, der mir während meiner drei Aufenthalte zu den experimentellen Arbeiten in seinem Labor an der Postgraduate School of Medicine der Keele-University in North Staffordshire, England mit Anregungen und Unterstützung zur Seite stand und mir das wissenschaftliche Arbeiten auf dem Gebiet der Molekulargenetik ermöglichte.

Besonderen Dank schulde ich Herrn Professor William Ollier und Herrn Dr. Ali Hajeer der ARC Epidemiology Research Unit, University Manchester, England, die mir die experimentellen Arbeiten über den Tumor Nekrose Faktor ermöglichten und mich in die Arbeit am Gensequenzierer einführten.

Weiterhin schulde ich Dank Herrn Professor Peter W. Jones, Dept. of Mathematics der Keele University, und Herrn Dr. Anthony Fryer für die Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ferner möchte ich allen danken, die als MTA, Doktoranden und wissenschaftliche Mitarbeiter zu meiner Gruppe gehört haben oder noch gehören und deren Beiträge in diese Arbeit eingeflossen sind. Dies sind:
Dr. Paul Hoban, Dr. Lilian Yengi, Julie Alldersea, Janice Gilford, Phil Hand, Dr. Corinna Leder und Judith Haas.
Ohne derer aller Interesse, Können und Begeisterung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Die freundschaftliche Atmosphäre in der Gruppe hat damit in besonderem Maß zu meiner Motivation an dieser Arbeit beigetragen.

Inhaltsverzeichnis **Seite**

1. Einleitung 5

2. Fragestellung 11

3. Literaturübersicht 11

4. Material und Methoden 19

4.1. Patienten 19

4.2. Methoden zur Bestimmung der Polymorphismen an Glutathion S-Transferase und Cytochrom P450 Genorten 20

4.3. Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Mikrosatelliten-Polymorphismen 27

4.4. Statistische Analyse 28

5. Ergebnisse 29

5.1. Patientencharakteristika 29

5.2. Genotyp-Frequenzen der Polymorphismen in den entgiftenden Enzymen 33

5.3. Genotyp-Frequenzen der TNF-Mikrosatelliten-Polymorphismen 39

5.4. Zusammenhang zwischen den Genvariationen und den Tumoreigenschaften 40

5.5. Genvariationen bei Patienten unterschiedlicher Altersgruppen 42

5.6. Genvariationen bei Patienten mit unterschiedlichem Alkohol- und Zigarettenkonsum ..43

5.7. Genvariationen bei Patienten mit Mehrfachtumoren und Rezidiven 44

6. Diskussion 46

6.1. Patienten- und Tumorcharakteristika 46

6.2. Einfluß der Genvariationen in den Glutathion S-Transferasen und Cytochrom P450 auf die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren 49

6.3. Einfluß der TNF-Mikrosatelliten-Polymorphismen auf die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren 55

6.4. Patienten unterschiedlicher Altersgruppen und mit unterschiedlichem Alkohol- und Zigarettenkonsum 57

6.5. Patienten mit Mehrfachtumoren 59

6.6. Beeinflussung des Tumorverhaltens durch die bestimmten Genvariationen 61

7. Schlußfolgerung 72

8. Zusammenfassung 74

9. Literatur 80

10. Legenden zu Tabellen und Abbildungen 99

11. Tabellen und Abbildungen 100

1 Einleitung

Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereichs stellen etwa 5% der neu diagnostizierten Malignome in Europa und den USA dar. Weltweit werden jährlich mit steigender Tendenz mehr als 500.000 Neuerkrankungen diagnostiziert (Blitzer u. Mitarb. 1988; Boring u. Mitarb. 1994). Trotz deutlicher Verbesserungen der therapeutischen und rekonstruktiven Maßnahmen blieb die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten Jahrzehnten nahezu unverändert (Jahnke 1995a; Muir u. Mitarb. 1995). Die meisten Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen sind Männer im 6. Lebensjahrzehnt. Das Verhältnis von Männern zu Frauen liegt bei etwa 5:1. Während Hypopharynxkarzinome häufiger bei Männern vorkommen (8-10:1), ist der Unterschied bei Mundhöhlenkarzinomen wesentlich geringer ausgeprägt (2:1) (Blitzer 1988; Muir 1995). Chronischer Alkoholkonsum und Zigarettenrauchen sind die Hauptrisikofaktoren für die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren. Beide Genußgifte haben nicht nur einen additiven Effekt, sondern erhöhen das Karzinomrisiko multiplikativ. Hoher Alkoholkonsum prädisponiert insbesondere zur Entwicklung von Karzinomen in Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx sowie im supraglottischen Larynx. Intensives Zigarettenrauchen führt hingegen bevorzugt zur Entwicklung von glottischen Larynxkarzinomen (Blot u. Mitarb. 1988; Brugere u. Mitarb. 1986; Elwood u. Mitarb. 1984). Viele Personen erkranken jedoch trotz ausgiebigen Konsums dieser Genußgifte nicht an einem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Hals-Bereich. Im Gegensatz dazu gibt es eine Gruppe von etwa 10% der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich, die bereits in jungen Jahren (etwa um das 40. Lebensjahr) oder trotz geringen Konsums der o.g. Giftstoffe an einem solchen Tumor erkranken (Elwood u. Mitarb. 1984; Brugere u. Mitarb. 1986; Blot u. Mitarb. 1988; Talami u. Mitarb. 1990).

Interindividuelle Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Zigarettenrauch-assoziierten Karzinogenen werden in den letzten Jahren zunehmend auf Genvariationen im Metabolismus dieser chemischen Substanzen zurückgeführt. (Nebert 1989; Harris u. Mitarb. 1991; Roots u. Mitarb. 1992a; Nakashi u. Mitarb. 1993). Der menschliche Körper wird permanent durch Verschlucken, Inhalieren und Absorption mit Fremdsubstanzen aus der Umwelt in Kontakt gebracht. Diese Stoffe sind nicht nur Produkte der Industrialisierung oder sogenannte

Genußgifte, sondern beinhalten auch eine Vielzahl von Substanzen, die in natürlichen Nahrungsmitteln enthalten sind. Viele Pflanzen produzieren solche potentiell toxischen Stoffe, welche der menschliche Körper abbauen muß. Zusätzlich zu diesen natürlichen Substraten führen biochemische Reaktionen im Körper zur Bildung von Intermediär- oder Endprodukten (beispielsweise Gallensäuren oder Steroide), die potentiell toxisch für den Körper sind, falls sie nicht umgehend abgebaut werden. Darüber hinaus kamen im Rahmen der Zivilisation Substanzen hinzu, die vom Körper entgiftet und ausgeschieden werden müssen (Goldstein u. Faletto 1993; Guengerich 1995; Raunio u. Mitarb. 1995). Viele potentiell mutagene Substanzen sind lipophil und können daher Zellmembranen passieren und von Transportproteinen wie Lipoproteinen im Körper transportiert werden (Hodgeson u. Dautermann 1980). Aufgrund ihrer Wasserunlöslichkeit können sie nicht direkt ausgeschieden werden. In der Regel werden diese Substanzen chemisch modifiziert und damit besser wasserlöslich gemacht. Für den Metabolismus dieser Stoffe sind eine Vielzahl entgiftender Enzyme im Körper zuständig. Ihre Rolle wird um so deutlicher, wenn es sich bei den aufgenommenen Giftstoffen um mutagene oder genotoxische Substanzen handelt. Nur eine rasche Inaktivierung und Ausscheidung dieser Substanzen kann das Erkrankungsrisiko für den Körper minimieren.

Die klassische Entgiftungsreaktion findet in zwei Schritten statt (Nebert 1989; Goldenstein u. Faletto 1993; Gonzales u. Mitarb. 1993b; Wolf u. Mitarb. 1994). Die erste Phase beinhaltet die Addition einer polaren reaktiven Gruppe an das Substrat. Diese verwandelt das ursprünglich inerte Substrat in ein reaktives Intermediärprodukt, welches dann von Phase-2-Enzymen in ein wasserlösliches Produkt umgewandelt werden kann. Die Phase 1-Reaktion wird als vorbereitender Schritt zur Entgiftung angesehen, der Prozeß aber erst durch die Phase 2-Enzyme vollendet. Eine koordinierte Expression der Phase 1- und Phase 2-Enzyme ist für das Zusammenspiel der beiden Reaktionsschritte und damit für den effektiven Abbau von Giftstoffen und Karzinogenen essentiell (Abb1.).

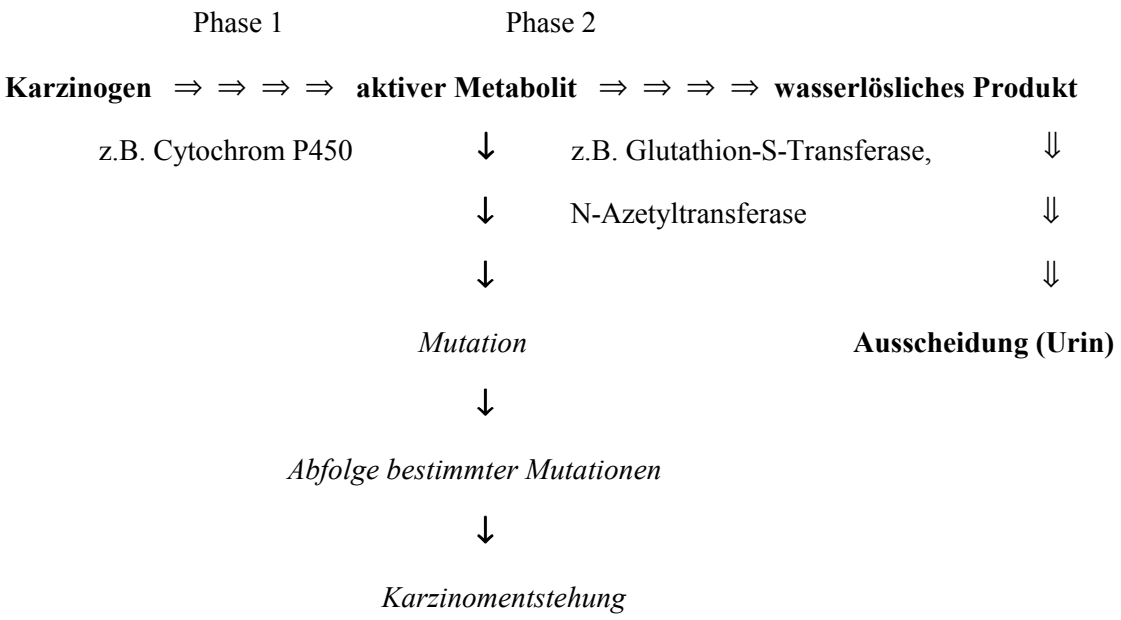


Abb. 1: Entgiftungsstoffwechsel

Die Enzyme, welche die Phase 1-Reaktionen katalysieren, entstammen nahezu ausschließlich der Cytochrom P450 Supergen-Familie (CYP), die auch als Monooxigenasen bezeichnet werden, da sie prokarzinogene Substrate durch die Addition eines einzelnen Sauerstoffatoms in ein aktives Epoxid umformen (Nebert 1989). Diese Enzyme haben eine breite Substratspezifität und daher eine geringe Substrataffinität. Phase 2-Reaktionen beinhalten die Konjugation des reaktiven Intermediärprodukts an endogene Substanzen wie Glukoronide, Wasser, Sulfate, Phosphate und Glutathion. Hauptvertreter der Phase 2-Enzyme sind Glutathion S-Transferasen (GST) und N-Azetyltransferasen. Die GST kommen in verschiedenen Formen vor und ihr Substratprofil überlappt sich stark (Mannervik u. Widersten 1995).

Ein interessantes Charakteristikum der Enzyme des Entgiftungsstoffwechsels ist, daß viele von ihnen genetische Variationen (Polymorphismen) aufweisen. Die unterschiedlichen Genotypen kodieren häufig Enzyme unterschiedlicher katalytischer Aktivität oder beeinflussen die Proteinexpression. Aus dem in Abb. 1 dargestellten Reaktionsablauf lassen sich nun Enzym-Kombinationen konstruieren, welche die Halbwertzeit des aktiven Metaboliten, der das für die Karzinomentstehung kritische Substrat darstellt, beeinflussen. So kann bei dieser Hypothese davon ausgegangen werden, daß im Falle von wenig aktiven CYP-Enzymen die aktiven Metaboliten langsam und kontinuierlich produziert werden. Verfügt eine

Person mit dieser Phase 1-Konstellation über hoch aktive Phase 2-Enzyme, so wird der aktive Metabolit schnell zu dem harmlosen, wasserlöslichen Produkt weiterverarbeitet. Es resultiert eine kurze Halbwertzeit des aktiven Karzinogens. In einem solchen Fall kann von einer protektiven Enzym-Konstellation ausgegangen werden. Liegen umgekehrt hoch aktive Phase 1-Enzyme vor, die zu einer schnellen Anflutung des aktiven Metaboliten führen, der durch weniger aktive Phase 2-Enzyme langsam weiterverarbeitet wird, so läßt sich ein Hochrisikotyp postulieren (Abb. 1).

Aus dem peripheren Blut lassen sich die Leukozyten extrahieren und daraus die DNA gewinnen. Mittels Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) können die Genotypen der einzelnen CYP- und GST- Polymorphismen für alle Patienten und Kontrollpersonen bestimmt werden. So läßt sich jedem Individuum ein bestimmter Genotyp an dem polymorphen Genort eines Enzyms zuordnen. Da im Genom in der Regel 2 Kopien eines Gens vorliegen (sog. Allele), kann eine Person entweder homozygot für den Wildtyp (Vorliegen zweier nicht durch eine Mutation veränderter Genkopien), heterozygot (Nachweis der Mutation auf einem Allel) oder homozygot für die Mutation (Nachweis der Mutation auf beiden Allelen) sein.

Neben dem Entgiftungsstoffwechsel ist im Prozeß der Karzinogenese das körpereigene Abwehrsystem von großer Bedeutung. Das Zytokin TNFα wurde als Endotoxin beschrieben, welches im Rahmen der körpereigenen Antwort auf bestimmte Lipopolysaccharide oder Bacille Carmen Guerre gebildet wird und eine Tumornekrose in tumortragenden Mäusen bewirkt. Zytokine sind Moleküle mit regulatorischen Funktionen, die für die Einleitung und Unterhaltung spezifischer und unspezifischer Immunantworten verantwortlich sind (Carswell u. Mitarb. 1975; Old 1985; Vilcek u. Lee 1991). Obwohl viele Zelltypen TNFα produzieren können, sind Monozyten und Makrophagen die Hauptquelle von TNFα. Dieses Zytokin induziert in der Endothelzelle eine Reihe proinflammatorischer Veränderungen, die zur Produktion weiterer Zytokine, zur Bildung von Adhäsionsmolekülen und zur Freisetzung von prokoagulatorischen Substanzen führen. Diese Veränderungen können zum septischen Schock führen. Weiterhin stimuliert TNFα B- und T-Lymphozyten, induziert Fieber im Gehirn, unterdrückt die Lipoproteinlipase, führt durch Beeinflussung von Fettzellen zur Tumorkachexie und stimuliert Leberzellen zur Produktion von Akutphaseproteinen (Old

1985; Larrick u. Mitarb. 1990). Unter den vielfältigen biologischen Charakteristika sind die Tumorwachstum-hemmenden Eigenschaften, mittels derer TNFα zytotoxisch und zytostatisch auf viele Tumorzellen wirkt, hervorzuheben.

Die Regulation der TNFα-Bildung erfolgt durch verschiedene Interleukine und andere hemmende Substanzen wie beispielsweise Kortikosteroide und Adenosin. Darüber hinaus gibt es verschiedene Genvariationen nahe den TNF-Genen, welche regulatorische Eigenschaften haben und die individuelle Fähigkeit beeinflussen, TNFα zu produzieren (Pocoit u. Mitarb. 1993). Die Gene von TNFα sind auf Chromosom 6p21 im Major Histokompatibility Complex (MHC) lokalisiert (Nedospasov u. Mitarb 1986; Udalova u. Mitarb. 1993). Diese Region ist nach der Struktur und Funktion der Gene in drei Klassen unterteilt. Die Klasse 1- und Klasse 2-MHC Gene bilden das telomere (Chromosomenperipherie) und zentromere (Chromosomenzentrum) Ende des Komplexes (Abb. 2). Sie kodieren sehr polymorphe Zelloberflächen-gebundene Glykoproteine des HLA-Systems, die Ziele bei der T-Zell-Erkennung fremder Oberflächenantigene sind. Polymorphismus ist ein sehr häufiges und wichtiges Charakteristikum der MHC-Gene. Er ist elementar für die biologische Funktion der Klasse 1- und Klasse 2-MHC-Gene (Webb u. Mitarb. 1990). Die Vererbung bestimmter Allelvarianten an diesen Genorten wird für eine Vielzahl von Immunregulationsstörungen verantwortlich gemacht, die u.a. bei dem Typ 1-Diabetes mellitus (Pocoit u. Mitarb. 1993), der Myasthenia gravis und dem systemischen Lupus erythematodes (SLE) eine Rolle spielen (Webb u. Mitarb. 1990; Fugger u. Mitarb. 1989). Die Klasse 3-MHC-Gene sind zwischen denen der Klasse 1 und 2 gelegen (Abb. 2) und kodieren eine Vielzahl verschiedener Moleküle wie Komplementfaktoren, die Nebennierensteroid 21-Hydroxylase, das Hitzeschockprotein HSP 70, TNFα und Lymphotoxin (TNFβ) (Webb u. Mitarb. 1990). Die Strukturvariabilität ist bei den Klasse 3-Genen weniger ausgeprägt, jedoch sind auch hier in den Komplementfaktor-Genen und den TNF-Genen Variationen beschrieben worden, welche die individuelle TNFα- und TNFβ-Produktion beeinflussen und somit bei der Immunabwehr bedeutsam sein können.

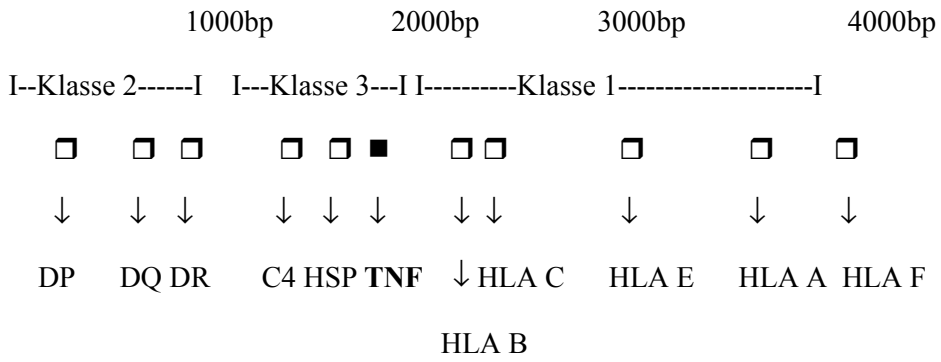


Abb. 2: Schematisierte Genkarte des menschlichen MHC-Komplexes auf dem kurzen Arm von Chromosom 6

Neben den exogenen und möglicherweise endogenen Faktoren, die das individuelle Risiko für die Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms bestimmen, wird auch der Verlauf der Erkrankung und damit die Prognose von vielen Einflüssen bestimmt. Aufgrund frühzeitiger Symptome werden glottische Larynxkarzinome häufig im Frühstadium diagnostiziert, in dem der Tumor noch organerhaltend operiert werden kann. Pharynxkarzinome werden hingegen meist erst in fortgeschrittenen Tumorstadien symptomatisch und sind meist mit einem zervikalen Lymphknotenbefall verbunden. Neben der Lokalisation, dem Stadium, der adäquaten Therapie und der Compliance des Patienten spielen die Aggressivität des Tumors sowie Reaktionen des Wirtsorganismus bei der Malignomerkrankung eine große Rolle (Chouaib. u. Mitarb. 1997). Vielfältige Anstrengungen sind unternommen worden, Marker zu definieren, die Aussagen über den Verlauf der Kopf-Hals-Karzinom-Erkrankung zulassen, um Hochrisikopatienten, beispielsweise für die Entwicklung von Tumorrezidiven und Zweitkarzinomen, frühzeitiger erkennen und effektiver behandeln zu können. Verbindungen zwischen chromosomalen Veränderungen im Tumorgenom und dem Krankheitsverlauf konnten bereits hergestellt werden (Bockmühl u. Mitarb. 1996; Califano u. Mitarb. 1996). Die in epidemiologischen Studien nachgewiesene familiäre Häufung von aggressiven Tumoren und Zweittumoren legt darüber hinaus die Existenz von genetischen Wirtsfaktoren (Copper u. Mitarb. 1995).

2 Fragestellung

Anhand der vorliegenden Arbeit sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. 1. Haben die Genpolymorphismen in den entgiftenden Enzymen der Glutathion S-Transferasen und Cytochrom P450 einen Einfluß auf das individuelle Erkrankungsrisiko von Kopf-Hals-Karzinom-Patienten? Ferner soll beurteilt werden, ob die TNF-Mikrosatelliten-Polymorphismen die individuelle Empfänglichkeit für diese Tumoren beeinflussen.

2. Kann die vorliegende Studie einen Beitrag dazu leisten, die Frage zu klären, ob die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren in unterschiedlichem Lebensalter oder bei unterschiedlichem Alkohol- und Zigarettenkonsum von besonderen genetischen Konstellationen beeinflußt wird?

3. Werden Faktoren, die für den Krankheitsverlauf bedeutsam sind (Tumorstadium, Halslymphknotenbefall, histologischer Differenzierungsgrad, Tumorrezidive, Mehrfachtumoren) durch zugrundeliegende Genotypen beeinflußt?

4. Abschließend soll beurteilt werden, ob eine klinische Anwendung der gewonnenen Ergebnisse sinnvoll erscheint.

3 Literaturübersicht

Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich erkranken meist zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr. Innerhalb dieser Gruppe kann häufig ein altersabhängiger Zusammenhang mit dem Alkohol- und Zigarettenkonsum festgestellt werden. Patienten, die in jüngerem Lebensalter erkranken, weisen meist einen höheren Genußmittelkonsum auf und entwickeln vermehrt Hypopharynxkarzinome (Elwood u. Mitarb. 1984; Brugere u. Mitarb. 1986; Blot u. Mitarb. 1988). Patienten, die bereits um das 40. Lebensjahr an einem Kopf-Hals-Karzinom erkranken, sind mit einer Häufigkeit von 2-5% in größeren Studien sehr selten (Clark u. Mitarb. 1982; Webber u. Mitarb. 1984; Shvero u. Mitarb. 1987). In dieser Altersgruppe ist ein exzessiver Alkohol- und Zigarettenkonsum meist nicht nachweisbar. Auch entwickeln diese Patienten im weiteren Verlauf vermehrt Zweittumoren (Shvero u. Mitarb. 1987). Ein etwas höherer Anteil an weiblichen Patienten wird in dieser Altersgruppe

ebenfalls beobachtet (Clark u. Mitarb. 1982; Webber u. Mitarb. 1984). Diese Umstände weisen auf eine besondere Prädisposition dieser Subpopulation hin.

Der Einfluß von Alkoholkonsum und Zigarettenrauchen auf die Entstehung der Kopf-Hals-Karzionme gilt heute als erwiesen. Die Alkoholmenge, ab welcher das Erkrankungsrisiko stark ansteigt wird in der Literatur mit etwa 60-80 g/d angegeben (Brugere u. Mitarb. 1986). Bei Rauchern steigt ab einem Konsum von 10 Packungsjahren (1 Packungsjahr ist definiert als Konsum einer Schachtel von 20 Zigaretten täglich über 1 Jahr) das Risiko stark an, ein Karzinom zu entwickeln (Elwood u. Mitarb. 1984; Brugere u. Mitarb. 1986; Blot u. Mitarb. 1988). Alkoholkonsum und Zigarettenrauchen haben aber nicht nur einen Einfluß auf die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren, sondern spielen auch im Krankheitsverlauf eine entscheidende Rolle. Von mehreren Autoren konnte beobachtet werden, daß mit zunehmendem Alkohol- und Zigarettenkonsum die Effektivität der Behandlung abnahm, das Risiko von Tumorrezidiven und die Mortalitätsrate aber anstieg (Brugere u. Mitarb. 1986; Vander Ark u. Mitarb. 1997; Dhooge u. Mitarb. 1998).

Als weitere ätiologische Faktoren werden berufsbedingte Umweltgifte wie Asbest, Holzstaub, Zement- und Teerprodukte, Metalldämpfe, Lösungsmittel sowie sozioökonomische Faktoren in der Pathogenese der Kopf-Hals-Karzinome vermutet (Maier u. Mitarb. 1992, 1993, 1997; Tisch u. Mitarb. 1996). Darüber hinaus wird bei Larynxkarzinomen ein Zusammenhang mit der Larynxpapillomatose sowie humanen Papillomaviren (HPV) der Typen 6 und 11 (Koufman u. Mitarb. 1997) und bei Tonsillenkarzinomen mit HPV Typen 16 und 33 vermutet (Snijders u. Mitarb. 1992). Einige der Risikofaktoren beeinflussen sich gegenseitig. Beispielsweise erhöhen Rauchen und Alkoholkonsum die Empfänglichkeit gegenüber HPV-Infektionen (Koufman u. Mitarb. 1997).

Die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen ist aber auch bei Personen, welche die Hauptrisikofaktoren aufweisen, ein seltenes Ereignis. Andererseits wird in der Literatur auch von einem relativ konstanten Anteil von 5-10% der Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren berichtet, die alle diese exogenen Risikofaktoren nicht aufweisen (Elwood u. Mitarb. 1984; Brugere u. Mitarb. 1986; Blot u. Mitarb. 1988; Talami u. Mitarb. 1990; Schwartz u. Mitarb. 1994). Diese Umstände machen das Vorliegen genetisch determinierter Risikofaktoren

wahrscheinlich (Bongers u. Mitarb. 1996; Chouaib u. Mitarb. 1997). Patienten, bei denen diese Tumorentstehung mehrfach unabhängig voneinander auftritt, scheinen eine besondere Risikogruppe darzustellen (De Vries u. Mitarb. 1986, 1987; Copper u. Mitarb. 1995). Die Definition von Mehrfachkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich wurde erstmals von Warren und Gates (1932) aufgestellt und später modifiziert (Hong u. Mitarb. 1990; Schwartz u. Mitarb. 1994). Danach soll der Zweittumor durch mindestens 2 cm nicht neoplastisch veränderte Mukosa von dem Primärtumor oder dem Resektionsrand nach Entfernung des Ersttumors entfernt sein. Die Definition wurde von Schwartz um die Tumoren erweitert, die nach mehr als drei Jahren (Jones u. Mitarb. 1995 definierten 5 Jahre) in geringerem Abstand zum Ersttumor entstanden. Treten die Zweittumoren gleichzeitig oder innerhalb von 6 Monaten auf, so bezeichnet man sie als synchron. Werden sie mehr als 6 Monate zeitlich versetzt diagnostiziert, so bezeichnet man sie als metachron. Die Mehrzahl der Zweittumoren (über 90%) sind metachron. In einem Kollektiv von Kopf-Hals-Karzinom-Patienten wird die jährliche Rate an neu aufgetretenen Zweitkarzinomen auf ca. 3% geschätzt (Jovanovic u. Mitarb. 1994). Die Inzidenz von Zweitkarzinomen variiert zwischen 10% und 40 % in verschiedenen Studien, abhängig von der Lokalisation und Prognose des Primärtumors (De Vries u. Snow 1986; Schwartz u. Mitarb. 1994). Patienten, die ein Zweitkarzinom entwickeln, haben eine deutlich höhere Morbidität und Mortalität. Das 5-Jahresüberleben liegt, abhängig von der Tumorlokalisation und den Rauch- und Trinkgewohnheiten, meist unter 10% (Schwartz u. Mitarb. 1994).

Epidemiologische Untersuchungen an Verwandten ersten Grades von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich haben ergeben, daß diese ein 3,5-fach höheres Risiko tragen, ebenfalls an einem solchen Tumor zu erkranken, verglichen mit Personen, die bei ähnlichem Alkohol- und Zigarettenkonsum diese familiäre Belastung nicht aufwiesen (Copper u. Mitarb. 1995). Eine familiäre Häufung von Mehrfachtumoren konnte ebenfalls beobachtet werden, was dazu führte einen "intrinsic factor" zu postulieren, der das relative Risiko eines Individuums beeinflußt, einen Tumor im Kopf- Hals-Bereich zu entwickeln (Bongers u. Mitarb. 1996). Eine Beeinflussung des individuellen Erkrankungsrisikos, insbesondere bei Zgarettenrauch-abhängigen Malignomen, wird seit

einigen Jahren mit Genvariationen in Enzymen des Entgiftungsstoffwechsels in Zusammenhang gebracht (Ketterer u. Mitarb. 1990; Harris u. Mitarb. 1991; Ingelman-Sundberg u. Mitarb. 1992; Roots u. Mitarb. 1992a; Gonzales u. Mitarb 1993a, b; Wolf u. Mitarb. 1994; Hayes u. Mitarb. 1995). Die Cytochrom P450 (CYP) Enzyme sind bekannt als Phase 1- Enzyme, welche beim Abbau von vielen Chemikalien bedeutsam sind (Guengerich 1995). Gene dieser Familie, von denen es etwa 150 gibt, kodieren membrangebundene Haem-enthaltende Enzyme (LaBella 1991), die Oxidationsreaktionen ausführen. In der Cytochrom P450 Supergen-Familie sind derzeit etwa zwei Dutzend Genfamilien bekannt, wobei etwa 10 bei Säugern vorkommen. Während die anfängliche Klassifizierung der Enzyme auf ihre Substrateigenschaften zurückgeht, richtet sich die neuere Nomenklatur nach der Übereinstimmung in ihrer Struktur. CYP bezeichnet die Supergenfamilie, gefolgt von einer Zahl, welche die Familie charakterisiert. Ein Buchstabe bestimmt dann die Subfamilie, sowie eine weitere Zahl, die das genaue Gen benennt, beispielsweise CYP 1A1 (Nebert u. Mitarb. 1991). In der Phase 2-Reaktion sind die Glutathion S-Transferasen (GST) von besonderem Interesse in Bezug auf die Entstehung von Krankheiten, insbesondere Malignomerkrankungen, da sie die Konjugation von elekrophilen Substanzen (häufig Karzinogene) mit reduziertem Glutathion katalysieren (Jacoby u. Mitarb. 1978; Chasseaud u. Mitarb. 1979; Mannervik u. Mitarb. 1985). Die GST sind ubiquitär vorkommende Enzyme, die in den meisten menschlichen Zellen in hoher Konzentration vorliegen. Beispielsweise sind die GST eingebunden in die Körperabwehr gegen oxidativen Streß, wie er bei der Entstehung vieler Erkrankungen eine Rolle spielt (Ketterer u. Mitarb. 1990; Hayes u. Strange 1995). Es ist bekannt, daß sie unzählige hydrophobe Liganden an sich binden. Vier Klassen wurden bisher unter den zytosolischen GST identifiziert: α, μ, π und τ. Nach der von Mannervik u. Mitarb. (1992) vorgeschlagenen Nomenklatur bezeichnet GST wieder die Supergenfamilie, gefolgt von einem (ursprünglich griechischen) Buchstaben, der die Familie benennt. Eine Zahl kennzeichnet wiederum das genaue Gen, z.B. GSTμ1 oder auch oft GSTM1 geschrieben. Interindividuelle Unterschiede in der Aktivität der CYP und GST wurden zunächst auf der Ebene der Proteine nachgewiesen. Mit der Entwicklung molekulargenetischer Untersuchungstechniken verlagerte sich das Interesse zunehmend auf die Ebene der Gene.

Diese Techniken sind sehr spezifisch, so daß bereits Allele, die sich in einer Base unterscheiden, identifiziert werden können, selbst wenn sie die Proteinstruktur nicht beeinflussen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden die Polymerasekettenreaktion (PCR), Restriktionenzym-Verdauungen und Elektrophorese-Techniken benutzt, um Allelvarianten zu identifizieren.

Die PCR stellt die in-vitro Vervielfältigung (Amplifikation) einer bekannten DNA-Sequenz dar. Sie wurde Mitte der 80er Jahre (Saiki 1985; Mullis und Falloona 1987) entwickelt, obwohl ihre Prinzipien bereits ein Jahrzehnt früher beschrieben wurden (Panet und Khorana 1974). Die PCR wird benutzt, um Gene zu charakterisieren, zu klonen und zu exprimieren (Newton u. Mitarb. 1989). Ferner konnten mit ihr Mutationen vererbter Erkrankungen identifiziert werden, wie beispielsweise bei der Mukoviszidose (Friedman u. Mitarb. 1991), oder Erreger nachgewiesen werden (z.B. Borrelien). Die Ausgangssubstanzen für die PCR sind die zu vervielfältigende DNA-Vorlage, die DNA-abhängige Polymerase, die vier verschiedenen Desoxyribonucleotidtriphosphate (dNTP´s) und sog. Primer, kurze Oligonucleotide mit komplementärer Struktur zu den die DNA-Vorlage begrenzenden Sequenzen. Die Primer binden an die komplementäre Einzelstrang-DNA, nachdem diese thermisch bei 94-95°C denaturiert wurde. Die Verlängerung der Primer wird durch die DNA-Polymerase bei entsprechender Temperatur unter Verwendung der Desoxyribonucleinsäuren ausgeführt. Es resultiert ein neuer, der Vorlagen-DNA entsprechender Strang, der in weiteren Zyklen wiederum als DNA-Vorlage benutzt werden kann. Die PCR besteht aus einer Abfolge von Zyklen, welche eine Hitzedenaturierung der DNA, Abkühlung der Mixtur um die Primer an die Einzelstrang-DNA zu binden und die folgende Primerverlängerung beinhalten. Die Temperatur, bei der die Primer an die DNA-Vorlage binden, variiert, abhängig von der Länge und der Basenzusammensetzung der Primer. Nach dem Ende des ersten Zyklus verdoppeln sich die DNA-Stränge. Im weiteren Verlauf steigt die Anzahl der DNA-Stränge exponentiell an. Nach 25-30 Zyklen liegt in der Regel genug DNA vor, um weitere Experimente durchführen zu können, beispielsweise Enzymverdauungen und anschließende gelelektrophoretische Auftrennungen (White u. Mitarb. 1989).

Die Verwendung von Restriktionsenzymen ist der meist benutzte Ansatz, um in der Molekulargenetik Allelvarianten zu erkennen. Die Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismen (RFLP) werden identifiziert, indem die DNA, die aus der PCR resultiert, mit Enzymen verdaut wird, die bestimmte Basensequenzen erkennen und daraufhin die Doppelstrang-DNA durchtrennen. Diese Enzyme werden Restriktionsenzyme genannt und kommen natürlich in vielen Bakterien vor, wahrscheinlich um vor Bakteriophagen zu schützen. Die Sequenzen, die sie erkennen und nach denen sie schneiden, werden Restriktionsstellen genannt. Im Rahmen der PCR-Technik wurde es möglich, kurze DNA-Sequenzen zu amplifizieren, die solche Restriktionsstellen enthalten, um sie dann mit dem entsprechenden Restriktionsenzym zu verdauen. Da die meisten Mutationen entweder die Bildung einer Restriktionssequenz oder den Verlust einer solchen zur Folge haben, unterscheiden sich die Fragmente verschiedener Allele (Knippers 1997). Sie werden nach der PCR und Restriktionsenzymverdauung durch eine Elektrophorese in Agarosegelen unterschieden. Diese Technik trennt Moleküle entweder nach ihrer Größe und/oder Ladung. Da DNA negativ geladen ist und ein festes Ladungs/Größen-Verhältnis aufweist, besteht die Trennung der DNA-Fragmente mittels Elektrophorese generell auf Größenunterschieden der entsprechenden Fragmente. Dabei ist die Laufstrecke im Gel proportional zu dem Logarithmus des Molekulargewichts. Je nach zu erwartender Größe der DNA-Fragmente kann die Konzentration des Agarosegels verändert werden. Die DNA-Banden werden durch Ethidiumbromidfärbungen dargestellt. Diese Substanz lagert sich zwischen den Basen der DNA an, was wiederum zu einer Fluoreszenz unter UV- Licht führt.
Beispielsweise können mit den genannten Techniken von der menschlichen Glutathion S-Transferase P1 zwei Isoformen identifiziert werden, die sich nur durch eine Aminosäure unterscheiden (Ile/Val an Position 104). Dieser Veränderung der Aminosäuren liegt ein Austausch von Adenin gegen Guanin (A/G Transition) am Nukleotid 313 des GSTP1-Gens zugrunde. Die enzymatischen Eigenschaften der beiden Proteine zeigen deutliche Unterschiede in der Hitzestabilität sowie Affinität beispielsweise für 1-Chlor-2,4,-Nitrobenzen, einem im Zigarettenrauch enthaltenen Karzinogen (Ali-Osman u. Mitarb. 1997; Harries u. Mitarb. 1997).

Andere Enzyme zeichnen sich durch ausgedehntere Veränderungen in ihren Genen aus. So gibt es beispielsweise bei der GSTT1 nur den Nachweis des intakten Gens, der mit einem funktionsfähigen Enzym korreliert ist oder den kompletten Verlust des Gens mit entsprechendem Verlust des funktionsfähigen Enzyms (Pemble u. Mitarb. 1992).
Von den CYP-Polymorphismen wurde das Gen CYP2D6 besonders ausführlich untersucht, sowohl phänotypisch, wie auch genotypisch, mit einer guten Korrelation zwischen phänotypischen und genotypischen Ergebnissen (Roots u. Mitarb. 1992a; Warwick u. Mitarb. 1994; Rannung u. Mitarb. 1995; Raunio u. Mitarb. 1995). Die zwei bisher identifizierten Mutationen führen zu Phänotypen mit unterschiedlicher katalytischer Aktivität, wobei das homozygot mutierte Gen ein Protein mit einer geringeren Affinität zum Substrat kodiert (poor metabolizer, PM) im Vergleich zum nicht mutierter Genotyp, dessen Enzym eine deutlich höhere Aktivität aufweist (extensive metabolizer, EM). Die Phänotypen können mittels Gelelektrophorese (Board u. Mitarb. 1981) oder chromatographischen Methoden (Hayes u. Mitarb. 1989) getrennt werden. In letzter Zeit werden auch hier zunehmend die o.g. molekulargenetische Verfahren eingesetzt, um direkt die zugrundeliegenden Allele zu identifizieren.
Andere im Rahmen der vorliegenden Studie untersuchte Genvariationen sind die Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Mikrosatelliten-Polymorphismen. Bereits 1893 wurde von W. B. Coley beobachtet, daß schwere Infektionen zu einer Reduktion von malignen Tumoren führen können. Eine erhöhte Produktion von TNFα durch Monozyten konnte bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen werden (Parks u. Mitarb. 1994; Knerer u. Mitarb. 1996). Viele Tumorwachstum-hemmende Effekte konnten auf die zytotoxischen Eigenschaften von TNFα zurückgeführt werden. TNFα kann beispielsweise bei Tumorzellen die Apoptose, den programmierten Zelltod, induzieren (Chouaib u. Mitarb. 1997). Diese Funktion hat dazu geführt, TNFα als mögliche therapeutische Substanz bei Tumorpatienten einzusetzen. Bisher ist dieser Einsatz aufgrund schwerer Nebenwirkungen limitiert. Neuere Methoden zur topischen und intraperitonealen Applikation oder der Gentransfer von TNFα in isolierte Zellen könnten Fortschritte erbringen (Eigler u. Mitarb. 1997). Neuere Studien zeigten, daß einige Tumoren, darunter Ovarialkarzinome, maligne

Melanome und auch Kopf-Hals-Tumoren in der Lage sind, in-vivo TNFα zu produzieren (Parks u. Mitarb. 1994; Knerer u. Mitarb. 1996). TNFα dient in diesem Falle nicht mehr der Tumorabwehr, da die Zellen, die dieses Zytokin produzieren, gegen seine antikarzinogenen Eigenschaften immun sind, sondern weist dann prokarzinogene Eigenschaften wie beispielsweise eine Stimulation der Tumorangiogenese oder die Destruktion von Knochen- und Bindegewebe auf (Parks u. Mitarb. 1994; Knerer u. Mitarb. 1996; Eigler u. Mitarb. 1997). Die physiologische Regulation der TNFα-Bildung erfolgt über ein Netzwerk mit anderen proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin IL 1 und IL 6 mit teilweise überlappender Funktion und antagonisierenden Zytokinen wie beispielsweise IL 10. Weitere TNFα hemmende Substanzen sind beispielsweise Kortikosteroide und Adenosin. Ferner kann die Halbwertzeit der TNFα-mRNA durch Medikamente, beispielsweise Thalidomid, beeinflußt werden (Parks u. Mitarb. 1994; Chouaib u. Mitarb. 1997; Eigler u. Mitarb. 1997).
Eine enge Verbindung der TNFα-Produktion zu Polymorphismen im HLA-System konnte nachgewiesen werden (Webb u. Mitarb. 1990; Pocoit u. Mitarb. 1993; Monos u. Mitarb. 1995). So zeigten HLA-DR2 Zellen, die mit Lektinen stimuliert wurden, eine geringere TNFα -Produktion als beispielsweise HLA-DR3 oder DR4-Zellen (Webb u. Mitarb. 1990). Mittlerweile sind mehrere Mikrosatelliten-Polymorphismen in und nahe den TNFα- und TNF β-Genen identifiziert worden (Udalova u. Mitarb. 1993). Dies sind Dinukleotid-Wiederholungen, deren Anzahl auf unterschiedlichen Allelen schwankt. Zwei dieser Mikrosatelliten-Sequenzen, TNFA und B genannt, sind eng miteinander verbunden und liegen 3,5 kb oberhalb des TNFβ-Gens. Andere Regionen, die polymorphe Mikrosatelliten-Sequenzen enthalten, liegen 8-10 kb unterhalb des TNFα-Gens (TNFD) und ein weiterer Marker im ersten Intron von TNFβ (TNFC). Der Mikrosatelliten-Polymorphismus TNFA weist 13 verschiedene Allele auf, der Marker TNFB 7, TNFC 2 und TNFD erneut 7 Allele (Udalova u. Mitarb. 1993). Obwohl diese Polymorphismen nicht in den transkribierten Gensequenzen von TNFα und TNFβ liegen, konnten Zusammenhänge zwischen bestimmten Haplotypen (gemeinsame Vererbung von Allel-Kombinationen) und verschiedenen Erkrankungen nachgewiesen werden, bei denen immunologische Faktoren eine Rolle spielen. Hierzu gehören der Typ 1-Diabetes mellitus, der systemische Lupus erythematodes (SLE), das

Sjögren-Syndrom und die primär chronische Polyarthritis PCP (Pocoit u. Mitarb. 1994; Monos u. Mitarb. 1995; Hajeer u. Mitarb. 1996). Darüber hinaus konnten Unterschiede in der Expression von TNFα und TNFβ mit einigen Allelen und Haplotypen der Mikrosatelliten-Polymorphismen in Zusammenhang gebracht werden (Pocoit u. Mitarb. 1994). Die daraus hergeleitete Vermutung, daß die Mikrosatelliten-Polymorphismen in den TNF-Genen die individuelle Immunregulation und die Körperabwehr gegen Krebszellen beeinflussen könnten, macht diese Genvariationen zu möglichen Einflußfaktoren für die Empfänglichkeit gegenüber Karzinomerkrankungen. Tatsächlich konnten bereits einige Tumorerkrankungen, wie Kolonkarzinome und multiple Hautbasaliome mit bestimmten TNF-Mikrosatelliten-Allelen in Verbindung gebracht werden (Campbell u. Mitarb. 1994; Hajeer u. Mitarb. 1997).

4 Material und Methoden

4.1 Patienten

Zwischen 1994 und 1997 wurden Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich aus den HNO-Kliniken des Virchow-Klinikums und der Charité der Humboldt-Universität zu Berlin in die Studie aufgenommen. Die Patientengruppe enthielt Männer und Frauen mit Mundhöhlen-, Pharynx- und Larynxkarzinomen, die sich mit erstmals diagnostizierten Tumoren in einer der Kliniken vorstellten oder im Rahmen der Tumorsprechstunde bis zu 5 Jahre nach der Tumorbehandlung betreut wurden. Neben den Patientendaten (Name, Geburtsdatum, Geschlecht, Alter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, Rauch- und Alkoholkonsum-Gewohnheiten bis zur Diagnosestellung) wurden die Tumorlokalisation, die TNM-Klassifikation (Hermanek u. Mitarb. 1987), der histologische Differenzierungsgrad des Tumors, die Art der Behandlung und die histologische Beurteilung der Resektionsränder in die Studie aufgenommen. Die regelmäßige Nachkontrolle in der Tumorsprechstunde sowie Auftreten und Zeitpunkt von Tumorrezidiven oder Zweittumoren wurde ebenfalls erfaßt.

Eine Kontrollgruppe von Personen, bei denen keine Malignomerkrankung vorlag, wurde ebenfalls in die Studie aufgenommen. Sie enthielt Patienten der HNO-Kliniken, die sich in der Alters- und Geschlechterverteilung wie auch im Alkohol- und Zigarettenkonsum möglichst

wenig von der Tumorgruppe unterschieden, bei denen aber keine malignen oder entzündlichen Erkrankungen vorlagen. Von allen Studienteilnehmern wurde 10 ml Venenblut entnommen, aus dem nach Extraktion der Leukozyten-DNA die Genotypen an den einzelnen Genorten bestimmt wurden.

4.2 Methoden zur Bestimmung der Polymorphismen an Glutathion S-Transferase und Cytochrom P450 Genorten

DNA-Extraktion:

Die Extraktion der DNA aus Blutproben wurde mittels der Phenol/Chloroform-Methode und Alkoholpräzipitation durchgeführt. 3ml EDTA-Blut wurden nach Lagerung bei -20°C bei Raumtemperatur aufgetaut, in 50 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen (Fa. Falcon) überführt und 35 ml 4°C kalter Lysepuffer hinzugefügt, um die Blutzellen zu lysieren. Das Röhrchen wurde geschüttelt und anschließend bei 1500 G für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, um die Degradierung der DNA durch Nukleasen zu vermeiden. Der Zellniederschlag wurde in 1,5 ml kaltem (4°C) SE-Puffer und 0,17 ml 5% NaDS resuspendiert und mit 2 mg/ml Proteinase K bei 37°C über Nacht inkubiert, um Proteine zu denaturieren und die Zellkernmembranen zu lysieren. Die Proben wurden dann in 10 ml Glasröhrchen überführt und 1,5 ml Phenol, gesättigt mit Tris-Puffer (pH 8,0) und 8-Hydroxyquinolin, hinzugefügt. Das Gemisch wurde geschüttelt, bis die Proteine ausfielen. Das 8-Hydroxyquinolin schützte vor der Oxidation des Phenols, und seine gelbliche Farbe erlaubte jederzeit die Identifizierung der organischen Phase. Die Proben wurden dann erneut bei 1500 G für 10 Minuten zentrifugiert, um die organische von der wäßrigen Phase zu trennen. Die wäßrige Phase, in der sich die DNA befand, wurde in ein weiteres Röhrchen gegeben, das 1,5 ml Chloroform / Isoamylalkohol (24:1) enthielt, um Phenolreste auszuwaschen. Die Mischung wurde für 5 Minuten bei 1500 G zentrifugiert. Die wäßrige Phase wurde erneut mit einer Pasteurpipette in ein frisches Glasröhrchen überführt, das erneut die Chloroform / Isoamylalkohol-Lösung enthielt. Die Chloroform-Extraktion wurde wiederholt und die wäßrige Phase in ein neues Glasröhrchen überführt. 0,15 ml 3 M Natriumazetat (pH 5,3) und 3,3 ml reiner Alkohol wurden hinzugefügt und das Röhrchen vorsichtig geschwenkt, bis die

DNA ausfiel. Die DNA wurde mit einem sterilisierten Glashaken aus der Lösung entfernt und in 0,1 ml sterilem, destilliertem Wasser in einem Eppendorfröhrchen resuspendiert. Kurzzeitige Lagerung der DNA erfolgte bei 4°C, Langzeitlagerung bei -20°C.

Polymerasekettenreaktion (PCR):

Alle Zusätze für die PCR wurden bei -20°C gelagert. Während sie vor dem Ansetzen der PCR-Lösung auftauten, befanden sich die zu untersuchenden DNA-Proben ebenfalls bei Raumtemperatur. Mikrozentrifugenröhrchen wurden mit den Patientenkodierungen beschriftet. Die PCR- Stammlösung wurde wie folgt zusammengestellt:

		Endkonzentration:
10 x PCR-Puffer (mit Mg2+-Zusatz 15mM) (Fa. Sigma)	=	1,5 mM
Primer 1 (5mM)	=	0,5mM
Primer 2 (5mM)	=	0,5mM
dNTP (4x5mM)	=	4x 0,2 mM
Taq Polymerase (5 IU*/l)	=	0,1 U

*1U entspricht der Menge an Enzym, das 10 Nanomol dNTP´s in löslichem Medium in 30 min. bei 74°C umsetzen kann.

Die Verdünnung erfolgte jeweils mit sterilem, destilliertem Wasser. Die Stammlösung wurde geschwenkt und jeweils 48 µl in jede der beschrifteten Patientenröhrchen gegeben. 2µl der zu untersuchenden DNA-Lösung wurden der PCR-Lösung hinzugefügt und das Gemisch mit 2 Tropfen flüssigem Paraffinöl abgedeckt, um eine Verdunstung bei den hohen Temperaturen während der PCR zu verhindern. Die Röhrchen wurden zentrifugiert, um die Ölphase zu trennen. Anschließend wurden die Proben in den Thermozykler gestellt und das für die jeweiligen Primer ermittelte Programm (siehe unten) der PCR eingestellt.

Restriktionsenzymverdauung:

Die Identifizierung der meisten Mutationen erforderte die Verdauung des PCR-Produkts mit einem Restriktionsenzym, welches eine bestimmte Sequenz auf einem der beiden Allele erkennt. Die Restriktion wurde wie folgt durchgeführt:

Eine Stammlösung für 20 Verdauungen (oder entsprechend mehr) wurde angesetzt:

10x enzymspezifischer Puffer, (mit dem Restriktionsenzym mitgeliefert)	=	40µl
steriles, destilliertes Wasser	=	160µl
Restriktionsenzym (10U/l) (Promega od. New England Biolabs)	=	5µl

10µl der Enzym-Stammlösung wurden mit 10µl PCR-Produkt vermischt und über Nacht bei der, für das jeweilige Enzym angegebenen Temperatur inkubiert. Anschließend wurden 8 ml Ladepuffer zu der Lösung hinzugegeben.

Agarose-Gelelektrophorese:

Eine Gelgußform wurde mit den entsprechenden Kämmen vorbereitet. Die Agarose wurde zwischen 2-4% Konzentrationen verwendet (Gelkonzentration abhängig von der DNA-Fragmentgröße) und in 0,5x TBE-Puffer unter gleichmäßigem Erhitzen gelöst. Nach anschließendem Abkühlen auf ca. 50°C wurden 2 ml Ethidiumbromidlösung (10mg/ml) hinzugefügt. Die Agarose wurde in die Gelform gegossen und etwa 30min. zum Aushärten bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurden die Kämme aus dem Gel entfernt, der Träger in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit 300ml 0,5 x TBE-Puffer mit 5ml Ethidiumbromid (10mg/ml) übergossen, bis das Gel etwa 5 mm mit Puffer bedeckt war. 5-8µl der zu untersuchenden DNA-Proben wurden in die einzelnen Gelaussparungen geladen und die Elektrophorese bei ca. 100V für 40-60min. durchgeführt.

Reagentien und Puffer:

Borsäure, Tris HCl, EDTA, Chloroform, NaCl, MgCl, Hydrochlorsäure, Natrium-dodezylsulfat, Natriumacetat 8-Hydroxyquinolin, Isoamylalkohol und Sukrose von BDH Chemicals Ltd. Poole, Dorset, UK. Phenol von Rathburn Chemicals Ltd., Walkerburn, Schottland, Agarose von Promega, Southampton, UK.

dNTPs und Taq-Polymerase von Promega, Primer von Pharmacia Biotech, St Albans, UK. Restriktionsenzyme von Promega oder New England Biolabs Hitchin, UK, Proteinase K von Sigma chemical, Poole, Dorset, UK.

Puffer:

TE-Puffer: 15,76g Tris-HCL, 18,6g Di-Natrium-EDTA, 100ml Aqua dest.

TBE-Puffer: 21,5g Tris-HCL, 1,9g Di-Natrium-EDTA, 11g Borsäure, 2000ml Aqua dest.

Ladepuffer: 2,0ml Bromphenolblau (1mg/ml in TE Puffer), 0,35g SDS (Natrium-dodezylsulfat), 0,5g Ficoll 400 in 5ml TE-Puffer

SE-Puffer: 18,6g Di-Natrium-EDTA, 1,0g Sarkosyl, 100ml Aqua dest.

Lysepuffer: 600mg Tris-base, 870mg NaCl, 100ml Aqua dest.

Geräteausstattung:

1. PCR Thermal Cycler; Hybaid OmniGene und Perkin Elmer Thermal Cycler
2. Elektrophoresekammern: Hoefer PS 300 DC Power Supply und Pharmacia EPS 300/400.
3. Gel-Elektrophorese Apparat, Pharmacia GNA-200.
4. Zentrifugen; Sanyo MSE Mistral 1000 und MSE micro-centaur, Fisons, Loughborough, UK.
5. UV- Beleuchter; LKB 2011 Macro Vue, Pharmacia
6. Filmkamera und Filme (Polaroid 665) von Kodak, UK.

Jede Genvariation wurde mit einer spezifischen PCR identifiziert, deren Details im folgenden aufgeführt sind.

GSTM1-Mutationen:

GSTM1A-, B-, AB- und 0- Genotypen wurden mittels multiplex PCR-Reaktionen identifiziert. Jeder Ansatz bestand aus zwei PCR-Amplifikationen. Der eine enthielt einen komplementären Primer zu dem GSTM1A-Allel (5´-TTGGGAAGGCGTCCAAGCGC-3´) und der andere einen B-spezifischen Primer (5´-TTGGGAAGGCGTCCAAGCAG-3´). Die beiden Allele unterscheiden sich durch eine Base in Exon 7. Zusätzlich enthielten die Ansätze einen komplementären Primer zu Intron 6 (5´-GCTTCACGTGTTATGAAGGTTC-3´). Um nachzuweisen, daß das GSTM1-Gen überhaupt vorhanden war (es gibt auch den Verlust des funktionsfähigen Allels, ein sogenanntes Null-Allel) wurden Primer zu Exon 4 und 5 des Gens (5´-CTGCCCTACTTGATTGATGGG-3´ und 5´-CTGGATTGTAGCAGATCATGC-3´), einer Region, die bei Patienten mit dem Verlust des GSTM1-Gens nicht mehr vorhanden ist, hinzugegeben. Als interne Kontrolle wurden β-Globin spezifische Primer (5´-ACACAACTGTGTTCACTAGC-3´ und 5´-CAACTTCATCCACGTTCACC-3´) verwendet. Ein Beispielgel zeigt Abb. A, Bahn 4-11, unten .

GSTM3-Mutation:

3bp-Deletion in Exon 6 (MnlI- RFLP):

Spezifische Primer: (5´-CCTCAGTACTTGGAAGAGCT-3´und 5´-CACATGAAAGCCTTCAGGTT-3´)

Das PCR-Programm lautete: Denaturierung 94°C, 3min., dann 35 Zyklen, jeweils Denaturierung (94°C, 45sec.), Primeranbindung (58°C, 30sec.), Primerelongation (72°C, 45sec.). Abschließend wurde eine Primerelongation bei 72°C für 8min. durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt (273bp für das Wildtypallel, 270bp für das mutierte Allel) wurde bei 37°C mit MnlI verdaut. Die erhaltenen Fragmente (125bp, 86bp, 51bp und 11bp für das Wildtypallel; 134bp, 125bp und 11 bp für das mutierte Allel) wurden auf einem 4% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Banden nach der Elektrophorese zeigt Abb. A (Bahn 1-3 oben) .

GSTP1-Mutation:

A/G-Transition in Nukleotid 313 (Alw 261- RFLP):

Spezifische Primer: (5´-ACCCCAGGGCTCTATGGGAA-3´und 5´-TGAGGGCACAAGAAGCCCCT-3´)

Das PCR-Programm lautete: Denaturierung 95°C, 5min., dann 30 Zyklen, jeweils Denaturierung (94°C, 30sec.), Primeranbindung (55°C, 30sec.), Primerelongation (72°C, 30sec.). Abschließend wurde eine Primerelongation bei 72°C für 5min. durchgeführt. Das resultierende PCR-Produkt wurde bei 37°C mit dem Enzym Alw261 verdaut. Die resultierenden Fragmente (176bp für den Wildtyp, 91bp und 85bp für das mutierte Allel) wurden auf einem 3% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Beispiel-Gel zeigt Abb. F (Bahn: 5-7 oben).

GSTT1-Mutation:

Zum Nachweis bzw. Verlust des GSTT1-Gens wurde ein 480bp-Fragment des GSTT1-Gens, welches bei GSTT1 negativen Personen fehlt, mit folgenden Oligonokleotidprimern nachgewiesen: (5´-TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC-3´ und 5´-TCACCGGATCATGGCCAGCA-3´). Als interne Kontrolle wurde eine Region des β-Globin-Gens (5´GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3´ und 5´-

TGGTCTCCTTAAACCCTGTCTTG-3´) amplifiziert. Das PCR-Programm lautete: Denaturierung 94°C, 150sec, anschließend 39 Zyklen, jeweils Denaturierung (93°C, 60sec.), Primeranbindung (58°C, 60sec.), Primerelongation (72°C, 60sec.). Eine abschließende Elongation bei 72°C für 7 Minuten wurde angeschlossen. Die einzelnen Fragmente, GSTT1 positiv (480bp) und die β-Globin Bande (325bp), wurden auf einem 2%-Gel aufgetrennt. Ein Beispiel zeigen Bahn 1 und 2 (unten) der Abb. A.

CYP2D6-Mutationen

Die zwei häufig im CYP2D6-Gen vorkommenden Mutationen wurden mit unterschiedlichen PCR-Reaktionen und nachfolgenden Enzymverdauungen nachgewiesen. Die Mutation der Intron 3 / Exon 4-Bindungsstelle (G/A) führt zu einem Verlust der Restriktionsstelle für das Enzym BstNI während die 2-Basenpaardeletion in Exon 5 eine Restriktionsstelle für Hpa II in dem mutierten Allel darstellt. Zusammen charakterisieren diese Genotypen 90% der Phänotypen bei Europäern; es gibt noch einige andere Mutationen im CYP2D6-Gen, die mit einer veränderten Expression des Enzyms einhergehen, in dieser Population aber sehr selten sind.

Intron 3/ Exon 4-G/A-Mutation (BstNI- RFLP):

Spezifische Primer zu Exon 3 / Intron 4: (5´-GCCTTCGCCAACCACTCCG-3´ und 5´-AAATCCTGCTCTTCCGAGGC-3´). Das PCR-Programm lautete: Denaturierung 94°C, 3min., dann 34 Zyklen, jeweils Denaturierung (94°C, 30sec.), Primeranbindung (60°C, 60sec.), Primerelongation (72°C, 60sec.). Ein abschließender Zyklus von Primerbindung und Elongation wurde bei 72°C für 8min. durchgeführt.

Das resultierende 334bp PCR- Produkt wurde bei 60°C mit BstNI, wie oben beschrieben, verdaut. Das Wildtyp-Allel enthält eine Schnittstelle nach 105bp (229bp/105bp), die im mutierten Allel fehlt (334bp). Die resultierenden Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden nach der Elektrophorese sind in einem Beispiel-Gel (siehe Tabellenanhang, Abb. B) dargestellt.

Exon 5-Deletion (HpaII-RFLP):

Spezifische Primer zu Exon 5 / Intron 5: (5´-GATGAGCTGCTAACTGAGCCC-3´ und 5´-CCGAGAGCATACTCGGGAC-3´). Das PCR- Programm entsprach dem der Intron 3/ Exon

4-Mutation. Das resultierende 268bp PCR-Produkt wurde bei 37°C mit HpaII, wie oben beschrieben, verdaut. Der Wildtyp enthält nur eine Schnittstelle nach 80bp (80bp/188bp), das mutierte Allel eine zweite nach weiteren 168 bp (20bp/80bp/168bp). Die resultierenden Fragmente wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden nach der Elektrophorese sind in Abb. C dargestellt.

CYP2E1-Mutationen

Die Mutation der 5´Endstelle im CYP2E1-Gen wurde ebenfalls mit einer PCR-Reaktion und nachfolgender Enzymverdauung nachgewiesen.

5´-End-Mutation (RsaI- RFLP):

Spezifische Primer: (5´-CCAGTCGAGTCTATACATTGTCA-3´ und 5´-TTCATTCTGTCTTCTAACTGG-3´). Das PCR-Programm lautete: Denaturierung 94°C, 3min., dann 30 Zyklen, jeweils Denaturierung (94°C, 60sec.), Primeranbindung (58°C, 60sec.), Primerelongation (72°C, 60sec.). Ein abschließender Zyklus von Primeranbindung und Elongation wurde bei 72°C für 5min. durchgeführt.

Das resultierende 410bp PCR- Produkt wurde bei 37°C mit RsaI und mit PstI verdaut. Die resultierenden Fragmente (RsaI-Verdauung: 410bp bei dem Wildtyp, 360bp und 50bp bei dem mutierten Allel; PstI-Verdauung: 290bp und 120 bp) wurden in einem 2% Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Beispielgel ist unter Abb. D dargestellt.

CYP1A1-Mutationen

In dem aus 7 Introns und 6 Exons bestehenden CYP1A1-Gen sind 4 Mutationen beschrieben worden (Cascorbi u. Mitarb. 1996), von denen die bei Europäern am häufigsten vorkommenden zwei untersucht wurden. Die m1-Mutation befindet sich in der 3´End-Region und führt zu einer T/C Transition, die im Enzym einen Thymin / Cytosin Austausch bewirkt. Die Transition stellt eine Restriktionsstelle für das Restriktionsenzym MspI dar. Die 2. Mutation, m2 genannt, beruht auf einer A/G Transition in Exon 7, was in der Haem-Bindungsstelle des Enzyms zu einem Austausch von Isoleucin durch Valin führt. Beide Mutationen im CYP1A1-Gen wurden mittels PCR und Restriktionsenzymverdauungen identifiziert.

3´End-Region-T/C-Mutation, T/C-Mutation (MspI RFLP):

Spezifische Primer: (5´-CAGTGAAGAGGTGTAGCCGCT-3´und 5´-TAGGAGTCTTGTCTCATGCCT-3´)

Das PCR-Programm lautete: Denaturierung 94°C, 3min., dann 39 Zyklen, jeweils Denaturierung (95°C, 60sec.), Primeranbindung (66°C, 60sec.), Primerelongation (72°C, 60sec.). Das resultierende 340bp PCR-Produkt wurde bei 37°C mit MspI verdaut. Das Wildtyp-Allel weist keine Schnittstelle auf, das mutierte Allel führt zu einer Spaltung in ein 140bp und ein 200bp-Fragment. Die resultierenden Fragmente wurden auf einem 2% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Ein Beispiel-Gel zeigt Abb. E.

CYP1A1 Exon 7-A/G-Mutation (NcoI- RFLP):

Spezifische Primer: (5´-AAAGGCTGGGTCCACCCTCT-3´und 5´-AAAGACCTCCCAGCGGGCCA-3´)

Das resultierende 322bp PCR-Produkt wurde bei 37°C mit NcoI, wie oben beschrieben, verdaut. Alle Allele weisen eine Schnittstelle nach 70bp auf. Darüber hinaus verfügt das Wildtyp-Allel über eine weitere Schnittstelle nach 20bp, die im mutierten Allel nicht nachweisbar ist. Demnach zeigt das Wildtyp-Allel DNA-Fragmente von 20bp, 70bp und 232bp, das mutierte Allel nur 2 Fragmente von 70bp und 252bp. Diese wurden auf einem 4% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. F).

4.3 Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Mikrosatelliten-Polymorphismen

Die polymorphen Mikrosatelliten-Marker TNFA mit der Wiederholung der Sequenz (AC/GT)n, TNFB (TC/GA)n, TNFC (TC/GA)n, sowie TNFD mit der Sequenz (TC/GA)n wurden ebenfalls mit PCR-Amplifikationen bestimmt. Spezifische Oligonukleotidprimer für die vier untersuchten Mikrosatellitenmarker wurden von der Fa. Pharmacia Biotech, St. Albans, UK bezogen, mit der Phosphoramiditmethode markiert und die Allele nach der Methode von Udalova u. Mitarb. bestimmt (1993). Für TNFA wurden folgende Primer verwendet:

5´-GCACTCCAGCCTAGGCCACAGA-3´und 5´-CCTCTCTCCCCTGCAACACACA-3´.

Die Primer für TNFB lauteten: 5´-GCCTCTAGATTTCATCCAGCCACA-3´und 5´-GTGTGTGTTGCAGGGGAGAGAGAG-3´. Die Primersequenzen für TNFC lauteten: 5´-

GGTTTCTCTGACTGCATCTTGTCC-3´ und 5´TCATGGGGAGAACCTGCAGAGAA-3´sowie für TNFD: 5´-CATAGTGGGACTCTGTCTCCAAAG-3´und 5´-TGAGACAGAGGATAGGAGAGACAG-3´. An der 5´-Endstelle wurden die Vorwärtsprimer mit 6-FAM-(für TNFC und TNFD) sowie HEX-(TNFA) und TAMRA-(TNFB) Fluoreszenslösungen markiert (Applied Biosystems). Die PCR-Stammlösung enthielt: 10mM Tris-HCl (pH 8,3) 50 mM KCl, 10mM MgCl2, 20µM jeder der dNTPs, ca. 200ng DNA der zu untersuchenden Patientenprobe und 0,5 U Taq-DNA-Polymerase. Die PCR wurde modifiziert nach Udalova u. Mitarb. (1993) mit folgendem PCR Programm durchgeführt: Für TNFA, B und C: 30 Zyklen, jeweils 95°C für 60 sec., 65°C für 60 sec. und 72°C für 45 sec., abschließend ein Zyklus von 72°C für 5 min. Bei TNFD wurde die Primeranbindung des 2. Schritts statt bei 65°C bei 60°C durchgeführt. Die anderen PCR-Bedingungen blieben unverändert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2% Agarosegel in 1x TBE für 60 min. in einer Elektrophoresekammer bei 100V im Gel bewegt, dann je nach ihrer Bandenstärke so gepoolt, daß etwa gleiche Mengen des PCR-Produkts in jedem Teströhrchen vorhanden waren. DNA-Größenstandards (0,5µl Genescan ROX, Applied Biosystems) und 1,5µl formamidhaltige Dextranblau-Färbelösung wurde zu 0,4µl des gepoolten PCR-Produkts gegeben. Es folgte ein Denaturierungsschritt für 2 min. bei 95°C und sofortiges Kühlen auf Eis. Die Elektrophorese wurde auf einem denaturierten Polyacrylamidgel (6% Acrylamid/ bis-Acrylamid 16:1, Severn Biotechnologies) in einem automatisierten DNA-Sequenzierer (373A, Applied Biosystems) durchgeführt. Die Größe der erhaltenen DNA-Fragmente wurde in mobility units (mu) unter Verwendung der Genescan-672-Software (Macintosh) ermittelt. Anschließend konnte die genaue Allelgröße unter Verwendung der Genotyper-Software (Macintosh) ermittelt wurden. Kontroll-DNA-Proben bekannter TNF-Genotypen wurden auf jedem Gel mitgeführt.

4.4 Statistische Analyse

Bei der vorliegenden Untersuchung handelt es sich um einen explorativen Studienansatz. Die untersuchten Genvariationen wurden aufgrund ihres vermuteten biologischen Einflusses ausgewählt. Die gewonnenen Resultate sind daher als Hypothesen zu verstehen, die der Bestätigung unabhängiger Studien bedürfen. Patientendaten und Genotypen wurden in Excel-

7-Tabellen (Microsoft) verschlüsselt und mit der Stata 5-Software (Stata Corporation) und Kwikstat 4 (TexaSoft) ausgewertet. Mit Chi-Quadrat-Tests wurden die einzelnen Untergruppen der Studie auf Homogenität untersucht. Logistische Regressionsanalysen wurden verwendet um die Bedeutung der Genotypen als Risikomarker zu berechnen. Signifikante Genotyp-Kombinationen wurden unterteilt in additive Effekte und synergistische Effekte, wenn die Interaktion unter Berücksichtigung der Einzeleffekte einen signifikanten Einfluß behielt. Regressionanalysen (Cox `s proportional hazards model) wurden verwendet, um festzustellen, welche Faktoren alleine oder in Kombination das Rezidivintervall beeinflußten. Bei Gegenüberstellungen im Rahmen der Fall-Kontroll-Studie wurden die Daten für Unterschiede in Alter, Geschlecht, Rauch- und Trinkgewohnheiten korrigiert, da Unterschiede für diese Parameter zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppe bestanden. Bei vielen Analysen war es aufgrund der Fallzahlen notwendig, Patienten mit Tumoren in benachbarten anatomischen Regionen zusammenzufassen (z.B. Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome, supraglottische und glottische Larynxkarzinome), obwohl bekannt ist, daß Unterschiede im biologischen Verhalten (z.B. Häufigkeit der Lymphknotenmetastasierung) bestehen. Bei der Auswertung wurde für Gruppenunterschiede in den Einflußfaktoren Alter, Geschlecht, Rauchen, Alkoholkonsum sowie Tumorlokalisation korrigiert und die statistischen Werte für beeinflussende Genotyp-Kombinationen ermittelt.
Generell wurden nur Ergebnisse, die ein Signifikanzniveau $p \leq 0{,}05$ aufwiesen berücksichtigt. Bei der Betrachtung eines Effekts in kleineren Untergruppen wurde der Schwerpunkt auf die Entwicklung der odds ratio bzw. hazard ratio gelegt und vereinzelt p-Werte bis 0,1 berücksichtigt. Im Text wurde dann darauf verwiesen, daß keine Signifikanz vorlag.

5 Ergebnisse

5.1 Patientencharakteristika

In dem Studienzeitraum von 1994-1997 wurden 465 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich in die Studie aufgenommen. 397 Patienten (85,4%) waren männlich, 68 (14,6%) waren weiblich. Das Durchschnittsalter betrug 60,95 Jahre. 305 Patienten waren an einem Larynxkarzinom erkrankt. Diese Gruppe unterteilte sich weiter in 230 Patienten mit

glottischen Karzinomen, 72 Patienten mit supraglottischen Karzinomen und 3 Patienten mit primär subglottischen Karzinomen. Die Mundhöhlen- und Pharynxkarzinom-Gruppe enthielt 164 Patienten, 70 Patienten mit Oropharynxkarzinomen, 46 Patienten mit Hypopharynxkarzinomen sowie 48 Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen (siehe Tabellenanhang, Tab. A). 39 Patienten wiesen mehr als einen Primärtumor im Kopf-Hals-Bereich auf. 35 Patienten hatten 2 voneinander unabhängige Tumoren, 4 Patienten 3 Tumoren. 29 der 39 Patienten mit Mehrfachtumoren hatten mindestens einen Mundhöhlen- oder Pharynxtumor, 31 der Patienten mit Zweittumoren hatten mindestens ein Larynxkarzinom.

34 (7,5%) Patienten waren Nichtraucher, 38 (8,4%) leichte Raucher (<10 Packungsjahre), 231 (51,0%) mäßige Raucher (10-25 Packungsjahre) und 150 (33,1%) starke Raucher (> 25 Packungsjahre). 63 (14,1%) Patienten konsumierten keinen Alkohol, 83 (18,5%) Patienten konsumierten geringe Mengen Alkohol (<50g/Tag), 219 (48,9%) Patienten konsumierten mäßige Mengen an Alkohol (50-100g/Tag) und 83 (18,5%) Patienten konsumierten mehr als 100 g Alkohol pro Tag (Tab. A). Signifikante Unterschiede zeigten sich im Konsum der Genußgifte zwischen den Kontrollpersonen und den Kopf-Hals-Tumor-Patienten. Ferner konsumierten Mundhöhlen- und Pharynxkarzinom-Patienten signifikant mehr Alkohol. Von 17 Patienten waren keine Angaben zum Alkoholkonsum sowie von 12 Patienten keine Angaben zu den Rauchgewohnheiten zu erhalten.

Die Geschlechterverteilung war 1:10 (w : m) bei den Larynxkarzinom-Patienten, 1:3,2 bei den Pharynxkarzinom-Patienten (Frauen entwickelten mehr Oropharynxkarzinome, Männer mehr Hypopharynxkarzinome) und 1:2 bei den Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen.

Larynxkarzinome wurden in 39,1% der Fälle als T1-Tumoren diagnostiziert, zu 24,4% als T2-Tumoren, zu 23,7% als T3-Tumoren und zu 12,8 % als T4-Tumoren. Innerhalb dieser Gruppe war der Anteil glottischer Karzinome unter den T1- und T2- Tumoren größer, während supraglottische vermehrt eine fortgeschrittene Tumorausdehnung aufwiesen.

Pharynxkarzinome wurden meist als fortgeschrittenere Tumoren diagnostiziert (T1=8,3%, T2=25,0%, T3=19,8%, T4=46,9%). Die Primärtumorausdehnung der Mundhöhlenkarzinome nahm eine Mittelstellung ein (T1=38,5%, T2=28,2%, T3=10,3%, T4=23,1%).

Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung wiesen 46,1% der Patienten einen zervikalen Lymphknotenbefall auf. Der Anteil lag, abhängig vom Tumorstadium, unter den Larynxkarzinom-Patienten lag bei 25,9%, bei den Mundhöhlenkarzinom-Patienten bei 41,0% und bei den Pharynxkarzinom-Patienten bei 74,0%. Die Metastasierungsrate in regionale Lymphknoten lag, wiederum abhängig von der Tumorlokalisation, bei T1-Tumoren bei 24,7%, bei T2-Tumoren bei 26,9%, bei T3-Tumoren bei 61,2% und bei T4-Tumoren bei 81,5%.

Im Rahmen der durchgeführten Studie wurden alle klinischen Parameter auf gegenseitige Beeinflussung analysiert. Größere Tumoren waren signifikant häufiger von undifferenzierter Histologie und zeigten öfter Lymphknotenmetastasen. Pharynxkarzinome wurden im Vergleich zu den Larynxkarzinomen in fortgeschrittenerem Tumorstadium diagnostiziert und gingen häufiger mit undifferenzierten Histologien einher. Ein statistischer Zusammenhang bestand zwischen dem Geschlecht und der Tumorlokalisation und damit auch zu der Häufigkeit des Lymphknotenbefalls. Männer erkrankten häufiger an Pharynxkarzinomen und wiesen vermehrt einen zervikalen Lymphknotenbefall auf. Die Tumorlokalisation wurde signifikant vom Alkoholkonsum beeinflußt. Larynxkarzinom-Patienten gaben überwiegend (85,6%) einen Alkoholkonsum bis 50g/d (Kategorie 1) oder 50-100g/d (Kategorie 2) an, während bei den Pharynxkarzinom-Patienten zu 73,0% die Alkoholkonsum-Kategorien 2 und 3 (>100g/d) festgestellt wurden. Die Patienten mit den Mundhöhlenkarzinomen lagen bei dem Alkoholkonsum zwischen den Larynx- und Pharynxkarzinom-Patienten (Tab. A). Der Zigarettenkonsum zeigte keine signifikante Beeinflussung der Tumorlokalisation. Sowohl Alkohol- als auch Zigarettenkonsum beeinflußten die Größe der diagnostizierten Tumoren. Mit zunehmendem Alkohol- und Zigarettenkonsum lagen fortgeschrittenere Primärtumoren vor, wofür sicherlich auch soziale Gründe verantwortlich sind. Der Zusammenhang zwischen dem Zigarettenkonsum und der Primärtumorgröße (T1-T4) erreichte aber nicht das Signifikanzniveau (p=0,064). Eine signifikante Verbindung des Alkoholkonsums mit dem zervikalen Lymphknotenbefall konnte nachgewiesen werden (p=0,037). Während 41,4% der Patienten mit einem Alkoholkonsum unter 100g/d einen zervikalen Lymphknotenbefall zum

Zeitpunkt der Tumordiagnose aufwiesen, waren es bei den Patienten mit höherem Alkoholkonsum 56,1%.

258 Patienten konnten nach erfolgter R0-Resektion (histologisch überprüfte tumorfreie Resektionsränder) regelmäßig nachbetreut werden. 27 Patienten mußten aus der Analyse ausgeschlossen werden, da nicht alle erforderlichen Informationen vorhanden waren. Bei den verbleibenden 231 Patienten bestand ein statistischer Zusammenhang zwischen der Tumorlokalisation und der Tumorgröße zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und dem histologischen Differenzierungsgrad der Tumoren. 11,4% der Larynxkarzinome waren gut differenziert, 72,7% mäßig und nur 15,9% undifferenziert. Bei den Pharynxkarzinomen stieg der Anteil der undifferenzierten Tumoren auf 43,8%, während nur 3,1% gut und 53,1% mäßig differenziert waren. Bei Betrachtung der Tumorausdehnung zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (T1-T4) zeigte sich eine ähnliche Verteilung. Während nur 15,4% der T1- und T2-Tumoren undifferenziert waren, stieg der Anteil bei den T4-Tumoren auf 51,9%. Auch der zervikale Lymphknotenbefall zeigte eine signifikante Abhängigkeit von dem histologischen Differenzierungsgrad des Primärtumors. Während 31,2% der gut differenzierten Tumoren einen zervikalen Lymphknotenbefall aufwiesen, stieg dieser Anteil unter den undifferenzierten Tumoren auf 65,1%.

188 der Patienten wurden nach histologisch überprüfter R0-Resektion über mindestens 2 Jahre nachbetreut, 79 Patienten konnten über 5 Jahre beobachtet werden. Von den über 2 Jahre nachbetreuten Patienten entwickelten 32 (17,2%) ein Tumorrezidiv. 43 (54,4%) der über 5 Jahre kontrollierten Patienten erkrankten nach erfolgter R0-Resektion an einem Tumorrezidiv. Dieser Anteil liegt wahrscheinlich unverhältnismäßig hoch, da eine nicht exakt zu ermittelnde Anzahl von rezidivfreien Patienten die Nachbetreuung vor Ablauf des 5-Jahres-Beobachtungszeitraums in der Tumorsprechstunde abbrach. Um trotz der unterschiedlichen Nachbetreuung der einzelnen Patienten statistisch berechnete Aussagen über die Beeinflussung der Rezidiventstehung treffen zu können, wurde nicht an einem fixen zeitlichen Intervallpunkt analysiert, sondern jeder Patient floß mit seinem individuellen Nachbeobachtungs-Zeitraum in die Auswertung ein. Die Ergebnisse wurden in Kaplan Meier-Kurven dargestellt. Das Auftreten eines Tumorrezidivs hing signifikant von der Primärtumor-

Lokalisation ab. 13,6% der Larynxkarzinom-Patienten erkrankten innerhalb von 2 Jahren an einem Tumorrezidiv, hingegen 29,8% der Mundhöhlen- und Pharynxkarzinom-Patienten (p=0,026). Nach 5 Jahren stieg der Anteil unter den Larynxkarzinom-Patienten auf 46,7% bei den Mundhöhlen / Pharynxkarzinom-Patienten auf 64,0%. Einen ebenfalls signifikanten Einfluß auf das Auftreten von Tumorrezidiven zeigte die Tumorgröße bei Diagnosestellung (siehe Tabellenanhang, Abb. G). Während 8,8% der Patienten mit T1-Tumoren innerhalb von 2 Jahren an einem Tumorrezidiv erkrankten, waren es bei Patienten mit T4-Tumoren 40% (p=0,0007). Alkohol- und Zigarettenkonsum beeinflußten das Auftreten von Tumorrezidiven. Nichtraucher hatten eine Rezidivrate von 7,7% nach 2 Jahren, während Patienten mit einem Zigarettenkonsum von mehr als 25 Packungsjahren zu 27,5 % innerhalb von 2 Jahren an einem Rezidivtumor erkrankten. Nach 5 Jahren stieg der Anteil der Tumorrezidive unter den starken Rauchern auf 75,0% an. Bei Patienten mit einem Alkoholkonsum unter 100g/d waren nach 2 Jahren in 11-19% der Fälle Tumorrezidive nachweisbar (abhängig von der Primärtumorlokalisation). Bei Patienten mit einem Alkoholkonsum über 100g/d waren es 37,5% (p=0,006).

Patienten mit gut differenzierten Tumoren entwickelten zu 5,9% innerhalb des 2-Jahresintervalls ein Tumorrezidiv, demgegenüber standen 31,9% Tumorrezidive bei Patienten mit undifferenzierten Tumoren (p=0,006, Abb. H). Eine Beeinflussung der Rezidivhäufigkeit durch das Geschlecht der Patienten konnte als Trend beobachtet werden (2-Jahresrezidive bei Männern 18,4%, bei Frauen 7,8%, p=0,117, Abb. I).

5.2 Genotyp-Frequenzen der Polymorphismen in den entgiftenden Enzymen

Der GSTM1-Polymorphismus zeigte in der Fall-Kontroll-Studie einen deutlichen Einfluß auf das Risiko, ein Kopf-Hals-Karzinom zu entwickeln. Signifikante Unterschiede wurden in der Frequenz des Genotyps GSTM1AB sowohl bei den Larynxkarzinom-Patienten, als auch bei den Mundhöhlen / Pharynxkarzinom-Patienten im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt. GSTM1AB war in den Tumorgruppen seltener nachweisbar als in der Kontrollgruppe (siehe Tabellenanhang, Tab. B). Somit konnte diesem Genotyp ein protektiver Einfluß zugeordnet werden. Die durch die entsprechenden odds ratios (OR) angezeigten

Risikofaktoren lagen für die Gesamttumorgruppe bei 0,36 und bei den Patienten mit Larynxkarzinomen bei 0,48. Näherungsweise, statistisch jedoch nicht ganz korrekt können die odds ratios mit dem relativen Risiko gleichgesetzt werden; die exakten Werte für das relative Risiko liegen etwas niedriger. Gegenüber Mundhöhlen / Pharynxkarzinomen errechnete sich ein protektiver Faktor von nahezu 10 (odds ratio=0,1).

Der GSTM3AA-Genotyp war signifikant häufiger in der Gesamttumorgruppe nachweisbar als unter den Kontrollpersonen. Signifikanz für diesen Genotyp wurde ebenfalls bei den statistischen Berechnungen zwischen der Larynxkarzinomgruppe und den Kontrollen erreicht. Die Unterschiede zwischen der Mundhöhlen / Pharynxkarzinomgruppe und den Kontrollen ergaben einen signifikanznahen Wert (p=0,06) bei vergleichbarer odds ratio von 1,7. Der GSTM3BB-Genotyp war hingegen in den Tumorgruppen seltener nachweisbar als in der Kontrollgruppe. Das Signifikanzniveau wurde bei dem Vergleich der Larynxkarzinomgruppe mit den Kontrollen jedoch nicht erreicht (p=0,06). Die odds ratio von 0,28 spiegelte einen protektiven Faktor von etwa 3,5 wieder. Der Vergleich der Genotyp-Frequenzen innerhalb der Larynxkarzinomgruppe zeigte, daß der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den Larynxkarzinomen weitgehend durch die niedrige Frequenz des GSTM3BB-Genotyps unter den Patienten mit glottischen Tumoren bedingt war (1,1 % bei Patienten mit glottischen Karzinomen gegenüber 3,1% bei Patienten mit supraglottischen Karzinomen, Tab. B). Patienten, die das GSTM3B-Allel aufwiesen, trugen meist auch das GSTM1A-Allel ($p<0.0001$). Der Nachweis des GSTM3B-Allels zeigte somit eine genetische Verbindung (Linkage) zu dem GSTM1A-Allel. Immunhistologische Untersuchungen mit einem für die GSTM3-Untereinheit spezifischen Antikörper (zur Verfügung gestellt von Dr. J. Hayes, Dundee) konnten nachweisen, daß GSTM3 in den Zilien des respiratorischen Epithels im Larynx enthalten ist. In allen äußeren Schichten des Plattenepithels hingegen fehlte GSTM3 (Abb. 3a, b).

Abb. 3a: Immunhistochemische Färbung des respiratorischen Flimmerepithels mit einem GSTM3-spezifischen Antikörper (x600)

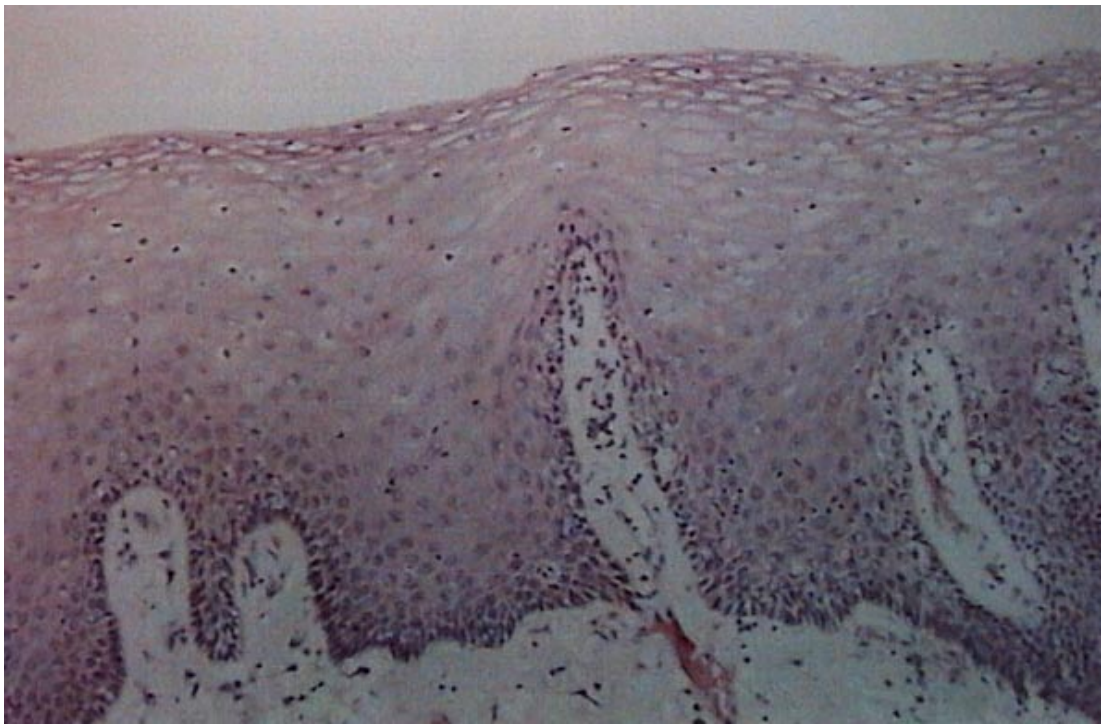


Abb. 3b: Immunhistochemische Färbung des pharyngealen Plattenepithels mit einem GSTM3- spezifischen Antikörper (x200)

Der GSTP1AA-Genotyp war in der Tumorgruppe seltener nachweisbar als bei den Kontrollpersonen. Parallel dazu nahm die Frequenz des homozygot mutierten Genotyps GSTP1BB zu. Signifikanz wurde bei der Gegenüberstellung von Gesamttumorgruppe und Kontrollgruppe nicht erreicht (p=0,07). Dies war bedingt durch deutliche Unterschiede in den Genotyp-Frequenzen zwischen Larynxkarzinom-Patienten und Mundhöhlen / Pharynxkarzinom-Patienten. Bei der getrennten Analyse der einzelnen Tumorgruppen zeigte sich ein signifikant selteneres Auftreten des GSTP1AA-Genotyps unter den Patienten mit Mundhöhlen / Pharynxkarzinomen, verglichen mit Kontrollpersonen und Larynxkarzinom-Patienten (GSTP1AA: 40,7% bei Mundhöhlen / Pharynxkarzinom-Patienten, 54,4% in der Kontrollgruppe, 50,5% bei den Larynxkarzinom-Patienten, Tab. B). In der Untergruppe der Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen war dieser Genotyp nur zu 24,2% nachweisbar. Die statistischen Berechnungen ergaben signifikante Unterschiede für den Vergleich der Mundhöhlen / Pharynxkarzinomgruppe gegen Kontrollpersonen (p=0,020, OR=0,56) wie auch für die gesonderte Analyse der Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen (p=0,001, OR=0,27). Immunhistologische Untersuchungen (Antikörper von Dr. A.A. Fryer zur Verfügung gestellt) verdeutlichten, daß das Enzym des GSTP1-Gens in allen äußeren Schichten des pharyngealen Plattenepithels nachweisbar war (Abb. 4a). Es zeigte sich ebenfalls eine Anfärbung der Zilien des respiratorischen Epithels im Larynx (Abb. 4b).

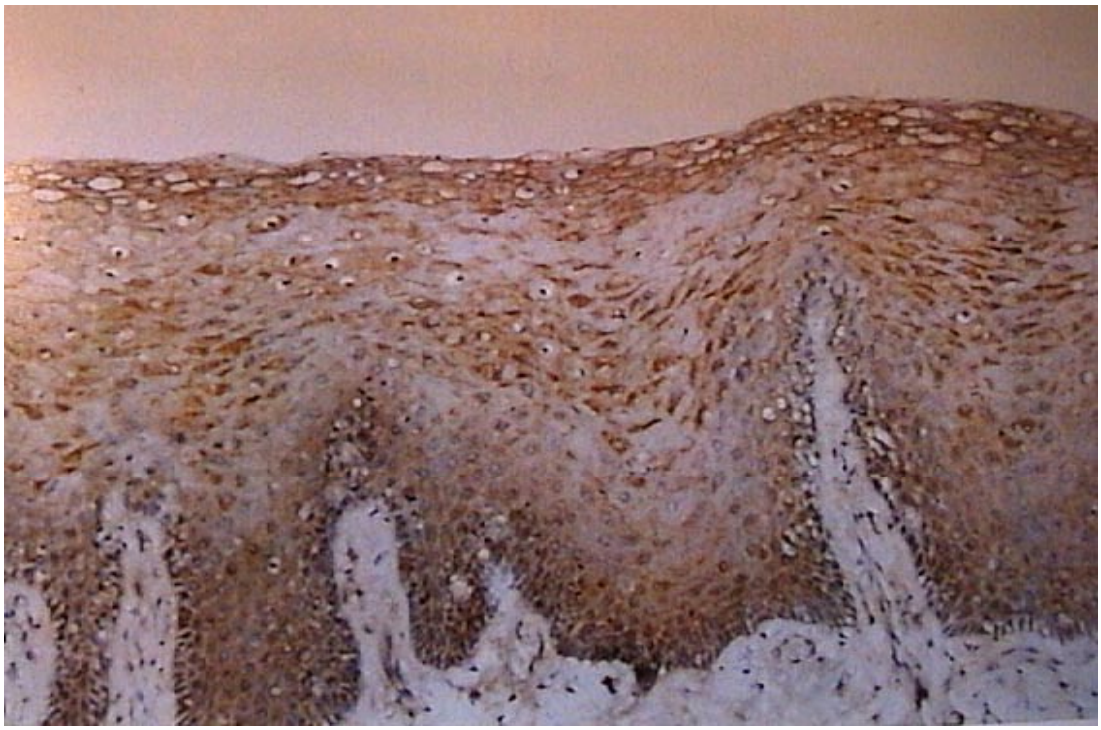


Abb. 4a: Immunhistochemische Färbung des pharyngealen Plattenepithels mit einem GSTP1-spezifischen Antikörper (x200)

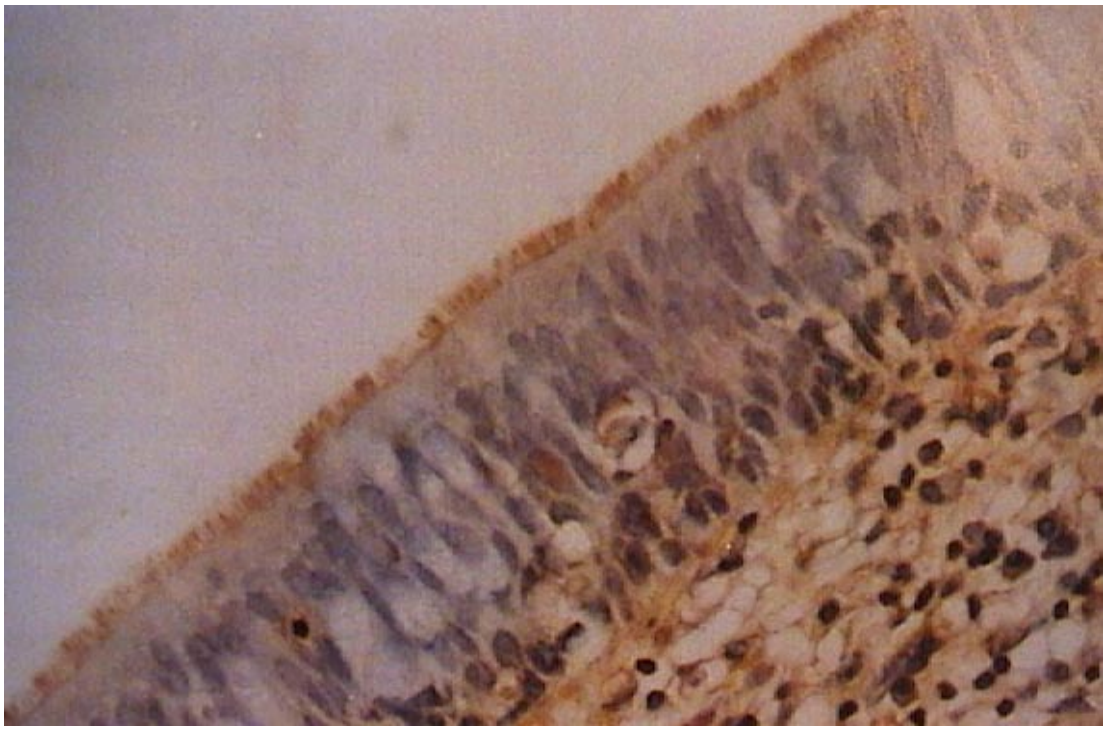


Abb. 4b: Immunhistochemische Färbung des respiratorischen Flimmerepithels mit einem GSTP1-spezifischen Antikörper (x300)

Der GSTT1-Polymorphismus zeigte keine signifikanten Unterschiede in den Genotyp-Frequenzen der Fall-Kontroll-Studie (Tab. B). Somit ließ sich eine Beeinflussung der Empfänglichkeit gegenüber Kopf-Hals-Tumoren aus dieser Studie nicht ableiten.
Die untersuchten Polymorphismen im CYP1A1-Gen zeigten ebenfalls keine statistisch signifikante Anhäufung eines Genotyps in einer der Studiengruppen. Der heterozygote Genotyp war an beiden CYP1A1-Genorten in einer Häufigkeit von etwa 10-15% in den einzelnen Gruppen nachweisbar, der homozygot mutierte Genotyp in 0-1%. Eine hoch signifikante Verbindung der m2-Mutation mit der m1-Mutation, wie von anderen Autoren berichtet (Cascorbi u. Mitarb. 1996), konnte bestätigt werden.
Die zwei im CYP2D6-Gen untersuchten Polymorphismen zeigten keine signifikanten Unterschiede in den Genotyp-Frequenzen der einzelnen Studiengruppen. Der heterozygot mutierte Genotyp des CYP2D6-1 Polymorphismus war bei etwa 30-35% der getesteten Personen nachweisbar. Homozygot war die Mutation zu 4-6% in den einzelnen Gruppen vorhanden. Die zweite, seltenere Mutation im CYP2D6-Gen trat heterozygot in etwa 3-4% auf und war homozygot zwischen 0 und 1% der untersuchten Patienten und Kontrollpersonen nachweisbar (Tab. B). Da beide Polymorphismen die Aktivität des entsprechenden Enzyms beeinflussen, wurden die Genotypen einzeln und zusammengefaßt, entsprechend den korrespondierenden Enzymaktivitäten analysiert. Wildtypen an beiden Genorten ergeben ein Enzym, das eine hohe Aktivität aufweist und mit EM (extensive metabolizer) bezeichnet wird. Ein heterozygoter Genotyp in einem der beiden Polymorphismen ergibt ein Enzym mittlerer Aktivität und wurde entsprechend dem zugrundeliegenden Genotyp HET für heterozygot genannt. Das Auftreten des heterozygoten Genotyps in beiden Polymorphismen führt zu einem gering aktiven Enzym, PM (poor metabolizer) genannt. Das Auftreten der homozygoten Mutation in einem der beiden Polymorphismen führt ebenfalls zu einer PM-Eigenschaft des Enzyms. In der Auswertung ergaben sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede für die Enzymtypen bei dem Vergleich der einzelnen Studiengruppen.
Der Polymorphismus im CYP2E1-Gen zeigte keine Unterschiede in den Genotyp-Frequenzen zwischen den Patientengruppen und der Kontrollgruppe (Tab. B). Heterozygotie für das mutierte Allel war in 3-8% der untersuchten Personen nachweisbar, Homozygotie in 0-1%.

5.3 Genotyp-Frequenzen der TNF-Mikrosatelliten-Polymorphismen

Die Allel-Frequenzen der TNF-Mikrosatelliten-Marker A, C und D ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patientengruppen und den Kontrollpersonen. In der Gruppe der Tumorpatienten war das Allel B3 hingegen signifikant häufiger nachweisbar als in der Kontrollgruppe (p=0,003, OR=1,92, Tab. C). In dem Maße, in dem die Häufigkeit des Allels B3 in der Tumorgruppe zunahm, verringerte sich der Anteil des B5-Allels (zum geringeren Anteil auch des B4-Allels). Die Allelfrequenzen von TNFB1, B2, B6 und B7 zeigten keine signifikanten Unterschiede. Der Anstieg in der Frequenz des B3-Allels unter den Patienten war durch den hohen Anteil dieses Allels bei den Larynxkarzinom-Patienten bedingt (25,2 % im Vergleich zu 13,1% bei den Kontrollpersonen, Tab. C). Die Frequenz dieses Allels bei Mundhöhlen / Pharynxkarzinom-Patienten zeigte keine signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe (Mundhöhlen / Pharynxkarzinome: 14,7%). Das mit TNFB3 assoziierte relative Risiko errechnete sich entsprechend für Larynxkarzinome mit 2,23 (OR), und für die Gesamttumorgruppe mit 1,92 (OR). Die Frequenz des B3-Allels stieg von 24,3% bei Patienten mit glottischen Larynxkarzinomen auf 28,8% bei Patienten mit supraglottischen Larynxkarzinomen an. Folglich nahm das relative Risiko ebenfalls zu (OR=2,67).

Homozygotie (Vorliegen des identischen Allels auf beiden Chromosomen) des TNFB3-Allels lag in der Kontrollgruppe in 3,0% der Fälle vor. Bei den Larynxkarzinom-Patienten war dieser Genotyp unter 13,7 % der Patienten vorhanden (Tab. C). In der Gruppe der Patienten mit supragottischen Larynxkarzinomen lag der Anteil des B3/B3-Genotyps bei 19,7%. Die odds ratio stieg entsprechend für die Larynxkarzinomgruppe auf 4,57 (p=0,003) und bei Patienten mit supraglottischen Larynxkarzinomen auf 6,5 (p<0,001).

Interaktionen zwischen TNF-Allelen und Genotypen der Glutathion S-Transferasen konnten nicht nachgewiesen werden. Auch ließen sich keine Interaktionen zwischen den TNF-Polymorphismen und CYP2D6- und CYP2E1-Genotypen nachweisen. Eine signifikante Interaktion zeigte sich zwischen dem Wildtyp am CYP1A1 m2-Genort und dem TNFB3-Allel bei den Larynxkarzinom-Patienten. Das relative Risiko, das mit dem Vorliegen eines B3-Allels verbunden war, stieg von 2,3 auf 3,9 (odds ratio), wenn zusätzlich der Wildtyp am

CYP1A1 m2-Genort vorhanden war. Bei Larynxkarzinom-Patienten, die zusätzlich homozygot für das TNFB3-Allel waren, stieg die odds ratio auf 8,8.

5.4 Zusammenhang zwischen den Genvariationen und den Tumoreigenschaften

Im folgenden wird der Verbindung zwischen den bestimmten Genpolymorphismen und verschiedenen Tumorcharakteristika wie Tumorgröße, Halslymphknotenbefall zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und dem histologischen Differenzierungsgrad des Tumorgewebes dargestellt.

GSTM1 0 war signifikant seltener bei Patienten mit zervikalem Lymphknotenbefall (46,8%) im Vergleich zu den Patienten mit N0-Hals nachweisbar (62,8%) (Tab. D). Bei einem Signifikanzniveau von p=0,024 errechnete sich eine protektive odds ratio von 0,52. Im Gegensatz dazu war der GSTM1B-Genotyp signifikant mit einem erhöhten Risiko von 2,5 (OR) assoziiert.

Die Häufigkeit des defekten GSTT1-Gens (GSTT1 0-Genotyp) variierte signifikant bei Patienten mit unterschiedlich differenziertem Tumorgewebe (p= 0,005, OR=2,87) (Tab. D). Während nur 17,0% der Patienten mit G2-Tumoren den GSTT1-Defekt aufwiesen, waren es bei Patienten mit undifferenzierten G3-Tumoren 37,0%. Die Patienten mit G0- und G1-Tumoren konnten aufgrund geringer Fallzahlen bei den statistischen Berechnungen nicht berücksichtigt werden.

Der folgenden Analyse liegen die zusammengefaßten Genotyp-Konstellationen der zwei untersuchten CYP2D6-Mutationen zugrunde. Eine stärkere Beeinflussung der klinischen Parameter durch die Einzelmutationen lag nicht vor. Mit einem CYP2D6EM-Enzymstatus einhergehende Genotypen waren seltener bei Patienten mit Halslymphknotenbefall nachweisbar (Tab. D). Das Signifikanzniveau wurde jedoch nicht erreicht (p=0,095, OR=0,63). Die Polymorphismen an den GSTM3-, GSTP1-, CYP1A1 m1- und m2- sowie CYP2E1-Genorten zeigten als Einzelfaktoren keine Beeinflussung der untersuchten Parameter.

Einzelne Allele der TNFB- und C-Mikrosatelliten-Marker beeinflußten ebenfalls nicht die hier untersuchten Parameter. Das TNFD6-Allel war hingegen bei Patienten mit

undifferenzierten Tumoren (G3) signifikant seltener nachweisbar als bei G2-Tumoren (p=0,02, OR=0,37). Folglich errechnete sich für das Vorliegen des TNFD6-Allels eine 2,6-fach höhere Wahrscheinlichkeit, einen Tumor mit einem höheren histologischen Differenzierungsgrad zu entwickeln.

Ein ähnlicher Zusammenhang konnte zwischen dem TNFA2-Allel und dem histologischen Differenzierungsgrad aufgezeigt werden. Statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht (p=0,07, OR=0,63). Eine Beeinflussung der anderen Parameter durch einzelne TNF-Allele konnte nicht nachgewiesen werden.

Einige Genotyp-Kombinationen zeigten einen wesentlich stärkeren Einfluß als die einzelnen Polymorphismen. Das mit dem GSTT1 0-Genotyp verbundene Risiko einen undifferenzierten Tumor zu entwickeln stieg bei gleichzeitigem Vorliegen des GSTM1 0 oder GSTM3AA-Genotyps weiter an. Auch in Kombination mit den TNF-Allelen B4 und D5 wurde ein höheres Signifikanzniveau und ein Anstieg der odds ratios bis auf 3,35 ermittelt. Auch wiesen Genotyp-Kombinationen eine signifikante Beeinflussung des histologischen Differenzierungsgrades auf, die als Einzelfaktoren nicht identifiziert wurden. Das gleichzeitige Vorliegen von GSTM3AA und TNFD5, CYP1A1 m2-Wildtyp und TNFB4 sowie TNFC1 und TNFD5 erhöhte das Risiko, einen undifferenzierten Tumor zu entwickeln um Faktoren zwischen 2 und 3 (Tab. E). Bei der Beeinflussung des initialen Lymphknotenbefalls konnte der protektive Einfluß der CYP2D6EM-Konstellationen und korrespondierende CYP2D6PM-Risikotypen nachgewiesen werden. Lag zusätzlich zum CYP2D6PM-Enzym der Wildtyp am CYP1A1 m2-Genort, der GSTM3AA-Genotyp oder das TNFC1-Allel vor, so stiegen die Risikowerte bis auf 5 an. Das initiale Tumorstadium wurde nur durch die Genotyp-Kombination GSTT1 0 / CYP1A1 m2- Wildtyp signifikant beeinflußt. Mit einem Risikofaktor von 1,7 hatten diese Patienten bei der Erstdiagnose bereits ein T3- oder T4-Karzinom, unabhängig von der Tumorlokalisation (Tab. E). Die meisten Genotyp-Kombinationen zeigten jedoch nur additive Effekte. Synergistische Effekte können dann angenommen werden, wenn die Genotyp-Kombination unter Berücksichtigung der Einflüsse der Einzelfaktoren einen signifikanten Einfluß behält (siehe Kapitel 4.4.). Dies traf für die Genotyp-Kombination GSTT1 0 / GSTM3AA und die Kombination CYP1A1 m2-Wildtyp /

TNFB4 in Bezug auf die Beeinflussung des histologischen Differenzierungsgrads der Tumoren zu sowie auf die Genotyp-Kombination GSTM3AA / CYP2D6PM für die Entwicklung von Halslymphknotenmetastasen zu (Tab. E).

5.5 Genvariationen bei Patienten unterschiedlicher Altersgruppen

Bei dem Vergleich der Genotyp-Frequenzen in den entgiftenden Enzymen zeigte sich, daß bei den Patienten in der Altersgruppe unter 50 Jahren der Genotyp GSTM1AB signifikant häufiger als im Gesamtkollektiv nachweisbar war (p=0,046, OR=3,98, Tab. F). Nach den statistischen Berechnungen beinhaltet dieser Genotyp demnach eine Prädisposition, in relativ jungem Alter an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken. Im Rahmen der Fall-Kontroll-Studie (Kapitel 5.2.) konnte diesem Genotyp aber ein protektiver Einfluß gegenüber dem Gesamtkollektiv zugeteilt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Patientengruppe unter dem 50. Lj. ergab sich nicht. Die Gruppe der unter 50-jährigen Patienten unterschied sich somit in der Häufigkeit des GSTM1AB-Genotyps signifikant von den älteren Patienten, nicht aber von der Kontrollgruppe. Demnach teilte diese Subpopulation nicht den in der Fall-Kontroll-Studie ermittelten protektiven Einfluß dieses Genotyps. Patienten unter dem 50. Lj scheinen demnach das Kopf-Hals-Karzinom unabhängig von ihrem GSTM1-Genotyp zu entwickeln.

In dieser Altersgruppe zeigte sich weiterhin ein signifikant häufigeres Auftreten des TNFD3-Allels (p=0,007, OR=3,48, Tab. F). Dieser Unterschied war sowohl im Vergleich zur Gesamtpatientengruppe als auch zur Kontrollgruppe signifikant. Das TNF-Allel D3 stellte demnach einen Risikofaktor dar, in jungem Alter an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken. Auch bei den Patienten, die in fortgeschrittenem Alter ein Kopf-Hals-Karzinom entwickelten, konnten beeinflussende Genpolymorphismen festgestellt werden. CYP2D6-1PM-Genotypen waren bei diesen Patienten signifikant häufiger nachweisbar, als in dem Gesamtkollektiv (p=0,008, OR=5,6, Tab. F). Patienten mit diesem Genotyp tragen demnach ein höheres Risiko in fortgeschrittenem Alter an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken. Weiterhin war auffällig, daß diese Patientengruppe nicht den im Gesamtkollektiv nachgewiesenen Risikofaktor, der mit dem TNFB3-Allel verbunden war, teilte. Das B3-Allel

war bei dieser Subpopulation nur zu 12,5% nachweisbar und zeigte damit keinen Unterschied zur Kontrollgruppe. Der Unterschied zur Gesamtpatientengruppe erreichte aufgrund der geringen Patientenzahl in dieser Untergruppe allerdings keine statistische Signifikanz (p=0,135).

5.6 Genvariationen bei Patienten mit unterschiedlichem Alkohol- und Zigarettenkonsum

Die Patienten wurden nach ihrem Alkohol- und Zigarettenkonsum jeweils in Gruppen von 0-3 eingeteilt, um Patientengruppen mit unterschiedlichem Konsum der für die Karzinomentstehung relevanten Genußgifte vergleichen zu können. Die ermittelten Gruppenzahlen für den Alkoholkonsum und das Rauchen wurden addiert. Patienten mit einer Summenzahl bis 2 (Geringtoxingruppe) wurden den Patienten mit einer Summenzahl größer oder gleich 5 (Hochtoxingruppe) gegenübergestellt.

Bei dem Vergleich der Genotyp-Frequenzen in den Polymorphismen der detoxifizierenden Enzyme ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Mehrere Trends konnten jedoch beobachtet werden. Am auffälligsten war, daß die Genotypen, die in der Gesamtpopulation mit einem protektiven Einfluß behaftet waren, in der Gruppe der Tumorpatienten mit geringem Toxinkonsum häufig nicht nachweisbar waren. Sowohl der Genotyp GSTM3BB (p=0,09) als auch GSTM1AB waren bei den 63 Patienten mit geringem Toxinkonsum nicht nachweisbar.

Unter den TNF-Markern war das A6-Allel bei den Patienten mit geringem Genußmittelkonsum (24,2%) häufiger nachweisbar als in der Gesamtpatientengruppe (14,6%) und bei Patienten mit hohem Toxinkonsum (16,5%). Signifikanz wurde bei der Gegenüberstellung der Geringtoxingruppe gegen alle Patienten erreicht (p=0,009, OR=1,87, Tab. G). Personen, die das TNFA6-Allel trugen, wiesen somit trotz geringen Alkohol- und Zigarettenkonsums ein erhöhtes Risiko auf, ein Kopf-Hals-Karzinom zu entwickeln. Bei der Analyse des Gesamtkollektivs trat dieses Allel als Risikofaktor nicht hervor, da der Einfluß mit zunehmendem Genußmittelkonsum geringer wurde. Signifikante Abweichungen in den

Genotyp-Frequenzen bei Patienten mit hohem Alkohol- und Zigarettenkonsum konnten nicht festgestellt werden.

5.7 Genvariationen bei Patienten mit Mehrfachtumoren und Rezidiven

Patienten mit Mehrfachtumoren wiesen an mehreren Genorten signifikante Abweichungen in den Genotyp-Frequenzen auf. Der Verlust des intakten GSTT1-Gens war bei den Patienten mit Mehrfachtumoren (40,5%) häufiger nachweisbar als bei den Kontrollpersonen (22,5%) oder Patienten mit Einfachkarzinomen (21,5%)(p=0,017, OR=2,39 bzw. p=0,008, OR=2,5, Tab. H.). Weiterhin war der GSTM3AA-Genotyp bei Patienten mit Mehrfachtumoren (86,5%) häufiger nachweisbar als in der Kontrollgruppe (66,5%) oder bei Patienten mit Einfachtumoren (76,0%, Tab. H). Statistische Signifikanz wurde nur bei dem Vergleich von Mehrfachtumoren gegen die Kontrollgruppe erreicht (p=0,016, OR=3,23). Da der GSTM3AA-Genotyp bereits als Risiko-Genotyp für die Gesamttumorgruppe nachgewiesen wurde, ergab die weitere Zunahme dieses Genotyps bei den Patienten mit Zweitkarzinomen keine Signifikanz (p=0,15). Die ansteigende odds ratio reflektiert aber diesen Anstieg (OR=1,7 bei Einfachtumoren, OR=3,23 bei Mehrfachtumoren).

Patienten mit Mehrfachkarzinomen wiesen die m2-Mutation im CYP1A1-Gen (2,8%) seltener auf als Patienten mit Einfachtumoren (14,9%; p=0,04, OR=0,16, Tab. H). Das Signifikanzniveau gegenüber der Kontrollgruppe wurde trotz nahezu identischer Genotyp-Frequenz (14,5%) aufgrund geringerer Fallzahl in der Kontrollgruppe nicht erreicht (p=0,09, OR=0,17).

Die TNF-Mikrosatelliten-Allele ergaben keine signifikanten Unterschiede in den Häufigkeiten der einzelnen Allele der Marker A, C und D. Der B-Marker wies ähnliche Veränderungen in den Allel-Frequenzen auf, die bereits bei der Gegenüberstellung von Patienten- bzw. Larynxkarzinomgruppe und Kontrollgruppe Risiko-beeinflussend waren. Das TNFB3-Allel war bei Patienten mit Mehrfachtumoren zu 30,3%, bei Patienten mit Einfachtumoren zu 21,5% und bei 13,1% der Kontrollpersonen nachweisbar. Statistische Signifikanz wurde für die Unterschiede zwischen Kontrollgruppe und Mehrfachtumorgruppe erreicht (p<0,001, OR=2,87, Tab. H). Die Zunahme dieses Genotyps von den Einfachtumoren zu den

Mehrfachtumoren ergab keine statistische Signifikanz (p=0,106). Der ermittelte Risikofaktor (OR=1,59) verdeutlicht, daß die Tumorpatienten, die das B3-Allel aufwiesen, ein erhöhtes Risiko hatten, an einem weiteren Karzinom zu erkranken, verglichen mit Patienten, die dieses Allel nicht trugen. Nur 3% der Kontrollpersonen wiesen das B3-Allel homozygot auf, während 10,4% der Patienten mit Einfachtumoren und 15,8% der Patienten mit Mehrfachtumoren auf beiden Genkopien das B3-Allel trugen. Diese Beobachtung unterstreicht die Selektion des heterozygoten TNFB3-Allels und des homozygoten Genotyps innerhalb der Patientengruppe mit Mehrfachtumoren. Für den homozygoten Nachweis des TNFB3-Allels errechnete sich eine odds ratio von 5,21 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für Patienten mit Mehrfachtumoren spezifische TNF-Mikrosatelliten-Allele konnten nicht nachgewiesen werden.

Von den 258 Patienten, die nach durchgeführter R0-Resektion in der Tumorsprechstunde nachkontrolliert wurden, entwickelten 32 Patienten in dem Zeitraum von 6 Monaten bis 2 Jahre nach chirurgischer Therapie ein Tumorrezidiv, während innerhalb des vollen Beobachtungszeitraums von 5 Jahren bei 43 Patienten ein Tumorrezidiv nach R0-Resektion diagnostiziert wurde.

Die Polymorphismen in den detoxifizierenden Enzymen beeinflußten nicht signifikant das Auftreten von Tumorrezidiven. Bei der Verteilung der TNF-Allele konnte hingegen eine Risiko-beeinflussende Allel-Kombinationen identifiziert werden. Zwischen dem Allel B1 und D5 bestand eine genetische Verbindung, was bedeutet, daß Personen, die das Allel B1 aufwiesen, vermehrt auch über das Allel D5 verfügten. Die Verbindung der beiden Allele war bei den untersuchten Patienten wie folgt:

Verbindung des TNFB1 und TNFD5 Allels

	B1 negativ	B1 positiv
D5 negativ	86	2
D5 positiv	48	43

Dies verdeutlicht, daß 95,6% der Patienten, die das TNFB1-Allel aufwiesen, gleichzeitig Träger des D5-Allels waren. Das Auftreten eines Tumorrezidivs war bei dem Vorliegen der B1D5-Allelkombination (Haplotyp) signifikant erhöht (p=0,043, HR=2,05, Abb. M). Einen stärkeren Einfluß hatte der Haplotyp B1D5 unter den Mundhöhlen / Pharynxkarzinom-Patienten, erreichte aufgrund geringerer Fallzahl aber keine Signifikanz (p= 0,055, HR=3,2, Abb. N). Der Einfluß des TNFB1D5- Haplotypen war überwiegend durch das TNFB1-Allel bestimmt, jedoch erreichten beide Einzelfaktoren keine Signifikanz (TNFB1: p=0,080, HR=1,93, Abb. K, TNFD5: p=0,298, Abb. L).

6 Diskussion

6.1 Patienten- und Tumorcharakteristika

Sowohl die Alters- wie auch Geschlechterverteilung in der Patientengruppe und den nach der Tumorlokalisation aufgestellten Untergruppen entsprachen denen vergleichbarer epidemiologischer Studien (Elwood u. Mitarb. 1984; Brugere u. Mitarb. 1986; Blot u. Mitarb. 1988). Auch die ausgeprägten Rauch- und Trinkgewohnheiten sind typisch für dieses Patientenkollektiv. Der Anteil von Alkoholabstinenzlern und Nichtrauchern war mit 2,6% in der vorliegenden Studie relativ niedrig. Er liegt meist bei 5-7%. Ferner bestätigte sich im vorliegenden Kollektiv, daß Alkoholkonsum für die Tumorentstehung in der sogenannten oberen Schluckstraße (Mundhöhle, Oro-Hypopharynx) von besonderer Bedeutung ist, während bei Larynxkarzinomen starkes Rauchen im Vordergrund steht (Elwood u. Mitarb. 1984; Brugere u. Mitarb. 1986; Blot u. Mitarb. 1988).

Die Auswahl der Kontrollpersonen war schwierig, da Personen im Alter von 50-70 Jahren, die mehr als 50g Alkohol täglich zu sich nehmen und mindestens 10-20 Packungsjahre an Zigarettenkonsum aufweisen, dabei aber gesund sind, schwer rekrutiert werden konnten. Folglich unterschied sich die Kontrollgruppe in ihrem Genußmittelkonsum signifikant von der Patientengruppe. Mit der heute verfügbaren statistischen Software lassen sich die Unterschiede im Genußmittelkonsum oder Alter zwischen Patienten- und Kontrollgruppe berücksichtigen, so daß eine in ihren Eigenschaften nicht völlig übereinstimmende Kontrollgruppe jedem Kollektiv, das möglicherweise ein selektioniertes Personenspektrum

enthält, vorzuziehen ist. In der vorliegenden Studie wurden Personen mit verschiedenen nicht entzündlichen Erkrankungen (Septumdeviationen, Hörsturzpatienten, Mittelgesichtstraumen), die nicht an einer Malignomerkrankung litten, in die Kontrollgruppe aufgenommen. Alle Genotyp-Frequenzen wurden mit einer in North Staffordshire, England von 1986-1996 rekrutierten Kontrollgruppe von 1200 Personen verglichen und wiesen in keinem der untersuchten Polymorphismen signifikante Unterschiede auf. Obwohl gerade in den hier bestimmten Polymorphismen regionale und ethnische Unterschiede bekannt sind (Kato u. Mitarb. 1992; Crouau-Roy u. Mitarb. 1993; Zhao u. Mitarb. 1994; Masimirembwa u. Mitarb. 1995), kann dies als Indiz dafür genommen werden, daß die Kontrollgruppe die bei gesunden Nordeuropäern anzutreffenden Genotyp-Frequenzen repräsentiert.

Männer rauchten und tranken signifikant mehr Alkohol und wiesen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung häufiger fortgeschrittene Tumorstadien auf als Frauen.

Geschlechtsunabhängig wurde durch starken Alkoholkonsum die Tumorlokalisation (Mundhöhlen / Pharynxtumoren), die Größe (T3-T4 Tumoren) sowie der Lymphknotenbefall signifikant beeinflußt. Die Primärtumor-Lokalisation hingegen beeinflußte signifikant das Tumorstadium zum Zeitpunkt der Diagnose sowie den histologischen Differenzierungsgrad des Tumors. Der histologische Differenzierungsgrad beeinflußte wiederum die Tumorgröße und das Auftreten von Halslymphknoten-Metastasen. Diese Zusammenhänge sind vielfach von anderen Autoren beschrieben worden (Elwood u. Mitarb. 1984; Brugere u. Mitarb. 1986; Blot u. Mitarb. 1988; Jahnke 1995a; Evans 1997; Robin 1997). Durch die hier nachgewiesene Verflechtung der einzelnen Patientencharakteristika mit Tumoreigenschaften konnte gezeigt werden, daß es sich bei den untersuchten Studiengruppen um ein repräsentatives Kollektiv von Kopf-Hals-Tumor-Patienten handelt.

In der vorliegenden Arbeit sollte nicht auf Einzelheiten der Tumorbehandlung eingegangen werden. Details zur chirurgischen Tumorbehandlung wurden nur soweit in die Datenbank der Studie aufgenommen, sofern sie erforderlich waren, Informationen über den weiteren Krankheitsverlauf zu liefern. Da die Gruppe der Kopf-Hals-Tumoren ein sehr inhomogenes Krankheitsbild darstellt, mußten verschiedene Patienten- und Tumoreigenschaften berücksichtigt werden. Der Zeitpunkt der Diagnose unterscheidet sich sehr stark, von häufigen

Frühdiagnosen bei glottischen Larynxkarzinomen aufgrund frühzeitig aufgetretener Heiserkeit bis zur Spätdiagnose bei Oro- und Hypopharynxkarzinomen, die meist erst in fortgeschrittenem Tumorstadium Schluckbeschwerden verursachen. Auch variiert die Häufigkeit des Lymphknotenbefalls bei Diagnosestellung zwischen benachbarten anatomischen Lokalisationen erheblich (Jahnke 1995a; Muir u. Weiland 1995; Evans 1997; Robin 1997). Einige Autoren konnten allein in Mundhöhle und Oropharynx 10 anatomische Untergruppen herausstellen, die sich in der Metastasierunghäufigkeit und dem Tumorverhalten signifikant unterschieden (Evans 1997). Lokalisation und Stadium der Tumoren sind für die Prognose dieser Erkrankung sicherlich von größerer Bedeutung als das histologische Grading oder genetische Wirtsfaktoren (Muir u. Mitarb. 1995, Evans 1997). Eine getrennte Analyse der hier untersuchten Genvariationen in einer so großen Anzahl von anatomischen Regionen würde eine Studiengruppe von mehreren tausend Patienten erforderlich machen und ist daher kaum zu realisieren. Um dennoch Aussagen über den Einfluß genetischer Wirtsfaktoren auf die Empfänglichkeit und den Krankheitsverlauf der Kopf-Hals-Karzinom-Patienten treffen zu können, wurden zunächst alle Patienten zusammengefaßt. In der weiteren Analyse wurden Patienten mit Tumoren in unterschiedlichen anatomischen Regionen, verschiedenen Tumoreigenschaften (histologischer Differenzierungsgrad, regionaler Lymphknotenbefall) sowie verschiedene Altersgruppen, Patienten mit unterschiedlichem Genußmittelkonsum und Patienten mit Tumorrezidiven und Mehrfachtumoren gesondert betrachtet.

Neben Parametern wie dem zervikalen Lymphknotenbefall, dem Tumorstadium und dem histologischen Differenzierungsgrad als Prognose-beeinflussende Faktoren (Muir u. Mitarb. 1995; Evans 1997; Robin 1997) werden in der Literatur eine Vielzahl weiterer Tumoreigenschaften, wie Tumorvaskularisation, Mitoseindex, Keratinisierung, verschiedene Wachstumsformen, Entzündungsparameter, Expression von Keratin 6, 13, 19, Expression von p53, EGFR (epithelial growth factor receptor) und Cyclin D1, Chromosomenverluste bestimmter Lokalisationen (LOH) sowie Onkogene der ras Familie, c-myc, int-2, hst-1 und bcl-1 beschrieben, die einen Einfluß auf den Krankheitsverlauf zu haben scheinen (Issing u. Mitarb. 1992; Janot u. Mitarb. 1996). Es ist jedoch kaum möglich, in einer umfangreichen

epidemiologischen Studie all diese Parameter auf die Beeinflussung durch genetische Wirtsfaktoren zu untersuchen, so daß sich die vorliegende Studie auf die Parameter Tumorlokalisation und Ausdehnung zum Zeitpunkt der Diagnose, histologisches Grading, Halslymphknoten-Metastasierung, Tumorrezidive und Mehrfachtumoren beschränkte. Diese Faktoren sind nach wie vor die Parameter, welche die Prognose der Erkrankung am nachhaltigsten beeinflussen (Janot u. Mitarb. 1996; Evans 1997; Robin 1997). Beispielsweise sinkt mit der Diagnose von befallenen Halslymphknoten das 5-Jahresüberleben von Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren um 50%. Der prognostische Einfluß von einem Tumorrezidiv oder Zweittumor ist noch deutlich ausgeprägter (Evans 1997; Robin 1997).

6.2 Einfluß der Genvariationen in den Glutathion S-Transferasen und Cytochrom P450 auf die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren

In der vorliegenden Arbeit hatte der GSTM1AB-Genotyp einen protektiven Einfluß auf die Entwicklung eines Kopf-Hals-Karzinoms, der für die Genotypen GSTM1A und GSTM1B nicht nachgewiesen werden konnte. Der hier durchgeführte PCR-Ansatz erlaubte es jedoch nicht, zwischen Individuen, die den Genotyp GSTM1BB tragen und dem Genotyp GSTM1B0 zu unterscheiden. Aus der Verteilung der einzelnen Allele kann davon ausgegangen werden, daß die Mehrzahl der GSTM1B-Individuen GSTM1B0-Genotypen trägt (der GSTM10 Genotyp liegt homozygot in 55-60 % der Population vor). Dasselbe gilt für GSTM1A. Nur der Nachweis von 2 GSTM1-Genkopien hatte einen protektiven Einfluß auf die Karzinomentwicklung, was auch als Gen-Dosis-Effekt bezeichnet wird (Brockmöller u. Mitarb. 1994; Strange u. Mitarb. 1998). Von anderen Autoren wurde bereits eine ähnliche Risikobeeinflussung des GSTM1-Polymorphismus auf Lungenkarzinome (Seidegard u. Mitarb. 1986; Kihara u. Mitarb. 1995) multiple Hautbasaliome (Haegerty u. Mitarb. 1996) und Blasenkarzinome (Brockmöller u. Mitarb. 1994) nachgewiesen. Die vorliegenden Ergebnisse an Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren unterstützen die Rolle des GSTM1-Polymorphismus bei Zigarettenrauch-abhängigen Karzinomerkrankungen.

Der GSTM3-Polymorphismus war hingegen nur bei Larynxkarzinom-Patienten mit einer Risikovermittlung verbunden. Bisher liegen epidemiologische Untersuchungen über diesen

erst kürzlich identifizierten Polymorphismus nur bei Hautbasaliomen vor. Bei dieser Erkrankung konnte ein Einfluß der Genotyp-Kombination GSTM3AA und GSTM1 0 mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko und dem Auftreten von multiplen Basaliomen in Verbindung gebracht werden (Yengi u. Mitarb. 1996). Eine Verbindung des GSTM3B-Allels mit dem GSTM1A-Allel, wie in dieser Studie beobachtet, ließ sich im vorliegenden Kollektiv bestätigen (Inskip u. Mitarb. 1995).

Interessanterweise wurde die Expression des GSTM3-Enzyms ausschließlich in den Zilien der respiratorischen Larynxschleimhaut nachgewiesen (Abb. 3a). Dies steht in Übereinstimmung mit ihrem protektiven Effekt überwiegend bei Larynxkarzinomen und weniger bei den Mundhöhlen / Pharynxkarzinomen. Die Zilien treten direkt mit den Partikeln des Zigarettenrauchs in Kontakt und stellen damit neben ihrer mechanischen Reinigungsfunktion bereits einen Teil der biochemischen Entgiftungsfunktion der Schleimhaut dar. An der großen Kontaktfläche der Zilien können demnach bereits polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe aus dem Zigarettenrauch zu nichttoxischen Substanzen entgiftet werden.

Der Mechanismus, durch den der GSTM3-Polymorphismus das Erkrankungsrisiko beeinflußt, ist nicht eindeutig geklärt. Die Aktivität der durch die verschiedenen Allele kodierten Enzyme unterscheidet sich nach bisherigen Erkenntnissen nicht (Inskip u. Mitarb. 1995). Das GSTM3B-Allel enthält jedoch eine Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor YY1, den das A-Allel nicht aufweist. Das Anbinden dieses Faktors kann zu einer stärkeren Expression des Enzyms führen, da er die Gentranskription von intragenen Orten aus reguliert (Flanagan 1995). Eine weitere Möglichkeit der Risikobeeinflussung ohne direkte Veränderung der Enzymaktivität wäre eine Verbindung zu anderen μ-Klasse-Genen, die auf benachbarten Chromosomenorten auf Chromosom 1p13 angeordnet sind. Solch ein Zusammenhang konnte zwischen dem GSTM1- und GSTM3-Polymorphismus gezeigt werden (Inskip u. Mitarb. 1995). Diese Hypothese wird durch Beobachtungen an Lungenkarzinom-Patienten gestützt, bei denen eine geringere Expression von GSTM3 bei gleichzeitigem Vorliegen des GSTM1 0-Genotyps festgestellt werden konnte (Anttila u. Mitarb. 1995).

Der GSTP1-Polymorphismus zeigte im Gegensatz dazu einen stärkeren Einfluß bei den Mundhöhlen / Pharynxkarzinom-Patienten. GSTP1 war immunhistochemisch insbesondere in

den äußeren Schichten des pharyngealen Plattenepithels nachweisbar, zeigte jedoch auch eine Anfärbung der Zilien des respiratorischen Epithels (Abb. 4a, b). Der Polymorphismus im GSTP1-Gen hat einen Austausch von Valin gegen Isoleucin am Codon 105 des Enzyms zur Folge. Dieser Aminosäureaustausch nahe der hydrophoben Bindungsstelle bedingt eine Veränderung der spezifischen Aktivität und Affinität für elektrophile Substrate wie beispielsweise Benzpyren (Ali-Osman u. Mitarb. 1997; Harries u. Mitarb. 1997). Der hier ermittelte Einfluß des mutierten GSTP1-Genotyps legt nahe, daß diese Genveränderung für die Entgiftung von Zigarettenrauch-assoziierten Karzinogenen in der Pharynxschleimhaut bedeutsam ist. In geringerem Ausmaß ließ sich dieser Einfluß auch bei den Larynxkarzinom-Patienten feststellen. GSTP1 scheint im respiratorischen Epithel aber nicht so bedeutsam zu sein wie im Plattenepithel des Pharynx, das kein GSTM3 enthält. Von anderen Arbeitsgruppen wurde bereits ein Einfluß der GSTP1-Genotypen auf weitere Zigarettenrauch-assoziierte Karzinomerkrankungen wie Lungen- und Blasenkarzinome nachgewiesen (Harries u. Mitarb. 1997). Ferner konnte kürzlich in einer japanischen Studie ein Einfluß des GSTP1-Polymorphismus auf die Entwicklung von Ösophaguskarzinomen festgestellt werden, was die Bedeutung dieses Polymorphismus in der vorliegenden Studie unterstützt (Morita u. Mitarb. 1998). Es muß hier angemerkt werden, daß ein weiterer Polymorphismus im GSTP1-Gen am Nukleotid 341 beschrieben wurde (Ali-Osman u. Mitarb. 1997). Diese Mutation kommt meist zusammen mit der Mutation am Nukleotid 313 vor und wird als C-Allel bezeichnet. Ein Einfluß dieses C-Allels auf die Entwicklung von Glioblastomen wurde von dem Erstbeschreiber beobachtet (Ali-Osman u. Mitarb. 1997). In der vorliegenden Studie wurden GSTP1C-Allele nicht bestimmt.

Im Gegensatz zu den Glutathion S-Transferasen konnte ein Einfluß von den untersuchten Polymorphismen der Cytochrom P450 auf das Erkrankungsrisiko nicht nachgewiesen werden. Die Bedeutung der verschiedenen Allele in den Cytochrom P450 1- und 2-Familien als Einflußfaktoren auf Zigarettenrauch-assoziierte Tumorerkrankungen hat in den letzten Jahren viel Interesse hervorgerufen. Die Rolle von CYP2D6, CYP1A1 und CYP2E1 in der Beeinflussung des Krebsrisikos ist in der Literatur jedoch nicht einheitlich. Epidemiologische Studien konnten einen Einfluß von CYP2D6EM (extensive metabolizer) bei Raucherinnen auf

die Entwicklung von Zervixkarzinomen nachweisen (Warwick u. Mitarb. 1994). Mittels phänotypisierender wie auch genotypisierender Methoden konnte weiterhin gezeigt werden, daß CYP2D6PM (PM =poor metabolizer) Enzyme seltener bei Lungenkarzinom-, Blasenkarzinom- und Magenkarzinom-Patienten vorkommen (Roots u. Mitarb. 1992b). Mit den hier untersuchten zwei Mutationen können ca. 90% der aktivitätsbeeinflussenden Genveränderungen bei Europäern erfaßt werden. Geringere Enzymaktivität (PM) wird bei etwa 7% der europäischen Bevölkerung nachgewiesen. Darüber hinaus ist jedoch bekannt, daß einige Personen über eine außergewöhnlich hohe Enzymaktivität verfügen, die eventuell auf einer Genduplikatur oder dem Vorhandensein besonderer Allele beruht (Guengerich 1995). Solche Individuen konnten bei den hier durchgeführten Untersuchungen aus methodischen Gründen nicht identifiziert werden.

Die CYP1A1 m2-Mutation zeigte als Einzelfaktor in der Fall-Kontroll-Studie den Trend, daß die homozygote Mutation einen prognostisch günstigen Faktor darstellen könnte. Aufgrund der Seltenheit dieses Genotyps wurde keine Signifikanz erreicht (p=0,10, OR=0,2). CYP1A1 hat als Einflußfaktor von Zigarettenrauch-assoziierten Tumorerkrankungen Interesse erregt, da CYP1A1 durch Benzpyren aus dem Zigarettenrauch induziert werden kann (Gonzales u. Mitarb. 1993b; Guengerich 1995) und in einer japanischen Studie gezeigt werden konnte, daß sowohl das mutierte Allel der 3´End Region (m1-Mutation) als auch das mutierte Allel im Exon 7 (m2-Mutation) alleine und in Kombination mit GSTM1 0-Homozygotie das Lungenkrebsrisiko beeinflußten (Nakaski u. Mitarb. 1993). Weitere japanische Studien legen ferner einen Einfluß der CYP1A1-Polymorphismen auf die Entstehung von Ösophaguskarzinomen nahe (Nimura u. Mitarb. 1997). Studien an europäischen Populationen konnten diesen Einfluß, zumindest was die m1-Mutation betrifft, bei Lungenkarzinom-Patienten nicht bestätigen (Hirvonen u. Mitarb. 1992; Drakoulis u. Mitarb. 1994). Die in der letzteren Studie berichtete Verbindung der Exon 7-Mutation mit der 3`End-Mutation konnte in der vorliegenden Studie ebenfalls nachgewiesen werden. Das seltenere Auftreten der Exon 7-Mutation im Vergleich zur 3´End-Mutation wurde hingegen nur bei den Mundhöhlen / Pharynxkarzinom-Patienten beobachtet. Diese Prozentzahlen sind jedoch aufgrund der Seltenheit der beiden Mutationen durch wenige Individuen stark beeinflußbar. Die Bedeutung

der CYP1A1-Mutationen auf Zigarettenrauch-assoziierte Karzinomerkrankungen ist schwer bei nordeuropäischen Populationen nachzuweisen, da die 3´End-Mutation sehr viel seltener zu finden ist (7,3%, Drakaulis u. Mitarb. 1994) als in der japanischen Bevölkerung (33,2%, Nakashi u. Mitarb. 1993). Die Risikobeeinflussung durch den CYP1A1 m2-Polymorphismus in Kombination mit dem TNF-Allel B3 weist aber auf einen möglichen Einfluß auch im vorliegenden Kollektiv hin (siehe unten). Im CYP1A1-Gen wurden kürzlich noch weitere Mutationen identifiziert. Der als m3-Mutation beschriebene Polymorphismus tritt nach bisherigen Erkenntnissen nur in der schwarz-afrikanischen Bevölkerung auf. Eine weitere, im Exon 7 beschriebene Mutation (m4) tritt bei Europäern mit einer Häufigkeit von etwa 3% auf (Cascorbi u. Mitarb. 1996). Sie wurde in der vorliegenden Studie nicht bestimmt.

Dem CYP2E1-Polymorphismus konnte im untersuchten Patientenkollektiv weder bei der Determinierung des Erkrankungsrisikos noch bei der Beeinflussung von Tumor- oder Prognosekriterien ein Einfluß zugeordnet werden. In japanischen Studien wurde der CYP2E1-Polymorphismus mit dem Lungenkrebsrisiko in Verbindung gebracht (Kato u. Mitarb. 1992; Uematsu u. Mitarb. 1994). Die Ergebnisse ließen sich in einer finnischen Population jedoch nicht nachweisen (Hirvonen u. Mitarb. 1993). Ferner konnte ein ausgeprägter Einfluß auf die Entstehung von Ösophaguskarzinomen in einer chinesischen Studie aufgezeigt werden während ein Einfluß von GSTM1-, GSTT1- und GSTP1-Polymorphismen dort nicht nachweisbar war (Lin u. Mitarb. 1998). Diese Ergebnisse sowie deutlich unterschiedliche Genotyp-Frequenzen in den Kontrollgruppen weisen auf ausgeprägte ethnische Unterschiede an diesen Genorten hin und lassen einen Vergleich asiatischer Kollektive mit europäischen Patientengruppen wenig sinnvoll erscheinen. Nach den vorliegenden Ergebnissen scheinen die hier untersuchten CYP-Polymorphismen aber eine untergeordnete Rolle in der Beeinflussung des Erkrankungsrisikos von Kopf-Hals-Karzinomen zu spielen.

Einen Einfluß von GSTM1-Genvariationen und in geringerem Maße auch vom GSTT1-Polymorphismus konnte bereits von einer amerikanischen Arbeitsgruppe aufgezeigt werden (Trizna u. Mitarb. 1995). Andere Autoren konnten allerdings keinen Einfluß der Polymorphismen an den GSTM1, GSTT1 und CYP1A1-Genorten auf das Erkrankungsrisiko von 185 Kopf-Hals-Karzinom-Patienten nachweisen (Oude-Ophuis u. Mitarb. 1998).

Erst kürzlich erschien eine Reihe weiterer Fall-Kontroll-Studien über Tumoren im oberen Aerodigestivtrakt. Von einigen Autoren konnten Risiko-vermittelnde Einflüsse der GST in diesem Patientenkollektiv bestätigt werden (bei Kopf-Hals-Karzinomen (phänotypisch): Lafuente u. Mitarb. 1998; bei Larynxkarzinomen: Jourenkova u. Mitarb. 1998; bei Mundhöhlenkarzinomen: Hung u. Mitarb. 1997; Park u. Mitarb. 1997), andere konnten signifikante Unterschiede in den Genotyp-Frequenzen nicht bestätigen (Gonzalez u. Mitarb. 1998). Die Patientenzahl dieser Studien lag jedoch teilweise unter 100 Patienten. Insbesondere die regionalen Unterschiede der GSTM3- und GSTP1-Genpolymorphismen weisen aber auf einen differenzierten Einfluß der GST- und CYP-Genvariationen in den einzelnen anatomischen Regionen des Kopf-Hals-Bereichs hin. Dies könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse verschiedener Gruppen sein.

Die bislang untersuchten Mutationen stellen wahrscheinlich nur einen kleinen Teil aus dem gesamten Spektrum der Allelvariationen in den GST- und CYP-Genen dar (Rannung u. Mitarb. 1995). Die fortlaufende Identifizierung weiterer Genpolymorphismen in den detoxifizierenden Enzymen zeigt der Nachweis des C-Allels im GSTP1-Gen (Ali-Osman u. Mitarb. 1997), der Nachweis der polymorphen GSTT2 (Coggan u. Mitarb. 1998) sowie der m4-Polymorphismus im Exon 7 des CYP1A1-Gens (Cascorbi u. Mitarb. 1996). Auch wurden kürzlich Polymorphismen in den Genen der N-Azetyltransferase, einem weiteren Phase-2-Enzym, mit einem veränderten Larynxkarzinom-Risiko in Verbindung gebracht (Henning u. Mitarb. 1999). Weiterhin wurde ein Genpolymorphismus in der Alkoholdehydrogenase-3 identifiziert und mit einem erhöhten Mundhöhlenkarzinom-Risiko in Verbindung gebracht (Coutelle u. Mitarb. 1997; Harty u. Mitarb. 1997).

Das Ausmaß der Risikobeeinflussung durch Polymorphismen in den entgiftenden Enzymen war in der vorliegenden Studie ähnlich dem für die GST- und CYP-Polymorphismen ermittelten Risikofaktoren bei anderen Karzinomerkrankungen (Magenkarzinome, Smith u. Mitarb. 1995; Astrozytome und Meningeome, Elexpuru-Camiruaga u. Mitarb. 1995; Zervixkarzinome, Ambrosone u. Mitarb. 1995; Hautbasaliome, Yengi u. Mitarb. 1996). Da die Anzahl der risikovermittelnden Gene bisher weder bekannt noch in ihrer Größenordnung abzuschätzen ist, bleibt auch die vorhandene Studie nur ein erster Schritt auf dem Weg, die

genetischen Risikofaktoren für die Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen zu identifizieren. Mit der zunehmenden Kenntnis über risikovermittelnde Genvariationen liegt das Potential dieser Untersuchungen in der Konstruktion von Genotyp-Kombinationen, die deutlich höhere Risikobeeinflussungen implizieren und eventuell in der klinischen Routine eingesetzt werden können. Die bisher nachgewiesenen Genotypen sind aber entweder zu selten oder mit einer zu geringen Risikobeeinflussung verbunden, um ihre Anwendung in der Klinikroutine zu empfehlen.

6.3 Einfluß der TNF-Mikrosatelliten-Polymorphismen auf die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren

Das TNFB3-Allel war bei Patienten mit Larynxkarzinomen sowohl heterozygot als auch homozygot (B3/B3-Genotyp) signifikant vermehrt nachweisbar, was eine Bestätigung für dessen Risikovermittlung ist. Die Interaktion zwischen dem TNFB3-Allel und dem Wildtyp am m2-Genort von CYP1A1 führte zum Anstieg des Erkrankungsrisikos bei dem Vorliegen einer Kopie des B3-Allels auf 3,9 sowie auf 8,8 für Homozygotie an B3. Der CYP1A1 m2-Polymorphismus bewirkte nur in Zusammenhang mit dem TNFB3-Allel eine Risikobeeinflussung auf die Larynxkarzinom-Entstehung. Es ist bekannt, daß TNFα die Expression von CYP-Genen beeinflussen kann (Stern u. Mitarb. 1996), was eine mögliche Erklärung für diese Interaktion sein könnte. Ein Zusammenhang zwischen CYP-Polymorphismen mit den hier untersuchten TNF-Genvariationen ist bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Bei Vorliegen dieser Genotyp-Kombination wurden Risikofaktoren erreicht, wie sie für einen geringen bis mittleren Alkohol- und Zigarettenkonsum in epidemiologischen Untersuchungen ermittelt wurden (Elwood u. Mitarb. 1984; Blot u. Mitarb. 1988). Ein Einfluß dieser Größenordnung konnte in der vorliegenden Arbeit bei Kopf-Hals-Tumoren erstmalig genetischen Konstellationen zugeordnet werden.

Das TNFB3-Allel wurde als Teil eines Risiko-beeinflussenden Haplotypen (miteinander zusammen vererbte Allele) erstmals bei Patienten mit primär chronischer Polyarthritis und Zöliakie nachgewiesen (Hajeer u. Mitarb. 1996; McManus u. Mitarb. 1996). Bei diesen Patienten war eine Verbindung zu bestimmten HLA-Genotypen feststellbar, in deren

Nachbarschaft die Gene für TNFα und TNFβ im MHC auf Chromosom 6p21 liegen. Ein weiterer Haplotyp, der ebenfalls das TNFB3-Allel enthält, trat gehäuft bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes auf (Hajeer u. Mitarb. 1997). Darüber hinaus ließ sich ein Einfluß des B3-Allels auf das Erkrankungsrisiko von Kolonkarzinomen nachweisen (Honchel u. Mitarb. 1996). In weiteren Untersuchungen konnte das TNFB3-Allel mit einer verstärkten Fähigkeit TNFα zu produzieren in Verbindung gebracht werden (Pocoit u. Mitarb. 1993). Ob diese Beeinflussung der TNFα-Produktion durch einen direkten Einfluß des TNFB3-Allels auf die Expression von TNFα bedingt ist oder ob das TNFB3-Allel mit anderen Genvariationen dieser Region in Verbindung steht, ist bisher nicht bekannt. Bei Kolonkarzinom-Patienten wurde ein hoher Anteil von Instabilitäten an den TNF-Mikrosatelliten-Markern bei dem Vergleich von Blut- und Tumor-DNA festgestellt (Honchel u. Mitarb. 1996). Erste Untersuchungen unserer Gruppe konnten diese Beobachtung bei Kopf-Hals-Tumoren bestätigen (unveröffentlichte Ergebnisse). Bei Lungenkarzinomen, Ovarialkarzinomen, Mammakarzinomen und Kopf-Hals-Karzinomen kommen DNA-Verluste auf Chromosom 6p häufig vor, was ein Hinweis dafür sein kann, daß auf dem verlorengegangenen Chromosomenabschnitt ein Tumorsuppressorgen lokalisiert ist (Wooster u. Mitarb. 1994; Field u. Mitarb. 1995a, b). Die Beeinflussung eines solchen Tumorsuppressorgens durch die TNF-Mikrosatelliten-Polymorphismen wäre möglich (McManus u. Mitarb. 1996). Weitere potentielle Zielorte stellen der polymorphe TNF2-Promoter (Wilson u. Mitarb. 1993), der mit der p53-Regulation in Verbindung gebrachte *waf1*-Polymorphismus und die Allelvariationen im Gen des Zellzyklus-regulierenden Proteins Cyclin D3 dar.

Die genaue Funktion der identifizierten TNF-Mikrosatelliten-Polymorphismen ist bisher nicht bekannt. Obwohl sie nicht in Genabschnitten liegen, die in Proteinstrukturen überschrieben werden und teilweise weit von den Strukturgenen TNFα und TNFβ entfernt sind, haben sie wahrscheinlich regulierende Einflüsse auf TNFα und TNFβ. (Pocoit u. Mitarb. 1993; Udalova u. Mitarb. 1993).

Die Rolle von TNFα als Immunmodulator bei Infektions-, Autoimmun- und einigen Malignomerkrankungen wurde in zahlreichen Studien untersucht (Carroll u. Mitarb. 1990; Larrick u. Mitarb. 1990; Parks u. Mitarb. 1994; Knerer u. Mitarb. 1996).
TNFα ist verantwortlich für einige lokale und systemische Effekte des Tumors wie Zerstörung von Tumorgewebe und Kachexie (Carroll u. Mitarb. 1990; Larrick u. Mitarb. 1990).
Heute wird TNFα eine komplexe Rolle in der Steuerung von zellproliferativen Prozessen, dem Zellzyklus und der Apoptose zugeschrieben. TNFα kann Phagozyten und Endothelzellen aktivieren, die Expression von MHC-Antigenen sowie Onkogenen, Transkriptionfaktoren, Entzündungsmediatoren und Akutphase-Proteinen steuern (Old 1985; Vilcek und Lee 1991).
Ein Einfluß von Variationen im MHC, in dem auch die TNF-Gene liegen, auf das Erkrankungsrisiko von Larynxkarzinomen konnte bereits gezeigt werden (De Vries u. Mitarb. 1987). Diese Untersuchungen beruhen jedoch nicht auf dem Nachweis genetischer Veränderungen, sondern auf der immunhistochemischen Identifizierung verschiedener HLA-Typen bei Larynxkarzinom-Patienten und Patienten mit Mehrfachkarzinomen im oberen Aerodigestivtrakt. Diese Beobachtungen führten dazu, genetisch determinierte Veränderungen zu postulieren, die bei einigen Karzinom-Patienten zu einer veränderten Immunabwehr gegenüber Tumoren führen, welche durch von außen einwirkende Giftstoffe hervorgerufen werden (De Vries u. Mitarb. 1987). Mit der Identifizierung Risiko-beeinflussender Mikrosatelliten-Polymorphismen in den TNF-Genen konnte diese Vermutung durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

6.4 Patienten unterschiedlicher Altersgruppen und mit unterschiedlichem Alkohol- und Zigarettenkonsum

Patienten unter dem 50. Lebensjahr teilten nicht den protektiven Einfluß des GSTM1AB Genotyps. Das TNFD3-Allel war hingegen nur in dieser Altersgruppe signifikant häufiger nachweisbar. Patienten, die in fortgeschrittenem Alter an einem Kopf-Hals-Karzinom erkrankten, teilten nicht den in der Gesamtgruppe nachgewiesenen Risikofaktor des TNFB3-Allels. Im CYP2D6-Gen waren die Mutationen, die mit einer verminderten Enzymaktivität

einhergehen und nach der 2-phasigen Entgiftungstheorie (siehe Abb.1) als protektiv eingeschätzt werden, signifikant häufiger unter den >80-jährigen Karzinompatienten vertreten. Es wird seit einiger Zeit vermutet, daß insbesondere Larynxkarzinom-Patienten altersabhängig eine unterschiedliche Pathogenese der Erkrankung aufweisen (Shervo u. Mitarb. 1987). Das Fehlen des protektiven Einflusses der GST-Polymorphismen, insbesondere GSTM1AB, bei Patienten unter dem 50. Lebensjahr sowie der Nachweis besonderer TNF-Allele legen den Schluß nahe, daß bei jungen Patienten besondere Genkonstellationen eine Rolle spielen, die Immunreaktionen gegen Tumorzellen beeinflussen, während Unterschiede im Karzinogenstoffwechsel weniger bedeutsam scheinen. Untersuchungen an dieser Patientengruppe sind in der Literatur aber bisher nicht mit statistischen Berechnungen belegt, sondern nur als Beobachtungen dargestellt (bei Kopf-Hals-Karzinomen: Clark u. Mitarb. 1982; bei Larynxkarzinomen: Webber u. Mitarb. 1984 sowie Shervo u. Mitarb. 1987). Idealerweise sollte für diese Patientengruppe eine noch niedrigere Altersgrenze als die in der vorliegenden Studie definiert werden. Eine Altersgrenze von 40 oder 45 Lebensjahren ließ aufgrund geringer Fallzahlen in der vorliegenden Studie jedoch keine statistischen Berechnungen zu. In den o.g. Kollektiven von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (bzw. Larynx) waren nur etwa 2-3% jünger als 40 Jahre alt (Clark u. Mitarb. 1982; Webber u. Mitarb. 1984; Shvero u. Mitarb. 1987).

Systematische Untersuchungen über Besonderheiten bei Kopf-Hals-Karzinom-Patienten in fortgeschrittenem Alter liegen in der Literatur ebenfalls nicht vor. Die verfügbaren Studien beinhalten teilweise konträre Aussagen. So wurde bei Patienten fortgeschrittenen Alters teilweise ein geringeres Rezidivrisiko nach Tumorbehandlung beobachtet (Magnano u. Mitarb. 1995) andererseits aber auch eine erhöhte Anzahl von Tumorrezidiven und zervikalen Lymphknotenmetastasen (Janot u. Mitarb. 1996). Ergebnisse der vorliegenden Studie legen den Schluß nahe, daß die Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms im fortgeschrittenen Alter zunehmend unabhängig von genetischen Risikofaktoren als zufälliges Ereignis auftritt.

In der Literatur wird ferner ein relativ konstanter Prozentsatz von etwa 5% der Kopf-Hals-Karzinom-Patienten berichtet, welche die Hauptrisikofaktoren, Rauchen und Alkoholkonsum, nicht teilen (Elwood u. Mitarb. 1984; Blot u. Mitarb. 1988; Brugere u. Mitarb. 1986).

Untersuchungen über die Ursache der besonderen Empfänglichkeit dieser Patientengruppe für die Karzinomentstehung liegen ebenfalls nicht vor. Der Einfluß der bestimmten Genvariationen bei diesen Patienten zeigte einige Parallelen zu den altersabhängigen Einflüssen. Erneut waren die als protektiv in der Gesamtgruppe identifizierten GST-Genotypen (GSTM1AB, GSTM3BB) sowie die CYP1A1 homozygoten Wildtypen in der Gruppe der Patienten mit geringer Toxinaufnahme nicht nachweisbar. Statistische Signifikanz wurde, da diese Genotypen bereits in der Gesamtpatientengruppe reduziert waren, nicht erreicht. Das TNFA6-Allel, welches im Rahmen anderer Studien bereits mit einer verminderten Bildung von TNFα in Verbindung gebracht werden konnte (Pocoit u. Mitarb. 1993) war bei Patienten mit geringem Genußmittelkonsum signifikant häufiger nachweisbar. Variationen am TNFA-Marker, wenn auch nicht das Vorliegen des A6-Allels, wurden bereits mit Kolonkarzinomen in Zusammenhang gebracht (Campbell u. Mitarb. 1994). Aus diesen Beobachtungen läßt sich vermuten, daß bei dieser Patientengruppe, ähnlich wie bei den jungen Patienten besondere immunologische Konstellationen bedeutsam sind.
In der Gruppe der Patienten mit hohem Alkohol- und Zigarettenkonsum konnten im Vergleich zur Gesamtgruppe keine signifikanten Unterschiede in den hier bestimmten Genotyp-Frequenzen festgestellt werden. Alle identifizierten Risikofaktoren waren in diesem Patientenkollektiv seltener vorhanden, so daß sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe ergaben, was den Schluß zuläßt, daß in dieser Untergruppe die Karzinomerkrankung durch ein übermäßiges Einwirken von Karzinogenen unabhängig von einem Risiko-Genotyp oder protektiven Genotyp entsteht.

6.5 Patienten mit Mehrfachtumoren

Nach der von Slaughter u. Mitarb. (1953) ursprünglich für Mundhöhlenkarzinome aufgestellten Feldkanzerisierungstheorie, die heute aber für den gesamten oberen Aerodigestivtrakt als bedeutsam angesehen wird (Dhooge u. Mitarb. 1998), erwirbt die gesamte Mukosa durch Karzinogeneinwirkung ein malignes Potential. Patienten, bei denen das seltene Ereignis der Tumorentstehung zwei- oder mehrmals unabhängig voneinander auftritt, lassen eine genetisch bedingte Disposition vermuten. So stellte im vorliegenden

Kollektiv die Gruppe der Patienten mit Mehrfachtumoren bei den Genotypisierungen die Subpopulation innerhalb der Kopf-Hals-Tumor-Patienten dar, die sich in ihren Genotyp-Frequenzen am deutlichsten sowohl von der Kontrollgruppe als auch von den Patienten mit Einfachtumoren unterschied. Dies betraf das häufige Auftreten des GSTM3AA-Genotyps, der bereits in der Gesamtpopulation als Risikofaktor identifiziert werden konnte. Ähnliches gilt für den Genotyp GSTT1 0. Der Verlust des funktionsfähigen GSTT1-Gens war unter den Patienten mit Mehrfachtumoren doppelt so häufig nachweisbar wie in der Kontrollgruppe oder bei den Patienten mit Einfachtumoren. Am CYP1A1 m2-Genort waren die protektiven Genotypen, die mit der m2-Mutation auf einem oder beiden Allelen einhergehen, signifikant seltener nachweisbar. Unter den TNF-Mikrosatelliten-Markern trat das bereits im Gesamtkollektiv ermittelte Risiko-Allel TNFB3, wie auch der homozygote Genotyp, bei den Patienten mit Mehrfachtumoren in weiter zunehmender Frequenz auf. Eine signifikante Interaktion zwischen dem TNFB3-Allel und dem CYP1A1 m2-Polymorphismus konnte aufgrund der geringen Anzahl von Patienten mit Mehrfachtumoren nicht nachgewiesen werden.

Die Entwicklung eines Zweittumors im oberen Aerodigestivtrakt ist einer der Hauptgründe für Therapieversagen und Mortalität nach einer kurativen Behandlung eines Kopf-Hals-Karzinoms. Ein Tumorrezidiv des Indextumors tritt in dieser wie in anderen Studien meist innerhalb der ersten zwei Jahre nach der Behandlung auf. Da Zweitkarzinome aber in einer relativ konstanten Rate von 3% jährlich auftreten, konzentriert sich die klinische Nachbetreuung von Kopf-Hals- Tumor-Patienten 24-36 Monate nach Behandlung des Indextumors zunehmend auf die Diagnose von Zweittumoren (Jovanovic u. Mitarb. 1994; Copper u. Mitarb. 1995; Dhooge u. Mitarb. 1998). Diese ist aufgrund unübersichtlicher anatomischer Verhältnisse nach ausgedehnten Resektionen und in oftmals bestrahltem Gebiet deutlich erschwert, was wiederholt zu dem Versuch geführt hat, Hochrisiko-Patienten für die Entwicklung von Zweitkarzinomen zu identifizieren und diese einer intensiveren Nachbetreuung zuzuführen (De Vries u. Mitarb. 1986, 1987; Bongers u. Mitarb. 1995; Dhooge u. Mitarb. 1998). Als erwiesen gilt bisher lediglich, daß Patienten, die zum Zeitpunkt des Indextumors nicht rauchten oder Alkohol tranken, ein geringes Risiko für das Auftreten

eines Zweitkarzinoms aufweisen; eine für die Nachbetreuung wenig hilfreiche Erkenntnis, da dies höchstens 5-10% der Patienten eines Kollektivs sind (Dhooge u. Mitarb. 1998). Die Identifizierung der o.g. Risiko-Genotypen für die Entstehung von Mehrfachtumoren könnte dazu beitragen, die Gruppe der Kopf-Hals-Tumor-Patienten entsprechend ihrer Genotyp-Konstellation unterschiedlich intensiv nachzubetreuen. Da die berechneten odds ratios für alle 4 Genotypen bei 2,5-5 lagen und die Risikoallele unter Patienten mit Mehrfachtumoren relativ häufig waren (CYP1A1 m2-Wildtyp: ca. 85%; GSTT10: ca. 40%; GSTM3AA: ca. 70%; TNFB3-Allel: ca. 30%) scheint eine
Anwendung dieser Risikomarker in der Tumornachsorge nicht mehr ganz abwegig zu sein.

6.6 Beeinflussung des Tumorverhaltens durch die bestimmten Genvariationen

Im Rahmen durchgeführten Studie ließ sich bestätigen, daß Tumorrezidive meist im Zeitraum von 6 Monaten bis zu 2 Jahren nach der Diagnose des Primärtumors auftreten (hier 32 der 43 Tumorrezidive) (Schwartz u. Mitarb. 1994; Jones u. Mitarb. 1995; Magnano u. Mitarb. 1995; Muir u. Weiland 1995). Nach 3-5 Jahren sind Tumorrezidive sehr selten, was dazu geführt hat, daß einige Autoren jedes nach 3 Jahren auftretende Malignom als Zweittumor werten (Schwartz u. Mitarb. 1994; Jones u. Mitarb. 1995). Im Zeitraum unter 6 Monaten nach der Primärtumor-Behandlung ist erneutes Tumorwachstum meist auf nachgewachsene Residualtumorzellen zurückzuführen (Bedi u. Mitarb. 1996), weshalb in der hier vorliegenden Studie jegliches Tumorwachstum bis zu 6 Monaten nach der Behandlung nicht als Rezidiv sondern als Residualtumor gewertet wurde. Die stärkste Beeinflussung der Rezidivhäufigkeit zeigten klinische Parameter wie die Tumorausdehnung und der histologische Differenzierungsgrad des Malignoms. Die Beeinflussung der Rezidivhäufigkeit durch den initialen Halslymphknotenbefall war geringer als erwartet. Hier sei jedoch darauf verwiesen, daß bei der vorliegenden Berechnung nur lokoregionäre Rezidive nach histologisch überprüfter R0-Resektion gewertet wurden, um bei der Untersuchung genetischer Variationen keine Beeinflussung durch Therapiefehler zu erhalten. Therapieunabhängig wäre sicherlich ein wesentlich stärkerer Einfluß des initialen Halslymphknotenbefalls auf die Tumorrezidivrate zu erwarten gewesen. Der Alkoholkonsum hatte lediglich einen

signifikanten Einfluß auf die Rezidivhäufigkeit von Pharynxkarzinomen. Geschlechtsabhängige Unterschiede waren nur sehr diskret auszumachen. Die Beeinflussung der Tumorrezidivrate durch die genannten Faktoren entspricht den Beobachtungen anderer Autoren und wurde aufgeführt um nachzuweisen, daß es sich bei dem vorliegenden Patientenkollektiv um ein für dieses Krankheitsbild repräsentatives Kollektiv handelte (Field u. Mitarb. 1995b; Magnano u. Mitarb. 1995; Evans 1997; Robin 1997).

Während bisher wenig über den Einfluß genetisch bedingter Wirtsfaktoren auf den Verlauf der Kopf-Hals-Tumor-Erkrankung bekannt ist, wird der Einfluß genetischer Veränderungen im Tumorgewebe auf die Beeinflussung des Tumorverhaltens seit einigen Jahren sehr intensiv untersucht. Genetische Veränderungen im H-ras-Protoonkogen sind im Tumorgenom mit einer schlechten Prognose verbunden (Issing u. Mitarb. 1992). Ähnliches wurde für die Expression von p53 oder Cyclin D1 gezeigt (Michalides u. Mitarb. 1995). Die Expression von Onkogenen und deren Proteinen, Metalloproteinasen, Zellzyklus- und Proliferation-steuernden Proteinen (Cyclin D1, D3) wurde bei Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen (Issing u. Mitarb. 1992; Califano u. Mitarb. 1996). Einige Marker wurden mit einem aggressiven Tumorverhalten in Verbindung gebracht, konnten sich bisher jedoch nicht in der Klinikroutine durchsetzen. Chromosomenverluste an diversen Orten wie beispielsweise 3p, 6p, 8p, 8q, 9p21, 11q13, 13q21, 14q24, 17p13 und 22q13 (Field u. Mitarb. 1995 a, b; Bockmühl u. Mitarb. 1996) konnten mit einem veränderten Tumorverhalten in Verbindung gebracht werden.

Der Verlauf der Tumorerkrankung ist jedoch nicht nur durch die Tumoreigenschaften bestimmt, sondern reflektiert vielmehr die Bilanz zwischen Tumoraggressivität und Gegenwehr des Wirtsorganismus. So ist seit langem bekannt, daß Faktoren, welche die Abwehrsituation des Wirtsorganismus schwächen, wie beispielsweise immunsuppressive Therapien, Kachexie und schlechte Ernährung, einen negativen Einfluß auf den Krankheitsverlauf von Tumorpatienten haben (Chouaib u. Mitarb. 1997).

Unter den hier untersuchten Genpolymorphismen waren Mutationen im CYP2D6-Gen, die mit einem PM (poor metabolizer)-Enzymstatus einhergehen, gehäuft mit dem Auftreten von Halslymphknoten-Metastasen verbunden. Statistische Signifikanz wurde in Kombination mit

anderen Genotypen wie dem Wildtyp am CYP1A1 m2-Genort, GSTM3AA und dem TNFC1-Allel erreicht. Der GSTM1B-Genotyp war signifikant mit einem gehäuften Lymphknotenbefall assoziiert, während GSTM10 als Einzelfaktor protektiv war. Dieser Zusammenhang eines bei den bisherigen Untersuchungen als negativ identifizierten Genotyps mit einem für den weiteren Krankheitsverlauf positiven Einfluß zeigt die Problematik bei der Identifizierung von Risikoallelen. Kürzlich konnte eine andere Studie zeigen, daß bei Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen, welche die CYP1A1 m1-Mutation trugen und mindestens ein GSTM1-Allel aufwiesen, häufiger Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen nachweisbar waren, verglichen mit GSTM1 0-Patienten (Lazarus u. Mitarb. 1998). Diese p53-Mutationen gelten nach bisherigem Wissensstand als ein prognostisch negativer Indikator.
Der positive Einfluß des GSTM1 0-Genotypen war bei der Betrachtung von Genotyp-Kombinationen nicht mehr nachweisbar, was die biologische Relevanz wie auch den Mechanismus dieser Beeinflussung des Tumorverhaltens fraglich erscheinen läßt. Auf eine mögliche Erklärung weisen Genotyp-Frequenzen einer Blasenkarzinom-Studie hin, in der das Fehlen des GSTM1A-Allels einen besseren Risikomarker darstellte als der GSTM10-Genotyp (Brockmöller u. Mitarb. 1996b), was wiederum auf der genetischen Verbindung des GSTM1A-Allels mit dem GSTM3B-Allel beruhen könnte (Inskip u. Mitarb. 1995).
Die TNF-Allele D6 und A2 konnten mit einer gut differenzierten Tumorhistologie in Zusammenhang gebracht werden. Das TNFA2-Allel wurde als Teil eines Haplotypen identifiziert, der gehäuft bei Patienten mit systemischem Lupus erythematodes auftritt (Hajeer u. Mitarb. 1997). Ein Einfluß auf das Verhalten von Tumoren ist bei beiden hier identifizierten Allelen in der Literatur bisher nicht beschrieben worden.
Viele Fall-Kontroll-Studien, die vorliegende eingeschlossen, konnten den meisten Risiko-beeinflussenden Genotypen bei der statistischen Auswertung nur eine geringe Risikovermittlung mit odds ratios zwischen 2 und 3 zuordnen. Deshalb werden zunehmend Kombinationen von Risiko-Allelen untersucht, in der Hoffnung, beeinflussende Faktoren mit odds ratios um 15 identifizieren zu können, die eine Anwendung in der Klinikroutine sinnvoll erscheinen lassen. Die Untersuchung von Interaktionen sollte auf biologischen Überlegungen beruhen. So sollten Polymorphismen, welche Enzyme der Phase 1- und Phase 2- Reaktion des

klassischen Entgiftungsstoffwechsels beeinflussen oder ein überlappendes Substratspektrum aufweisen, auf eine Interaktion untersucht werden. Ferner könnten Genpolymorphismen, deren Enzyme Moleküle entgiften, die aus der gleichen pathologischen Noxe entstanden (z.B. Entgiftung von Nitrosaminen und PAH aus dem Zigarettenrauch) synergistisch wirken. Auch könnten Genotyp-Interaktionen eine Verbindung in der Regulation der Expression der kodierten Genprodukte aufweisen (Strange u. Mitarb. 1998). Der signifikante Nachweis von Interaktionen ist äußerst schwierig, da aus statistischen Gesichtspunkten der Studienumfang mit zunehmender Komplexität der untersuchten Kombinationen exponentiell zunehmen muß. In der Mehrzahl der bisher veröffentlichten Studien, wie beispielsweise in einer der umfangreichsten dieser Art (Brockmöller u. Mitarb. 1996b), konnten zwischen 8 Genvariationen und 7 Patientencharakteristika bei Blasenkarzinom-Patienten keine Interaktionen nachgewiesen werden. Die vorliegende Studie ergab neben einer Vielzahl additiver Effekte synergistische Einflüsse nur für GSTT1 0 / GSTM3AA und CYP1A1 m2-Wildtyp / TNFB4 in der Beeinflussung des histologischen Differenzierungsgrads sowie für GSTM3AA / CYP2D6PM für die Prädisposition eines von der Tumorlokalisation unabhängigen Halslymphknotenbefalls. Unter den Interaktionen zwischen verschiedenen GST-Polymorphismen hat insbesondere die Kombination GSTM1 0 / GSTT1 0 Interesse hervorgerufen, da beide Genprodukte am Abbau von Sauerstoffradikalen beteiligt sind und eine Häufung dieser Genotyp-Kombination bei Ovarialkarzinom-Patienten nachgewiesen wurde (Warwick u. Mitarb. 1994). Im vorliegenden Kollektiv ließen sich lediglich additive Effekte zwischen diesen beiden Genotypen aufzeigen, der Synergismus zwischen GSTT1 0 und GSTM3AA könnte aber auf der genetischen Verbindung zwischen dem GSTM1A-Allel und dem GSTM3B-Allel beruhen (Inskip u. Mitarb. 1995). Bisher wurden synergistische Einflüsse zwischen dem GSTT1- und GSTM3-Polymorphismus in der Literatur nicht beschrieben. Der hier nachgewiesene Synergismus von Phase 1-/ Phase 2-Polymorphismen (GSTM3AA / CYP2D6PM auf die Entwicklung eines Halslymphknotenbefalls) ist nach der Hypothese des Entgiftungsstoffwechsels von besonderem Interesse. Nachdem gezeigt werden konnte, daß der CYP2D6-Metabolismus von Debrisoquin bei Lungenkarzinom-Patienten mit geringer GSTμ-Aktivität gegen trans-Stilbenoxid im Vergleich zu Patienten mit hoher GSTμ-

Aktivität verringert war (Roots u. Mitarb. 1992b), kann ferner eine direkte Beeinflussung beider Polymorphismen vermutet werden. Da über eine Verbindung der CYP2D6-Polymorphismen mit GSTM3-Genotypen bisher keine weiteren Arbeiten vorliegen, bleibt die Ursache dieses Synergismus spekulativ.
Wie bereits in der Fall-Kontroll-Studie, wurde eine Interaktion zwischen dem CYP1A1 m2-Polymorphismus und TNFB-Allelen im Zusammenhang mit dem histologischen Differenzierungsgrad nachgewiesen. Eine mögliche Erklärung ist die bereits erwähnte Beeinflussung der Expression verschiedener CYP-Enzyme durch ausgeschüttete Zytokine (u.a. TNFα) nach Entzündungsreizen (Shedlofsky u. Mitarb. 1994; Muntanerelat u. Mitarb. 1995).

Eine Häufung von Tumorrezidiven, insbesondere Mundhöhlen / Pharynxkarzinomen bei Patienten mit Vorliegen des TNFB1D5-Haplotypen, konnte gezeigt werden. Weder einzelne Genotypen noch Kombinationen von Polymorphismen in den entgiftenden Enzymen wiesen hingegen einen signifikanten Einfluß auf. Der B1D5-Haplotyp wurde bereits mit einem erhöhten Risiko an primär chronischer Polyarthritis (PCP) zu erkranken und mit Störungen bei der Initiierung und Regulation von Immunantworten in Verbindung gebracht (Hajeer u. Mitarb. 1996). Inwieweit diese auch bei der Entwicklung von Rezidivtumoren im Kopf-Hals-Bereich bedeutsam sind, läßt sich nach den bisher vorliegenden Ergebnissen nur vermuten. Trends konnten für den GSTP1- und CYP1A1 m2-Polymorphismus berechnet werden, die statistischen Berechnungen lagen jedoch deutlich vom Signifikanzniveau entfernt (p=0,1-0,2). Der überraschend geringe Einfluß der GST- und CYP-Polymorphismen auf das Auftreten von Rezidiven liegt wahrscheinlich an der abnehmenden Patientenzahl bei zunehmendem Zeitintervall der Nachbeobachtung. Entsprechend der Beeinflussung prognoserelevanter Tumorcharakteristika wäre ein ähnlicher Zusammenhang zwischen der Rezidivhäufigkeit und einzelnen GST- und CYP-Genotypen zu erwarten gewesen.
Aus der Vielzahl der einflußreichen Polymorphismen ließen sich 4 identifizieren, die in verschiedenen Untergruppen der Studie immer wieder als Risiko-Genotypen auftauchten: GSTT1 0, GSTM3AA, CYP1A1 m2-Wildtyp und das TNF-Allel B3.

Auffällig war, daß am CYP1A1 m2-Genort der Wildtyp einen Risikofaktor darstellte, der Einfluß an CYP2D6-Genorten aber genau umgekehrt war. Hier waren Mutationen im Gen mit einem schlechter differenzierten Tumor und gehäuften Halslymphknoten-Metastasen verbunden. Ähnliche Beobachtungen an CYP2D6-Genorten konnten bereits von unserer Arbeitsgruppe an einem anderen Kollektiv von Mundhöhlenkarzinomen gemacht werden (Worrall u. Mitarb. 1998). Diese stehen im Widerspruch mit dem 2-phasigen Entgiftungsstoffwechsel. Die Funktion der CYP-Polymorphismen ist jedoch nicht so eindeutig, wie aus der Phase 1-/ Phase 2-Hypothese hervorgeht (Abb.1). Es ist bekannt, daß die CYP-Enzyme für einige Substanzen toxifizierende Reaktionen unterstützen, bei anderen Substanzen aber detoxifizierende Funktionen haben können (Roots u. Mitarb. 1992a). Auch ist die Rolle der CYP-Enzyme im Entgiftungsstoffwechsel generell nicht unumstritten (Ingelman-Sundberg u. Mitarb. 1992). Obwohl heute davon ausgegangen wird, daß sich die CYP- und GST-Enzyme als Reaktion auf chemische Substanzen aus der Umgebung entwickelt haben, gibt es neuere Untersuchungen, die diesen Enzymen einen Einfluß in dem Stoffwechsel endogener Liganden zuordnen. Den CYP-Polymorphismen wird ferner ein Einfluß auf die Zellproliferation und Apoptose zugeschrieben (Nebert 1994; Rannung u. Mitarb. 1995). CYP1A1 und CYP2D6 sind in der Embryonalphase und Fetalentwicklung stark erhöht und scheinen einen Einfluß auf die Zelldifferenzierung zu haben. Das in-vivo Substrat für CYP2D6 ist bisher jedoch nicht bekannt und von einigen Autoren wird bezweifelt, daß das CYP2D6-Protein überhaupt eine physiologische Funktion hat (Rannung u. Mitarb. 1995).

Anhand der hier gewonnenen Ergebnisse stellt sich die Frage, warum Polymorphismen, die in der Fall-Kontroll-Studie nur einen geringen oder gar keinen Einfluß auf die Entstehung der Kopf-Hals-Tumoren zeigten (z.B. CYP1A1-1, GSTT1 0), Tumorcharakteristika, wie den histologischen Differenzierungsgrad oder die Halslymphknoten-Metastasierung, signifikant beeinflußten. Dies impliziert, daß andere Mechanismen als sie der Entgiftungsstoffwechsel erklären kann für die Beeinflussung dieser Tumorcharakteristika verantwortlich sind. Unterstützt wird diese Vermutung durch epidemiologische Studien, die einen Einfluß der CYP2D6-Polymorphismen auf die Entwicklung von multiplen Hautbasaliomen nachwiesen,

einer Erkrankung, die nach derzeitigem Wissensstand nicht von Zigarettenrauch-abhängigen Karzinogenen beeinflußt wird (Yengi u. Mitarb. 1996).

Die Karzinomentstehung ist durch einen zunehmenden Verlust bedingt, die normale Zellhomöostase zu kontrollieren (Hart 1997). So sind die histologischen Veränderungen, die im Rahmen der Karzinomentstehung in unterschiedlichen Stadien beobachtet werden, Ausdruck einer fortschreitenden Anhäufung von genetischen Schäden. Die Entstehung eines Tumors wird heute auf einen Mehrschritt-Mechanismus zurückgeführt, bei dem es durch die Abfolge von bestimmten Mutationen zur zunehmenden Entdifferenzierung und somit zur Bildung von Zellhyperplasien, Dysplasien und vom Carcinoma in situ bis zum invasiven Plattenepithelkarzinom kommt (Harris u. Mitarb. 1991; Bockmühl u. Mitarb. 1996; Califano u. Mitarb. 1996). Die in der Zelle verursachten genetischen Schäden beinhalten Veränderungen des gesamten DNA-Gehalts, Deletionen (Verlust von DNA-Fragmenten), Additionen, Translokationen von Chromosomen-Fragmenten, Genamplifikationen (vermehrtes Kopieren von einem Allel), DNA-Mutationen und chemische Veränderungen der DNA (Hart 1997). Bei Kopf-Hals-Karzinomen gilt als erwiesen, daß sowohl spontane als auch Karzinogen-induzierte genetische Veränderungen zur Tumorentstehung beitragen (Hart 1997). Für einige vererbte Tumorerkrankungen konnten spezifische genetische Veränderungen, z.B. die Inaktivierung bestimmter Tumorsuppressorgene, im Prozeß der Karzinomentstehung nachgewiesen werden. Die Mutationen sind bei den meisten Tumorerkrankungen jedoch heterogen (Califano u. Mitarb. 1996; Hart 1997). Bei Kopf-Hals-Karzinomen und einer Vielzahl anderer Tumorerkrankungen konnten häufige Veränderungen im p53-Tumorsuppressorgen auf Chromosom 17p als frühes Ereignis in der Karzinogenese festgestellt werden. p53 kann bei genotoxisch gestreßten Zellen den Zellzyklus stoppen und damit die DNA-Reparatur ermöglichen oder, falls dies nicht mehr möglich ist, die Apoptose (den programmierten Zelltod) einleiten.

Mit fortschreitenden Entdifferenzierung weisen die Zellen einen Selektionsvorteil gegenüber benachbarten Zellen auf und setzen sich im Tumorgewebe gegen weniger entdifferenzierte Zellen durch. So kommt es zu einer fortschreitenden Malignisierung der Tumoren, denen der Wirtsorganismus keine effektive Abwehr mehr entgegensetzen kann (Califano u. Mitarb.

1996; Hart 1997). Es gibt bereits Hinweise, daß die hier untersuchten Polymorphismen dieses biologische Verhalten von Tumoren beeinflussen. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß PAH-Anlagerungen (polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe, wie sie im Zigarettenrauch enthalten sind) an die DNA gehäuft im Lungengewebe bei Individuen mit GSTM1 0-Genotypen auftreten (Perera 1996). Von anderen Autoren wurde eine bis zu 9-fache Zunahme von Mutationen im p53-Gen des Tumorgenoms bei homozygotem Vorliegen der m1-Mutation im CYP1A1-Gen und gleichzeitigem Vorliegen des GSTM1 0-Genotyps bei Patienten mit Lungenkarzinomen nachgewiesen (Goto u. Mitarb. 1996; Kawajiri u. Mitarb. 1996). Ähnliche Zusammenhänge zwischen CYP1A1-Genotypen und p53-Mutationen ließen sich auch bei Mundhöhlenkarzinomen bestätigen (Lazarus u. Mitarb. 1998). Ferner konnten p53-Mutationen in Ovarialkarzinomen (Sarhanis u. Mitarb. 1996), Blasenkarzinomen (Brockmöller u. Mitarb. 1996a) sowie p53- und H-ras-1-Mutationen in Lungenkarzinomen (Ryberg u. Mitarb. 1994) mit dem GSTM1 0-Genotyp der Patienten in Verbindung gebracht werden, was den Schluß zuläßt, daß GSTM1 p53 vor Mutationen schützt. p53 ist eines der am häufigsten von Veränderungen betroffenen Gene in dysplastischen Läsionen des oberen Aerodigestivtrakts. Es folgen weitere Mutationen in der Tumorzelle, die Tumorprogression und Metastasierungs-Wahrscheinlichkeit beeinflussen und damit insgesamt die Prognose des Krankeitsverlaufs bestimmen (Watling u. Mitarb. 1992; Magnano u. Mitarb. 1995; Bedi u. Mitarb. 1996; Goto u. Mitarb. 1996).

Eine weitere Möglichkeit, wie die hier untersuchten Polymorphismen das Tumorverhalten beeinflussen könnten, ist völlig unabhängig von ihrer Eigenschaft als detoxifizierende Enzyme oder Immunregulatoren. So könnten die Polymorphismen über eine Verbindung mit benachbarten Genen, die für die Tumorinitiierung oder Suppression bedeutsam sind, in Wechselwirkung stehen (genetische Linkage). Der untersuchte Polymorphismus wäre nur ein Marker für eine Veränderung in einem solchen Gen, welches das Tumorverhalten beeinflußt. Dieser Zusammenhang wird insbesondere an dem Genort von CYP2D6 vermutet (Roots u. Mitarb. 1992a, b), der auf Chromosom 22q13 in unmittelbarer Nähe des Interleukin 2 b-Rezeptors, des platelet-derived-growth-factor-β und des Tumorsuppressorgens Neurofibromatosis Typ 2 auf einem Chromosomenabschnitt liegt, der häufig von

Allelverlusten im Tumorgewebe betroffen ist (Field u. Mitarb. 1995a, b). Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit ein Einfluß des GSTT1-Polymorphismus auf den histologischen Differenzierungsgrad nachgewiesen werden. GSTT1 und GSTT2 liegen nahe CYP2D6 auf Chromosom 22. Eine genetische Verbindung zwischen dem GSTT1- und CYP2D6- Polymorphismus, die jedoch nicht sehr ausgeprägt ist, konnte ebenfalls in der vorliegenden Studie festgestellt werden. Kürzlich wurde auch im GSTT2-Gen ein Polymorphismus identifiziert. Ob die Allelvarianten funktionell relevant sind und ob die Veränderungen in beiden Genen miteinander in Verbindung stehen, ist noch nicht bekannt (Coggan u. Mitarb.1998).

Erstaunlich war bei den hier gewonnenen Ergebnissen, daß der GSTP1-Polymorphismus bei der Beeinflussung der Tumorcharakteristika keine Rolle spielte. Neben den bereits nachgewiesenen Unterschieden in der Proteinaktivität der durch die einzelnen Allele kodierten Enzyme wird diese Genvariation mit der Zellproliferation in Zusammenhang gebracht (Harries u. Mitarb. 1996). GSTP1 liegt auf Chromosom 11q13 in einem größeren Amplikon (Chromosomenfragment mit mehreren gemeinsam kopierten Genen; Islam u. Mitarb. 1989; Ali-Osman u. Mitarb. 1996). Chromosomenverluste und Genamplifikationen (vermehrtes Kopieren von Genen) an diesem Genort sind häufig im Tumorgewebe bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich nachweisbar und konnten mit einer veränderten Prognose in Verbindung gebracht werden (Müller u. Mitarb. 1994; Parise u. Mitarb. 1994; Magnano u. Mitarb. 1995). Auf diesem Amplikon liegt auch der Genort für das Zellzyklus-regulierende Protein Cyclin D1, welcher ebenfalls polymorph ist. Ein Einfluß dieser Genvariation auf den Differenzierungsgrad von Kopf-Hals-Tumoren konnte kürzlich von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden (Matthias u. Mitarb. 1998c). Der Cyclin D1-Polymorphismus scheint Verbindungen zu Zellzyklus-steuernden Eigenschaften von TNFα zu haben und in Verbindung mit bestimmten TNF-Allelen Auswirkungen auf den Verlauf von Kopf-Hals-Karzinomen zu haben (eigene, unveröffentlichte Ergebnisse). Eine gegenseitige Beeinflussung der GSTP1- und Cyclin D1-Polymorphismen wie auch eine Verbindung zu einem benachbarten Tumorsuppressorgen wird ebenfalls von einigen Autoren vermutet (Müller u. Mitarb. 1994; Parise u. Mitarb. 1994).

Diese Zusammenhänge legen nahe, daß der Einfluß der untersuchten Genvariationen zumindest teilweise auf Gen-Gen-Interaktionen beruhen könnte und der in der Einleitung beschriebene Entgiftungsstoffwechsel, dessen einzelne Enzymaktivitäten durch Genpolymorphismen beeinflußt werden, als Erklärung allein nicht ausreicht.
Ähnliche Überlegungen müssen auch für den Einfluß der TNF-Mikrosatelliten-Marker angestellt werden. Sie liegen nicht in transkribierten Genabschnitten und bewirken somit keine direkte Veränderung von Proteinstrukturen. Für einige Allele wurde eine Beeinflussung der Expression von TNFα nachgewiesen (Pocoit u. Mitarb. 1993), dessen Rolle bei der Abwehr des Organismus gegen Tumorzellen seit seiner Entdeckung unumstritten ist (Carswell u. Mitarb. 1975; Larrick u. Mitarb. 1990). Ein Einfluß der TNF-Mikrosatelliten-Polymorphismen auf das Entstehungsrisiko einiger Malignomerkrankungen wurde ebenfalls nachgewiesen (Kolonkarzinome: Campbell u. Mitarb. 1994; Hautbasaliome: Hajeer u. Mitarb. 1997). In der vorliegenden Arbeit zeigten TNF-Allele, die mit einer verstärkten TNFα-Bildung in Verbindung gebracht werden, generell positive Einflüsse.
Nicht alle der identifizierten TNF-Mikrosatelliten-Allele oder Haplotypen konnten aber bisher mit Veränderungen in der Expression von TNFα in Verbindung gebracht werden. Auch ist unklar, ob die verschiedenen Mikrosatelliten-Allele direkt die Expression von TNFα steuern oder mit anderen Genvariationen dieser Region in Verbindung stehen, wie beispielsweise dem TNF2-Promoter-Polymorphismus (McManus u. Mitarb. 1996). In diesem Fall könnten auch sie lediglich einen Marker für eine benachbarte Genvariation darstellen, die das Tumorverhalten beeinflußt.
Kürzlich konnte eine hohe Frequenz von Instabilitäten an den TNF-Mikrosatelliten-Markern beim Vergleich der Stammzell- und Tumorzell-DNA von Kolonkarzinom-Patienten nachgewiesen werden (Honchel u. Mitarb. 1996). Diese Resultate konnten von unserer Arbeitsgruppe in ersten Versuchen bei Kopf-Hals-Karzinomen bestätigt werden. Der Genort der TNF-Mikrosatelliten-Marker auf Chromosom 6p21.3 ist ein im Tumorgewebe häufig von Chromosomenverlusten betroffenes Areal (Field u. Mitarb. 1995a; Honchel u. Mitarb. 1996).

Diese Beobachtungen, sowie das häufige Auftreten von Allelimbalancen (verstärktes Kopieren eines Allels) an diesen Genorten im Tumorgewebe führte zur Postulierung von Tumorsuppressorgenen auf Chromosom 6p (Honchel u. Mitarb. 1996).
Die Mechanismen, die den Zusammenhang von genetischen Konstellationen in der Stammzell-DNA des Wirtsorganismus mit dem Tumorverhalten zu erklären versuchen, bleiben jedoch spekulativ. Alle bisher bekannten Untersuchungen, die vorliegende eingeschlossen, beschreiben dieses Phänomen lediglich, ohne die genauen Mechanismen zu klären. Erstmalig gelang hier jedoch die Identifizierung von Genvariationen im Wirtsorganismus, die das Risiko beeinflussen, einen undifferenzierten Tumor, einen Halslymphknotenbefall oder ein Tumorrezidiv im Kopf-Hals-Bereich zu entwickeln.

7 Schlußfolgerung

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Studie können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden.:

1. Polymorphismen an den Genorten der Glutathion S-Transferasen sowie Genvariationen an TNF-Genorten beeinflussen das Risiko, an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken.
Die genetischen Risikofaktoren unterscheiden sich zwischen Tumoren der unterschiedlichen anatomischen Regionen.

2. Subpopulationen von Patienten, die frühzeitig an einem Kopf-Hals-Karzinom erkranken oder nicht die exogenen Risikofaktoren teilen, weisen eine Häufung von Risiko-vermittelnden Allelen an Genorten der Glutathion S-Transferasen, Cytochrome P450 und im Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) auf.

3. Die untersuchten Genvariationen im Entgiftungsstoffwechsel und in den TNF-Genen beeinflussen nicht nur das Erkrankungsrisiko von Kopf-Hals-Karzinomen, sondern sind auch für den weiteren Krankheitsverlauf von Bedeutung.

4. Die Beeinflussung des Tumorverhaltens (Lymphknoten-Metastasierung, histologischer Differenzierungsgrad, Tumorrezidive, Mehrfachtumoren) durch diese genetisch determinierten Wirtsfaktoren ist bei vielen einzelnen Genotypen und Genotyp-Kombinationen ausgeprägter als ihre Risiko-Vermittlung in der Fall-Kontroll-Studie.

5. Die Mechanismen, welche der Beeinflussung des Tumorverhaltens durch die Genvariationen im Wirtsorganismus zugrunde liegen, bleiben nach den bisherigen Forschungsergebnissen dieser und anderer Studien spekulativ. Der 2-phasige Entgiftungsstoffwechsel reicht als alleinige Erklärung für den nachgewiesenen Einfluß der Cytochrom P450- und Glutathion S-Transferase-Polymorphismen auf die Beeinflussung des Tumorverhaltens nicht aus.

6. Patienten mit Mehrfachtumoren zeigten die ausgeprägteste Anhäufung von Risiko-Genotypen. Vier Genotypen konnten identifiziert werden, mit denen sich aus einem Patientenkollektiv von Kopf-Hals-Tumor-Patienten etwa 1/3 der Patienten identifizieren ließe, die ca. 2/3 aller Zweittumoren entwickeln werden.

7. Eine Weiterführung des hier vorgenommenen Studienansatzes scheint deshalb erfolgversprechend, um mit fortschreitender Identifizierung genetischer Risikofaktoren im Wirtsgenom Genotyp-Kombinationen zu konstruieren, die es ermöglichen, Hochrisiko-Patienten, beispielsweise für die Entwicklung von Tumorrezidiven oder Zweittumoren, frühzeitig zu identifizieren. Die bisher nachgewiesenen Einflüsse reichen aber für eine breite Anwendung in der Klinikroutine noch nicht aus.

8 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, genetische Wirtsfaktoren zu identifizieren, die das Erkrankungsrisiko und den Verlauf von Kopf-Hals-Tumor-Erkrankungen beeinflussen. Dazu wurden an einem Kollektiv von 465 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich sowie einer Kontrollgruppe von 260 Personen mit molekularbiologischen Nachweismethoden Genvariationen in Enzymen analysiert, die Zigarettenrauch-assoziierte Karzinogene metabolisieren. Weiterhin wurden in diesen Studiengruppen Mikrosatelliten-Polymorphismen nahe den Tumor-Nekrose-Faktor-Genen bestimmt.
258 der Kopf-Hals-Tumor-Patienten wurden nach histologisch überprüfter R0-Resektion bis zu 5 Jahre nach Primärtherapie nachbetreut. Diese Gruppe wurde nach einem Einfluß der o.g. Genvariationen auf die initiale Tumorgröße, einen Halslymphknotenbefall zum Zeitpunkt der Diagnosestellung, den histologischen Differenzierungsgrad der Tumoren sowie Tumorrezidive und Zweittumoren untersucht.
Folgende Ergebnisse wurden ermittelt:
1. In der Fall-Kontroll-Studie konnten signifikante Unterschiede in den Genotyp-Frequenzen der Glutathion S-Transferasen GSTM1, GSTM3 und GSTP1 zwischen der Patientengruppe und der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Dem mit 2 funktionsfähigen Allelen einhergehenden Genotyp GSTM1AB konnte ein signifikanter, protektiver Einfluß gegenüber allen Tumorlokalisationen im Kopf-Hals-Bereich zugeschrieben werden. Der GSTM3BB-Genotyp, der durch ein intragenes Motiv für den Transkriptionsfaktor YY1 zu einer verstärkten Expression des kodierten Enzyms führen kann, erwies sich als signifikant protektiv nur gegenüber Larynxkarzinomen. Immunhistochemische Untersuchungen, die das GSTM3-Enzym innerhalb der Epithelien des oberen Aerodigestivtrakts ausschließlich in den Zilien des respiratorischen Epithels des Larynx nachweisen konnten, untermauerten den auf diese Region beschränkten Einfluß. Der Wildtyp des GSTP1-Polymorphismus, dessen Protein nicht über die Enzymaktivität-beeinflussende Mutation nahe der hydrophoben Bindungsstelle verfügt, war bei den Kopf-Hals-Tumor-Patienten seltener vorhanden als bei den Kontrollpersonen. Diesem Genotyp konnte somit ebenfalls ein protektiver Einfluß

zugeschrieben werden, der bei Pharynxkarzinomen ausgeprägter war als bei Larynxkarzinomen. Diese regionalen Unterschiede konnten erneut mit immunhistochemischen Nachweismethoden unterstützt werden. GSTP1 zeigte eine breite Verteilung in allen äußeren Schichten des pharyngealen Plattenepithels; in den Epithelien des Larynx war eine schwächere Anfärbung nachweisbar.

2. Signifikante Unterschiede in den Genotyp-Frequenzen der Cytochrom P450 CYP1A1, CYP2D6 und CYP2E1 zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe konnten nicht ermittelt werden. Eine signifikante Risikobeeinflussung konnte diesen Polymorphismen somit nicht zugeschrieben werden.

3. Unter den Mikrosatelliten-Polymorphismen nahe den Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Genen wurde das TNFB3-Allel signifikant häufiger bei Larynxkarzinom-Patienten verglichen mit Kontrollpersonen oder Mundhöhlen- und Pharynxkarzinom-Patienten nachgewiesen. Diesem Allel konnte somit ein risikovermittelnder Einfluß zugeschrieben werden, der für Homozygotie (dem Vorliegen zweier TNFB3 Genkopien) mit einem Risikofaktor von etwa 5-6 verbunden war. Da andere Arbeitsgruppen bei Personen mit dem TNFB3-Allel eine Beeinflussung der TNFα Expression, eine Verbindung zum HLA-Typ B8 sowie Störungen in der Initiierung von Immunantworten bei PCP, Zöliakie und dem systemischen Lupus erythematodes bereits beschrieben haben, kann auch in der Pathogenese des Larynxkarzinoms eine Störung in der Immunantwort auf dysplastische Zellen und Tumorzellen vermutet werden.

4. Eine signifikante Interaktion in der Risikovermittlung konnte für das gleichzeitige Vorliegen des TNFB3-Allels und des CYP1A1 m2-Wildtyps nachgewiesen werden. Personen mit dieser Genotyp-Kombination zeigten einen stärkeren Effekt auf die Risikobeeinflussung als jeder der Einzelfaktoren. Da bekannt ist, daß CYP-Enzyme durch TNFα induziert werden können, läßt sich vermuten, daß bei diesen Patienten neben Störungen in der Immunregulation eine Beeinflussung der Expression von CYP1A1 vorliegt.

5. Verschiedene Altersgruppen der Patienten wiesen teilweise erhebliche Unterschiede in den Genotyp- bzw. Allel-Frequenzen auf. Bei Patienten, die bereits um das 50. Lebensjahr an einem Kopf-Hals-Karzinom erkrankten, waren ausgeprägtere Genvariationen nachweisbar

(GSTM1AB, TNFD3), während bei Patienten in fortgeschrittenem Alter die für das Gesamtkollektiv ermittelten Risikofaktoren zunehmend unbedeutender wurden.

6. Patienten, die wenig oder nicht rauchten und keinen Alkohol tranken, wiesen signifikante Unterschiede in den TNF-Mikrosatelliten-Allelen auf, welche ebenfalls mit Regulationsstörungen von TNFα in Verbindung gebracht wurden. Bei Patienten mit geringem Genußmittelkonsum waren TNF-Allele signifikant häufiger nachweisbar, die von anderen Arbeitsgruppen bereits als Risikofaktor für die Entwicklung von Kolonkarzinomen beschrieben wurden.

7. Bei dem Vergleich der Patienten-Genotypen mit den Tumorcharakteristika zeigte sich eine signifikante Beeinflussung des histologischen Differenzierungsgrads. Patienten mit undifferenzierten Tumoren wiesen gehäuft das defekte GSTT1-Gen auf. Im Gegensatz dazu konnte das TNFD6-Allel signifikant häufiger bei Patienten mit gut differenzierten Tumoren nachgewiesen werden. Der Genotyp GSTM1B war signifikant häufiger mit einem positiven Halslymphknotenbefall assoziiert. Synergistische Effekte für die Prädisposition, undifferenzierte Tumoren zu entwickeln, konnte den Genotyp-Kombinationen GSTT10 / GSTM3AA und CYP1A1 m2-Wildtyp / TNFB4 zugeschrieben werden. Ein vergleichbarer Zusammenhang bestand zwischen der Genotyp-Kombination CYP2D6PM / GSTM3AA und dem Nachweis von Halslymphknoten-Metastasen.

8. Das Auftreten von Tumorrezidiven war bei gleichzeitigem Nachweis des TNFB1- und TNFD5-Allels (B1D5-Haplotyp) signifikant erhöht. Der Einfluß war bei Patienten mit Mundhöhlen /Pharynxkarzinomen ausgeprägter als bei Patienten mit Larynxkarzinomen. Dieser Haplotyp konnte bereits mit einer gestörten Immunantwort in Verbindung gebracht werden und ist gehäuft bei Patienten mit PCP nachweisbar.

9. Die ausgeprägtesten Genvariationen lagen bei den Patienten vor, die einen Zweittumor im Kopf-Hals-Bereich entwickelten. Alle bisher identifizierten Risikogenotypen (GSTT1 0, GSTM3AA, CYP1A1 m2-Wildtyp, TNFB3) traten in dieser Subpopulation vermehrt auf. Trotz der geringen Patientenzahl von 39 konnten diesen Genvariationen signifikante Unterschiede in den Allel-/Genotyp-Frequenzen mit Risikofaktoren zwischen 2,5 und 5 zugeordnet werden. Die Häufung von Risiko-Genotypen bei Patienten mit Mehrfachtumoren

kann als Bestätigung für den Einfluß dieser Genvariationen an einem zweiten Kollektiv angesehen werden und untermauert damit deren Bedeutung. Auch ließe sich nach Bestätigung der Genotyp-Frequenzen an einem größeren Kollektiv von Patienten mit Mehrfachtumoren ein mehrstufiges Risikomodell entwickeln, welches es ermöglichen würde, aus einem Kollektiv von Kopf-Hals-Tumor-Patienten etwa 1/3 der Patienten zu identifizieren, die ca. 2/3 der Zweittumoren entwickeln werden.

In der Fall-Kontroll-Studie wurde eine Risikobeeinflussung von Genvariationen an GSTM1-, M3- und P1-Genorten, die mit Veränderungen im Stoffwechsel von Karzinogenen einhergehen, erstmalig in einer Studie an Kopf-Hals-Karzinomen systematisch untersucht. Obwohl die Bedeutung des Konfliktes zwischen Wirtsorganismus einerseits und dysplastischer Zelle und Tumorzelle andererseits unumstritten ist, liegen bisher wenige Untersuchungen über genetisch determinierte Veränderungen im Immunsystem von Tumorpatienten vor. Die Typisierung der TNF-Mikrosatelliten-Allele wurde zunächst in der immunologischen Forschung angewandt. Erst in letzter Zeit wurden die dort erhaltenen Erkenntnisse auf Tumorpatienten übertragen, beispielsweise mit Kolonkarzinomen und Hautbasaliomen. In der vorliegenden Arbeit ist erstmalig der Nachweis erbracht, daß TNF-Genvariationen bei Kopf-Hals-Tumoren alleine und in Kombination mit CYP1A1-Genotypen einen risikovermittelnden Einfluß haben.

Von verschiedenen Autoren wurde bereits vermutet, daß die Tumorentstehung bei besonders jungen Patienten, wie auch bei Patienten, die nicht den intensiven Konsum an exogenen Genußgiften teilen, von genetischen Risikofaktoren bestimmt wird. In beiden Untergruppen konnten signifikant gehäuft TNF-Allele nachgewiesen werden, die mit Störungen in der Initiierung von Immunantworten und einer verminderten Fähigkeit, TNFα zu bilden, in Verbindung gebracht werden. Im Gegensatz dazu konnte bestätigt werden, daß Kopf-Hals-Tumoren mit zunehmendem Alter und zunehmendem Genußmittelkonsum unabhängig von den hier bestimmten genetischen Wirtsfaktoren entstehen.

Darüber hinaus konnten sowohl den Polymorphismen an den GST- und CYP-Genorten, wie auch den TNF-Mikrosatelliten Einflüsse auf das Tumorverhalten und den weiteren Krankheitsverlauf zugeschrieben werden. Eine Beeinflussung des histologischen

Differenzierungsgrads, ferner eines zervikalen Lymphknotenbefalls wie auch das Auftreten von Tumorrezidiven nach R0-Resektionen sowie die Prädisposition einen Zweittumor zu entwickeln, konnte den untersuchten Genvariationen zugeschrieben werden. Die Bedeutung, welche diese Polymorphismen im weiteren Krankheitsverlauf haben, scheint ihre traditionelle Rolle als risikovermittelnde Genvariationen in Fall-Kontroll-Studien zu übertreffen. Nach den hier vorliegenden Ergebnissen muß kritisch in Frage gestellt werden, ob der Mechanismus, durch den die GST- und CYP-Polymorphismen das Tumorverhalten beeinflussen, allein auf ihrer Beeinflussung des Entgiftungsstoffwechsels beruht. Mit veränderten Enzymaktivitäten allein läßt sich kaum erklären, weshalb die GSTT1-, CYP2D6- und CPY1A1-Polymorphismen keinen signifikanten Einfluß auf die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren hatten, der durch die Beeinflussung des Abbaus von Zigarettenrauch-assoziierten Karzinogenen zu erwarten wäre. Hingegen ließ sich eine Beeinflussung des histologischen Differenzierungsgrads (GSTT1, CYP1A1 m2-Mutation) des Auftretens von Halslymphknoten-Metastasen (CYP2D6) sowie eine Häufung von Mehrfachtumoren (GSTT1, CYP1A1 m2-Mutation) nachweisen.

Von verschiedenen Autoren wurde bereits vermutet, daß die Polymorphismen in den detoxifizierenden Enzymen nicht nur einen Einfluß auf den Stoffwechsel von Karzinogenen aus dem Zigarettenrauch haben. Ihr Einfluß auf das Tumorverhalten und den Krankheitsverlauf läßt sich eher durch eine Beeinflussung von Mutationshäufigkeiten in Onkogenen (z.B. in Ki-ras und p53 durch CYP2D6-Genotypen) oder einer Beeinflussung der Zelldifferenzierung (GSTP1, CYP-Genorte) erklären. Eine weitere, bereits diskutierte Möglichkeit wäre, daß diese Polymorphismen mit anderen Genen, z.B. Tumorsuppressorgenen, auf benachbarten Chromosomenabschnitten in Verbindung stehen. Sie würden somit Marker für andere funktionell relevante Genvariationen darstellen. Interessanterweise liegen alle Genpolymorphismen, für die ein Einfluß auf das Tumorverhalten und den weiteren Krankheitsverlauf nachgewiesen werden konnte, auf Chromosomenabschnitten, die im Tumorgewebe häufig von DNA-Verlusten betroffen sind und auf denen Tumorsuppressorgene vermutet werden. So könnte der Einfluß der TNF-Marker auf einer Beeinflussung des TNF2-Promotors nahe TNF oder eines vermuteten

Tumorsuppressorgens auf Chromosom 6p beruhen. Tumorsuppressorgene werden weiterhin auf Chromosom 22q13 (nahe CYP2D6 und GSTT1) sowie auf dem Chromosomenabschnitt 11q13 (nahe GSTP1) vermutet.

Der Stellenwert dieser Arbeit ist zunächst darin zu sehen, daß die bereits von mehreren Autoren vermuteten endogenen Faktoren, die sowohl die Empfänglichkeit gegenüber Kopf-Hals-Tumoren als auch den Verlauf der Erkrankung beeinflussen, mit Genvariationen an Genorten der GST , CYP und nahe den TNF-Genen in Verbindung gebracht werden konnten. Die multifaktorielle Genese der Kopf-Hals-Karzinome gilt heute als gesichert. Exogene Faktoren spielen bei der Entwicklung der Tumoren sicherlich die entscheidende Rolle. Der Einfluß, den genetische Faktoren insbesondere im weiteren Krankheitsverlauf haben, läßt sich nach den vorliegenden Untersuchungen nur abschätzen. Da diese Untersuchungen nur teilweise in der Routine durchgeführt werden könnten (CYP- und GST-Genotypen), andere Untersuchungen aber aufwendigere Methoden erfordern (Identifizierung der TNF-Marker nach Fluoreszensmarkierung im Gensequenzierer), läßt sich zum jetzigen Zeitpunkt ein Einsatz in der Klinikroutine noch nicht propagieren. Die ermittelten Risikofaktoren einzelner Genpolymorphismen überschreiten selten Werte von 3-4. Risikofaktoren zwischen 5 und 10 konnten nur für Homozygotie des TNFB3-Markers, Genotyp-Kombinationen (beispielsweise TNFB3 / CYP1A1 m2-Wildtyp) oder in einzelnen Subpopulationen ermittelt werden.

Von Epidemiologen werden Risikofaktoren von 20 und mehr gefordert, um Tests für den Einsatz in der Klinikroutine zu empfehlen. Diese Werte sind bisher nicht erreicht worden.

Die vorliegende Arbeit zeigt aber auf, daß das Potential dieser Art von molekulargenetischen Untersuchungen in der Identifizierung von Risiko-vermittelnden Genotyp-Kombinationen liegt. Deren Routinebestimmung könnte bereits in naher Zukunft sinnvoll werden, um Patienten, die ein hohes Risiko haben, beispielsweise ein Rezidiv oder einen Zweittumor zu entwickeln, engmaschiger nachzukontrollieren und früher identifizieren zu können, um damit ihre schlechte Prognose zu verbessern.

9 Literatur

Ali-Osman, F., Akande, O.A., Antoun, G., Mao, J., Buolamwin, J.: Molecular cloning, characterisation and expression in Escherichia coli of full-length cDNAs of three novel functionally different human glutathione S-transferase Pi 1 gene variants. J. Biol. Chem. 5272: 10004-10012, 1997.

Ambrosone, C.B., Freudenheim, J.L., Graham, S., Marshall, J.R., Vena, J.E., Brasure, J.R., Laughlin, R., Nemoto, T., Michalek, A.M., Harrington, A., Ford, T.D., Shields, P.G.: Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase (M1) genetic polymorphisms and postmenopausal cancer risk. Cancer Res. 55: 3483-3485, 1995.

Anttila, S., Luostarinen, L., Hirvonen, A., Elovaara, E., Karjalainen, A., Nurminen, T., Hayes, J.D., Vainio, H., Ketterer, B.: Pulmonary expression of glutathione S-transferase M3 in lung cancer patients: association with GSTM1 polymorphism, smoking and asbestos exposure. Cancer Res. 55: 3305-3309, 1995.

Bedi, G.C., Westra, W.H., Gabrielson, E., Koch, W., Sidransky, D.: Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. Cancer Res. 56: 2484-2487, 1996.

Blitzer, P.H.: Epidemiology of head and neck cancer. Semin. Oncol. 15: 2-9, 1988.

Blot, W.J., McLaughlin, J.K., Winn, D.M.: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. Cancer Res. 48: 3282-3287, 1988.

Board, P.G.: Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. Am. J. Hum. Genet. 33: 36-43, 1981.

Bockmühl, U., Schwendel, A., Dietel, M., Petersen, I.: Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. Cancer Res. 56(23): 5325-9, 1996.

Bockmühl, U., Petersen, S., Schmidt, S., Petersen, I., Dietel, M.: Patterns of chromosomal alterations in metastasizing and non-metastasizing primary head and neck carcinomas. Cancer Res. 57(23): 5213-6, 1997.

Bongers, V., Snow, G.B., de Vries, N., Cattan, A.R., Hall, A.G., van der Waal, I., Braakhuis, B.J.M.: Second primary head and neck squamous cell carcinoma predicted by the glutathione S-transferase expression in healthy tissue in the direct vicinity of the first tumor. Lab. Investig. 73(4): 503-10, 1995.

Bongers, V., Braakhuis, B.J.M., Tobi, H., Lubsen, H., Snow, G.B.: The relation between cancer incidence among relatives and the occurrence of multiple primary carcinomas following head and neck cancer. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 5 (8): 595-598, 1996.

Boring, C.C., Squires, T.S., Tong, T., Montgomery, S.: Cancer statistics 1994. CA Cancer J. Clin. 44: 7-26, 1994.

Brockmöller, J., Kerb, R., Drakoulis, N., Nitz, M., Roots, I.: Genotype and phenotype of glutathione S-transferase class μ isoenzymes μ and ψ in lung cancer patients and controls. Cancer Res. 53: 1004-1011, 1993.

Brockmöller, J., Kerb, R., Drakoulis, N., Staffeldt, B., Roots, I.: Glutathione S-transferase M1 and its variants A and B as host factors of bladder cancer susceptibility: a case-control study. Cancer Res. 54: 4103- 4111, 1994.

Brockmöller, J., Kaiser, R., Kerb, R., Cascorbi, I., Jaeger, V., Roots, I.: Polymorphic enzymes of xenobiotic metabolism as modulators of acquired p53 mutations in bladder cancer. Pharmacogenetics 6(6): 535-45, 1996a.

Brockmöller, J., Cascorbi, I., Kerb, R., Roots, I.: Combined analysis of inherited polymorphisms in arylamine N-acetyltransferase 2, glutathione S-transferase M1 an T1, microsomal epoxide hydrolase, and cytochrome P450 enzymes as modulators of bladder cancer risk. Cancer Res. 56: 3915-3925,1996b.

Brugere, J., Guenel, P., Leclerc, A., Rodriguez, J.: Differential effects of tobacco and alcohol in cancer of the larynx, pharynx and mouth. Cancer 57: 391-395, 1986.

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

Campbell, D.A., Field, M., McArdle, C.S., Cooke, T.G., Gallagher, G.: Polymorphism at the tumor necrosis factor locus: a marker of genetic predisposition to colorectal cancer? Lancet 343: 293-294, 1994.

Carroll, M.C., Katzman, P., Alicot, E.M.: Linkage or resistance to lysis by alloreactive natural killer cells is governed by a gene in the human major histocompatibility complex between BF and HLA-B. Proc. Natl. Acad. Sci. 87: 9794-9799, 1990.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L.: An endotoxin serum factor that causes necrosis of tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 3666-3670, 1975.

Cascorbi, I., Brockmöller, J., Roots, I.: A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1; population frequency, mutation linkages and impact on lung cancer susceptibility. Cancer Res. 56: 4965-4969, 1996.

Chasseaud, L.F.: The role of glutathione and glutathione S-transferase in the metabolism of chemical carcinogens and other electrophilic agents. Adv. Cancer Res. 29: 175-274, 1979.

Chouaib, S., Asselin-Paturel, C., Mami-Chouaib, F., Caignard, A., Blay, J.Y.: The host-immune conflict: from immunosuppression to resistence and destruction. Immunol. Today 18,10: 493-497, 1997.

Clark, R.M., Rosen, I.B., Laperriere, N.J.: Malignant tumors of the head and neck in a young population. Am. J. Surg. 144: 459-462, 1982.

Coggan, M.,Whitbread, L., Whittington, A., Board, P.: Structure and organization of the human theta-class glutathione S-transferase and D-dopachrome tautomerase gene complex. Biochem. J. 334: 617-623, 1998.

Copper, M.P., Jovanovic, A., Nauta, J.J.P., Braakhuis, B.J.M., DeVries, N., van der Waal, I., Snow, G.B.: Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch. Otolarynogol. 121: 157-160, 1995.

Coutelle, C., Ward, P.J., Fleury, B., Quattrocchi, P., Chambrin, H., Iron, A., Couzigou, P., Cassaigne, A.: Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms. Hum. Genet. 99(3): 319-325, 1997.

Crouau-Roy, B., Briant, L., Bouissou, C., Stavropoulos, C., Pociot, F., Cambon-Thomsen, A., Clayton, J.: Tumor necrosis factor microsatellites in four European populations. Hum. Immunol. 38: 213-216, 1993.

De Vries, N., Snow, G.B.: Multiple primary tumors in laryngeal cancer. J. Laryngol. Otol. 100: 915-918, 1986.

DeVries, N., Drexhage, H.H., van de Waal, L.P.: Human leukocyte antigens and immunoglobulin allotypes in head and neck cancer patients with and without multiple primary tumors. Cancer 60: 957-961, 1987.

Dhooge, I., J., de Vos, M., van Cauwenberge, P.B.: Multiple primary malignant tumors in patients with head and neck cancer: results of a prospective study and future perspectives. Laryngoskope 108: 250-256, 1998.

Drakoulis, N., Cascorbi, I., Brockmöller, J., Gross, C.R., Roots, I.: Polymorphisms in the human CYP1A1 gene as susceptibility factors for lung cancer: exon-7 mutation (4889 A to G), and a T to C mutation in the 3`-flanking region. Clin. Investig. 72: 240-248, 1994.

Eigler, A., Sinha, B., Hartmann, G., Endres, S.: Taming TNF: strategies to restrain this proinflammatory cytocine. Immunol. Today 18,(10): 487-492, 1997.

Elexpuru-Camiruaga, J., Buxton, N., Kandula, V., Dias, V.S., Campbell, D., McIntosh, J., Broome, J., Jones, P., Inskip, A., Alldersea, J., Fryer, A.A., Strange, R.C.: Susceptibility to astrocytoma and meningioma: Influence of allelism at glutathione S-transferase, GSTT1 and GSTM1 and cytochrome P450, CYP2D6 loci. Cancer Res. 55: 4237-4239, 1995.

Elwood, J.M., Pearson, J.C.G., Skippen, D.H., Jackson, S.M.: Alcohol, smoking, social and occupational factors in the etiology of cancer of the oral cavity, pharynx and larynx. Int. J. Cancer 34: 603-612, 1984.

Evans, P.R.: Tumors of the oropharynx and lymphomas of the head and neck. In: Hibbert, J. (Hrsg.) Scott-Brown´s Otolaryngology (Bd 5) Laryngology and head and neck surgery. (6. Aufl.) Oxford, Boston, Johannesburg, Melbourne New Dehi Singapore, Butterworth-Heinemann: 14.1-14.18, 1997.

Field, J.K., Kiaris, H., Howard, P., Vaughan, E.D., Spandidos, D.A., Jones, A.S.: Microsatellite instability in squamous cell carcinoma of the head and neck. Br. J. Cancer 71: 1065-1069, 1995a.

Field, J.K., Kiaris, H., Risk, J.M., Tsiriyotis, C., Adamson, R., Zoumpourlis, V., Rowley, H., Taylor, K., Whittaker, J., Howard, P., Beirne, J.C., Gosney, J.R., Woolgar, J., Vaughan, E.D., Spandidos, D.A., Jones, A.S: Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. Br. J. Cancer 72: 1180-1188, 1995b.

Flanagan, J.R.: Autologous stimulation of YY1 transcription factor expression- role of an insulin-like growth-factor. Cell Growth Differ. 6: 85-190, 1995.

Friedman, K.J., Highsmith, W.E., Silverman, L. M.: Detecting multiple cystic fibrosis mutations by polymerase chain reaction-mediated site-directed mutagenesis. Clin. Chem. 37/5: 753-755, 1991.

Fryer, A.A, Zhao, L., Alldersea, J., Pearson, W. R., Strange, R.C.: Use of site directed mutagenesis of allele-specific PCR primers to identify the GSTM1 A, GSTM1 B, GSTM1 AB and GSTM1 null polymorphisms at the glutathione S-transferase, GSTM1 locus. Biochem. J. 295: 313-315, 1993.

Fugger, L., Morling, N., Ryder, L.P.: NCO restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the tumor necrosis factor (TNF-α) region in four autoimmune diseases. Tissue Antigens 34: 17-21, 1989.

Goldstein, J.A., Faletto, M.B.: Advances in mechanisms of activation and deactivation of environmental chemicals. Environ. Health Perspect. 100: 169-76, 1993.

Gonzales, F.J., Gelboin, H.V.: Role of human cytochrome P450s in risk assessment and susceptibility environmentally based disease. J. Toxicol. Environ. Health 40(2-3): 289-308, 1993a.

Gonzales, F.J., Liu, S.Y., Yano, M.: Regulation of cytochrome P450 genes: molecular mechanisms. Pharmacogenetics 3: 51-57, 1993b.

Gonzalez, M.V., Alvarez, V., Pello, M.F., Menendez, M.J., Suarez, C., Coto, E.: Genetic polymorphism of N-acetyltransferase-2, glutathione S-transferase M1, and cytochromes P450 2E1 and P450 2D6 in the susceptibility to head and neck cancer. J. Clin. Pathol. 51(4): 294-298, 1998.

Goto, I., Yoneda, S., Yamamoto, M. and Kawajiri, K.: Prognostic significance of germ line polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes in patients with non-small cell lung cancer. Cancer Res. 56: 3725-3730, 1996.

Guengerich, P.F.: Cytochromes P450 of human liver. Classification and activity profiles of the major enzymes. In: Pacifici, G.M., Fraccia, G.N. (Hrsg.) Advances in drug metabolism in man. European Comission, Directorate General Science, Research and Development: 181-195, 1995.

Hajeer, A.H., Worthington, J., Silman, A.J., Ollier,W.R.: Association of tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms with HLA-DRB1*04-bearing haplotypes in rheumatoid arthritis patients. Arthritis Rheum. 39: 1109-1114, 1996.

Hajeer, A.H., Worthington, J., Davies, E.J., Hillarby, M.C., Poulton, K., Ollier, W.R.: TNF microsatellite a2, b3 and d2 alleles are associated with systemic lupus erythematosus. Tissue Antigens 49: 222-227, 1997.

Hajeer, A.H., Lear, J.T., Ollier, W.R., Naves, M., Worthington, J., Bell, D.A., Smith, A., Bowers, B., Jones, P.W., Strange, R.C., Fryer, A.A.: Tumor necrosis factor microsatellite polymorphisms and skin type identify individuals at high risk of multiple cutaneous basal cell carcinomas. Carcinogenesis (im Druck).

Harries, L.W., Stubbins, M.J., Forman, D., Howard, G.C.W., Wolf, C.R.: Identification of genetic polymorphism at the GSTP1 locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer. Carcinogenesis 18: 1221-1226, 1997.

Harris, C.C.: Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. Cancer Res. 51: 5023-5044, 1991.

Hart, T.C.: Applications of molecular epidemiology to head and neck cancer. Otolaryngol. Clin. North Am. 30,1: 21-34, 1997.

Harty L.C., Caporaso, N.E., Hayes, R.B., Winn, D.M., Bravo-Otero, E., Blot, W.J., Kleinmann, D.V., Brown, L.M., Armenian, H.K., Frauneni, J.F., Shields, P.G.: Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancer. J. Natl. Cancer Inst. 89: 1698-705, 1997.

Hayes, J.D.: Purification and characterisation of a polymorphic Yb-containing glutathione-S-transferase, GST U from human liver. Clin. Chem. Enzym. Commun. 1: 245-264, 1989.

Hayes, J.D., Strange, R.C.: Contribution of the glutathione S-transferase supergene familiy to resistance to oxidative stress. Free Rad. Res. 22: 193-207, 1995.

Heagerty, A., Smith, A., English, J., Lear, J., Perkins, W., Bowers, B., Jones, P., Gilford, J., Alldersea, J., Fryer, A.A., Strange, R.C.: Susceptibility to multiple cutaneous basal cell carcinomas: significant interactions between glutathione S-transferase GSTM1 genotypes, skin type and male gender. Br. J. Cancer 73: 44-48, 1996.

Henning, S., Cascorbi, I., Münchow, B., Jahnke, V., Roots, I.: Association of N-acetyltransferases NAT-1 and NAT-2 genotypes to laryngeal cancer risk. Pharmacogenetics 9: 103-111, 1999.

Hermanek, P., Sobin, L.H. (Hrsg.): TNM Classification of malignant tumors. (4.Aufl.) , UICC Union Internationale Contre le Cancer, Springer-Verlag, Berlin, 1987.

Hirvonen, A., Husgafvel-Pursianen, K., Karjalainen, A., Anttila, S., Vainio, H.: Point-mutational Msp1 and Ile-Val polymorphisms closely linked in the CYP1A1 gene: lack of association with susceptibility to lung cancer in a Finnish study population, Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 1: 485-489, 1992.

Hirvonen, A., Husgafvel-Pursiainen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H.: The human CYP2E1 gene and lung cancer: Dra1 and Rsa1 restriction length polymorphisms in a Finnish study population. Carcinogenesis 14: 85-88, 1993.

Hodgson, E., Dauterman,W.C.: Introduction to biochemical toxicology. In: Biochemical toxicology, Hodgson, E, Guthrie, F.E.(Hrsg). London, Bakewell Scientific Publication: 4-10, 1980.

Honchel, R., McDonnell, S., Schaid, D.J., Thibodeau, S.N.: Tumor necrosis factor-α allelic frequency and chromosome 6 allelic imbalance in patients with colorectal cancer. Cancer Res. 56: 145-149, 1996.

Hong, W.K., Lippmann, S.C., Itri, L., Karp, D., Lee, J.S., Byers, R.M., Schantz, S.P., Kramer, A.M., Lotan, R., Peters, L.J., Dimery, I.W., Brown, B.W., Goepfert, M.: Prevention of second primary tumors with isoretinoin in squamous cell carcinoma of the head and neck. N. Engl. J. Med. 323: 795-801, 1990.

Hung, H.C., Chuang, J., Chien, Y.C., Chem, H.D., Chiang, C.P., Kuo, Y.S., Hildesheim, A., Chen, C.J.: Genetic polymorphisms of CYP2E1, GSTM1, and GSTT1; environmental factors and risk of oral cancer. Cancer Epidemol. Biomarkers Prev. 6(11): 901-905, 1997.

Ingelman-Sundberg, M., Johansson, I., Persson, I., Yue, Q.Y., Dahl M.L., Bertilsson L., Sjoqvist, F.: Genetic polymorphism of cytochrome P450: interethnic differences and relationship to incidence of lung cancer. Pharmacogenetics 2(6): 264-71, 1992.

Inskip, A., Elexperu-Camiruaga, J., Buxton, N., Dias, P.S., MacIntosh, J., Campbell, D., Jones, P.W., Yengi, L., Talbot, A., Strange, R.C., Fryer, A.A.: Identification of polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: evidence for linkage with GSTM1*A. Biochem. J. 312: 713-716, 1995.

Islam, M.Q., Platz, A., Szpirer, J., Szpirer, C., Levan, G., Mannervik, B.: Chromosomal localization of human glutathione transferase genes of classes alpha, mu, and pi. Hum. Genet. 82: 338-342, 1989.

Issing, W.J., Wustrow, T.P.U., Heppt, W.: Onkogene und ihre Bedeutung für Kopf- und Halskarzinome. HNO 40: 283-291, 1992.

Jakoby, W.B.: The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. Adv. Enzymol. 46: 383-413, 1978.

Jahnke, V. Bösartige Tumoren des Larynx. In: Naumann, H.H., Helms, J., Herberhold, C., Kastenbauer, E. (Hrsg.) Oto-Rhino-Laryngologie in Klinik und Praxis, Band 3, Hals, Stuttgart, New York, Georg Thieme Verlag: 388-421, 1995a.

Jahnke, V., Strange, R.C., Matthias, C., Fryer, A.A.: Erste Ergebnisse über Glutathion-S-Transferase GSTM1 und GSTT1 Genotypen und die genetische Prädisposition beim Larynxkarzinom. Laryngol. Rhinol. Otol. 74: 691-694, 1995b.

Jahnke, V., Matthias, C., Fryer, A.A., Strange, R.C.: Glutathione-S-transferase and cytochrome P450 polymorphism as risk factors for squamous cell carcinoma of the larynx. Am. J. Surg. 172: 671-673, 1996.

Janot, F., Klijanienko, J., Russo, A., Mamet, J.P., de Braud, F., El-Naggar, A.K., Pignon, J.P., Luboinski, B., Cvitkovic, E.: Prognostic value of clinicopathological parameters in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective analysis. Br. J. Cancer 73: 531-538, 1996.

Jones, A.S., Morar, P., Phillips, D.E., Field, J.K., Husband, D., Helliwell, T.R., Path, M.C.R.: Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. Cancer 75: 1343-1353, 1995.

Jovanovic, A., van der Tol, I.G.H., Kostense, P.J., Schulten, E.A.J.M., De Vries, N., Snow, G.B., van der Waal, I.: Second respiratory and upper digestive tract cancer following oral squamous cell carcinoma. Eur. J. Cancer 30B: 225-229, 1994.

Jourenkova, N., Reinikainen, M., Bouchardy, C., Dayer, P., Benhamou, S., Hirvonen, A.: Larynx cancer risk in relation to glutathione S-transferase M1 and T1 genotypes and tobacco smoking. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7(1): 19-23, 1998.

Kato, S., Shields, P.G., Caporaso, N.E., Hoover, R.N., Trump, B.F., Sugimura, H., Weston, A., Harris, C.C.: Cytochrome P450IIE1 genetic polymorphisms, racial variation and lung cancer risk. Cancer Res. 52: 6712-6715, 1992.

Knippers, R.: Untersuchungen an komplexen Genen: Gene des Menschen. In: Knippers (Hrsg.) Molekulare Genetik. 7.Aufl., Stuttgart, NewYork, Georg Thieme Verlag: 420-467, 1997.

Kawajiri, K., Nakachi, K., Imai, K., Watanabe, J., Hayashi, S.I.: The CYP1A1 gene and cancer susceptibility. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 14: 77-87, 1993.

Kawajiri, K., Eguchi, H., Nakachi, K., Sekija, T., Yamamoto, M.: Association of CYP1A1 germ line polymorphisms with mutations of the p53 gene in lung cancer. Cancer Res. 56: 72-76, 1996.

Ketterer, B., Meyer, D.J., Taylor, J.B., Pemble, S., Coles, B., Fraser, G.: GSTs and protection against oxidative stress. In: Hayes, J.D, Pickett, C.B, Mantle, T.J. (Hrsg.) Glutathione S-transferases and drug resistance. London, Taylor and Francis: 97-112, 1990.

Kihara, M., Noda, K.: Risk of smoking for squamous and small cell carcinomas of the lung modulated by combinations of CYP1A1 and GSTM1 gene polymorphisms in a Japanese population. Carcinogenesis 16: 2331-2336, 1995.

Knerer, B., Hulla, W., Martinek, H.: IL-1 and TNF-α but no IL-2 expression is found in squamous cell carcinomas of the head and neck by RT-PCR. Acta Otolaryngol (Stockh) 116: 132-136, 1996.

Koufman, J.A., Burke, A.J.: The etiology and pathogenesis of laryngeal carcinoma. Otolaryngol. Clin. North. Am. 30,1: 1-19, 1997.

LaBella, F.S.: Cytochrome P450 enzymes: ubiquitous receptors for drugs. Can. J. Physiol. Pharmacol. 69(8): 1129-32, 1991.

Lafuente, A., Maristany, M., Arias, C., Cuchi, A., Lafuente, M.J., Molina, R., Ballesta, A., Trasserra, J.: Glutathione and glutathione S-transferases in human squamous cell carcinomas of the larynx and GSTM1 dependent risk. Anticancer Res. 18(1A): 107-111, 1998.

Larrick, J.W., Wright, S.C.: Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor-α. Faseb J. 4: 3215-3218, 1990.

Lazarus, P., Sheikh, S.N., Ren, Q., Schantz, S.P., Stern, J.C., Richie, J.P., Park, J.Y.: p53, but not p16 mutations in oral squamous cell carcinomas are associated with specific CYP1A1 and GSTM1 polymorphic genotypes and patient tobacco use. Carcinogenesis 19(3): 509-514, 1998.

Lin, D.X., Tand, Y.M., Peng, Q., Lu, S.X., Ambrosone, C.B., Kadlubar, F.F.: Susceptibility to esophageal cancer and genetic polymorphisms in glutathione S-transferase T1, P1, and M1 and cytochrome P450 2E1. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 7(11): 1013-1018, 1998.

Magnano, M., Bussi, M., de Stefani, A., Milan, F., Lerda, W., Ferrero, V., Gervasio, F., Ragona, R., Gabriele, P., Valente, G., Cortesina, G.: Prognostic factors for head and neck tumor recurrence. Acta Otolaryngol. (Stockh) 115: 833-838, 1995.

Maier, H., Gewelke, U., Dietz, A.: Risk factors for cancer of the larynx: results of the Heidelberg case-control study. Otolaryngol. Head Neck Surg. 107: 577-582, 1992.

Maier, H., Zoller, J., Herrmann, A., Kreiss, M., Heller, W.D.: Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. Otolaryngol. Head Neck Surg. 108(6): 655-61, 1993.

Maier, H., Tisch, M., Enderle, G., Dietz, A., Weidauer, H.: Berufliche Exposition gegenüber Farben, Lacken und Lösungsmitteln und Krebsrisiko im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes. HNO 45(11): 905-8, 1997.

Mannervik, B.: The isoenzymes of glutathione transferases. Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 57: 357-417, 1985.

Mannervik, B., Awasthi, Y.C., Board, P.G., Hayes, J.D., Di Ilio, C., Ketterer, B., Listowsky, I., Morgenstein, R., Muramatsu, M., Pearson, W.R., Pickett, C.B., Sato, K., Widersten, M., Wolf, C.R.: Nomenclature for human glutathione transferases. Biochem. J. 282: 305-306, 1992.

Mannervik, B., Widersten, M.: Human glutathione transferases: classification, tissue distribution, structure, and functional properties. In: Advances in drug metabolism in man. Pacifici, R., Fracchia, G.N. (Hrsg.) Commission of the European Communities, Luxemburg, 63-72, 1995.

Masimirembwa, C., Bertilsson, L., Johansson, I., Hasler, J.A., Ingelman-Sundberg, M.: Phenotyping and genotyping of S-mephenytoin hydroxylase (cytochrome P450 2C19) in a Shona population of Zimbabwe. Clin. Pharmacol. 57, 6: 656-661, 1995.

Matthias, C., Bockmühl, U., Jahnke, V., Jones, P.W., Hayes, J., Alldersea, J., Gilford, J., Bailey, L., Bath, J., Worrall, S.F., Hand, P., Fryer, A.A., Strange, R.C.: Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione-S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. Pharmacogenetics 8: 91-100, 1998a.

Matthias, C., Jahnke, V., Fryer, A.A., Strange, R.C., Ollier, W., Hajeer, A.: Influence of tumour-necrosis-factor microsatellite polymorphisms on susceptibility to head and neck cancer. Acta Otolaryngol. (Stockh) 118: 284-288, 1998b.

Matthias, C., Branigan, K., Jahnke, V., Leder, K., Haas, J., Heighway, J., Jones, P.W., Strange, R.C., Fryer, A., Hoban, P.R.: Polymorphism within the cyclin D1 gene is associated with prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin. Cancer Res. 4: 2411-2418, 1998c.

McManus, R. , Moloney, M., Borton, M., Finch, A., Chuan, Y.T., Lawlor, E., Weir, D.G., Kelleher, D.: Association of celiac disease with microsatellite polymorphisms close to tumor necrosis factor genes. Hum. Immunol. 45: 24-31, 1996.

Michalides, R., van Veelen, N., Hart, A., Loftus, B., Wientjens, E., Balm, A.: Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. Cancer Res. 55: 975-978, 1995.

Monos, D.S., Kamoun, M., Udalova, I.A., Csanky, E., Cizman, B., Turetskaya, R.L., Smirnova, J.B., Zharkov, V.G., Gasser, D., Zmijewski, C.M., Spielman, R.S., Nedospasov, S.A. Genetic polymorphism of the human tumor necrosis factor region in insulin-dependent diabetes mellitus. Linkage disequilibrium of TNFab microsatellite alleles with HLA haplotypes. Hum. Immunol. 44: 70-79, 1995.

Müller, D., Millon, R., Lidereau, R., Engelmann, A., Bronner, G., Flesh, H., Eber, M., Methlin, G., Abecassis, J.: Frequent amplification of 11q13 DNA markers is associated with lymph node involvement in human head and neck squamous cell carcinomas. Eur. J. Cancer 30B: 113-120, 1994.

Mullis, K.B., Faloona, F.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335-50, 1987.

Muntanerelat, J., Ourlin, J.C., Domergue, J., Maurel, P.: Differential effects of cytokines on the inducible expression on CYP1A1, CYP1A2 and CYP3A4 in human hepatocytes in primary culture. Hepatology 22,1143-1153, 1995.

Muir, C., Weiland, L.: Upper aerodigestive tract cancers. Cancer 75: 147-153, 1995.

Nakachi, K., Imai, K., Hayashi, S., Kawajiri, K.: Polymorphisms of the CYP1A1 and glutathione S-transferase genes associated with susceptibility to lung cancer in relation to cigarette dose in a Japanese population. Cancer Res. 53: 2994-2999, 1993.

Nebert, D.W.: Genes encoding drug-metabolizing enzymes: possible role in human disease. In: Woodhead, A.D., Bender, M.A. and Leonard, R.C.(Hrsg) Phenotypic variation in population: relevance to risk assessment. Basic Life Sci. 43: 45-64, 1989.

Nebert, D.W.: Drug-metabolizing enzymes in ligand-modulated transcription. Biochem. Pharmacol. 47: 25-37, 1994.

Nedospasov, S.A., Shakov, A.N., Turetskaya, R.L., Mett, V.A., Azizov, M.M., Georgiev, G.P., Korobko, V.G., Dobrynin, V.N., Filippov, S.A., Bystrov, N.S.: Tandem arrangement of genes coding for tumor necrosis factor (TNF-alpha) and lymphotoxin (TNF-beta) in the human genome. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1: 611-624, 1986.

Newton, C.R., Graham, A., Hepinstall, L.E., Powell, S. J., Summers, C., Kalshekern, N., Smith, J.C., Markham, A. F.: Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). Nucleic Acids Res., 17: 2503-2016, 1989.

Nimura, Y., Yokohama, S., Fujimori, M., Aoki, T., Adachi, W., Nasu, T., He, M., Ping, Y.M., Iida, F.: Genotyping of CYP1A1 and GSTM1 genes in esophageal carcinoma patients with special reference to smoking. Cancer 80(5): 852-857, 1997.

Old, L.J.: Tumor necrosis factor (TNF). Science 230: 630-632, 1985.

Oude-Ophuis, M.B., van Lieshout, E.M., Roelofs, H.M., Peters, W.H., Manni, J.J.: Glutathione S- transferase M1 and T1 and cytochrome P450 1A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. Cancer 82(5): 936-43, 1998.

Panet, A., Khorana, H.G.: Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribonucleotide templates to cellulose and its use in their replication. J. Biol. Chem. 249: 5213-21, 1974.

Parise, O., Janot, F., Guerry, R., Fortin, A., Luboinski, B., Trusz, T., Schwaab, G., Busson, P.: Chromosome 11q13 gene amplification in head and neck squamous cell carcinomas: relation with lymph node invasion. Int. J. Oncol. 5: 309-313, 1994.

Park, J.Y., Muscat, J.E., Ren, Q., Schantz, S.P., Harwick, R.D., Stern, J.C., Pike, V., Richie, J.P., Lazarus, P.: CYP1A1 and GSTM1 polymorphisms and oral cancer risk. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 6(10): 791-797, 1997.

Parks, R.R., Yan S.D., Huang C.C.: Tumor necrosis factor-α production in human head and neck squamous cell carcinoma. Laryngoscope 104: 860-864, 1994.

Pemble, S. E., Taylor, J.B.: An evolutionary perspective on glutathione transferases inferred from class Theta glutathione transferase cDNA sequences. Biochem. J. 287: 957-963, 1992.

Perera, F.P.:. Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment and prevention. J. Natl. Cancer Inst. 88: 496-509, 1996.

Pociot, F., Briant, L., Jongeneel, C.V., Molvig, J., Worsaae, H., Abbal, M., Thomsen, M., Nerup, J., Chambon-Thomsen, A.: Association of tumor necrosis factor (TNF) and class II major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF-α and TNF-β by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. Eur. J. Immunol. 23: 224-231, 1993.

Rannug, A., Alexandrie, A.K., Persson, I., Ingelman-Sundberg, M.: Genetic polymorphism of cytochromes 1A1, 2D6 and 2E1; Regulation and toxicological significance. J. Occup. Med. 37: 25-36, 1995.

Raunio, H., Pasanen, M., Maenpaa, J., Hakkola, J., Pelkonen, O. Expression of extrahepatic cytochrome P450 in humans. In: Pacifici, G.M., Fracchia, G.N. (Hrsg.) Advances in drug metabolism in man. European Commission, Directorate General Science, Research and Development: 233-245, 1995.

Robin, P.E., Olofson, J.: Tumors of the larynx. In: Hibbert, J. (Hrsg) Scott-Brown´s Otolaryngology (Bd. 5) Laryngology and head and neck surgery. (6. Aufl.) Oxford, Boston, Johannesburg, Melbourne, New Dehi, Singapore, Butterworth-Heinemann: 11.1-11.47, 1997.

Roots, I., Drakoulis, N., Brockmöller, J.: Polymorphic enzymes and cancer risk: concepts, methodology, and data review. In: Kalow, W. (Hrsg.) Pharmacogenetics of drug metabolism. New York, Pergamon Press Inc.: 815-841, 1992a.

Roots, I., Brockmöller, J., Drakoulis, N., Loddenkemper, R.: Mutant genes of cytochrome P450 2D6, glutathione S-transferase class mu, and arylamine N-acetyltransferase in lung cancer patients. Clin. Investig. 70: 307-319, 1992b.

Sarhanis, P., Redman, C., Perrett, C. , Brannigan, K., Clayton, R.N., Hand, P., Musgrove, C., Suarez, V., Jones, P., Fryer, A.A., Farrell, W.E., Strange, R.C.: Epithelial ovarian cancer: influence of polymorphism at the glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 loci on p53 expression. Br. J. Cancer 74: 1757-1761, 1996.

Schwartz, L.H., Ozsahin, M., Zhang, G.N., Touboul, E., Vataire, D.F., Andolenko, P., Lacau-Saint-Guily, J., Laugier, A., Schlienger, M.: Synchronous and metachronous head and neck carcinomas. Cancer 74, 7:1933-1938, 1994.

Seidegard, J., Pero, R.W., Miller, D.G., Beattie, E.J.: A glutathione transferase in human leukocytes as a marker for the susceptibility to lung cancer. Carcinogenesis 7: 751-753, 1986.

Saiki, R.K., Scharfs, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Hor, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science 230: 1350-1354, 1985.

Shedlofsky, S.I., Israel, B.C., McClain, C.J., Hill, D.B., Blouin, R.A.: Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. J. Clin. Investig. 94: 2209-2214, 1994.

Shvero, J., Hadar, T., Segal, K., Abraham, A., Sidi, J.: Laryngeal carcinoma in patients 40 years of age and younger. Cancer 60: 3092-3096, 1987.

Slaughter, D.P., Southwick, H.W., Smejjkal, W.: Field cancerisation in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. Cancer 6: 963-968, 1953.

Smith, G., Stanley, L.A., Sim, E., Strange, R.C., Wolf, C.R.: Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility. Cancer Surv. 25: 27-65, 1995.

Snijders, P.J., Meijer, C.J., van den Brule, A.J., Schrijemarkers, H.F., Snow, G.B., Walboomers, J.M.: Human papillomavirus (HPV) type 16 and 33 E6/E7 region transcripts in tonsillar carcinomas can originate from integrated and episomal HPV DNA. J. Gen. Virol. 73(8): 2059-66, 1992.

Stern, U., Walther, W., Shoemaker, R.H.: Reversal of multidrug resistance by transduction of cytokine genes into human colon carcinoma cells. J. Nat. Cancer Inst. 88:1383-1392, 1996.

Strange, R.C.: The GSTM1 0 locus and cancer susceptibility. In: Tew, K., Mannervik, B., Mantle, T.J., Pickett, C.B., Hayes, J.D. (Hrsg.) Structure and function of glutathione transferases. Boca Raton, FL, CRC Press: 160-167, 1993.

Strange, R.C., Lear, J.T., Fryer, A.A.: Glutathione S-transferase polymorphisms: influence on susceptibility to cancers. Chem. Biol. Interact.111-112: 351-364, 1998.

Talami, R., Franceschi, S., Barra, S., La Veccia, C.: The role of alcohol in oral and pharyngeal cancer in non-smokers, and of tabacco in non-drinkers. Int. J. Cancer 46: 391-393, 1990.

Tisch, M., Enderle, G., Zoller, J., Maier, H.: Mundhöhlenkrebs bei Maschinenarbeitern. Laryngol. Rhinol. Otol. 75(12): 759-63, 1996.

Trizna, Z., Clayman, G.L., Spitz, M.R., Goepfert, H.: Glutathione S-transferase genotypes as risk factors for head and neck cancer. Am. J. Surg. 170(5): 499-501, 1995.

Udalova, I.A., Nedospasov, S.A., Webb, G.C., Chaplin, D.D., Turetskaya, R.L.: Highly informative typing of the human TNF locus using six adjacent polymorphic markers. Genomics 16: 180-186, 1993.

Uematsu, F., Ikwa, S., Kikuchi, H., Sagami, I., Kanamaru, R., Abe, T., Satoh, K., Motomiya, M., Watanabe, M.: Restriction fragment length polymorphism of the human CYP2E1 (cytochrome P40IIE1) gene and susceptibility to lung cancer: possible relevance to low smoking exposure. Pharmacogenetics 4: 58-62, 1994.

Vander Ark, W., DiNardo, L.J., Oliver, D.S.: Factors affecting smoking cessation in patients with head and neck cancer. Laryngoskope 107: 888-892, 1997.

Vilcek, J., Lee, T.H.: Tumor necrosis factor. J. Biol. Chem. 266:7313-7316, 1991.

Warren, S., Gates, D.C.: Multiple primary malignant tumors: a survey to the literature. Am. J. Cancer 16: 1358-1414, 1932.

Warwick, A., Sarhanis, P., Redman, C., Pemble, S., Taylor, J.B., Ketterer, B., Jones, P., Alldersea, J., Gilford, J., Yengi, L., Fryer, A.A., Strange, R.C.: Theta class glutathione S-transferase GSTT1 genotypes and susceptibility to cervical neoplasia: interactions with GSTM1, CYP2D6 and smoking. Carcinogenesis 15: 2841-2845, 1994.

Watling, D.L., Gown, A.M.: Overexpression p53 in head and neck cancer. Head Neck 14: 437-444, 1992.

Wilson, A.G., De Vries, N., Pocoit, F., di Giovine, F.S., van der Putte, L.B.A., Duff, G.W.: An allelic polymorphism within the tumor necrosis factor-α promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR 3 alleles. J. Exp. Med. 177: 557-581, 1993.

Webb, G.C., Chaplin, D.D.: Genetic variability at the human tumor necrosis factor loci. J. Immunol. 145: 1278-1285, 1990.

Webber, P.: Carcinoma of the larynx in a young population. J. Laryngol. Otol. 98: 901-904, 1984.

White, T.J., Arnheim, N., Ehrlich, H.A.: The polymerase chain reaktion. Trends Gen. 5: 185-189, 1989.

Wolf, C.R., Smith, C.A.D, Forman, D.: Metabolic polymorphisms in carcinogen metabolising enzymes and cancer susceptibility. Br. Med. Bull. 50(3): 718-731, 1994.

Wooster, R., Cleton-Jansen, A.M., Collins, N., Manjion, J., Cornelis, R.S., Cooper, C.S., Gusterson, B.A., Ponder, B.A.J., von Deimling, A., Wiestler, O.D., Cornelisse, C.J., Devilee, P., Stratton, M.R.: Instability of short tandem repeats (microsatellites) in human cancers. Nature Genet. 6: 152-156, 1994.

Worsham, M.J., Wolman, S.R., Carey, T.E., Zarbo, R.J., Benninger, M.S., van Dyke, D.L.: Common clonal origin of synchronous primary head and neck squamous cell carcinomas: Analysis by tumor karyotypes and fluorescence in situ hybridisation. Hum. Pathol. 26: 251-261, 1993.

Worrall, S.F., Corrigan, M., High, A., Starr, D., Matthias, C., Wolf, R.C., Jones, P.W., Hand, P., Gilford, J., Farrell, W.E., Hoban, P., Fryer, A.A., Strange, R.C.: Susceptibility and outcome in oral cancer: preliminary data showing an association with polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6. Pharmacogenetics 8: 433-439, 1998.

Yengi, L., Inskip, A., Gilford, J., Alldersea, J., Bailey, L., Smith, A., Lear, J.T., Heagerty, A.H.M., Bowers, B., Hand, P., Hayes, J.D., Jones, P.W., Strange, R.C., Fryer, A.A.: Polymorphism at the glutathione S-transferase, GSTM3 locus: interactions with cytochrome P450 and glutathione S-transferase genotypes as risk factors for multiple cutaneous basal cell carcinoma. Cancer Res. 56: 1974-1977, 1996.

Zhao, L., Alldersea, J., Fryer, A.A., Tighe, A., Ollier, B., Thomson, W., Jones, P., Strange, R.C.: Polymorpism at the glutathione S-transferase GSTM1 A,B,A/B and null phenotypes in Nigerians. Clin. Chim. Acta 225: 85-88, 1994.

10 Legenden zu Tabellen und Abbildungen

Tab. A: Studienpatienten

Tab. B: GST- und CYP-Genotyp-Frequenzen in den Studiengruppen

Tab. C: Häufigkeit des TNFB3-Allels sowie Anteil homozygoter Träger in den einzelnen Studiengruppen

Tab. D: Beeinflussung des cervikalen Lymphknotenbefalls und des histologischen Differenzierungsgrades durch Genpolymorphismen

Tab. E: Beeinflussende Allel-/ Genotyp-Kombinationen

Tab. F: Allel-/ Genotyp-Frequenzen bei Patienten unterschiedlicher Altersgruppen

Tab. G: Einflußreiche Genpolymorphismen bei Patienten mit unterschiedlichem Alkohol- und Zigarettenkonsum

Tab. H: Allel- / Genotyp-Frequenzen bei Patienten mit Mehrfachtumoren im oberen Aerodigestivtrakt

Abb. A: GST Genotypen

Abb. B: Intron 3 / Exon 4-Mutation im CYP2D6-Gen

Abb. C: Exon 5 Deletion im CYP2D6 Gen

Abb. D: CYP2E1 Genotypen

Abb. E: CYP1A1 3'flanking Region-Mutation (m1-Mutation)

Abb. F: CYP1A1 Exon 7 Mutation (m2-Mutation)

Abb. G: Anteil der Patienten mit Tumorrezidiv, aufgeteilt nach initialer Tumorausdehnung

Abb. H: Anteil der Patienten mit Tumorrezidiv, aufgeteilt nach histologischem Differenzierungsgrad

Abb. I: Anteil der Patienten mit Tumorrezidiv, aufgeteilt nach Geschlecht

Abb. K: Anteil der Patienten mit Tumorrezidiv, aufgeteilt nach TNFB1-Allel

Abb. L: Anteil der Patienten mit Tumorrezidiv, aufgeteilt nach TNFD5-Allel

Abb. M: Anteil der Patienten mit Tumorrezidiv, aufgeteilt nach TNFB1D5-Allel-Kombination

Abb. N: Anteil der Patienten mit Pharynxkarzinom-Rezidiv, aufgeteilt nach TNFB1D5 Allel-Kombination

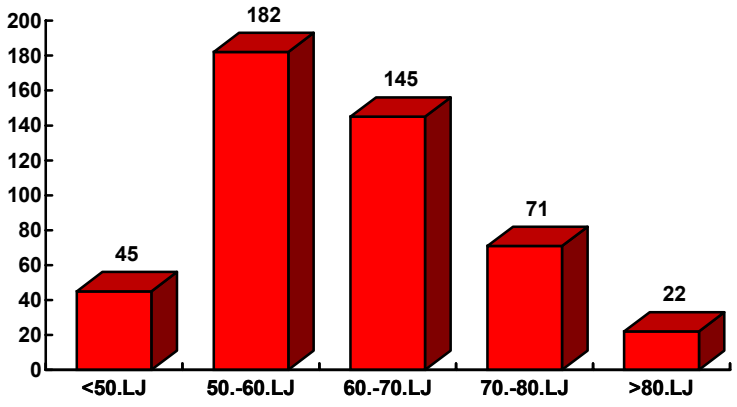
11 Tabellen und Abbildungen

Tab. A:

Tumorlokalisation	Häufigkeit	Häufigkeit/Prozent nach Subtraktion der Zweitumoren
glottischer Larynx	230	204 /43,9%
supraglottischer Larynx	72	67 /14,4%
subglottischer Larynx	3	3 /0,7%
Mundhöhle	48	39 /8,4%
Oropharynx	70	65 /14,0%
Hypopharynx	46	31 /6,7%
Mehrfachtumoren*	39	39 /8,4%
nicht exakt zuzuordnen	17	17 /3,7%

Altersverteilung der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen

Anzahl der Patienten



Altersgruppen

Zigaretten- und Alkoholkonsum der Patienten- und Kontrollgruppe

	0 Zig	<10PJ	10-25 PJ	>25PJ	0 Alk	<50g/d	50-100g/d	>100g/d
Kontrollen	9,7%	28,2%	39,8%	22,3%	2,9%	61,2%	22,3%	13,6%
Tumoren	7,5%	8,4%	51,0%	33,1%	14,1%	18,5%	48,9%	18,5%

Zigaretten- und Alkoholkonsum der Larynx- und Pharynxkarzinom-Patienten

	0 Zig	<10PJ	10-25 PJ	>25PJ	0 Alk	<50g/d	50-100g/d	>100g/d
Larynx-karzinome	6,9%	6,9%	54,7%	31,4%	12,7%	20,4%	53,5%	13,5%
Pharynx-karzinome	9,8%	12,2%	43,1%	35,9%	15,4%	14,6%	39,8%	30,1%

Statistische Auswertung:

Kontrollgruppe gegen Pharynxkarzinom-Patienten:

Rauchen (0-10 PJ gegen >10 PJ): p=0,0134, odds ratio = 2,2, 95% CI: 1,2-4.1

Alkohol (0-50 g/d gegen >50 g/d): p<0,0001, odds ratio = 4,2, 95% CI: 2,3-7,5

Kontrollen gegen Larynxkarzinom-Patienten:

Rauchen (0-10 PJ gegen >10 PJ): p<0,0001, odds ratio = 3,8, 95% CI: 2,1-6,7

Alkohol (0-50 g/d gegen >50 g/d): p<0,0001, odds ratio = 3,6, 95% CI: 2,2-6,0

Larynxkarzinom-Patienten gegen Pharynxkarzinom-Patienten:

Rauchen (0-10 PJ gegen >10PJ): p=0,1126

Alkohol (0-50g/d gegen >50 g/d): p=0,0008

Tab. B:

GSTM1 n (%)	KO	Tu-ges.*	LAR	PHA	GL	SPGL	SBGL	OR	OPH	HPH
AA/A0	52 (29,2)	125 (29,1)	71 (27,6)	39 (33,3)	48 (24,9)	22 (34,9)	1 (33,3)	10 (31,3)	20 (36,4)	9 (30,0)
BB/B0	18 (10,1)	50 (11,6)	34 (13,2)	12 (33,3)	24 (12,4)	10 (15,9)	- (0,0)	4 (12,5)	6 (10,9)	2 (6,7)
AB	13 (7,3)	12 (2,8)	8 (3,1)	1 (0,9)	8 (4,1)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	1 (3,3)

0	95 (53,4)	243 (56,5)	144 (56,1)	65 (55,6)	113 (58,6)	31 (49,2)	2 (66,6)	18 (56,2)	29 (52,7)	18 (60,0)

GSTM3 n (%)	KO	Tu-ges*.	LAR	PHA	GL	SPGL	SBGL	OR	OPH	HPH
AA	113 (66,5)	315 (76,1)	187 (74,5)	84 (76,4)	139 (75,1)	46 (73,0)	2 (66,6)	24 (77,4)	38 (73,1)	22 (73,3)
AB	50 (29,4)	89 (21,5)	60 (23,9)	23 (20,9)	44 (23,8)	15 (23,8)	1 (33,3)	7 (22,6)	11 (21,2)	5 (17,6)
BB	7 (4,1)	10 (2,4)	4 (1,6)	3 (2,7)	2 (1,1)	2 (3,2)	- (0,0)	- (0,0)	3 (5,8)	3 (10,0)

GSTT1 n (%)	KO	Tu-ges.*	LAR	PHA	GL	SPGL	SBGL	OR	OPH	HPH
positiv	158 (77,8)	316 (76,7)	206 (80,2)	79 (72,5)	148 (78,7)	55 (83,3)	3 (100)	23 (76,7)	34 (69,4)	22 (73,3)
negativ	45 (22,2)	96 (23,3)	51 (19,8)	30 (27,5)	40 (21,3)	11 (16,7)	-	7 (23,3)	15 (30,6)	8 (26,7)

GSTP1 n (%)	KO	Tu-ges.*	LAR	PHA	GL	SPGL	SBGL	OR	OPH	HPH
AA	100 (54,4)	198 (46,6)	132 (50,5)	48 (40,7)	98 (50,5)	33 (51,6)	1 (33,3)	8 (24,2)	27 (49,1)	13 (43,3)
AB	65 (35,3)	173 (40,7)	97 (37,2)	54 (45,8)	72 (37,1)	25 (39,1)	-	22 (66,7)	21 (38,2)	11 (36,7)
BB	19 (10,3)	54 (12,7)	32 (12,3)	16 (13,6)	24 (12,4)	6 (9,4)	2 (66,6)	3 (9,1)	7 (12,7)	6 (20,0)

CYP2D6-1 n (%)	KO	Tu-ges.*	LAR	PHA	GL	SPGL	SBGL	OR	OPH	HPH
EM	144 (61,8)	254 (61,7)	159 (61,9)	64 (58,7)	118 (62,4)	38 (58,5)	3 (100)	22 (73,3)	27 (55,1)	15 (50,0)
HET	76 (32,6)	138 (33,5)	84 (32,7)	40 (36,7)	60 (31,8)	24 (36,9)	-	7 (23,3)	19 (38,8)	14 (46,7)
PM	13 (5,6)	20 (4,8)	14 (5,4)	5 (4,6)	11 (5,8)	3 (4,6)	-	1 (3,3)	3 (6,1)	1 (3,3)
CYP2D6-2										
EM	218 (96,9)	394 (96,6)	241 (95,2)	107 (99,1)	178 (96,2)	60 (92,3)	3 (100)	28 (96,6)	49 (100)	30 (100)
HET	7 (3,1)	12 (2,9)	10 (4,0)	1 (0,9)	5 (2,7)	5 (7,7)	- (0,0)	1 (3,4)	- (0,0)	- (0,0)
PM	- (0,0)	2 (0,5)	2 (0,8)	- (0,0)	2 (1,1)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)

CYP1A1-2 m1-Mut. n (%)	KO	Tu-ges*.	LAR	PHA	GL	SPGL	SBGL	OR	OPH	HPH
wt/wt	184 (89,8)	346 (85,0)	213 (85,2)	92 (86,0)	159 (85,9)	52 (83,9)	2 (66,7)	28 (93,3)	41 (85,4)	23 (79,3)
wt/m1	19 (9,3)	60 (14,7)	37 (14,8)	15 (14,0)	26 (14,1)	10 (16,1)	1 (33,3)	2 (6,7)	7 (14,6)	6 (20,7)
m1/m1	2 (1,0)	1 (0,3)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)

CYP1A1-1 m2-Mut. n (%)										
wt/wt	165 (85,5)	353 (86,1)	225 (82,7)	90 (90,9)	170 (82,9)	52 (81,3)	3 (100)	29 (96,7)	45 (90,0)	26 (89,6)
wt/m2	26 (13,5)	55 (13,4)	45 (16,5)	9 (9,1)	34 (16,6)	11 (17,2)	- (0,0)	1 (3,3)	5 (10,0)	3 (10,3)
m2/m2	2 (1,0)	2 (0,5)	2 (0,7)	- (0,0)	1 (0,5)	1 (1,6)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)

CYP2E1 n (%)	KO	Tu-ges.*	LAR	PHA	GL	SPGL	SBGL	OR	OPH	HPH
WT	165 (94,3)	362 (93,0)	216 (92,3)	101 (94,4)	156 (91,2)	57 (95,0)	3 (100)	28 (96,6)	46 (95,8)	27 (90,0)
HET	10 (5,7)	26 (6,7)	17 (7,3)	6 (5,6)	14 (8,2)	3 (5,0)	- (0,0)	1 (3,4)	2 (4,2)	3 (10,0)
Mut/Mut	- (0,0)	1 (0,3)	1 (0,4)	- (0,0)	1 (0,6)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)	- (0,0)

(KO= Kontrollpersonen, Tu-ges.= gesamte Tumorpatienten, LAR= Larynxkarzinompatienten, PHA= Mundhöhlen- und Pharynxkarzinom-Patienten, GL= Patienten mit glottischen Larynxkarzinomen, SPGL= Patienten mit supraglottischen Larynxkarzinomen, SBGL= Patienten mit subglottischen Larynxkarzinomen, OR=Patienten mit Mundhöhlenkarzinomen, OPH= Patienten mit Oropharynxkarzinomen, HPH= Patienten mit Hypopharynxkarzinomen)
*inklusive Patienten mit Mehrfachtumoren

Statistische Auswertung:

GSTM1 AB:

Gesamttumoren gegen Kontrollen: p=0,02, OR=0,36, 95%CI: 0,15-0,87

Larynxkarzinome gegen Kontrollen: p=0,05, OR=0,48, 95%CI: 0,15-1,00

Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome gegen Kontrollen: p=0,01, OR=0,1, 95%CI: 0,01-0,82

GSTM3AA:

Gesamttumorgruppe gegen Kontrollen: p=0,017, OR=1,6, 95%CI: 1,1-2,4

Larynxkarzinome gegen Kontrollen: p=0,026, OR=1,6, 95%CI: 1,1-2,5

Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome gegen Kontrollen: p=0,06, OR=1,7, 95%CI: 1,0-2,8

GSTM3 BB:

Gesamttumorgruppe gegen Kontrollen: p=0,26, OR=0,58, 95%CI: 0,20-1,71

Larynxkarzinome gegen Kontrollen: p=0,06, OR=0,28, 95%CI: 0,06-1,23

Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome gegen Kontrollen: p=0,42

glottische Larynxkarzinome gegen Kontrollen: p=0,04, OR=0,25, 95%CI: 0,12-0,92

GSTP1AA:

Gesamttumorgruppe gegen Kontrollen: p=0,07, OR=0,73, 95%CI: 0,51-1,05

Larynxkarzinome gegen Kontrollen: p=0,43

Mundhöhlen- und Pharynxkarzinome gegen Kontrollen: p=0,02, OR=0,56, 95%CI: 0,33-0,95

Mundhöhlenkarzinome gegen Kontrollen: p=0,001, OR=0,27, 95%CI: 0,11-0,67

Tab. C:

TNF	KO	TU-ges.	LAR	PHA.	GL	SGL	MH	OPH	HPH
B3/ges. (%)	52/396 (13,1)	191/848 (22,5)	129/512 (25,2)	34/232 (14,7)	91/374 (24,3)	38/132 (28,8)	10/60 (16,7)	18/112 16,1)	6/60 (10,0)
B3/B3	3,0%	10,8%	13,7%	4,3%	11,8%	19,7%	0,0%	1,8%	6,7%

Statistische Auswertung:

B3-Allel

Gesamttumorgruppe gegen Kontrollen p=0,003, OR=1,92, 95%CI: 1,21-3,07

Larynxkarzinome gegen Kontrollgruppe p<0,001, OR=2,23, 95%CI: 1,38-3,62

glottische Larynxkarzinome gegen Kontrollen p=0,002, OR=2,13, 95%CI: 1,29-3,52

supraglottische Larynxkarzinome gegen Kontrollen p<0,001, OR=2,67, 95%CI: 1,48-4,8

B3/B3 Homozygotie

Gesamttumorgruppe gegen Kontrollen p=0,02, OR=3,58, 95%CI: 1,21-11,93

Larynxkarzinome gegen Kontrollgruppe p=0,003, OR=4,57, 95%CI: 1,51-15,48

supraglottische Larynxkarzinome gegen Kontrollen p<0,001, OR=6,5, 95%CI: 1,87-24,68

Pharynxkarzinome gegen Kontrollgruppe p=0,65

Interaktion TNF B3 / CYP1A1-1 Wildtyp

Kontrollpersonen gegen Larynxkarzinompatienten p=0,0009, OR=3,9, 95%CI: 1,8-8,7

Kontrollpersonen gegen Pharynxkarzinom-Patienten p=0,598

Interaktion TNF B3/B3 / CYP1A1-1 Wildtyp

Kontrollpersonen gegen Larynxkarzinompatienten p=0,037, OR=8,8, 95%CI: 1,2-67,1

Kontrollpersonen gegen Pharynxkarzinom-Patienten p=0,552

Tab. D:

Genotyp	Lymphknoten negativ (%)	Lymphknoten positiv (%)
CYP2D6 EM	83 (63,4)	48 (52,2)
CYP2D6 HET	40 (63,5)	34 (37,0)
CYP2D6 PM	8 (6,1)	10 (10,9)

Genotyp	Lymphknoten negativ (%)	Lymphknoten positiv (%)
GSTM1 A	35 (26,5)	34 (36,2)
GSTM1 B	10 (7,6)	16 (17,0)
GSTM1 AB	4 (3,0)	0 (0,0)
GSTM1 0	83 (62,8)	44 (46,8)

Genotyp	G2 Tumoren (%)	G3 Tumoren (%)
GSTT1 0	24 (17,0)	20 (37,0)
TNF A2	113 (37,7)	31 (27,7)
TNF D6	25 (8,4)	3 (2,7)

Statistische Auswertung:

Lymphknoten negativ gegen Lymphknoten positiv:

CYP2D6 EM: p=0,095, OR=0,63, 95%CI: 0,35-1,12

GSTM1 B: p=0,047, OR=2,5, 95%CI: 1,01-6,29

GSTM1 0: p=0,024, OR=0,52, 95%CI: 0,29-0,92

G2 gegen G3 Tumoren:

GSTT1 0: p=0,005, OR=2,87, 95%CI: 1,34-9,16

TNF D6: p=0,02, OR=0,37, 95%CI: 0,14-0,95

TNFA2: p=0,07, OR=0,63, 95%CI: 0,38-1,04

Tab. E:

histologischer Differenzierungsgrad G2 gegen G3 Tumoren,	Signifikanz-niveau p=	odds ratio OR=	95% Confidenz-intervall, 95%CI=
GSTT1 0*	0,026	2,29	1,10-4,77
GSTT1 0 / GSTM1 0	0,026	2,7	1,12-6,49
GSTT1 0 / GSTM3 AA	0,006	2,9	1,35-6,31
GSTT1 0 / GSTP1 AA	0,036	2,79	1,07-7,29
GSTT1 0 / TNF D5	0,009	3,35	1,35-8,32
GSTT1 0 / TNF B4	0,030	3,2	1,12-9,34
GSTM1 0 / TNF B4	0,029	2,3	1,09-5,18
GSTM3 AA / TNF D5	0,027	2,19	1,09-4,39
CYP1A1-1WT / TNF B4	0,006	2,67	1,16-5,38
TNF C1 / TNF D5	0,018	2,50	1,16-5,38
Initialer Lymphknotenbefall, N0 gegen N+			
CYP2D6 EM*	0,067	0,57	0,31-1,03
CYP2D6 PM	0,079	2,6	0,89-7,63
CYP2D6 PM / CYP1A1-1 WT	0,029	3,7	1,1-12,1
CYP2D6 PM / TNF C1	0,023	4,46	1,23-16,23
CYP2D6 PM / GSTM3 AA	0,013	5,02	1,39-18,09
initiales Tumorstadium T1 / T2 gegen T3 / T4			
GSTT1 0 / CYP1A1-1 WT	0,041	1,7	1,02-3,11

Statistische Daten wurden ermittelt durch logistische Regressionsanalyse nach Korrektur für Unterschiede der Vergleichsgruppen für die Faktoren: Geschlecht, Alter, Alkoholkonsum, Rauchgewohnheiten sowie Tumorlokalisation.

*Die Abweichung von den Rohdaten ist durch die Korrektur für die o.g. Faktoren bedingt.

Tab. F:

GSTM1AB	Tu-ges.	<50. LJ	51.-60. LJ	61.-70. LJ	71.-80. LJ	>80. LJ
AB/ges. (%)	12/430 (2,8)	4/39 (10,3)	5/170 (2,9)	1/135 (0,7)	1/66 (1,5)	1/20 (5,0)

CYP2D6-1PM	Tu-ges.	<50. LJ	51.-60. LJ	61.-70. LJ	71.-80.LJ	>80.LJ
PM/ges. (%)	20/412(4,9)	3/40 (7,5)	2/159 (1,2)	8/131 (6,2)	3/66 (4,6)	4/18 (22,2)

TNFD3	Tu-ges.	<50. LJ	51.-60. LJ	61.-70. LJ	71.-80.LJ	>80.LJ
D3/ges.(%)	16/822(1,9)	6/82 (7,3)	5/314 (1,6)	3/258 (1,2)	1/128 (0,8)	1/40 (2,5)

Statistische Auswertung:

GSTM1 AB, Patienten unter dem 50.LJ gegen die Gesamttumorgruppe:

p=0,046, OR=3,98, 95%CI: 1,02-14,26

CYP2D6-1 PM, Patienten älter als 80 Jahre gegen die Gesamttumorgruppe:

p=0,008, OR=5,60, 95%CI: 1,41-20,62

TNFD3-Allel, Patienten unter dem 50.LJ gegen die Gesamttumorgruppe:

p=0,007, OR=3,48, 95%CI: 1,18-9,48

Tab. G:

GSTM3BB	Geringtoxingruppe	Hochtoxingruppe	Ges.-Gruppe
BB/ges. (%)	0*/61 (0,0)	5/98 (5,1)	10/428 (2,3)

TNFA6-Allel	Geringtoxingruppe	Hochtoxingruppe	Ges.-Gruppe
A6/ges. (%)	30/124 (24,2)	33/200 (16,5)	125/858 (14,6)

Statitische Auswertung:

GSTM3 BB

Geringtoxingruppe gegen Gesamtgruppe: p=0,22

Geringtoxingruppe gegen Hochtoxingruppe: p=0,09

*bei einer Ereignishäufigkeit von "0" kann keine odds ratio angegeben werden.

TNFA6 Allel:

Geringtoxingruppe gegen Gesamtpatientengruppe: p=0,009, OR:1,87, 95%CI: 1,16-3,01

Geringtoxingruppe gegen Hochtoxingruppe: p=0,109, OR:1,62, 95%CI: 0,89-2,92

Tab. H:

Polymorphismus	Kontrollen	Einfachtumoren	Mehrfachtumoren
GSTT1 0 /ges. (%)	45/203 (22,2)	81/377 (21,5)	15/37 (40,5)
GSTM3 AA/ges. (%)	113/170 (66,5)	297/391 (76,0)	32/37 (86,5)
CYP1A1-1 wt/m2 od m2/m2/ ges. (%)	28/193 (13,5)	56/374 (14,4)	1/36 (2,8)
TNFB3-Allel/ges. (%)	52/396 (13,1)	168/782 (21,5)	23/76 (30,3)
TNFB3/B3 in %	3,0%	10,4%	15,8%

Statistische Auswertung:

GSTT1 0:

Mehrfachtumoren gegen Kontrollen: p=0,017, OR=2,39, 95%CI: 1,08-5,30

Mehrfachtumoren gegen Einfachtumoren: p=0,008, OR=2,5, 95%CI: 1,16-5,26

GSTM3 AA:

Mehrfachtumoren gegen Kontrollen: p=0,016, OR=3,23, 95%CI: 1,12-10,0

Mehrfachtumoren gegen Einfachtumoren: p=0,15, OR=2,03, 95%CI: 0,73-6,10

CYP1A1-1 wt/m2 oder m2/m2:

Mehrfachtumoren gegen Kontrollen: p=0,09, OR=0,17, 95%CI: 0,01-1,22

Mehrfachtumoren gegen Einfachtumoren: p=0,04, OR= 0,16, 95%CI: 0,11-0,96

TNFB3-Allel:

Mehrfachtumoren gegen Kontrollen: p<0,001, OR=2,87, 95%CI: 1,44-5,71

Mehrfachtumoren gegen Gesamttumorgruppe: p=0,106, OR=1,59, 95%CI: 0,91-2,74

Mehrfachtumoren gegen Pharynxkarzinome: p=0,002, OR=2,53, 95%CI: 1,13-4,86

Mehrfachtumoren gegen Larynxkarzinome: p=0,35, OR=1,29, 95%CI: 0,73-2,25

TNF B3/B3:

Mehrfachtumoren gegen Kontrollen: p=0,008, OR=5,21, 95%CI: 1,22-23,43

Mehrfachtumoren gegen Einfachtumoren: p=0,52

Abbildungen

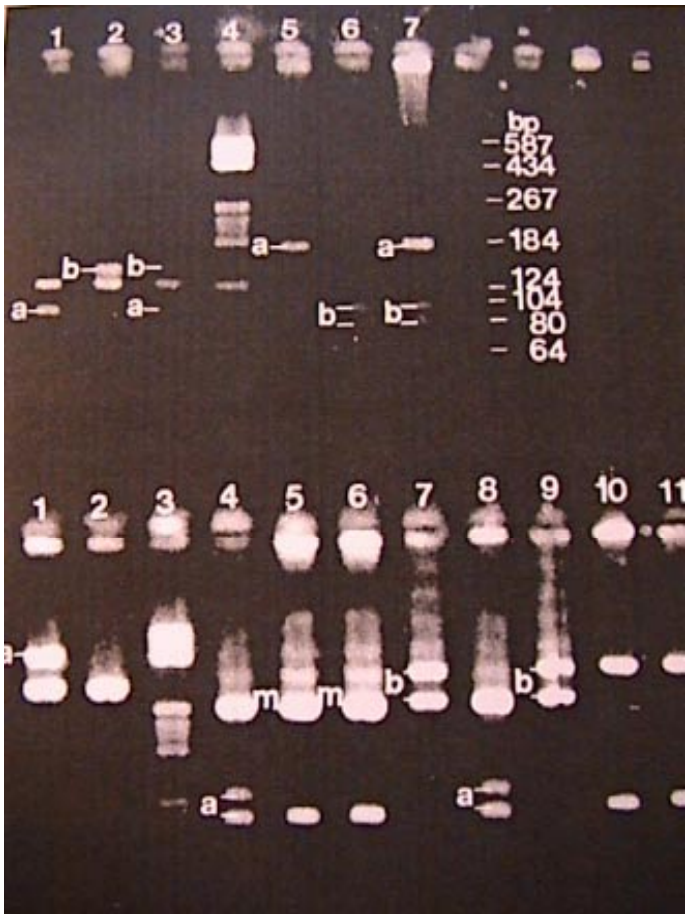
Abb. A: GST-Genotypen

oben: Bahn: 1 2 3 4 5 6 7

Genotypen: GSTM3AA, BB, AB, Marker, GSTP1AA, BB, AB

unten: Bahn: 1 2 3 4/5 6/7 8/9 10/11

Genotypen: GSTT1+, null, Marker, GSTM1A, GSTM1B, GSTM1AB, GSTM1 null



Bahn: 1 2 3 4 5 6 7 8 9
Genotypen: EM, EM, PM, HET, EM, EM, HET, HET , Marker

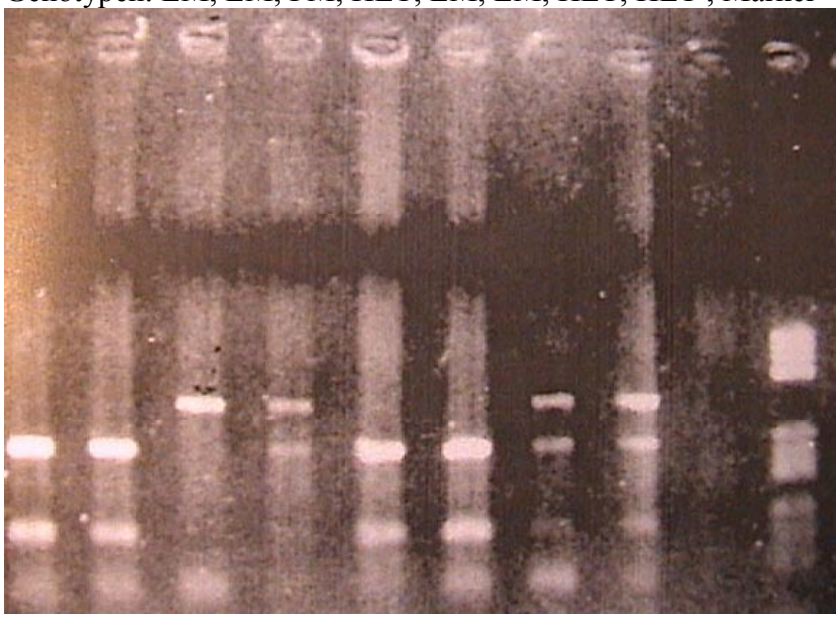


Abb. B: Intron 3 / Exon 4-Mutation im CYP2D6-Gen

Bahn: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Genotypen: EM, EM, EM, HET, EM, EM, PM, PM, HET, Marker

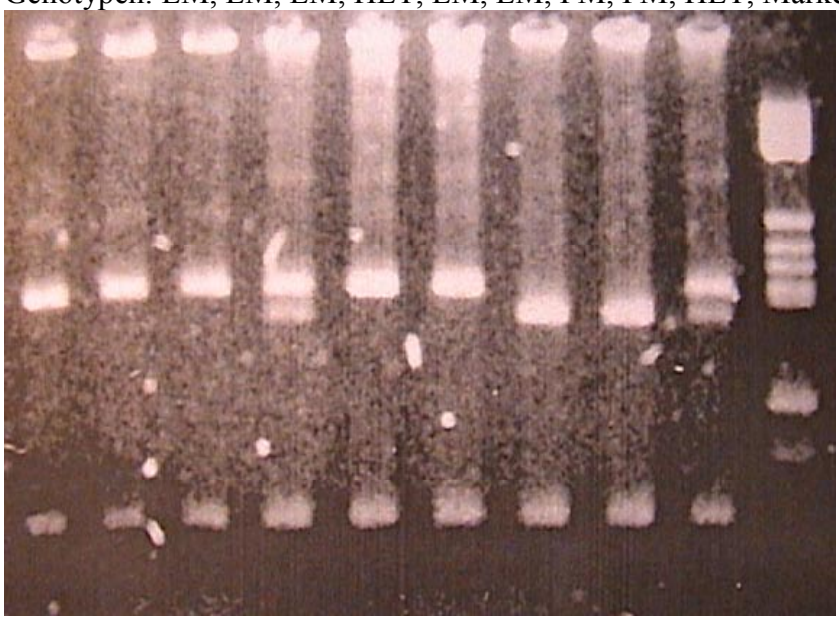


Abb. C: Exon 5 Deletion im CYP2D6-Gen

obere Reihe PstI-Verdauung, Bahn:	1	2	3	4	5	6
Genotypen:	unverdaut	wt/wt	---	mut/wt	wt/wt	Marker
untere Reihe RsaI-Verdauung, Bahn:	1	2	3	4	5	6
Genotypen:	unverdaut	wt/wt	wt/wt	mut/wt	wt/wt	Marker

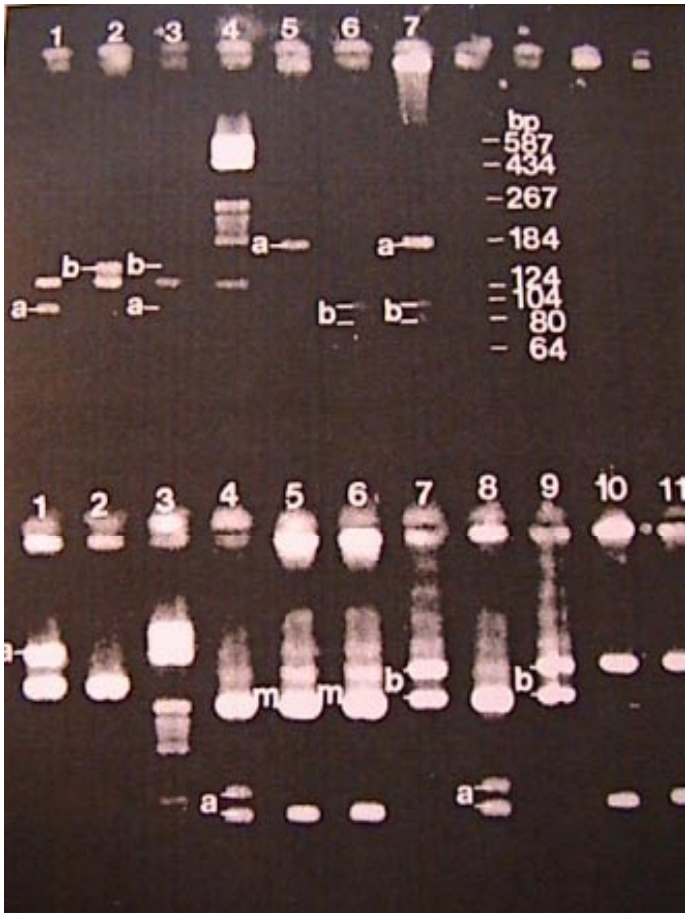


Abb. D: CYP2E1-Genotypen

Bahn: 1 2 3 4

Genotypen: wt/wt m1/wt m1/m1 Marker

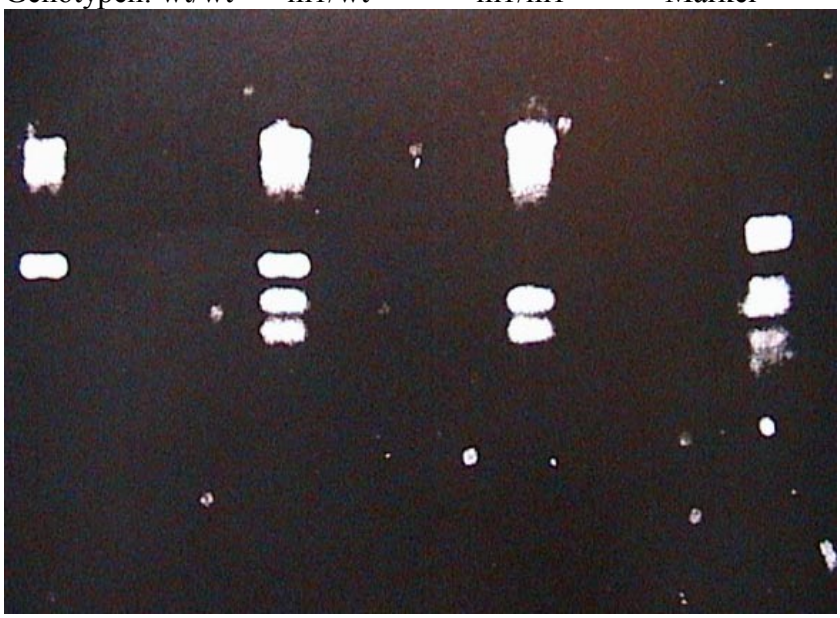


Abb. E: CYP1A1 3'flanking Region-Mutation (m1-Mutation)

Bahn: 1-3 4-6 7-9 10

Genotypen: m2/m2 m2/wt wt/wt Marker

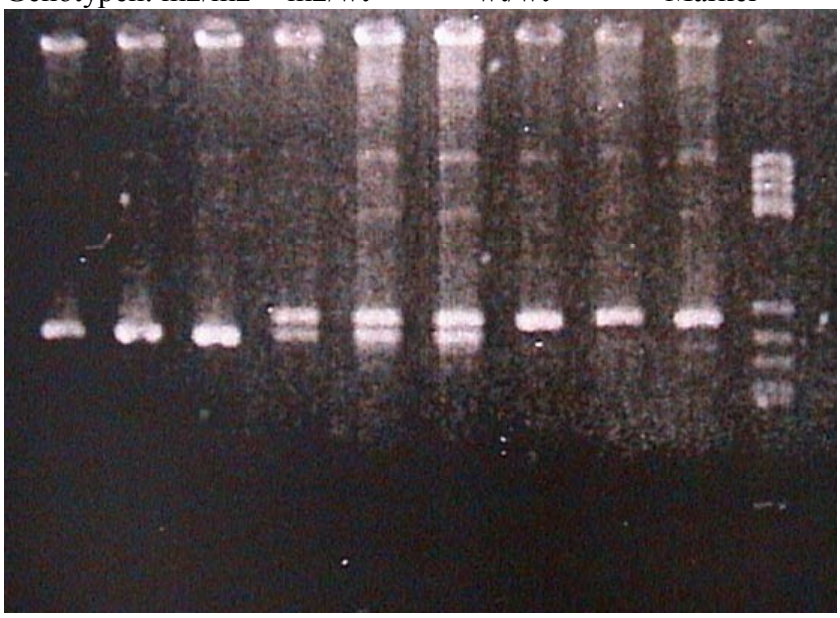
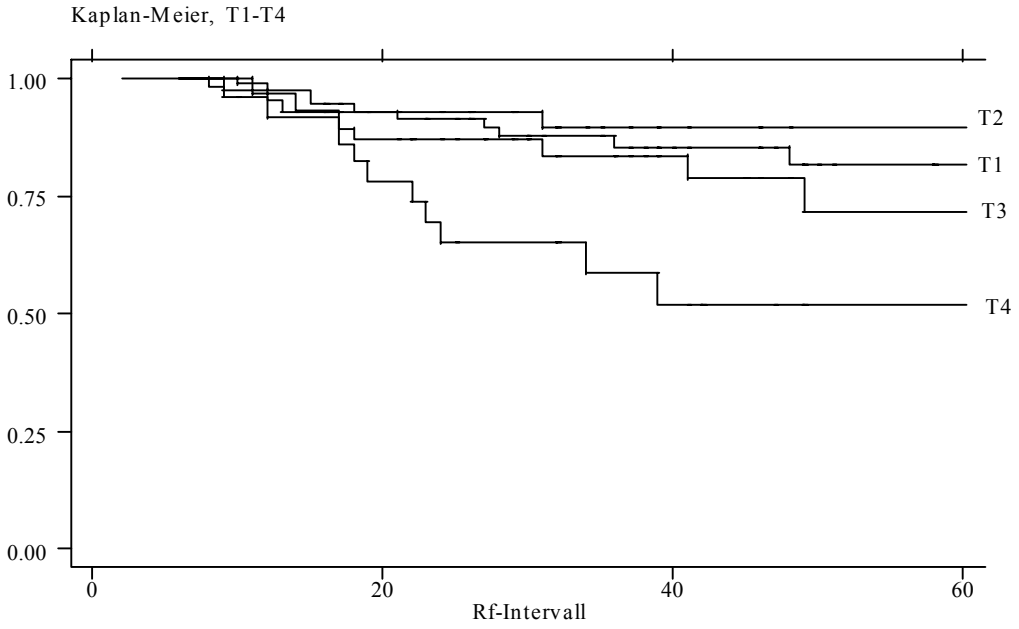
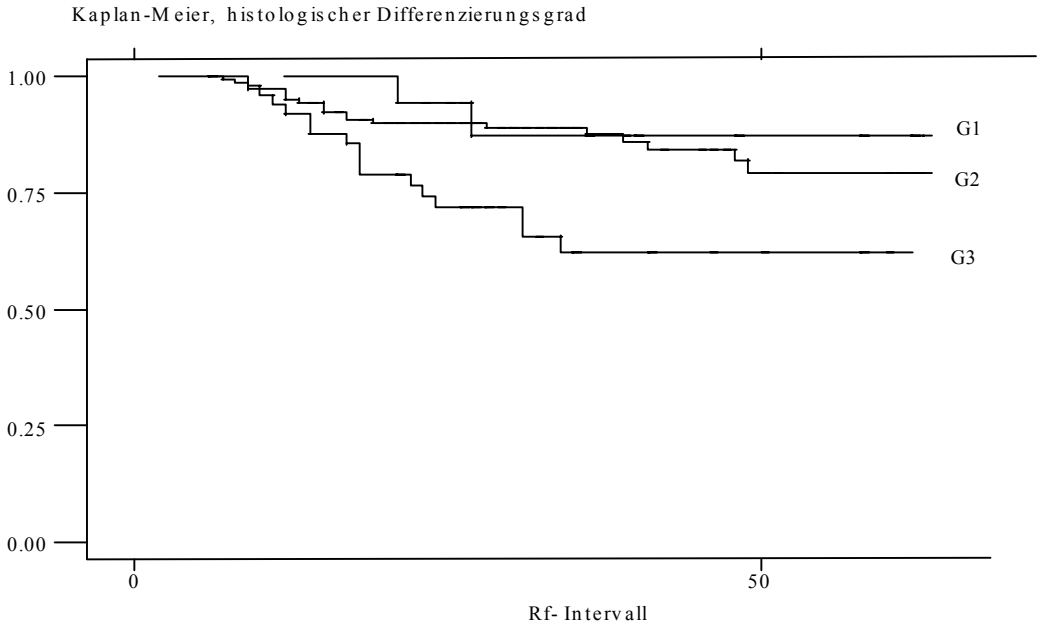


Abb. F: CYP1A1 Exon 7-Mutation (m2-Mutation)



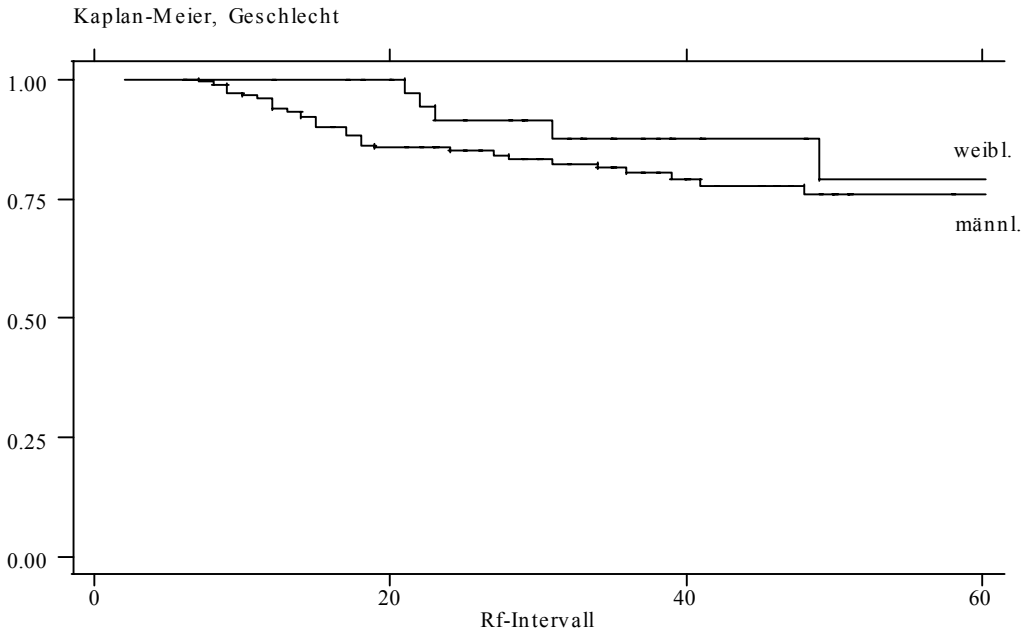
Rezidivfreies Intervall in Monaten, Signifikanzniveau: p=0,009

Abb. G:



Rezidivfreies Intervall in Monaten, Signifikanzniveau: p=0,002

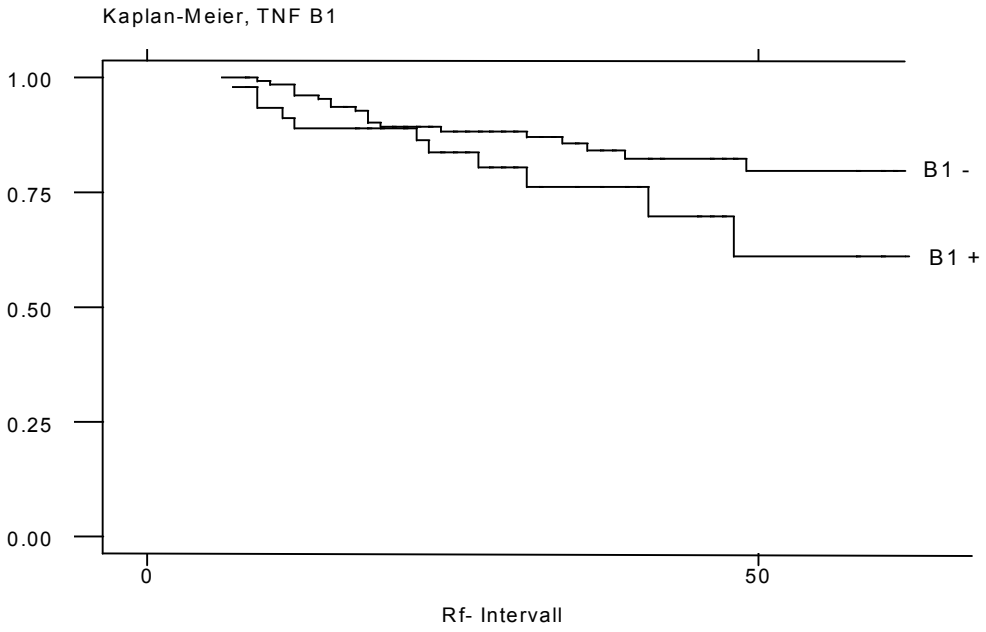
Abb. H:



Rezidivfreies Intervall in Monaten

Abb. I:

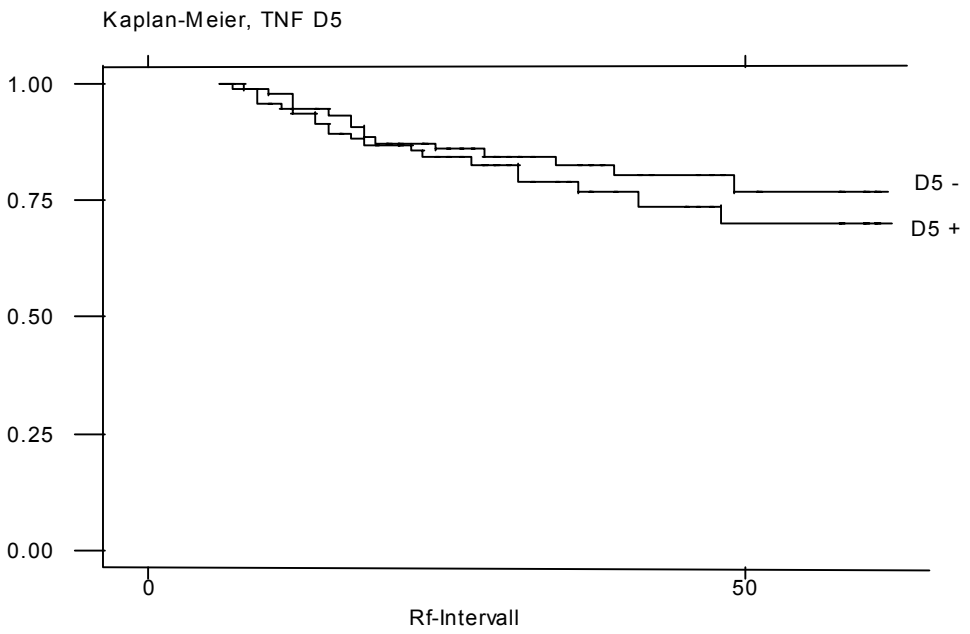
Signifikanzniveau: p=0,106, HR=1,77, 95%CI: 0,88-3,52



Rezidivfreies Intervall in Monaten

Abb. K:

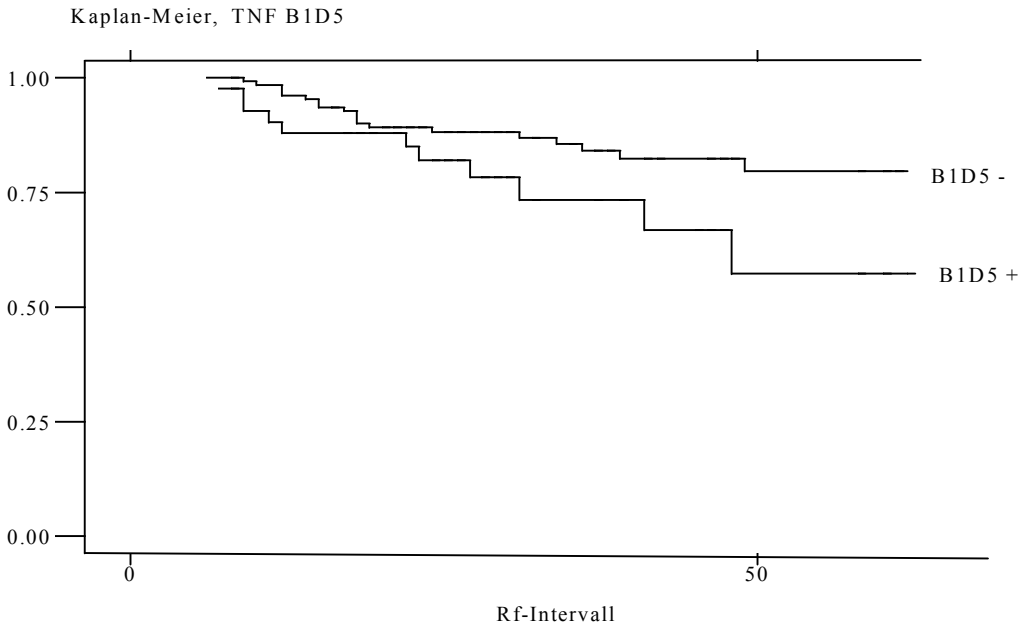
Signifikanzniveau: p=0,080, HR=1,93, 95%CI: 0,89-2,85



Rezidivfreies Intervall in Monaten

Abb. L:

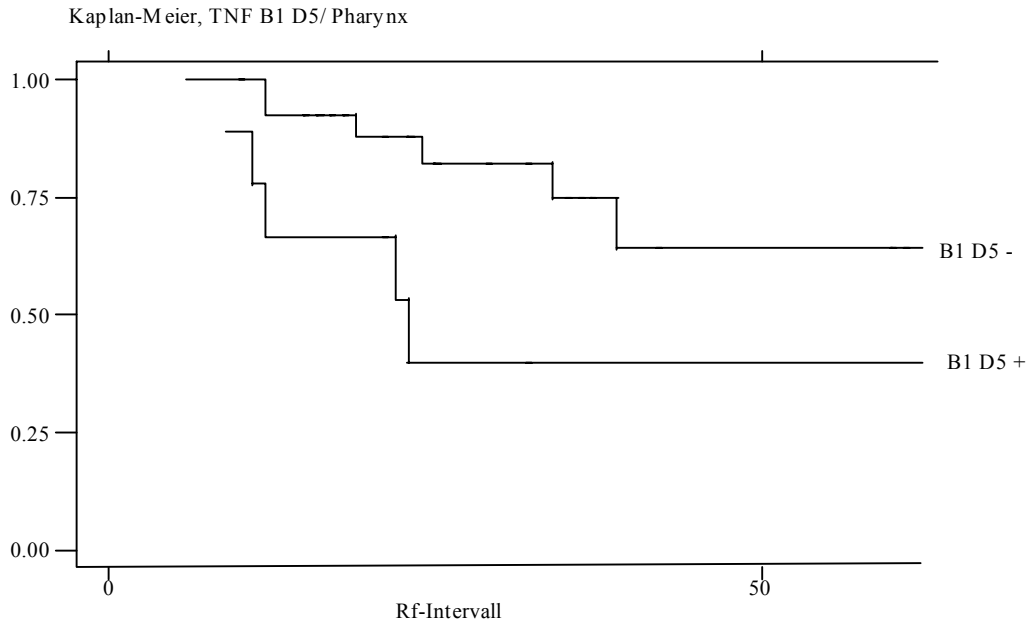
Signifikanzniveau: p=0,298



Rezidivfreies Intervall in Monaten

Abb. M:

Signifikanzniveau: p=0,043, HR=2,05, 95%CI: 1,02-4,12



Rezidivfreies Intervall in Monaten

Abb. N:

Signifikanzniveau: p=0,055, HR=3,2, 95%CI: 0,97-10,57