

Universitätsklinikum Ulm
Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. med. G. Rettinger

**Der Einfluss von Genpolymorphismen von
Detoxifikationsenzymen
auf das Outcome
bei Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

Oliver Jochen Staneff
Karlsruhe

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter: PD Dr. med. Silke Gronau
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Thomas Barth

Tag der Promotion: 20.02.2009

Meinen lieben Eltern Rose-Marie und Theodor Ernst Staneff

Ihr beständiger Rückhalt, ihre Geduld und finanzielle Unterstützung ermöglichten meine Ausbildung und trugen maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

0	Abkürzungsverzeichnis	
1	Einleitung	1
1.1	Zelluläre Biotransformation	1
1.2	Die Entstehung von Tumoren	2
1.3	Cytochrom P-450	3
1.3.1	Cytochrom P-450 1A1 (Cyp P-450 1A1)	3
1.4	Glutathion - S - Transferasen	4
1.4.1	Glutathion - S - Transferase - M1 (GST-M1)	4
1.4.2	Glutathion - S - Transferase - T1 (GST-T1)	5
1.5	Fragestellung	5
2	Material und Methode	6
2.1	Material	6
2.1.1	Chemikalien	6
2.1.2	Enzyme	7
2.1.3	Längenstandard	7
2.1.4	Lösungen, Medien	7
2.1.5	Kunststoffartikel	7
2.1.6	Laborgeräte	8
2.1.7	Computerprogramme	8
2.1.8	Patientenkollektiv	8
2.1.9	Probengewinnung	8
2.2	Methoden	9
2.2.1	Extraktion von DNS	9
2.2.2	Polymerase-Chain-Reaktion (PCR)	9
2.2.3	MspI Restriktion	14
2.2.4	Gelelektrophorese	15
2.2.5	Statistische Auswertung	17

3	Ergebnisse	19
3.1	Häufigkeitsverteilung und Signifikanzwert p der untersuchten Variablen...	19
3.1.1	Gesamtzahl, Alter und Geschlecht	19
3.1.2	Tumortyp, Lokalisation , Grading und TNM-Klassifikation	21
3.1.3	Tumorbehandlung.....	24
3.1.4	Beobachtungszeitraum, Rezidive und Überlebenszeiten.....	25
3.1.5	Noxen	26
3.1.6	Genstatus	27
4	Diskussion	38
4.1	Wissenschaftlicher Hintergrund und Fragestellung.....	38
4.2	Methodik und Ergebnisse	39
4.3	Methodenkritik	41
4.4	Konsequenzen.....	41
5	Zusammenfassung	43
6	Literaturverzeichnis	45
7	Anhang	51
7.1	TNM-, und R-Klassifikation im Kopf-Hals Bereich.....	51
8	Danksagungen	52
9	Lebenslauf	53
9.1	Schulbildung	53
9.2	Studienverlauf.....	53
9.3	Beruf	54

Abkürzungsverzeichnis

Σ	Summe
μM	mikromolar
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
bp	Basen-Paare
BPs	Benz-a-pyrene
BSA	Bovines Serum Albumin
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dem.	demineralisiert
dest.	destilliert
df	degree of freedom
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNS	Desoxyribonukleosinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
HNO	Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde
KZiff	Kombinations-Ziffer
M	molar
max	maximal
min	minimal
min.	Minute
n	Anzahl
nm	Nanometer
PAHs	Aromatische Kohlenwasserstoffe
PCR	Polymerase-Chain-Reaktion
vs.	Versus

1 Einleitung

Sowohl Monooxygenasen als auch Glutathion-S-Transferasen stellen mit ihren Isoenzymen wichtige Katalysatoren im Ablauf der Biotransformation von endogenen sowie exogenen Substanzen da [25]. Sie tragen somit zur Aufrechterhaltung der Funktionalität des Organismus bei. Abweichungen in der Struktur führen zu einer Veränderung ihrer katalytischen Wirkung [25, 43].

Diese Arbeit geht der Frage nach, inwieweit Mutationen von Detoxifikationsenzymen Auswirkungen auf das Outcome von Patienten mit Tumoren im Kopf-Hals-Bereich haben.

1.1 Zelluläre Biotransformation

Viele Xenobiotika sind lipophil; dies hat zur Folge, dass der Organismus diese Substanzen nicht ausscheiden kann. Geschieht dies nicht, oder nur unzureichend können potentielle Mutagene Zellmembranen passieren und mit der DNS und anderen Zellbestandteilen agieren [25]. Dies kann zu Mutationen und somit zu einer Tumorentstehung führen.

Die Umwandlung von lipophilen in hydrophile Komponenten wird durch eine Reihe von biochemischen Reaktionen bewerkstelligt. Diese finden hauptsächlich in der Leber, aber auch in Lunge, Darm und Nieren statt. Kern dieser Biotransformation ist eine Zwei-Phasen-Reaktion. Phase I überführt den auszuscheidenden Stoff mittels Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse in einen reaktiven Zustand. Dieser Vorgang ist Voraussetzung für die Verarbeitung der Stoffe in Phase II. Dort findet die Kopplung der Phase-I-Produkte an große multipolare Moleküle statt, welche die Wasserlöslichkeit der Metaboliten bewirken [25]. Jeder Reaktionstyp der Phasen wird durch spezifische Enzyme katalysiert. Die Endprodukte werden anschließend über die Nieren, in geringerem Maße auch mit der Galle, ausgeschieden.

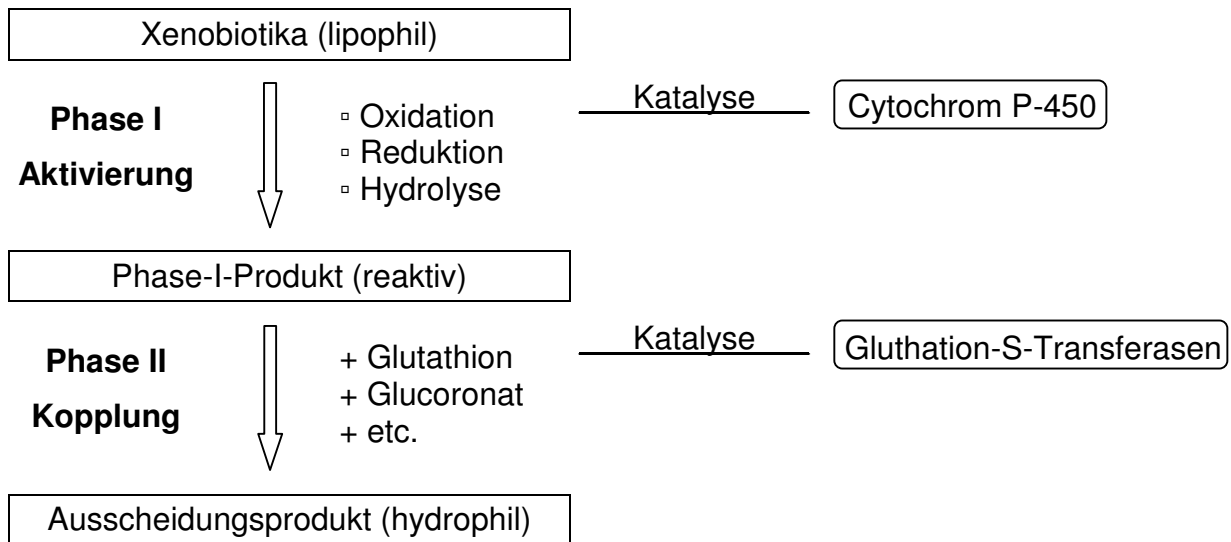


Abbildung 1 Schematische Darstellung der Biotransformation

Der menschliche Organismus muss im Stande sein eine Vielzahl verschiedener Xenobiotika zu metabolisieren; daher entstanden im Laufe der Evolution unterschiedliche Enzymfamilien [25, 31]. In dieser Studie wurden einzelne Untergruppen der Enzyme Cytochrom P-450 Oxydase und der Glutathion-S-Transferase untersucht, um die Auswirkungen von Mutationen dieser Isoenzyme auf die Überlebenszeit von Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren zu klären.

1.2 Die Entstehung von Tumoren

Die Biotransformation kann nicht als reine Detoxifikation angesehen werden. Durch die Aktivierung der Xenobiotika können zum Teil hochreaktive Metaboliten entstehen [25]. Sowohl die Überfunktion von Schlüsselenzymen der Phase I (erhöhtes Vorkommen von Phase-I-Produkten), als auch Funktionsausfall der Enzyme der Phase II (verminderter Abbau der Phase-I-Produkte) führen zu einem erhöhten Vorkommen polarer Metaboliten. Diese können aufgrund ihrer freien Elektrodenkonfiguration andere Moleküle oxidieren und zu Veränderungen von Fettsäuren, Proteinen und der Basensequenz im DNS-Strang führen.

Zellen verfügen über die Möglichkeit Radikale durch Antioxidantien, wie reduziertes Glutathion, Vitamin C, Vitamin E etc. zu neutralisieren, oder die bereits geschädigte DNS durch den Einsatz von DNS-Polymerasen zu reparieren [16].

Sind freie Radikale in einem Übermaß vorhanden, erfolgt eine irreparable Schädigung der DNS und somit ihrer Funktion: die ursprünglichen DNS-Produkte können nicht mehr erstellt werden; folglich entstehen Mutationen. Gewährleisten die veränderten DNS-Informationen keine geregelte Zellaktivität, bewirken sie die Tumorentstehung [25, 43].

1.3 Cytochrom P-450

An der Membran des endoplasmatischen Retikulums findet die wichtigste Phase-I-Reaktion statt: die Hydroxylierung. Mittels dieser speziellen Form der Oxidation wird ein Atom molekularen Sauerstoffs in das Substrat eingebaut. Es entsteht die reaktive OH-Gruppe (Alkohol- bzw. Phenolgruppe). Diese Reaktion wird durch die hämhaltige Monooxygenase Cytochrom P-450 katalysiert.

Sie erhielt ihren Namen aufgrund der Eigenschaft, bei Bindung von Kohlenmonoxid an das Eisen der Hämgruppe ein Absorptionsmaximum von 450 nm zu zeigen; P steht dabei für Pigment.

1.3.1 Cytochrom P-450 1A1 (Cyp P-450 1A1)

Diese Untergruppe der Monooxygenase spielt eine übergeordnete Rolle in der Metabolisierung von Benz-a-pyrenen (BPs) und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAHs) [42]. Große Mengen dieser Substratgruppen fallen beim Rauchen, Braten von rotem Fleisch (Nitritpökelsalze) und der Verbrennung von Kraftstoffen an. Sie sind Bestandteil chemischer Prozesse, sowie derer Produkte wie organischen Lösungsmitteln, Pestiziden, Lacken und Farben.

Sato et al zeigte, dass Veränderungen der enzymatischen Aktivität durch Mutationen einen Anstieg der reaktiven Metaboliten bewirken [40]. Es wurden bisher vier Mutationen entdeckt [10].

Bei dem Genpolymorphismus m1 liegt eine Punktmutation an der Nukleinsäure 6235 von Exon 7 vor. Dort kommt es zu einer Basentransition von Thymin durch Cytosin. Diese kann mittels des Restriktionsenzym MspI nachgewiesen werden. Man spricht deshalb von einem MspI-Genpolymorphismus.

Dieser tritt mit 31% am häufigsten in der japanischen Bevölkerung auf. Europäer zeichnen sich lediglich durch ein zehnpromzentiges Vorkommen aus [13, 39].

Eine weitere Mutation (m2) die einen Anstieg von Phase-I-Produkten bewirkt, liegt ebenfalls im Exon 7 des Cyp P-450 1A1 Gens und betrifft den Basentausch von Arginin zu Guanin. Diese äußert sich im katalytischen Zentrum des Enzyms in einer Änderung der Aminosäuren Isoleucin zu Valin (Iso462Val) [13, 14, 21].

Die Punktmutation m3, eine Transition von Thymin zu Cytosin in Position 5996 ist nur bei afrikanischen Menschen bekannt [14].

Die Mutation m4 führt zu einem Austausch von Cytosin für Arginin in Position 4887, und hat somit einen Tausch der Aminosäure Threonin zu Asparagin (Thr461Asp) [40] zur Folge. Die Mutation m4 konnte bis jetzt noch nicht mit Krankheiten in Verbindung gebracht werden.

Der Einfluss der m1 Mutation auf die Entstehung von Tumoren bei z. B. aktivem und passivem Tabakkonsum wurde hingegen durch mehrere Studien belegt [35, 36, 45].

1.4 Glutathion - S - Transferasen

Das Enzym erhielt seinen Namen, da es die Konjugation der Metaboliten mit reduziertem Glutathion katalysiert. Dieses Tripeptid kommt in Zellen der meisten Körpergewebe in relativ hohen Konzentrationen vor. Freie Radikale können auch mit Glutathion allein reagieren. Demzufolge spielt es eine zentrale Rolle in der zellulären Antioxidation [16, 24, 25].

1.4.1 Glutathion - S - Transferase - M1 (GST-M1)

Für dieses Enzym sind drei Genotypen bekannt: A, B und Null. Träger der Genotypen AA, A/0, BB, B/0 exprimieren auf mindestens einem Allel ein funktionelles Enzym GST-M1. Die seltenen Träger der Gruppe A/B korrelieren mit einem sehr hohen Enzymvorkommen.

Individuen mit der homozygoten Null-Allelkonstellation sind nicht in der Lage GST-M1 zu exprimieren. Dieser Verlust bewirkt eine verringerte Metabolisierung der reaktiven Metaboliten. Diese können folglich vermehrt mit der Zell-DNS reagieren, was zu Zellentartungen führen kann. Die Assoziation von Null-Genotypen mit der Entstehung von Tumoren in Blase, Lunge und Larynx bei entsprechender Exposition wurde belegt [1, 2, 24, 34].

50 % der kaukasischen Bevölkerung ist homozygoter Null-Allel-Träger, mit einer Spannweite von 38 % in den Niederlanden und 62 % in Schottland [7, 8, 27].

1.4.2 Glutathion - S - Transferase - T1 (GST-T1)

Für dieses Enzym sind ebenfalls die drei Genotypen A, B und Null bekannt. Die Konsequenzen bei einem Ausfall dieses Enzyms innerhalb der Biotransformation zeigen Studien mit Null-Allelträgern, die verglichen zu Wild-Allelträgern, schneller Vergiftungserscheinungen bei entsprechender Exposition aufzeigten. Der Verlust von GST-T1 führt zu einer verminderten Metabolisierung von reaktiven Phase-I-Substanzen. Diese können eine Zellentartung bewirken. Insbesondere wurde eine Assoziation zwischen starkem Tabakkonsum und der Entstehung von Lungen- und Larynxkarzinomen beschrieben [1, 2, 20, 23, 24, 26, 34, 41]. Am häufigsten kommt der Null-Allelträger in der orientalischen Bevölkerung vor. Lediglich 10 % der europäischen Menschen haben diesen Genpolymorphismus [7, 8, 27].

1.5 Fragestellung

Aufgrund des relativ häufigen Vorkommens der oben genannten Mutationen, soll in dieser Studie der Einfluss von Genpolymorphismen von Detoxifikationsenzymen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren untersucht werden. Insbesondere der Einfluss von Alter, Geschlecht, Tabak- und Alkoholkonsum, für den Krankheitsverlauf bedeutsame Faktoren (Tumorstadium, Halslymphknotenbefall, histologischer Differenzierungsgrad, Tumorrezidive), sowie die Tumorversorgung (Operation vs. Bestrahlung) werden dazu in Bezug gebracht.

2 Material und Methode

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Borsäure	AppliChem, Darmstadt
BSA 100x (Bovines Serum Albumin)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat)	Peqlab, Erlangen
EDTA (Ethylen-Diamin-Tetra-Acetat)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol (70%, 100%)	Sigma Aldrich, Seelzen
Ethidiumbromid 1%	Merck, Darmstadt
H ₂ O dest.	Hauseigene Destillierungsanlage
MgCl ₂	Quiagen, Hilden
NaCl	Mallinckrodt Baker, Holland
Primer Cyp P-450 1A1 /1 (5'-AAG AGG TGT AGC CGC TGC ACT-3')	Thermo Electron, Ulm
Primer Cyp P-450 1A1 /2 (5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3')	Thermo Electron, Ulm
Primer GST-M1 A (5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3')	Thermo Electron, Ulm
Primer GST-M1 B (5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3')	Thermo Electron, Ulm
Primer GST-T 1 (5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3')	Thermo Electron, Ulm
Primer GST-T 2 (5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3')	Thermo Electron, Ulm
Primer IFN 3 (5'-GGC ACA ACA GGT AGT AGG CG-3')	Thermo Electron, Ulm
Primer IFN 5 (5'-GCC ACA GGA GCT TCT GAC ACC-3')	Thermo Electron, Ulm
Qualex Gold Agarose	Hybaid-AGS, Heidelberg
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-diaminomethan	Amersham Life Science, USA
Xylol	Merck, Darmstadt

2.1.2 Enzyme

DNA-Mspl (5'...C↓CGG...3') (3'...GGC↓C...5')	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
Hot-Star-Taq Polymerase	Quiagen, Hilden
Proteinase K (20 mg/ml)	Roth, Karlsruhe

2.1.3 Längenstandard

Bioladder 100 (Markerbanden von 100 - 1000 bp)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
---	--------------------------------------

2.1.4 Lösungen, Medien

DNA-BlueRun	AGS, Heidelberg
NEB-Buffer 2	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
PCR-Puffer (10-fach)	Quiagen, Hilden
TBE-Puffer (1-fach)	100 mM TRIS 09 mM Borsäure 1 mM EDTA
TEN-Puffer	10 mM TRIS 1 mM EDTA 0,1 M NaCl

2.1.5 Kunststoffartikel

Einmal-Pasteur-Pipetten	VWR, Darmstadt
PCR Tubes 0,2 ml (Certified DNase, RNase free)	Advanced Biotechnologies, Epsom, Surrey
Pipetten - Research	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (div. Größen)	Molecular BioProduks ART, San Diego, USA
Safe-Lock Tubes 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg

2.1.6 Laborgeräte

Agagel Maxi	Biometra, Göttingen
Gel-Dokumentationssystem	Intas, Göttingen
Magnetrührer Ikamag Ret	IKA Labortechnik, Staufen
Mikrotom	
Uno Thermoblock	Biometra Göttingen
Vortexer REAX top	Heidolph, Kehlheim
Zentrifuge, Biofuge pico	Heraeus, Hanau

2.1.7 Computerprogramme

MS-Office Programme	Microsoft Dynamics, Krefeld
Systat 10.2	Systat Inc. Point Richmond, CA
WinSTAT	R. Fitch Software, Bad Krozingen

2.1.8 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv dieser Studie umfasst 141 Patienten. Hierbei handelt es sich um Patienten der Hals-, Nasen-, Ohrenklinik der Universität Ulm (Leiter: Prof. Dr. med. G. Rettinger), die in der Zeit von 1996 bis 2000 behandelt wurden. Auswahlkriterium war das Vorliegen eines histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinoms im Bereich der Mundhöhle und des Oropharynx. Der Beobachtungszeitraum erstreckte sich von Januar 1996 bis Dezember 2003. In dieser Zeit wurden durch Auswertung der Patientenakten zusätzliche Informationen zu Rezidivenstehungen und Todeszeitpunkten festgehalten.

2.1.9 Probengewinnung

Da viele Patienten zu Studienbeginn bereits verstorben waren, wurde die benötigte DNS aus Tumorgewebe gewonnen. Jenes war nach Operationsende in der Pathologie der Universität Ulm (Leiter: Prof. Dr. med. P. Möller) in Paraffin fixiert und gelagert worden.

2.2 Methoden

2.2.1 Extraktion von DNS

Nach Sichtung der betreffenden pathohistologischen Befunde, wurden aus den entsprechenden Paraffinblöcken mittels eines Mikrotoms je nach Größe des Gewebes 5 bis 10 Scheiben mit einer Dicke von 20 µm abgetragen. Dieses Ausgangsmaterial wurde zwei Mal mit Xylol entparaffiniert. Um dieses wieder zu entfernen, wurde das Material anschließend zwei Mal mit 100% und ein Mal mit 70% Alkohol versetzt. Nachfolgend verdunstete der Alkoholüberstand 20 min lang bei 25 °C im Wärmeschrank. Anschließend wurde je nach Größe des Pellet 400 µl bzw. 200 µl TEN-Puffer (Tris-EDTA-NaCl) sowie 20 µl bzw. 10 µl Proteinase K dazugegeben, und dieses 12 h bei 55 °C in einem Wasserbad inkubiert. Mittels Proteinase K wurden die Gewebezellen digestiert und die DNS zugänglich gemacht. Um ein ungewolltes Interagieren der Proteinase während der PCR mit Restriktionsnukleasen zu vermeiden, wurde das Lysat für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, was die Inaktivierung der Proteinase K zur Folge hatte.

2.2.2 Polymerase-Chain-Reaktion (PCR)

2.2.2.1 Methodische Grundlagen

Mithilfe der PCR können kleinste Mengen einer genetischen Vorlage vervielfältigt werden. Zuerst wird der DNS-Doppelstrang thermisch getrennt (Denaturierung). Danach hybridisieren frequenzspezifische Primer an den zu amplifizierenden Abschnitt (Annealing). Eine thermostabile DNS-Polymerase verlängert die Primer vom 5'- zum 3'-Ende (Elongation). Durch jeden aufeinanderfolgende Zyklus der Denaturierung, des Annealings und der Elongation wird der zu bestimmende DNS-Abschnitt exponentiell vermehrt, da jeder DNS-Strang als Kopiervorlage eines weiteren Stranges zur Verfügung steht. Folglich befinden sich theoretisch nach n Zyklen 2^n DNS-Doppelstränge im Reaktionsgefäß. Jeder Zyklusabschnitt muss mit der Optimaltemperatur des jeweiligen Enzyms durchlaufen werden. Die Anzahl der Zyklen sowie die Temperaturregulation (Aufheizen, Halten, Abkühlen) werden durch einen programmierbaren Thermocycler (Uno Thermoblock) gewährleistet.

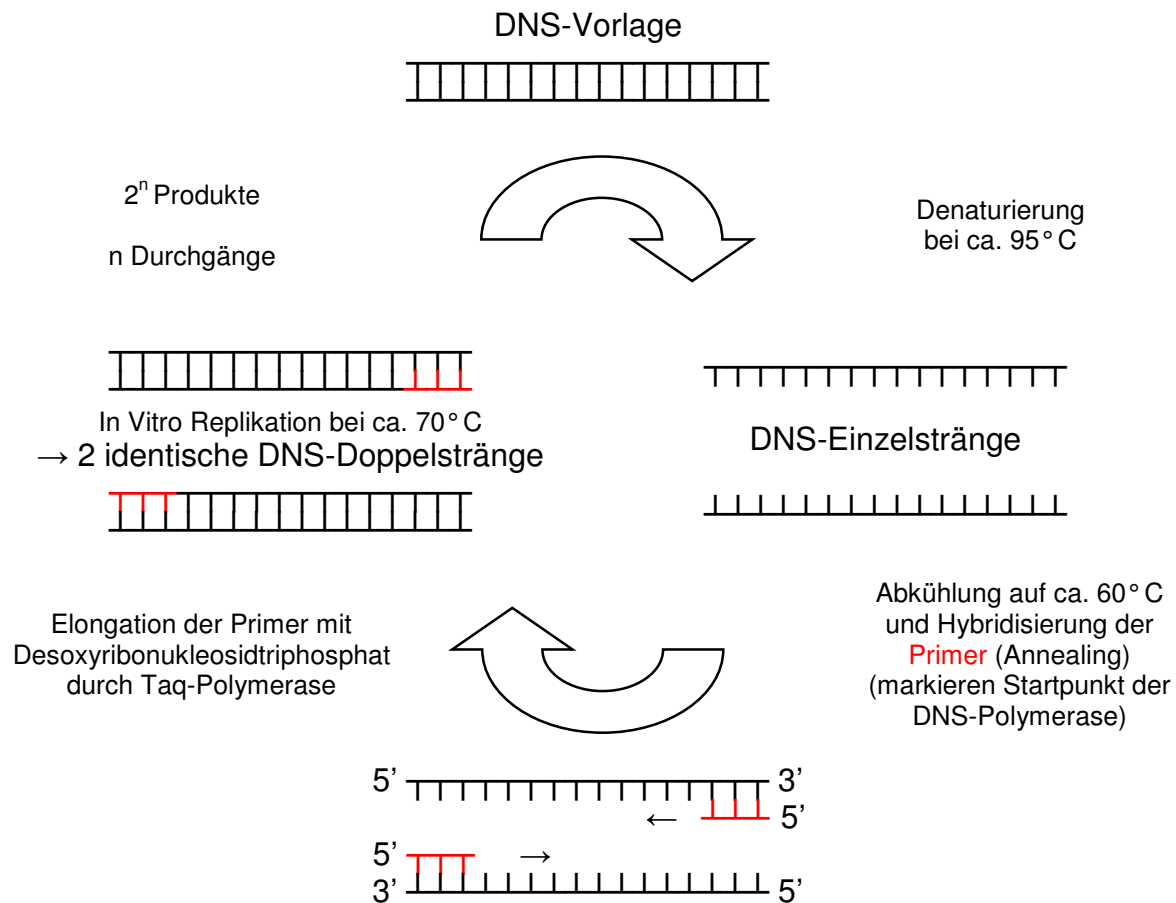


Abbildung 2 Schematische Darstellung der Polymerase-Chain-Reaktion (PCR)

2.2.2.2 Durchführung

Alle Genpolymorphismen der Patienten DNS wurden mittels der Polymerase-Chain-Reaktion bestimmt. Sowohl die Genotypen der Glutathion-S-Transferase M1 (GST-M1), der Glutathion-S-Transferase T1 (GST-T1), als auch des Cytochrom P-450 1A1 (Cyp P-450 1A1) wurden durch alleelspezifische Primer identifiziert.

Unter der Verwendung der Primer GST-M1 A: 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3' (spezifisch für des 5'-Ende von Exon 4) und GST-M1 B: 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3' (spezifisch für des 5'-Ende von Exon 5) ließen sich jeweils Amplifikationsfragmente mit einer Länge von 273 bp erstellen. Lag ein sogenanntes Null-Alleel vor (GST-M0/GST-M0), so existierte diese Region nicht; der Patient konnte kein GST-M1 exprimieren und kein Fragment war nachweisbar.

Mithilfe der Primer GST-T1: 5'-GAA CTC CCT GAA AAG CTA AAG C-3' und GST-T2: 5'-GTT GGG CTC AAA TAT ACG GTG G-3' erhielt man ein 480 bp Fragment, das bei GST-T1 negativen Patienten (Null-Allel) nicht vorhanden war. Als Positivkontrolle für das Vorliegen von DNS-Ausgangsmaterial in der Probe diente ein β -Interferon Gen mit einer Länge von 180 bp. Dieses wurde mit den Primern IFN 3: 5'-GGC ACA ACA GGT AGT AGG CG-3' und IFN 5: 5'-GCC ACA GGA GCT TCT GAC ACC-3' amplifiziert. Um etwaige Verunreinigungen seitens der benötigten Chemikalien und/oder Gefäße auszuschließen, wurde bei jedem Reaktionsansatz eine Negativkontrolle mitbestimmt, die alle Komponenten ausschließlich der DNS-Probe enthielt. Folgende Komponenten wurden verwendet:

Tabelle 1 Komponenten für die GST-M1 / GST-T1 / IFN Polymerase-Chain-Reaktion (PCR)

Komponente	Volumen für 20 Proben	Konzentration	Stoffmenge pro Ansatz
Desoxyribonukleosidtriphosphat	48 μ l		2,4 μ l
Wasser (destilliert)	172 μ l		8,6 μ l
Hot-Star-Taq	3 μ l	5 U/ μ l	0,75 U
MgCl ₂	6 μ l		0,3 μ l
PCR-Puffer	30 μ l		1,5 μ l
Primer GST-M1 A	10 μ l	5 μ M	2,5 pmol
Primer GST-M1 B	10 μ l	5 μ M	2,5 pmol
Primer GST-T 1	10 μ l	5 μ M	2,5 pmol
Primer GST-T 2	10 μ l	5 μ M	2,5 pmol
Primer IFN 3	3 μ l	5 μ M	0,75 pmol
Primer IFN 5	3 μ l	5 μ M	0,75 pmol

Verwendet wurden 15 μ l PCR-Ansatz und 2 μ l Ausgangs-DNS pro Probengefäß (0,2 ml PCR Tube).

Die Amplifikation der Proben-DNS für den Mutationsnachweis des Cytochrom P-450 1A1 Gens gelang mittels Primer Cyp P-450 1A1 /1 (5'-AAG AGG TGT AGC CGC TGC ACT-3') und Primer Cyp P-450 1A1 /2 (5'-TAG GAG TCT TGT CTC ATG CCT-3').

Man erhielt somit 335 bp Fragmente. Um auch hier etwaige Verunreinigungen auszuschließen, wurde bei jedem Reaktionsansatz eine Negativkontrolle mitbestimmt, die alle Komponenten ausschließlich der DNS-Probe enthielt. Folgende Komponenten wurden verwendet:

Tabelle 2 Komponenten für die Cyp P-450 1A1 Polymerase-Chain-Reaktion (PCR)

Komponenten	Volumen für 20 Proben	Konzentration	Stoffmenge pro Ansatz
Desoxyribonukleosidtriphosphat	128 µl		6,4 µl
Wasser (destilliert)	328 µl		16,4 µl
Hot-Star-Taq	8 µl	5 U / µl	2 U
PCR Puffer	64 µl		3,2 µl
Primer Cyp 1A1 /1	16 µl	5 µM	4 pmol
Primer Cyp 1A1 /2	16 µl	5µM	4 pmol

Verwendet wurden 26,6 µl PCR-Ansatz und 2 µl Ausgangs-DNS pro Probengefäß (0,2 ml PCR Tube).

Die in dieser Studie verwendete Taq-Polymerase von Quiagen wird in einem inaktiven Zustand geliefert. Dies hat zum Vorteil, dass bei Zimmertemperatur kein ungewollter Start der Hybridisierung stattfinden kann, da die Polymerase nur eine bestimmte Zeit aktiv ist. Sie wird am Anfang des PCR Zyklus einmalig 15 Minuten bei 95 °C aktiviert. Der Thermocycler wurde entsprechend programmiert.

Tabelle 3 Ablauf der GSTM, GSTT, IFN Amplifikation:

Prozess	Zeit (in min.)	Temperatur (in °C)	Wiederholung
Taq Aktivierung	15	95	1
Denaturierung	1	94	30
Annealing	1	61	
Elongation	1	72	
Finale Elongation	5	72	1
Kühlung	3	20	1
Pause		10	

Tabelle 4 Ablauf der Cyp P-450 1A1 Amplifikation:

Prozess	Zeit (in min.)	Temperatur (in °C)	Wiederholung
Taq Aktivierung	15	95	1
Denaturierung	1	94	34
Annealing	1	65	
Elongation	1	72	
Finale Elongation	5	72	1
Kühlung	10	25	1
Pause		10	

Ergab die Auswertung per Gelelektrophorese kein eindeutiges Ergebnis, wurden erneute Bestimmungen der entsprechenden Probe durchgeführt.

2.2.3 MspI Restriktion

2.2.3.1 Methodische Grundlagen

Restriktions-Endonukleasen sind eine Klasse von bakteriellen Enzymen die Phosphodiesterbindung von DNS an ganz bestimmten, für sie typischen Stellen, hydrolysieren können. Man erreicht somit ein Schneiden an vordefinierten Basensequenzen. Die Einhaltung spezifischer Reaktionsbedingungen, wie Zusatzstoffe und Temperatur, muss enzyspezifisch gesichert sein.

Heutzutage ist die Herstellung von Isoschizomeren möglich. Das sind Restriktions-Endonukleasen verschiedener Herkunft, die aber die gleiche Erkennungssequenz besitzen. In dieser Studie wurde das Isoschizomer MspI eingesetzt.

Die M1-Mutation bewirkt im Cyp P-450 1A1 Enzym einen Austausch von Thymin durch Cytosin. Ist eine solche Transition gegeben, schneidet (\downarrow) MspI die bp-Sequenz: 5'...C \downarrow CGG...3' bzw. 3'...GGC \downarrow C...5'. Besteht in der amplifizierten DNS ein homozygoter Cyp P-450 1A1 Genotyp (+/+), so liegt keine Basensubstitution vor. MspI schneidet folglich nicht. Das 335 bp Fragment bleibt erhalten. Existiert ein mutierter Genotyp (-/-), liegt der Basentausch vor - es entstehen 2 Fragmente mit den Längen von 206 bp und 129 bp. Liegt ein heterozygoter Genotyp vor (+/-), entstehen 3 Fragmente, mit den Längen von 206 bp und 129 bp des einen Allels (mutiert), sowie das 335 bp Fragment des anderen Allels (nicht mutiert).

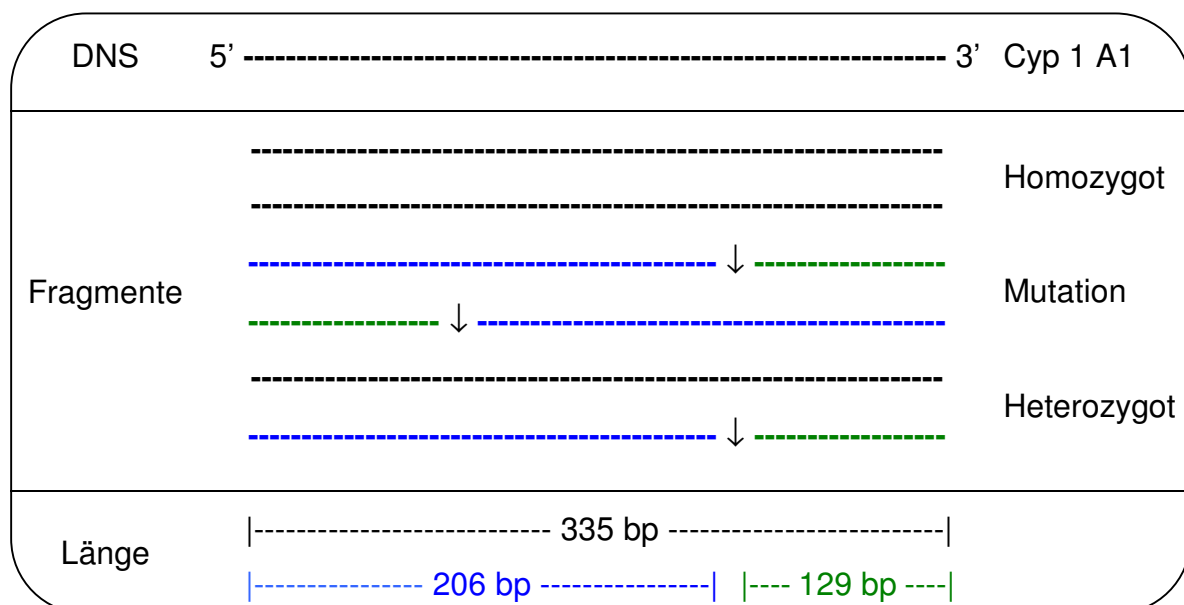


Abbildung 3 Schematische Schnittstellen der Cyp P-450 MspI Genpolymorphismen

2.2.3.2 Durchführung

Für die Identifikation des Cytochrom P-450 1A1 Genotypes, wurde nach der Amplifikation und Produktkontrolle mittels Gelelektrophorese eine Digestion mit dem Restriktionsenzym Msp I durchgeführt.

Tabelle 5 Komponenten für die Msp I Restriktion

Komponente	Volumen für 20 Proben	Konzentration	Stoffmenge pro Ansatz
Bovines Serum Albumin	20 µl	1 mg/ml	1 µg
Wasser (destilliert)	120 µl		6 µl
Msp I	50 µl		2,5 µl
NEB-Buffer 2	40 µl		2 µl

Verwendet wurden 11,5 µl Restriktions-Ansatz und 8 µl PCR-Produkt pro Probengefäß (1,5 ml Safe-Lock Tube).

Der Verdau lief anschließend 3 h bei 36 °C in einem Wärmeschrank ab. Um etwaige Verunreinigungen seitens der benötigten Chemikalien und/oder Gefäße auszuschließen, wurde auch an dieser Stelle bei jedem Reaktionsansatz eine Negativkontrolle mitbestimmt, die alle Komponenten ausschließlich der DNS-Probe enthielt. Als Positivkontrolle diente die dem MspI Verdau vorhergehende Gelelektrophorese der Amplifikationsprodukte.

2.2.4 Gelelektrophorese

Die qualitative Auswertung sowohl der GST-M1, GST-T1 Amplifikation als auch der Cyp-P-450 1A1 MspI Restriktion wurde anhand der Gelelektrophorese durchgeführt.

2.2.4.1 Methodische Grundlagen

Durch Anlegen einer elektrischen Spannung an ein Agarosegel wird eine Wanderung der negativ geladenen Nukleinsäuren in Richtung Anode erzwungen. Die Diffusionsgeschwindigkeit der DNS-Fragmente verhält sich umgekehrt proportional zur Länge der Basenpaare. Nach erfolgter Wanderung, werden die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichneten Nukleinsäuren durch UV Licht visualisiert und dadurch im Agarosegel lokalisiert. Als Farbstoff diente in dieser Studie Ethidiumbromid (1%), das bei einer Wellenlänge von 366 nm im UV-Licht sichtbar wird.

2.2.4.2 Durchführung

Für die Auswertungen der jeweiligen Genpolymorphismen diente ein 1,8 % Agarosegel. Dafür wurden 200 ml eines 10-fach TBE Puffers mit 1800 ml H₂O demin. versetzt. Anschließend wurden 2,52 g Agarose in 140 ml von diesem 1-fach TBE Puffer aufgekocht, nach Abkühlung auf 60 °C 15 µl Ethidiumbromid dazupipettiert, welches sich mittels eines Magnetrührers mit dem Agarosegel vermischte. Nach weiterer Auskühlung auf 55 °C wurde das flüssige Ethidiumbromidgel in eine horizontal ausgerichtete Gelkammer gegossen. Ein Gel-Kamm diente als Platzhalter für die Geltaschen, in die nach dem Aushärten die Proben pipettiert wurden. Weiteres 1-fach TBE diente als Laufpuffer, der den Kontakt mit den Elektroden herstellte. In jede Geltasche wurde ein Gemisch aus 15 µl PCR- bzw. Restriktions-Produkt und 3 µl BlueRun gegeben. Der blaue Farbstoff sorgte einerseits für die sichtbare Grenze der Laufbanden, das Glycerin hielt andererseits die DNS-Fragmente in der Gelkammer; dies führte zu exakteren DNS-Banden. Ein Längenstandard in der ersten und zwölften Geltasche diente zur Identifikation der DNS-Fragmente. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von ca. 120V für 50 Minuten. Pro Gel konnten so 18 Proben, zwei Längenstandarde und eine Negativkontrolle ausgewertet werden.

2.2.4.3 Qualitative Auswertung

Um die aufgetrennten Banden in der Gelmatrix sichtbar zu machen, wurde das Gel in der Photo-Kammer unter einer Videokamera ausgerichtet und mit UV-Licht bestrahlt; die so sichtbaren DNS-Banden wurden anschließend photographisch dokumentiert und ausgedruckt.

2.2.5 Statistische Auswertung

Patientendaten und Genotypen wurden in Excel-2000-Tabellen (Microsoft) verschlüsselt und mit Systat 10.2 (Systat Inc.) sowie WinSTAT (R. Fitch Software) ausgewertet.

Der Log-rank Test, auch als Cox Mantel Test bekannt, ist das Standardverfahren in der Überlebenszeitanalyse für einfache Gruppenvergleiche in klinischen Studien. Mit diesem nicht-parametrischen Test lässt sich statistisch überprüfen, ob das Mortalitätsrisiko in zwei oder mehr Gruppen verschieden ist. Alle Ereignisse werden als gleich gewichtete Größe (O - E) gemessen.

Die Ergebnisse statistischer Tests werden in der Regel als sogenannte p-Werte (p-values) angegeben. Der p-Wert ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein beobachteter Unterschied auf Zufall beruht, falls man annimmt, dass alle Therapiearten die gleiche Wirksamkeit haben, d.h. falls die Nullhypothese gilt. Inhalt der Nullhypothese ist es, dass zwei oder mehrere Verteilungen von Stichprobenwerten aus derselben Grundgesamtheit entnommen wurden.

Als Signifikanzniveau wurde $p = 0.05$ gesetzt.

Das Testverfahren zur Feststellung von signifikanten Unterschieden bei nominalen Skalen ist der Chi-Quadrat Test. Die Nullhypothese wird geprüft, indem die Verteilung der Häufigkeiten der Stichprobenwerte mit der theoretisch erwarteten Häufigkeit verglichen wird. Bei nominalskalierten Variablen ist der Chi-Quadrat Test nach Pearson entscheidend. Ein hoher Chi-Quadrat Wert deutet auf einen niedrigen Signifikanzwert also auf eine hohe Signifikanz. df bedeutet "degree of freedom" und bezeichnet die Anzahl der Variationsmöglichkeiten einer Variable; bei Kreuztabellen bezeichnet sie die Anzahl der Reihen minus 1 mal Anzahl der Spalten minus 1. Sie ist also ein Indikator für die Anzahl der Zellen. Ein hoher df-Wert macht einen hohen Chi-Quadrat Wert unsicher, da er aus kleinen Unterschieden zwischen vielen Zellen zusammengesetzt sein könnte. Zur Berechnung der Signifikanz muss der Freiheitsgrad folglich berücksichtigt werden.

Asymptotische Signifikanz ist das Signifikanzniveau auf der Grundlage der Annahme, dass der Datenumfang groß ist. Ist ein Datensatz klein verteilt, ist dies möglicherweise kein relevanter Hinweis auf Signifikanz.

Der t-Test ist eine Entscheidungsregel auf einer mathematischen Grundlage, mit deren Hilfe ein Unterschied zwischen den empirisch gefundenen Mittelwerten zweier Gruppen näher analysiert werden kann. Er liefert nur für intervallskalierte Daten zuverlässige Informationen. Die zentrale Frage des t-Tests lautet: Wie wahrscheinlich ist die empirisch gefundene oder eine größere Mittelwertsdifferenz unter allen möglichen rein theoretisch denkbaren Differenzen.

Der U-Test nach Wilcoxon, Mann und Whitney prüft über die Rangfolge, ob die Mittelwerte zweier Stichproben gleich sind. Er ist das verteilungsunabhängige Gegenstück zum t-Test und unempfindlich gegen Varianzunterschiede.

Die untersuchten Variablen Geschlechterverteilung, Lokalisation, Grading, TNM-Klassifikation, Tumorbehandlung, Tumorrezidiv, Noxen, Genstatus und Genkombination wurden mit dem Cox Mantel sowie t- und U-Testverfahren ausgewertet. Mittels Chi-Quadrat und der entsprechenden Signifikanz p wurde der Einfluss der Ergebnisse in Bezug auf die Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. das Rezidivvorkommen bestimmt.

Die Graphische Darstellung der untersuchten Variablen erfolgte mit dem Kaplan-Meier Plot.

3 Ergebnisse

3.1 Häufigkeitsverteilung und Signifikanzwert p der untersuchten Variablen

3.1.1 Gesamtzahl, Alter und Geschlecht

Diese Studie umfasst ein Patientenkollektiv von insgesamt 141 Patienten. Das Durchschnittsalter betrug 55,9 Jahre. 22 Patienten (16%) waren weiblich, 119 (84%) männlich (Verhältnis 1: 5.4).

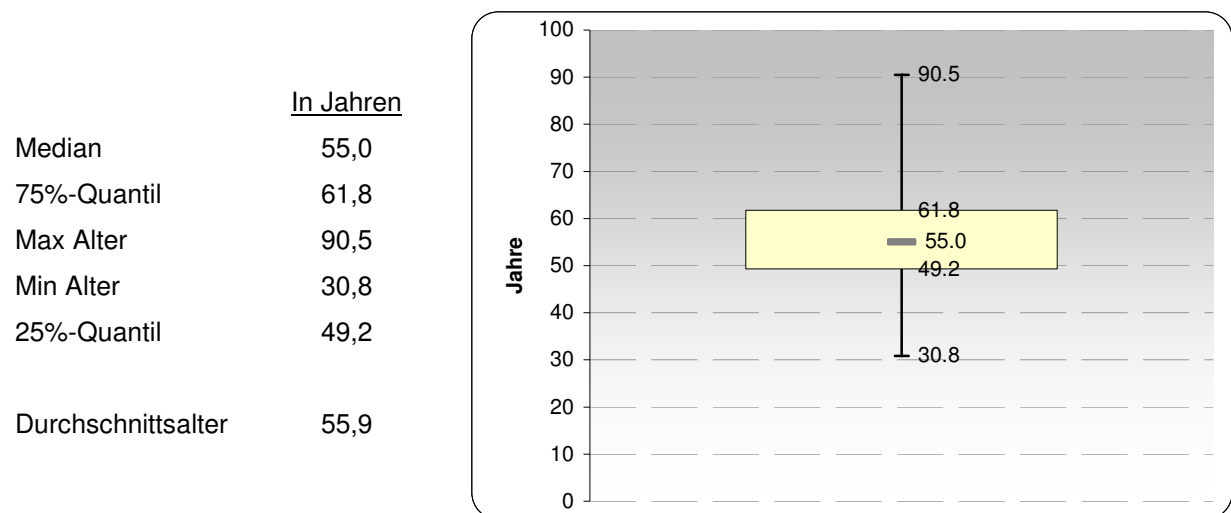


Abbildung 4 Altersverteilung bei Erstvorstellung

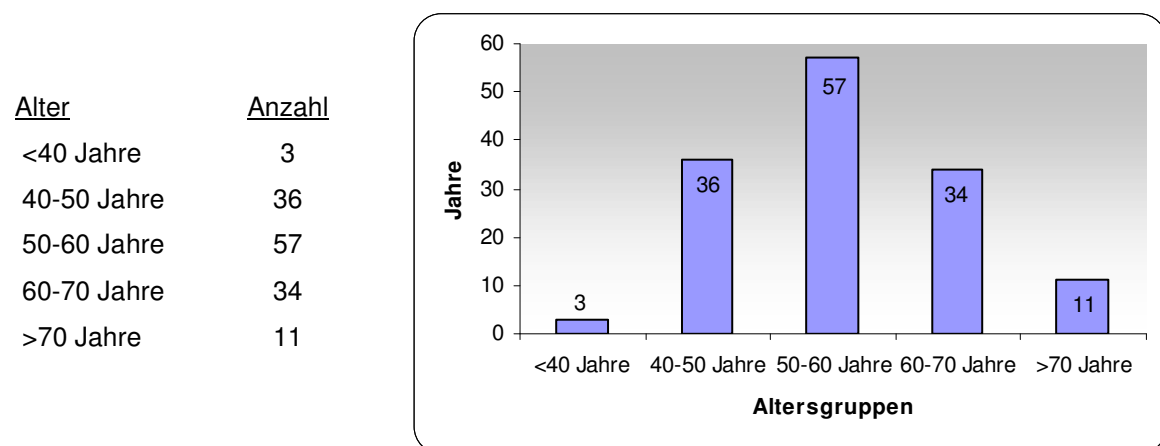


Abbildung 5 Altersverteilung bei Erstvorstellung

	<u>Anzahl</u>
weiblich	22
männlich	119
Verhältnis	1: 5,4

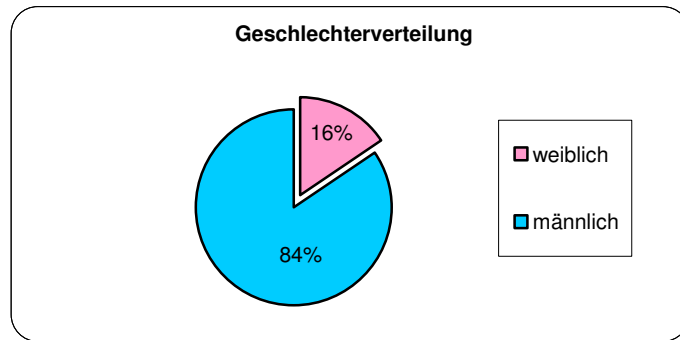


Abbildung 6 Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für die Geschlechterverteilung dieses Patientenkollektivs keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit.

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat 0,332 mit 1 df

Signifikanzwert p 0,564

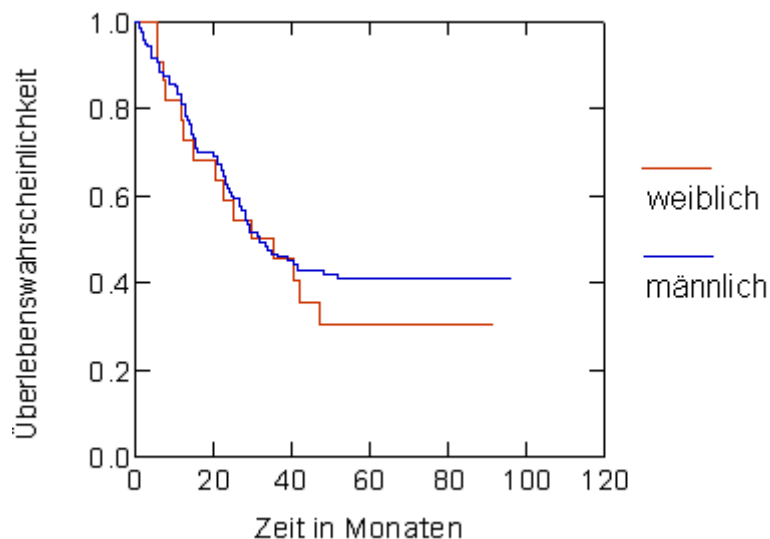


Abbildung 7 Kaplan-Meier Plot:

Überlebenswahrscheinlichkeit der Geschlechterverteilung

3.1.2 Tumortyp, Lokalisation , Grading und TNM-Klassifikation

Es wurden 141 Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals Bereich untersucht, diese waren bei 31 (22 %) in der Mundhöhle und bei 110 (78 %) im Oropharynx lokalisiert. Es wurden folgende Tumorstadien festgestellt: 21 Patienten hatten einen Tumor im Stadium T₁, 45 im Stadium T₂, 31 im Stadium T₃ und 44 im Stadium T₄. In 34 Fällen waren keine regionären Lymphknoten betroffen (N₀). Im weiteren zeigte sich bei 27 Patienten ein N₁-, bei 72 Patienten ein N₂- und bei sieben Patienten ein N₃-Lymphknotenbefall. Bei einem Patienten konnte die regionären Lymphknoten nicht beurteilt werden (N_x). Fernmetastasen wurden bei vier der Patienten diagnostiziert (M₁). Bei 21 Patienten zeigte sich ein hoher (G₁), bei 90 ein mittlerer (G₂) und bei 40 ein niedriger Differenzierungsgrad der Tumorzellen (G₃).

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für die Lokalisation des Tumors keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat	1,846 mit 1 df
Signifikanzwert p	0,174

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für den Differenzierungsgrad des Tumorgewebes G₁ bis G₃ keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat	2,361 mit 2 df
Signifikanzwert p	0,307

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für die Tumorstadien T₁ bis T₄ einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat 15,899 mit 3 df
Signifikanzwert p 0,001

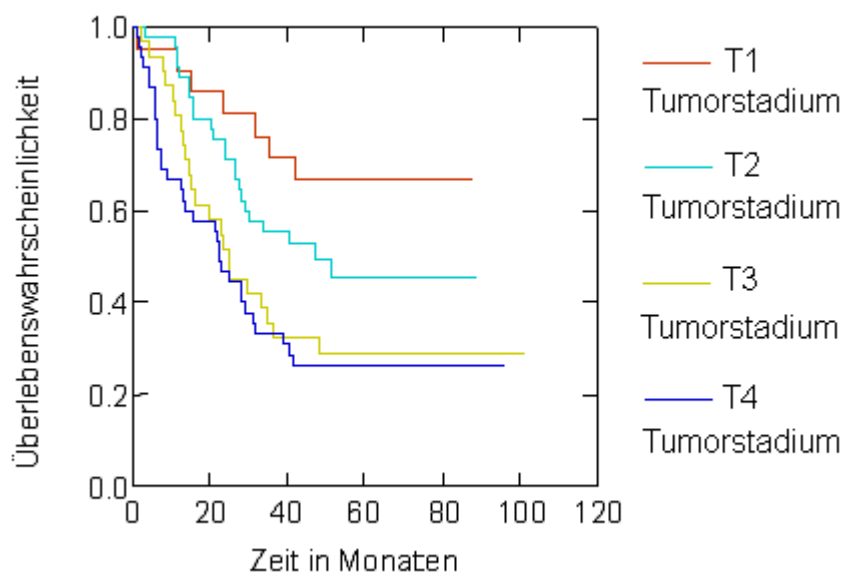


Abbildung 8 Kaplan-Meier Plot:

Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten hinsichtlich Tumorstadien

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für den Metastasenstatus M einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat 6,647 mit 2 df

Signifikanzwert p 0,036

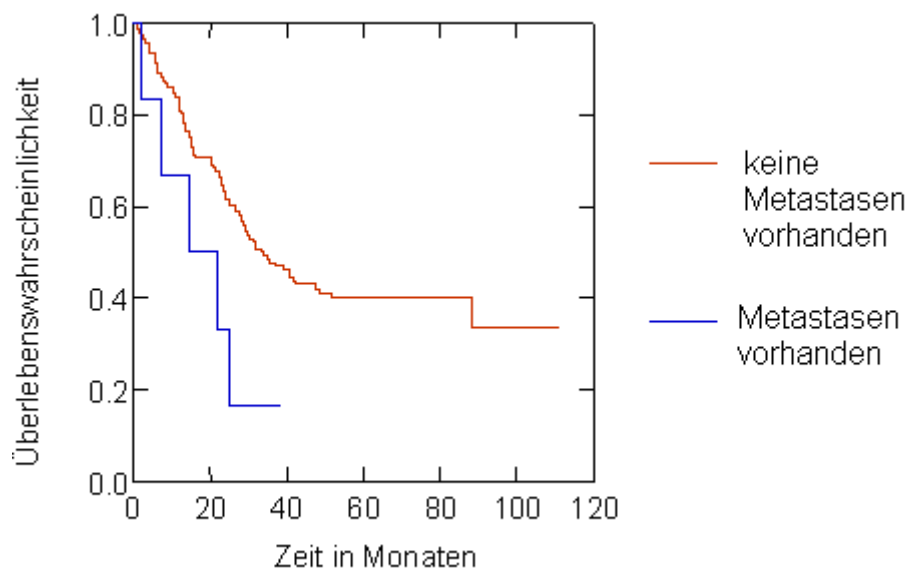


Abbildung 9 Kaplan-Meier Plot:

Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten hinsichtlich Metastasenstatus

3.1.3 Tumorbehandlung

In 64 Fällen wurde der Tumor operativ entfernt; 49 mit einem Resektionsstatus von R₀, 15 mit R₁. 54 wurden additiv, 10 nicht bestrahlt. 78 Patienten wurden nicht operiert; 72 wurden anstelle dessen bestrahlt. 6 Patienten erhielten keine Bestrahlung. Diese Studie belegte das bessere Outcome der operativ R₀ versorgten Patienten.

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für die Tumorversorgung einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat	11,621 mit 2 df
Signifikanzwert p	0,003

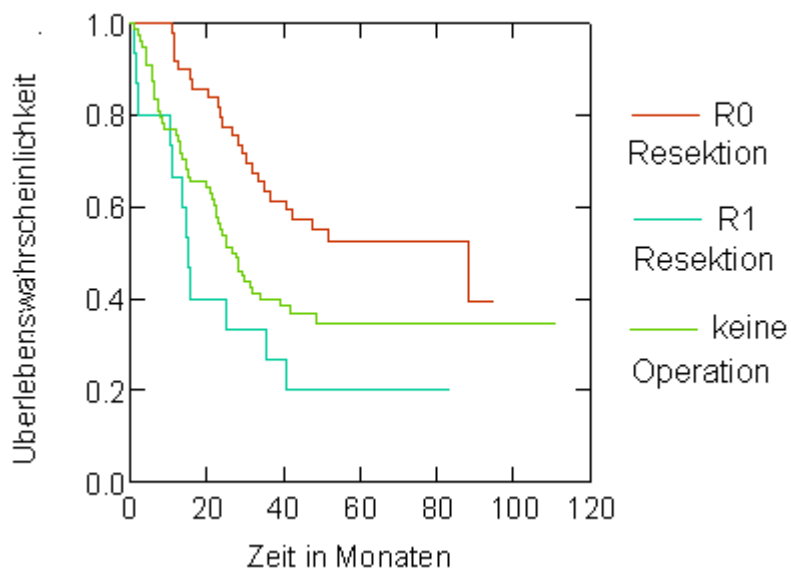


Abbildung 10 Kaplan-Meier Plot:

Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten hinsichtlich Tumorbehandlung

3.1.4 Beobachtungszeitraum, Rezidive und Überlebenszeiten

Der Beobachtungszeitraum lag zwischen Januar 1996 und Dezember 2003. Bei 90 Patienten wurde in dieser Zeit kein Rezidiv, bei 51 ein Rezidiv festgestellt. Es wurde in 74 Fällen eine rezidivfreie Zeit von unter 24 Monaten, in 67 Fällen eine über 24 Monaten verzeichnet. 85 Patienten verstarben im Beobachtungszeitraum, wovon bei 44 ein Rezidiv diagnostiziert wurde. 56 Patienten überlebten, 49 rezidivfrei. In 75 Fällen wurde eine Überlebenszeit von unter 3 Jahren, in 66 Fällen von über 3 Jahren festgestellt.

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für die Rezidivrate einen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat	20,936 mit 1df
Signifikanzwert p	0,00000474

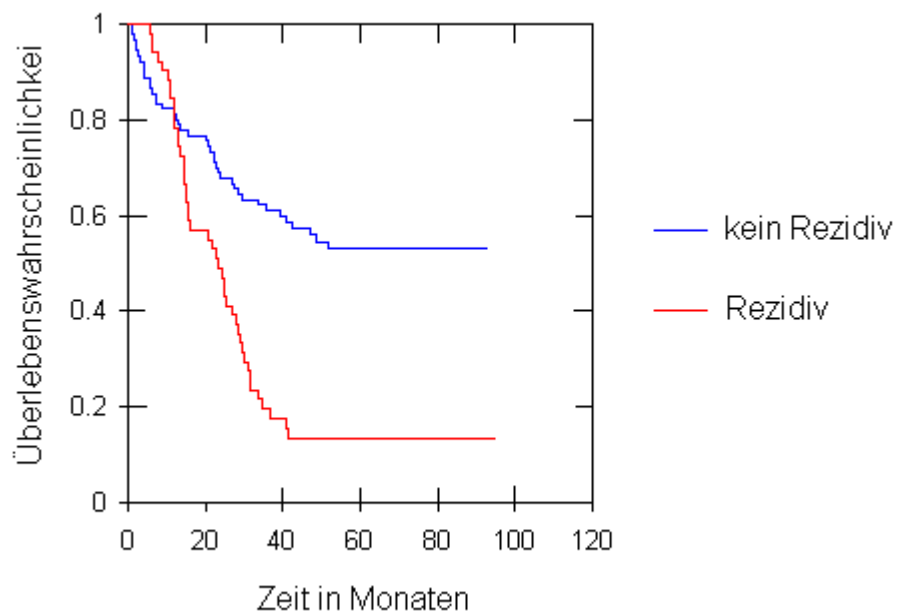


Abbildung 11 Kaplan-Meier Plot:

Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten hinsichtlich Rezidivrate

3.1.5 Noxen

18 Patienten gaben an weder Nikotin noch Alkohol zu konsumieren. Vier rauchten, tranken aber keinen Alkohol. 27 rauchten nicht, tranken aber Alkohol. 92 bestätigten den Konsum von Nikotin und Alkohol.

Noxen:

kein Nikotin / kein Alkohol:	n = 18
Nikotin / kein Alkohol:	4
kein Nikotin / Alkohol:	27
Nikotin / Alkohol:	92

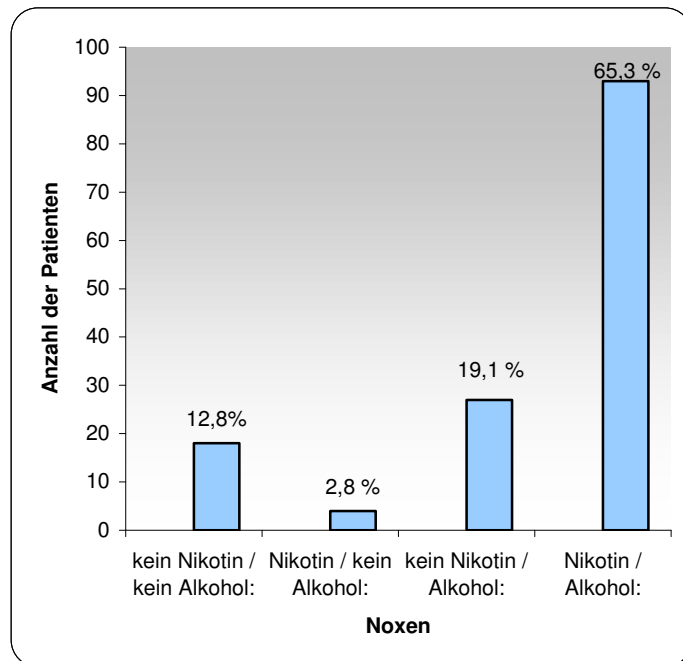


Abbildung 12 Verteilung der konsumierten Noxen des Patientenkollektivs

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für den Noxen-Konsum keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat	0,968 mit 2 df
Signifikanzwert p	0,616

3.1.6 Genstatus

3.1.6.1 Der Cyp P- 450 1A1 Genotyp

Nachdem in allen 141 Fällen ein Cyp P-450 1A1 Vorkommen in der Probe durch PCR Positivkontrolle gesichert wurde (Abb. 13), erbrachte der Nachweis mittels Msp I-Enzymverdau folgende Ergebnisse:

bei 106 Patienten (75,2 %) konnte ein 335 bp großes DNS-Fragment nachgewiesen werden, was typisch für den rein nicht-mutierten Zustand des Cyp 1A1 ist. Dies entspricht dem homozygoten Genotypen. Bei einem Patienten (0,7 %) konnte ein 129 und ein 206 bp langes DNS-Fragment dargestellt werden, welche die Mutation belegen. Bei 34 Patienten wurde ein 129 bp, ein 206 bp als auch ein 335 bp langes DNS-Fragment nachgewiesen. Diese Kombination belegt den heterozygoten Genotypen des Cyp P-450 1A1 Gens (Abb. 13, 14, 15).

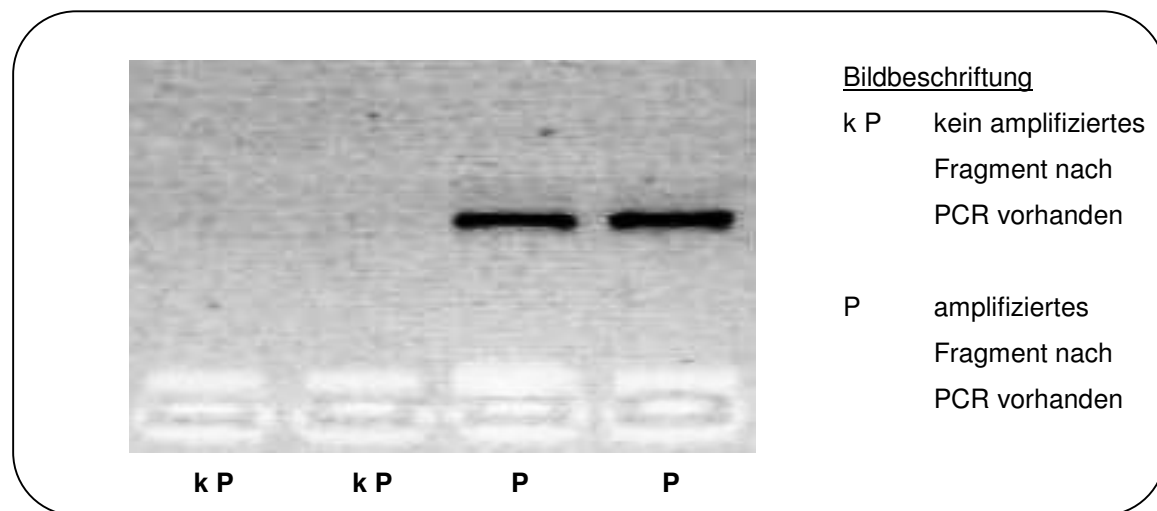


Abbildung 13 Beispiel einer Cyp P-450 1A1 PCR Positivkontrolle

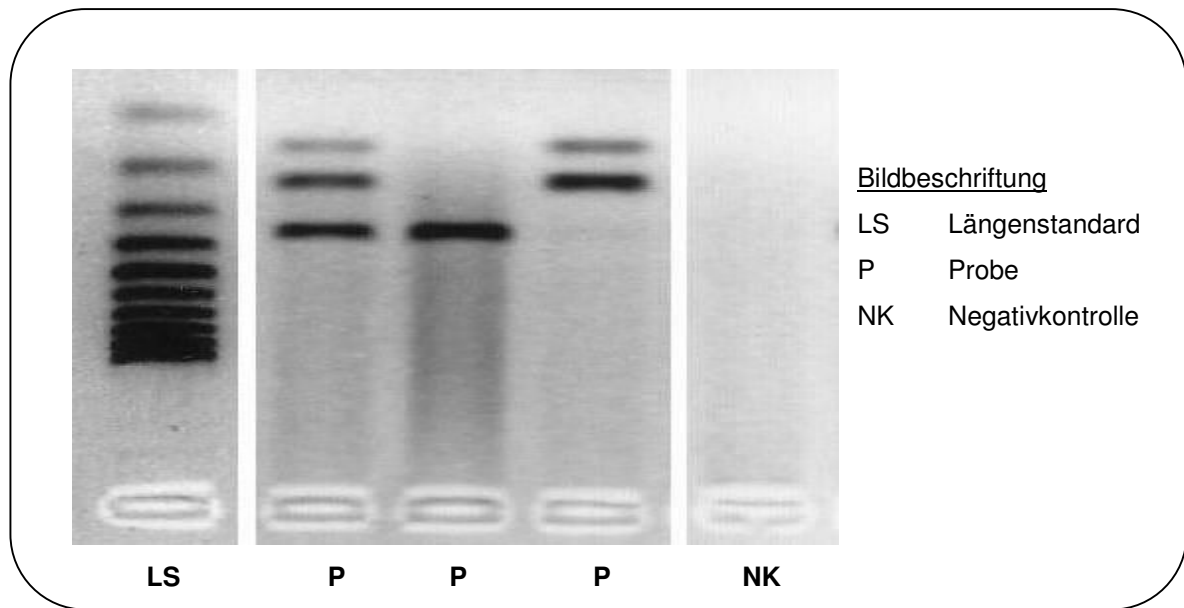


Abbildung 14 Beispiel einer Cyp P-450 1A1 MspI Elektrophorese

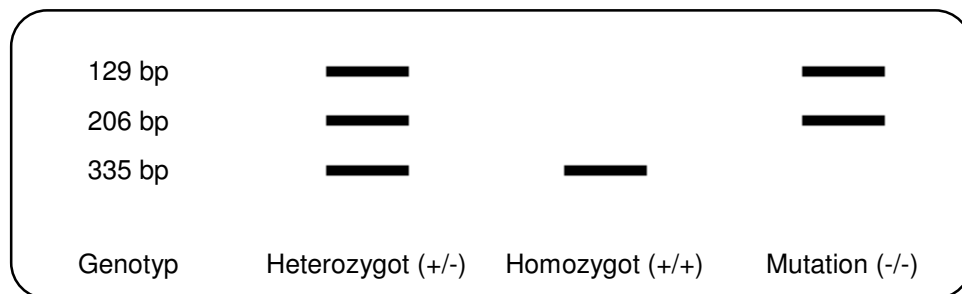


Abbildung 15 Auswertungsschema des Cyp P-450 MspI Genpolymorphismus

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für den Cyp P-450 1A1 Status keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat 0,654 mit 1 df

Signifikanzwert p 0,419

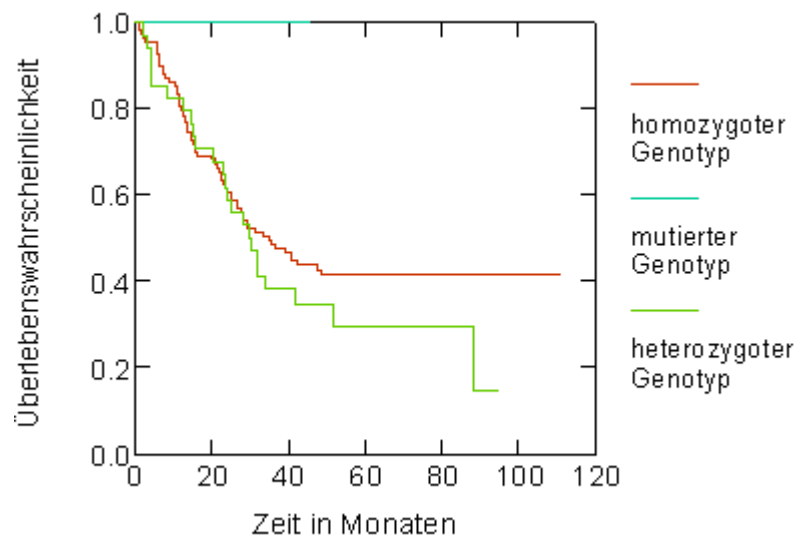


Abbildung 16 Kaplan-Meier Plot:

Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit Cyp P-450 1A1 Genstatus

3.1.6.2 Der GST-M1 Genotyp

Bei 57 der 142 Patienten (40,1 %) war die für das GSTM1-Gen typische 273 Basenpaare große Bande nicht nachweisbar, was dem Null-Genotyp entspricht. Bei 85 Patienten (59,9 %) war der Basenpaarnachweis positiv, was dem Eins-Genotyp entspricht (Abb. 18, 19).

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für den GST-M1 Status keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat 0,031 mit 1 df

Signifikanzwert p 0,860

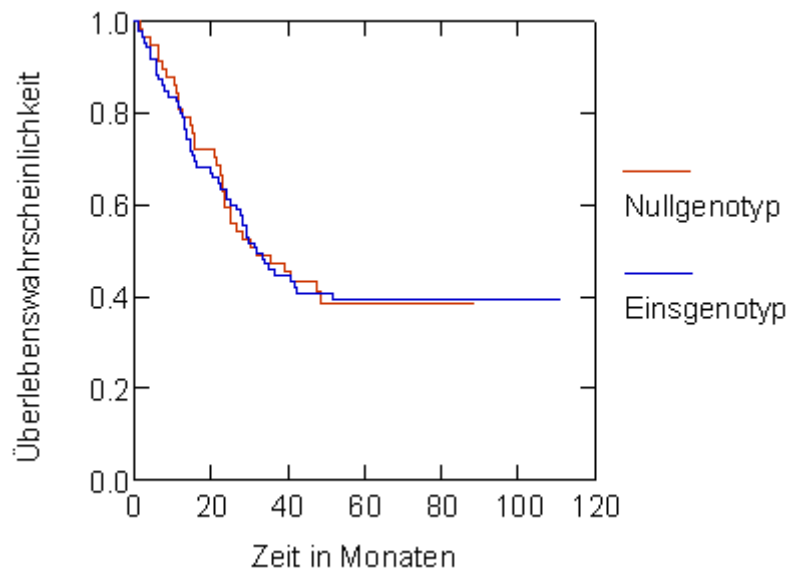


Abbildung 17 Kaplan-Meier Plot:

Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit GST-M1 Genstatus

3.1.6.3 Der GST- T1 Genotyp

Bei 34 der 142 Patienten (23,9 %) war die für das GSTM1-Gen typische 273 Basenpaare große Bande (Abb. 18) nicht nachweisbar, was dem Null-Genotyp entspricht. Bei 108 Patienten (76,1 %) war der Basenpaarnachweis positiv, was dem Eins-Genotyp entspricht (Abb. 18, 19).

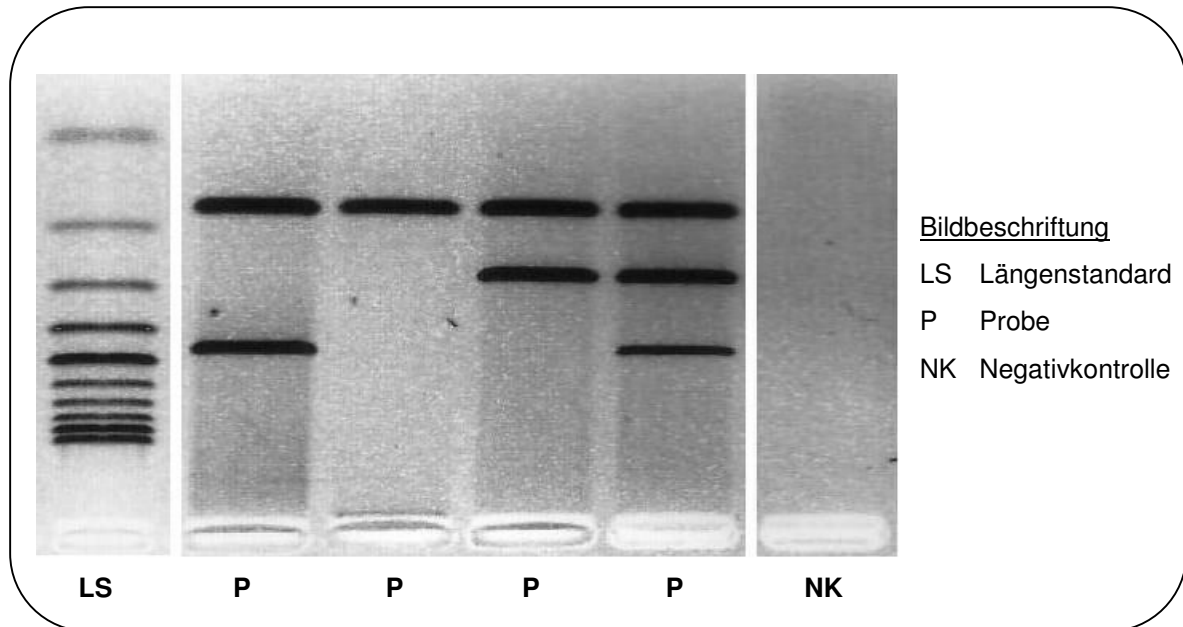


Abbildung 18 Beispiel einer GST-M1, GST-T1, IFN Elektrophorese

180 bp	IFN	—	DNS vorhanden
273 bp	GST-M1	—	GST-M1 Genotyp vorhanden
480 bp	GST-T1	—	GST-T1 Genotyp vorhanden

Abbildung 19 Auswertungsschema des GST-M1, GST-T1 Genpolymorphismus

Die Bande des als Positivkontrolle mitamplifizierten Interferongens war bei allen durchgeführten Untersuchungen nachweisbar, in den Negativkontrollen ohne DNA wurden keine Banden nachgewiesen.

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für den GST-T1 Status keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat	1,267 mit 1 df
Signifikanzwert p	0,260

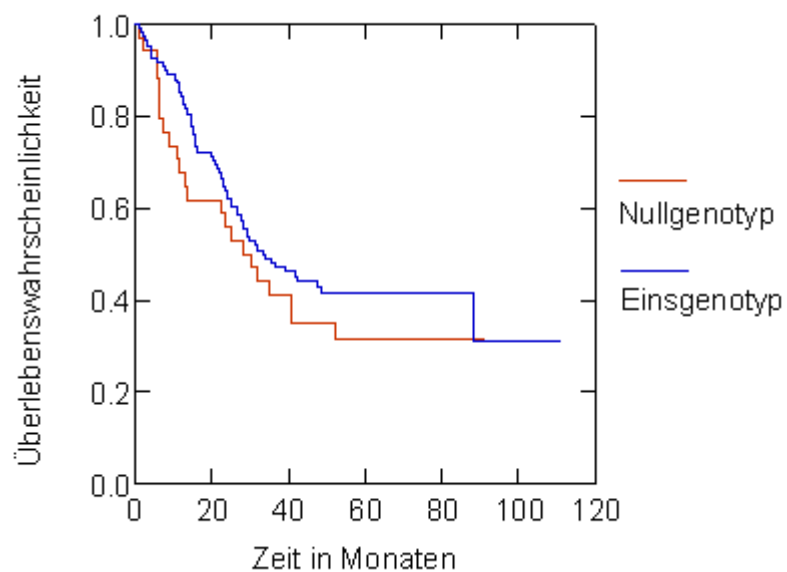


Abbildung 20 Kaplan-Meier Plot:

Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten mit GST-T1 Genstatus

3.1.6.4 Kombinationen der Cyp P-450 1A1, GST-M1 und GST-T1 Genotypen

Die Kombination der drei Genotypen ergab folgende Häufigkeitsverteilung:

Cyp P-450 1A1	GST-M1	GST-T1	KZiff	Anzahl
1	0	0	1	8
2	0	0	2	0
3	0	0	3	5
1	0	1	4	34
2	0	1	5	1
3	0	1	6	9
1	1	0	7	17
2	1	0	8	0
3	1	0	9	4
1	1	1	10	47
2	1	1	11	0
3	1	1	12	16

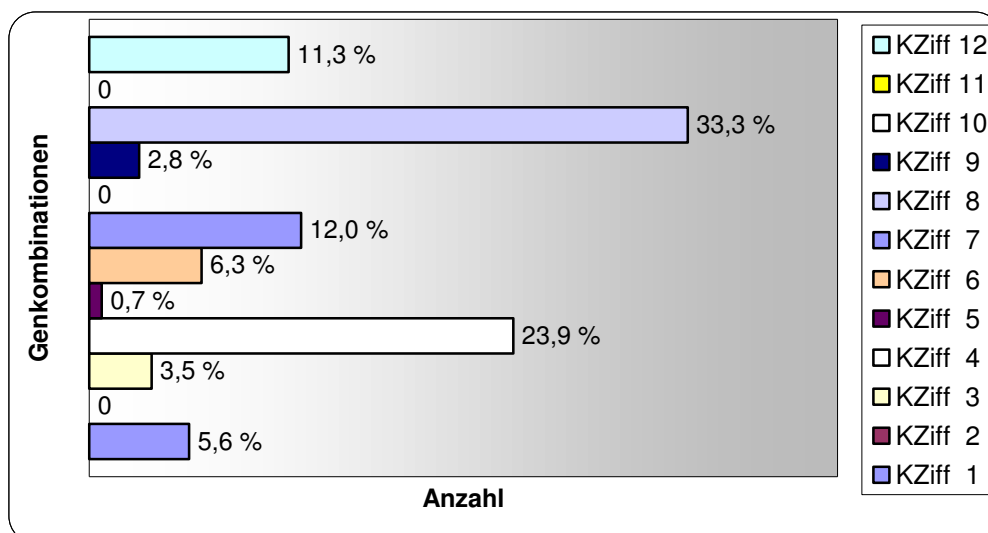


Abbildung 21 Verteilung der Genotypenkombinationen

Der ungestörte Ablauf der Biotransformation korreliert mit dem Reaktivitätszustand der Katalysatoren. Der theoretisch optimale Ablauf wäre ein normales Aktivitätsniveau des Phase I Enzyms (Cyp P-450 1A1) gefolgt von funktionsfähigen Phase II Enzymen (GST-M1 und GST-T1). Da durch Mutationen und Null-Genotypen der Detoxifikationsenzyme dieser Zustand verändert werden könnte, wurde in dieser Abhandlung der Einfluss eines theoretisch effektiven sowie ineffektiven Zustandes auf die Überlebenswahrscheinlichkeit untersucht.

Einteilung effektiver Ablauf (Gruppe 10 und 12):

Phase I	Cyp P-450 1A1 homozygot nicht mutiert oder heterozygot mutiert
Phase II	GST-M Eins-Genotyp GST-T Eins-Genotyp

Einteilung ineffektiver Ablauf (Gruppe 1,3,4,5,6,7 und 9):

Phase I	Cyp P-450 1A1 homozygot nicht mutiert, mutiert oder heterozygot mutiert
Phase II	GST-M Null-Genotyp und GST-T Null-Genotyp GST-M Eins-Genotyp und GST-T Null-Genotyp GST-M Null-Genotyp und GST-T Eins-Genotyp

Der objektive Vergleich kumulativer Überlebensraten ergab für diese Kombination keinen signifikanten Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit:

Log-rank Test (Cox Mantel)

Chi-Quadrat 0,088 mit 1 df

Signifikanzwert p 0,767

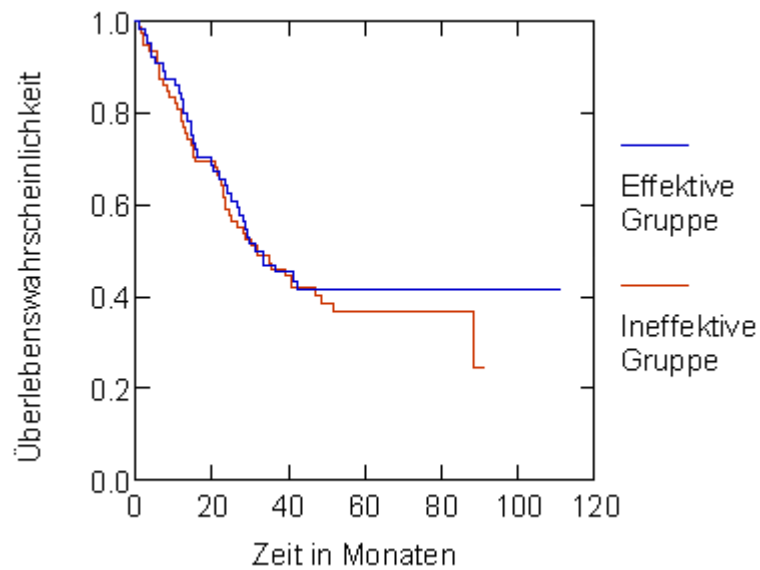


Abbildung 22 Kaplan-Meier Plot:

Überlebenswahrscheinlichkeit der Genotypenkombinationen

3.1.6.5 Rezidivvorkommen in den Genotypengruppen

Das Vorkommen von Rezidiven hat eine signifikante Auswirkung auf die Überlebenswahrscheinlichkeit (siehe Kapitel 3.1.4).

Das Rezidivvorkommen der Cyp P-450 1A1 -, GST-M1 sowie GST-T1 Genotypen wurde mittels dem unabhängigen t-Test bzw. U-Test untersucht.

Hierbei zeigte sich keine signifikante Häufung des Rezidivvorkommens bezogen auf die Gruppeneinteilung Cyp P-450 1A1 -, GST-M1 sowie GST-T1 Genotypen:

Häufung des Rezidivvorkommens Cyp P-450 1A1 Genotyp:

t-Test (homogen)

Freiheitsgrade	139
Signifikanzwert p	0,131

U-Test (Mann-Whitney)

Signifikanzwert p	0,131
-------------------	-------

Häufung des Rezidivvorkommens GST-M1 Genotyp:

t-Test (homogen)

Freiheitsgrade	139
Signifikanzwert p	0,656

U-Test (Mann-Whitney)

Signifikanzwert p	0,654
-------------------	-------

Häufung des Rezidivvorkommens GST-T1 Genotyp:

t-Test (homogen)

Freiheitsgrade	139
Signifikanzwert p	0,776

U-Test (Mann-Whitney)

Signifikanzwert p	0,774
-------------------	-------

3.1.6.6 Rezidivvorkommen in der Genotypenkombination

Die theoretische Einteilung der effektiven und ineffektiven Biotransformationsgruppe wurde auf ein erhöhtes Rezidivvorkommen mittels unabhängigem t-Test bzw. U-Test untersucht.

Hierbei zeigte sich keine signifikante Häufung des Rezidivvorkommens bezogen auf die Gruppeneinteilung effektiv / ineffektiv:

t-Test (homogen)

Freiheitsgrade	139
Signifikanzwert p	0,439

U-Test (Mann-Whitney)

Signifikanzwert p	0,437
-------------------	-------

4 Diskussion

4.1 Wissenschaftlicher Hintergrund und Fragestellung

Im Jahre 2005 bekannten sich 32,2% der männlichen und 22,4% der weiblichen deutschen Bevölkerung im Alter von 15 und mehr Jahren dazu Raucher zu sein [44]. Der Verbrauch an reinem Alkohol je Einwohner betrug im Vorjahr 10,1 l [32]. Die chronische Zufuhr von Alkohol und Nikotin stellt die Hauptursache in der Entstehung von Kopf-, Hals-Tumoren dar [6, 28]. Permanenter Zigarettenkonsum ist mit der Entstehung von Larynxkarzinomen im Bereich der Glottis, Alkoholabusus mit der Entwicklung von Karzinomen in Mundhöhle, Oropharynx, Hypopharynx sowie im supraglottischen Larynx assoziiert [1, 6, 20, 41]. Jährlich werden weltweit etwa 500000 Plattenepithelkarzinome diagnostiziert. In den USA und Europa besitzen sie eine Inzidenz von 5 % [4, 9]. Trotz stetig verbesserten Behandlungsmethoden scheint die 5 Jahres-Überlebensrate konstant zu bleiben [19, 33]. Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen 55 und 65 Jahren, mit einer Geschlechtsverteilung Frauen zu Männern von 1:5 [4, 33]. Beobachtungen, dass nicht alle Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren einen chronischen Alkohol oder Nikotin - Abusus haben, sowie die Tatsache, dass einige Patienten bereits zwischen 30 und 40 Jahren erkranken, lässt Rückschlüsse auf eine interindividuelle Entgiftungskapazität zu [12, 18, 22]. Der Zusammenhang von Genpolymorphismen der Detoxifikationsenzyme Cytochrom P-450 Monooxygenase sowie Gluthadion-S-Transferase M1 bzw. T1 und der Entstehung von Tumoren im Kopf-Hals-Bereich wurde mehrfach wissenschaftlich untersucht [1, 11, 20, 29, 30, 37, 40, 41]. Inwieweit Mutationen dieser Entgiftungsenzyme, einzeln oder im Cluster betrachtet, Einfluss auf das Outcome der Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren haben, wurde in dieser Abhandlung untersucht. Aussagen diesbezüglich sind für die optimierte Behandlung von Kopf-, Hals-Tumoren von Interesse.

4.2 Methodik und Ergebnisse

Die DNS von 141 Patienten, gewonnen aus paraffinfixiertem Tumorgewebe, wurde mittels spezifischer Primer und Restriktions-Endonukleasen auf das Vorhandensein von Genpolymorphismen der Entgiftungsenzyme Cyp P-450 1A1, GST-M1 und GST-T1 untersucht. Für die Überlebenswahrscheinlichkeit relevante Faktoren wie Alter, Geschlecht, Tumortyp, Lokalisation, TNM-Klassifikation, Grading, Tumorrezidiv, Noxen-Konsum, Genstatus sowie mögliche Kombinationen der Mutationen wurden zusätzlich statistisch erfasst. Für die statistische Überlebenszeitanalyse wurden anhand des Cox Mantel Testverfahrens der Chi-Quadrat Wert und die Signifikanz p bestimmt. Die Signifikanz p für das Rezidivvorkommen in den Genotypengruppen wurde mittels t-Test sowie U-Test (Mann-Whitney) ermittelt.

Die Alters- und Geschlechterverteilung dieser Abhandlung entsprach vergleichbarer epidemiologischen Studien [6].

Der Anteil an Patienten die einen Alkohol- oder Nikotinkonsum verneinten war mit 12,8 % in dieser Untersuchung relativ hoch. Laut Blot et al. liegt dieser bei 5 – 7 % [6, 29, 30].

Ein signifikanter Einfluss von Geschlechterverteilung, Tumorlokalisierung, Lymphknotenbefall, Grading, Noxen sowie Genpolymorphismen der Detoxifikationsenzyme auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren konnte nicht nachgewiesen werden.

Der Einfluss der Tumorstadien (T_1 - T_4) auf das Outcome konnte mit einem Signifikanzwert von $p = 0.001$ belegt werden.

Der Metastasenstatus (M_0 – M_1) stellt einen wichtigen Überlebensfaktor mit $p = 0.036$ dar.

Die Tumorversorgung, d.h. operative Versorgung vs. Bestrahlung, zeigte einen signifikanten Vorteil des operativen R_0 Verfahrens mit $p = 0.003$.

Das Auftreten von Tumorrezidiven hat mit einer Signifikanz von $p = 0.00000474$ einen sehr hohen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit.

Eine signifikante Häufung des Rezidivvorkommens bezogen auf die Gruppeneinteilung der Cyp P-450 1A1 -, GST-M1 -, GST-T1 Genotypen sowie auf die Kombination der Genotypen bezüglich effektive / ineffektive Biotransformation konnte nicht belegt werden.

Schwerpunkt dieser Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von Genpolymorphismen von Detoxifikationsenzymen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren. In vorbestehenden Studien wurden Auswirkungen von Mutationen des Cytochrom P-450 1A1 Gens auf die Tumorentstehung bei z. B. aktivem und passivem Tabakkonsum belegt [35, 36, 45].

Ebenfalls konnte der Einfluss von Veränderungen in den Glutathion - S - Transferase-Genen belegt werden [1, 2, 20, 23, 24, 26, 34, 41].

Ausgehend von der Annahme, dass ein erhöhtes Erkrankungsrisiko auch mit einem verändertem Outcome zusammenhängen könnte, wurde diese These in der vorliegenden Abhandlung untersucht.

Mit dieser Studie konnte gezeigt werden, dass Genpolymorphismen der Detoxifikationsenzyme Cyp P-450, GST-M1 und GST-T1 isoliert und im Cluster betrachtet keinen Einfluss auf das Outcome bei Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren haben.

Die Polymorphismen dieser Enzyme sind wichtige aber nicht die einzigen risikorelevanten Faktoren in der Entstehung von Kopf-, Hals-Tumoren. Es ist anzunehmen, dass nicht alle Detoxifikationsenzyme mit Untergruppen der Biotransformation erforscht und ausgewertet wurden. Aktuelle Studien belegen den Einfluss von Mutationen der Alkoholdehydrogenase-3, GSTM2, GSTM3, GSTP1, Cyp 2D6, Cyp2E1 und N-Azetyltransferase Gene. Aber auch die Untersuchungen der bisher bekannten Polymorphismen sind im Bezug auf das Erkrankungsrisiko bzw. auf das Outcome nicht einheitlich oder können einen Zusammenhang nicht nachweisen [3, 38].

4.3 Methodenkritik

Der Nachweis der zu untersuchenden Genabschnitte mittels PCR zeigte, dass bei in Paraffin fixierten Gewebestücken, zusammenhängende Basenpaare mit einer Länge von bis zu ca. 500 bp amplifiziert werden konnten. Bei 141 Patienten konnte ein 335 bp Cyp P-450 1A1 Fragment, ein 273 bp GST-M1 bzw. ein 480 bp GST-T1 Fragment mittels spezifischer Primer amplifiziert werden.

Bei 12 Patienten konnte kein 335 bp Cyp P-450 1A1 Fragment, bei 19 weder ein 335 bp Cyp P-450 1A1 Fragment noch ein 480 bp GST-T1 Fragment, trotz positiven DNS Nachweises mittels IFN-Kontrolle, ermittelt werden. Demzufolge wurden diese 31 Patienten nicht in die Statistische Untersuchung aufgenommen.

Ursache hierfür könnte sein, dass die DNS des Gewebes während des Fixationsvorganges in Paraffin unregelmäßige Strangbrüche erleidet und so keine genügend langen DNS-Stränge vorhanden sind, die amplifiziert werden könnten. Die Studie von Blömeke et al. favorisiert deshalb für diese Art von DNS Untersuchung tiefgefrorenes und nicht paraffinfixiertes Ausgangsmaterial [5].

4.4 Konsequenzen

Tabakrauch sowie Fehl- und Überernährung stellen neben substanzspezifischen Tumorrisiken an Arbeitsplätzen die wichtigsten exogenen Krebsrisikofaktoren da [6, 28]. Nachweislich beeinflussen genetische Faktoren das individuelle Erkrankungsrisiko [22]. Studien an Verwandten ersten Grades erbrachten ein signifikant höheres Risiko einen Tumor im Kopf-Hals-Bereich zu entwickeln, als in der Normalbevölkerung [12]. Die genetische Prädisposition zeigt sich auch bei Personen, die ohne Karzinogenexposition einen Tumor entwickeln [22]. Die Überlegung, dass diese genetischen Faktoren auch Einfluss auf das Outcome bei Tumorpatienten zu haben scheinen ist Bestandteil dieser Abhandlung.

Diese Untersuchung zeigt jedoch, dass kein signifikanter Zusammenhang von Mutationen der Detoxifikationsenzyme Cyp P-450 1A1, GST-M1 und GST-T1 auf das Outcome von Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren besteht.

Auch die theoretisch relevante Kombination von Mutationen im Ablauf der Biotransformation ließ keinen Zusammenhang erkennen.

Cyp P-450 1A1, GST-M1 und GST-T1 stellen nur einige der verschiedenen Enzyme der Biotransformation dar. Es müssten weitere Studien erfolgen, die den eventuellen Einfluss anderer relevanter Entgiftungsenzyme, einzeln und im Cluster betrachtet, auf das Outcome bei Tumorpatienten untersuchen, da sicher nicht alle Detoxifikationseenzyme mit Untergruppen der Biotransformation erforscht und ausgewertet werden konnten.

Nicht nur Mutationen von Detoxifikationseenzymen, sondern auch Lebensgewohnheiten stellen neben den Behandlungsmöglichkeiten wichtige Faktoren für das Outcome bei Tumorpatienten dar. Demark-Wahnefried et al. belegten den Zusammenhang von Wandel der Lebensgewohnheiten und der Überlebensrate bei Tumorpatienten. Alter, Geschlecht und Bildungsgrad stellen wichtige Faktoren für die Einsicht und Durchführbarkeit da. Ändern Patienten auch nach der Tumordiagnose und Behandlung ihre Lebensgewohnheiten nicht ausreichend, können diese weiterhin einen negativen Einfluss auf das Outcome ausüben [15].

Es ist anzunehmen, dass ein Zusammenspiel verschiedener für den Krankheitsverlauf entscheidender Faktoren wie beispielsweise Genpolymorphismen, die Tumorausbreitung und der Metastasenstatus aber auch der Allgemeinzustand bedingt durch Lebensgewohnheiten und Ernährungsweisen [15] als auch der Hormonstatus [17] des Patienten für das Outcome verantwortlich sind.

Da das Ausmaß der entscheidenden Faktoren in der Tumorentstehung und Outcome-Beeinflussung weder bekannt noch aktuell einzugrenzen ist, bleibt auch diese Untersuchung nur ein Teil des Ganzen im Bemühen, die Zusammenhänge der Entstehung von Kopf-, Hals-Tumoren aus der Sicht der Genetik zu verstehen.

5 Zusammenfassung

Die Detoxifikation von Noxen findet auf zellulärer Ebene in zwei Phasen statt. Vertreter der Phase I ist die Monooxygenase Cytochrom P-450 (Cyp P-450 1A1). Genpolymorphismen verstärken die Aktivität dieses Enzyms. Somit fallen schneller Phase-I-Produkte an, die aufgrund ihrer Reaktivität potentiell zelltoxisch sind. Vertreter der Phase II sind die Gluthation-S-Transferasen (GST-M1 und GST-T1). Sie koppeln Phase-I-Produkte an multipolare Moleküle, um somit die Ausscheidbarkeit zu gewährleisten. Veränderungen in der Genstruktur verringern die Effektivität dieser Enzyme. Phase-I-Produkte können demzufolge nicht oder nur langsam abgebaut werden. Inwieweit dieser Zustand Einfluss auf das Outcome hat, war Ziel dieser Abhandlung.

Das Kollektiv betrug 141 Patienten. Auswahlkriterium war die Behandlung eines Plattenepithelkarzinoms der Mundhöhle oder des Oropharynx zwischen 1996 und 2000 im Klinikum für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde Ulm. Ausgangsmaterial war in Paraffin fixiertes Tumorgewebe. Die Identifikation des Cytochrom P-450 1A1 Genotypes, wurde anhand der PCR und dem Restriktionsenzym Msp I durchgeführt. Die Genotypen GST-M / GST-T – Transferasen wurden ebenfalls mithilfe der Polymerase-Chain-Reaktion (PCR) bestimmt.

Ein signifikanter Einfluss von Genpolymorphismen von Detoxifikationsenzymen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten mit Kopf-Hals Tumoren konnte für die untersuchten Variablen Alter, Geschlecht, Tumortyp, Lokalisation, Lymphknotenbefall (N), Tumorausbreitung, Klassifikation, Grading, Rezidive, Noxen-Konsum, Genotypen sowie mögliche Kombinationen der Mutationen nicht nachgewiesen werden. Der Einfluss des Tumorstadiums ($T_1 - T_4$) auf das Outcome konnte mit einem Signifikanzwert von $p = 0.001$ nachgewiesen werden. Der Metastasenstatus ($M_0 - M_1$) stellt einen wichtigen Überlebensfaktor mit $p = 0.036$ da. Die Tumorversorgung, d.h. operative Versorgung vs. Bestrahlung, zeigte einen signifikanten Vorteil des operativen R_0 Verfahrens mit $p = 0.003$. Das Auftreten von Tumorrezidiven hat mit einer Signifikanz von $p = 0.00000474$ einen sehr hohen Einfluss auf die Überlebenswahrscheinlichkeit.

Eine signifikante Häufung des Rezidivvorkommens bezogen auf die Gruppeneinteilung der Cyp P-450 1A1 -, GST-M1 -, GST-T1 Genotypen sowie auf die Kombination der Genotypen bezüglich effektive / ineffektive Biotransformation konnte nicht belegt werden.

Der Einfluss von Genpolymorphismen bei Detoxifikationsenzymen auf die Entstehungswahrscheinlichkeit von Kopf-Hals Tumoren konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. Mit diese Arbeit konnte gezeigt werden, dass isoliert betrachtete Genpolymorphismen der Detoxifikationsenzyme Cyp P-450, GST-M1 und GST-T1 keinen Einfluss auf das Outcome bei Patienten mit Kopf-, Hals-Tumoren haben. Auch für die Kombination der verschiedenen Aktivitätszustände der Biotransformationsenzyme konnte kein signifikanter Einfluss nachgewiesen werden. Es ist anzunehmen, dass ein Zusammenspiel verschiedener für den Krankheitsverlauf entscheidender Faktoren wie beispielsweise Genpolymorphismen, die Tumorausbreitung und der Metastasenstatus aber auch der Allgemeinzustand bedingt durch Lebensgewohnheiten und Ernährungsweisen als auch der Hormonstatus des Patienten für das Outcome verantwortlich sind.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Acar H, Ozturk K, Muslumanoglu MH, Yildirim MS, Cora T, Cilingir O, Ozer B: Relation of glutathione S-transferase genotypes (GSTM1 and GSTT1) to laryngeal squamous cell carcinoma risk. *Cancer Genet and Cytogenetics* 169: 89-93 (2006)
- [2] Bell DA, Taylor JA, Paulson DF, Robertson CN, Mohler JL, Lucier GW: Genetic risk and carcinogen exposure: a common inherited defect of the carcinogen-metabolism gene glutathione S-transferase M1 (GSTM1) that increases susceptibility to bladder cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 85: 1159-1164 (1993)
- [3] Biselli JM, de Angelo Calsaverini Leal RC, Ruiz MT, Goloni-Bertollo EM, Maníglia JV, Rossit AR, Pavarino-Bertelli EC: GSTT1 and GSTM1 polymorphism in cigarette smokers with head and neck squamous cell carcinoma. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia (Engl Ed)* 72: 654-658 (2006)
- [4] Blitzer PH: Epidemiology of head and neck cancer. *Seminars in Oncology* 15: 2-9 (1988)
- [5] Blomeke B, Bennett WP, Harris CC, Shields PG: Serum, plasma and paraffin-embedded tissues as sources of DNA for studying cancer susceptibility genes. *Carcinogenesis* 18: 1271-1275 (1997).
- [6] Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF: Smoking and drinking in relation zu oral and pharyngeal cancer. *Cancer Research Journal* 48: 3282-3287 (1988)
- [7] Board P, Coggan M, Johnston P, Ross V, Suzuki T, Webb G: Genetic heterogeneity of the human glutathione transferases: a complex of gene families. *Pharmaceutical Therapie* 48: 357-369 (1990)
- [8] Board PG: Biochemical genetics of glutathione S-transferase in man. *American Journal of Human Genetics* 33: 36-43 (1981)

-
- [9] Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S: Cancer statistics CA: A Cancer Journal for Clinicians 44: 7-26 (1994)
- [10] Cascorbi I, Brockmoller J and Roots I: A C4887A polymorphism in exon 7 of human CYP1A1: population frequency, mutation linkages, and impact on lung cancer susceptibility.
Cancer Research 56: 4965–4969 (1996)
- [11] Cheng L, Sturgis EM, Eicher SA, Char D, Spitz MR, Wei Q: Glutathione S-transferase polymorphisms and risk of squamous-cell carcinoma of the head and neck.
International Journal of Cancer Research 84: 220-224 (1999)
- [12] Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJP, Braakhuis BJM, de Vries N, van der Waal I, Snow GB: Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck.
Archives of Otolaryngology - Head and Neck Surgery 121: 157-160 (1995)
- [13] Cosma G, Crofts F, Taioli E, Toniolo P and Garte S: Relationship between genotype and function of the human CYP1A1 gene.
Journal of Toxicology and Environmental Health 40: 309–316 (1993)
- [14] Crofts F, Taioli E, Trachman J, Cosma GN, Currie D, Toniolo P and Garte SJ: Functional significance of different human CYP1A1 genotypes.
Carcinogenesis 15: 2961–2963 (1994)
- [15] Demark-Wahnefried W, Aziz NM, Rowland JH, Pinto BM: Riding the crest of the teachable moment: promoting long-term health after the diagnosis of cancer.
Journal of Clinical Oncology 23: 5814-5830 (2005)
- [16] Hayes JD, Pulford DJ: The glutathione S-transferase supergene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance.
Critical Reviews of Biochemistry Molecular Biology 30: 445-603 (1995)
- [17] Hussey AJ, Hayes JD: Human mu-class glutathione S-transferase present in liver, skeletal muscle and testicular tissue.
BBA - Biochimica et Biophysica Acta 1203: 131-141 (1993)

-
- [18] Jahnke V, Matthias C, Bockmühl U, Strange RC: Genetische Prädisposition für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen.
Laryngorhinootologie 78: 24-27 (1999)
- [19] Jahnke V "Bösartige Tumoren des Larynx." In: Naumann HH, 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 (1995)
- [20] Jain M, Kumar S, Rastogi N, Lal P, Ghoshal UC, Tiwari A, Pant MC, Baiq MQ, Mittal B: GSTT1, GSTM1 and GSTP1 genetic polymorphisms and interaction with tobacco, alcohol and occupational exposure in esophageal cancer patients from North India.
Cancer Letters 242: 60-67 (2006)
- [21] Kiyohara C, Nakanishi Y, Inutsuka S, Takayama K, Hara N, Motohiro A, Tanaka K, Kono S and Hirohata T: The relationship between CYP1A1 aryl hydrocarbon hydroxylase activity and lung cancer in a Japanese population.
Pharmacogenetics 8: 315–323 (1998)
- [22] Koch WM, McQuone S: Clinical and molecular aspects of squamous cell carcinoma of the head and neck in the nonsmoker and nondrinker.
Current Opinion in Oncology 9: 257-261 (1997)
- [23] Lafuente A, Molina R, Palou J, Castel T, Moral A, Trias M: Phenotype of glutathione S-transferase Mu (GSTM1) and susceptibility to malignant melanoma.
British Journal of Cancer 72: 324-326 (1995)
- [24] Lafuente A, Pujol F, Carretero P, Pérez Villa J, Cuchi A: Human glutathione S-transferase μ (GST μ) deficiency as a marker for the susceptibility to bladder and larynx cancer among smokers.
Cancer Letters 68: 49-54 (1993)
- [25] Lang M, Pelkonen O: Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis.
IARC Scientific Publications 148: 13-22 (1999)

-
- [26] Lee JM, Wu MT, Lee YC, Yang SY, Chen JS, Hsu HH, Huang PM, Kuo SW, Lee CJ, Chen CJ: Association of GSTP1 polymorphism and survival for esophageal cancer.
Clinical Cancer Research 11: 4749-4753 (2005)
- [27] Lin HJ, Han CY, Bernstein DA, Hsiao W, Lin BK, Hardy S: Ethnic distribution of the glutathione transferase Mu 1-1 (GSTM1) null genotype in 1473 individuals and application to bladder cancer susceptibility.
Carcinogenesis 15: 1077-1081 (1994)
- [28] Maier H, Gewelke U, Dietz A, Heller WD: Kehlkopfrisiko bei chronischem Tabak und / oder Alkoholkonsum.
Otorhinolaryngology Nova 1: 271-277 (1991)
- [29] Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, Jones PW, Hayes JD, Alldersea J, Gilford J, Bailey L, Bath J, Worrall SF, Hand P, Fryer AA, Strange RC: Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upperaerodigestive tract cancers.
Pharmacogenetics 8: 91-100 (1998)
- [30] Matthias C, Jahnke V, Fryer AA, Strange RC: Influence of glutathione s-transferase and cytochrome p450 polymorphisms on prognosis of head and neck cancer.
Laryngorhinootologie 81 :406-412 (2002)
- [31] Matthias C, Jahnke V, Hand P, Fryer AA, Strange RC: Immunohistochemische und molekulargenetische Untersuchungen zum Einfluss von Glutathion S-Transferasen auf die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich.
Laryngorhinootologie 78: 182-188 (1991)
- [32] Meyer C, John U: Alkohol - Zahlen und Fakten zum Konsum. Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (Hrsg).
Jahrbuch Sucht 2005: 7-28 (2005)
- [33] Muir C, Weiland L: Upper aerodigestive tract cancers.
Cancer 75: 147-153 (1995)

-
- [34] Murata M, Shiraishi T, Fukutome K, Watanabe M, Nagao M, Kubota Y, Ito H, Kawamura J, Yanati R: Cytochrome P4501A1 and glutathione S-transferase M1 genotypes as risk factors for prostate cancer in Japan. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 28: 657-660 (1998)
- [35] Nakachi K, Imai K, Hayashi S and 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 Research* 53: 2994–2999 (1993)
- [36] Nakachi K, Imai K, Hayashi S, Watanabe J and Kawajiri K: Genetic susceptibility to squamous cell carcinoma of the lung in relation to tobacco smoking dose. *Cancer Research* 51: 5177–5180 (1991)
- [37] Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA: GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* 9: 185-191 (2000)
- [38] Oude Ophuis MB, van Lieshout EM, Roelofs HM, Peters WH, Manni JJ: Glutathione S-transferase M1 and T1 and cytochrome P4501A1 polymorphisms in relation to the risk for benign and malignant head and neck lesions. *Cancer* 1 82: 936-943 (1998)
- [39] Petersen DD, Mckinney CE, Ikeya K, Smith HH, Bale AE, McBride OW and Nebert DW: Human CYP1A1 gene: cosegregation of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. *American Journal of Human Genetics* 48: 720–725 (1991)
- [40] Sato M, Sato T, Izumo T, Amagasa T: Genetic polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis* 20: 1927-1931 (1999)
- [41] Sharma A, Mishra A, Das BC, Sardana S, Sharma JK.: Genetic polymorphism at GSTM1 and GSTT1 gene loci and susceptibility to oral cancer. *Neoplasma* 53: 309-315 (2006)

- [42] Shimada T, Yun C-H, Yamazaki H, Gautier J-C, Beaune PH and Guengerich FP: Characterization of human lung microsomal cytochrome P-450 1A1 and its role in the oxidation of chemical carcinogens.
Molecular Pharmacology 41: 856–864 (1992)
- [43] Smith G, Stanley LA, Sim E, Strange RC, Wolf CR: Metabolic polymorphisms and cancer susceptibility.
Cancer surveillance 25: 27-65 (1995)
- [44] Statistisches Bundesamt Deutschland: Rauchverhalten nach Altersgruppen. Ergebnisse der Mikrozensus-Befragung (2005)
- [45] Sugimura H, Wakai K, Genka K, Nagura K, Igarashi H, Nagayama K, Ohkawa A, Baba S, Morris BJ, Tsugane S, Ohno Y, Gao C, Li Z, Takezaki T, Tajima K and Iwamasa T: Association of Ile462Val (Exon 7) polymorphism of cytochrome P450 IA1 with lung cancer in the Asian population: further evidence from a case-control study in Okinawa.
Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention 7: 413–417 (1998)

7 Anhang

7.1 TNM-, und R-Klassifikation im Kopf-Hals Bereich

TNM-Klassifikation entsprechend der gültigen Einteilung der International Union Against Cancer (UICC).

T – Primärtumor

TX Primärtumor kann nicht beurteilt werden

T0 Kein Anhalt für Primärtumor

T1 Tumor 2cm in größter Ausdehnung

T2 Tumor > 2cm bis 4cm in größter Ausdehnung

T3 Tumor > 4cm in größter Ausdehnung

T4 Tumor infiltrierte Nachbarstrukturen wie Knochen, tiefe Muskulatur der Zunge

Tis Carcinoma in situ

N – Regionäre Lymphknoten

NX Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden

N0 Keine regionären Lymphknotenmetastasen

N1 ipsilateral solitäre Lymphknotenmetastase < 3cm

N2a Lymphknotenmetastasen ipsilateral solitär > 3 bis 6cm

N2b Lymphknotenmetastasen ipsilateral multipel < 6cm

N2c Lymphknotenmetastasen bilateral bzw. kontralateral < 6cm

N3 Lymphknotenmetastase > 6cm

M – Fernmetastasen

MX Fernmetastasen können nicht beurteilt werden

M0 Keine Fernmetastasen

M1 Fernmetastasen

R – Resektionsstatus

R0 - Tumor makroskopisch komplett im Gesunden entfernt,
Resektionsflächen mikroskopisch tumorfrei

R1 - mikroskopisch Tumorgewebe an den Resektionsflächen nachgewiesen

8 Danksagungen

Frau PD Dr. med. S. Gronau gilt mein besonderer Dank für die freundliche Anleitung zur vorliegenden Untersuchung und Unterstützung bei der Durchführung sowie beim Verfassen dieser Arbeit.; nur durch ihre kompetente Betreuung und konstruktive wissenschaftliche Beratung konnte diese Arbeit gelingen.

Herrn Professor Dr. med. H. Riechelmann danke ich besonders für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Hilfestellung bei der statistischen Auswertung.

Dem gesamten Laborteam der HNO-Forschung für die freundschaftliche Zusammenarbeit, insbesondere Frau M. Jerg für die Mithilfe bei der Arbeit im Labor.

Den Mitarbeitern des Pathohistologischeninstitutes Herrn Dr. I. Melzner, Frau K. Dorsch und Frau B. Rettenmaier für die gute Zusammenarbeit und freundliche Hilfestellung in interdisziplinären Fragen.

Meiner Schwester Eva-Maria Staneff für die konstruktive Stellungnahme.

9 Lebenslauf

Name	Oliver Jochen Staneff
Geburtsdatum	11. Mai 1977
Geburtsort	Karlsruhe
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	evangelisch



9.1 Schulbildung

1983 - 1987	Grundschule Bermatingen
1987 - 1994	Gymnasium Markdorf
1994 - 1997	Wirtschaftsgymnasium Friedrichshafen
1997	Abitur, Allgemeine Hochschulreife

Zivildienst

09/1997 – 09/1998	St. Josef-Krankenhaus Markdorf
-------------------	--------------------------------

9.2 Studienverlauf

10/1998	Humanmedizin an der Medizinischen Universität Ulm
03/2001	Ärztliche Vorprüfung
04/2002	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2005	Approbation als Arzt

9.3 Beruf

11/2005 bis
01/2008 Assistenzarzt in der Abteilung für Allgemein-, Viszeral- und
Gefäßchirurgie (CA Dr. med. J. Benz) und
Unfall- und Wiederherstellungschirurgie
(CA PD Dr. med. M. R. Sarkar)
Karl-Olga-KH GmbH, Stuttgart

Seit 02/2008 Assistenzarzt in der Abteilung für Orthopädie
Baumann – Klinik (CA Prof. Dr. med. D. Parsch)
Karl-Olga-KH GmbH, Stuttgart

Stuttgart, den _____ Unterschrift _____