

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)

Chromosomale Alterationen in Miniorgankulturen oropharyngealer humaner Schleimhautzellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Agnieszka Sawicka
aus Morag

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichtersteller: PD Dr. med. Ulrich Harréus

Mitberichtersteller: Prof. Dr. Kai Hell
Priv. Doz. Dr. Ursula Strobl

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Maximilian Reiter

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.07.2010

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Karzinogenese	6
1.2	Genetische Alterationen bei Kopf-Hals-Karzinomen	7
1.3	Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und freie Radikale in der Kanzerogenese	9
1.4	DNA-Reparatur	13
1.5	Zielsetzung	16
2	Material und Methoden	17
2.1	Miniorgankulturen	17
2.1.1	Patientengut	17
2.1.2	Gewinnung und Präparation der Schleimhaut, Kultivierung der Miniorgane	18
2.1.3	Fremdstoffinkubation	19
2.1.4	Vitalitätsbestimmung	21
2.1.5	Materialien für Miniorgankulturen	22
2.2	Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)	23
2.2.1	Fixierung der Zellen auf Objektträgern	23
2.2.2	Lyse der Zell- und Kernmembranen	24
2.2.3	Elektrophorese und Anfärbung der DNA	24
2.2.4	Digitale Auswertung	24
2.2.5	Materialien für Comet Assay	26
2.3	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	27
2.4	Comet-FISH	27
2.4.1	Entwässerung der Zellen und Auftragen der Sonden	27
2.4.2	Denaturierung und Hybridisierung der DNA	28
2.4.3	Fluoreszenzfärbung und digitale Auswertung	28
2.4.4	Schematischer Ablauf des Comet Assays und Comet-FISH	30
2.4.5	Materialien für Comet-FISH	31
2.5	Untersuchung zur DNA-Reparatur	32
2.6	Methodenspezifische Labormaterialien	33
2.6.1	Enzyme, Zellkulturmedien und Chemikalien	33
2.6.2	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör	35

3	Ergebnisse	38
3.1	Statistische Analyse	38
3.2	DNA-Schädigung an Miniorganen	38
3.2.1	Schädigung der Gesamt-DNA der Schleimhautzellen	41
3.2.2	Chromosomale Schädigung bei tumorfreien Patienten	42
3.2.3	Chromosomale Schädigung bei Tumorpatienten	43
3.2.4	Vergleich der Schädigung bei Tumor- und tumorfreien Patienten	44
3.3	DNA-Reparaturkapazität	45
3.3.1	DNA-Reparatur bei Tumor- und tumorfreien Patienten	46
3.3.2	Reparatur der chromosomalen DNA bei tumorfreien Patienten	47
3.3.3	Reparatur der chromosomalen DNA bei Patienten mit Karzinom des Oropharynx	48
3.3.4	Vergleich der Reparatur bei Tumor- und tumorfreien Patienten	49
3.4	Anzahl der Fluoreszenz-Signale	50
3.4.1	Anzahl der Fluoreszenz-Signale in unbehandelten Schleimhautzellen bei Tumor- und Kontrollpatienten	51
3.4.2	Anzahl der Fluoreszenz-Signale in Schleimhautzellen bei Tumor- und Kontrollpatienten nach der Inkubation mit Wasserstoffperoxid	52
3.4.3	Anzahl der Fluoreszenz-Signale in Schleimhautzellen bei Tumor- und Kontrollpatienten nach der DNA-Reparatur	53
4	Diskussion	54
4.1	Auswahl der Patienten	54
4.1.1	Tumorfreie Patienten als Spender von Schleimhaut des Oropharynx	54
4.1.2	Patienten mit Oropharynxkarzinom als Spender von Schleimhaut des Oropharynx	54
4.2	Methodenauswahl	55
4.2.1	Miniorgankulturen	55
4.2.2	Comet Assay und Comet-FISH	56
4.3	Auswahl der Chromosomen	59
4.4	Oxidative DNA-Schädigung	63
4.5	DNA-Reparatur von oxidativen Schäden	66

5	Zusammenfassung	69
6	Literatur	71
7	Anhang	84
7.1	Verwendete Abkürzungen	84
7.2	Anamnesen der Probenspender	86
7.3	Lebenslauf	88
7.4	Danksagung	89

1 Einleitung

1.1 Karzinogenese

Malignes Wachstum entsteht durch unkontrollierte Proliferation von Zellen, die sich von einer einzigen Körperzelle ableiten und deren Erbgut durch die Wirkung chemischer oder physikalischer Noxen verändert (mutiert) wurde. Bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erkannte Theodor Boveri, dass einer Tumorentstehung chromosomale Veränderungen und somatische Mutationen zugrunde liegen (Boveri, 1914). Es handelt sich um Mutationen am Erbgut, dessen Genprodukte an der Proliferationskontrolle beteiligt sind. Hierbei spielen Protoonkogene und Tumorsuppressorgene eine entscheidende Rolle. Protoonkogene kodieren Proteine, die das Wachstum und die Zellteilung unterstützen, Tumorsuppressorgene hingegen solche, die es unterdrücken. Die mutierten Protoonkogene (Onkogene) und Tumorsuppressorgene können keine normale Kontrollfunktion ausüben, so dass von außerhalb der Zelle kommende Proliferationssignale verstärkt oder abgeschwächt werden. Malignes Wachstum ist das Ergebnis einer Störung im Gleichgewicht von stimulierenden und hemmenden Regulatoren der Zellteilung. Der zugrundeliegende genetische Mechanismus für die Aktivierung von Protoonkogenen ist häufig ein DNA-Gewinn, eine Translokation oder Inversion von chromosomalen Abschnitten (Rabbitts, 1994). Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen erfolgt hingegen über einen Verlust von genetischem Material (Bockmühl, 1998).

Die Entwicklung der Krebserkrankung erfolgt über die Stufen Initiation, Promotion und Progression. Initiation stellt eine irreversible Veränderung des genetischen Materials in Einzelzellen dar. Bei der Promotion wird das selektive Zellwachstum zu Zellklonen stimuliert (z.B. durch Eingriffe in Signalwege). Der Promotor selber bewirkt keine bleibende Veränderung der Zelle. Seine Wirkung ist meist reversibel und muß über Wochen oder Monate anhalten, damit aus einer initiierten Zelle ein Mikrotumor (präneoplastischer Herd) entsteht. Durch Initiation und Promotion entstehen zuerst gutartige Tumore. Deren Umwandlung in Malignome wird als Progression bezeichnet. Die Wachstumsautonomie und das Metastasierungspotenzial nimmt dabei zu. Dieser Prozess wird durch weitere

Mutationen und andere Vorgänge begünstigt und dauert Monate bis Jahre (s. Abb.1).

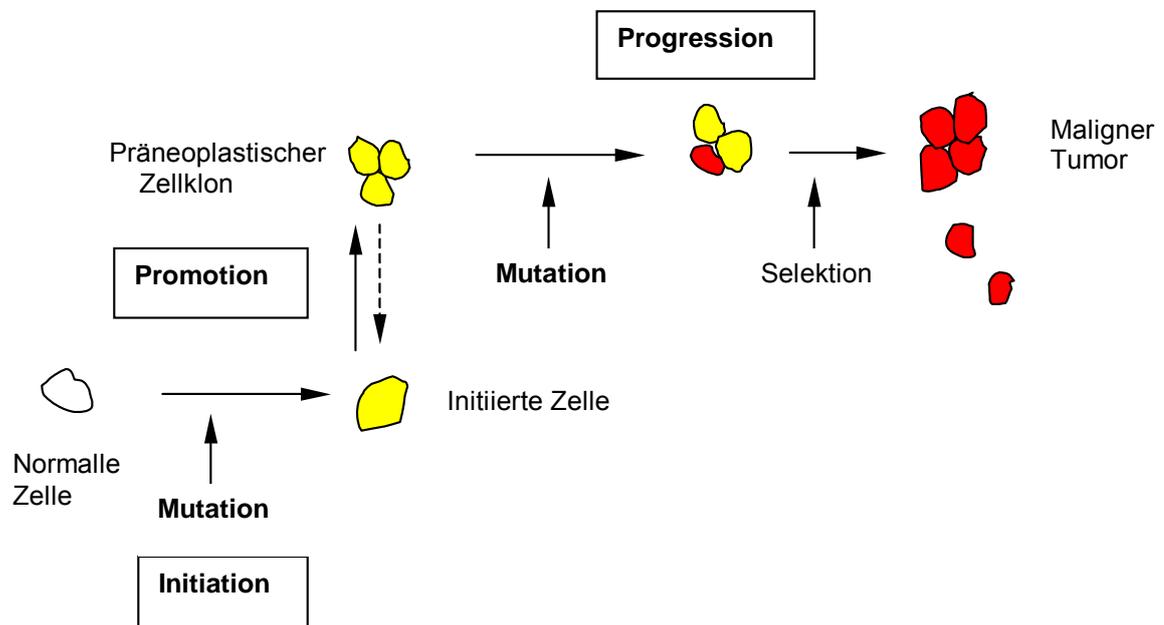


Abb.1 Mehrstufenprozess der Krebsentstehung

1.2 Genetische Alterationen bei Kopf-Hals-Karzinomen

Bei den bösartigen Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches handelt es sich überwiegend um Plattenepithelkarzinome. Kopf-Hals-Karzinome sind dabei heute weltweit die sechsthäufigste Malignomerkrankung (Steward und Kleihues, 2003).

Tumore entstehen durch DNA-Schädigung auf verschiedenen Ebenen, von Mutationen des einzelnen Nukleotids bis hin zu numerischen und strukturellen Aberrationen eines ganzen Chromosoms. Auslösende Faktoren sind insbesondere chemische Kanzerogene, physikalische Noxen (UV- und radioaktive Strahlen), virale Infektionen (z.B. HPV), oder auch ein geschwächtes Immunsystem (z.B. HIV) (Gellrich, 2004). Die größte Bedeutung bei der Entstehung der Kopf-Hals-Karzinome haben Kanzerogene im Tabakrauch und im Alkohol, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine, Aldehyde und aromatische Amine (Goldenberg et al., 2004). Eine große Rolle für eine potenzielle Tumorinduktion spielen auch inhalative Noxen am Arbeitsplatz (u.a. Holz- und Metallstäube sowie chrom- und nickelhaltige Farben und Lacke).

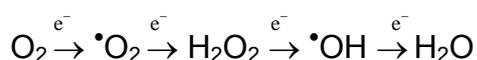
Exogene Einflüsse können jedoch nicht ausschließlich die Ursachen für die Tumorgenese sein. Es gibt viele Hinweise, dass auch individuelle, genetisch determinierte Risikofaktoren dazu beitragen (Brockmoller et al., 2000). Zu diesen Faktoren gehören Mutagensensitivität (Cloos et al., 1996) sowie die Reparaturkapazität nach induzierter DNA-Schädigung (Cheng et al., 1998; Rydzanicz et al., 2005). Mutagensensitivität beschreibt die Empfindlichkeit einzelner Organismen gegenüber mutagenen Einflüssen von Fremdstoffen. Sie wird unter anderem von Genpolymorphismen metabolisierender Enzyme beeinflusst, die für die Aktivierung oder den Abbau einzelner Schadstoffe verantwortlich sind. Hierzu zählen z.B. das Cytochrom P450-System (Dandara et al., 2005), die Glutathion-S-Transferasen (Geisler et al., 2005) und die Alkoholdehydrogenase 3 (Peters et al., 2005). Induzierte Mutationen sowohl spontane Fehler während der Replikation des genetischen Materials müssen eliminiert werden, um ein Gleichgewicht zwischen DNA-Schäden und die Reparatur zu bewahren. Zu diesem Zweck besitzen alle Zellen besondere Reparaturmechanismen. Wird eine DNA-Schädigung nicht repariert, so kann es zur Persistenz des Schadens und zu nachfolgender Transformation kommen (Friedlander, 2001). Zur Mutagensensitivität zählt ebenso die Expression des p53-Gens, das eine wichtige Rolle u.a. auch bei der Reparatur spielt. All diese Regulatormechanismen können bei manchen Individuen unzulänglich sein und zur genetischen Instabilität führen.

Je nach ihren chemischen Eigenschaften können genotoxische Agenzien mit unterschiedlichen Molekülen in der DNA stabile kovalente Bindungen eingehen. DNA-Addukte wurden in Lungen-, Blasen-, Pankreas- und Kopf-Hals-Tumoren gefunden (Banaszewski et al., 2000; Li et al., 2001). Bei einigen Kanzerogenen stehen klastrogene Schäden im Vordergrund, die sich z.B. als Chromosomenaberrationen oder Mikrokernbildung zeigen. Weitere Substanzen können Aneuploidien, Genamplifikationen und Chromosomentranslokationen bewirken. Aneuploidien findet man bei zwei Dritteln aller Kopf-Hals-Tumoren (Bockmühl et al., 2002). Auch strukturelle chromosomale Alterationen treten bei Karzinomen im Oropharynx auf. Häufige strukturelle chromosomale Aberrationen finden sich im Bereich der Chromosomen 3, 5, 8, 9, 11, 17 und 18 (Jin et al., 2000). Bei der Tumorentstehung führen diese genetischen Aberrationen zur

Aktivierung eines Protoonkogenes und/oder zur Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens. Im Rahmen der Tumorgenese kann die Nukleotidsequenz so verändert sein, dass ein Allel wegfällt oder im Fall der Homozygotie ein Allel neu hinzukommt. Mit der *loss of heterozygosity* (LOH)-Analyse können bei Kopf-Hals-Karzinomen häufig Allelverluste auf den Chromosomenarmen 3p, 5q, 8p, 9p, 11q, 13q, 17p und 18q festgestellt werden (Hirao et al., 2001). Der Verlust des chromosomalen Abschnittes 9p21 steht am Anfang der Progression des Kopf-Hals-Karzinoms und verursacht die Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p16. Dieses wiederum ist entscheidend für die Zell-Zyklus-Regulation. Circa 50% der Kopf-Hals-Tumore zeigen Mutationen des p53 Gens, das im chromosomalen Abschnitt 17p13 lokalisiert ist (Dong et al., 2004). p53 spielt eine wichtige Rolle bei der DNA-Reparatur und Apoptose. Häufig kommt bei Malignomen im oberen Aerodigestivtrakt auch die Amplifikation des Onkogens Cyclin D1 im Bereich der chromosomalen Bande 11q13 vor (Bockmuhl et al., 1996b; Hui et al., 2005). Cyclin D1 ist für Kontrolle des Zell-Zyklus mitverantwortlich (Lin et al., 2006a).

1.3 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und freie Radikale in der Kanzerogenese

Freie Radikale sind chemisch definierte Spezies (Atome, Moleküle, Ionen), die ein oder mehrere ungepaarte Elektronen besitzen. Radikale können aus neutralen Molekülen durch Abgabe oder Aufnahme eines Elektrons gebildet werden. Eine weitere Möglichkeit der Radikalbildung besteht in einer homolytischen Spaltung einer kovalenten Bindung. Radikalische Spezies entstehen in biologischen Systemen beim Metabolismus von Molekülen, natürlichen wie synthetischen Ursprungs. Die schrittweise Reduktion des Sauerstoffmoleküls führt zur Bildung des Superoxidradikalanions ($\cdot\text{O}_2^-$), des Wasserstoffperoxids (H_2O_2), des Hydroxylradikals ($\cdot\text{OH}$) und schließlich des Wassers:



Außer $\cdot\text{O}_2^-$, H_2O_2 und $\cdot\text{OH}$ zählen unter anderem Alkoxyradikal ($\text{RO}\cdot$), Peroxyradikal ($\text{ROO}\cdot$), Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Hydroperoxyradikal (HO_2^-)

Stickstoffmonoxid (NO^\bullet) und Peroxynitritanion (OONO^-) zu den reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Das Superoxidradikalanion ist ein Reduktionsmittel und kann Übergangsmetallionen wie Cu^{2+} oder Fe^{3+} in ihre reduzierten Formen (Cu^+ ; Fe^{2+}) überführen oder Chinone zu Semichinonen reduzieren. Beim Wasserstoffperoxid handelt es sich um eine stabile Verbindung, die auch das Endprodukt vieler Oxidationsreaktionen in Zellen darstellt. Es kann sowohl als Oxidations- als auch als Reduktionsmittel fungieren. H_2O_2 ist wenig reaktiv, aber wegen seiner elektrischen Neutralität kann es leicht durch die Membrane diffundieren und mit zellulären Molekülen in verschiedenen Zellkompartimenten reagieren (Bartosz, 2006). Obwohl H_2O_2 selbst kein freies Radikal ist, ist es eine Quelle für Hydroxylradikale. Dies erfolgt durch Interaktion mit Übergangsmetallionen („Fenton-Reaktionen“) oder durch Reaktion mit einer Reihe anderer Verbindungen, z.B. NO^\bullet oder Peroxynitritt ONOO^- (Leonard et al., 2004). $^\bullet\text{OH}$ ist ein besonders starkes Oxidationsmittel, das prinzipiell mit allen organischen Molekülen rasch reagieren kann. Es kann Wasserstoffatome aus jeder Kohlen-Wasserstoff-Bindung abstrahieren, Additionsreaktionen eingehen und Doppelbindungen aufbrechen. Wegen seiner großen Reaktivität kann $^\bullet\text{OH}$ nicht durch Membrane diffundieren (Pryor, 1986; Sarker et al., 1995). Um mit der DNA zu reagieren muss es daher direkt im Nukleus gebildet werden. H_2O_2 stellt eine diffusionfähige, latente Form von $^\bullet\text{OH}$ dar, die mit Metallionen in der DNA-Umgebung reagieren kann und folglich $^\bullet\text{OH}$ generiert (Cadet et al., 2003).

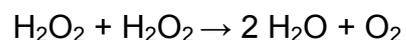
Sauerstoffradikale und nicht-radikalische reaktive Sauerstoffspezies, in erster Linie Superoxid und Wasserstoffperoxid, werden bei einer Reihe biologischer Reaktionen gebildet. ROS entstehen im Zellstoffwechsel vor allem in Mitochondrien (Elektronentransport) oder werden durch Makrophagen gebildet. ROS treten auch bei Entzündungsprozessen vermehrt auf. Lösliche Zellbestandteile, wie z.B. Thiole, Hydrochinone, Flavine, Catecholamine, Metallionen und Hämproteine, erzeugen ROS bei Autooxidationsvorgängen. Verschiedene Enzyme setzen $\text{O}_2^{\bullet-}$ im Rahmen ihres katalytischen Kreislaufs frei. Zu ihnen zählen die Xanthinoxidase, die Aldehydoxidase, die Tryptophandioxygenase und die Diaminoxidase. Auch die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme des endoplasmatischen Retikulums sind in der Lage, Sauerstoff zu aktivieren. Dies konnte für die Cytochrom-P450-

abhängigen Monoxygenasen, für die NADPH-abhängigen Cytochromreduktasen und für die flavinabhängigen Monoxygenasen gezeigt werden (Valko et al., 2004; Inoue et al., 2003). Zu exogenen Quellen der ROS zählen Peroxide, Phenole, Reduktionsmittel (z.B. Ascorbat), Chinone (z.B. Adriamycin, Cytostatica), Ethanol, Aflatoxin B1, aber auch Metabolite polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe sowie ionisierende und UVA-Strahlung.

Die Bildung von ROS wird durch antioxidative Schutzmechanismen kontrolliert. Superoxidradikalanionen werden durch die Superoxiddismutasen (SOD) unter Kontrolle gehalten. Diese Enzyme katalysieren die Disproportionierung von $\cdot\text{O}_2^-$:



Zur Entgiftung von Wasserstoffperoxid können verschiedene Enzymsysteme beitragen. In den Peroxisomen katalysiert die Katalase die Disproportionierung von H_2O_2 :



Die zytosolische Glutathionperoxidase katalysiert die Reduktion von H_2O_2 durch das Glutathion (GSH):



Organische freie Radikale werden in der Reaktion mit GSH, katalysiert durch Glutathion-S-Transferasen, inaktiviert. Die Bildung von ROS durch Fremdstoffe wird durch die NADPH-Chinonoxidoreduktase unterbunden (Mates et al., 1999). Zu den nicht-enzymatischen Antioxidantien gehören: Aminosäuren (z.B. Arginin), die Vitamine A, C und E, Thiole (besonders Glutathion), Tee-Polyphenole und enzymgebundene Mineralien (z.B. Selenium und Zink) (Fang et al., 2002). Unter bestimmten Bedingungen jedoch kann die Bildungsrate reaktiver Sauerstoffspezies die Kapazität antioxidativer Systeme übersteigen, so dass zelluläre Bestandteile oxidativ zerstört werden. Es tritt ein „oxidativer Stress“ auf,

der unter anderem bei der Tumorgenese (insbesondere der Tumorpromotion) eine Rolle spielt.

Freie Radikale können prinzipiell mit allen vitalen Zellmolekülen reagieren. Sie können mit löslichen, niedermolekularen Verbindungen wie Neurotransmittern oder Coenzymen in Wechselwirkung treten und diese inaktivieren. Sie sind aber auch in der Lage, auf zelluläre Makromoleküle und Membrane einzuwirken und dafür zu sorgen, dass diese ihre physiologischen Funktionen nicht mehr ausüben können.

Reaktive Sauerstoffspezies vermögen mit Nukleinsäuren zu reagieren und diese zu schädigen. Dies geschieht auf zweierlei Wegen. Zum einen können sie mit der Zucker-Phosphat-Kette in Wechselwirkung treten und Strangbrüche oder Chromosomenbrüche verursachen (Ward et al., 1987; Pfeiffer et al., 2000). Andererseits können sie sowohl den Zuckeranteil (Desoxyribose der DNA) als auch verschiedene Basen oxidativ verändern (Dizdaroglu et al., 2002). Zurzeit sind mehr als 100 Produkte von DNA-Schäden bekannt (Valko et al., 2006). Beispiele für oxidative Modifikationen von Nukleobasen sind 5-Hydroxymethyluracil (5-OH-MUra), Thyminglykol, 2,6-Diamino-4-Hydroxy-5-Formamidopyrimidin (Fapy-Guanin) und 8-Oxo-Guanin (8-oxoG) (Bohr, 2002). Es werden unterschiedliche Effekte von DNA-Schäden beschrieben: Mutationen, Instabilität von Mikrosatelliten, Heterozygotieverlust, chromosomale Alterationen, geänderte Genexpression, Cytostase (Zellwachstum- und Teilungshemmung), Cytotoxizität und neoplastisches Wachstum (Cooke et al., 2006). 8-oxoG kann, anstatt mit Cytosin, mit Adenin Paare bilden und dadurch GC → TA Transversionen auslösen (Lindahl and Wood, 1999). Diese Mutation trifft oft Onkogene und Tumorsuppressorgene (Hussain and Harris, 1998). 5-Hydroxymethyluracil verursacht Deletionen (Chaung and Boorstein, 1997). Es ist bewiesen, dass ROS die Transkriptionskontrolle beeinflussen. Die Anwesenheit von 8-oxoG in Promotor-Regionen kann bei der Bindung des Transkriptionsfaktors stören (Ghosh and Mitchell, 1999). Dazu gehören AP-1, SP1, TNF α , NF- κ B, die wichtige Regulatoren von Apoptose, Zellproliferation und Zytokin-Produktion sind. Unabhängig von genotoxischen Schäden, kann oxidativer Stress

Signaltransduktion, Zellproliferation und die immunologische Antwort beeinflussen (epigenetische Effekte), was zur Tumorentstehung führen kann (Epe, 2002).

Erhöhte Spiegel der oxidativen DNA-Schäden sind in vielen Neoplasien vorhanden. Oxidative Mechanismen spielen eine potenzielle Rolle in Initiation, Promotion und Progression der Kanzerogenese. GC → TA Transversionen wurden im ras-Onkogen und p53-Tumorsuppressoren festgestellt (Leonard et al., 2004). ROS können auch die Expression von Protoonkogenen wie c-fos, c-myc und c-jun stimulieren (Kawanishi et al., 2001). Viele kanzerogene Promotoren (z.B. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, PMA) verstärken die H₂O₂-Produktion und vermindern Aktivitäten von SOD, Katalase und Glutathionperoxidase (Gomez et al., 1999).

1.4 DNA – Reparatur

Mit dem Begriff „DNA-Reparatur“ werden enzymatische Prozesse zusammengefasst, welche die Fähigkeit haben, DNA-Schäden zu beseitigen. Täglich werden in jeder Säugerzelle mehr als 10⁴ DNA-Läsionen verursacht, die spontan während Replikation und Zellmetabolismus entstehen (Lindahl, 1993). Dazu tragen Umweltfaktoren bei, denen der Mensch jeden Tag ausgesetzt ist. Jeder der DNA-Schäden wird in der Zelle mit einer Geschwindigkeit von ca. 10.000 Basenpaaren pro Stunde repariert. 130 DNA-Reparatur-Gene sind bis jetzt im menschlichen Genom verifiziert worden, wobei die tatsächliche Zahl wahrscheinlich viel höher ist (Wood et al., 2001). Der DNA-Reparaturprozess spielt in der Karzinogenese eine entscheidende Rolle. Infolge unzureichender Reparatur bleiben Mutationen zurück, welche zur malignen Entartung der Zelle führen können. So ist bei Personen mit genetischen Defekten in der Erkennung von DNA-Schäden und ihrer DNA-Reparatur (z.B. Xeroderma pigmentosum, Cockayne-Syndrom, Fanconi-Anämie, Ataxia telangiectasia, Bloom-Syndrom) die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Krebserkrankungen deutlich erhöht (de Boer and Hoeijmakers, 2000). Auch die meisten Malignome mit einer erblichen Komponente, wie das familiäre Kolonkarzinom (HNPCC) oder Brustkrebs werden in Zusammenhang mit Defekten im Rahmen der DNA-Reparatur gebracht (Hoeijmakers, 2001a; Scherer et al., 2005).

DNA-Schäden werden durch Sensorsysteme erkannt. An Kontrollpunkten vor der DNA-Replikation (in G1) und der Zellteilung (in G2) wird die DNA auf Integrität geprüft, um die Replikation geschädigter DNA und die Weitergabe defekter Chromosome zu verhindern. Dabei wird der Zellzyklus angehalten, wodurch Zeit für DNA-Reparatur gewonnen wird. Wenn die DNA-Reparatur nicht möglich ist, kann die Zelle durch Apoptose eliminiert werden. Eines der wichtigsten regulatorischen Gene, das über Schadensreparatur oder Tod einer geschädigten Zelle entscheidet, ist das Tumorsuppressorgen p53. In 50 % aller Tumore ist dieses Gen mutiert (Halazonetis, 2004).

Einer der Mechanismen der DNA-Reparatur ist die Alkyltransferasereparatur. Alkyltransferasen reparieren DNA-Schäden, indem sie den Alkylrest auf sich selbst übertragen. Dadurch verlieren sie ihre Aktivität („Selbstmordreaktion“). Ein Beispiel dafür ist O⁶-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT), die Methylgruppen von der O⁶-Position des Guanin entfernt (Kaina et al., 2001). Die Alkyltransferasereparatur ist ein fehlerfreies Reparatursystem, das aber wegen des großen energetischen Aufwands (ein Proteinmolekül pro Addukt), nur zur Entfernung eines seltenen, hochmutagenen DNA-Schadens benutzt wird. Sie zeigt die Aktivität gegenüber O⁶-Addukten des tabakspezifischen Nitrosamins N-Nitrosornikotin und manchen Zytostatika (Kohn und Bohr, 2002).

Niedermolekulare DNA-Addukte (z.B. 3-Methyladenin) und Basenveränderungen, wie 8-Oxo-Guanin, Uracil, Hypoxantin sowie Basenfehlpaarungen werden mittels Basenexzisionsreparatur (BER) entfernt (Krokan et al., 2000). Der BER-Mechanismus wird durch nicht enzymatischen Basenverlust oder durch hochspezifische Glykosylasen initiiert. Nach der Beseitigung der veränderten Base wird der abasische Zuckerrest (AP-Stelle) durch Apurin-Apyrimidin-Endonukleasen herausgeschnitten und mit Hilfe der DNA-Polymerase β durch eine korrekte Base ersetzt. Die DNA-Ligase 3 verknüpft schließlich die Strangenden („Short Patch“). Bei etwas umfangreicheren Veränderungen des Zucker-Phosphat-Rückgrats (zwei bis acht Nukleotid-Lücken) wird nicht eine einzelne Base, sondern eine kurze Nukleotidsequenz durch Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase β herausgeschnitten. DNA-Polymerase δ oder ϵ sorgt

anschließend für die Neusynthese der zum intakten Strang komplementären Basen. Die DNA-Ligase 1 schließt die Lücke im DNA-Strang („Long Patch“) (Hoeijmakers, 2001). Die BER gehört zu den sehr zuverlässigen Reparaturmechanismen. Wegen seiner hohen Spezifität und Effektivität spielt die BER eine wichtige Rolle in der Karzinogenese. Eine Läsion im Gen für 8-oxo-Guanin–DNA-Glykosylase (hOGG1) oder LOH in seinem Locus korreliert mit einem erhöhten Krebsrisiko (Audebert et al., 2000b; Wikman et al., 2000).

Bei großen Addukten (z.B. von Benz(a)pyren, aromatischen Aminen, DNA-Quervernetzungen) oder bei Pyrimidindimeren aber auch bei AP-Stellen, Thyminglykol, 8-oxo-Guanin, N⁶-Methyladenin wird die Nukleotidexzisionsreparatur (NER) initiiert. Das fehlerhafte Nukleotid wird gemeinsam mit einem größeren Abschnitt von Nukleotiden herausgeschnitten. In dem gesamten Prozess von der Schadenserkenkung bis zur Ligierung ist eine komplexe Maschinerie von mehr als 30 verschiedenen DNA-Reparaturproteinen involviert. Wie wichtig dieses Reparatursystem ist, zeigt z.B. Xeroderma pigmentosum, wobei die NER defekt ist.

Mismatchreparatur (MMR; Basenfehlpaarungsreparatur) ist für die Entfernung nicht korrekt gepaarter, normaler Nukleotide verantwortlich. Sie entstehen als Folge von Fehlern bei der DNA-Replikation oder/und DNA-Reparatur. Für die Erkennung von Fehlpaarungen ist primär MSH2 verantwortlich, das mit MSH3 zusammen größere Fehlinsertionen und als Komplex mit MSH6 einfache Basenfehlpaarung und Insertionen erkennt. Der hereditäre Ausfall des msh2-Gens führt früher und häufiger zur Manifestation des Dickdarmkrebses (Jiricny and Nystrom-Lahti, 2000).

Doppelstrangbrüche (DSB) werden vor allem durch ionisierende Strahlung und ROS ausgelöst. Ein einziger DSB kann zum Zelltod führen. DSB werden mit zwei verschiedenen Systemen repariert, entweder durch homologe Rekombination (HR) oder durch nichthomologe Verknüpfung der Strangenden („non homologous end joining“; NHEJ). Mängel in diesen Mechanismen kann verschiedene Erkrankungen wie Ataxia teleangiectasia, aber auch Brustkrebs als Resultat haben (Thompson and Schild, 2002).

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit wurde der DNA-schädigende Effekt oxidativer Fremdstoffe am Beispiel von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) auf Epithelien des oberen Aerodigestivtraktes sowie endogene Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen untersucht. Nachfolgende Fragestellungen lagen der Arbeit zugrunde:

- Welchen Einfluss hat oxidativer Stress auf die DNA humaner oropharyngealer Schleimhautzellen von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Oropharynx und Kontrollpatienten?
- Gibt es quantitative Unterschiede in der **Schädigung** der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 innerhalb einer Gruppe sowie zwischen beiden Spendergruppen?
- Liegen quantitative Unterschiede in der **DNA Reparatur** in der Tumor- und der Kontrollgruppe vor?
- Liegen quantitative Unterschiede in der **DNA Reparatur** der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 innerhalb einer Gruppe sowie zwischen beiden Spendergruppen vor?
- Unterscheidet sich das qualitative Reparaturmuster der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 in den beiden Spendergruppen?

Für die Bearbeitung der Fragestellungen wurden Miniorgankulturen aus oropharyngealen Schleimhautzellen kultiviert und der Einfluss auf die DNA der Zellen mittels einer Kombination aus Comet Assay und Fluoreszenz in situ Hybridisierung analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Miniorgankulturen

Multizelluläre Aggregate (Sphäroide) von Zellkulturen in einem Epithelverband, die von einer mehrstufigen Epithelschicht umhüllt sind, werden Miniorgankulturen (MOK) genannt. Im Gegensatz zu üblichen Einzelzellinkubationen, in denen Wechselwirkungen zwischen den Zellen nur bedingt stattfinden, sind Interaktionen in dieser Gewebe-formation, ähnlich der in-vivo-Situation, möglich. Aus diesem Grund bietet sich das Modell der Miniorgankulturen für Langzeit-Zytotoxizitätsmessungen bzw. Genotoxizitätsmessungen an. Die MOK ermöglichen wiederholte Inkubationen mit genotoxischen Substanzen und nachfolgende Reparaturphasen. Somit kann in diesem Model der Zellkultivierung eine umwelt- bzw. berufsbedingte Fremdstoffexposition simuliert werden.

Miniorgankulturen humaner oropharyngealer Mucosa wurden nach einer auf Stainsvag (Steinsvag et al., 1991) an adenoidem Gewebe basierende Methode weiterentwickelt. Kleinsasser et al. beschrieben die Kultivierung der Organkulturen nasaler Mucosa (Kleinsasser et al., 2001a) und zeigten deren Verwendbarkeit für in vitro Langzeitinkubation mit Xenobiotika (Kleinsasser et al., 2004).

Die dreidimensionale Organkulturen stellen eine alternative, zeitlich stabile und in vivo nahe Kulturform dar. Die zelluläre Differenzierung der Organe bleibt mindestens vier Wochen, ohne Vitalitätsverlust der Zellen, erhalten (Fjellbirkeland et al., 1996). Das Epithel der Miniorgane besitzt im Gegensatz zu dem aus Monolayerkulturen einen Aufbau gemäß der Situation im lebenden Organismus. Die Zellen wachsen auf ihrer Matrix und bilden ihre eigene Basalmembran.

2.1.1 Patientengut

Die Schleimhaut des Oropharynx stammte von 15 Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Oropharynx (12 männlich, 3 weiblich, Durchschnittsalter 56,7 Jahre) und von 22 Patienten ohne maligne Erkrankung (alle männlich, Durchschnittsalter 44,1 Jahre). Die Patienten wurden entsprechend eines Ethikkommissionsantrags präoperativ aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis für die Durchführung der Versuche. Die Spender wurden nach Tabak-

und Alkoholkonsum, beruflicher Schadstoffexposition und eventuell schädliche Lebensgewohnheiten befragt, um eine etwaige Exposition gegenüber schädlichen Noxen bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigen zu können (Anamnese siehe Anhang, Tab. 20 und 21). Grundsätzlich wurde nur makroskopisch gesunde Schleimhaut des Oropharynx untersucht, die operationsbedingt mitentfernt werden musste. Nur die Patienten, die keiner Chemotherapie oder Bestrahlung ausgesetzt waren, dienten als Spender.

2.1.2 Gewinnung und Präparation der Schleimhaut, Kultivierung der Miniorgane

Die frisch entnommenen Proben wurden in Kochsalzlösung ins Labor transportiert und sofort weiterbearbeitet. Unter sterilen Bedingungen (Sterilbank Harasafe, Heraeus, Hanau) wurde die Probe in Fragmente mit ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten und dreimalig in phosphatgepufferter Salzlösung (D-PBS Ca²⁺ und Mg²⁺ frei, Gibco™) von Blutbestandteilen gereinigt. Die Gewebestückchen wurden auf die 24-Well-Platten (Multiwell Tissue Culture Plate, 24 Well, Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA) aufgetragen und mit jeweils 250 µl Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM, Promocell, Heidelberg) kultiviert. Das BEGM war mit Bovine Pituitary Extract, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Triiodthyronin, Transferrin und Retinoic Acid (Promocell) versetzt. Pro Versuch wurden zwei Platten benötigt. Diese wurden vorher mit 250 µl 1,5 % Agar Noble (Difco Laboratories, Detroit, USA) beschichtet. Der Agar wurde in destilliertem Wasser gelöst und mit dem Nährmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, BRL Lifetechnologies, Eggenstein), 10 % fetalem Kälberserum (FCS, Gibco BRL), nicht essentiellen Aminosäuren (1,1 µl/ml), Streptomycin (1,8 µl/ml), Amphotericin B (3,6 µl/ml) und Fungizin (Gibco BRL) supplementiert. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ Konzentration und 100 % Luftfeuchtigkeit (Brutschrank, Haracell, Heraeus, Hanau), wobei das Medium alle 2 Tage, die Platte alle 7 Tage gewechselt wurde. Die Vitalität während der gesamten Kultivierung wurde mittels eines inversen Mikroskops (DMIRB, Leica, Heerbrugg) kontrolliert. Die völlige Epithelialisierung eines Mukosablocks trat nach 2-3 Wochen ein. Die Miniorgankulturen konnten bis zu 40 Tage ohne Vitalitätsverlust in Kulturbedingungen gelassen werden (Al Batran et al., 1999).

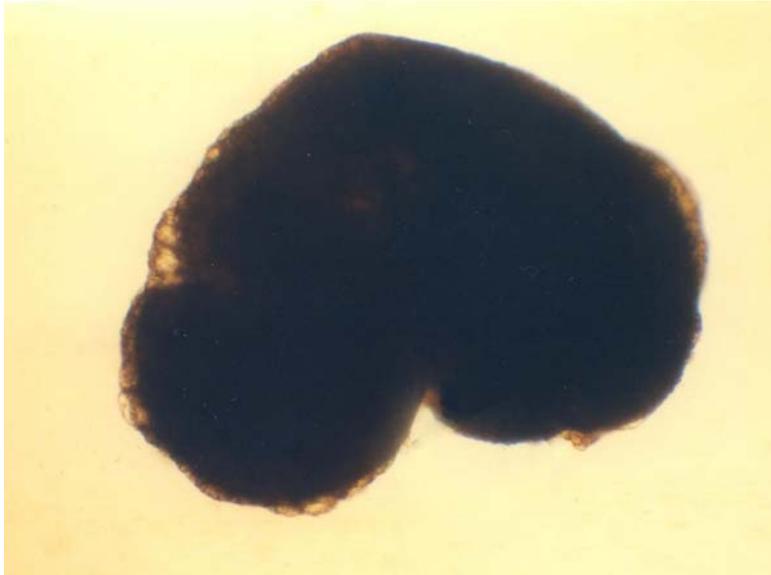


Abb.2: Vollständig epithelisiertes Miniorgan humaner oropharyngealer Mukosa

2.1.3 Fremdstoffinkubation

Sobald die Miniorgankulturen in vollem Umfang epithelialisiert waren, wurden sie mit einem genotoxischen Fremdstoff inkubiert. Dazu wurde Wasserstoffperoxid (H_2O_2 , Perhydrol, 30 %, Merck, Darmstadt) in einer Konzentration von 200 μM eingesetzt. Als Negativkontrolle diente bidestilliertes Wasser (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen). Inkubiert wurde 30 Minuten, bei 37 °C, in einem Schüttelwasserbad (GFL 1083). Der Entzug der Testsubstanz erfolgte durch zweimaliges Waschen mit 250 μl BEGM. Ein Teil der Miniorgankulturen wurde weitere 24 Stunden kultiviert, um Reparaturprozesse an der DNA zu ermöglichen. Der Rest wurde sofort nach der Inkubation zur Gewinnung von Einzelzellen verwendet und anschließend der Genotoxizitätsuntersuchung sowie dem Vitalitätstest zugeführt (s.Abb.3).

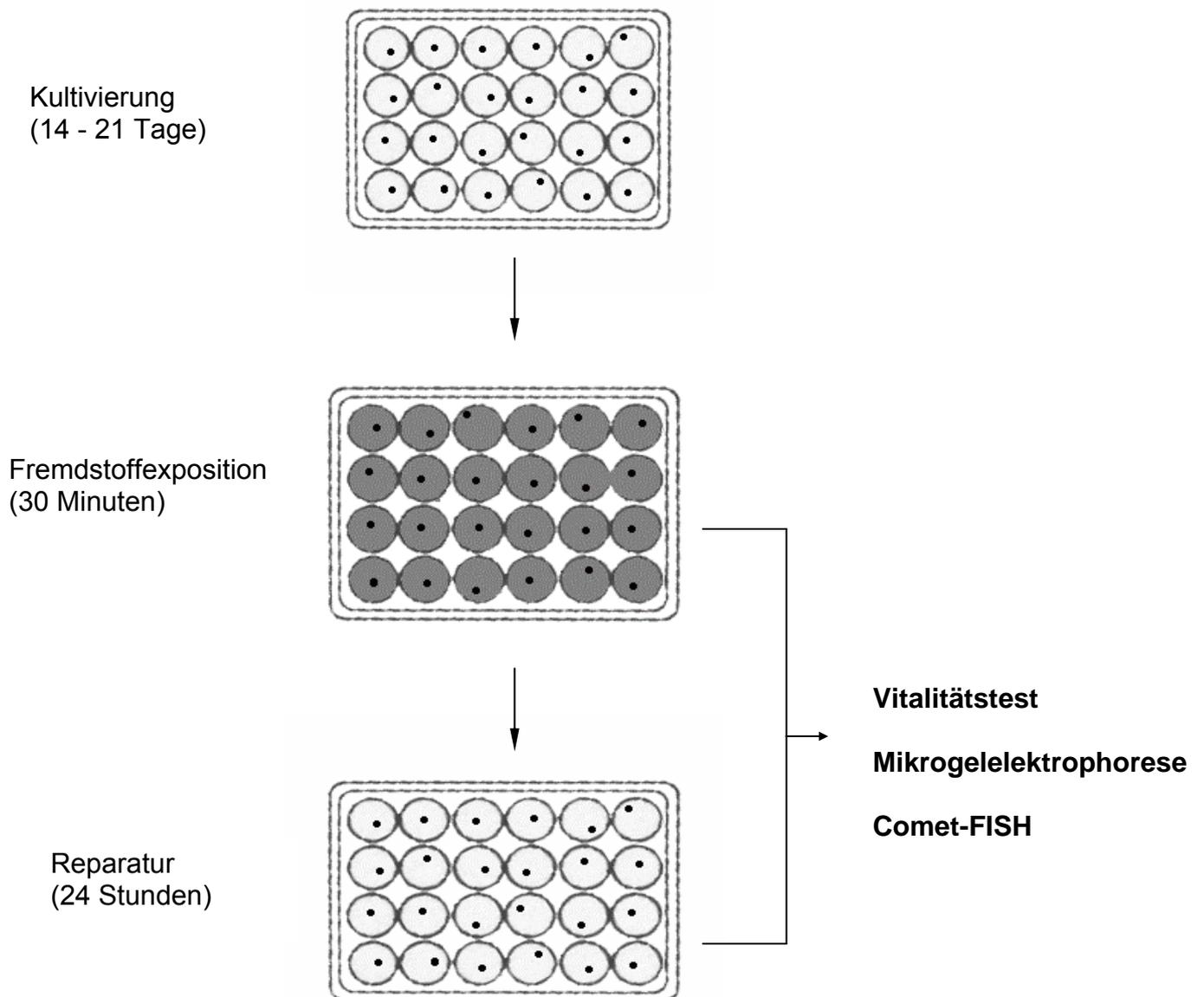


Abb.3: Schema von H₂O₂-Exposition der Miniorgankulturen. Die Miniorgane werden nach 14 - 21 Tagen mit H₂O₂ inkubiert. Unmittelbar nach der Exposition wird ein Teil davon dem Vitalitätstest, Mikrogelelektrophorese und Comet-FISH zugefügt. Ein anderer wird 24 Stunden weiter kultiviert und nach dieser Reparaturphase ebenfalls o.g. Untersuchungen zugefügt.

Isolierung der Zellen aus dem Epithelverbund fand in einem Enzymgemisch statt. Dieses bestand aus Kollagenase P (1 mg/ml, Boehringer, Mannheim), Hyaluronidase (1 mg/ml, Boehringer) und Protease E Typ 14 von *Streptomyces griseus* (5 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) gelöst in BEGM (Pool-Zobel et al., 1994). Es wurden je drei Miniorgane in einem Eppendorfgefäß (Safe Lock Tubes, 1,5 ml, Eppendorf Biopur,

Hamburg) mit 600 µl Enzymlösung im Schüttelwasserbad bei 37 °C 45 Minuten inkubiert. Nach kurzem Schütteln mittels eines Minishakers (MS1, IKA, Wilmington, USA) wurden die Bindgewebereste mit einer Kanüle entfernt. Um die Enzymaktivität zu beenden und das Verkleben der Zellen zu verhindern, wurde 600 µl FCS pro Reaktionsgefäß zugegeben. Anschließend erfolgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 800 U/Min und 4 °C. Nach dem Beseitigen des Überstandes wurde 1 ml kaltes PBS zugefügt und abermals unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde zwei weitere Male wiederholt. Die Pipettiervorgänge wurden auf Eis und unter Rotlicht durchgeführt um zusätzliche Schäden an der DNA zu vermeiden. Das gewonnene Zellpellet wurde weiter für die Vitalitätsmessung, Mikrogelelektrophorese und Fluoreszenz in situ Hybridisierung verwendet.

2.1.4 Vitalitätsbestimmung

Die Vitalitätsmessung der Zellen erfolgte anhand des Trypanblau-Ausschlusstestes (Philips, 1973). Der Farbstoff Trypanblau dringt durch die Zellmembran geschädigter Zellen ein. Dadurch erscheinen diese unter dem Mikroskop blau. Vitale Zellen hingegen verhindern ein Eindringen des Farbstoffes, da hier die Zellmembran intakt ist. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde mit 50 µl Trypanblau-Lösung (Trypan Blue Stain 0,4 %, Gibco™) versetzt. Hiermit wurde eine Neubauer-Zählkammer (Merck, Darmstadt) gefüllt und unter 400-facher Vergrößerung (Lichtmikroskop, Zeiss, Oberkochen) ausgezählt. Es wird der prozentuale Anteil der vitalen Zellen berechnet.

2.1.5 Materialien für Miniorgankulturen

Materialien	Anleitung
Agar für Miniorgankultur 2,25 g Agarpulver (Agar Nogle) 150 ml Aqua bidest.	Agarpulver und Aqua bidest. Vermischen, in Mikrowelle erhitzen, in 30 ml Portionen abfüllen und sterilisieren
Dublecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 500 ml Aqua bidest. 9,99 g DMEM Pulver 1,96 g HEPES Pulver	DMEM und HEPES in Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 7,2 einstellen, sterilfiltrieren und in 250 ml Portionen abfüllen
DMEM-Agarplatten 30 ml Agar Noble 30 ml DMEM 6 ml FCS 120 µl nicht essentielle Aminosäuren 120 µl Amphotericin B 240 µl Penicillin-Streptomycin-Lösung	DMEM, FCS, nicht essentielle Aminosäure, Amphotericin B und Penizilin-Streptomycin in einem sterilen Gefäß vermischen, Agar Noble in der Mikrowelle erhitzen, mit supplementiertem Medium versetzen und 24-Well-Platten mit Multipette in 200 µl Portionen beschichten
Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM) 500 ml Bronchial Epithelium Basal Medium (BEBM) Supplement Pack: BPE-26, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Triiodothyronin, Transferrin, Retinoic Acid	unter sterilen Bedingungen zugeben, gut mischen, bei 4 °C lagern

Tab.1: verwendete Materialien für Miniorgankulturen

2.2 Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)

Mikrogelelektrophorese wurde zum ersten Mal von Östling und Johanson (1984) zum Nachweis der DNA Schädigung an Einzelzellen nach UV-Bestrahlung eingesetzt. Das Verfahren bei neutralem pH-Wert erlaubte die Untersuchung von Doppelstrangbrüchen der DNA. Singh et al. (Singh et al., 1988) optimierten die Methode und stellten die alkalische Version des Comet Assay vor. Ein pH-Wert > 13 macht die Detektion von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen, DNA- Addukten und inkompletten Exzisionsreparaturvorgängen möglich.

Der Comet Assay ist eine in mehreren Varianten etablierte Untersuchungsmethode (McKelvey-Martin et al., 1993) und kann nahezu an jedem Zelltyp durchgeführt werden. Der Test bietet Möglichkeiten, die Wirkung genotoxischer Substanzen auf die Erbsubstanz zu quantifizieren und wird deswegen u.a. zum Biomonitoring von umwelt- und arbeitsbedingter Belastung eingesetzt (Moller et al., 2000).

Nach Lyse der Zell- und Kernmembranen erfolgte die alkalische Denaturierung der DNA. Anschließend wurde die DNA im elektrischen Feld aufgetrennt. Abhängig vom Ausmaß der induzierten Schädigung zeigten die DNA-Fragmente im elektrischen Feld verschiedene Migrationsmuster. Je stärker die Schädigung, d.h. je kleiner die Fragmente, desto schneller und damit weiter wanderte die DNA im elektrischen Feld. Daraus resultierte ein kometenähnliches Bild, mit weitgehend intakter DNA im Kopf und fragmentierter DNA im Schweif des „Kometen“.

2.2.1 Fixierung der Zellen auf Objektträgern

Die Objektträger, die mit der Mattierung entlang beider Längskanten versehen waren (24 mm x 70 mm, Langenbrinck, Emmendingen), wurden mit 85 µl 0,5 % Normal Melting Agarose (Biozym) beschichtet und mindestens 48 Stunden luftgetrocknet. Die Zellsuspension wurde mit 75 µl 0,7 % Low Melting Agarose (Biozym, Hameln) versetzt, auf den vorpräparierten Objektträgern verteilt und eingedeckt. Nach zehnmütigem Antrocknen auf einer gekühlten Platte erfolgte die Auftragung der zweiten Schicht der 0,7 % Agarose (85 µl), die eine bessere Einbettung der Zellen gewährleistet. Um zusätzliche DNA-Läsionen durch UV-Licht zu vermeiden wurde die gesamte Prozedur bei Rotlicht durchgeführt.

2.2.2 Lyse der Zell- und Kernmembranen

Die Auflösung der Zell- und Kernmembranen und Freisetzung der DNA fand in alkalischem Puffer (pH 10) statt, bestehend aus 2,5 M NaCl (Natriumchlorid, Sigma, Steinheim), 10 mM Trisma Base (Merck), 100 mM Na₂EDTA (Natrium Ethylendiamintetraacetat, Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg), 1 % N-Lauroylsarcosin Natrium Salz (Sigma), 1 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim). Triton X-100 und DMSO wurden kurz vor dem Versuch zum Puffer zugegeben. In der Lösung wurden die Objektträger mindestens 1 Stunde bis maximal eine Woche bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.3 Elektrophorese und Anfärbung der DNA

Nach der Lyse der Membranen erfolgte die Elektrophorese. Dafür wurden die Objektträger in eine horizontale Elektrophoresekammer (Renner, Dannstadt) anodennah eingebracht, die zuvor mit dem auf 4 °C gekühltem Elektrophoresepuffer gefüllt wurde. Nach 20 Minuten alkalischer Denaturierung und Entspiralisierung wurde die Elektrophorese gestartet (20 min; 25 V; 300 ±3 mA). Der Elektrophoresepuffer bestand aus 10mM NaOH (Natriumhydroxid, Merck) und 200 mM Na₂EDTA (pH 13). Nach der Auftrennung erfolgte eine Neutralisation durch dreimaliges Waschen mit Pufferlösung (400 mM Trizma Base, pH 7,5) in geringem Abstand. Anschließend wurden die Objektträger mit 75 µl Ethidiumbromid (0,2 mg/ml) angefärbt und in einer Feuchtkammer bei 4 °C im Dunkeln bis zur Auswertung aufbewahrt.

2.2.4 Digitale Auswertung

Die Analyse der Objektträger erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (DMLB Fluoreszenzmikroskop, Leica, Heerbrugg, Schweiz) und digitaler Bildverarbeitung (Comet 3.1, Kinetic Imaging, Liverpool, GB). Zur Quantifizierung der DNA-Läsionen und Reparaturkapazität wurde der *Olive Tail Moment* angewandt (OTM). Dieser beschreibt das Verhältnis zwischen der DNA im Kopf zur fragmentierten DNA im Schweif, multipliziert mit der gesamten Laufstrecke (Olive and Banath, 1993). Der

OTM Wert steigt mit zunehmender Fragmentierung der DNA und wird ohne Einheit angegeben. Es werden 80 Zellen pro Objektträger ausgewertet.

2.2.5 Materialien für Comet Assay

Materialien	Anleitung
proteolytische Enzymlösung 10 mg Hyaluronidase 10 ml Kollagenase P 50 mg Protease	in 10 ml BEGM auflösen, sterilfiltrieren
Agarose 0,5 % 0,5 %ige Low-Melting Agarose PBS	unter kurzem Erhitzen in der Mirowelle in PBS auflösen und bis zur Weiterverwendung im Wasserbad bei 37 °C aufbewahren
Agarose 0,7% 0,7 %ige Normal-Melting Agarose PBS	unter kurzem Erhitzen in der Mirowelle in PBS auflösen und bis zur Weiterverwendung im Wasserbad bei 37 °C aufbewahren
Lysepuffer 1 ml Triton X-100 10 ml DMSO 89 ml Lysestammlösung	Triton X-100 und DMSO in 100 ml Messzylinder geben; mit Lysestammlösung bis zum Eichstrich auffüllen
Lysestammlösung 146,4 g NaCl (2,5 M) 1,2 g Trihydroxymethylaminomethan (Tris; 19 mM) 37,2 g Na ₂ EDTA (100 mM) 10 g N-Laurylsarcosinnatriumsalz (1 %) Aqua bidest.	NaCl, Tris und N-Laurylsarcosinnatriumsalz in 500 ml Aqua bidest. lösen, Na ₂ EDTA in 160 ml Aqua bidest. mit Zugabe von NaOH-Plätzchen lösen; nach Zugabe aller Komponenten pH auf 10 einstellen und mit Aqua bidest. auf 1 Liter auffüllen
Elektrophoresepuffer 24 g NaOH –Plätzchen (300 mM) 0,744 g Na ₂ EDTA (1mM) Aqua bidest.	NaOH-Plätzchen und Na ₂ EDTA in 2 Liter Aqua bidest. lösen, bei 4 °C lagern
Neutralisationspuffer 48,5 g Tris Aqua bidest.	Tris in 1 l Aqua bidest. lösen, pH auf 7,5 einstellen, bei Raumtemperatur aufbewahren
Ethidiumbromidlösung 0,2 mg/ml Ethidiumbromidlösung in Aqua bidest. (Stammlösung)	1:10 Verdünnung der Stammlösung mit Aqua bidest. sterilfiltrieren, bei 4°C lichtgeschützt aufbewahren

Tab.2: verwendete Materialien für Comet Assay

2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist eine aussagekräftige Methode, die es ermöglicht, Nukleinsäuresequenzen in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen (=in situ) zu visualisieren. Der Mechanismus der FISH basiert auf Hybridisierung von spezifischen Nukleinsäuren (Sonden-DNA) an komplementäre Nukleinsäuresequenzen (Ziel-DNA). Die Ziel-DNA und die markierte DNA-Sonde werden in einer Formamidlösung durch Hitze denaturiert, die Hybridisierung wird durch Inkubation bei 37 °C ermöglicht. Die Markierung der Sonden-DNA mit fluoreszierendem Farbstoff lässt die darzustellende Sequenz lokalisieren. Mit der FISH-Technik ist es möglich, ein ganzes Chromosom (Einsatz von sogenannten Painting-Sonden), das Zentromer eines bestimmten Chromosoms oder auch simultan alle Chromosomen eines Chromosomensatzes (Zentromer-Sonden bzw. pan-zentromerische Zentromer-Sonde), Chromosomenenden (Telomer-Sonden) oder einzelne Abschnitte auf einem Chromosom (Gen-Sonden) zu identifizieren. Das FISH-Verfahren wurde erstmals von Pardue und Gall (Pardue and Gall, 1969) sowie von John et al. (John et al., 1969) beschrieben.

2.4 Comet-FISH

Die Kombination aus Comet Assay und FISH wurde an Lymphozyten von McKelvey-Martin et al. (1998) vorgestellt und von Harréus et al. (Harréus et al., 2004) für den Einsatz an humanen Schleimhautzellen modifiziert. Der Einsatz von fluoreszierenden DNA-Proben, die an spezifische Gen-Sequenzen hybridisieren, erlaubt die Lokalisation bestimmter Gene innerhalb eines Kometen. Mit der Messung von Anzahl und Lage der Hybridisierungssignale innerhalb von Kometen können Schädigung und Reparaturvorgänge in spezifischen Genloci dargestellt werden.

2.4.1 Entwässerung der Zellen und Auftragung der Sonden

Elektrophoretischer Auftrennung und Neutralisation der Zellen folgte zweimaliges Waschen mit SSC-Puffer (0,3 M NaCl, 30 mM Natrium Citrat; pH 7; Fa. Sigma) für jeweils 5 Minuten. Danach erfolgte eine fünfminütige Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 85 % und 100 %). Für die Gelstabilisierung

wurden die Objektträger auf einer Heizplatte (Reichert-Jung, Medax) 10 Minuten bei 37 °C getrocknet. Die Stellen, auf die die Sonden aufgetragen werden sollten (je zwei auf einen Objektträger), markierte man mit einem Diamantschreiber. In kleine Reaktionsgefäße (Safe-Lock Tubes, 0,5 ml, Eppendorf, Hamburg) wurden 7 µl Hybridisationspuffer (Dextran Sulfat, Formamid, SSC, pH 7; Fa. Vysis), 1 µl DNA-Sonde (Fluorophore-labeled painting probe and blocking DNA in Tris-EDTA Puffer) und 2 µl bidestilliertes Wasser vermischt und kurz abzentrifugiert. Die Nukleinsäuresequenzen (DNA-Sonden) waren entweder mit einem grünen fluoreszierendem Farbstoff - für die Chromosomen 3 und 8 (WCP 3, WCP 8 SpektrumGreen, Vysis) oder mit rotem – für die Chromosomen 5 und 11 (WCP 5, WCP 11 SpektrumOrange, Vysis) markiert. Das 10 µl Sondengemisch wurde auf die markierten Stellen aufgetragen, mit dem Deckglas abgedeckt und mit dem elastischen Kleber (Fixogum, Marabu) versiegelt.

2.4.2 Denaturierung und Hybridisierung der DNA

Denaturierung der Zielsequenz und der Sonde wurde durch Erhitzen auf ca. 72 °C erreicht. Die Objektträger wurden dafür auf einer Präzisionheizplatte (Harry Gestigkeit GmbH, Düsseldorf) 5 Minuten erhitzt. Danach wurden sie in die vorgewärmte Feuchtkammer hingelegt und über Nacht bei 37 °C inkubiert, um die Hybridisierung der Sonde mit der Zielsequenz zu ermöglichen. Schließlich wurde nichthybridisierte DNA bei 45 °C gespült, um störende Hintergrundsignale zu vermeiden. Dazu wurden die Objektträger drei Mal in 50 % Formamid/2xSSC Lösung (pH 7-8) und einmalig in 2 x SSC Lösung jeweils 10 Minuten gereinigt. Im Anschluss an eine fünfminütige Inkubation in 2 x SSC mit 0,1 % Detergent Tergitol NP-40 (pH 7) wurden die Objektträger luftgetrocknet.

2.4.3 Fluoreszenzfärbung und digitale Auswertung

Die nicht zu markierenden Teile der Chromosomen wurden mit dem Gegenfärbemittel 4'-6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 42 ng/ml, Vysis) eingefärbt, so dass über den erzielten Kontrast eine eindeutige Detektion der Zielsequenz ermöglicht wurde. 150 µl DAPI mit 75 µl Antifade (Vysis) wurden in einem Eppendorf-Gefäß vermischt. 15 µl der Mischung wurden auf die markierte Fläche aufgetragen,

mit einem Deckglas verschlossen und mit Nagellack versiegelt. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger bei -20°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Detektion der DNA Schädigung erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Leica DMLB, Leica, Heerbrugg) und gekoppeltem Computer. Das Mikroskop war mit drei Filtern und einer 100 Watt Lampe ausgestattet. Es wurden 20 Zellen pro Objektträger ausgewertet. Das hierbei verwendete Programm (Comet++, Kinetic ImagingTM) ermöglicht die Bestimmung des OTM und des *Munich Chromosomal Tail Moment* (MCTM). Der MCTM erlaubt quantitative Aussage über chromosomale Schädigung in einer Zelle. Er bildet ein Produkt von mittlerer chromosomaler Migrationstrecke und der chromosomalen Fluoreszenz im Schweif des Kometen geteilt durch die gesamte chromosomale Fluoreszenz der Zelle. Es wurde überdies die Anzahl von Hybridisations-Signalen bestimmt. Die Datenspeicherung erfolgte in einem Microsoft ExcelTM Format.

2.4.4 Schematischer Ablauf des Comet Assays und Comet-FISH

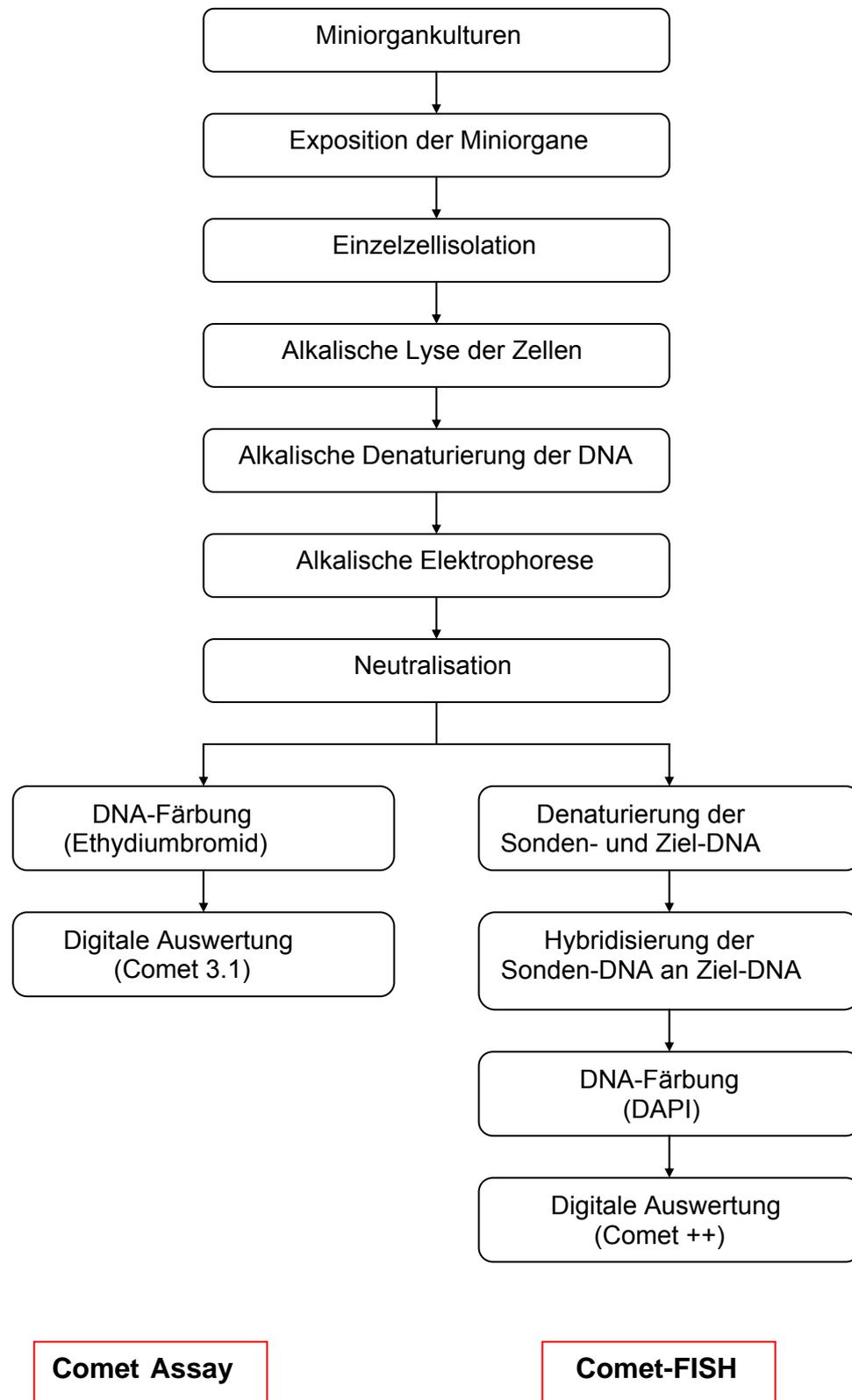


Abb.4: Schematischer Ablauf des Comet Assays und Comet-FISH

2.4.5 Materialien für Comet- FISH

Materialien	Anleitung
2xSSC-Lösung 100 ml 20xSSC Aqua bidest.	20xSSC und Aqua bidest. mischen und auf 1000 ml auffüllen, pH 7,0 (\pm 0,2) einstellen
DNA-Sonden 2 μ l DNA-Sonde 4 μ l Aqua bidest. 14 μ l LSI-Puffer	Komponenten in ein Eppendorff-Gefäß pipettieren und kurz mit Tischzentrifuge zentrifugieren
Formamid-Waschlösung 157,5 ml Formamid 31,5 ml 20 SSC 122 ml Aqua bidest.	Komponenten in einem 500 ml Standzylinder mischen und auf pH 7-7,5 einstellen (max. 7 Tage lagern)
2xSSC/NP-40-Lösung 1 ml NP-40 1000 ml SSC	NP-40 im Wasserbad erhitzen, bis es flüssig ist; langsam in 1000 ml SSC lösen und auf pH 7,0 (\pm 0,2) einstellen (6 Monate haltbar)
DAPI DAPI Antifade III-Puffer	DAPI und Antifade im Verhältnis 2.1 mischen

Tab.3: verwendete Materialien für Comet-FISH

2.5 Untersuchung zur DNA-Reparatur

Die Mutagensensitivität und die DNA-Reparaturkapazität wurden mittels Comet-FISH bestimmt. Die Kombination von beiden Methoden gab die Möglichkeit strukturelle, chromosomale Veränderungen nach oxidativen Schäden nachzuweisen. Die häufigsten Aberrationen bei Kopf-Hals-Karzinomen wurden für die Chromosomen 3, 5, 8, 9, 11 und 18 beschrieben (Bockmühl, 1998). Die Reparaturkapazität wurde durch den Vergleich der Alterationen von Chromosomen 3, 5, 8 und 1 zwischen Patienten mit und ohne Karzinom des Oropharynx untersucht (Harréus et al., 2004).

Die Miniorgankulturen wurden dreißig Minuten mit H_2O_2 (200 μM) inkubiert. Nach Herauswaschen des Fremdstoffs mit BEGM erfolgte eine 24-stündige Reparatur durch Weiterkultivierung bei Bedingungen, wie unter 2.1.2 beschrieben. Nach dem Ablauf der Zeit wurden die Miniorgane wie unter 2.1.4. beschrieben aufgetrennt und anschließend der Mikrogelelektrophorese und Comet-FISH zugeführt.

Die DNA-Reparaturkapazität (DRC) wird aus dem Anteil reparierter Zellen nach der Schädigung und den Zellen mit der Ausgangsschädigung bestimmt.

$$\text{DRC} = 100 - \frac{\text{OTM (nach 24 Stunden Reparatur)} \times 100}{\text{OTM nach Ausgangsschädigung durch } \text{H}_2\text{O}_2}$$

2.6 Methodenspezifische Labormaterialien

2.6.1 Enzyme, Zellkulturmedien und Chemikalien

Chemikalien	
Agar Noble	DIFCO, Detroit, USA
Bovine Serum Albumin	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol 70, 85, 100 %	Klinikapotheke der LMU
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na ₂ EDTA)	Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Steinheim
Low-Melting-Agarose: Sea Plaque GTG	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-Laurylsacrosinnatriumsalz (C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, Steinheim
Normal-Melting-Agarose: Seakem LE	FMC-Bio Products, Rockland, USA
NP-40	Abbott, Illinois, USA
Saline sodium citrate buffer (SSC)	Abbott, Illinois, USA
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypanblau 0,4%	Merck, Darmstadt
Wasserperoxid 30 %	Merck, Darmstadt

Tab.4: verwendete Chemikalien

Enzyme, Zellkulturmedien, Zusätze

Amphotericin B	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM)	Promocell, Heidelberg
DAPI	Abbott, Illinois, USA
DNA-Sonden	Abbott, Illinois, USA
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Hyaluronidase aus Schafshoden	Roche, Mannheim
Kollagenase P aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Roche, Mannheim
MEM-Joklik (ohne L-Glutamin und NaHCO ₃)	Linaris, Wertheim-Bettingen
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS, ohne Calcium, Magnesium, Natriumbicarbonate)	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI): w/NaHCO ₃ , N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin	Biochrom, Heidelberg
Supplementpack für BEGM	Promocell, Heidelberg

Tab.5: verwendete Enzyme, Zellkulturen, Zusätze

2.6.2 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör

Verbrauchsmaterialien	
24-Well-Platte	Falcon, Heidelberg
Deckgläser zum Mikroskopieren Glasdicke 0,08 – 0,12 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Farbfilme ISO 100, ISO 400	Kodak, New York, USA
Kryoröhrchen 2 ml, steril	Nalgene, Rochester, USA
Objektträger 24x70 mm	Merck, Darmstadt
Objektträger 24x70 mm, je 5mm seitlich mattiert	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträgerkasten für 50 Objektträger	GLW, Würzburg
Pasteurpipetten, steril 7 ml	Merck, Darmstadt
Pasteurpipetten, unsteril 7 ml	Merck, Darmstadt
Pipetten (2 µl, 10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (5 µl, 10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Schreibdiamant	Renner, Darmstadt

Tab.6: verwendete Verbrauchsmaterialien

Geräte und Zubehör

Analysenwaage Voyager (0,1mg – 62 g)	Ohaus, Gießen
Auswertung/ Datenspeicherung:	
Programm Comet 3.1.	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Comet++	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Excel	Microsoft
Elektrophoresegerät E865	Renner, Dannstadt
Gefrierschrank (-80°C)	New Brunswick Scientific, Nürtingen
horizontale Elektrophoresekammer (237 x 180 mm)	Renner, Dannstadt
Kühlschrank (+4°C) und Gefrierschrank (-30°C)	Bosch, Stuttgart
Mikroskope:	
Standardmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Inversmikroskop DMIRB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop DMLB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem N2.1, BP 516-560	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem I3, BP 450-490	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Objektive 100x/1,25 Öl; 40x/0,5;	Leica, Heerbrugg, Schweiz
10x/0,22; 4x/0,1	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht, Schorndorf
Minishaker MS1	Clarkson Lab., Chula Vista, USA
Kryo -1°C-Freezing -Container	Nalgene, Rochester, USA
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Spiegelreflexkamera	Minolta, Osaka, Japan
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Reichert-Jung, Kiel

Waage 1419 (1mg – 600 g)	Sartorius, Gießen
Zählkammer nach Neubauer	Merck, Darmstadt
Zentrifuge, Varifuge 3.0R	Heraeus, Darmstadt
Zentrifuge, Varifuge 3.0RS	Sartorius, Gießen

Tab.7: verwendete Geräte und Zubehör

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS™ 13.1. Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Boxplots. Der Boxplot besteht aus einer Box, die vom 25. Perzentil (25 % aller Werte sind kleiner) und vom 75. Perzentil (25 % aller Werte sind größer) begrenzt wird. Die innere Linie repräsentiert den Median. Der kleinste und der größte Wert werden durch die umgekehrte bzw. obere T-Linie markiert. Extremwerte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen, werden mit einem Stern markiert, Ausreißerwerte, die um mehr als eineinhalb Kastenlängen außerhalb liegen, mit einem Kreis. Die Unterschiede zwischen den OTM/MCTM-Werten wurden mit jeweiligen Kontrollen verglichen und mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Daten geprüft. Die unterschiedliche Werte von den Patienten mit Oropharynxkarzinom gegenüber tumorfreien Patienten wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei Stichproben getestet.

3.2 DNA-Schädigung an Miniorganen

Genotoxische und mutagene Effekte von Wasserstoffperoxid wurden mit Comet-FISH an Miniorgankulturen gemessen. Durch den Einsatz der Miniorgankulturen konnten der *in-vivo*-Situation ähnliche Verhältnisse geschaffen werden. Die alkalische Mikrogelelektrophorese ermöglicht die Darstellung von DNA-Strangbrüchen, alkalilabilen Stellen, Crosslinks, DNA-Addukten und unvollständiger DNA-Reparatur. Die DNA-Migration im Spannungsfeld der Elektrophorese und die Entstehung der Kometen sind abhängig von dem Grad induzierter DNA-Schädigung. DNA-Fragmente befinden sich im Schweif des Kometen, intakte DNA hingegen verbleibt im Kopf. Durch die Fluoreszenzfärbung der DNA mit Ethidiumbromid können die Kometen visualisiert und unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

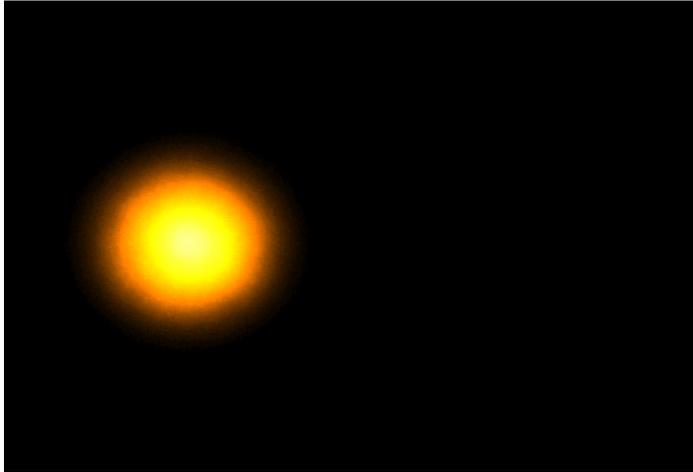


Abb.5: DNA einer Schleimhautzelle ohne Inkubation mit H₂O₂

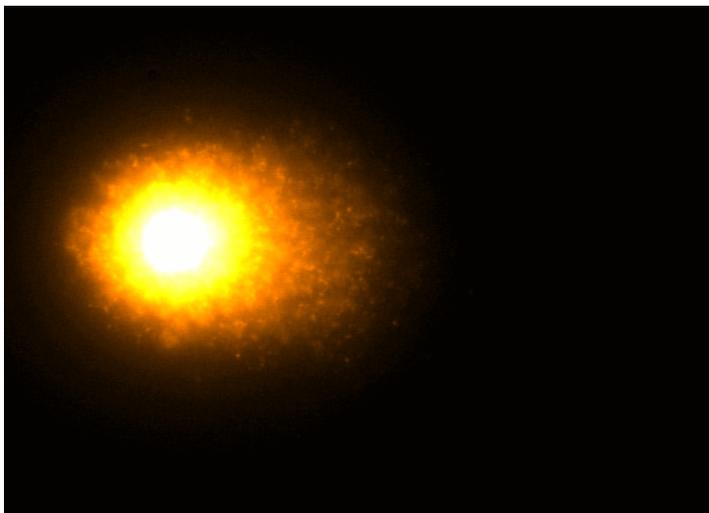


Abb.6: DNA einer Schleimhautzelle nach der Inkubation mit H₂O₂

Die Kombination des Comet Assay mit der Fluoreszenz in-situ-Hybridisierung (FISH) ermöglicht neben der quantitativen Darstellung genotoxischer Schäden und deren Reparatur die Analyse einzelner Chromosomen und deren Verhalten innerhalb des Kometen. In der vorliegende Arbeit wurden die Chromosomen 3, 5, 8 und 11 mittels FISH analysiert. Mit einem Fluorochrom markierte DNA-Sonden ermöglichten die Lokalisierung der untersuchten Chromosomen. Im Fall ungeschädigter Chromosomen konnten zwei Fluoreszenz-Signale beobachtet werden, mehrere hingegen deuteten auf Chromosomen-Brüche hin. Die gesamte DNA wurde mit DAPI gefärbt.

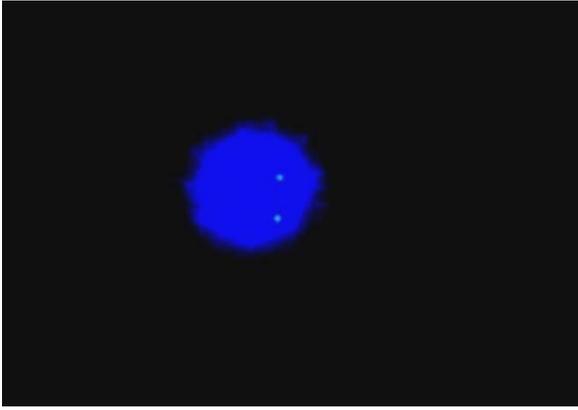


Abb.7.: DNA einer oropharyngealen ungeschädigten Schleimhautzelle eines Tumorpatienten. Die Gesamt-DNA und Chromosom 3 (grün) weisen keine Schädigung auf.

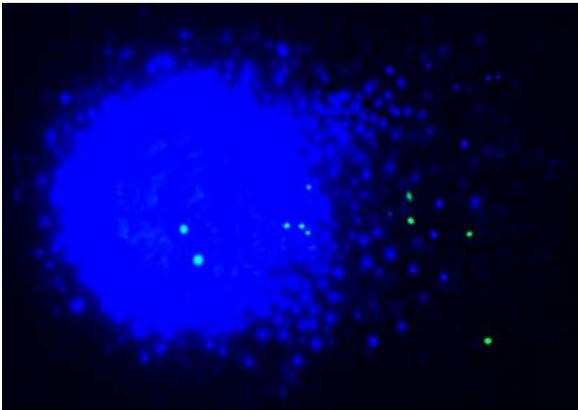


Abb.8: DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Tumorpatienten nach Inkubation mit H_2O_2 . Die Gesamt-DNA (blau) und Chromosom 8 (grün) weisen Schädigung auf.

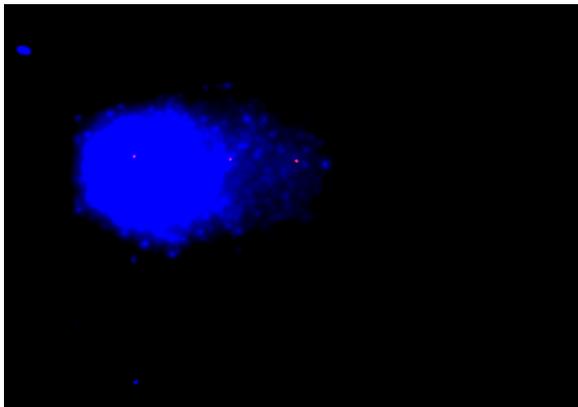


Abb.9: DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Tumorpatienten nach Inkubation mit H_2O_2 . Die Gesamt-DNA (blau) und Chromosom 5 (rot) weisen Schädigung auf.

3.2.1 Schädigung der Gesamt-DNA der Schleimhautzellen

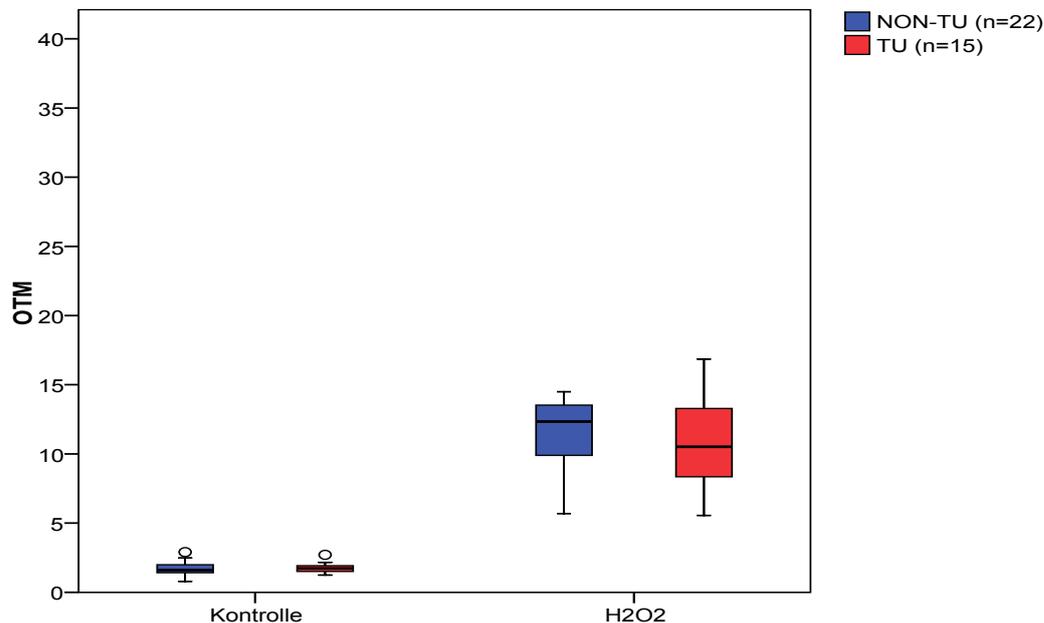


Abb.10: Die DNA-Schädigung von Schleimhautzellen nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und ohne der H_2O_2 -Inkubation (Kontrolle). Darstellung der Olive Tailmoment (OTM)-Mittelwerte und Standardfehler bei Tumor- (TU) und Kontrollpatienten (NON-TU).

Die Inkubation der Miniorgankulturen mit Wasserstoffperoxid führte zur einer deutlichen DNA-Schädigung bei Tumor-, als auch bei Kontrollpatienten. Die OTM-Werte lagen bei 10,9 beziehungsweise 11,8. Die Werte der Negativkontrolle waren 1,8 (Tumorpatienten) und 1,6 (Kontrollen).

Zwischen den Werten für beide Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied weder für H_2O_2 noch für die Negativkontrolle festgestellt werden (Tab.9).

Tab.8: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich H_2O_2 -Schädigung zur Kontrolle bei Tumor bzw. tumorfreien Patienten

NON-TU H_2O_2 / NON-TU Kontrolle	$p \leq 0,001$
TU H_2O_2 / TU Kontrolle	$p \leq 0,001$

Das Signifikanzniveau nach Bonferroni Korrektur lag bei $p \leq 0,025$

Tab.9: p-Werte im Mann-Whitney Test für den Vergleich der Kontrolle bei Tumor- / tumorfreien Patienten bzw. H_2O_2 -Schädigung bei Tumor- / tumorfreien Patienten

NON-TU Kontrolle / TU Kontrolle	$p \geq 0,421$
NON-TU H_2O_2 / TU H_2O_2	$p \geq 0,300$

Das Signifikanzniveau nach Bonferroni Korrektur lag bei $p \leq 0,025$

3.2.2 Chromosomale Schädigung bei tumorfreien Patienten

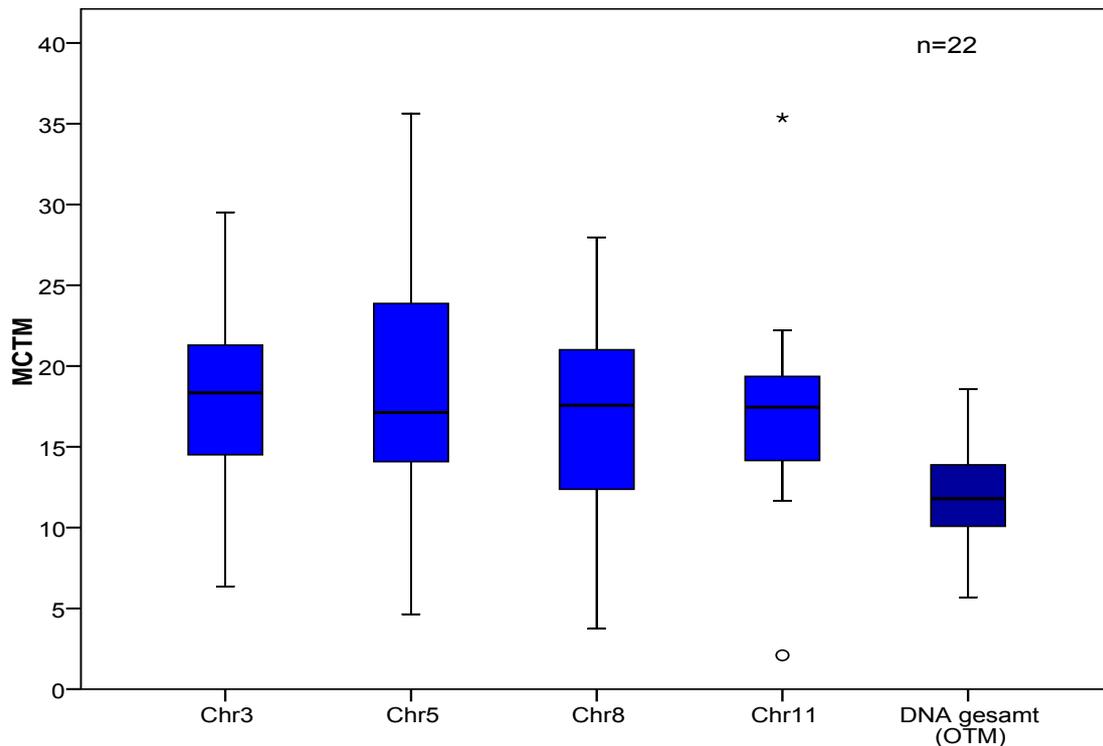


Abb.11: Schädigung der Chromosomen 3,5,8 und 11 in Schleimhautzellen tumorfreier Spender nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid angegeben als *Munich Chromosomal Tailmoment* (MCTM)-Mittelwert und Standardfehler. Die Werte wurden mit der gesamten DNA-Schädigung, angegeben als Olive Tailmoment (OTM), verglichen.

Der MCTM für die Chromosomen 3, 5, 8 und 11 in Schleimhautzellen der Kontrollen nach der Inkubation mit H_2O_2 ergab Mittelwerte von 17,9 (Chr3), 18,8 (Chr5), 16,6 (Chr8) und 17,2 (Chr11). Der OTM-Mittelwert für die Schädigung der Gesamte-DNA lag bei 11,8. Mittels Wilcoxon-Test wurde die Schädigung der Chromosomen mit der gesamten DNA-Schädigung einer Zelle verglichen. Es konnten signifikante Unterschiede der DNA-Schädigung zwischen allen Chromosomen und der gesamten DNA- Schädigung festgestellt werden (Tab.10).

Tab.10: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der chromosomalen gegenüber gesamter DNA-Schädigung

Chromosom 3 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$
Chromosom 5 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$
Chromosom 8 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$
Chromosom 11 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$

Das Signifikanzniveau nach Bonferroni Korrektur lag bei $p \leq 0,0125$ definiert

3.2.3 Chromosomale Schädigung bei Tumor-Patienten

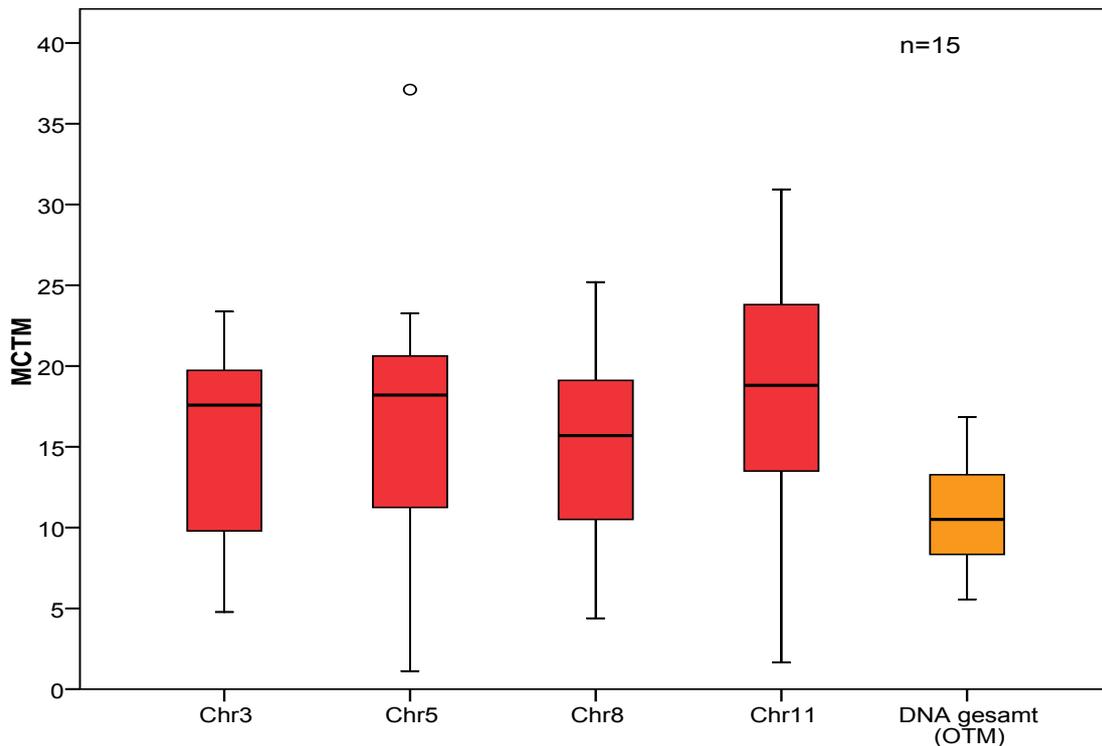


Abb.12: Schädigung der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 in Schleimhautzellen von Tumorpatienten nach der Inkubation mit Wasserstoffperoxid angegeben als *Munich Chromosomal Tailmoment* (MCTM)-Mittelwert und Standardfehler. Die Werte wurden mit der gesamten DNA-Schädigung, angegeben als Olive Tailmoment, verglichen.

In Schleimhautzellen von Patienten mit Oropharynxkarzinom wurden für die einzelne Chromosome mittlere MCTM-Werte von 15,5 (Chr3), 16,7 (Chr5), 15,1 (Chr8) und 18,0 (Chr11) gemessen. Der OTM-Mittelwert für die DNA Gesamt-Schädigung war 10,9. Es wurden statistisch signifikante Unterschiede in der Fragmentierung der Chromosomen 3,5 und 11 im Vergleich mit der gesamten DNA festgestellt (Tab.11). Es wurde jedoch kein signifikanter Unterschied in der Fragmentierung des Chromosoms 8 im Vergleich mit der gesamten DNA beobachtet.

Tab.11: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der chromosomalen gegenüber gesamter DNA-Schädigung

Chromosom 3 / DNA gesamt	$p \leq 0,012$
Chromosom 5 / DNA gesamt	$p \leq 0,006$
Chromosom 8 / DNA gesamt	$p \leq 0,015$
Chromosom 11 / DNA gesamt	$p \leq 0,004$

Das Signifikanzniveau nach Bonferroni Korrektur lag bei $p \leq 0,0125$

3.2.4 Vergleich der Schädigung bei Tumorpatienten und Kontrollen

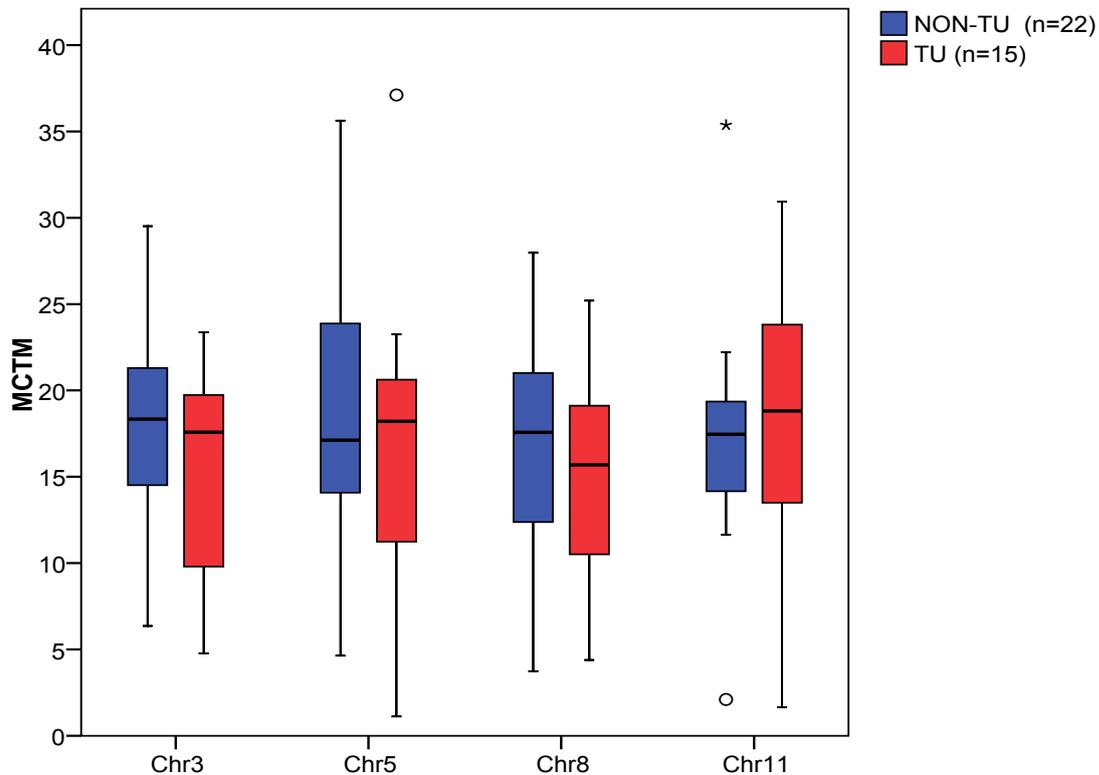


Abb.13: Vergleich der Schädigung von Chromosomen 3, 5, 8 und 11 bei Kontrollen und Tumorpatienten nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid angegeben als *Munich Chromosomal Tailmoment* (MCTM)-Mittelwert und Standardfehler

Die MCTM-Mittelwerte nach der DNA-Schädigung in Schleimhautzellen der Non-Tumorpatienten lagen bei 17,9 (Chr3), 18,81 (Chr5), 16,6 (Chr8) und 17,2 (Chr11). Die Werte für Tumorpatienten waren 15,5 (Chr3), 16,7 (Chr5), 15,1 (Chr8) und 18,0 (Chr11). Die statistische Analyse mittels Mann-Whitney Test ergab keine signifikanten Unterschiede in der chromosomalen Schädigung zwischen den beiden Patientengruppen (Tab.12).

Tab.12: p-Werte im Mann-Whitney Test für den Vergleich der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 zwischen Tumorpatienten (TU) und Non-Tumorpatienten (NON-TU)

NON-TU Chr3 / TU Chr3	$p \geq 0,300$
NON-TU Chr5 / TU Chr5	$p \geq 0,610$
NON-TU Chr8 / TU Chr8	$p \geq 0,412$
NON-TU Chr11 / TU Chr11	$p \geq 0,395$

Das Signifikanzniveau nach Bonferroni Korrektur lag bei $p \leq 0,0125$

3.3 DNA Reparaturkapazität

Nach der DNA-Schädigung durch eine einstündige Inkubation der Miniorgankulturen des Oropharynx mit H_2O_2 wurde das Reparaturverhalten der DNA untersucht. Die DNA Reparaturkapazität (DRC) wurde für ein Reparaturintervall von 24 Stunden bestimmt. Die persistierenden Schäden wurden mit Comet-FISH quantifiziert.

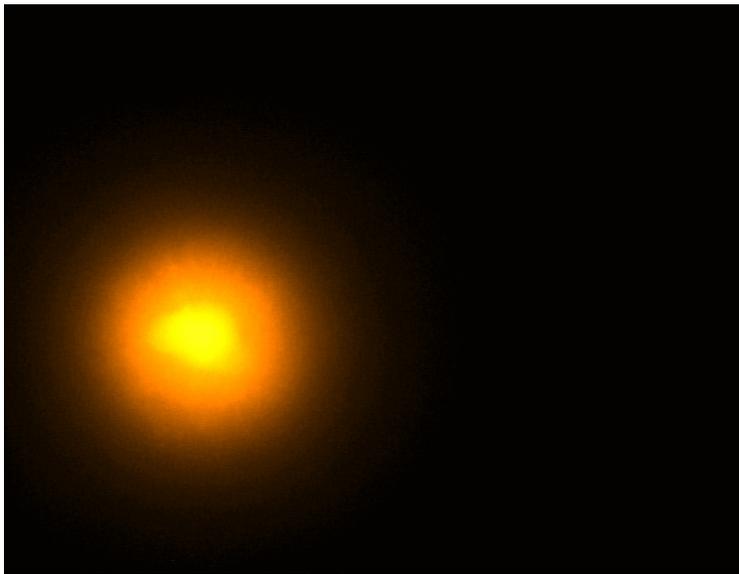


Abb.14 DNA einer Schleimhautzelle nach der Inkubation mit H_2O_2 und anschließender 24-stündiger Reparaturphase

3.3.1 DNA Reparaturkapazität bei Tumor- und tumorfreien Patienten

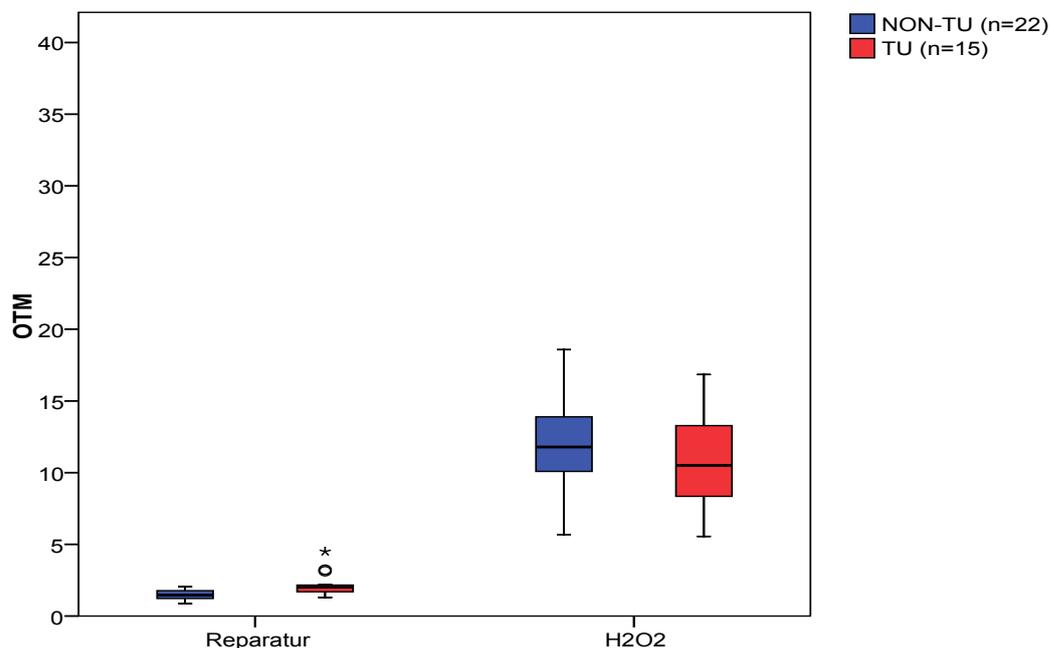


Abb.15: DNA-Schädigung und DNA-Reparatur in Schleimhautzellen nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Darstellung der *Olive Tailmoment* (OTM)-Mittelwerte und Standardfehler bei Tumor- (TU) und tumorfreien Patienten (NON-TU)

Die Inkubation der Miniorgankulturen von tumorfreien Patienten mit Wasserstoffperoxid verursachte deutliche DNA-Schädigung und ergab den OTM-Mittelwert von 11,8. Das 24-stündige Reparaturintervall führte zur erheblichen Reduzierung der DNA-Schädigung (Abb.15). OTM-Mittelwert lag bei 1,5, was 87,3 % DRC entspricht. Bei den Tumorpatienten nach 24-stündiger Reparatur konnte die Ausgangsschädigung durch H_2O_2 vom OTM 10,9 auf OTM 2,2 reduziert werden (DRC 79,9 %). Mittels Wilcoxon-Test wurde H_2O_2 -Schädigung vrs. Reparatur bei Tumor bzw. tumorfreien Patienten verglichen. Mit Mann-Whitney-U Test hingegen wurden die Reparaturvermögen der Kontrollen vrs. Tumorpatienten analysiert. Es wurden signifikante Unterschiede in beiden Fällen festgestellt (Tab. 13).

Tab 13. : p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich H_2O_2 -Schädigung vrs. Reparatur bei Tumor bzw. Kontrollpatienten und in Mann-Whitney-U Test für den Vergleich der Reparatur beider Gruppen

NON-TU H_2O_2 / NON-TU Reparatur	$p \leq 0,001$
TU H_2O_2 / TU Reparatur	$p \leq 0,001$
NON-TU Reparatur / TU Reparatur	$P \leq 0,001$

Das Signifikanzniveau nach Bonferroni Korrektur lag bei $p \leq 0,025$

3.3.2 Reparatur der chromosomalen DNA bei Kontrollpatienten

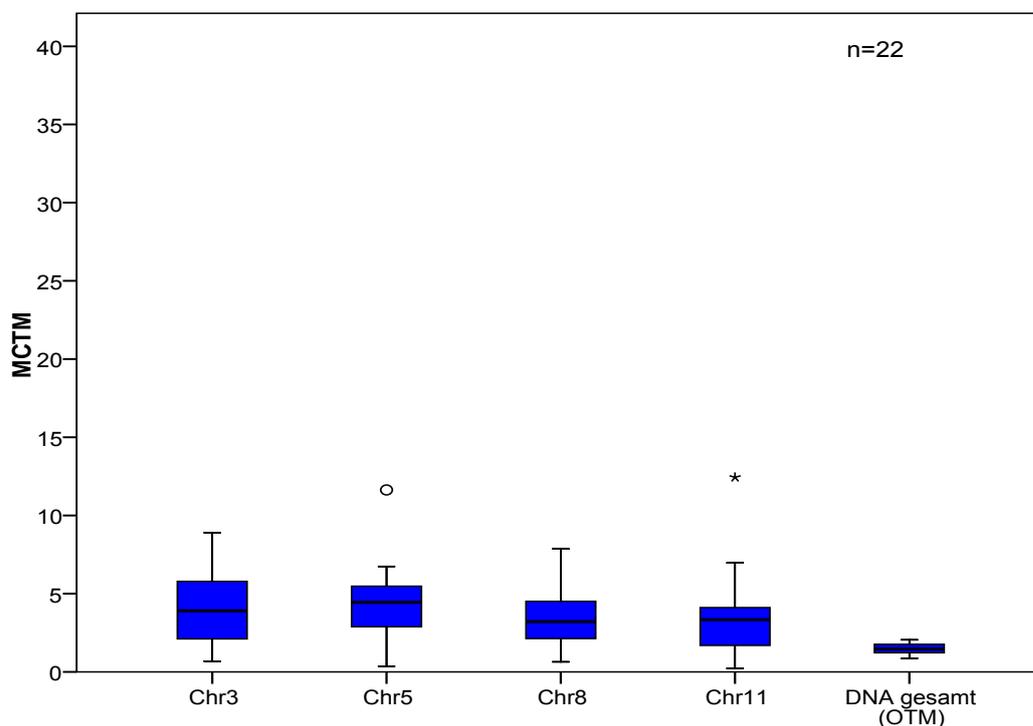


Abb.16: Reparatur der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 in Schleimhautzellen der Kontrollpatienten nach Schädigung mit Wasserstoffperoxid angegeben als *Munich Chromosomal Tailmoment* (MCTM)-Mittelwert und Standardfehler. Die Werte werden mit der Reparatur der gesamten DNA, angegeben als *Olive Tailmoment* (OTM), verglichen.

Der MCTM für die Chromosomen 3, 5, 8 und 11 in Schleimhautzellen der tumorfreien Patienten nach der Inkubation mit H_2O_2 und anschließendem 24-stündigem Reparaturintervall ergab Mittelwerte von 4,1 (Chr3), 4,2 (Chr5), 3,4 (Chr8) und 3,5 (Chr11). Der OTM-Mittelwert für die gesamte DNA nach der gleichen Behandlung der Zellen war 1,5. Mittels Wilcoxon-Test wurde die Reparatur der Chromosomen mit der Reparatur der gesamten DNA-Reparatur einer Zelle verglichen. Es konnten signifikante Unterschiede in der Reparatur aller Chromosomen und der gesamten DNA festgestellt werden (Tab.14).

Tab.14: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der chromosomalen gegenüber gesamter DNA-Reparatur

Chromosom 3 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$
Chromosom 5 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$
Chromosom 8 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$
Chromosom 11 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$

Das Signifikanzniveau nach Bonferroni Korrektur lag bei $p \leq 0,0125$

3.3.3 Reparatur der chromosomalen DNA bei Patienten mit Karzinom des Oropharynx

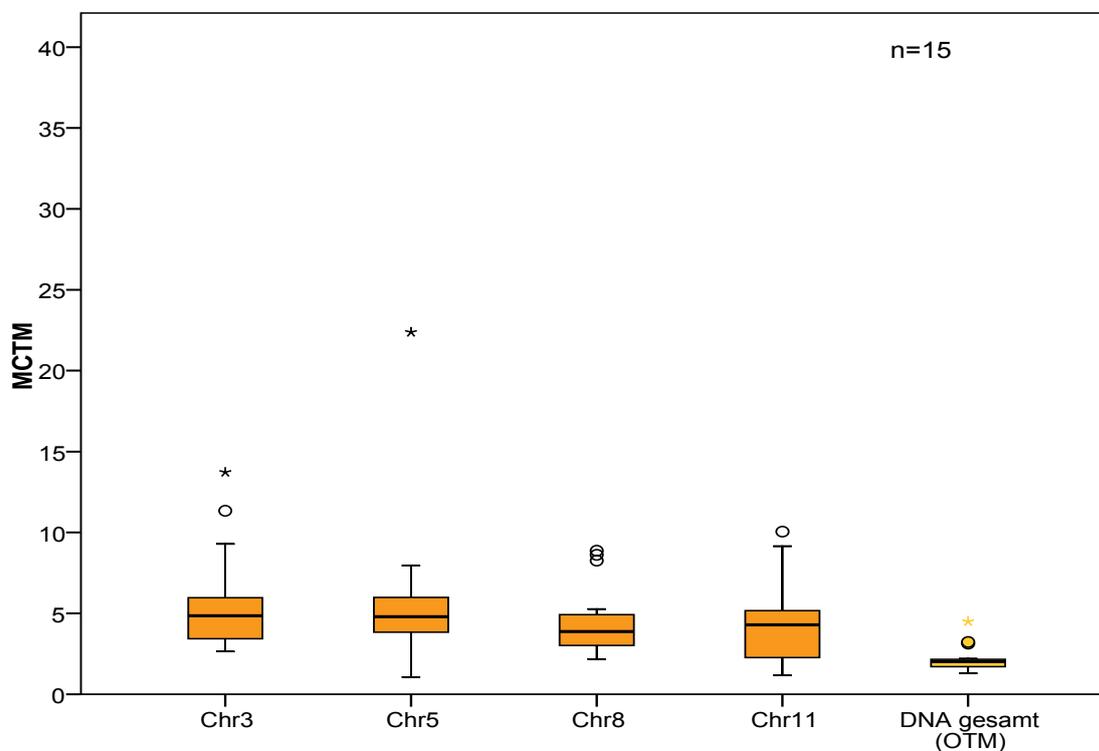


Abb.17: MCTM-Mittelwerte und Standardfehler nach der Reparatur der oxidativ-geschädigten Chromosomen 3, 5, 8 und 11 in Schleimhautzellen von Tumor-Patienten. Die Werte werden mit der Reparatur der gesamten DNA, angegeben als *Olive Tailmoment* (OTM), verglichen.

Die 24-stündige Reparaturphase nach der H_2O_2 -Exposition der Schleimhautzellen von Tumor-Patienten bewirkte einen wesentlichen Rückgang der DNA-Schädigung. Die mittleren MCTM-Werte lagen bei 5,7 (Chr3), 5,9 (Chr5), 4,5 (Chr8) und 4,4 (Chr11). Die Reparatur der Gesamt-DNA ergab die mittlere OTM-Wert 2,2. Der Vergleich der Reparatur der einzelnen Chromosomen und der Reparatur der Gesamt-DNA mittels Wilcoxon-Test ergab signifikante Unterschiede (Tab.15).

Tab.15: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der chromosomalen gegenüber gesamter DNA-Reparatur

Chromosom 3 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$
Chromosom 5 / DNA gesamt	$p \leq 0,001$
Chromosom 8 / DNA gesamt	$p \leq 0,003$
Chromosom 11 / DNA gesamt	$p \leq 0,005$

Das Signifikanzniveau nach Bonferroni Korrektur lag bei $p \leq 0,0125$

3.3.4 Vergleich der Reparatur bei Tumor- und Kontrollpatienten

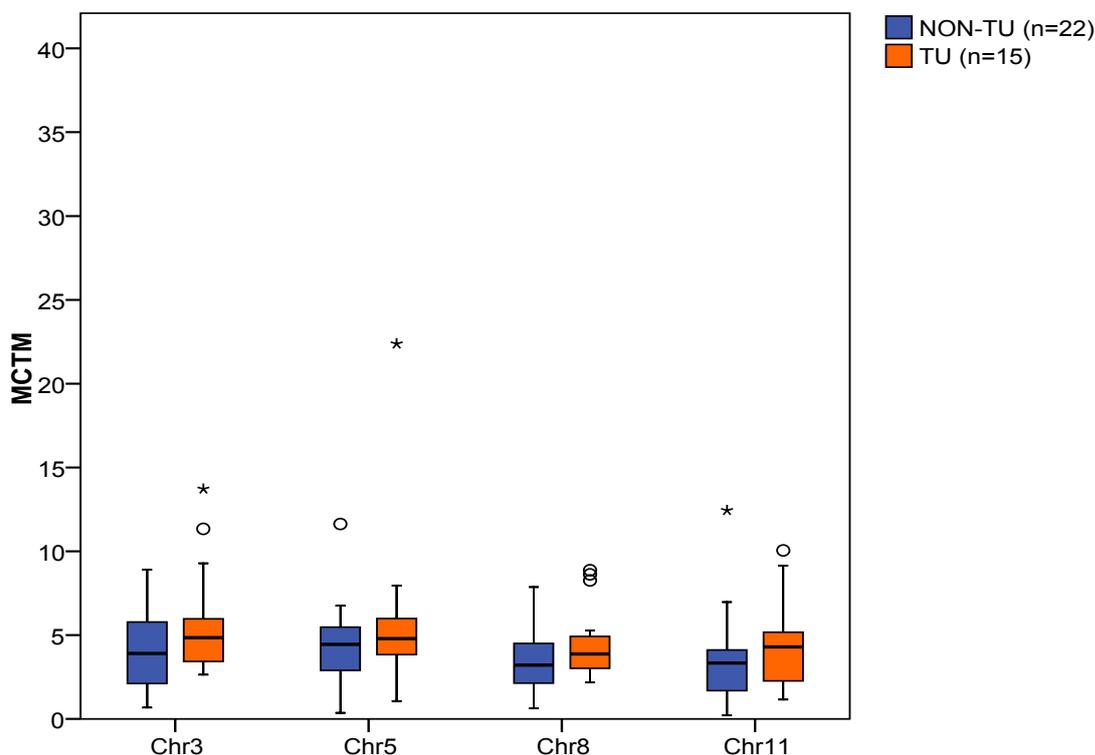


Abb.18: Vergleich der Reparatur der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 bei Kontrollpatienten und Tumorpatienten nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid angegeben als *Munich Chromosomal Tailmoment* (MCTM)-Mittelwert und Standardfehler

Die Messung der DNA-Schädigung nach der 24-stündigen Reparaturphase in Schleimhautzellen von tumorfreien Spender ergab die folgende mittlere MCTM-Werte: 4,1 (Chr3), 4,2 (Chr5), 3,4 (Chr8) und 3,5 (Chr11). Die MCTM-Werte von Patienten mit Karzinom des Oropharynx nach der gleichen Behandlung der Zellen waren 5,7 (Chr3), 5,9 (Chr5), 4,5 (Chr8) und 4,4 (Chr11). Es wurden Unterschiede in der DNA-Reparatur der einzelnen Chromosomen zwischen beiden Patientengruppen beobachtet. Die waren jedoch statistisch nicht signifikant (Tab.16).

Tab.16: p-Werte im Mann-Whitney Test für den Vergleich der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 zwischen Tumorpatienten (TU) und tumorfreien Patienten (NON-TU).

NON-TU Chr3 / TU Chr3	$p \geq 0,150$
NON-TU Chr5 / TU Chr5	$p \geq 0,330$
NON-TU Chr8 / TU Chr8	$p \geq 0,138$
NON-TU Chr11 / TU Chr11	$p \geq 0,222$

Das Signifikanzniveau nach Bonferroni Korrektur lag bei $p \leq 0,0125$

3.4 Anzahl der Fluoreszenz-Signale

In der vorliegenden Arbeit konnten mit Comet-FISH die Schädigungsmuster einzelner Chromosomen und der gesamten DNA der Schleimhautzellen des Oropharynx dargestellt und analysiert werden. Das Einsetzen der direkt markierenden DNA-Sonden ermöglichte die Visualisierung der untersuchten Chromosomen 3, 5, 8 und 11. Die gesamte DNA wurde mit DAPI gefärbt und die chromosomale Fluoreszenz-Signale innerhalb der Gesamt-DNA lokalisiert. Zwei Signale representieren ein ungeschädigtes Chromosomenpaar, mehrere Signale hingegen könnten auf Chromosomenbrüche und unvollständige DNA-Reparatur deuten. Die Wanderungstrecke der DNA-Fragmente ist, wie oben unter 2.2 beschrieben, von dem Ausmaß der Schädigung abhängig. Die Fluoreszenz-Signale können deswegen in Kopf oder/und im Schweif des Kometen verteilt sein.

3.4.1 Anzahl der Fluoreszenz-Signale in unbehandelten Schleimhautzellen bei Tumor- und Kontrollpatienten

In unbehandelten Zellen von tumorfreien Spender wurden durchschnittlich 2,0 Fluoreszenz-Signale der Chromosome 3, 5, 8, 11 in Kometen gezählt. Dies deutet auf ungeschädigte chromosomale DNA. In Schleimhautzellen von Tumorpatienten hingegen konnte man Chromosomenbrüche beobachten. Die Zellen wiesen mehr als zwei Hybridisierung-Signale der allen untersuchten Chromosomen auf (Tab. 17).

	NON-TUMOR		TUMOR	
Kontrolle	Anzahl der Signale KOPF	Anzahl der Signale SCHWEIF	Anzahl der Signale KOPF	Anzahl der Signale SCHWEIF
Chromosom 3	2,0	0,0	2,3	0,0
Chromosom 5	2,0	0,0	2,6	0,0
Chromosom 8	2,0	0,0	2,3	0,0
Chromosom 11	2,0	0,0	2,4	0,0

Tab.17: Anzahl der Signale (Mittelwert) im Kopf und im Schweif des Kometen von unbehandelten Schleimhautzellen in Miniorgankulturen (Kontrolle) den Patienten mit und ohne Karzinom des Oropharynx

3.4.2 Anzahl der Fluoreszenz-Signale in Schleimhautzellen bei Tumor- und Kontrollpatienten nach der Inkubation mit Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid induzierte erhebliche Chromosomenbrüche in Mukosazellen der Miniorgankulturen sowohl bei Kontrollpatienten als auch bei Tumorpatienten. Die Fluoreszenz-Signale wurden im Kopf und im Schweif der Kometen lokalisiert. Patienten mit Oropharynxkarzinom wiesen jedoch eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber oxidativen Stress. Im Vergleich zu Kontrollpatienten konnte man in Zellen der Tumorpatienten mehr Signalen beobachten (Tab 18).

Schädigung	NON-TUMOR		TUMOR	
	Anzahl der Signale KOPF	Anzahl der Signale SCHWEIF	Anzahl der Signale KOPF	Anzahl der Signale SCHWEIF
Chromosom 3	3,0	2,2	3,1	2,2
Chromosom 5	3,4	1,9	3,8	1,9
Chromosom 8	3,2	1,8	3,5	1,7
Chromosom 11	3,2	2,4	3,2	3,6

Tab.18: Anzahl der Signale (Mittelwert) im Kopf und im Schweif des Kometen nach der Inkubation der Miniorgankulturen mit H₂O₂ bei den Patienten mit und ohne Karzinom des Oropharynx

3.4.3 Anzahl der Fluoreszenz-Signale in Schleimhautzellen bei Tumor- und Kontrollpatienten nach der DNA-Reparatur

Die 24-stündige Reparaturphase nach der 30-minütigen Wasserstoffperoxidexposition bewirkte einen wesentlichen Rückgang der DNA-Schädigung in Zellen der Miniorgankulturen von Oropharynx. In Zellen von Kontrollpatienten konnte beinahe vollständige Reparatur festgestellt werden. Zellen der Patienten mit Oropharynxkarzinom wiesen jedoch mehrere Chromosomenbrüche auf. Chromosomenfragmente befanden sich sowohl im Kopf der Kometen als auch im Schweif.

	NON-TUMOR		TUMOR	
Reparatur	Anzahl der Signale KOPF	Anzahl der Signale SCHWEIF	Anzahl der Signale KOPF	Anzahl der Signale SCHWEIF
Chromosom 3	2,1	0,0	2,8	0,1
Chromosom 5	2,2	0,0	2,9	0,1
Chromosom 8	2,0	0,0	2,5	0,1
Chromosom 11	2,2	0,0	2,7	0,0

Tab.19: Anzahl der Signale (Mittelwert) im Kopf und im Schweif des Kometen nach der Inkubation der Miniorgankulturen mit H₂O₂ und nachfolgender 24-stündigen Reparaturphase bei den Patienten mit und ohne Karzinom des Oropharynx

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Patienten

Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Gewebe wurde von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München gespendet. Zur Vermeidung kofaktorieller Einflüsse auf die Untersuchungsergebnisse wurde Gewebe nur von solchen Patienten entnommen, die neben der zur Operation führenden Grunderkrankung keine weiteren chronischen Infektions- oder Systemerkrankungen aufwiesen.

4.1.1 Tumorfremie Patienten als Spender von Schleimhaut des Oropharynx

Oropharyngeale Schleimhaut wurde bei Tonsillektomien gewonnen, welche aufgrund chronisch rezidivierender Infektionen der Mandel oder einer Hyperplasie bei Schlaferkrankungen durchgeführt wurden. Durch diese aus unterschiedlichen Gründen durchgeführten Operationen findet eine Selektion der Patienten statt. Es sind dabei entzündungsbedingt Veränderungen des Gewebes möglich. Andererseits werden solche Eingriffe in einem möglichst infektfreien Zeitpunkt durchgeführt.

4.1.2 Patienten mit Oropharynxkarzinom als Spender von Schleimhaut des Oropharynx

Das untersuchte Gewebe entstammte Operationen, die aufgrund der Tumorerkrankung durchgeführt wurden. Die Patienten mit oropharyngealen Karzinomen wiesen unterschiedliche Schweregrade und Stadien der Erkrankung auf. Aufgrund der Zentrumsfunktion der Ludwig-Maximilians-Universität für derartige Erkrankungen werden solche Fälle hier besonders häufig behandelt und es kann deshalb ein guter Überblick über oropharyngeale Tumore gewonnen werden. Für die Studie wurde makroskopisch gesunde Schleimhaut verwendet, die ausschließlich von erstdiagnostizierten Fällen ohne vorausgegangene Strahlen- und/oder Chemotherapie stammte.

4.2 Methodenauswahl

4.2.1 Miniorgankulturen

Dreidimensionale Organkulturen bieten eine alternative Form der Kultivierung des Epithels. Steinsvag et al. berichteten über nichtadhäsive stationäre Organkulturen aus humanem adenoidem Gewebe (Steinsvag et al., 1991). Eine modifizierte Methode zur Kultivierung dreidimensionaler Organkulturen nasaler Mukosa wurde von Kleinsasser et al. (Kleinsasser et al. 2001) entwickelt und deren Verwendbarkeit für in vitro-Mehrfachinkubationen mit Xenobiotika nachgewiesen (Kleinsasser et al., 2004).

Miniorgankulturen wurden in vielerlei Untersuchungen eingesetzt. So fand eine Kultivierung des Schilddrüsengewebes statt, um den Einfluss von Thyroidperoxidase auf die Hormonproduktion zu beobachten (Hayakawa et al., 1993). In einer anderen Studie wurden die Miniorgankulturen der Gallenblase entwickelt und ihre morphologischen und funktionellen Eigenschaften wie Endo- und Exozytosis geprüft (Veranic and Psenicnik, 1996). Victorov et al. stellten organtypische Hirnkulturen und deren Verwendbarkeit für die biochemischen, histologischen und molekularen Analysen vor. Diese Kultivierung wurde in der Flasche mit Nährmedium unter ständiger Rotation geführt (Victorov et al., 2001). Kulturen aus humanem Brustepithel wurden zur Beurteilung des Einflusses von 17- β -Estradiol und Tamoxifen (Antiestrogen) auf die Proliferationskapazität des Gewebes eingesetzt (Calaf, 2006). Erst kürzlich fanden Miniorgankulturen der nasalen Mukosa die Verwendbarkeit in einer Untersuchung zu kumulativen genotoxischen und apoptotischen Effekten von Xenobiotika (Buehrlen et al., 2007).

Miniorgankulturen ermöglichen eine Standardisierung und Abschätzung des in vivo-Potenzials von genotoxischen Stoffen in humanen Kultursystemen. Bisher wurden dafür Einzelinkubationen separierter Zellen des Epithels sowie Lymphozyten eingesetzt (Kleinsasser et al., 2000b; Harréus et al., 2005). Im Vergleich zu Zellen in intaktem Gewebe, weisen Einzelzellkulturen begrenzte metabolische Aktivität für endogene Substanzen und Xenobiotika auf. Außerdem zeigen sie geänderte DNA-

Mutagensensitivität und Reparaturkapazität (Teissier et al., 1998; Farkas and Tannenbaum, 2005). In den dreidimensionalen Organkulturen bleiben die Wechselwirkungen zwischen den Zellen erhalten, was der in vivo-Situation nahe kommt. Dieses Modell bietet die Möglichkeit, repetitiv Versuche zur Untersuchung des epithelialen Zellwachstums, ihrer Differenzierung und Reparatur durchzuführen (Wallner et al., 2005).

4.2.2 Comet Assay und Comet-FISH

Genotoxische und mutagene Effekte von Fremdstoffen werden mit unterschiedlichen Testverfahren an den verschiedensten Zellsystemen gemessen. Die Verwendung des optimalen Testsystems ist abhängig von der Art und Dauer der Exposition, den erwarteten Zellmechanismen, die durch die zu testende Substanz ausgelöst werden, sowie von dem jeweiligen Zielorgan (Albertini et al., 2000).

Der Comet Assay ermöglicht als Kurzzeitverfahren die Darstellung von DNA-Schädigungen, die durch biologische, physikalische oder chemische Noxen an humanen Einzelzellen induziert werden. Dieses Testsystem konnte sich insbesondere für die Untersuchung möglicher genotoxischer Effekte von Umwelt- und Arbeitsstoffen sowie durch Strahlen induzierten DNA-Schäden und zum Biomonitoring etablieren (Kleinsasser et al., 2000a). Die alkalische Form der Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) weist DNA-Strangbrüche und –Addukte, Crosslinks und alkalilabile Stelle sowie nachfolgende DNA-Reparatur nach (Tice et al., 2000). Hierzu können praktisch alle zu Einzelzellen separierbare Gewebetypen eingesetzt werden, was diesen Test besonders vorteilhaft macht (Moller, 2006). Als humane Zellen werden häufig Lymphozyten des peripheren Blutes verwendet. An Schleimhautzellen der Nase und des Magens wurde erstmals die Genotoxizität von Lindan mit dem Comet Assay nachgewiesen (Pool-Zobel et al., 1993). Harréus et al. verwendeten den Comet Assay an humanen Schleimhautbiopsien des oberen Aerodigestivtraktes zur Genotoxizitätsbestimmung von Natriumdichromat, Benzo[a]pyren und N-Nitrosodiethylamin (Harreus et al., 1999). Der Test gibt Auskunft über eine spezifische Empfindlichkeit des getesteten Gewebes gegenüber Schadstoffen (Mutagensensitivität) (Harréus et al., 1999; Bendesky et al., 2006; Shao et al., 2005). Mit Hilfe des Comet Assays wurde die Mutagensensitivität von

Patienten mit Larynx- bzw. Oropharynxkarzinomen für Epithelien der betroffenen Organe gegenüber Phthalaten, Nitrosaminen und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen bestimmt (Kleinsasser et al., 1999). Neben Untersuchungen zu substanzinduzierten Strangbrüchen kann auch die DNA-Reparaturfähigkeit mittels Comet Assay in einer quantitativen und einer zeitlichen Dimension beurteilt werden (Harréus et al., 2001; Speit and Hartmann, 2006). Harréus et al. untersuchten mit Hilfe des Comet Assays die DNA-Reparatur in Epithelien der Nase nach der Inkubation der Zellen mit N-Nitrosodiethylamin (Harréus et al., 2001). Eine Weiterentwicklung des Verfahrens ermöglichte es diese Methode auch für Organkulturen humaner Schleimhautzellen des Aerodigestivtraktes zu adaptieren, was der in vivo-Situation sehr nahe kommt (Kleinsasser et al., 2001).

Neben dem Comet Assay werden unterschiedliche Testverfahren an den verschiedensten Zellsystemen zur Messung von genotoxischen und mutagenen Effekten von Fremdstoffen eingesetzt. So stellt der Ames-Test eine Methode zur Identifikation mutagener Effekte (Substitutionen von Basenpaaren und Frameshifts-Mutationen) an prokaryonten Zellen dar (Ames et al., 1975; Mortelmans and Zeiger, 2000). Der Schwesterchromatidaustauschtest hingegen dient zur Detektion von DNA-Schädigungen, welche auf die DNA-Replikation Einfluss nehmen können (Basenalkylierung oder Crosslinks). DNA-Strangbrüche sind hier nicht nachweisbar, auch S-Phase-unabhängige Mutagene werden nicht erkannt (Djelic et al., 2006). Der Mikrokerntest und Chromosomenabberationstest ermöglichen eine Darstellung chromosomaler Schädigung. Diese Testsysteme haben neben der relativ langen Versuchsdauer den Nachteil, Fremdstoffe nicht gezielt an humanen Frischbiopsaten eines Organs testen zu können, welches direkten Kontakt mit einem Karzinogen hat. Der Comet Assay in Kombination mit Miniorgankulturen ermöglicht eine wiederholte Inkubation humaner Epithelien des Kopf-Hals-Bereichs mit Umweltfremdstoffen. So können toxikologische Risikofaktoren für den Ausgangsort häufiger Tumoren im Kopf-Hals-Gebiet evaluiert werden. Der Comet Assay ist ein sensitives, einfaches Kurzzeitverfahren, das an vielen Zellsystemen einsetzbar ist. Der Test ermöglicht Screeninguntersuchungen sowohl für Personengruppen als auch für einzelne Substanzen.

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) erlaubt es, mit Sonden spezifische Genloci anzufärben. Erste Untersuchungen zeigten die Möglichkeit auf, diese Methode in Kombination mit einer Darstellung von Strangbrüchen zu evaluieren (Anderson et al., 1997). Im Besonderen wurde hier eine Kombination von FISH und Comet Assay für humanen Schleimhautzellen etabliert (Harreus et al., 2004). Comet-FISH ermöglicht die qualitative Zuordnung von Strangbrüchen innerhalb der Gesamt-DNA sowie die Definition von besonders empfindlichen Genloci und ist somit eine vielversprechende Methode zur Beurteilung des genotoxischen Potenzials von Fremdstoffen in humanen Zielzellen. Mit Hilfe einer derartigen Analyse werden die Vorteile der Mikrogelelektrophorese mit der Darstellung spezifischer chromosomaler Abschnitte während einer DNA-Schädigung und –Reparatur verbunden. Comet-FISH ermöglicht die Identifikation von spezifischen Sequenzen, die im Kopf oder/und im Schweif des Kometen, abhängig von DNA-Fragmentierung, lokalisiert sein können (Anderson et al., 1997). Diese Methodik wurde bereits in einigen Studien eingesetzt. Santos et al. verwendeten Comet-FISH an Lymphozyten um die Lokalisierung von Telomeren, Zentromeren und gewählten Gensequenzen im Nukleus zu bestimmen (Santos et al., 1997). In einer anderen Studie wurden mit Hilfe von Comet-FISH die Schädigungs- und Reparaturprozesse im Gen p53. Hierfür wurden mononukleare Leukozyten und Tumorzelllinien der Harnblase mit γ -Strahlen geschädigt (McKelvey-Martin et al., 1998). Für die Unterscheidung der unspezifischen DNA-Fragmentierung nach UVA-Strahlung wurden voll markierte Chromosomen von Lymphozyten verwendet (Rapp et al., 2000). McKenna et al. untersuchten die DNA-Reparatur in RT4 humanen Tumorzelllinien der Harnblase nach der Behandlung mit Mitomycin C (McKenna et al., 2003a). Mit Comet-FISH wurde sowohl das Verhalten von Schleimhautzellen des Kolons bei der Karzinogenese (Schaeferhenrich et al., 2003), als auch der DNA-Schädigung mit Mitomycin C und Bleomycin in humanen Vollblut ex vivo bestimmt (Arutyunyan et al., 2004). Harréus et al. verwendeten die Methodenkombination zur Untersuchung von Patienten mit Oropharynxkarzinom (Harréus et al., 2004). Es konnte mit Comet-FISH die Fragmentierung von bestimmten Genen nach der Röntgen-Bestrahlung in vivo nachgewiesen werden (Amendola et al., 2006). In einer Studie von Knobel et al. wurde mit Comet-FISH die gen- und chromosomspezifische Schädigung mit Uran in Kolonzellen bestimmt (Knobel et al., 2006). Erst kürzlich fand die Kombination von Comet Assay und FISH

Einsatz in der Untersuchung der genotoxischen Wirkung von Eisen an Leukozyten (Park et al., 2007).

4.3 Auswahl der Chromosomen

Die Auswahl der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 in dieser Arbeit basiert auf früheren Untersuchungen, in denen in Tumorzellen des oberen Aerodigestivtraktes erhöhte Aberrationen dieser Chromosomen gefunden wurden (Rybicki et al., 2003; Li et al., 1994). So konnten DNA-Verluste auf den Chromosomen 3p, 5q und 8p, DNA-Gewinne auf den Chromosomen 3q, 5p, 8q und 11q13-14 wie auch Chromosomenbrüche in 3p11, 5q11, 5q13, 8p11, 8q11 und 11q13 bei 11 Zelllinien von Kopf-Hals-Karzinomen identifiziert werden (Singh et al., 2001).

Deletionen im Bereich von 3p gehören zu den häufigsten analysierten chromosomalen Aberrationen in Tumorzellen vom Kopf-Hals-Bereich. Diese wurden in 97% der Fälle von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes gefunden (Bockmuhl et al., 1996a; Chakraborty et al., 2003). Auf dem 3p Chromosom befinden sich mehrere Gene, denen eine Rolle in der Karzinogenese zugeschrieben wird. So kommt im Allel 3p14.2 das Tumorsupressorgen FHIT (fragile-histidine-triad) vor. Es wurde mehrmals bewiesen, dass der Heterozygotieverlust und Chromosomenbrüche auf den FHIT-Gen-Loci mit einer signifikanten Risikoerhöhung für die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich einhergeht (Mineta et al., 2002; Pavelic et al., 2001). Auch im Allel 3p14.1, wo das Tumorsupressorgen FOXP1 lokalisiert ist, konnte der Heterozygotieverlust nicht nur bei Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs, sondern auch bei vielen anderen Tumoren (z.B. Kolon- und Magenkarzinom) beobachtet werden (Banham et al., 2001). Alterationen ereignen sich außerdem im Bereich des Allels 3p21.3, wo das Tumorsupressorgen RASSF1A lokalisiert ist. Dazu zählen Heterozygotieverlust, Methylierung und Minisatelliteninstabilität. Diese Ereignisse finden schon in der ersten Phase der Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich statt, weshalb eine Analyse des RASSF1A Gens zur früheren Entdeckung dieses Tumors beitragen kann (Hogg et al., 2002; Wong et al., 2006). Das Gen hogg1 kodiert 8-Oxo-Guanin-DNA-Glykosylase 1, welche eine entscheidende Rolle in der Basenexzisionsreparatur spielt. Der Heterozygotieverlust im Lokus des Gens hogg1 (3p26.2) wurde in Tumoren des

Kopf-Hals-Bereichs gefunden. Verminderte *hogg1* Expression führte zur 8-oxoG-Akkumulation, was zur Tumorentstehung im oberen Aerodigestivtrakt beiträgt (Hagiwara et al., 2005).

Auch am langen Arm des Chromosoms 3 treten Veränderungen auf, die für die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich von Bedeutung sein können. Im Gegensatz zu 3p stehen hier allerdings die Amplifikationen von DNA im Vordergrund, die besonders im Bereich 3q26.3-q29 vorkommen (Kujawski et al., 2002; Brieger et al., 2006). Dieses beinhaltet mehrere Onkogene, die in die Tumorprogression verwickelt sind. Zwei davon scheinen hier eine übergeordnete Bedeutung zu haben. *PIK3CA* ist in 3q26 lokalisiert und kodiert das Enzym Phosphatidylinositol-3-Kinase, ein Bestandteil der Lipid-Signaltransduktion, die in mehreren Funktionen wie Proliferation, Zellmigration und Überleben von Zellen involviert ist (Rameh and Cantley, 1999). DNA-Amplifikation und Minisatelliteninstabilität wurden in Tumorzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs gefunden (Or et al., 2006). In Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus wurde auch DNA-Amplifikation des Gens *TFRC* (kodiert das Transferrin-Receptor) beobachtet. Seine Überexpression korreliert mit fernen Metastasen (Wada et al., 2006). Ein weiteres Gen, das *p63* ist ein Homonym des Gens *p53*, das aber andere transkriptionelle Aktivitäten ausübt. So kann die *DNp63*-Isoform die Aktivität von *p53* unterdrücken (Redon et al., 2001). Eine erhöhte Kopienanzahl des *p63*-Gens wurde häufig bei Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes identifiziert (Hibi et al., 2000).

Ähnlich wie das Chromosom 3 beinhaltet auch das Chromosom 5 mutagensensitive Genloci. In Tumorzellen des oberen Aerodigestivtraktes wurden mehrmals DNA-Verluste im langen Arm des Chromosoms 5 gefunden (Gollin, 2001; Hermsen et al., 2005). Heterozygotieverluste finden sich vor allem auf dem Allel 5q21 (Sanz-Ortega et al., 2003). Interessanterweise befindet sich an dieser Stelle das *APC*-Gen (familiäre adenomatöse Polyposis coli), das in der Entstehung von Kolonkarzinomen eine wichtige Rolle spielt (Jeter et al., 2006). Der Heterozygotieverlust auf dem Chromosom 5q21 kann mit der Progression des Tumors im Kopf-Hals-Bereich verbunden sein, es bleibt jedoch abzuwarten, ob es eindeutig zugeordnet werden kann (Mancini et al., 2003).

DNA-Amplifikation von 5p ist ein häufiges Ereignis in der Karzinogenese des Kopf-Hals-Bereichs (Tjia et al., 2005; Ashman et al., 2003). DNA-Gewinne wurden im Locus 5p15.33 identifiziert, wo ein Gen für hTERT (human telomerase reverse transcriptase), eine katalytische Komponente der Telomerase, lokalisiert ist (Bryce et al., 2000). Im oberen Aerodigestivtrakt konnte eine Überexpression von Telomerase, beruhend auf einer Veränderung im Locus 5.15.33 nachgewiesen werden (Nguyen et al., 2003). Neue Untersuchungen weisen auf die DNA-Amplifikation in 5p15.2 in Tumorzellen des Ösophagus hin. In dem Locus befinden sich JS-1 und JS-2 Gene, deren Überexpression eine kritische Rolle in der molekulare Pathogenese des Ösophaguskarzinoms spielen kann (Fatima et al., 2006).

Für die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich sind auch Alterationen des Chromosoms 8 mitverantwortlich (Bockmühl and Petersen, 2002). Im langen Arm des Chromosoms 8 wurden DNA-Gewinne in 50% der laryngealen Tumoren identifiziert (Juhász et al., 2005). Insbesondere der Abschnitt 8q24 unterliegt häufigen DNA-Amplifikationen (Hermsen M et al., 2005). In dieser Region sind (Proto)onkogene MYC, TRIB1 und FAM84B lokalisiert. Die Untersuchungen deuten auf eine Überexpression von MYC und FAM84B in den Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes hin (Huang et al., 2006; Rodrigo et al., 1996). Auch andere Veränderungen des Chromosoms 8q wie Isochromosom i(8q) und Translokationen des ganzen Arms werden in diesen Tumoren beobachtet (Jin et al., 2000).

Bei Kopf-Hals-Karzinomen konnten ebenfalls häufig Allelverluste auf dem Chromosomarm 8p festgestellt werden (Bockmühl, 1998; Rogowski et al., 2004). Mutagensensitive Areale befinden sich auf den Allelen 8p21, 8p22 und 8p23 (Wu et al., 1997; van Dekken et al., 2006). Studien weisen auf mehrere Tumorsuppressorgene hin, die sich in diesen Regionen befinden (Zhou et al., 2005). Die Inaktivierung von diesen Genen ist mit maligner Entartung verbunden. Im Locus 8p21 ist das Killer/DR5 Gen lokalisiert. Er gehört zur Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Familie und wird als ein Mediator der Apoptose angesehen. Durch seine verminderte Expression kommt es zur Abnahme der Apoptoserate und zu steigender Proliferation, was zur Tumorentstehung führen kann (Pai et al., 1998; Adams et al., 2005). Ein anderes Gen, PRK, lokalisiert in 8p21, kodiert eine Serin/Threonin Kinase (S/T-PK), die eine wesentliche Rolle in der Meiose und Mitose spielt. Eine

verminderte Expression dieses Gens wird in Zusammenhang mit der Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich gebracht (Dai et al., 2000). Das Tumorsupressorgen DLC1 ist in der Region 8p21.3-22 lokalisiert. Ein Heterozygotieverlust und Methylierung dieses Gens ist häufig in Kopf-Hals-Karzinomen anzutreffen (Hewitt et al., 2004). Auch im Locus 8p23 wurde mehrmals ein Heterozygotieverlust bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen (Ishwad et al., 1999; Sunwoo et al., 1999). Veränderungen in den genannten Bereichen des Genoms führen bei Tumorpatienten zu einer schlechten Prognose der Erkrankung (Bockmühl et al., 2001).

Auch dem Chromosom 11 wird eine Bedeutung in der Krebsentstehung im Kopf-Hals-Bereich zugeschrieben (Götte et al., 2005). Es werden numerische Aberrationen und DNA-Amplifikationen von diesem Chromosom beobachtet (Xie et al., 2006c; Xie et al., 2006b; Xie and Zhang, 2006; Xie et al., 2006a). Die Untersuchungen des Chromosoms 11 mit FISH in Ösophaguskarzinomgewebe wiesen die Aneusomie nach (Mohan et al., 2007). Der DNA-Gewinn im Bereich der chromosomalen Bande 11q13 wurde vielfach nachgewiesen und in 30-50% der Tumorfälle identifiziert (Williams et al., 1993; Jarmuz et al., 2005). Es befinden sich in dieser Region einige Gene, die eine wichtige Rolle in der Tumorgenese des oberen Aerodigestivtraktes spielen können. Dazu gehören INT2/FGF3, Cyklin D1, EMS1, FGF2, VEGF β , PPP1CA, SHANK2 und Gluthation-S-Transpherase π (Roh et al., 2000; Freier et al., 2006). Cyklin D1 (CCND1) scheint hier das wichtigsten Onkogen zu sein. Es spielt eine bedeutsame Rolle in der Zellzyklus-Kontrolle (Übergang von der G1- zur S-Phase). Überexpression von CCND1 führt zur unkontrollierten Zellproliferation. Die Veränderung in CCND1 ist mit einer schlechten Prognose und Fernmetastasierung assoziiert (Diehl, 2002). Ein Grund für die Deregulierung des Cyklins D1 könnte mit dem Polymorphismus G \rightarrow A zusammenhängen. Das Allel A kodiert eine Isoform von CCND1 mit einer längeren Halbwertszeit, was zu ihrer Überakkumulation und zur erhöhten Proliferation führt (Betticher et al., 1995; Rydzanicz et al., 2006).

Zusätzlich zu den in dieser Arbeit gewählten Chromosomen spielen eine Reihe weiterer Chromosomen in der Karzinogenese des Oropharynx eine Rolle. Empfindliche Genloci werden unter anderem auf den Chromosomen 9, 13 und 17 identifiziert (Rosin et al., 2000; Lin et al., 2006b).

4.4 Oxidative DNA-Schädigung

Produkte der Sauerstoffreduktion, reaktive Sauerstoffspezies, verursachen eine DNA-Schädigung. Sie können mit der Zucker-Phosphatkette in Wechselwirkung treten oder den Zuckeranteil bzw. die DNA-Basen oxidativ verändern. Beispiele für oxidative Modifikationen von Nukleobasen sind Thyminglykol, 5-Hydroxymethyluracil, 2, 6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin und 8-Hydroxyguanin.

8-Hydroxyguanin ist im Stande GC→TA Transversionen auszulösen, die zur Initiation/Progression des Tumors führen können (Ames et al., 1993). Zusätzlich vermögen ROS andere zelluläre Komponenten z.B. Lipide anzugreifen und auf dieser Weise reaktive Intermediate zu generieren, die wiederum mit Nukleinsäuren reagieren können. Diese DNA-Läsionen sind genotoxisch und induzieren Mutationen, die oft Protoonkogene und Tumorsuppressorgene wie z.B. ras und p53 betreffen (Cooke et al. 2006). Darüber hinaus beeinflussen ROS wesentliche zelluläre Prozesse wie die Proliferation und die Apoptose. Aus diesen Gründen spielt die oxidative DNA-Schädigung eine wichtige Rolle in der Ätiologie von Tumoren (Ames, 1983; Marnett, 2000).

Der Tabakrauch gilt als der wichtigste Risikofaktor in der Kanzerogenese im oberen Aerodigestivtrakt. Er stellt u.a. eine reiche Quelle von ROS dar. Lungen von Zigarettenrauchern enthalten zwei- bis dreifach mehr 8-Hydroxyguanin (Olinski et al., 1992). Dauerhafte Erzeugung größerer Mengen von ROS kann zu Mutationen, lokalen Gewebeschäden, Invasion und zur Metastasierung beitragen. Erhöhte Spiegel von H₂O₂ wurden in sieben verschiedenen Tumorzelllinien festgestellt (Szatrowski and Nathan, 1991). Auch bei Patienten mit Larynxkarzinom wurde eine höhere Produktion von H₂O₂ im Vergleich zu gesunden Patienten beobachtet (Szuster-Ciesielska et al., 2004). Jalszynski et al. konnten an Schleimhautzellen des Larynx eine Steigerung der Tumoragegressivität zusammen mit der Konzentration von oxidativ veränderten DNA-Basen nachweisen (Jalszynski et al., 2003). An Zelllinien von Larynxkarzinom wurden in 50% aller Fälle GC→TA Transversionen identifiziert, was auf oxidative DNA-Schäden hinweist (Kiuru et al., 1997).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden oxidative DNA-Schäden am Beispiel von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit Hilfe von Comet-FISH untersucht. Es konnten signifikante genotoxische Auswirkungen in den Miniorgankulturen humaner oropharyngealer Mukosa festgestellt werden, mit vergleichbarer Schädigung in der Karzinomgruppe und der Kontrollgruppe. Im Gegensatz hierzu haben Szekely et al. eine erhöhte Mutagensensitivität als endogenen Risikomarker für prämaligne Läsionen des Kopf-Hals-Bereichs beschrieben, nachdem sie Lymphozyten mit Bleomycin, das oxidative Schäden induziert, inkubierten (Szekely et al., 2005). Eine erhöhte Sensitivität von Lymphozyten und Leukozyten gegenüber H_2O_2 wurde auch bei Patienten mit Brustkrebs und Hautkrebs festgestellt (Blasiak et al., 2004). In einer weiteren Untersuchung konnte nach Inkubation von Lymphozyten mit N-Nitrosodiethylamin (NDEA) eine erhöhte Mutagensensitivität in Patienten mit nasopharyngealem Karzinom nachgewiesen werden, nicht jedoch nach Exposition gegenüber Chromat und Nikelsulfat (Kleinsasser et al., 2001b). In einer anderen Studie wurde DNA-Fragmentierung durch Benzo[a]pyren 7,8-diol,-9,10-epoxid (BPDE) in Schleimhautzellen des Oropharynx von Tumor- und Kontrollpatienten mit Hilfe von Comet-FISH untersucht. Die Schädigung der Gesamt-DNA war in beiden Spendengruppen vergleichbar. Die Einzellanalyse der Chromosomen 1, 3, 5 und 8 ergab vergleichbare Strangbruchraten bei allen Chromosomen in der Kontrollgruppe. Bei Patienten mit Oropharynxkarzinom jedoch konnte man eine erhöhte DNA-Strangbruchrate der Chromosomen 3, 5 und 8 im Vergleich mit dem Chromosom 1 nach der BPDE-Exposition belegen (Harrèus et al., 2004). Diese Ergebnisse deuten auf eine größere Empfindlichkeit dieser Chromosomen gegenüber Xenobiotika. Gajecka et al. wiesen eine erhöhte Chromatidbruchrate in Lymphozyten von Patienten mit Larynxkarzinom nach der Inkubation mit Bleomycin im Vergleich mit tumorfreien Patienten nach. Der deutliche Anstieg der Chromatidfragmentierung wurde für Chromosomen 1p22, 5q31, 6q23 und 10q24 beobachtet (Gajecka et al., 2004). Hierbei werden die DNA-Schäden durch DNA-Adduktbildung und inkomplette Base-Exsisions-Reparatur hervorgerufen und können im Rahmen der DNA-Strangbruch-Induktion zur Mutationen führen (Alexandrov et al., 2002).

Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse müssen die Unterschiede in Bezug auf Patientengruppen, Testsubstanz und untersuchte Zellen berücksichtigt werden. Kleinsasser et al. untersuchten der DNA-Schädigung mit Hilfe der Comet Assay in der Schleimhaut des Larynx und Oropharynx und in Lymphozyten nach der

Inkubation mit Dibutylphthalat (DBP), Diisobutylphthalat (DiBP), N-Nitosodiethylamin (NDEA), Benzo[a]pyren (B[a]P) und N-Methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG). DBP und DiBP verursachten die höhere OTM-Werte in Lymphozyten als in Mukosa-Zellen, für NDEA und B[a]P hingegen konnten keine Unterschiede zwischen beiden Zelltypen beobachtet werden (Kleinsasser et al., 2000). In einer anderen Studie wurde die genotoxische Wirkung von Myosmin in Nasenschleimhautzellen und in Lymphozyten untersucht (Kleinsasser et al., 2003). Es gibt metabolische Unterschiede zwischen Einzelzellen und Mukosa im Zellverbund. Ausserdem stellt die Epithelschicht eine schützende Barriere für die Zellen gegenüber Noxen dar. Auch die Chromatinstruktur der Zellen kann eine protektive Rolle spielen (Bohr, 1991).

In der hier vorliegenden Arbeit wurde auch die chromosomale Schädigung mit der Schädigung der Gesamt-DNA in einer Karzinom- und Kontrollgruppe verglichen. Es konnte eine erhöhte Empfindlichkeit aller untersuchter Chromosomen gegenüber H_2O_2 im Vergleich zur Gesamt-DNA in beiden Gruppen beobachten werden. Ähnliche Beobachtungen wurden an Adenokarzinomzellen des Kolons gemacht. Die genotoxische Wirkung von Produkten des oxidativen Stresses wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Trans-2-hexenal und 4-Hydroxy-2-nonenal wurde hier in den Genen APC, KRAS und TP53 mit Comet-FISH untersucht. TP53 zeigte hier eine größere Schädigung als die Gesamt-DNA gegenüber Trans-2-hexenal und 4-Hydroxy-2-nonenal (Glei et al., 2007).

4.5 DNA-Reparatur von oxidativen Schäden

Humane Zellen besitzen hoch wirksame Schutzmechanismen, die die Integrität des Genoms überwachen und Schäden reparieren. Obwohl die DNA sehr häufig durch genotoxische Effekte geschädigt wird, sind Mutationen äußerst selten (bei der DNA-Replikation 1 Fehler pro 10^9 kopierte Nukleotide). Intakte Reparaturgene sind somit ein wirksamer Schutz gegen die Entstehung von Tumorstufen und ihre weitere Entartung. Die meisten Tumoren erwerben im Verlauf ihrer Entstehung inaktivierende Mutationen von DNA-Reparaturgenen. Reparaturdefiziente Zellen sind genetisch instabil. Dies bedeutet erhöhte Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Noxen und erhöhte Frequenz von Spontanmutationen (Hoeijmakers, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der Mutagensensitivität die DNA-Reparatur als ein weiterer möglicher endogener Marker in der Kopf-Hals-Karzinogenese untersucht. Die DNA-Reparaturkapazität wurde an Miniorgankulturen der oropharyngealen Schleimhaut von Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom nach H_2O_2 -Schädigung innerhalb eines 24-stündigen Reparaturintervalls bestimmt. Es konnte in den Spendern mit Oropharynxkarzinom eine signifikant reduzierte Reparaturkapazität der gesamten DNA im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Anhand dieser Ergebnisse kann man vermuten, dass ein Abfall der DNA-Reparaturkapazität in den Zielzellen des Kopf-Hals-Bereichs einen endogenen Risikomarker für die Entstehung von Malignomen des oberen Aerodigestivtraktes darstellt (Fan et al., 2001). Dies wurde in mehreren Untersuchungen bestätigt. Es existieren zahlreiche Studien die eine angeborene reduzierte DNA Reparaturkapazität als Risikomarker für Kopf-Hals-Karzinome beschreiben. Eine Untersuchung wies eine reduzierte DNA-Reparaturkapazität in Patienten mit Larynxkarzinom nach der Schädigung der Lymphozyten mit Bleomycin nach (Gajecka et al., 2005; Sasiadek et al., 2002). Ein ähnlicher Effekt wurde auch in Lymphozyten von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom nach Radiotherapie beobachtet (Palyvoda et al., 2003). In Gegensatz dazu stellten Kleinsasser et al. keinen ersichtlichen Unterschied in der DNA-Reparatur nach Nitrosoaminexposition an Lymphozyten zwischen Patienten mit Nasopharynxkarzinom und Patienten ohne Malignom fest (Kleinsasser et al., 2005). Sasiadek et al. dagegen wiesen eine erhöhte Reparaturkapazität in Diepoxybutan-geschädigte Lymphozyten von

Patienten mit Kopf-Hals-Malignom in Vergleich mit Kontrollpatienten auf (Sasiadek et al., 2002). Diese divergierende Ergebnisse können auf eine Abhängigkeit der DNA-Reparaturkapazität von der Art der Schädigung und der Lokalisierung der Tumorerkrankung hinweisen.

Die meisten oxidierten Basen in der DNA werden durch Basenexzisionsreparatur (BER) eliminiert (Slupphaug et al., 2003). Auch Mismatchreparatur (MMR) und Nukleotidexzisionsreparatur (NER) sind daran beteiligt. Der BER-Mechanismus wird durch nicht-enzymatischen Basenverlust oder durch hochspezifische Glykosylasen initiiert. 8-oxo-Guanin-DNA-Glykosylase (OGG1) entfernt die am meisten durch ROS veränderte Base 8-oxo-Guanin (8-oxoG). Eine Individuelle Variabilität der BER-Enzymaktivitäten und deren Regulation stehen in Zusammenhang mit erhöhtem Krebsrisiko. Zahlreiche Studien wiesen die Assoziation zwischen Mutationen in *hogg1* und verschiedenen Tumoren nach (Audebert et al., 2000a; Mambo et al., 2005; Sokhansanj and Wilson, III, 2006). Paz-Elizur et al. wiesen eine niedrigere angeborene Aktivität der 8-oxo-Guanin-DNA-Glykosylase 1 in peripheren Blutmonozyten von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen in Vergleich zu Kontrollpatienten nach (Paz-Elizur et al., 2006; Paz-Elizur et al., 2007). Fan et al. konnten häufige Heterozygotieverlust (LOH) in *hogg1* in den Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches belegen (Fan et al., 2001). Der Verlust des Allels in *hogg1* und die nachfolgende 8-oxoG-Akkumulation wurde auch bei 30% der Patienten mit Ösophaguskarzinom festgestellt (Hagiwara et al., 2005). In einer Studie wurde ein Anstieg der Expression von *hogg1* in Adenokarzinomen beobachtet. In Plattenepithelkarzinomen hingegen war die Expression von *ogg1* reduziert (Bonde et al., 2007). Es gibt auch Beobachtungen, dass Defekte in anderen Reparaturgenen wie *MLH1*, *XPD* oder *MSH2* zur Krebsentstehung des Kopf-Hals-Bereichs beitragen (Demokan et al., 2006; Liu et al., 2007).

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden individuelle Abweichungen der DNA-Reparaturfähigkeit beobachtet. Diese Unterschiede kann man auf den genetischen Polymorphismus in Reparatur- und Stoffwechselgenen zurückführen (Mohrenweiser et al., 2003; Jones et al., 2007). Eine Untersuchung wies eine Assoziation des Polymorphismus der OGG1 (Ser326Cys) mit erhöhtem Krebsrisiko für Oropharynxkarzinome bei Tabak- und Alkoholkonsumenten nach (Elahi et al.,

2002). Auch ein Polymorphismus der Gene CYP2E1, XPA und ERCC1 beeinflusst das Krebsrisiko des oralen Epithels (Sugimura et al., 2006).

Die Kombination aus Comet Assay und FISH ermöglicht die Bestimmung der genspezifischen Reparatur und der genetischen Instabilität in spezifischen Domänen oder Chromosomen. Bei Tumor-Patienten im Vergleich zu Kontrollpatienten konnten zwar bei allen untersuchten Chromosomen (3, 5, 8 und 11) erhöhte MCTM nachgewiesen werden; die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Es wurden keine quantitativen Unterschiede in der DNA-Reparatur zwischen den Chromosomen 3, 5, 8 und 11 innerhalb der Patientengruppe mit Oropharynxkarzinomen und tumorfreien Spender beobachtet. In der vorliegenden Untersuchung wurden auch die Fluoreszenz-Signale im Kopf und im Schweif des Komets gezählt. Bei tumorfreien Spendern wurden nach der 24-stündigen Reparaturphase durchschnittlich zwei Signale im Kopf und keine im Schweif des Komets in allen vier Chromosomen beobachtet. Dies deutet auf völlige Reparatur der Chromosomen hin. Bei Patienten mit Oropharynxkarzinom hingegen wurden mehrere Fluoreszenz-Signale im Kopf und verstreutere Signale im Schweif des Komets nachgewiesen (Tab.19). Das könnte auf eine Instabilität bestimmter Gen-Loci auf den Chromosomen 3, 5, 8 und 11 bei Patienten mit Oropharynxkarzinom nach oxidativer Schädigung hinweisen. Auch in anderen Studien wurden Reparaturkapazität und genetische Instabilität in bestimmten Genen mit Comet-FISH untersucht. Kumaravel und Bristow wiesen mit Comet-FISH eine reduzierte DNA-Reparatur von oxidativen Schäden des HER-2/neu aber nicht von p53 in Mammakarzinom-Zelllinien nach (Kumaravel and Bristow, 2005). In Blasenkarzinom-Zelllinien hingegen wurde nach γ -Strahlung und anschließender 15-minütiger Reparaturphase die vollständige Reparatur des p53 beobachtet (McKenna et al., 2003b). Ebenso konnte nach der oxidativen Schädigung der Lymphozyten die bessere Reparatur des p53 in Vergleich zur Gesamt-DNA beobachtet werden (Horvathova et al., 2004). In durchgeführten Untersuchungen in der vorliegender Arbeit wurde hingegen die Gesamt-DNA besser als Chromosomen 3, 5, 8 und 11 repariert. Diese divergierenden Ergebnisse könnten darauf hinweisen, dass die Reparaturkapazität von den eingesetzten Zellsystemen und der gewählten Patientenpopulation abhängig ist.

5 Zusammenfassung

Bösartige Tumore des oberen Luft- und Verdauungstraktes werden durch das Zusammenwirken einer Vielzahl exogener Kanzerogene mit endogenen Risikofaktoren verursacht. Dazu zählt die Sensibilität der DNA gegenüber Fremdstoffen (Mutagensensitivität) und die Fähigkeit, derartige DNA-Schäden zu reparieren (DNA-Reparaturkapazität). Entsteht ein Ungleichgewicht mit z.B. eingeschränkter DNA-Reparatur, kann es zu Mutationen mit nachfolgendem Tumorwachstum kommen. Je nach Art der DNA-Schädigung werden verschiedene Reparaturstrategien eingeschlagen. Dazu zählen Alkyltransferasereparatur, Basenexzisionsreparatur, Nukleotidexzisionsreparatur, Mismatchreparatur und Doppelstrangbruchreparatur. Oxidativ veränderte Basen wie 8-Oxo-Guanin werden vor allem mittels BER repariert.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den DNA-schädigenden Effekt oxidativer Fremdstoffe am Beispiel von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) an Miniorgankulturen von Epithelien des oberen Aerodigestivtraktes zu testen, sowie Mutagensensitivität und DNA-Reparatur als endogene Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen zu bestimmen. Es wurde das genotoxische Potential von H_2O_2 und nachfolgende Reparatur in oropharyngealen Schleimhautzellen von Patienten mit Plattenepithelkarzinom des Oropharynx und Kontrollpatienten untersucht. Chromosomale Schädigung und Reparatur wurden in Chromosomen 3, 5, 8 und 11 bestimmt.

Die genotoxische Wirkung von Wasserstoffperoxid und die DNA-Reparatur wurden an Miniorgankulturen untersucht. Die Miniorgane wurden aus humanen Mukosafragmenten des Oropharynx kultiviert. Zur Quantifizierung und Qualifizierung der oxidativen DNA-Schädigung wurde eine Kombination der alkalischen Form der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung eingesetzt. Hybridisierung der fluoreszierenden Chromosom-Sonden an spezifische Gen-Sequenzen erlaubte die Lokalisation der untersuchten Chromosomen und deren Fragmenten innerhalb eines Kometen. Mit der Messung von Anzahl und Lage der Hybridisierungssignale innerhalb des Kometen könnten Schädigung und Reparaturmuster der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 dargestellt werden.

Wasserstoffperoxid verursachte eine starke genotoxische Schädigung in Miniorgankulturen oropharyngealer humaner Schleimhautzellen bei Patienten mit Oropharynxkarzinom und bei Kontrollpatienten. Weder in der gesamten DNA noch in den Chromosomen wurden Unterschiede in der Schädigung zwischen beiden Patientengruppen beobachtet. Auch das Ausmaß der Fragmentierung der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 innerhalb beider Gruppen war vergleichbar. Die 24-stündige Reparaturphase bewirkte einen wesentlichen Rückgang der DNA-Schädigung in der Tumor- und Kontrollgruppe. Es konnte jedoch eine bessere Effizienz der Reparatur sowohl der Gesamt-DNA als auch der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 in Schleimhautzellen von tumorfreien Spendern festgestellt werden. Es lagen keine Unterschiede in der DNA-Reparatur von allen untersuchten Chromosomen innerhalb beider Gruppen vor. Die Analyse der Fluoreszenz-Signale nach der DNA-Schädigung zeigte mehr Chromosomenbrüche der vier Chromosomen in Zellen von Patienten mit Oropharynxkarzinom als von Patienten ohne Malignom. Nach Reparaturintervallen von 24 Stunden zeigte sich eine Reduzierung der Anzahl der Signale in beiden Gruppen. In den Zellen der Tumorpatienten wurden jedoch mehr Signale beobachtet, die über den Kopf und den Schweif verstreut waren.

Das Modell der Miniorgankulturen erwies sich für genotoxikologische Untersuchungen als gut geeignet. Durch die Möglichkeit der mehrfachen Exposition mit anschließenden Reparaturphasen ist eine Annäherung an reale Lebensbedingungen möglich. Die Kombination des Comet Assay mit Fluoreszenz in situ Hybridisierung ermöglicht, chromosomale Alterationen unter dem Einfluss von genotoxischer Schädigung in Miniorgankulturen des Oropharynx zu bestimmen. Die Anwendung von Comet-FISH zur quantitativen und qualitativen Darstellung der DNA-Reparatur in humanen Epithelien erscheinen besonders erfolgversprechend. Die hier durchgeführte Untersuchungen können zu einem Ansatz für die Analyse der Schädigung und Reparatur anderer Chromosomen oder bestimmten Genen werden.

6 Literatur

- Adams, J., Cuthbert-Heavens, D., Bass, S., and Knowles, M.A. (2005). Infrequent mutation of TRAIL receptor 2 (TRAIL-R2/DR5) in transitional cell carcinoma of the bladder with 8p21 loss of heterozygosity. *Cancer Lett.* 220, 137-144.
- Al Batran, S.E., Astner, S.T., Supthut, M., Gamarra, F., Brueckner, K., Welsch, U., Knuechel, R., and Huber, R.M. (1999). Three-dimensional in vitro cocultivation of lung carcinoma cells with human bronchial organ culture as a model for bronchial carcinoma. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21, 200-208.
- Albertini, R.J., Anderson, D., Douglas, G.R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A.T., Norppa, H., Shuker, D.E., Tice, R., Waters, M.D., and Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat. Res.* 463, 111-172.
- Alexandrov, K., Cascorbi, I., Rojas, M., Bouvier, G., Kriek, E., and Bartsch, H. (2002). CYP1A1 and GSTM1 genotypes affect benzo[a]pyrene DNA adducts in smokers' lung: comparison with aromatic/hydrophobic adduct formation. *Carcinogenesis* 23, 1969-1977.
- Amendola, R., Basso, E., Pacifici, P.G., Piras, E., Giovanetti, A., Volpato, C., and Romeo, G. (2006). Ret, Abl1 (cAbl) and Trp53 gene fragmentations in comet-FISH assay act as in vivo biomarkers of radiation exposure in C57BL/6 and CBA/J mice. *Radiat. Res.* 165, 553-561.
- Ames, B.N. (1983). Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science* 221, 1256-1264.
- Ames, B.N., McCann, J., and Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.* 31, 347-364.
- Ames, B.N., Shigenaga, M.K., and Hagen, T.M. (1993). Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 7915-7922.
- Anderson, D., Yu, T.W., and Browne, M.A. (1997). The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence in situ hybridisation (FISH) assays. *Mutat. Res.* 390, 69-77.
- Arutyunyan, R., Gebhart, E., Hovhannisyann, G., Greulich, K.O., and Rapp, A. (2004). Comet-FISH using peptide nucleic acid probes detects telomeric repeats in DNA damaged by bleomycin and mitomycin C proportional to general DNA damage. *Mutagenesis* 19, 403-408.
- Ashman, J.N., Patmore, H.S., Condon, L.T., Cawkwell, L., Stafford, N.D., and Greenman, J. (2003). Prognostic value of genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma detected by comparative genomic hybridisation. *Br. J. Cancer* 89, 864-869.
- Audebert, M., Chevillard, S., Levalois, C., Gyapay, G., Vieillefond, A., Kljanienco, J., Vielh, P., El Naggar, A.K., Oudard, S., Boiteux, S., and Radicella, J.P. (2000a). Alterations of the DNA repair gene OGG1 in human clear cell carcinomas of the kidney. *Cancer Res.* 60, 4740-4744.
- Audebert, M., Radicella, J.P., and Dizdaroglu, M. (2000b). Effect of single mutations in the OGG1 gene found in human tumors on the substrate specificity of the Ogg1 protein. *Nucleic Acids Res.* 28, 2672-2678.
- Banaszewski, J., Szmaja, Z., Szyfter, W., Szyfter, K., Baranczewski, P., and Moller, L. (2000). Analysis of aromatic DNA adducts in laryngeal biopsies. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 257, 149-153.
- Banham, A.H., Beasley, N., Campo, E., Fernandez, P.L., Fidler, C., Gatter, K., Jones, M., Mason, D.Y., Prime, J.E., Trougouboff, P., Wood, K., and Cordell, J.L. (2001). The FOXP1 winged helix

- transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. *Cancer Res.* *61*, 8820-8829.
- Bartosz,G. (2006).*Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie.* Wydawnictwo Naukowe PWN.
- Bendesky,A., Michel,A., Sordo,M., Calderon-Aranda,E.S., Acosta-Saavedra,L.C., Salazar,A.M., Podoswa,N., and Ostrosky-Wegman,P. (2006). DNA damage, oxidative mutagen sensitivity, and repair of oxidative DNA damage in nonmelanoma skin cancer patients. *Environ. Mol. Mutagen.* *47*, 509-517.
- Betticher,D.C., Thatcher,N., Altermatt,H.J., Hoban,P., Ryder,W.D., and Heighway,J. (1995). Alternate splicing produces a novel cyclin D1 transcript. *Oncogene* *11*, 1005-1011.
- Blasiak,J., Arabski,M., Krupa,R., Wozniak,K., Rykala,J., Kolacinska,A., Morawiec,Z., Drzewoski,J., and Zadrozny,M. (2004). Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat. Res.* *554*, 139-148.
- Bockmuhl,U. (1998). [Significance of the analysis of genetic alterations in head-neck carcinomas]. *HNO* *46*, 74-83.
- Bockmuhl,U., Ishwad,C.S., Ferrell,R.E., and Gollin,S.M. (2001). Association of 8p23 deletions with poor survival in head and neck cancer. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* *124*, 451-455.
- Bockmuhl,U. and Petersen,I. (2002). DNA ploidy and chromosomal alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* *441*, 541-550.
- Bockmuhl,U., Schwendel,A., Dietel,M., and Petersen,I. (1996b). Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* *56*, 5325-5329.
- Bockmuhl,U., Schwendel,A., Dietel,M., and Petersen,I. (1996a). Distinct patterns of chromosomal alterations in high- and low-grade head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res.* *56*, 5325-5329.
- Bohr,V.A. (1991). Gene specific damage and repair after treatment of cells with UV and chemotherapeutical agents. *Adv. Exp. Med. Biol.* *283*, 225-233.
- Bohr,V.A. (2002). Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* *32*, 804-812.
- Bonde,P., Gao,D., Chen,L., Duncan,M., Miyashita,T., Montgomery,E., Harmon,J.W., and Wei,C. (2007). Selective decrease in the DNA base excision repair pathway in squamous cell cancer of the esophagus. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* *133*, 74-81.
- Boveri,T. (1914). *Yur Frage der Entstehung maligner Tumoren.* Gustav-Fischer, Jena.
- Brieger,J., Kastner,J., Gosepath,J., and Mann,W.J. (2006). Evaluation of microsatellite amplifications at chromosomal locus 3q26 as surrogate marker for premalignant changes in mucosa surrounding head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* *167*, 26-31.
- Brockmoller,J., Cascorbi,I., Henning,S., Meisel,C., and Roots,I. (2000). Molecular genetics of cancer susceptibility. *Pharmacology* *61*, 212-227.
- Bryce,L.A., Morrison,N., Hoare,S.F., Muir,S., and Keith,W.N. (2000). Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia.* *2*, 197-201.
- Buehrlen,M., Harreus,U.A., Gamarra,F., Hagen,R., and Kleinsasser,N.H. (2007). Cumulative genotoxic and apoptotic effects of xenobiotics in a mini organ culture model of human nasal mucosa as detected by the alkaline single cell microgel electrophoresis assay and the annexin V-affinity assay. *Toxicol. Lett.* *169*, 152-161.

- Cadet,J., Douki,T., Gasparutto,D., and Ravanat,J.L. (2003). Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.* 531, 5-23.
- Calaf,G.M. (2006). Susceptibility of human breast epithelial cells in vitro to hormones and drugs. *Int. J. Oncol.* 28, 285-295.
- Chakraborty,S.B., DasGupta,S., Roy,A., Sengupta,A., Ray,B., Roychoudhury,S., and Panda,C.K. (2003). Differential deletions in 3p are associated with the development of head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients. *Cancer Genet. Cytogenet.* 146, 130-138.
- Chang,W. and Boorstein,R.J. (1997). Molecular spectrum of mutations induced by 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in (CHO)-PL61 cells. *Mutat. Res.* 373, 125-137.
- Cheng,L., Eicher,S.A., Guo,Z., Hong,W.K., Spitz,M.R., and Wei,Q. (1998). Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 7, 465-468.
- Cloos,J., Spitz,M.R., Schantz,S.P., Hsu,T.C., Zhang,Z.F., Tobi,H., Braakhuis,B.J., and Snow,G.B. (1996). Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 530-535.
- Cooke,M.S., Olinski,R., and Evans,M.D. (2006). Does measurement of oxidative damage to DNA have clinical significance? *Clin. Chim. Acta* 365, 30-49.
- Dai,W., Li,Y., Ouyang,B., Pan,H., Reissmann,P., Li,J., Wiest,J., Stambrook,P., Gluckman,J.L., Noffsinger,A., and Bejarano,P. (2000). PRK, a cell cycle gene localized to 8p21, is downregulated in head and neck cancer. *Genes Chromosomes. Cancer* 27, 332-336.
- Dandara,C., Ballo,R., and Parker,M.I. (2005). CYP3A5 genotypes and risk of oesophageal cancer in two South African populations. *Cancer Lett.* 225, 275-282.
- de Boer,J. and Hoeijmakers,J.H. (2000). Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21, 453-460.
- Demokan,S., Suoglu,Y., Demir,D., Gozeler,M., and Dalay,N. (2006). Microsatellite instability and methylation of the DNA mismatch repair genes in head and neck cancer. *Ann. Oncol.* 17, 995-999.
- Diehl,J.A. (2002). Cycling to cancer with cyclin D1. *Cancer Biol. Ther.* 1, 226-231.
- Dizdaroglu,M., Jaruga,P., Birincioglu,M., and Rodriguez,H. (2002). Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic. Biol. Med.* 32, 1102-1115.
- Djelic,N., Spremo-Potparevic,B., Bajic,V., and Djelic,D. (2006). Sister chromatid exchange and micronuclei in human peripheral blood lymphocytes treated with thyroxine in vitro. *Mutat. Res.* 604, 1-7.
- Dong,H., Bonala,R.R., Suzuki,N., Johnson,F., Grollman,A.P., and Shibutani,S. (2004). Mutagenic potential of benzo[a]pyrene-derived DNA adducts positioned in codon 273 of the human P53 gene. *Biochemistry* 43, 15922-15928.
- Elahi,A., Zheng,Z., Park,J., Eyring,K., McCaffrey,T., and Lazarus,P. (2002). The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis* 23, 1229-1234.
- Epe,B. (2002). Role of endogenous oxidative DNA damage in carcinogenesis: what can we learn from repair-deficient mice? *Biol. Chem.* 383, 467-475.
- Fan,C.Y., Liu,K.L., Huang,H.Y., Barnes,E.L., Swalsky,P.A., Bakker,A., Woods,J., and Finkelstein,S.D. (2001). Frequent allelic imbalance and loss of protein expression of the DNA repair gene hOGG1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Lab Invest* 81, 1429-1438.

- Fang, Y.Z., Yang, S., and Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* 18, 872-879.
- Farkas, D. and Tannenbaum, S.R. (2005). In vitro methods to study chemically-induced hepatotoxicity: a literature review. *Curr. Drug Metab* 6, 111-125.
- Fatima, S., Chui, C.H., Tang, W.K., Hui, K.S., Au, H.W., Li, W.Y., Wong, M.M., Cheung, F., Tsao, S.W., Lam, K.Y., Beh, P.S., Wong, J., Law, S., Srivastava, G., Ho, K.P., Chan, A.S., and Tang, J.C. (2006). Transforming capacity of two novel genes JS-1 and JS-2 located in chromosome 5p and their overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* 17, 159-170.
- Fjellbirkeland, L., Bjerkvig, R., Steinsvag, S.K., and Laerum, O.D. (1996). Nonadhesive stationary organ culture of human bronchial mucosa. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 15, 197-206.
- Freier, K., Schwaenen, C., Sticht, C., Flechtenmacher, C., Muhling, J., Hofele, C., Radlwimmer, B., Lichter, P., and Joos, S. (2006). Recurrent FGFR1 amplification and high FGFR1 protein expression in oral squamous cell carcinoma (OSCC). *Oral Oncol.*
- Friedlander, P.L. (2001). Genomic instability in head and neck cancer patients. *Head Neck* 23, 683-691.
- Gajecka, M., Jarmuzs, M., Szyfter, W., and Szyfter, K. (2004). Non-random distribution of chromatid breaks in lymphocytes of laryngeal squamous cell carcinoma patients. *Oncol. Rep.* 12, 153-157.
- Gajecka, M., Rydzanicz, M., Jaskula-Sztul, R., Wierzbicka, M., Szyfter, W., and Szyfter, K. (2005). Reduced DNA repair capacity in laryngeal cancer subjects. A comparison of phenotypic and genotypic results. *Adv. Otorhinolaryngol.* 62, 25-37.
- Geisler, S.A., Olshan, A.F., Cai, J., Weissler, M., Smith, J., and Bell, D. (2005). Glutathione S-transferase polymorphisms and survival from head and neck cancer. *Head Neck* 27, 232-242.
- Ghosh, R. and Mitchell, D.L. (1999). Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res.* 27, 3213-3218.
- Glei, M., Schaeferhenrich, A., Claussen, U., Kuechler, A., Liehr, T., Weise, A., Marian, B., Sendt, W., and Pool-Zobel, B.L. (2007). Comet fluorescence in situ hybridization analysis for oxidative stress-induced DNA damage in colon cancer relevant genes. *Toxicol. Sci.* 96, 279-284.
- Goldenberg, D., Lee, J., Koch, W.M., Kim, M.M., Trink, B., Sidransky, D., and Moon, C.S. (2004). Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* 131, 986-993.
- Gollin, S.M. (2001). Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. *Head Neck* 23, 238-253.
- Gomez, D.E., Skilton, G., Alonso, D.F., and Kazanietz, M.G. (1999). The role of protein kinase C and novel phorbol ester receptors in tumor cell invasion and metastasis (Review). *Oncol. Rep.* 6, 1363-1370.
- Gotte, K., Ganssmann, S., Affolter, A., Schafer, C., Riedel, F., Arens, N., Finger, S., and Hormann, K. (2005). Dual FISH analysis of benign and malignant tumors of the salivary glands and paranasal sinuses. *Oncol. Rep.* 14, 1103-1107.
- Hagiwara, A., Kitajima, Y., Sato, S., and Miyazaki, K. (2005). Allelic loss of the DNA repair gene OGG1 against oxidative damage in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* 13, 1009-1016.
- Halazonetis, T.D. (2004). Constitutively active DNA damage checkpoint pathways as the driving force for the high frequency of p53 mutations in human cancer. *DNA Repair (Amst)* 3, 1057-1062.

- Harreus,U., Baumeister,P., Zieger,S., and Matthias,C. (2005). The influence of high doses of vitamin C and zinc on oxidative DNA damage. *Anticancer Res.* 25, 3197-3201.
- Harreus,U., Schmezer,P., Kuchenmeister,F., and Maier,H. (1999). [Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract]. *Laryngorhinootologie* 78, 176-181.
- Harreus,U.A., Kleinsasser,N.H., Zieger,S., Wallner,B., Reiter,M., Schuller,P., and Berghaus,A. (2004). Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization. *Mutat. Res.* 563, 131-138.
- Harreus,U.A., Wallner,B.C., Kastenbauer,E.R., and Kleinsasser,N.H. (2001). [DNA repair in mucous membrane cells and lymphocytes with the comet assay]. *Laryngorhinootologie* 80, 23-26.
- Hayakawa,N., Hirakawa,S., Nakai,H., Suzuki,S., and Ota,Z. (1993). The effects of thyroid-stimulating hormone and thyroid microsomal antibody on thyroid peroxidase activity in human follicular cells: a mini organ culture study. *Endocr. J.* 40, 149-161.
- Hermesen,M., Alonso,G.M., Meijer,G., van Diest,P., Suarez,N.C., Marcos,C.A., and Sampedro,A. (2005). Chromosomal changes in relation to clinical outcome in larynx and pharynx squamous cell carcinoma. *Cell Oncol.* 27, 191-198.
- Hewitt,C., Wilson,P., McGlenn,E., MacFarlane,G., Papageorgiou,A., Woodward,R.T., Sloan,P., Gollin,S.M., Paterson,I., Parkinson,K.K., Read,A.P., and Thakker,N. (2004). DLC1 is unlikely to be a primary target for deletions on chromosome arm 8p22 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 209, 207-213.
- Hibi,K., Trink,B., Patturajan,M., Westra,W.H., Caballero,O.L., Hill,D.E., Ratovitski,E.A., Jen,J., and Sidransky,D. (2000). AIS is an oncogene amplified in squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 5462-5467.
- Hirao,T., Nelson,H.H., Ashok,T.D., Wain,J.C., Mark,E.J., Christiani,D.C., Wiencke,J.K., and Kelsey,K.T. (2001). Tobacco smoke-induced DNA damage and an early age of smoking initiation induce chromosome loss at 3p21 in lung cancer. *Cancer Res.* 61, 612-615.
- Hoeijmakers,J.H. (2001). Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411, 366-374.
- Hogg,R.P., Honorio,S., Martinez,A., Agathangelou,A., Dallol,A., Fullwood,P., Weichselbaum,R., Kuo,M.J., Maher,E.R., and Latif,F. (2002). Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur. J. Cancer* 38, 1585-1592.
- Horvathova,E., Dusinska,M., Shaposhnikov,S., and Collins,A.R. (2004). DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization. *Mutagenesis* 19, 269-276.
- Huang,X.P., Rong,T.H., Wang,J.Y., Tang,Y.Q., Li,B.J., Xu,D.R., Zhao,M.Q., Zhang,L.J., Fang,Y., Su,X.D., and Liang,Q.W. (2006). Negative implication of C-MYC as an amplification target in esophageal cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 165, 20-24.
- Hui,A.B., Or,Y.Y., Takano,H., Tsang,R.K., To,K.F., Guan,X.Y., Sham,J.S., Hung,K.W., Lam,C.N., van Hasselt,C.A., Kuo,W.L., Gray,J.W., Huang,D.P., and Lo,K.W. (2005). Array-based comparative genomic hybridization analysis identified cyclin D1 as a target oncogene at 11q13.3 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 65, 8125-8133.
- Hussain,S.P. and Harris,C.C. (1998). Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res.* 58, 4023-4037.

- Inoue,M., Sato,E.F., Nishikawa,M., Park,A.M., Kira,Y., Imada,I., and Utsumi,K. (2003). Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr. Med. Chem.* 10, 2495-2505.
- Ishwad,C.S., Shuster,M., Bockmuhl,U., Thakker,N., Shah,P., Toomes,C., Dixon,M., Ferrell,R.E., and Gollin,S.M. (1999). Frequent allelic loss and homozygous deletion in chromosome band 8p23 in oral cancer. *Int. J. Cancer* 80, 25-31.
- Jaloszynski,P., Jaruga,P., Olinski,R., Biczysko,W., Szyfter,W., Nagy,E., Moller,L., and Szyfter,K. (2003). Oxidative DNA base modifications and polycyclic aromatic hydrocarbon DNA adducts in squamous cell carcinoma of larynx. *Free Radic. Res.* 37, 231-240.
- Jarmuz,M., Grenman,R., Golusinski,W., and Szyfter,K. (2005). Aberrations of 11q13 in laryngeal squamous cell lines and their prognostic significance. *Cancer Genet. Cytogenet.* 160, 82-88.
- Jeter,J.M., Kohlmann,W., and Gruber,S.B. (2006). Genetics of colorectal cancer. *Oncology (Williston Park)* 20, 269-276.
- Jin,C., Jin,Y., Wennerberg,J., Dictor,M., and Mertens,F. (2000). Nonrandom pattern of cytogenetic abnormalities in squamous cell carcinoma of the larynx. *Genes Chromosomes. Cancer* 28, 66-76.
- Jiricny,J. and Nystrom-Lahti,M. (2000). Mismatch repair defects in cancer. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 10, 157-161.
- John,H.A., Birnstiel,M.L., and Jones,K.W. (1969). RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* 223, 582-587.
- Jones,I.M., Thomas,C.B., Xi,T., Mohrenweiser,H.W., and Nelson,D.O. (2007). Exploration of methods to identify polymorphisms associated with variation in DNA repair capacity phenotypes. *Mutat. Res.* 616, 213-220.
- Juhasz,A., Balazs,M., Sziklay,I., Rakosy,Z., Treszl,A., Repassy,G., and Adany,R. (2005). Chromosomal imbalances in laryngeal and hypopharyngeal cancers detected by comparative genomic hybridization. *Cytometry A* 67, 151-160.
- Kaina,B., Ochs,K., Grosch,S., Fritz,G., Lips,J., Tomicic,M., Dunkern,T., and Christmann,M. (2001). BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 68, 41-54.
- Kawanishi,S., Hiraku,Y., and Oikawa,S. (2001). Mechanism of guanine-specific DNA damage by oxidative stress and its role in carcinogenesis and aging. *Mutat. Res.* 488, 65-76.
- Kiuru,A., Servomaa,K., Grenman,R., Pulkkinen,J., and Rytomaa,T. (1997). p53 mutations in human head and neck cancer cell lines. *Acta Otolaryngol. Suppl* 529, 237-240.
- Kleinsasser,N.H., Gamarra,F., Bergner,A., Wallner,B.C., Harreus,U.A., Juchhoff,J., Kastenbauer,E.R., and Huber,R.M. (2001a). Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat Spec.* 63, 141-147.
- Kleinsasser,N.H., Juchhoff,J., Wallner,B.C., Bergner,A., Harreus,U.A., Gamarra,F., Buhrlen,M., Huber,R.M., and Rettenmeier,A.W. (2004). The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat. Res.* 561, 63-73.
- Kleinsasser,N.H., Sassen,A.W., Semmler,M.P., Harreus,U.A., Licht,A.K., and Richter,E. (2005). The tobacco alkaloid nicotine demonstrates genotoxicity in human tonsillar tissue and lymphocytes. *Toxicol. Sci.* 86, 309-317.
- Kleinsasser,N.H., Wagner,C., Wallner,B.C., Harreus,U.A., and Kastenbauer,E.R. (2001b). Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients. *Mutat. Res.* 491, 151-161.

- Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Harreus, U.A., Zwickenpflug, W., and Richter, E. (2003). Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Toxicology* 192, 171-177.
- Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Kastenbauer, E.R., Muenzenrieder, R.K., and Harreus, U.A. (2000a). Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutat. Res.* 467, 21-30.
- Kleinsasser, N.H., Weissacher, H., Kastenbauer, E.R., Dirschedl, P., Wallner, B.C., and Harreus, U.A. (2000b). Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 257, 337-342.
- Knobel, Y., Gleis, M., Weise, A., Osswald, K., Schaferhenrich, A., Richter, K.K., Claussen, U., and Pool-Zobel, B.L. (2006). Uranyl nitrilotriacetate, a stabilized salt of uranium, is genotoxic in nontransformed human colon cells and in the human colon adenoma cell line LT97. *Toxicol. Sci.* 93, 286-297.
- Kohn, K.W., Bohr, V.A. (2002). Genomic Instability and DNA repair. In: "The Cancer Handbook". Hrsg. Alison, M.R. Nature Publishing Group.
- Krokan, H.E., Nilsen, H., Skorpen, F., Otterlei, M., and Slupphaug, G. (2000). Base excision repair of DNA in mammalian cells. *FEBS Lett.* 476, 73-77.
- Kujawski, M., Rydzanicz, M., Sarlomo-Rikala, M., Gabriel, A., and Szyfter, K. (2002). Chromosome alterations reflect clonal evolution in squamous cell carcinoma of the larynx. *Med. Sci. Monit.* 8, BR279-BR282.
- Kumaravel, T.S. and Bristow, R.G. (2005). Detection of genetic instability at HER-2/neu and p53 loci in breast cancer cells using Comet-FISH. *Breast Cancer Res. Treat.* 91, 89-93.
- Leonard, S.S., Harris, G.K., and Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1921-1942.
- Li, D., Firozi, P.F., Chang, P., Wang, L.E., Xiong, P., Sturgis, E.M., Eicher, S.A., Spitz, M.R., Hong, W.K., and Wei, Q. (2001). In vitro BPDE-induced DNA adducts in peripheral lymphocytes as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int. J. Cancer* 93, 436-440.
- Li, X., Lee, N.K., Ye, Y.W., Waber, P.G., Schweitzer, C., Cheng, Q.C., and Nisen, P.D. (1994). Allelic loss at chromosomes 3p, 8p, 13q, and 17p associated with poor prognosis in head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 86, 1524-1529.
- Lin, H.S., Berry, G.J., Sun, Z., and Fee, W.E., Jr. (2006a). Cyclin D1 and p16 expression in recurrent nasopharyngeal carcinoma. *World J. Surg. Oncol.* 4, 62.
- Lin, M., Smith, L.T., Smiraglia, D.J., Kazhiyur-Mannar, R., Lang, J.C., Schuller, D.E., Kornacker, K., Wenger, R., and Plass, C. (2006b). DNA copy number gains in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* 25, 1424-1433.
- Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 362, 709-715.
- Lindahl, T. and Wood, R.D. (1999). Quality control by DNA repair. *Science* 286, 1897-1905.
- Liu, R., Yin, L.H., and Pu, Y.P. (2007). Reduced expression of human DNA repair genes in esophageal squamous-cell carcinoma in china. *J. Toxicol. Environ. Health A* 70, 956-963.
- Mambo, E., Chatterjee, A., Souza-Pinto, N.C., Mayard, S., Hogue, B.A., Hoque, M.O., Dizdaroglu, M., Bohr, V.A., and Sidransky, D. (2005). Oxidized guanine lesions and hOgg1 activity in lung cancer. *Oncogene* 24, 4496-4508.

- Mancini,U.M., Estecio,M.R., Gois,J.F., Fukuyama,E.E., Valentim,P.J., Cury,P.M., Bertollo,E.M., and Tajara,E.H. (2003). The chromosome 5q21 band minisatellite and head and neck cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 147, 87-88.
- Marnett,L.J. (2000). Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21, 361-370.
- Mates,J.M., Perez-Gomez,C., and Nunez,d.C., I (1999). Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* 32, 595-603.
- McKelvey-Martin,V.J., Green,M.H., Schmezer,P., Pool-Zobel,B.L., De Meo,M.P., and Collins,A. (1993). The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review. *Mutat. Res.* 288, 47-63.
- McKelvey-Martin,V.J., Ho,E.T., McKeown,S.R., Johnston,S.R., McCarthy,P.J., Rajab,N.F., and Downes,C.S. (1998). Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* 13, 1-8.
- McKenna,D.J., Gallus,M., McKeown,S.R., Downes,C.S., and McKelvey-Martin,V.J. (2003a). Modification of the alkaline Comet assay to allow simultaneous evaluation of mitomycin C-induced DNA cross-link damage and repair of specific DNA sequences in RT4 cells. *DNA Repair (Amst)* 2, 879-890.
- McKenna,D.J., Rajab,N.F., McKeown,S.R., McKerr,G., and McKelvey-Martin,V.J. (2003b). Use of the comet-FISH assay to demonstrate repair of the TP53 gene region in two human bladder carcinoma cell lines. *Radiat. Res.* 159, 49-56.
- Mineta,H., Miura,K., Takebayashi,S., Misawa,K., Araki,K., Misawa,Y., and Ueda,Y. (2002). Prognostic value of glucose transporter 1 expression in patients with hypopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res.* 22, 3489-3494.
- Mohan,V., Ponnala,S., Reddy,H.M., Sistla,R., Jesudasan,R.A., Ahuja,Y.R., and Hasan,Q. (2007). Chromosome 11 aneusomy in esophageal cancers and precancerous lesions--an early event in neoplastic transformation: an interphase fluorescence in situ hybridization study from south India. *World J. Gastroenterol.* 13, 503-508.
- Mohrenweiser,H.W., Wilson,D.M., III, and Jones,I.M. (2003). Challenges and complexities in estimating both the functional impact and the disease risk associated with the extensive genetic variation in human DNA repair genes. *Mutat. Res.* 526, 93-125.
- Moller,P. (2006). The alkaline comet assay: towards validation in biomonitoring of DNA damaging exposures. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 98, 336-345.
- Moller,P., Knudsen,L.E., Loft,S., and Wallin,H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 9, 1005-1015.
- Mortelmans,K. and Zeiger,E. (2000). The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat. Res.* 455, 29-60.
- Nguyen,D.C., Parsa,B., Close,A., Magnusson,B., Crowe,D.L., and Sinha,U.K. (2003). Overexpression of cell cycle regulatory proteins correlates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinomas. *Int. J. Oncol.* 22, 1285-1290.
- Olinski,R., Zastawny,T., Budzbon,J., Skokowski,J., Zegarski,W., and Dizdaroglu,M. (1992). DNA base modifications in chromatin of human cancerous tissues. *FEBS Lett.* 309, 193-198.
- Olive,P.L. and Banath,J.P. (1993). Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat. Res.* 294, 275-283.

- Or, Y.Y., Hui, A.B., To, K.F., Lam, C.N., and Lo, K.W. (2006). PIK3CA mutations in nasopharyngeal carcinoma. *Int. J. Cancer* 118, 1065-1067.
- Pai, S.I., Wu, G.S., Ozoren, N., Wu, L., Jen, J., Sidransky, D., and El Deiry, W.S. (1998). Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer Res.* 58, 3513-3518.
- Palyvoda, O., Polanska, J., Wygoda, A., and Rzeszowska-Wolny, J. (2003). DNA damage and repair in lymphocytes of normal individuals and cancer patients: studies by the comet assay and micronucleus tests. *Acta Biochim. Pol.* 50, 181-190.
- Pardue, M.L. and Gall, J.G. (1969). Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 64, 600-604.
- Park, E., Gleit, M., Knobel, Y., and Pool-Zobel, B.L. (2007). Blood mononucleocytes are sensitive to the DNA damaging effects of iron overload--in vitro and ex vivo results with human and rat cells. *Mutat. Res.* 619, 59-67.
- Pavelic, K., Krizanac, S., Cacev, T., Hadzija, M.P., Radosevic, S., Crnic, I., Levanat, S., and Kapitanovic, S. (2001). Aberration of FHIT gene is associated with increased tumor proliferation and decreased apoptosis-clinical evidence in lung and head and neck carcinomas. *Mol. Med.* 7, 442-453.
- Paz-Elizur, T., Ben Yosef, R., Elinger, D., Vexler, A., Krupsky, M., Berrebi, A., Shani, A., Schechtman, E., Freedman, L., and Livneh, Z. (2006). Reduced repair of the oxidative 8-oxoguanine DNA damage and risk of head and neck cancer. *Cancer Res.* 66, 11683-11689.
- Paz-Elizur, T., Elinger, D., Blumenstein, S., Krupsky, M., Schechtman, E., and Livneh, Z. (2007). Novel molecular targets for risk identification: DNA repair enzyme activities. *Cancer Biomark.* 3, 129-133.
- Peters, E.S., McClean, M.D., Liu, M., Eisen, E.A., Mueller, N., and Kelsey, K.T. (2005). The ADH1C polymorphism modifies the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck associated with alcohol and tobacco use. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14, 476-482.
- Pfeiffer, P., Goedecke, W., and Obe, G. (2000). Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis* 15, 289-302.
- Philips, H.J. (1973). Dye exclusion test for cell viability. In: Kruse, P.F. et al. (Hrsg.) *Tissue Culture* Academic Press, New York, 407-408.
- Pool-Zobel, B.L., Guigas, C., Klein, R., Neudecker, C., Renner, H.W., and Schmezer, P. (1993). Assessment of genotoxic effects by lindane. *Food Chem. Toxicol.* 31, 271-283.
- Pool-Zobel, B.L., Lotzmann, N., Knoll, M., Kuchenmeister, F., Lambertz, R., Leucht, U., Schroder, H.G., and Schmezer, P. (1994). Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ. Mol. Mutagen.* 24, 23-45.
- Pryor, W.A. (1986). Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions. *Annu. Rev. Physiol* 48, 657-667.
- Rabbitts, T.H. (1994). Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* 372, 143-149.
- Rameh, L.E. and Cantley, L.C. (1999). The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J. Biol. Chem.* 274, 8347-8350.
- Rapp, A., Bock, C., Dittmar, H., and Greulich, K.O. (2000). UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. *J. Photochem. Photobiol. B* 56, 109-117.

- Redon,R., Muller,D., Caulee,K., Wanherdrick,K., Abecassis,J., and du,M.S. (2001). A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but not p63 gene as a likely target of 3q26-qter gains. *Cancer Res.* 61, 4122-4129.
- Rodrigo,J.P., Lazo,P.S., Ramos,S., Alvarez,I., and Suarez,C. (1996). MYC amplification in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 122, 504-507.
- Rogowski,M., Walenczak,I., Pepinski,W., Skawronska,M., Sieskiewicz,A., and Klatka,J. (2004). Loss of heterozygosity in laryngeal cancer. *Rocz. Akad. Med. Bialymst.* 49, 262-264.
- Roh,H.J., Shin,D.M., Lee,J.S., Ro,J.Y., Tainsky,M.A., Hong,W.K., and Hittelman,W.N. (2000). Visualization of the timing of gene amplification during multistep head and neck tumorigenesis. *Cancer Res.* 60, 6496-6502.
- Rosin,M.P., Cheng,X., Poh,C., Lam,W.L., Huang,Y., Lovas,J., Berean,K., Epstein,J.B., Priddy,R., Le,N.D., and Zhang,L. (2000). Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin. Cancer Res.* 6, 357-362.
- Rybicki,B.A., Savera,A.T., Gomez,J.A., Patel,S.C., Ballard,N.E., Benninger,M.S., Zarbo,R.J., and Van Dyke,D.L. (2003). Allelic loss and tumor pathology in head and neck squamous cell carcinoma. *Mod. Pathol.* 16, 970-979.
- Rydzanicz,M., Golusinski,P., Mielcarek-Kuchta,D., Golusinski,W., and Szyfter,K. (2006). Cyclin D1 gene (CCND1) polymorphism and the risk of squamous cell carcinoma of the larynx. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 263, 43-48.
- Rydzanicz,M., Wierzbicka,M., Gajecka,M., Szyfter,W., and Szyfter,K. (2005). The impact of genetic factors on the incidence of multiple primary tumors (MPT) of the head and neck. *Cancer Lett.* 224, 263-278.
- Santos,S.J., Singh,N.P., and Natarajan,A.T. (1997). Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp. Cell Res.* 232, 407-411.
- Sanz-Ortega,J., Valor,C., Saez,M.C., Ortega,L., Sierra,E., Poch,J., Hernandez,S., and Sanz-Esponera,J. (2003). 3p21, 5q21, 9p21 and 17p13 allelic deletions accumulate in the dysplastic spectrum of laryngeal carcinogenesis and precede malignant transformation. *Histol. Histopathol.* 18, 1053-1057.
- Sarker,A.H., Watanabe,S., Seki,S., Akiyama,T., and Okada,S. (1995). Oxygen radical-induced single-strand DNA breaks and repair of the damage in a cell-free system. *Mutat. Res.* 337, 85-95.
- Sasiadek,M., Schlade-Bartusiak,K., Zych,M., Noga,L., and Czemarmazowicz,H. (2002). Opposite responses in two DNA repair capacity tests in lymphocytes of head and neck cancer patients. *J. Appl. Genet.* 43, 525-534.
- Schaeferhenrich,A., Sendt,W., Scheele,J., Kuechler,A., Liehr,T., Claussen,U., Rapp,A., Greulich,K.O., and Pool-Zobel,B.L. (2003). Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem. Toxicol.* 41, 655-664.
- Scherer,S.J., Avdievich,E., and Edelman,W. (2005). Functional consequences of DNA mismatch repair missense mutations in murine models and their impact on cancer predisposition. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 689-693.
- Shao,L., Lin,J., Huang,M., Ajani,J.A., and Wu,X. (2005). Predictors of esophageal cancer risk: assessment of susceptibility to DNA damage using comet assay. *Genes Chromosomes. Cancer* 44, 415-422.

- Singh, B., Gogineni, S.K., Sacks, P.G., Shaha, A.R., Shah, J.P., Stoffel, A., and Rao, P.H. (2001). Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res.* 61, 4506-4513.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., and Schneider, E.L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184-191.
- Slupphaug, G., Kavli, B., and Krokan, H.E. (2003). The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat. Res.* 531, 231-251.
- Sokhansanj, B.A. and Wilson, D.M., III (2006). Estimating the effect of human base excision repair protein variants on the repair of oxidative DNA base damage. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15, 1000-1008.
- Speit, G. and Hartmann, A. (2006). The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol. Biol.* 314, 275-286.
- Steinsvag, S.K., Strand, M., Berg, O., Miaguchi, M., and Olofsson, J. (1991). Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* 101, 1323-1331.
- Sugimura, T., Kumimoto, H., Tohnai, I., Fukui, T., Matsuo, K., Tsurusako, S., Mitsudo, K., Ueda, M., Tajima, K., and Ishizaki, K. (2006). Gene-environment interaction involved in oral carcinogenesis: molecular epidemiological study for metabolic and DNA repair gene polymorphisms. *J. Oral Pathol. Med.* 35, 11-18.
- Sunwoo, J.B., Sun, P.C., Gupta, V.K., Schmidt, A.P., El Mofty, S., and Scholnick, S.B. (1999). Localization of a putative tumor suppressor gene in the sub-telomeric region of chromosome 8p. *Oncogene* 18, 2651-2655.
- Szatrowski, T.P. and Nathan, C.F. (1991). Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* 51, 794-798.
- Szekely, G., Remenar, E., Kasler, M., and Gundy, S. (2005). Mutagen sensitivity of patients with cancer at different sites of the head and neck. *Mutagenesis* 20, 381-385.
- Szuster-Ciesielska, A., Hryciuk-Umer, E., Stepulak, A., Kupisz, K., and Kandefer-Szerszen, M. (2004). Reactive oxygen species production by blood neutrophils of patients with laryngeal carcinoma and antioxidative enzyme activity in their blood. *Acta Oncol.* 43, 252-258.
- Teissier, E., Fennrich, S., Strazielle, N., Daval, J.L., Ray, D., Schlosshauer, B., and Ghersi-Egea, J.F. (1998). Drug metabolism in in vitro organotypic and cellular models of mammalian central nervous system: activities of membrane-bound epoxide hydrolase and NADPH-cytochrome P-450 (c) reductase. *Neurotoxicology* 19, 347-355.
- Thompson, L.H. and Schild, D. (2002). Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat. Res.* 509, 49-78.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., and Sasaki, Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206-221.
- Tjia, W.M., Sham, J.S., Hu, L., Tai, A.L., and Guan, X.Y. (2005). Characterization of 3p, 5p, and 3q in two nasopharyngeal carcinoma cell lines, using region-specific multiplex fluorescence in situ hybridization probes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 158, 61-66.
- Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J., and Telser, J. (2004). Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell Biochem.* 266, 37-56.
- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., and Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem. Biol. Interact.* 160, 1-40.

- van Dekken, H., Wink, J.C., Vissers, K.J., van Marion, R., Koppert, L.B., Tilanus, H.W., Siersema, P.D., Tanke, H.J., Szuhai, K., and Hop, W.C. (2006). Genomic analysis of early adenocarcinoma of the esophagus or gastroesophageal junction: tumor progression is associated with alteration of 1q and 8p sequences. *Genes Chromosomes. Cancer* 45, 516-525.
- Veranic, P. and Psenicnik, M. (1996). A mini organ culture as a model for studying the gallbladder epithelium of mouse. *Biol. Cell* 88, 145-151.
- Victorov, I.V., Lyjin, A.A., and Aleksandrova, O.P. (2001). A modified roller method for organotypic brain cultures: free-floating slices of postnatal rat hippocampus. *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 7, 30-37.
- Wada, S., Noguchi, T., Takeno, S., and Kawahara, K. (2006). PIK3CA and TFRC Located in 3q Are New Prognostic Factors in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.*
- Wallner, B.C., Harreus, U.A., Gamarra, F., Sassen, A., and Kleinsasser, N.H. (2005). [Mini-organ cultures of human nasal mucosa. A model for eco-genotoxicological investigations]. *HNO* 53, 1037-1046.
- Ward, J.F., Evans, J.W., Limoli, C.L., and Calabro-Jones, P.M. (1987). Radiation and hydrogen peroxide induced free radical damage to DNA. *Br. J. Cancer Suppl* 8, 105-112.
- Wikman, H., Risch, A., Klimek, F., Schmezer, P., Spiegelhalter, B., Dienemann, H., Kayser, K., Schulz, V., Drings, P., and Bartsch, H. (2000). hOGG1 polymorphism and loss of heterozygosity (LOH): significance for lung cancer susceptibility in a caucasian population. *Int. J. Cancer* 88, 932-937.
- Williams, M.E., Gaffey, M.J., Weiss, L.M., Wilczynski, S.P., Schuurig, E., and Levine, P.A. (1993). Chromosome 11Q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 119, 1238-1243.
- Wong, M.L., Tao, Q., Fu, L., Wong, K.Y., Qiu, G.H., Law, F.B., Tin, P.C., Cheung, W.L., Lee, P.Y., Tang, J.C., Tsao, G.S., Lam, K.Y., Law, S., Wong, J., and Srivastava, G. (2006). Aberrant promoter hypermethylation and silencing of the critical 3p21 tumour suppressor gene, RASSF1A, in Chinese oesophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* 28, 767-773.
- Wood, R.D., Mitchell, M., Sgouros, J., and Lindahl, T. (2001). Human DNA repair genes. *Science* 291, 1284-1289.
- Wu, C.L., Roz, L., Sloan, P., Read, A.P., Holland, S., Porter, S., Scully, C., Speight, P.M., and Thakker, N. (1997). Deletion mapping defines three discrete areas of allelic imbalance on chromosome arm 8p in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes. Cancer* 20, 347-353.
- Xie, X., Clausen, O.P., and Boysen, M. (2006a). Correlation of numerical aberrations of chromosomes X and 11 and poor prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 132, 511-515.
- Xie, X., Huang, J., and Fejer, M.M. (2006b). Narrow-linewidth near-degenerate optical parametric generation achieved with quasi-group-velocity-matching in lithium niobate waveguides. *Opt. Lett.* 31, 2190-2192.
- Xie, X., Song, M.H., Jin, F., Ahn, S.N., Suh, J.P., Hwang, H.G., and McCouch, S.R. (2006c). Fine mapping of a grain weight quantitative trait locus on rice chromosome 8 using near-isogenic lines derived from a cross between *Oryza sativa* and *Oryza rufipogon*. *Theor. Appl. Genet.* 113, 885-894.
- Xie, X. and Zhang, J. (2006). Trends in the rates of resistance of *Ureaplasma urealyticum* to antibiotics and identification of the mutation site in the quinolone resistance-determining region in Chinese patients. *FEMS Microbiol. Lett.* 259, 181-186.

Zhou,X., Jordan,R.C., Li,Y., Huang,B.L., and Wong,D.T. (2005). Frequent allelic imbalances at 8p and 11q22 in oral and oropharyngeal epithelial dysplastic lesions. *Cancer Genet. Cytogenet.* 161, 86-89.

7 Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen

BEGM	Bronchial Epithelial Growth Medium
BER	Basenexzisionsreparatur
BPDE	Benzo(a)pyren-dihydrodiol-9,10-epoxid
BSA	Bovine Serum Albumin
Chr	Chromosom
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	Dubbleco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DRC	DNA Reparaturkapazität
DSB	Doppelstrangbrüche
EDTA	Ethylendiaminetetraessigsäure
Fapy-Guanin	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
FCS	fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GSH	Glutathion
HNPCC	hereditäres kolorektales Karzinom ohne Polyposis
HR	homologe Rekombination
LOH	Heterozygotieverlust („loss of heterozygosity“)
MCTM	Munich Chromosomal Tailmoment
MGMT	O ⁶ -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MI	Minisateliten
MMR	Mismatchreparatur
MOK	Miniorgankulturen
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NDEA	N-Nitrosodiethylamin
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB	Nuklearfaktor-κB
NHEJ	nichthomologe Verknüpfung der Strangenden (“non homologous end joining“)
OGG1	8-oxo-Guanin-DNA-Glykosylase

5-OH-MUra	5-Hydroxymethyluracil
8-oxoG	8-oxo-Guanin
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phoshat-gepuffertes Salz
PHA	Phytohämagglutinin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SCE	Schwesterchromatidaustausch
SOD	Superoxiddismutase
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
UDS	außerplanmäßige DNA-Synthese

7.2 Anamnesen

Tab. 20: Anamnesen der Spender (ohne Karzinomerkrankung) der Schleimhaut des Oropharynx für die Untersuchung an Miniorgankulturen

Nr.	Alter	Geschlecht	Alkoholkonsum g/d	Nikotinkonsum Stk/d	Beruf
1	37	♂	0	0	arbeitslos
2	28	♂	k. A.	0	k. A.
3	45	♂	0	20	Flugzeugmechaniker
4	33	♂	0	0	k. A.
5	62	♂	0	0	k. A.
6	34	♂	k. A.	20	k. A.
7	38	♂	150	20	k. A.
8	65	♂	0	0	k. A.
9	48	♂	0	40	Beamter
10	31	♂	k. A.	0	k. A.
11	35	♂	25	5	k. A.
12	48	♂	10	30	k. A.
13	38	♂	50	20	Vertrieb
14	36	♂	k. A.	k. A.	k. A.
15	63	♂	0	0	k. A.
16	37	♂	0	20	Systembetreuer
17	33	♂	25	20	Sachbearbeiter
18	40	♂	25	0	k. A.
19	61	♂	45	0	k. A.
20	52	♂	10	40	Gärtner
21	47	♂	15	20	Lehrer
22	59	♂	25	0	tech. Angestellter

♂ männlich, Alkoholkonsum in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Stück von Zigaretten pro Tag (Stk/d), k.A. keine Angabe

Tab. 21: Anamnesen der Spender (mit Oropharynxkarzinom) der Schleimhaut des Oropharynx für die Untersuchung an Miniorgankulturen

Nr.	Alter	Geschlecht	Alkoholkonsum g/d	Nikotinkonsum Stk/d	Beruf
1	61	♂	25	40	k. A.
2	57	♂	20	40	Angestellter
3	45	♀	20	10	Sachbearbeiterin
4	52	♂	10	20	Lehrer
5	45	♂	150	30	k. A.
6	58	♂	90	30	Meister
7	54	♂	0	0	Konstrukteur
8	51	♂	100	10	k. A.
9	56	♂	k. A.	k. A.	k. A.
10	68	♂	k. A.	k. A.	k. A.
11	60	♂	k. A.	k. A.	k. A.
12	77	♀	k. A.	k. A.	k. A.
13	49	♀	10	20	Büroarbeiterin
14	50	♂	k. A.	k. A.	k. A.
15	62	♀	30	15	Hausfrau
16	64	♂	25	30	k. A.

♂ männlich, Alkoholkonsum in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Stück von Zigaretten pro Tag (Stk/d), k. A. keine Angabe

7.3 Lebenslauf

Name: Agnieszka Sawicka
Geburtsdatum und –ort: 26.12.1977 in Morag
Staatangehörigkeit: polnisch

Berufliche Tätigkeit

Seit 12/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor
Radioisotope Centre POLATOM, Otwock-Swierk,
Polen

05/2005 – 09/2006 Mitarbeiterin bei BSL Bioservice Scientific
Laboratories GmbH, Planegg

11/2003 – 04/2005 Mitarbeiterin bei GenPharmTox BioTech,
Martinsried

10/2002 – 10/2003 Praktikantin im Klinikum der Ludwig- Maximilians-
Universität Großhadern, Klinische Chemie

Berufliche Weiterbildung

11/2005 DGPT-Kurs: Chemische Kanzerogenese und
Mutagenese

02/2006 DGPT- Kurs: Molekulare Zelltoxykologie

Studium

Seit Oktober 2003 Promotion im Labor für klinisch
experimentelle Onkologie der Klinik und Poliklinik für
Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Ludwig-
Maximilians- Universität München

10/1996 – 06/2001 Studium der Biologie an der Universität zu Lodz
Hauptfach: Biochemie

Schulische Ausbildung

09/1992 – 06/1996 Lyzeum in Lodz, Abiturabschluss

7.4 Danksagung

Bei allen, die auf das Zustandekommen dieser Arbeit durch ihre Unterstützung positiven Einfluss genommen haben, möchte ich mich herzlich bedanken.

Allen voran gilt der Dank Herrn Prof. Dr. med. Alexander Berghaus, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwigs-Maximilians-Universität München, für die Ermöglichung dieser Studie.

Herzlichst danke ich Herrn PD. Dr. med. Ulrich Harréus für die Übernahme und wissenschaftliche Betreuung meiner thematischen Fragestellung. Seine zahlreiche fachliche Ratschläge haben mir bei der Gestaltung dieser Arbeit sehr geholfen.

Ein besonderes Dankeschön an Frau Sabina Zieger für umfassende Beratung und Hilfestellung bei den Versuchen. Dank ihrem Humor und Freundschaft hat sie eine angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe geschaffen.

Herr Dr. med. Maximilian Reiter hat mich bei der Korrektur meiner Arbeit sehr unterstützt. Für alle Tips und Anmerkungen danke ich ihm sehr.

Vielen Dank an alle meine Freunde, insbesondere Agnieszka und Kristian für ihre Hilfsbereitschaft, Verständnis und seelische Unterstützung. Dank ihnen war mein Aufenthalt in München ein spannendes Abenteuer.

Schlußendlich möchte ich meiner Mutter ein Dankeschön sagen, die den größten Teil zu meiner Ausbildung beigetragen und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat.

