

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

**Genoprotektive Effekte von Celebrex[®] und
Mutagensensitivität im CyclinD1 bei Patienten mit und ohne
Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes**

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

vorgelegt von

Martina Hartmann aus St. Georgen
(2009)

**Mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: PD Dr. U. Harréus

**Mitberichterstatter: PD Dr. Hans-Joachim Stemmler
PD Dr. Doris Mayr**

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. M. Reiter**

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

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.2009

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Epidemiologie der Kopf-Halskarzinome.....	7
1.2	Mehrstufenmodell der Kanzerogenese	7
1.3	Risikofaktoren der Krebsentstehung.....	9
1.3.1	Endogene Risikofaktoren	9
1.3.2	Exogene Risikofaktoren	11
1.4	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.....	12
1.5	Cyclooxygenase (COX)	13
1.6	COX-1, COX-2	14
1.7	Produkte der Cyclooxygenase und ihre Aufgaben	15
1.8	Inhibitoren der Cyclooxygenase	16
1.8.1	Geschichtlicher Hintergrund	16
1.8.2	Mechanismus der Cyclooxygenase-Inhibition	17
1.8.3	Celebrex [®] : Selektiver COX-2-Inhibitor.....	18
1.9	CyclinD1 (CCND1).....	19
1.9.1	Stellenwert in der Kopf-Hals-Karzinogenese.....	19
1.9.2	Aufbau	20
1.9.3	Aktivierung und Funktionen	20
1.10	Aufgabenstellung und Zielsetzung	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Patientengut und Gewebeproben	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Präparieren und Anlegen der Schleimhautproben.....	24
2.2.2	Kultivierungsphase	24
2.2.3	Miniorgankulturen	25
2.2.4	Fremdstoffexposition	26
2.2.5	Gewinnung von Einzelzellen aus dem Zellverband	27
2.2.6	Bestimmung der Vitalität	28
2.2.7	Mikrogelelektrophorese (Comet-Assay).....	28
2.2.7.1	Präparation der Objektträger	29
2.2.7.2	Lysierung der Zell- und Kernmembran	29
2.2.7.3	Elektrophorese	29
2.2.7.4	Digitale Analyse der DNA-Migration	30

2.2.8	Comet-FISH	31
2.2.8.1	Hybridisierung	31
2.2.8.2	Zellfärbung	32
2.2.8.3	Digitale Auswertung der DNA-Migration	32
2.2.9	Übersicht des Versuchsaufbaus	34
2.3	Methodenspezifisches Material	35
2.3.1	Miniorgankulturen	35
2.3.2	Mikrogelelektrophorese	36
2.3.3	Comet-FISH	37
2.3.4	Medikament	38
2.3.5	Chemikalien, Zellkulturmedien, Enzyme	39
2.3.6	Verbrauchsmaterialien	40
2.3.7	Geräte und Zubehör	41
3	Ergebnisse	42
3.1	Statistische Testverfahren und graphische Darstellung	42
3.2	DNA-Schädigung an Interphasezellen	42
3.2.1	DNA-Schädigung in der tumorfreien Patientengruppe	45
3.2.1.1	DNA-Schädigung mit BPDE	46
3.2.1.2	Einfluß des COX-2-Inhibitors Celebrex [®] auf die DNA-Schädigung mit BPDE..	48
3.2.2	DNA-Schädigung in der Karzinomgruppe	51
3.2.2.1	DNA-Schädigung mit BPDE	52
3.2.2.2	Einfluß des COX-2-Inhibitors Celebrex [®] auf die DNA-Schädigung mit BPDE..	54
3.2.3	Vergleich der Patientengruppen mit und ohne Kopf-Hals-Karzinom	58
3.2.3.1	Vergleich der DNA-Schädigung mit BPDE zwischen den Patientengruppen mit und ohne Kopf-Hals-Karzinom	58
3.2.3.2	Vergleich des Einfluß des COX-2-Inhibitors Celebrex [®] auf die DNA- Schädigung mit BPDE zwischen den Patientengruppen mit und ohne Kopf- Hals-Karzinom	59
4	Diskussion	63
4.1	Patienten	63
4.1.1	Auswahl der Patienten	63
4.1.2	Patienten als Spender von Oropharynxschleimhaut	63
4.2	Diskussion der Methodik	64
4.2.1	Comet-Assay	64
4.2.2	Comet-FISH	64

4.2.3	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	65
4.3	DNA-Schäden durch Benz(a)pyren-7,8-diol-9,10-epoxid.....	66
4.4	CyclinD1.....	67
4.5	Verwendung des COX-2-Inhibitors Celebrex®	70
4.6	Diskussion der Ergebnisse	72
4.6.1	Mutagensensitivität des CyclinD1-Gens als endogener Risikomarker	72
4.6.2	Ausschluss einer genotoxischen Wirkung des COX-2-Inhibitors Celebrex® ..	73
4.6.3	Genoprotektiver Effekt des Celebrex®	74
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	78
7	Anhang.....	91
7.1	Abkürzungsverzeichnis.....	91
7.2	Anamnesen	92
7.3	Lebenslauf.....	94
7.4	Danksagung.....	95

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie der Kopf-Halskarzinome

Zusammen mit den Herz-Kreislaufkrankungen gehören die malignen Tumorerkrankungen zu den häufigsten Todesursachen in den Industrieländern.

Laut Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. wurde die Zahl der jährlich auftretenden Neuerkrankungen an Krebs im Jahre 2002 in Deutschland auf ca. 218250 Erkrankungen bei Männern und ca. 206000 bei Frauen geschätzt. Davon machten die Malignome des Mund- und Rachenraums unter den Männern mit einer altersstandardisierten Inzidenz von 19,3/100000 einen Anteil von 3,6% aus und standen somit an siebter Stelle der Häufigkeitsverteilung aller Malignome der Männer. Die geschätzte Zahl der jährlichen Neuerkrankungen bei Frauen dagegen war mit 6,1/100000 dreimal so niedrig. Dabei lag das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei 61, für Frauen bei 69 Jahren. Die rohe Mortalitätsrate der Männer betrug im Jahre 2002 9,2, die der Frauen 2,3/100000 der Bevölkerung [GEKID, 2006].

Bei Beobachtung der altersstandardisierten Mortalitätsrate bei Kopf- Hals- Malignomen fiel auf, dass diese in den letzten 20 Jahren um ca. das Zwei- Dreifache angestiegen war, was bei keiner anderen Krebserkrankung zu verzeichnen war. Hierzu haben vor allem die gestiegenen Mortalitätsraten der Tumoren der Mundhöhle und des Rachens beigetragen [Reiter et al., 2009].

1.2 Mehrstufenmodell der Kanzerogenese

Unter der Kanzerogenese versteht man den Prozess der Tumorentstehung, der trotz aller Bemühungen bis heute nur teilweise geklärt werden konnte. Bereits 1914 wurde vom Würzburger Mediziner und Zoologen Theodor Boveri ein Zusammenhang zwischen Chromosomenschäden und Krebs vermutet und später die Bildung somatischer Mutationen als ätiologisches Prinzip für die Krebsentstehung von Bauer (1928) postuliert [Boveri, 1914; Bauer, 1928]. Bei der Transformation einer gesunden Zelle in eine maligne Tumorzelle reicht eine Mutation nicht aus, es findet vielmehr ein sog. „*multistep process*“ statt bei dem mehrere genetische Veränderungen zusammen treffen [Califano, 1996; Hanahan und Weinberg, 2000].

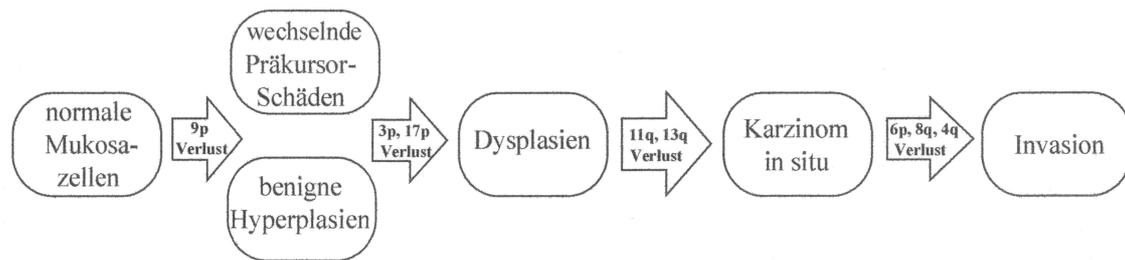


Abb. 1: Modell der genetischen Progression bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich [nach Califano et al., 1996]

Mutationen in Regulations-, Wachstums- oder Differenzierungsgenen können dabei zur tumorösen Entartung von Körperzellen führen, die dadurch in der Lage sind ein autonomes, nicht mehr regulativ kontrolliertes Wachstum aufzuweisen. In diesem Zusammenhang spielen vor allem Veränderungen in Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen eine wichtige Rolle. Erst durch Mutationen werden Protoonkogene zu Onkogenen aktiviert. Dadurch kommt es zu einer übermäßigen Onkoproteinsynthese oder einer konstitutiven Anschaltung von Signaltransduktionswegen, ohne exogene Wachstumssignale (Funktionszugewinn). Zu den betroffenen Genen gehören unter anderem *ras*, *myc*, *hst1*, *int2*, *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) und *CyclinD1*, die normalerweise den Zellzyklus positiv regulieren.

Bei den Tumorsuppressorgenen hingegen, die im Normalfall eine Tumorentstehung durch Einleitung eines Wachstumsstopps und/oder einer Apoptose hemmen, kommt es durch die Mutation zu einem Funktionsverlust. Betrifft dieser beide Allele spricht man vom sog. „*loss of heterozygosity*“ (LOH), der bei Kopf-Hals-Karzinomen überwiegend auf den Chromosomen 3p, 5q, 8p, 9p, 9q, 11p und 17q beschrieben und mit der Kanzerogenese und der Progression von Malignomen in Verbindung gebracht wurde. Drei der genannten Regionen beinhalten Tumorsuppressorgene wie das p53 (17q), p16 (9p) und VHL (3p) [Luch, 2001; Hardisson, 2003]. Weitere bekannte Tumorsuppressorgene sind das BRCA-1 und BRCA-2 Gen sowie das Retinoblastom-Gen [Luch, 2001]. Die Auswirkungen der unterschiedlichen genetischen und epigenetischen Veränderungen führen in der Summe der Ereignisse zu 6 Schlüsselkennzeichen des malignen Tumorwachstums, zu den sog. „*hallmarks of cancer*“: Infiltration und Metastasierung, Angiogenese, Umgehung der Apoptose,

Immunescape, Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen und eine wachstumsunabhängige Proliferation [Hanahan, 2000].

Charakteristisch für die Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt ist die sog. „*field cancerization*“. Dieser Begriff wurde erstmals 1953 von Slaughter et al. eingeführt. Er beschreibt die Existenz von multiplen prämaligen Feldern mit genetisch veränderten Zellen in der Schleimhaut, die bei histologischen Untersuchungen entdeckt wurden und das Karzinomgewebe umgeben [Slaughter et al., 1953; Califano et al., 1996]. Diese Felder sind meist makroskopisch unsichtbar. Sie sind monoklonalen Ursprungs und breiten sich nicht-invasiv im Epithelgewebe aus. Dabei können sie einen Durchmesser von über 7 cm erreichen. Eine klonale Selektion innerhalb der Felder führt letztendlich zur weiteren malignen Entartung und zur Entstehung von Zweitkarzinomen. Für die Entstehung von Zweitkarzinomen sind somit 3 Modelle in Erwägung zu ziehen. Neben echten Sekundärtumoren und den Rezidiven sind die sekundären Felddumoren als eigene Entität aufzufassen [Braakhuis et al., 2005]. Weitere Organsysteme in denen die „*field cancerization*“ beschrieben wurde sind Lunge, Ösophagus, Brust, Cervix, Vulva, Haut, Colon, und Blase [Braakhuis et al., 2003].

1.3 Risikofaktoren der Krebsentstehung

1.3.1 Endogene Risikofaktoren

Da Karzinogene unterschiedliche Auswirkungen auf die jeweils exponierten Personen haben, geht man heute davon aus, dass eine genetische Prädisposition die sog. individuelle Suszeptibilität eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung spielt. Das Risiko an Krebs zu erkranken wird demnach nicht nur durch die Höhe und Dauer der krebserregenden Fremdstoffexposition beeinflusst, sondern wird ebenfalls in erheblichem Maße durch individuelle, endogene Faktoren moduliert [Maier und Tisch, 1999].

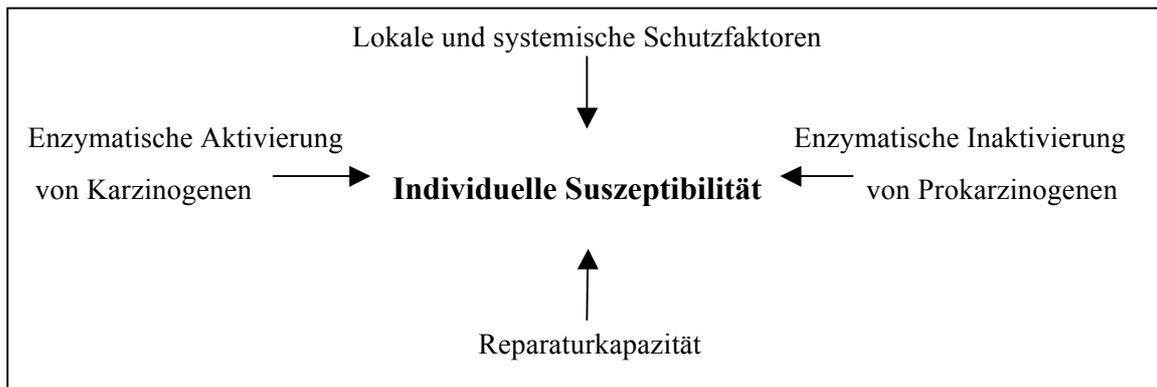


Abb. 2: Modulation der individuellen Suszeptibilität nach [Maier und Tisch, 1999]

Einer dieser Faktoren ist die Mutagensensitivität. Sie beschreibt die individuelle Empfindlichkeit der Organismen gegenüber DNA-schädigender Substanzen [Cloos et al., 1996]. Wang et al. konnte in diesem Zusammenhang eine erhöhte Mutagensensitivität als endogenen Risikofaktor für die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich nachweisen, nachdem mit BPDE an Lymphozyten DNA-Schäden induziert wurden und dabei erhöhte Strangbruchraten bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom im Vergleich zu gesunden Probanden verifiziert werden konnten [Wang et al., 1998].

Ein weiterer Faktor ist die individuell unterschiedliche, genetisch determinierte Aktivität von Enzymen, die Prokarzinogene aktivieren (Phase-1-Enzyme) und/oder Karzinogene abbauen (Phase-2-Enzyme). Zu den Enzym polymorphismen, die bei der Karzinomentstehung maßgeblich beteiligt sind, zählen u.a. das Cytochrom-P-450-System, die Gluthation-S-Transferase und die Alkohol-Dehydrogenase-3 [Jefferies et al., 2001; Coutelle et al., 1997]. Es erscheint ebenso wahrscheinlich, dass eine eingeschränkte Reparaturkapazität das Risiko an Krebs zu erkranken, erhöht. Hierzu existieren zahlreiche Studien, in denen eine angeboren reduzierte Reparaturkapazität als Risikofaktor für Kopf-Hals-Karzinome beschrieben wurde [Schantz et al., 1997; Cheng et al., 1998]. Harréus et al. konnte in Versuchen eine signifikant reduzierte Reparaturkapazität bei Mukosazellen von Oropharynxkarzinompatienten im Vergleich zur Kontrollgruppe als endogenen Risikomarker nachweisen, wobei dies bei der Untersuchung von Lymphozyten hingegen nicht nachweisbar war [Harréus et al., 2004]. Polymorphismen im Reparaturgen XRCC1 konnten ebenfalls im Rahmen einer Fall-Kontrollstudie als Risikofaktor für eine Malignomentstehung identifiziert werden [Sturgis et al., 1999].

1.3.2 Exogene Risikofaktoren

Es gilt heute als unbestritten, dass Rauchen, Kautabak und der Genuss von Alkohol zu den Hauptrisikofaktoren der Tumorbildung im Oropharynxbereich zählen. Die Kombination von Tabak und Alkoholkonsum führt dabei zu einer synergistischen, überadditiven Risikoerhöhung [Maier et al., 1990]. Von etwa 2500 verschiedenen Stoffen, die im Tabak enthalten sind werden ca. 300 als kanzerogen eingestuft. Die wichtigsten Kanzerogene sind dabei die tabakspezifischen Nitrosamine, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH's), das α -Teilchen emittierende Isotop ^{210}Po (Polonium), Kohlenmonoxid, Phenole, Spurenelemente und Hydrogencyanid.

Neben dem Rauchen von Pfeifen, Zigarren und Zigaretten gilt auch der Genuss von Kautabak als krebserregend. In Indien und in Teilen Südostasiens ist es vor allem der Gebrauch von Betelkautabak, bestehend aus Arecanuss und Tabak der mit einer erhöhten Inzidenz von Oropharynxkarzinomen einhergeht [IARC, 1985; IARC, 1986, zitiert nach Das und Nagpal, 2002]. Metabolite des Alkohols wie das Acetaldehyd wurden als mutagene und kanzerogene Tumorpromoter entdeckt und beschrieben. Die Eigenschaft des Ethanol als Lösungsmittel verstärkt hierbei zusätzlich die Penetration kanzerogener Substanzen ins Gewebe [Harty et al., 1997].

Einige Studien weisen auch auf eine virale Beteiligung an der Karzinomentstehung hin. Eine Infektion mit humanen Papilloma-Viren (HPV) 16 und 18 führt zu einer Codierung vom Onkoprotein E6, welches an das Tumorsuppressorgen p53 bindet und dieses dadurch inaktiviert. Darüber hinaus konnte die Anwesenheit von Epstein-Barr-Viren (EBV) bei 50% der Plattenepithelkarzinome und in 5% von oralen Läsionen detektiert werden [Das und Nagpal, 2002]. Eine mangelnde Mundhygiene und eine falsche bzw. unzureichende Ernährung mit konsekutivem Vitamin- und Eisenmangel ergeben weitere Risikofaktoren [Mehrotra et al., 2006]. Auch eine berufliche Schadstoffexposition mit Asbestfeinstaub, Glasfaserstaub, Farben, Lacken und Lösungsmitteln gehen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit dieser Tumorerkrankungen einher [Maier et al., 1999].

1.4 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Bei Benz(a)pyren 7,8-diol,-9,10-epoxid (BPDE) handelt es sich um einen aus 5 Benzolringen aufgebauten polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff (PAH). Diese Kohlenwasserstoffe sind als Umweltschadstoffe und Risikofaktoren für die Karzinomentstehung bei Mensch und Tier allgemein anerkannt. Sie kommen in der Luft an Staub- und Rußpartikeln gebunden vor und werden vorwiegend inhalativ bzw. ingestiv in den Körper aufgenommen. Das Benz(a)pyren gilt dabei als Leitsubstanz der PAHs und wird von der International Agency for Research of Cancer jüngst als humanes Kanzerogen der Gruppe 1 eingestuft [IARC Monograph Vol.92, 2007]. Benz(a)pyrene sind in der Umwelt weit verbreitet, sie treten unter anderem bei der unvollständigen Verbrennung von organischem Material, im Tabakrauch, beim Grillen mit Holzkohle, in der Steinkohle-, Eisen-, Stahl-, Teerindustrie, in Auto- und Industrieabgasen sowie in Spuren in Nahrungsmitteln und im Boden auf [Kazerouni et al., 2001; Smith et al., 2000; Maier et al., 1994]. Erst eine metabolische Aktivierung der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe mittels Cytochrom P 450-abhängigen Polyoxygenasen führt zur Bildung karzinogener Metabolite. Von besonderem Interesse ist dabei die Generierung von hochreaktiven Dihydrodiolepoxidderivaten wie dem BPDE [Gelboin et al., 1980]. Durch kovalente Bindung der elektrophilen Epoxide an die DNA kommt es zur Bildung von Addukten. Die Bindung erfolgt dabei vorwiegend an die exozyklische Aminogruppe des Desoxyguanosins [Bi et al., 2005]. Die strukturellen Veränderungen der DNA können eine Induktion von DNA-Strangbrüchen auslösen oder Mutationen und Gendelektionen während der DNA-Replikation zur Folge haben. Eine mögliche Reparatur derartiger Schäden erfolgt durch die Nukleotid- oder Basenexzisionsreparaturmechanismen. Bei fortbestehender Mutation kann es zu einer Aktivierung eines Onkogens beziehungsweise Inaktivierung eines Tumorsuppressorgens kommen [Liang et al., 2003; Tang et al., 1992]. Inzwischen existiert eine Vielzahl an Studien über die schädigende Wirkung der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe. Eine karzinogene Eigenschaft dieser Stoffe konnte schon vor Jahrzehnten tierexperimentell nachgewiesen werden. Hammond et al. berichtet 1974 über ein signifikant erhöhtes Mortalitätsrisiko an Mundhöhlen-, Rachen-, Speiseröhren- und Kehlkopfkarcinomen bei jahrelang teerexponierten Arbeitern [Hammond et al., 1974; Maier et al., 1999]. In einer Arbeit von Wei et al. konnte eine erhöhte

Strangbruchrate an Lymphozytenkulturen von Lungenkarzinomerkrankten nach Schädigung mit BPDE gezeigt werden [Wei et al., 1996].

1.5 Cyclooxygenase (COX)

Die Cyclooxygenase oder auch Prostaglandin-H-Synthase genannt, ist ein membrangebundenes bifunktionales Enzym, das eine Cyclooxygenase- und eine Peroxidase-Aktivität besitzt [Lin et al., 2002].

In den Zellen werden verschiedene Isoformen der Cyclooxygenase exprimiert. Die COX-1 ist dabei in den meisten Geweben konstitutiv vorhanden, während die Stimulation der COX-2-Expression erst durch entzündliche Geschehen induziert werden muss. Die COX-1 wurde 1971 von Vane et al. entdeckt, das Vorhandensein einer zweiten Isoform, der COX-2 wurde hingegen erstmalig in den 90er Jahren beschrieben [Marnett et al., 1999]. Beide Isoformen bestehen aus membrangebundenen Haemoproteinen, die primär nach ihrer Synthese und dem Transport im Endoplasmatischen Retikulum zu finden sind [Spencer et al., 1998].

Der Cyclooxygenase-Metabolismus beginnt mit der Gewinnung freier Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden, durch die hydrolytisch aktive Phospholipase A₂. Anschließend wird mittels Cyclooxygenase in zwei Schritten Prostaglandin G₂ und daraus wiederum Prostaglandin H₂ synthetisiert. Das Prostaglandin H₂ wird über weitere spezifische Synthesen in Prostaglandine, Prostazykline und Thromboxane (Prostaglandin E₂, D₂, I₂, F_{2α} und TxA₂) umgewandelt. Die verschiedenen Typen und die Anzahl der hergestellten Prostaglandine und Thromboxane variieren je nach Zelltyp vor allem durch die hier vorherrschenden unterschiedlichen endständigen Synthesen [Lin et al., 2002]. Die Metabolite haben eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Effekten. Sie sind in einer Reihe von Homöostase- und Krankheitsprozessen (Inflammation bis hin zu Karzinomen) involviert [DuBois et al., 1998].

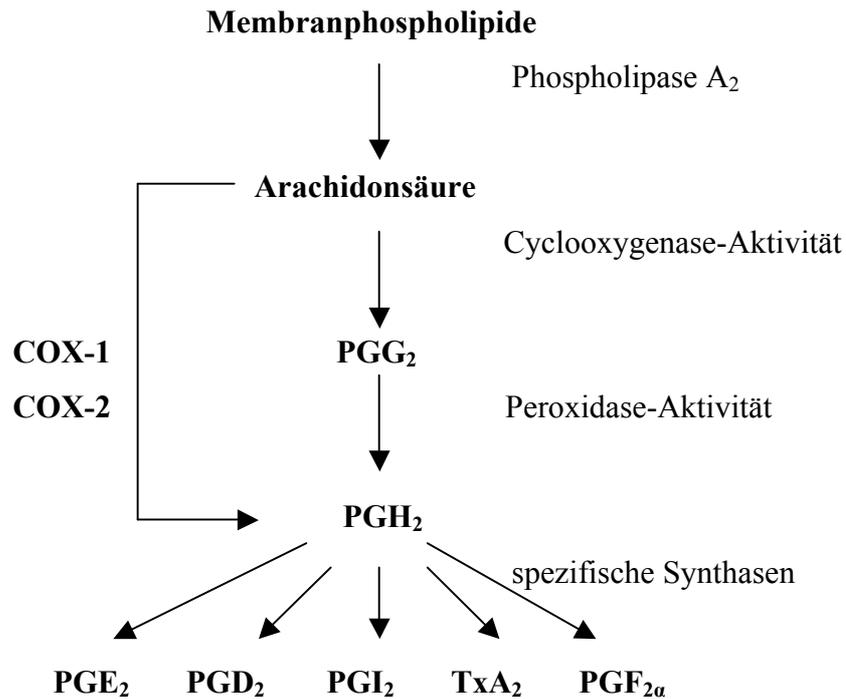


Abb. 3: Schema zur Arachidonsäurekaskade nach [Lin et al., 2002]

1.6 COX-1, COX-2

Die COX-1 spielt eine wesentliche Rolle bei physiologischen Vorgängen im Körper. Sie wird praktisch in allen Geweben konstitutiv exprimiert und als sog. „housekeeping enzyme“ bezeichnet [DuBois et al., 1998]. Große Mengen an COX-1 kommen in Endothelzellen, Thrombozyten und Tubuluszellen der Niere vor. Die zweite Isoform, die COX-2 (sog. „response enzyme“) wird unter entzündlichen und neoplastischen Umständen gebildet. Ihre Expression kann in den meisten Geweben durch Wachstumsfaktoren, Zytokine, Onkogene und unter anderem auch durch Tabakkarzinogene induziert werden. Ausnahmen bilden dabei die Nieren und das Gehirn, in denen die COX-2 stets vorhanden ist [Mitchell et al., 1999]. Beide Isoenzyme üben die gleiche katalytische Aktivität auf dieselben Substrate aus und weisen ca. 60% Homologien auf. Sie gleichen sich in ihrer Länge und ihrem Gewicht von 70kDa, unterscheiden sich jedoch in ihrer Regulation, Verteilung und Expression [Kismet et al., 2004]. Die Gene der zwei Enzyme liegen auf verschiedenen Chromosomen, COX-1 auf Chromosom 9 und COX-2 auf Chromosom 1 [Kam and See, 2000]. Studien über die Tertiärstruktur der COX-1 und 2 ergaben beinahe identische

Aminosäuresequenzen der Substratbindungsstellen und der katalytischen Regionen. Dennoch stellten sich entscheidende Unterschiede in dieser Region heraus. Durch den Austausch des Isoleucins in der Position 434 und 523 gegen Valin resultiert ein größerer und flexiblerer Substratbindungskanal der COX-2 gegenüber der COX-1 und eine um 25 % größere Inhibitor-bindende Domäne [Picot et al., 1994; Kurumbail et al., 1996].

Eine Beteiligung des COX-2-Enzyms an einigen pathologischen Prozessen wie der Karzinogenese ist nach heutigem Wissensstand anzunehmen. In einer Studie von Chan et al. konnte eine erhöhte Expression der COX-2 in HNO-Karzinomen belegt werden. Dabei wird COX-2 eine neoangiogenetische und das Tumorwachstum fördernde Wirkung zugeschrieben [Chan et al., 1999; Lang and Issing, 2003]. Eine Überexpression der COX-2 wurde auch in vielen anderen soliden Tumoren wie der Brust, Colon, Leber, Lunge, Ösophagus, Pankreas, Uterus und Cervix gefunden [Chen et al., 2005]. Renkonen et al. entdeckte nicht nur eine vermehrte COX-2-Expression in Kopf-Hals-Karzinomen, sondern konnte diese auch bereits in prämaligen Läsionen (orale Leukoplakien) nachweisen [Renkonen et al., 2002]. Eine Überexpression ist zudem mit einer schlechteren Prognose hinsichtlich des Langzeitüberlebens bei Nasopharynxkarzinomen vergesellschaftet [Chen et al., 2005].

Insgesamt tragen COX-2 Enzyme zur Karzinogenese durch Katalysierung der Mutagensynthese [Eling et al. 1990], Verminderung der Apoptose [Tsujii and DuBois, 1995], erhöhte Entzündungsreaktion und Immunsuppression [Kojima et al., 2001] sowie vermehrte Angiogeneese [Tsujii et al. 1998, Gallo et al. 2001] und ein gesteigertes Potential zum infiltrativen Wachstum und zur Metastasierung bei [Tsujii et al., 1997; Dohadwala et al., 2001].

1.7 Produkte der Cyclooxygenase und ihre Aufgaben

Die durch die Cyclooxygenase generierten Prostaglandine sind an der Regulation der vaskulären Homöostase, der Magenfunktion, Nierenfunktion, Plättchenfunktion und vieler weiterer Funktionen beteiligt. Die Produktion des Prostaglandin E₂ und I₂ übt über eine reduzierte Säureproduktion, vermehrte muköse Schleimsekretion und eine Vasodilatation in der Magenschleimhaut eine zytoprotektive Wirkung an der gastrointestinalen Schleimhaut aus. Eine Erhöhung der Bicarbonatsekretion im Duodenum trägt zusätzlich zum Schutz vor Ulzerationen in diesem Bereich bei [Miller et al., 1983]. Prostaglandine wie PGE₂ und PGI₂ sind auch in den Nieren zu finden. Sie

kontrollieren dort die Reninfreisetzung, regulieren den Gefäßtonus und die Tubulusfunktion und sind damit maßgeblich an der Steuerung der Nierenfunktion beteiligt [Kam and See, 2000]. Im ZNS tragen Prostaglandin E₂ und D₂ zur Schlaf- und Thermoregulation bei. Erhöhte Prostaglandin E₂-Konzentrationen können dabei zu erhöhten Temperaturen und Fieber führen [Hayaishi, 1991; Cao et al., 1996]. Als Vasodilatator im kardiovaskulären System gilt das Prostaglandin I₂, das von den Endothelzellen sezerniert wird. Prostaglandin E₂ und F_{2α} können hingegen vasokonstriktorisch oder vasodilatatorisch in den Gefäßwänden wirken [FitzGerald et al., 1983]. Die Prostaglandine in den weiblichen Geschlechtsorganen sind unter anderem für die Regulation der Reproduktionsfunktion zuständig. Eine Beteiligung des Prostaglandin E₂ an der regelmäßig stattfindenden Ovulation konnte in einer Studie von Davis et al. gezeigt werden [Davis et al., 1999]. Das in den Thrombozyten gebildete Thromboxan gilt als potenter pro-aggregatorisch wirkender Vasokonstriktor. Auch in der Lunge spielen Prostaglandine eine Rolle. Während PGE₂ und PGI₂ dort eine dilatierende Wirkung haben, führen PGD₂, PGF_{2α} und TXA₂ zu einer Verengung der Atemwege [Simmons et al., 2004]. Im Knochenstoffwechsel haben Prostaglandine die Aufgabe das Gleichgewicht zwischen dem Knochenauf- und abbau aufrechtzuerhalten [DuBois et al., 1998].

1.8 Inhibitoren der Cyclooxygenase

1.8.1 Geschichtlicher Hintergrund

Seit der Entdeckung der Acetylsalizylsäure (ASS) vor etwas mehr als hundert Jahren gelten das ASS sowie andere nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs) als die weltweit meist genutzten Therapeutika zur Behandlung von Schmerz, Entzündung und Fieber. Heute werden die NSAIDs auch in Studien zum Nachweis einer möglichen Wirksamkeit im Bereich der Krebsprävention, bei Morbus Alzheimer und bei kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt [Kismet, 2004].

Inzwischen existiert eine Vielzahl von NSAIDs. Aufgrund zahlreicher Nebenwirkungen, bedingt durch ihre unselektive Hemmung von COX-1 sowie COX-2, wurde verstärkt nach selektiven, nebenwirkungsärmeren Wirkstoffen geforscht.

1.8.2 Mechanismus der Cyclooxygenase-Inhibition

Die Cyclooxygenase wird durch die Einnahme nicht-steroidaler Antirheumatika (NSAID) inhibiert. Diese lassen sich in nicht selektive und COX-2 selektive Antirheumatika einteilen. Die Hemmung wird dabei durch die Bindung der NSAIDs an die Cyclooxygenase-aktiven Seite des COX-Enzyms bewirkt. Das Andocken des eigentlichen Substrats, nämlich der Arachidonsäure an das Enzym wird dadurch verhindert. Ein allgemein gültiges Modell der Cyclooxygenase-Inhibition von Kurumbail et al. stellt die verschiedenen Gleichgewichtsreaktionen zwischen freien Enzymen und Inhibitoren und zwei oder drei Inhibitor-Enzym-Komplexen dar, welche in der nachfolgenden Abbildung dargestellt sind [Kurumbail et al., 2001].

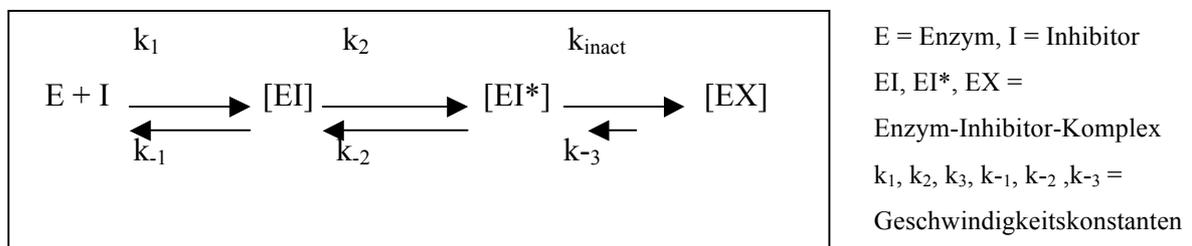


Abb. 4: Schema der Cyclooxygenase-Inhibition [Kurumbail et al., 2001]

Die Enzymaktivität der selektiven Cyclooxygenase-2-Inhibitoren ist durch einen sogenannten kinetischen 3-Schritt Mechanismus charakterisiert. Zunächst findet eine sekundenschnelle reversible und kompetitive Bindung beider Isoformen, COX-1 sowie COX-2 statt. Verantwortlich für die Selektivität des COX-2-Inhibitors ist jedoch ein nachfolgender langsamer Schritt, bei dem eine zeitabhängige Bindung des COX-2-Enzyms an den Inhibitor erfolgt. Dieser Vorgang benötigt mehrere Minuten und führt zu einer nonkompetitiven, dichten Enzym-Inhibitor-Komplexbildung. Die COX-2-Hemmer bewirken dabei keine kovalente Modifikation des Enzyms. Die Halbwertszeit der Dissoziation des Inhibitors vom dicht gebundenen Enzym-Inhibitor-Komplex benötigt jedoch mehrere Stunden, was für eine eher langsame Dissoziationsrate spricht [Isakson, 2003].

1.8.3 Celebrex®: Selektiver COX-2-Inhibitor

1998 wurde Celebrex® (Wirkstoff Celecoxib) als eines der ersten selektiv wirksamen Cyclooxygenase-2-Inhibitoren zugelassen und kam erstmals 1999 in den USA zum klinischen Einsatz. Es fand primär Anwendung in der Therapie von Schmerzen und Entzündungen bei rheumatoider Arthritis und Osteoarthritis, vor kurzem wurde es auch zur Behandlung von Dysmenorrhoe und akuten Schmerzen zugelassen. Durch seine Selektivität konnte eine deutliche Reduktion der bekannten unerwünschten Nebenwirkungen von NSAIDs wie z.B: im Bereich des oberen Gastrointestinaltraktes erreicht werden [DeWitt, 1999; Isakson, 2003].

Der COX-2-Inhibitor Celebrex® ist ein neutraler und stark lipophiler Stoff, mit einer begrenzten Löslichkeit in wässrigen Medien. Nach oraler Applikation wird die maximale Plasmakonzentration nach zwei bis maximal vier Stunden erreicht. Im Plasma liegt der COX-2-Inhibitor in hohem Maße an Albumin gebunden vor. Celebrex® unterliegt anschließend einer ausgiebigen Metabolisation in der Leber. Die oxidative Biotransformation verläuft dabei über das dortige Cytochrom P450 (CYP) 2C9 Isoenzym. Durch die Metabolisierung entstehen Hydroxyl-, Carboxylsäure, und Glucuronidderivate, welche nun über Urin und Fäces ausgeschieden werden können. Lediglich 2% des Medikamentes werden dabei unverändert ausgeschieden [Davies et al., 2000].

NSAIDs und selektive Cyclooxygenase-2-Inhibitoren wie das Celebrex® konnten in umfassenden präklinischen Modellen einen karzinom-präventiven Effekt demonstrieren und wurden im Rahmen klinischer Studien bei Patienten mit Familiärer Adenomatöser Polyposis (FAP) zur Prävention von Kolonkarzinomen erfolgversprechend eingesetzt [Hawk et al., 2003]. Auch eine mögliche synergistische Wirkung bei der Kombination von Coxiben (COX-2-selektive Inhibitoren) mit der konventionellen Krebstherapie (Chemo-, Radiotherapie) und mit neueren Therapieansätzen wie der Hormontherapie und den Inhibitoren von Wachstumsfaktoren konnte in Studien aufgezeigt werden. Dabei weisen Coxibe einige wichtige Vorteile, wie die orale Einnahmemöglichkeit, geringere Nebenwirkungen und das Vorhandensein weniger medizinischer Kontraindikationen auf. Eine Coxib-basierte Kombinationstherapie potenziert hier möglicherweise die Anti-Tumor-Wirkung, wirkt fiebersenkend und schmerzlindernd und reduziert gleichzeitig typische Nebenwirkungen der Chemotherapie bzw. der konventionellen Krebstherapie [Gasparini et al., 2003].

1.9 CyclinD1 (CCND1)

1.9.1 Stellenwert in der Kopf-Hals-Karzinogenese

Kopf-Hals-Karzinome gehören zu einer heterogenen Gruppe von Tumoren, die mit einer hohen Rate an Rezidiven, Zweitkarzinomen und hoher Morbidität vergesellschaftet sind. Trotz der medizinischen Fortschritte und Strategieänderungen in der Therapie in den letzten 20 Jahren, ließ sich die durchschnittliche 5-Jahres-Überlebensrate von ca. 55% nicht signifikant verbessern. Durch die meist späte Entdeckung dieser Tumoren sinkt die 5-Jahres-Überlebensrate bei fortgeschrittenen Tumorstadien sogar unter 10%. Das Fehlen aussagekräftiger und prognostischer Biomarker trägt möglicherweise zu den schlechten Ergebnissen bei [Sathyan et al., 2008; Reuter et al., 2007].

Aus diesem Grund rückt die Suche nach neuen therapeutischen Angriffspunkten immer mehr in den Mittelpunkt aktueller Forschungen. In diesem Zusammenhang ist das CyclinD1 zu nennen, welches zur Gruppe der Protoonkogene gehört. CyclinD1 ist ein wesentlicher Regulator des Zellzyklus in der G1-Phase. Es initiiert den Übertritt der Zelle von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus. Dadurch nimmt es einen entscheidenden Einfluss auf die Zellteilung und das Zellwachstum. Abnorme Veränderungen im CyclinD1 können zu einem Verlust der Zellzykluskontrolle und zu einem unkontrollierten Zellwachstum führen, welches auf die Tumorgenese unterstützend wirkt [Coqueret, 2002]. Eine Genamplifikation und Überexpression des CyclinD1 konnte wiederholt bei Karzinomen verschiedenen histologischen Ursprungs beobachtet werden [Sathyan et al., 2008]. Dazu zählen auch die Kopf-Hals-Karzinome, bei denen in 39-64% eine Überexpression des Onkoproteins nachgewiesen werden konnte [Hardisson, 2003]. Desweiteren korrelieren Amplifikation und Überexpression signifikant mit der Tumorinvasivität, den regionalen Lymphknotenmetastasen und dem Tumorstadiums bei Kopf-Hals-Karzinomen. Aberrationen im CyclinD1-Gen gelten ebenfalls als prognostische Marker hinsichtlich des Langzeitüberlebens und der Dauer der Rezidivfreiheit [Thomas et al., 2005].

Interaktionen zwischen den Onkogenen CyclinD1 und EGFR und der COX-2 wurden von Sudbo et al. beschrieben. Dabei konnte in prämaligen Läsionen gezeigt werden, dass die Aktivierung von EGFR zu einer gesteigerten Produktion der COX-2 und einer konsekutiv erhöhten Prostaglandinmenge geführt hat, die wiederum eine weitere Stimulation des EGFR bewirkt hat. Gleichzeitig kam es durch die EGFR Aktivierung zu

einer erhöhten CyclinD1-Expression und damit auch zu einer vermehrten Zellzyklusprogression. Alle drei genannten Genprodukte liegen in vielen Tumorgeweben überexprimiert vor und sind hochwahrscheinlich an der Entstehung von Karzinomen beteiligt [Sudbo, 2004].

1.9.2 Aufbau

Das CyclinD1 gehört zu der Familie der Zyklone (CyclinA, B1, B2, D1-3 und E). Es wird vom CyclinD1/ PRAD-1 Gen codiert, das auf dem langen Arm des Chromosoms 11 lokalisiert ist (Chr.11q13). Das Gen besteht aus 15 kb und 5 Exons [Coqueret, 2002]. Zyklone, wie das CyclinD1 sind sogenannte regulatorische Proteine des Zellzyklus, die phasenspezifisch hochreguliert werden und durch Bindung an inaktive zyklinabhängige Proteinkinasen (CDK) zu deren Aktivierung führen. Die Aktivität der Proteinkinasen wird wiederum durch Inhibitoren (z.B. p16, p21, p27) reguliert [Böcker et al., 2004].

1.9.3 Aktivierung und Funktionen

Durch die Bindung des CyclinD1 an seine Kinasepartner, die Zyklin-abhängige Kinase 4 und 6 (CDK 4/6) entsteht ein aktiver Komplex, der zusammen mit dem CyclinE/CDK2-Komplex das Retinoblastomprotein, ein Tumorsuppressorprotein mehrmals phosphoryliert und damit inaktiviert. Durch die Hyperphosphorylierung wird die hemmende Funktion des Retinoblastomproteins auf den E2F Transkriptionsfaktor aufgehoben. Dieser kann nun die Transkription mehrerer Gene, die für den Übertritt der G1 in die S-Phase und die nachfolgende DNA-Replikation benötigt werden, induzieren. [Fu et al, 2004; Tashiro et al., 2007]. Die Expression des CyclinD1 wird weitgehend über extrazelluläre Signale und Signalkaskaden reguliert. Dafür kommen unter anderem Wachstumsfaktoren wie das EGF, IGF1, IGF2 sowie die Retinoidsäure, Aminosäuren, (PPAR) γ ligand und Hormone wie das Androgen in Betracht. Insgesamt fungiert das CyclinD1 als Vermittler zwischen der Zellteilungsstimulation von außen und dem komplexen Zellzyklus im Inneren der Zelle. Eine Übersicht über weitere Funktionen des CyclinD1 sind auf der folgenden Abbildung zu sehen [Fu et al., 2004].

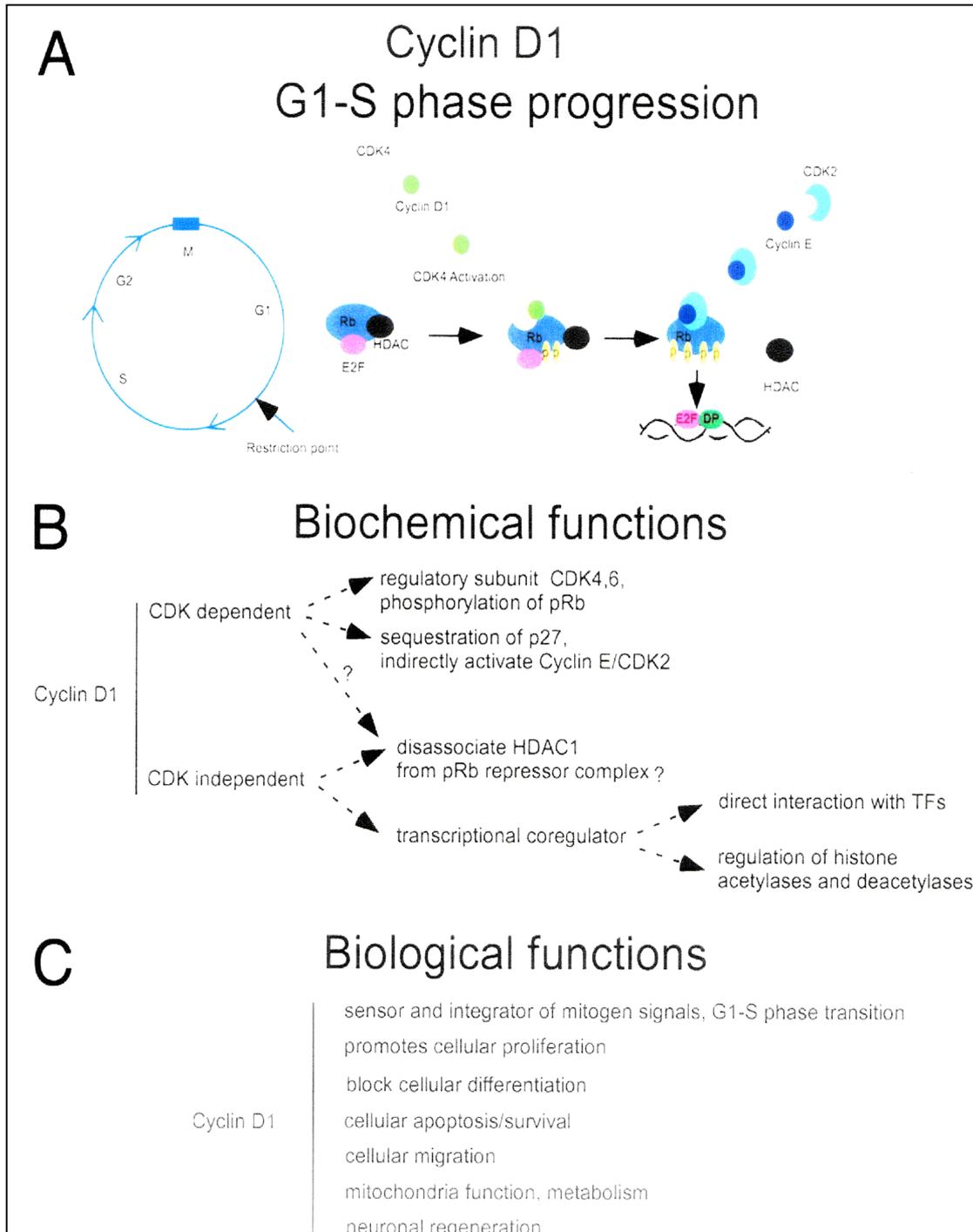


Abb. 5: Zusammenfassung der CyclinD1-Funktionen [Fu et al., 2004]

1.10 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Anhaltend hohe Fallzahlen maligner Tumore im Kopf-Halsbereich lösen die Suche nach neuen therapeutischen Angriffspunkten und chemopräventiv wirkenden Substanzen aus. Dabei rückt das Interesse in den Vordergrund, spezifische Gene zu untersuchen, um möglicherweise mehr Informationen in Bezug auf endogene Risikomarker für die Entwicklung von Kopf-Hals-Karzinomen zu erhalten.

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen an makroskopisch gesunder Schleimhaut von Spendern mit und Spendern ohne Oropharynxkarzinomen vorgenommen und die Ergebnisse beider Gruppen miteinander verglichen. Nach Schädigung der DNA durch Benz(a)pyren 7,8-diol,-9,10-epoxid (BPDE) wurde mittels Comet-FISH, einer Kombination aus dem Comet-Assay und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung, die Schädigung der Gesamt-DNA und die individuelle Mutagensensitivität im CyclinD1-Gen ermittelt. Zusätzlich wurde durch den Einsatz von Celebrex[®] eine mögliche genoprotektive Wirkung im CyclinD1-Gen sowie in der Gesamt-DNA untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientengut und Gewebeproben

Das Patientengut in der hier vorliegenden Arbeit umfasste 30 Patienten, wobei zwischen einer Gruppe mit und einer Gruppe ohne Oropharynxkarzinom mit jeweils 15 Patienten unterschieden wurde. Das durchschnittliche Alter der Tumorgruppe betrug 58,6 Jahre (46 bis 79 Jahre) mit 4 weiblichen und 11 männlichen Patienten, das der tumorfreien Gruppe 46,4 Jahre (29 bis 62 Jahre) mit 6 weiblichen und 9 männlichen Patienten (weitere Angaben siehe Anamnese im Anhang).

Alle Spender waren Patienten aus der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität und wurden vor dem Eingriff über die wissenschaftliche Verwendung ihrer Gewebeproben schriftlich und mündlich aufgeklärt. Bei den Proben handelte es sich um Oropharynxschleimhaut des oberen Aerodigestivtrakts. Die Schleimhaut der tumorfreien Spender wurde im Rahmen von Uvulopalatopharyngoplastiken und Tonsillektomien bei chronischer Tonsillitis bzw. Hyperplasie der Gaumenmandel vom Gaumenbogen entnommen. Die Schleimhautproben der Karzinompatienten wurden während des operativen Eingriffs zur Entfernung des Tumorgewebes aus der nahe gelegenen gesunden Schleimhaut gewonnen. Die Präparate wurden anschließend in sterile physiologische Kochsalzlösung gegeben und mit einer Verzögerung von maximal fünf Stunden ins Labor transportiert, um dort zeitnah weiter verarbeitet zu werden.

Die durchgeführten Untersuchungen wurden gemäß des Ethikkommissionsantrags (221/04/Rs) durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität geprüft und genehmigt.

2.2 Methoden

2.2.1 Präparieren und Anlegen der Schleimhautproben

Die oropharyngeale Schleimhaut wurde unter sterilen Bedingungen zu Miniorgankulturen weiterverarbeitet. Dazu wurde das Präparat von unbrauchbarem Material wie Blutgefäßen, Drüsengewebe und nekrotischen Arealen befreit. Anschließend wurde die Mukosa mit möglichst glatten Schnittträgern in kleine Stücke von ca. 1mm Kantenlänge geteilt. Nach dreimaligem Waschen in *Phosphate Buffered Saline* (PBS) konnten sie auf eine 24-Well-Platte aufgebracht werden, die zuvor mit einem Gemisch aus 1,5% Agar Noble, DMEM, fötalem Kälberserum (FCS), nicht essentiellen Aminosäuren, Amphotericin B, Penicillin und Streptomycin beschichtet worden war. In jedem der 24 Wells befanden sich ein bis zwei der präparierten Mukosastückchen.

Als Kulturmedium wurde pro Well 250µl *Bronchial Epithelial Growth Medium* (BEGM, Nährmedium) verwendet. Die Schleimhautfragmente schwammen somit im Nährmedium und hafteten nicht an den Rändern der Wells an.

2.2.2 Kultivierungsphase

Die nachfolgende Kultivierung fand im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit statt. Nach jeweils 48 Stunden wurde das verbrauchte Nährmedium aus jedem Well abgesaugt und durch frisches BEGM ersetzt. Zusätzlich wurden einmal wöchentlich die 24-Well-Platten erneuert, da die in der Beschichtung gelösten Nährstoffe ebenfalls aufgebraucht waren. Die Kultivierungsdauer der Mukosastückchen zu Miniorgankulturen betrug ca. zwei bis vier Wochen.

Während der gesamten Kultivierungsphase wurden die Vitalitäten und die Epithelialisierungsfortschritte der Kulturen mit Hilfe eines inversen Mikroskops kontrolliert. Eine Besiedelung der Kulturen durch Mikroorganismen (Bakterien, Pilze) konnte durch das regelmäßige Mikroskopieren ebenfalls ausgeschlossen werden. Die fertigen Miniorgankulturen zeichneten sich durch eine vollständige Epithelialisierung ihrer Oberfläche aus.

2.2.3 Miniorgankulturen

Die Miniorgankulturen stellen ein mittlerweile etabliertes Modell zur Untersuchung verschiedenster genotoxischer aber auch genoprotektiver Xenobiotika *in vitro* dar. Als Erstbeschreiber berichtete Steinsvåg et al. 1991 über die Herstellung dieser Organkulturen aus adenoidem Gewebe. Nach einer Kultivierungsdauer von 40 Tagen konnte eine Reepithelialisierung der Oberfläche sowie eine Zilientätigkeit beobachtet werden [Steinsvåg et al., 1991]. Ein etwas modifiziertes Modell stellten die dreidimensionalen Miniorgankulturen humaner nasaler Schleimhaut von Kleinsasser et al. dar. An diesen konnte gezeigt werden, dass sowohl eine einmalige als auch repetitive Inkubation mit Xenobiotika möglich ist, ohne die Struktur der exponierten Mukosa zu zerstören [Kleinsasser et al., 2004]. In ihrem epithelialen Verband verfügen die Miniorgankulturen außerdem über metabolische Kompetenzen und können eine Vielzahl von Zell-Zell-Interaktionen vorweisen. Sie stellen somit ein geeignetes Modell zur Nachahmung von *in-vivo* Situationen dar [Wallner et al., 2005].

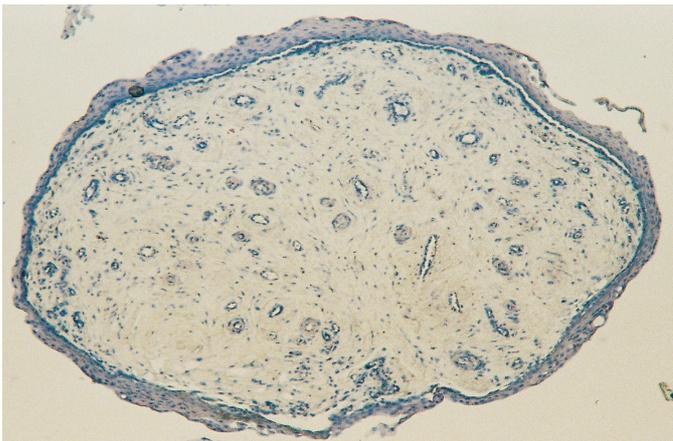


Abb. 6: Miniorgankultur, histologischer Schnitt in HE-Färbung nach 21 Tagen Kultivierung (5-fache Vergrößerung)

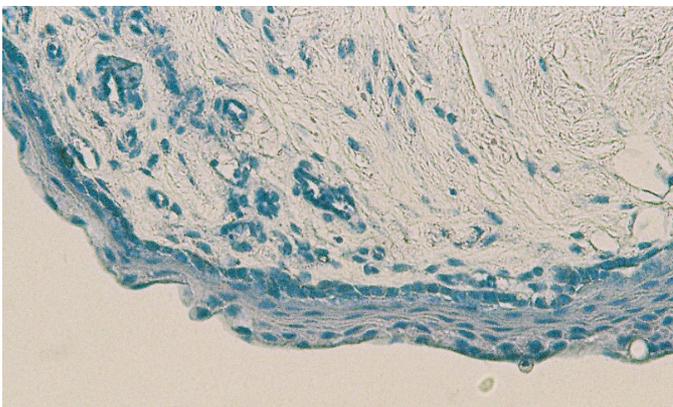


Abb. 7: Miniorgankultur, histologischer Schnitt in HE-Färbung nach 21 Tagen Kultivierung (40-fache Vergrößerung)

2.2.4 Fremdstoffexposition

Nach Beendigung des Kultivierungsprozesses der Miniorgankulturen konnte mit der Medikamenteninkubation und der anschließenden DNA-Schädigung begonnen werden. Alle Versuche wurden mit dem Präparat Celebrex[®] durchgeführt. Die DNA-Schädigung wurde mittels Benz[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE), einem aktiven Metaboliten des Benz[a]pyrens induziert. Um eine nachfolgende Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erzielen, unterlagen beide Gruppen (Karzinompatienten vs. tumorfreie Patienten) des Patientenkollektivs dem gleichen Behandlungsschema. Bei Beginn der Medikamenteninkubation wurden jeweils 25µl des Medikaments Celebrex[®] für 30 Minuten auf die 24-Well-Platte gebracht. Die hierbei verwendete Endkonzentration des Medikaments von 0,1µg/ml wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe und dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) hergestellt. Die Inkubation fand währenddessen im Brutschrank bei 37°C statt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Miniorgankulturen durch zweimaliges Waschen mit BEGM gereinigt. An den folgenden Inkubationstagen 2 und 3 wurde das oben genannte Behandlungsschema mit Celebrex[®] wiederholt.

Am Tag 3 wurde zusätzlich die DNA mittels BPDE geschädigt. Ein Teil der mit Celebrex[®] vorinkubierten Miniorgankulturen wurden für 60min mit 25µl BPDE versetzt. Dafür wurde eine Endkonzentration von 9µM gewählt. Um die Höhe der Ausgangsschädigung zu ermitteln, wurden einige ausschließlich mit BPDE behandelt. Die anschließende Inkubation fand in einem 37°C Schüttelwasserbad statt. Im Anschluss wurde die Substanz durch zweimaliges Waschen mit BEGM wieder entfernt. Der andere Teil der mit Celebrex[®] behandelten Miniorgankulturen diente zum Ausschluss einer genotoxischen Wirkung durch das Medikament selbst. Als Negativkontrolle wurden einige der Miniorgankulturen ausschließlich mit DMSO inkubiert.

Die eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanzen beruhten auf Dosis-Wirkungskurven, die im Rahmen von Vorversuchen und vorausgegangenen Untersuchungen im Labor für klinisch experimentelle Onkologie der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität ermittelt wurden. Mit Hilfe einer Vorversuchsreihe wurde auch über die Häufigkeit, mit der die Medikamenteninkubation stattfinden sollte, entschieden. Dafür wurde der genoprotektive Effekt von Celebrex[®] nach einmaliger und dreimaliger Vorinkubation untersucht und verglichen. Dabei

konnte eine signifikante Reduktion der genotoxischen Schädigung und ein kumulativ protektiver Effekt bei mehrmaliger Anwendung nachgewiesen werden. Die Entscheidung fiel deshalb auf eine dreimalige Vorinkubation mit Celebrex[®].

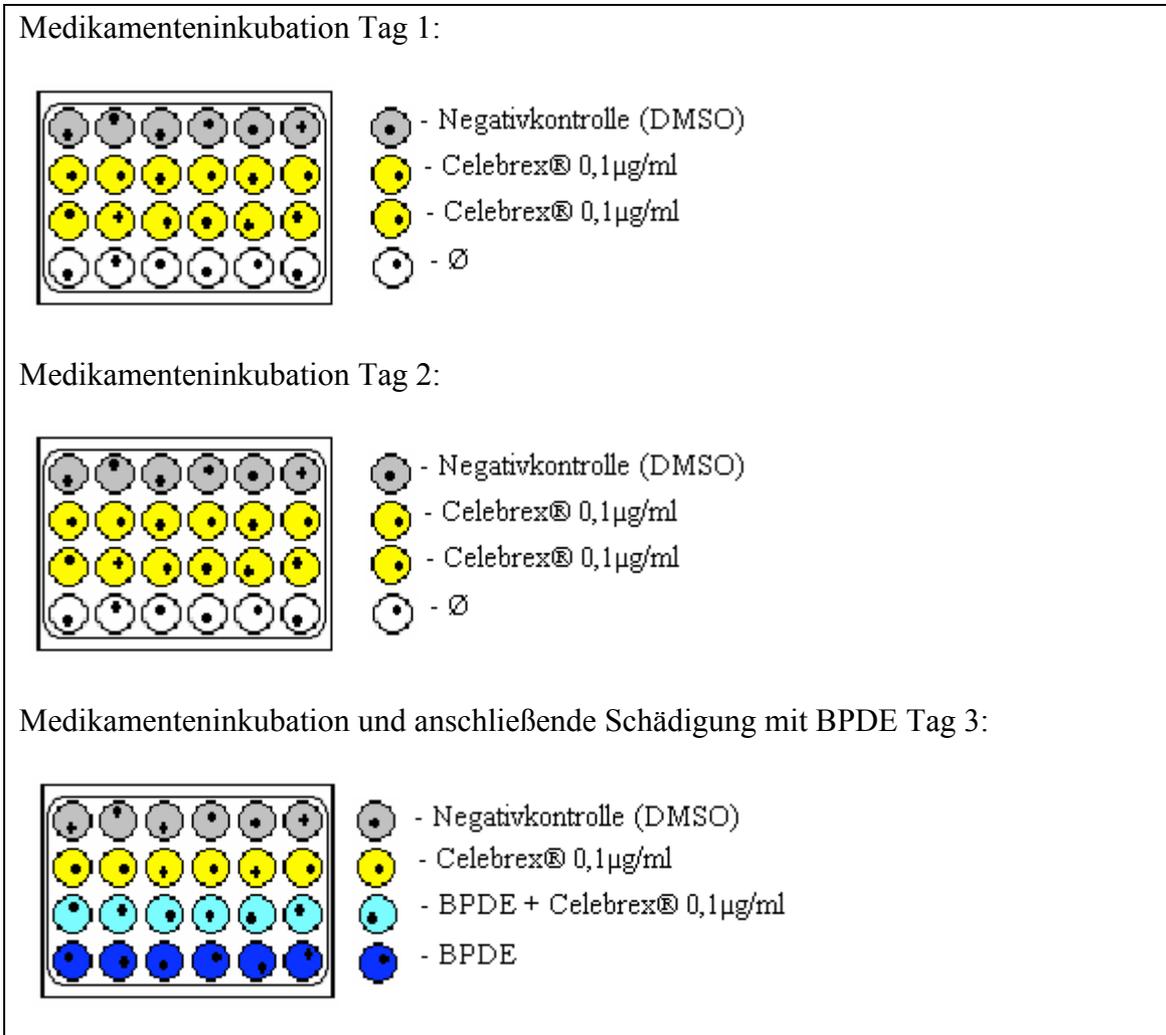


Abb. 8: Inkubationsschema der Miniorgankulturen Tag 1-3

2.2.5 Gewinnung von Einzelzellen aus dem Zellverband

Zur Einzelzellgewinnung mussten die Miniorgankulturen in ein Enzymgemisch aus 50mg Protease, 10mg Hyaluronidase und 10mg Kollagenase P gebracht werden. Die Enzyme wurden hierfür in 10ml BEGM gelöst und sterilfiltriert. Jeweils zwei bis drei Miniorgane wurden in ein Eppendorf Gefäß mit 600µl des Enzymgemischs pipettiert und 45 Minuten lang im Schüttelwasserbad bei 37°C inkubiert. Um zusätzliche DNA-Schäden durch das UV-Licht zu vermeiden, wurden nach Ablauf der Inkubationszeit alle weiteren Arbeitsschritte bis zur digitalen Auswertung unter Rotlicht durchgeführt.

Mittels Minishaker wurden die Einzelzellen vom restlichen Bindegewebe getrennt. Mit Hilfe einer sterilen Kanüle konnten nun die bindegewebigen Bestandteile aus den Eppendorf Gefäßen entfernt werden. Durch die Zugabe von jeweils 600µl des FCS, wurden die Enzyme neutralisiert. Die Gefäße wurden während des gesamten Vorgangs mittels Eiswasser von außen gekühlt.

Bei 800 U/min und 4°C wurde die Einzelzellsuspension für fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden von jedem Gefäß 1000µl des Überstands entfernt und mit 1000µl kaltem PBS aufgefüllt. Der Inhalt der Gefäße wurde durchmischt und erneut bei 800 U/min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Danach wurden die restlichen Überstände verworfen und die so gewonnenen Zellpellets der Vitalitätsbestimmung und der Mikrogelelektrophorese zugeführt.

2.2.6 Bestimmung der Vitalität

Die Vitalitätsprüfung der Zellen zum Ausschluss zytotoxischer Effekte der Fremdstoffe erfolgte mittels Trypanblau-Ausschlusstest [Phillips, 1973].

Dafür wurde von jeder Versuchsreihe ein Zellpellet mit 50µl Trypanblau versetzt. Ein Tropfen dieser Zellsuspension wurde in die Neubauer-Zählkammer gebracht und unter einem Mikroskop (400-fache Vergrößerung) begutachtet. Dabei wurde der Prozentsatz vitaler Zellen aus 4 x 4 Kleinquadraten ermittelt. Die vitalen Zellen färbten sich dabei nicht an, da sie über eine intakte Zellmembran verfügten. Avitale Zellen erschienen dagegen blau, da das Trypanblau hier durch die geschädigte Membran gelangen konnte.

2.2.7 Mikrogelelektrophorese (Comet-Assay)

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Comet-Assay handelt es sich um die alkalische Version der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese. Nach DNA-Schädigung durch genotoxische Substanzen entsteht eine DNA-Fragmentierung, die sich nach der Elektrophorese in einem „kometenartigen“ Bild mit intakter DNA im Kopf und geschädigter DNA im Schweif darstellt.

Der Comet-Assay wurde 1984 als neutrale Form der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese von Oestling und Johanson erstmals beschrieben [Oestling und Johanson, 1984]. Die modifizierte, alkalische Version dieses Verfahrens ermöglichte die Darstellung von genotoxischen Effekten in Form von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen, DNA

Crosslinks und einer inkompletten Exzisionsreparatur unter anderem an Lymphozyten und Schleimhautzellen [Singh et al., 1988; Harréus et al., 1999]. Dabei können eine Vielzahl von Substanzen auf ihre Genotoxizität geprüft werden. Diese Methode ermöglicht ebenfalls die Untersuchung von DNA-Reparaturkapazitäten und findet auch im Biomonitoring gehäuft Anwendung [Speit und Hartmann, 2006].

2.2.7.1 Präparation der Objektträger

Um eine bessere Haftung der Zellen auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden diese zuvor mit 85µl 0,5% *Normal Melting Agarose* beschichtet. Die Längsseiten der verwendeten Objektträger waren beidseits mattiert. Die Dauer der Aushärtung der Agaroseschicht betrug mindestens 48 Stunden.

Jedes Zellpellet wurde in 75µl 0,7% *Low Melting Agarose* resuspendiert und auf die vorbereiteten Objektträger gebracht. Anschließend wurden sie mit einem Deckglas versehen und zum Aushärten für 10 Minuten auf eine gekühlte Metallplatte gelegt. Nach Entfernung der Deckgläser wurde eine dritte und letzte Schicht mit 85µl 0,7% Agarose aufgetragen, die wiederum mit einem Deckglas abgedeckt wurde. Die Deckgläser konnten nach Beendigung einer erneuten 10-minütigen Aushärtungsphase auf der gekühlten Metallplatte vorsichtig entfernt werden.

2.2.7.2 Lysierung der Zell- und Kernmembran

Zur Freilegung der DNA für die nachfolgende Elektrophorese mussten die Zell- und Kernmembranen vorher aufgelöst werden. Die Objektträger wurden dafür vertikal in eine Färbekammer gestellt, die anschließend mit 100ml einer frisch hergestellten Lyselösung gefüllt wurde. Die Objektträger wurden bei 4°C mindestens eine Stunde bis maximal eine Woche in der Lyselösung belassen.

2.2.7.3 Elektrophorese

Im Anschluss wurden die Objektträger anodennah in einer Elektrophoresewanne platziert. Die Wanne war wassergekühlt und mit einem 4°C kalten Elektrophoresepuffer gefüllt. Zur 20-minütigen Entspiralisierung und Denaturierung der DNA mussten die Objektträger vollständig mit dem Puffer bedeckt werden. Im Anschluss wurde die Elektrophorese (25Volt, 300mA) für 20 Minuten durchgeführt. Die Objektträger

wurden anschließend auf einer Färbebrücke dreimal im Abstand von fünf Minuten mit 400mM Trisma-Puffer neutralisiert. Die Objektträger die für die Negativkontrollen (DMSO, 3 x Celebrex®) bestimmt waren wurden mit 75µl des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid gefärbt. Bis zur Auswertung (innerhalb 7 Tage) erfolgte die Aufbewahrung in einem angefeuchteten, lichtgeschützten Objektträgerkasten im Kühlschrank.

2.2.7.4 Digitale Analyse der DNA-Migration

Die Auswertung der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA erfolgte mittels DMLB Fluoreszenzmikroskop und einer daran angeschlossenen CCD-Camera mit digitaler Bildverarbeitung (Komet 3.1). Dabei wurden jeweils 40 Zellen pro Objektträger ausgewertet, d.h. also insgesamt 80 Zellen pro Versuchsansatz. Je nach Ausmaß der induzierten DNA-Schädigung führen die DNA-Fragmente zu unterschiedlichen Migrationsmustern im elektrischen Feld. Dabei wandern die Fragmente umso schneller und weiter, je stärker die DNA geschädigt wurde. Das hieraus resultierende Bild ist „kometenartig“. Die ungeschädigte DNA befindet sich dabei im Kopf, die geschädigte dagegen im Schweif des „Kometen“.

Um das Ausmaß der Schädigung zu beschreiben, wurde der Olive Tailmoment (OTM) verwendet. Er beschreibt das Produkt aus der mittleren Wanderungstrecke und dem Anteil der DNA im Schweif des Kometen, in Relation zur Gesamt-DNA einer Zelle (Olive and Bannath, 1993). Der OTM wird üblicherweise ohne Einheit angegeben.

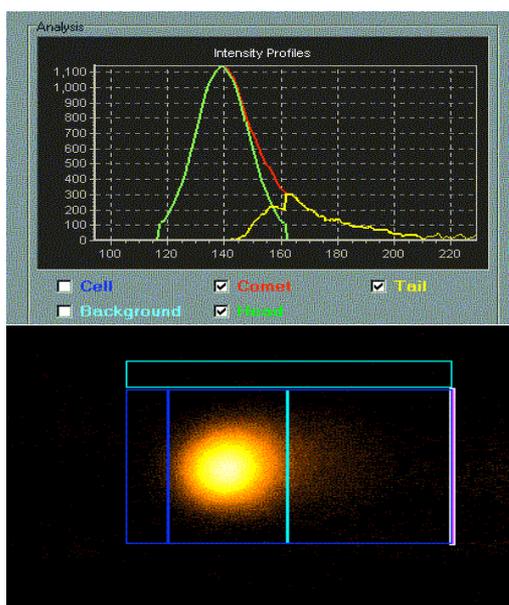


Abb. 9: Epithelzelle mit geschädigter DNA in der Comet 3.1 Auswertung

2.2.8 Comet-FISH

Beim Comet-FISH handelt es sich um eine Kombination des Comet-Assays mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Die in situ Hybridisierung wurde erstmals 1969 von Pardue und Gall beschrieben und 1986 mittels Fluoreszenzfärbung erweitert [Pardue und Gall, 1969, Pinkel et al., 1986]. Diese Kombination ermöglichte erstmals die visuelle Darstellung einzelner Chromosomen und chromosomaler Anteile (Gene).

In einer Arbeit von Menke et al. und McKelvey et al. wurde die Kombination von Comet-Assay und FISH zum Nachweis chromosomaler Alterationen an Pflanzenzellen und Lymphozyten angewandt [Menke et al., 2000; McKelvey-Martin et al., 1998]. Basierend auf diesen Protokollen wurde die Methode Comet-FISH nach entsprechenden Modifikationen zum Vergleich chromosomaler Alterationen in Schleimhautzellen des Aerodigestivtraktes von Patienten mit und ohne Karzinom des Oropharynx eingesetzt [Harréus et al., 2004]. Comet-FISH wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Schädigung des Chromosoms 11 und des CyclinD1-Gens innerhalb der Gesamtschädigung der DNA beurteilen zu können.

2.2.8.1 Hybridisierung

Die Objektträger die für den Comet-FISH bestimmt waren, wurden nach der Elektrophorese und der anschließenden Neutralisation nicht mit Ethidiumbromid gefärbt. Sie wurden stattdessen für 5 Minuten in eine mit 2 x SSC-Lösung gefüllte Glasküvette gestellt. Im Anschluss daran wurden die Objektträger in eine Ethanolreihe mit aufsteigenden Konzentrationen (70%, 85%, 100%) gegeben und für jeweils 5 Minuten dehydriert. Um die Agaroseschicht auf den Objektträgern endgültig zu stabilisieren, wurden sie auf eine 37°C warme Heizplatte für zehn Minuten zum Trocknen gelegt.

Bevor die DNA-Sonde auf die vorher markierte Stelle des Objektträgers aufgebracht werden konnte, musste sie aufgetaut und angemischt werden. Für jeden Objektträger wurde eine Mischung aus 1µl Sonde, 7µl Hybridisierungspuffer und 2µl Aqua bidest. benötigt. Die Sondenmischung wurde in ein Eppendorf Gefäß pipettiert, mit Hilfe eines Minishakers gemischt und anschließend mit einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Jeweils 10µl der Mischung wurde auf die markierte Stelle (2 x 2cm) des Objektträgers aufgebracht und mit einem Deckglas versehen. Nachdem die Ränder mit Zementkleber versiegelt waren, wurden die Objektträger zur Codenaturierung für 5-6 Minuten auf eine

74°C Präzisionsheizplatte gelegt. Die Objektträger wurden anschließend zur Hybridisierung für mindestens 16 Stunden in eine lichtgeschützte Feuchtkammer platziert und im Brutschrank bei 37°C aufbewahrt. Die DNA-Probe hybridisierte dabei am Zentromer (band region 11p11.11-q11, locusD11Z1) und am LSI CyclinD1 (band 11q13) des Chromosoms 11.

2.2.8.2 Zellfärbung

Nach Abschluss der Hybridisierungsphase wurden die Deckgläser entfernt und die Objektträger für 10 Minuten in eine Glasküvette gestellt, die mit einer 45°C warmen Formamid-Waschlösung gefüllt war. Der Inkubationsvorgang in der Formamid-Waschlösung wurde anschließend noch zweimal wiederholt. Die Objektträger wurden für weitere 10 Minuten in eine Küvette mit 2 x SSC und anschließend für 5 Minuten in eine mit 2 x SSC/NP 40 gegeben, die beide ebenfalls auf 45°C erwärmt waren. Die Objektträger wurden in allen 5 Küvetten für 1-3 Sekunden geschüttelt, um unspezifische Bindungen zu entfernen. Anschließend wurden sie aus der letzten Lösung genommen und für 20 Minuten luftgetrocknet.

Im Anschluss daran wurden die Zellen mit DAPI und Antifade (Verhältnis 2:1) gegengefärbt. Dafür wurden jeweils 15µl dieser Färbelösung auf die Objektträger gebracht und mit einem Deckglas abgedeckt. Nach der Versiegelung des Deckglases mit Hilfe eines Nagellacks konnten die Objektträger bis zur Auswertung bei -20°C lichtgeschützt gelagert werden.

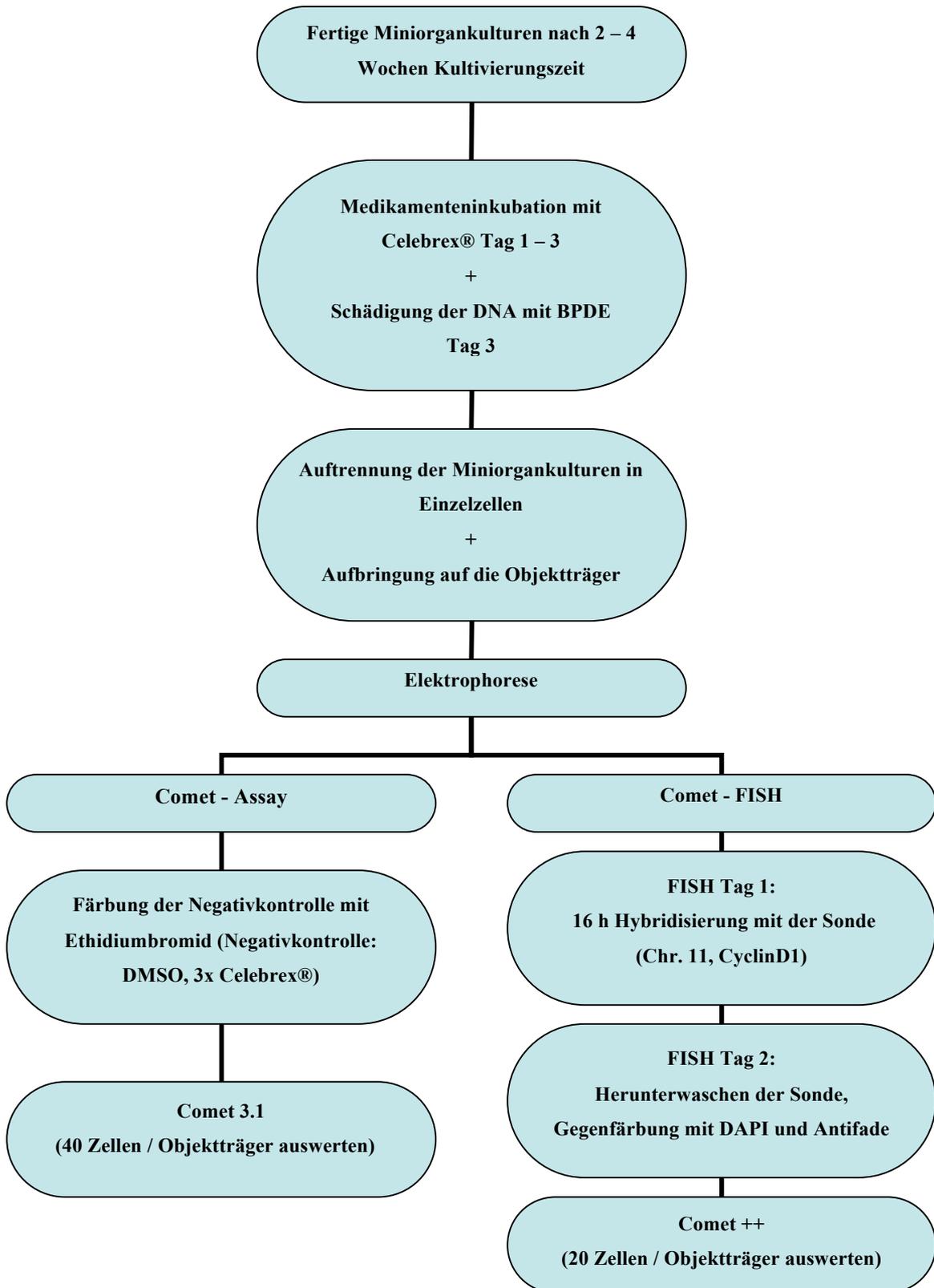
2.2.8.3 Digitale Auswertung der DNA-Migration

Die Auswertung der mit DAPI und Antifade gegengefärbten Zellen erfolgte mit Hilfe eines DMLB Fluoreszenzmikroskops und einer daran angeschlossenen CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (Comet ++). Pro Objektträger wurden 20 Zellen ausgewertet.

Der genotoxische Effekt auf die Gesamt-DNA wurde wie unter 2.2.7.4 erläutert mit dem Olive Tailmoment quantifiziert. In Anlehnung an den OTM wurde für den Comet-FISH der Munich Chromosomal Tailmoment (MCTM) verwendet. Er wird berechnet aus dem Produkt der mittleren chromosomalen Wanderungsstrecke und der chromosomalen Fluoreszenz im Kometenschweif dividiert durch die gesamte

Fluoreszenz des Chromosoms in der Zelle. Dabei wird die Wanderungsstrecke vom ersten bis zum letzten Signal des Chromosoms berechnet und bezieht sich nicht auf die Mitte des Zellkerns wie es für den OTM gültig ist.

2.2.9 Übersicht des Versuchsaufbaus



2.3 Methodenspezifisches Material

2.3.1 Miniorgankulturen

Miniorgankulturen	Anleitung
Bronchial Epithelial Growth Medium	
500ml Bronchial Epithel Basalmedium (BEBM) Supplement Pack: BPE-26, hEGF-5, Insulin-2.5, HC-250, Epinephrin-250, T3-3.35, Transferrin-5, RA-50, +100µl Amphotericin B, 5ml Gentamicin	Supplement Pack, Amphotericin B und Gentamicin dem BEBM unter sterilen Bedingungen zugeben, gut mischen und bei 4°C lagern
DMEM-Medium	
500ml Aqua bidest. 9,99g DMEM Pulver 1,96g HEPES Pulver	DMEM und HEPES in Aqua bidest auflösen; ph-Wert auf 7,2 einstellen, sterilfiltrieren und in 250ml Portionen abfüllen
Agar 1,5%	
0,45g Agarosepulver (Agar Noble) 30ml Aqua bidest.	Agarosepulver in Aqua bidest. lösen, in der Mikrowelle erhitzen und sterilfiltrieren
DMEM-Agaroseplatten	
30ml Agar Noble 30ml DMEM 6ml FCS 75µl nicht essentielle Aminosäuren 120µl Amphotericin B 240µl Penicillin-Streptomycin-Lösung	DMEM, FCS, nicht essentielle Aminosäuren, Amphotericin B und Penicillin-Streptomycin in sterilem Gefäß mischen; mit erhitztem Agar Noble versetzen; Wells der 24-Well-Platte mit jeweils 250µl der Mischung beschichten

Enzymlösung zur Einzelzellgewinnung	
50mg Protease 10mg Hyaluronidase 10mg Kollagenase P 10ml BEGM	Enzyme in 10ml BEGM lösen und sterilfiltrieren

2.3.2 Mikrogelelektrophorese

Mikrogelelektrophorese	Anleitung
Agarose	
0,5% Low-Melting-Agarose 0,7% Low-Melting-Agarose PBS	Agarose in PBS lösen und in der Mikrowelle aufkochen, im Wasserbad bei 37°C aufbewahren

Lysestammlösung	
146,4g NaCl (2,5M) 1,2g Trishydroxymethylaminimethan (10mM) 37,2g Na ₂ EDTA (100mM) 10g N-Lauroylsarcosinnatriumsalz (10%) Aqua bidest.	NaCl, Trishydroxymethylaminimethan in 500ml Aqua bidest. lösen, Na ₂ EDTA in 160ml Aqua bidest. mit Zugabe von NaOH-Plätzchen lösen, N-Lauroylsarcosinnatriumsalz in 160ml Aqua bidest. lösen, alles mischen und mit Aqua bidest auf 1l auffüllen, ph-Wert auf 10 einstellen

Lysepuffer	
1ml Triton X [®] -100 10ml DMSO 89ml Lysestammlösung	Triton X [®] -100 und DMSO in 100ml Messzylinder geben, mit Lysestammlösung auf 100ml auffüllen

Elektrophoresepuffer	
24g NaOH-Plätzchen (300 mM) 0,744g Na ₂ EDTA (1 mM) Aqua bidest.	NaOH-Plätzchen und Na ₂ EDTA in 2l Aqua bidest. lösen, bei 4°C kühl stellen

Neutralisationspuffer (400mM)	
48,5g Trishydroxymethylaminomethan Aqua bidest.	Trishydroxymethylaminomethan in 1l Aqua bidest. lösen, ph-Wert auf 7,5 einstellen, Lagerung bei Raumtemperatur

Ethidiumbromid -Färbelösung	
0,2mg/ml Ethidiumbromidstammlösung Aqua bidest.	1:10 mit Aqua bidest. verdünnen, sterilfiltrieren , lichtgeschützt bei 4°C aufbewahren

2.3.3 Comet-FISH

Comet-FISH	Anleitung
2 x SSC-Lösung	
100ml 20 x SSC Aqua bidest.	20 x SSC in einen Messzylinder geben, mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen, ph-Wert auf 7,0 (\pm 0,2) einstellen (6 Monate haltbar)

Formamid-Waschlösung	
157,5ml Formamid 31,5ml 20 x SSC 122ml Aqua bidest.	Substanzen in ein Messzylinder geben, mischen und ph-Wert auf 7-8 einstellen (7 Tage haltbar; bei 4°C lagern)

2 x SSC / NP-40-Lösung	
1ml NP-40 1000ml 2 x SSC	NP-40 in das SSC pipettieren und mischen, ph-Wert auf 7,0 (\pm 0,2) einstellen (6 Monate haltbar)

DNA-Sonde	
1 μ l Sonde 2 μ l Aqua bidest. 7 μ l Hybridisierungspuffer	Komponenten in ein Eppendorf-Tube geben, kurz mischen, anschließend zentrifugieren

DAPI-Antifade-Lösung	
DAPI Antifade	DAPI und Antifade im Verhältnis 2:1 mischen

2.3.4 Medikament

Medikament	Firma
Celebrex [®] (100mg Hartkapseln) Inhaltsstoffe: Celecoxib, Lactose-Mono- hydrat, Natriumdodecylsulfat, Povidon K 30, Croscarmellose-Natrium, Magnesium, Gelatine, Farbstoffe: Titandioxid (E 171), Indigocarmin, Aluminiumsalz (E 132)	Pfizer, Parke-Davis, Mack Illert

2.3.5 **Chemikalien, Zellkulturmedien, Enzyme**

Chemikalien, Zellkulturmedien, Enzyme	Firma
Agar Noble	DIFICO, Detroit, USA
Aminosäuren, nicht essentielle	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Amphotericin B	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Antifade	Vysis-Abbott, Illinois, USA
Aqua bidest.	Apotheke LMU
Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM)	Promocell, Hamburg
+Supplementpack für BEBM	Promocell, Hamburg
Benz(a)pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	Midwest Research Institute, Kansas, USA
DAPI	Vysis-Abbot, Illinois, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM-Medium	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
DNA-Sonde (LSI CyclinD1 SO/ CEP11 SG)	Vysis-Abbott, Illinois, USA
Ethanol 70, 85, 100%	Klinikapotheke LMU
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na ₂ EDTA)	Serva, Heidelberg
Fötales Kälber Serum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Formamid	Sigma, Steinheim
Gentamicin	Promocell, Heidelberg
HEPES	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Hyaluronidase	Sigma, Steinheim
Kollagenase P	Roche, Mannheim
Low-Melting-Agarose; Sea Plaque GTG	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxidplättchen (NaOH)	Merck, Mannheim
N-Lauroylsacrosinnatriumsalz	Sigma, Steinheim
Normal-Melting-Agarose; Seakem LE	FMC-Bio Products, Rockland, USA
NP-40	Vysis-Abbott, Illinois, USA
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim

Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Protease	Sigma, Steinheim
Saline sodium citrate buffer (20 x SSC)	Vysis-Abbott, Illinois, USA
Supplement Pack für BEGM	Promocell, Heidelberg
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X [®] -100	Sigma, Steinheim
Trypanblau 0,4%	Merck, Darmstadt

2.3.6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma
24-Well-Platte	Falcon, Heidelberg
Combitipps	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser zum Mikroskopieren, Glasdicke 0,08-0,12mm	Langenbrinck, Emmendingen
Deckgläschen 2 x 2cm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmalspritzen (5ml, 10ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten steril, 0,22µm Filter Unit, Millex-GV, Millex-GS	Millipore, Eschborn
Filme ISO 100, ISO 400	Kodak, New York, USA
Objektträger 24 x 70mm, seitlich mattiert	Langenbrick, Emmendingen
Objektträgerkasten für 50 Objektträger	GLW, Würzburg
Petrischalen	nunc, Wiesbaden
Pinzetten	Angiokard, Friedeburg
Pipetten (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Pipette aus Polystyrol (2, 10, 25ml) steril	Greiner, Frickenhausen
Eppendorf-Gefäße	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (15ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50ml)	Greiner, Frickenhausen
Schreibdiamant	Renner, Darmstadt
Skalpelle	SEATHER, Osaka, Japan
Zementkleber (Fixogum)	Marabu, Tamm

2.3.7 Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Firma
Analysewaage Voyager (0,1mg-62g)	Ohaus, Gießen
Auswertung/Datenspeicherung:	
Programm Komet 3.1	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Komet ++	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Exel	Microsoft
Brutschrank Funktion Line	Heraeus, Hanau
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau
Elektrophoresenetzgerät E865	Renner, Darmstadt
Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart
Horizontale Elektrophoresekammer	Renner, Darmstadt
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer Combimag RCT	IKA, Staufen
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 Ö1; 40x/ 0,5; 10x0,22; 4x/0,1	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht, Schorndorf
Minishaker MS1	IKA-WORKS, Wilmington, USA
ph-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Präzisionsheizplatte PZ 28-1	Harry Gestigkeit, Düsseldorf
Präzisionsheizplatte SP 13	Reichert-Jung, Wien-Österreich
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Spiegelreflexkamera	Minolta, Osaka, Japan
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Waage 1419 (1mg-600g)	Sartorius, Gießen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zellzählkammer nach Neubauer	Merck, Darmstadt
Zentrifuge Varifuge 3.ORS und 3.OR, Rotorradius = 21,1cm	Heraeus, Hanau

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Testverfahren und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms SPSS 15.0™. Für die graphische Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots gewählt. Diese wurden mit dem Datenanalyseprogramm SPSS 15.0™ angefertigt.

Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar, d.h. 50% der hier abgebildeten Werte liegen darüber und 50% der Werte darunter. Die obere Begrenzungslinie stellt das 75. Perzentil dar (d.h. 75% aller Werte sind kleiner), die untere das 25. Perzentil (d.h. 25% aller Werte sind kleiner). Durch zwei weitere Linien, den oberen und unteren Whisker, werden jeweils der kleinste und der jeweils größte Wert dargestellt. Die Länge der Whisker beträgt max. das eineinhalbfache des Interquartilabstandes (IQR). Ausreißer, die mehr als eineinhalb Boxplotlängen außerhalb liegen, werden mit einem Kreis [°] markiert. Werte, die hingegen mehr als drei Boxplotlängen außerhalb liegen, werden mit einem Stern [*] versehen.

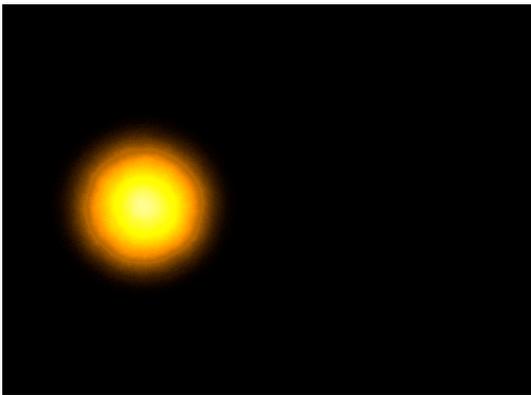
Die unterschiedlichen OTM/MCTM-Werte innerhalb der Tumor- bzw. Kontrollgruppe werden einander gegenüber gestellt und mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben geprüft. Zum Vergleich der Ergebnisse der Tumorgruppe mit denen aus der Kontrollgruppe wurde der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben verwendet.

Aufgrund der multiplen Testung innerhalb der Gruppe wurde zur Absicherung des Signifikanzniveaus der einzelnen Tests mittels Bonferroni-Verfahren korrigiert. Das ursprüngliche Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde hierfür durch die Anzahl der Tests innerhalb der Gruppe dividiert und somit neu festgelegt.

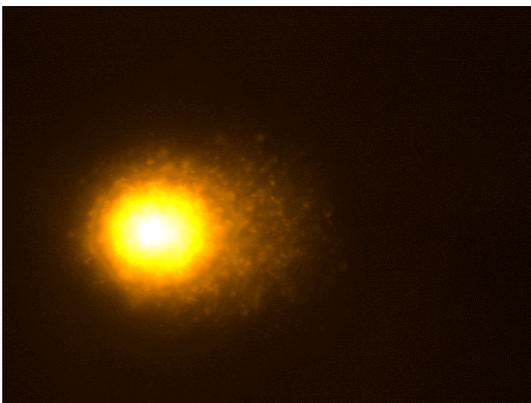
3.2 DNA-Schädigung an Interphasezellen

Die durch BPDE induzierten Strangbrüche bilden im alkalischen Milieu, wie zum Beispiel beim Comet-Assay bzw. Comet-FISH, DNA-Fragmente. Im elektrischen Feld weisen diese, je nach molekularem Gewicht und Größe ein unterschiedliches Migrationsverhalten auf. Die Fragmente legen dabei eine umso größere Strecke in Richtung der Anode zurück, desto kleiner und stärker geschädigt sie sind. Dabei

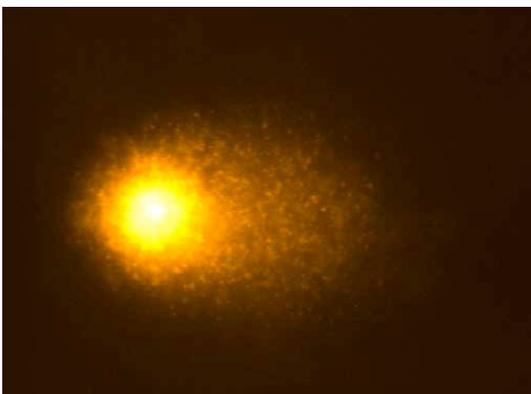
entsteht das Bild eines Kometen mit weitgehend intakter DNA im Kopf und fragmentierter DNA im Schweif des Kometen. Durch das Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid beim Comet-Assay und mit DAPI beim Comet-FISH, lässt sich das unterschiedliche Wanderungsverhalten der Gesamt-DNA bzw. der spezifischen Genloci farblich darstellen. In den nachfolgenden Abbildungen sind Mukosazellen mit unterschiedlichen Wanderungsmustern nach Durchführung des Comet-Assay und der nachfolgenden Anfärbung der DNA mittels Ethidiumbromid zu sehen.

**Abb. 10:**

DNA einer ungeschädigten oropharyngealen Schleimhautzelle nach Durchführung des CometAssay und Färbung mit Ethidiumbromid

**Abb. 11:**

DNA einer mittelgradig geschädigten oropharyngealen Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet-Assay und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid

**Abb. 12:**

DNA einer hochgradig geschädigten oropharyngealen Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet-Assay und anschließender Färbung mit Ethidimbromid

Das gleiche Migrationsprinzip zeigt sich bei der Markierung einzelner Gene mittels spezifischen DNA-Sonden. Allerdings fällt die Intensität der DNA-Färbung deutlich geringer aus, da es sich um Fragmente kleinerer Massen handelt. Die drei nachfolgenden Abbildungen zeigen Mukosazellen nach der Durchführung des Comet-FISH. Die Gesamt-DNA stellt sich hier durch die Gegenfärbung mit DAPI blau dar. Das CyclinD1-Gen wird durch ein rotes, das Zentromer von Chromosom 11 durch ein grünes Signal repräsentiert.

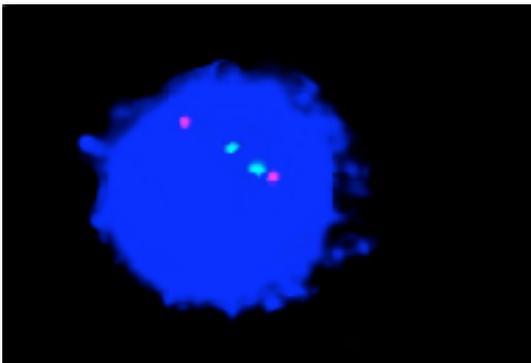


Abb. 13: DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Karzinompatienten nach Inkubation mit DMSO. Nach Durchführung des Comet-FISH und einer DNA-Gegenfärbung mit DAPI, weisen weder die Gesamt-DNA (blau) noch das CyclinD1-Gen (rot) bw. das Zentromer Chr.11 (grün) eine Schädigung auf

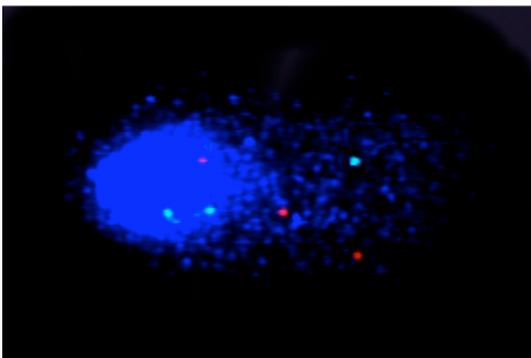


Abb. 14: DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Karzinompatienten nach Inkubation mit BPDE. Sowohl die Gesamt-DNA als auch das CyclinD1/Zentromer Chr. 11 weisen eine Schädigung auf

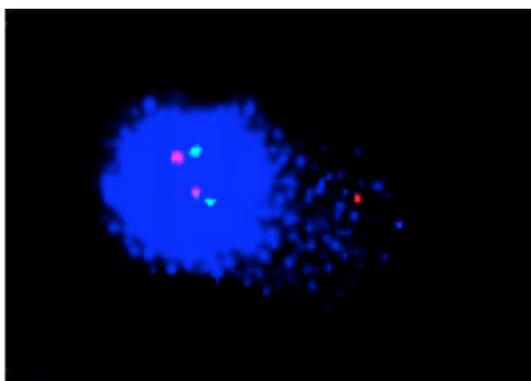


Abb. 15: DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Karzinompatienten nach Vorinkubation mit Celebrex® und anschließender Schädigung mit BPDE. Sowohl bei der Gesamt-DNA als auch im CyclinD1-Gen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Schädigung

In der vorliegenden Arbeit wurden Schleimhautproben von insgesamt 30 Patienten mit Comet-Assay und Comet-FISH untersucht. Unter ihnen waren 15 tumorfreie Patienten (6w, 9m) und 15 Karzinompatienten (4w, 11m). Das Alter reichte von 29 bis 79 Jahren. Im Mittel lag das Alter der Kontrollpatienten bei 46,4 Jahren, das der Tumorpatienten bei 58,6 Jahren. (s. Anamnesen der Spender im Anhang). In Bezug auf das Lebensalter und das Geschlecht wurde soweit möglich ein Matching durchgeführt. Der Unterschied im Altersniveau resultiert jedoch aus den verschiedenen Operationsindikationen. Während in jungen Jahren Tonsillektomien vorrangig durchgeführt werden, sind Tumoroperationen im Kopf-Hals-Bereich meist mit einem höheren Lebensalter vergesellschaftet.

Die Gesamt-DNA-Schäden wurden mit Hilfe des OTM, die genetischen Schädigungen mit dem MCTM beschrieben. Als Negativkontrolle wurde DMSO ($c = 166\text{mM}$) auf die Miniorgankulturen gegeben und die Gesamt-DNA-Schädigung mit der einfachen Mikrogelelektrophorese, die Schädigung im CyclinD1/Zentromer Chr.11 einmalig mittels Comet-FISH ausgewertet. Wie erwartet, kam es zu keiner relevanten genotoxischen Schädigung der DNA durch DMSO ($\text{OTM} < 2$ [Olive et al. 1993]). Die Fremdstoffexposition wurde mit BPDE in einer Endkonzentration von $9\mu\text{M}$ durchgeführt [Reiter, 2007]. Für die Vorinkubation der Miniorgankulturen mit dem selektiven COX-2-Inhibitor Celebrex[®] wurde eine Endkonzentration von $0,1\mu\text{g/ml}$ gewählt [Matthias et al., 2006].

3.2.1 DNA-Schädigung in der tumorfreien Patientengruppe

Abkürzungsverzeichnis-tumorfreie Patientengruppe (Kontrolle):

Kontrolle (DMSO): OTM-Mittelwerte der Negativkontrollen mit DMSO

COX: OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach dreimaliger Vorinkubation mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®].

BPDE: OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach Inkubation mit BPDE

COX+BPDE: OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] und anschließender Inkubation mit BPDE

CyclinD1-BPDE: MCTM-Mittelwerte des CyclinD1-Gens nach Inkubation mit BPDE

CyclinD1-COX+BPDE: MCTM-Mittelwerte des CyclinD1 nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] und anschließender Inkubation mit BPDE

Chr.11-BPDE: MCTM-Mittelwerte des Zentromers von Chromosom 11 nach Inkubation mit BPDE

Chr.11-COX+BPDE: MCTM-Mittelwerte des Zentromers von Chromosom 11 nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] und anschließender Schädigung mit BPDE

Tab. 1: Abkürzungsverzeichnis-tumorfreie Patientengruppe (Kontrolle)

3.2.1.1 DNA-Schädigung mit BPDE

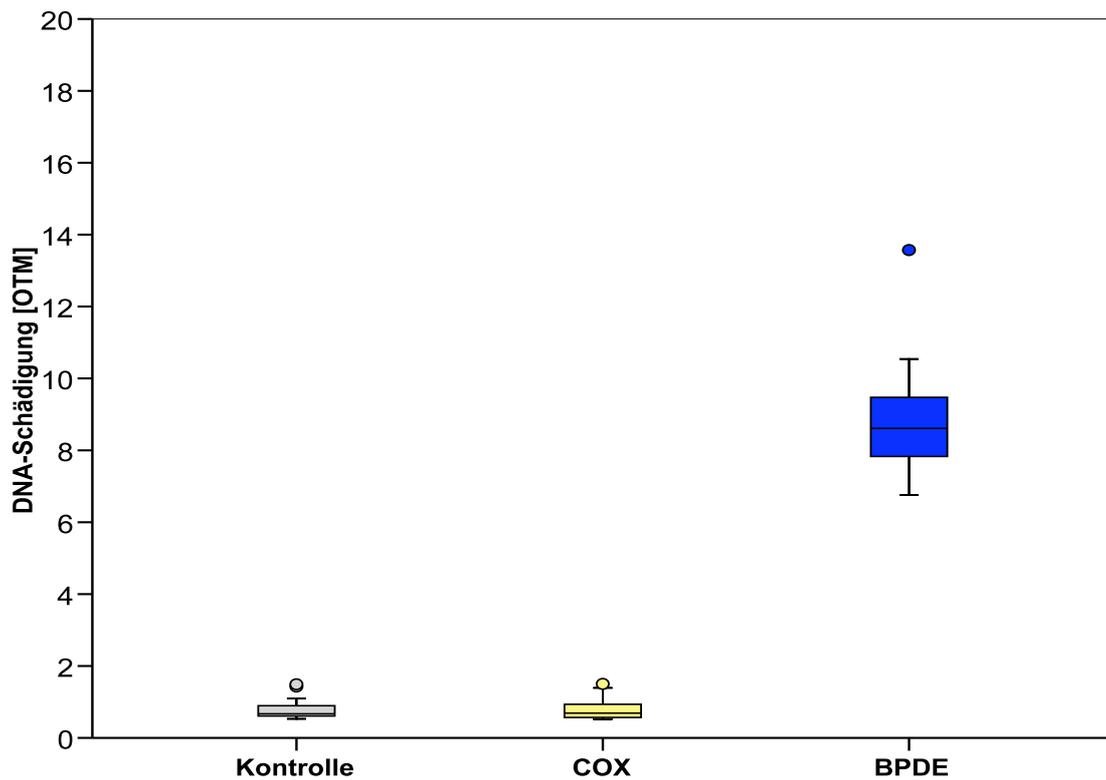


Abb. 16: Ausmaß der DNA-Schädigung in der tumorfreien Patientengruppe (n = 15). Vergleich der OTM-Werte nach BPDE-Inkubation mit der Negativkontrolle DMSO und Vergleich der OTM-Werte nach Inkubation mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] mit der Negativkontrolle DMSO

Der OTM für die Gesamt-DNA ergab Mittelwerte von 0,8 für die Negativkontrolle (DMSO), 0,8 für den COX-2-Inhibitor Celebrex[®] und 8,9 für BPDE. BPDE verursacht in der Gesamt-DNA signifikant höhere DNA-Schäden als die Negativkontrolle mit DMSO. Der COX-2-Inhibitor Celebrex[®] verursacht hingegen keine signifikant höheren Schädigungen der DNA im Vergleich zur Negativkontrolle mit DMSO (s. Tab.2).

Tab. 2: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO zu BPDE, sowie zu COX-2-Inhibitor Celebrex[®] bei der tumorfreien Patientengruppe

Kontrolle (DMSO) vs. BPDE	$p \leq 0,001$
Kontrolle (DMSO) vs. COX	$p = 0,615$
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,025$	

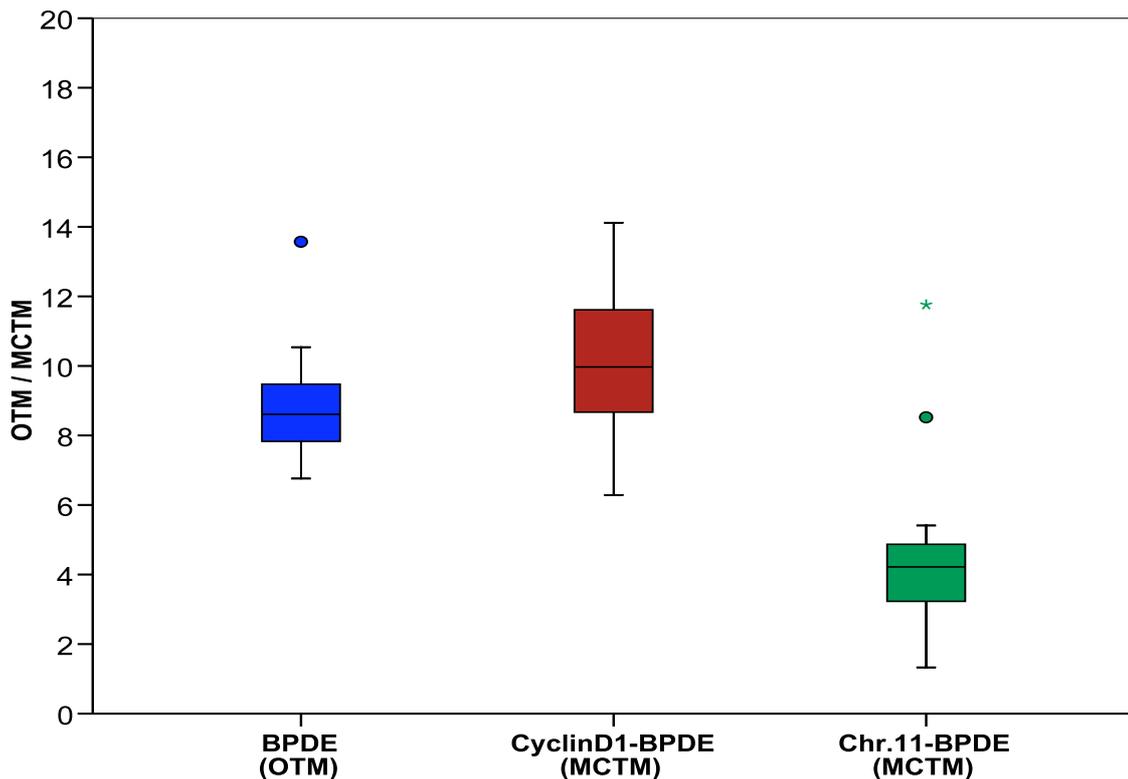


Abb. 17: Ausmaß des Gesamt-DNA Schadens und der DNA-Schädigung des CyclinD1-Gens sowie des Zentromers von Chromosom 11 nach BPDE-Inkubation bei tumorfreien Patienten (n = 15)

Der OTM-Mittelwert der Gesamt-DNA nach BPDE-Inkubation lag bei 8,9. Der MCTM für das CyclinD1-Gen und das Chromosom 11 ergab Mittelwerte von 10,2 (CyclinD1) und 4,6 (Zentromer von Chromosom 11). Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben wurde die Fragmentierung der Gesamt-DNA mit der DNA-Schädigung im CyclinD1-Gen und im Zentromer von Chromosom 11 verglichen. Zusätzlich wurde die Schädigung der DNA zwischen dem CyclinD1-Gen und dem Zentromer von Chromosom 11 verglichen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Gesamtschädigung und der genetischen Schädigung im CyclinD1-Gen konnte nicht festgestellt werden, jedoch beim Vergleich zwischen der DNA-Gesamtschädigung und der des Zentromers von Chromosom 11. Es bestand ebenfalls eine statistische Signifikanz beim Vergleich der DNA-Schädigung des CyclinD1-Gens und der des Vergleichschromosoms 11 (s. Tab.3).

Tab. 3: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der BPDE induzierten DNA-Schädigung der Gesamt-DNA, des CyclinD1-Gens und des Zentromers von Chromosom11 bei tumorfreien Patienten

BPDE vs. CyclinD1-BPDE	$p = 0,031$
BPDE vs. Chr.11-BPDE	$p \leq 0,001$
CyclinD1-BPDE-Chr.11-BPDE	$p \leq 0,001$
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,017$	

3.2.1.2 Einfluß des COX-2-Inhibitors Celebrex® auf die DNA-Schädigung mit BPDE

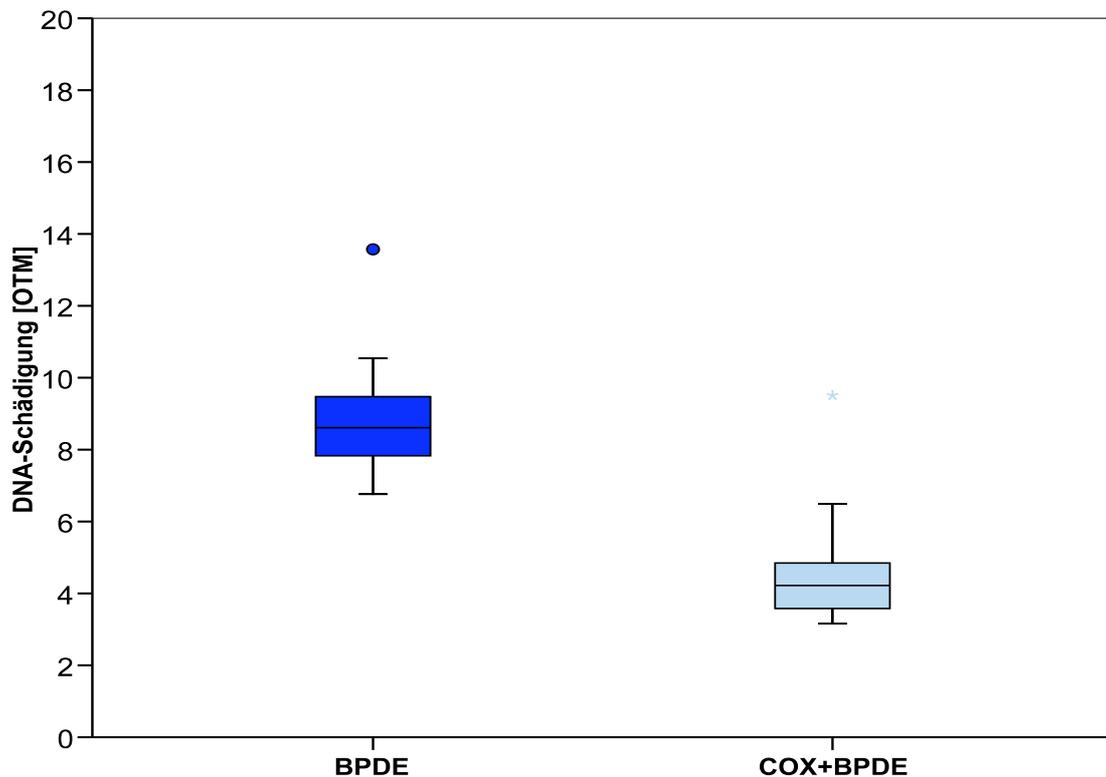


Abb. 18: Ausmaß der DNA-Gesamtschädigung und Vergleich der OTM-Werte nach Inkubation mit BPDE und nach Vorinkubation mit COX-2-Inhibitor Celebrex® bei tumorfreien Patienten (n = 15)

Die OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA lagen bei 8,9 für BPDE und bei 4,6 für COX-2-Inhibitor und anschließender BPDE-Inkubation. Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben wurden die beiden OTM-Werte miteinander verglichen. Es konnte eine signifikante Reduktion der DNA-Schädigung durch die Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex® gezeigt werden (s. Tab.4).

Tab. 4: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der DNA-Schädigung von BPDE mit der BPDE induzierten Schädigung nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex® bei tumorfreien Patienten

BPDE vs. COX+BPDE	$p \leq 0,001$
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,05$	

Bei der Gesamt-DNA ergab sich nach Inkubation mit COX-2-Inhibitor Celebrex® und BPDE ein OTM-Mittelwert von 4,6. Der MCTM für das CyclinD1-Gen und das Zentromer von Chromosom 11 lag bei 4,2 (CyclinD1) und 2,9 (Zentromer von Chromosom 11). Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben wurden die OTM/MCTM-Werte untereinander verglichen. Der Vergleich der Gesamt-DNA mit dem Cyclin D1-Gen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Die Gesamt-DNA sowie das CyclinD1-Gen verglichen mit dem Zentromer von Chromosom 11 erwies sich jedoch als statistisch signifikant (s. Abb. 19 u. Tab.5).

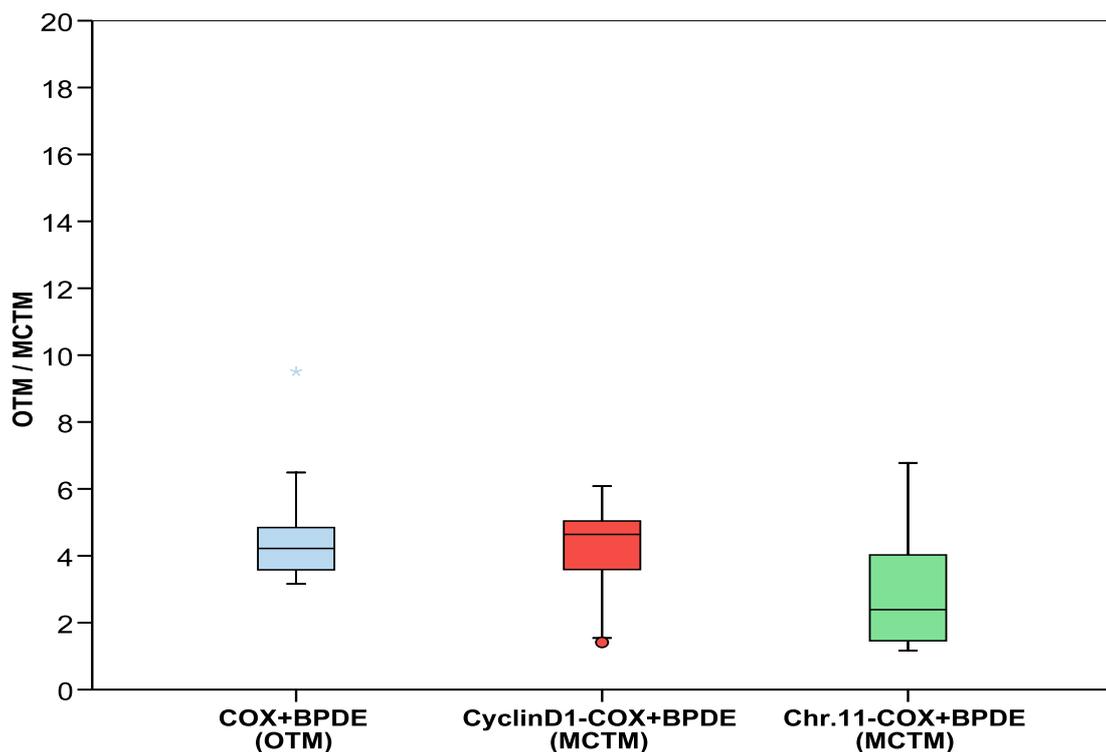


Abb. 19: Darstellung des Ausmaßes der Genotoxizität von BPDE an der Gesamt-DNA, dem CyclinD1-Gen und dem Chromosom 11 nach Vorbehandlung der Miniorgankulturen mit COX-2-Inhibitor Celebrex® bei tumorfreien Patienten (n = 15)

Tab. 5: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der BPDE induzierten DNA-Schädigung in der Gesamt-DNA, dem CyclinD1-Gen und dem Zentromer von Chromosom 11 nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] bei tumorfreien Patienten

COX+BPDE vs. CyclinD1-COX+BPDE	p = 0,712
COX+BPDE vs. Chr.11-COX+BPDE	p = 0,005
CyclinD1-COX+BPDE vs. Chr.11-COX+BPDE	p = 0,015
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,017$	

Der MCTM für das CyclinD1-Gen und das Zentromer von Chromosom 11 nach Schädigung mit BPDE ergab Mittelwerte von 10,2 (CyclinD1) und 4,6 (Zentromer von Chromosom 11). Bei Vorbehandlung der Miniorgankulturen mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] und anschließender Schädigung mit BPDE lagen die MCTM-Mittelwerte hingegen bei 4,2 (CyclinD1) und 2,9 (Zentromer von Chromosom 11). Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben ergab sich sowohl für das CyclinD1-Gen als auch für das Zentromer von Chromosom 11 eine signifikant reduzierte DNA-Schädigung durch die Vorbehandlung mit Celebrex[®] (s.Abb. 20 u. Tab.6).

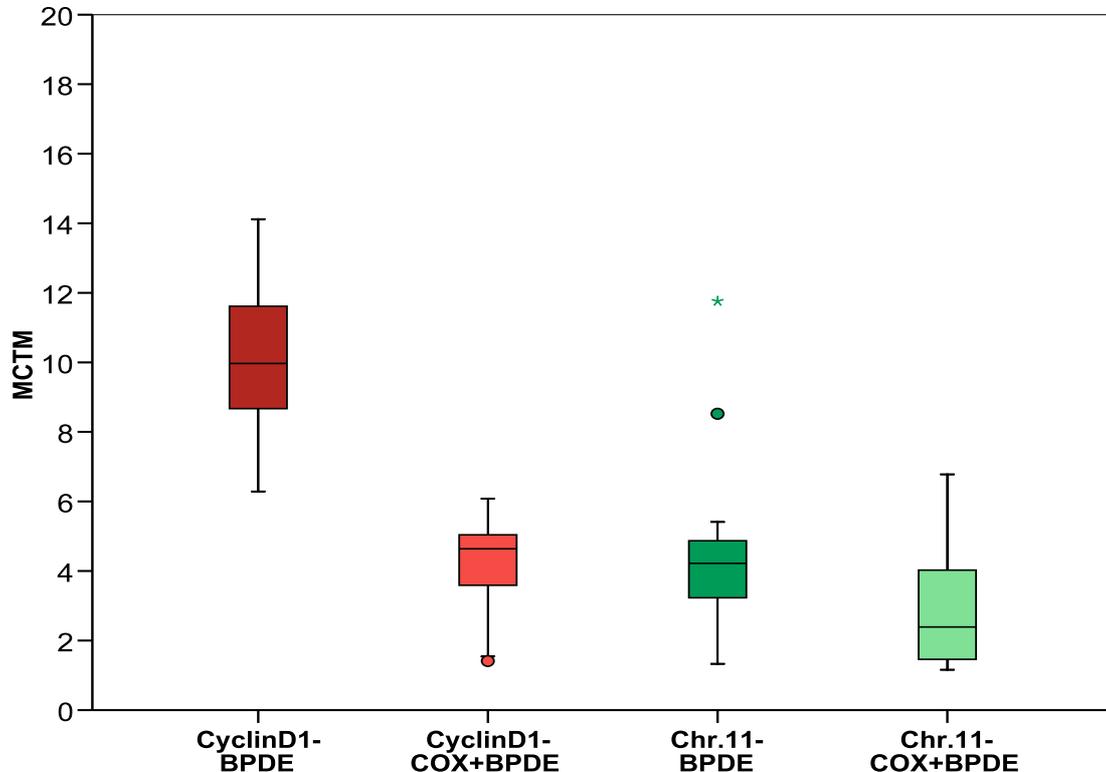


Abb. 20: Darstellung der BPDE induzierten DNA-Schädigung bei den mit COX-2-Inhibitor-Celebrex[®] vorbehandelten Miniorgankulturen im Vergleich zu unbehandelten in der tumorfreien Patientengruppe (n = 15)

Tab. 6: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der BPDE induzierten genetischen Schäden im CyclinD1 und im Zentromer von Chromosom 11 zwischen den mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] vorbehandelten Miniorgankulturen und den unbehandelten bei tumorfreien Patienten

CyclinD1-BPDE vs. CyclinD1-COX+BPDE	$p \leq 0,001$
Chr.11-BPDE vs. Chr. 11-COX+BPDE	$p = 0,011$
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,025$	

3.2.2 DNA-Schädigung in der Karzinomgruppe

Abkürzungsverzeichnis-Karzinomgruppe (Tumorgruppe):

Kontrolle (DMSO): OTM-Mittelwerte der Negativkontrolle mit DMSO

COX: OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach dreimaliger Vorinkubation mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®]

BPDE: OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach Inkubation mit BPDE

COX+BPDE: OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] und anschließender Inkubation mit BPDE

CyclinD1-BPDE: MCTM-Mittelwerte des CyclinD1-Gens nach Inkubation mit BPDE

CyclinD1-COX+BPDE: MCTM-Mittelwerte des CyclinD1-Gens nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] und anschließender Inkubation mit BPDE

Chr.11-BPDE: MCTM-Werte des Zentromers von Chromosom 11 nach Inkubation mit BPDE

Chr.11-COX+BPDE: MCTM-Mittelwerte des Zentromers von Chromosom 11 nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] und Schädigung mit BPDE

Tab. 7.: Abkürzungsverzeichnis-Karzinomgruppe (Tumorgruppe)

3.2.2.1 DNA-Schädigung mit BPDE

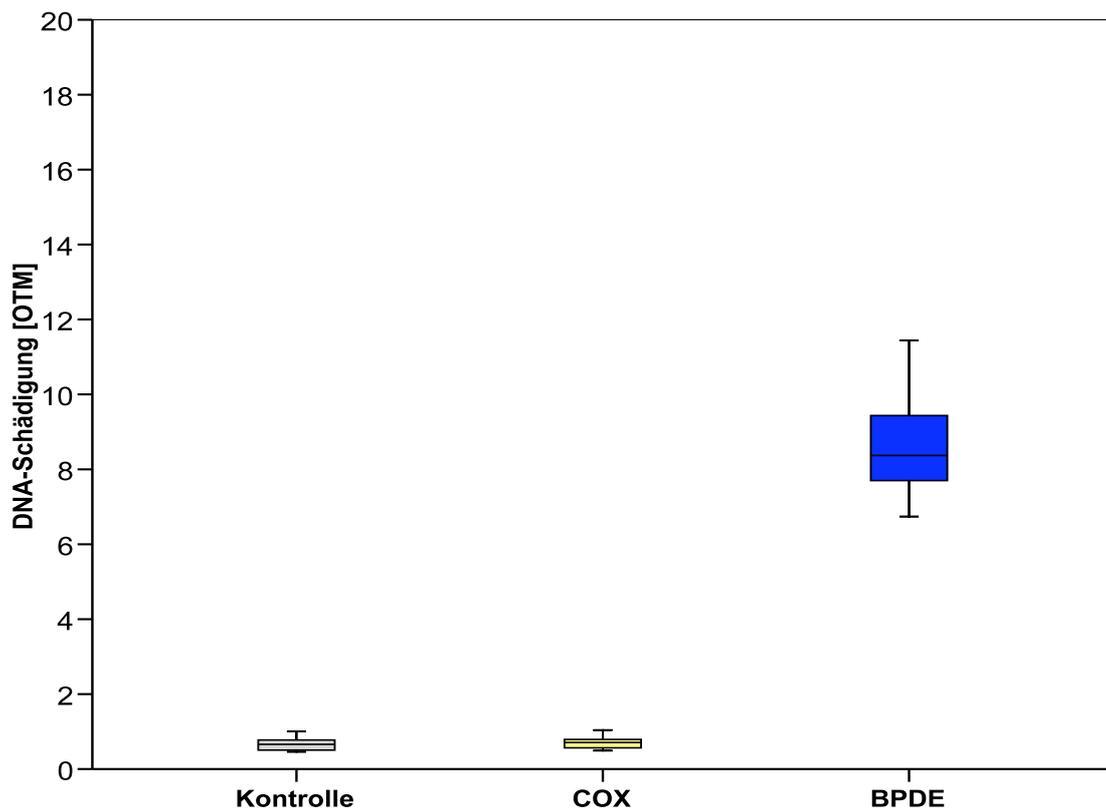


Abb. 21: Ausmaß der DNA-Schädigung bei Karzinompatienten (n = 15). Vergleich der OTM-Werte nach BPDE-Inkubation mit der Negativkontrolle DMSO sowie Vergleich der OTM-Werte nach Inkubation mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] mit der Negativkontrolle DMSO

Der OTM-Mittelwert der Gesamt-DNA betrug 8,6 für BPDE, 0,7 für DMSO und 0,7 für COX-2-Inhibitor Celebrex[®]. Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben wurden die OTM-Werte von BPDE und dem Cox-2-Inhibitor Celebrex[®] mit der Negativkontrolle verglichen. Dabei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen der Schädigung mit BPDE und der Negativkontrolle DMSO gezeigt werden. Eine statistische Signifikanz zwischen der Negativkontrolle DMSO und dem COX-2-Inhibitor Celebrex[®] konnte erwartungsgemäß nicht festgestellt werden (s.Tab 8.).

Tab. 8: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO zu BPDE sowie zu COX-2-Inhibitor Celebrex[®] bei Karzinompatienten

Kontrolle (DMSO) vs. BPDE	$p \leq 0,001$
Kontrolle (DMSO) vs. COX	$p = 0,191$
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,025$	

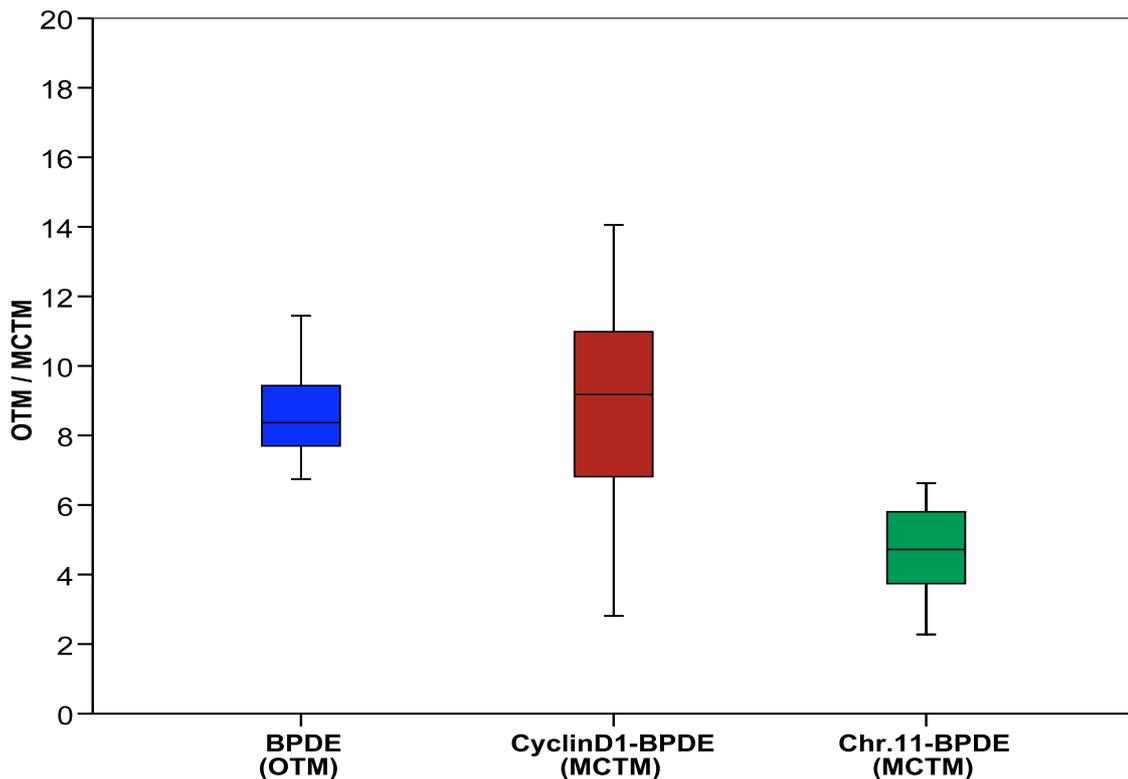


Abb. 22: Ausmaß des DNA-Gesamtschadens sowie der DNA-Schädigung des CyclinD1-Gens und des Zentromers von Chromosom 11 nach BPDE –Inkubation bei Karzinompatienten (n = 15)

Der OTM-Mittelwert der Gesamt-DNA nach BPDE-Inkubation lag bei 8,6. Der MCTM für das CyclinD1-Gen und das Chromosom 11 ergab Mittelwerte von 8,8 (CyclinD1) und 4,7 (Zentromer von Chromosom 11). Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben wurde die Fragmentierung der Gesamt-DNA mit der DNA-Schädigung im CyclinD1-Gen und im Zentromer von Chromosom 11 verglichen. Zusätzlich wurde die Schädigung der DNA zwischen dem CyclinD1-Gen und dem Zentromer von Chromosom 11 verglichen. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Gesamt-Schädigung und der genetischen Schädigung im CyclinD1 konnte nicht festgestellt werden, jedoch beim Vergleich zwischen der DNA-Gesamtschädigung und der des Zentromers von Chromosom 11. Es bestand ebenfalls eine statistische Signifikanz beim Vergleich der DNA-Schädigung des CyclinD1-Gens und der des Vergleichschromosoms 11 (s. Tab.9).

Tab. 9: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der BPDE induzierten DNA-Schädigung der Gesamt-DNA, des CyclinD1-Gens und des Zentromers von Chromosom 11 in der Karzinomgruppe

BPDE vs. CyclinD1-BPDE	P = 0,865
BPDE vs. Chr.11-BPDE	P ≤ 0,001
CyclinD1-BPDE vs. Chr.11-BPDE	P ≤ 0,001
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: p ≤ 0,017	

3.2.2.2 Einfluß des COX-2-Inhibitors Celebrex® auf die DNA-Schädigung mit BPDE

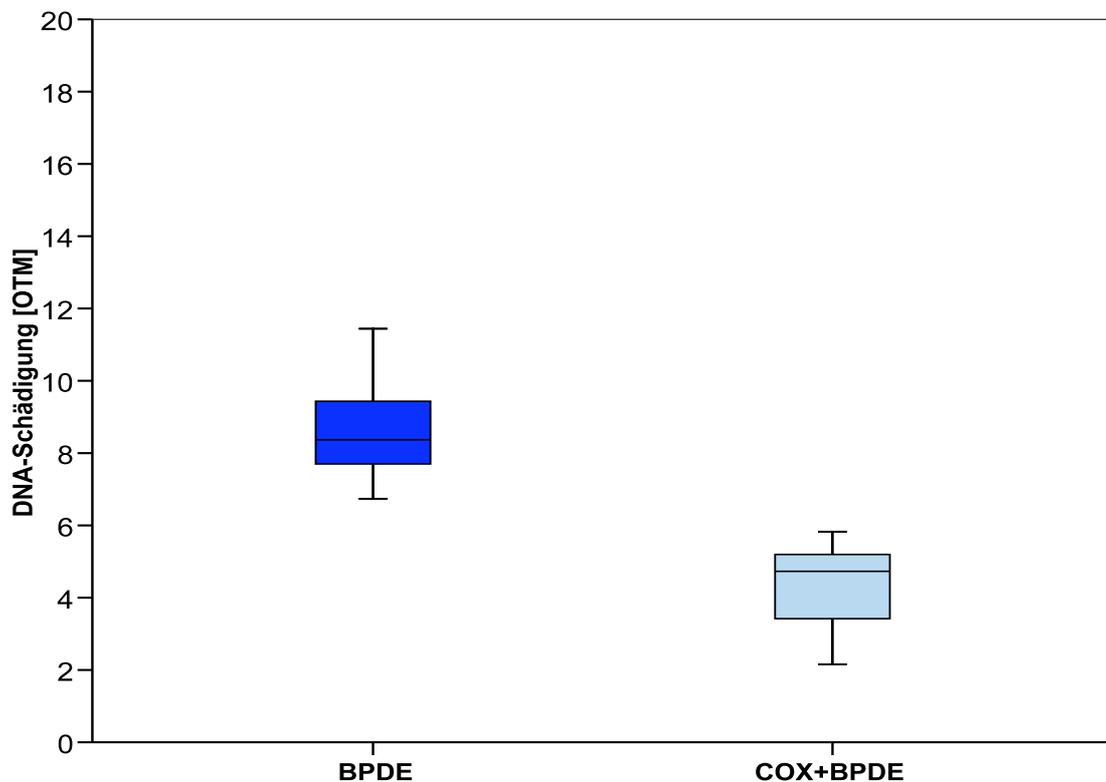


Abb.23: Ausmaß der DNA-Gesamtschädigung und Vergleich der OTM-Werte nach Inkubation mit BPDE und nach Vorinkubation mit COX-2-Inhibitor Celebrex® bei Karzinompatienten (n = 15)

Die OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA betragen 8,6 für BPDE allein und 4,4 bei der zusätzlichen Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex®. Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben wurden die beiden OTM-Werte miteinander verglichen. Es konnte eine signifikante Reduktion der BPDE induzierten DNA-Schädigung durch die Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex® gezeigt werden (s.Tab.10).

Tab. 10: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der DNA-Schädigung von BPDE mit der BPDE induzierten Schädigung nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex® bei Karzinompatienten

BPDE vs. COX+BPDE	$p \leq 0,001$
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,05$	

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse nach Vorbehandlung der Miniorgankulturen mit COX-2-Inhibitor Celebrex® und anschließender Inkubation mit BPDE. Dabei lag der OTM-Mittelwert der Gesamt-DNA bei 4,4, der MCTM-Mittelwert des CyclinD1-Gens bei 4,7, und der MCTM-Mittelwert des Zentromers von Chromosom 11 bei 2,5. Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben wurden die OTM/MCTM-Werte untereinander verglichen. Der Vergleich der Gesamt-DNA mit dem CyclinD1-Gen ergab keine statistisch signifikanten Unterschiede. Die Gesamt-DNA sowie das CyclinD1-Gen verglichen mit dem Zentromer von Chromosom 11 erwies sich jedoch als statistisch signifikant (s.Abb. 24 u.Tab.11).

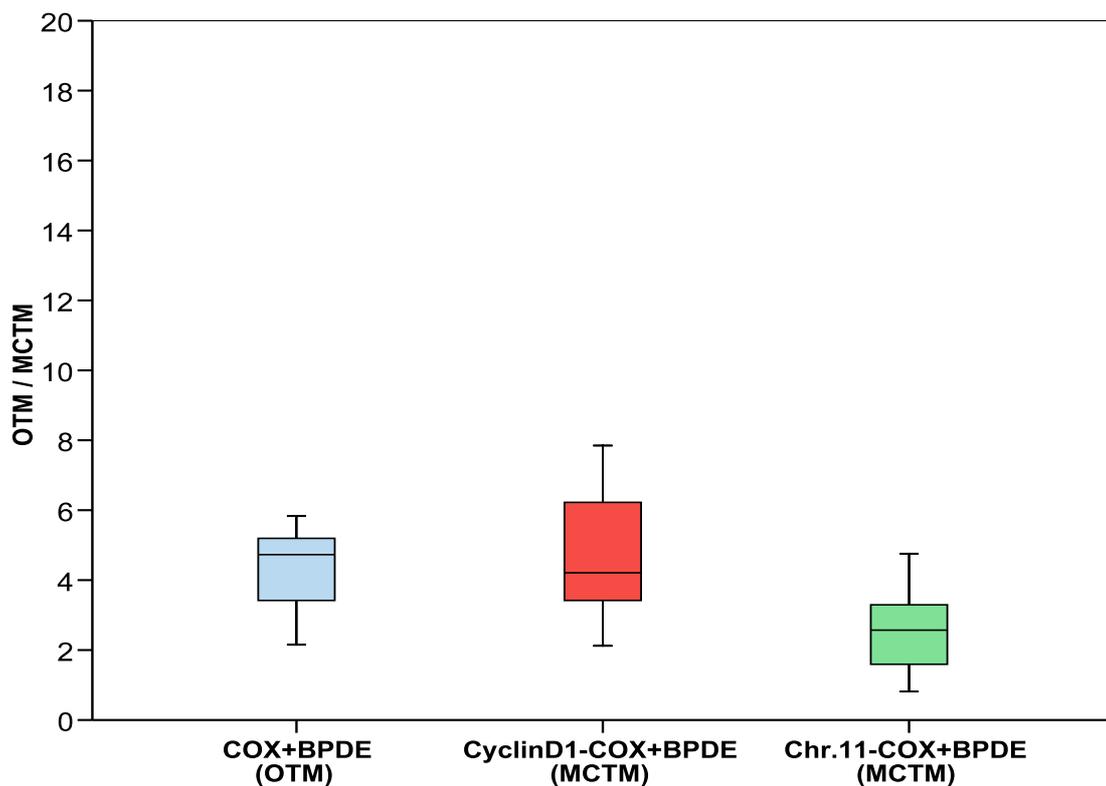


Abb. 24: Darstellung des Ausmaßes der Genotoxizität von BPDE an der Gesamt-DNA, dem CyclinD1-Gen und dem Chromosom 11 nach Vorbehandlung der Miniorgankulturen mit COX-2-Inhibitor Celebrex® bei Karzinompatienten (n = 15)

Tab. 11: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der BPDE induzierten DNA-Schädigung in der Gesamt-DNA, dem CyclinD1 Gen und dem Zentromer von Chromosom 11 nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex® bei Karzinompatienten

COX+BPDE vs. CyclinD1-COX+BPDE	p = 0,394
COX+BPDE vs. Chr.11-COX+BPDE	p = 0,003
CyclinD1-COX+BPDE vs. Chr.11-COX+BPDE	p ≤ 0,001
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: p ≤ 0,017	

Der MCTM für das CyclinD1-Gen und das Zentromer von Chromosom 11 nach Schädigung mit BPDE ergab Mittelwerte von 8,8 (CyclinD1) und 4,7 (Zentromer von Chromosom 11). Nach Vorbehandlung der Miniorgankulturen mit COX-2-Inhibitor Celebrex® und anschließender Schädigung mit BPDE lagen die MCTM-Mittelwerte hingegen bei 4,7 (CyclinD1) und 2,5 (Zentromer von Chromosom 11). Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben ergab sich sowohl für das CyclinD1-Gen, als auch für das Zentromer von Chromosom 11 eine signifikant reduzierte DNA-Schädigung mittels BPDE durch die Vorbehandlung mit Celebrex® (Tab.12 u. Abb. 25).

Tab. 12: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der BPDE induzierten genetischen Schäden im CyclinD1 und im Zentromer von Chromosom 11 zwischen den mit COX-2-Inhibitor Celebrex® vorbehandelten Miniorgankulturen und den nicht vorbehandelten bei Karzinompatienten

CyclinD1-BPDE vs. CyclinD1-COX+BPDE	p ≤ 0,001
Chr.11-BPDE vs. Chr.11-COX+BPDE	p ≤ 0,001
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: p ≤ 0,025	

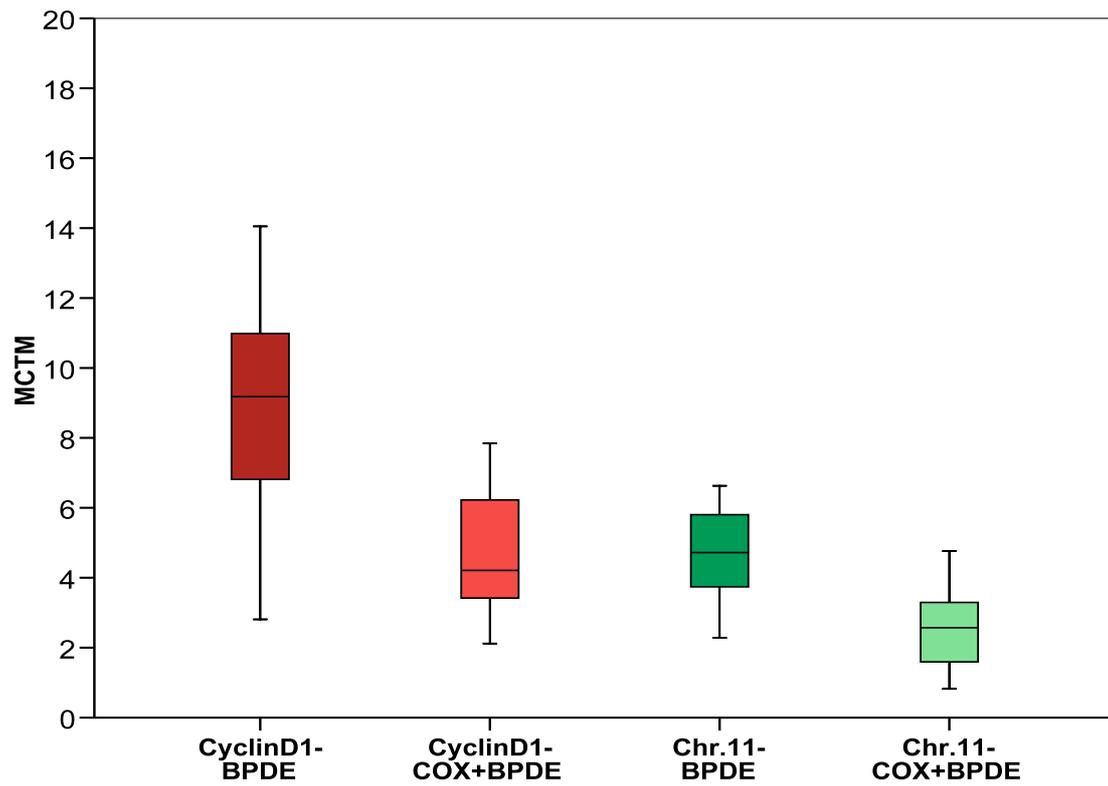


Abb. 25: Darstellung der BPDE induzierten DNA-Schädigung bei den mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] vorbehandelten Miniorgankulturen im Vergleich zu unbehandelten in der Karzinomgruppe (n = 15)

3.2.3 Vergleich der Patientengruppen mit und ohne Kopf-Hals-Karzinom

3.2.3.1 Vergleich der DNA-Schädigung mit BPDE zwischen den Patientengruppen mit und ohne Kopf-Hals-Karzinom

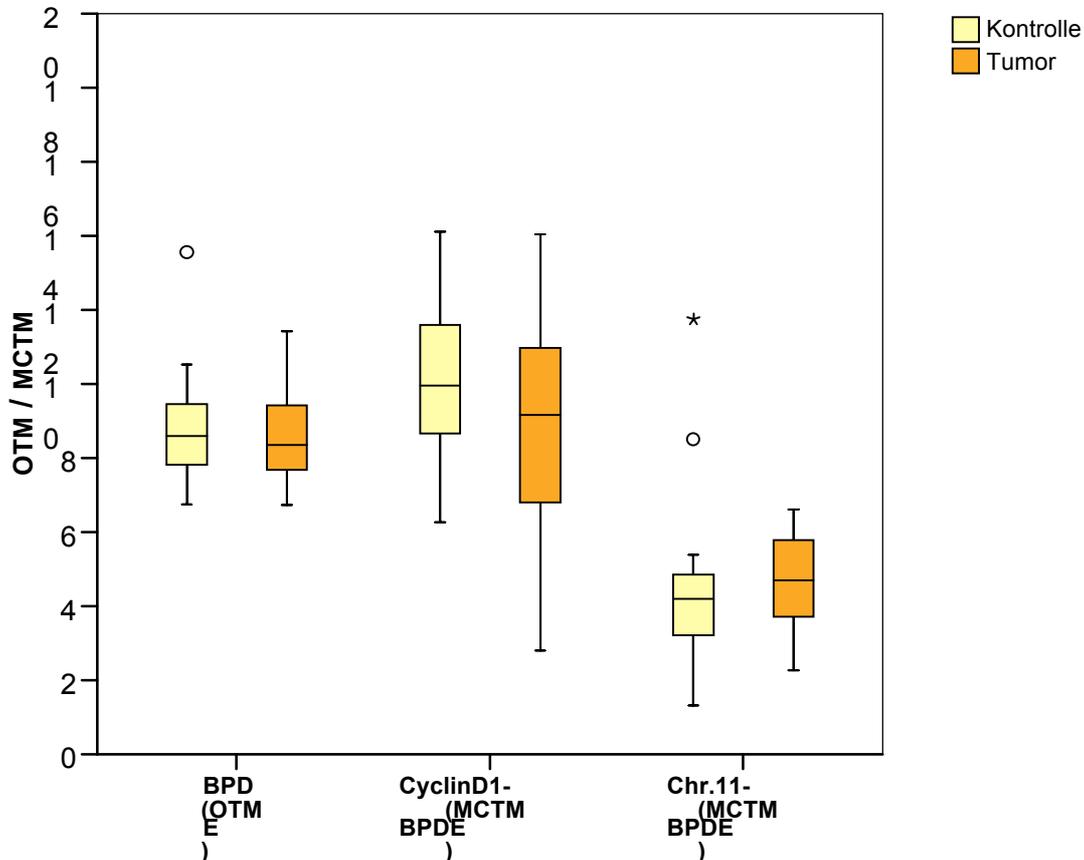


Abb. 26: Ausmaß der BPDE induzierten DNA-Schädigung bei Karzinompatienten (n = 15) und tumorfreien Patienten (n = 15)

Der OTM/MCTM der tumorfreien Patienten ergab Mittelwerte von 8,9 (OTM) für die Gesamt-DNA, 10,2 (MCTM) für das CyclinD1-Gen und 4,6 (MCTM) für das Zentromer von Chromosom 11. Bei den Karzinompatienten wurden OTM/MCTM-Mittelwerte von 8,6 (OTM) bei der Gesamt-DNA, 8,8 (MCTM) beim CyclinD1-Gen und 4,7 (MCTM) beim Zentromer von Chromosom 11 ermittelt. Die Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Stichproben ergab weder in der Schädigung der Gesamt-DNA, noch in der genetischen Schädigung des CyclinD1 bzw. des Zentromers von Chromosom 11 statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Karzinom- und der tumorfreien Patientengruppe (s. Tab.13).

Tab. 13: p-Werte im Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der BPDE induzierten Schädigung der Gesamt-DNA, des CyclinD1-Gens und des Zentromers von Chromosom 11 in der Karzinomgruppe mit der Schädigung in der tumorfreien Gruppe

Non-Tumor-BPDE vs. Tumor-BPDE	p = 0,820
Non-Tumor-CyclinD1-BPDE vs. Tumor-CyclinD1-BPDE	p = 0,237
Non-Tumor-Chr.11-BPDE vs. Tumor-Chr.11-BPDE	p = 0,395
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,017$	

3.2.3.2 Vergleich des Einfluß des COX-2-Inhibitors Celebrex® auf die DNA-Schädigung mit BPDE zwischen den Patientengruppen mit und ohne Kopf-Hals-Karzinom

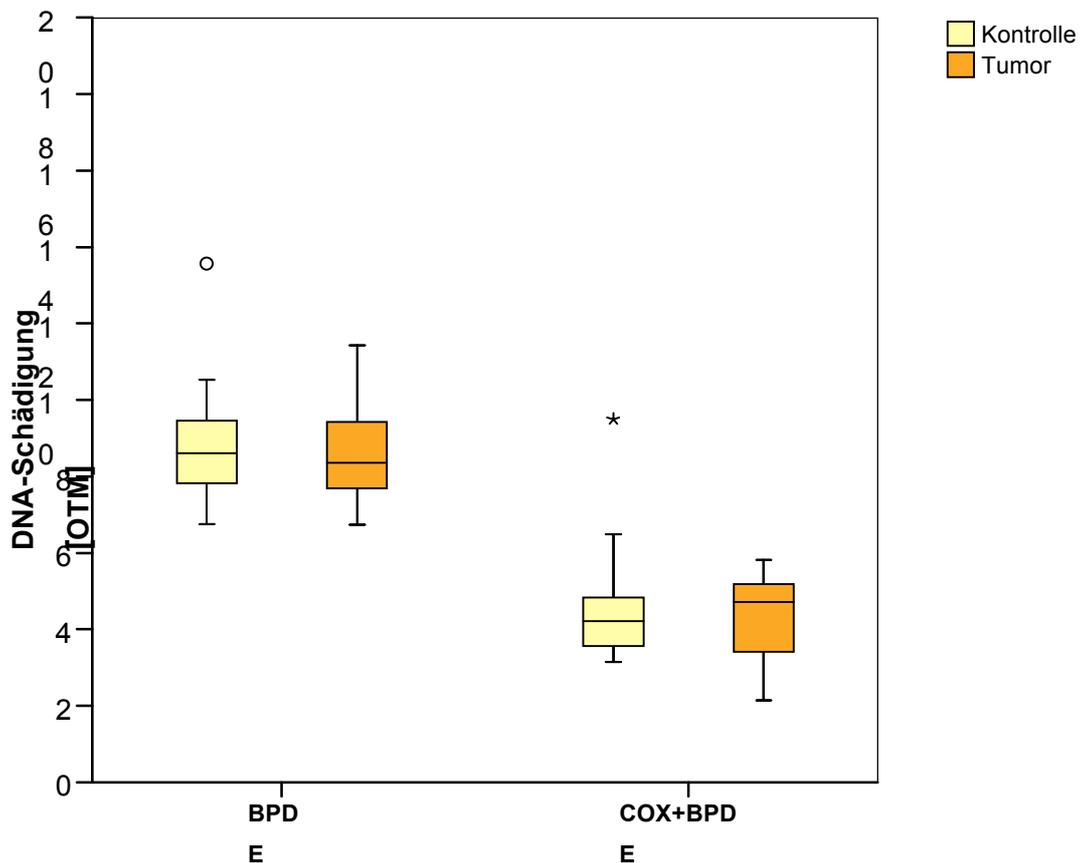


Abb. 27: Ausmaß des BPDE induzierten DNA-Gesamtschadens bei alleiniger Inkubation mit BPDE und nach Vorinkubation mit COX-2-Inhibitor Celebrex® in der tumorfreien Patientengruppe (n = 15) und der Karzinomgruppe (n = 15)

Der OTM nach BPDE-Schädigung ergab Mittelwerte von 8,9 in der tumorfreien Patientengruppe und 8,6 in der Karzinomgruppe. Nach Vorinkubation der Miniorgankulturen mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] lagen die OTM-Mittelwerte bei 4,6 in der tumorfreien Gruppe und bei 4,4 in der Karzinomgruppe. Die Durchführung des Mann-Whitney-U-Tests ergab in beiden Fällen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Karzinomgruppe und der tumorfreien Patientengruppe (s. Tab.14).

Tab. 14: p-Werte im Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der BPDE induzierten DNA-Schädigung mit und ohne Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] zwischen den Studiengruppen

Non-Tumor-BPDE vs. Tumor-BPDE	P = 0,820
Non-Tumor-COX+BPDE vs. Tumor-COX+BPDE	P = 0,756
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,025$	

Die OTM/MCTM-Mittelwerte in der Karzinomgruppe betragen 4,4 (OTM) für die Gesamt-DNA, 4,7 (MCTM) für das CyclinD1-Gen und 2,5 (MCTM) für das Zentromer von Chromosom 11. In der tumorfreien Patientengruppe lagen die OTM/ MCTM-Mittelwerte bei 4,6 (OTM) für die Gesamt-DNA, 4,2 (MCTM) für das CyclinD1-Gen und bei 2,9 (MCTM) für das Zentromer von Chromosom 11. Der Vergleich der Karzinomgruppe mit der tumorfreien Patientengruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ergab weder für die Gesamt-DNA, noch für das CyclinD1-Gen statistisch signifikante Unterschiede. Auch für das Zentromer von Chromosom 11 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Vergleich der beiden Patientengruppen (s. Tab.15 u. Abb. 28).

Tab. 15: p-Werte im Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich des Einflusses von COX-2-Inhibitor Celebrex[®] auf die BPDE-Schädigung der Gesamt-DNA, des CyclinD1-Gens und des Zentromers von Chromosom 11 zwischen der Karzinomgruppe und der tumorfreien Patientengruppe

Non-Tumor COX+BPDE vs. Tumor COX+BPDE	P = 0,756
Non-Tumor CyclinD1-COX+BPDE vs. Tumor CyclinD1-COX+BPDE	P = 0,663
Non-Tumor Chr.11-COX+BPDE vs. Tumor-Chr.11-COX+BPDE	P = 0,787
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,017$	

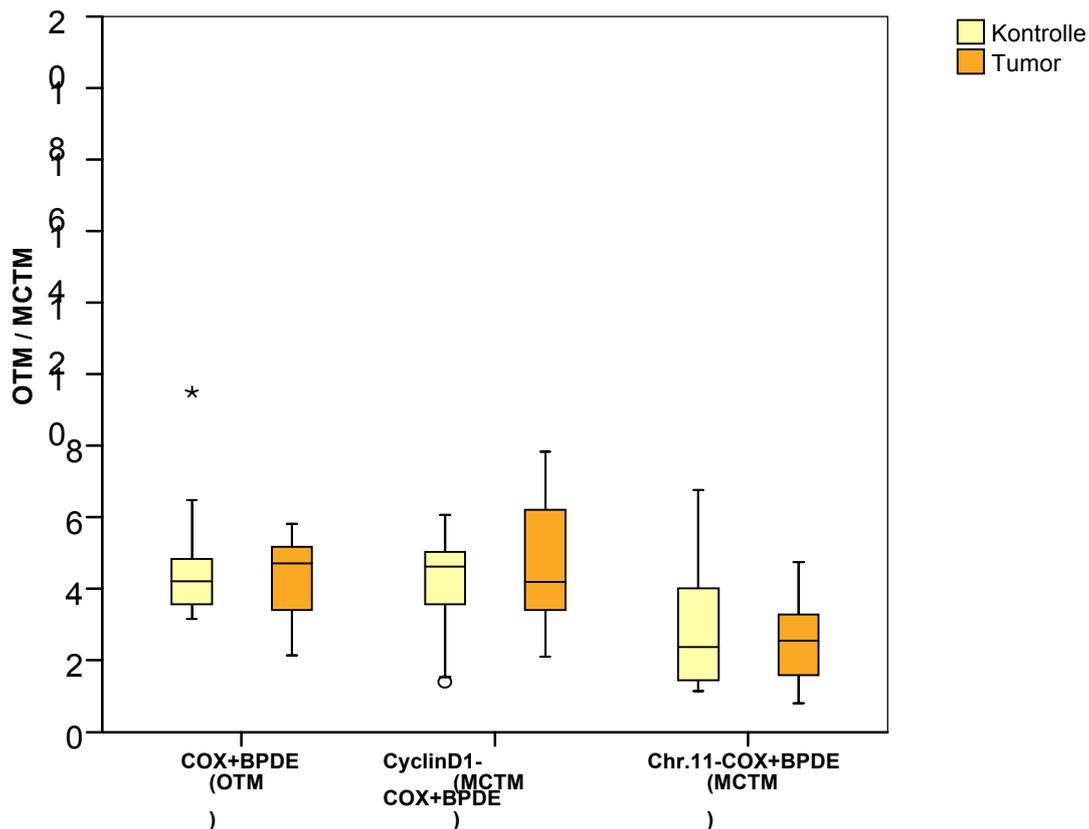


Abb. 28: Darstellung des Ausmaßes der Genotoxizität von BPDE an der Gesamt-DNA, dem CyclinD1-Gen und dem Chromosom 11 nach Vorbehandlung der Miniorgankulturen mit COX-2-Inhibitor Celebrex® bei Karzinompatienten (n = 15) und tumorfreien Patienten (n = 15)

In der Karzinomgruppe lagen die MCTM-Mittelwerte nach alleiniger Inkubation mit BPDE bei 8,8 für das CyclinD1-Gen und bei 4,7 für das Zentromer von Chromosom 11. Nach Vorbehandlung mit COX-2-Inhibitor Celebrex® ergab der MCTM in der Karzinomgruppe Mittelwerte von 4,7 für CyclinD1 und 2,5 für das Zentromer von Chromosom 11. In der tumorfreien Patientengruppe lagen die MCTM-Mittelwerte nach alleiniger Inkubation mit BPDE bei 10,2 für das CyclinD1 und bei 4,6 für das Zentromer von Chromosom 11. Der MCTM nach Vorbehandlung mit Celebrex® erbrachte hier Mittelwerte von 4,2 für das CyclinD1-Gen und 2,9 für das Zentromer von Chromosom 11. Mittels Mann-Whitney-U-Test konnten auch hier in keinem der Fälle ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Karzinom- und der Kontrollgruppe aufgezeigt werden (s. Tab.16 u. Abb. 29).

Tab. 16: p-Werte im Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der BPDE-Schädigung bei den mit Celebrex[®] vorbehandelten bzw. unbehandelten Miniorgankulturen zwischen Studiengruppen.

Non-Tumor CyclinD1-BPDE vs. Tumor CyclinD1-BPDE	P = 0,237
Non-Tumor CyclinD1-COX+BPDE vs. Tumor CyclinD1-COX+BPDE	P = 0,663
Non-Tumor Chr.11-BPDE vs. Tumor Chr.11-BPDE	P = 0,395
Non-Tumor Chr.11-COX+BPDE vs. Tumor Chr.11-COX+BPDE	P = 0,787
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur: $p \leq 0,013$	

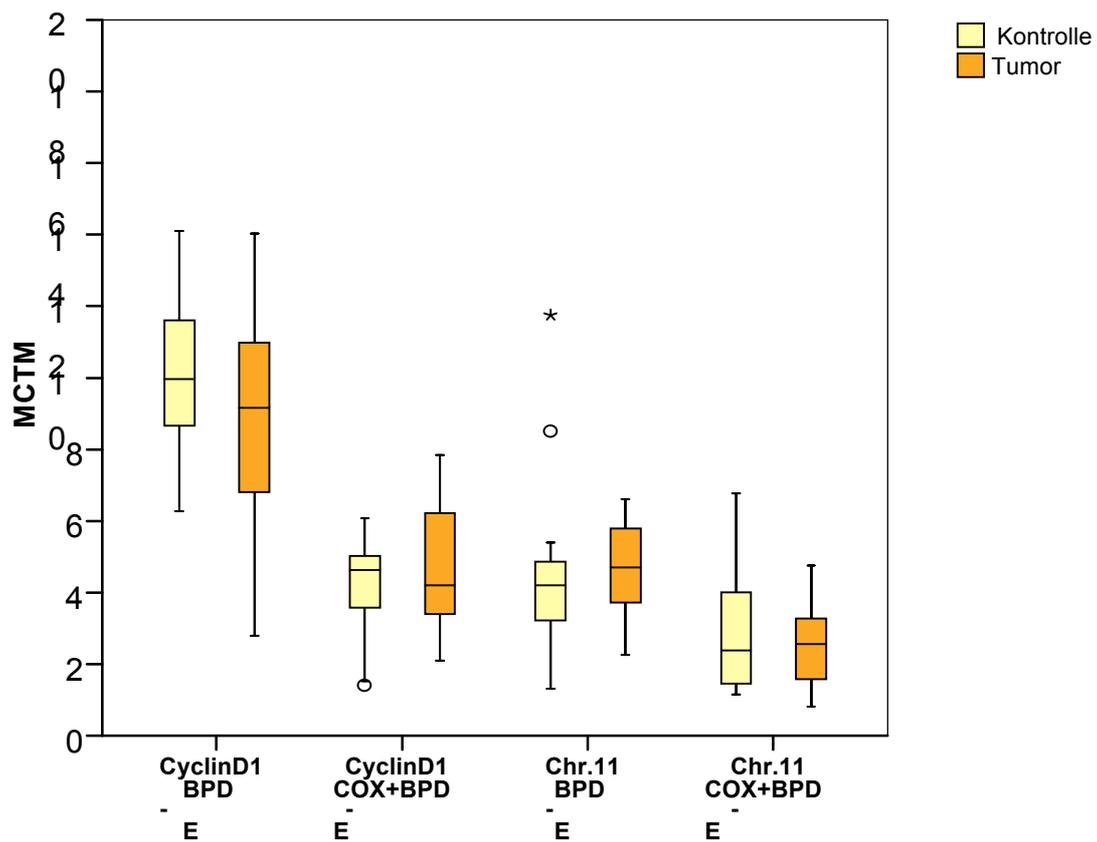


Abb. 29: Darstellung der BPDE induzierten DNA-Schädigung bei den mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] vorbehandelten Miniorgankulturen im Vergleich zu unbehandelten bei Karzinompatienten (n = 15) und tumorfreien Patienten (n = 15)

4 Diskussion

4.1 Patienten

4.1.1 Auswahl der Patienten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebeproben stammen von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität. Alle Patienten wurden zuvor über die Verwendung ihrer Proben für wissenschaftliche Zwecke schriftlich und mündlich aufgeklärt. Zur Vermeidung von kofaktoriellen Einflüssen auf die Untersuchungsergebnisse wurde ausschließlich das Gewebe von Patienten gewonnen, die neben der zur Operation indizierten Grunderkrankung keine weitere chronische Infektions- oder Systemerkrankung hatten.

4.1.2 Patienten als Spender von Oropharynxschleimhaut

Die Schleimhautzellen des Oropharynx tumorfreier Patienten konnten im Rahmen von Tonsillektomien aus schmalen Schleimhautstreifen gewonnen werden, die dem Operationsgebiet randständig anlagen. Die Tonsillektomien erfolgten zum einen aufgrund chronisch rezidivierender Entzündungen der Mandeln und zum anderen im Zusammenhang mit Mandelhyperplasien bei obstruktiven Schlafapnoen. Entzündungsbedingte Veränderungen der Gewebeproben können nicht vollkommen vermieden werden, es wurde jedoch versucht, den Eingriff im möglichst infektfreien Intervall durchzuführen. Die Patienten mit Oropharynxkarzinomen wiesen unterschiedliche Schweregrade und Stadien der Erkrankungen auf. Aufgrund der Zentrumsfunktion der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität für diese Erkrankungen, entsteht ein vergleichsweise hohes Aufkommen der zu behandelnden Fälle. Die Gewebeproben entstammten dabei von Operationen, die durch die Karzinomerkrankung indiziert waren. Diese wurden möglichst tumorfern im Gesunden entnommen. Insgesamt handelt es sich in dieser Arbeit ausnahmslos um erstdiagnostizierte Fälle ohne vorausgegangene Strahlentherapie und/oder Chemotherapie. Durch die Untersuchung mussten außerhalb des indizierten Operationsrahmens keine zusätzlichen Gewebeproben entnommen werden.

4.2 Diskussion der Methodik

4.2.1 Comet-Assay

Der alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay, kurz Comet-Assay stellt eine geeignete Methode zur Evaluierung DNA-schädigender Potentiale verschiedener Stoffgruppen dar. Die Untersuchung der DNA-Schäden findet dabei an Einzelzellen statt. Mit dem Comet-Assay wird der Nachweis von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und von Fragmenten die aus inkompletten DNA-Nukleotidexzisionsreparaturen stammen, ermöglicht [Speit und Hartmann, 1995]. Nach DNA-Schädigung durch genotoxische Substanzen entsteht eine DNA-Fragmentierung, die sich durch die Elektrophorese in einem „kometenartigen“ Bild mit intakter DNA im Kopf und geschädigter DNA im Schweif darstellen lässt. Die Wanderung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld weist eine Proportionalität zur induzierten Schädigung auf. Insgesamt stellt der Comet-Assay eine vielseitig einsetzbare Methode dar. Er ermöglicht neben der Genotoxizitätsprüfung von Substanzen, die Untersuchung von DNA-Reparaturkapazitäten und findet auch im Biomonitoring gehäuft Anwendung [Speit und Hartmann, 2006].

4.2.2 Comet-FISH

Für die Umwandlung einer gesunden Zelle in eine maligne Tumorzelle ist eine singuläre Schädigung der DNA meist nicht ausreichend, es handelt sich vielmehr um einen „*multistep process*“, bei dem die Akkumulation einer Vielzahl von Alterationen im genetischen Material notwendig ist [Califano et al., 1996]. Gesunde Zellen besitzen ein ausgewogenes Verhältnis an Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, die die Regulation der Zellzyklusfunktion positiv beeinflussen. Durch die Anhäufung von genetischen Alterationen, die zu einer Aktivierung von Onkogenen oder einem Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene führen, wird jedoch die Grundlage für eine Karzinomentstehung geschaffen [Luch, 2001; Hanahan und Weinberg, 2000]. Eine Onkogenaktivierung kann durch die Bildung von DNA-Addukten, chromosomalen Transformationen und Inversionen bedingt sein. Die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene hingegen wird durch eine DNA-Reduzierung, wie zum Beispiel durch einen Allelverlust ausgelöst [Copper et al., 1995].

Die Lokalisierung solcher Veränderungen verlangt Techniken, die den Nachweis genetischer/chromosomaler Alterationen ermöglicht. Darauf basierend wurde der Comet-Assay mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) kombiniert und in der vorliegenden Arbeit für die Beantwortung der verschiedenen Fragestellungen an humanen Schleimhautzellen eingesetzt.

Die Kombination des Comet-Assay mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) wurde bereits in der Vergangenheit von McKelvey-Martin et al. für die Markierung von p53 in Lymphozyten eingesetzt [McKelvey-Martin et al., 1998]. Eine weitere Arbeitsgruppe konnte an Pflanzenzellen mit der kombinierten Methode den Stellenwert verschiedener chromosomaler Domänen bei der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch mutagene Substanzen nachweisen [Menke et al., 2000]. Der Comet-FISH fand zudem Anwendung bei der Untersuchung der Mutagensensitivität von Chromosom 1, 3, 5 und 8 an humanen Schleimhautzellen im Zusammenhang mit der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen [Harréus et al., 2004]. Desweiteren konnte in einer Studie von Escobar et al. gezeigt werden, dass mit Hilfe des Comet-FISH schädigende Einflüsse verschiedener Chemotherapeutika auf spezifische Chromosomenregionen, die bei Leukämieentstehungen beteiligt sind, nachweisbar waren [Escobar et al., 2007]. Im Rahmen der onkologischen Forschung kann der Comet-FISH genutzt werden, um eine genetische Instabilität im HER2/neu- sowie im p53-Genlocus bei Mammakarzinomen nachzuweisen [Kumaravel und Bristow, 2005].

4.2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die in situ Hybridisierung mit radioaktiv markierter DNA wurde erstmals 1969 von Pardue und Gall beschrieben, bevor im Jahre 1986 Pinkel et al. einen fluoreszierenden Farbstoff anstelle eines Radionuklids verwendete [Pardue und Gall, 1969; Pinkel et al., 1986]. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung stellt eine geeignete Methode zur Aufdeckung von Alterationen in Chromsomen oder Chromosomenanteilen (Gene) dar. Im Unterschied zur klassischen zytogenetischen Analytik liegen die Vorteile der Fluoreszenz in situ Hybridisierung in einer kürzeren Prozessdauer und sie verfügt zusätzlich über eine höhere Sensitivität und Spezifität [Jain, 2004].

Während bei Comet-FISH die Interphase-DNA und damit die Anzahl von Chromosomen bzw. bestimmter chromosomaler Anteile (Gene) untersucht wird, können bei Metaphase-FISH strukturelle DNA-Veränderungen, wie z.B. Inversion, Deletion

und Transformation dargestellt werden [Jain, 2004]. Die Anwendungsgebiete der Fluoreszenz in situ Hybridisierung in der medizinischen Diagnostik sind weitreichend. Neben der Diagnostik viraler Infektionen [Ohshima et al., 2002], ermöglicht die FISH auch zytogenetische Untersuchungen. In der pränatalen Diagnostik können somit z.B. Trisomie 13, 18 und 21 rasch und mit einer hohen Sensitivität und Spezifität entdeckt werden [Ogilvie, 2003]. Aber auch in der Präimplantationsdiagnostik [Sermon et al., 2004] und bei der Aufdeckung hereditärer Gendefekte bei Kindern [Stefanou et al., 2002] spielt FISH eine entscheidende Rolle. Im onkologischen Bereich ist Comet-FISH/FISH vielseitig einsetzbar, da die meisten Genloci, die im Verdacht stehen an der Karzinogenese wesentlich beteiligt zu sein, bis zu einer minimalen Größe von 1 kB angefärbt werden können [Teixeira, 2002].

4.3 DNA-Schäden durch Benz(a)pyren-7,8-diol-9,10-epoxid

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) liegen in der Luft an Feinstaubpartikel gebunden vor und werden über Inhalation und Ingestion in den Körper aufgenommen. Sie entstehen u.a. bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe und sind insbesondere im Tabakrauch enthalten. Die Schleimhäute des oberen Aerodigestivtrakts stellen dabei das erste Kontaktorgan und die wichtigste Lokalisation für die tabakassoziierte Karzinogenese dar [Hoffmann und Wynder, 1999]. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen in der Umwelt zählen die PAH zu den bedeutendsten Karzinogenen für den Menschen [Akin et al., 1976; DeMarini, 2004]. Das Benz(a)pyren wird als Leitsubstanz der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe angesehen und von der IARC seit 2007 als Gruppe 1-Kanzerogen, d.h. sicher krebserregend für den Menschen, eingestuft [IARC Monograph Vol. 92, 2007].

Erst im menschlichen Organismus erfährt das Benz(a)pyren eine Biotransformation über Cytochrom-P450-abhängige Peroxidasen in die eigentlichen kanzerogen wirksamen Metabolite. Im Mittelpunkt des Interesses steht dabei die Entstehung von BPDE, einem hochreaktiven Dihydrodiolepoxid. Die kovalente Bindung des BPDE an verschiedene Basen, bevorzugt an Desoxyguanosin bewirkt eine stabile Bildung von DNA-Addukten [Luch, 2001]. Durch eine inkomplette Nukleotidexzisionsreparatur kann es in der nächsten Replikationsphase der DNA zu Einzelstrangbrüchen, Mutationen und Gendelektionen kommen. Diese können in kritischen Regionen eine Aktivierung von Protoonkogenen bzw. eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen

auslösen und somit zur Kanzerogenese beitragen [Liang et al., 2003; Harréus et al., 2004].

In epidemiologischen Untersuchungen wurde eine Korrelation zwischen der Ingestion von BPDE und der Karzinomentstehung bei Mäusen festgestellt [Culp and Beland, 1994]. Auch nach inhalativer Aufnahme von Benz(a)pyrenen konnte tierexperimentell ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Malignomen gezeigt werden [Ketkar et al., 1978].

Genotoxische und mutagene Effekte von Benz(a)pyrenen und dem Metabolit BPDE sind ebenfalls an Säugern und humanen Zellsystemen untersucht worden [Conney et al., 1994]. Die Arbeitsgruppe von Wei et al. konnte an humanen Lymphozyten eine Assoziation von BPDE mit einem erhöhten Lungenkrebsrisiko feststellen [Wei et al., 1996]. In einer weiteren Studie führte BPDE zu einer vermehrten COX-2-Expression und einer retinoic acid receptor- β (RAR β)-Inhibition in humanen Epithelzellen des Ösophagus, welche dadurch möglicherweise zur Karzinomentstehung in diesem Bereich beiträgt [Song and Xu, 2001; Song et al., 2005]. Eine Kurzbehandlung humaner Fibroblasten mit BPDE führte zu DNA-Addukten und Strangbrüchen. BPDE bewirkte dabei ein konzentrationsabhängiges Ansteigen der DNA-Migration im Comet-Assay [Hanelt et al., 1997]. Auch an humanen Miniorgankulturen von Nasenschleimhaut wurden nach BPDE-Inkubation signifikante DNA-Schäden nachgewiesen [Wallner et al., 2005].

4.4 CyclinD1

Das Protein des in der vorliegenden Arbeit ausgewählten CyclinD1-Gens spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Zellzyklusprogression in der späten G1-Phase, beim Fortschreiten des Zellwachstums und der Zellproliferation und bei der Modulation der Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Angesichts der Komplexität der CyclinD1-Funktionen scheint es nicht überraschend, dass Alterationen im CyclinD1-Gen durchaus eine wichtige Rolle bei der malignen Transformation von Zellen und somit in der Kanzerogenese spielen [Coqueret, 2002].

Die ersten Hinweise dafür, dass CyclinD1 als Onkogen fungieren kann, lieferte die Studie von Hinds et al. Sie konnten zeigen, dass ein cDNA-Klon des CyclinD1-Gen zusammen mit einem defekten Adenovirus E1A Onkogen eine maligne Zelltransformation bewirkte [Hinds et al., 1994]. Eine Kooperation des CyclinD1 mit

verschiedenen Onkogenen wie dem Myc oder dem Ras, die zu einer Induktion von Tumoren in Mäusen und zu einer Zelltransformation in kultivierten Zellen führte, konnte ebenfalls nachgewiesen werden [Coqueret et al., 2002].

Durch die Einwirkung kanzerogener Faktoren auf das menschliche Genom entstehen DNA-Schäden, die bei fehlenden DNA-Reparatur- und Apoptosemechanismen zu einer stabilen Mutation führen können. Die Akkumulation weiterer genetischer Veränderungen bewirkt über mehrere Zwischenstufen die Transformation einer gesunden Zelle in eine maligne Tumorzelle [Luch, 2001; Hardisson, 2003]. Betrifft die Mutation ein Protoonkogen, wie das CyclinD1, welches normalerweise regulierend auf den Zellzyklus einwirkt, wird dieses zum Onkogen aktiviert. Durch die möglicherweise daraus resultierende Gen-Amplifikation und/oder Überexpression des Onkoproteins entstehen nachfolgend unkontrollierte Zellwachstums- und Differenzierungsprozesse, die eine tumorogene Entartung der Zelle unterstützen [Thomas et al., 2005; Sudbø, 2004].

Rearrangements, Amplifikationen und/oder vermehrte Expressionen des CyclinD1-Gens und seine überexprimierte mRNA wurde bei einer Vielzahl humaner Tumoren wie den B-Zell-Lymphomen, Adenomen der Nebenschilddrüse, Mammakarzinomen, Kolonkarzinomen, Lungenkarzinomen, Blasenkarzinomen, Leberkarzinomen und den Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes nachgewiesen. Izzo et. al sowie Bartkova et al. postulierten, dass eine Dysregulation im Sinne einer CyclinD1-Überexpression ein frühes Ereignis bei der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen darstellt. Die Überexpression des CyclinD1 konnte bereits im gesunden und im prämaligen Gewebe von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen aufgezeigt werden [Bartkova et al., 1995; Izzo et al., 1998].

Insgesamt führten die Alterationen des CyclinD1 zu einer Verkürzung der G1-Phase des Zellzyklus und zu einer Reduktion der Mitogen-abhängigen Zellproliferation [Hardisson, 2003]. Die Arbeitsgruppe von Tashiro et al. konnte nachweisen, dass das CyclinD1 als Onkogen das unkontrollierte Wachstum, die Angiogenese über vermehrte Produktion des *Vascular Endothelial Growth Factors* (VEGF) und eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika sowie eine verminderte Apoptose über eine erniedrigte Fas-Expression hervorrufen kann. Es wurde ebenso demonstriert, dass eine Überexpression von CyclinD1 in Fibroblasten von Nagetieren über eine Erhöhung der *Fibroblast Growth Factor Receptor Expression* (FGFR-1 und -2) eine Tumorprogression bewirken kann [Tashiro et al., 2007]. In der Summe der Ereignisse

wird den Zellen dadurch die Möglichkeit der malignen Entartung und des tumorösen Wachstums verliehen.

Eine Amplifikation des Onkoproteins wurde bei 26-39%, eine Überexpression hingegen bei 35-64% der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen gefunden [Hardisson, 2003]. Die Genamplifikation und/oder Überexpression des CyclinD1 korreliert mit der Ausdehnung des Tumorbefalls, der lokalen Invasivität, dem Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen und dem Tumorstadium bei Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs. Einige weitere Studien konnten belegen, dass Alterationen des CyclinD1 auch als prognostische Marker hinsichtlich des Überlebens dienen können. Eine erhöhte CyclinD1-Expression geht dabei mit einer insgesamt schlechteren Prognose, einem verkürzten krankheitsfreien Intervall und einem verminderten Langzeitüberleben einher [Kalish et al., 2004; Thomas et al., 2005].

Durch seine potentielle Rolle bei der Genese von Plattenepithelkarzinomen stellt das CyclinD1 einen wertvollen Biomarker und einen möglichen präventiven sowie therapeutischen Angriffspunkt dar [Arber et al., 1997]. Ein möglicher Therapieansatz stellt die sog. Antisense-Methode bzw. eine Antikörper-Mikroinjektion dar. Die Anwendung dieser Methode führte in verschiedenen humanen Karzinomzelllinien, in denen CyclinD1 amplifiziert und überexprimiert vorlag zu einer Rückbildung der tumorigenen Eigenschaften der Zelllinien. Durch die intrazelluläre Expression einer Antisense-CyclinD1 cDNA kam es dort zu einer verminderten endogenen CyclinD1-Expression, zu einer Hemmung des unkontrollierten Zellwachstums und einem Verlust der Karzinogenität dieser Zelllinien bei Mäusen [Arber et al., 1997; Tashiro et al., 2007]. Zusätzlich konnte mittels dieser Methode auch eine erhöhte Chemosensitivität gegenüber Therapeutika wie z.B. dem Cisplatin an Tumorzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs demonstriert werden [Nakashima and Clayman, 2000].

Desweiteren wurde in einer Studie von Chan et al. gezeigt, dass durch den Einsatz von COX-2-Inhibitor Celecoxib eine zeit- und dosisabhängige Wachstumshemmung der Zelllinien von Nasopharynxkarzinomen über eine verminderte Expression von CyclinD1 und einem konsekutiven Zellzyklusarrest in der G1-Phase hervorgerufen werden kann [Chan et al., 2005].

4.5 Verwendung des COX-2-Inhibitors Celebrex®

Selektiven COX-2-Inhibitoren wie dem Celecoxib (Celebrex®) werden chemopräventive Effekte zugeschrieben. Unter dem Begriff der Chemoprävention versteht man dabei den Versuch, durch Einzel- oder Kombinationssubstanzen bei erhöhtem karzinogenem Risiko die Entstehung von Malignomen im Vorfeld zu verhindern, ihr Fortschreiten zu verzögern oder gänzlich zu stoppen. Dabei werden für die chemopräventive Wirkung oftmals viel geringere Konzentrationen als im Rahmen der antiinflammatorischen und analgetischen Therapie benötigt [Kismet et al., 2004; Matthias, 2005].

Eine COX-2-Überexpression bzw. eine vermehrte mRNA konnte bei einer Vielzahl von humanen Tumoren, wie den Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes, den kolorektalen Karzinomen, den urogenitalen Karzinomen, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, dem Glioblastom sowie dem Astrozytom und bei Mammakarzinomen gefunden werden. Diese scheint eine wichtige Rolle in der Kanzerogenese sowie in der pathophysiologischen Progression der Karzinome zu spielen. Auch in prämaligen Läsionen lässt sich bereits eine Überexpression von COX-2 nachweisen, was für ein frühes Ereignis während der Karzinomentstehung spricht [Gasparini et al., 2003; Sudbo, 2004].

Die COX-2-Expression kann durch viele verschiedene Stimuli wie Zytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren, Onkogene und Tumorpromotoren wie dem Benz(a)pyren induziert werden [Thomas et al., 2005; Matthias et al., 2006]. Bei Kopf-Hals-Karzinomen weisen 70-88% der Patienten eine COX-2-Überexpression auf [Thomas et al., 2005]. Diese ist mit einer insgesamt schlechteren Prognose vergesellschaftet. Die erhöhte Expression der COX-2 korreliert mit einem erhöhten Lymphknotenmetastasierungsrisiko, einem aggressiverem Wachstumsverhalten und einer schlechteren 5-Jahres-Überlebensrate [Blanke and Masferrer, 2003; Chen et al., 2005].

Chemoprotektiv wirken COX-2-Inhibitoren wie das Celecoxib beispielsweise über die Hemmung der Cyclooxygenase-2-Aktivität. Hierdurch wird die Zellproliferation, Metastasierung und die Angiogenese gehemmt, die mutagenen Eigenschaften exogener Karzinogene abgeschwächt und ein funktionierendes Immunsystem wieder hergestellt [Grösch et al., 2006]. In einigen Studien wurde zusätzlich eine Reihe von COX-2-unabhängigen Mechanismen der Kanzerogenesehemmung beschrieben. Mehrere Arbeitsgruppen konnten nachweisen, dass eine Behandlung verschiedenster

Tumorzelllinien mit Celecoxib einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase und somit eine Hemmung der weiteren Zellzyklusprogression induzierte [Narayanan et al., 2003; Chan et al., 2005; Grösch et al., 2006; Li et al., 2008]. Desweiteren wurde eine Modifikation der Zellzyklus regulierenden Proteine durch Celecoxib beobachtet. Eine verminderte Expression von Cyclin D1, A und B und eine gleichzeitig erhöhte Expression der Zellzyklusinhibitoren p21 und p27 kann so möglicherweise eine Wachstumshemmung der Tumorzellen bewirken. Auch Narayanan et al. wiesen einen hemmenden Effekt von Celecoxib auf die DNA-Synthese und eine zusätzliche Apoptoseinduktion in Prostatakarzinomzellen bei Ratten nach [Narayanan et al., 2003]. In zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Studien konnte ebenfalls eine chemopräventive Wirkung von COX-2-Inhibitoren in verschiedensten Tumorentitäten bestätigt werden. In einer Arbeit von Grösch et. al. wies Celecoxib einen antiproliferativen Effekt in humanen Kolonkarzinomzelllinien *in-vitro* und *in-vivo* auf [Grösch et al., 2001].

In bereits abgeschlossenen präklinischen und noch andauernden klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Kombination der COX-2-Inhibitoren mit anderen Modalitäten der Krebstherapie (Radiotherapie, Chemotherapie, Hormontherapie) bzw. mit neueren Therapiestrategien wie dem EGFR-Tyrosinkinase-Rezeptorinhibitor eine vielversprechende additive und synergistische Wirkung bei guter Verträglichkeit aufweist [Saha and Choy, 2003; Gasparini et al., 2004; Zhang et al., 2005].

Die Untersuchung einer protektiven Wirkung von Celebrex[®] auf die Gesamt-DNA und auf bestimmte Gene, die ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit war, wurde in der bisherigen Literatur jedoch kaum thematisiert. Lediglich unsere Arbeitsgruppe beschrieb bisher einen antimutagenen Effekt durch die Verwendung von Celecoxib in Verbindung mit oxidativem Stress [Matthias et al., 2006].

Um den klinischen Bezug zu bewahren und da der Reinstoff von Celebrex[®], das Celecoxib uns nicht zur Verfügung gestellt wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit bei der Durchführung der Versuche das fertige Medikament eingesetzt (Liste aller Inhaltsstoffe siehe 2.3.4). Dabei können kofaktorielle Einflüsse nicht gänzlich ausgeschlossen werden, wenngleich wir solche für unwahrscheinlich halten.

4.6 Diskussion der Ergebnisse

4.6.1 Mutagensensitivität des CyclinD1-Gens als endogener Risikomarker

Unter der Mutagensensitivität versteht man die individuelle Empfindlichkeit eines Patienten gegenüber einer Fremdstoffexposition [Cloos et al., 1996]. Aufgrund seiner Eigenschaften als primäres Kontaktorgan für Xenobiotika wurden in der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie oropharyngeale Schleimhautzellen als Testmaterial gewählt.

Die Patientengruppe mit erstdiagnostiziertem Oropharynxkarzinom wurde der tumorfreien Patientengruppe gegenüber gestellt. Bei beiden Gruppen wurde die DNA der oropharyngealen Schleimhautzellen mittels Comet-FISH untersucht. Dabei lies sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Fragmentierung der Gesamt-DNA durch BPDE zwischen beiden Spendergruppen feststellen. Diese Ergebnisse waren somit übereinstimmend mit denen aus vorausgegangenen Studien zur Mutagensensitivität der Gesamt-DNA von Lymphozyten und Schleimhautzellen aus Miniorgankulturen [Kleinsasser et al., 2001; Harréus et al., 2004]. Im Gegensatz dazu konnte in einigen früheren Studien an Lymphozyten eine erhöhte Mutagensensitivität bei Fremdstoffexposition festgestellt werden. Die Arbeitsgruppe von Wu et al. berichtete in diesem Zusammenhang über eine erhöhte Mutagensensitivität als endogenen Risikomarker für prämaligne Läsionen des Kopf-Hals-Bereichs, nachdem sie Lymphozyten mit BPDE und Bleomycin geschädigt hatten [Wu et al., 2002]. Eine erhöhte Sensitivität von Lymphozyten gegenüber Bleomycin sowie BPDE konnte auch bei Patienten mit Lungenkarzinomen nachgewiesen und als Biomarker für das Auftreten von Zweitmalignomen nach Karzinomen des oberen Aerodigestivtrakts beschrieben werden [Cloos et al., 2000; Wu et al. 2007]. Es scheint demnach eine Abhängigkeit der Ergebnisse zur Mutagensensitivität von der verwendeten Zellart zu geben. Diese Unterschiede ergeben sich möglicherweise dadurch, dass die Schleimhautzellen von Miniorgankulturen im Gegensatz zu Lymphozyten metabolische Kompetenzen besitzen und daher dem *in vivo*-Modell sehr viel näher kommen [Kleinsasser et al., 2004].

In Anlehnung an vorausgegangene Studien, bei denen eine signifikante Erhöhung der Mutagensensitivität auf chromosomaler Ebene sowie bestimmter Chromosomenloci belegt werden konnte, wurde in der vorliegenden Arbeit speziell die Mutagensensitivität eines Gens, nämlich die des CyclinD1-Gens untersucht. Harréus et al. zeigten in einem zu dieser Arbeit analogen Versuchsaufbau, eine erhöhte Sensitivität für die Chromosomen 5 und 8 nach BPDE-Exposition in makroskopisch gesunder Schleimhaut

von Patienten mit Oropharynxkarzinomen [Harréus et al., 2004]. An Lymphozyten wurde ebenfalls eine erhöhte Sensitivität des Genlocus 3p21.3 nach DNA-Schädigung mit BPDE als möglicher prognostischer Marker für die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich nachgewiesen [Wu et al., 2002; Zhu et al., 2002]. Auch bei der Entstehung von Blasenkarzinomen konnte ein empfindlicher Genlocus 9p21 in Lymphozyten entdeckt werden, nachdem sie mittels BPDE geschädigt wurden [Hazra et al., 2004].

Die DNA-Fragmentierung des CyclinD1-Gens war bei beiden Patientengruppen vergleichbar. Es konnte somit kein signifikanter Unterschied der Mutagensensitivität nach Schädigung mit BPDE im CyclinD1-Gen ausgemacht werden. Die Untersuchungsergebnisse innerhalb der Gruppen erbrachten ebenfalls eine vergleichbare DNA-Fragmentierung in der Gesamt-DNA und im CyclinD1. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Mutagensensitivität des CyclinD1-Gens als endogener Risikomarker in der Pathogenese der Kopf-Hals-Karzinome wohl eher keine Rolle spielt. Auch die Wahrscheinlichkeit, dass eine individuell erhöhte Mutagensensitivität des CyclinD1-Gens zu vermehrten Mutation sowie Amplifikation und/oder Überexprimierung beiträgt, die im Karzinomgewebe aber auch bereits im benachbarten gesunden bzw. dysplastischen Gewebe nachweisbar ist, scheint eher gering zu sein.

4.6.2 Ausschluss einer genotoxischen Wirkung des COX-2-Inhibitors

Celebrex[®]

Nach dreimaliger Inkubation der oropharyngealen Schleimhautzellen mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] in einer Konzentration von 0,1µg/ml, konnte in beiden Patientengruppen keine signifikante DNA-Fragmentierung ermittelt werden. Eine genotoxische Wirkung des Celebrex[®] auf die Miniorgankulturen konnten in unserem Versuchsaufbau ausgeschlossen werden. Damit konnten bereits bestehende Ergebnisse zum Ausschluss einer Genotoxizität von Celebrex[®] bestätigt werden [Matthias et al., 2006].

Grundlage für die Wahl der Konzentration und die Häufigkeit, mit der die Medikamenteninkubation stattfinden sollte, lieferten Untersuchungsergebnisse von Matthias et al., bei denen eine mehrmaligen Vorinkubation mit Celebrex[®] in einer Konzentration von 0,1µg/ml zu einem kumulativ-protektiven Effekt auf

nasopharyngeale Schleimhautzellen von Miniorgankulturen geführt hat [Matthias et al., 2006].

4.6.3 Genoprotektiver Effekt des Celebrex[®]

Analog zur Untersuchung der Mutagensensitivität unter 4.6.1., wurde auch hier die DNA der oropharyngealen Schleimhautproben von Tumorpatienten und Kontrollen mit Hilfe von Comet-FISH untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Vorinkubation der Miniorgankulturen mit COX-2-Inhibitor Celebrex[®] und die anschließenden BPDE-Schädigung im Gegensatz zur alleinigen Inkubation der Miniorgankulturen mit BPDE zu einer signifikant verminderten DNA-Schädigung geführt hat. Diese genoprotektive Wirkung des Celebrex[®] konnte sowohl in der Gesamt-DNA als auch im CyclinD1-Gen sowie im Zentromer des Chromosoms 11 aufgezeigt werden. Zwischen der Tumor- und der Kontrollgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied; bei beiden Gruppen verringerte sich die DNA-Fragmentierung nach der Vorbehandlung mit Celebrex[®] gleichermaßen.

Diese Ergebnisse lassen sich zum einen dadurch erklären, dass das Celecoxib (Celebrex[®]) einen Einfluss auf die Glutathion-S-Transferase, ein wichtiges Entgiftungsenzym für endogene, aber auch exogene elektrophile Stoffe wie dem BPDE, nimmt. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass die Verwendung des COX-2-Inhibitors Celecoxib zu einer signifikant erhöhten mRNA-Expression der Glutathion-S-Transferase sowie zu einer vermehrten Aktivität dieses Enzyms in humanen Tumorzelllinien und in Gewebeproben von Ratten geführt hat [Mehar et al., 2008; Gupta et al., 2007]. Einen hohen Stellenwert bei der Inaktivierung des BPDE wird der Glutathion-S-Transferase zu geschrieben. Sie katalysiert die Konjugation des Elektrophils mit Glutathion und ermöglicht so die nachfolgende Exkretion [Myllynen et al., 2007]. In einer Studie von Weng et al. konnte nachgewiesen werden, dass durch die Transfektion und die dadurch bedingte Überexpression der Glutathion-S-Transferase-M2 in humanen Zelllinien von Lungenkarzinomen eine BPDE induzierte Adduktbildung und somit die Schädigung der DNA wirkungsvoll reduziert werden konnte [Weng et al., 2005]. Desweiteren wurde an transgenen Zelllinien von Hamstern eine nahezu vollständige Verhinderung der BPDE induzierten DNA-Adduktbildungen durch die humane Glutathion-S-Transferase-P1 demonstriert [Kushman et al., 2007].

Genetisch epidemiologische Studien bezüglich Glutathion-S-Transferase-Polymorphismen geben Hinweise darauf, dass veränderte Expressionen oder Allelvariationen der Glutathion-S-Transferase möglicherweise mit einem erhöhten Risiko der Entstehung verschiedener Tumoren vergesellschaftet sind [Kushman et al., 2007; Pljesa-Ercegovac et al., 2008]. In Tiermodellen führte eine Induktion der Glutathion-S-Transferase durch chemopräventive Substanzen zu einer verminderten chemisch induzierten DNA-Schädigung und einer Hemmung der Kanzerogenese [Talalay et al., 1995; Kushman et al., 2007].

Ein weiterer möglicher Erklärungsansatz für den genoprotektiven Effekt des Celebrex[®] liegt in der Fähigkeit des Medikaments antioxidativ zu wirken. Mehrere Arbeitsgruppen haben einen DNA schädigenden Mechanismus des BPDE über kovalente Bindungen aber auch über Oxidation beschrieben [Wei et al., 1996; Wang et al., 1998; Kleinsasser et al., 2004]. Der Nachweis einer antioxidativen Wirkungsweise des Celebrex[®] konnte bereits in vorangegangenen *in vitro*-Studien u.a. an nasopharyngealen Schleimhautzellen von Miniorgankulturen erbracht werden [Ajith et al., 2005; Matthias et al., 2006].

Zudem deuten die Ergebnisse der Arbeit darauf hin, dass zusätzlich zu den bereits bekannten Einflüssen des COX-2-Inhibitors auf die Immunabwehr, Neoangiogenese und die Zellproliferation ein möglicher, direkt antimutagener Wirkungsmechanismus dieser Substanz besteht. Untersuchungsergebnisse der *in vitro*-Studie an Bakterienstämmen (*Salmonella typhimurium*) von Ajith et al. konnten eine antimutagene Aktivität von Celecoxib gegenüber direkt mutagen wirkenden Stoffen sowie gegenüber Substanzen, die erst eine Aktivierung benötigen, nachweisen. Die Verwendung von Celecoxib führte auch hier zur Verhinderung von Frameshift-Mutationen durch NDPA (4-Nitro-o-phenylendiamin) und zu einer signifikanten Verminderung der Bindung des Addukt-bildenden Mutagens MNNG (N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin) an die DNA [Ajith et al., 2005]. Dass BPDE neben der Adduktbildung auch Frameshift-Mutationen induzieren kann, wurde in der Arbeit von Xie et al. beschrieben [Xie et al., 2003]. In Anlehnung an diese Erkenntnisse vorhergehender Studien, verhindert so möglicherweise auch hier die Anwendung des Celebrex[®] direkt eine Anlagerung des BPDE an die DNA sowie eventuelle Frameshift-Mutationen, was die signifikante Verringerung der DNA-Schädigung in dieser Arbeit ebenfalls erklären würde.

5 Zusammenfassung

Bösartige Tumore des Mund- und Rachenraums stehen bei den Männern an 7. Stelle der Häufigkeitsverteilung aller Malignome. Trotz diagnostischer und therapeutischer Fortschritte ist die Häufigkeit des Auftretens und der Sterblichkeit dieser Tumore weitgehend konstant geblieben. Die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtrakts gilt dabei als erstes Kontaktorgan für exogen zugeführte DNA-schädigende Substanzen. Insbesondere der kombinierte Tabak- und Alkoholkonsum spielt bei der Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich eine entscheidende Rolle. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und der Metabolit des Benz[a]pyrens, das Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid stellen dabei Tabakinhaltstoffe mit besonderer Bedeutung in der Karzinogenese dar. Neben exogenen spielen auch endogene Risikofaktoren bei der Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich eine entscheidende Rolle. Da krebserregende Fremdstoffe unterschiedliche Auswirkungen auf die jeweils exponierten Personen haben, ist die Evaluierung der genetischen Empfindlichkeit (sog. Suszeptibilität) von enormer Bedeutung. Hierzu zählt die Sensibilität der DNA gegenüber Xenobiotika und die Fähigkeit derartige DNA-Schäden zu reparieren. Mutationen oder ein Ungleichgewicht in Onkogenen und/oder Tumorsuppressorgenen, können zu einem nachfolgenden Tumorwachstum führen. Ein Beispiel eines Onkogens ist das CyclinD1, welches als wesentlicher Regulator des Zellzyklus in der G1-Phase gilt. Es nimmt dabei entscheidenden Einfluss auf die Zellteilung und das Zellwachstum. Abnorme Veränderungen des CyclinD1 können durch Verlust der Zellzykluskontrolle zu unkontrollierter Zellteilung und zu abnormem Zellwachstum führen. Bei einer Vielzahl von Oropharynxkarzinomen ist eine erhöhte Amplifikation und/oder Expression des CyclinD1 nachgewiesen und mit einer schlechteren Prognose vergesellschaftet. Zur Untersuchung der Rolle der genetischen Suszeptibilität des CyclinD1 bei der Entstehung von oropharyngealen Karzinomen wurde in der vorliegenden Arbeit die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet-Assay), eine etablierte Methode zur Quantifizierung von DNA-Schäden mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) kombiniert. Nach Inkubation mit BPDE konnte so neben der Bestimmung der Gesamt-DNA-Schädigung, die Schädigung am CyclinD1-Gen durchgeführt werden. Dafür wurden frisch entnommene, makroskopisch gesunde oropharyngeale Schleimhautproben von Patienten mit Oropharynxkarzinomen und tumorfreien

Patienten verglichen. Im Ergebnis konnte für die Mutagensensitivität kein signifikanter Unterschied zwischen den tumorfreien Kontrollpatienten und den Tumorpatienten nachgewiesen werden. Desweiteren wurde im analogen Versuchsaufbau eine mögliche genoprotektive/chemopräventive Wirkung des COX-2-Inhibitors Celebrex[®] an oropharyngealen Schleimhautzellen beider Patientengruppen untersucht. Durch die Vorinkubation der Miniorgankulturen mit Celebrex[®] konnte nach anschließender Schädigung mit BPDE eine signifikant reduzierte DNA-Schädigung der Gesamt-DNA sowie im CyclinD1-Gen aufgezeigt werden. Dabei verringerte sich die DNA-Fragmentierung bei beiden Patientengruppen gleichermaßen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen auf eine eher untergeordnete Rolle der Mutagensensitivität des CyclinD1-Gens als endogenen Risikomarker in der Pathogenese der Kopf-Hals-Karzinome vermuten. Ein genoprotektiver Effekt durch den Einsatz von Celebrex[®] konnte hingegen demonstriert werden. Weitere klinische Studien sind zu empfehlen, welche die Effektivität und Verträglichkeit von Celebrex[®] in der Tumorprävention und -therapie evaluieren.

6 Literaturverzeichnis

1. Ajith T.A., Subin J.P., Jacob J., Sanjay P.S., Babitha N.V. Antimutagenic and Anti-Oxidant Activities of the Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Celecoxib. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2005) 32: 888-893
2. Akin F.J., Snook M.E., Severson R.E., Chamberlain W.J., Walters D.B. Identification of polynuclear aromatic hydrocarbons in cigarette smoke and their importance as tumorigens. *J Natl Cancer Inst.* (1976) 57: 191-195
3. Arber N., Doki Y., Han E.K-H., Sgambato A., Zhou P., Kim N-H., Delohery T., Klein M.G., Holt P.R., Weinstein I.B. Antisense to Cyclin D1 Inhibits the Growth and Tumorigenicity of Human Colon Cancer Cells. *Cancer Research* (1997) 57: 1569-1574
4. Bartkova J., Lukas J., Müller H., Strauss M., Gusterson B., Bartek J. Abnormal Patterns of D-Type Cyclin Expression and G₁ Regulation in Human Head and Neck Cancer. *Cancer Research* (1995) 55: 949-956
5. Bauer HK: "Mutationstheorie der Geschwulstentstehung". Berlin, Springer (1928)
6. Bi X., Slater D.M., Ohmori H., Vaziri C. DNA polymerase kappa is specifically required for recovery from the benzo(a)pyrene-dihydrodiol epoxide (BPDE)-induced S-phase checkpoint. *The Journal of Biological Chemistry* (2005) 280 (23): 22343-22355
7. Blanke C.D., Masferrer J.L. Chemotherapy with Cyclooxygenase-2 Inhibitors in the Treatment of Malignant Disease: Pre-Clinical Rationale and Preliminary Results of Clinical Trials. In: Dannenberg A.J., DuBois R.N.: COX-2. *Prog Exp Tum Res.* Basel, Karger(2003) 37: 243-260
8. Böcker W., Denk H., Heitz Ph.U. *Pathologie.* Urban & Fischer (2004) 3.Auflage: 51-52
9. Boveri T: "Zur Frage der Entstehung maligner Tumoren." Jena, Gustav Fischer Verlag (1914)
10. Braakhuis B.J.M., Brakenhoff R.H., Leemans C.R. Head and neck cancer: molecular carcinogenesis. *Annals of oncology* (2005) 16 (Supplement 2): ii249-ii250

11. Braakhuis B.J.M., Tabor M.P., Kummer J.A., Leemans C.R., Brakenhoff R.H. A genetic explanation of slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* (2003) 63: 1727-1730
12. Califano J., van der Riet P., Westra W., Nawroz H., Clayman G., Piantadosi S., Corio R., Lee D., Greenberg B., Koch W., Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* (1996) 56: 2488-2492
13. Cao C., Matsumura K., Yamagata K., Watanabe Y. Endothelial cells of the rat brain vasculature express cyclooxygenase-2 mRNA in response to systemic interleukin-1beta: a possible site of prostaglandin synthesis responsible for fever. *Brain Research* (1996) 733: 263-272
14. Chan C.M.L., Ma B.B.Y., Wong S.C., Chan A.T.C. Celecoxib induces dose dependent growth inhibition in nasopharyngeal carcinoma cell lines independent of cyclooxygenase-2 expression. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (2005) 59: S268-S271
15. Chan G., Boyle J.O., Yang E.K., Zhang F., Sacks P.G., Shah J.P., Edelstein D., Soslow R.A., Koki A.T., Woerner B.M., Masferrer J.L., Dannenberg A.J. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* (1999) 59: 991-994
16. Chen W.-C., McBride W.H., Chen S.-M., Lee K.-F., Hwang T.-Z., Jung S.-M., Shau H., Liao S.-K., Hong J.-H., Chen M.-F. Prediction of poor survival by cyclooxygenase-2 in patients with T4 nasopharyngeal cancer treated by radiation therapy: clinical and in vitro studies. *Head and Neck* (2005): 503-512
17. Cheng L., Eicher S.A., Guo Z., Hong W.K., Spitz M.R., Wei Q. Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* (1998) 7: 465-468
18. Cloos J., Leemans C.R., van der Sterre M.L., Kuik D.J., Snow G.B., Braakhuis B.J. Mutagen sensitivity as a biomarker for second primary tumors after head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2000) 9: 713-717
19. Cloos J., Spitz M.R., Schantz M.R., Hsu T.C., Zhang Z., Tobi H., Braakhuis B.J., Snow G.B. Genetic Susceptibility to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* (1996) 88: 530-535
20. Conney A.H., Chang R.L., Jerina D.M., Wei S.J. Studies on the metabolism of benzo(a)pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite. *Drug Metab Rev.* (1994) 26: 125-163

21. Copper M.P., Jovanovic A., Nauta J.J.P., Braakhuis B.J.M., de Vries N., van der Waal I., Snow G.B. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* (1995) 121: 157-160
22. Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control. *Gene* (2002) 299: 35-55
23. Coutelle C., Ward P.J., Fleury B., Quattrocchi P., Chambrin H., Iron A., Couzigou P., Cassaigne A. Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms. *Hum. Genet.* (1997) 99: 319-325
24. Culp S.J., Beland F.A. Comparison of DNA adduct formation in mice fed coal tar or benzo(a)pyrene. *Carcinogenesis* (1994) 15: 247-252
25. Das B.R., Nagpal J.K. Understanding the biology of oral cancer. *Med Sci Monit* (2002) 8(11): RA 258-267
26. Davies N.M., Mc Lachlan A.J., Day R.O., Williams K.M. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of celecoxib: A selective cyclooxygenase-2 inhibitor. *Clin Pharmacokin.* (2000) 38(3): 225-242
27. Davis B.J., Lennard D.E., Lee C.A., Tiano H.F., Morham S.G., Wetsel W.C., Langenbach R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1 β . *Endocrinology* (1999) 140: 2685-2695
28. DeMarini D.M. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat. Res.* (2004) 567: 447-474
29. DeWitt D.L. Cox-2-Selektive Inhibitors: The New Super Aspirins. *Molecular pharmacology* (1999) 55: 625-631
30. Dohadwala M., Luo J., Zhu L., Lin Y., Dougherty G.J., Sharma S., Huang M., Pold M., Batra R.K., Dubinett S.M. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent invasion is mediated by CD44. *J. Biol. Chem.* (2001) 276: 20809-20812
31. DuBois R.N., Abramson S.B., Crofford L., Gupta R.A., Simon L.S., Van de Putte L.B.A., Lipsky P.E. Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* (1998) 12: 1063-1073
32. Eling T.E., Thompson D.C., Foureman G.L., Curtis J.F., Hughes M.F. Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Annu Rev pharmacol Toxicol* (1990) 30: 1-45

33. Escobar P.A., Smith M.T., Vasishta A., Hubbard A.E., Zhang L. Leukaemia-specific chromosome damage detected by comet with fluorescence in situ hybridisation (comet-FISH). *Mutagenesis* (2007) 22 (5): 321-327
34. FitzGerald G.A., Pedersen A.K., Patrono C. Analysis of prostacyclin and thromboxane biosynthesis in cardiovascular disease. *Circulation* (1983) 67: 1174-1177
35. Fu M., Wang C., Li Z., Sakamaki T., Pestell R.G. Minireview: Cyclin D1: Normal and abnormal functions. *Endocrinology* (2004) 145: 5439-5447
36. Gallo O., Franchi A., Magnelli L., Sardi L., Vannacci A., Boddi V., Chiarugi V., Masini E. Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Neoplasia* (2001) 3: 53-61
37. Gasparini G., Longo R., Sarmiento R., Morabito A. Inhibitors of cyclooxygenase 2: a new class of anticancer agents? *Lancet Oncology* (2003) 4: 605-615
38. Gelboin H.V. Benzo(a)pyrene Metabolism, Activation, and Carcinogenesis: Role and Regulation of Mixed-Function Oxidases and related Enzymes. *Physiological Reviews* (1980) 60 (4): 1107-1166
39. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) in Zusammenarbeit mit dem Robert-Koch –Institut (RKI). Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe Saarbrücken 2006
40. Grösch S., Maier T.J., Schiffmann S., Geisslinger G. Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Independent Anticarcinogenic Effects of Selective COX-2 Inhibitors. *J Natl Cancer Inst* (2006) 98: 736-747
41. Grösch S., Tegeder I., Niederberger E., Bräutigam L., Geisslinger G. Cox-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB Journal* (2001) 15: 2742-2744
42. Gupta S., Sarotra P., Aggarwal R., Dutta N., Agnihotri N. Role of Oxidative Stress in Celecoxib-Induced Renal Damage in Wistar Rats. *Dig Dis Sci* (2007) 52: 3092-3098
43. Hammond E.C., Sellikoff I.J., Seidmann H. Multiple interaction effects of cigarette smoking. Extrapulmonary cancer. In: Bucalossi P., Veronesi U., Cascinelli G. (eds) *Cancer epidemiology, environmental factors*. (1974) 3: 147-15

44. Hanahan D., Weinberg R.A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* (2000) Vol. 100: 57-70
45. Hanelt S., Helbig R., Hartmann A., Lang M., Seidel A., Speit G. A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo(a)pyrene and (+/-)-anti-benzo(a)pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res.* (1997) 390: 179-188
46. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* (2003) 260: 502-508
47. Harréus U.A. Untersuchung exogener und endogener Risikofaktoren für die Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes. Habilitation (2004) Aus der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde Ludwig-Maximilians-Universität (Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus)
48. Harréus U.A., Schmezer P., Kuchenmeister F., Maier H. Genotoxische Wirkung auf menschliche Schleimhautbiopsien des oberen Aerodigestivtraktes. *Laryngol. Rhinol. Otol.* (1999) 78: 176-181
49. Harréus U.A., Kleinsasser N.H., Zieger S., Wallner B., Reiter M., Schuller P., Berghaus A. Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucoasa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization. *Mutation Research* (2004) 563: 131-138
50. Harty L.C., Caporaso N.E., Hayes R.B. Winn D.M., Bravo-Otero E., Blot W.J., Kleiman D.V., Brown L.M., Armenian H.K., Fraumeni J.F.Jr., Shields P.G. Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* (1997) 89:1698-1705
51. Hawk E.T, Viner J.L., Umar A. Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Cyclooxygenase-2-Selective Inhibitors in Clinical Cancer Prevention Trials. *Prog Exp Tum Res.* (2003) 37: 210-242
52. Hayaishi O. Molecular mechanisms of sleep-awake regulation: roles of prostaglandin D2 and E2. *FASEB Journal* (1991) 5: 2575-2581
53. Hazra A., Grossman H.B., Zhu Y., Luo S., Spitz MR., Wu X. Benzo[a]pyrene diol epoxide-induced 9p21 aberrations associated with genetic predisposition to bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer* (2004) 41 (4): 330-338
54. Hinds P.W., Dowdy S.F., Eaton E.N., Arnold A., Weinberg R.A. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91: 709-713

55. Hoffmann D., Wynder E.L., Active and passive smoking. In: Toxicology Marquardt H., Schäfer S.G., McClellan R., Welch F. (Hrsg.), Academic press, San Diego, CA (1999): 879-898
56. International Agency for Research on Cancer (IARC) Monograph, Vol. 92: Publikation in Vorbereitung; Stand: 03/09) online: <http://monographs.iarc.fr.ENG/Classification/crthgr01.php>
57. International Agency for Research on Cancers: Tobacco habits other than smoking: betel quid and areca-nut chewing and some related nitrosamines. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Lyon, IARC (1985) 37
58. International Agency for Research on Cancers: Tobacco smoking. In: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Lyon IARC (1986) 38
59. Isakson P.C. Pharmacology of COX-2 Inhibitors. *Prog Exp Tum Res.* (2003) 37: 25-51
60. Izzo J.G., Papadimitrakopoulou V.A., Li X.Q., Ibarquen H., Lee J.S., Ro J.Y., El-Naggar A., Hong W.K., Hittelman W.N. Dysregulated cyclin D1 expression early in head and neck tumorigenesis: in vivo evidence for an association with subsequent gene amplification. *Oncogene* (1998) 17 (18): 2313-2322
61. Jain K.K. Current status of fluorescent in-situ hybridisation. *Med Device Technol.* (2004) 15:14-17
62. Jefferies S., Foulkes W.D. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncology* (2001) 37: 115-126
63. Kalish L.H., Kwong R.A., Cole I.E., Gallagher R.M., Sutherland R.L., Musgrove E.A. Deregulated Cyclin D1 Expression is Associated with Decreased Efficacy of the Selective Epidermal Growth Factor Receptor Tyrosine Kinase Inhibitor Gefitinib in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cell Lines. *Clinical Cancer Research* (2004) 10: 7764-7774
64. Kam P.C.A., See A.U-L. Cyclo-oxygenase isoenzymes: physiological and pharmacological role. *Anaesthesia* (2000) 55: 442-449
65. Kazerouni N., Sinha R., Hsu C.H., Greenberg A., Rothman N. Analysis of 200 food items for benz(a)pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study. *Food and Chemical Toxicology* (2001) 39: 423-436

66. Ketkar M., Reznik G., Schneider P., Mohr U. Investigations on the carcinogenic burden by air pollution in man. Intratracheal instillation studies with benzo(a)pyrene in bovine serum albumin in Syrian hamsters. *Cancer Lett.* (1978) 4: 235-239
67. Kismet K., Akay M.T., Abbasoğlu O., Ercan A. Celecoxib: A potent cyclooxygenase-2 inhibitor in cancer prevention. *Cancer Detection and Prevention* (2004) 28: 127-142
68. Kleinsasser N.H., Juchhoff J., Wallner B.C., Bergner A., Harréus U.A., Gamarra F., Bühlren M., Huber R.M., Rettenmeier A.W. The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestiv tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat. Res.* (2004) 561: 63-73
69. Kleinsasser N.H., Wagner C., Wallner B.C., Harréus U.A., Kastenbauer E.R. Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients. *Mutat Res* (2001) 491: 151-161
70. Kojima M., Morisaki T., Uchiyama A., Doi F., Mibu R., Katano M., Tanaka M. Association of enhanced cyclooxygenase-2 expression with possible local immunosuppression in human colorectal carcinomas. *Ann. Surg. Oncol.* (2001) 8: 458-465
71. Kumaravel T.S., Bristow R.G. Detection of genetic instability at HER-2/neu and p53 loci in breast cancer cells using Comet-FISH. *Breast Cancer Research and Treatment.* (2005) 91:89-93
72. Kurumbail R.G., Kiefer J.R., Marnett L.J. Cyclooxygenase enzymes: catalysis and inhibition. *Current Opinion in Structural Biology* (2001) 11: 752-760
73. Kurumbail R.G., Stevens A.M., Gierse J.K., McDonald J.J., Stegeman R.A., Pak J.Y., Gildehaus D., Miyashiro J.M., Penning T.D., Seibert K., Isakson P.C., Stallings W.C. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* (1996) 384: 644-648
74. Kushman M.E., Kabler S.L., Fleming M.H., Ravoori S., Gupta R.C., Doehmer J., Morrow C.S., Townsend A.J. Expression of human glutathione S-transferase P1 confers resistance to benzo(a)pyrene or benzo(a)pyrene-7,8-dihydrodiol mutagenesis, macromolecular alkylation and formation of stable N2-Gua-BPDE adducts in stably transfected V79MZ cells co-expressing hCYP1A1. *Carcinogenesis* (2007) 28: 207-214
75. Lang S., Issing W. Chemoprävention. In: *Manual Kopf-Hals-Malignome*, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München (2003): 64-69
76. Li Q., Peng J., Zhang G.Y. Effect of a selective COX-2- Inhibitor on cell proliferation. *Journal of Central South University* (2008) 33: 11123-1128

77. Liang Z., Lippman S.M., Kawabe A., Shimada Y., Xu X-C. Identification of Benzo(a)pyrene Diol Epoxide-binding DNA Fragments using DNA Immunoprecipitation Technique. *Cancer Research* (2003) 63: 1470-1474
78. Lin D., Subbaramaiah K., Shah J., Dannenberg A., Boyle J. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. *Head and Neck* (2002) 24: 792-799
79. Luch A. Kanzerogene Chemikalien. Chemisch induzierter Krebs und genetisch bedingte Unterschiede in der Empfindlichkeit. In: *Chemie in unserer Zeit*, 35. Jahrgang 2001, Nr.5, 294-305
80. Maier H., Dietz A., Gewelke U., Seitz H.K., Heller W.D. Tobacco- and alcohol-associated cancer risk of upper respiratory and digestive tract. *Laryngorhinootolog.* (1990) 69: 505-511
81. Maier H., Sennewald E. Plattenepithelkarzinome. Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich- Ergebnisse der Heidelberger Fallkontrollstudien. Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften (HVBG), Sankt Augustin (1994)
82. Maier H., Tisch M. Beruf und Krebs im Kopf-Hals-Bereich. *HNO* (1999) 47: 1025-1037
83. Marnett L.J., Kalgutkar A.S. Cyclooxygenase 2 inhibitors: discovery, selectivity and the future. *Trends Pharmacol. Sci.* (1999) 20: 465-469
84. Matthias C. Weiße Flecken in der Mundschleimhaut. Harmlose Läsion oder Präkanzerose? *MMW-Fortschr.Med.* (2005) 147 (Nr. 48): 1006-1008
85. Matthias C., Schuster M.T., Zieger S., Harréus U. COX-2 Inhibitors Celecoxib and Rofecoxib Prevent Oxidative DNA Fragmentation. *Anticancer Research* (2006) 26: 2003-2007
86. McKelvey-Martin V.J., Ho E.T.S., McKeown S.R., Johnston S.R., McCarthy P.J., Rajab N.F., Downes C.S. 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* (1998) 13: 1-8
87. Mehar A., Macanas-Pirard P., Mizokami A., Takahashi Y., Kass G.E.N., Coley H.M. The effects of Cyclooxygenase-2 Expression in Prostate Cancer Cells. Modulation of Response to cytotoxic Agents. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* (2008) 324. 1181-1187

88. Mehrotra R., Yadav S. Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian Journal of Cancer* (2006) 43: 60-65
89. Menke M., Angelis K.J., Schubert I. Detection of specific DNA lesions by a combination of Comet assay and FISH in plants. *Environ. Mol. Mutagen.* (2000) 35: 132-138
90. Miller T.A. Protective effects of prostaglandins against gastric mucosal damage: current knowledge and proposed mechanisms. *American Journal of Physiology* (1983) 245: G601-G623
91. Mitchell J.A., Warner T.D. Cyclooxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *British Journal of Pharmacology* (1999) 128: 1121-1132
92. Myllynen P., Kurttila T., Vaskivuo L., Vähäkangas K. DNA damage caused by benzo(a)pyrene in MCF-7 cells is increased by verapamil, probenecid and PSC833. *Toxicology Letters* (2007) 169: 3-12
93. Nakashima T., Clayman G.L. Antisense Inhibition of CyclinD1 in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* (2000) 126: 957-961
94. Narayanan B. A., Condon M.S., Bosland M.C., Narayanan N.K., Reddy B.S. Suppression of N-Methyl-N-nitrosurea/Testosterone-induced Rat Prostate Cancer Growth by Celecoxib: Effects on Cyclooxygenase-2, Cell Cycle Regulation, and Apoptosis Mechanism(s). *Clinical Cancer Research* (2003) 9: 3503-3513
95. Oestling O., Johanson K.J. Microgelelectrophoretic study of radiation –induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1984) 123: 291-298
96. Ogilvie C.M. Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Pathol Biol (Paris)*. (2003) 51:156-160
97. Ohshima K., Ishiguro M., Yamasaki S., Miyagi J., Okamura S., Sugio Y., Muta T., Sasaki H., Tuchiya T., Kawasaki C., Kikuchi M. Chromosomal and comparative genomic analyses of HHV-8-negative primary effusion lymphoma in five HIV-negative Japanese patients. *Leuk Lymphoma*. (2002) 43: 595-601
98. Olive P.L., Banath J.P. Induction and rejoining of radiation induced DNA single-strand breaks: “tail moment” as a function of position in the cell cycle. *Mutat. Res.* (1993) 294: 275-283

99. Pardue M.L., Gall J.G. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1969) 64: 600-604
100. Phillips H.J. Dye exclusion tests for cell viability. In: *Tissue Culture*. Kruse P.F.(Hrsg.), Academic Press, New York (1973): 407-408
101. Picot D., Loll P.J., Garavito R.M. X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H2 synthase-1. *Nature* (1994) 367: 243-249
102. Pinkel D., Gray J.W., Trask B., Van Den Engh G., Fuscoe J., and Van Dekken H. Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* (1986) 51 Pt 1: 151-157
103. Pljesa-Ercegovac M., Mimic-Oka J., Dragicevic D., Savic-Radojevic A., Opacic M., Pljesa S., Radosavljevic R., Simic T. Altered antioxidant capacity in human renal cell carcinoma: Role of glutathione associated enzymes. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* (2008) 26: 175-181
104. Reiter M. Chromosomale Alterationen und Mutagensensitivität in humanen Lymphozyten und Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtrakts. Medizinische Dissertation, Hals-Nasen-Ohrenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München (2007): 1-99
105. Reiter M., Harréus U., Matthias C., Hölzel D. Epidemiologie. In *Manual Kopf-Hals-Malignome*, Tumorzentrum München und W. Zuckschwerdt Verlag München (2009): 9-13
106. Renkonen J., Wolff H., Paavonen T. Expression of cyclooxygenase -2 in human tongue carcinoma and its precursor lesions. *Virchows Arch* (2002) 440: 594-597
107. Reuter C.W.M., Morgan M.A., Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *British Journal of Cancer* (2007) 96: 408-416
108. Saha D., Choy H. Potential for Combined Modality Therapy of Cyclooxygenase Inhibitors and Radiation. In: Danneberg A.J., DuBois R.N.: *COX-2*. *Prog Exp Tum Res*. Basel, Karger (2003) 37: 193-209
109. Sathyan K.M., Nalinakumari K.R., Abraham T., Kannan S. CCND1 polymorphisms (A870G and C1722G) modulate its protein expression and survival in oral carcinoma. *Oral Oncology* (2008) 44: 689-697
110. Schantz S.P., Zhang Z.F., Spitz M.S., Sun M., Hsu T.C. Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity. *Laryngoscope* (1997) 107: 765-781

111. Sermon K., Van Steirteghem A., Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* (2004) 363: 1633-1641
112. Simmons D.L., Botting R.M. Hla T. Cyclooxygenase isozymes: The biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharm. Rev.* (2004) 56: 387-437
113. Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* (1988) 175: 184-191
114. Slaughter D., Southwick H., Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* (1953) 6: 963-968
115. Smith L.E., Denissenko M.F., Bennett W.P., Li H., Amin S., Tang M., Pfeifer G.P. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Natl. Cancer Inst.* (2000) 92: 803-811
116. Song S., Lippman S.M., Zou Y., Ye X., Ajani J.A., Xu X.-C. Induction of cyclooxygenase-2 by benzo(a)pyrene diol epoxide through inhibition of retinoic acid receptor- β_2 expression. *Oncogene* (2005) 24: 8268-8276
117. Song S., Xu X.-C. Effect of Benzo(a)pyrene Diol Epoxide on Expression of Retinoic Acid Receptor- β in Immortalized Esophageal Epithelial Cells and Esophageal Cancer Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (2001) 281: 872-877
118. Speit G., Hartmann A. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* (1995) 10: 555-559
119. Speit G., Hartmann A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol. Biol.* (2006) 314: 275-286
120. Spencer A.G., Woods J.W., Arakawa T., Singer I.I., Smith W.L. Subcellular localization of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2 by immunoelectron microscopy. *J. Boil. Chem.* (1998) 273: 9886-9893
121. Stefanou E.G., Hanna G., Foakes A., Crocker M. Fitchett M. Prenatal diagnosis of cri du chat (5p-) syndrome in association with isolated moderate bilateral ventriculomegaly. *Prenat Diagn.* (2002) 22(1): 64-66
122. Steinsvåg S.K., Strand M., Berg O., Miaguchi M., Olofsson J. Human respiratory mucosa in nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* (1991) 101: 1323-1331

123. Sturgis E.M., Castillo E.J., Li L., Zheng R., Eicher S.A., Clayman G.L., Strom S.S., Spitz M.R., Wei Q. Polymorphisms of the DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* (1999) 20: 2125-2129
124. Sudbo J. Novel management of oral cancer: A paradigm of predictive oncology *Clinical Medicine & Research*. (2004) 2: 233-242
125. Talalay P., Fahey J.W., Holtzclaw W.D., Presterl T., Zhang Y. Chemoprevention against cancer by phase 2 enzyme induction. *Toxicol.Lett.* (1995) 82-83: 173-179
126. Tang M-S., Pierce J.R., Doisy R.P., Nazimiec M.E., MacLeod M.C. Differences and Similarities in the Repair of Two Benzo(a)pyrene Diol Epoxide Isomers Induced DNA Adducts by uvrA, uvrB, and uvrC Gene Products. *Biochemistry* (1992) 31: 8429-8436
127. Tashiro E., Tsuchiya A., Imoto M. Functions of Cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Sci* (2007) 98: 629-635
128. Teixeira M.R. Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer*. (2002) 38: 1580-1584
129. Thomas G.R., Nadiminti H., Regalado J. Molecular predictors of clinical outcome in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Exp. Path.* (2005) 86: 347-363
130. Tsujii M., DuBois R. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpression prostaglandin endoperoxide synthase-2. *Cell* (1995) 83: 493-501
131. Tsujii M., Kawano S., DuBois R. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) 94: 3336-33340
132. Tsujii M., Kawano S., Tsuji S., Sawaoka H., Hori M., Dubois R. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* (1998) 93: 705-716
133. Wallner B.C., Harréus U.A., Gamarra F., Sassen A., Kleinsasser N.H. Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa. Ein Modell f ur  kogenotoxikologische Untersuchungen. In: HNO Deutsche Gesellschaft f ur Hals-Nasen-Ohren- Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie. Springer Medizin Verlag (2005): 1-19

134. Wang L-E., Sturgis E.M., Eicher S.A., Hong W.K., Wei Q. Mutagen sensitivity to benzo(a)pyrene diol epoxide and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clinical Cancer Res.* (1998) Vol. 4: 1773-1778
135. Wei Q., Gu J., Cheng L., Bondy M.L., Jiang H., Hong W.K., Spitz M. R. Benz(a)pyrene Diol Epoxide-induced Chromosomal Aberrations and Risk of Lung Cancer. *Cancer Research* (1996) 56: 3975-3979
136. Weng M.W., Hsiao Y.-M., Chiou H.-L., Yang S.-F., Hsieh Y.-S., Cheng Y.-W., Yang C.-H., Ko J.-L. Alleviation of benzo(a)pyrene-diolepoxide-DNA damage in human lung carcinoma by glutathione S-transferase M2. *DNA Repair* (2005) 4: 493-502
137. Wu X., Lin J., Etzel C.J., Dong Q., Gorlova O.Y., Zhang Q., Amos C.I., Spitz M.R. Interplay between mutagen sensitivity and epidemiological factors in modulating lung cancer risk. *Int J Cancer* (2007) 120 (12): 2687-2695
138. Wu X., Lippman S.M., Lee J.J., Zhu Y., Wei Q.V., Thomas M., Hong W.K., Spitz M.R. Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions. *Cancer Res.* (2002) 62: 2813-2818
139. Xie Z., Braithwaite E., Guo D., Zhao B., Geacintov N.E., Wang Z. Mutagenesis of Benzo(a)pyrene Diol Epoxide in Yeast: Requirement for DNA Polymerase ζ and Involvement of DNA Polymerase η . *Biochemistry* (2003) 42: 11253-11262
140. Zhang X., Chen Z.G., Choe M.S., Lin Y., Sun S.-Y., Wieand S., Shin H.J.C., Chen A., Khuri F.R., Shin D.M. Tumor Growth Inhibition by Simultaneously Blocking Epidermal Growth Factor Receptor and Cyclooxygenase-2 in a Xenograft Model. *Clin Cancer Res.* (2005) 11: 6261-6269
141. Zhu Y., Spitz M.R., Zheng Y.L., Hong W.K., Wu X. BPDE-induced lymphocytic 3p21.3 aberration may predict head and neck carcinoma risk. *Cancer* (2002) 95: 563-568

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

B(a)P	Benz(a)pyren
BEGM	Basal Epithelial Growth Medium
BPDE	Benz(a)pyren-7,8-diol-epoxid
BRCA-1, BRCA-2	Breast Cancer Gen-1, -2
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Chr	Chromosom
Comet-FISH	Comet-Assay kombiniert mit FISH
COX-1, -2	Cyclooxygenase Typ 1, -Typ 2
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamitetraacetat
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fötales Kälberserum
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.v.
IARC	International Agency for Research on Cancer
LOH	Loss of heterozygosity
MCTM	Munich chromosomal Tailmoment
NDPA	4-Nitro-o-Phenylendiamin
MNNG	N-methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
MOK	Miniorgankultur
OTM	Olive Tailmoment
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate Buffered Saline
SSC	Saline Sodium Citrate buffer

7.2 Anamnesen

Anamnesen Tab. 17: Anamnesen der Spender oropharyngealer Schleimhaut für die Untersuchung mit Comet/Comet-FISH ohne Oropharynxkarzinom

Nr.	Alter	♂/♀	Alkohol*	Nikotin*	OP-Indikation	Beruf
1	31	♂	0 g/d	0 py	chron. Tonsillitis	Mechaniker
2	53	♂	0 g/d	0 py	OSAS	Landwirt
3	42	♀	0 g/d	0 py	chron. Tonsillitis	k.A.
4	54	♀	0 g/d	7,5 py	OSAS	Löterin
5	51	♂	3,2 g/d	0 py	chron. Tonsillitis	Bauingenieur
6	53	♀	0 g/d	25 py	chron. Tonsillitis	Heilpraktikerin
7	48	♂	0 g/d	28 py	chron. Tonsillitis	k.A.
8	46	♂	0 g/d	24 py	chron. Tonsillitis	Handwerker
9	47	♂	0 g/d	14 py	OSAS	Bodenleger
10	55	♀	k.A.	k.A.	OSAS	k.A..
11	40	♂	0 g/d	0 py	OSAS	k.A..
12	62	♀	0 g/d	0 py	chron. Tonsillitis	OP-Schwester
13	43	♂	0 g/d	0 py	chron. Tonsillitis	Arzt
14	42	♀	29 g/d	0 py	OSAS	Beamtin
15	29	♀	0 g/d	8 py	chron. Tonsillitis	k.A.

♂ männlich, ♀ weiblich, Alkoholkonsum in Gramm pro Tag, Nikotinkonsum in pack years,

k.A. keine Angabe, OSAS obstruktives Schlafapnoesyndrom, *nicht verifizierte

Patientenangaben

Tab. 18: Anamnesen der Spender oropharyngealer Schleimhaut für die Untersuchung mit Comet/Comet-FISH mit Oropharynxkarzinom

Nr.	Alter	♂/♀	Alkohol*	Nikotin *	Staging/Grading	OP-Indikation	Beruf
1	62	♂	0 g/d	0 py	T2N1M0/G3	Hypopharynx-CA	Rentner
2	71	♀	0 g/d	100 py	T2N0M0/G3	Mundboden-CA	Rentnerin
3	50	♀	80 g/d	50 py	T4N0M0/G3	Oropharynx-CA	k.A.
4	52	♂	32 g/d	25 py	T2N0M0/G3	Zungengrund-Ca	Büroangest.
5	55	♀	0 g/d	40 py	T1N2M0/G3	Tonsillen-CA	Hausfrau
6	51	♂	160 g/d	33 py	T2N2M0/G3	Zungenrand-CA	Hausmeister
7	50	♂	80 g/d	32 py	T1N0M0/G2	Glossotonsillar-CA	Möbelpacker
8	63	♂	48 g/d	20 py	T1N3M0/G3	Mundboden-CA	Rentner
9	46	♀	0 g/d	26 py	T2N2M0/G3	Tonsillen-Ca	Vertriebsassistent
10	79	♂	0 g/d	118 py	T2N0M0/G3	Mundboden-CA	Rentner
11	65	♂	0 g/d	0 py	T2N1M0/G2	Tonsillen-CA	k.A.
12	55	♂	14 g/d	0 py	T1N1M0/G3	Tonsillen-CA	Bürokaufmann
13	71	♂	200 g/d	0 py	T3N0M0/G1	Zungengrund-CA	Rentner
14	59	♂	75 g/d	40 py	T3N1M0/G3	Mundboden-CA	k.A.
15	50	♂	32 g/d	18 py	k.A.	Tonsillen-CA	Reisekaufmann

♂ männlich, ♀ weiblich, Alkoholkonsum in Gramm pro Tag, Nikotinkonsum in pack years, CA = Karzinom, k.A. = keine Angaben, * nicht verifizierte Patientenangaben

7.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name:	Martina Hartmann
Wohnort:	Hüterweg 6, 85748 Garching bei München
Geburtsdatum:	09.01.1981
Geburtsort:	St.Georgen im Schwarzwald
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung

09/87 - 07/91	Grundschule, Wasserburg am Bodensee
09/91 - 07/00	Valentin-Heider-Gymnasium, Lindau am Bodensee
Juni 2000	Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife Leistungskurse: Mathematik, Musik

Freiwilliges soziales Jahr

09/00 – 07/01	Freiwilliges soziales Jahr im Kreiskrankenhaus Lindau, Abteilung Chirurgie sowie Gynäkologie und Geburtshilfe
---------------	--

Universität

10/01 - 12/08	Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians- Universität München
09/03	Erhalt der Ärztlichen Vorprüfung (Physikum) an der Ludwig – Maximilians-Universität München
02/07 - 01/08	Praktisches Jahr: - Chirurgie, Städtisches Klinikum Schwabing - Innere Medizin, Städtisches Klinikum Neuperlach - Wahlfach: Gynäkologie, Klinikum Grosshadern
Abschluss	17.12.08 mit dem 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,5)
Berufliche Tätigkeit	Seit 05/09 Assistenzärztin im Krankenhaus Altötting, Abteilung Gynäkologie und Geburtshilfe

7.4 Danksagung

Mein Dank gilt dem Direktor der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Prof. Dr. Alexander Berghaus, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der finanziellen Mittel, wodurch diese Arbeit erst zustande kommen konnte.

Vielen Dank an PD. Dr. Ulrich Harréus, der mir die Möglichkeit gab diese Arbeit im Labor für experimentelle Onkologie zu erstellen. Auch er unterstützte das Gelingen der Arbeit durch seine Fachkenntnisse und Ideen zur Durchführung der Arbeit in hohem Maße.

Mein spezieller Dank gilt Dr. Maximilian Reiter, der meine Arbeit betreute, mich in die Grundlagen der Thematik einführte und stets ein offenes Ohr für Probleme und Fragen jeglicher Art hatte.

Ein besonderer Dank gilt Sabina Zieger, die mir im Labor stets weiter half wo immer sie konnte und mir mit vielen Gesprächen und Tipps immer zur Seite stand.

Ein weiterer Dank gilt Dr. Christian Welz, der mich bei der Entstehung meiner Arbeit mit seinem Wissen unterstützt hat und mir bei Problemen immer gerne weiter half.

Mein Dank gilt auch Fr. Dr. Schubert-Fritschle, IBE, für ihre Beratung bezüglich der Statistik dieser Arbeit

Zum Schluss noch ein ganz besonderer Dank an meine Eltern, die mich immer unterstützen und mit gutem Rat zur Seite stehen. Ohne Sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.