

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

**DNA-Protektion antioxidativer Wirkstoffe gegenüber
Rauchkondensat an Miniorgankulturen humaner Mukosazellen des
Oropharynx**

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

Vorgelegt von

Dominique Böck

aus
Dachau
2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Ulrich Harréus
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Kai Kehe Priv. Doz. Dr. Jürgen Schaubert
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Maximilian Reiter
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung 17.03.2011

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Karzinome des oberen Aerodigestivtrakts	7
1.1.1	Epidemiologie der Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs	7
1.1.2	Entstehung der Kopf-Hals-Malignome	7
1.2	Exogene Risikofaktoren	9
1.2.1	Rauchkondensat	10
1.3	Prävention und Therapie von Karzinomen durch Nahrungsbestandteile und Medikamente	11
1.3.1	Curcumin	11
1.3.2	Wirkung von Curcumin	12
1.4	Die Cyclooxygenase	13
1.4.1	Wirkmechanismus der Cyclooxygenase	14
1.4.2	Coxibe - selektive COX-2-Hemmer	16
1.5	<i>Epidermal growth factor receptor (EGFR)</i>	17
1.6	Problemstellung und Zielsetzung	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Patientengut	19
2.2	Miniorgankulturen (MOK)	19
2.2.1	Anlegen der Schleimhautproben	20
2.2.2	Kultivierung der MOK	20
2.2.3	Ansatz A: Inkubation der Kulturen mit Curcumin und Rauchkondensat	22
2.2.4	Ansatz B: Inkubation der Kulturen mit Celebrex [®] und Rauchkondensat	24
2.2.5	Methodenspezifische Materialien	26
2.3	Einzelzell-Mikrogelelektrophorese	26
2.3.1	Isolierung der Zellen	27
2.3.2	Vitalitätsbestimmung	27
2.3.3	Präparation der Objektträger; Lyse der Zell- und Kernmembranen	28
2.3.4	Elektrophorese	28
2.3.5	Digitale Auswertung der Negativkontrolle und der Kontrollen von Curcumin und Celebrex [®]	29
2.3.6	Methodenspezifische Materialien	31
2.4	Comet Fluoreszenz in situ Hybridisierung	32

2.4.1	Entwässerung der Objektträger; Hybridisierung mit EGFR/Zentromer	33
2.4.2	Waschen und Anfärben der Objektträger	33
2.4.3	Digitale Auswertung der chromosomalen DNA-Migration	33
2.4.4	Methodenspezifische Materialien	35
2.5	Versuchsablauf	36
2.6	Verbrauchsmaterialien	37
2.7	Technische Geräte und Zubehör	38
3	Ergebnisse	40
3.1	Vitalitätsmessungen	40
3.2	Statistische Testverfahren	41
3.3	Schädigung der Gesamt-DNA in oropharyngealen Schleimhautzellen durch Rauchkondensat	41
3.4	Protektive Wirkung von Umweltstoffen und Medikamenten an Miniorgankulturen von humanen Schleimhautzellen	43
3.4.1	Genprotektive Wirkung von Curcumin	43
3.4.2	Genprotektive Wirkung des Medikaments Celebrex [®] (Cyclooxygenase-2-Hemmer)	44
3.5	Nachweis von DNA-Schäden im EGFR-Gen in humanen Schleimhautzellen mittels Comet-FISH	46
3.5.1	Ausschluss einer toxischen Wirkung von Curcumin und Celebrex [®] mittels Comet-FISH	46
3.5.2	Schädigung der DNA des <i>epidermal growth factor</i> Gens auf Chromosom 7 durch Rauchkondensat	47
3.6	Genprotektive Wirkung von Curcumin und Celebrex [®] am <i>epidermal growth factor receptor</i> Gen auf Chromosom 7 von humanen Schleimhautzellen des Oropharynx	50
3.6.1	Genprotektive Effekte von Curcumin an Chromosom 7 von Miniorgankulturen des oberen Aerodigestivtrakts	50
3.6.2	Genprotektive Effekte von Celebrex [®] an Chromosom 7 von Miniorgankulturen des oberen Aerodigestivtrakts	52
4	Diskussion	54
4.1	Auswahl der Patienten	54
4.1.1	Patienten als Spender von Schleimhautproben des Oropharynx	54
4.1.2	Begleiterkrankungen und Risikofaktoren der jeweiligen Spender	54

4.2	Genotoxische Wirkung von Rauchkondensat an humanen Schleimhautzellen des Oropharynx	55
4.3	Genprotektive Wirkung von Curcumin an humaner Schleimhaut des Oropharynx	58
4.4	Genprotektive Wirkung von Celebrex® an gesunder Schleimhaut des Oropharynx	61
4.5	Der Einfluss des <i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR) auf die Karzinogenese des oberen Aerodigestivtrakts.....	64
4.5.1	Der <i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR) und Curcumin	65
4.5.2	Der <i>epidermal growth factor receptor</i> (EGFR) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2)	65
5	Zusammenfassung.....	68
6	Abbildungsverzeichnis	70
7	Literaturverzeichnis	72
8	Anhang	84
8.1	Abkürzungen	84
8.2	Danksagung	85

1 Einleitung

1.1 Karzinome des oberen Aerodigestivtrakts

1.1.1 Epidemiologie der Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs

Basierend auf den Zahlen des Krebsregisters des Saarlandes und des Krebsregisters München erkrankten im Jahre 2004 in der Bundesrepublik Deutschland insgesamt circa 436000 Menschen an Krebs. Das mittlere Erkrankungsalter lag sowohl bei Männern als auch bei Frauen bei 69 Jahren, die relative Überlebensrate variierte jedoch von 60% bei Frauen und 53% bei Männern. Circa 208000 Menschen verstarben im Jahre 2004 an einer Krebserkrankung, geringfügig weniger als noch im Jahre 1998 [Reiter et al., 2008; Krebsregister Saarland, München, 2004].

Der geschätzte Anteil der Krebsneuerkrankungen im Mund- und Rachenraum betrug im Jahre 2004 circa 11000 Personen. Hierbei zeigte sich mit 7600 Neuerkrankungen eine dreimal höhere Inzidenz bei Männern als mit lediglich 2800 gemeldeten Fällen bei Frauen. Hals-Kopf-Karzinome waren bei Männern hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung an siebter Stelle direkt nach den Magenkarzinomen gelistet. Die mittlere 5-Jahres-Überlebensrate fiel mit 47% für Männer deutlich schlechter aus als mit 55% für Frauen. Dies ist mit einer günstigeren Kombination von Lokalisation, Art und Stadium bei Erstdiagnose und somit einer sich daraus ableitenden besseren Prognose zu erklären. Laut den statistischen Angaben des Krebsregisters war in den 1970er und 1980er Jahren eine Zunahme der Inzidenz der Kopf-Hals-Karzinome verzeichnet worden, wohingegen seit Ende der 1990er Jahre eine leichte Abnahme der Zahlen und der Sterblichkeit sich abzeichnet [Krebsregister Saarland, München, 2004]. Trotzdem bleibt die Prognose aller Karzinome des oberen Aerodigestivtrakts weiterhin schlecht [Konkimalla et al., 2007].

1.1.2 Entstehung der Kopf-Hals-Malignome

Der Begriff Kopf-Hals-Karzinom ist definiert als ein topographisch-anatomischer Sammelbegriff aller Malignome des oberen Aerodigestivtrakts. Diese anatomische Region umfasst die Mundhöhle, den Oro-, Hypo-, Nasopharynx, Larynx und die Nasennebenhöhlen [Döbrossy, 2005].

Bis heute ist der genaue Entstehungsmechanismus der Karzinome nicht vollständig geklärt. Der Tumorgenese wird ein multifaktorielles Geschehen zu Grunde gelegt und wird als sogenannter „multistep process“ in der gängigen Literatur beschrieben [El-Naggar, 2007]. Konkimalla et al. unterschieden in ihrem Review 2007 einerseits patientenabhängige exogene Faktoren und andererseits pathochemische und molekulare endogene Faktoren, die sowohl die Entstehung und die Art, als auch die Prognose und das Wachstum beeinflussen [Konkimalla et al., 2007]. Des Weiteren haben Alter [Döbrossy, 2005], ethnische Zugehörigkeit, sozioökonomischer Status [Shah et al., 2003] und individuelle Gesundheit einen Einfluss auf die Tumorentstehung.

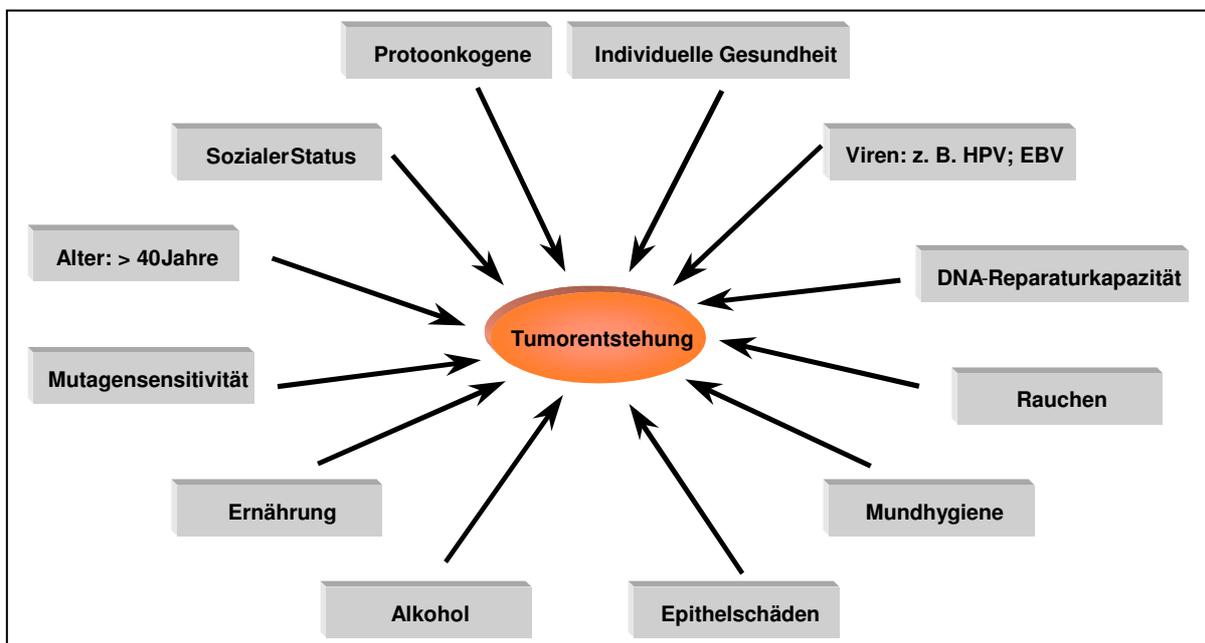


Abbildung 1: Einflussfaktoren auf die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich

Weinberg beschrieb 1996 den Entwicklungsprozess von gutartigen Zellreihen zu bösartigen Zellklonen mit dem Vorgang der Initiation, Promotion und Progression. Dieser dreischrittige Tumorentstehungsprozess konnte auch in Tierversuchen nachgewiesen werden und hat bis heute Gültigkeit [Weinberg et al. 1996]. Histologisch gesehen entwickelt sich eine Hyperplasie des Gewebes über eine Dysplasie bis hin zum Carcinoma in situ, welches letztendlich zum invasiven Karzinom übergeht [Weinberg et al., 1996]. Diese fakultativen präkanzerösen Gewebeveränderungen imponieren im Hals-Kopf-Bereich manchmal als weißliche, nicht abstreifbare Belege, sogenannte Leukoplakien [Speight et al., 1993].

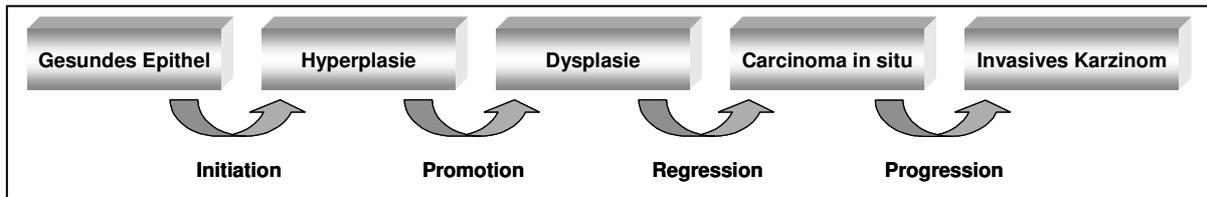


Abbildung 2: möglicher Tumorentstehungsprozess

Der Zellzyklus zeichnet sich durch einen ständigen Wechsel zwischen DNA-Schädigung und Reparatur aus. Jedes Individuum hat eine unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber exogenen Noxen (Mutagensensitivität), die eine DNA-Schädigung hervorrufen, und eine eigene Reparaturkapazität [Sancar, 1994]. Genetische Mutationen in einzelnen Genen konnten in den letzten Jahren für die verschiedensten Karzinomarten gefunden werden. Die Mutation im BRCA 1 und 2-Gen steht zum Beispiel für ein erhöhtes Risiko für die Brustkrebsentstehung [Davies, 1995], die APC-Gen-Mutation erhöht das Risikopotential für das kolorektale Karzinom [Lea et al., 2007]. Im Kopf-Hals-Bereich ist bis heute kein eindeutiges Gen zur Früherkennung, Prognose oder Therapieoption bekannt. Es wird jedoch in einigen Artikeln über die Beteiligung des EGFR-Rezeptors und des TP 53 diskutiert. Zahlreiche Autoren beschreiben in Ihren Essays eine Überexpression des *epidermal growth factor* Rezeptor in Karzinomen des Oropharynx [Lea et al., 2007]

1.2 Exogene Risikofaktoren

Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Mund- und Rachenkarzinomen gelten Tabak- und Alkoholkonsum. Besonders die Kombination beider Faktoren erhöht die Wahrscheinlichkeit zu erkranken deutlich [Taylor et al., 2006]. Beim Tabakkonsum muss auch der orale Genuss, meist in Form von Kautabak, bedacht werden [Goldenberg et al., 2004]. Des Weiteren ist der Konsum von Zigarillos, Zigarren und das Rauchen von Pfeifen als ebenso karzinogen einzustufen [Satcher, 1999].

Als weitere Risikofaktoren sind eine unzureichende Mundhygiene und einseitige Ernährung, insbesondere ein zu geringer Verzehr von Obst und Gemüse, beschrieben [Winn et al., 1991]. Für einige Karzinomarten ist eine Beteiligung von Viren beschrieben. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine Infektion mit dem Humanen Papilloma Virus (HPV), welches auch als Risikofaktor für das Cervixkarzinom gilt. Insbesondere die Infektion mit dem als „High-Risk“ eingestuften HPV Typ 16 gilt als Risikofaktor für die Karzinome des Oropharynx [Ragin et al.,

2007]. Auch eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus ist nachweislich an der Genese von Karzinomen des oberen Aerodigestivtrakts beteiligt. Zheng et al. beschreibt in seinem Artikel den Einfluss von EBV auf Onkoproteine (z. B. LMP-1), welche eine Rolle in der Entstehung von Nasopharynxkarzinomen haben [Zheng et al., 2007].

1.2.1 Rauchkondensat

Der langjährige Zigarettenkonsum gilt als der Hauptverursacher von Karzinomen unter anderem im Mund- und Rachenbereich. Mehr als 50 verschiedene karzinogen wirkende Stoffe wurden im Zigarettenrauch bereits nachgewiesen. Die wichtigsten hierbei sind polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine, aromatische Amine und Phenole [deMarini, 2004]. In dieser Arbeit wurde nicht die Wirkung eines speziellen Inhaltsstoffes untersucht, sondern die DNA-schädigende Wirkung von Rauchkondensat. Rauchkondensat ist ein Stoffgemisch, welches alle Inhaltsstoffe einer Zigarette enthält, wie sie bei inhalativem Konsum an die Schleimhautzellen gelangen. In dieser Versuchsreihe wurde exemplarisch Rauchkondensat von *Marlboro*^R-Medium-Zigaretten verwendet.

Das Rauchkondensat wurde in einer eigens dafür entwickelten Maschine hergestellt. Die Zigarette wird in dieses Gerät eingespannt, von diesem „geraucht“ und der dadurch entstehende Qualm kondensiert [Foy et al., 2004]. Der Zigarettenrauch ist ein komplexes Gemisch aus Dämpfen, wie z.B. Kohlendioxid oder Kohlenmonoxid, und festen Partikeln, wie z.B. Nikotin oder Teer. Beide Bestandteilgruppen finden sich im Rauchkondensat wieder [Smith et al., 2000]. Je nachdem welche Zigarettenart gewählt wurde variieren die Zusammensetzungen der einzelnen Stoffgruppen. Foy et al. untersuchten in Ihrem 2004 veröffentlichten Essay die schädigende Wirkung mehrerer verschiedener namhafter Zigarettenmarken, sowie den Unterschied zwischen normalen Zigaretten und deren Light Varianten [Foy et al., 2004].

N-Nitrosamine und Benzo[a]pyren werden als sogenannte Präkarzinogene bezeichnet, da sie zuerst metabolisch durch einen Cytochrom P450 abhängigen Aktivierungsprozess in ihren mutagen wirkenden Metaboliten umgewandelt werden müssen [Li et al., 2007].

Phenole dienen als sogenannte Cokarzinogene, indem sie nicht selbst karzinogen wirken, sondern von anderen Stoffen induziertes Tumorwachstum fördern [Rubin, 2002].

Die bisherigen Untersuchungen über die Inhaltsstoffe und die Eigenschaften von Rauchkondensat stützten die Entscheidung diesen Stoff als schädigendes Agens in dieser Arbeit zu verwenden.

1.3 Prävention und Therapie von Karzinomen durch Nahrungsbestandteile und Medikamente

In vielen Studien und Versuchen wurde die Wirkungsweise von Nahrungsmitteln oder deren molekularer Bestandteile auf Malignome getestet. Nachgewiesen wurden zum Beispiel die Wirkung von Katechinen, Inhaltsstoffe des grünen Tees, Grapefruit, Betacarotin aus Möhren und viele andere Naturstoffe. Katechine, Grapefruit und Betacarotin zum Beispiel haben Einfluss auf die Tumorgenese in Folge von Entzündungsreaktionen und daraus resultierenden möglichen Hyperproliferationen. [Aggarwal et al., 2006].

1.3.1 Curcumin

Curcumin oder Diferuloylmethan ist der gelbe Farbstoff aus der Wurzel der *Curcuma longa* Pflanze. Diese Gelbwurzel gehört zur Familie der Ingwergewächse (Zingiberacea) und wächst hauptsächlich in tropischen Gebieten [Mitchell, 2002]. Sie enthält neben Curcumin mehrere andere Curcuminoidderivate. Curcumin wird als Lebensmittelzusatzstoff (E100) zur Färbung von diversen Lebensmitteln wie zum Beispiel Margarine, Konfitüre und Senf verwendet. Darüber hinaus dient es als Geschmacksträger und Aromastoff und ist Hauptbestandteil des Currypulvers [Higdon, 2005]. Curcumin wird schon seit jeher in der traditionellen chinesischen und ayurvedischen Medizin als Medikament zur Heilung von Krankheiten verwendet. Schon 1910 wurde Curcumin als entzündungshemmend, antiviral, antibakteriell, antimykotisch und antioxidativ beschrieben. Es wurde bereits bei Alzheimer, Diabetes, Rheumatismus, Leber- und Gallenbeschwerden, chronischen Wunden und Entzündungen jeglicher Art mit guten Erfolgen angewendet [Gautam et al., 2007].

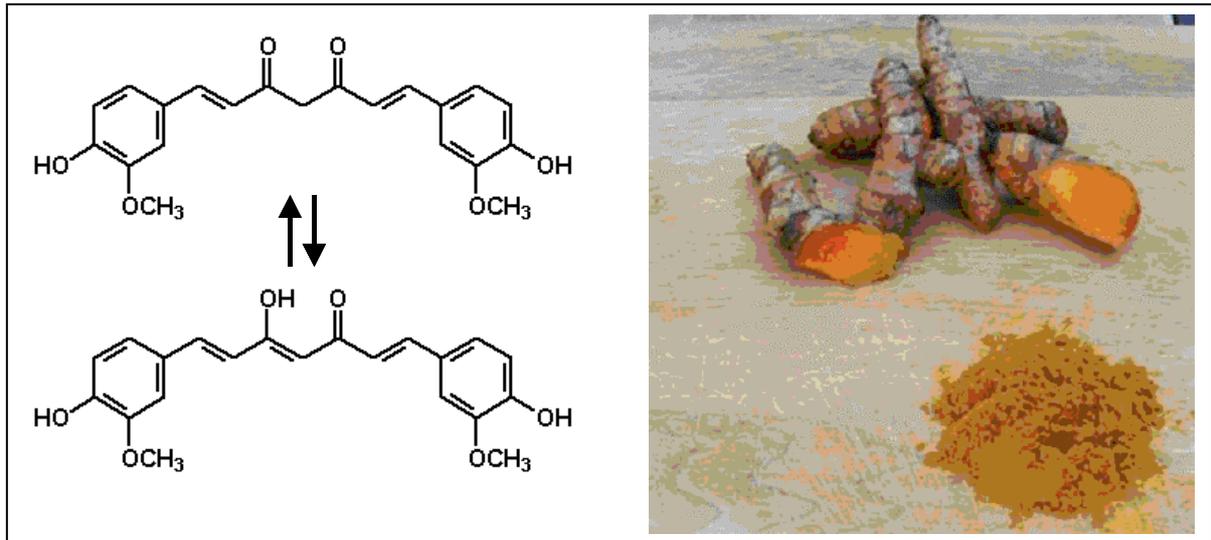


Abbildung 3: Strukturformel von Curcumin

1.3.2 Wirkung von Curcumin

Die Effekte von Curcumin auf die molekularen Vorgänge im Körper sind vielfältig. Beschrieben sind Wirkungen auf Transkriptionsfaktoren (NF- κ B, AP-1, EGR-1), Enzyme (COX2, LOX, iNOS), Zellzyklusproteine (Cyclin D1), Zytokine (TNF- α) und Rezeptoren (EGFR, HER2) [Shishodia et al., 2005].

Die antiinflammatorische Wirkung beruht auf einer Hemmung der Cyclooxygenase und Lipoxygenase und Induktion der Nitritoxidsynthetase. Diese Enzyme sind wichtige Bestandteile der Entzündungsreaktion [Menon et al., 2007; Rao, 2007]. Auch die Regulation der Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α und IFN- γ durch die Derivate der Curcumawurzel spielen bei der entzündungshemmenden Wirkung eine Rolle [Bright, 2007].

Außerdem wurde in vielen Versuchen der positive Einfluss von Curcumin auf die Karzinomentstehung nachgewiesen. Die Hauptwirkung wird hierbei der Hemmung von EGFR, NF- κ B, Cytochrom P450 und von Protoonkogenen zugeschrieben [Lin, 2007].

In Bezug auf die Tabakkarzinogenese muss auch der antioxidativen Wirkung von Curcumin ein großer Stellenwert zugesprochen werden. In vielen in vitro- und in vivo-Tests wurde die Eigenschaft als Radikalfänger herausgearbeitet [Khopde et al., 1999, Ruby et al., 1995].

Des Weiteren wurde eine Induktion der Apoptose in Tumorzellen, nicht jedoch in gesunden Zellen nachgewiesen [Duvoix et al., 2005].

Nicht nur präventiver Nutzen, sondern auch therapeutischer Nutzen wird Curcumin zugesprochen. Jagetia beschrieb eine positive Wirkung bei Patienten, deren Krebserkrankungen mit einer zusätzlichen Bestrahlung behandelt wurden. Curcumin soll die strahlentherapeutische Wirkung auf die Krebszellen verstärken und gleichzeitig gesunde Zellen vor deren Einfluss schützen [Jagetia, 2007].

Auch ein chemosensitiver Effekt wurde in einem Artikel von Limtrakul et al. beschrieben. Curcumin, als ein Nuklear Faktor KB-Blocker, verstärkt die Wirkung mancher Chemotherapeutika [Limtrakul, 2007].

1.4 Die Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenase, auch bekannt unter dem Namen „Prostaglandin-H-Synthase“ oder „Prostaglandinendoperoxid-Synthase“ spielt eine wichtige Rolle bei der Biosynthese von Eikosanoiden. Zur Gruppe der Eikosanoide gehören Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene, Derivate der Arachidonsäure. Sie spielen eine wichtige Rolle bei Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktionen [Mohan et al., 2003]. Die Cyclooxygenase setzt sich aus einer *epidermal growth factor* ähnlichen Domäne, bestehend aus einer Membranbindungsdomäne und einer katalytischen Domäne zusammen [Simmons et al., 2004].

1.4.1 Wirkmechanismus der Cyclooxygenase

Die Cyclooxygenasen sind membranständige Hämoproteine, welche sowohl als Oxygenasen als auch Peroxidasen für die Umwandlung von Arachidonsäure zu einer Vielzahl von Prostaglandinen verantwortlich sind. Die Derivate der Arachidonsäure, vor allem Prostaglandine, Thromboxane und Leukotriene spielen eine entscheidende Rolle bei Überempfindlichkeits- und Entzündungsreaktionen. Durch Verletzung einer Zellmembran, bestehend aus Phospholipiden, wird durch Zytokine, wie z.B. Interleukin-1, das Enzym Phospholipase A2 aktiviert. Hierdurch entsteht Arachidonsäure. Im Weiteren wird Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase in einem sauerstoffabhängigen Vorgang in zwei instabile Prostaglandinvorstufen umgewandelt. Prostaglandin H₂ und Prostaglandin G₂ werden anschließend in PGI₂, PGE₂, PGF_{2α} sowie Thromboxan A₂ überführt. Prostaglandine erhöhen durch ihre Bindung an die Prostaglandinrezeptoren die Schmerzrezeptorintensität [Mohan et al., 2003]

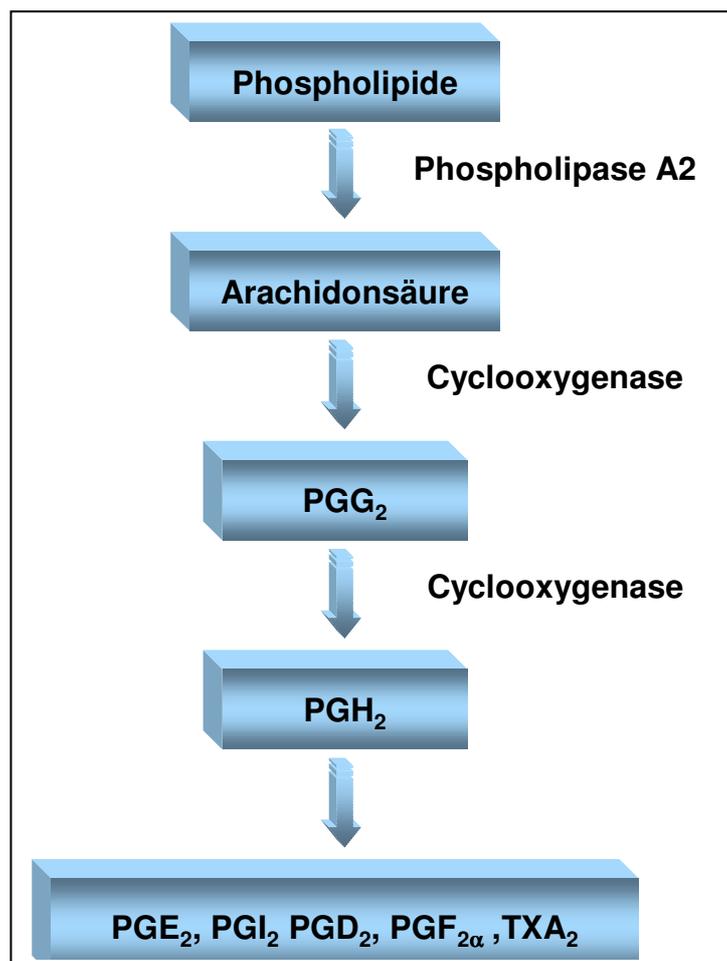


Abbildung 4: Cyclooxygenase-Kaskade

Bei den Cyclooxygenasen können zwei sich strukturell ähnelnde Formen unterschieden werden, die Cyclooxygenase-1 (COX-1) und Cyclooxygenase-2 (COX-2) [Smith et al., 2000].

Die Cyclooxygenase-1 wird als sogenanntes „Housekeeping“-Enzym bezeichnet, welches sich in annähernd jeder Zelle des Körpers befindet und weitgehend für die Homöostase der Prostaglandine und die Gewährleistung eines Basislevels verantwortlich ist [DuBois et al., 1998].

Die Cyclooxygenase-2 wird als sogenanntes „Response“-Enzym bezeichnet, welches unter physiologischen Bedingungen nur in sehr geringen Konzentrationen im menschlichen Körper zu finden ist. Es stellt die induzierbare Form der Cyclooxygenase dar und muss erst durch bestimmte intra- und extrazelluläre Reize, wie Stress, Entzündungsmediatoren (Interleukine, TNF- α , bakterielle Endotoxine), Wachstumsfaktoren (EGFR) und Onkogene aktiviert werden [Futagami et al., 2007].

Zahlreiche Mechanismen, wie die Angiogenese, Metastasierung, Apoptose und Differenzierung von Tumorgewebe, werden von der Cyclooxygenase-2 beeinflusst [Fosslien et al., 2000]. Auch die Umwandlung von „Prokarzinogene in Karzinogene“, zum Beispiel von Inhaltsstoffen des Rauchkondensats, spielt bei der Tabakkarzinogenese eine große Rolle [Ouyang et al., 2007]. Abschließend darf auch die Wirkung einer chronischen Entzündung des Gewebes als Risikofaktor für die Tumorentstehung nicht außer Acht gelassen werden [Futagami et al., 2007].

In immunhistochemischen Analysen von Tumorschnitten, Kopf-Hals-Karzinome eingeschlossen, konnte in vielen Malignomen eine erhöhte Prostaglandinproduktion nachgewiesen werden. Diese erhöhte Prostaglandin-Konzentration scheint im Zusammenhang mit einer zusätzlich nachgewiesenen deutlichen COX-2-Überexpression zu stehen [Fosslien et al., 2000].

1.4.2 Coxibe - selektive COX-2-Hemmer

Selektive COX-2-Hemmer zählen zur Gruppe der Nicht-Opioid-Analgetika und werden auch als Nicht-Steroidale-Antirheumatika (NSAR) bezeichnet. Sie vermindern durch eine Hemmung der Cyclooxygenase die Prostaglandin- und Thromboxanbildung. NSAR haben unterschiedliche Wirkqualitäten: analgetisch, antipyretisch und antiphlogistisch [Van Hecken et al., 2000]. Aus der Gruppe der selektiven Cox-2-Hemmer wurde für die Versuche dieser Arbeit ein Sulfonamidderivat, das Celecoxib (Handelsname Celebrex[®]) verwendet.

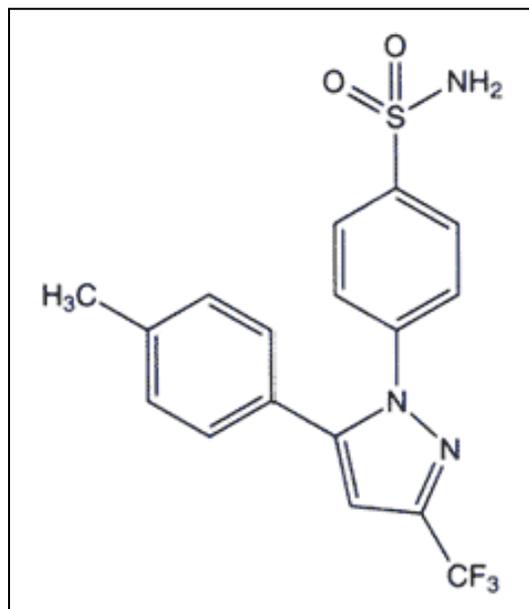


Abbildung 5: Strukturformel von Celebrex[®]

Der Metabolismus von Celecoxib verläuft über die hepatische Transformation in Hydroxyl- und Carboxylsäuren und Glucuronid-Derivate. Die oxidative Aktivierung wird durch das Cytochrom P450 2C9 Isoenzym gewährleistet [Isakson, 2003].

Als typische Indikationen für Celebrex[®] gelten chronische Gelenkserkrankungen, wie Arthrose und rheumatoide Arthritis. Selten treten nach Gabe von Celebrex[®] gastrointestinale Nebenwirkungen wie Blutungen oder Ulzera auf. Unter Langzeittherapien wurden vermehrt kardiovaskuläre Nebenwirkungen, Hautreaktionen und Blutdruckanstiege bei den Patienten beobachtet [Hochberg et al., 2002].

In vielen Studien wurde die Wirkung von selektiven COX-2-Hemmern in Bezug auf die Entstehung und Heilung von Krebs sowohl an Tierversuchen, als auch in klinischen Studien getestet. Bisher wurde in einigen Artikeln eine das

Tumorwachstum hemmende Wirkung der selektiven COX-2-Hemmer bei der Karzinomentstehung im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen [Futagami et al., 2007]. Auch der protektive Einfluss auf die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich wurde bereits in einigen Artikeln diskutiert [Mohan et al., 2003].

1.5 ***Epidermal growth factor receptor (EGFR)***

Der *epidermal growth factor* Rezeptor ist ein transmembranöses Glykoprotein, das hauptsächlich in der Plasmamembran verschiedenster Zellen vorkommt und unter anderem den *epidermal growth factor* und *transforming growth factor* (TGF-alpha) bindet.

Er ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von 170kDa und liegt auf Chromosom 7p12 [Ono et al., 2002].

Der *epidermal growth factor* Rezeptor wird zur Gruppe der ErbB/Her-Rezeptoren gezählt, welcher unter anderen ErbB-2, ErbB-3 und ErbB-4 angehören [Ono et al., 2002]. Der Rezeptor ist ein transmembranärer Wachstumsfaktor mit mehreren extrazellulären, cysteinreichen, liganden-bindenden Domänen, transmembranären Regionen und einer intrazellulären, C-terminalen Tyrosinkinase-Domäne [Kalyankrishna et al., 2006]. Die Aufgabe der Domänen besteht darin, Signale von der Außenseite einer Zelle in ihr Inneres zu übermitteln, wodurch anschließend spezielle Signalkaskaden in Gang gesetzt werden können. Hieraus resultiert jedoch auch die Möglichkeit der Weiterleitung abnormer Signale, welche dann in der Krebsentstehung eine entscheidende Rolle darstellen [Pomerantz et al., 2004].

Die Tyrosinkinaserzeptoren EGFR und ErbB2 zählen zur Gruppe der Protoonkogene, die durch Genamplifikation oder Überexpression der Genprodukte aktiviert werden können. In einer Arbeit von Küsters konnte eine Amplifikation des EGFR-Gens in der Gruppe der Kopf-Hals-Tumoren mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung nachgewiesen werden [Küsters, 2006].

Bei der Untersuchung von Tumorgewebe unterschiedlicher Lokalisation konnte eine Überexpression der Tyrosinkinaserzeptoren festgestellt werden. Diese zeigte sich sowohl bei Ovarialkarzinomen [Maihle et al., 2002], Lungenneoplasien [Lynch et al., 2004], Colonkarzinomen [Kinoshita et al., 1999] als auch bei Neoplasien des oberen Aerodigestivtrakts [Shin et al., 1994].

Mutagensensitivität zählt als Risikofaktor für eine DNA-Mutation in Zellen und daraus resultierende Zellumwandlung. Daraufhin kommt es zu einer aus der Mutation resultierenden Überexpression zum Beispiel der Wachstumsfaktoren wie EGFR. Auf Grund der hohen Expression von EGFR in verschiedenen Karzinomen wurde in einigen Studien versucht hieraus einen Therapieansatz zu erstellen. Hierbei wurde der Einsatz von Zytostatika, wie Gefitinib, Cetuximab und Erlotinib, welche eine EGFR inhibierende Wirkung haben, beschrieben [Yano et al., 2003] Weitere EGFR-hemmende Substanzen wurden in einigen Phase I-II Studien in einem Bericht von Normanno et al. erwähnt [Normanno et al., 2003].

1.6 Problemstellung und Zielsetzung

Die Schleimhaut des Mund- und Rachenbereichs stellt die erste signifikante Kontaktstelle mit Nahrungsmitteln, Medikamenten und schädlichen Noxen, wie Zigarettenrauch und Alkohol, dar.

Da die Häufigkeit des Auftretens und die Sterblichkeit in Bezug auf Karzinome des oberen Aerodigestivtrakts die letzten Jahre weitgehend konstant geblieben sind, ist es wichtig, sowohl DNA-schädigende Wirkstoffe, als auch genprotektive Substanzen aufzudecken.

In der vorliegenden Arbeit soll, nach durch Rauchkondensat verursachter DNA-Schädigung an Miniorgankulturen des oberen Aerodigestivtrakts, die Einflüsse von zwei unterschiedlichen Wirkstoffen, Curcumin und Celebrex[®], getestet werden. Ziel ist es deren protektive Eigenschaften in Folge eines Rückgangs der DNA-Schädigung in Schleimhautzellen nachzuweisen. Hierzu wurden Miniorgankulturen kultiviert, mit Rauchkondensat, Curcumin und Celebrex[®] inkubiert und anschließend die DNA-Schädigung der Zellen ausgewertet.

Mutationen an der DNA durch Noxen sind nicht immer gleichmäßig über die gesamte DNA einer Zelle verteilt. Einzelne spezielle Genorte zeigen ein sensibleres Schädigungsverhalten.

In diesen Versuchen wurden mittels Comet-FISH zur Beurteilung des spezifischen Schädigungsmusters des EGFR-Gens auf Chromosom 7p12 jene Bezirke mit fluoreszierenden Sonden angefärbt.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

Die in der Arbeit verwendeten Gewebeproben stammten von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität.

Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 30,5 Jahre. Die Gruppe der Probanden bestand aus 25 Männern und 15 Frauen.

Bei den Spendern wurde auf Grund einer chronischen Tonsillitis oder einer Hyperplasie der Gaumenmandel im Rahmen eines obstruktiven Schlafapnoesyndroms die Indikation zur operativen Entfernung der Tonsillen gestellt. Im Zuge der durchgeführten Tonsillektomie wurde vom Gaumenbogen gesunde Schleimhaut gewonnen. Die Patienten wurden präoperativ über die wissenschaftliche Verwendung der Gewebeproben aufgeklärt und eingehend über Lebensgewohnheiten, Tabak- und Alkoholkonsum und berufliche Exposition gegenüber Schadstoffen befragt. Die Untersuchungen wurden durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilians-Universität gemäß Ethikantrag Nr.:211/04 geprüft und befürwortet.

Die Schleimhautresektate wurden sofort nach Entnahme in sterile physiologische Kochsalzlösung gegeben und zeitnah ins Labor transportiert. Dort wurden die Frischbiopsate sofort weiterverarbeitet und die einzelnen Versuchsreihen gestartet.

2.2 Miniorgankulturen (MOK)

Anfang der neunziger Jahre berichteten Steinsvag et al. erstmalig über die Entstehung und Benutzung von Miniorgankulturen (MOK) unter Laborbedingungen. Hierbei handelte es sich um Fragmente des respiratorischen Epithels, welche in Organkulturen überführt wurden und innerhalb von 40 Tagen ein neues, mehrreihiges Epithel mit Zilienfunktion ausbildeten [Steinsvag et al., 1991].

Das Modell der Miniorgankulturen wurde stetig weiterentwickelt. Über die modifizierte Methode zur Kultivierung von dreidimensionalen MOK berichteten Kleinsasser et al. im Jahre 2004. Hierbei wurde die genotoxische Wirkung von Xenobiotika durch mehrfache, auch repetitiv mögliche, in-vitro Inkubation an nasaler Mukosa getestet [Kleinsasser et al., 2004].

MOK werden aus gesunden Schleimhautproben des oberen Aerodigestivtrakts von Patienten gewonnen. Hierbei wird den Zellen der angelegten Kulturen die Möglichkeit gegeben, weiter in einem vitalen Zellverband zu leben. Durch die weiterhin praktikabel gebliebenen Zell-zu-Zell-Interaktionen ähnelt das Modell der Miniorgankulturen den in vivo-Verhältnissen [Buehrlen et al., 2007].

2.2.1 Anlegen der Schleimhautproben

Die Schleimhautproben mussten zunächst im Labor unter sterilen Bedingungen von Drüsengewebe, Koagulationsstellen und Blutbestandteilen makroskopisch befreit werden. Auf einer Petrischale wurden nun die Resektate mit einem Skalpell in stecknadelkopfgroße Stücke zerteilt.

Diese wurden dreimal in Phosphate-Buffered-Saline (PBS) gereinigt und anschließend auf eine beschichtete 24-Well-Platte gegeben.

In jedes Well wurden, je nach Größe der Probe in 250µl BEGM zwischen 1 bis 3 Mukosastückchen gegeben.

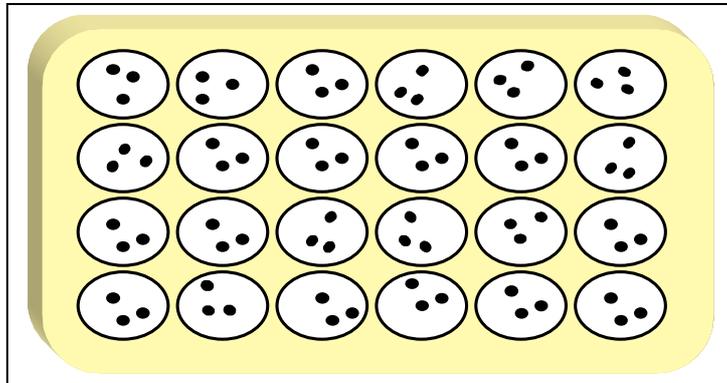


Abbildung 6: 24-Well-Platte mit Miniorgankulturen

2.2.2 Kultivierung der MOK

Die 24-Well-Platten mit den MOK wurden im Brutschrank mit einer konstanten Temperatur von 37°C, einem Kohlendioxidanteil von 5% und einer Luftfeuchtigkeit von 100% kultiviert. Alle 48 Stunden wurde das Nährmedium erneuert. Nach sieben Tagen erfolgte ein Wechsel der 24-Well-Platten.

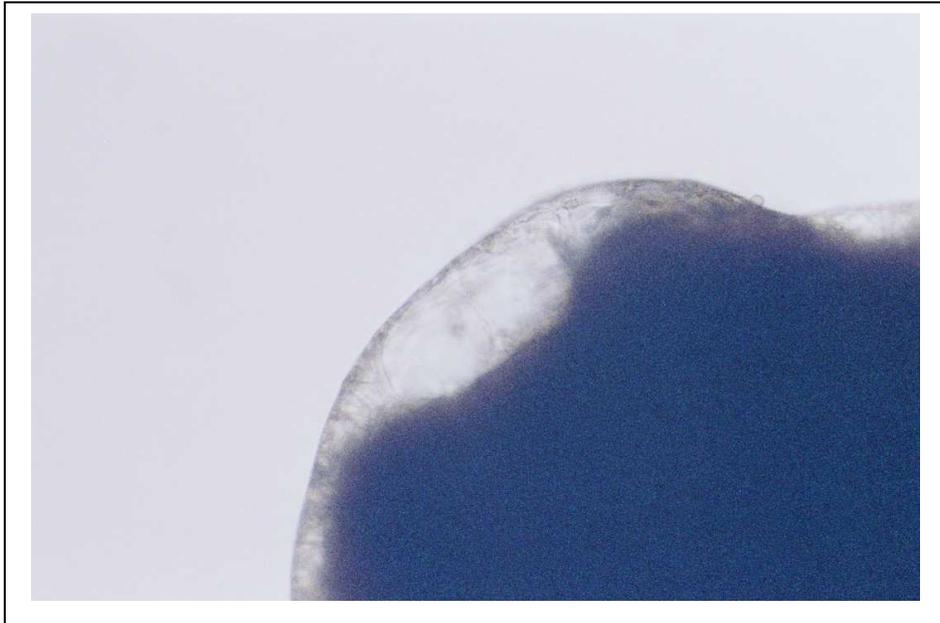


Abbildung 7: Mukosastückchen nach 2 Wochen Kultivierung (1:40)

Der Kultivierungsprozess wurde mit einem inversen Mikroskop überwacht, um etwaige Infektionen durch Bakterien oder Pilzsporen zu erkennen und um das Fortschreiten der Epithelialisierung der MOK zu überprüfen. Die Kultivierungsdauer bis zur vollständigen Epithelialisierung, siehe Abbildung 8, betrug je nach Probe zwischen 3 und 5 Wochen. Nach vollständiger Kultivierung begann die Inkubation mit den jeweils zu untersuchenden Substanzen.

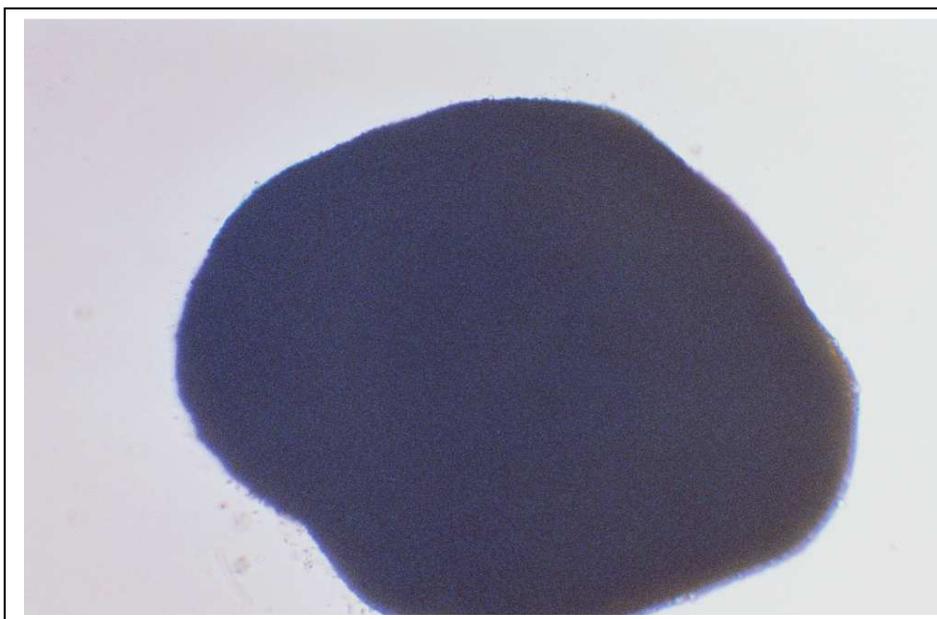


Abbildung 8: Mukosastückchen nach vollständiger Epithelialisierung (1:10)

2.2.3 Ansatz A: Inkubation der Kulturen mit Curcumin und Rauchkondensat

Vor Beginn der Versuchsreihe musste Curcumin, welches nur als Pulver erhältlich ist, gelöst und bis zu einer 1µM Konzentration verdünnt werden. Die Konzentration und erste antioxidative Effekte wurde an Vorversuchen einer aufsteigenden Reihe durch Harréus et al. ermittelt. Bei einer Konzentration von 1µM zeigte sich eine signifikante Wirkung von Curcumin [Harréus et al.; noch nicht veröffentlicht]. Als Lösungsmittel diente hierzu wie auch im Ansatz B für Celebrex[®] Dimethylsulfoxid (DMSO), das auch als Negativkontrolle in beiden Versuchsreihen verwendet wurde.

Zuerst wurde die Hälfte der MOK mit 25µl einer 1µM Curcumin Lösung für 60 Minuten inkubiert. Nach Ablauf des Zeitintervalls wurde die Substanz durch zweimaliges Waschen mit BEGM entfernt. Als nächster Schritt wurde, in einen Teil der mit Curcumin inkubierten Wells als auch einigen bisher freien Wells, jeweils 25µl Rauchkondensat (0,7mg/ml) gegeben. Die nur mit Rauchkondensat bebrüteten Wells dienten als Maß für die Schädigung von Rauchkondensat. Die Einwirkzeit für das Rauchkondensat wurde basierend auf Erkenntnissen aus Vorversuchen auf 18 Stunden festgelegt. Bei den vorbestehenden Vorversuchen zeigte sich eine deutliche Schädigung erst bei einer Inkubation von 18 Stunden. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurden die Organkulturen durch zweimaliges Spülen mit BEGM von allen Stoffen gereinigt und der Auftrennung in Einzelzellen zugeführt.

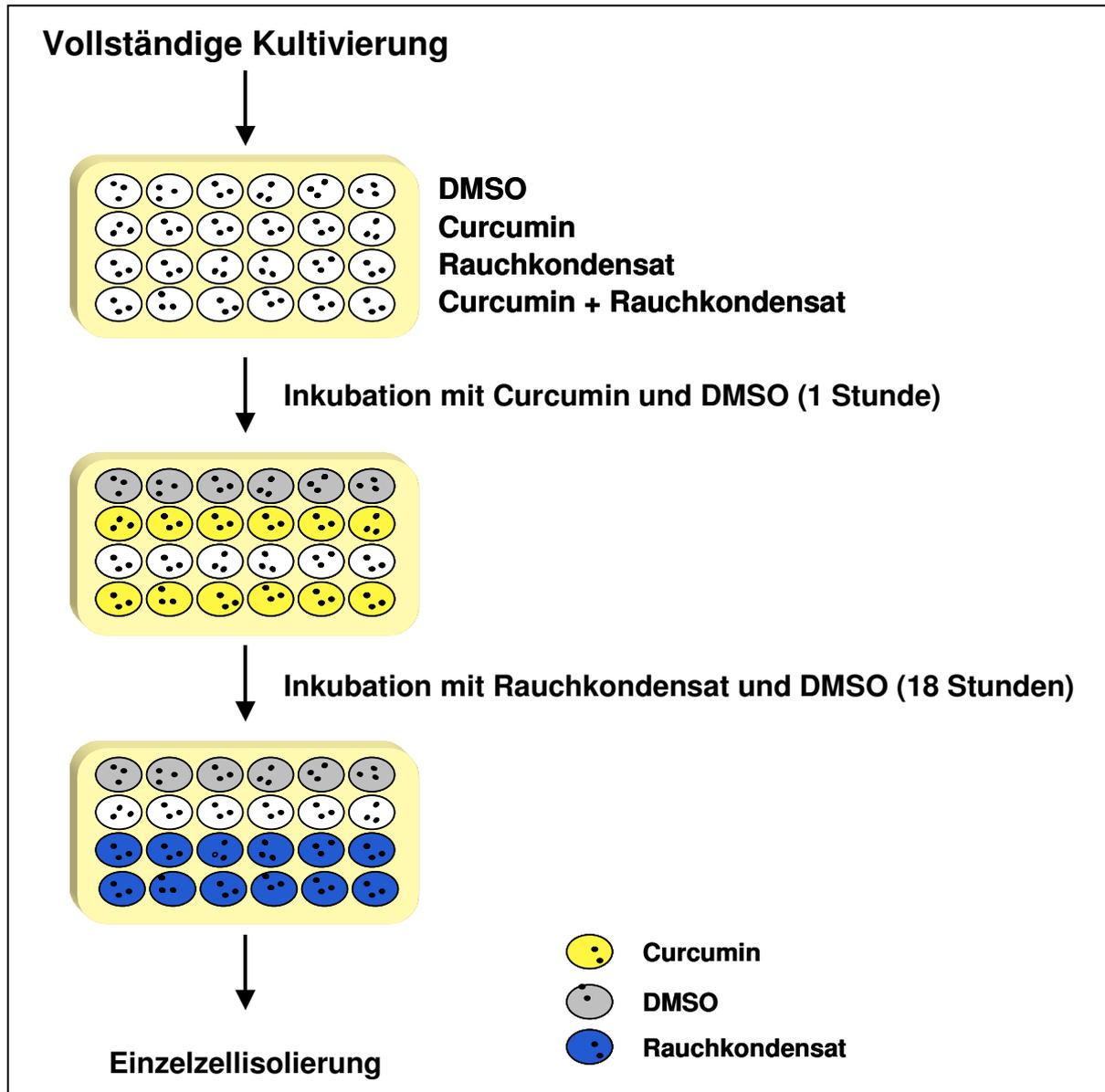


Abbildung 9: Inkubation mit Curcumin und Rauchkondensat (Ansatz A)

2.2.4 Ansatz B: Inkubation der Kulturen mit Celebrex[®] und Rauchkondensat

Im Ansatz B wurden die Organkulturen analog zu Ansatz A nur mit differenten Einwirkzeiten und Substanzen inkubiert. Die Versuche wurden mit dem Medikament Celebrex[®], dessen Hauptinhaltsstoff Celecoxib (100mg/Kapsel) ist, durchgeführt. Zum Zeitpunkt der Versuchsreihen lag der Inhaltstoff Celecoxib nicht als reiner Stoff vor.

Basierend auf Ergebnissen von Dosiswirkungskurven von Vorversuchen wurde die Inkubationszeit von Celebrex[®] auf 3x1/2 Stunde festgelegt.

Nach vollständiger Kultivierung der Schleimhautproben wurden an drei aufeinander folgenden Tagen einmal täglich für eine halbe Stunde das in DMSO gelöste Medikament Celebrex[®] in einer Konzentration von 0,1µM auf die Zellen gegeben und anschließend jeweils zweimal mit BEGM gereinigt. Am dritten Tag wurde den Kulturen außerdem das Rauchkondensat zugeführt und 18 Stunden in den Wells belassen.

Die Negativkontrolle wurde analog zu Versuch A mit dem Lösungsmittel DMSO durchgeführt.

Auch diese Miniorgankulturen wurden nach zweimaligem Waschen mit BEGM dem Vorgang der Einzelzellisolierung zugeführt.

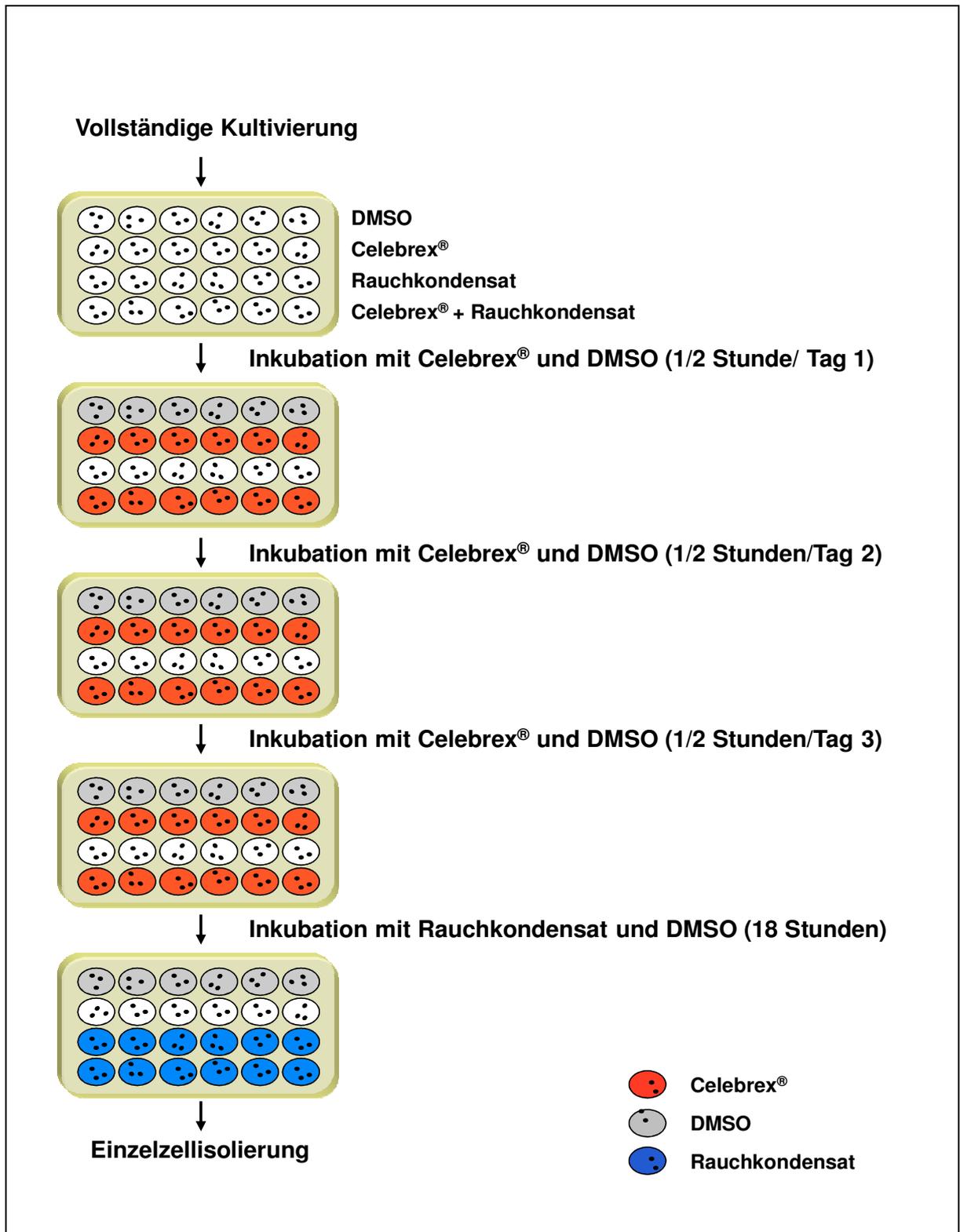


Abbildung 10: Inkubation mit Celebrex® und Rauchkondensat (Ansatz B)

2.2.5 Methodenspezifische Materialien

Material für Miniorgankulturen	Anleitung
--------------------------------	-----------

Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM)	
500ml Bronchial Epithelial Basalmedium (BEBM) Supplement Pack : BPE-26, hEGF-5, Insulin-2.5, HC-250, Epinephrin-250, T3-3.35, Transferrin-5, RA-50	Supplement Pack unter sterilen Verhältnissen dem BEBM zugeben und gut mischen. Lagerung: 4 °C Haltbarkeit: 6 Monate

Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	
500ml Aqua bidest. 9,99g DMEM Pulver 11,96g HEPES Pulver	DMEM und HEPES Pulver in Aqua bidest. lösen, auf einen pH-Wert von 7,2 einstellen und Sterilfiltrieren. Lagerung: 4 °C Haltbarkeit: 6 Monate

Agar 1,5%	
0,45g Agarpulver (Agar Noble) 30ml Aqua bidest.	Agarpulver mit Aqua bidest. verrühren, in der Mikrowelle erhitzen und sterilisieren.

24-Well-Agarplatte	
30ml Agar 1,5% 30ml DMEM 75µl nicht essentielle Aminosäuren 120µl Fungizone 240µl Penicillin-Streptomycin-Lösung 6ml fötales Kälberserum (FCS)	DMEM, FCS, nicht essentielle Aminosäuren, Fungizone und Penicillin-Streptomycin-Lösung steril mischen und mit in der Mikrowelle erhitztem Agar Noble versetzen. Anschließend mit einer Multipipette jedes Well der Agarplatte mit 250µl dieses Mediums beschichten.

2.3 Einzelzell-Mikrogelelektrophorese

Die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese wurde erstmals 1984 in einem Bericht von Oestling et al. erwähnt [Oestling et al., 1984]. Dieses Verfahren wurde im Laufe der Zeit beständig weiterentwickelt und modifiziert [Harréus et al., 2002]. Es können sowohl Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen als auch DNA-Crosslinks und inkomplette Exzisionsreparaturstellen nachgewiesen werden. Die Versuchsdauer an

humanen Frischbiopsaten konnte durch dieses Testverfahren erheblich verkürzt werden [Frenzilli et al., 2006]. Die durch die genotoxischen Substanzen hervorgerufene DNA-Fragmentierung zeigt sich nach Ablauf der Mikrogelelektrophorese in der digitalen Bildauswertung in Form eines Kometen. Intakte DNA präsentiert sich im Kopf des Kometen, geschädigte DNA-Teilabschnitte im Schweif [Harréus et al., 2002].

2.3.1 Isolierung der Zellen

Um eine Schädigung der Zellen durch UV-Licht auszuschließen, wurden alle weiteren Arbeitsschritte im Rotlicht durchgeführt.

Für die Gewinnung von Einzelzellen wurde nach Abschluss der Inkubation mit Curcumin, Celebrex[®] und Rauchkondensat den Miniorgankulturen ein Enzymgemisch hinzugefügt. Dabei wurden je 1-2 MOK in 600µl eines Gemisches aus Hyaluronidase, Kollagenase und Proteas hinzugegeben und 45 Minuten im Schüttelwasserbad bei einer Temperatur von 37°C inkubiert.

Zur Neutralisation der Enzyme wurden zu jedem Tube 600µl fötales Kälberserum gegeben und bei 800U/min, einem Rotorradius von 21,1cm und einer Temperatur von 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und 1ml 4°C kaltes PBS als Reinigungslösung hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde ein weiteres Mal wiederholt bevor der Überstand vollständig entfernt werden konnte und die Einzelzellen der Mikrogelelektrophorese zugeführt wurden.

2.3.2 Vitalitätsbestimmung

Nach der Einzelzellisolierung wurde je ein Zellpellet jeder Versuchsreihe dem Trypan-Ausschlusstest zugeführt. Hierbei ließ sich der prozentuale Anteil der vitalen Zellen bestimmen. 50µl Trypanblau wurden mit der Zellsuspension vermischt. Diese Mischung wurde dann in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und unter einem Mikroskop (400fach Vergrößerung) die vitalen und avitalen Zellen ausgezählt. Avitale Zellen, deren Membran beschädigt war, färbten sich blau an, vitale Zellen erschienen farblos. Die Vitalität entspricht dem prozentualen Anteil der gesunden Zellen in Bezug auf die Gesamtzahl der Zellen in einem Abschnitt der Zählkammer [Phillips et al., 1973]. Die Vitalität der Versuche lag bei beiden Ansätzen immer über 90%.

2.3.3 Präparation der Objektträger; Lyse der Zell- und Kernmembranen

Im Vorfeld mussten die Objektträger präpariert und die Lyselösung vorbereitet werden. Um eine bessere Haftung der Zellen auf dem Objektträger zu erreichen, wurden diese mit 85µl 0,5% Agarose beschichtet. Um eine vollständige Aushärtung der Agarose gewährleisten zu können, mussten die mit einem Diamantstift beschrifteten Objektträger vor Gebrauch mindestens 48 Stunden gelagert werden.

Nach Abschluss der Vorbereitungen wurden die Zellpellets jetzt mit 75µl 0,7% Agarose vermischt und anschließend auf die präparierten Objektträger aufgetragen.

Zur Aushärtung wurden die Objektträger auf eine gekühlte Platte gelegt. Nach ca. 10 Minuten konnte eine weitere Schicht Agarose (85µl) hinzugefügt werden. Nach Ablauf weiterer 10 Minuten wurden die Objektträger in einer Küvette platziert und mit der Lyselösung umspült.

Die Lyse bewirkte eine Auflösung der Zell- und Kernmembranen, wodurch eine Freilegung der DNA ermöglicht wurde. Nach einer Verweildauer von mindestens einer Stunde bei einer Temperatur von 4°C konnte die Elektrophorese durchgeführt werden.

2.3.4 Elektrophorese

Nachdem die Elektrophoresekammer mit dem Elektrophoresepuffer aufgefüllt worden war, wurden die getrockneten Objektträger horizontal, anodennah beginnend, in die Kammer positioniert und mit Puffer vollständig bedeckt.

Während der 20minütigen Inkubation im alkalischen Milieu kam es zur Entspiralisierung und Denaturierung der DNA. Danach erfolgte der Start der 20 Minuten dauernden Elektrophorese mit 25V und 300mA. Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Objektträger auf eine Färbebrücke gelegt und dreimal im Abstand von 5 Minuten mit Trisma-Base neutralisiert.

Im Anschluss wurden jene Objektträger, die für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung vorgesehen waren, in eine Küvette mit zweifach SSC gestellt und innerhalb einer Stunde weiterverarbeitet. Negativkontrollen und die Objektträger mit der alleinigen Inkubation mit Curcumin bzw. Celebrex[®] wurden nun mit 75µl Ethidiumbromid, ein

DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff, angefärbt. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger lichtgeschützt, feucht und kalt bei 4 °C gelagert.

2.3.5 Digitale Auswertung der Negativkontrolle und der Kontrollen von Curcumin und Celebrex®

Die Auswertung der mit Ethidiumbromid gefärbten Objektträger erfolgte mit Hilfe eines DMLB Fluoreszenzmikroskops mit einer daran angeschlossenen CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (KOMET 3.1). Mit dieser Methode können die DNA Fragmentierungen ermittelt werden. DNA-Schädigungen, die durch Einzelstrangbrüche entstehen, zeigen im elektrischen Feld ein unterschiedliches Migrationsverhalten. Hierbei wandern die Fragmente umso schneller und weiter, je stärker ihre DNA geschädigt wurde bzw. je kleiner die Fragmente sind.

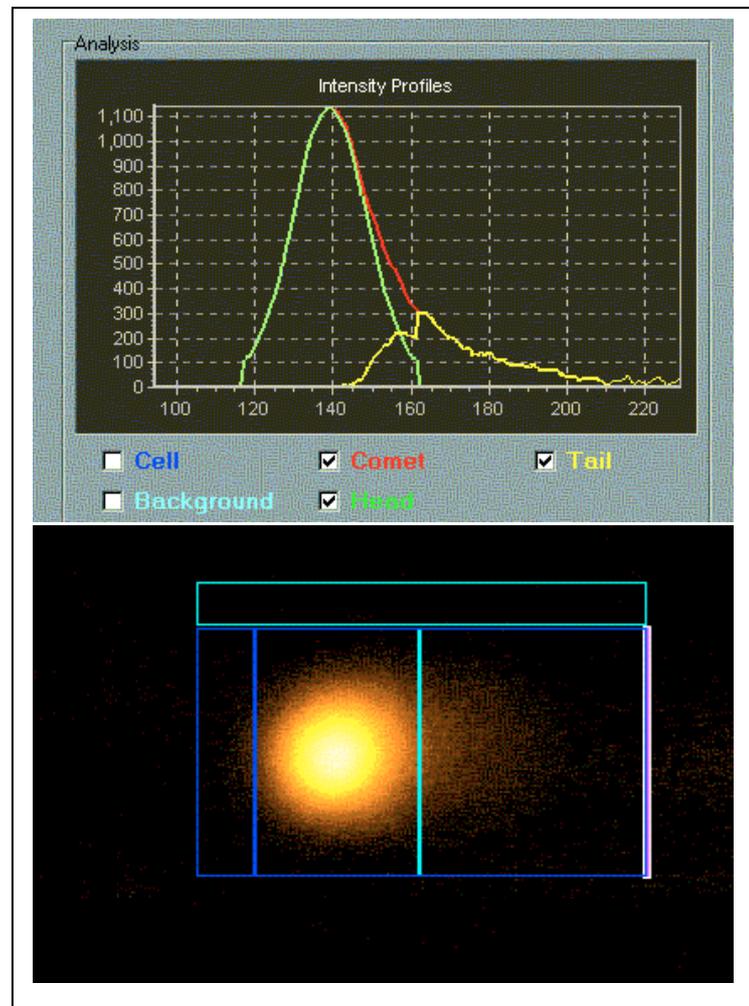


Abbildung 11: Auswertung mit Comet 3.1

Das Maß der Schädigung wird mit dem Olive Tailmoment quantifiziert. Im Mikroskop zeigt sich ein kometenähnliches Bild, wobei sich die intakte DNA im „Kopf“ und die

zerstörte DNA im „Schweif“ des Kometen abbilden. Der Olive Tailmoment wird berechnet aus der mittleren Wanderungsstrecke der DNA und dem Anteil der DNA im Schweif des Kometen in Relation zur Gesamt-DNA einer Zelle [Olive et al., 1993]. Abbildung 12 zeigt zum einen eine intakte Zelle der Negativkontrolle, zum anderen eine geschädigte Zelle nach Inkubation mit Rauchkondensat. Zellen, deren OTM < 2 liegt, gelten als nicht geschädigt. Auf diese Weise wurden pro Objektträger achtzig Zellen ausgewertet und deren OTM-Mittelwert berechnet.

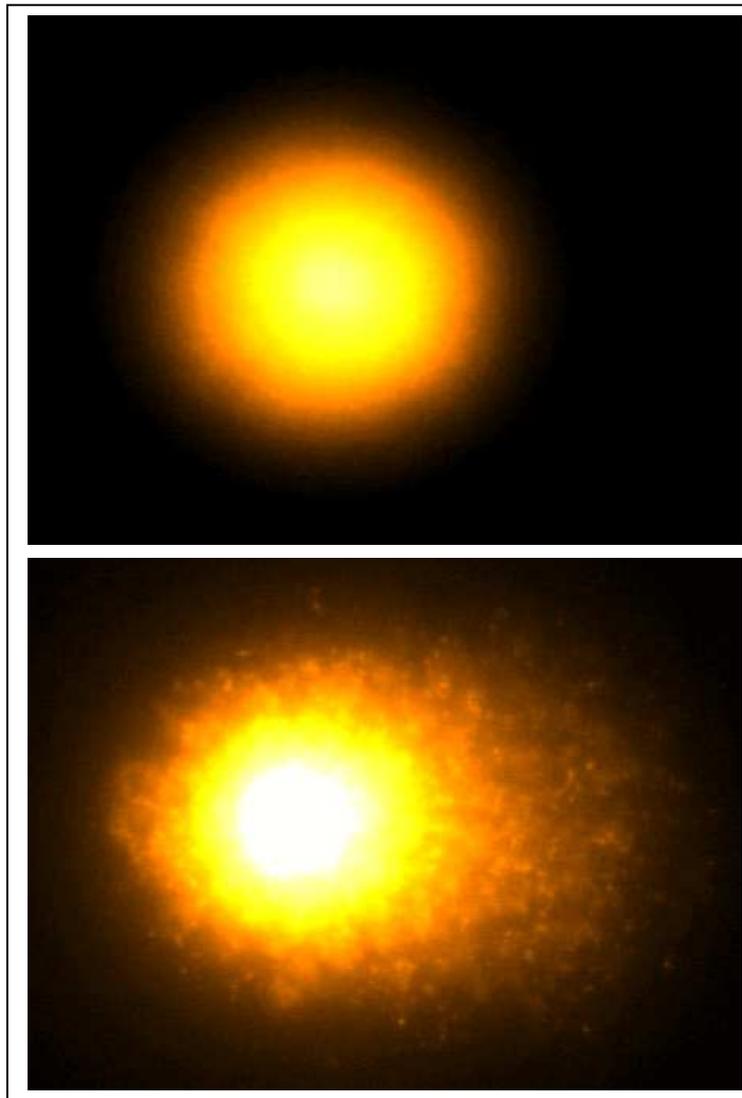


Abbildung 12: DNA einer intakten und einer geschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet-Assays

2.3.6 Methodenspezifische Materialien

Mikrogelelektrophorese	Anleitung
Enzymlösung	
10ml BEGM 50mg Protease 10mg Hyaluronidase 10mg Kollagenase P	Protease, Hyaluronidase und Kollagenase P in BEGM durch Klopfen und Schütteln lösen und anschließend filtrieren.
Agarose 0,5%	
0,5% Low-Melting-Agarose PBS	Agarosepulver in PBS auflösen, in der Mikrowelle erhitzen und bei 37 °C im Wasserbad bis zum Gebrauch aufbewahren.
Agarose 0,7%	
0,7% Normal-Melting-Agarose PBS	Analog zu Agarose 0,5%
Lysestammlösung	
146,4 NaCl (2,5M) 1,2g Trihydroxymethylaminomethan (10mM) 37,2g Na ² EDTA (100mM) 10g N-Laurylsarcosinnatriumsalz (1%) Aqua bidest.	NaCl, Trihydroxymethylaminomethan in 500 ml Aqua bidest. lösen; Na ² EDTA unter Zugabe von NaOH-Plätzchen in 160ml Aqua bidest. auflösen; N-Laurylsarcosinnatriumsalz in 160ml Aqua bidest. lösen. Alles vermischen, mit Aqua bidest. auf 1Liter auffüllen und auf einen pH-Wert von 10 einstellen. Lagerung: Raumtemperatur Haltbarkeit: 12 Monate
Lysepuffer	
1ml Triton X-100 [®] 10ml DMSO 89ml Lysestammlösung	Triton X-100 [®] und DMSO in einen 100ml Messzylinder geben und bis zum Eichstrich mit Lysestammlösung auffüllen
Elektrophoresepuffer	
24g NaOH-Plätzchen (300mM) 0,744g Na ² EDTA (1mM) Aqua bidest.	NaOH-Plätzchen und Na ² EDTA in 2 Litern Aqua bidest. Lösen, und auf 4 °C herunterkühlen.

Neutralisationspuffer	
48,5g Trihydroxymethylaminomethan Aqua bidest.	Trihydroxymethylaminomethan in 1l Aqua bidest. lösen und auf einen pH-Wert von 7,5 einstellen. Lagerung: Raumtemperatur Haltbarkeit: 12 Monate

Ethidiumbromidlösung	
0,2mg/ml Ethidiumbromid-Stammlösung Aqua bidest.	1:10 Verdünnung mit Aqua bidest. und filtrieren Lagerung: lichtgeschützt; Raumtemperatur

2xSSC	
100ml 20xSSC Aqua bidest.	20xSSC mit 900ml Aqua bidest. mischen und auf einen pH-Wert zwischen 6,8-7,2 einstellen. Lagerung: Raumtemperatur Haltbarkeit: 6 Monate

2.4 Comet Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung ermöglicht es, mittels Fluoreszenz markierter DNA-Sonden Gen- oder Chromosomenabnormalitäten sichtbar zu machen. Diese Methode wird vor allem in der pränatalen Diagnostik zum Auffinden von Chromosomenschäden verwendet. Die einfache in situ Hybridisierung wurde bereits 1969 in einigen Essays beschrieben und im Jahre 1996 durch eine vorherige Fluoreszenzfärbung weiterentwickelt [Swiger et al., 1996].

Durch Modifikationen von Inkubationsphasen, Konzentrationen und Vorbehandlung der Zellen konnte dieses Verfahren auch für humane Schleimhautzellen verwendet werden. Dies ermöglicht die Lokalisation spezieller Genloci und deren Schädigung oder Reparatur darzustellen [Rapp et al., 2005]. Durch dieses Verfahren demonstrierten McKenna et al. die Reparatur der Genregion TP53 in zwei Blutkrebszelllinien [McKenna et al., 2003].

2.4.1 Entwässerung der Objektträger; Hybridisierung mit EGFR/Zentromer

Nach Inkubation in 2xSSC für 2x5 Minuten erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe aus 70%, 85% und 100% Ethanol für jeweils 5 Minuten. Nach Kennzeichnung des Objektträgeranteils, der später mit den Sonden inkubiert werden sollte, wurden die Objektträger auf einer 37°C warmen Heizplatte 10 Minuten getrocknet und erwärmt.

Nun wurde auf den markierten Anteil 10µl der EGFR-Rezeptor/Zentromer DNA-Sonde aufgetragen, ein Deckglas aufgelegt und dieses mit Fixogum luftdicht verschlossen. Zur Codenaturierung kamen die Objektträger für exakt 5 Minuten auf eine 74°C heiße Präzisionsheizplatte, bevor sie anschließend für mindestens 16 Stunden in einer feuchten Kammer im Brutschrank bei 37°C hybridisiert wurden.

2.4.2 Waschen und Anfärben der Objektträger

Zum Auswaschen der überschüssigen DNA-Sonden wurden die Objektträger nach Entfernen des Fixogums und des Deckglases abwechseln in auf 45°C erhitztes Formamid, 2xSSC und NP40 getaucht.

Im Anschluss wurde zur Anfärbung der DNA ein Gemisch aus Dapi und Antifade verwendet. Dapi und Antifade wurden hierzu im Verhältnis von 2:1 gemischt und nach der Trocknung auf einer 37°C heißen Heizplatte je 18,5µl auf jeden Objektträger aufgebracht, mit einem Deckglas verschlossen und mit Klarlack versiegelt.

Bis zur Auswertung wurden die Objektträger im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt.

2.4.3 Digitale Auswertung der chromosomalen DNA-Migration

Die Auswertung erfolgte analog zum Comet Assay mit Hilfe eines DMLB Fluoreszenzmikroskops und einer daran angeschlossenen CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (Comet ++TM). Es wurden auch hier der Olive Tailmoment als Maß der Gesamt-DNA-Schädigung quantifiziert.

Des Weiteren wurde in Anlehnung daran der Munich Chromosomal Tail Moment (MCTM) quantifiziert, als Maß der DNA- Schädigung in einem bestimmten Genort.

Der MCTM errechnet sich aus der Länge des Schweifes, der Anzahl der Signale, deren Intensität und Lokalisation. Er beschreibt das Produkt der mittleren chromosomalen Wanderungsstrecke und der chromosomalen Fluoreszenz im Kometenschweif, dividiert durch die gesamte Fluoreszenz des Chromosoms in der Zelle [Harréus et al., 2004]. Vorab wurden die unter dem Mikroskop sichtbaren grünen und roten Signale im Kopf und im Schweif gezählt. Eine komplett intakte Zelle während der Interphase sollte keinen sichtbaren Schweif besitzen und jeweils zwei grüne (Zentromer) und zwei rote (EGFR) fluoreszierende Signale im Kopf aufweisen. Je stärker die Zelle geschädigt ist, umso mehr Fragmente weist diese auf und desto mehr Signale sind zu erkennen bzw. befinden sich im Schweif des Kometen. Pro Objektträger wurden 25 Zellen ausgewertet. Es wurde der Gesamt-OTM und der MCTM für die roten und grünen Signale ausgerechnet. Die roten Signale stellen das EGFR-Gen auf Chromosom 7p12 dar, die grünen Signale das Zentromer des Chromosoms 7 (7p11,1-q11,1). Die Anfärbung erfolgte sowohl in der Inter- als auch der Metaphase des Zyklus.

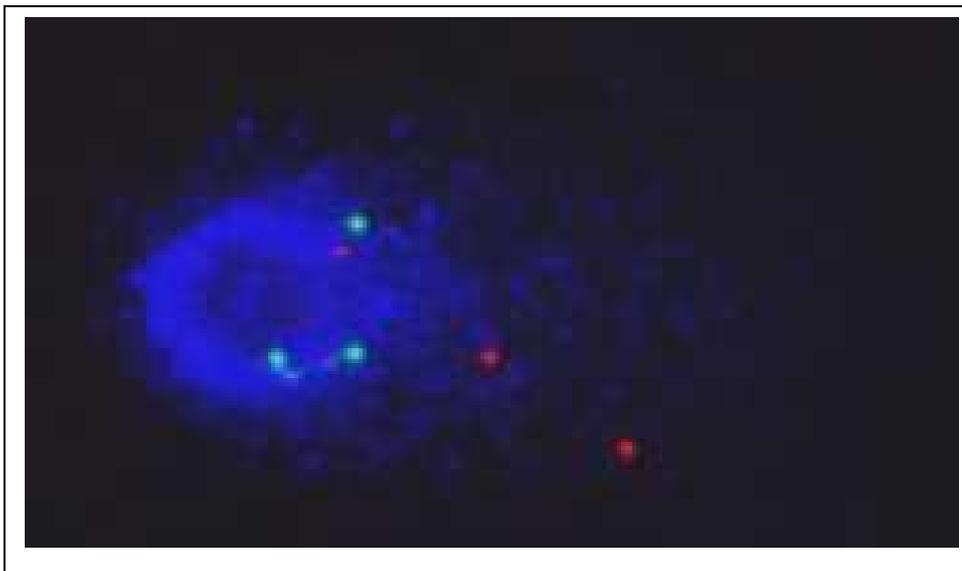


Abbildung 13: DNA einer geschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet-FISH

2.4.4 Methodenspezifische Materialien

Comet FISH	Anleitung
2xSSC-Lösung 100ml 20xSSC Aqua bidest.	20xSSC mit Aqua bidest. mischen und auf einen pH 7,0 (\pm 0,2) einstellen. Lagerung: Raumtemperatur Haltbarkeit: 6 Monate
Formamid-Waschlösung 132,5ml Formamid 120ml Aqua bidest. 200ml 20xSSC	Alle drei Komponenten in einem Messzylinder mischen und auf einen pH-Wert zwischen 7-7,5 einstellen. Lagerung: 4°C Haltbarkeit: 7 Tage
DAPI DAPI (4'-6-diamidino-2-Phenylindol) Antifade-III-Puffer	DAPI und Antifade im Verhältnis 2 :1 mischen.

2.5 Versuchsablauf

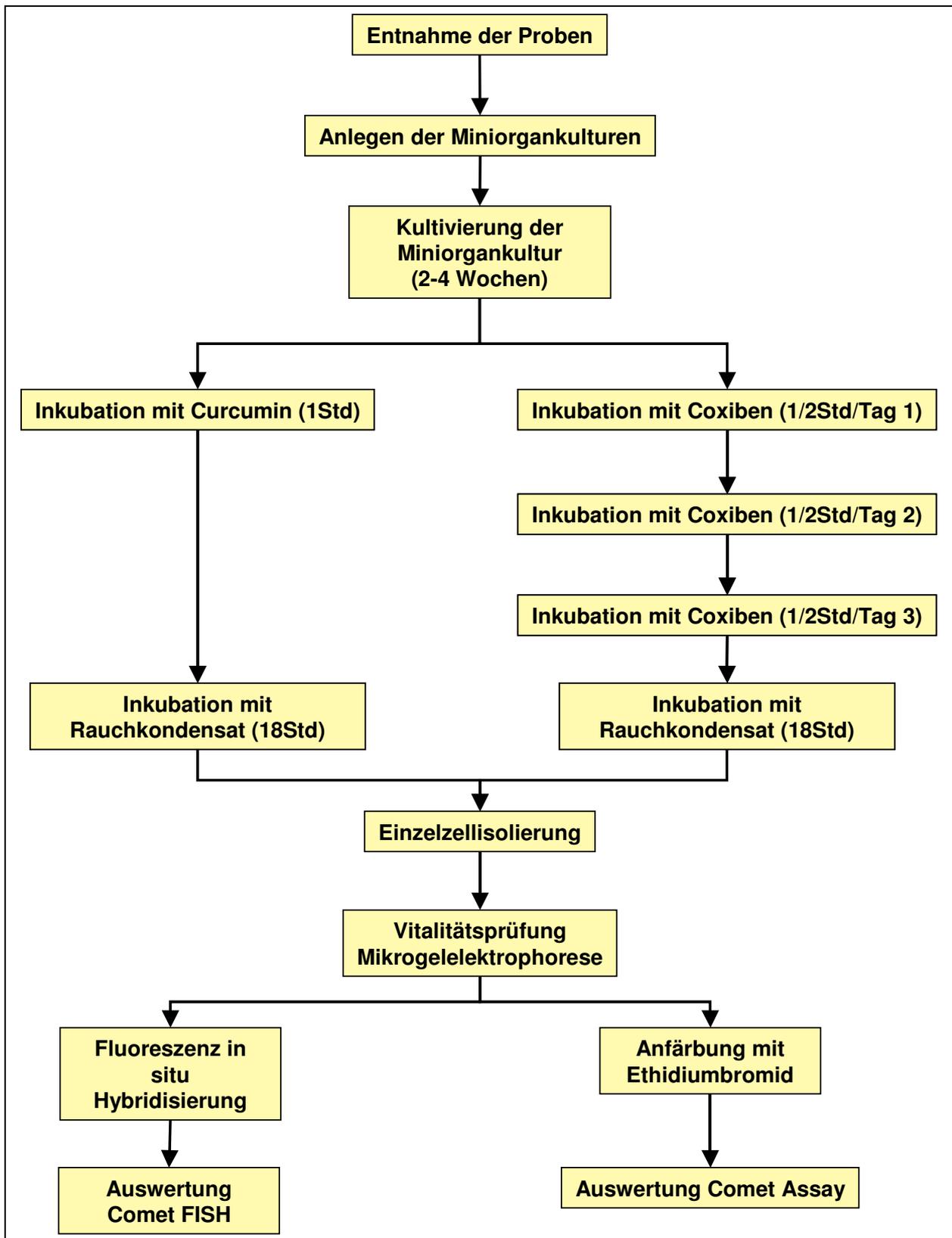


Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

2.6 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller	Ort
24-Well-Platten	Falcon	Heidelberg
Combitips	Eppendorf	Hamburg
Deckgläser für Objektträger (klein)	Langenbrick	Emmendingen
Deckgläser für Objektträger (76x26mm)	Langenbrick	Emmendingen
Einmalspritzen (10ml)	Becton Dickinson	Heidelberg
Einwegfiltereinheiten steril; Millex-GV; Millex-GS	Millipore	Eschborn
Färbekammer	VWR	Ismaning
Hybridisierungskammer	VWR	Ismaning
Küvette	VWR	Ismaning
Kanülen	VWR	Ismaning
Objektträger 24x70mm je 5mm seitlich mattiert	Langenbrick	Emmendingen
Objektträgerkasten	GLW	Würzburg
Pipetten aus Polystyrol (2,10,25ml); steril	Greiner	Frickenhausen
Pipettenspitzen (200;1000 μ l); steril	Eppendorf	Hamburg
Petrischalen	VWR	Deutschland
Pinzetten	Angiokard	Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5ml	Eppendorf	Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (13ml)	Sarstedt	Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50ml)	Greiner	Frickenhausen
Stericup (150ml), steril	Millipore	Eschborn
Skalpell	Pfm	Köln
Schreibdiamant	Renner	Dannstadt
Tubes	Eppendorf	Hamburg

Chemikalien	Hersteller	Ort
Aminosäuren, nicht essentiell	Gibco Lifetechnologies	Eggenstein
Aqua bidest	Apotheke LMU	München
Agar Noble	DIFCO	Detroit, USA
Alkohol absolut	Apotheke	LMU
Alkohol 85%	Apotheke	LMU
Alkohol 70%	Apotheke	LMU
Antifade	Abbott	Illinois, USA
Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM)	Promocell	Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma	Steinheim
EGFR-Rezeptor Sonden	Abbott	Illinois, USA
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz	Serva	Heidelberg
Dapi	Abbott	Illinois, USA

Chemikalien	Hersteller	Ort
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Lifetechnologies	Eggenstein
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	Darmstadt
Fötales Kälber Serum (FCS)	Gibco Lifetechnologies	Eggenstein
Formamid	Sigma	Steinheim
Fungizone	Gibco Lifetechnologies	Eggenstein
HEPES (N-2-Hydroxaethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure)	Gibco Lifetechnologies	Eggenstein
Hyaluronidase aus Schafshoden	Sigma	Steinheim
Kollagenase P aus Clostridium histolyticum	Roche	
Low Melting-Agarose, Sea-Plaque GTG, 0,7%	FMC-Bio Products	Rockland, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma	Steinheim
Natriumhydroxid Plätzchen(NaOH)	Merck	Darmstadt
N-Lauroylsarcosin Natrium Salz	Sigma	Steinheim
Normal Melting-Agarose Seakem LE, 0,5%	FMC-Bio Products	Rockland, USA
NP 40	Abbott	Illinois, USA
Protease aus Streptomyces griseus	Sigma	Steinheim
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma	Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Lifetechnologies	Eggenstein
SSC -Stammlösung	Abbott	Illinois, USA
Supplement Pack für BEGM	Promocell	Heidelberg
Trypanblau 0,4%	Gibco Lifetechnologies	Eggenstein
Triton X-100 ^R	Sigma	Steinheim
Trishydroxymethylaminomethan	Merck	Darmstadt

2.7 Technische Geräte und Zubehör

In nachfolgender Tabelle sind alle technischen Geräte, die im Laufe der Versuche benutzt worden sind, aufgeführt.

Gerätebezeichnung	Gerätetyp	Hersteller	Ort
Analysewaage	Voyager (0,1mg-62mg)	Ohaus	Gießen
Akku-Jet		Eppendorf	Hamburg
Brutschrank	Function Line	Heraeus	Hanau
Brutschrank	HeraCell	Heraeus	Hanau
Bunsenbrenner			
Combitip		Eppendorf	Hamburg
Eismaschine		Migel ice life	
Elektrophoresenetzgerät	E865	Renner	Dannstadt
Elektrophoresewanne	Horizontalwanne (237x180mm)	Renner	Dannstadt
Kühlschrank (+4 °C)		Bosch	Stuttgart

Gerätebezeichnung	Gerätetyp	Hersteller	Ort
Magnetrührgerät	Combimag RCT	IKA	Staufen
Mikroskop (Standard)		Zeiss	Oberkochen
Mikroskop (Inversion)	DM IRB	Leica	Herbruggen, CH
Mikroskop (Fluoreszenz)	DM LB	Leica	Herbruggen, CH
Mikroskop Filtersystem	N 2.1, BP 516-560	Leica	Herbruggen, CH
Mikroskop Filtersystem	I3, BP 450-490	Leica	Herbruggen, CH
Mikroskop Objektiv	100x/1,25 Öl; 40x/0,5; 10x/0,22; 4x/0,1	Leica	Herbruggen, CH
Mikrowelle	MWS 2819	Bauknecht	Schorndorf
Minishaker	MS1	IKA-WORKS	Wilmington, USA
Pipetten 10,100,1000µl		Eppendorf	Hamburg
pH-Meter	766 Calimatic	Knick	Berlin
Präzisionsheizplatte	PZ 28-1	Harry Gestigkeit	Düsseldorf
Präzisionsheizplatte	SP 13	Reichert - Jung	Wien, A
Programm	Comet 3.1	Kinetic Imaging	Liverpool
Programm	Comet ++	Kinetic Imaging	Liverpool
Programm	Excel	Microsoft	
Schüttelwasserbad	1083	GFL	Burgwedel
Schüttler	Vortex Genie 2	Scientific	Bohemia, NY, USA
Spiegelreflexkamera		Minolta	Osaka, Japan
Sterilbank	Herasafe	Heraeus	Hanau
Waage	1419 (1mg-600g)	Sartorius	Gießen
Wasserbad	1002	GFL	Burgwedel
Zellzählkammer (Neubauer)		Merck	Darmstadt
Zentrifuge	Varifuge 3.ORS	Heraeus	Hanau
Zentrifuge Rotorradius 21,1cm	Varifuge 3. OR	Heraeus	Hanau

3 Ergebnisse

Die Gesamt-DNA-Schädigung wurde sowohl bei den Kontrollen als auch bei der Fremdkubation mit schädigenden Agenzien durch den Olive Tailmoment (OTM) quantifiziert.

In der Zusammenschau der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass bei einer Auswertung mittels Comet-Assay erst von einer relevanten genotoxischen Reaktion ausgegangen werden kann, wenn ein OTM >2 vorliegt [Olive et al., 1993].

Die DNA-Schädigung in bestimmten Genloci, in diesem Fall im Ephithelial-Growth-Factor-Rezeptor-Gen, wurde mittels Comet-FISH durch den Munich Chromosomal Tailmoment (MCTM) quantifiziert. Auch hier gilt erst ein MCTM>2 als Anhalt für eine relevante Schädigung des angefärbten Gens [Harréus et al., 2004].

Alle Werte des OTM und des MCTM sind im Folgenden als Mittelwerte und Standardfehler (\pm) angegeben.

3.1 Vitalitätsmessungen

In allen Versuchen wurde zum Ausschluss einer Zytotoxizität die Vitalität der Zellen gemessen. Mikroskopisch wurde die Anzahl vitaler und avitaler Zellen in einer Neubauerzählkammer bestimmt und in prozentualer Relation zur Gesamtzellzahl gesetzt. Diese lag in allen Versuchen über 90%. Eine Vitalität unter 80% galt zunächst als Ausschlusskriterium.

In folgender Tabelle sind die Mittelwerte der Vitalitäten der einzelnen Versuchsreihen dokumentiert. Als Minimalwert im Versuch A wurden 91,00%, als Maximalwert 100% ermittelt. Analog ergaben sich im Versuch B 90,00% und 100%.

Vitalitätsbestimmung des Ansatz A mit Curcumin	
Negativkontrolle mit DMSO	99,50%
Curcumin	99,71%
Rauchkondensat	95,86%
Curcumin+ Rauchkondensat	97,00%

Vitalitätsbestimmung des Ansatz B mit COX-2-Hemmern (Celebrex®)	
Negativkontrolle mit DMSO	99,55%
Celebrex® ;(Celecoxib, COX-2-Hemmer)	98,09%
Rauchkondensat	94,00%
Celebrex® + Rauchkondensat	96,73%

3.2 Statistische Testverfahren

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse wurde mit dem Programm SPSS™13,0 durchgeführt, die graphische Darstellung erfolgte durch Box Plots. Die Box Plots geben einen Bereich zwischen der 25. und 75. Perzentile wieder. Diese Kastenlänge ist gekennzeichnet durch eine obere und untere T-Linie, verbunden durch eine innere Linie, welche den Median repräsentiert. In den folgenden Abbildungen wurden Ausreißerwerte mittels eines Kreises gekennzeichnet, Extremwerte mittels eines Sterns. Ausreißerwerte sind definiert als Werte, die mehr als das 1,5-fache außerhalb der Kastenlänge liegen, Extremwerte mehr als das 3-fache. Der Vergleich der OTM-Werte bzw. MCTM-Werte des Fremdstoffes und der Kontrollansätze wurde durch den Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben geprüft. Zusätzlich wurden Signifikanzen errechnet und durch Bonferroni korrigiert. Von einer eindeutigen Signifikanz wurde bei Werten von $p < 0,05$ ausgegangen.

3.3 Schädigung der Gesamt-DNA in oropharyngealen Schleimhautzellen durch Rauchkondensat

Der Nachweis einer zytotoxischen sowie genotoxischen Schädigung durch Rauchkondensat wurde sowohl in Ansatz A als auch in Ansatz B durchgeführt. Eine Inkubation mit DMSO als Negativkontrolle zeigte mit OTM-Werten von 0,71 im Ansatz A und 0,79 im Ansatz B keine DNA-Fragmentierung.

Bei Rauchkondensat konnten im Vergleich zur oben aufgeführten Negativkontrolle signifikante Schäden nachgewiesen werden.

Die OTM-Werte lagen hier im Mittel bei 8,97 bzw. bei 8,74. ($p < 0,001$).

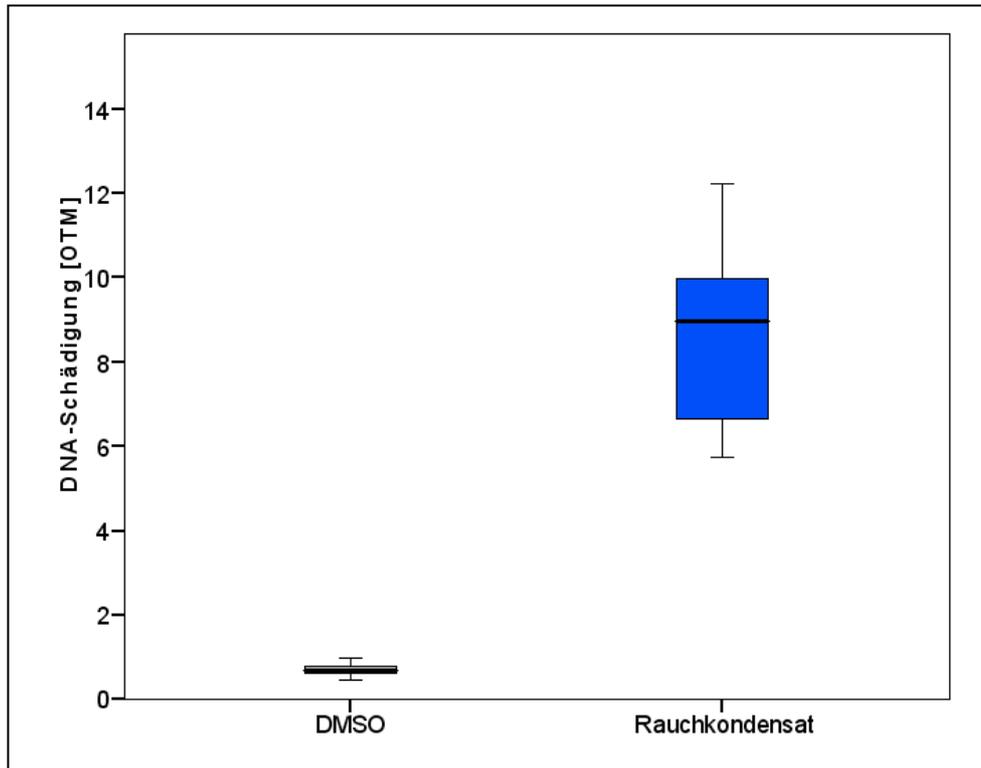


Abbildung 15: Ausmaß der DNA-Schädigung (Ansatz A) bei Inkubation mit DMSO und Rauchkondensat ($p < 0,001$)

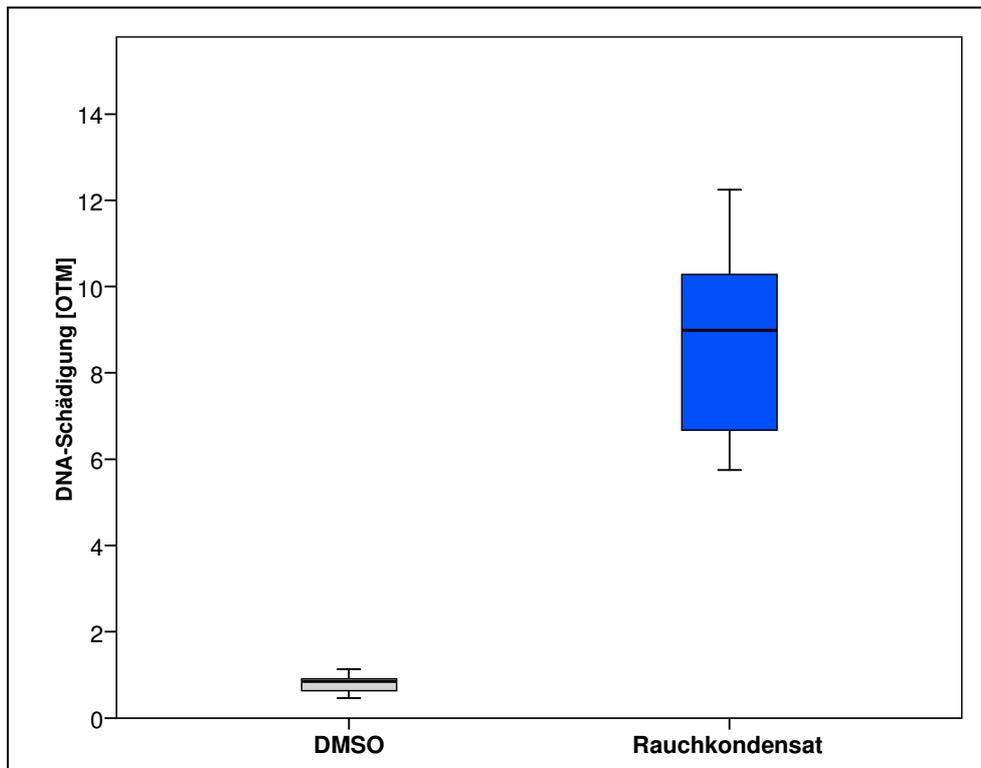


Abbildung 16: Ausmaß der DNA-Schädigung (Ansatz B) bei Inkubation mit DMSO und Rauchkondensat ($p < 0,001$)

3.4 Protektive Wirkung von Umweltstoffen und Medikamenten an Miniorgankulturen von humanen Schleimhautzellen.

Der Nachweis der antioxidativen und somit genprotektiven Wirkung von Umweltstoffen und Medikamenten wurde an Miniorgankulturen von Schleimhautproben des Oropharynx von gesunden Spendern erstellt.

In diesen Versuchen wurde die Auswirkung von Curcumin und Celebrex[®] an humanen Mukosazellen getestet.

3.4.1 Genprotektive Wirkung von Curcumin

Die Inkubation von Curcumin erfolgte sowohl alleine, als auch in Kombination mit Rauchkondensat.

Die Negativkontrolle mit DMSO ergab wie oben beschrieben einen OTM-Mittelwert von 0,71. Durch die alleinige Inkubation mit Curcumin und den Vergleich zur Negativkontrolle konnte eine eigene genotoxische Wirkung von Curcumin ausgeschlossen werden. Es ergaben sich OTM-Werte von 0,69.

Bei der Inkubation von Rauchkondensat alleine zeigte sich eine Schädigung mit Werten im Mittel von 8,97. Wurde Curcumin und Rauchkondensat gemeinsam auf die Kulturen gegeben, halbierten sich die OTM-Werte. Es wurden OTM-Mittelwerte von 4,99 gemessen. Der Vergleich der alleinigen Curcumininkubation und der Kombination aus Rauchkondensat und Curcumin ergab eine Signifikanz von $p < 0,001$. Der p-Wert der Kombination aus Curcumin und schädigendem Agens im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO war dementsprechend genauso $p < 0,001$.

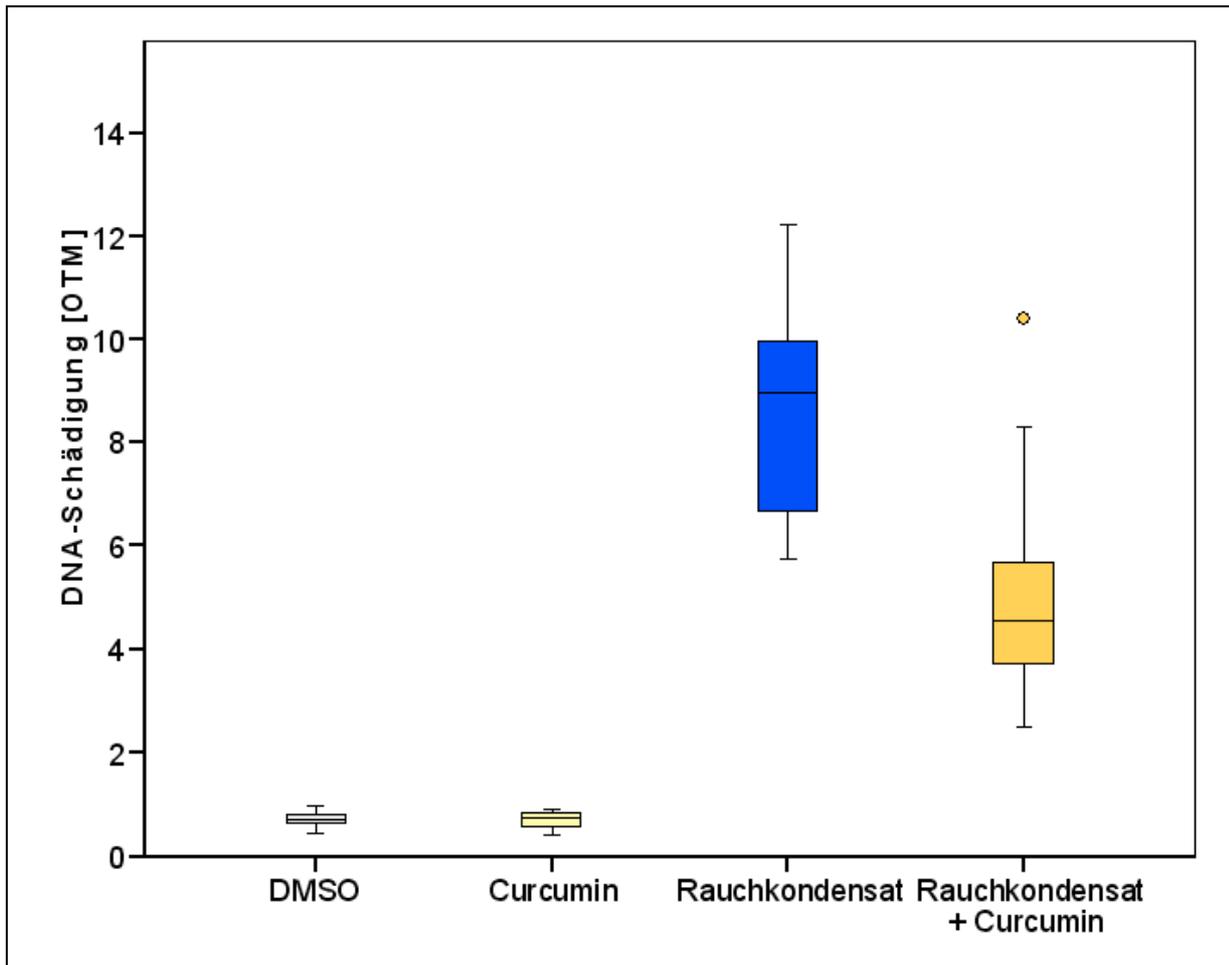


Abbildung 17: Ausmaß der gesamten DNA-Schädigung bei Inkubation mit DMSO ($p < 0,001$), Curcumin und Rauchkondensat ($p < 0,001$)

3.4.2 Genprotektive Wirkung des Medikaments Celebrex[®] (Cyclooxygenase-2-Hemmer)

Analog zum vorangegangenen Versuch wurde die genoprotektive Wirkung des Medikaments Celebrex[®], dessen Hauptinhaltsstoff Celecoxib ist, nachgewiesen. Die Negativkontrolle mit DMSO ergab hier im Mittel 0,79. Eigenes, relevantes genotoxisches Potential konnte durch eine dreimalige Inkubation mit Celebrex[®] ausgeschlossen werden. Die OTM Werte lagen im Mittel bei 0,81.

Rauchkondensat alleine zeigte jedoch eine erhebliche DNA-Fragmentierung mit Werten von 8,74.

Die Kombination beider Stoffe zeigte eine deutliche Reduzierung der DNA-Schädigung.

Die OTM-Werte der Kombinationsinkubation lagen bei 3,73, also eine Halbierung der OTM-Werte. Die Signifikanz konnte für den Vergleich von Celebrex[®] und der Kombination mit Rauchkondensat mit $p < 0,001$ beschrieben werden. Der Wert für den Vergleich mit der Negativkontrolle konnte ebenfalls mit $p < 0,001$ angegeben werden.

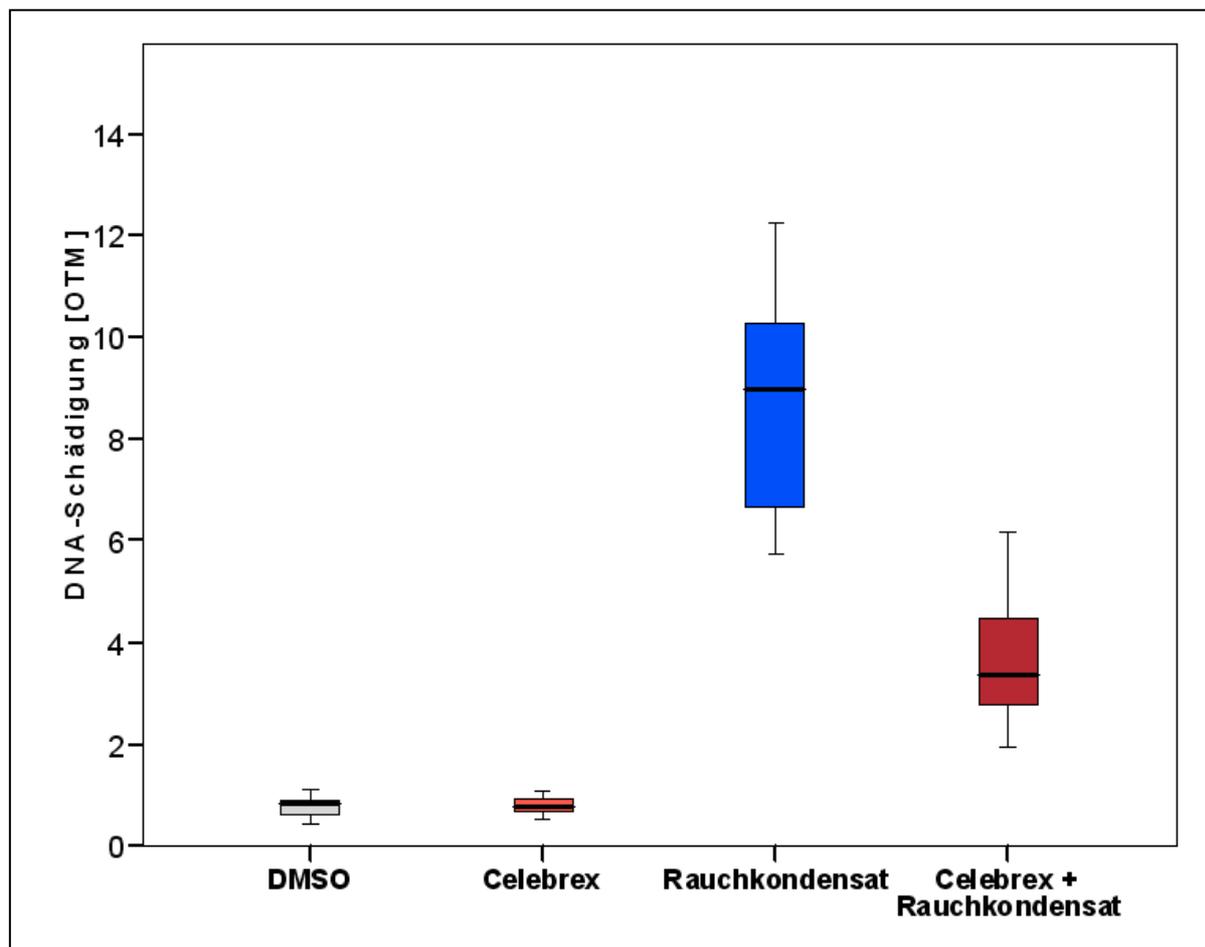


Abbildung 18: Ausmaß der gesamten DNA-Schädigung bei Inkubation mit DMSO ($p < 0,001$), Celebrex[®] und Rauchkondensat ($p < 0,001$)

3.5 Nachweis von DNA-Schäden im EGFR-Gen in humanen Schleimhautzellen mittels Comet-FISH

Im Folgenden wurden die Methoden Comet-Assay und Fluoreszenz in situ Hybridisierung zu einer Methode, dem Comet-FISH, verbunden. Auch hier wurde der Olive Tailmoment als Maß der Gesamt-DNA-Schädigung quantifiziert. Des Weiteren wurde hierbei die DNA-Schädigung in einem bestimmten Genlokus, in diesem Fall dem Chromosom 7, EGFR-Gen, durch den Munich Chromosomal Tailmoment (MCTM) ermittelt. Es wurde neben dem OTM der MCTM der grünen (Zentromer des Chromosom 7) und roten (EGFR) DNA-Signale ermittelt.

3.5.1 Ausschluss einer toxischen Wirkung von Curcumin und Celebrex[®] mittels Comet-FISH

Eine nicht geschädigte Zelle sollte zwei rote und zwei grüne fluoreszierende Signale aufweisen. Die roten Signale stellten die Chromosomen Region 7p12 (EGFR) dar, die grünen Signale das Zentromer des Chromosom 7 (7p11,1-q11,1). Zum Beweis der genotoxischen Wirkung von Rauchkondensat in bestimmten Genlokalisationen und der fehlenden Schädigung ohne Fremdkubation wurde auch bei dieser kombinierten Methodik eine Negativkontrolle mit DMSO angefertigt. Des Weiteren wurden Negativkontrollen mit Curcumin und Celebrex[®] angefertigt, um die eigene toxische Wirkung der Substanzen auf das EGFR-Gen auszuschließen. Hierbei konnte ein MCTM <2 sowohl für EGFR als auch für das Zentromer ermittelt werden. In nahezu allen Zellen waren zwei rote und zwei grüne Signale sichtbar und es war kein relevanter Schweif zu erkennen.

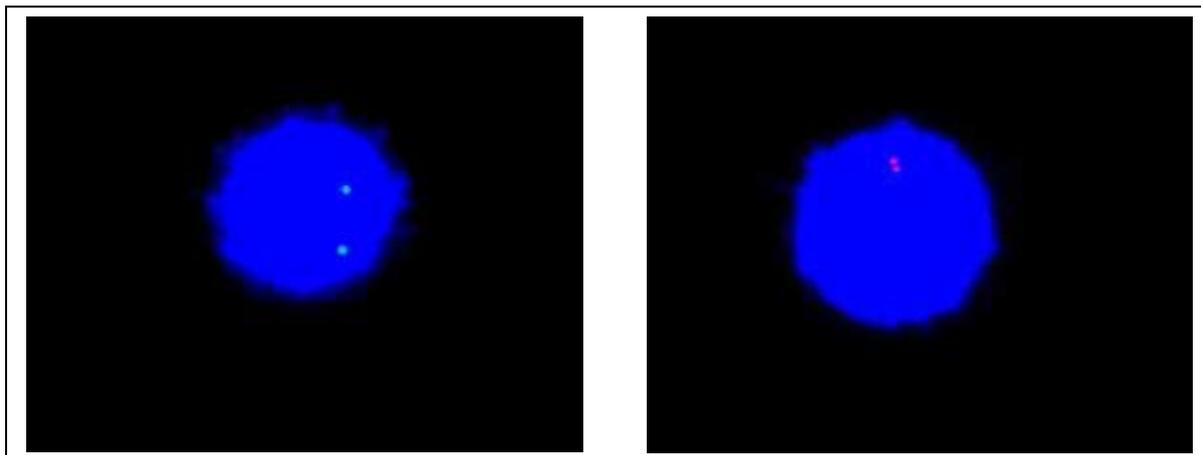


Abbildung 19: Kontrollen mit Curcumin und Celebrex[®], Zellen ohne Schädigung

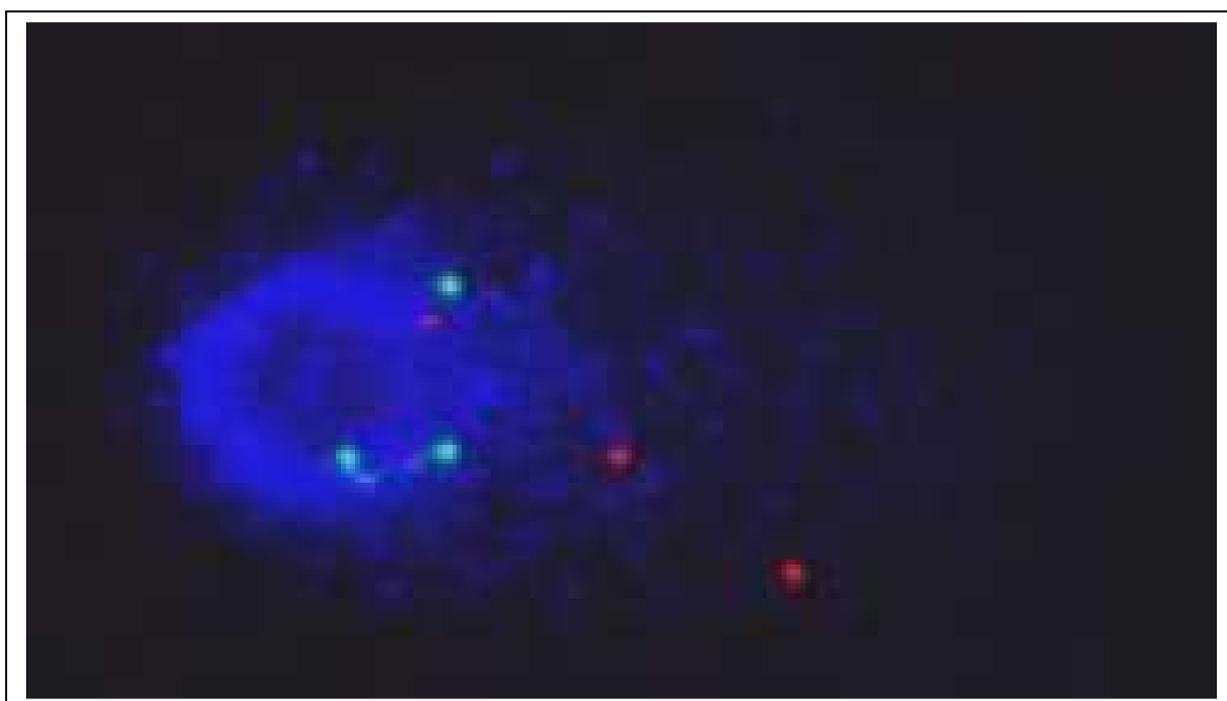


Abbildung 20: Schleimhautzelle mit DNA-Schädigung (rot=EGFR; grün=Zentromer)

3.5.2 Schädigung der DNA des *epidermal growth factor* Gens auf Chromosom 7 durch Rauchkondensat

Durch Rauchkondensat konnte sowohl eine Schädigung der Gesamt-DNA, als auch eine Schädigung der DNA im EGFR-Gen nachgewiesen werden. Der OTM betrug im Ansatz A im Mittel 8,97, im Ansatz B 8,74. Der MCTM für EGFR (rote Signale) lag im Mittel bei 10,30 bzw. 8,74. Die Signale des Zentromers (grüne Signale) ergaben einen MCTM-Mittelwert von 6,81 bzw. 5,97.

Zur Ermittlung der Signifikanz wurde der OTM mit jeweils dem MCTM der EGFR oder Zentromer Signale verglichen.

Bei der statistischen Auswertung im Versuch A zeigte sich im Vergleich des OTM und des MCTM (EGFR) eine Signifikanz von $p < 0,037$. Genauso konnte beim Vergleich mit den Zentromer-Signalen eine eindeutige Signifikanz von $p < 0,004$ erhoben werden.

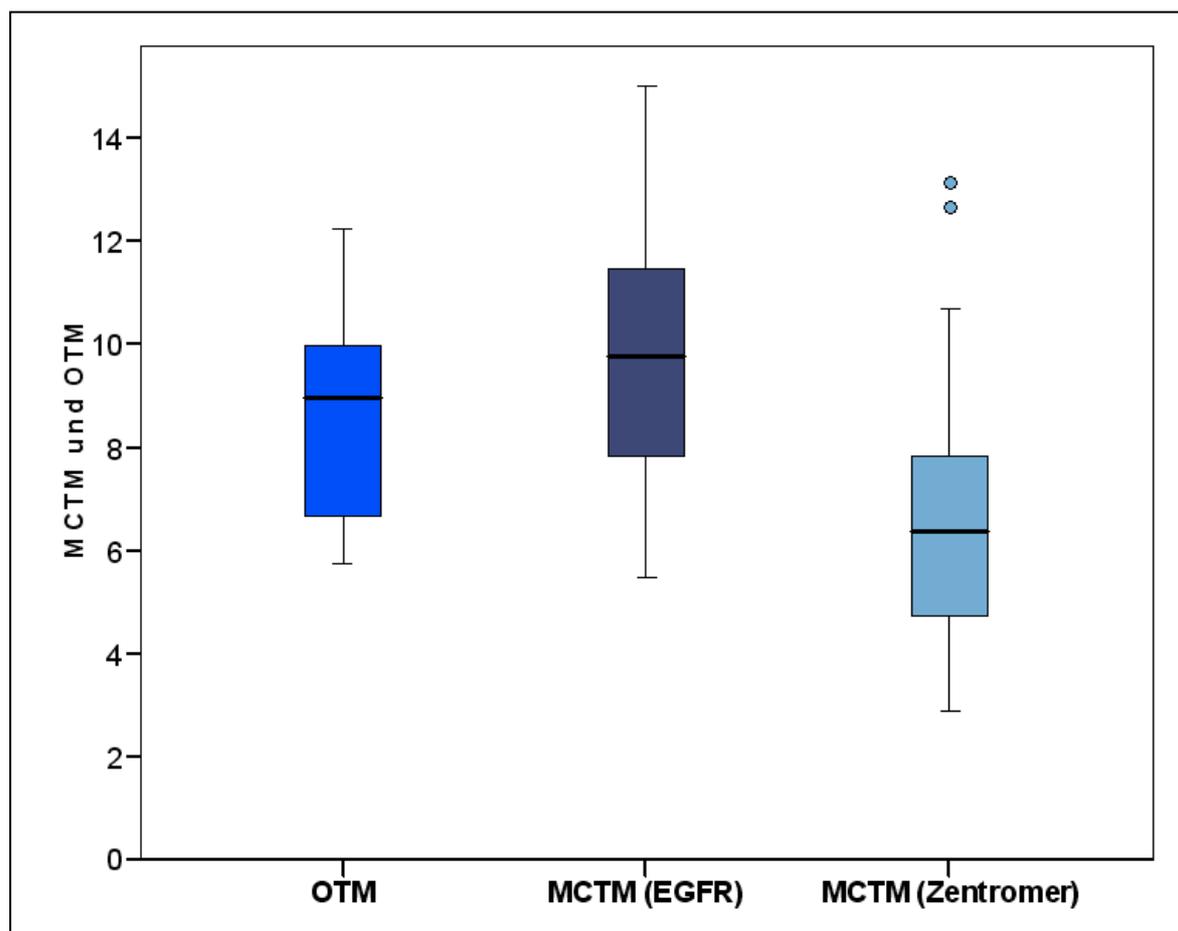


Abbildung 21: (Ansatz A) Ausmaß der DNA-Schädigung im *epidermal growth factor* Gen nach Inkubation mit Rauchkondensat (EGFR $p < 0,037$; Zentromer $p < 0,004$)

Im Versuch B ergab der Wilcoxon-Test folgende Werte: Bei der statistischen Auswertung konnte beim Vergleich von OTM und MCTM (EGFR) keine Signifikanz $p < 0,970$ errechnet werden. Der p-Wert verglichen mit dem Zentromer MCTM-Werten konnte jedoch im Mittel mit $p < 0,002$ beschrieben werden.

In fast allen Teilauswertungen ergab sich eine deutliche Signifikanz zwischen der Schädigung der Gesamt-DNA und der Schädigung der DNA des EGFR-Gens.

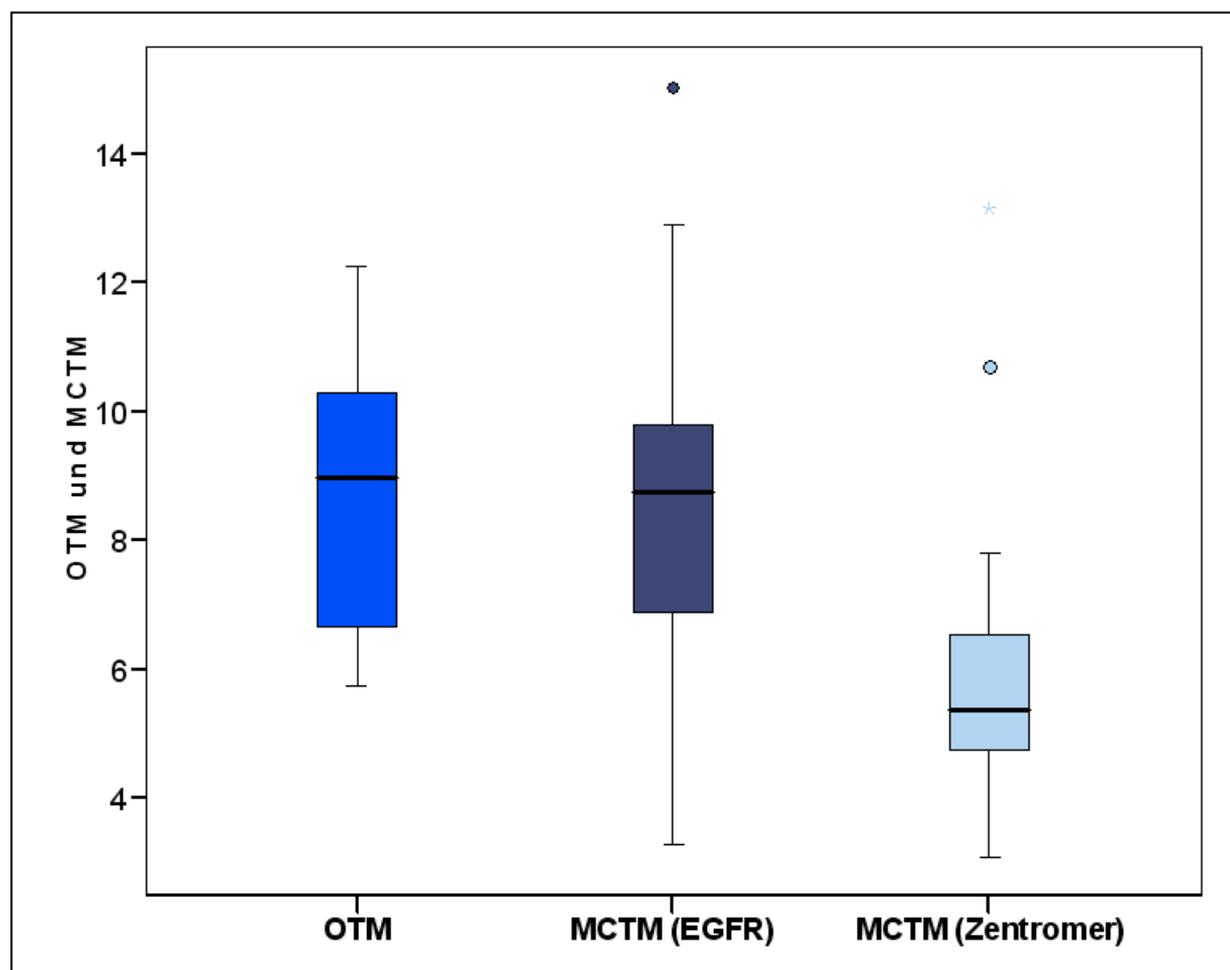


Abbildung 22: (Ansatz B) Ausmaß der DNA-Schädigung im *epidermal growth factor* Gen nach Inkubation mit Rauchkondensat (EGFR $p < 0,970$; Zentromer $p < 0,002$)

3.6 Genprotektive Wirkung von Curcumin und Celebrex[®] am *epidermal growth factor receptor* Gen auf Chromosom 7 von humanen Schleimhautzellen des Oropharynx

Mit dem Comet-FISH ist es möglich, genprotektive Effekte von Naturstoffen und Medikamenten bezogen auf ein bestimmtes Gen oder Chromosom nachzuweisen. In dieser Versuchsreihe wurde die Wirkung auf das Chromosom 7 mit seinem Tyrosin-Kinase-Rezeptor, dem *epidermal growth factor receptor*, bestimmt. Dazu wurden spezielle Sonden benutzt, die genau diese Region des Chromosoms anfärben.

3.6.1 Genprotektive Effekte von Curcumin an Chromosom 7 von Miniorgankulturen des oberen Aerodigestivtrakts

Zunächst wurde die genprotektive Wirkung von Curcumin untersucht. Es wurden jeweils die OTM-Werte der kombinierten Inkubation mit Curcumin und Rauch mit den jeweiligen MCTM-Werten der grünen (Zentromer) und roten (EGFR) Signale eben dieser Kombination ermittelt und statistisch verglichen. Nachfolgend wurde ein Vergleich der alleinigen Rauchkondensatbeimengung mit einer kombinierten Mischung von beiden Stoffen durchgeführt. Die Mittelwerte für die Signale des Zentromers betragen 6,81 für Rauchkondensat alleine und 4,44 für die Kombinationsinkubation. Analog dazu zeigten sich folgende MCTM-Mittelwerte für EGFR 10,30 bzw. 6,37.

Eine Signifikanz von $p < 0,001$ ergab der Wilcoxon-Test sowohl beim Vergleich der EGFR als auch der Zentromer Signale des Rauchkondensats alleine mit eben diesen Signalen der Kombination aus Rauchkondensat und Curcumin. Der p-Wert für den Vergleich der Gesamt-DNA-Schädigung bei kombinierter Gabe und der DNA-Schädigung im EGFR-Gen betrug $p < 0,04$ für EGFR und $p < 0,108$ für das Zentromer .

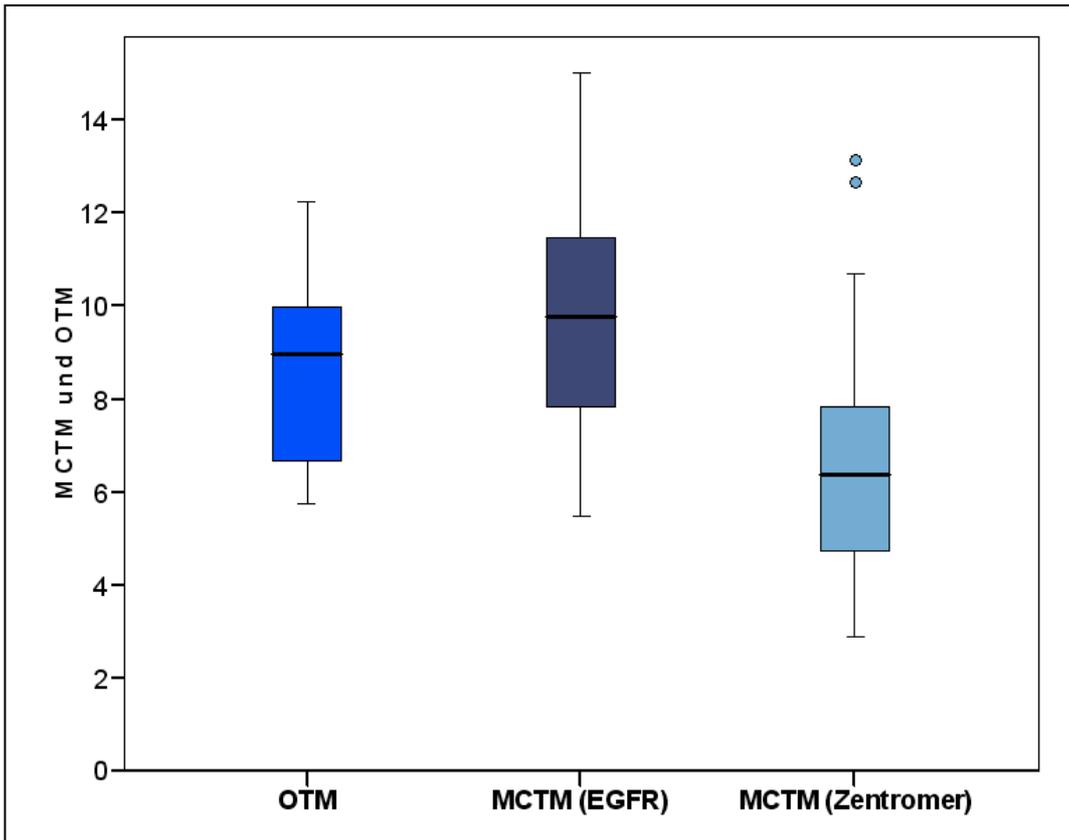


Abbildung 23: DNA-Schädigung im EGFR-Gen durch Inkubation mit Rauchkondensat ($p < 0,001$)

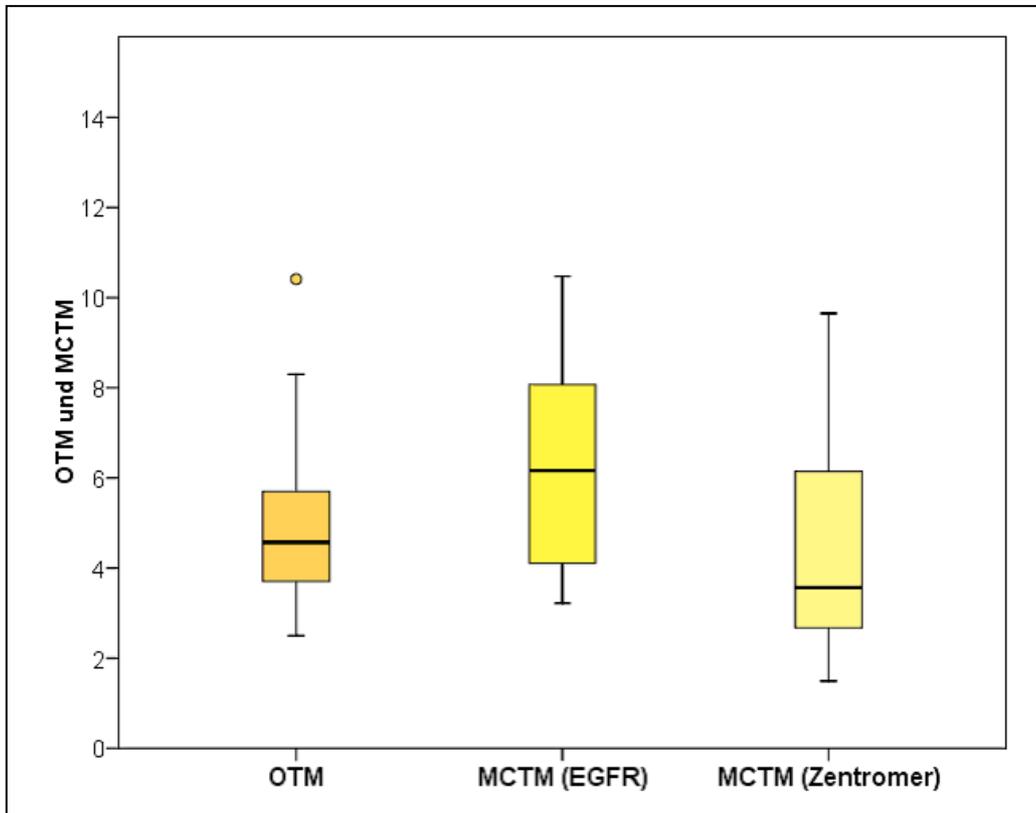


Abbildung 24: DNA-Schädigung im EGFR-Gen durch Curcumin und Rauchkondensat (EGFR $p < 0,04$; Zentromer $p < 0,108$)

3.6.2 Genprotektive Effekte von Celebrex® an Chromosom 7 von Miniorgankulturen des oberen Aerodigestivtrakts

In der Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich auch hier ein signifikanter Unterschied der MCTM-Werte zwischen der Inkubation mit Rauchkondensat alleine und der Kombination dessen mit Celebrex®.

Auch hier wurden dieselben Vergleichspaare gebildet. Ein OTM=8,74; MCTM EGFR=8,74 und ein MCTM Zentromer=5,79 wurden für Rauchkondensat alleine gemessen. Für die Zugabe von Celebrex® ergaben sich OTM=3,73, MCTM EGFR=5,12 und MCTM Zentromer=3,04. Auch hier konnten Signifikanzen von $p < 0,001$ für den Vergleich der MCTM-Werte von EGFR und des Zentromers von Rauch alleine und derselben Signale der Kombination mit Celebrex® ermittelt werden. $P < 0,037$ ergab der Vergleich der OTM-Werte und der MCTM-Werte der EGFR Signale bei kombinierter Inkubation. Analog dazu ergab sich $p < 0,036$ bei den Zentromer Signalen.

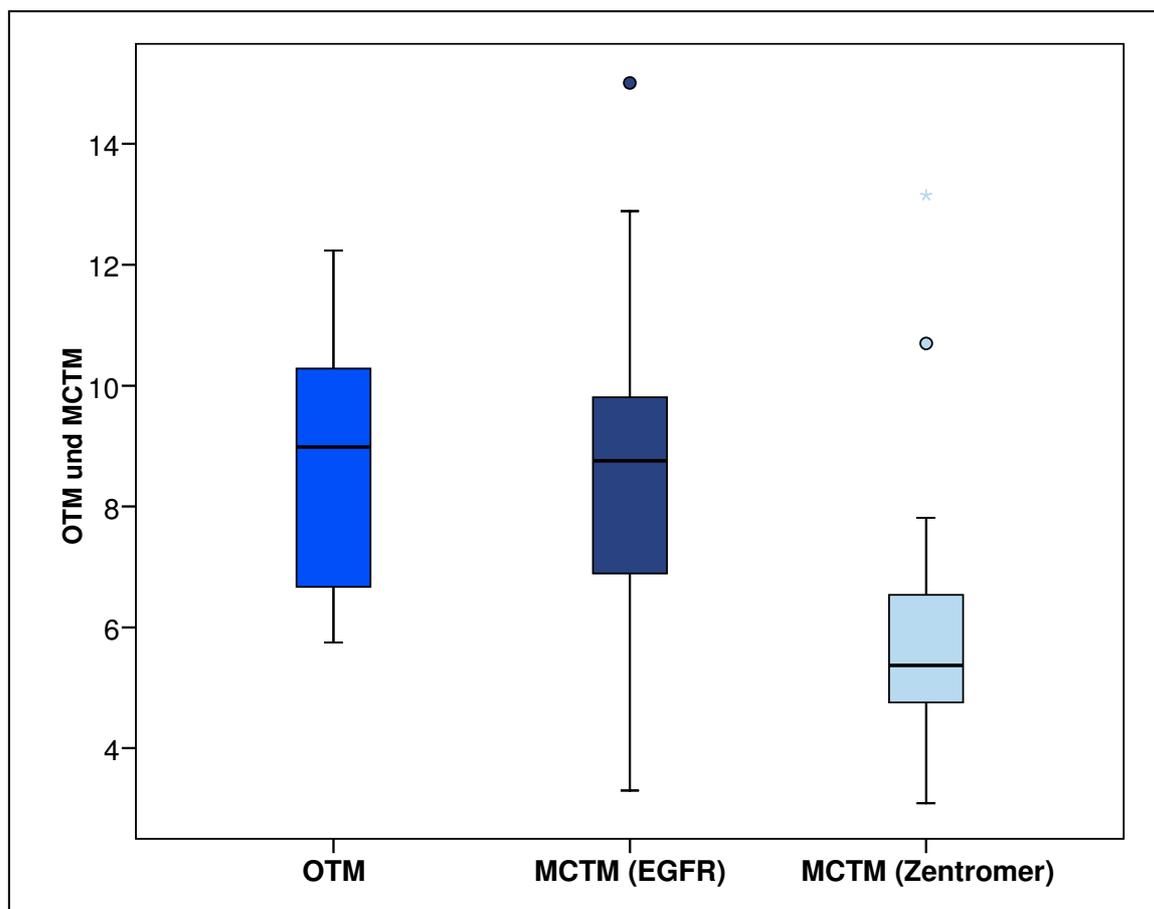


Abbildung 25: DNA-Schädigung im EGFR-Gen durch Rauchkondensat ($p < 0,001$)

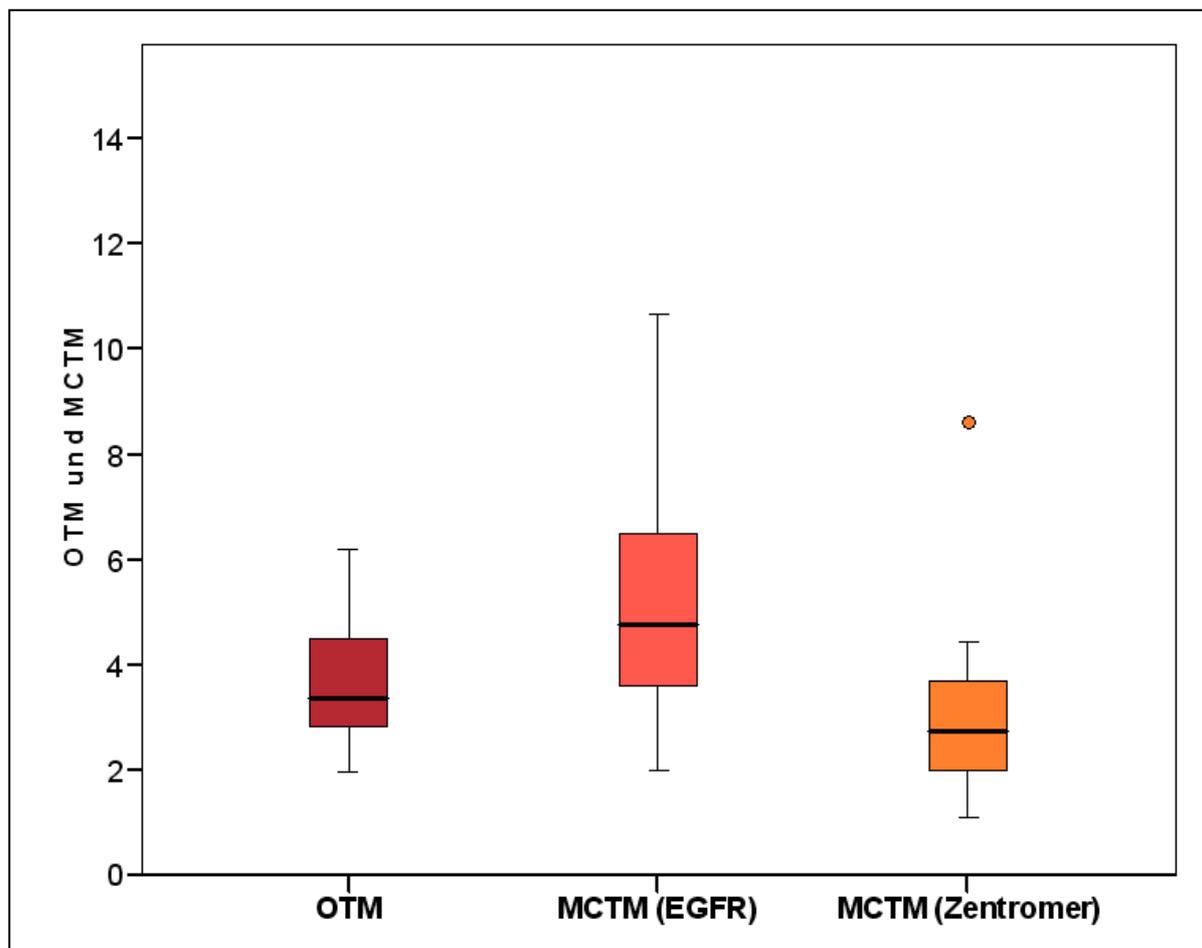


Abbildung 26: DNA-Schädigung im EGFR-Gen durch Celebrex[®] und Rauchkondensat (EGFR $p < 0,037$; Zentromer $p < 0,036$)

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Patienten

Als Spender von Schleimhautgewebe dienten für die Versuche in der vorliegenden Arbeit Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München.

4.1.1 Patienten als Spender von Schleimhautproben des Oropharynx

Die Gewebeproben stammten in allen Fällen aus Schleimhautgewebe des Oropharynx von Patienten ohne Karzinomerkrankung. Die Proben wurden im Zuge einer Entfernung der Gaumenmandel vom Rande des Operationsgebietes entnommen. Es wurde kein lymphatisches Gewebe verwendet. Die Indikation zur Tonsillektomie wurde in den meisten Fällen aufgrund von rezidivierenden bzw. chronischen Entzündungen der Tonsillen gestellt. Die Operationen wurden im akut entzündungsfreien Intervall durchgeführt, somit konnten störende Einflüsse einer Entzündungsreaktion in den Zellen weitgehend vermieden werden. Einzelne Patienten litten unter einer Hyperplasie der Tonsillen, meistens im Zusammenhang mit einer Schlafapnoe. Es entstand für die Patienten während des Eingriffs kein zusätzliches Risiko. Es wurde lediglich im Rahmen des Standarteingriffs entnommenes Gewebe für die Versuche verwendet.

Die Schleimhaut des Oropharynx ist ein frühes Kontaktorgan im Bereich des oberen Aerodigestivtrakts, welches mit Umweltstoffen und Medikamenten in Berührung kommt [Martu et al., 2006]. Daher ist Schleimhaut dieser Lokalisation besonders geeignet, um die genotoxische Wirkung von Rauchkondensat und die genoprotektive Wirkung von Curcumin und Celebrex[®] nachzuweisen.

4.1.2 Begleiterkrankungen und Risikofaktoren der jeweiligen Spender

Von allen Patienten wurde im Vorfeld der Operation eine Anamnese erhoben. Es wurde darauf geachtet, dass die Probanden keine weiteren chronischen Infektions- oder Systemerkrankungen hatten. Auf Grund der Vorerkrankung der Patienten

konnte eine entzündungsbedingte Veränderung des Gewebes nicht vollständig verhindert werden. Es wurde jedoch nur Gewebe von Operationen entnommen, die im infektfreien Intervall durchgeführt wurden.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse wurde der vorangegangene langjährige Zigarettenkonsum einiger Probenspender berücksichtigt.

4.2 Genotoxische Wirkung von Rauchkondensat an humanen Schleimhautzellen des Oropharynx

Der Zigarettenrauch ist neben dem Alkohol einer der beiden Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Mund-Rachen-Bereich [Goldenberg et al., 2004]. Der Zigarettenrauch enthält viele verschiedene, als karzinogen eingestufte Einzelwirkstoffe. Im Rauchkondensat, welches für die Versuche dieser Arbeit verwendet wurde, sind alle Inhaltsstoffe des herkömmlichen Zigarettenrauchs enthalten. So besteht die Möglichkeit die Wirkungsweise dieses Stoffgemisches zu testen, wie es in vivo tatsächlich an die Schleimhäute gelangt. Die genaue Zusammensetzung variiert von Zigarettenmarke zu Zigarettenmarke, jedoch bleiben die Hauptinhaltsstoffe gleich [Smith et al., 2000]. Beim herkömmlichen Zigarettenrauch kann eine Dampf- und eine Partikelphase unterschieden werden. In der Gasphase findet man hauptsächlich Kohlenmonoxid und Kohlendioxid, wohingegen Nikotin zu den festen Bestandteilen gerechnet wird [Guerin et al., 1987]. Lu et al. analysierten mit Hilfe eines zweidimensionalen Gaschromatographen mehrere verschiedene Rauchkondensate. Hierbei zeigte sich ein Stoffgemisch aus mehr als 400 verschiedenen als karzinogen verdächtige Stoffe [Lu et al., 2004]. Neun dieser Inhaltsstoffe wurden nach der Bewertung der IARC (International Agency for Research on Cancer) als karzinogen eingestuft und sind somit in der Gruppe 1 gelistet. Hierunter zählen Benzol, Cadmium, Arsen, Nickel, 2-Naphtylamin, Vinylchlorid, 4-Aminobiphenyl und Beryllium [IARC, 2003]. Diese Stoffe wirken direkt schädigend auf die DNA der Zelle oder durch Bildung freier Radikale [Bower et al., 2005], während andere erst durch Verstoffwechslung ihre karzinogene Wirkung entfalten oder nur als Cokarzinogene fungieren.

Bei der Beurteilung von DNA-Schäden durch Rauchkondensat kann nicht ein eindeutiger Mechanismus zu Grunde gelegt werden, es handelt sich vielmehr um ein

Zusammenwirken dieser komplexen Mischung von Stoffgruppen [Nagaraj et al., 2006].

Einer dieser tumorinduzierenden Faktoren in der Tabakkarzinogenese ist das Benzo[a]pyren aus der Gruppe der polyzyklischen aromatischen Amine, welches in der letzten Bewertung durch die IARC in der Gruppe 1 (karzinogen) eingestuft wurde. Benzo[a]pyrene gelten wie auch Nitrosamine als Präkarzinogene, d.h. sie müssen zuerst eine metabolische Aktivierung durchlaufen, bevor sie mutagen wirken können. Benzo[a]pyren wird durch Enzyme der Cytochrom P450 Familie [Li et al., 2007] und der Cyclooxygenase-2 [Janot et al., 1993] in Benzo[a]pyren-7,8-diol-epoxid (BPDE), dem eigentlich karzinogenen Metabolit, umgewandelt. Wynder et al. sprachen bereits 1979 dem BPDE die ultimative karzinogene Wirkung im Rauchkondensat zu [Wynder et al., 1979]. Bestätigung fand diese Aussage bis heute in einer großen Anzahl an Studien. [Übersicht in Rubin, 2002]. BPDE kann einerseits direkt an die DNA binden und eine Adduktbildung hervorrufen, andererseits Sauerstoffradikale (ROS=reactive oxygen species), bilden. Hieraus können Einzelstrangbrüche oder DNA-Mutationen resultieren [Nagaraj et al., 2006]. Signifikante DNA-Schäden konnten bereits an Mäusen [Culp et al., 1994], humanen Schleimhautzellen [Conney et al., 1994], Fibroblasten [Hanelt et al., 1997] und Miniorgankulturen von Nasenschleimhaut [Wallner et al., 2005] nachgewiesen werden. BPDE verursacht nicht nur DNA-Adduktbildungen, sondern kann auch für Gen-Mutationen verantwortlich gemacht werden. Hierzu zählen Mutationen im p53, einem der wichtigsten Tumorsuppressorgene [Pfeifer et al., 2002].

Ebenfalls gelten N-Nitroseverbindungen, welche N-Nitrosodiethylamin (NDEN), N-Nitrosornikotin (NNN) und (Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) umfassen, als wichtiger Bestandteil des Tabakrauchs. Bei der Beurteilung durch die IARC wurde NDEN in Gruppe 2A (wahrscheinliches humanes Karzinogen) [IARC; 2003], die anderen beiden Substanzen NNN und NNK in Gruppe 1 (karzinogen) eingestuft [IARC, 2003]. Auf die Rolle der Nitrosamine bei der Entstehung von Malignomen wurde in Tierversuchen durch Hecht [Hecht, 1998] und bei der Untersuchung von unterschiedlichen Zelllinien mittels Comet-Assay durch Kleinsasser et al. [Kleinsasser et al., 2001] hingewiesen. In diesem Fall geschieht die Metabolisierung über eine α -Hydroxylierung durch die Cytochrom P450 abhängige Monooxygenase. Den daraus resultierenden Metaboliten ist es möglich, mit der DNA Addukte zu bilden und Strangbrüche zu induzieren.

Als wichtigstes Kokarzinogen des Rauchkondensats wird in der gängigen Literatur Phenol und dessen Abkömmling Catechol angesehen [Rubin, 2002]. Dessen Einfluss auf die Tabakkarzinogenese wird bis heute kontrovers diskutiert. Einige Versuche lassen vermuten, dass Phenol selbst keine eindeutige tumorauslösende Wirkung besitzt, sondern hauptsächlich einen die Tumorentstehung fördernden Einfluss aufweist [Smith et al, 2000]. Phenole selbst können jedoch durch die Bildung von freien Radikalen zur DNA-Schädigung in Zellen beitragen [Smith et al., 2000] und so die Tumorentstehung, ausgelöst durch zum Beispiel BPDE, vorantreiben. Die zytotoxische Wirkung wurde bereits an Leukämiezellen [Sellassie et al., 1998]; Mäusen [Wynder et al., 1963] und Schleimhautzellen der Lunge [Smith et al., 2000] nachgewiesen. Abschließend ist jedoch nicht eindeutig bewiesen, ob dieses, im Rauchkondensat mit der höchsten Konzentration vorliegende Cokarzinogen [Rubin, 2002], nur tumorfördernde oder nicht auch tumorinduzierende Einflüsse aufweist.

Jeder einzelne Inhaltsstoff für sich kann je nach Konzentration und Konsum für die DNA-Schäden und somit für die Tumorentstehung verantwortlich gemacht werden. Die Kombination der mutagenen Einflüsse der einzelnen Inhaltsstoffe muss als Ursache für das DNA-schädigende Potential von Rauchkondensat gesehen werden [DeMarini, 2004].

Auch die Ergebnisse dieser Arbeit lassen erwartungsgemäß auf ein erhebliches genotoxisches Potential von Rauchkondensat schließen. Mittels Comet-Assay und Comet-FISH konnte in Form von DNA-Strangbrüchen alkalischer Stellen eine DNA-Schädigung in den mit Rauchkondensat inkubierten Miniorgankulturen nachgewiesen werden.

4.3 Genprotektive Wirkung von Curcumin an humaner Schleimhaut des Oropharynx

Die Untersuchungen der Wirkung von Nahrungsbestandteilen und biologischen Produkten bieten seit Jahrzehnten einen interessanten Ansatz für die Forschung. Vielen Naturstoffen wird eine protektive Wirkung in Bezug auf Krebserkrankungen nachgesagt. Diese natürlichen Agenzien können grob in zwei Gruppen geteilt werden. Einerseits blockierende Stoffe, welche die Initiation der Karzinogenese hemmen oder gänzlich blockieren, andererseits unterdrückende Stoffe, welche die maligne Entartung während der Promotion und Progression der Karzinomentwicklung beeinflussen [Duvoix et al., 2005; Aggarwal et al., 2006].

Legt man der Wirkungsweise die Einteilung von Duvoix et al. zu Grunde, kann Curcumin zu beiden dieser Gruppen gezählt werden. Es hat sowohl einen Einfluss auf die Initiation als auch die Promotion und Progression im Rahmen der Tumorentstehung.

In einigen Tierversuchen konnte ein positiver Effekt auf die Tumorgenese im Gastrointestinaltrakt und im Kopf-Hals-Bereich bereits nachgewiesen werden. Auch eine vorausgegangene Untersuchung in unserem Labor zeigte antioxidative Effekte an Schleimhautzellen des Kopf-Hals-Bereichs. Azuine et al. beschreiben diese Wirkung zum Beispiel bei Malignomen, die durch Benzo[a]pyrene und 7,12 dimethyl benzo[a]anthrazene verursacht wurden [Azuine et al., 1992]. Auch Desphande et al. beschäftigten sich mit dieser Problematik, allerdings legten sie Ihr Augenmerk auf Karzinome des Magens. Bei Ihren Untersuchungen an Mäusen zeigte sich ein Rückgang der Tumorausdehnung, welcher durch Hemmung des Benzo[a]pyrens erklärt wurde [Desphande et al., 1997].

Wie in den vorherigen Kapiteln beschrieben, trägt die Bildung von freien Radikalen durch Rauchkondensat erheblich zur Schädigung von DNA, Proteinen und Membranlipiden bei [Menon et al., 2007]. Ruby et al. untersuchte die antioxidativen Effekte von Curcumin in einem in vitro Modell an Rattenlebern und an Makrophagen [Ruby et al., 1995]. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass Curcumin in der Lage ist, die Produktion von Superoxiden und Hydroxyradikalen in diesen Zellarten zu verhindern. Khopde et al. zeigten dessen Eigenschaft als Radikalfänger von Phenoxyradikalen und die Hemmung der Oxidation von Lipiden [Khopde et al.,

1999]. Weitere Versuche von Screejayan et al. wiesen Curcumin als einen potenten Nitrogendioxid-Radikalfänger aus [Screejayan et al., 1997]. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. In einem Artikel von Fujisawa wird vermutet, dass Curcumin womöglich selbst in der Lage ist, Radikale zu bilden, welche dann mit sich und anderen reagieren und dadurch stabile Produkte entstehen [Fujisawa et al., 2004].

Abschließend können natürlich auch chronische Entzündungsreize mit der Karzinomentstehung, insbesondere der Initiation und Promotion, assoziiert sein [Mitchell, 2002]. Curcumin kann sich hier durch seine antiinflammatorische Wirkung protektiv auf die Tumorgenese auswirken. Der entzündungshemmende Einfluss von Curcumin beruht auf einer Hemmung der Cyclooxygenase-2 und der Lipoxygenase, zwei der wichtigsten Enzyme bei der Entzündungsentstehung. Der spezifische Regulationsmechanismus ist bisher nicht vollständig erfasst. Es gibt jedoch Anhaltspunkte, dass es im Laufe der Transkription zur Hemmung der Enzyme kommt [Rao, 2007].

In der Literatur wird neben der antioxidativen Wirkung auch von einer Beeinflussung des Zellzyklus und dessen Regulierungsmechanismen ausgegangen [Karunagaran et al., 2007]. Dieser Effekt muss hauptsächlich auf die Beeinflussung von Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und die Apoptose beeinflussende Gene zurückgeführt werden [Maheshwari et al., 2006]. Der wichtigste Transkriptionsfaktor, welcher in fast allen Karzinomen vorkommt und in Zusammenhang mit dem Zigarettenkonsum steht, ist der nuclear factor kappa B (NF- κ B). Curcumin hemmt die Aktivierung von NF- κ B, indem es die Phosphorylierung von I- κ B [Singh et al., 1995] durch Inaktivierung der I- κ B Kinase blockiert [Jobin et al., 1999]. Gleichzeitig kommt es zu einer Reduzierung der von NF- κ B beeinflussten Expression von Cyclin D1, COX-2 und Bcl-2 [LoTempio et al., 2005].

Auch die Apoptose, der programmierte Zelltod, beeinflusst die Malignomprogression. Curcumin ist in der Lage, die Apoptose entarteter Zellen einzuleiten und gleichzeitig gesunde Zellen zu schützen. Karunagaran beschreibt den proapoptotischen Effekt von Curcumin in einer Regulierung der in die Apoptose involvierten Caspase, Cyclin D1, Cox-2 und Bcl-2 [Karunagaran et al., 2007]. Bezüglich dieser Erkenntnisse beschrieb Aggarwal in seiner Arbeit an unterschiedlichen Zelllinien ein Verharren der

Tumorzellen in der G1/S Phase und eine dann eingeleitete Apoptose [Aggarwal et al., 2004].

Einige Inhaltsstoffe des Rauchkondensats, wie Benzo[a]pyrene und N-Nitrosamine, liegen als Präkarzinogene vor und müssen erst durch Phase I-Enzyme, wie das Cytochrom P450, oder Phase II-Enzyme, wie Glutathion-S-Transferase, in Ihre karzinogen wirkende Form umgewandelt werden. Auffallend ist hierbei, dass es bezüglich des Einflusses von Curcumin auf die Glutathion-S-Transferase unterschiedliche Aussagen gibt. Hierfür scheint die Konzentration verantwortlich zu sein. Susan et al. berichten von einer Aktivierung, wohingegen Iersel et al. eine Hemmung durch Curcumin beschreiben [Susan et al., 1992; Iersel et al., 1996]. In Bezug auf Cytochrom P450 wurde Curcumin ein hemmender Einfluss zugesprochen [Leu et al., 2002]. Dieser Einfluss auf die Aktivierung einiger Inhaltsstoffe des Rauchkondensats kann auch in dieser Arbeit mit für den Rückgang der DNA-Schädigung verantwortlich gemacht werden.

Auch wird die Angiogenese, die die Grundlage für das Wachstum eines Tumors darstellt, durch Curcumin beeinflusst. Arbiser et al. beschrieben diese durch eine Hemmung des *vascular epithelial growth factor* (VEGF) und des Angiopoietins, die für die Angiogenese eines Tumors ausschlaggebenden Faktoren [Arbiser et al., 1998].

Mit der vorliegenden Arbeit konnte eine signifikante DNA-Protektion an humanem Gewebe durch Curcumin nachgewiesen werden. Es zeigte sich ein deutlicher Rückgang der durch Rauchkondensat verursachten DNA-Schäden an Zellen von Miniorgankulturen des Oropharynx. Zusammenfassend kann jedoch bislang nicht ein spezieller Einfluss von Curcumin auf die Tumorentstehung für den Rückgang der Schädigung verantwortlich gemacht werden, sondern es muss am ehesten ein multifaktoriellen Geschehen zu Grunde gelegt werden.

4.4 Genprotektive Wirkung von Celebrex® an gesunder Schleimhaut des Oropharynx

Die Cyclooxygenase spielt eine wichtige Rolle in der Biosynthese von Prostaglandinen. Es müssen zwei Isoenzyme der Cyclooxygenase unterschieden werden, COX-1 und COX-2, beide von unterschiedlichen Genen codiert mit unterschiedlichen Einflüssen auf den Körper. Die Cyclooxygenase-1 wird als sogenanntes „Housekeeping Enzym“ bezeichnet, welches sich in annähernd jeder Zelle des Körpers befindet und weitgehend für die Homöostase der Prostaglandine und die Gewährleistung eines Basislevels verantwortlich ist [DuBois et al., 1998]. Die Cyclooxygenase-2 ist ein Enzym, welches unter normalen Umständen nur in sehr niedrigen Konzentrationen vorkommt und erst durch verschiedenste Einflüsse, wie zum Beispiel Entzündungen, Stress, Tumoren oder Onkogene stimuliert wird [Mohan et al., 2003].

Cyclooxygenase-Hemmer zählen zu den meist verschriebenen Medikamenten weltweit. In den Versuchen dieser Arbeit wurde Celecoxib, ein selektiver Cyclooxygenase-2-Hemmer, verwendet, welcher zumeist bei der Bekämpfung von Fieber, Schmerzen und Entzündungen Verwendung findet [Hilario et al., 2006].

In immunohistochemischen Analysen von Tumorschnitten konnte in vielen Karzinomen eine erhöhte Prostaglandinproduktion und eine Überexpression von COX-2 nachgewiesen werden. Beschrieben wurden diese Veränderungen in Malignomen des Ösophagus [Rubio et al., 1986], der Lunge [Wolf et al., 1998], der Prostata [Gupta et al., 2000] und des Gastrointestinaltrakts [Gupta et al., 2001]. Renkonen et al. dokumentierten 2002 auch eine Überexpression der Cyclooxygenase-2 in Neoplasien des Kopf-Hals-Bereichs in immunohistochemisch untersuchten Tumorzellen des Oropharynx. Weiterhin zeigte er einen stetigen Anstieg dieser Expression korrelierend mit den Phasen der Karzinogenese über die Stufen der Hyperplasie, Dysplasie zum invasiven Karzinom [Renkonen et al., 2002].

Diese erhöhte Cyclooxygenase-2 Produktion kann durch eine Vielzahl von Faktoren reguliert werden. Hierzu zählen Wachstumsfaktoren z.B. EGFR, Onkogene und Tumorsuppressorgene, z.B. p53 [Huh et al., 2003]. Auch exogene Faktoren, wie z.B. die Inhaltsstoffe des Rauchkondensats, sind in der Lage, das COX-2-Gen zu aktivieren und somit die dessen Expression zu steigern. In der Literatur finden sich

Beispiele, in denen es nach Inkubation mit BPDE zu einer erhöhten Cyclooxygenase-2 Produktion kam. Dies unterstützten Studien an Osteoblasten [Tsai et al., 2004], an Astrozyten von Ratten [Weng et al., 2004] und an Hautzelllinien von Mäusen [Ouyang et al., 2007]. Moraitis et al. berichteten von einer deutlich erhöhten COX-2 mRNA Syntheserate in oraler Schleimhaut von Rauchern im Gegensatz zu Schleimhautzellen von Nichtrauchern [Moraitis et al., 2005]. Erklärt werden kann dieser Mechanismus durch eine von BPDE ausgelöste Aktivierung der mitogen-activated Proteinkinase (MAPK)/AP-1 und des Transkriptionsfaktors NF- κ B [Ouyang et al., 2007].

Die Cyclooxygenase hat, wie auch Curcumin, auf viele verschiedene Stadien der Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich Einfluss, wobei viele Wirkungsweisen sich ähnlich sind, jedoch bis heute nicht alle Mechanismen vollständig geklärt werden konnten.

COX-2 ist ein bifunktionales Enzym mit einer Peroxidase-aktiven und einer Cyclooxygenase-aktiven Seite [Altorki et al., 2004]. Die Peroxidase-aktive Seite ist in der Lage, Prokarzinogene, wie z.B. Benzo[a]pyren und N-Nitrosamine, in deren karzinogene Metabolite umzuwandeln [Mester et al., 1999].

Da COX-2 neben Cytochrom P 450 für die Metabolisierung von einigen Präkarzinogenen des Rauchkondensats mit verantwortlich ist, führt Celebrex[®] als selektiver COX-2-Hemmer zu einer verminderten Aktivierung unter anderem von Benzo[a]pyren. Mit dem Rückgang der Konzentration von BPDE kann eine verminderte DNA-Adduktbildung und somit ein Rückgang der DNA-Schädigung in den Versuchen dieser Arbeit erklärt werden.

Ajith et al. untersuchten in einem in vitro Modell an Rattenlebern und Bakterienstämmen (*Salmonella typhimurium*) die antioxidative Wirkung von Celecoxib [Ajith et al., 2001]. Die Ergebnisse zeigten eine Hemmung der Oxidation von Lipiden durch diesen selektiven COX-2-Hemmer. Dieser Mechanismus kann durch ein Abfangen der Peroxyl- und Hydroxylradikale durch Celecoxib erklärt werden. Da BPDE hauptsächlich über die Bildung freier Radikale seine karzinogene Wirkung entfaltet, könnte unter anderem, gestützt auf die Ergebnisse von Ajith et al., das Potential von Celebrex[®], freie Radikale abzufangen, dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit zugrunde liegen.

Des Weiteren ist eine Beteiligung der Cyclooxygenase-2 an der Angiogenese und der Metastasierung von Malignomen, sowie ein Zusammenhang mit der Apoptose von dysplastischen Zellen beschrieben [Wang et al., 2002]. Die Angiogenese, die die Grundlage für das Wachstum eines Tumors darstellt [Chen et al., 2002], korreliert stark mit der Menge an COX-2 im betroffenen Gewebe. Dieses ist in der Lage, die Produktion von *vascular endothelial growth factor* (VEGF) zu steigern und somit die Vaskularisation voranzutreiben [Jaeckel et al., 2001]. Durch den Einsatz von Celecoxib oder anderen selektiven COX-2-Hemmern kann die Progression einer Dysplasie zu einem Carcinoma in situ durch die Vaskularisation teilweise aufgehalten werden [Wang et al., 2002].

Ein weiterer Effekt, der die Tumorgenese durch Celebrex[®] positiv beeinflusst, wird in der Steigerung der Apoptose von entarteten Zellen gesehen [Grösch et al., 2006]. Eine Analyse des Zellzyklus von Tumorgewebe zeigte ein Verharren der Zellen im Stadium G0/G1 und eine erhöhte Apoptoserate durch den Einsatz von Celebrex[®] [Nishimura et al., 1999].

Außerdem unterdrückt Celecoxib die durch Rauchkondensat induzierte Aktivierung von NF- κ B und verringert die Expression von NF- κ B regulierten Proteinen wie zum Beispiel Cyclin D1, COX-2, MMP-9 [Shishodia et al., 2004].

Abschließend gilt natürlich, genauso wie im vorherigen Kapitel bei Curcumin beschrieben, ein chronischer Entzündungsreiz als Risikofaktor für die Entstehung von Dysplasien. Bei nahezu jeder Entzündungsreaktion kommt es zu einer erhöhten Prostaglandinproduktion, welche durch Hemmung der Cyclooxygenase reduziert werden kann und sich somit protektiv auf die Dysplasieentwicklung von Geweben auswirkt.

4.5 Der Einfluss des *epidermal growth factor receptor* (EGFR) auf die Karzinogenese des oberen Aerodigestivtrakts

In dieser Arbeit wurde nicht nur das Augenmerk auf die protektive Wirkung von Curcumin und Celebrex[®] auf die Gesamt-DNA einer Zelle gerichtet, sondern es wurde auch die DNA-Schädigung auf Chromosom 7 im EGFR-Gen, mittels Comet-FISH, untersucht.

Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) ist ein transmembranöses Glykopeptid, welches hauptsächlich den *epidermal growth factor* (EGF) und den *transforming growth factor* (TNF- α) bindet. Die Aktivierung von EGFR induziert eine Autophosphorylierung und schließlich eine Aktivierung von ras-mitogen-activated Proteinkinase (MEK), Phosphatidylinositol(PI)-3-kinase, Phospholipase C gamma (PLC- γ), Signalüberträgerstoffen und Transkriptionfaktoren [Hynes et al., 2005, Rogers et al., 2005].

Schon 1994 beschrieben Shin et al. eine Überexpression von EGFR in oralen Malignomen [Shin et al., 1994]. Bestätigt wurden diese Vermutungen unter anderem durch Kalyankrishna et al. [Kalyankrishna et al., 2006]. Dieser Konzentrationsanstieg resultiert aus einer gesteigerten mRNA Synthese und einer fehlenden Rückregulation. Zu den Faktoren dieser erhöhten mRNA Synthese zählen unter anderem die Dysregulation von p53 [Grandis, 1998], der Polymorphismus der Dinukleotidrepead Sequenz im Intron-1 des EGFR-Gens [Amador et al., 2004] und die verminderte Größe der EGFR-Amplifikation [Nagatsuka et al., 2001]. Eine Überexpression von EGFR führt zu einem verstärkten Wachstum der entarteten Zellen und zu einer schnelleren Ausbreitung des Tumorgewebes. Die Expression des EGFR in Tumorzellen korreliert mit der Wachstumsgeschwindigkeit, der Metastasierung, dem Differenzierungsgrad und der Angiogenese [Rogers et al., 2005]. Die Prognose von Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs mit einer deutlich gesteigerten EGFR-Konzentration ist daher als deutlich schlechter beschrieben [Pomerantz et al., 2004; Yano et al., 2003].

4.5.1 Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und Curcumin

In dieser Arbeit konnte, nach Inkubation der Miniorgankulturen mit Rauchkondensat und Curcumin, ein deutlicher Rückgang der DNA-Schädigung auf Chromosom 7 festgestellt werden.

Zu einem fraglichen genprotektiven Potential von Curcumin bezüglich des EGFR-Gens gibt es nach Vergleich mit der aktuellen Literatur bisher keine ausführlichen Daten.

Allgemein ist bekannt, dass Curcumin als ein potenter Hemmstoff einiger Wachstumsfaktoren, unter anderem auch EGFR und Her2 gilt [Aggarwal et al., 2003]. Korutla et al. wiesen in Kulturen von NIH 3T3 Zellen, welche humanen EGFR besitzen, die hemmende Eigenschaft von Curcumin nach. Er erklärte seine Ergebnisse durch eine Blockierung der Phosphorylierung des *epidermal growth factor receptor*. Des Weiteren beschrieb er einen Rückgang der durch EGF eingeleiteten Calcium-Freisetzung [Korutla et al., 1995].

In weiteren Versuchen zeigte sich, dass Curcumin nicht nur den Rezeptor sondern auch das Protein selbst zu hemmen vermag [Hong et al., 1999]. Am Beispiel von Tumorzellen des Colons bestätigten Reddy et al. die Vermutungen einer EGFR-Blockade durch Curcumin. Es zeigte sich eine Verlangsamung des malignen Wachstums und ein Rückgang der Neoplasien [Reddy et al., 2006].

Der Rückgang der DNA-Schädigung im EGFR-Gen, der in den Versuchen ersichtlich war, könnte mit diesen Mechanismen erklärt werden. Eine Blockade des *epidermal growth factor receptor* führt wahrscheinlich zu einer Verminderung der Überexpression im Tumorgewebe und es wäre möglich, dass so die Apoptose dieser Zellen eingeleitet wird [Aggarwal et al., 2006].

Diesem Nachweis der antitumorösen Wirkung von Curcumin müssen noch weitere Studien folgen, um die Effektivität von Curcumin in der Tumorprävention und Therapie insbesondere bezogen auf den *epidermal growth factor receptor* nachzuweisen.

4.5.2 Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) und die Cyclooxygenase-2 (COX-2)

Die Signal-Kaskaden sowohl vom *epidermal growth factor receptor* (EGFR) als auch von der Cyclooxygenase-2 spielen eine große Rolle in der Karzinogenese des Kopf-

Hals-Bereichs. Für beide, EGFR [Herbst et al., 2002] und COX-2 [Renkonen et al., 2002] wurde unabhängig voneinander eine Überexpression in präkanzerösen und kanzerösen Schleimhautzellen beschrieben.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein deutlicher Rückgang der DNA-Schädigung (siehe Ergebnisse Kapitel 4.6.2) sowohl im EGFR-Gen als auch im Zentromer des Chromosoms 7 nach Inkubation mit Celebrex[®] nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse können durch eine enge Vernetzung der beiden Kaskaden und deren Interaktionen untereinander erklärt werden.

Beide Faktoren, EGFR und TGF- α , welche Liganden am EGF-Rezeptor sind, können eine Überexpression von COX-2 einleiten. Hierbei scheint laut Huh et al. die Ras/Raf/mitogen-activated Proteinkinase den ausschlaggebenden Faktor darzustellen, welche sowohl auf Transkriptions- als auch Posttranskriptionsebene steigernden Einfluss hat [Huh et al., 2003]. Eine Erklärung hierfür wird in der Literatur durch die Aktivierung von Transkriptionfaktoren gesehen, welche an die COX-2 Promoter Region binden können [Dannenbergh et al., 2003].

Andererseits kann die Cyclooxygenase-2 ihrerseits die Aktivität des *epidermal growth factor receptor* stimulieren. Für diesen Vorgang scheinen hauptsächlich Prostaglandine, hier sei vor allem PGE₂ genannt, verantwortlich zu sein. Zu den genauen Mechanismen, wie Prostaglandin E₂ die EGFR Expression steigert, sind in der Literatur diverse Vorgänge beschrieben. Pai et al. zeigten diese Aktivierung des EGFR an normalen Schleimhautzellen des Magens und an Tumorzellen des Darmes. Er löste diese durch eine von extrazellulären Signalen regulierte Kinase-2 Kaskade (Protein-G Rezeptor gekoppelt) aus [Pai et al., 2002]. Während zum Beispiel Shao et al. diese Vorgänge durch eine gesteigerte Amphiregulin Expression erklärten. Sie beschrieben eine erhöhte Amphiregulin Konzentration, ein weiterer Ligand am EGFR, an Tumorzellen des Colon [Shao et al., 2003].

Auf Grund dieser Zusammenhänge und der engen Vernetzung beider Kaskaden kann die protektive Wirkung von Celebrex[®] erklärt werden.

Celecoxib zeigte bereits Erfolge in experimentellen Studien gegen Brustkrebs. Hierbei zeigte sich ein protektiver Effekt von COX-2-Hemmern gegenüber HER-2/neu, ein Rezeptor ähnlich dem *epidermal growth factor receptor* [Howe et al., 2002]. Des Weiteren berichteten Handler et al. über eine Blockierung des EGFR durch COX-2-Hemmer in NIH 3T3 Zellen [Handler et al., 1990].

Interessant ist außerdem eine Kombinationstherapie aus COX-2-Hemmern und EGFR-Inhibitoren.

Hierzu wurden bereits einige in vitro und in vivo Studien veröffentlicht, welche synergistische Effekte von Tyrosinkinaseinhibitoren und Cyclooxygenasehemmern beschreiben. Zhang et al. verwendeten hierzu Celecoxib und ZD 1839 und erzielten Effekte an Zellen von Karzinomen des oberen Aerodigestivtrakts, während de Luca et al. Erfolge bei Darm- und Brustmalignomen nachwies [Zhang et al., 2005; de Luca et al., 2004]. Auch in klinischen Studien wurde diese Kombinationstherapie bei Patienten mit Malignomen des Kopf-Hals-Bereiches bereits getestet und zeigte große Erfolge [Writh et al., 2005]. In beiden Studien wurde Celecoxib und jeweils ein EGFR-Hemmer verwendet. Es zeigte sich bei einigen Patienten ein Rückgang der Tumormassen, bei anderen kam es zu einer Stagnation der Erkrankung.

5 Zusammenfassung

Die Schleimhaut des Oropharynx stellt die erste signifikante Berührungsstelle im Bereich des oberen Aerodigestivtrakts dar, die mit Umweltstoffen und Medikamenten in Kontakt kommt. Der Zigarettenrauch ist neben dem Alkohol einer der beiden Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen im Mund-Rachen-Bereich. Die DNA-Schädigung in diesem Fall durch Rauchkondensat kann einen ersten Schritt in der Tumorgenese im Kopf-Hals-Bereich darstellen. Basierend hierauf wurden in den vorliegenden Versuchsreihen Schleimhaut des Oropharynx von gesunden Probanden verwendet, welche zunächst zu Miniorgankulturen kultiviert wurde. Miniorgankulturen bieten die Möglichkeit eine in vivo Situation zu imitieren. Als mögliche genprotektive Substanzen wurden Curcumin und Celebrex[®] verwendet.

Zur Erfassung der quantitativen DNA-Schädigung wurde in dieser Arbeit die alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet Assay) mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an tumorfreien Mucosazellen des oberen Aerodigestivtrakts kombiniert. Mutationen an der DNA sind hierbei nicht gleichmäßig auf die gesamte DNA einer Zelle verteilt sondern oftmals auf einzelnen Chromosomen bzw. Genen verstärkt lokalisiert. Mittels FISH erhält man die Möglichkeit im Gegensatz zur einheitlichen Anfärbung der gesamten DNA, eine spezifische Kennzeichnung spezieller Chromosome oder Genorte durchzuführen. Nach Inkubation mit Rauchkondensat und Curcumin bzw. Celebrex[®] wurde die DNA-Schädigung im EGFR-Gen untersucht. Das Zentromer des Chromosoms 7 diente hierbei als Referenz.

Die Untersuchungen erweitern das Verständnis der tabakinduzierten Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich, gleichzeitig zeigt es therapeutische und präventive Möglichkeiten auf, die die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren erweitern können. In den Versuchen konnte eine deutliche DNA-Schädigung durch Rauchkondensat nachgewiesen werden. Rauchkondensat ist ein Stoffgemisch, dessen Inhaltsstoffe direkt karzinogen oder als sogenanntes Cokarzinogen wirken.

Zur Behandlung und Prävention von Tumorerkrankungen werden nicht nur Medikamente sondern auch Naturstoffe getestet.

Das Ergebnis dieser Arbeit zeigt eine deutlich geringere DNA-Schädigung nach zusätzlicher Inkubation mit Curcumin bzw. Celebrex[®]. Es zeigte sich durchschnittlich eine Halbierung der DNA-Schädigung im EGFR-Gen nach Inkubation mit Curcumin bzw. Celebrex[®].

Diesem Nachweis protektiver Eigenschaften von Curcumin und Celebrex[®] müssen weitere Studien folgen, die eine Effektivität der Substanzen in der Tumorprävention und –therapie nachweisen. Hierbei wäre eine prophylaktische Therapie mit Celebrex oder Curcumin in Betracht zu ziehen. Des Weiteren ist an eine die üblichen Therapieformen unterstützende Maßnahme zu denken.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einflussfaktoren auf die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich	8
Abbildung 2: möglicher Tumorentstehungsprozess	9
Abbildung 3: Strukturformel von Curcumin	12
Abbildung 4: Cyclooxygenase-Kaskade	14
Abbildung 5: Strukturformel von Celebrex [®]	16
Abbildung 6: 24-Well-Platte mit Miniorgankulturen	20
Abbildung 7: Mukosastückchen nach 2 Wochen Kultivierung (1:40)	21
Abbildung 8: Mukosastückchen nach vollständiger Epithelialisierung (1:10)	21
Abbildung 9: Inkubation mit Curcumin und Rauchkondensat (Ansatz A)	23
Abbildung 10: Inkubation mit Celebrex [®] und Rauchkondensat (Ansatz B)	25
Abbildung 11: Auswertung mit Comet 3.1	29
Abbildung 12: DNA einer intakten und einer geschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet-Assays	30
Abbildung 13: DNA einer geschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet-FISH	34
Abbildung 14: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs	36
Abbildung 15: Ausmaß der DNA-Schädigung (Ansatz A) bei Inkubation mit DMSO und Rauchkondensat ($p < 0,001$)	42
Abbildung 16: Ausmaß der DNA-Schädigung (Ansatz B) bei Inkubation mit DMSO und Rauchkondensat ($p < 0,001$)	42
Abbildung 17: Ausmaß der gesamten DNA-Schädigung bei Inkubation mit DMSO ($p < 0,001$), Curcumin und Rauchkondensat ($p < 0,001$)	44
Abbildung 18: Ausmaß der gesamten DNA-Schädigung bei Inkubation mit DMSO ($p < 0,001$), Celebrex [®] und Rauchkondensat ($p < 0,001$)	45
Abbildung 19: Kontrollen mit Curcumin und Celebrex [®] , Zellen ohne Schädigung	47
Abbildung 20: Schleimhautzelle mit DNA-Schädigung (rot=EGFR; grün=Zentromer)	47
Abbildung 21: (Ansatz A) Ausmaß der DNA-Schädigung im <i>epidermal growth factor</i> Gen nach Inkubation mit Rauchkondensat (EGFR $p < 0,037$; Zentromer $p < 0,004$)	48

Abbildung 22: (Ansatz B) Ausmaß der DNA-Schädigung im <i>epidermal growth factor</i> Gen nach Inkubation mit Rauchkondensat (EGFR $p < 0,970$; Zentromer $p < 0,002$)	49
Abbildung 23: DNA-Schädigung im EGFR-Gen durch Inkubation mit Rauchkondensat ($p < 0,001$)	51
Abbildung 24: DNA-Schädigung im EGFR-Gen durch Curcumin und Rauchkondensat (EGFR $p < 0,04$; Zentromer $p < 0,108$).....	51
Abbildung 25: DNA-Schädigung im EGFR-Gen durch Rauchkondensat ($p < 0,001$) .	52
Abbildung 26: DNA-Schädigung im EGFR-Gen durch Celebrex [®] und Rauchkondensat (EGFR $p < 0,037$; Zentromer $p < 0,036$).....	53

7 Literaturverzeichnis

1. Aggarwal, B. B., Kumar, A., Bharti, A. C.; Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies; *Anticancer Res.* 23: 363-398 (2003)
2. Aggarwal, B. B., Shishodia, S.; Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer; *Biochem. Pharm.* 71: 1397-1421 (2006)
3. Aggarwal, S., Takada, Y., Singh, S., Myers, J. N., Aggarwal, B. B.; Inhibition of growth and survival of human head and neck squamous cell carcinoma cells by curcumin via modulation of nuclear factor-kappaB signaling; *Int. J. Cancer.* 111: 679-692 (2004)
4. Ajith, T., Subin, J. P, Jacob, J., Sanjay, P. S., Babitha, N. V.; Antimutagenic and antioxidant activities of the non-steroidal anti-inflammatory drug celecoxib. *Clin Exp. Pharmacol. Physiol.* 32: 888-893 (2005)
5. Altorki, N. K., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J.; COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract tumors; *Semin. Oncol.* 31: 30-37 (2004)
6. Amador, M. L., Oppenheimer, D., Perea, S., Maitra, A., Cusatis, G., Iacobuzio-Donahue, C., Baker, S. D., Ashfaq, R., Takimoto, C., Forastiere, A., and Hidalgo, M.; An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors; (2004)
7. Arbiser, J. L., Klauber, N., Rohan, R., van Leeuwen, R., Huang, M. T., Fisher, C., Flynn, E., Byers, H. R.; Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis; *Mol. Med.* 4: 376-383 (1998)
8. Azuine, M. A., Bhide, S. V.; Chemopreventive effect of turmeric against stomach and skin tumors induced by chemical carcinogens in Swiss mice; *Nutrition and Cancer* 17: 77-83 (1992)
9. Bower, J. J., Leonard, S. S., Shi, X.; Conference overview: molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis; *Mol. Cel. Bio.* 179: 3-15 (2005)
10. Bright, J. J.; Curcumin and autoimmune disease; *Adv. Exp. Med. Biol.* 595: 425-451 (2007)
11. Buehrlen, M., Harreus, U. A., Gamarra, F., Hagen, R., Kleinsasser, N. H.; Cumulative genotoxic and apoptotic effects of xenobiotics in a mini organ culture model of human nasal mucosa as detected by the alkaline single cell

- microgel electrophoresis assay and the annexin V-affinity assay; *Tox. Lett.* 169: 152-161 (2007)
12. Chen, Y. J., Jin, Y. T., Shieh, D. B., Tsai, S. T., Wu, L. W.; Molecular characterization of angiogenic properties of human oral squamous cell carcinoma cells; *Oral Oncol.* 38: 699-705 (2002)
 13. 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.* 26: 125-163 (1994)
 14. Culp, S. J., Beland, F. A.; Comparison of DNA adduct formation in mice fed coal tar or benzo[a]pyrene; *Carcinogenesis* 15: 247-252 (1994)
 15. Dannenberg, A. J., Subbaramaiah, K.; Targeting cyclooxygenase-2 in human neoplasia: rationale and promise; *Cancer Cell.* 4: 431-436 (2003)
 16. Davies, K.; Breast cancer genes. Further enigmatic variations; *Nature* 378: 762-763 (1995)
 17. De Luca, A., Grassi, M., Maiello, M. R., Di Maio, M., Mancino, M., De Maio, E., Gridelli, C., Perrone, F., Normanno, N.; Does the sequence of gemcitabine and vinorelbine affect their efficacy in non-small cell lung cancer in vitro? *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 45: 894 (2004)
 18. DeMarini, D. M.; Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review; *Mutat. Res.* 567: 447-474 (2004)
 19. Deshpande, S. S., Ingle, A. D., Maru, G. B.; Inhibitory effects of curcumin-free aqueous turmeric extract on benzo[a]pyrene-induced forestomach papillomas in mice; *Cancer Lett.* 118: 79-85 (1997)
 20. Döbrossy, L.; Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem; *Cancer Metastasis Re.* 24: 9-17 (2005)
 21. DuBois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., van de Putte, L. B., Lipsky, P. E.; Cyclooxygenase in biology and disease; *J. Clin. Invest.* 93: 493-504 (1998)
 22. Duvoix, A., Blasius, R., Delhalle, S., Schneckeburger, M., Morceau, F., Henry, E., Dicato, M., Diederich, M.; Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin; *Cancer Lett.* 223: 181-190 (2005)
 23. El Naggar, A. K.; Pathobiology of head and neck squamous tumorigenesis; *Curr. Cancer Drug. Targets.* 7: 606-612 (2007)

24. Fosslie, E.; Molecular pathology of cyclooxygenase-2 in neoplasia; *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30: 3-21 (2000)
25. Foy, J. W., Bombick, B. R., Bombick, D. W., Doolittle, D. J., Mosberg, A. T., Swauger, J. E.; A comparison of in vitro toxicities of cigarette smoke condensate from Eclipse cigarettes and four commercially available ultra low-"tar" cigarettes; *Food Chem. Tox.* 42: 237-243 (2004)
26. Frenzilli, G., Scarcelli, V., Fornai, F., Paparelli, A., Nigro, M.; The comet assay as a method of assessment of neurotoxicity: usefulness for drugs of abuse; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1074: 478-481 (2006)
27. Fujisawa, S., Atsumi, T., Ishihara, M., Kadoma, Y.; Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds; *Anticancer Res.* 24: 563-569 (2004)
28. Futagami, S., Suzuki, K., Hiratsuka, T., Shindo, T., Hamamoto, T., Ueki, N., Kusunoki, M., Miyake, K., Gudis, K., Tsukui, T., Sakamoto, C.; Chemopreventive effect of celecoxib in gastric cancer; *Inflammopharmacology*: 1-4; (2007)
29. Gautam, S. C., Gao, X., Dulchavsky, S.; Immunomodulation by curcumin; *Adv. Exp. Med. Biol.* 595: 321-341 (2007)
30. Goldenberg, D., Lee, J., Koch, W. M., Kim, M. M., Trink, B., Sidransky, D., Moon, C. S.; Habitual risk factors for head and neck cancer; *Otolaryngoscop.* 131: 986-993 (2004)
31. Grösch, S., Maier, T. J., Schiffmann, S., Geisslinger, G.; Cyclooxygenase-2 (COX-2)-independent anticarcinogenic effects of selective COX-2 inhibitors; *Journal of the National Cancer Institute*; Vol. 98: 736-747 (2006)
32. Guerin, M. R., Higgins, C. E., Griest, W. H.; The analysis of the particulate and vapour phases of tobacco smoke; 1987
33. Gupta, R. A. and DuBois, R. N.; Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2; *Nature Rev. Cancer* 1: 11-21 (2001)
34. Gupta, S., Srivastava, M., Ahmad, N., Bostwick, D. G., Mukhtar, H.; Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma; *Prostate.* 42: 73-78 (2000)
35. Handler, J. A., Danilowicz, R. M., Eling, T. E.; Mitogenic signaling by epidermal growth factor (EGF), but not platelet-derived growth factor, requires arachidonic acid metabolism in BALB/c 3T3 cells. Modulation of EGF-dependent c-myc expression by prostaglandins; *J. Biol. Chem.* 265: 3669-3673 (1990)

36. 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.* 390: 179-188 (1997)
37. Harréus, U. A., Kastenbauer, E. R., Wallner, B. C., Kleinsasser, N. H.; The single cell microgelelectrophoresis technique in ecogenotoxicology; *Laryngohinootologie* 81: 528-533 (2002)
38. Harréus, U.A., Kleinsasser N.H., Zieger S., Waller, B., Reiter, M., Schuller, P., Berghaus, A.; Sensitivity to DNA-damage and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridisation; *Mutat. res.* 563: 131-138 (2004)
39. Hecht, S. S.; Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines; *Chem. Res. Toxicol.* 11: 559-603 (1998)
40. Herbst, R. S. and Shin, D. M.; Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy; *Cancer* 94: 1593-1611 (2002)
41. Higdon J; Curcumin; Linus Pauling Institute: 1-10 (2005)
42. Hilario, M. O., Terreri, M. T., Len, C. A.; Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors; *Jornal de Pediatria* 82; 206-212 (2006)
43. Hochberg, M. C.; New directions in symptomatic therapy for patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis; *Semin. Arthritis Rheum.* 32: 4-14 (2002)
44. Hong, R. L., Spohn, W. H., Hung, M. C.; Curcumin inhibits tyrosine kinase activity of p185neu and also depletes p185neu; *Clin. Cancer Res.* 5: 1884-1891 (1999)
45. Howe, L. R., Subbaramaiah, K., Patel, J., Masferrer, J. L., Deora, A., Hudis, C., Thaler, H. T., Muller, W. J., Du, B., Brown, A. M., Dannenberg, A. J.; Celecoxib, a selective cyclooxygenase 2 inhibitor, protects against human epidermal growth factor receptor 2 (HER-2)/neu-induced breast cancer; *Cancer Res.* 62: 5405-5407 (2002)
46. Huh, Y. H., Kim, S. H., Kim, S. J., Chun, J. S.; Differentiation status-dependent regulation of cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production by epidermal growth factor via mitogen-activated protein kinase in articular chondrocytes; *J. Biol. Chem.* 278: 9691-9697 (2003)

47. Hynes, N. E., Lane, H. A.; ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors; *Nat. Rev. Cancer* 5: 341-354 (2005)
48. IARC International Agency for Research on Cancer; Monographs on the evaluation of the carcinogenic risks of chemicals to humans (2003)
49. Iersel, M. L., Ploemen, J. P., Struik, I., van Amersfoort, C., Keyzer, A. E., Schefferlie, J. G., and van Bladeren, P. J.; Inhibition of glutathione S-transferase activity in human melanoma cells by alpha,beta-unsaturated carbonyl derivatives. Effects of acrolein, cinnamaldehyde, citral, crotonaldehyde, curcumin, ethacrynic acid, and trans-2-hexenal; *Chem. Biol. Intract.* 102: 117-132 (1996)
50. Isakson, P. C.; Pharmacology of COX-2 inhibitors; 2003
51. Jaeckel, E. C., Raja, S., Tan, J., Das, S. K., Dey, S. K., Girod, D. A., Tsue, T. T., Sanford, T. R.; Correlation of expression of cyclooxygenase-2, vascular endothelial growth factor, and peroxisome proliferator-activated receptor delta with head and neck squamous cell carcinoma; *Arch. Otolaryngol Head Neck Surg.* 127: 1253-1259 (2001)
52. Jagetia, G. C.; Radioprotection and radiosensitization by curcumin; *Adv. Exp. Med. Biol.* 595: 301-320 (2007)
53. Janot, F., Massaad, L., Ribrag, V., de Waziers, I, Beaune, P. H., Luboinski, B., Parise, O., Jr., Gouyette, A., Chabot, G. G.; Principal xenobiotic-metabolizing enzyme systems in human head and neck squamous cell carcinoma; *Carcinogenesis* 14: 1279-1283 (1993)
54. Jobin, C., Bradham, C. A., Russo, M. P., Juma, B., Narula, A. S., Brenner, D. A., Sartor, R. B.; Curcumin blocks cytokine-mediated NF-kappa B activation and proinflammatory gene expression by inhibiting inhibitory factor I-kappa B kinase activity; *J. of Immunology* 163. 3474 -3483 (1999)
55. Kalyankrishna, S. and Grandis, J. R.; Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer; *J. Clin. Oncol.* 24: 2666-2672 (2006)
56. Karunagaran, D., Joseph, J., Kumar, T. R.; Cell growth regulation; *Adv. Exp. Med. Biol.* 595: 245-268 (2007)
57. Khopde, M., Priyadarsini, K. I., Venkatesan, P., Rao, M. N.; Free radical scavenging ability and antioxidant efficiency of curcumin and its substituted analogue; *Biophys. Chem.* 80: 85-91 (1999)

58. Kinoshita, T., Takahashi, Y., Sakashita, T., Inoue, H., Tanabe, T., Yoshimoto, T.; Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenases 1 and 2 in human colon carcinoma cells; *Biochem. Biophys. Acta.* 438: 120-130 (1999)
59. Kleinsasser, N. H., Gamarra, F., Bergner, A., Wallner, B. C., Harreus, U. A., Juchhoff, J., Kastenbauer, E. R., and Huber, R. M.; Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay; *ORL.* 63:141-147 (2001)
60. Kleinsasser, N. H., Juchhoff, J., Wallner, B. C., Bergner, A., Harreus, U. A., Gamarra, F., Buhrlen, M., Huber, R. M., Rettenmeier, A. W.; The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology; *Mut. Res.* 561: 63-73 (2004)
61. Konkimalla, V. B., Suhas, V. L., Chandra, N. R., Gebhart, E., Efferth, T.; Diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma; *expert Rev. Anticancer Ther.* 7: 317-329 (2007)
62. Korutla, L., Cheung, J. Y., Mendelsohn, J., Kumar, R.; Inhibition of ligand-induced activation of epidermal growth factor receptor tyrosine phosphorylation by curcumin; *Carcinogenesis* 16: 1741-1745 (1995)
63. Krebsregister des Saarlandes und München; *Krebserkrankungen in Deutschland; Bericht* (2004);
64. Küsters S; Detection of EGFR and ErbB2 gene amplification in human tumour models using fluorescence-in-situ-hybridisation on tissue and cellline microarrays; (2006)
65. Lea, I. A., Jackson, M. A., Li, X., Bailey, S., Peddada, S. D., Dunnick, J. K.; Genetic pathways and mutation profiles of human cancers: site- and exposure-specific patterns; *Carcinogenesis* 28: 1851-1858 (2007)
66. Leu, T. H. and Maa, M. C.; The molecular mechanisms for the antitumorigenic effect of curcumin; *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents* 2: 357-370 (2002)
67. Li, D., Wang, L. E., Chang, P., El Naggar, A. K., Sturgis, E. M., Wei, Q.; In vitro benzo[a]pyrene diol epoxide-induced DNA adducts and risk of squamous cell carcinoma of head and neck; *Cancer Res.* 67: 5628-5634 (2007)
68. Limtrakul, P.; Curcumin as chemosensitizer; *Adv. Exp. Med. Biol.* 595: 269-300 (2007)

69. Lin, J. K.; Molecular targets of curcumin; *Adv. Exp. Med. Biol.* 595:227-243 (2007)
70. LoTempio, M. M., Veena, M. S., Steele, H. L., Ramamurthy, B., Ramalingam, T. S., Cohen, A. N., Chakrabarti, R., Srivatsan, E. S., Wang, M. B.; Curcumin suppresses growth of head and neck squamous cell carcinoma; *Clin. Cancer Res.* 11: 6994-7002 (2005)
71. Lu, X., Zhao, M., Kong, H., Cai, J., Wu, J., Wu, M., Hua, R., Liu, J., Xu, G.; Characterization of cigarette smoke condensates by comprehensive two-dimensional gas chromatography/time-of-flight mass spectrometry (GC x GC/TOFMS). Part 2: basic fraction; *J. Sep. Sci.* 27: 101-109 (2004)
72. Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., Harris, P. L., Haserlat, S. M., Supko, J. G., Haluska, F. G., Louis, D. N., Christiani, D. C., Settleman, J., Haber, D. A.; Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib; *N. Engl. J. Med.* 350: 2129-2139 (2004)
73. Maheshwari, R. K., Singh, A. K., Gaddipati, J., Srimal, R. C.; Multiple biological activities of curcumin: a short review; *Life Sciences* 78: 2081-2087 (2006)
74. Maihle, N. J., Baron, A. T., Barrette, B. A., Boardman, C. H., Christensen, T. A., Cora, E. M., Faupel-Badger, J. M., Greenwood, T., Juneja, S. C., Lafky, J. M., Lee, H., Reiter, J. L., Podratz, K. C.; EGF/ErbB receptor family in ovarian cancer ; *Cancer Trat. Res.* 107: 247-258 (2002)
75. Martu, C. and Radulescu, L.; Etiopathogenical relationship between ENT pathology and tobacco smoke; *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. iasi.* 110: 861-866 (2006)
76. McKenna, D. J., Rajab, N. F., McKeown, S. R., McKerr, G., McKelvey-Martin, V. J.; Use of the comet-FISH assay to demonstrate repair of the TP53 gene region in two human bladder carcinoma cell lines; *Radiat. Res.* 159: 49-56 (2003)
77. Menon, V. P. and Sudheer, A. R.; Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin; *Adv. Exp. Med. Biol.* 595: 105-125 (2007)
78. Mestre, J. R., Chan, G., Zhang, F., Yang, E. K., Sacks, P. G., Boyle, J. O., Shah, J. P., Edelstein, D., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J.; Inhibition of cyclooxygenase-2 expression. An approach to preventing head and neck cancer; *Annals NY Acad. Sci.* 889: 62-71 (1999)

79. Mitchell Terri A report on Curcumin`s anti-cancer effects; LE Magazine 7: 1-6 (2002)
80. Mohan, S. and Epstein, J. B.; Carcinogenesis and cyclooxygenase: the potential role of COX-2 inhibition in upper aerodigestive tract cancer; Oral Oncol. 39(6): 537-546 (2003)
81. Moraitis, D., Du, B., De Lorenzo, M. S., Boyle, J. O., Weksler, B. B., Cohen, E. G., Carew, J. F., Altorki, N. K., Kopelovich, L., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J.; Levels of cyclooxygenase-2 are increased in the oral mucosa of smokers: evidence for the role of epidermal growth factor receptor and its ligands; Cancer Res. 65: 664-670 (2005)
82. Nagaraj, N. S., Beckers, S., Mensah, J. K., Waigel, S., Vigneswaran, N., Zacharias, W.; Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto reductases in oral cancer cells; Tox. Lett. 165: 182-194 (2006)
83. Nagatsuka, H., Ishiwari, Y., Tsujigiwa, H., Nakano, K., and Nagai, N.; Quantitation of epidermal growth factor receptor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in pre-malignant and malignant oral epithelial lesions; (2001)
84. Nishimura, G., Yanoma, S., Mizuno, H., Kawakami, K., Tsukuda, M.; A selective cyclooxygenase-2 inhibitor suppresses tumor growth in nude mouse xenografted with human head and neck squamous carcinoma cells; Japan J. Cancer Res. 90:1152-1162 (1999)
85. Normanno, N., Maiello, M. R., De Luca, A.; Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors (EGFR-TKIs): simple drugs with a complex mechanism of action; J. Cell. Physiol. 194: 13-19 (2003)
86. Oestling O. and Johanson K.J.; Microgelelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells; Biochem. Research Com. 123: 291-298 (1984)
87. Olive, P. L. and 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. 294: 275-283 (1993)
88. Ono, Y., Nakanishi, Y., Gotoh, M., Sakamoto, M., Hirohashi, S.; Epidermal growth factor receptor gene amplification is correlated with laminin-5 gamma2 chain expression in oral squamous cell carcinoma cell lines; Canc. Lett. 175: 197-204 (2002)

89. Ouyang, W., Ma, Q., Li, J., Zhang, D., Ding, J., Huang, Y., Xing, M. M., Huang, C.; Benzo[a]pyrene diol-epoxide (B[a]PDE) upregulates COX-2 expression through MAPKs/AP-1 and IKKbeta/NF-kappaB in mouse epidermal Cl41 cells; *Mol. Carcinog.* 46: 32-41 (2007)
90. Pai, R., Soreghan, B., Szabo, I. L., Pavelka, M., Baatar, D., Tarnawski, A. S.; Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy; *Nat. Med.* 8: 289-293 (2002)
91. Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S., Hainaut, P.; Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers; *Oncogene* 21: 7435-7451 (2002)
92. Phillips H.J.; Dye exclusion test for cell viability; *Academie. Press N.Y.*: 407-408 (1973)
93. Pomerantz, R. G. and Grandis, J. R.; The epidermal growth factor receptor signaling network in head and neck carcinogenesis and implications for targeted therapy; *Semin. Oncol.* 31: 734-743 (2004)
94. Ragin, C. C., Modugno, F., Gollin, S. M.; The epidemiology and risk factors of head and neck cancer: a focus on human papillomavirus; *J. Dent. Res.* 86: 104-114 (2007)
95. Rao, C. V.; Regulation of COX and LOX by curcumin; *Adv. Exp. Med. Biol.* 595: 213-226 (2007)
96. Rapp, A., Hausmann, M., Greulich, K. O.; The comet-FISH technique: a tool for detection of specific DNA damage and repair; *Methods. Mol. Biol.* 291: 107-119 (2005)
97. Reddy, S., Rishi, A. K., Xu, H., Levi, E., Sarkar, F. H., Majumdar, A. P.; Mechanisms of curcumin- and EGF-receptor related protein (ERRP)-dependent growth inhibition of colon cancer cells; *Nutr. Cancer* 55: 185-194 (2006)
98. Reiter, M. Chromosomale Alterationen und Mutagensensitivität in humanen Lymphozyten und Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtrakts, (2008)
99. Renkonen, J., Wolff, H., Paavonen, T.; Expression of cyclo-oxygenase-2 in human tongue carcinoma and its precursor lesions; *Virchows archive* 440: 594-597 (2002)

100. Rogers, S. J., Harrington, K. J., Rhys-Evans, P., Charoenrat, P., and Eccles, S. A.; Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer; (2005)
101. Rubin, H.; Selective clonal expansion and microenvironmental permissiveness in tobacco carcinogenesis; *Oncogene* 21: 7391-7411 (2002)
102. Rubio, C. A.; Further studies on the therapeutic effect of indomethacin on esophageal tumors; *Cancer* 58: 1116-1119 (1986)
103. Ruby, A. J., Kuttan, G., Babu, K. D., Rajasekharan, K. N., Kuttan, R.; Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids; *Canc. Lett.* 94: 79-83 (1995)
104. Sancar, A.; Mechanisms of DNA excision repair; *Science* 266: 1954 (1994)
105. Satcher, D.; Cigars and public health; (1999)
106. Screevjaya S., Rao, MNA.: Nitrit oxide scavenging by curcuminoids. *J. Pharm. Pharmacol.* 49: 105-107 (1997)
107. Selassie, C. D., DeSoyza, T. V., Rosario, M., Gao, H., and Hansch, C.; Phenol toxicity in leukemia cells: a radical process, *Chem. Biol. Interactions.* 113:175-190 (1998)
108. Shah J.P., Johnson N.W., Batsakus J.G.; Oral cancer; Martin Dunitz London (2003)
109. Shao, J., Lee, S. B., Guo, H., Evers, B. M., Sheng, H.; Prostaglandin E2 stimulates the growth of colon cancer cells via induction of amphiregulin; *Cancer Res.* 63: 5218-5223 (2003)
110. Shin, D. M., Ro, J. Y., Hong, W. K., Hittelman, W. N.; Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis; *Cancer Res.* 54: 3153-3159 (1994)
111. Shishodia, S. and Aggarwal, B. B.; Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates activation of cigarette smoke-induced nuclear factor (NF)-kappaB by suppressing activation of IkappaBalpha kinase in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of cyclin D1, COX-2, and matrix metalloproteinase-9; *Cancer Res.* 64: 5004-5012 (2004)
112. Shishodia, S., Sethi, G., Aggarwal, B. B.; Curcumin: getting back to the roots; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1056: 206-217 (2005)
113. Simmons, D. L., Botting, R. M., Hla, T.; Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition; (2004)

114. Singh, S. and Aggarwal, B. B.; Activation of transcription factor NF-kappa B is suppressed by curcumin (diferuloylmethane) [corrected]; *J. Biol. Chem.* 270: 24995-25000 (1995)
115. Smith, C. J. and Hansch, C.; The relative toxicity of compounds in mainstream cigarette smoke condensate; *Food Chem. Tox.* 38: 637-646 (2000)
116. Smith, W. L., DeWitt, D. L., Garavito, R. M.; Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology; *Ann. Rev. Biochem.* 69: 145-182 (2000)
117. Speight, P. M. and Morgan, P. R.; The natural history and pathology of oral cancer and precancer; *Community Dental Health* 10: 31-41 (1993)
118. Steinsvag, S. K., Strand, M., Berg, O., Miaguchi, M., Olofsson, J.; Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system; *Laryngoscope.* 101: 1323-1331 (1991)
119. Susan, M., Rao, M. N.; Induction of glutathione S-transferase activity by curcumin in mice; *Arzneimittelforschung* 42: 962-964 (1992)
120. Swiger, R. R. and Tucker, J. D.; Fluorescence in situ hybridization: a brief review; *Environ. Mol. Mutagen.* 27:245-254 (1996)
121. Taylor, B. and Rehm, J.; When risk factors combine: the interaction between alcohol and smoking for aerodigestive cancer, coronary heart disease, and traffic and fire injury; *Add. Beh.* 31: 1522-1535 (2006)
122. Tsai, K. S., Yang, R. S., Liu, S. H.; Benzo[a]pyrene regulates osteoblast proliferation through an estrogen receptor-related cyclooxygenase-2 pathway; *Chem Res Toxicol.* 17: 679-684 (2004)
123. Van Hecken, A., Schwartz, J. I., Depre, M., De, Lepeleire, I., Dallob, A., Tanaka, W., Wynants, K., Buntinx, A., Arnout, J., Wong, P. H., Ebel, D. L., Gertz, B. J., De Schepper, P. J.; Comparative inhibitory activity of rofecoxib, meloxicam, diclofenac, ibuprofen, and naproxen on COX-2 versus COX-1 in healthy volunteers; *J Clin Pharmacol.* 40: 1109-1020 (2000)
124. Wallner, B. C., Harreus, U. A., Gamarra, F., Sassen, A., Kleinsasser, N. H.; Mini-organ cultures of human nasal mucosa. A model for eco-genotoxicological investigations; *HNO* 12: 1037-1046 (2005)
125. Wang, Z., Fuentes, C. F., Shapshay, S. M.; Antiangiogenic and chemopreventive activities of celecoxib in oral carcinoma cell; *Laryngoscope* 112:839-843 (2002)
126. Weinberg, R. A.; How cancer arises; *Sci Am.* 275:32-40 (1996)

127. Weng, M. W., Hsiao, Y. M., Chen, C. J., Wang, J. P., Chen, W. C., Ko, J. L.; Benzo[a]pyrene diol epoxide up-regulates COX-2 expression through NF-kappaB in rat astrocytes; *Toxicol. Lett.* 151(2): 345-355 (2004)
128. Winn, D. M., Blot, W. J., McLaughlin, J. K., Austin, D. F., Greenberg, R. S., Preston-Martin, S., Schoenberg, J. B., Fraumeni, J. F., Jr.; Mouthwash use and oral conditions in the risk of oral and pharyngeal cancer; (1991)
129. Wirth, L. J., Haddad, R. I., Lindeman, N. I., Zhao, X., Lee, J. C., Joshi, V. A., Norris, C. M., Jr., Posner, M. R.; Phase I study of gefitinib plus celecoxib in recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck; *Clin. Oncol.* 41: 496 (2005)
130. Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H., Ristimaki, A.; Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma; *Cancer. Res.* 58: 4997-5001 (1998)
131. Wynder, E. L. and HOFFMAN, D.; Experimental aspects of tobacco carcinogenesis; *Cancer Res.* 8: 249-453 (1963)
132. Wynder, E. L. and Hoffmann, D.; Smoking and health: pathogenic and preventive considerations; *New England Journal of Medicine* 300: 894-903 (1979)
133. Yano, S., Kondo, K., Yamaguchi, M., Richmond, G., Hutchison, M., Wakeling, A., Averbuch, S., Wadsworth, P.; Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition; *Anticancer Res.* 23: 3639-3650 (2003)
134. Zhang, X., Chen, Z. G., Choe, M. S., Lin, Y., Sun, S. Y., Wieand, H. S., Shin, H. J., 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)
135. Zheng, H., Li, L. L., Hu, D. S., Deng, X. Y., Cao, Y.; Role of Epstein-Barr virus encoded latent membrane protein 1 in the carcinogenesis of nasopharyngeal carcinoma; *Cell. Mol. immunol.* 4: 185-196 (2007)

8 Anhang

8.1 Abkürzungen

APC	adenomatöse Poliposis coli
BEGM	basal epithelial groth medium
BPDE	Benz[a]pyren-7,8-diol-epoxid
BRCA-1/2	breast cancer gene 1/2
Comet-FISH	Comet Assay kombiniert mit FISH
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
COX-2	Cyclooxygenase 1
COX-1	Cyclooxygenase 2
EBV	Epsteinbarvirus
EGFR	epidermal growth factor receptor
FCS	fötale Kälberserum (fetal calf serum)
FISH	Fluoreszenz in-situ Hybridisierung
HPV	Human Papilloma Virus
MCTM	Munich Chromosomal Tailmoment
MOK	Miniorgankulturen (mini organ culture)
OTM	Olive Tailmoment
PAH	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate Buffered Saline
SSC	saline sodium citrate buffer

8.2 Danksagung

Mein Dank gilt dem Direktor der Klinik für Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde, Prof. Dr. Alexander Berghaus, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und finanziellen Mittel, ohne die, die diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Mein großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Ulrich Harréus, der mir diese Arbeit ermöglichte, sie betreute und stets ein offenes Ohr für alle Probleme hatte.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Dr. Maximilian Reiter, der mich in die Thematik der Arbeit einführte und mich bei Ihrer Umsetzung jederzeit unterstützte.

Ein besonderer Dank gilt Sabina Zieger. Bei Ihr möchte ich mich für ihre unermüdliche tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und Probenbeschaffung bedanken.

Dank gilt auch meinen Mitdoktoranden die mir zu jeder Zeit helfend beistanden.

Abschließend gilt mein Dank meiner Familie, die mich zu jeder Zeit tatkräftig unterstützt hat und ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.