

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

**Über den Einfluss der Stimulation / Inhibition  
des Epidermal growth factor receptor auf karzi-  
nogen-induzierte DNA-Schäden in oropharyn-  
gealen Schleimhautzellen**

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

vorgelegt von  
**Katharina Heinrich**  
aus Friedberg / Hessen  
2012

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München**

**Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ulrich Harréus**

**Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Stefan Endres  
Priv. Doz. Dr. med. Susanna Müller**

**Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Philipp Baumeister**

**Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. Maximilian Reiser  
FACR, FRCR**

**Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2012**

*Für Pfevi*

# Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Kopf-Hals-Tumoren</b> .....	<b>7</b>
1.1.1	Epidemiologie .....	7
1.1.2	Ätiologie .....	8
<b>1.2</b>	<b>(Anti)Benzo[a]pyren-r-7, t-8-dihydrodiol-t-9,10epoxid (BPDE)</b> .....	<b>10</b>
<b>1.3</b>	<b>Feldkanzerogenese</b> .....	<b>12</b>
<b>1.4</b>	<b>EGFR</b> .....	<b>13</b>
1.4.1	Geschichte .....	13
1.4.2	Aufbau.....	13
1.4.3	Vorkommen.....	14
1.4.4	Aktivierung .....	15
1.4.5	Funktion .....	16
1.4.6	Pathomechanismen .....	20
<b>1.5</b>	<b>Liganden</b> .....	<b>21</b>
1.5.1	Transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ ).....	22
<b>1.6</b>	<b>Antikörper</b> .....	<b>23</b>
1.6.1	Cetuximab (Erbix <sup>TM</sup> ).....	23
<b>1.7</b>	<b>Tyrosinkinaseinhibitoren</b> .....	<b>25</b>
1.7.1	Erlotinib ( Traceva <sup>TM</sup> ) .....	25
<b>1.8</b>	<b>Multi Drug Resistance (MDR)</b> .....	<b>26</b>
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b> .....	<b>28</b>
<b>3</b>	<b>PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Patienten</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2</b>	<b>Miniorgankulturen</b> .....	<b>32</b>
3.2.1	Einführung.....	32
3.2.2	Kultivierungsmedien .....	33
3.2.3	Herstellung von Miniorgankulturen .....	34
3.2.4	Kultivierungsphase/Bebrütungsphase .....	35
<b>3.3</b>	<b>Vorversuch</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4</b>	<b>Versuch mit Cetuximab und Erlotinib</b> .....	<b>38</b>
<b>3.5</b>	<b>Herstellung von Einzelzellen</b> .....	<b>41</b>
<b>3.6</b>	<b>Comet Assay</b> .....	<b>42</b>

3.6.1	Einführung.....	42
3.6.2	Objektträger .....	43
3.6.3	Lyse .....	44
3.6.4	Elektrophorese.....	45
3.6.5	Färbung mit Ethidiumbromid.....	46
3.6.6	Auswertung .....	47
<b>3.7</b>	<b>Vitalitätstest .....</b>	<b>48</b>
<b>3.8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>49</b>
3.8.1	Herstellerliste der Chemikalien .....	49
3.8.2	Laborgeräte.....	51
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
<b>4.1</b>	<b>Vitalitäten .....</b>	<b>52</b>
<b>4.2</b>	<b>Statistische Analysen .....</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Patientendaten .....</b>	<b>53</b>
<b>4.4</b>	<b>Schädigung mit BPDE .....</b>	<b>54</b>
<b>4.5</b>	<b>Ergebnisse Vorversuch: Dosiswirkungskurve von TGF-<math>\alpha</math> .....</b>	<b>55</b>
4.5.1	Ergebnisse der Nontumor-Gruppe .....	55
<b>4.6</b>	<b>Ergebnisse Erlotinib und Cetuximab .....</b>	<b>59</b>
4.6.1	Ergebnisse der Nontumor-Gruppe .....	59
4.6.2	Ergebnisse der Karzinom-Gruppe .....	66
4.6.3	Vergleich von Nontumor- und Karzinom-Gruppe .....	73
<b>4.7</b>	<b>Vergleich von OTM und % DNA.....</b>	<b>79</b>
<b>5</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>81</b>
<b>5.1</b>	<b>Auswahl der Patienten.....</b>	<b>81</b>
<b>5.2</b>	<b>BPDE .....</b>	<b>82</b>
<b>5.3</b>	<b>Auswahl der Messmethode.....</b>	<b>83</b>
<b>5.4</b>	<b>Statistische Tests.....</b>	<b>84</b>
<b>5.5</b>	<b>Therapeutische Bedeutung von Cetuximab und Erlotinib .....</b>	<b>85</b>
<b>5.6</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>86</b>
5.6.1	DNA-fragmentierende Wirkung von BPDE.....	86
5.6.2	Diskussion der Dosiswirkungskurve von TGF- $\alpha$ .....	86
5.6.3	Diskussion über den Einfluss von TGF- $\alpha$ , Cetuximab und Erlotinib.....	87
<b>5.7</b>	<b>Schlussfolgerung.....</b>	<b>93</b>

<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>94</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>96</b>
7.1	Literatur.....	96
7.2	Abkürzungsverzeichnis.....	114
7.3	Lebenslauf .....	116
7.4	Danksagung.....	117
7.5	Publikationen aus der Arbeit .....	118

# 1 Einleitung

## 1.1 Kopf-Hals-Tumoren

### 1.1.1 Epidemiologie

Malignome des Kopf-Hals-Bereiches machen in der Bundesrepublik Deutschland einen Anteil von 4,8 % (♂7,3%, ♀2.1%) aller Krebserkrankungen aus. Damit stellen sie gemeinsam mit den Blasenkarzinomen die viert häufigste bösartige Tumorerkrankung, nach Lungen-, Prostata-/ Mamma-, und kolorektalen Karzinomen dar.

Die altersstandardisierte Inzidenz liegt in der männlichen Bevölkerung bei 25,1, in der weiblichen bei 5,2 pro 100.000 Einwohner. In absoluten Zahlen ausgedrückt bedeutete dies für das Jahr 2002, dass in der Gesamtbevölkerung 19709 (♂15.651; ♀4058) Neuerkrankungen auftraten, wobei die Mortalität bei 6671 (♂5250; ♀1421) Fällen lag. Die höhere Inzidenz beim männlichen Geschlecht im Vergleich zum weiblichen erklärt sich vor allem durch den häufigeren Tabak- und Alkoholkonsum der männlichen Patienten. Das mittlere Erkrankungsalter bei Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches liegt mit ca. 60 Jahren vergleichsweise niedrig, was dazu führt, dass über 10 % aller Sterbefälle durch Krebserkrankungen bei Männern im Altersbereich von 40-59 Jahren auf diese Tumoren zurückzuführen sind.<sup>163</sup>

Die Prognose der Kopf-Hals-Karzinome ist insgesamt schlecht. Die 5-Jahresüberlebensrate liegt bei 57, 1 %, bei Rezivtumoren oder Zweitmalignomen bei 20 %.<sup>155, 156</sup>

Das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen ist insbesondere beim Oropharynxkarzinom ausschlaggebend für die Prognose. So liegt die 5 Jahres-Überlebensrate ohne Lymphknotenbefall (T1 und T2 Tumoren) bei 75-80 %. Bei Lymphknoteninfiltration sinkt das 5 Jahres-Überleben hingegen auf 35-40 %.<sup>127</sup>

### 1.1.2 Ätiologie

Bei 90 % der im Kopf-Hals-Bereich lokalisierten Malignome handelt es sich um Plattenepithelkarzinome.<sup>167</sup> Die Ursachen dafür sind vielfältig. Am häufigsten ist jedoch der Konsum von Tabak und Alkohol als Ursache der Erkrankung zu werten.<sup>13</sup>

#### **Tabak und Alkohol**

Tabak und Alkohol stellen in 80 % der Fälle die Ursache für die Entstehung von Oropharynxkarzinomen dar.<sup>13</sup> Alkohol wirkt in unterschiedlicher Weise auf die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtrakt. Er führt zu einer Induktion von Cytochrom P 450-Enzymen. Zahlreiche schädigende Stoffe wie z.B. Tabakkarzinogene werden über Cytochrom P 450-Enzyme metabolisch aktiviert, wodurch sie ihre kanzerogene Wirkung erhalten oder diese verstärkt wird.<sup>180</sup>

Alkohol wird über die Alkoholdehydrogenase in das kanzerogene, mutagene und toxische Acetaldehyd (erster Metabolit der Alkoholoxidation) umgewandelt und kann somit selbst die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes schädigen.<sup>181</sup> Des Weiteren stellt Alkohol ein Lösungsmittel für andere Karzinogene dar, die hierdurch besser in die Mukosazellen eindringen können. Eine Schädigung der Speicheldrüsen durch Alkohol führt außerdem zu verminderter Speichelproduktion, so dass die Einwirkzeit kanzerogener Stoffe verlängert wird.<sup>116</sup>

Tabak ist ein weltweit stark verbreitetes Suchtmittel und kann für eine Vielzahl von Krebserkrankungen verantwortlich gemacht werden. In Tabakrauch wurden 69 kanzerogene Substanzen gefunden, darunter auch 10 verschiedene polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH).<sup>86</sup> Das Risiko eine tabakassoziierte Tumorerkrankung zu erleiden, steigt sowohl mit der Intensität als auch mit der Dauer des Konsums.<sup>86</sup>

Eine Kombination von Tabak und Alkohol, wie es häufig bei Patienten mit oropharyngealen Karzinomen anzutreffen ist, führt zu einem multiplikativen



Risiko, d.h. die kanzerogenen Faktoren summieren sich nicht einfach, sondern verstärken sich gegenseitig.<sup>28, 166</sup>

### **Arbeits- und Umweltstoffe**

Es ist eine Vielzahl an Arbeits- und Umweltstoffen bekannt, die zu einem Karzinom im Kopf-Hals-Bereich führen können. Auch für diese Substanzen, wie z.B. Asbest oder Zementstaub, ist ein multiplikatives Risiko in Kombination mit Rauchen bekannt.<sup>66, 119, 120, 161, 197</sup>

### **Virale Infektionen**

Eine weitere Ursache bei der Entstehung von Oropharynxkarzinomen ist die Infektion mit dem humanen Papillomavirus 16 und 18. Zwar ist die Prävalenz des Virus bei Hals-Kopf-Karzinompatienten gering<sup>100, 165</sup>, doch scheint die Infektion vor allem bei Patienten, die keine anderen Risikofaktoren aufweisen, eine entscheidende Rolle zu spielen.<sup>88</sup>

Vor allem für den asiatischen Raum ist bekannt, dass Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus zu Karzinomen des Nasopharynx führen können.<sup>184, 217</sup>

### **Lebensumstände**

Die Ernährung spielt bei der Entstehung von Karzinomen eine wichtige Rolle. So mindert eine obst- und gemüseriche Kost aufgrund des Gehaltes an Antioxidantien das Risiko an einem Kopf-Hals-Karzinom zu erkranken.<sup>36, 99, 166</sup>

Mangelnde Mundhygiene und ein schlechter Zahnstatus stellen einen ständigen Reiz für die Schleimhäute des Oropharynx dar und sind ebenfalls Risikofaktoren für die Entstehung von Krebs.<sup>40, 117</sup>

## 1.2 (Anti)Benzo[a]pyren-r-7, t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid (BPDE)

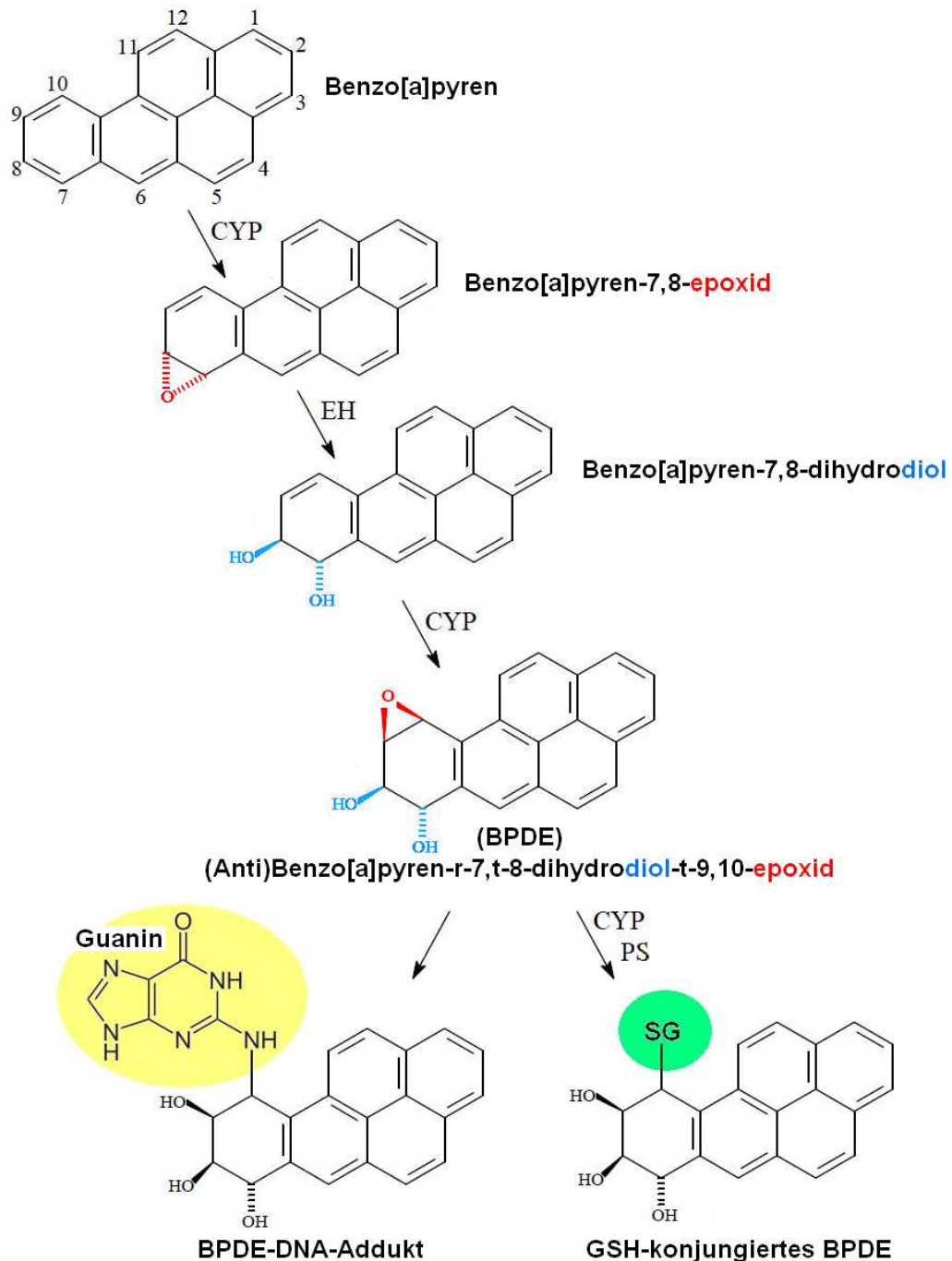
Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) sind ubiquitär vorkommende, organische Verbindungen, die aus mindestens zwei anellierten Ringsystemen bestehen. PAH entstehen vor allem bei der Pyrolyse von organischen Materialien, wie fossiler Brennstoffe, Holz und Tabak.<sup>144, 193</sup> Sie können sich ebenfalls bei der Zubereitung von Lebensmitteln, beim Grillen, Braten oder Räuchern entwickeln.<sup>98</sup>

PAHs werden aufgrund ihrer Lipophilie über die Haut und den Aerogigestivtrakt aufgenommen und werden schnell in löslichere Metabolite umgebaut, die dann wiederum mit Sulphat, Glutathion oder Glucuronsäure konjugiert werden. Danach erfolgt die Ausscheidung über Faeces oder den Urin.<sup>87</sup>

Der bekannteste Vertreter dieser polycyclischen Aromaten ist das Benzo[a]pyren (B[a]P). Es besteht aus fünf kondensierten Benzolringen und wird seit 2007 von der International Agency for Research on Cancer der WHO (IARC) in die Gruppe 1 und damit als kanzerogen eingestuft. Die technische Richtkonzentration (TRK) wurde mit 0,002 mg/m<sup>3</sup> festgelegt.<sup>87, 211</sup>

B[a]P wird bei Aufnahme in den Körper durch die Isoenzyme CYP 1A1 und CYP 1B1 des Cytochrom P 450 enzymatisch in (anti)Benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid (BPDE) umgebaut. Dies geschieht in zwei Schritten. Zuerst werden die Atome C7 und C8 durch die Monooxygenase des Cytochrom P 450 zu einem Epoxid oxidiert. Durch die Epoxid-Hydratase (EH) kommt es zur Umwandlung in ein trans-Diol. Anschließend entsteht durch eine zweite Oxidation ein weiteres Epoxid an C9 und C10. Diese Epoxid-Gruppe ist in der Lage, eine Bindung mit der Aminogruppe von Desoxyribonukleinsäuren (DNA), speziell mit Guanin, einzugehen und bildet somit ein schädigendes DNA-Addukt (siehe Abb.1).<sup>2, 87, 113, 114, 154</sup> Dies wird als einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Karzinomen durch Tabakkonsum verantwortlich gemacht.<sup>72 118 216 59</sup> Es konnten sowohl Chromosomenaberrationen als auch Einzelstrangbrüche oder Basensubstitutionen nachgewiesen werden.<sup>113, 114 169, 187</sup> In dieser Arbeit

nachgewiesen werden.<sup>113, 114 169, 187</sup> In dieser Arbeit wurde BPDE als schädigendes Agens zur DNA-Fragmentierung verwendet.



**Abb.1 Umwandlung von B[a]P zu BPDE** (modifiziert nach IARC Monographs Vol.92, 2010); CYP = Cytochrom P 450 Oxidase; EH = Epoxid-Hydrolase; PS = Prostaglandin-H-Synthase; GSH/SG = Glutathion; Metabolisierung des Prokarzinogens B[a]P zu BPDE. DNA-Adduktbildung und GSH-Konjugation von BPDE.<sup>87</sup>

## 1.3 Feldkanzerogenese

1953 formte Slaughter den Begriff der Feldkanzerogenese, unter der Annahme, dass Karzinogene nicht nur im Bereich des Malignoms, sondern auf weite Teile der oralen Schleimhaut schädigend wirken. Er untersuchte 783 Patienten mit oralen Malignomen. Bei allen resezierten Karzinomen war das umliegende benigne Epithel bereits verändert. Es konnten Hyperplasien, Hyperkeratosen und Anteile mit Fibrosen und Atrophien nachgewiesen werden. „Alleinstehende Foci von Karzinomen in situ oder isolierte Inseln von invasiven Plattenepithelkarzinomen wurden gefunden“, so Slaughter.

Bei 88 seiner Patienten (11,2%) stellte er Zweitmalignome, bzw. multifokale Primärtumoren fest. Slaughter schlussfolgerte: „Dann ist es unser Konzept, dass orale epidermoide Karzinome aus multifokalen Arealen mit präkanzerösen Veränderungen entstehen und nicht aus einer Zelle, die plötzlich bösartig wird.“<sup>191</sup>

Braakhuis et al. konnten diese Theorie stützen, als sie histopathologisch benignes Epithel in Tumornähe untersuchten. Dabei stellten sie bei einem Viertel fest, dass tumorassoziierte, genetische Alterationen bereits vorhanden waren.<sup>18</sup>

Diese Theorie wird heute auch dadurch untermauert, dass in nicht-transformiertem Epithel bei Karzinom-Patienten eine vermehrte Expression des Epidermal growth factor receptor (EGFR) und des Wachstumsfaktors TGF- $\alpha$  gefunden wurde.<sup>62</sup> Dies trifft ebenso für prämaligne Läsionen in oropharyngealen Regionen zu.<sup>185</sup>

## 1.4 EGFR

### 1.4.1 Geschichte

Der Nobelpreisträger Stanley Cohen entdeckte 1962 eine wachstumsfördernde Substanz in Speicheldrüsen von Mäusen und nannte sie EGF (*epidermal growth factor*).<sup>30</sup> Schließlich gelang es ihm 1980 auf menschlichen Zelloberflächen einen Rezeptor nachzuweisen, an dem EGF bindet. Diesen nannte er EGF-Rezeptor.<sup>31</sup>

Heute ist bekannt, dass dieser Rezeptor auf zahlreichen Tumorzellen stark exprimiert ist, was ihn zu einem Ziel der Antitumorthherapie machte.<sup>6</sup>

### 1.4.2 Aufbau

Der EGFR (Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor, *epidermal growth factor receptor*, ErbB-1 / HER1) gehört zu den Tyrosinkinase-Rezeptoren und ist ein Mitglied der ErbB / HER - Familie. Zu dieser zählen drei weitere Rezeptoren: ErbB-2neu / HER2neu, ErbB-3 / HER3 und ErbB-4 / HER4.<sup>140, 225</sup>

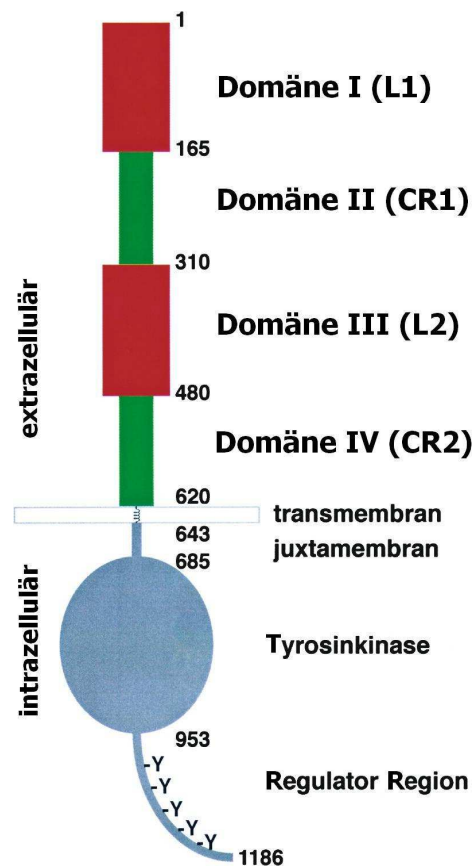
Eine 1186 Aminosäuren umfassende und 170 kDa schwere Polypeptidkette bildet das Grundgerüst des EGFR, der als monomeres Glykoprotein in der Zellmembran verankert ist.<sup>207</sup>

Unterteilt wird er in 3 Bestandteile:

1. einer extrazellulären, N-terminalen Domäne
2. einer hydrophoben transmembranösen Domäne und
3. einer intrazellulären, C-terminalen Domäne, welche die Kinase Region mit phosphorylierender Aktivität umfasst.<sup>207</sup>

Bindungsstelle für Liganden ist die amino-terminale, extrazelluläre Region des EGFR, bestehend aus 4 Subdomänen, I-IV (L1, CR1, L2, CR2).<sup>8</sup> Die Domänen I (L1) und III (L2) sind reich an Leucin und weisen eine 37%ige Übereinstimmung auf, wohingegen II (CR1) und IV (CR2) homologe cystein-

reiche Domänen sind. (Abbildung 2).<sup>213, 214</sup> Die größte Rolle bei der Bindung der Liganden fällt Domäne III zu.<sup>94, 102</sup>



**Abb.2: Aufbau des EGFR**  
(modifiziert nach Burgess et al. 2003). Darstellung des EGFR mit intra- und extrazellulärem Anteil.<sup>23</sup>

### 1.4.3 Vorkommen

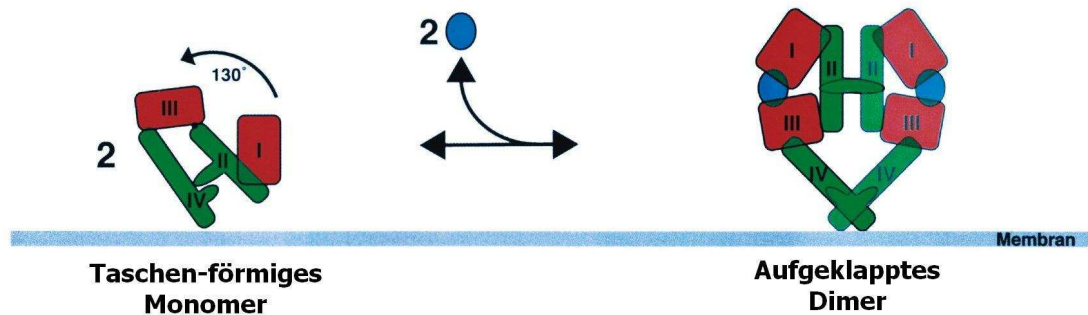
In erster Linie befindet sich der EGFR auf der Zelloberfläche von epithelialem Gewebe. Bei Ligandenbindung kommt es zu einer Aktivierung nachgeschalteter Tyrosinkinasen, die physiologischerweise Proliferation, Wachstum und Differenzierung regulieren.<sup>77, 224, 164, 223</sup> Anschließend folgt die Internalisierung des Rezeptors in das Endosom, einer lysosomalen Zellorganelle, wo der Rezeptor nach seiner Aktivierung abgebaut wird.<sup>24</sup>

Außerdem ist bekannt, dass der EGFR als Transkriptionsfaktor im Zellkern fungiert und dort mit STAT 3, einem Transkriptions-initiiierendem Protein, interagiert.<sup>110</sup> Psyrrri et al. zeigten, dass der EGFR im Nukleus von Oro-

pharynxkarzinomzellen zu finden ist und sein erhöhtes Vorkommen dort mit vermehrter Lokalrezidivrate und schlechter Prognose korreliert.<sup>160</sup>

#### 1.4.4 Aktivierung

Die Subdomänen der extrazellulären Region des EGFR sind C-förmig konfiguriert und bilden zwischen Domäne II und IV eine taschenartige Struktur. In dieser befindet sich der Dimerisierungsarm des Monomers.<sup>56, 139</sup> Eine Ligandenbindung an Domäne III führt zu einer Konformationsänderung des EGFR, so dass diese Tasche aufklappt.<sup>23, 56, 139</sup> Hierdurch wird der Dimerisierungsarm freigelegt und die Interaktion mit einem anderen aktivierten Rezeptor der ErbB-Familie ermöglicht (Abb.3). Es entsteht entweder ein Homodimer, wenn zwei EGFR-Rezeptoren interagieren oder ein Heterodimer, wenn es sich um zwei verschiedene Rezeptoren der ErbB-Familie handelt. Bei Zellen, die vermehrt EGFR exprimieren, können auch Tetramere vorkommen.<sup>56, 139, 225</sup> Ein Dimer besteht immer aus zwei Liganden und zwei Rezeptoren, die im Zentrum über direkte Interaktion der Domäne II verbunden sind.<sup>21, 41, 106, 138</sup> Da weder die Liganden untereinander in Kontakt stehen, noch eine Interaktion eines Liganden mit beiden Rezeptoren möglich ist, spricht man von einer sogenannten rezeptorvermittelten Dimerisation.<sup>139 56</sup> Diese führt letztendlich zu einer Erhöhung der intrazellulären Tyrosinkinaseaktivität durch Transfer von Phosphateinheiten des Adenosinriphosphat (ATP) auf Tyrosinreste des EGFR in der trans-Position. Die resultierenden aktivierten Tyrosinkinasen rekrutieren ihrerseits verschiedene nachgeschaltete Moleküle und leiten damit die Signaltransduktion ein.<sup>177,178</sup>



**Abb.3: Darstellung der Konformationsänderung des EGFR bei Ligandenbindung** (modifiziert nach Burgess et al. 2003). Das blaue Oval stellt den Liganden dar. Nach Bindung an das Monomer kommt es zu einer 130° Konformationsänderung im EGFR und Freilegung des Dimerisierungsarms in Domäne II. Dies führt zur rezeptorvermittelten Dimerisation.<sup>23</sup>

### 1.4.5 Funktion

Die Dimerisierung und Autophosphorylierung des Rezeptors führt zur Aktivierung einer Vielzahl von nachgeschalteten Proteinen, die für die Signaltransduktion verantwortlich sind. Hierzu zählen:

#### MAP-Kinase-Signalweg

Die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase, kurz MAPK, ist eine im Zytosol lokalisierte Proteinkinase, deren Name darauf beruht, dass sie durch extrazelluläre Liganden, meist mitogene Substanzen, reguliert wird. Nach Phosphorylierung des EGFR kommt es über die Aktivierung einer Reihe von Signalproteinen (GRB 2 [Growth factor receptor Protein 2], SOS [Son of sevenless], Ras, B-Raf) zur Phosphorylierung der Kinasen MEK 1 und 2. Diese wiederum führen zur Phosphorylierung und Aktivierung von ERK 1 und 2 (= extrazellulär-signalregulierte Kinase 1 und 2, auch p44 MAPK und p42 MAPK genannt). Diese aktivieren letztendlich Transkriptionsfaktoren der AP1-Familie (= Activator-Protein 1), wie z.B. Jun und Fos, die als Heterodimer an die DNA binden können und dort die Transkription von Genen, die für die Zellzyklussteuerung zuständig sind, initiieren. Folgend sind Zellzyklusprogression, Zell-



teilung und Hemmung der Apoptose (Abb.4).<sup>33, 110, 128, 129, 170, 219</sup>  
In Kopf-Hals-Karzinomen wurde beobachtet, dass erhöhte EGFR- und TGF- $\alpha$ -Expression positiv mit der Expression von aktiviertem ERK korreliert.<sup>1</sup>

### **PI3 Kinase-Akt-Signalweg**

Durch Bindung an einen phosphorylierten Tyrosinkinase-Rezeptor, wie den EGFR, wird die PI3 Kinase (Phosphatidylinositol3-Kinase) aktiviert. Diese wandelt das an der Zellmembran verankerte PIP2 (Phosphatidylinositol4,5-bisphosphat) in PIP3 (Phosphatidylinositol3,4,5-trisphosphat) um. PIP3 kann seinerseits die Serin/Threonin-Kinase Akt, ein Protoonkogen, aktivieren.

Akt wirkt auf vielen unterschiedlichen Wegen. Es kann z.B. über BAX, einem Kofaktor des Tumorsuppressorproteins p53, die Apoptose hemmen, oder über eine Reihe weiterer Proteine (Rheb, mTOR, S6K) die Translation von Proteinen herbeiführen. Somit ist Akt für eine Vielzahl von Prozessen, wie Zellwachstum, Apoptoseresistenz, Invasion und Tumormigration verantwortlich zu machen (Abb.4).<sup>128, 129</sup> In Kopf-Hals-Karzinomen konnte eine Überexpression von phosphoryliertem Akt in rund 60 - 80 % der Fälle nachgewiesen werden.<sup>143</sup>

### **STAT – Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription**

STAT fungieren als Transkriptionsfaktoren und befinden sich in inaktiver Form im Zytosol. Nach Aktivierung durch den EGFR kommt es zur Phosphorylierung und Homo-/Heterodimerisierung der STAT-Proteine. Diese Dimere können direkt an die DNA im Zellkern binden und die Transkription von Genen steuern, die für die Steuerung des Zellzyklus, der Zellproliferation und der Apoptose zuständig sind (Abb.4).<sup>20</sup> In Karzinomen wurde eine erhöhte Aktivität der STAT 3 und 5 gefunden und eine damit verbundene erhöhte Proliferation und verminderte Apoptoserate.<sup>17</sup> Eine Erhöhung der EGFR und STAT3 Aktivität wurde sowohl in bösartig veränderter als auch in gesunder Mukosa von Kopf-Hals-Karzinom-Patienten gefunden.<sup>64, 65</sup>

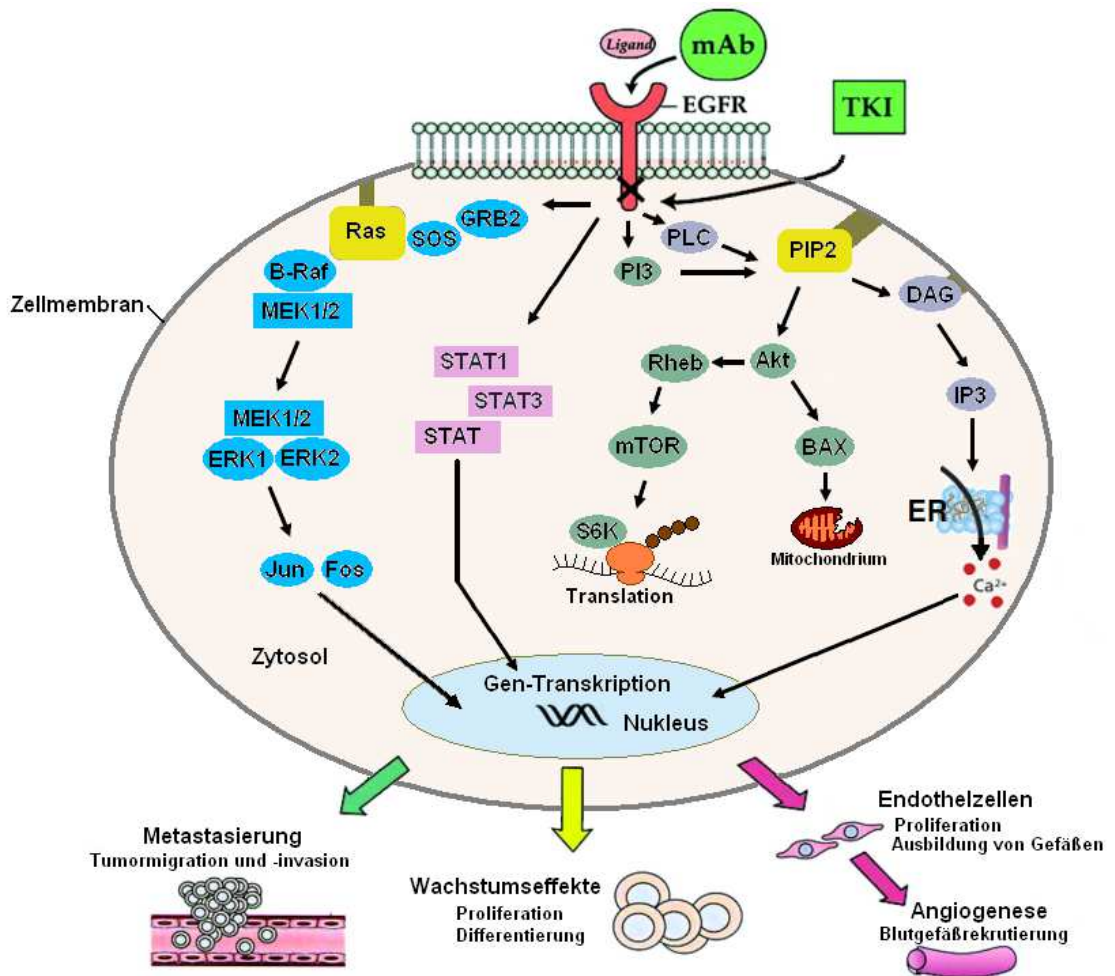
### **PLC-Signalweg**

Ein weiterer Downstream-Signalweg des EGFR ist die Aktivierung der Phospholipase C (PLC). Diese spaltet Phosphatreste von Phospholipiden ab. Ein Beispiel dafür ist die Umwandlung von PIP<sub>2</sub> in DAG (Diacyl-Glycerol) und IP<sub>3</sub> (Inositol1,4,5-trisphosphat). DAG bleibt dabei membrangebunden, wohingegen sich IP<sub>3</sub> als lösliche Struktur im Zytosol bewegt und dort an IP<sub>3</sub>-Rezeptoren (beispielsweise Ca<sup>2+</sup>-Kanäle des endoplasmatischen Retikulums) binden kann (Abb.4).

Dies führt zu einer Erhöhung von Ca<sup>2+</sup> im Zytosol und zu vermehrter intrazellulärer Enzymaktivität anderer wichtiger proliferativer Transduktoren und Transkriptionsfaktoren. Diese Effekte haben gleichfalls Einfluss auf das Tumorstadium.<sup>70, 71, 52</sup>

Diese Signaltransduktoren regulieren Prozesse wie Proliferation, Wachstum und Differenzierung.<sup>77, 224, 164, 223</sup> Kommt es zu einer Störung dieser Prozesse, kann dies zu einer malignen Transformation mit ungehemmtem Zellwachstum, verminderter Apoptoserate, Invasion, Angiogenese und Metastasierung führen.<sup>91, 175, 185, 201</sup>

Beendet wird der Signalvorgang durch Internalisierung des EGFR und Aufnahme in das Endosom der Zelle.<sup>11</sup>



**Abb.4: Der Signalweg des EGFR**

(modifiziert nach Harari 2004). mAb=monoklonaler Antikörper; TKI=Tyrosinkinaseinhibitor; ER=Endoplasmatisches Retikulum.<sup>69</sup>

## 1.4.6 Pathomechanismen

### Karzinome

In 90-100% der Kopf-Hals-Karzinome ist der EGFR stark exprimiert.<sup>34, 85, 147, 173</sup> Auch sein Ligand TGF- $\alpha$  ist in Kopf-Hals-Karzinomen vermehrt exprimiert und führt durch autokrine Stimulation zu gesteigerter Aktivierung des Rezeptors.<sup>62, 190 136, 171, 218</sup> Diese Veränderungen sind mit aggressiven Formen von Kopf-Hals-Karzinomen, kürzeren krankheitsfreien Intervallen, hohen Rezidivraten und hoher Mortalität assoziiert.<sup>51, 84, 171, 175</sup> Eine ungehemmte Aktivierung des EGFR kann auf verschiedenen Wegen erfolgen. Einerseits kann die Synthese des EGFR gesteigert sein, andererseits auch eine verminderte Downregulierung zu Grunde liegen. Ursache der gesteigerten Synthese kann dysreguliertes p53, ein Regulatorprotein des Zellzyklus, sein.<sup>64, 228</sup> Des Weiteren können Polymorphysmen in der Dinucleotidsequenz des EGFR-Gens eine Überexpression des EGFR bewirken.<sup>3, 45</sup> Außerdem konnte auch eine Gen-Amplifikation für das vermehrte Auftreten des EGFR gefunden werden.<sup>131, 134</sup> Die verminderte Downregulierung erhöht die zur Verfügung stehenden Rezeptoren und somit auch die Aktivität des EGFR.<sup>204</sup>

Eine andere Pathologie stellen EGFR-Mutationen dar. Die häufigste ist die EGFRvIII-Mutation. Hierbei handelt es sich um eine Deletion im EGFR-Gen. Diese führt zu einer ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors und somit zu einer Stimulation der Transduktionswege.<sup>14, 104, 115</sup>

### Tumorfremie Schleimhaut von Karzinompatienten

Eine verstärkte Expression des EGFR konnte auch bei nicht-malignen Epithelzellen in Tumornähe und in prämaligen Läsionen nachgewiesen werden, was die Theorie der Feldkanzerogenese stützt. Diese Epithelzellen sind wie die Karzinome in der Lage, Wachstumsfaktoren auto- und parakrin abzugeben und den EGFR und damit sich selbst zu stimulieren.<sup>62, 137, 185</sup> Grandis et al. konnten zeigen, dass sowohl der EGFR als auch einer seiner Effektoren, STAT3, in normaler Mukosa von Kopf-Hals-Karzinom-Patienten vermehrt exprimiert sind.<sup>63, 65</sup>

## 1.5 Liganden

Bisher sind 12 Liganden bekannt, die an ErbB-Rezeptoren binden.<sup>91</sup>

Zu diesen zählen unter anderem der EGF (*epidermal growth factor*), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor alpha*), Amphiregulin, HB-EGF (*heparin-binding-EGF-like-growth-factor*), Betacellulin und Heregulin. Eine erhöhte mRNA Konzentration dieser sechs Liganden konnte in Kopf-Hals-Karzinomen nachgewiesen werden.<sup>171 130</sup> Spezifisch an den EGFR binden jedoch nur EGF, TGF- $\alpha$  und Amphiregulin.<sup>77</sup>

Alle diese Liganden sind Vorläuferproteine. Sie werden aus Integralmembranproteinen an der extrazellulär gelegenen Region proteolytisch abgespalten und können somit ihren Effektor unmittelbar stimulieren.<sup>74</sup>

## **Transforming growth factor alpha (TGF- $\alpha$ )**

TGF- $\alpha$  ist ein Ligand des EGFR. Lokalisiert ist sein Gen auf Chromosom 2p13.<sup>39</sup> Entdeckt wurde TGF- $\alpha$  1978.<sup>35</sup> Seinen Namen erhielt es auf Grund der Beobachtung, dass es an Fibroblasten von Rattennieren eine Transformation des Phenotyps im Sinne eines progressiven Zellwachstums hervorrief.<sup>124, 205</sup> TGF- $\alpha$  wird von Zellen sezerniert und hat ein Molekulargewicht von 5-20 kDA.<sup>39</sup> Die kleinste Form, ein aus 50 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, entsteht durch Proteolyse eines 160 Aminosäuren umfassenden Vorläuferproteins.<sup>38</sup> Je nach Zelltyp kann sich durch unterschiedliche Proteolyse und Glykosylierung ein höheres Molekulargewicht des TGF- $\alpha$  ausprägen.<sup>19, 57, 200</sup> Es hat eine 30%ige Übereinstimmung mit und eine ähnliche räumliche Struktur wie EGF, wobei sechs Zysteinreste völlig gleich sind.<sup>26, 123</sup> Diese Ähnlichkeit könnte eine Erklärung dafür sein, dass beide Liganden an der gleichen Domäne des EGFR binden. TGF- $\alpha$  und EGF haben ähnliche Wirkungen. Beide besitzen in gleichem Maße die Fähigkeit DNA-Synthese in Zelllinien zu induzieren und in vivo eine Neovaskularisation herbeizuführen.<sup>179</sup>

Doch scheint TGF- $\alpha$  in höherem Maße aktiv zu sein als EGF.<sup>133</sup> TGF- $\alpha$  löst in Gegensatz zu EGF keine Refraktärperiode aus und kann damit auch einen durch EGF refraktären Rezeptor stimulieren.<sup>54</sup>

Bei Keratinozyten konnte gezeigt werden, dass TGF- $\alpha$  eine vermehrte Expression seiner selbst induzieren kann.<sup>29</sup>

## 1.6 Antikörper

### 1.6.1 Cetuximab (Erbix<sup>TM</sup>)

Anfang der Achtzigerjahre gelang es erstmals der Arbeitsgruppe um J. Denry Sato Antikörper gegen den EGFR zu entwickeln und nachzuweisen, dass diese das Zellwachstum hemmen, darunter auch das 225-IgG, der Prototyp des Cetuximab.<sup>92, 125, 174</sup>

Cetuximab ist ein rekombinanter chimärer monoklonaler IgG1-Antikörper mit einem Molekulargewicht von 152 kDa. Er bindet spezifisch an die Domäne III des extrazellulär gelegenen Anteils des EGFR und überlagert somit dessen Liganden-Bindungsstelle.<sup>47, 108</sup> Er weist dabei eine fünf- bis zehnfach höhere Affinität zum EGFR auf als seine Liganden und verdrängt diese kompetitiv.<sup>10, 43, 60</sup>

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung von Cetuximab zu folgenden Wirkungen führt:

- Hemmung der Homo- / Heterodimerisierung
- Hemmung der Tyrosinkinaseaktivität und der damit assoziierten Signalkaskaden
- Induzierung der Internalisierung des EGFR
- eine teilweise Verminderung der EGFR-Expression
- Hemmung von Zellwachstum und –proliferation
- Hemmung der Angiogenese.<sup>82, 151, 152, 159, 150</sup>

Außerdem konnte eine Stimulation der Immunantwort gegen die Tumorzellen gefördert werden.<sup>27</sup> Huang et al. beobachteten, dass es unter der Behandlung von Plattenepithelkarzinomzellen mit Cetuximab zu einem Arrest der Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase kam, verbunden mit einer Abnahme der sich in der S-Phase befindlichen Zellen.<sup>81</sup>

Zugelassen wurde Cetuximab sowohl von der FDA als auch von der EMEA im Jahre 2004, einerseits zur Therapie von EGFR-überexprimierenden, metastasierten Kolorektalkarzinomen bei Irinotecan-Unverträglichkeit oder vorangegangener frustraner Irinotecan-Therapie, andererseits zur Therapie von

fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches in Kombination mit Strahlentherapie oder platinbasierter Chemotherapie.

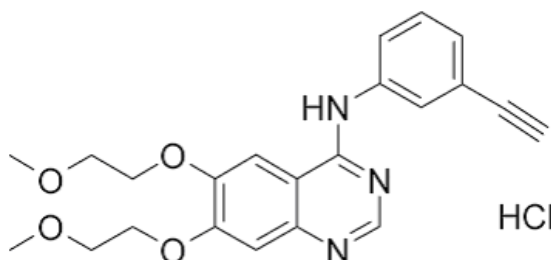
Zahlreiche Studien konnten eine Verlängerung der Überlebenszeit unter Cetuximab Mono- und Kombinationstherapien darlegen.<sup>15, 83, 206</sup> Verabreicht wird Cetuximab aufgrund seiner langen Halbwertszeit von 114 Stunden einmal wöchentlich als Infusionslösung mit einer Initialdosis von 400 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche, und einer Erhaltungsdosis von 250 mg/m<sup>2</sup> Körperoberfläche. Cetuximab ist im Vergleich zu herkömmlichen Zytostatikatherapien nebenwirkungsarm, kann aber eine schwere infusionsbedingte Reaktion, im Sinne eines anaphylaktischen Schockes hervorrufen. Des Weiteren ist häufig eine akneähnliche Hautreaktion zu beobachten, die mit der Wirkung des Medikaments positiv korreliert.<sup>16</sup> Außerdem kann es unter der Behandlung zu Elektrolytverschiebungen kommen.<sup>43, 47</sup>



## 1.7 Tyrosinkinaseinhibitoren

### 1.7.1 Erlotinib ( Traceva™)

Erlotinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor (Abb.5), der kompetitiv und reversibel die Tyrosinkinaseaktivität des EGFR hemmt und somit die nachfolgende Signaltransduktion verhindert. Er bindet an die intrazelluläre  $Mg^{2+}$ -ATP Bindungsstelle und verhindert damit die Autophosphorylierung des Rezeptors.<sup>148, 162, 188</sup> Außerdem ist Erlotinib in der Lage einer Multi Drug Resistance, die über ABC (ATP-binding-cassette-Transporter)-Proteine vermittelt wird, entgegenzuwirken. Multi Drug Resistance stellt in der Therapie von Karzinomen ein häufiges Problem dar, bei dem das Tumorgewebe eine Resistenz gegenüber Pharmaka (meist Zytostatika) erwirbt.<sup>182, 183</sup> Aufgrund seiner guten Bioverfügbarkeit kann Erlotinib in einer Dosis von 150 mg einmal täglich oral verabreicht werden. Erlotinib wurde von der FDA 2004 und von der EMEA 2005 für die Therapie des lokal fortgeschrittenen oder metastasierten nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms als Zweitlinientherapie nach mindestens einem erfolglosen Chemotherapieregime zugelassen. Eine Erweiterung dieser Zulassung erfolgte 2010 sowohl in Europa als auch in den USA als Erstlinientherapie nach mindestens vier Zyklen einer platinbasierten Chemotherapie im stabilen Tumorstadium ohne Tumorprogression. Eine weitere Zulassung wurde 2005 von der FDA und 2007 von der EMEA für die Therapie des metastasierten Pankreastumors in Kombination mit Gemcitabin erteilt. Derzeit wird die Zulassung für Kopf-Hals-Karzinome in klinischen Studien erprobt.<sup>44, 48</sup> Zu den häufigsten unerwünschten Wirkungen der Erlotinibtherapie zählt das Auftreten eines Erythems (Rash) (bei 75% der Patienten) und Diarrhoe (bei 54%), selten in schwerer Ausprägung.<sup>44</sup>



**Abb.5:**  
Strukturformel von  
Erlotinib HCl.

## 1.8 Multi Drug Resistance (MDR)

Als Multi Drug Resistance (MDR) bezeichnet man die zelluläre Resistenz gegen Arzneistoffe durch erhöhten Metabolismus oder vermehrten Auswärtstransport aus der Zelle.<sup>22</sup> Die Exposition gegenüber eines einzigen Agens kann ausreichen, um eine Resistenz gegen eine große Breite an verschiedenen Medikamenten zu verursachen.<sup>49</sup> Vermittelt wird diese Resistenz durch „Adenosintriphosphat(ATP)-binding-cassette“(ABC)-Transporter. Dies sind Proteine, die verschiedene Moleküle spezifisch durch Lipidmembranen transportieren können und daher auch Effluxpumpen genannt werden. In einigen Studien wurde gezeigt, dass der EGFR Einfluss auf die Expression und Translation von Multi-drug-resistance-Proteinen nimmt.<sup>55, 121</sup> Bisher sind 49 humane Gene bekannt, die für diese Proteine kodieren.<sup>176</sup> Es gibt eine Vielzahl von Transmembranproteinen, die den ABC-Transportern angehören. Dazu zählen die multidrug-resistance-associated proteins (MRP1-7), der ABC-Halbtransporter ABCG2, auch breast cancer resistance protein (BCRP) genannt, und das P-Glycoprotein.<sup>4, 111, 158, 176</sup>

Das MRP2 und das P-Glykoprotein werden im Folgenden genauer erörtert. MRP1 und MRP2 (auch cMOAT = *canalicular multispecific organic anion transporter*) sind je 190 kDa schwere, unidirektionale, ATP-getriebene Transmembranglykoproteine. Zu ihren Aufgaben zählt die Detoxifikation durch Auswärtstransport von Glutathion-, Glucuronat- oder Sulfat-konjugierter Xenobiotika, wie z.B. von GSH-konjugiertem BPDE im Falle des MRP2.<sup>58, 93, 107, 195</sup>

Das P-Glykoprotein hat eine Masse von 170 kDa und ist wie andere ABC-Transporter eine ATP-abhängige Effluxpumpe.<sup>50, 158</sup> Im Gegensatz zum MRP2 sind seine Substrate unkonjugiert.<sup>50, 67, 107</sup> Das P-Glykoprotein transportiert vor allem phyto-logische Zytostatika, wie Antracycline (Doxorubicin), Etoposid, Vincaalkaloide (Vincristin), Dactinomycin und Pacitaxel, aber es dient auch der Detoxifikation durch Eliminierung von Toxinen

und Xenobiotika, wie z.B. B[a]P.<sup>158, 226</sup> Tyrosinkinaseinhibitoren, wie Erlotinib und Gefitinib sind ebenfalls Substrate des P-Glykoproteins.<sup>44</sup>

P-Glykoprotein wird häufig von Tumorzellen exprimiert und kann vor allem nach einer Chemotherapie bei refraktärer Tumorerkrankung erhöht sein.<sup>158,</sup>

<sup>172</sup> Beeinflusst wird das P-Glykoprotein durch eine Reihe Medikamente und aerodigestiv aufgenommener Substanzen (Nahrungsbestandteile, Umweltschadstoffe).<sup>7, 229</sup> Die bekanntesten Inhibitoren des P-Glykoproteins sind Verapamil und Cyclosporin A.<sup>7, 44</sup>

## 2 Zielsetzung der Arbeit

Bisher ist wenig darüber bekannt, wie es zur vermehrten Expression des Epidermal growth factor receptor (EGFR) in gesundem Gewebe in Tumornähe kommt und welche Rolle der EGFR bei Tumorgenese und Resistenzmechanismen spielt.

Ziel der Arbeit war es, den Einfluss des EGFR-Agonisten TGF alpha und der Antagonisten Cetuximab und Erlotinib auf die Genotoxizität von Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) zu testen. Dies geschah mittels quantitativer Messung der DNA-Schädigung durch den Comet-Assay (alkalische Mikrogelelektrophorese).

Die Arbeit soll dazu dienen, einen besseren Einblick in die Funktion des EGFR zu bekommen. Um dies zu erreichen, wurden folgende Versuche an Miniorgankulturen, welche aus OP-Biopsaten gesunder Oropharynxschleimhaut von Karzinompatienten und Kontrollpatienten gewonnen wurden, durchgeführt:

1. Bestimmung der optimalen TGF- $\alpha$  Konzentration zur Stimulation von Miniorgankulturen.
2. Ausschluss genotoxischer Effekt von TGF- $\alpha$ , Erlotinib und Cetuximab.
3. Messung der durch Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) verursachten DNA-Schädigung an Miniorgankulturen im Vergleich mit:
  - a) TGF- $\alpha$  und Erlotinib vorbehandelten Miniorgankulturen.
  - b) TGF- $\alpha$  und Cetuximab vorbehandelten Miniorgankulturen.
  - c) TGF- $\alpha$ , Cetuximab und Erlotinib vorbehandelten Miniorgankulturen.
4. Vergleich der Messparameter OTM und %DNA.

## **3 Patienten, Material und Methoden**

### **3.1 Patienten**

Die verwendeten Schleimhautfrischbiopsate wurden im Rahmen medizinisch notwendiger Operationen in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München gewonnen und stellten somit keine zusätzliche Belastung für die Patienten dar. Eine schriftliche Einverständniserklärung zur wissenschaftlichen Verwendung der Schleimhautproben wurde eingeholt.

Die Mukosa wurde sowohl bei tumorfreien Patienten entnommen als auch bei Patienten, die an einem Oropharynxkarzinom erkrankt waren. Bei letztgenannten war die gewonnene Schleimhaut mindestens einen Zentimeter vom tumorfreien Resektionsrand des Karzinoms entfernt. Die operativen Eingriffe stellten bei den Tumorpatienten die Tumorresektion dar und bei den tumorfreien Patienten eine Tonsillektomie bei chronischer Tonsillitis oder eine Uvulopalatopharyngoplastik (UPPP) bei obstruktiven Schlafapnoesyndrom (OSAS).

Alle Patientendaten wurden gemäß datenschutzrechtlichen Vorschriften behandelt. Dieses Vorgehen wurde nach Prüfung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München (Antrag-Nr.: 349/05) zugelassen, die Versuche von der Autorin eigenhändig durchgeführt.

## Anamnesen der Patienten

### Nontumor-Patienten

	Nr.	Alter	♀/ ♂	OP-Indikaiton	Nikotin [py]	Alkohol [g/d]
<b>V O R V E R S U C H</b>	1	48	♂	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	2	20	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	k.A.	k.A.
	3	28	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	4	45	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	5	44	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	6	19	♂	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	7	32	♂	Chron. rez. Tonsillitiden	16	10
	8	18	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	9	40	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	17	10
	10	25	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	11	45	♂	OSAS	0	10
	12	48	♂	OSAS	0	0
	13	45	♂	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	14	28	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	15	27	♂	Peritonsillitis	0	0
<b>H A U P T V E R S U C H</b>	1	45	♂	OSAS	0	10
	2	48	♂	OSAS	0	0
	3	45	♂	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	4	28	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	5	27	♂	Peritonsillitis	0	0
	6	29	♂	Chron. rez. Tonsillitiden	0	10
	7	24	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	2	10
	8	41	♀	OSAS	2	<5
	9	19	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0,5	k.A.
	10	23	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	8	0
	11	29	♂	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	12	20	♂	Chron. rez. Tonsillitiden	2	0
	13	59	♂	OSAS	0	40
	14	50	♂	OSAS	10	0
	15	21	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	16	19	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	17	18	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	18	27	♂	Chron. rez. Tonsillitiden	5	10
	19	33	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0
	20	57	♀	Chron. rez. Tonsillitiden	0	0

**Tumor-Patienten**

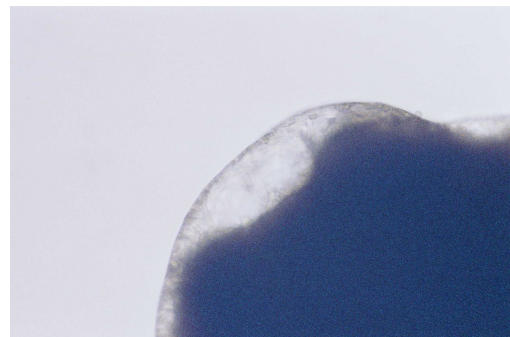
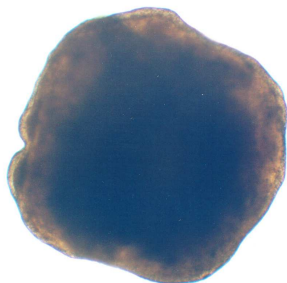
	Nr.	Alter	♀/ ♂	Lokalisation	Staging/Grading	Nikotin [py]	Alkohol [g/d]
<b>V O R V E R S U C H</b>	1	54	♂	Zungengrund	k.A.	20	60
	2	60	♂	Oropharynx	pT4 pN0 cM0 G2	60	40
	3	47	♂	Zungengrund	pT3 pN0 cM0 G2	19	47
	4	81	♀	Tonsillen	pT2 pN3 cMx G2	0	0
	5	61	♀	Uvula	pT3 pN0 cMx G2	60	13
	6	53	♂	Zungengrund	pT3 pN2c cM0 G2	30	40
	7	77	♂	Tonsillen	pT3 pN0 cMo G3	0	34
	8	58	♂	Oropharynx	pT2 pN0 cM0 G3	30	34
	9	69	♂	Oropharynx	pT1 pN2a cM0 G2	10	0
	10	46	♀	Oropharynx	pT2 pN2b cM0 G3	7,5	10
	11	51	♂	Oropharynx	pT2 pN3 cMx G3	53	40-80
	12	65	♂	Oropharynx	pT3 pN2a cM0 G2	30	34
	13	51	♂	Tonsillen	pT2 pN1 cMx G2	30	80
	14	54	♂	Oropharynx	pT3 pN2b cM0 G3	10	27
	15	65	♂	Oropharynx	pT2 pN2 cM0 G2	40	80
<b>H A U P T V E R S U C H</b>	1	51	♂	Oropharynx	pT2 pN3 cMx G3	53	40-80
	2	65	♂	Oropharynx	pT3 pN2a cM0 G2	30	34
	3	51	♂	Tonsillen	pT2 pN1 cMx G2	30	80
	4	54	♂	Oropharynx	pT3 pN2b cM0 G3	10	27
	5	62	♂	Zungengrund	pT3 pN0 cMx G1	k.A.	k.A.
	6	65	♀	Tonsillen	pT2 pN2b cM0 G3	2	10
	7	61	♂	Oropharynx	pT4a pN2a cM1 G3	20	47
	8	56	♂	Zungengrund	pT2 pN2b cMx G3	30	80
	9	53	♂	Oropharynx	pT4 cN2c cM0 Gx	0	0
	10	65	♀	Zungengrund	pT2 pN1 cM0 G1	5	0
	11	48	♀	Oropharynx	pT2 pN2c cM0 G2	15	10
	12	62	♂	Oropharynx	pT3 pN2b cM0 G1	30	10
	13	61	♀	Zungengrund	pT2 pN0 cM0 Gx	22	k.A.
	14	58	♀	Oropharynx	pT4a pN2a cM0 G3	40	0
	15	65	♂	Oropharynx	pT2 pN2c cM0 G2	40	80
	16	70	♂	Weichgaumen	pT1 pN0 cM0 G3	50	10
	17	56	♂	Zungengrund	pT2 pN0 cM0 G3	15	13
	18	69	♂	Weichgaumen	pT1 pN1 cM0 G2	10	34
	19	65	♂	Zungengrund	pT2 pN0 cM0 G1	0	0
	20	61	♂	Tonsillen	pT2 pN2a cM0 G2	0	0

## 3.2 Miniorgankulturen

### 3.2.1 Einführung

Steinsvag et al. gelang es 1991 die ersten Miniorgankulturen herzustellen. Dabei wurde das bei Resektionen der Tonsilla pharyngealis gewonnene Gewebe in kleine Fragmente zerlegt und 40 Tage bebrütet. Die Fragmente schwammen dabei frei in einer Nährlösung. Das adenoide Gewebe wurde während dieser Zeit mit Lichtmikroskop, Elektronenmikroskop und Transmissionselektronenmikroskop beobachtet. Die Fragmente bildeten ein mehrreihiges und mehrschichtiges Epithel aus, besaßen eine Basalmembran und schlagende Zilien. (Abb.6) Anfangs waren Lymphozyten im Gewebe zu erkennen, die aber im Laufe der Kultivierung durch kollagenes Bindegewebe ersetzt wurden.<sup>196</sup>

Kleinsasser et al. entwickelten dieses Verfahren zur Kultivierung von respiratorischer Schleimhaut weiter. Sie nutzen die Miniorgankulturen, um Versuche mit mehrfacher Inkubation von genotoxischen Substanzen durchzuführen.<sup>95</sup> Es gelang ihnen zu zeigen, dass Miniorgankulturen sich stark von Einzelzellen unterscheiden. Durch ihren Verbund und ihre Interaktion fiel die Schädigung durch Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) geringer aus als bei Einzelzellen.<sup>96</sup> Außerdem zeichneten sie sich durch eine stabile Enzymaktivität aus, was die Grundlage für ein metabolisches System bildet und somit einem in vivo Versuch näher kommt als Einzelzell-Experimente.<sup>97</sup>



**Abb.6:** Epithelialisierte Miniorgankultur (Vergrößerung links: 40fach; rechts: 100fach)



### 3.2.2 Kultivierungsmedien

Zur Kultivierung der Miniorgankulturen dienten sterile 24-Well-Platten. Diese wurden mit 250 µl eines Agarose – DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)-Gemisches beschichtet.

#### Herstellung von Agarose 1,5 %

0,45 g Agarosepulver (Agar Noble)	in steriles Gefäß einwiegen	}	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. mischen</li> <li>2. in Mikrowelle aufkochen</li> <li>3. in Dampfsterilisator bei 120°C sterilisieren</li> </ol>
30 ml Aqua bidestillata	zugeben		

#### Herstellung von DMEM Lösung

9,99 g DMEM Pulver	in steriles Gefäß einwiegen	}	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. lösen</li> <li>2. den pH-Wert auf 7,2 einstellen</li> <li>3. Filtration über einen Sterilfilter</li> </ol>
11,96 g HEPES* Pulver			
500 ml Aqua bidestillata	zugeben		

\*N-2-Hydroxaethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure

### Herstellung des Nährbodens und Auftragen auf die Platten

30 ml DMEM Lösung	in steriles 50 ml Tube geben	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. steriles 50 ml Tube schwenken</li> <li>2. Inhalt des 50 ml Tubes in sterilisierte und aufgekochte Agarose 1,5 % geben</li> <li>3. je 250 µl pro Well auf die 24-Well-Platte pipettieren</li> <li>4. Well-Platte für mindestens 2 Stunden bei 4°C auskühlen lassen</li> </ol>
6 ml Fetales Kälberserum	in Tube zugeben	
75 µl nicht-essentielle Aminosäuren	in Tube zugeben	
120 µl Penicillin- Streptomycin-Gemisch	in Tube zugeben	
240 µl Amphotericin B	in Tube zugeben	

### 3.2.3 Herstellung von Miniorgankulturen

Die Frischbiopsate wurden sofort nach Entnahme in sterile 0,9 %ige Kochsalzlösung gegeben und umgehend gekühlt und lichtgeschützt in das Labor gebracht. Dort wurden sie unter einer sterilen Werkbank auf eine Petrischale gegeben und mit einem Skalpell von makroskopisch sichtbaren Koagel, Gefäßen und Bindegewebe getrennt. Anschließend folgte die Zerkleinerung in ca. 1 mm<sup>3</sup> große Stücke. Diese wurden dreimal in je 5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden in jedes Well einer 24-Well-Platte ein bis drei Mukosastücke pipettiert. Pro Well wurden 250 µl Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM) zugegeben.

### Herstellung von Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM)

500 ml Bronchial Epithelial Basalmedium	}	1. Supplement Pack unter steriler Werkbank zugeben 2. mischen 3. bei 4°C lagern
Supplement Pack: - BPE-26 - Insulin-2.5 - HC-250 - Epinephrin-250 - T3-3.35 - Transferrin-5 - RA-50		

#### 3.2.4 Kultivierungsphase / Bebrütungsphase

Die Miniorgankulturen wurden im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit drei bis vier Wochen bebrütet. Um die Ernährung der Miniorgankulturen zu gewährleisten, wurde einerseits im Abstand von 48 Stunden das Nährmedium BEGM 250 µl erneuert, andererseits die Mukosastücke nach jeweils sieben Tagen auf eine neue 24-Well-Platte überführt.

Während der Bebrütungsphase standen die Miniorgankulturen unter regelmäßiger Beobachtung unter einem inversen Mikroskop. Dies diente dazu, Infektionen mit Bakterien, Hefen und Schimmelpilzen auszuschließen, sowie den Wachstumsfortschritt der sich neu bildenden Epithelschicht zu beurteilen.

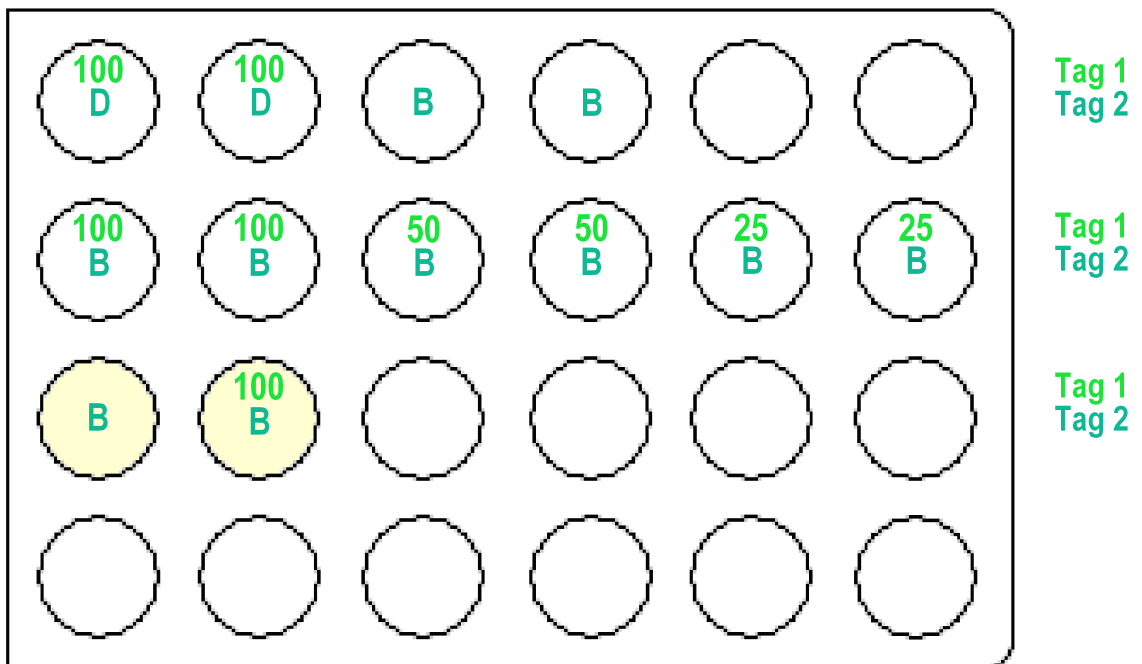
### 3.3 Vorversuch


Der Vorversuch sollte zeigen, ob sich die von Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) hervorgerufene DNA-Schädigung der Miniorgankulturen durch unterschiedliche Konzentrationen des Wachstumsfaktors TGF- $\alpha$  beeinflussen lässt. Es wurden absteigende Verdünnungsreihen von TGF- $\alpha$  mit Aqua bidestillata hergestellt. Die Endkonzentration betrug 100, 50 und 25 ng/ml. In jeweils zwei Wells wurden die Miniorgankulturen mit der gleichen Konzentration für 24 Stunden stimuliert. Weitere zwei Wells wurden zur Negativkontrolle herangezogen. Die darin befindlichen Miniorgankulturen wurden ebenfalls mit TGF- $\alpha$  in der höchsten Konzentration für 24 Stunden stimuliert, um durch TGF- $\alpha$  verursachte DNA-Schäden ausschließen zu können.

Zwei Wells wurden ausschließlich mit BPDE behandelt, um den Einfluss von TGF- $\alpha$  zu erfassen, so dass ein Ausgangswert für die Schädigung ohne TGF- $\alpha$  ermittelt werden konnte. Nachdem TGF- $\alpha$  24 Stunden eingewirkt hatte, wurden die Miniorgankulturen zweimal mit je 250  $\mu$ l BEGM gewaschen. Um gleiche Bedingungen zu schaffen, wurde auch in den beiden Negativkontrollen das Medium erneuert.

BPDE wurde folgend mit Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und je 25  $\mu$ l in jedes Well, ausschließlich der Negativkontrolle, gegeben, so dass eine Endkonzentration von 9  $\mu$ M vorlag. Anstelle von BPDE wurde für die Negativkontrolle 25  $\mu$ l DMSO verwendet. Die Miniorgankulturen inkubierten für eine Stunde bei 37°C im Wasserschüttelbad. Anschließend wurden alle mit BPDE geschädigten Miniorgankulturen zweimal mit BEGM gewaschen und auch hier, zur Gewährleistung gleicher Bedingungen in den zwei Wells der Negativkontrolle, das Nährmedium ausgetauscht.

In Abbildung 7 ist das Schema des Versuches dargestellt:



	= Vitalität
<b>100</b>	=TGF- $\alpha$ 100 ng/ml; 24h; 37°C
<b>50</b>	=TGF- $\alpha$ 50 ng/ml; 24h; 37°C
<b>25</b>	=TGF- $\alpha$ 25 ng/ml; 24h; 37°C
<b>D</b>	= 25 $\mu$ l Dimethylsulfoxid (DMSO); 1h; 37°C
<b>B</b>	= 9 $\mu$ M Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE); 1h; 37°C

**Abb.7:** Schema des Vorversuches

### 3.4 Versuch mit Cetuximab und Erlotinib

In diesem Versuch wurde der Einfluss von TGF- $\alpha$ , Cetuximab und Erlotinib auf die DNA-Schädigung durch BPDE untersucht. Die Miniorgankulturen der ersten beiden Wells wurden als Negativkontrolle verwendet. Am ersten Tag wurden den Proben DMSO und Aqua bidestillata zugegeben, am zweiten Tag folgte die Stimulation mit TGF- $\alpha$  50 ng/ml für 24 Stunden. Anstatt der Schädigung durch BPDE wurde am dritten Tag DMSO für eine Stunde zugegeben. Ziel war es, wie schon im Vorversuch, DNA-Schäden durch Aqua bidestillata, DMSO sowie TGF- $\alpha$  auszuschließen.

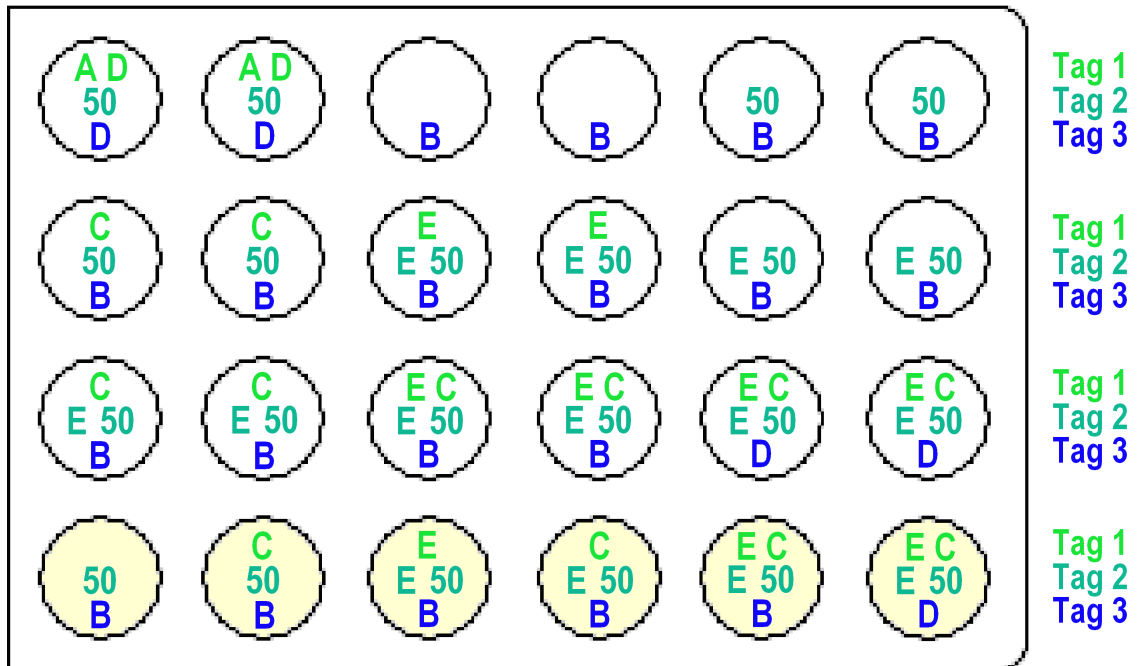
Als Ausgangswert diente die durch BPDE hervorgerufene DNA-Schädigung. Hierzu wurden zwei Wells nicht mit TGF- $\alpha$  stimuliert, sondern ausschließlich mit BPDE geschädigt.


In die zwei rechten Wells der oberen Reihe wurde zusätzlich vor der Schädigung mit Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE), TGF- $\alpha$  50 ng/ml zugeführt, um einen Ausgangswert für den Einfluss des TGF- $\alpha$  auf die BPDE-Schädigung zu erhalten.

In den folgenden Wells wurden die Miniorgankulturen vor Zugabe von TGF- $\alpha$  und BPDE mit den Medikamenten Cetuximab und Erlotinib behandelt. Diese wirkten 24 Stunden ein und wurden anschließend mit je 250  $\mu$ l BEGM heruntergewaschen. Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der in der Therapie von Kopf-Hals-Karzinompatienten einmal wöchentlich durch eine intravenöse Gabe in Kombination mit Strahlen- oder Chemotherapie verabreicht wird.<sup>43</sup> Im Versuchsaufbau wurde Cetuximab am ersten Tag einmalig den Miniorgankulturen zugeführt.

Erlotinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der in Kombination mit anderen onkologischen Therapeutika verabreicht wird. Auf Grund seiner kurzen Halbwertszeit muss Erlotinib täglich oral aufgenommen werden.<sup>44</sup> Daher wurde in der vorliegenden Arbeit Erlotinib 24 Stunden bei Einmalgabe, und 24 bzw. 48 Stunden bei Zweimalgabe vor der Schädigung zugeführt.

Am zweiten Tag wurden die mit Cetuximab und Erlotinib vorbehandelten Miniorgankulturen mit TGF- $\alpha$  50 ng/ml für 24 Stunden stimuliert und danach mit je 250  $\mu$ l BEGM gewaschen. Um gleiche Bedingungen zu schaffen, wurde auch in den Wells mit unbehandelten Miniorgankulturen das Medium erneuert. Vor der Schädigung mit BPDE wurde, wie im Vorversuch, zweimal das BEGM in jedem Well ausgetauscht. Danach folgte auch hier eine Schädigung durch BPDE mit einer Endkonzentration von 9  $\mu$ M, wobei die Negativkontrolle anstelle von BPDE mit 25  $\mu$ l DMSO versetzt wurde. Es schloss sich eine Inkubation für eine Stunde bei 37°C im Wasserschüttelbad an. Alle mit BPDE geschädigten Miniorgankulturen wurden erneut zweimal mit BEGM gewaschen. In den zwei Wells der Negativkontrolle wurde ebenfalls das Nährmedium ausgetauscht. Das Versuchsschema ist in Abbildung 8 dargestellt:



	= Vitalität
<b>50</b>	= TGF- $\alpha$ 50 ng/ml; 24h; 37°C
<b>A</b>	= 25 $\mu$ l Aqua bidestillata; 24h; 37°C
<b>D</b>	= 25 $\mu$ l Dimethylsulfoxid (DMSO); 1h; 37°C
<b>B</b>	= 9 $\mu$ M Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE); 1h; 37°C
<b>C</b>	= 10 $\mu$ g/ml Cetuximab; 24h; 37°C
<b>E</b>	= 0,5 $\mu$ M Erlotinib; 24h; 37°C

**Abb.8:** Schema des Versuches mit Erlotinib und Cetuximab



### 3.5 Herstellung von Einzelzellen

Die Arbeiten erfolgten unter Infrarotlicht, um DNA-Schäden durch UV-Licht ausschließen zu können.

Zum Herauslösen der Zellen aus dem Zellverband wurden jeweils die Miniorgankulturen aus zwei gleichbehandelten Wells in ein mit 600 µl Enzymlösung gefülltes Eppendorf<sup>TM</sup>-Tube überführt. Die Enzymlösung wurde wie folgt hergestellt:

50 mg Protease	}	± 0,5 mg in steriles 50 ml Tube einwiegen und in 10 ml Nährmedium lösen
10 mg Hyaluronidase		
10 mg Collagenase P		

Die Tubes wurden auf einem Minishaker geschüttelt und anschließend durch einen Polypropylenfilter (Porendurchmesser 0,22 µm) steril filtriert. Danach wurden 600 µl in jedes Eppendorf<sup>TM</sup>-Tube vorgelegt.

Nach Zugabe der Miniorgankulturen wurden die Eppendorf<sup>TM</sup>-Tube bei 37°C 45 min im Schüttelwasserbad inkubiert. Nach der Inkubation wurden einerseits die Eppendorf<sup>TM</sup>-Tubes im Eisbad gekühlt und andererseits mit 600 µl fetalem Kälberserum versetzt, um die Enzymaktivität zu stoppen. Jedes Eppendorf<sup>TM</sup>-Tube wurde 20 Sekunden auf dem Minishaker gerüttelt, um die Zellen vom Bindegewebe zu lösen. Danach wurde aus jedem Tube das Bindegewebe mit einer sterilen Kanüle entfernt. Die Zellsuspension wurde anschließend in einer Zentrifuge mit einem Rotorradius von 21,1 cm bei 800 Umdrehungen pro Minute und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert, das übriggebliebene Zellpellet mit 1000 µl einer 4°C kalten phosphatgepufferten Kochsalzlösung (PBS) resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Reinigungsvorgang mit PBS wurde ein weiteres Mal durchgeführt. Danach wurde der Überstand mit einer Pipette abgesaugt und das Zellpellet für den Comet Assay oder den Trypanblau-Vitalitätstest verwendet.

## 3.6 Comet Assay

### 3.6.1 Einführung

Der Comet Assay, auch alkalische Einzelzellgelelektrophorese genannt, dient dem quantitativen Nachweis von DNA-Schäden. 1984 wurde er erstmals von Östling und Johanson beschrieben und DNA-Doppelstrangbrüche an Säugetierzellen nachgewiesen.<sup>145</sup> 1987 wurde der Comet Assay erstmals mit menschlichen Zellen (u.a. Plattenepithelkarzinomzellen) durchgeführt.<sup>146</sup> Singh et al. entwickelten die Methode 1988 weiter, indem sie alkalische Puffer verwendeten und somit auch der Nachweis von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen, Crosslinks und inkompletten Exzisionsreparaturstellen gelang.<sup>189</sup>

Zahlreiche Studien trugen zur Etablierung des Comet Assays als geeignetes Verfahren zur Quantifizierung von DNA-Schäden bei.<sup>53, 61, 72, 202</sup>

Zur Sicherung und Verbesserung der Reliabilität und der Validität kommen heute die Kriterien des *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures (IWGTP)*<sup>25, 203</sup> und die Richtlinien des *Internationalen Comet Assay Workshops*<sup>5, 75</sup> zur Durchführung und Auswertung des Comet Assays zur Anwendung.

Der Comet Assay ist ein Verfahren, bei dem die DNA auf einem mit Agarose beschichtetem Objektträger der Wanderung im elektrischen Feld zugänglich gemacht wird. Dabei verbleibt die intakte DNA im Zellkern, die fragmentierte DNA wandert hingegen zur Anode. Die Wanderungstrecke ist abhängig von der Größe der Fragmente. Je kleiner das DNA-Fragment ist, umso schneller ist die Wanderungsgeschwindigkeit und somit auch die in einer bestimmten Zeit zurückgelegte Strecke. Dadurch entsteht nach Anfärbung und Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop das Bild eines Kometen, mit dem Nukleus als Kopf und der fragmentierten DNA als Schweif.

### 3.6.2 Objektträger

Für den Comet Assay wurden spezielle, zur besseren Haftung der Agarose an den Längsseiten mattierte, Objektträger (24 x 70 mm) benutzt. Diese wurden nach Nummerierung mit einem Diamantstift und vor dem Auftragen der Zellen mit 85 µl Agarose 0,5 % grundiert.

#### Herstellung der Agarose 0,5 %:

0,1 g normal melting Agarose 0,5 %	Einwiegen, in 20 ml PBS lösen und aufkochen.
---------------------------------------	----------------------------------------------

Danach härteten die Objektträger mindestens zwei Tage aus.

Zum Aufbringen der Zellen auf den Objektträger wurden die Zellpellets mit je 75 µl Agarose 0,7 % resuspendiert, auf den Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas versehen.

#### Herstellung der Agarose 0,7 %:

0,7 g low melting Agarose 0,7 %	Einwiegen, in 10 ml PBS lösen, aufkochen und im Wasserbad auf 37°C temperieren.
------------------------------------	------------------------------------------------------------------------------------

Zum Aushärten wurden die Objektträger für 15 Minuten auf eine gekühlte Metallplatte gelegt. Nach Abziehen des Deckglases folgte eine erneute Beschichtung mit 85 µl Agarose 0,7 %, sowie eine weitere Aushärtung für 15 Minuten.

### 3.6.3 Lyse

Die Lyse diente der Auflösung von Kern- und Zellmembranen. Dazu wurden die Objektträger ohne Deckglas für eine Stunde in eine Färbekammer gestellt und mit 100 ml einer 4°C kalten Lyselösung vollständig bedeckt.

#### Herstellung der Lysestammlösung:

146,4 g NaCl (2,5 M)	}	einwiegen und in 500 ml Aqua bi-destillata lösen	}	Alle drei Lösungen in einen Messkolben geben, auf einen Liter mit Aqua bi-destillata auffüllen und auf einen pH-Wert von 10 einstellen.
1,2 g Trihydroxymethylaminomethan (10 mM)				
37,2 g Na <sub>2</sub> EDTA (100 mM)	}	unter Zugabe von NaOH-Plätzchen einwiegen und in 160 ml Aqua bi-destillata lösen		
10 g N-Laurylsarcosinnatriumsalz (1 %)			}	einwiegen und in 160 ml Aqua bi-destillata lösen

Mindesthaltbarkeit bei Raumtemperatur: 12 Monate

#### Herstellung der Lysegebrauchslösung:

1 ml Triton X 100	}	in ein 250 ml Becherglas geben und auf 100 ml mit Lysestammlösung auffüllen. Danach die Lösung auf 4°C kühlen.
10 ml DMSO		

### 3.6.4 Elektrophorese

Zur Durchführung der Elektrophorese wurde die Elektrophoresekammer in ein 4°C kaltes Wasserbad gestellt, an einen Generator angeschlossen und mit Hilfe der Dosenlibelle justiert. Die Objektträger wurden aus der Lyselösung genommen und horizontal in die Elektrophoresekammer eingelegt. Die Ausrichtung erfolgte anodenwärts (Abb.9). Anschließend wurde die Elektrophoresekammer luftblasenfrei mit Puffer befüllt.

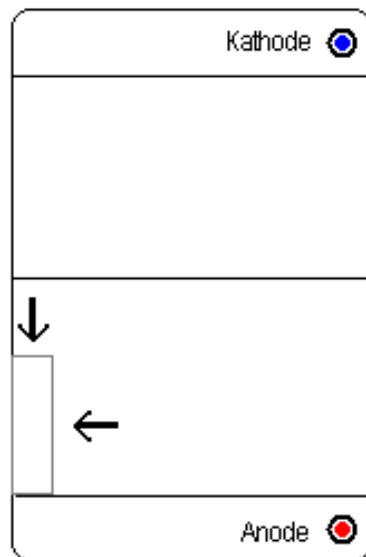


Abb.9: Elektrophoresekammer

#### Herstellung des Elektrophoresepuffers:

24 g NaOH Pellets	}	In Messbecher einwiegen, auf zwei Liter mit Aqua bidestillata auffüllen und auf 4°C temperieren.
0,744 g EDTA disodium		

Die Objektträger wurden 20 Minuten im alkalischen Milieu belassen. Dies diente der Entspiralisierung der DNA. Danach folgte die 20-minütige Elektrophorese bei 25 V und 300 mA.

Nach diesem Vorgang wurden die Objektträger zum Zwecke der Neutralisation auf Färbebänke überführt und im Abstand von 5 Minuten dreimal mit Trismapuffer benetzt.

#### **Herstellung des Neutralisationspuffers:**

48,5 g Trishydroxymethylaminomethan	Einwiegen und in einem Liter Aqua bidestillata lösen. Anschließend den pH-Wert auf 7,5 einstellen.
-------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------

#### **3.6.5 Färbung mit Ethidiumbromid**

Zum Anfärben der DNA wurde der Farbstoff Ethidiumbromid verwendet. Dieser interkaliert mit Nukleinsäuren, was zu einer Änderung des Absorptionsspektrums und dadurch zu einer orange-roten Fluoreszenz im Bereich von 300 nm (UV-Licht) führt.<sup>78</sup>

Die Menge an DNA, sowie die Länge der einzelnen Stränge ist proportional zur Strahlungsstärke, d.h. je mehr DNA vorhanden ist und je länger die Nukleinsäurestränge sind, desto intensiver ist die Fluoreszenz.<sup>78</sup>

Auf jeden Objektträger wurde 75 µl Ethidiumbromidlösung (0,02 mg/ml) pipettiert und darauf ein Deckglas gelegt. Die Aufbewahrung erfolgte in Objektträgerkästen, welche mit Aqua bidestillata befeuchtet wurden.

#### **Herstellung von Ethidiumbromidlösung 0,02 mg/ml:**

Ethidiumbromidstammlösung 0,2 mg/ml	1:10 Verdünnung mit Aqua bidestillata und Filtration durch einen gemischten Zelluloseesterfilter (Porendurchmesser 0,22 µm)
----------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### 3.6.6 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem DMLB Fluoreszenzmikroskop in 400facher Vergrößerung. An das Mikroskop war eine CCD-Kamera angeschlossen, die das Bild digitalisierte. Die Verarbeitung des Bildmaterials erfolgte mit dem Programm Komet 3.1. Mit diesem wurden pro Objektträger 80 zufällig ausgewählte Zellen ausgewertet (Abb.10). Zur Auswertung wurde sowohl der prozentuale DNA-Anteil im Schweif (%tail DNA oder %DNA) als auch der Olive Tail Moment (OTM) herangezogen und gegenübergestellt. Der OTM ist das Produkt aus der DNA Menge des Schweifes, gemessen an der Strahlungsstärke der Fluoreszenz im Verhältnis zur Gesamt DNA, und der durchschnittlichen Wanderungstrecke des Schweifes.<sup>141, 142</sup>

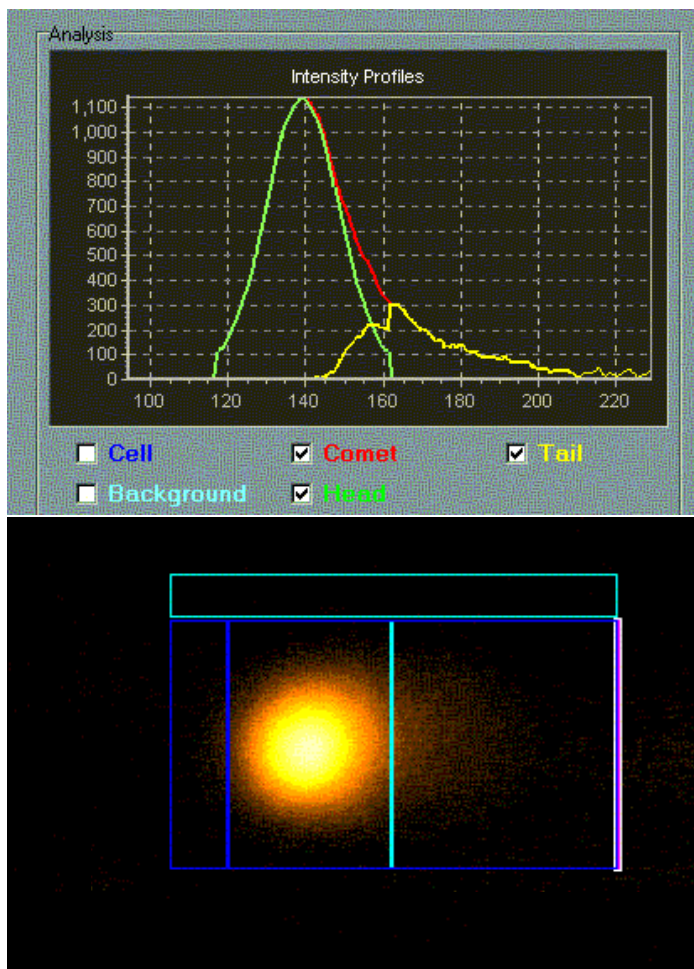


Abb.10: Auswertung einer Zelle mit dem Programm Komet 3.1

### 3.7 Vitalitätstest

Die Vitalität der Zellen wurde mit dem Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt.<sup>153</sup> Trypanblau ist ein blauer Farbstoff, der in vitale Zellen nicht eindringen kann. Eine Aufnahme des Farbstoffes in die Zelle ist auf eine veränderte Membrandurchlässigkeit zurückzuführen. Somit färben sich avitale Zellen blau an.

Die Auszählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer (Abb.11). Dazu wurde auf die Kammer ein Deckglas gelegt und am Rande dieses Glases die Suspension aus Zellpellet und 50 µl Trypanblau pipettiert. Durch die Kapillarstruktur der Kammer füllte sich diese mit der Suspension. Anschließend wurden die Zellen unter einem Phasenkontrastmikroskop in 400facher Vergrößerung ausgezählt.

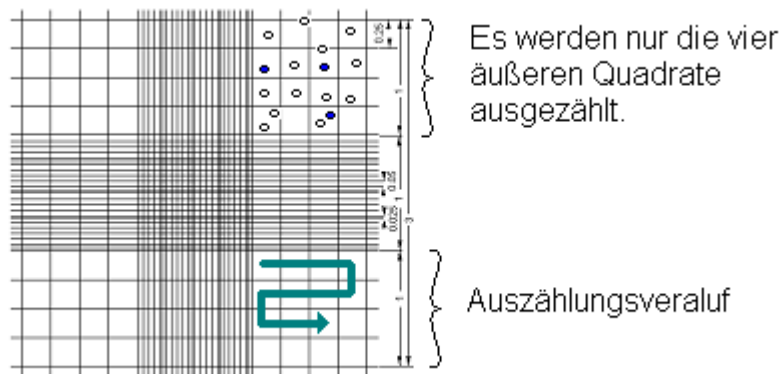


Abb.11: Neubauer-Zählkammer

$$\text{Ergebnis \% : } \frac{\text{vitale Zellen}}{\text{Zellen gesamt (vitale Zellen + avitale Zellen)}} \times 100$$



## 3.8 Anhang

### 3.8.1 Herstellerliste der Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Verbrauchsmaterialien	Firma
24-Well-Platten	Falcon, Heidelberg
Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE)	Midwest Research Institute, Kansas City, USA
Cetuximab, Erbitux™ 5 mg/ml Infusionslösung 20 ml	Merck, Darmstadt
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser für Objektträger (76 x 26 mm)	Langenbrick, Emmendingen
Einmalspritzen (5 und 10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten steril; Millex-GV; Millex-GS	Millipore, Eschborn
Erlotinib	LC Labs, Woburn, MA, USA
Kanülen	VWR, Ismaning
Objektträger 24 x 70 mm je 5 mm seitlich mattiert	Langenbrick, Emmendingen
Objektträgerkasten	GLW, Würzburg
Pipetten aus Polystyrol (2, 10, 25 ml); steril	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen (200; 1000 µl); steril	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	VWR, Ismaning
Pinzetten	Angiokard, Fiedeburg
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Stericup (150 ml), steril	Millipore, Eschborn
Skalpell	Pfm, Köln
Schreibdiamant	Renner, Dannstadt
TGF-α 0,1 mg Flasche	Sigma and Aldrige, Taufkirchen
Tubes	Eppendorf, Hamburg

<b>Chemikalien</b>	<b>Firma</b>
Aminosäuren, nicht essentiell	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Aqua bidest	Apotheke des Klinikums der LMU, München
Agar Noble	DIFCO, Detroit, USA
Alkohol 70 %, 80 %, absolut	Apotheke des Klinikums der LMU, München
Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM)	Promocell, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
EGFR-Rezeptor Sonden	Abbott, Illinois, USA
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälber Serum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
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, Mannheim
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
Protease aus Streptomyces griseus	Sigma, Steinheim
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Supplement Pack für BEGM	Promocell, Heidelberg
Trypanblau 0,4%	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt

### 3.8.2 Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Firma
Analysewaage; Voyager (0,1 mg-62 mg)	Ohaus, Gießen
Akku-Jet	Eppendorf, Hamburg
Brutschrank, Function Line	Heraeus, Hanau
Brutschrank, HeraCell	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	
Combitip	Eppendorf, Hamburg
Eismaschine KF 75	Migel ice line, Mailand, Italien
Elektrophoresenetzgerät, E865	Renner, Dannstadt
Elektrophoresewanne, Horizontalwanne (237*180 mm)	Renner, Dannstadt
Kühlschrank (+4°C)	Bosch, Stuttgart
Magnetrührgerät, Combimag RCT	IKA, Staufen
Mikroskop (Standart)	Zeiss, Oberkochen
Mikroskop (Inversion), DM IRB	Leica, Herbruggen, Schweiz
Mikroskop (Fluoreszenz), DM LB	Leica, Herbruggen, Schweiz
Mikroskop Filtersystem, N 2.1, BP 516-560	Leica, Herbruggen, Schweiz
Mikroskop Filtersystem, I 3, BP 450-490	Leica, Herbruggen, Schweiz
Mikroskop Objektive 100x / 1,25 Öl 40x / 0,5 10x / 0,22 4x / 0,1	Leica, Herbruggen, Schweiz
Mikrowelle, MWS 2819	Bauknecht, Schorndorf
Minishaker, MS 1	IKA-WORKS, Wilmington, USA
Pipetten 10, 100, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg
ph-Meter, 766 Calimatic	Knick, Berlin
Programm, Comet 3.1	Kinetic Imaging, Liverpool, GB
Programm, Excel	Microsoft, Unterschleißheim
Schüttelwasserbad, 1083	GFL, Burgwedel
Schüttler, Vortex Genie 2	Scientific, Bohemia, NY, USA
Spiegelreflexkamera	Minolta, Osaka, Japan
Sterilbank, Herasafe	Heraeus, Hanau
Waage, 1419 (1 mg-600 g)	Sartorius, Gießen
Wasserbad, 1002	GFL, Burgwedel
Zellzählkammer (Neubauer)	Merck, Darmstadt
Zentrifuge, Varifuge 3.ORS	Heraeus, Hanau

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vitalitäten

Zum Ausschluss zytotoxischer Zellschädigungen und apoptotischer Vorgänge wurde nach der Inkubation der Miniorgankulturen mit allen verwendeten Testsubstanzen, sowie nach der Auftrennung der Miniorgankulturen in Einzelzellen, ein Vitalitätstest mit dem Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Dabei lagen die Vitalitäten in den Vorversuchen stets über 93% und in den Versuchen mit Cetuximab und Erlotinib stets über 80%.

### 4.2 Statistische Analysen

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS<sup>TM</sup> Version 18. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots verwendet. Innerhalb der Box des Boxplots liegen 50% der Werte (unteres und oberes Quartil). Die Länge der Box wird dabei als Interquartilsabstand (IQR) bezeichnet. Der Median als durchgehender Strich in der Box veranschaulicht die Verteilung der Einzelwerte und deren Schiefe. Der Whisker wurde als Begrenzung jener Datenwerte gewählt, die sich binnen des 1,5fachen Interquartilsabstandes ( $1,5 \times \text{IQR}$ ) befinden. Liegen alle Werte des Versuches in diesem Bereich, so endet der Whisker am niedrigsten (unterer Whisker), bzw. am höchsten Wert (oberer Whisker). Alle sich darüber hinaus befindlichen Werte sind als so genannte Ausreißerwerte ( $>1,5 \times \text{IQR}$ ) mit einem Kreis (°), beziehungsweise als Extremwerte ( $>3 \times \text{IQR}$ ) mit einem Stern (\*) gekennzeichnet. Die Einzelwerte, welche zur statischen Auswertung herangezogen wurden, entstanden jeweils aus dem arithmetischen Mittel von 80 ausgewerteten Zellen des Versuches.

Die Normalverteilung der Werte wurde mittels Kolmogorov-Smirnov-Test ermittelt. Da die Bedingung der Normalverteilung bei den hier vorliegenden

Werten gegeben war, konnte der T-Test angewandt werden. Um die Werte innerhalb eines Versuches (z.B. DNA-Schädigung durch BPDE vs. negativ Kontrolle der selben Patientengruppe) zu vergleichen, wurde der verbundene T-Test eingesetzt. Zum Vergleich zweier unabhängiger Größen, wie z.B. von Tumorpatienten mit Non-Tumorpatienten wurde der unverbundene T-Test angewandt. Dem multiplen Testproblem (Problem der Inkonsistenz und der Inflation des Alphafehlers bei multiplen Nullhypothesen) wurde mit der Bonferroni-Korrektur begegnet und ein lokales Signifikanzniveau für jede Nullhypothese definiert, indem das globale Signifikanzniveau durch die Anzahl der Tests innerhalb einer Gruppe dividiert wurde. Das globale Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Zum Vergleich von OTM- mit %DNA-Werten wurde die Pearson-Korrelation herangezogen. Die Darstellung der Werte erfolgte in einem Punktdiagramm.

### 4.3 Patientendaten

Im Vorversuch wurden Schleimhautbiopsate von  $n=30$  Patienten untersucht. Dabei handelte es sich um 15 Patienten, die an einem Oropharynxkarzinom litten (Durchschnittsalter: 59,47 Jahre; von 46-81 Jahren; 3♀; 12♂) und weitere 15 Kontrollpatienten ohne Karzinomerkrankung (Durchschnittsalter: 33,44 Jahre; von 18-48 Jahren; 8♀; 7♂).

Bei den Versuchen mit Erlotinib und Cetuximab ( $n=40$ ) wurden Schleimhautproben von 20 Patienten mit einem Oropharynxkarzinom verwendet (Durchschnittsalter: 59,90 Jahre; von 48-70 Jahren; 5♀; 15♂), sowie 20 Proben von tumorfreien Kontrollpatienten (Durchschnittsalter: 32,94 Jahre; von 18-59 Jahren; 10♀; 10♂). (siehe S.30 und 31)

## 4.4 Schädigung mit BPDE

Die BPDE-induzierten Strangbrüche wurden durch die Entspiralisierung im alkalischen Milieu separiert und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Im elektrischen Feld wandern kleinere DNA Fragmente schneller und somit weiter in Richtung der Anode, wohingegen größere Fragmente im Zellkern verbleiben. Durch Anfärbung mit Ethidiumbromid kann die DNA unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden. Dabei entsteht das Bild eines Kometen, mit intakter DNA im Kopf und fragmentierter DNA im Schweif. Als Maß der Schädigung diente der Olive Tail Moment (OTM) (Abb.12 a+b). Er ist die relative Fluoreszenzdichte des Schweifes multipliziert mit der durchschnittlichen Wanderungsstrecke der DNA.<sup>141, 142</sup>



**Abb.12a:**  
Bild einer ungeschädigten Zelle im Fluoreszenzmikroskop.

Vergrößerung:  
400fach

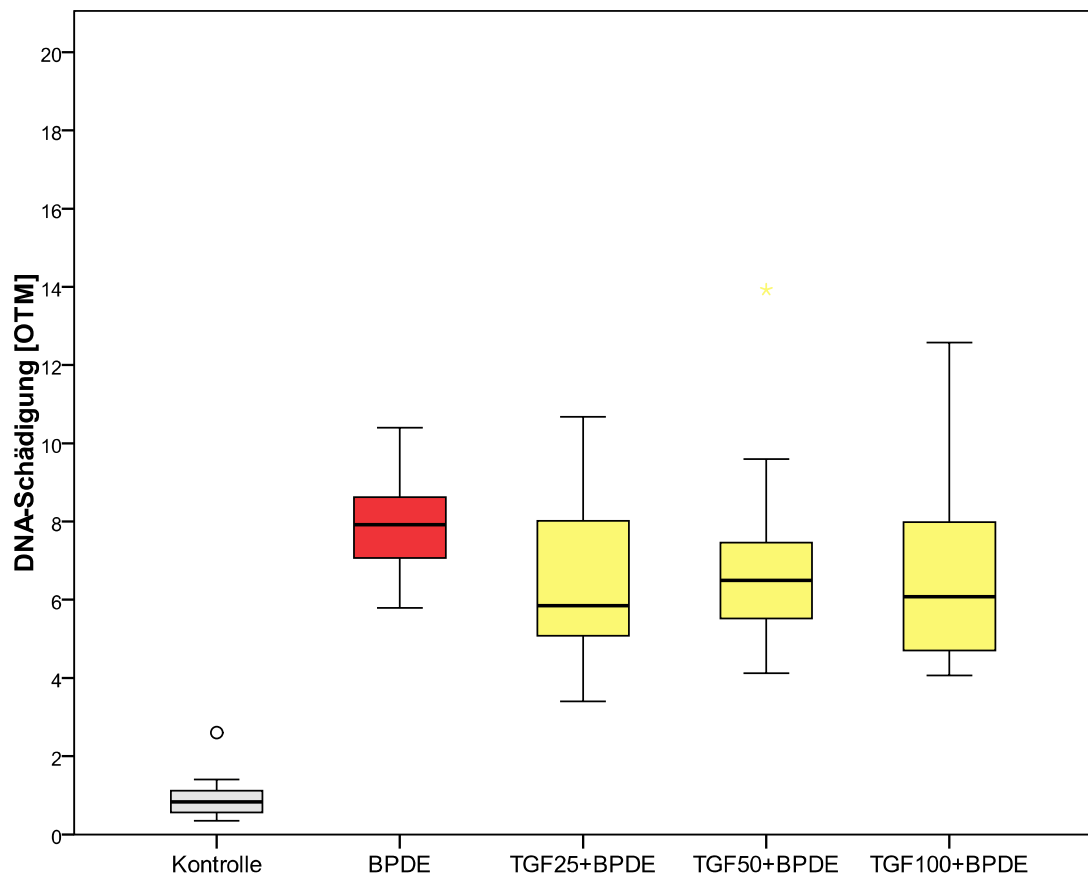


**Abb.12b:**  
Bild einer geschädigten Zelle mit einem nach rechts verlaufenden Schweif im Fluoreszenzmikroskop

Vergrößerung:  
400fach

## 4.5 Ergebnisse Vorversuch: Dosiswirkungs- kurve von TGF- $\alpha$

### 4.5.1 Ergebnisse der Nontumorgruppe Dosiswirkungskurve von TGF- $\alpha$



**Abb.13:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei Nontumor-Patienten. (n=15). Vergleich der OTM-Werte von Solventen (Kontrolle) mit BPDE, sowie BPDE unter Zugabe unterschiedlicher TGF- $\alpha$  Konzentrationen.

Abkürzungserläuterung:

Kontrolle = Dimethylsulfoxid (DMSO) + Aqua bidestillata

BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M

TGF25 = TGF- $\alpha$  25 ng/ml

TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml

TGF100 = TGF- $\alpha$  100 ng/ml

In der Kontrolle wurden die Solventen der unterschiedlichen Testsubstanzen, Aqua bidestillata und Dimethylsulfoxid (DMSO), auf ihre genotoxischen Eigenschaften getestet. Hierbei ließ sich keine relevante DNA-Fragmentierung erkennen (Mittelwert: 0,91 OTM). Im Gegensatz dazu zeigte eine Inkubation der Miniorgankulturen mit BPDE eine signifikante DNA-Schädigung gegenüber der Kontrolle (Mittelwert: 8,00 OTM).

Vergleich	p-Wert
Kontrolle vs. BPDE	< 0,001

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,007$

Eine zusätzliche Gabe von TGF- $\alpha$  zu BPDE (Mittelwerte: TGF25 = 6,52 OTM; TGF50 = 6,97 OTM; TGF100 = 6,63 OTM) ergab keinen signifikanten Unterschied zu BPDE alleine.

Vergleich	p-Wert
BPDE vs. TGF25+BPDE	0,031
BPDE vs. TGF50+BPDE	0,058
BPDE vs. TGF100+BPDE	0,022

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,007$

Des Weiteren zeigte sich keine Disparität der verschiedenen TGF- $\alpha$  Konzentrationen.

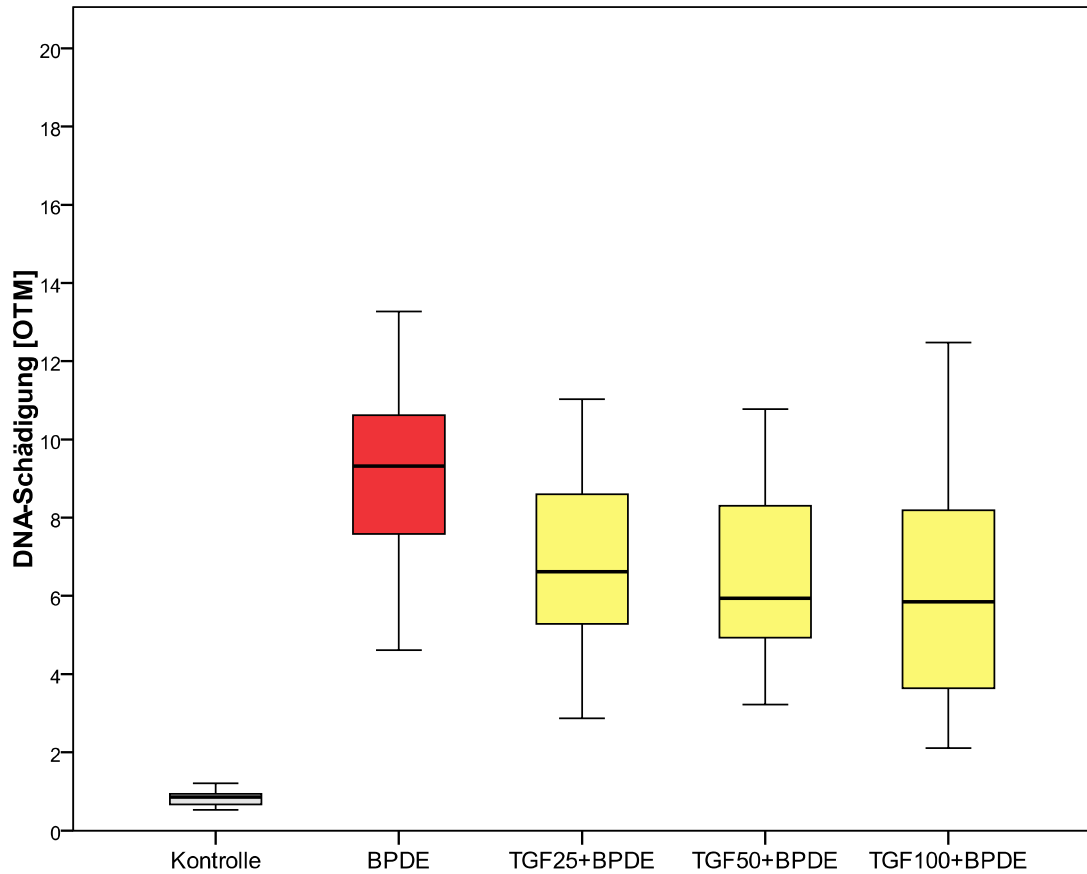
Vergleich	p-Wert
TGF100+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,685
TGF100+BPDE vs. TGF25+BPDE	0,900
TGF50+BPDE vs. TGF25+BPDE	0,466

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,007$



## 4.5.2 Ergebnisse der Karzinom-Gruppe

### Dosiswirkungskurve von TGF- $\alpha$



**Abb.14:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei tumorfreier Schleimhaut von Karzinompatienten (n=15). Vergleich der OTM-Werte von Solventen (Kontrolle) mit BPDE, sowie BPDE unter Zugabe unterschiedlicher TGF- $\alpha$  Konzentrationen.

Abkürzungserläuterung:

Kontrolle = Dimethylsulfoxid (DMSO) + Aqua bidestillata

BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M

TGF25 = TGF- $\alpha$  25 ng/ml

TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml

TGF100 = TGF- $\alpha$  100 ng/ml

In der Kontrolle der Karzinompatientengruppe konnte ebenfalls eine DNA-Fragmentierung der tumorfreien Schleimhautzellen durch die Lösemittel Aqua bidestillata und DMSO ausgeschlossen werden (Mittelwert: 0,84 OTM). Hingegen zeigte BPDE eine signifikante DNA-Schädigung (Mittelwert: 9,12 OTM) gegenüber der Kontrolle.

Vergleich	p-Wert
Kontrolle vs. BPDE	< 0,001

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,007$

Bei Zugabe von TGF- $\alpha$  kam es bei allen Konzentrationen (Mittelwerte: TGF25 = 7,01 OTM; TGF50 = 6,57 OTM; TGF100 = 6,28 OTM) zu einer Verringerung des durch BPDE induzierten DNA-Schadens.

Vergleich	p-Wert
BPDE vs. TGF25+BPDE	0,001
BPDE vs. TGF50+BPDE	< 0,001
BPDE vs. TGF100+BPDE	0,001

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,007$

Es ließ sich auch hier kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen TGF- $\alpha$  Konzentrationen feststellen.

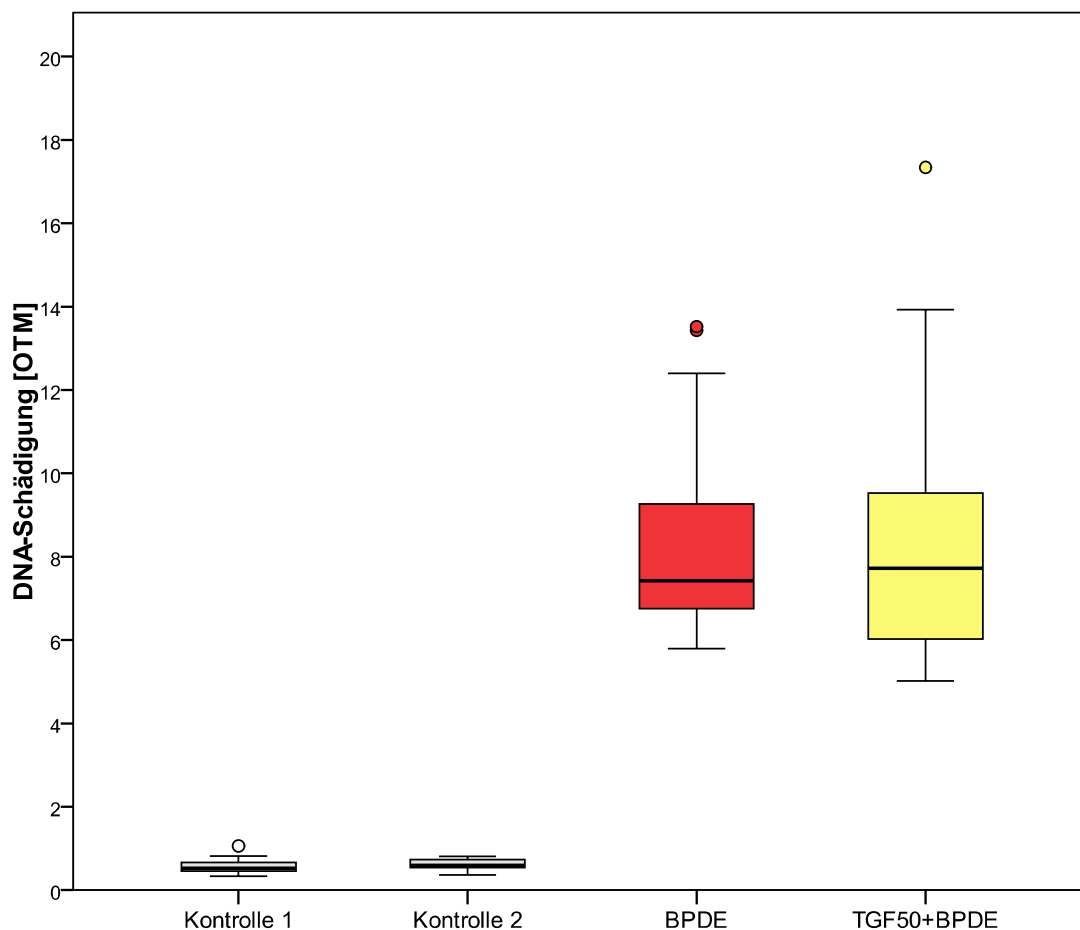
Vergleich	p-Wert
TGF100+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,709
TGF100+BPDE vs. TGF25+BPDE	0,125
TGF50+BPDE vs. TGF25+BPDE	0,409

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,007$

## 4.6 Ergebnisse Erlotinib und Cetuximab

### 4.6.1 Ergebnisse der Nontumorgruppe

#### Vergleich von BPDE und TGF- $\alpha$



**Abb.15:** Darstellung der DNA-Schädigung bei Nontumor-Patienten (n=20). Vergleich der OTM-Werte von Solventen und Testsubstanzen (Kontrollen) mit BPDE, sowie von BPDE mit der Zugabe von TGF- $\alpha$  50 ng/ml.

Abkürzungserläuterung:

Kontrolle 1 = Dimethylsulfoxid (DMSO) + Aqua bidestillata

Kontrolle 2 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml +  
 Cetuximab 10  $\mu$ g/ml +  
 Erlotinib 0,5  $\mu$ M +  
 Dimethylsulfoxid (DMSO)

BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M

TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml

Kontrolle 1 diente dem Ausschluss genotoxischer Potentiale der Testsubstanzen Aqua bidestillata und Dimethylsulfoxid (DMSO). Es konnte kein genotoxischer Effekt eruiert werden (Mittelwert: 0,59 OTM).

In der Kontrolle 2 wurden die Testsubstanzen (TGF- $\alpha$ , Cetuximab, Erlotinib) selbst auf ihre DNA-Schädigende Wirkung untersucht. Hier zeigte sich ebenfalls keine DNA-Fragmentierung der Schleimhautzellen (Mittelwert: 0,61 OTM).

In der Gegenüberstellung beider Kontrollen ergaben sich keine Differenzen.

Vergleich	p-Wert
Kontrolle 1 vs. Kontrolle 2	0,315

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Im Vergleich dazu konnte für BPDE eine hohes Maß an DNA-Schädigung nachgewiesen werden (Mittelwert: 8,05 OTM).

Vergleich	p-Wert
BPDE vs. Kontrolle 1	< 0,001
BPDE vs. Kontrolle 2	< 0,001

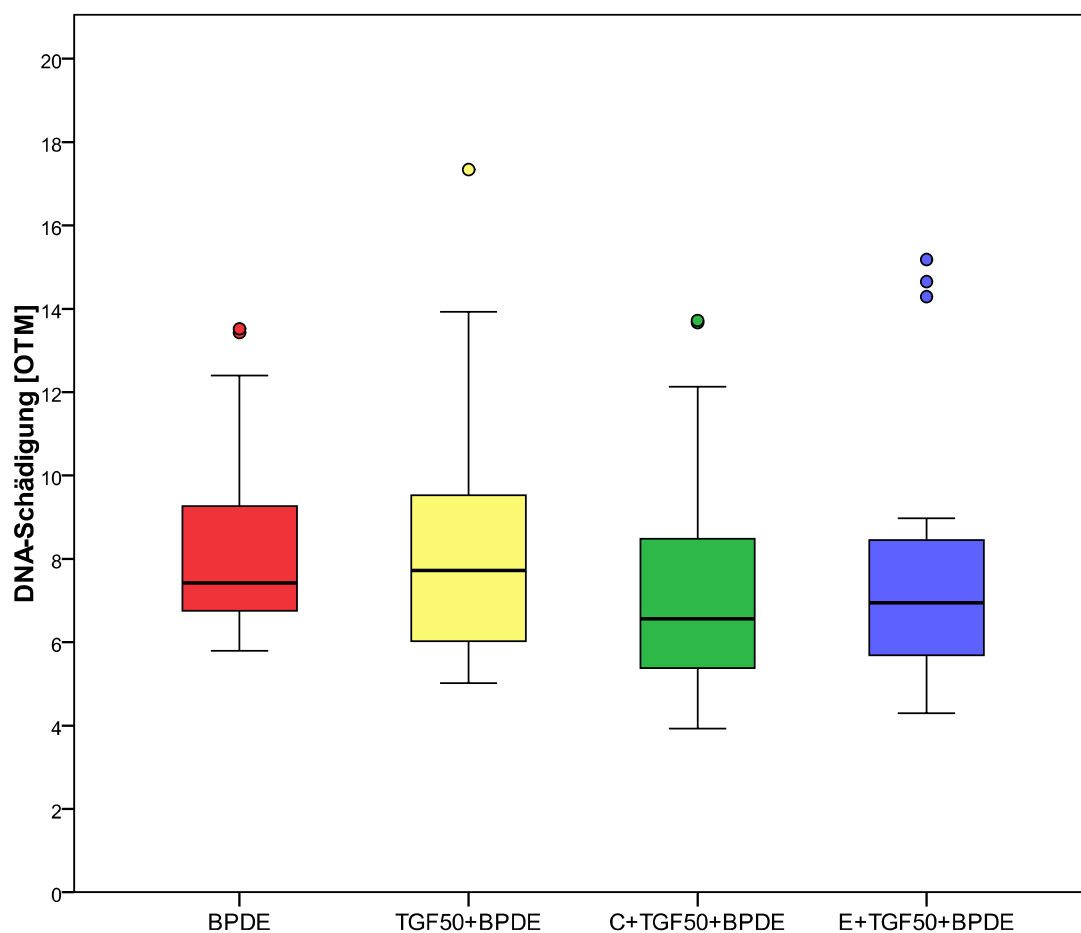
Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Ein Einfluss von TGF- $\alpha$  50 ng/ml auf die DNA-Schädigung durch BPDE ließ sich nicht nachweisen (Mittelwert: 8,63 OTM).

Vergleich	p-Wert
BPDE vs. TGF50+BPDE	0,452

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

## Vergleich von Cetuximab und Erlotinib



**Abb.16:** Darstellung der DNA-Schädigung von Nontumor-Patienten (n=20). Vergleich der OTM-Werte von TGF- $\alpha$  mit der Zugabe von je Cetuximab oder Erlotinib.

Abkürzungserläuterung:

BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M

TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml

C = Cetuximab 10  $\mu$ g/ml

E = Erlotinib 0,5  $\mu$ M

Die Zugabe von Cetuximab zu TGF50+BPDE (Mittelwert: 7,02 OTM) konnte im Vergleich mit BPDE und TGF50+BPDE keinen signifikanten Unterschied erwirken.

Vergleich	p-Wert
C+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,039
C+TGF50+BPDE vs. BPDE	0,005

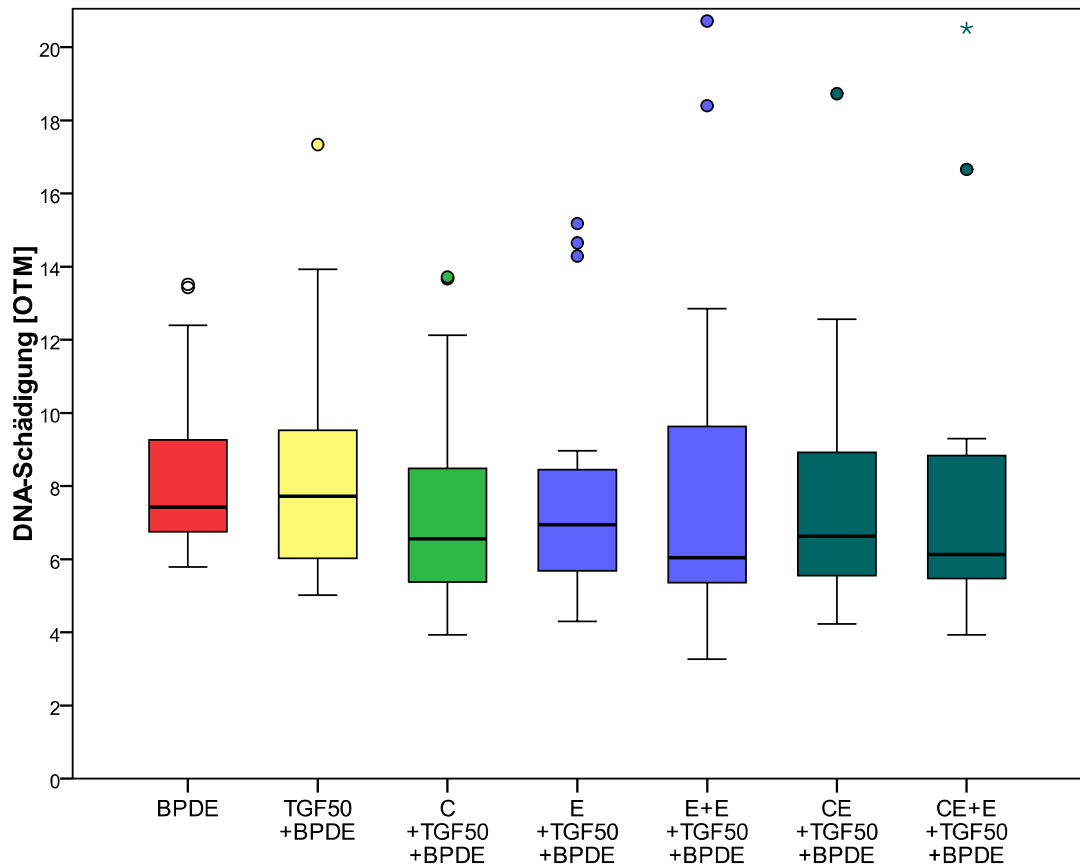
Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Die einmalige Zugabe von Erlotinib zu TGF50+BPDE (Mittelwert: 7,78 OTM) führte zu keinen signifikanten Veränderungen gegenüber BPDE oder TGF50+BPDE.

Vergleich	p-Wert
E+TGF50+BPDE vs. BPDE	0,300
E+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,107

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

## Kombination von Cetuximab mit Erlotinib



**Abb.17:** Darstellung der DNA-Schädigung von Nontumor-Patienten (n=20). Vergleich von einmaliger und zweimaliger Erlotinibgabe, sowie die Gegenüberstellung der OTM-Werte von Cetuximab/Erlotinib-Kombinationen.

Abkürzungserläuterung:

- BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M
- TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml
- C = Cetuximab 10  $\mu$ g/ml
- E = Erlotinib 0,5  $\mu$ M
- E+E = zweimalige Gabe von Erlotinib 0,5  $\mu$ M
- CE = Cetuximab 10  $\mu$ g/ml + Erlotinib 0,5  $\mu$ M

Die zweimalige Gabe von Erlotinib zu TGF50+BPDE (Mittelwert: 7,41 OTM) zeigte keinen signifikanten Unterschied zur Gabe von BPDE oder TGF50+BPDE. Im direkten Vergleich mit der einmaligen Erlotinibgabe ergab sich ebenfalls keine Signifikanz.

Vergleich	p-Wert
E+E+TGF50+BPDE vs. BPDE	0,583
E+E+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,357
E+E+TGF50+BPDE vs. E+TGF50+BPDE	0,817

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Die simultane Gabe von Cetuximab und Erlotinib (Mittelwert: 7,50 OTM) hatte keinen signifikanten Einfluss auf die DNA-Schädigung im Vergleich zu BPDE oder TGF50+BPDE. Außerdem gab es keinen Unterschied der Kombination von Cetuximab und Erlotinib im Vergleich zur DNA-Schädigung bei alleiniger Cetuximabgabe oder Erlotinib-Einzelgabe.

Vergleich	p-Wert
CE+TGF50+BPDE vs. BPDE	0,228
CE+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,081
CE+TGF50+BPDE vs. C+TGF50+BPDE	0,369
CE+TGF50+BPDE vs. E+TGF50+BPDE	0,898

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Bei gleichzeitiger Gabe von Cetuximab und Erlotinib-Zweifachgabe zu TGF50+BPDE (Mittelwert: 7,18 OTM) zeigten sich weder in Bezug auf BPDE noch auf TGF50+BPDE Signifikanzen. Auch der Vergleich mit Cetuximab alleine ergab keinen Unterschied. Gleichfalls unauffällig blieb die Gegenüberstellung mit zweimaliger Erlotinibgabe.

Vergleich	p-Wert
CE+E+TGF50+BPDE vs. BPDE	0,271
CE+E+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,163
CE+E+TGF50+BPDE vs. C+TGF50+BPDE	0,575
CE+E+TGF50+BPDE vs. E+E+TGF50+BPDE	0,475

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$



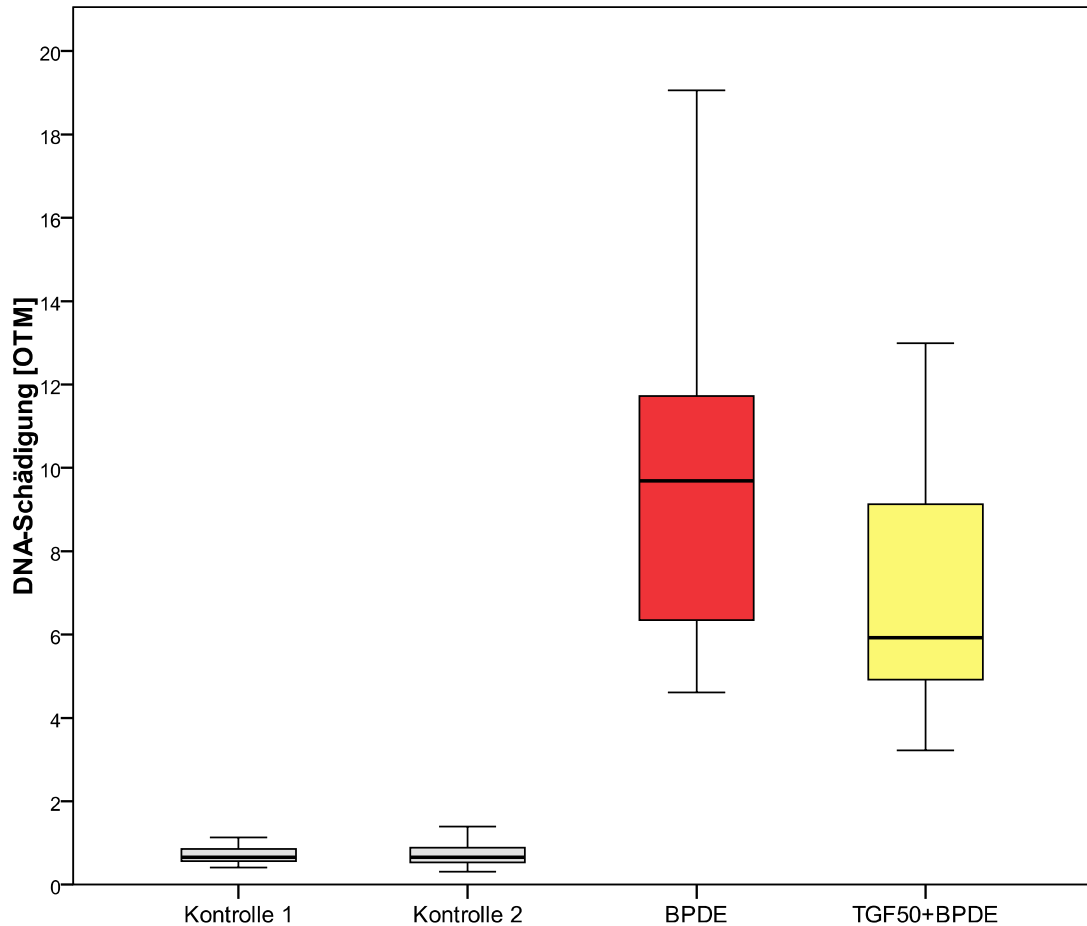
Vergleicht man die Kombinationen von Cetuximab und Erlotinib miteinander, ergeben sich keine Unterschiede zwischen der Kombination mit Erlotinib Einzelgabe und Zweifachgabe.

Vergleich	p-Wert
CE+E+TGF50+BPDE vs. CE+ TGF50+BPDE	0,867

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

## 4.6.2 Ergebnisse der Karzinom-Gruppe

### Vergleich von BPDE und TGF- $\alpha$



**Abb.18:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei tumorfreier Schleimhaut von Karzinompatienten (n=20). Vergleich der OTM-Werte von Solventen und Testsubstanzen (Kontrollen) mit BPDE, sowie von BPDE mit der Zugabe von TGF- $\alpha$  50 ng/ml.

Abkürzungserläuterung:

Kontrolle 1 = Dimethylsulfoxid (DMSO) + Aqua bidestillata

Kontrolle 2 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml +  
 Cetuximab 10  $\mu$ g/ml +  
 Erlotinib 0,5  $\mu$ M +  
 Dimethylsulfoxid (DMSO)

BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M

TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml

Wie schon in der Nontumorgruppe diente Kontrolle 1 dem Ausschluss der DNA Schädigung durch die Lösemittel Aqua bidestillata und DMSO. In Kontrolle 2 sollte die genotoxische Wirkung der Testsubstanzen TGF- $\alpha$ , Erlotinib

und Cetuximab ausgeschlossen werden. In beiden Kontrollen ließ sich keine relevante DNA-Schädigung nachweisen (Mittelwerte: Kontrolle 1 = 0,70 OTM; Kontrolle 2 = 0,71 OTM). Die Kontrollen zeigten keine Unterschiede.

Vergleich	p-Wert
Kontrolle 1 vs. Kontrolle 2	0,771

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Im Vergleich dazu konnte für BPDE eine hohes Maß an DNA-Fragmentierung festgestellt werden (Mittelwert: 9,72 OTM).

Vergleich	p-Wert
BPDE vs. Kontrolle 1	< 0,001
BPDE vs. Kontrolle 2	< 0,001

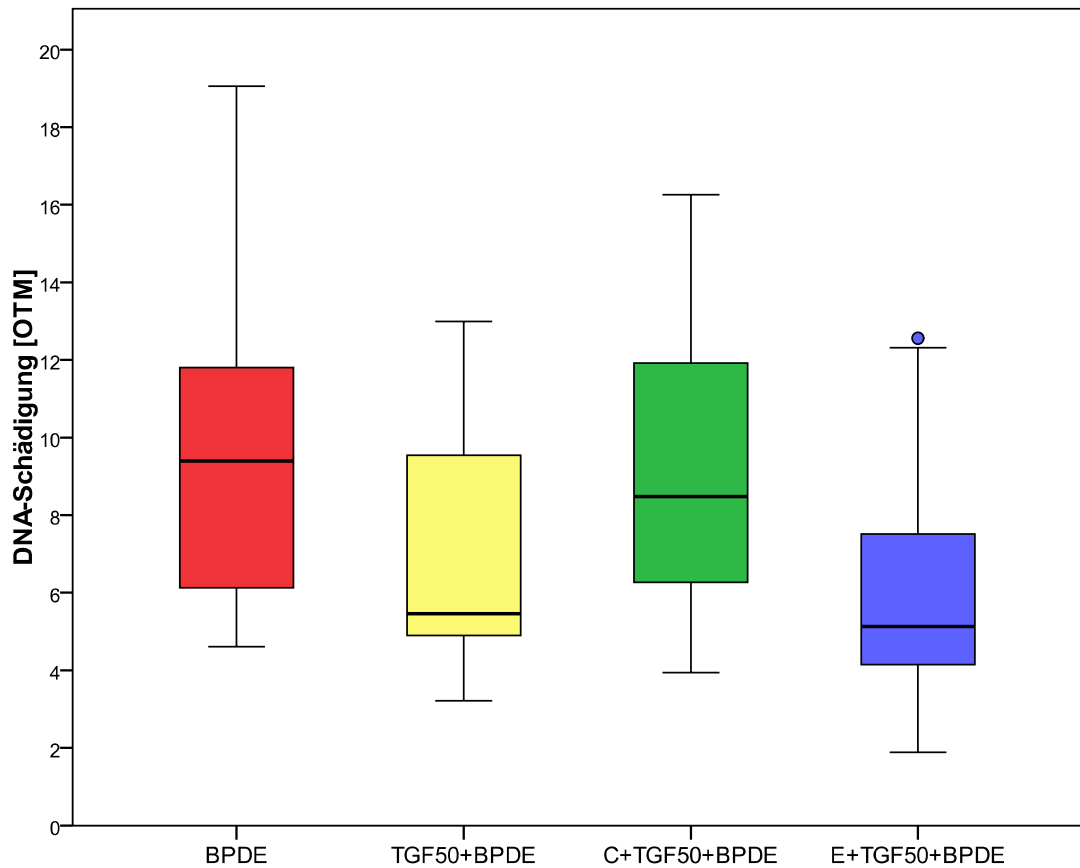
Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Die Zugabe von TGF50 zu BPDE (Mittelwert: 6,90 OTM) reduzierte den BPDE-induzierten DNA-Schaden signifikant

Vergleich	p-Wert
BPDE vs. TGF50+BPDE	< 0,001

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

## Vergleich von Cetuximab und Erlotinib



**Abb.19:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei tumorfreier Schleimhaut von Karzinompatienten (n=20). Vergleich der OTM-Werte von TGF- $\alpha$  mit der Zugabe von je Cetuximab oder Erlotinib.

Abkürzungserläuterung:

BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M

TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml

C = Cetuximab 10  $\mu$ g/ml

E = Erlotinib 0,5  $\mu$ M

Die Gabe von Cetuximab zu TGF50+BPDE (Mittelwert: 9,43 OTM) hebt den DNA-Schaden der Schleimhautzellen wieder auf das Ausgangsniveau der BPDE-Schädigung an. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Zugabe von Cetuximab zu TGF50+BPDE und der alleinigen TGF50+BPDE-Gabe. Zwischen der Gabe von BPDE und der Zugabe von Cetuximab zu TGF50+BPDE ergibt sich keine Signifikanz.

Vergleich	p-Wert
C+TGF50+BPDE vs. BPDE	0,620
C+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	< 0,001

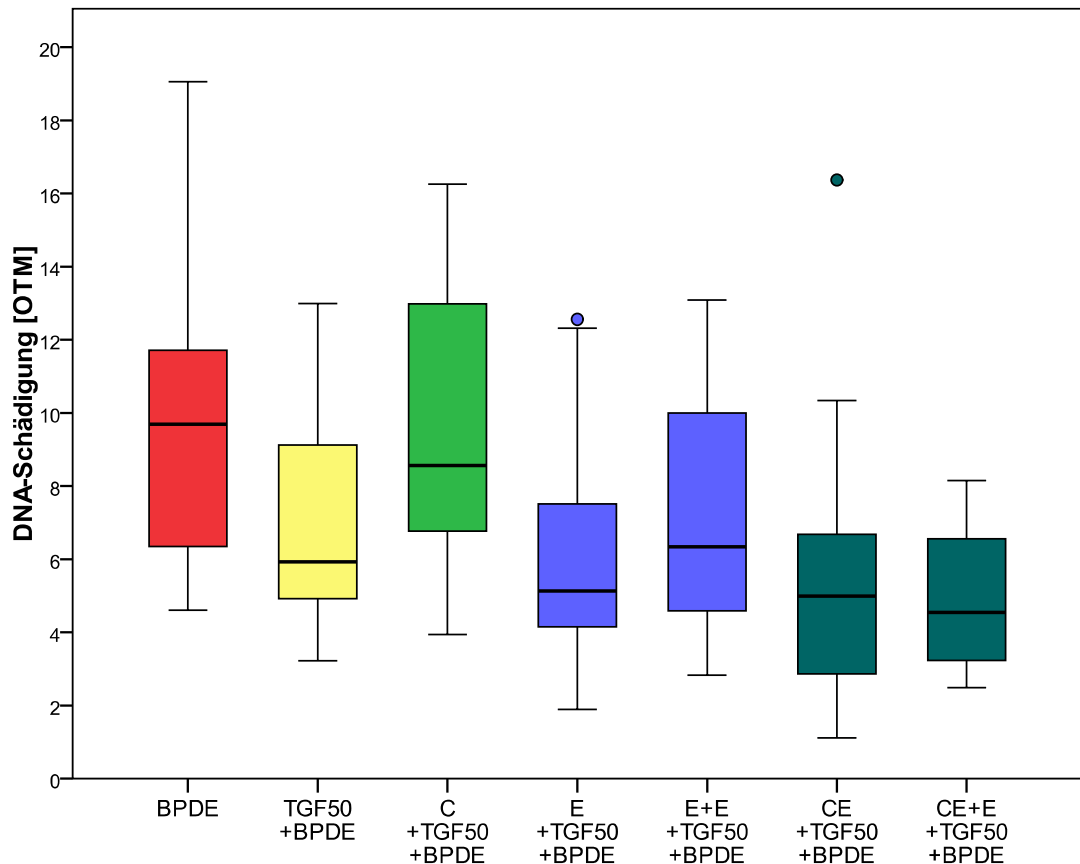
Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Die einmalige Gabe von Erlotinib zu TGF50+BPDE (Mittelwert: 5,99 OTM) zeigte keine Signifikanz gegenüber TGF50+BPDE, gleichwohl war die Schädigung signifikant niedriger als für BPDE alleine.

Vergleich	p-Wert
E+TGF50+BPDE vs. BPDE	< 0,001
E+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,122

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

## Kombination von Cetuximab mit Erlotinib



**Abb.20:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei tumorfreier Schleimhaut von Karzinompatienten (n=20). Vergleich von einmaliger und zweimaliger Erlotinibgabe, sowie die Gegenüberstellung der OTM-Werte von Cetuximab/Erlotinib-Kombinationen.

Abkürzungserläuterung:

- BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9 µM
- TGF50 = TGF-α 50 ng/ml
- C = Cetuximab 10 µg/ml
- E = Erlotinib 0,5 µM
- E+E = zweimalige Gabe von Erlotinib 0,5 µM
- CE = Cetuximab 10 µg/ml + Erlotinib 0,5 µM

Die zweimalige Gabe von Erlotinib zu TGF50+BPDE (Mittelwert: 7,31 OTM) zeigte im Vergleich mit TGF50+BPDE keinen signifikanten Unterschied. Jedoch lag auch hier, wie bei der Einmalgabe, die Schädigung unterhalb der von BPDE. In der Gegenüberstellung von einmaliger und zweimaliger Erlotinibgabe ließ sich kein Unterschied feststellen.

Vergleich	p-Wert
E+E+TGF50+BPDE vs. BPDE	0,001
E+E+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,443
E+E+TGF50+BPDE vs. E+TGF50+BPDE	0,113

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Bei gleichzeitiger Behandlung der Miniorgankulturen mit Cetuximab und Erlotinib + TGF50+BPDE (Mittelwert: 5,35 OTM) nahm sowohl gegenüber BPDE als auch gegenüber Cetuximab+TGF50+BPDE die DNA-Fragmentierung signifikant ab. Im Vergleich mit TGF50+BPDE und Erlotinib+TGF50+BPDE ergab sich kein Unterschied.

Vergleich	p-Wert
CE+TGF50+BPDE vs. BPDE	< 0,001
CE+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,011
CE+TGF50+BPDE vs. C+TGF50+BPDE	< 0,001
CE+TGF50+BPDE vs. E+TGF50+BPDE	0,107

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Bei der Gabe von Cetuximab in Kombination mit zweimaliger Erlotinibgabe und TGF50+BPDE (Mittelwert: 4,90 OTM) ließ sich zu BPDE und TGF50+BPDE eine signifikante Abnahme der DNA-Schädigung messen. Im Vergleich mit der Doppelgabe von Erlotinib alleine war der Unterschied gleichermaßen signifikant. Ebenso verglichen mit Cetuximab.

Vergleich	p-Wert
CE+E+TGF50+BPDE vs. BPDE	< 0,001
CE+E+TGF50+BPDE vs. TGF50+BPDE	0,001
CE+E+TGF50+BPDE vs. C+TGF50+BPDE	< 0,001
CE+E+TGF50+BPDE vs. E+E+TGF50+BPDE	< 0,001

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$

Zwischen den Kombinationen von Cetuximab und Erlotinib einmalig mit Cetuximab und Erlotinib zweimalig ergab sich kein Unterschied.

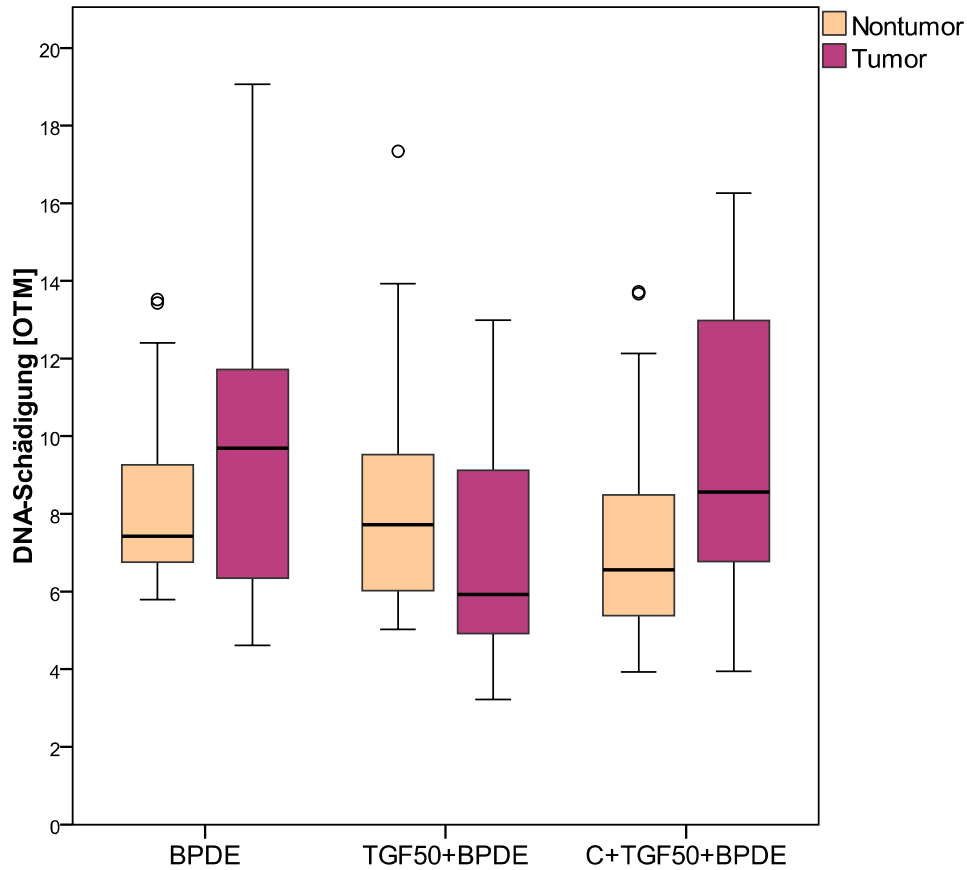
Vergleich	p-Wert
CE+TGF50+BPDE vs. CE+E+TGF50+BPDE	0,533

Lokales Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,0025$



### 4.6.3 Vergleich von Nontumor- und Karzinomgruppe

#### Vergleich von TGF- $\alpha$ und Cetuximab mit BPDE



**Abb.21:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei Nontumor-Patienten (n=20) und tumorfreier Schleimhaut von Karzinompatienten (n=20). Vergleich der OTM-Werte nach Gabe von BPDE, BPDE zuzüglich TGF- $\alpha$  50 ng/ml und nach Behandlung mit Cetuximab.

Abkürzungserläuterung:

BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M

TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml

C = Cetuximab 10  $\mu$ g/ml

Im Vergleich zwischen den OTM-Werten von gesunder Schleimhaut (Nontumorgruppe) mit tumorfreier Schleimhaut der Karzinom-Patienten ist weder zwischen der BPDE-Schädigung ein signifikanter Unterschied eruiert noch zwischen den OTM-Werten der mit TGF- $\alpha$  behandelten Miniorgankulturen.

	Nontumorgruppe [OTM]	Karzinomgruppe [OTM]
BPDE	8,05	9,72
TGF50+BPDE	8,63	6,90

Vergleich	p-Wert
BPDE (Nontumor-Patienten) vs. BPDE (Karzinom-Patienten)	0,152
TGF50+BPDE (Nontumor-Patienten) vs. TGF50+BPDE (Karzinom-Pat.)	0,079

Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$

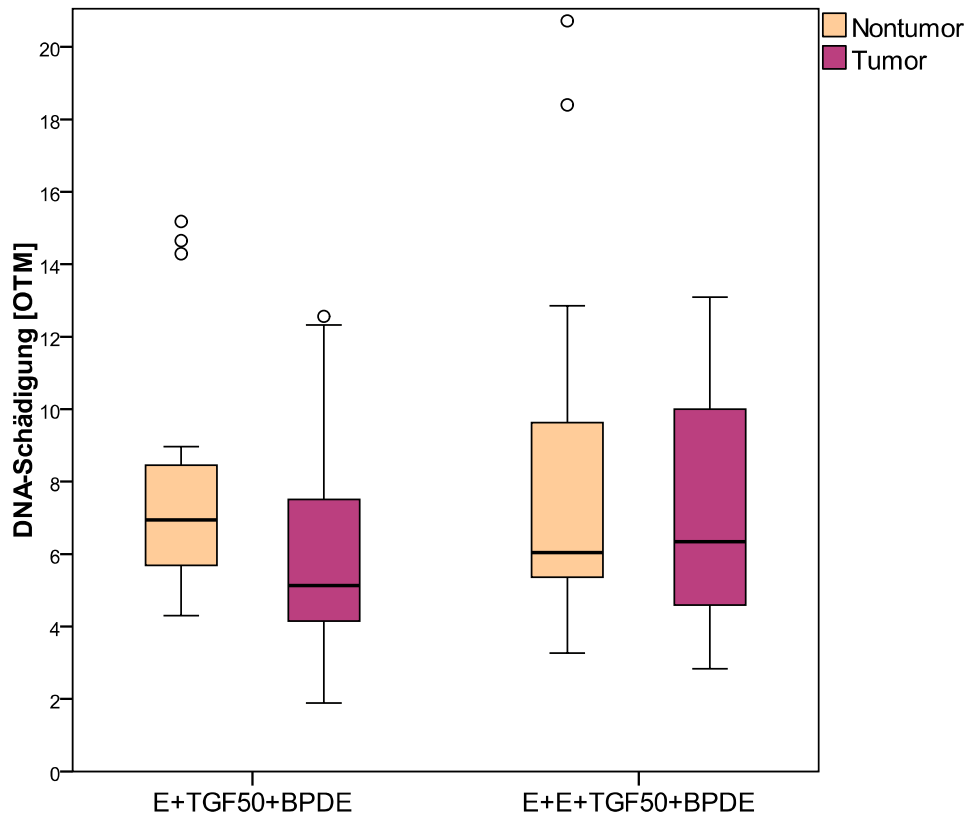
Zwischen den mit Cetuximab+TGF50+BPDE behandelten Epithelzellen der Nontumor-Patienten und der Karzinom-Patienten lässt sich ebenfalls kein Unterscheid feststellen.

	Nontumorgruppe [OTM]	Karzinomgruppe [OTM]
C+TGF50+BPDE	7,02	9,43

Vergleich	p-Wert
C+TGF50+BPDE (Nontumor-Pat.) vs. C+TGF50+BPDE (Karzinom-Pat.)	0,063

Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$

### Vergleich einmaliger mit zweimaliger Erlotinibgabe



**Abb.22:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei Nontumor-Patienten (n=20) und tumorfreier Schleimhaut von Karzinompatienten (n=20). Vergleich der OTM-Werte nach einmaliger und zweimaliger Erlotinibgabe.

Abkürzungserläuterung:

BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M

TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml

E = Erlotinib 0,5  $\mu$ M

E+E = zweimalige Gabe von Erlotinib 0,5  $\mu$ M

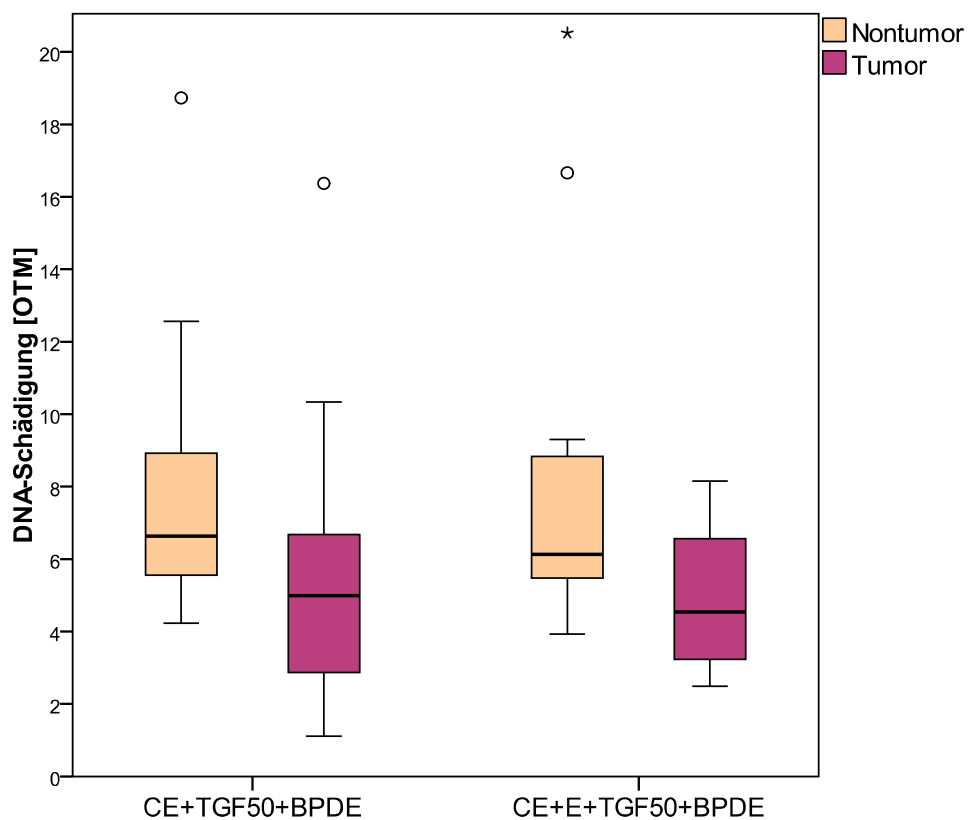
Bei der Gegenüberstellung von Nontumor-Patienten und Karzinom-Patienten ergab sich kein Unterschied der DNA-Fragmentierung weder nach einmaliger noch nach zweimaliger Erlotinibgabe.

	Nontumorgruppe [OTM]	Karzinomgruppe [OTM]
E+TGF50+BPDE	7,78	5,99
E+E+TGF50+BPDE	7,41	7,31

Vergleich	p-Wert
E+TGF50+BPDE (Nontumor-Pat.) vs. E+TGF50+BPDE (Karzinom-Pat.)	0,089
E+E+TGF50+BPDE (Nontumor-Pat.) vs. E+E+TGF50+BPDE (Karzinom-Pat.)	0,609

Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$

## Vergleich der Kombinationsbehandlung



**Abb.23:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei Nontumor-Patienten (n=20) und tumorfreier Schleimhaut von Karzinompatienten (n=20) nach kombinierter Behandlung der Zellen mit Cetuximab und Erlotinib.

Abkürzungserläuterung:

BPDE = Benzo(a)pyren-Diolepoxid (BPDE) 9  $\mu$ M

TGF50 = TGF- $\alpha$  50 ng/ml

E = Erlotinib 0,5  $\mu$ M

CE = Cetuximab 10  $\mu$ g/ml + Erlotinib 0,5  $\mu$ M

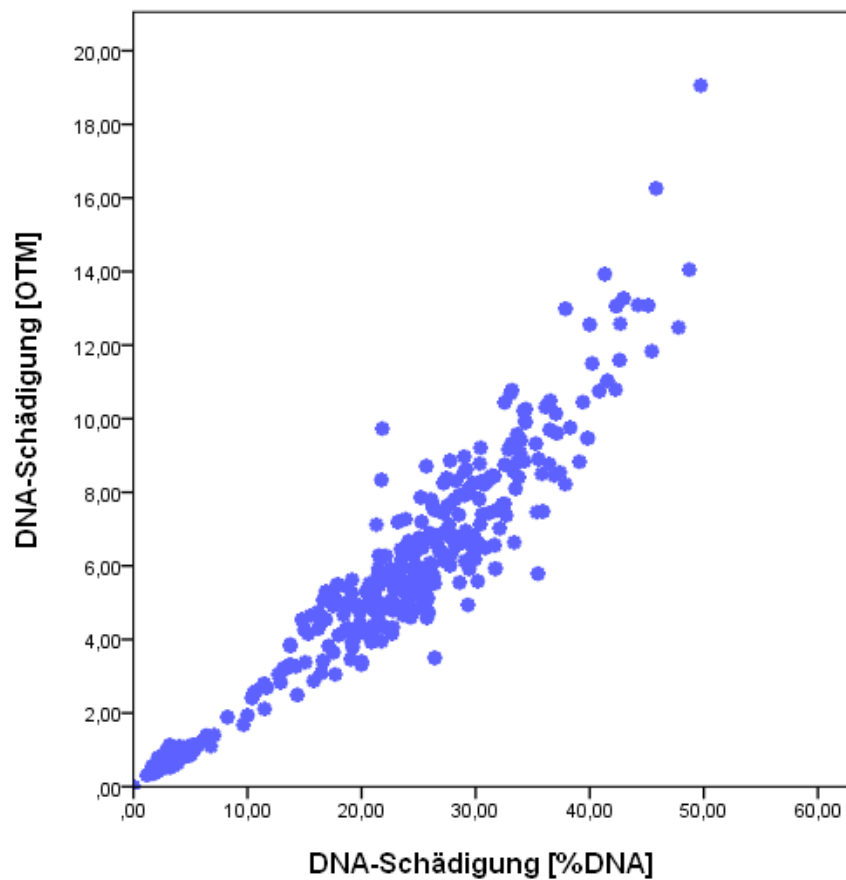
Sowohl bei der Kombinationsbehandlung mit Cetuximab- und einmaliger Erlotinibgabe als auch bei Cetuximab- und zweimaliger Erlotinibgabe lagen die OTM-Werte der Karzinom-Gruppe signifikant unter denen der Nontumorgruppe.

	Nontumorgruppe [OTM]	Karzinomgruppe [OTM]
CE+TGF50+BPDE	7,50	5,35
CE+E+TGF50+BPDE	7,18	4,90

Vergleich	p-Wert
CE+TGF50+BPDE (Nontumor-Patienten) vs. CE+TGF50+BPDE (Karzinom-Patienten)	0,040
CE+E+TGF50+BPDE (Nontumor-Patienten) vs. CE+E+TGF50+BPDE (Karzinom-Patienten)	0,009

Signifikanzniveau:  $p \leq 0,05$

## 4.7 Vergleich von OTM und %DNA



**Abb.24:** Darstellung der Korrelation zwischen den OTM-Messwerten (Y-Achse) und den %DNA-Messwerten (X-Achse)

Bei der Korrelation der OTM- und %DNA-Werte zeigte sich ein starker linearer Zusammenhang im Pearson-Test. Alle Werte korrelierten auf einem Niveau von 0,01 (2-seitig) signifikant. Ein Überblick über die absoluten Zahlen findet sich in der nachfolgenden Tabelle.

## Vergleich aller OTM und %DNA Mittelwerte

	<u>OTM</u>	<u>%DNA</u>
<b>Dosiswirkungskurve Nontumorgruppe</b>		
Kontrolle	0,91	4,36
BPDE	8,00	32,55
TGF25	6,63	25,36
TGF50	6,97	27,48
TGF100	6,52	27,33
<b>Dosiswirkungskurve Karzinomgruppe</b>		
Kontrolle	0,84	4,40
BPDE	9,12	35,69
TGF25	6,28	25,93
TGF50	6,57	26,17
TGF100	7,01	29,26
<b>Hauptversuch Nontumorgruppe</b>		
Kontrolle 1	0,59	2,71
Kontrolle 2	0,61	2,60
BPDE	8,05	32,85
TGF50+BPDE	8,63	32,81
C+TGF50+BPDE	7,02	29,19
E+TGF50+BPDE	7,78	29,88
E+E+TGF50+BPDE	7,41	29,36
CE+TGF50+BPDE	7,50	29,63
CE+E+TGF50+BPDE	7,18	29,20
<b>Hauptversuch Karzinomgruppe</b>		
Kontrolle 1	0,70	3,00
Kontrolle 2	0,71	3,09
BPDE	9,72	35,26
TGF50+BPDE	6,90	24,65
C+TGF50+BPDE	9,43	33,43
E+TGF50+BPDE	5,99	23,53
E+E+TGF50+BPDE	7,31	27,63
CE+TGF50+BPDE	5,35	19,02
CE+E+TGF50+BPDE	4,90	18,94



## 5 Diskussion

### 5.1 Auswahl der Patienten

Die in der Arbeit verwendeten Schleimhautfrischbiopsate stammten ausschließlich von Patienten, die in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München operiert wurden. Um kofaktorielle Einflüsse zu minimieren, wurden nur Patienten in die Studie eingeschlossen, die außer der zum operativen Eingriff führenden Grunderkrankung keine chronischen oder systemischen Erkrankungen aufwiesen.

Die Gewinnung oropharyngealer Schleimhaut bei tumorfreien Patienten erfolgte im Rahmen von Tonsillektomien. Dabei wurde ein kleiner den Tonsillen anliegender Randanteil der Schleimhaut für die vorliegende Arbeit verwendet. Die Entfernung der Tonsillen erfolgte entweder bei Patienten mit einem obstruktiven Schlafapnoe-Syndrom oder aufgrund chronisch-rezidivierender Tonsillitiden. Bei letztgenannten Patienten können entzündliche Veränderungen der Schleimhaut nicht ganz ausgeschlossen werden, jedoch wurde die Operation im infektfreien Intervall vorgenommen.

Aufgrund der hohen Fallzahlen von Oropharynxkarzinomen in einem Zentrum wie der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, herrscht hier ein großes Spektrum der Erkrankungsstadien vor. Für die Arbeit wurden Patienten ausgewählt, deren Erkrankung erstdiagnostiziert wurde und die noch keine onkologische Therapie erhalten hatten. Bei der Gewinnung der Biopsate wurde ein möglichst tumorfernes Gewebestück am Resektionsrand entnommen und anschließend die R0-Resektion histopathologisch gesichert.

Die Schleimhaut des Oropharynx stellt insbesondere deshalb ein interessantes Gewebe für diese Arbeit dar, weil viele Umweltschadstoffe und Tabakkarzinogene, wie das hier verwendete BPDE, primär den oberen Anteil des Aerodigestivtraktes in hoher Konzentration passieren, bevor sie in den Kör-

per eindringen können. Zusätzlich ist für Oropharynxkarzinome im Gegensatz zu Larynxkarzinomen ein hohes Maß an EGFR-Überexpression nachgewiesen worden, daher erschienen diese als geeignete Test-Entität.<sup>199</sup>

## 5.2 BPDE

In der vorliegenden Arbeit wurde (anti)Benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid (BPDE) als schädigendes Agens zur Fragmentierung der DNA eingesetzt. Es entsteht im menschlichen Körper in zwei Schritten durch Umwandlung mittels Cytochrom P450-abhängigen Polyoxxygenasen aus Benzo[a]pyren (B[a]P), dem bekanntesten Vertreter polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe (PAH).<sup>113, 114, 154, 193</sup> PAHs sind ubiquitär vorkommende, organische Verbindungen, die bei der Pyrolyse von Tabak, Holz und fossilen Brennstoffen, aber auch bei der Zubereitung von Nahrungsmitteln entstehen.<sup>98, 144, 192, 193</sup> Sie werden durch Inhalation und Ingestion in den Körper aufgenommen, und bergen aufgrund ihres kanzerogenen Potentials eine große Gefahr für den oberen Aerodigestivtrakt als primäre Kontaktstelle.<sup>37, 211</sup> Das von der International Agency for Research on Cancer der WHO (IARC) 2007 in die Gruppe 1 eingestufte und damit als sicher kanzerogen geltende BPDE verursacht über kovalente Bindung sogenannte DNA-Addukte.<sup>87</sup> Diese stören die Replikation und Transkription und führen zu alkalilabilen Stellen, Strangbrüchen und Mutationen.<sup>2, 109, 169, 187, 221</sup> Mit dem Comet Assay lassen sich solche DNA-Fragmentierungen nachweisen. Hanelt et al. konnten an Fibroblasten demonstrieren, dass die Konzentration von BPDE positiv mit der Migrationsstrecke der DNA im Comet Assay korreliert.<sup>68</sup> Ebenso konnte an humanen Miniorgankulturen des Nasopharynx eine durch BPDE verursachte DNA-Schädigung im Comet Assay bestätigt werden.<sup>210</sup>

## 5.3 Auswahl der Messmethode

Für den Comet Assay stehen verschiedene Parameter zur Quantifizierung der DNA-Schädigung zur Verfügung. Bisher gibt es nur wenige Studien, die diese Messmethoden miteinander vergleichen. In unserer Studie stellten wir die zwei gebräuchlichsten Analyseverfahren, den Olive tail moment (OTM) und den prozentualen DNA-Anteil im Schweif (%tail DNA, hier %DNA genannt) gegenüber.<sup>168</sup> Der OTM ist die relative Fluoreszenzdichte des Schweifes multipliziert mit der durchschnittlichen Wanderungsstrecke der DNA.<sup>141, 142</sup> Somit fließt der Parameter %DNA in die Messgröße OTM ein.<sup>194</sup> OTM ist ein sensiblerer Parameter um Abweichungen in der Schädigung festzustellen. Er ist daher aber auch anfälliger für Störungen.<sup>168</sup> Verschiedene Studien zeigen, dass OTM und %DNA eng miteinander korrelieren und keine unterschiedlichen Ergebnisse liefern. OTM und %DNA werden somit als gleichwertige Messparameter angesehen.<sup>194</sup> Einige Arbeitsgruppen befinden %DNA für leichter interpretierbar und anschaulicher, da es sich um eine definierte Skala von 0-100 % handelt, der OTM jedoch nicht in fassbaren Einheiten gemessen wird.<sup>101, 194, 112</sup> Weitere Vorteile von %DNA sind die Unabhängigkeit von den Programmeinstellungen des Messprogramms und die direkte Vergleichbarkeit verschiedener Studien.<sup>32, 112</sup> Lee und Steinert vertreten die Ansicht, dass man immer beide Parameter auswerten sollte.<sup>105</sup> Lovell und Omori beschreiben in ihrer Arbeit die Schwierigkeit der statistischen Analyse von %DNA-Daten. Sie geben zu bedenken, dass parametrische Tests zwar eine größere Power haben als ihre nicht-parametrischen Äquivalente, aber sie weisen potentiell auch eine höhere Alphafehlerrate auf.<sup>112</sup> Die Anwendung von nichtparametrischen Tests (Wilcoxon- und Man-Whitney-U-Test) bei den hier vorliegenden Daten zeigte allerdings keinerlei Unterschied im Vergleich mit der Auswertung mittels parametrischer Tests (T-Test).

In der hier vorliegenden Arbeit korrelierten OTM und %DNA ebenfalls miteinander (Abb.24). Jedoch ergaben sich im Vergleich der Testgruppen, die in %DNA gemessen wurden zum Teil Signifikanzen sowohl im T-Test als auch

in den nichtparametrischen Tests, die sich bei der Berechnung mit OTM-Werten nicht bestätigten. Auch nach logarithmischer Transformation der %DNA-Daten, wie es von Lovell et Omori empfohlen wird, blieben die Signifikanzen in den Tests bestehen.<sup>112</sup> Eine Ursache für dieses Phänomen könnte in den niedrigen %DNA-Werten der hier vorliegenden Arbeit liegen. Collins et al. schlagen vor, dass die Kontrollzellen eine Schädigung von 10 – 20 %DNA haben sollten, um statistische Probleme zu vermeiden.<sup>32</sup>

Um einem Alphafehler zu begegnen, also die Nullhypothese (es besteht kein Zusammenhang zwischen den Gruppen) fälschlicherweise zu verwerfen, fiel die Entscheidung die Auswertung in OTM vorzunehmen.

## 5.4 Statistische Tests

Als statistische Testverfahren wurden der verbundene und der unverbundene T-Test herangezogen. Überprüft wurde die Normalverteilung der Werte, die als Bedingung für den T-Test vorausgesetzt wird, mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test. Mittels Bonferroni-Holm-Korrektur wurde für jede Testung ein lokales Signifikanzniveau definiert. Damit konnte man einer Alphafehlerkumulation bei multiplen Tests, in denen es mehrere Nullhypothesen gibt, entgegen und verhindern, dass Nullhypothesen verworfen werden, obwohl sie wahr sind. Zum Vergleich der OTM- und %DNA-Werte diente die Pearsonkorrelation.

## 5.5 Therapeutische Bedeutung von Cetuximab und Erlotinib

Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der den EGFR und seine nachgeschalteten Signalwege hemmt. Dies führt unter anderem zu einer Hemmung von Zellwachstum und –proliferation, sowie zu einer Unterdrückung der Neoangiogenese.<sup>82, 150, 151</sup>

Therapeutisch wird Cetuximab aufgrund seiner langen Halbwertszeit von 144 Stunden einmal wöchentlich als Infusionslösung gegeben.<sup>43, 47</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde Cetuximab daher als Einmalgabe 48 Stunden vor der Schädigung mit BPDE verabreicht.

Erlotinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der die intrazelluläre Tyrosinkinaseaktivität des EGFR hemmt und damit die Signaltransduktion des EGFR unterbindet.<sup>220</sup> Es wird vor allem bei therapieresistenten Tumorerkrankungen eingesetzt.<sup>44, 48</sup> Als oral verfügbares Medikament mit einer Halbwertszeit von 36 Stunden wird Erlotinib täglich in Tablettenform verabreicht.<sup>44, 48</sup>

Um dieser klinischen Situation gerecht zu werden, wurde Erlotinib in der hier vorliegenden Arbeit 24 Stunden bei einmaliger Gabe, bzw. 48 und 24 Stunden bei zweimaliger Verabreichung, vor der BPDE-Inkubation verabreicht. Die Mehrfachgabe sollte über eine mögliche Kumulierung der Wirkung Aufschluss geben.

## 5.6 Diskussion der Ergebnisse

### 5.6.1 DNA-fragmentierende Wirkung von BPDE

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA tumorfreier Schleimhaut von Oropharynxkarzinom-Patienten und Nontumor-Patienten mittels Comet Assays untersucht. Im Vorversuch wurde anhand einer Dosiswirkungskurve eine geeignete TGF- $\alpha$ -Konzentration ermittelt. Der zweite Versuchsaufbau stellt den Hauptteil dieser Arbeit dar.

Die DNA-Fragmentierung durch BPDE war in beiden Gruppen (Tumor und Nontumor) des Vorversuches und des Hauptexperimentes gleich (siehe Abb.:13, 14, 15, 18 und 21). Damit konnten die Ergebnisse anderer Studien bezüglich der genotoxischen Wirkung auf Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes gestützt werden.<sup>72, 73, 96</sup>

### 5.6.2 Diskussion der Dosiswirkungskurve von TGF- $\alpha$

Der erste Versuch dieser Arbeit diente der Findung einer idealen Konzentration von TGF- $\alpha$ . Es wurde tumorfreie Schleimhaut von Patienten mit einem Oropharynxkarzinom und Oropharynx-Schleimhaut von tumorfreien Patienten verwendet. Durch die Zugabe von TGF- $\alpha$  vor der Schädigung durch BPDE ließ sich in der Karzinomgruppe der Schaden verringern (Abb.14), hingegen blieb dieser in der Nontumorgruppe unverändert (Abb.13). Dies bestätigten die Ergebnisse bereits vorangegangener Studien.<sup>12</sup> Zwischen den verschiedenen Konzentrationen von TGF- $\alpha$  ließ sich kein signifikanter Unterschied eruieren. In der Literatur finden sich sehr heterogene Angaben über verwendete TGF- $\alpha$ -Konzentrationen von 50 pg/ml bis zu 10  $\mu$ g/ml.<sup>205, 212</sup> Maquardt et al. isolierten 10 pg/ml TGF- $\alpha$  mittels HPLC aus Melanomzelllinien.<sup>123</sup> Daher erschien uns eine eher niedrige TGF- $\alpha$  Dosis für angemessen. Pike et al. konnten zeigen, dass eine Dosis von 50 ng/ml TGF ausreichend ist, um 50% der EGF-Rezeptoren in einer 6-8  $\mu$ g Membranprotein enthaltenden Lösung von A431-Zellen zu besetzen.<sup>157</sup>

Yu et al. untersuchten den TGF- $\alpha$  Serumspiegel bei Patienten mit Nasopharynxkarzinomen in einem 5-Jahres follow-up vor, während und nach Strahlentherapie. Vor der Therapie lag der TGF- $\alpha$ -Spiegel im Durchschnitt bei 36,6 ng/ml. Bei Patienten, die nach der Therapie ein Rezidiv entwickelten, bzw. an der Karzinomkrankung starben, lag die TGF- $\alpha$ -Konzentration bei 48,2. bzw. 50,2 ng/ml. Deshalb wurde eine Konzentration von 50 ng/ml im vorliegenden Modell der Miniorgankulturen gewählt, um einen möglichst in vivo-nahen Versuchsaufbau zu gestalten.<sup>227</sup>

### **5.6.3 Diskussion über den Einfluss von TGF- $\alpha$ , Cetuximab und Erlotinib**

#### **Der Einfluss von TGF- $\alpha$ auf die BPDE-induzierte DNA-Fragmentierung**

Wie schon im Vorversuch ließ sich durch vorherige Stimulation der Miniorgankulturen mittels TGF- $\alpha$  die BPDE-induzierte DNA-Fragmentierung in der Tumorgruppe verringern (Abb.18), wohingegen es auf die Nontumorgruppe keinen Einfluss hatte (Abb.15). Dies bestätigt die Ergebnisse von Baumeister et al., dass TGF- $\alpha$  eine Erhöhung der Resistenz tumorfreier Mukosa von Karzinompatienten gegenüber BPDE herbeiführt.<sup>12</sup>

Da in der Nontumorgruppe durch TGF- $\alpha$  kein Effekt auf die BPDE-Schädigung hervorgerufen wird (Abb.15), lässt sich eine direkte Interaktion zwischen TGF- $\alpha$  und BPDE ausschließen.

Grandis und Twardy zeigten, dass sowohl der EGFR als auch TGF- $\alpha$  in normaler Mukosa von Hals-Kopf-Karzinom-Patienten hoch exprimiert sind.<sup>62</sup> Dadurch ließe sich der Einfluss von TGF- $\alpha$  auf die hier vorliegende tumorfreie Schleimhaut von Karzinompatienten erklären. Die Verringerung des durch BPDE verursachten Schadens könnte auf zwei Mechanismen beruhen, welche beide durch den EGFR beeinflusst werden. Zum Einen besteht die Möglichkeit der Glutathion(GSH)-Konjugation von BPDE.<sup>87</sup> Pandur et al.

zeigten, dass eine Aktivierung des EGFR-nachgeschalteten Proteins Ras zu einer Erhöhung der Gamma-Glutamyltransferase führt, einem Schlüsselenzym des Gutathion-Stoffwechsels und somit eine vermehrte GSH-Konjugation vorliegen könnte.<sup>149</sup> Hierzu ist die Studienlage sehr kontrovers. Auf der einen Seite zeigten Studien, dass der Abbau von BPDE über die Konjugation mit GSH eher eine untergeordnete Rolle spielt und die Akkumulation von GSH-konjugiertem BPDE sogar zu einer Erhöhung der DNA-Addukte führt.<sup>208 195</sup> Auf der anderen Seite fanden Le Blanc et al. heraus, dass eine Blockade der GSH-Synthese verantwortlich für ein erhöhtes Maß an BPDE-DNA-Addukten ist.<sup>103</sup>

Die zweite Möglichkeit der BPDE-Metabolisierung stellt die Eliminierung durch Multi-Drug-Resistance-Proteine (MDRP) dar. Hierbei stehen zwei Proteine im Vordergrund – das P-Glykoprotein und das Resistance-associated protein-2 (MRP2).<sup>50</sup> Benzo[a]pyren ist ein Substrat des P-Glykoproteins,<sup>226</sup> wohingegen GSH-konjugiertes BPDE durch MRP2 eliminiert wird.<sup>195</sup> Der Metabolismus unkonjugiertem BPDEs verbleibt unklar. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass BPDE durch das P-Glykoprotein aus der Zelle entfernt wird. Myllynen et al. zeigten, dass es nach Inhibition des P-Glykoproteins zu einem massiven Anstieg der BPDE-DNA-Addukte in der Zelle kam.<sup>132</sup> In Studien ließ sich vielfach erkennen, dass der EGFR einen großen Einfluss auf die Resistenzentwicklung gegenüber tumorwirksamer Medikamente mittels MDR-Proteine hat.<sup>183</sup> So werden Medikamente, die am EGFR wirken, wie Cetuximab und Erlotinib vor allem wegen ihres positiven Einflusses auf die Chemosensitivität eingesetzt.<sup>9, 46, 79, 186, 209, 215</sup>

Die in dieser Arbeit festgestellte Minderung der BPDE-bedingten DNA-Fragmentierung durch TGF- $\alpha$  könnte demnach eine erworbene Eigenschaft der Zellen zur Protektion vor dauerhafter, kanzerogener Einwirkung darstellen. Da dieses Verhalten in der vorliegenden Arbeit nur bei gesunder Schleimhaut von Oropharynxkarzions-Patienten beobachtet werden konnte und nicht in der Nontumorgruppe, stützt dies zudem die Theorie der Feldkanzerogenese.



### **Der Einfluss von Cetuximab auf die Chemosensibilität der Miniorgankulturen**

In dieser Studie hatte die Gabe von Cetuximab (Abb.16), wie auch die Gabe von TGF- $\alpha$  (Abb.15 und 16) bei der Nontumorgruppe keinen signifikanten Einfluss auf die von BPDE induzierte DNA-Fragmentierung.

Hingegen ließ sich bei den Karzinompatienten der durch TGF- $\alpha$  hervorgerufenen Effekt auf die BPDE-Schädigung durch Cetuximab-Zugabe nicht mehr nachweisen. Die DNA-Fragmentierung wurde wieder auf das Ausgangsniveau der BPDE-Schädigung angehoben (Abb.19). Cetuximab bindet als monoklonaler Antikörper spezifisch an die Ligandenbindungsstelle des EGFR.<sup>47, 108</sup> Dies zeigt, dass der Effekt von TGF- $\alpha$  über EGFR-spezifische Mechanismen gesteuert wird.<sup>76, 81</sup>

In zahlreichen experimentellen und klinischen Studien wurde belegt, dass Cetuximab eine Erhöhung der Sensibilität maligner Zeller gegenüber einer (Radio-)Chemotherapie erhöht.<sup>9, 16, 79, 209</sup> In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Cetuximab zwar nicht die Sensibilität der Mukosa gegenüber BPDE erhöht, jedoch die verminderte Sensibilität im Falle von TGF- $\alpha$  aufhebt.

### **Der Einfluss von Erlotinib**

In der vorliegenden Arbeit zeigte Erlotinib keinen Einfluss auf die Miniorgankulturen der Nontumorgruppe (Abb. 16 und 17). Eine Wirkung auf tumorfreie Schleimhaut von Karzinompatienten ließ sich hingegen belegen. Es zeigte sich kein Unterschied zwischen der Einfachgabe und der Zweifachgabe von Erlotinib (Abb 20). Die DNA-Fragmentierung durch BPDE wurde bei gleichzeitiger Gabe von TGF- $\alpha$  und Erlotinib (einfach und zweifach Gabe) signifikant reduziert (Abb.20). Hingegen zeigte die Zugabe von Erlotinib zu TGF- $\alpha$  keinen signifikanten Unterschied zu TGF- $\alpha$  alleine (Abb.20).

Die Erwartung, dass auch Erlotinib, wie Cetuximab, den durch TGF- $\alpha$  reduzierten Schaden antagonisiert und wieder auf das Ausgangsniveau der alleinigen BPDE-Schädigung anhebt, bestätigte sich nicht. Das kann auf der ei-

nen Seite bedeuten, dass Erlotinib keinen messbaren Einfluss auf die Miniorgankulturen nimmt und das Ergebnis die Wirkung von TGF- $\alpha$  widerspiegelt. Eine andere mögliche Erklärung für diese Beobachtung kann der Einfluss des P-Glykoprotein auf Erlotinib und BPDE sein.

Erlotinib ist, wie auch Benz[a]pyren, ein Substrat des P-Glykoprotein.<sup>44</sup> Es kann durch Inhibition des P-Glykoprotein in der Zelle akkumulieren.<sup>122</sup> Für den aktiven Erlotinib-Metaboliten OSI 420 konnte eine Konzentrationsabnahme in P-Glykoprotein-überexprimierenden Zellen gezeigt werden.<sup>42</sup> Zusätzlich kann Erlotinib über Inhibition der EGFR-Tyrosinkinase die Aktivität des P-Glykoprotein steuern.<sup>182, 183</sup> Allerdings ist dieser Einfluss abhängig vom Substrat der Effluxpumpe. So zeigten Nogucchi et al., dass Erlotinib die P-Glykoprotein-vermittelte Resistenz gegenüber Vincristin und Paclitaxel unterdrückt, hingegen die von Mitoxantron und Doxorubicin nicht tangiert.<sup>135</sup> Geht man davon aus, dass BPDE zu den Substraten des P-Glykoprotein gehört, auf die Erlotinib keinen Einfluss nimmt, so könnte auch ein vermehrter BPDE-Abfluss aus der Zelle Ursache des reduzierten DNA-Schadens sein. Daneben könnte aber auch TGF- $\alpha$  Einfluss auf die nicht von Erlotinib blockierten EGFR-Rezeptoren nehmen und über die Induktion / Aktivierung des P-Glykoprotein nicht nur eine Konzentrationsminderung des BPDE, sondern auch von Erlotinib hervorrufen.<sup>222</sup>

Um die intrazelluläre Domäne des EGFR zu erreichen, muss Erlotinib erst durch die Zellmembran diffundieren.<sup>148, 162, 188</sup> Daher könnte man einen schnelleren und effizienteren Wirkeintritt des TGF- $\alpha$ , auf Grund seines extrazellulären Angriffspunktes am EGFR mutmaßen.<sup>56</sup> Da aber bei der zweimaligen Erlotinibgabe, die erste Dosis 24 Stunden vor der TGF- $\alpha$  -Gabe verabreicht und dennoch kein signifikanter Unterschied erzielt wurde, ist somit ein zeitlicher Faktor zugunsten von TGF- $\alpha$  unwahrscheinlich.

### **Die Kombination von Cetuximab und Erlotinib**

In der vorliegenden Arbeit hatte die Kombination von Cetuximab und Erlotinib mit TGF- $\alpha$  in der Nontumorgruppe keinen erkennbaren Einfluss auf die BPDE-Schädigung (Abb.17). Hingegen verringerte sie in der Karzinomgruppe den durch BPDE verursachten DNA-Schaden signifikant (Abb.20). Im Vergleich mit TGF- $\alpha$  alleine zeigte die Kombination von Cetuximab mit einmaliger Erlotinibgabe und TGF- $\alpha$  keinen Unterschied (Abb.20). Jedoch kam es zu einer signifikanten Abnahme der Schädigung bei zweimaliger Erlotinibgabe in Kombination mit Cetuximab und TGF- $\alpha$  (Abb.20).

Wie bereits für die Zugabe von Erlotinib zu TGF- $\alpha$  beschrieben, könnte der Einfluss von TGF- $\alpha$  und Erlotinib auf das P-Glykoprotein auch bei der Kombination mit Cetuximab eine große Rolle spielen. Da alle drei Substanzen in der Nontumorgruppe keinen Einfluss auf die BPDE-Schädigung haben (Abb.17), kann eine Interaktion der Stoffe untereinander ausgeschlossen werden. Es bleibt die Frage, warum die Doppelgabe von Erlotinib zu Cetuximab und TGF- $\alpha$  den BPDE-induzierten DNA-Schaden verringert (Abb.20), wohingegen die alleinige Cetuximab Gabe zu TGF- $\alpha$  den Schaden im Vergleich zu TGF- $\alpha$  alleine erhöhte (Abb.19). Eine genaue Analyse dieser Beobachtung ist mit dem heutigen Wissensstand nicht möglich und es sind weitere Studien nötig, um den Wirkmechanismus von Cetuximab, Erlotinib und TGF- $\alpha$  auf genotoxische Substanzen zu verstehen.

Janjigian et al. veröffentlichten kürzlich eine klinische Studie, in der erstmals Cetuximab und Erlotinib bei Patienten mit Adenokarzinom der Lunge kombiniert wurden. Bisweilen zeigte sich auch hier kein Vorteil für die Patienten.<sup>90</sup> Andere Studien, die jedoch weder an Patienten noch an tumorfreier Schleimhaut von Tumorpatienten, sondern ausschließlich an Tumorzelllinien (in vitro und an Xenografts) durchgeführt wurden, zeigten bei der Kombinationen von EGFR-Antikörpern mit Tyrosinkinaseinhibitoren gegenteilige Ergebnisse. Eine Kombination der Medikamente wies in diesen Studien eine vermehrte Wachstumshemmung, verminderte nachgeschaltete EGFR-Aktivität und höhere Tumorregression auf, als die alleinige Gabe der jeweiligen Substanz.<sup>80.</sup>

<sup>126, 198</sup> In diesen Studien wurde allerdings nicht die Auswirkung der EGFR-hemmenden Medikamente auf den genotoxischen Effekt von Zytostatika - oder Tabakkarzinogenen untersucht. Die o.g. Studien lassen außerdem weitere Unterschiede zu der vorliegenden Arbeit erkennen. Zum einen sind alle o.g. Studien an Tumorzellen durchgeführt worden. Der Einfluss von Cetuximab und Erlotinib auf tumorfreie Schleimhaut von Karzinompatienten wurde bisher nicht untersucht. Zum anderen wurden alle Studien ohne den Zusatz von TGF- $\alpha$  durchgeführt. TGF- $\alpha$  scheint aber essentiellen Einfluss auf die Pathogenese von Kopf-Hals-Karzinomen zu haben. Wie bereits erwähnt, sind TGF- $\alpha$  -Serumspiegel zwischen 48,2 - 50,2 ng/ml eng korreliert mit Rezidiven und höher Letalität von Hals-Kopf-Karzinom-Patienten.<sup>227</sup>

Ishikawa et al. konnten zeigen, dass erhöhte TGF- $\alpha$ -Serumspiegel zu einem schlechten Ansprechen von Tyrosinkinaseinhibitoren (hier: Gefitinib) führten, und letztendlich auch die Prognose der Patienten verschlechterten.<sup>89</sup>

Dies legt nahe, dass TGF- $\alpha$  einen hohen Einfluss auf die Signalkaskade des EGFR, die Entwicklung von Resistenzen – nicht nur gegen Zytostatikawirkstoffe, sondern auch gegen Tyrosinkinaseinhibitoren – und schließlich auch auf die Tumorprognose hat.

## 5.7 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF- $\alpha$ , Cetuximab und Erlotinib keinen Einfluss auf die von BPDE-induzierte DNA-Schädigung von oraler Mukosa bei tumorfreien Patienten haben.

Im Gegensatz dazu ist tumorfreie Schleimhaut von Oropharynxkarzinompatienten in hohem Maße sensibel gegenüber diesen Substanzen.

TGF- $\alpha$  scheint für den Schutz der Zelle vor mutagenen Substanzen wichtig zu sein, aber auch eine essentielle Rolle in der Entwicklung von Chemoresistenz bei Karzinompatienten zu spielen und sollte tiefergehend untersucht werden.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit an Miniorgankulturen spiegeln im Gegensatz zu den Studien mit Zelllinien die Ergebnisse der ersten klinischen Studie, die eine Cetuximab/Erlotinib-Kombination verabreichte wider. Damit scheint dieses Modell sehr gut geeignet, um realistische Aussagen über die Wirkung von verschiedenen Substanzen treffen zu können.

Allerdings werden weitere Studien benötigt, um die Vorgänge der Chemoresistenz genauer verstehen zu können.

## 6 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich sind die vierthäufigste Tumor-entität in der Bundesrepublik Deutschland. Ihre Prognose ist trotz intensiver Therapiemaßnahmen oft schlecht. Verursacht werden Kopf-Hals-Karzinome in 80% der Fälle durch Alkohol- und Tabakkonsum. Bei der Pyrolyse organischer Verbindungen, wie z.B. im Zigarettenrauch, entstehen polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH). Benzo[a]pyren ist der bekannteste Vertreter der PAH. Sein kanzerogener Metabolit, BPDE wurde in dieser Arbeit als schädigendes Agens verwendet.

In 90-100% der Oropharynxkarzinome ist der EGFR, eine Rezeptor-Tyrosinkinase hoch exprimiert. Durch Bindung von Liganden, wie z.B. TGF- $\alpha$  wird der EGFR aktiviert. Seine nachgeschaltete Signalkaskade initiiert physiologischerweise Zellwachstum und Proliferation. In Tumoren führt dies zu verstärktem Wachstum, Tumorinvasion, Neoangiogenese und Metastasierung. Daneben hat der EGFR einen Einfluss auf die Multi Drug Resistance von Tumorzellen. Es ist bekannt, dass sowohl der EGFR als auch TGF- $\alpha$  in gesunder Mukosa von Kopf-Hals-Karzinompatienten überexprimiert sind und damit die Theorie der Feldkanzerogenese untermauern.

Diese bedeutende Funktion des EGFR ließ ihn zum geeigneten Angriffspunkt in der Antitumorthherapie werden. Cetuximab ist ein monoklonaler Antikörper, der als extrazellulär wirkendes Medikament die Ligandenbindungsstelle des EGFR besetzt und damit den EGFR hemmt. Es wird bei der Therapie von Malignomen vielfach eingesetzt. Erlotinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der die intrazelluläre Aktivität des EGFR unterbindet. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von TGF- $\alpha$ , Cetuximab und Erlotinib auf die BPDE-induzierte DNA-Schädigung gesunder Schleimhaut von Patienten mit einem Oropharynxkarzinom (n=20) im Vergleich zu tumorfreien Kontrollpatienten (n=20) untersucht. Dazu wurden aus der Mukosa der Patienten Miniorgankulturen hergestellt und kultiviert. Miniorgankulturen sind Gewebekulturen von ca. 1 mm<sup>3</sup> Größe. Zum Nachweis der durch BPDE-verursachten DNA-

Fragmentierung dient die alkalische Mikrogelelektrophorese, auch Comet Assay genannt.

Die ideale TGF- $\alpha$ -Konzentration wurde anhand einer Dosiswirkungskurve an n=30 Patienten ermittelt und mit 50 ng/ml festgelegt. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass TGF- $\alpha$  einen signifikanten Einfluss auf die Chemosensitivität von gesunder Schleimhaut von Karzinompatienten hat. In der Nontumorgruppe konnte weder ein Einfluss von TGF- $\alpha$ , noch Cetuximab oder Erlotinib kombiniert mit TGF- $\alpha$  auf den durch BPDE verursachten Schaden nachgewiesen werden. In der Tumorgruppe verringerte TGF- $\alpha$  die Fragmentierung durch BPDE, die Zugabe von Cetuximab zu TGF- $\alpha$  hob den Schaden wieder auf die Ausgangsschädigung von BPDE an. Da Erlotinib auch durch Hemmung des EGFR wirkt, wäre ein ähnliches Ergebnis zu erwarten gewesen. Doch die Zugabe von Erlotinib (einmalige und zweimalige Gabe) zu TGF- $\alpha$  bewirkte keine Veränderung verglichen mit TGF- $\alpha$  alleine. Eine kombinierte Gabe von Cetuximab und Erlotinib zu TGF- $\alpha$  reduzierte die DNA-Fragmentierung gegenüber der BPDE-Schädigung. Im Vergleich mit der alleinigen TGF- $\alpha$ -Gabe zeigte die Kombination von Cetuximab und Erlotinib-Doppelgabe zu TGF- $\alpha$  sogar eine weitere signifikante Reduktion der DNA-Fragmentierung. Dies spiegelt die Ergebnisse neuester klinischer Studien wider. TGF- $\alpha$  scheint eine essentielle Rolle bei der Entwicklung von Mutagen- und Chemoresistenz (speziell über MDR-Proteine) und der Prognose der Erkrankung zu spielen. Es werden weitere Studien benötigt, um den genauen Wirkmechanismus von TGF- $\alpha$  auf diese Resistenzmechanismen verstehen zu können. TGF- $\alpha$  könnte ein Grund dafür sein, warum manche Patienten sehr gut, andere wiederum unmerklich auf Anti-EGFR-Medikamente ansprechen, und dies würde Möglichkeiten in der gezielteren Behandlung von Kopf-Hals-Karzinompatienten eröffnen.

# 7 Anhang

## 7.1 Literatur

1. Albanell J, Codony-Servat J, Rojo F, Del Campo JM, Sauleda S, Anido J, Raspall G, Giralt J, Rosello J, Nicholson RI, Mendelsohn J, Baselga J (2001) Activated extracellular signal-regulated kinases: association with epidermal growth factor receptor/transforming growth factor alpha expression in head and neck squamous carcinoma and inhibition by anti-epidermal growth factor receptor treatments. *Cancer Res* 61: 6500-6510
2. Alexandrov K, Rojas M, Satarug S (2010) The critical DNA damage by benzo(a)pyrene in lung tissues of smokers and approaches to preventing its formation. *Toxicol Lett* 198: 63-68
3. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusatis G, Iacobuzio-Donahue C, Baker SD, Ashfaq R, Takimoto C, Forastiere A, Hidalgo M (2004) An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res* 64: 9139-9143
4. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM (2003) P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene* 22: 7468-7485
5. Anderson D, Plewa MJ (1998) The International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 13: 67-73
6. Arteaga CL (2002) Overview of epidermal growth factor receptor biology and its role as a therapeutic target in human neoplasia. *Semin Oncol* 29: 3-9
7. Baguley BC, Turner PM, Ferguson LR (1990) Protection by inhibitors of multidrug resistance against mitochondrial mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Cancer* 26: 55-60
8. Bajaj M, Waterfield MD, Schlessinger J, Taylor WR, Blundell T (1987) On the tertiary structure of the extracellular domains of the epidermal growth factor and insulin receptors. *Biochim Biophys Acta* 916: 220-226
9. Baselga J, Norton L, Masui H, Pandiella A, Coplan K, Miller WH, Jr., Mendelsohn J (1993) Antitumor effects of doxorubicin in combination with anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *J Natl Cancer Inst* 85: 1327-1333
10. Baselga J (2001) The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4: S16-22
11. Baulida J, Kraus MH, Alimandi M, Di Fiore PP, Carpenter G (1996) All ErbB receptors other than the epidermal growth factor receptor are endocytosis impaired. *J Biol Chem* 271: 5251-5257
12. Baumeister P, Schwenk-Zieger S, Reiter M, Welz C, Harreus U (2009) Transforming Growth Factor-alpha reduces carcinogen-induced DNA



- damage in mini-organ cultures from head-and-neck cancer patients. *Mutat Res* 677: 42-45
13. Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF, Jr. (1988) Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48: 3282-3287
  14. Boerner JL, Danielsen A, Maihle NJ (2003) Ligand-independent oncogenic signaling by the epidermal growth factor receptor: v-ErbB as a paradigm. *Exp Cell Res* 284: 111-121
  15. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Cohen RB, Raben D, Jones C, Kies MS, Baselga J, Ang KK (2004) Cetuximab prolongs survival in patients with locoregionally advanced squamous cell carcinoma of head and neck: A phase III study of high dose radiation therapy with or without cetuximab. *ASCO Meeting Abstracts* 22: 5507
  16. Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Cohen RB, Jones CU, Sur RK, Raben D, Baselga J, Spencer SA, Zhu J, Youssoufian H, Rowinsky EK, Ang KK (2009) Radiotherapy plus cetuximab for locoregionally advanced head and neck cancer: 5-year survival data from a phase 3 randomised trial, and relation between cetuximab-induced rash and survival. *Lancet Oncol* 11: 21-28
  17. Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19: 2474-2488
  18. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH (2003) A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 63: 1727-1730
  19. Bringman TS, Lindquist PB, Derynck R (1987) Different transforming growth factor-alpha species are derived from a glycosylated and palmitoylated transmembrane precursor. *Cell* 48: 429-440
  20. Bromberg J, Darnell JE, Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19: 2468-2473
  21. Brown PM, Debanne MT, Grothe S, Bergsma D, Caron M, Kay C, O'Connor-McCourt MD (1994) The extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. Studies on the affinity and stoichiometry of binding, receptor dimerization and a binding-domain mutant. *Eur J Biochem* 225: 223-233
  22. Broxterman HJ, Giaccone G, Lankelma J (1995) Multidrug resistance proteins and other drug transport-related resistance to natural product agents. *Curr Opin Oncol* 7: 532-540
  23. Burgess AW, Cho HS, Eigenbrot C, Ferguson KM, Garrett TP, Leahy DJ, Lemmon MA, Sliwkowski MX, Ward CW, Yokoyama S (2003) An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12: 541-552
  24. Burke P, Schooler K, Wiley HS (2001) Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by endocytosis and intracellular trafficking. *Mol Biol Cell* 12: 1897-1910

25. Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-Schwaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A (2007) Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. *Mutat Res* 627: 31-35
26. Campbell ID, Cooke RM, Baron M, Harvey TS, Tappin MJ (1989) The solution structures of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *Prog Growth Factor Res* 1: 13-22
27. Carter P (2001) Improving the efficacy of antibody-based cancer therapies. *Nat Rev Cancer* 1: 118-129
28. Castellsague X, Quintana MJ, Martinez MC, Nieto A, Sanchez MJ, Juan A, Monner A, Carrera M, Agudo A, Quer M, Munoz N, Herrero R, Franceschi S, Bosch FX (2004) The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. *Int J Cancer* 108: 741-749
29. Coffey RJ, Jr., Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR (1987) Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Nature* 328: 817-820
30. Cohen S (1962) Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J Biol Chem* 237: 1555-1562
31. Cohen S, Carpenter G, King L, Jr. (1980) Epidermal growth factor-receptor-protein kinase interactions. Co-purification of receptor and epidermal growth factor-enhanced phosphorylation activity. *J Biol Chem* 255: 4834-4842
32. Collins AR (2004) The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 26: 249-261
33. Cross TG, Scheel-Toellner D, Henriquez NV, Deacon E, Salmon M, Lord JM (2000) Serine/threonine protein kinases and apoptosis. *Exp Cell Res* 256: 34-41
34. Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, Demard F, Milano G (1993) Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol* 11: 1873-1878
35. de Larco JE, Todaro GJ (1978) Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 4001-4005
36. De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL, Correa P, Oreggia F, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Leiva J (2005) Dietary patterns and risk of cancer of the oral cavity and pharynx in Uruguay. *Nutr Cancer* 51: 132-139
37. DeMarini DM (2004) Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res* 567: 447-474
38. Derynck R, Roberts AB, Winkler ME, Chen EY, Goeddel DV (1984) Human transforming growth factor-alpha: precursor structure and expression in *E. coli*. *Cell* 38: 287-297
39. Derynck R (1988) Transforming growth factor alpha. *Cell* 54: 593-595

40. Divaris K, Olshan AF, Smith J, Bell ME, Weissler MC, Funkhouser WK, Bradshaw PT (2010) Oral health and risk for head and neck squamous cell carcinoma: the Carolina Head and Neck Cancer Study. *Cancer Causes Control* 21: 567-575
41. Domagala T, Konstantopoulos N, Smyth F, Jorissen RN, Fabri L, Geleick D, Lax I, Schlessinger J, Sawyer W, Howlett GJ, Burgess AW, Nice EC (2000) Stoichiometry, kinetic and binding analysis of the interaction between epidermal growth factor (EGF) and the extracellular domain of the EGF receptor. *Growth Factors* 18: 11-29
42. Elmeliegy MA, Carcaboso AM, Tagen M, Bai F, Stewart CF (2011) Role of ATP-binding cassette and solute carrier transporters in erlotinib CNS penetration and intracellular accumulation. *Clin Cancer Res* 17: 89-99
43. EMEA (2008) EMEA European Public Assessment report; Product information 24/11/2008 Erbitux-H-C-558-II-28.
44. EMEA (2009) EMEA European Public Assessment report; Product information 27/01/2009 Tarceva-H-C-618-II-14.
45. Etienne-Grimaldi MC, Pereira S, Magne N, Formento JL, Francoual M, Fontana X, Demard F, Dassonville O, Poissonnet G, Santini J, Bensaoudoun RJ, Szepietowski P, Milano G (2005) Analysis of the dinucleotide repeat polymorphism in the epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in head and neck cancer patients. *Ann Oncol* 16: 934-941
46. Fan Z, Baselga J, Masui H, Mendelsohn J (1993) Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res* 53: 4637-4642
47. FDA (2004) FDA Label Informationen Cetuximab <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm113714.htm>> (Stand: Februar 2011)
48. FDA (2010) FDA Label Informationen Erlotinib <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm209058.htm>> (Stand: Februar 2011).
49. Ferguson LR, Pearson AE (1996) The clinical use of mutagenic anti-cancer drugs. *Mutat Res* 355: 1-12
50. Ferguson LR, De Flora S (2005) Multiple drug resistance, antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat Res* 591: 24-33
51. Ford AC, Grandis JR (2003) Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck* 25: 67-73
52. Foskett JK, White C, Cheung KH, Mak DO (2007) Inositol trisphosphate receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. *Physiol Rev* 87: 593-658
53. Frenzilli G, Scarcelli V, Fornai F, Paparelli A, Nigro M (2006) The comet assay as a method of assessment of neurotoxicity: usefulness for drugs of abuse. *Ann N Y Acad Sci* 1074: 478-481
54. Gan BS, Hollenberg MD, MacCannell KL, Lederis K, Winkler ME, Derynck R (1987) Distinct vascular actions of epidermal growth factor-

- urogastrone and transforming growth factor- $\alpha$ . *J Pharmacol Exp Ther* 242: 331-337
55. Garcia R, Franklin RA, McCubrey JA (2006) EGF induces cell motility and multi-drug resistance gene expression in breast cancer cells. *Cell Cycle* 5: 2820-2826
  56. Garrett TP, McKern NM, Lou M, Elleman TC, Adams TE, Lovrecz GO, Zhu HJ, Walker F, Frenkel MJ, Hoyne PA, Jorissen RN, Nice EC, Burgess AW, Ward CW (2002) Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor  $\alpha$ . *Cell* 110: 763-773
  57. Gentry LE, Twardzik DR, Lim GJ, Ranchalis JE, Lee DC (1987) Expression and characterization of transforming growth factor  $\alpha$  precursor protein in transfected mammalian cells. *Mol Cell Biol* 7: 1585-1591
  58. Gerk PM, Vore M (2002) Regulation of expression of the multidrug resistance-associated protein 2 (MRP2) and its role in drug disposition. *J Pharmacol Exp Ther* 302: 407-415
  59. Godschalk R, Nair J, van Schooten FJ, Risch A, Drings P, Kayser K, Dienemann H, Bartsch H (2002) Comparison of multiple DNA adduct types in tumor adjacent human lung tissue: effect of cigarette smoking. *Carcinogenesis* 23: 2081-2086
  60. Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J (1995) Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1: 1311-1318
  61. Grandi C, D'Ovidio MC, Tomao P (2006) [Use of the comet test in occupational medicine and industrial toxicology: considerations and prospects]. *G Ital Med Lav Ergon* 28: 5-13
  62. Grandis JR, Tweardy DJ (1993) Elevated levels of transforming growth factor  $\alpha$  and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res* 53: 3579-3584
  63. Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ (1998) Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth *In vitro*. *J Clin Invest* 102: 1385-1392
  64. Grandis JR, Zeng Q, Drenning SD, Tweardy DJ (1998) Normalization of EGFR mRNA levels following restoration of wild-type p53 in a head and neck squamous cell carcinoma cell line. *Int J Oncol* 13: 375-378
  65. Grandis JR, Drenning SD, Zeng Q, Watkins SC, Melhem MF, Endo S, Johnson DE, Huang L, He Y, Kim JD (2000) Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4227-4232
  66. Gustavsson P, Jakobsson R, Johansson H, Lewin F, Norell S, Rutkvist LE (1998) Occupational exposures and squamous cell carcinoma of

- the oral cavity, pharynx, larynx, and oesophagus: a case-control study in Sweden. *Occup Environ Med* 55: 393-400
67. Haimeur A, Conseil G, Deeley RG, Cole SP (2004) The MRP-related and BCRP/ABCG2 multidrug resistance proteins: biology, substrate specificity and regulation. *Curr Drug Metab* 5: 21-53
  68. Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G (1997) 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
  69. Harari PM (2004) Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology. *Endocr Relat Cancer* 11: 689-708
  70. Harari PM, Huang SM (2004) Combining EGFR inhibitors with radiation or chemotherapy: will preclinical studies predict clinical results? *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58: 976-983
  71. Harari PM, Ritter MA, Petereit DG, Mehta MP (2004) Chemoradiation for upper aerodigestive tract cancer: balancing evidence from clinical trials with individual patient recommendations. *Curr Probl Cancer* 28: 7-40
  72. Harreus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H (1999) [Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract]. *Laryngorhinootologie* 78: 176-181
  73. Harreus UA, Kleinsasser NH, Zieger S, Wallner B, Reiter M, Schuller P, Berghaus A (2004) Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 563: 131-138
  74. Harris RC, Chung E, Coffey RJ (2003) EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284: 2-13
  75. Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR (2003) Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* 18: 45-51
  76. Hasegawa Y, Goto M, Hanai N, Ijichi K, Terada A, Hyodo I, Ogawa T, Fukushima M (2007) Prediction of chemosensitivity using multigene analysis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology* 73: 104-111
  77. Holbro T, Hynes NE (2004) ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 44: 195-217
  78. Holtzhauer M (2009) *Biochemische Labormethoden (Sprenger Labormanuale)*, 3.Auflage; Seite 51; Verlag: Springer Verlag
  79. Hsu CH, Gao M, Chen CL, Yeh PY, Cheng AL (2005) Inhibitors of epidermoid growth factor receptor suppress cell growth and enhance chemosensitivity of nasopharyngeal cancer cells in vitro. *Oncology* 68: 538-547

80. Huang S, Armstrong EA, Benavente S, Chinnaiyan P, Harari PM (2004) Dual-agent molecular targeting of the epidermal growth factor receptor (EGFR): combining anti-EGFR antibody with tyrosine kinase inhibitor. *Cancer Res* 64: 5355-5362
81. Huang SM, Bock JM, Harari PM (1999) Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 59: 1935-1940
82. Huang SM, Li J, Harari PM (2002) Molecular inhibition of angiogenesis and metastatic potential in human squamous cell carcinomas after epidermal growth factor receptor blockade. *Mol Cancer Ther* 1: 507-514
83. Humblet Y, Vega-Villegas E, Mesia R, Awada A, Geoffrois L, Borel C, Hitt R, Amellal N, Bessa E-H, Bourhis J (2004) Phase I study of cetuximab in combination with cisplatin or carboplatin and 5-fluorouracil (5-FU) in patients (pts) with recurrent and/or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *ASCO Meeting Abstracts* 22: 5513
84. Hynes NE, Stern DF (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198: 165-184
85. Hynes NE, Lane HA (2005) ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5: 341-354
86. IARC (2004) International Agency for Research on Cancer. Tobacco smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum* 38. Lyon: IARC, 1986.
87. IARC (2010) *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 92 (2010) Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*
88. Ihloff AS, Knecht R, Tribius S (2010) [HPV infection in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *Highlights from ASCO 2010*]. *HNO* 58: 1163-1167
89. Ishikawa N, Daigo Y, Takano A, Taniwaki M, Kato T, Hayama S, Murakami H, Takeshima Y, Inai K, Nishimura H, Tsuchiya E, Kohno N, Nakamura Y (2005) Increases of amphiregulin and transforming growth factor-alpha in serum as predictors of poor response to gefitinib among patients with advanced non-small cell lung cancers. *Cancer Res* 65: 9176-9184
90. Janjigian YY, Azzoli CG, Krug LM, Pereira LK, Rizvi NA, Pietanza MC, Kris MG, Ginsberg MS, Pao W, Miller VA, Riely GJ (2011) Phase I/II trial of cetuximab and erlotinib in patients with lung adenocarcinoma and acquired resistance to erlotinib. *Clin Cancer Res*
91. Kalyankrishna S, Grandis JR (2006) Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 24: 2666-2672
92. Kawamoto T, Sato JD, Le A, Polikoff J, Sato GH, Mendelsohn J (1983) Growth stimulation of A431 cells by epidermal growth factor: identification of high-affinity receptors for epidermal growth factor by

- an anti-receptor monoclonal antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 1337-1341
93. Keppler D, Leier I, Jedlitschky G, König J (1998) ATP-dependent transport of glutathione S-conjugates by the multidrug resistance protein MRP1 and its apical isoform MRP2. *Chem Biol Interact* 111-112: 153-161
  94. Kim JH, Saito K, Yokoyama S (2002) Chimeric receptor analyses of the interactions of the ectodomains of ErbB-1 with epidermal growth factor and of those of ErbB-4 with neuregulin. *Eur J Biochem* 269: 2323-2329
  95. Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harreus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER, Huber RM (2001) Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 63: 141-147
  96. Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harreus UA, Gamarra F, Buhrlen M, Huber RM, Rettenmeier AW (2004) The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res* 561: 63-73
  97. Kleinsasser NH, Harreus UA, Gamarra F, Driemel O, Hagen R, Buehrlen M (2009) Cytochrome P4502A6 stability in a mini organ culture model of human nasal mucosa for genotoxicology studies as detected by flow cytometry. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266: 385-389
  98. Knize MG, Salmon CP, Pais P, Felton JS (1999) Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens. *Adv Exp Med Biol* 459: 179-193
  99. Kreimer AR, Randi G, Herrero R, Castellsague X, La Vecchia C, Franceschi S (2006) Diet and body mass, and oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: analysis from the IARC multinational case-control study. *Int J Cancer* 118: 2293-2297
  100. Kreimer AR, Villa A, Nyitray AG, Abrahamsen M, Papenfuss M, Smith D, Hildesheim A, Villa LL, Lazcano-Ponce E, Giuliano AR (2011) The epidemiology of oral HPV infection among a multinational sample of healthy men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 172-182
  101. Kumaravel TS, Jha AN (2006) Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat Res* 605: 7-16
  102. Lax I, Bellot F, Howk R, Ullrich A, Givol D, Schlessinger J (1989) Functional analysis of the ligand binding site of EGF-receptor utilizing chimeric chicken/human receptor molecules. *EMBO J* 8: 421-427
  103. LeBlanc A, Shen S, Lew K, Weinfeld M, Le XC (2009) Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in mononuclear white blood cells by CE immunoassay and its application to studying the effect of glutathione depletion. *Electrophoresis* 30: 1558-1563
  104. Lee JW, Soung YH, Kim SY, Nam HK, Park WS, Nam SW, Kim MS, Sun DI, Lee YS, Jang JJ, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH (2005) Somatic

- mutations of EGFR gene in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 11: 2879-2882
105. Lee RF, Steinert S (2003) Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 544: 43-64
  106. Lemmon MA, Bu Z, Ladbury JE, Zhou M, Pinchasi D, Lax I, Engelman DM, Schlessinger J (1997) Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *EMBO J* 16: 281-294
  107. Leslie EM, Deeley RG, Cole SP (2001) Toxicological relevance of the multidrug resistance protein 1, MRP1 (ABCC1) and related transporters. *Toxicology* 167: 3-23
  108. Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM (2005) Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7: 301-311
  109. Liang Z, Lippman SM, Kawabe A, Shimada Y, Xu XC (2003) Identification of benzo(a)pyrene diol epoxide-binding DNA fragments using DNA immunoprecipitation technique. *Cancer Res* 63: 1470-1474
  110. Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC (2001) Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3: 802-808
  111. Litman T, Druley TE, Stein WD, Bates SE (2001) From MDR to MXR: new understanding of multidrug resistance systems, their properties and clinical significance. *Cell Mol Life Sci* 58: 931-959
  112. Lovell DP, Omori T (2008) Statistical issues in the use of the comet assay. *Mutagenesis* 23: 171-182
  113. Luch A (2005) Chemicals as tumor-inducing agents. *Discov Med* 5: 472-477
  114. Luch A (2005) Nature and nurture - lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 5: 113-125
  115. Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA (2004) 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
  116. Maier H, Born IA, Mall G (1988) Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. *Klin Wochenschr* 66 Suppl 11: 140-150
  117. Maier H, Zoller J, Herrmann A, Kreiss M, Heller WD (1993) Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 108: 655-661
  118. Maier H, Fischer G, Sennewald E, Heller WD (1994) [Occupational risk factors for pharyngeal cancer. Results of the Heidelberg Pharyngeal Cancer Study]. *HNO* 42: 530-540
  119. Maier H, Tisch M, Enderle G, Dietz A, Weidauer H (1997) [Occupational exposure to paint, lacquer and solvents, and cancer risk in the area of the upper aero-digestive tract]. *HNO* 45: 905-908



120. Maier H, Tisch M (1999) [Occupation and cancer of the head-neck area]. *HNO* 47: 1025-1037
121. Mandic R, Rodgarkia-Dara CJ, Krohn V, Wiegand S, Grenman R, Werner JA (2009) Cisplatin resistance of the HNSCC cell line UT-SCC-26A can be overcome by stimulation of the EGF-receptor. *Anti-cancer Res* 29: 1181-1187
122. Marchetti S, de Vries NA, Buckle T, Bolijn MJ, van Eijndhoven MA, Beijnen JH, Mazzanti R, van Tellingen O, Schellens JH (2008) Effect of the ATP-binding cassette drug transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2 on erlotinib hydrochloride (Tarceva) disposition in in vitro and in vivo pharmacokinetic studies employing Bcrp1<sup>-/-</sup>/Mdr1a/1b<sup>-/-</sup> (triple-knockout) and wild-type mice. *Mol Cancer Ther* 7: 2280-2287
123. Marquardt H, Hunkapiller MW, Hood LE, Twardzik DR, De Larco JE, Stephenson JR, Todaro GJ (1983) Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 4684-4688
124. Massague J (1985) Transforming growth factor-beta modulates the high-affinity receptors for epidermal growth factor and transforming growth factor-alpha. *J Cell Biol* 100: 1508-1514
125. Masui H, Kawamoto T, Sato JD, Wolf B, Sato G, Mendelsohn J (1984) Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res* 44: 1002-1007
126. Matar P, Rojo F, Cassia R, Moreno-Bueno G, Di Cosimo S, Tabernero J, Guzman M, Rodriguez S, Arribas J, Palacios J, Baselga J (2004) Combined epidermal growth factor receptor targeting with the tyrosine kinase inhibitor gefitinib (ZD1839) and the monoclonal antibody cetuximab (IMC-C225): superiority over single-agent receptor targeting. *Clin Cancer Res* 10: 6487-6501
127. Matthias C, Panzer M, Röpfer B (2009) Oropharynx-tumoren. Manual Kopf-Hals-Malignome Herausgeber: Tumorzentrum München
128. McCubrey JA, Steelman LS, Abrams SL, Lee JT, Chang F, Bertrand FE, Navolanic PM, Terrian DM, Franklin RA, D'Assoro AB, Salisbury JL, Mazzarino MC, Stivala F, Libra M (2006) Roles of the RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT pathways in malignant transformation and drug resistance. *Adv Enzyme Regul* 46: 249-279
129. McCubrey JA, Steelman LS, Kempf CR, Chappell W, Abrams SL, Stivala F, Malaponte G, Nicoletti F, Libra M, Basecke J, Maksimovic-Ivanic D, Mijatovic S, Montalto G, Cervello M, Cocco L, Martelli AM (2011) Therapeutic Resistance Resulting from Mutations in Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR Signaling Pathways. *J Cell Physiol*
130. Mendelsohn J (2002) Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 20: 1S-13S

131. Mrhalova M, Plzak J, Betka J, Kodet R (2005) Epidermal growth factor receptor--its expression and copy numbers of EGFR gene in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Neoplasma* 52: 338-343
132. Myllynen P, Kurttila T, Vaskivuo L, Vahakangas K (2007) DNA damage caused by benzo(a)pyrene in MCF-7 cells is increased by verapamil, probenecid and PSC833. *Toxicol Lett* 169: 3-12
133. Myrdal SE, Twardzik DR, Auersperg N (1986) Cell-mediated co-action of transforming growth factors: incubation of type beta with normal rat kidney cells produces a soluble activity that prolongs the ruffling response to type alpha. *J Cell Biol* 102: 1230-1234
134. Nagatsuka H, Ishiwari Y, Tsujigiwa H, Nakano K, Nagai N (2001) Quantitation of epidermal growth factor receptor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in pre-malignant and malignant oral epithelial lesions. *Oral Oncol* 37: 599-604
135. Noguchi K, Kawahara H, Kaji A, Katayama K, Mitsushashi J, Sugimoto Y (2009) Substrate-dependent bidirectional modulation of P-glycoprotein-mediated drug resistance by erlotinib. *Cancer Sci* 100: 1701-1707
136. Normanno N, Bianco C, De Luca A, Salomon DS (2001) The role of EGF-related peptides in tumor growth. *Front Biosci* 6: D685-707
137. O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles S (2000) Expression and regulation of c-ERBB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 88: 759-765
138. Odaka M, Kohda D, Lax I, Schlessinger J, Inagaki F (1997) Ligand-binding enhances the affinity of dimerization of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor. *J Biochem* 122: 116-121
139. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K, Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S (2002) Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110: 775-787
140. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA, Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO J* 19: 3159-3167
141. Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990) Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 122: 86-94
142. Olive PL, Banath JP (1993) Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 294: 275-283
143. Ongkeko WM, Altuna X, Weisman RA, Wang-Rodriguez J (2005) Expression of protein tyrosine kinases in head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol* 124: 71-76
144. Ono-Ogasawara M, Smith TJ (2004) Diesel exhaust particles in the work environment and their analysis. *Ind Health* 42: 389-399

145. Ostling O, Johanson KJ (1984) Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298
146. Ostling O, Johanson KJ, Blomquist E, Hagelqvist E (1987) DNA damage in clinical radiation therapy studied by microelectrophoresis in single tumour cells. A preliminary report. *Acta Oncol* 26: 45-48
147. Ozanne B, Richards CS, Hendler F, Burns D, Gusterson B (1986) Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas. *J Pathol* 149: 9-14
148. Palmer BD, Trumpp-Kallmeyer S, Fry DW, Nelson JM, Showalter HD, Denny WA (1997) Tyrosine kinase inhibitors. 11. Soluble analogues of pyrrolo- and pyrazoloquinazolines as epidermal growth factor receptor inhibitors: synthesis, biological evaluation, and modeling of the mode of binding. *J Med Chem* 40: 1519-1529
149. Pandur S, Pankiv S, Johannessen M, Moens U, Huseby NE (2007) Gamma-glutamyltransferase is upregulated after oxidative stress through the Ras signal transduction pathway in rat colon carcinoma cells. *Free Radic Res* 41: 1376-1384
150. Peng D, Fan Z, Lu Y, DeBlasio T, Scher H, Mendelsohn J (1996) Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 up-regulates p27KIP1 and induces G1 arrest in prostatic cancer cell line DU145. *Cancer Res* 56: 3666-3669
151. Perrotte P, Matsumoto T, Inoue K, Kuniyasu H, Eve BY, Hicklin DJ, Radinsky R, Dinney CP (1999) Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin Cancer Res* 5: 257-265
152. Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B, Kerbel RS (1997) Neutralizing antibodies against epidermal growth factor and ErbB-2/neu receptor tyrosine kinases down-regulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implications for signal transduction therapy of solid tumors. *Am J Pathol* 151: 1523-1530
153. Philips JM HD (1970) Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans Br Mycol Soc* 55:158-161
154. Phillips DH, Grover PL (1994) Polycyclic hydrocarbon activation: bay regions and beyond. *Drug Metab Rev* 26: 443-467
155. Piccirillo JF, Costas I, Reichman ME (2007) Cancers of the head and neck. Ries LAG, Young JL, Keel GE, Eisner MP, Lin YD, Horner M-J (editors) SEER Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: US SEER Program, 1988-2001, Patient and Tumor Characteristics National Cancer Institute, SEER Program, NIH Pub No 07-6215, Bethesda, MD, 2007

156. Pigorsch S, Zimmermann F (2009) Zweitkarzinome, Tumorrezidive und Metastasen. Manual Kopf-Hals-Malignome Herausgeber: Tumorzentrum München
157. Pike LJ, Marquardt H, Todaro GJ, Gallis B, Casnellie JE, Bornstein P, Krebs EG (1982) Transforming growth factor and epidermal growth factor stimulate the phosphorylation of a synthetic, tyrosine-containing peptide in a similar manner. *J Biol Chem* 257: 14628-14631
158. Pinedo HM, Giaccone G (1995) P-glycoprotein--a marker of cancer-cell behavior. *N Engl J Med* 333: 1417-1419
159. Prewett M, Rockwell P, Rockwell RF, Giorgio NA, Mendelsohn J, Scher HI, Goldstein NI (1996) The biologic effects of C225, a chimeric monoclonal antibody to the EGFR, on human prostate carcinoma. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19: 419-427
160. Psyri A, Yu Z, Weinberger PM, Sasaki C, Haffty B, Camp R, Rimm D, Burtness BA (2005) Quantitative determination of nuclear and cytoplasmic epidermal growth factor receptor expression in oropharyngeal squamous cell cancer by using automated quantitative analysis. *Clin Cancer Res* 11: 5856-5862
161. Purdue MP, Jarvholm B, Bergdahl IA, Hayes RB, Baris D (2006) Occupational exposures and head and neck cancers among Swedish construction workers. *Scand J Work Environ Health* 32: 270-275
162. Raymond E, Faivre S, Armand JP (2000) Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase as a target for anticancer therapy. *Drugs* 60 Suppl 1: 15-23; discussion 41-12
163. Reiter M, Harréus U, Matthias C, Hölzel D (2009) Epidemiologie. Manual Kopf-Hals-Malignome Herausgeber: Tumorzentrum München
164. Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A (2007) Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 96: 408-416
165. Ribeiro KB, Levi JE, Pawlita M, Koifman S, Matos E, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V, Curado MP, Shangina O, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Lissowska J, Daudt A, Menezes A, Bencko V, Mates D, Fernandez L, Fabianova E, Gheit T, Tommasino M, Boffetta P, Brennan P, Waterboer T (2011) Low human papillomavirus prevalence in head and neck cancer: results from two large case-control studies in high-incidence regions. *Int J Epidemiol*
166. Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R, La Vecchia C (2004) Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol* 40: 207-213
167. Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, P OC, Eccles SA (2005) Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev* 24: 47-69
168. Rosenberger A, Rossler U, Hornhardt S, Sauter W, Bickeboller H, Wichmann HE, Gomolka M (2011) Validation of a fully automated COMET assay: 1.75 million single cells measured over a 5 year period. *DNA Repair (Amst)*

169. Routledge MN, McLuckie KI, Jones GD, Farmer PB, Martin EA (2001) Presence of benzo[a]pyrene diol epoxide adducts in target DNA leads to an increase in UV-induced DNA single strand breaks and supF gene mutations. *Carcinogenesis* 22: 1231-1238
170. Rubinfeld H, Seger R (2005) The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol* 31: 151-174
171. Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N (1995) Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19: 183-232
172. Sanfilippo O, Ronchi E, De Marco C, Di Fronzo G, Silvestrini R (1991) Expression of P-glycoprotein in breast cancer tissue and in vitro resistance to doxorubicin and vincristine. *Eur J Cancer* 27: 155-158
173. Santini J, Formento JL, Francoual M, Milano G, Schneider M, Dassonville O, Demard F (1991) Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 13: 132-139
174. Sato JD, Kawamoto T, Le AD, Mendelsohn J, Polikoff J, Sato GH (1983) Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors. *Mol Biol Med* 1: 511-529
175. Scaltriti M, Baselga J (2006) The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12: 5268-5272
176. Schinkel AH, Jonker JW (2003) Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 55: 3-29
177. Schlessinger J (2000) Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103: 211-225
178. Schlessinger J, Lemmon MA (2003) SH2 and PTB domains in tyrosine kinase signaling. *Sci STKE* 2003: RE12
179. Schreiber AB, Winkler ME, Derynck R (1986) Transforming growth factor-alpha: a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* 232: 1250-1253
180. Seitz HK, Cho CH (2009) Contribution of alcohol and tobacco use in gastrointestinal cancer development. *Methods Mol Biol* 472: 217-241
181. Seitz HK, Stickel F (2009) Acetaldehyde as an underestimated risk factor for cancer development: role of genetics in ethanol metabolism. *Genes Nutr*
182. Shi Z, Peng XX, Kim IW, Shukla S, Si QS, Robey RW, Bates SE, Shen T, Ashby CR, Jr., Fu LW, Ambudkar SV, Chen ZS (2007) Erlotinib (Tarceva, OSI-774) antagonizes ATP-binding cassette subfamily B member 1 and ATP-binding cassette subfamily G member 2-mediated drug resistance. *Cancer Res* 67: 11012-11020
183. Shi Z, Parmar S, Peng XX, Shen T, Robey RW, Bates SE, Fu LW, Shao Y, Chen YM, Zang F, Chen ZS (2009) The epidermal growth factor tyrosine kinase inhibitor AG1478 and erlotinib reverse ABCG2-mediated drug resistance. *Oncol Rep* 21: 483-489

184. Shimakage M, Horii K, Tempaku A, Kakudo K, Shirasaka T, Sasagawa T (2002) Association of Epstein-Barr virus with oral cancers. *Hum Pathol* 33: 608-614
185. Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN (1994) Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res* 54: 3153-3159
186. Shin DM, Donato NJ, Perez-Soler R, Shin HJ, Wu JY, Zhang P, Lawhorn K, Khuri FR, Glisson BS, Myers J, Clayman G, Pfister D, Falcey J, Waksal H, Mendelsohn J, Hong WK (2001) Epidermal growth factor receptor-targeted therapy with C225 and cisplatin in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 7: 1204-1213
187. Shukla R, Geacintov NE, Loechler EL (1999) The major, N2-dG adduct of (+)-anti-B[a]PDE induces G-->A mutations in a 5'-AGA-3' sequence context. *Carcinogenesis* 20: 261-268
188. Singh J, Dobrusin EM, Fry DW, Haske T, Whitty A, McNamara DJ (1997) Structure-based design of a potent, selective, and irreversible inhibitor of the catalytic domain of the erbB receptor subfamily of protein tyrosine kinases. *J Med Chem* 40: 1130-1135
189. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191
190. Sizeland AM, Burgess AW (1992) Anti-sense transforming growth factor alpha oligonucleotides inhibit autocrine stimulated proliferation of a colon carcinoma cell line. *Mol Biol Cell* 3: 1235-1243
191. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W (1953) Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 6: 963-968
192. Smith CJ, Perfetti TA, Garg R, Hansch C (2003) IARC carcinogens reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log P values. *Food Chem Toxicol* 41: 807-817
193. Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer GP (2000) Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 92: 803-811
194. Spickenheuer A, Marczyński B, Raulf-Heimsoth M, Rihs H, Kociemba E, Brüning T, Pesch B (2007) Der Comet Assay aus statistischer Perspektive -Tail Length, % DNA im Schweif oder Olive Tail Moment? BGFA - Forschungsinstitut für Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung, Institut der Ruhr-Universität Bochum, Bochum und Fachbereich Statistik, Universität Dortmund, Dortmund
195. Srivastava SK, Watkins SC, Schuetz E, Singh SV (2002) Role of glutathione conjugate efflux in cellular protection against benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide-induced DNA damage. *Mol Carcinog* 33: 156-162
196. Steinsvag SK, Strand M, Berg O, Miaguchi M, Olofsson J (1991) Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* 101: 1323-1331

197. Sturgis EM, Pytynia KB (2005) After the smoke clears: environmental and occupational risks for carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Cancer J* 11: 96-103
198. Sutter AP, Hopfner M, Huether A, Maaser K, Scherubl H (2006) Targeting the epidermal growth factor receptor by erlotinib (Tarceva) for the treatment of esophageal cancer. *Int J Cancer* 118: 1814-1822
199. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurung E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH (1998) Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer Res* 18: 4793-4800
200. Teixido J, Gilmore R, Lee DC, Massague J (1987) Integral membrane glycoprotein properties of the prohormone pro-transforming growth factor-alpha. *Nature* 326: 883-885
201. Thompson DM, Gill GN (1985) The EGF receptor: structure, regulation and potential role in malignancy. *Cancer Surv* 4: 767-788
202. Tice RR, Strauss GH (1995) The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. *Stem Cells* 13 Suppl 1: 207-214
203. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35: 206-221
204. Timpson P, Lynch DK, Schramek D, Walker F, Daly RJ (2005) Cortactin overexpression inhibits ligand-induced down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res* 65: 3273-3280
205. Todaro GJ, Fryling C, De Larco JE (1980) Transforming growth factors produced by certain human tumor cells: polypeptides that interact with epidermal growth factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 5258-5262
206. Trigo J, Hitt R, Koralewski P, Diaz-Rubio E, Rolland F, Knecht R, Amellal N, Bessa EH, Baselga J, Vermorken JB (2004) Cetuximab monotherapy is active in patients (pts) with platinum-refractory recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN): Results of a phase II study. *ASCO Meeting Abstracts* 22: 5502
207. Ullrich A, Coussens L, Hayflick JS, Dull TJ, Gray A, Tam AW, Lee J, Yarden Y, Libermann TA, Schlessinger J, et al. (1984) Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. *Nature* 309: 418-425
208. Upadhyaya P, Hochalter JB, Balbo S, McIntee EJ, Hecht SS (2010) Preferential glutathione conjugation of a reverse diol epoxide compared with a bay region diol epoxide of benzo[a]pyrene in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 38: 1397-1402
209. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso

- M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R (2008) Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 359: 1116-1127
210. Wallner BC, Harreus UA, Gamarra F, Sassen A, Kleinsasser NH (2005) [Mini-organ cultures of human nasal mucosa. A model for ecogenotoxicological investigations]. *HNO* 53: 1037-1046
211. Wang LE, Xiong P, Zhao H, Spitz MR, Sturgis EM, Wei Q (2008) Chromosome instability and risk of squamous cell carcinomas of head and neck. *Cancer Res* 68: 4479-4485
212. Wang Y, Crisostomo PR, Wang M, Markel TA, Novotny NM, Meldrum DR (2008) TGF- $\alpha$  increases human mesenchymal stem cell-secreted VEGF by MEK- and PI3-K- but not JNK- or ERK-dependent mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R1115-1123
213. Ward CW, Hoyne PA, Flegg RH (1995) Insulin and epidermal growth factor receptors contain the cysteine repeat motif found in the tumor necrosis factor receptor. *Proteins* 22: 141-153
214. Ward CW, Garrett TP (2001) The relationship between the L1 and L2 domains of the insulin and epidermal growth factor receptors and leucine-rich repeat modules. *BMC Bioinformatics* 2: 4
215. Watkins D, Cunningham D (2007) The role of epidermal growth factor receptor-targeted antibody therapy in previously treated colorectal cancer. *Clin Colorectal Cancer* 6 Suppl 2: S47-52
216. Wei Q, Gu J, Cheng L, Bondy ML, Jiang H, Hong WK, Spitz MR (1996) Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer. *Cancer Res* 56: 3975-3979
217. Wei WI, Sham JS (2005) Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 365: 2041-2054
218. Wells A (1999) EGF receptor. *Int J Biochem Cell Biol* 31: 637-643
219. Wilkinson MG, Millar JB (2000) Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *FASEB J* 14: 2147-2157
220. Wood ER, Truesdale AT, McDonald OB, Yuan D, Hassell A, Dickerson SH, Ellis B, Pennisi C, Horne E, Lackey K, Alligood KJ, Rusnak DW, Gilmer TM, Shewchuk L (2004) A unique structure for epidermal growth factor receptor bound to GW572016 (Lapatinib): relationships among protein conformation, inhibitor off-rate, and receptor activity in tumor cells. *Cancer Res* 64: 6652-6659
221. Xie Z, Braithwaite E, Guo D, Zhao B, Geacintov NE, Wang Z (2003) Mutagenesis of benzo[a]pyrene diol epoxide in yeast: requirement for DNA polymerase zeta and involvement of DNA polymerase eta. *Biochemistry* 42: 11253-11262
222. Yang JM, Sullivan GF, Hait WN (1997) Regulation of the function of P-glycoprotein by epidermal growth factor through phospholipase C. *Biochem Pharmacol* 53: 1597-1604
223. Yarden Y, Ullrich A (1988) Growth factor receptor tyrosine kinases. *Annu Rev Biochem* 57: 443-478



224. Yarden Y, Ullrich A (1988) Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochemistry* 27: 3113-3119
225. Yarden Y, Sliwkowski MX (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 127-137
226. Yeh GC, Lopaczynska J, Poore CM, Phang JM (1992) A new functional role for P-glycoprotein: efflux pump for benzo(alpha)pyrene in human breast cancer MCF-7 cells. *Cancer Res* 52: 6692-6695
227. Yu Y, Dong W, Zhou X, Li S (2004) The significance of serum soluble intercellular adhesion molecule 1 and transforming growth factor alpha in patients with nasopharyngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 130: 1205-1208
228. Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS (2007) Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal* 19: 2013-2023
229. Zhou S, Lim LY, Chowbay B (2004) Herbal modulation of P-glycoprotein. *Drug Metab Rev* 36: 57-104

## 7.2 Abkürzungsverzeichnis

<b>%DNA</b>	% tail DNA
<b>ABC</b>	ATP-binding-cassette-Transporter
<b>ABCG2</b>	ABC-Halbtransporter G2
<b>AP1</b>	Aktivatorprotein 1
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>B[a]P</b>	Benzo[a]pyren
<b>BCRP</b>	Breast cancer resistance protein
<b>BEGM</b>	Bronchial Epithelial Growth Medium
<b>BPDE</b>	(Anti)Benzo[a]pyren-r-7, t-8-dihydrodiol-t-9,10epoxid
<b>C</b>	Cetuximab
<b>cMOAT</b>	Canalicular multispecific organic anion transporter
<b>CYP</b>	Cytochrom P 450 Oxidase
<b>DAG</b>	Diacyl-Glycerol
<b>DMEM</b>	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>E</b>	Erlotinib
<b>EGF</b>	Epidermal growth factor
<b>EGFR</b>	Epidermal growth factor receptor
<b>EH</b>	Epoxid-Hydrolase
<b>EMA</b>	European Medicines Agency – Europäische Arzneimittelbehörde
<b>ER</b>	Endoplasmatisches Retikulum
<b>ERK</b>	Extrazellulär-signalregulierte Kinase
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration – US-amerikanische Arzneimittelbehörde
<b>GRB2</b>	Growth factor receptor binding protein 2
<b>HB-EGF</b>	Heparin-binding-EGF-like-growth-factor
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxaethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure

<b>HPLC</b>	High performance liquid chromatography – Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>IARC</b>	International Agency for Research on Cancer der WHO
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>IQR</b>	Interquartilsabstand
<b>mAb</b>	Monoklonaler Antikörper
<b>MAPK</b>	Mitogen aktivierte Proteinkinase
<b>MDR</b>	Multi Drug Resistance
<b>MRP</b>	Multidrug-resistance-assoziierte Proteine
<b>OSAS</b>	Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
<b>OTM</b>	Olive tail moment
<b>PAH</b>	Polycyclische aromatische Kohlenwasserstoffe
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferter Kochsalzlösung
<b>PI3</b>	Phosphatidylinositol3-Kinase
<b>PIP2</b>	Phosphatidylinositol4,5-bisphosphat
<b>PIP3</b>	Phosphatidylinositol3,4,5-trisphosphat
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>PS</b>	Prostaglandin-H-Synthase
<b>SG / GSH</b>	Glutathion
<b>SOS</b>	Son of sevenless
<b>STAT</b>	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
<b>TGF100</b>	Transforming growth factor alpha 100 ng/ml
<b>TGF25</b>	Transforming growth factor alpha 25 ng/ml
<b>TGF50</b>	Transforming growth factor alpha 50 ng/ml
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	Transforming growth factor alpha
<b>TKI</b>	Tyrosinkinaseinhibitoren
<b>TRK</b>	Technische Richtkonzentration
<b>UPPP</b>	Uvulopalatopharyngoplastik

## 7.4 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Bedanken, die mich in meinem Studium und bei meiner Doktorarbeit unterstützt und begleitet haben.

Ganz besonderem Dank gilt...

... **Herrn Prof. Dr. med. Alexander Berghaus** für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der finanziellen Mittel.

... **Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Harréus** für die Ermöglichung der Promotion im Labor für klinisch experimentelle Onkologie und für die Hilfe bei der Korrektur und Vollendung der Arbeit.

... **Herrn Dr. med. Philipp Baumeister**, der mir das nötige Hintergrundwissen vermittelte. Ich danke Ihm für sein unablässiges Engagement, seine unvergleichliche Hilfsbereitschaft und Unterstützung. Ich kann mit fester Überzeugung behaupten, dass er der beste Betreuer der Welt ist.

... **Frau Sabina Schwenk-Zieger** für die Einführung in die Methodik. Durch ihre unablässige Hilfe, ihre brillanten Ratschläge und Ideen war sie unersetzlich für diese Arbeit und sie hatte immer ein offenes Ohr, in guten wie in schlechten Zeiten.

... **Frau Sandrin Mohn**. Dank ihres hingebungsvollen Einsatzes, bei schwierigem Sachverhalt, erhielt die Arbeit die nötige germanistische Korrektur.

... **meinen Eltern**, die mich so viele Jahre unterstützt und mir all das ermöglicht haben.

... **Marci und Pfevi**, die meine Höhen und Tiefen erdulden mussten und immer für mich da waren.

## 7.5 Publikationen aus der Arbeit

*Baumeister P, Heinrich K, Märte M, Reiter M, Schwenk-Zieger S, Harréus U (2011)*

The impact of EGFR stimulation and inhibition on BPDE induced DNA fragmentation in oral/oropharyngeal mucosa in vitro.

*Oral Oncology. 2011 Dec;47(12):1141-7. Epub 2011 Sep 7.*