

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. A. Berghaus

**Quantifizierung genotoxischer Schäden an humanen
Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes**

Dissertation

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

vorgelegt von

Paul Reinhart Schuller

aus

Bukarest

2008

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Berichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Ulrich Harréus
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Dr. Ulrich Welsch Prof. Dr. Rudolf Hatz
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	31.07.2008

Meinen lieben Eltern,
die mir die Erstellung dieser
Arbeit ermöglicht haben

Danksagung

Ich danke der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Ludwig-Maximilians-Universität München und ihrem ärztlichen Direktor, **Herrn Prof. Dr. med. A. Berghaus**, für die Bereitstellung der Forschungsräumlichkeiten, -Materialien und Proben.

Bei **Herrn PD Dr. med. C. Matthias** möchte ich mich herzlich für die Durchsicht des Textes bedanken.

Herrn **PD Dr. med. U. Harréus** gilt mein ganz besonderer Dank für die freundliche Überlassung des Themas sowie für die Unterstützung, die er mir stets zukommen ließ. Ich danke Ihm für die Korrektur des Textes, für die Bereitstellung der Labormaterialien und für seine hervorragende Betreuung.

In gleicher Weise danke ich den Mitarbeitern des Labors für klinisch-experimentelle Onkologie, die mir bei meiner Arbeit in kollegialer Weise zur Seite standen.

Vor allem möchte ich mich bei **Frau Sabina Zieger** bedanken, die mir als ständige Ansprechpartnerin mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Mutagenese und Kanzerogenese von Tumoren	4
1.2	Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes	6
1.2.1	<i>Epidemiologie</i>	8
1.2.2	<i>Endogene Risikofaktoren</i>	9
1.2.2.1	DNA-Reparatur	10
1.2.3	<i>Exogene Risikofaktoren</i>	11
1.2.4	<i>Schädigung der Erbsubstanz durch Fremdstoffe</i>	13
1.2.4.1	Benzo[a]pyren-diol-epoxid (BPDE)	14
1.2.4.2	N-Nitrosodiethylamin (NDEA)	16
1.2.4.3	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)	17
1.3	Darstellung von Genotoxizität	18
1.3.1	<i>Die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)</i>	18
1.3.2	<i>Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)</i>	20
1.4	Zielsetzung	23
2	Material und Methoden	24
2.1	Patienten	24
2.1.1	<i>Tonsillenschleimhaut von tumorfreien Spendern</i>	24
2.1.2	<i>Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillen-Karzinom</i>	24
2.1.3	<i>Laryngeale Schleimhaut von Spendern mit Larynx-Karzinom</i>	24
2.1.4	<i>Spender von Tonsillengewebe für Comet /Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung</i>	25
2.2	Materialien und Geräte	25
2.2.1	<i>Testsubstanzen</i>	25
2.2.2	<i>Färbungen und Chromosomensonden</i>	26
2.2.3	<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	26
2.2.4	<i>Herstellung der Gebrauchslösungen</i>	26
2.2.5	<i>Verbrauchsmaterialien</i>	29
2.2.6	<i>Geräte und Auswertungsprogramme</i>	29
2.3	Die alkalische Mikrogelelektrophorese	31
2.3.1	<i>Präparation des Testgewebes</i>	31
2.3.2	<i>Gewinnen von Einzelzellen</i>	32
2.3.3	<i>Bestimmen der Zellzahl und Vitalität</i>	32
2.3.4	<i>Präparation der Xenobiotika</i>	32
2.3.5	<i>Inkubation mit den Fremdstoffen</i>	33
2.3.6	<i>Reparatur</i>	33
2.3.7	<i>Aufbringen der Zellen auf Objektträger</i>	34
2.3.8	<i>Lyse der zellulären Membranen und Alkalische Elektrophorese</i>	34
2.3.9	<i>Färbung und digitale Auswertung</i>	35
2.3.10	<i>Statistische Ergebnisanalyse</i>	35
2.4	Comet Assay - Fluoreszenz in situ Hybridisierung	37
2.4.1	<i>Auswahl, Entnahme und Vorbereitung der Proben</i>	37
2.4.2	<i>Vorbereitung und Hybridisierung der DNA-Sonden</i>	37
2.4.3	<i>Auswaschen ungebundener DNA-Sonden</i>	37
2.4.4	<i>Gegenfärben der zellulären DNA</i>	38

2.4.5	<i>Datenspeicherung und digitale Auswertung</i>	38
2.4.6	<i>Quantifizierung der Schäden mit dem MCTM</i>	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Zellvitalitäten	40
3.2	Ergebnisse des Comet Assay	40
3.2.1	<i>DNA-Schädigung nach Fremdstoffinkubation</i>	<i>41</i>
3.2.1.1	DNA-Schädigung an Tonsillenschleimhaut von Kontrollpatienten	41
3.2.1.2	DNA-Schädigung an Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarzinom	42
3.2.1.3	DNA-Schädigung an Larynx-Schleimhaut von Spendern mit Larynx-Karzinom	43
3.2.2	<i>Vergleich gewebespezifischer Mutagensensitivität</i>	<i>44</i>
3.2.2.1	Mutagensensitivität von Tonsillenschleimhaut gesunder Spendern und von Spendern mit Tonsillenkarzinom	44
3.2.2.2	Mutagensensitivität von Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarzinom und von Larynxschleimhaut von Spendern mit Larynxkarzinom	45
3.2.3	<i>DNA-Reparatur nach Fremdstoffexposition</i>	<i>46</i>
3.2.3.1	DNA-Reparatur von Tonsillenschleimhaut tumorfreier Spender	46
3.2.3.2	DNA-Reparatur tonsillärer Schleimhautzellen von Spendern mit Tonsillenkarzinom	47
3.2.3.3	DNA-Reparatur laryngealer Schleimhautzellen von Spendern mit Larynx-Karzinom	48
3.2.4	<i>Vergleich der DNA-Reparatur verschiedener Kollektive</i>	<i>49</i>
3.2.4.1	DNA-Reparaturfähigkeit von Tonsillenschleimhaut von gesunden Spendern und Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarzinom	49
3.2.4.2	DNA-Reparaturfähigkeit von Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarzinom und Larynxschleimhaut von Spendern mit Larynxkarzinom	50
3.3	Ergebnisse von Comet/FISH	51
3.3.1	<i>DNA-Schädigung durch BPDE</i>	<i>51</i>
3.3.1.1	DNA-Schädigung an Chromosom 1	52
3.3.1.2	DNA-Schädigung an Chromosom 3	53
3.3.1.3	DNA-Schädigung an Chromosom 5	54
3.3.1.4	DNA-Schädigung an Chromosom 8	55
3.3.2	<i>Vergleich der untersuchten Chromosomen</i>	<i>56</i>
4	Diskussion	58
4.1	Auswahl und Epidemiologie des Spenderkollektivs	58
4.2	Diskussion des Testgewebes	59
4.3	Diskussion der Methoden	59
4.3.1	<i>Der Comet Assay</i>	<i>60</i>
4.3.2	<i>Die Kombination Comet/FISH</i>	<i>62</i>
4.3.2.1	Datengewinnung	63
4.3.2.2	Quantifizierung von Genschäden mit dem Munich Chromosomal Tail Moment	64
4.4	Diskussion der Testsubstanzen	65
4.4.1	<i>BPDE</i>	<i>65</i>
4.4.2	<i>NDEA</i>	<i>66</i>
4.5	Darstellung von DNA-Schäden mit dem Comet Assays	68
4.5.1	<i>Diskussion der genotoxischen Schädigung</i>	<i>68</i>
4.5.1.1	DNA-Schädigung bei den Spendergruppen	68
4.5.2	<i>Vergleich der DNA-Schädigung der einzelnen Spendergruppen</i>	<i>69</i>
4.5.2.1	Vergleich der DNA-Schädigung von Spendern mit und ohne Tonsillen-Karzinom	69

4.5.2.2	Vergleich der DNA-Schädigung von Spendern mit Karzinom der Tonsille und des Larynx	70
4.5.3	<i>Diskussion der DNA-Reparatur</i>	70
4.5.3.1	DNA-Reparatur der einzelnen Spendergruppen	71
4.5.4	<i>Vergleich der DNA-Reparatur der einzelnen Spendergruppen</i>	72
4.5.4.1	Vergleich der DNA-Reparatur von Tonsillengewebe von Patienten mit und ohne Tonsillenkarcinom	73
4.5.4.2	Vergleich der DNA-Reparatur von Patienten mit Tonsillenkarcinom und Larynxkarcinom	73
4.6	Darstellung von DNA-Schäden mit Comet/FISH	74
4.6.1	<i>Diskussion der Schädigung durch BPDE</i>	74
4.6.2	<i>Vergleich der chromosomalen Schädigung</i>	75
4.7	Ausblick	76
<u>5</u>	<u>Zusammenfassung</u>	<u>77</u>
<u>6</u>	<u>Literatur</u>	<u>79</u>
<u>7</u>	<u>Anhang</u>	<u>89</u>
7.1	Anamnesen der Patienten	89
7.1.1	<i>Tumorfremie Spender von Tonsillengewebe</i>	89
7.1.2	<i>Spender von Tonsillenschleimhaut mit Tonsillenkarcinom</i>	90
7.1.3	<i>Spender von Larynxschleimhaut mit Larynxkarcinom</i>	90
7.1.4	<i>Spender von tumorfreier Tonsillenschleimhaut für die Kombination Comet/FISH</i>	91
7.2	Verwendete Abkürzungen	92
7.3	Publikationen aus der Arbeit	93
7.4	Curriculum Vitae	94

1 Einleitung

1.1 Mutagenese und Kanzerogenese von Tumoren

Karzinomerkrankungen stellen weltweit eine der häufigsten Todesursachen dar. Allein in Deutschland waren laut Todesursachenstatistik im Jahr 2005 ungefähr ein Viertel der Todesfälle den verschiedenen Karzinomen zuzuschreiben. Zirka vier Prozent der Tumoren lagen dabei im Kopf-Hals-Bereich [Statistisches Bundesamt, 2006].

Bei der Entstehung eines Karzinoms geht man von einem multifaktoriellen Prozess aus. Dieser wird einerseits von exogenen Einflüssen getragen, welche die Erbsubstanz in Form der DNA in ihrer Integrität gefährden, andererseits durch Faktoren, die in der genetischen Ausstattung des Individuums selbst begründet sind und beispielsweise Einfluss auf die Reparatur vorhandener Schäden haben. Äußere Einflüsse mit schädigender Wirkung auf die DNA werden *genotoxisch* genannt [Wallner et al., 2005]. Genotoxische Substanzen sind in ihrer großen Mehrzahl unter den vielfältigen chemischen Verbindungen zu finden, die in unserer Umwelt und Arbeitswelt vorhanden sind.

Viele Chemikalien sind nicht a priori genotoxisch, sondern werden erst im Körper durch Metabolisierung zu einem Mutagen. Ähnlich treten durch den Metabolismus körpereigene Schadstoffe auf, zum Beispiel „freie Radikale“, welche durch ihr hohes Reaktionspotential körpereigene Moleküle wie die DNA schädigen können. Die Integrität der menschlichen DNA beruht auf dem komplexen und ausgeglichenen Zusammenspiel zwischen DNA-Schädigung und –Reparatur. Jedes Individuum ist mit Enzymen ausgestattet, die einmal entstandene Schäden an der DNA beheben können [Poulsen et Loft, 1995]. Die Kapazität und Qualität dieser Reparaturmechanismen ist individuell ausgeprägt und trägt wesentlich zum Erhalt eines funktionierenden, anpassungsfähigen und gesunden Organismus bei. Interindividuelle Variationen der genannten Mechanismen begründen die unterschiedliche Mutagensensitivität des Einzelnen.

Durch exogen oder endogen verursachte, fehlerhafte Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren oder Proto-Onkogene kann ein Tumor entstehen. Genauso ist die Inaktivierung von wachstumslimitierenden Faktoren, zum Beispiel die Apoptose regulierenden Genen, möglich. Das komplexe Zusammenspiel zwischen endogenen regulatorischen Mechanismen und gleichzeitig von außen einwirkenden schädigenden und schützenden Einflüssen erschwert den Nachweis einzelner Risikofaktoren *in vivo*. Zur Feststellung des Schadenspotentials einzelner Faktoren ist man deshalb auf *in vitro*-Versuche angewiesen. Neben den Gründen für die Entstehung einer malignen Erkrankung ist aber auch das Risiko des Einzelnen, eine solche Erkrankung zu entwickeln, von großem Interesse. Daher wird mittels *Biomonitoring* versucht, verschiedene endogene und exogene Risikofaktoren des Einzelnen gebündelt zu untersuchen.

Bei der Überprüfung verschiedener Substanzen auf ihre Genotoxizität fiel auf, dass nicht nur die Auswahl der Stoffe selbst, sondern auch die Reihenfolge ihrer Applikation für die Ausprägung eines Karzinoms entscheidend ist [McCarver et Hines, 2002]. Desweiteren ist nach der Mehrstufenhypothese für die maligne Entartung einer Körperzelle die Mutation mehrerer Tumorsuppressorgene und Protoonkogene notwendig [Hildebrandt, 1999]. Diese vollzieht sich in drei Phasen:

- Die Initiierung: Man versteht hierunter die Auslösung von Mutationen, die irreversible Transformation der DNA, welche auf die Tochterzellen übertragen werden kann.
- Die Latenzperiode: Während der sogenannten Realisation der genetischen Veränderung kommt es zur Proliferation der initiierten Zellen, zur Bildung von Tumorzellen mit Kernatypien und Kernpolymorphien; man geht von einem Zeitraum von 15 bis 20 Jahren aus, die Phase kann durch Synkanzerogenese, Kokanzerogenese und verschiedene Promotoren verkürzt werden.
- Die klinische Manifestation: Das Karzinom wird klinisch fassbar, in frühen Stadien als *Carcinoma in situ*, als infiltrativ wachsender Tumor oder bereits mit Metastasen.

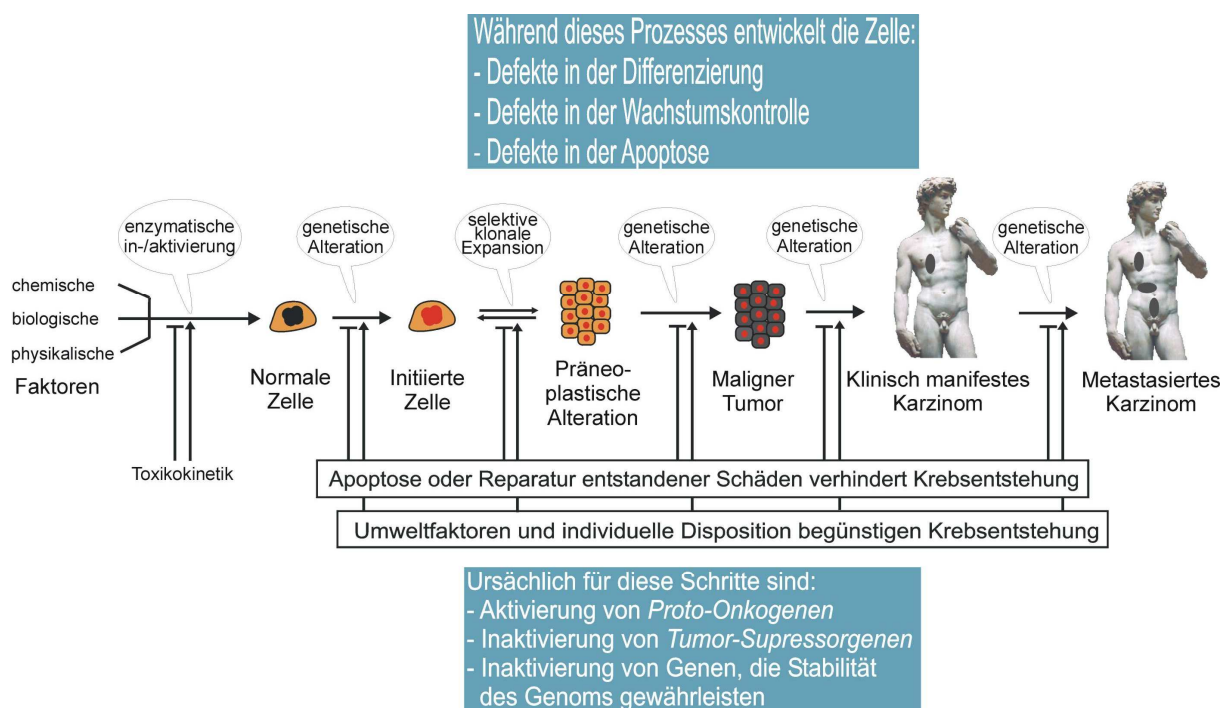


Abbildung 1: Die Entstehung eines malignen Tumors geht in drei Schritten vor sich; weitere Veränderungen führen zum klinisch manifesten Tumor mit evtl. Metastasen. Nach: [Praet, 2003].

In den letzten Jahren wurden viele Gene mit Einfluss auf das Zellwachstum nachgewiesen. Aufgrund der Art und Weise ihrer Einflussnahme auf die Zellproliferation werden sie grob in zwei Klassen eingeteilt:

Proto-Onkogene fungieren als Wachstums- und Differenzierungsregulatoren. Sie wirken durch ihre codierten Proteine promotiv. Wenn sie aufgrund von Mutation oder Amplifikation aktiviert werden, werden diese Gene zu Onkogenen. Die Zellen unter dem Einfluss der Onkogene vermehren oder differenzieren sich unkontrolliert. *Tumor-Suppressorgene* sind Gene, die den Zellzyklus bremsen und einer übermäßigen Vermehrung

von Zellen entgegen wirken. Durch Mutationen mit Funktionsverlust des codierten Proteins fällt die hemmende Wirkung weg und die beeinflussten Zellen vermehren sich ungehindert [Poulsen et Loft, 1995].

Als Ursache für die Mutation der DNA und das Ausbilden maligner Eigenschaften kommen sowohl chemische, als auch physikalische oder biologische Einflüsse in Frage. Allgemein werden zwei Arten von Kanzerogenen unterschieden: *Tumorinitiatoren* verändern die DNA durch Interaktion im Sinne einer Mutation. *Tumorpromotoren*, wie beispielsweise Wachstumsfaktoren, beschleunigen das Wachstum eines vorhandenen Tumors, ohne jedoch selbst das Potential zur Mutation der DNA zu besitzen [Pöschl et Seitz, 2004]. Diese Einflüsse können einzeln oder zusammen in allen drei Phasen der Krebsentstehung wirksam werden:

- Bei der **Initiation** durch Auslösung direkter bzw. indirekter Schäden oder die Behinderung von körpereigenen Reparaturprozessen.
- Bei der **Promotion** durch Begünstigung der Zellproliferation.
- Bei der **Progression** durch Unterdrückung von Immun-Reaktionen und Begünstigung des Tumorwachstums.

Mit zunehmender Kenntnis der Entstehungsmechanismen wird der Schwerpunkt immer mehr auf präventive Maßnahmen verlagert, um so die Inzidenz maligner Tumoren zu verringern. Beim einzelnen Patienten kann unter Umständen der Ausbruch einer malignen Erkrankung verhindert werden, so dass eine nebenwirkungsreiche Therapie und langfristige Nachbehandlung nicht notwendig werden. Als Nebenaspekt kann durch vergleichsweise kostengünstige Präventionsmaßnahmen eventuell die Notwendigkeit teurer Therapien manifester Krebserkrankungen wegfallen. Eine erfolgreiche Prävention ist jedoch nur durch die Identifizierung von Gefahrstoffen beziehungsweise besonders gefährdeter Personengruppen möglich [Bartsch et al., 1999].

1.2 Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes

Fremdstoffe aus der Umwelt können über mehrere Wege mit den Zellen des menschlichen Organismus in Interaktion treten. Zum Beispiel werden fettlösliche Substanzen, wie das Pestizid Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), gut über die Haut aufgenommen und können so ihre Wirkung im Körper entfalten [Forawi et al., 2004]. Die Aufnahme von Fremdstoffen aus der Atemluft und aus der Nahrung überwiegt aber bei weitem. Ihr Weg führt durch Nase bzw. Mund über den Rachen (*Pharynx*) bzw. Kehlkopf (*Larynx*) in tiefer liegende Luft- bzw. Verdauungswege.

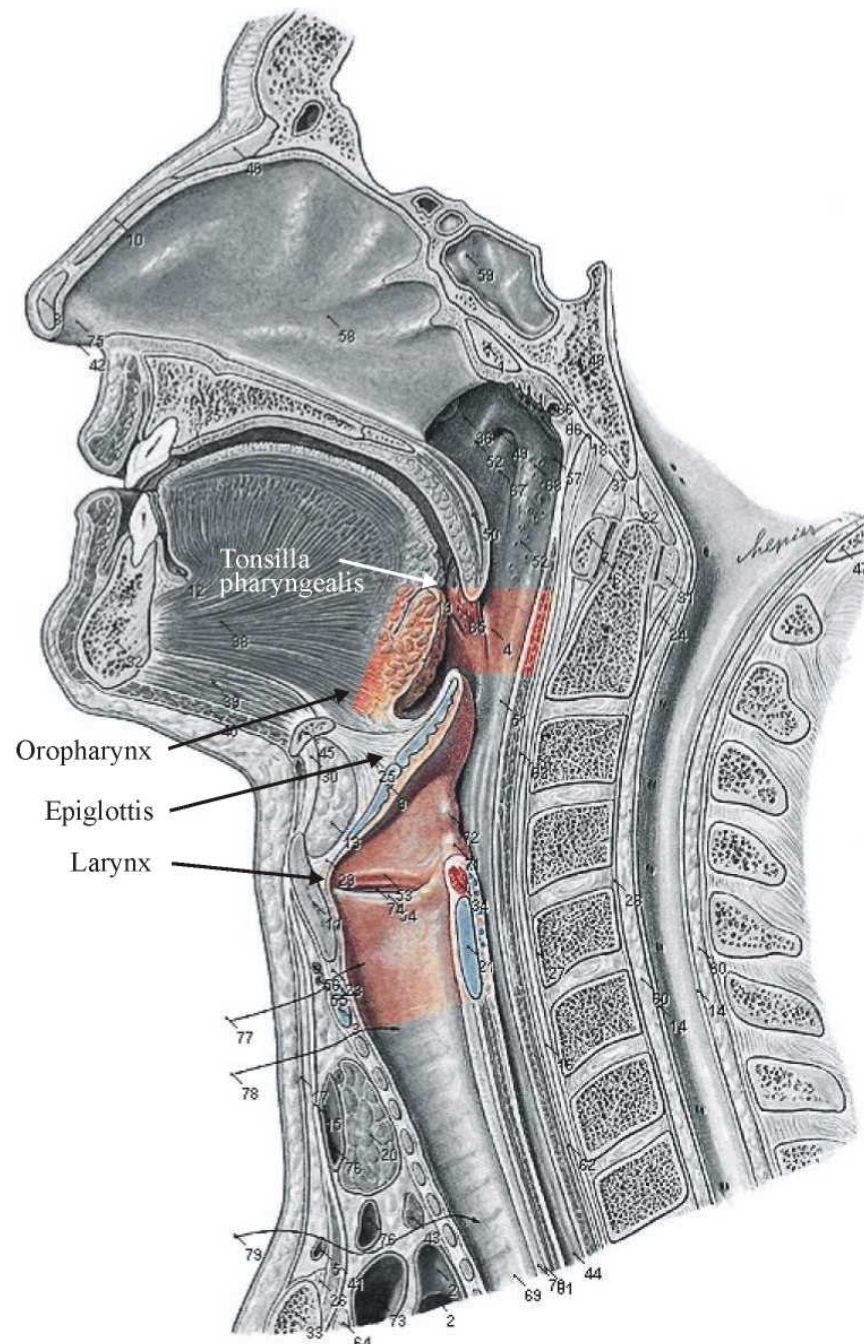


Abbildung 2: Medianschnitt durch den Kopf mit Abbildung des oberen Aerodigestivtraktes. Grafik mit Genehmigung aus: Sobotta Atlas der Anatomie des Menschen [Putz et Pabst, 1997]

Der Pharynx ist in Nasopharynx, Oropharynx und Hypopharynx unterteilt. Der Oropharynx erstreckt sich vom Unterrand des Gaumensegels (*velum palatini*) bis zum Oberrand des Kehldeckels (*epiglottis*) und beinhaltet die Gaumenmandel (*tonsilla palatina*). Darunter befindet sich der Hypopharynx, der in den Kehlkopf (*Larynx*) übergeht (siehe Abbildung 2). Im Oropharynx kreuzen sich der Weg der Atemluft und der Speise. Auf der Mukosa in diesem Bereich schlagen sich Partikel sowohl aus Luft, als auch aus der Nahrung, nieder. Die exponierte Lokalisation erklärt auch, warum viele Krankheitserreger den Oropharynx als Eintrittspforte nutzen. Zur deren Abwehr befinden sich immunkompetente Zellen in den Tonsillen. Diese spannen sich im sogenannten Waldeyer'schen Rachenring um den Pharynx. Ein weiterer Grund für die hohe Belastung des Oropharynx liegt in den herrschenden

Strömungsverhältnissen. Die Luftturbulenzen beim Ein- und Ausatmen sorgen für das „Abzentrifugieren“ von Schwebestoffen aus der Luft, wobei Partikel zwischen 4 und 9 µm zu fast 80 Prozent in den nasalen Luftwegen abgesetzt werden. Größere Partikel (10 bis 30 µm) dagegen werden bereits in der vorderen Nase eliminiert [Keck et al., 2000].

Oberhalb des Larynx trennen sich Luft- und Speiseweg wieder, die Atemluft wird in die Trachea geleitet, Speisen gelangen in den Oesophagus. Luftströmungen ähnlichen zu denen im Oropharynx sorgen auch hier für Ablagerungen von Schwebestoffen, außerdem werden durch das respiratorische Flimmerepithel Fremdstoffe retrograd aus den unteren Abschnitten in Richtung Larynx transportiert und dort akkumuliert.

1.2.1 Epidemiologie

1998 machten die Malignome des Kopf-Hals-Bereiches 6,8 % aller malignen Neuerkrankungen bei Männern aus und waren zusammen mit dem Harnblasenkarzinom auf Rang vier hinter Prostata-, Lungen-, und kolorektalem Karzinom vertreten. Die geschätzte altersstandardisierte Inzidenz lag im selben Jahr bei 24,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Männern. Der Altersgipfel maligner Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich liegt im sechsten Lebensjahrzehnt. Der im Vergleich zu anderen malignen Neuerkrankungen frühe Beginn führt dazu, dass im Alter zwischen 40 und 59 Jahren fast 10 % aller durch Malignome verursachten Todesfälle auf Tumoren des Kopf-Hals-Bereiches zurückzuführen sind.

Unter den malignen Neoplasien des oberen Aerodigestivtraktes ist die Inzidenz der Karzinome des Larynx und des Oropharynx am größten. Die epidemiologische Auswertung des Tumorregister München ergab die Anzahl von 8,8 neu aufgetretenen Larynxkarzinomen bzw. 6,1 neuen Oropharynxkarzinomen pro 100.000 männlichen Einwohnern [Schlesinger-Raab et al., 1998]. Bei Frauen war das Zungenkarzinom mit 1,5 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen am häufigsten, mit je 1,4 Neuerkrankungen pro 100.000 folgten gleichauf an zweiter Stelle die Karzinome des Oropharynx und Hypopharynx, an dritter Stelle das Karzinom des Larynx mit einer Inzidenz von 1,2 je 100.000 Frauen.

Mit einem Anteil von über 90 % sind Plattenepithelkarzinome der überwiegende Teil der malignen Neoplasien im Kopf-Hals-Bereich. Männer sind wesentlich häufiger als Frauen betroffen, je nach Tumorentität zwischen ein bis fünf mal häufiger beim Hypopharynxkarzinom und bis zu zwanzig mal häufiger beim Larynxkarzinom [Jakse et Vinzenz, 1992]. Der Hauptgrund dafür liegt hauptsächlich in dem gegenüber gleichaltrigen Frauen deutlich erhöhtem Alkohol- und Tabakkonsum der erkrankten Männer begründet, welcher als Hauptrisikofaktor bekannt ist [Genden et al., 2002; Pöschl et Seitz, 2004]. Weiterhin wird die berufliche Exposition gegenüber Fremdstoffen wie polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen oder Nickel, Chrom und verschiedenen Stäuben mit Karzinomen des oberen Kopf-Hals-Bereichs ursächlich in Verbindung gebracht, sowie verschiedene Viren wie dem Epstein-Barr-Virus, welche ätiologisch mit den Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes vergesellschaftet sind.

In dieser Arbeit wurden aufgrund der beschriebenen Häufigkeit der Tumorlokalisation Patienten mit Larynxkarzinomen und Oropharynxkarzinomen untersucht.

1.2.2 Endogene Risikofaktoren

Die Entstehung maligner Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich wird durch endogene und exogene Risikofaktoren beeinflusst. Endogene Faktoren liegen in der genetische Ausstattung des Einzelnen begründet und sind nicht beeinflussbar.

Interindividuell unterschiedliche Gensequenzen für das selbe Protein, sogenannte genetische Polymorphismen, bedingen die individuelle Leistungsfähigkeit verschiedener Stoffwechselwege. Im Falle der Metabolisierung kanzerogener Substanzen beeinflussen sie auf diese Weise die *Suszeptibilität* des Einzelnen. Besondere Auswirkungen auf die Suszeptibilität haben dabei genetische Polymorphismen von Genen, die den Zellzyklus steuern oder für Proteine der DNA-Reparatur codieren. Im Vergleich zu Kontrollgruppen erhöhen verschiedene Polymorphismen das relative Risiko, an Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes zu erkranken, auf mehr als das Doppelte [Hall et al., 2007]. Als weiteres Beispiel kann die *Biotransformation* dienen, welche die Ausscheidung schlecht wasserlöslicher Stoffe ermöglicht. Funktionelle Gruppen der zu eliminierenden Substanz werden von Phase-I-Enzymen wie Cytochrom-P-450-abhängigen (CYP) Monooxygenasen durch Oxidation oder Reduktion verändert, so dass Reaktionen mit anderen Molekülen wie Glucuronsäure, jedoch auch der DNA erleichtert werden. Viele Karzinogene, wie das in der vorliegenden Arbeit getestete BPDE, werden auf diese Weise aktiviert. Eine Induktion des Enzymsystems, zum Beispiel durch chronische Ethanolingestion, kann zu einer vermehrten Aktivierung von Kanzerogenen führen [Cai et al., 1997; Lieber et al., 1987].

In Phase II wird die Konjugation der zu eliminierenden Substanz an stark polare Moleküle vermittelt; die „Entgiftung“ von BPDE beispielsweise geschieht über Glutathion-S-Transferase (GST), welche hauptsächlich in Lunge und Leber in verschiedenen Isoenzymen vorkommt [Wang et al., 2000].

Eine genetisch bedingte hohe Aktivität der Phase-I-Enzyme und eine schwache Aktivität der Phase-II-Enzyme können aufgrund schneller Aktivierung und langsamer Ausscheidung von Karzinogenen eine höheres Malignitätsrisiko bedingen, wie verschiedene Studiengruppen anhand der Auswirkung von Mutationen an CYP und GSTM auf die Anzahl der DNA-Addukte nachweisen konnten [Bartsch et al., 1999; Rojas et al., 2000]. Eine *CYP1A1* mit normaler Umsatzrate hatte in Kombination mit der funktionslosen Mutante von *GSTM1* signifikanten Einfluss auf die Anzahl von DNA-Addukten in den Leukozyten der Testpersonen.

Mutationen sind vererbare Veränderungen der genetischen Information [Brown, 1999]. Sie ermöglichen die Anpassung an veränderte Umweltbedingungen und sind Grundlage der Evolution. Durch die Mutation wichtiger Gene, zum Beispiel von Tumorsuppressorgenen, können bei Funktionsverlust auch erhebliche Nachteile für die Zelle oder den Organismus entstehen. Mutationen an Tumorsuppressorgenen oder Proto-Onkogenen können die Entstehung von Karzinomen ebenfalls beeinflussen.

Ein Beispiel ist das Tumorsuppressorgen p53, dessen Protein in zahlreiche Zellfunktionen, wie der Transkription, der DNA-Reparatur und der Kontrolle des Zellzyklus involviert ist. Bei starker Beschädigung der DNA kann es in einer Reaktionskaskade die Apoptose auslösen, bevor sich die Zelle vermehren und ein Karzinom verursachen kann [Harris, 1996]. Laut

Hussain lässt sich bei der Hälfte aller menschlichen Karzinome eine Mutation am Gen für p53 nachweisen [Hussain et al., 2001].

Zum Schutz der genetischen Stabilität haben sich im Laufe der Evolution verschiedene DNA-Reparaturmechanismen herausgebildet. Auf sie wird in Punkt 1.2.2.1 näher eingegangen.

1.2.2.1 DNA-Reparatur

Die Unversehrtheit der genetischen Information ist Voraussetzung für das Überleben des Individuums und einer Spezies. Als Reaktion auf genotoxische Einflüsse kann bei der sogenannten SOS-Antwort über verschiedene Transmitter, wie dem p53, der Zellzyklus angehalten werden, so daß die Zelle DNA-Schäden über verschiedene Reparaturmechanismen beseitigen kann. Sollte dies nicht möglich sein, kann zum Schutz des Organismus die Apoptose der Zelle ausgelöst werden [Abid-Essefi et al., 2003].

Normalerweise wird durch die spezifische Paarung der Basen in der DNA gewährleistet, dass sich der codierende und anticodierende DNA-Strang gegenseitig stabilisieren und die Matrizen- und die Kopiedoppelhelix bei der DNA-Replikation identisch sind [Watson et Crick, 1953]. Aufgrund der fortwährenden Veränderung der DNA durch die Vielfalt der mutagenen Einflussfaktoren sind effektive Mechanismen zur Sicherung der genetischen Stabilität essentiell, um die an der DNA aufgetretenen Veränderungen zu reparieren.

Trotz Unterschiede in der Enzymausstattung bei prokaryotischen und eukaryotischen Zellen sind die Prinzipien der DNA-Reparatur beider Zelltypen vergleichbar. Vier wichtige Reparaturmechanismen werden hier kurz erklärt:

- Aufgrund einer verzerrten Bindungsgeometrie kann es bei der Replikation zu einer falschen Basenpaarungen kommen. Bereits während der DNA-Synthese kann ein Enzym des DNA-Polymerase-Komplexes das fälschlicherweise eingebaute Nukleotid entfernen.
- Die Mismatch-Reparatur erfolgt erst nach abgeschlossener Replikation, kann dafür aber auch Insertionen bei der Replikation der DNA am Kopiestrang erkennen und entfernen. Patienten mit hereditärem nicht-polipösen Colonicarcinom (HNPCC) weisen häufig Mutationen an MLH1 und MSH2 auf; diese Gene codieren für Proteine der Mismatch-Reparatur [Taylor et al., 2003].
- Für die Basen-Exzisionsreparatur werden mehrere tausend Basenpaare pro Sekunde nach Nukleotidschäden durchsucht. Geschädigte Basen werden aus der N-glykosidischen Bindung zur Desoxiribose herausgetrennt, der entstandene depurinierte Zucker aus dem DNA-Strang exzidiert und die Lücke wieder durch eine DNA-Polymerase geschlossen.
- Die Nukleotid-Exzisionsreparatur ist die häufigste und umfassendste Form der DNA-Reparatur. Beschädigte Basen, Thymin-Dimere und längere Insertionen sind typisches Ziel dieser Reparaturform. Anders als bei der Basen-Exzisionsreparatur wird nicht die schadhafte Base aus dem Desoxyribose-Gerüst der DNA herausgetrennt, sondern ein oder mehr Nukleotide werden markiert, indem in den betroffenen DNA-Strang vor und nach den betroffenen Nukleotiden künstlich Einzelstrangbrüche (sogenannte *nicks*) eingefügt werden und das komplette Segment entfernt und abgebaut wird. Das

komplette Segment wird von DNA-Polymerase neu gebildet und über die DNA-Ligase mit dem ursprünglichen Strang verknüpft. Versuche an Zelllinien mit mangelhafter Enzymausstattung für diese Reparaturform erbrachten, dass die Nukleotid-Exzisionsreparatur hauptverantwortlich für die Beseitigung von Schäden durch PAH ist [Braithwaite et al., 1998].

Speit und Hartmann konnten durch einen Vergleich der Reparaturfähigkeit normaler und Xeroderma-Pigmentosum-Zelllinien nachweisen, dass ein Großteil der durch mutagene Substanzen induzierte Schaden über DNA-Exzisionsreparatur beseitigt wird [Speit et Hartmann, 1995]. Die beiden letztgenannten Reparaturmethoden involvieren absichtlich eingefügte Einzelstrangbrüche, welche mit dem Comet Assay quantitativ dargestellt werden können. Eine Unterscheidung der Mechanismen ist jedoch nicht möglich [Olive et Banath, 1993].

Anhand von Lymphozyten wurden bei Patienten mit Karzinomen des Nasopharynx mit dem Comet Assay Unterschiede in der Suszeptibilität von Tumorpatienten und Kontrollpersonen untersucht [Kleinsasser et al., 2001b]. Ein direkter Vergleich der Mutagensensitivität oder des Reparaturverhaltens von Mukosazellen des Larynx oder Oropharynx konnte an den üblichen Literaturstellen nicht gefunden werden.

1.2.3 Exogene Risikofaktoren

Biologische, chemische und physikalische Einflüsse wirken zu jeder Zeit auf den Menschen ein. Um ihr Gefahrenpotential zu entfalten, bedürfen sie der Aufnahme. Während auf endogene Risikofaktoren nur wenig Einfluss genommen werden kann, ist es möglich, sich vor den adversen Effekten exogener Risikofaktoren durch Vermeidung zu schützen.

Die Stoffe, die aufgrund ihres intensiven und direkten Kontaktes mit den Zellen des oberen Aerodigestivtraktes das höchste Gefahrenpotential bergen, sind Alkohol und Tabak. Sich gegenseitig verstärkende Effekte der schädlichen Einflüsse beider Genussmittel konnten in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden. Bei gleichzeitiger Aufnahme waren die verursachten Schädigungen im Bereich von Hypopharynx und Larynx multiplikativ [Menvielle et al., 2004]. In einer Studie von Lieber wurde dies unter anderem darauf zurückgeführt, dass chronischer Alkoholkonsum Alkoholdehydrogenasen und Cytochrom P-450 induziert, so dass Nitrosamine und andere Karzinogene schneller in ihre metabolisch aktiven Substanzen umgewandelt werden [Lieber, 1997]. Akuter Alkoholkonsum hemmt diesen Vorgang jedoch kompetitiv [Lieber et al., 1987].

Dabei deuteten verschiedene Studien auf eine kokanzero gene und promotorische Wirkung von Ethanol hin, vermittelt zum Beispiel über oben genannte Enzyminduktionen, der Wirkung als Lösungsmittel für andere Kanzerogene oder Eingriffen in den Folsäurestoffwechsel, während der Metaboliten Acetaldehyd das eigentliche Kanzerogen ist [Boffetta et Hashibe, 2006; Meskar et al., 2001]. Mehrere Autoren schreiben Ethanol selbst kanzerogenes Potential zu, da es Hinweise darauf gibt, dass es die Reparatur alkylierter DNA beeinträchtigt. [Pöschl et Seitz, 2004; Riedel et al., 2003].

Tabakrauch ist in zahlreichen Untersuchungen als der häufigste allein wirksame Grund für Krebserkrankungen in industrialisierten Ländern identifiziert worden [Bartsch et al., 1999; Godschalk et al., 2002]. Ein ursächlicher Zusammenhang konnte nicht nur für die Lunge nachgewiesen werden, sondern auch für andere organspezifische Karzinome, wie solche des oberen respiratorischen Traktes und der Harnblase [Kälble, 2001]. Beim Abbrennen einer Zigarette entstehen neben Kohlenmonoxidverbindungen verschiedene organische und anorganische Verbindungen, wovon ca. 40 als Karzinogene bekannt sind. Darunter sind neben PAHs und anderen Pyrolyseprodukten N-Nitrosamine, aromatische Amine, Acetaldehyde, Formaldehyde und Benzol nachweisbar.

Durch die Gruppe der *polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe* (PAH) sind besonders Arbeiter von Eisen-, Stahl-, Rohöl- und Teerverarbeitenden Betrieben gefährdet. Durch die Verbrennungsvorgänge bei hohen Temperaturen ist die Konzentration der PAH an obengenannten Arbeitsplätzen stark erhöht [Boffetta et al., 1997]. Der Zusammenhang zwischen unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten, namentlich der Aufnahme fermentierter Fischsoße, und der vermehrten Entstehung von Karzinomen im oberen Aerodigestivtrakt, konnte in einer Studie in der chinesischen Provinz Guandong nachgewiesen werden [Ke et al., 2002]. In der vorliegenden Arbeit werden einige Vertreter aus dieser Gruppe auf ihre schädigenden Einflüsse auf die DNA von Schleimhautzellen des Oropharynx und Larynx hin untersucht.

Die Anzahl der durch physikalische oder biologische Interaktion induzierten Karzinome ist relativ zu den chemisch induzierten gering. Physikalischen Einfluss auf die DNA nimmt hauptsächlich ionisierende Strahlung wie UV- oder Röntgenstrahlung. Ein starker Zusammenhang zwischen der Bildung von Basaliomen oder Melanomen und der Exposition der Haut gegenüber UV-Licht konnte nachgewiesen werden [Perlis et Herlyn, 2004].

Biologische Faktoren können durch eine Änderung des Milieus, beispielsweise eine chronische Infektion, oder auf der Ebene der Erbinformation auf humanen Zellen einwirken. Für Träger von *Helicobacter pylori* besteht, abhängig von verschiedenen Virulenzfaktoren, ein bis zu 7,4-fach gesteigertes Risiko für ein Magenkarzinom [Held et al., 2004]. Die Billharziose, die durch parasitäre Pärchenegelarten (*Schistosomen*) ausgelöst wird, begünstigt das Auftreten bösartiger Erkrankungen der Harnblase und gilt als Präkanzerose [Kälble, 2001].

Viren können direkt das Genom der Zellen verändern; wenigstens 95% aller Karzinomzellen der Cervix uteri tragen virale Erbinformation in sich, bis zu 80% DNA davon stammt vom *humanen Papillomavirus* (HPV) [Moscarini et al., 2004]. Besonders bei jüngeren Patienten gilt neben den „klassischen“ Risikofaktoren, Rauchen und Alkohol, HPV als besonderer Risikofaktor für das in dieser Arbeit untersuchte Tonsillenkarzinom [Syrjänen, 2004]. Möglicherweise gehen die in infizierten Zellen erstellten Proteine E6 und E7 mit den Genprodukten der zellulären Tumor-Suppressorgene p53 und pRB Komplexe ein und beeinträchtigen deren wachstumshemmende Wirkung [Duensing et Münger, 2004].

Das Epstein-Barr-Virus gehört zu den ubiquitären humanen Herpesviren. Es ist ätiologisch mit Lymphomen, vor allem dem Burkitt-Lymphom, vergesellschaftet, es gibt aber auch eine eindeutige Verbindung zum nicht keratinisierenden Nasopharynxkarzinom [Ambinder, 2003]. Von der IARC wird es als Karzinogen der Gruppe 1 eingestuft. Wahrscheinlich ist EBV an

der Entstehung des Tonsillenkarcinoms beteiligt, laut einigen Autoren besteht bei gleichem Wirkungsmechanismus sogar eine stärkere Assoziation als beim humane Papillomavirus [Szkaradkiewicz et al., 2002].

1.2.4 Schädigung der Erbsubstanz durch Fremdstoffe

Um die Gefahr, die durch bestimmte Stoffe ausgeht, zu minimieren, werden maximal zulässige Expositionszeiträume oder Höchstkonzentrationen für genotoxische Stoffe, zum Beispiel am Arbeitsplatz oder in der Umwelt, festgelegt. Aufgrund der kumulativen Wirkung vieler Substanzen können Grenzwerte, bei denen eine Gefährdung ausgeschlossen ist, nicht angegeben werden [Lutz, 2002].

In Deutschland wurden *Maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK)* als höchstzulässige, die Gesundheit im allgemeinen nicht beeinträchtigende Konzentration eines Arbeitsstoffes definiert. Die Kanzerogenität oder Keimzellmutagenität wird darüber über *Technische Richtkonstanten (TRK)* hinaus gesondert bewertet und gekennzeichnet. *TRK* dienen unter Angabe des Restrisikos als Richtwerte zur Kontrolle der getroffenen Schutzmaßnahmen. Außerdem untersuchen die Deutsche Forschungsgemeinschaft und verschiedene andere Forschungseinrichtungen Stoffe auf ihr genotoxisches Potential hin und klassifizieren Kanzerogene nach folgende Tabelle [Greim, 1998]:

MAK	EU	IARC	TLV
A1 Krebserzeugend beim Menschen	1 Krebserzeugend beim Menschen	1 Carcinogenic to humans	A1 Confirmed human carcinogen
A2 Krebserzeugend im Tierversuch	2 Begründete Annahme für krebserzeugende W ir- kung beim Menschen	2 A Probably carcino- genic to humans	A2 Suspected human carcinogen
B Verdacht auf krebserzeugende W irkung	3 Unzureichende Anhalts- punkte für krebserregende W irkung beim Menschen 3 a gut untersuchte Stoffe 3 b unzureichend untersuchte Stoffe	2 B Possibly carcinogenic to humans	A3 Animal carcinogen
		3 N ot classifiable as to its carcinogenicity to humans	A4 N otclassifiable aashuman carcinogen
		4 Probably not carcino- genic to humans	A5 N ot suspected as a human carcinogen

Tabelle 1: Die Klassifizierungssysteme verschiedener internationaler Forschungseinrichtungen für krebserzeugende Stoffe im Überblick

Beispielhaft für Substanzen mit genotoxischen Eigenschaften werden in der vorliegenden Arbeit zwei Stoffe, deren DNA-schädigendes Potential bekannt ist, verwendet, um die Sensitivität von Zellen aus dem oberen Aerodigestivtrakt zu untersuchen.

1.2.4.1 Benzo[a]pyren-diol-epoxid (BPDE)

Das in den Versuchen verwendete (*anti*)Benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid (BPDE) ist ein Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH). PAH sind aufgrund ihrer Flüchtigkeit und ihre chemisch-physikalischen Eigenschaften sehr variabel. Viele werden durch die Luft transportiert und sind dort in Konzentrationen zwischen 0,1 und 1 ng/m³ in ländlichen Gebieten und 30 ng/m³ in der Nähe von Industrieanlagen nachweisbar. Außerdem werden PAH sehr leicht über die Haut aufgenommen.

BPDE entsteht im Körper durch die enzymatische Umwandlung aus Benzo[a]pyren (B[a]P). Von der IARC wurde BPDE mit B[a]P lange Zeit in die Gruppe 2A eingestuft. Inzwischen liegen ausreichende Beweise für eine Kanzerogenität der Substanz beim Menschen vor, mit der aktuellen Ausgabe der Monographien ist die Substanz in die Gruppe 1 eingeordnet worden. Die karzinogene Wirkung wird durch die Bildung von Addukten an die DNA vermittelt. Die Verwendung von DNA-Addukten als Biomarker, der die Suszeptibilität Einzelner für Kanzerogene aus seiner Umgebung vorhersagen könnte, scheint gerechtfertigt [Bartsch et al., 1999].

B[a]P entsteht im Allgemeinen bei der Karbonisierung, bei der Pyrolyse und bei unvollständiger Verbrennung organischer Materialien [Garry et Nesslany, 2003]. So sind beispielsweise Arbeiter von Kokereien erhöhten Konzentrationen von B[a]P ausgesetzt. Arnould et al. wiesen eine erhöhte Anzahl von DNA-Addukten in deren Leukozyten und eine erhöhte Konzentrationen des Abbauprodukts 1-Hydroxypyren (1-OHP) im Urin nach [Arnould et al., 2001]. B[a]P wurde ebenfalls bei der Steinkohleproduktion, der Eisen- und Stahlverhüttung, bei der industriellen Herstellung von Graphitelektroden, von Calciumcarbid, der Raffinierung von Teer und bei der Aluminiumreduktion nachgewiesen [Boffetta et al., 1997]. Auch bei nichtindustriellen Prozessen bildet sich B[a]P bei der Verbrennung organischer Verbindungen. Es kommt in Dieselabgasen vor, bei der Nahrungszubereitung durch Garen über offenem Holz- oder Kohlefeuer, zum Beispiel beim Grillen. B[a]P wird auch in besonders hohen Dosen aus Tabakrauch aufgenommen, so dass man zusammenfassend von einem ubiquitären Auftreten sprechen kann [Garry et Nesslany, 2003]. Eine TRK zum Schutz vor den adversen Effekten von Benzo[a]pyren existiert mit dem Maximalwert von 0,002 mg/m³.

Anstatt des in der Umwelt rein vorkommenden B[a]P wurde in der vorliegenden Arbeit das direkt schädigende Metabolit BPDE verwendet. Die Inkubationsdauer während der Versuche lag bei 60 Minuten. Weil die Transformation von B[a]P zu BPDE einige Zeit beansprucht und die Phase-I-Enzyme, welche die Umwandlung katalysieren, vor allem in der Leber exprimiert werden, kann bei Verwendung von B[a]P nicht von einer wirksamen oder gleichbleibenden Konzentration des ultimativ wirksamen Xenobiotikums BPDE im Comet Assay-Modell ausgegangen werden.

BPDE selbst entsteht im Körper als elektrophiler reaktiver Metabolit aus Benzo[a]pyren. Monoxigenasen im Cytochrom P450-System wie CYP1A1, CYP2C9, CYP3A4 und Prostaglandin-H-Synthetasen katalysieren die Umwandlung von B[a]P in das biologisch aktive Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol 9,10-epoxid [Rojas et al., 2000; Szeliga et Dipple, 1998], indem am C7- und C8-Atom von B[a]P durch eine Oxidierung eine Epoxidgruppe

eingefügt wird. Diese wird durch eine Hydrierungsreaktion gespalten (*7,t-8-dihydrodiol*). An den Kohlenstoffatomen Nummer 9 und 10 wird durch erneute Oxidierung das *trans-9-10-Epoxid* gebildet.

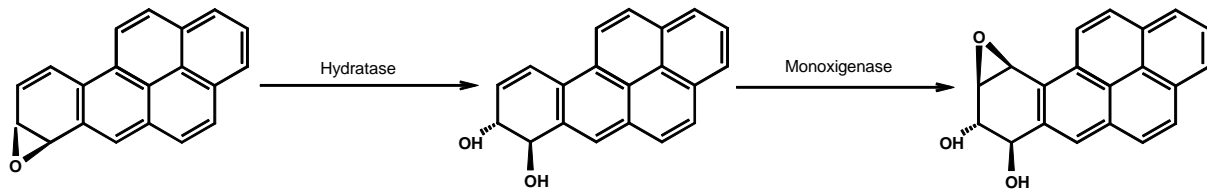


Abbildung 3: Die enzymatische Umwandlung von B[a]P zu BPDE findet in der Leber durch Oxidierung und Hydrolyse an C7 bis C10 statt. (*anti*)Benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid, das Produkt der Umwandlung, kann kovalente Bindungen mit der Aminogruppe von Nukleinsäuren eingehen. Nach: [Song et al., 1998].

Durch die hohe Reaktivität des Epoxids hat das Molekül eine hohe Affinität für kovalente Bindungen. Wenn BPDE in den Zellkern gelangt, können Reaktionen mit der Aminogruppe von (Desoxy-)Ribonukleinsäuren stattfinden und sich dadurch DNA- beziehungsweise RNA-Addukte bilden. Aufgrund der Stereochemie der Monoxigenasen im Cytochrom-P-450-System wird die Bildung der (+)-*anti*-Isoform von BPDE gegenüber anderen Isoformen bevorzugt. Das (+)-*anti*-BPDE ist die aggressivste Form, sie bindet mit erhöhter Wahrscheinlichkeit an Desoxyguanosin [Weinstein et al., 1976]. Auf diese Weise kann das DNA-Addukt (+)-*anti*-Benzo[a]pyren-dihydrodiol-epoxid-*trans*-Desoxyguanosin entstehen.

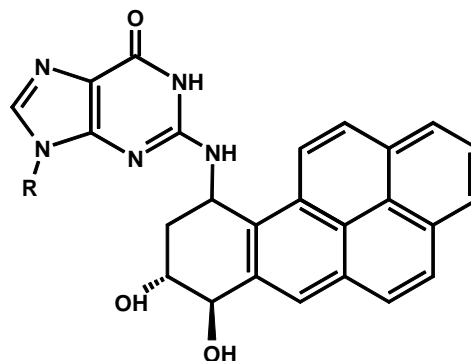


Abbildung 4: BPDE in kovalenter Bindung an Guanin; an Stelle des Rest *R* befindet sich Desoxyribose, die das Rückgrat der DNA-Doppelhelix bildet. Durch das Addukt wird die Struktur der DNA instabiler, Mutationen treten auf.

Aufgrund der Addukte von BPDE kommt es im genetischen Code mit einem Anteil von 45 % hauptsächlich zu Basensubstitutionen, in den meisten Fällen wird eine Transition G:C zu T:A [Shukla et al., 1999] verursacht. Seltener entstehen Baseninsertionen oder Deletionen, die auch zu Verschiebungen des Leserasters führen können. Durch die Bindung von BPDE an die DNA-Moleküle, die fest in der Doppelhelix verankert sind, steigt neben der Gefahr für Mutationen auch die Anzahl an Einzelstrangbrüchen in der DNA signifikant [Routledge et al., 2001]. Anhand von BPDE konnte nachgewiesen werden, dass durch die Verwendung von Tabak als Genussmittel die Anzahl der DNA-Addukte signifikant ansteigt [Godschalk et al., 2002].

BPDE wurde in dieser Arbeit als Testsubstanz verwendet, da das B[a]P, aus dem es entsteht, ubiquitär vorkommt und zum größten Teil bei der Aufnahme in den menschlichen Körper mit den Zellen des oberen Aerodigestivtraktes in Kontakt tritt.

1.2.4.2 N-Nitrosodiethylamin (NDEA)

Nitrosamine, wie das in den Versuchen verwendete *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA), wirken als *Prokanzerogene*. Um ihre karzinogene Wirkung zu entfalten, müssen Nitrosamine durch Metabolisierung im Körper aktiviert werden.

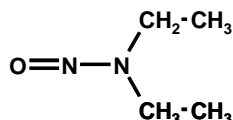


Abbildung 5: Die Struktur von NDEA

Dies geschieht bei den Dialkylnitrosaminen, wie z.B. NDEA, über eine α -C-Hydroxylierung, die durch Cytochrom-P-450-abhängige Monoxigenasen, hauptsächlich die Subfamilien CYP2A und CYP2E, vermittelt wird [Kushida et al., 2000]. Das gebildete Molekül ist instabil und zerfällt unter Abspaltung von Acetaldehyd in ein Diazohydroxid.

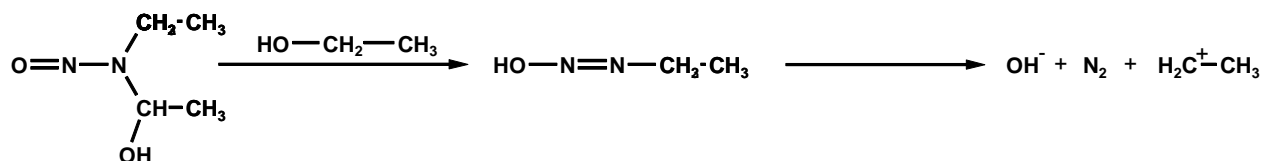


Abbildung 6: Die Metabolisierung und Umwandlung von NDEA zu Ethyldiazohydroxid und zum mutagenen Carbenium-Ion geschieht unter Abspaltung von Acetaldehyd

Die mutagene Wirkung von NDEA kann einerseits durch Acetaldehyd vermittelt werden [IARC, 1999; Yoo et al., 1990]. Andererseits kann das Ethyldiazohydrid aufgrund seiner elektrophilen Eigenschaften stabile Verbindungen mit nukleophilen Teilen der DNA eingehen [Eisenbrand et Metzler, 1994b; Sierra et al., 2001]. NDEA wird von der IARC in Gruppe 2A der „wahrscheinlich für den Menschen kanzerogenen Substanzen“ eingeteilt [IARC, 1998].

Durch Abspaltung von Stickstoff und einer Hydroxylgruppe entsteht das stark reaktive, primäre Carbenium-Ion. Es wird für das eigentlich wirksame Karzinogen gehalten [Aiub et al., 2003]. Durch Ethylierung von Sauerstoff- und Stickstoffatomen kann das Ion Basen von DNA- oder RNA-Strängen angreifen und dadurch zu Mutationen führen.

Als leicht flüchtige Substanz werden Nitrosamine maßgeblich über die Atemluft aufgenommen. Neben Tabakrauch als Hauptquelle im Alltag werden Nitrosamine auch aus Baustoffen, Holzschutzmitteln und Medikamenten freigesetzt [Abdel-Rahman et El-Zein, 2000]. Auch aus verschiedenen kosmetischen Produkten wie Sonnenschutzmittel erfolgt die Aufnahme über die Haut in einer Quote von bis zu 65 Prozent [Franz et al., 1993].

Zusätzliche Belastung durch Nitrosamine kann durch Exposition am Arbeitsplatz entstehen. Besonderer Gefährdung unterliegen Arbeiter in der gummi-, sprengstoff-, metall- oder lederverarbeitenden Industrie [Monarca et al., 2001]. So konnte Straif *et al.* 2000 eine erhöhte Mortalität aufgrund von Tumoren des Ösophagus, des Mundbereichs und des Pharynx durch

epidemiologische Untersuchungen an Arbeitern aus der gummiverarbeitenden Betrieben nachweisen [Straif et al., 2000].

Die Ingestion stellt den zweiten wichtigen Aufnahmemodus dar, weil Nitrosamine unter anderem auch in Lebensmitteln in erhöhten Konzentrationen vorhanden sind. Im Mittel betrug 1990 in Deutschland die tägliche Aufnahme primärer Amine aus Nahrungsmitteln 29mg pro Tag bei Frauen, 37mg pro Tag bei Männern [Pfundstein et al., 1991].

Nitrosamine können im Magen durch endogene Nitrosierung von mit der Nahrung aufgenommenen Nitraten im sauren Milieu entstehen [Knight et al., 1991]. Sie sind in gepökeltem, also mit Nitritpökelsalz haltbar gemachtem Fleisch, vorhanden. Wenn Fleisch durch Garen zubereitet wird, entstehen gesundheitsschädliche Nitrosamine durch die chemischen Reaktionen bei hohen Temperaturen. Lin *et al.* haben auch einen Zusammenhang zwischen der gesteigerten Aufnahme von Nitrosaminen mit der Nahrung und einem erhöhten Risiko für Ösophaguskarzinome nachgewiesen [Lin et al., 2002].

1.2.4.3 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG)

MNNG stammt aus der Gruppe der Nitrosamide. Der Fremdstoff wird von der IARC in Gruppe 2A der beim *Menschen wahrscheinlich krebserzeugenden Substanzen* eingeteilt. Als alkylierende Substanz ist N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin in der Lage, durch Addukte DNA-Strangbrüche, chromosomale Aberrationen, den Austausch von Schwesterchromatiden oder die Bildung von Mikrokernen zu bewirken [Hsie et al., 1987].

In Genotoxizitätsversuchen an verschiedenen Nagetieren und Hunden wurde die Karzionogenität von MNNG gezeigt. Kartasheva und Bykorez konnten die Bildung von gastrointestinalen Tumoren an Ratten nachweisen, deren Trinkwasser mit MNNG versetzt worden war [Kartasheva et Bykorez, 1975]. Die Forschungsgemeinschaft von Aoyagi zeigten das genotoxische Potential des Fremdstoffes anhand von malignen Neoplasien im Magen und Darm von Ratten [Aoyagi et al., 2000].

Slamenova *et al.* konnten die genotoxische Wirkung von MNNG ebenfalls für humane Zellen (Lymphozyten und Hepatozyten) nachweisen [Slamenova et al., 1997]. Eine starke DNA-Fragmentierung durch MNNG wurde von Harréus und Kleinsasser [Harréus et al., 1999; Kleinsasser et al., 2000] an humane Zellen des oberen Aerodigestivtraktes belegt.

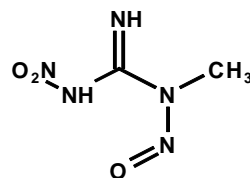


Abbildung 7: MNNG

N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin wirkt direkt kanzerogen, das heißt, dass der Stoff nicht metabolisiert werden muss, bevor er seine kanzerogene Wirkung entfaltet. Einzelstrangbrüche werden von MNNG selten verursacht, aber es kann aufgrund seiner alkylierenden Eigenschaften nukleophile Zentren an den Basen der DNA angreifen. Durch die so entstehenden kovalenten Bindungen kommt es häufig zu DNA-Addukten. Die Bindung an das O⁶-Methylguanin oder an die N³-Position von Adenin triggert DNA-Glykosidasen, welche im Endeffekt zur Zerstörung der betroffenen DNA-Teile führen [Zhu et Zhang, 2003].

Die Verwendung von MNNG ist heutzutage auf Laboratorien beschränkt, wo man es als Mutagen, Teratogen und Karzinogen verwendet. Ein kommerzieller Gebrauch findet nicht statt. Früher wurde es in der Produktion von Diazomethan, einem Methylierungsmittel, eingesetzt. Die Gefahr für eine Exposition am Arbeitsplatz gegenüber MNNG besteht nur in Forschungseinrichtungen [IARC, 1987].

MNNG wird häufig, so auch in dieser Versuchsreihe, bei Genotoxizitätsuntersuchungen als Positivkontrolle eingesetzt.

1.3 Darstellung von Genotoxizität

Es existieren mehrere etablierte Versuchsmethoden zur Darstellung von Schäden an der DNA. Drei häufig eingesetzte Methoden sind der Mikrokern-Test, der Ames-Test und der Comet Assay [Baatout et Derradji, 2004; Kleinsasser, 2004]. Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden wurden von Harréus et. al. beschrieben [Harréus et al., 2002]. Vorgestellt wird die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methodik:

1.3.1 Die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)

Die Mikrogelelektrophorese (MGE) ist eine sensitive Methode zur Darstellung und Messung von DNA-Schäden an eukaryotischen (in Sonderfällen auch prokaryotischen) Einzelzellen [Harréus et al., 1999].

Dabei werden nicht miteinander verbundene Zellen, eventuell nach Inkubation mit Testsubstanzen, auf mikroporöses Gel aufgetragen. Nach Lyse der zellulären Membranen können im elektrischen Feld Strangbrüche und andere Schäden der DNA mikroskopisch nachgewiesen werden.

1984 wurde die ursprüngliche, neutrale Methode von Østling und Johanson entwickelt, um Schäden am Erbgut bestrahlter Zellen über Unterschiede im Migrationsverhalten der DNA zu quantifizieren [Østling et Johanson, 1984]. Durch das neutrale Milieu während der Elektrophorese gelang nur der Nachweis von Doppelstrangbrüchen in der DNA.

Die Durchführung der Elektrophorese in alkalischem Milieu wurde als Modifikation 1988 von Singh vorgestellt [Singh et al., 1988]. Bei alkalischen pH-Werten denaturiert zelluläre Ribonukleinsäure (RNA) und wird abgebaut, so dass sie nicht mit dem Nachweis von DNA-Schäden interferiert. Außerdem trennen sich durch den Effekt des Denaturierens auch die beiden DNA-Stränge voneinander. So werden in erster Linie Einzelstrangbrüche in der DNA nachgewiesen. Substanzinduziert treten diese bei bestimmten Noxen wie Wasserstoffperoxid (H₂O₂) um bis zu 2000 mal häufiger auf als Doppelstrangbrüche [Singh et al., 1988]. Darüber hinaus sind DNA-Schäden nachweisbar, deren Ursache offene Exzisionsreparaturstellen im DNA-Strang sind. Auch Schäden, die durch Alkylierung mit kleinen Resten, speziell an Zucker- und Phosphatresten entstehen (alkalilabile Stellen), werden in der alkalischen Mikrogelelektrophorese nachweisbar [Speit et Hartmann, 1995].

Aufgrund der negativen Ladung des Phosphatgerüsts der DNA wandern Fragmente in einem elektrischen Spannungsfeld aus dem Nukleus in Richtung der Anode. Direkt proportional zur Schädigung der DNA steigt der Grad ihrer Fragmentierung und die Größe der einzelnen Fragmente nimmt ab, so daß diese leichter migrieren können und ihre zurückgelegte Strecke zunimmt [Olive et Banath, 1993]. Das Migrationsverhalten der DNA erklärt sich durch das *unwinding* (Entdrillen) ihrer superhelikalen Strukturen. Die DNA liegt im Nukleus nicht als „Faden“ vor, sondern ist um zahlreiche Proteine (Histone) gewickelt. Diese verleihen der DNA Stabilität und räumliche Struktur (*loops*). Dabei ist die DNA aber innerer Spannung ausgesetzt. Bei einem Strangbruch relaxiert die DNA und migriert effektiver.

Nach Abschluß der Elektrophorese sind die kleinsten Fragmente am weitesten gewandert und finden sich im Schweif in Richtung der Anode (siehe Abbildung 8).

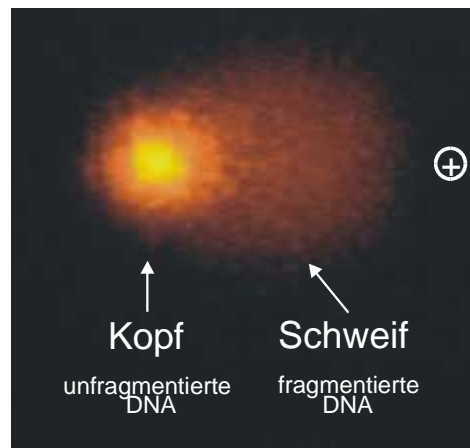


Abbildung 8: Ein mit Ethidiumbromid gefärbter Komet. Die DNA ist mäßig geschädigt. Im elektrophoretischen Spannungsfeld sind die Fragmente in Richtung Anode gewandert (Original-Vergrößerung: 400fach).

Die Kometen werden durch Färbung mit einem geeigneten, DNA-markierenden Fluoreszenzfarbstoff, sichtbar gemacht. Anschließend können sie unter einem Mikroskop betrachtet werden. Die Bewertung der DNA-Schäden kann nach verschiedenen Kategorien, wie zum Beispiel der Fluoreszenzdichte im Kopf oder Schweif des Kometen erfolgen.

Der Comet Assay ist inzwischen eine etablierte Methode für Genotoxizitätstests. Versuche an Zellen verschiedener Lokalisationen des oberen Aerodigestivtraktes und vor allem an Lymphozyten sind mit dieser Methode durchgeführt worden [Collins et al., 1997; Garry et Nesslany, 2003; Harréus et al., 2002]. Dabei hat sich jedoch gezeigt, dass die anhand von Lymphozyten gewonnen Ergebnisse nicht uneingeschränkt mit denen von Mukosazellen vergleichbar sind, so dass die Genotoxizität von Xenobiotika direkt an Mukosazellen von Larynx oder Oropharynx untersucht werden sollte, da Fremdstoffe aus der Luft oder Nahrung an diesen Lokalisationen zuerst in Kontakt mit dem menschlichen Körper tritt [Kleinsasser et al., 2000].

Methodische Grundlage für diese Arbeit ist die modifizierte, alkalische Form der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese [Harréus et al., 1999; Pool-Zobel et al., 1994]. Sie wurde für den Nachweis des genotoxischen Potentials verschiedener Fremdstoffe sowie für die Evaluierung individueller Mutagensensitivität eingesetzt.

1.3.2 Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Die Technik der *in situ* Hybridisierung (ISH) erlaubt es, Nukleinsäure-Sequenzen direkt im biologischen Präparat (*in situ*) nachzuweisen, ohne die meistens zur genaueren Beurteilung essentielle Morphologie einer Zelle zu zerstören.

Untersuchungstechniken, welche die Chromosomen direkt betrachten, sind relativ jung. Die korrekte Anzahl der menschlichen Chromosomen wurde erst 1956 von Tijo und Levans publiziert. In den sechziger Jahren konnten Erfahrung mit Chromosomenpräparationen gewonnen werden. Polysomien, wie Trisomie 21, und später auch Translokationen von Chromosomen-Teilen wurden als Ursache für Krankheiten entdeckt. Beispielhaft ist die Entdeckung des sogenannten Philadelphia-Chromosoms mit Translokation eines Teils von Chromosom 22 auf Chromosom 9 bei CML-Patienten [Rowley, 1973].

Die Technik der in-situ-Hybridisierung wurde erstmals um 1970 sowohl von Pardue und Gall, als auch unabhängig von John *et al.*, beschrieben [John *et al.*, 1969; Pardue *et al.*, 1970]. Erstmals konnte die Genauigkeit der Betrachtung direkt auf die Ebene der DNA-Sequenz gebracht werden. Seitdem sind eine Vielzahl von Verbesserungen eingeführt worden; die anfangs übliche Kennzeichnung der Sonden mit radioaktiven Isotopen ist fast vollständig durch Fluoreszenzfarbstoffe ersetzt. Im Folgenden werden einige Anwendungsmöglichkeiten der *in situ* Hybridisierung kurz vorgestellt.

Die direkte Markierung der DNA ermöglicht es, von Zellen in der Metaphase ein Karyogramm anzufertigen; üblicherweise werden die Chromosomen, die im Zellkern ohne erkennbare Ordnung vorliegen, dazu in Gruppen nebeneinander abgebildet. In einer Verbesserung der Technik werden einzelne Abschnitte auf den Chromosomen spezifisch markiert (*banding*), so dass ein Austausch von Chromosomenteilen offensichtlich wird.

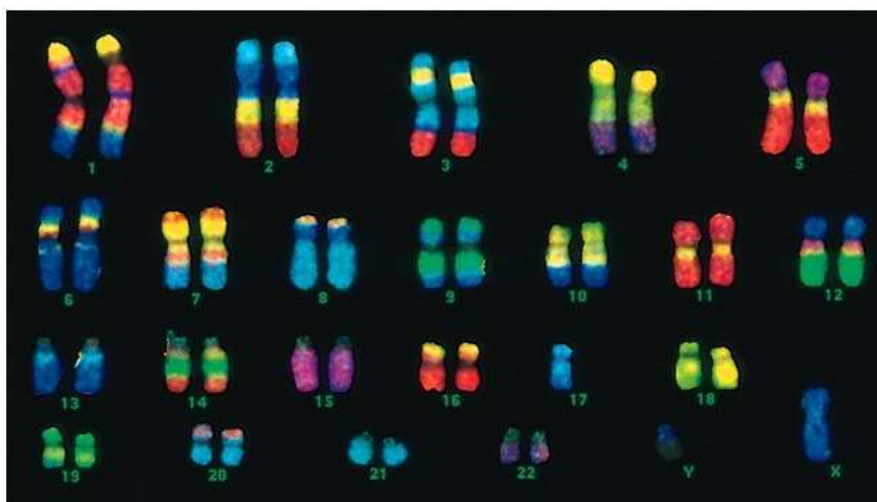


Abbildung 9: Multicolor-banding der Chromosomen eines Mannes; Chromosom 17 ist nur einfach vorhanden. Quelle: www.assis.unesp.br/~egalhard/imagens3/FISH_chromosome.jpg

Durch Fortschritte bei der Herstellung der Gensonden und zunehmende Kenntnis über die Sequenz verschiedener Gene konnte die Auflösung der Technik weiter gesteigert werden. Das Vorhandensein von Amplifikationen einzelner Gene, wie HER2 beim Brustkrebs [Bofin *et al.*, 2004], oder Genrearrangements wie BCR/ABL bei malignen hämatologischen Erkrankungen

[Lee et al., 2004], kann heute routinemäßig durch Markieren von einzelnen Genen überprüft werden [Bartlett, 2004; Langer et al., 2004].

Das Prinzip der Methode beruht auf der komplementären Basenpaarung. Um eine bekannte Basensequenz nachzuweisen, wird die gegengleiche (homologe) Sequenz (*Probe* oder *Sonde*) mit einem Fluoreszenzmarker versehen. Die Proben-DNA bindet während der Renaturierung an den komplementären Strang der nachzuweisenden Sequenz und beide formen ein sogenanntes Hybrid. Dreidimensionale Strukturen wie die Doppelhelix müssen dazu erst geöffnet bzw. doppelsträngige DNA muss getrennt werden (Denaturierung), um eine Anbindung der Sonden-DNA zu ermöglichen.

Nach dem Entfernen nicht gebundener Sonden kann die gesuchte Sequenz, die je nach Sonde ein Genabschnitt oder das gesamte bekannte Genom einer Zelle umfassen kann, quantitativ nachgewiesen werden. Üblicherweise werden Zusätze verwendet, um die nicht mit Proben markierte DNA unspezifisch anzufärben und um das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verlangsamen (z. B. mit Antifade-Solution).

Die Kombination der Mikrogelelektrophorese mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eröffnet die Möglichkeit, Genotoxizitätsuntersuchungen schnell und einfach durchzuführen. Beide Methoden wurde 1998 von der Gruppe um McKelvey-Martin erstmals kombiniert [McKelvey-Martin et al., 1998]. Wie Friedberg feststellte, ist die Verteilung der Schäden und Reparaturstellen auf der DNA nicht konstant über das gesamte Genom verteilt, sondern ist abhängig von verschiedenen Faktoren wie der Transkriptionsrate variabel [Friedberg, 1996]. Um die zeit- und kostenintensive Lokalisation von Schäden und Reparaturstellen zu vereinfachen, haben McKelvey-Martin *et al.* beispielhaft die Schädigung von *p53* bestimmt. Dazu wurden Leukozyten und Zellen der Tumorlinie *HT1376* bestrahlt und die fragmentierte DNA mittels MGE elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die Lage von *p53* mit einem spezifischen Fluoreszenzmarker festgestellt.

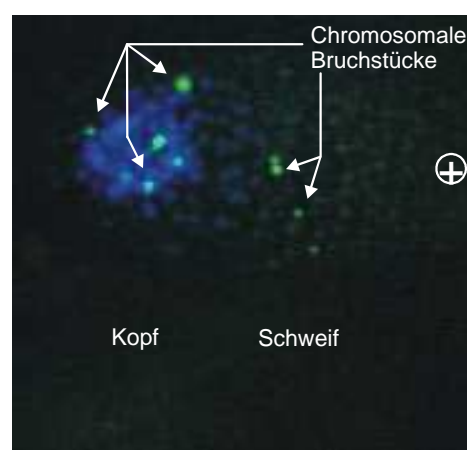


Abbildung 10: Nach der Elektrophorese ist die DNA entsprechend ihrer Fragmentierung aufgeteilt. Die gesamte DNA ist blau gefärbt, grün leuchten Teile des spezifisch mit FISH untersuchte Chromosoms (Originalvergrößerung 400fach).

Durch komparative Genomhybridisierung (*CGH*) konnte nachgewiesen werden, dass die Chromosomen 3, 5 und 8 bei einem Großteil der Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des

oberen Aerodigestivtraktes verändert sind, während Chromosom 1 weniger häufig geschädigt wurde [Bockmühl et al., 1998; Rapp et al., 2000].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methodenkombination Comet/FISH erstmals an humanen Schleimhautzellen aus Frischbiopsaten des oberen Aerodigestivtraktes angewandt. Das genotoxische Potential von BPDE sowie die individuelle Mutagensensitivität wurden bestimmt. Dazu wurde die DNA-Fragmentierung von Chromosom 1, 3, 5 und 8 mittels Comet/FISH visualisiert und mit dem MCTM quantifiziert.

1.4 Zielsetzung

Der Entstehung von Malignomen liegt eine multifaktorielle Pathogenese zugrunde. Neben endogenen Faktoren sind eine Exposition gegenüber DNA-schädigenden Substanzen aus der Arbeits- und Umwelt ausschlaggebend. Mit der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese steht eine etablierte Methode für Genotoxizitätsuntersuchungen zur Verfügung.

Bei Aufnahme genotoxischer Substanzen durch Ingestion oder Inhalation findet der erste Kontakt mit den Zellen des Organismus im oberen Aerodigestivtrakt statt. In der vorliegenden Arbeit wurden frische Einzelzell-Biopsate aus dieser Region von Spendern mit und ohne Tumoranamnese mit typischen Vertretern polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine inkubiert und die DNA-Schädigung quantifiziert.

Unterschiede zwischen den Spenderkollektiven im Bezug auf die Reparatur genotoxischer Schäden wurden untersucht.

Die Kombination des Comet Assay mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurde zur Darstellung von DNA-Schädigung auf chromosomalem Level etabliert. Zur Quantifizierung der gemessenen Schädigung wurde der MCTM eingeführt.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

Die Spender entstammten dem Patientengut der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München. Die Studie wurde von der Ethikkommission der Universität unter der Nummer 221/04 genehmigt. Alle Patienten wurden präoperativ von ärztlichen Mitarbeitern der Klinik über ihre Teilnahme an einer wissenschaftlichen Studie aufgeklärt und haben der Teilnahme an der Studie zugestimmt. Die Proben wurden aus den Operationspräparaten gewonnen, so dass sich für die Patienten kein zusätzliches Risiko ergab.

Vorausgehend zur Untersuchung wurden die Anamnesen der Patienten erhoben. Neben Daten zum Beruf des Patienten wurden auch Fragen zur privaten und beruflichen Gewohnheiten wie Alkohol- und Tabakkonsum gestellt, um die individuelle Fremdstoffexposition zu erfassen. Das Merkblatt zur Patientenaufklärung kann im Anhang eingesehen werden.

Die Anzahl der „Schachteljahre“ (*pack years, py*) und der Alkoholkonsum gemäß dem Ethanolgehalt verschiedener Getränke in Gramm pro Tag (*g/d*) wurde aus den individuellen anamnestischen Angaben berechnet.

2.1.1 Tonsillenschleimhaut von tumorfreien Spendern

Für die Kontrollgruppe wurde Tonsillengewebe von 20 Spendern im Alter zwischen 33 und 86 verwendet, darunter 2 Frauen und 18 Männer. Das Durchschnittsalter lag bei 52,7 Jahren. Die Proben fielen im Rahmen der Operation benigner Erkrankungen der Tonsillen, wie Hyperplasien oder chronischen Tonsillitiden, an. Im Mittel wurde von den Kontrollpatienten 37,25 mg Alkohol pro Tag konsumiert, der Tabakgenuss lag im Mittel bei 17,8 pack years. Die Anamnesen der Patienten wurden der Krankenakte entnommen; sie sind in Tabelle 2 im Anhang angegeben (siehe Punkt 7.1.1).

2.1.2 Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillen-Karzinom

Die Gruppe bestand aus 2 Frauen und 8 Männern, insgesamt also 10 Patienten im Alter zwischen 44 und 89 Jahren (durchschnittlich 65 Jahre alt), mit einem histologisch gesicherten Plattenepithelkarzinom der Tonsille. Nur makroskopisch tumorfreies Tonsillengewebe wurde verwendet. Der Mittelwert des Alkoholkonsums der Spender lag bei 37,3 mg pro Tag, der des Tabakkonsums bei 35,5 pack years.

Eine Liste der Anamnesen findet sich unter Punkt 7.1.2 im Anhang.

2.1.3 Laryngeale Schleimhaut von Spendern mit Larynx-Karzinom

Die für diese Versuche verwendeten Zellen wurden aus makroskopisch gesunder Schleimhaut vom Larynx von 10 ausschließlich männlichen Patienten mit histologisch gesichertem

Karzinom im Larynx-Bereich entnommen. Das Alter der Spender lag zwischen 46 und 72 Jahren, der Altersdurchschnitt bei 63,6 Jahren. Es wurde nur Gewebe, das bedingt durch die Operationstechnik entfernt werden musste, für die Versuche verwendet. Die Spender konsumierten im Mittel 159 mg Alkohol pro Tag, der mittlere Tabakkonsum lag bei 52,5 pack years.

Die Anamnesen der Patienten, die der Krankenakte entnommen wurden, sind tabellarisch im Anhang aufgeführt (siehe Punkt 7.1.3)

2.1.4 Spender von Tonsillengewebe für Comet /Fluoreszenz-in-situ Hybridisierung

Spender von Tonsillengewebe für die Versuchskombination Comet/FISH waren 12 männliche und 6 weibliche Patienten, insgesamt 18 Patienten. Ihr Alter lag zwischen 8 und 55 Jahren, das Durchschnittsalter war 30,1 Jahre. Es wurde nur makroskopisch gesundes Gewebe für die Versuche verwendet. Die Entnahme des Gewebes für die Versuchsreihe erfolgte im Rahmen der medizinischen Indikation. Alkohol- und Tabakkonsum lagen im Mittel bei 13 mg pro Tag bzw. 5,7 pack years.

Die Anamnesen der Patienten sind in Tabelle 5 unter Punkt 7.1.4 im Anhang aufgelistet.

2.2 Materialien und Geräte

2.2.1 Testsubstanzen

Als Testsubstanzen dienen:

Dimethylsulfoxid (DMSO) (166 mM)

CAS 67-68-5 (CH₃)₂SO [Merck; Darmstadt]

(anti)Benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid (BPDE) (9 µM)

CAS 58917-67-2 C₂₀H₁₄O₃ [Midwest Research Institute; USA]

N-Nitrosodiethylamin (NDEA) (50 mM)

CAS 55-18-5 BestNr.: N-0756 (C₂H₅)₂N₂O [Sigma; Steinheim]

N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) (0,035 mM)

CAS 70-25-7 BestNr.: GA 10673 C₂H₅N₅O₃ [Aldrich, Milwaukee, USA]

Enzyme und Medien

Hyaluronidase aus Schafshoden [Boehringer; Mannheim]

Kollagenase P aus Clostridium histolyticum [Boehringer; Mannheim]

Protease aus Streptomyces griseus [Sigma; Steinheim]

MEM-Joklik Medium (ohne Glutamin und NaHCO₃) [Linaris; Bettingen am Main]

Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS) ohne

Calcium, Magnesium und Natriumbikarbonat [Gibco BRL Lifetechnologies; Eggenstein]

2.2.2 Färbungen und Chromosomensonden

30 WCP (Whole Chromosome paint) 1 DNA Probe	[Vysis Inc.; Downers Groove, IL, USA]
30 WCP (Whole Chromosome paint) 3 DNA Probe	[Vysis Inc.; Downers Groove, IL, USA]
30 WCP (Whole Chromosome paint) 5 DNA Probe	[Vysis Inc.; Downers Groove, IL, USA]
30 WCP (Whole Chromosome paint) 8 DNA Probe	[Vysis Inc.; Downers Groove, IL, USA]
Antifade Solution	
(p-Phenylendiamin in PBS und Glycerol)	[Vysis Inc.; Downers Groove, IL, USA]
DAPI III in Antifade Solution	[Vysis Inc.; Downers Groove, IL, USA]
Ethidiumbromid	[Sigma; Steinheim]
Trypan Blue Staining 0,4% Trypanblau	[Gibco BRL Lifetechnologies; Eggenstein]

2.2.3 Chemikalien und Reagenzien

Folgende Chemikalien und Reagenzien fanden Anwendung [Bezugsquelle nachstehend]:

Aqua ad injectabilia (H ₂ O)	[Merck; Darmstadt]
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natrium (Na ₂ EDTA)	[Serva, Heidelberg]
Ethanol (C ₂ H ₅ OH) 100%, 85%, 70%	[Klinikapotheke LMU München]
Formamid (CH ₃ NO) 99%	[Sigma; Steinheim]
Low-Temperature-Melting-Agarose:	
Sea-Plaque-Agarose 0,7%	[FMC-Bioproducts; Rockland, Maine, USA]
Normal-Melting-Agarose	
Seakem LE Agarose 0,5%	[FMC-Bioproducts; Rockland, Maine, USA]
Natriumchlorid (NaCl)	[Sigma; Steinheim]
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	[Merck; Darmstadt]
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH wasserfrei)	[Merck; Darmstadt]
N-Lauroylsarcosin Natrium Salz (C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br)	[Sigma; Steinheim]
NP40 Waschlösung	[Vysis Inc.; Downers Groove, IL, USA]
20x Saline-sodium citrate buffer (SSC 0,2 µM)	[Sigma; Steinheim]
Trishydroxymethylaminomethan (Trizma-base) (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	[Merck; Darmstadt]
Triton-X 100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	[Sigma; Steinheim]

2.2.4 Herstellung der Gebrauchslösungen

2x SSC (Saline Sodium Citrate)

100 ml 20x SSC Stocklösung (0,3 M Na-Citrat und 3 M NaCl)

850 ml Aqua bidest.

100 ml 20x SSC Stocklösung mit 850 ml Aqua bidest. mischen, auf 1000 ml auffüllen und den pH auf 7,0 +/- 0,2 einstellen. Höchstens 6 Monate verwenden.

2x SSC / 0,1% NP40-Waschlösung

1 ml NP40 Waschlösung

1000 ml 2x SSC

Zu 1000 ml 2x SSC 1 ml NP40 (0,1%) Waschlösung hinzugeben und den pH-Wert auf 7,0 +/- 0,2 einstellen.

50% Formamid / 2x SSC Waschlösung

157,5 ml Formamid
31,5 ml 20x SSC Stocklösung
122 ml Aqua bidest.

Das Formamid mit der 20x SSC Stocklösung vermischen, mit Aqua bidest. auffüllen. Den pH auf 7,0 und 8,0 einstellen. Bei 2 - 8°C maximal sieben Tage aufbewahren.

Agarose

0,5 prozentige Normal-melting Agarose
0,7 prozentige Low-melting Agarose

Pulver mit PBS versetzen, kurz in der Mikrowelle erhitzen und im Schüttelwasserbad bei 37°C aufbewahren.

Elektrophoresepuffer

24 g NaOH (300 mM)
0,744 g Na₂EDTA
ad 2 l Aqua bidest.

NaOH und Na₂EDTA in 2 l Aqua bidest. lösen und bei 4°C lagern.

Enzymlösung zur Zellisolierung

50 mg Protease
10 mg Hyaluronidase
10 mg Kollagenase P

in 10 ml MEM-Joklik lösen, sterilfiltrieren und bis zur Verwendung im Wasserbad bei 37°C aufbewahren.

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg Ethidiumbromid
50 ml Aqua bidest.

10 mg Ethidiumbromid in 50 ml Aqua bidest. lösen; die Lösung bei 4°C lichtgeschützt aufbewahren.

Ethidiumbromid-Färbelösung

5 ml Ethidiumbromid-Stammlösung (0,2mg / ml)
45 ml Aqua bidest.

Eine 1:10 Verdünnung aus Ethidiumbromid-Stammlösung in Aqua bidest. herstellen und sterilfiltrieren. Bis zur baldigen Verwendung lichtgeschützt lagern.

DNA-Färbesonden

14 µl Hybridisierungspuffer
2 µl 30 WCP DNA-Markierungssonde
4 µl Aqua bidest.

Hybridisierungspuffer und 30 WCP DNA-Markierungssonde im Gefrierschrank bei -20°C lagern. Kurz vor Versuchsbeginn auf Raumtemperatur bringen. Alle Arbeitsschritte werden lichtgeschützt durchgeführt.

Den Hybridisierungspuffer, 30 WCP DNA-Markierungssonde und Aqua bidest. in einem Eppendorfgefäß mischen, bis zum Färben bei 37°C bereitstellen.

Gegenfärbelösung

12 μl DAPI III

6 μl Antifade-Lösung

Alle Arbeitsschritte lichtgeschützt durchführen. Reagenzien bei -20°C lagern. Auf Raumtemperatur bringen, mischen und auf Objektträger auftragen.

Lysestammlösung

146,4 g NaCl (2,5 M)

1,2 g Trizma-Base (10 mM)

37,2 g Na_2EDTA (100 mM)

10 g (1%) N-Lauroylsarcosin Natrium Salz

auf 1 l Aqua bidest.

Das NaCl in 500 ml Aqua bidest. lösen, Na_2EDTA unter Zugabe von NaOH-Plättchen in 160 ml Aqua bidest. auflösen. Das N-Lauroylsarcosin Natrium Salz wird in 160 ml Aqua bidest. gelöst. Alle Komponenten mischen, den pH-Wert auf 10 einstellen und mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen.

Lysepuffer

1 ml Triton-X 100 (1%)

10 ml DMSO (10%)

89 ml Lysestammlösung

Die drei Komponenten vermischen und bis zur Verwendung gekühlt aufbewahren.

MEM-Joklik

10,98 g Pulvermedium Joklik-MEM, ohne L-Glutamine, ohne NaHCO_3

2 g NaHCO_3

10 ml Penicillin-Streptomycin

Pulver in 1 l Aqua bidest. unter Zugabe von Penicillin-Streptomycin lösen, pH-Wert auf 7,20 bis 7,25 einstellen, unter der Sterilbank mit Hilfe der H_2O -Strahlpumpe sterilfiltrieren und portionsweise bei 4°C für maximal 4 Wochen aufbewahren.

Neutralisationspuffer (400 mM)

48,5 g Trizma-Base (10 mM)

990 ml Aqua bidest.

48,5 g Trizma-Base mit 990 ml Aqua bidest. mischen und auf einen pH-Wert von 7,5 einstellen. Auf 1 l auffüllen und bei Raumtemperatur aufbewahren.

2.2.5 Verbrauchsmaterialien

Folgende Materialien wurden zur Durchführung der Versuche verwendet:

Deckgläser zum Mikroskopieren, 24 x 70 mm Dicke 0,08 – 0,12 mm	[Langenbrinck;	Emmendingen]
Deckgläser zum Mikroskopieren, 22 x 22 mm Stärke 0 (22 x 22 mm)	[Langenbrinck;	Emmendingen]
Diamantschreiber	[Renner;	Dannstadt]
Einmalspritzen 5ml und 10 ml	[Becton, Dickinson;	Heidelberg]
Einmalskalpell steril	[Feather Safety Razor Co.;	Japan]
Einweg-Filtereinheiten steril, Millex-GV gelb 0,22 µm	[Millipore;	Eschborn]
Einweg-Filtereinheiten steril, Millex-GS blau 0,22 µm	[Millipore;	Eschborn]
Reaktionsgefäße 0,5 ml steril, einzeln verpackt „Safe-Lock“	[Eppendorf;	Hamburg]
Fixogum „Marabu“	[Marabuwerke;	Tamm]
Mikrotiterplatte „Cellstar“ steril, 96 Wells	[Greiner;	Frickenhausen]
Nagellack, farblos	[Generisch]	
Objektträger geschnitten, beidseitig mit längslaufendem Mattrand, 76 x 24 mm	[Langenbrinck;	Emmendingen]
Objektträgerkasten für 50 Objektträger 76 x 24 mm	[Greiner;	Frickenhausen]
Pipettenspitzen (2,5 µl „Nanotips“; 20 µl; 200 µl; 1000 µl)	[Eppendorf;	Hamburg]
Röhrchen mit Schraubverschluß, 15 ml	[Sarsted;	Nümbrecht]
Röhrchen mit Schraubverschluß, 50 ml	[Greiner;	Frickenhausen]
Stericup Filtereinheit	[Millipore;	Eschborn]
Zählkammer nach Neubauer „improved“	[Merck;	Darmstadt]

2.2.6 Geräte und Auswertungsprogramme

Akkujet	[Brand;	Wertheim]
Analysewaage „Voyager“	[Ohaus;	Gießen]
Analysewaage „Type 1419“	[Sartorius;	Gießen]
Auswertung und Datenspeicherung:		
Generische IBM-kompatible PC	[LMU;	München]
„Komet 3.1“, „Komet ++“	[Kinetic Imaging Inc.;	Liverpool, U.K.]
Microsoft Office	[Microsoft Corp.;	Redmond, WA, USA]
SPSS für Windows V. 12.0	[SPSS Inc.;	U.K.]
Inkubator „Function Line“	[Haraeus;	Hanau]
Elektrophorese-Netzgerät E865	[Renner;	Dannstadt]
Horizontale Elektrophoresekammer		

(237 x 180 mm)	[Renner;	Dannstadt]
Heizplatte Thermo Standon „mini Hotplate“	[Lamb;	Eastbourne, U.K.]
Heizplatte Reichert-Jung	[Medox Nagel GmbH;	Kiel]
Wasserstrahlpumpe „Plastibrand“	[Brand;	Wertheim]
Kühlschrank (+4°C) und Gefrierschrank (-18°C)	[Bosch;	Stuttgart]
Kühlschrank (+4°C) und Gefrierschrank (-18°C)	[Liebherr;	Bulle, Schweiz]
Magnetrührer Combimag RTC	[IKA;	Staufen]

Mikroskope:

Mikroskop „DM LB“	[Leica;	Heerbrugg, Schweiz]
Filter:	Filtersystem N 2.1; Grünanregung BP 515 nm – 560 nm RKP 580 LP 580	
Objektive:	4x/0,1; 10x/0,22; 40x/0,5	

Mikroskop für Fluoreszenzuntersuchung „DM LB“	[Leica;	Heerbrugg, Schweiz]
Filter:	DAPI: Anregung 367 nm Emission 452 nm SpectrumGreen Anregung 509 nm Emission 538 nm SpectrumOrange: Anregung 559 nm Emission 588 nm	
Objektive:	10x/0,25; 40x/0,75; 100x/1,25 Oil	

Phasenkontrastmikroskop	[Zeiss;	Oberkochen]
-------------------------	---------	-------------

Mikrowelle MWS 219	[Bauknecht;	Schorndorf]
pH-Meter 766 Calcimatic	[Knick;	Berlin]
Pipetten „Research“ (2,5; 5; 10; 25 ml)	[Eppendorf;	Hamburg]
Schüttelwasserbad 1083	[GFL;	Burgwedel]
Schüttler „Vortex Genie“	[Scientific Industries; Bohemia, NY, USA]	
Sterilbank „Herasafe“	[Haraeus;	Hanau]
Thermometer für Oberflächen „mini“	[Merck;	Darmstadt]
Wasserbad 1002	[GFL;	Burgwedel]
Zentrifuge „Varifuge 3.0R“	[Haraeus;	Hanau]
Zentrifuge „Varifuge 3.0RS“	[Haraeus;	Hanau]
Zentrifuge „5412“	[Eppendorf;	Hamburg]

2.3 Die alkalische Mikrogelelektrophorese

Für die Kontrollversuche und für die Kombinationsmethode Comet Assay / Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde Tonsillengewebe von Patienten ohne Nachweis eines tumorösen Geschehens verwendet. Für die Versuche mit Zellen von Patienten mit Tonsillenkarcinom wurde tumorfreies Tonsillengewebe eingesetzt. Makroskopisch gesunde Larynxschleimhaut wurde für die Versuche von Spendern mit Larynxkarzinom verwendet.

Eine graphische Darstellung des Versuchsablaufs soll das Verständnis der Beschreibung vereinfachen (siehe Abbildung 11).

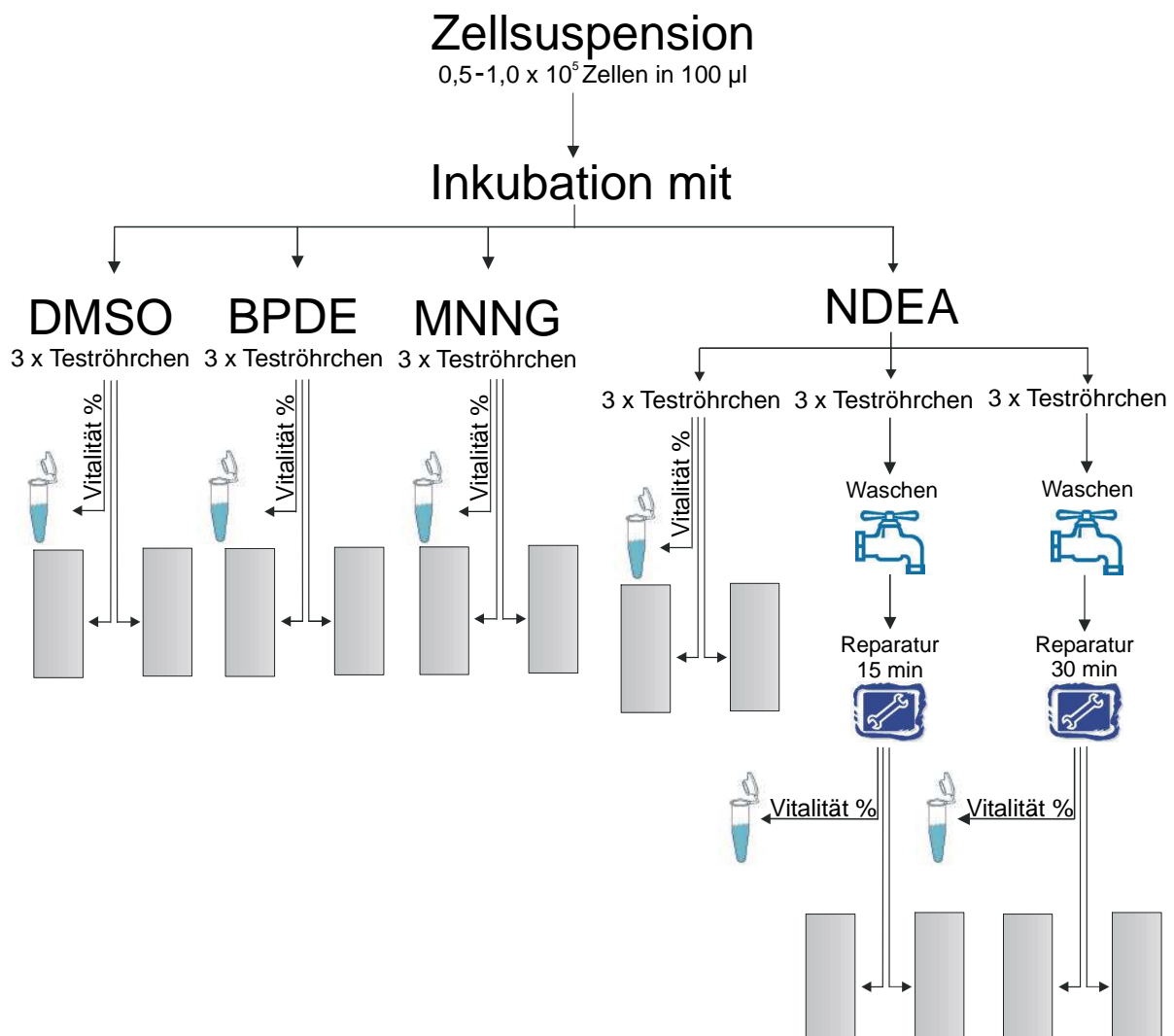


Abbildung 11: Graphische Darstellung des Versuchsablaufs beim Comet Assay

2.3.1 Präparation des Testgewebes

Die zu untersuchenden Gewebeproben wurden innerhalb von einer Stunde nach Entnahme in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) lichtgeschützt vom Operationssaal ins Labor transportiert. Anschließend wurden die Proben unter sterilen Bedingungen

makroskopisch mit einem Skalpell von Fremdgewebe, z.B. Bindegewebe oder Blut, befreit. Für die Versuche mit Larynxschleimhaut wurde makroskopisch tumorfreie Mukosa verwendet. Die Mukosa wurde von der Gewebeprobe abgelöst, anschließend wie das auch Tonsillengewebe schonend mit dem Skalpell weiter in ca. 2 mm² große Stücke zerlegt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Rotlicht, um einer Schädigung der DNA durch UV-Licht vorzubeugen.

Tonsillengewebe und Larynxschleimhaut wurden anschließend in gleicher Weise weiter verarbeitet.

2.3.2 Gewinnen von Einzelzellen

Die Enzyme zum Lösen der Zellen aus dem Zellverband (50 mg Protease, 10 mg Hyaluronidase und 10 mg Kollagenase P) wurden in 10 ml MEM-Joklik gelöst und sterilfiltriert.

Das zerkleinerte Gewebe wurde mit der Enzymlösung in ein Becherglas gegeben. In den folgenden 60 Minuten wurden die Zellen im Schüttelwasserbad bei 37°C (Frequenz ca. 60 U/min) aufbewahrt, während sie sich aus dem Zellverband lösten.

Anschließend wurden die Zellen durch doppellagiges Gaze in ein Röhrchen [50 ml, Greiner; Frickenhausen] abgossen, um gröbere Gewebsreste zu entfernen, und bei Raumtemperatur und 400 U/min (10 Minuten) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das verbliebene Zellpellet in 1 ml MEM-Joklik resuspendiert.

2.3.3 Bestimmen der Zellzahl und Vitalität

50 µl der Zellsuspension wurden in einem Eppendorf-Gefäß mit 50 µl Trypanblau (0,4%) [Gibco BRL Lifetechnologies; Eggenstein] vermischt. Ein Tropfen der Suspension wurde in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und unter einem Phasenkontrastmikroskop bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Es wurden die Zellzahl pro ml und das prozentuale Verhältnis vitaler Zellen zur Gesamtzahl ermittelt.

Als vital wurden die Zellen mit intakter Zellmembran gewertet. Sie nahmen kein Trypanblau auf und blieben klar. Die Zellen, die sich blau färbten, wurden als avital gezählt [Ashkenazi et al., 2001; Philips, 1973].

Nach der Fremdstoffinkubation wurde ein zweiter Vitalitätstest durchgeführt, um zytotoxische Effekte, beispielsweise durch mechanische Belastung beim Zentrifugieren, auszuschließen. Ansätze, deren Zellvitalität unter 90% lagen, wurden nicht für Versuche verwendet.

Durch weiteres Hinzugeben von Nährmedium wurde eine Gesamtzellzahl von ca. 1,2 x 10⁶ Zellen pro ml Zellsuspension eingestellt.

2.3.4 Präparation der Xenobiotika

Die Negativkontrolle wurde mit Dimethylsulfoxid (DMSO) [Merck; Darmstadt] (166 mM) durchgeführt. Es diente ebenfalls als Lösungsmittel für die anderen Fremdstoffe. Für die

Positivkontrolle wurde N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) [Aldrich, Milwaukee, USA] als direkt alkylierende Substanz (0,035 mM) verwendet.

Als Testsubstanz dienten (anti)Benzo[a]pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-epoxid (BPDE) [Midwest Research Institute; USA] in einer Konzentration von 9 µM und 50 millimolares N-Nitrosodiethylamin (NDEA) [Sigma; Steinheim]. Letzteres ergab auch die Ausgangsschädigung für die Reparaturversuche. Für die Versuchsreihe über 15 Minuten und 30 Minuten Reparaturzeit wurde ebenfalls NDEA verwendet.

Gewebe, das für die Kombination Comet Assay / FISH verwendet wurde, wurde nur mit BPDE als Testsubstanz bzw. DMSO als Negativkontrolle inkubiert.

2.3.5 Inkubation mit den Fremdstoffen

Pro Xenobiotikum wurden je 3 Aliquots mit jeweils $0,5 - 1,0 \times 10^5$ Zellen in 100 µl MEM-Joklik angesetzt. Nach Inkubation mit dem Fremdstoff wurde aus zweien eine Doppelbestimmung der Messwerte durchgeführt, aus dem Dritten ein Trypanblau-Vitalitätstest.

Die Zellaliquots in Suspension wurden auf die Wells der Mikrotiterplatte [„Cellstar“ steril, 96 Wells, Greiner; Frickenhausen] verteilt, anschließend wurde je 10 µl des Fremdstoffs beigemischt. Die Mikrotiterplatte wurde so in einen Reagenzglasständer eingelegt, daß der Unterrand der Mikrotiterplatte auf Höhe des Wasserspiegels im Wasserbad lag und eine gute Wärmeübertragung gewährleistet war. Die Zellen wurden im Wasserbad mit den Schadstoffen inkubiert (37°C, 60 Minuten, Schüttelfrequenz ca. 60 U/min).

Nach einer Stunde Inkubationsdauer wurde die Suspension aus den Wells der Mikrotiterplatte in dafür vorgesehene Reaktionsröhrchen [Greiner; Frickenhausen] überführt. Die jeweiligen Vertiefungen wurden erneut mit 100 µl MEM-Joklik gespült und die Lösung ebenfalls in das Reaktionsgefäß pipettiert, um die im Well enthaltenen Zellen möglichst vollständig zu erfassen. Daraufhin wurden die Röhrchen zentrifugiert (400 U/min, 24°C, 5 Minuten) und der Überstand vorsichtig abpipettiert.

Aus dem dritten Well je Testsubstanz wurde zum Ausschluß zytotoxischer Effekte (siehe auch 2.3.3) ein zweiter Trypanblau-Vitalitätstest durchgeführt.

2.3.6 Reparatur

Die Reparaturversuche mit NDEA wurden an eigenen Zellaliquots nach oben beschriebener Fremdstoffinkubation durchgeführt. Die Zellen wurden wieder in 200 µl MEM-Joklik resuspendiert und bei 400 U/min und 24°C für 5 Minuten zentrifugiert, um den Fremdstoff vollständig auszuwaschen. Der Überstand wurde abpipettiert, die Zellen in 200 µl MEM-Joklik aufgenommen und für 15 Minuten bzw. 30 Minuten im Wasserbad belassen.

Nach Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit wurden die Reagenzröhrchen aus dem Wasserbad genommen, bei 400 U/min, 24°C für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abpipettiert.

Die Zellpellets wurden dann ebenfalls wie unter Punkt 2.3.7 beschrieben auf Objektträger aufgebracht.

2.3.7 Aufbringen der Zellen auf Objektträger

Spezielle Objektträger mit entlang ihrer Längskanten angerauten Rändern [Langenbrinck; Emmendingen] wurden verwendet, um der Agaroseschicht später eine optimierte Haftung auf den Trägern zu ermöglichen. Die Objektträger wurden mindestens zwei Tage vor Versuchsbeginn mit 85 μ l 0,5-prozentiger Normal-melting-Agarose [FMC-Bioproducts; Rockland, Maine, USA] beschichtet und mit einem 24 x 70 mm messenden Deckgläschen der Dicke 0,08 bis 0,12 mm [Langenbrinck; Emmendingen] zur Fixierung der Schicht versehen. Die präparierten Objektträger wurden bei Raumtemperatur und lichtgeschützt gelagert.

Die Zellansätze für die Doppelbestimmung eines jeden Xenobiotikums wurden nach Entfernen des Deckgläschen auf die vorbereiteten Objektträger ausgebracht. Dazu wurden die Zellen in 75 μ l Agarose (0,7%) [FMC-Bioproducts; Rockland, Maine, USA] aufgenommen und, ohne die vorhandene Agaroseschicht auf den Objektträgern zu beschädigen, gleichmäßig verteilt. Die Objektträger wurden mit einem neuen Deckgläschen belegt, um eine homogene Verteilung der Zellen zu erreichen, und zum Aushärten der Agarose für ca. 10 Minuten auf eine gekühlte Metallplatte gegeben. Zur besseren Fixierung der Zellen wurde nach dem Aushärten der Agaroseschicht das Deckglas vorsichtig entfernt und weitere 85 μ l 0,7-prozentige Agarose wurden aufgetragen. Abschließend wurden die Objektträger erneut mit einem Deckgläschen versehen und für ca. 10 Minuten auf der Metallplatte abgekühlt.

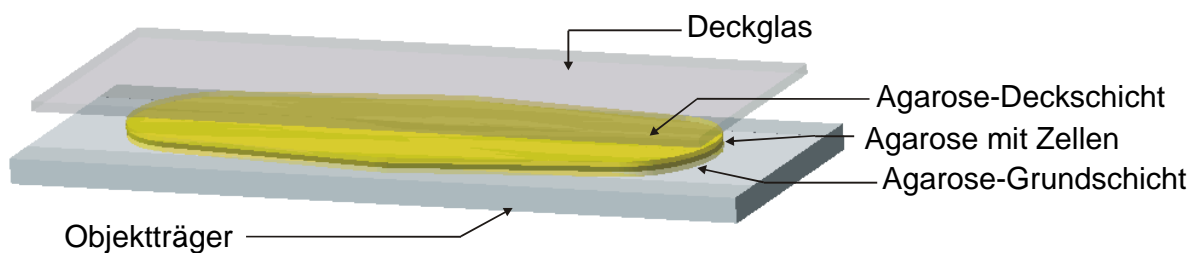


Abbildung 12: Darstellung der Agaroseschichten auf dem Objektträger

2.3.8 Lyse der zellulären Membranen und Alkalische Elektrophorese

Nach Aushärten der Agarose wurde das Deckgläschen vorsichtig seitlich abgezogen und die Objektträger in eine Küvette gestellt. Die Lyseflüssigkeit wurde hinzugegeben und die

Küvette lichtgeschützt bei 4°C für mindestens eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt, um die Zell- und Kernmembran aufzulösen.

Nach Beendigung der Lyse wurde die Elektrophorese-Kammer [Renner; Dannstadt] in eine eisgekühlte Wanne gestellt und horizontal ausgerichtet. Im Kühlschrank auf 4°C gekühlter Elektrophoresepuffer wurde bis knapp unterhalb der Liegefläche für die Objektträger blasenfrei eingefüllt.

Die Objektträger wurden, an der Anode beginnend, in die Elektrophoresekammer gelegt. Nach Auffüllen des Puffers und einer 20 Minuten dauernden Denaturierungs- und Entspiralisierungphase („*unwinding*“) der DNA im stark alkalischen Milieu (pH > 12) wurde die Elektrophorese bei 25V und 300 mA [Netzgerät E865, Renner; Dannstadt] für ebenfalls 20 Minuten durchgeführt.

2.3.9 Färbung und digitale Auswertung

Die Objektträger wurden aus der Elektrophoresekammer genommen und dreimalig mit 400 millimolarer Pufferungslösung (pH von 7,5) übergossen, um den pH-Wert zu neutralisieren und den folgenden Färbungsvorgang nicht zu beeinträchtigen. Für den Comet Assay wurden die Objektträger daraufhin gleichmäßig mit 75 µl zehnpromzentiger Ethidiumbromid-Färbelösung gefärbt und mit einem Deckgläschen versehen. Die Lagerung erfolgte in angefeuchteten Objektträgerkasten [Greiner; Frickenhausen] lichtgeschützt im Kühlschrank für maximal 7 Tage.

Die Auswertung der Ergebnisse wurde fluoreszenzmikroskopisch [Leica *DM LB*, Heerbrugg, Schweiz; Filtersystem N 2.1; Grünanregung BP 515 – 560 nm; RKP 580 LP 580] bei vierhundertfacher Vergrößerung unter Verwendung des Programms „Komet 3.1“ [Komet Img., Liverpool; Großbritannien] durchgeführt. Über eine CCD-Kamera wurde das Bild vom Mikroskop digitalisiert und am PC direkt vermessen. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 13 auf der folgenden Seite zusammengefasst.

Pro Testsubstanz wurden zwei Objektträger mit je 40 Zellen ausgewertet. Dabei wurde die Menge DNA im Kopf und Schweif des Kometen anhand der Leuchtintensität getrennt erfasst, außerdem die mittlere Position von Kopf und Schweif. Für die statistische Auswertung wurden die Daten in Microsoft Excel 97™ zwischengespeichert.

Folgende Formel diente zur Berechnung des *Olive Tail Moments* als Marker für die DNA-Schädigung [Olive et Banath, 1993]:

$$\text{Olive Tail Moment} = \frac{\text{DNA [Schweif]}}{(\text{DNA [Schweif]} + \text{DNA [Kopf]})} * \text{Mittl. Position DNA [Schweif]} - \text{Mittl. Position DNA [Kopf]}$$

2.3.10 Statistische Ergebnisanalyse

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte mit dem Programm SPSS in Version 12.0 Für die statistische Signifikanz wurde als lokales α-Niveau ein p-Wert ≤ 0,05 festgelegt.

Der Wilcoxon-Test diente zur statistischen Analyse der OTM-Werte verbundener Stichproben. Dazu zählten der Vergleich von Negativkontrollen und Testsubstanzen, sowie der Vergleich der Ausgangsschädigung mit der nach Reparatur. Aufgrund der Mehrfachtestung wurde der Friedman-Test angewandt. Unabhängige Stichproben, wie OTM-Werte nach Schädigung bzw. Reparatur unterschiedlicher Spendergruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen, aufgrund der Mehrfachtestung wurde hier der Kruskal-Wallis-Test angewandt.

SPSS wurde auch zur Erstellung der Boxplots verwendet, die der graphischen Darstellung der Ergebnisse dienen. Der untere Rand der Box kennzeichnet dabei die 25. Perzentile (75% aller Werte liegen darüber), der obere Rand die 75. Perzentile (25% aller Werte liegen darüber). Der Median wird durch die Linie in der Box gekennzeichnet, der größte und kleinste Wert durch die nach oben bzw. umgekehrt nach unten ragende T-Linie. Ausreißerwerte, die um mehr als das 1,5-fache der Boxlänge von ihr entfernt sind, werden mit einem Kreis gekennzeichnet, Extremwerte, deren Abweichung mehr als das 3-fache beträgt, mit einem Stern.

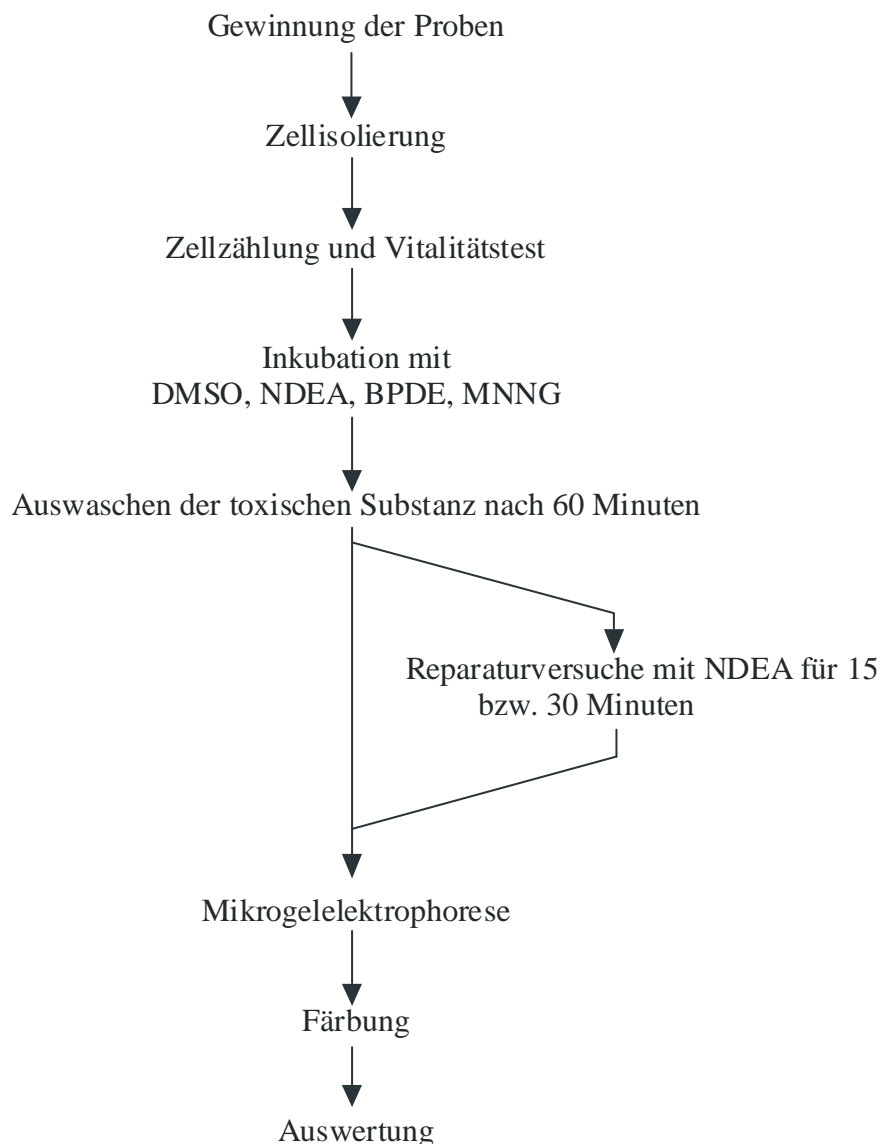


Abbildung 13: Übersicht über den Versuchsablauf der Toxizitäts- und Reparaturtests

2.4 Comet Assay - Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Proben wurden in 0,9%iger Kochsalzlösung lichtgeschützt aus dem Operationssaal ins Labor transportiert und dort innerhalb von einer Stunde weiterverarbeitet. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter Rotlicht, um weitere DNA-Schäden zu verhindern bzw. das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern.

2.4.1 Auswahl, Entnahme und Vorbereitung der Proben

Für die Kombination des Comet Assay mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung wurde Tonsillengewebe von tumorfreien Spendern verwendet. Die Vorbereitung und Behandlung der Proben für die Kombination Comet Assay / Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung erfolgte analog den Punkten 2.3.1 bis 2.3.5 und 2.3.7 bis 2.3.8. Als Testsubstanz diente BPDE.

Nach der Elektrophorese wurden die auf Objektträger fixierten Zellen nicht, wie in Punkt 2.3.9 beschrieben, mit Ethidiumbromid gefärbt, sondern für 2 bis 5 Minuten in frischem 2x SSC bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend erfolgte die Entwässerung in einer aufsteigenden Ethanolreihe 70%, 85% und 100% jeweils für 2 bis 5 Minuten.

Die Objektträger wurden dann bei 37°C für 10 Minuten zur Gelstabilisierung auf einer Heizplatte [Reichert-Jung; Medox-Nagel GmbH, Kiel] getrocknet. Die Temperatur wurde per Oberflächenthermometer kontrolliert und möglichst konstant gehalten. Eine gut erreichbare Stelle mit intakter Agaroseschicht wurde auf dem Objektträger zum Aufbringen der Gensonde markiert.

2.4.2 Vorbereitung und Hybridisierung der DNA-Sonden

Der Hybridisierungspuffer und die jeweilige DNA-Markierungsprobe wurden schonend auf Raumtemperatur erwärmt. Anschließend wurden 14 µl Hybridisierungspuffer mit 2 µl DNA-Markierungsprobe für das gewünschte Chromosom und 4 µl Aqua bidest. gut vermischt. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Färbemixtur bei 37°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Der vorbereitete Probenmix wurde auf die zuvor markierte Stelle am Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas luftblasenfrei abgedeckt. Der mit Fixogum versiegelte Objektträger wurde für 5 bis 6 Minuten auf eine 74°C warme Heizplatte gelegt. In dieser Zeit erfolgt die Kodierung der Zell-DNA und der mit Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Sonden.

Der Objektträger wurde in eine vorgewärmte Feuchtkammer gelegt und zur Hybridisierung der Zell-DNA mit den Gensonden bei 37°C für 12 bis 16 Stunden in den Brutschrank gegeben. Um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs durch Lichteinfall zu minimieren, erfolgte der Hybridisierungsvorgang unter Lichtausschluss. Die Lichtexposition bei allen nachfolgenden Arbeitsschritten wurde aus diesem Grund ebenfalls möglichst minimiert.

2.4.3 Auswaschen ungebundener DNA-Sonden

Nach der Hybridisierung wurden drei Küvetten mit Waschlösung (50% Formamid mit 2x SSC) befüllt, eine weitere Küvette mit 2 x SSC und eine fünfte Küvette mit 2x SSC / 0,1% NP40-Waschlösung. Alle wurden in einem Wasserbad [Typ 1002, GFL; Burgwedel] auf konstant 45°C temperiert.

Nach Entfernen der Deckgläser wurden die Objektträger für 1 bis 3 Sekunden in der Waschlösung geschwenkt und für 10 Minuten in der Küvette belassen, um nicht gebundene DNA-Sonden zu entfernen. In den beiden folgenden mit Waschlösung befüllten Küvetten wurde die Waschprozedur zwei weitere Male wiederholt.

Die Objektträger wurden danach in 2 x SSC geschwenkt und für 10 Minuten in der Küvette belassen, abschließend in der 2x SSC / 0,1% NP40-Waschlösung geschwenkt und für 5 Minuten inkubiert, um die nicht an zelluläre DNA gebundenen Fluoreszenzmarker weitestgehend auszuwaschen.

2.4.4 Gegenfärben der zellulären DNA

Die Objektträger wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur luftgetrocknet.

Auf die hybridisierten Stellen wurden je 18 µl Färbelösung (12 µl DAPI III mit 6 µl Antifade-Solution) gegeben. Auf diese Weise konnte neben dem markierten Chromosom auch die restliche DNA der Zelle angefärbt werden. Die so bearbeiteten Stellen wurden mit Deckgläsern der Größe 22 x 22 mm [Stärke 0, Langenbrinck; Emmendingen] versehen und mit Nagellack versiegelt.

Die Lagerung erfolgte bei -20°C und unter Lichtausschluß.

2.4.5 Datenspeicherung und digitale Auswertung

Die bearbeiteten Objektträger wurden innerhalb von drei Tagen ausgewertet, um die maximale Intensität der Farbstoffe auszunutzen.

Die Verwendung des Fluoreszenzmikroskops Leica *DM LB* mit folgenden Filtern auf einem Wechselrad erleichterte die simultane Aufnahme von DAPI III und des Fluoreszenzmarkers, ohne das der Objektträger bewegt werden musste:

DAPI III:	Anregung	367 nm	Emission	452 nm
SpectrumGreen	Anregung	509 nm	Emission	538 nm
SpectrumOrange:	Anregung	559 nm	Emission	588 nm

Die Digitalisierung erfolgte bei vierhundertfacher Vergrößerung über eine CCD-Kamera, die Bilder wurden am PC unter Verwendung des Programms „Komet ++“ [Komet Img., Liverpool; Großbritannien] vermessen und im Microsoft Excel-Format gespeichert.

Für die Kontrolle und BPDE wurden pro Versuch zwei Objektträger mit jeweils 10 Zellen ausgewertet. Dabei wurde anhand der DAPI III-Verteilung analog zu Ethidiumbromid die gesamte DNA im Kopf und Schweif des Kometen erfasst; über SpectrumGreen (für Chromosom 1 und 5) bzw. SpectrumOrange (für Chromosom 3 und 8) wurden die Position und Intensität der Fluoreszenzmarker ermittelt.

2.4.6 Quantifizierung der Schäden mit dem MCTM

Als Maßeinheit für die Schädigung der Chromosomen wurde erstmals in Anlehnung an den für den Comet Assay etablierten Olive Tail Moment der *Munich Chromosomal Tail Moment (MCTM)* entwickelt und verwendet.

$$MCTM = \frac{DNA[Schweif]^{Marker}}{(DNA[Schweif]^{Marker} + DNA[Kopf]^{Marker})} * \text{Mittl. Position DNA[Schweif]}^{Marker} - \text{Mittl. Position DNA[Kopf]}$$

Die erhobenen Daten wurden anschließend analog zu Punkt 2.3.10 mit SPSS weiter bearbeitet. Der Versuchsablauf ist in der folgenden Abbildung als Diagramm dargestellt.

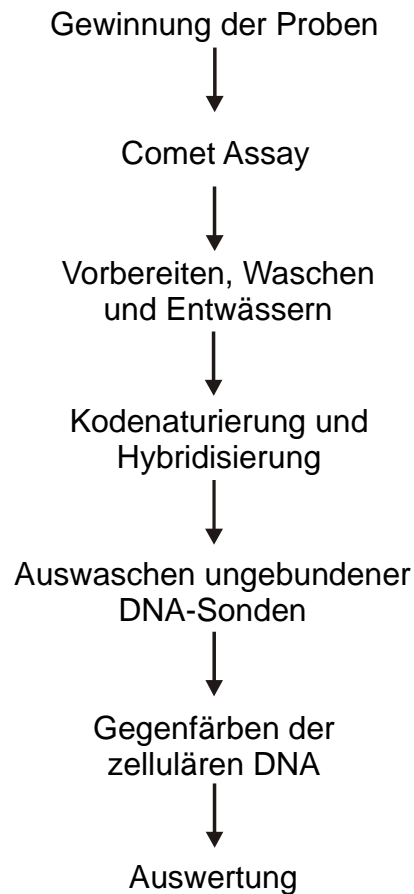


Abbildung 14: Übersicht über den Versuchsablauf der Comet/FISH-Kombination

3 Ergebnisse

Die Auswirkung genotoxischer Effekte der verwendeten Xenobiotika auf Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes wurde in der vorliegenden Arbeit durch Boxplots (siehe Punkt 2.3.10) dargestellt. Die Zellvitalitäten wurden wie beschrieben für jeden Versuch untersucht. Sie sind einleitend zu jedem Test aufgeführt. Mittels des Comet Assay wurden die Versuche zu DNA-Schädigung und -Reparaturkapazitäten der verschiedenen Gewebe dargestellt und verglichen. Die Schäden an der Gesamt-DNA einer Zelle wurden anhand des *Olive Tail Moment* mit den Schäden einzelner Chromosom durch den *Munich Chromosome Tail Moment* verglichen. *OTM*-Werte ≤ 2 sind dabei nicht als Schädigung der DNA zu werten. Absichtlich in DNA eingefügte Strangbrüche, wie dies zum Beispiel in geringer Anzahl im Rahmen der Replikation geschieht, werden ebenfalls detektiert und erhöhen den *OTM* geringfügig. [Olive et Banath, 1993].

3.1 Zellvitalitäten

Wie unter Punkt 2.3.3 beschrieben, wurde parallel zu den Genotoxizitätsuntersuchungen bei allen durchgeführten Untersuchungen die Zellvitalität mit dem Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Der Test ergab vor Beginn der Inkubation mit dem Xenobiotikum eine Vitalität von $> 95 \%$. Eine Wiederholung des Tests wurde nach dem Auswaschen des Fremdstoffes bzw. nach Ablauf der Reparaturzeit durchgeführt, um toxische Effekte durch die Testsubstanzen auszuschließen. Hier ergaben sich durchwegs Zellvitalitäten von $> 90 \%$.

3.2 Ergebnisse des Comet Assay

Zur Darstellung der unterschiedlichen Schädigungsmuster werden in den folgenden Abbildungen die in unterschiedlichem Maße fragmentierte DNA dreier Zellen gezeigt. Zur Visualisierung wurde mit Ethidiumbromid gefärbt.

In Abbildung 15 A liegt die DNA in annähernd runder Form vor; man geht von einem sehr geringen Fragmentierungsgrad aus, aufgrund der Fragmentgröße ist die Migrationsstrecke im elektrischen Feld minimal. In Abbildung 15 B ist noch die runde Form mit ungeschädigter DNA erkennbar, ein kleiner Schweif beherbergt die aufgrund der zugenommenen Schädigung weiter migrierten DNA-Fragmente. In Abbildung 15 C hat die Menge fragmentierter DNA relativ zur unfragmentierten DNA weiter zugenommen, eine größere Menge von DNA-Fragmenten ist in Richtung Anode gewandert.



Abbildung 15: Mit Ethidiumbromid gefärbte zelluläre DNA mit nahezu keiner (A), mittelgradiger (B) und starker (C) Schädigung. (Fluoreszenzmikroskopie bei 400-facher Vergrößerung)

Für die statistische Analyse wurden 80 Zellen pro Testsubstanz und Patient ausgewertet. Als Marker für die Schädigung der Gesamt-DNA wurde der *Olive Tail Moment (OTM)*, wie unter Punkt 2.4.6 beschrieben, bestimmt. Er ist im Folgenden im Mittelwert und in der Standardabweichung (\pm) angegeben.

3.2.1 DNA-Schädigung nach Fremdstoffinkubation

Die drei Spendergruppen wurden mit dem Friedman-Test auf signifikant unterschiedliche OTM-Wert gegenüber der Negativkontrolle untersucht. Bei $p \leq 0,001$ für BPDE und NDEA aller Spendergruppen wurde wie beschrieben fortgefahren.

3.2.1.1 DNA-Schädigung an Tonsillenschleimhaut von Kontrollpatienten

Am Beispiel von makroskopisch gesunder Tonsillenschleimhaut von tumorfreien Spendern wurden die genotoxischen Auswirkungen der Umweltgifte BPDE und NDEA auf humane Zellen des oberen Aerodigestivtraktes untersucht.

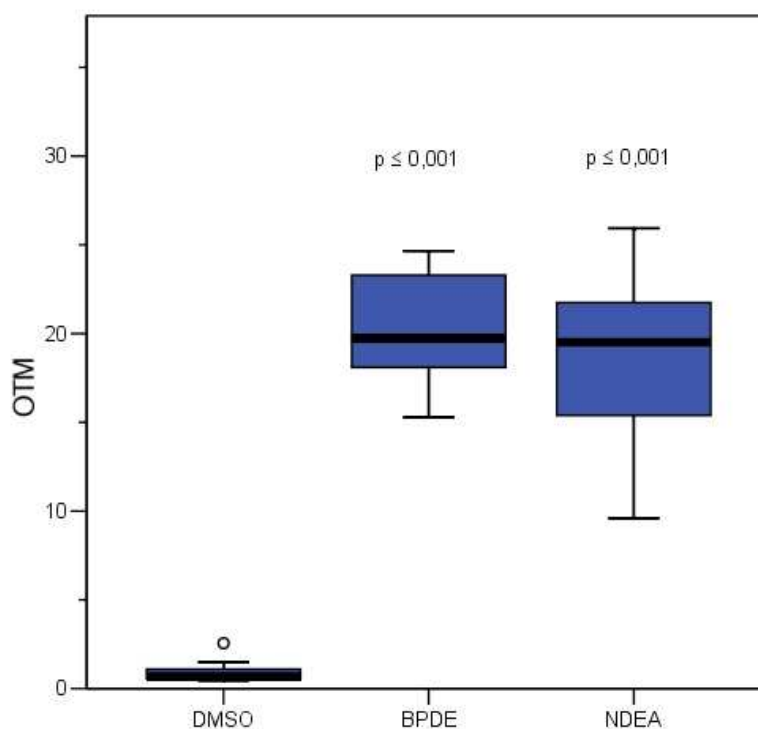


Abbildung 16: Mutagensensitivität der Kontrollpatienten, gemessen an Tonsillenschleimhaut (X-Achse: Testsubstanz; Y-Achse: mittlere OTM-Werte; n = 20)

Der Median der mittleren *OTM*-Werte nach Inkubation mit BPDE lag bei Tonsillenschleimhaut von Spendern ohne maligne Erkrankungen im Bereich von $22,7 \pm 8,3$. Die Schädigung durch Inkubation mit NDEA lag bei *OTM* $18,4 \pm 4,4$. Die Negativkontrolle mit DMSO ergab einen *OTM* von $0,9 \pm 0,5$.

Der statistische Vergleich mittels des Wilcoxon-Tests fiel mit einem p-Wert von kleiner 0,001 bei beiden Xenobiotika hoch signifikant gegenüber der Negativkontrolle aus.

3.2.1.2 DNA-Schädigung an Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarcinom

Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarcinom wurde ebenfalls mit BPDE und NDEA inkubiert und die DNA-Schädigung gemessen.

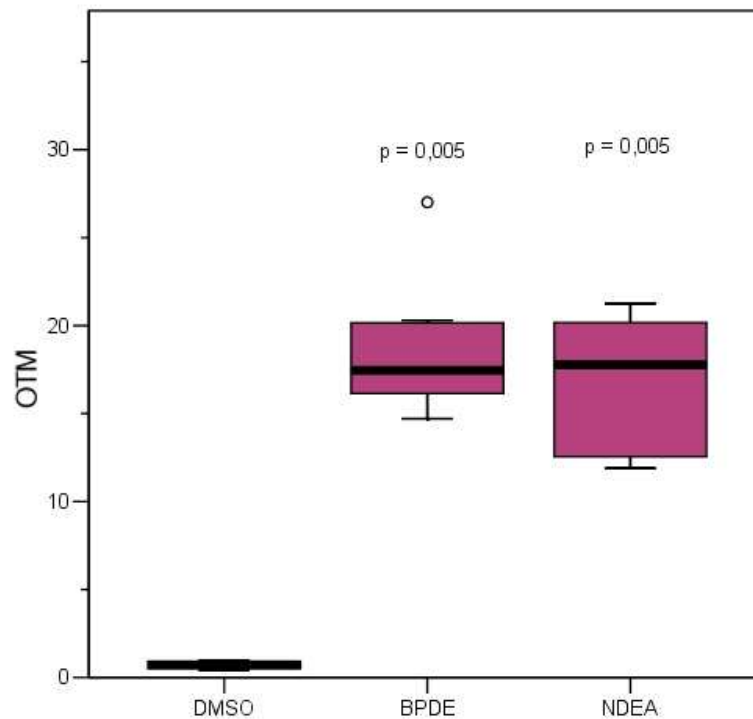


Abbildung 17: Mutagensensitivität der Spender mit Tonsillenkarcinom, gemessen an Tonsillenschleimhaut (X-Achse: getestete Substanz; Y-Achse: mittlere OTM-Werte; n = 10)

Die Inkubation mit BPDE ergab an Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarcinom eine Schädigung von $OTM 18,3 \pm 3,6$. Die Inkubation mit NDEA führte zu einer Schädigung von $OTM 16,9 \pm 3,7$, bei der Negativkontrolle von $OTM 0,7 \pm 0,2$. Der statistische Vergleich ergab einen p-Wert von 0,005 für BPDE und NDEA gegenüber der Negativkontrolle.

3.2.1.3 DNA-Schädigung an Larynx-Schleimhaut von Spendern mit Larynx-Karzinom

Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarcinom wurde mit den Umweltgiften BPDE und NDEA inkubiert und die DNA-Schädigung gemessen.

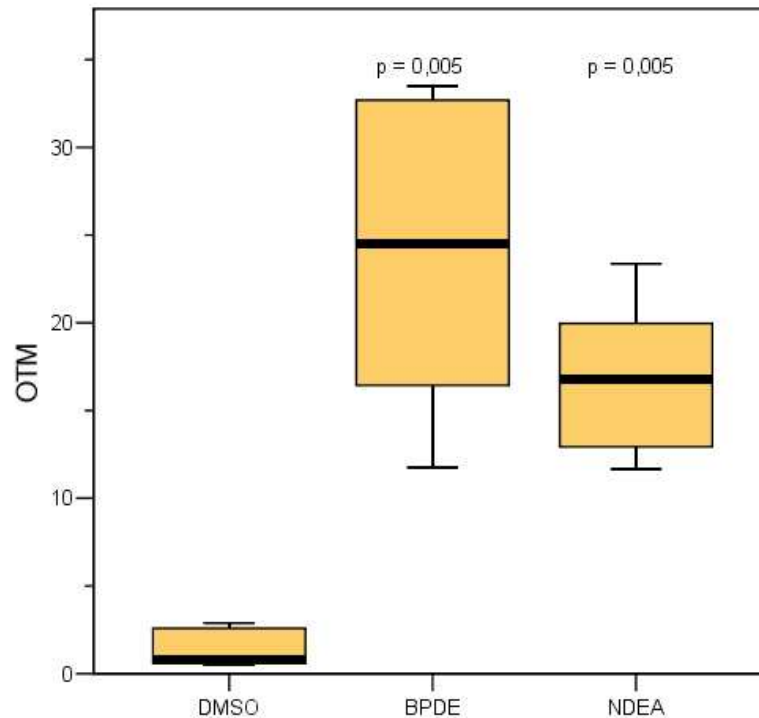


Abbildung 18: Mutagensensitivität, gemessen an Larynxschleimhaut von Spendern mit Larynxkarzinom (X-Achse: Testsubstanzen; Y-Achse: Mittlere OTM-Werte; n = 10)

Bei Larynxschleimhaut von Gewebsspendern mit Larynxkarzinom führte die Inkubation mit BPDE zu einer DNA-Schädigung von $OTM\ 23,9 \pm 7,7$. Nach der Inkubation mit NDEA zeigten die Zellen OTM -Werte im Bereich von $16,9 \pm 3,8$. Die Negativkontrolle mit DMSO führte zu einem OTM von $1,3 \pm 1,0$.

Das statistische Signifikanzniveau konnte mit $p = 0,005$ für beide Testsubstanzen nachgewiesen werden.

3.2.2 Vergleich gewebespezifischer Mutagensensitivität

Im Kruskal-Wallis-Test wie bei den im Folgenden durchgeführten Mann-Whitney-U-Tests ergaben sich für die unten aufgeführten Vergleiche keine signifikanten Unterschiede zwischen den Spenderkollektiven.

3.2.2.1 Mutagensensitivität von Tonsillenschleimhaut gesunder Spendern und von Spendern mit Tonsillenkarzinom

Tonsillenschleimhaut von Spendern mit und ohne Tonsillenkarzinom wurde mit den Schadstoffen BPDE und NDEA inkubiert. Die Sensitivität der beiden Gewebe wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test verglichen.

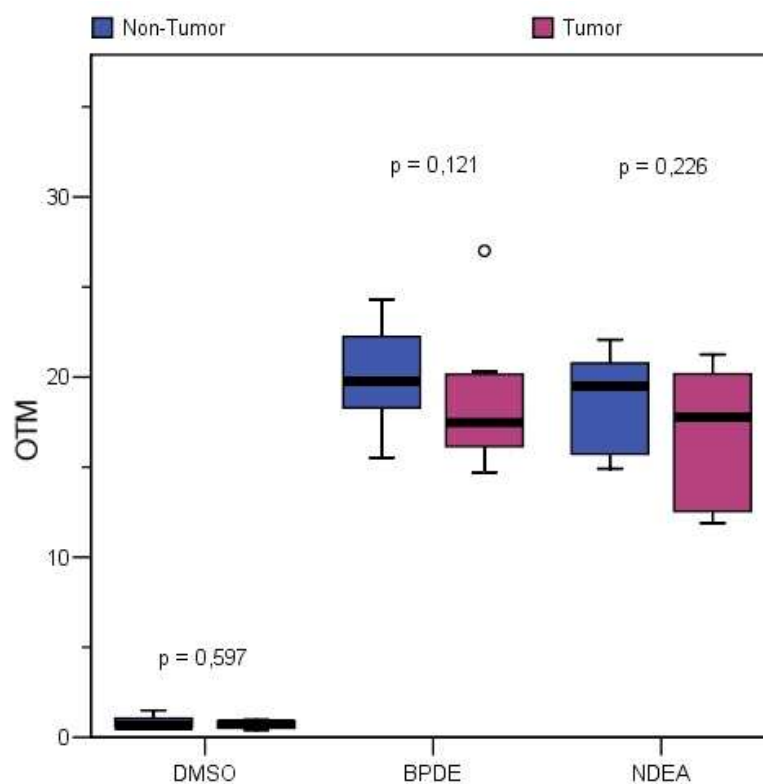


Abbildung 19: Vergleich der Mutagensensitivität von Spendern mit und ohne Tonsillenkarzinom anhand von Tonsillenschleimhaut (X-Achse: Testsubstanzen; Y-Achse: Mittlerer OTM; n = 10)

Der Vergleich von Tonsillenschleimhaut von Spender mit und ohne Tonsillenkarzinom wurde mit einer Kollektivgröße von jeweils 10 Patienten durchgeführt.

Für Gewebespenders ohne maligne Erkrankung ergaben sich die in Punkt 3.2.1.1 aufgeführten OTM-Werte für die DNA-Schädigung. Die OTM-Werte für Tonsillengewebe von Spendern mit Tonsillenkarzinom sind unter Punkt 3.2.1.2 zusammengefasst.

Beim Vergleich der DNA-Schädigung beider Kollektive ergaben sich für die Negativkontrolle ein p-Wert von 0,597; bei BPDE wurde ein Signifikanzniveau von $p = 0,121$ und bei NDEA von $p = 0,226$ erreicht. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Spenderkollektiven.

3.2.2.2 Mutagensensitivität von Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarcinom und von Larynxschleimhaut von Spendern mit Larynxkarcinom

Tonsillenkarcinome von Spendern mit Tonsillenkarcinom und Larynxmukosa von Spendern mit Larynxkarcinom wurde mit den Xenobiotika BPDE und NDEA inkubiert. Es erfolgte ein Vergleich der DNA-Schädigung.

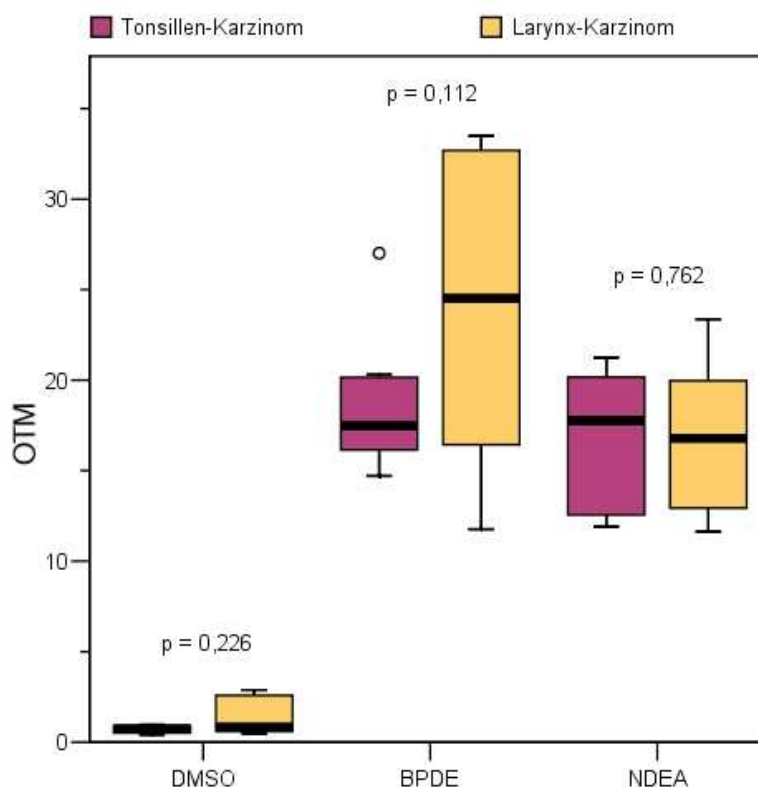


Abbildung 20: Vergleich der Mutagensensitivität von Spendern tonsillärer Schleimhaut mit Tonsillenkarcinom und Spendern laryngealer Schleimhaut mit Larynxkarcinom (X-Achse: Testsubstanzen; Y-Achse: mittleren OTM-Werte; n = 10)

Der Vergleich wurde mit jeweils 10 Proben je Gruppe durchgeführt. Für Spender mit Tonsillenkarcinom ergaben sich die in Punkt 3.2.1.2 aufgeführten OTM-Werte für die DNA-Schädigung. Die OTM-Werte für Spender mit Larynxkarcinom sind unter Punkt 3.2.1.3 zusammengefasst.

Die DNA-Schädigungen beider Gewebe wurde verglichen, dabei ergab sich für die Negativkontrollen ein p-Wert von 0,226; der Vergleich der Schädigung erreichte bei BPDE ein Signifikanzniveau von $p = 0,112$ und bei NDEA von $p = 0,762$. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Spenderkollektiven.

3.2.3 DNA-Reparatur nach Fremdstoffexposition

3.2.3.1 DNA-Reparatur von Tonsillenschleimhaut tumorfreier Spender

Tonsillenschleimhaut von malignomfreien Spendern wurde mit NDEA inkubiert. Anschließend wurde das Xenobiotikum ausgewaschen und die Zellen hatten 15 min bzw. 30 min lang Gelegenheit zur DNA-Reparatur.

Die asymptotische Signifikanz im Friedman-Test ergab einen Wert von $p \leq 0,001$, so dass mit dem Wilcoxon-Test weiter verfahren wurde.

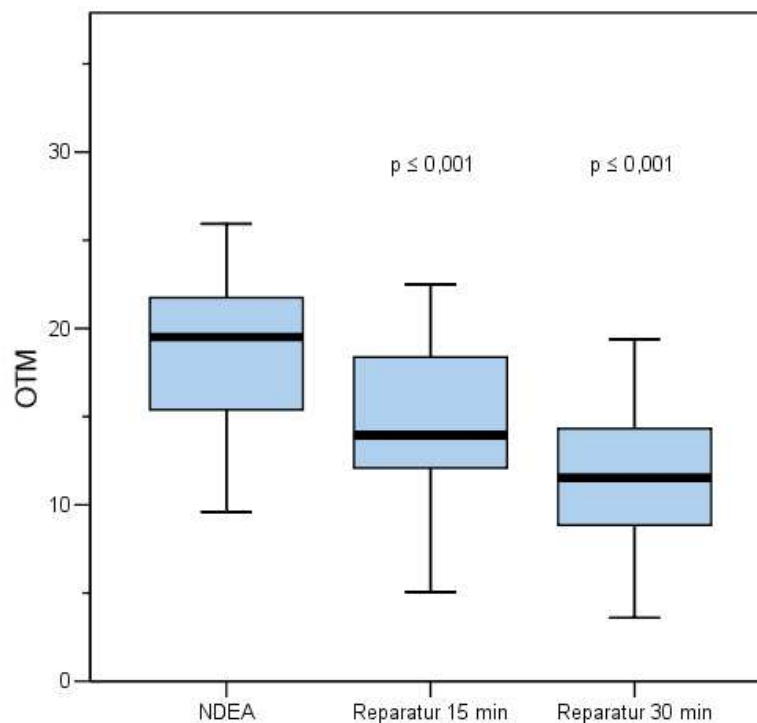


Abbildung 21: Darstellung der DNA-Reparatur von Tonsillenschleimhaut tumorfreier Spender (X-Achse: Reparaturzeit; Y-Achse: mittlerer OTM; n = 20)

Die Initialschädigung an Tonsillenschleimhaut von Spendern ohne Tonsillenkarcinom nach Inkubation mit NDEA lag bei $OTM 18,4 \pm 4,4$. Nach einem Reparaturintervall von 15 min sank der OTM -Wert auf $14,5 \pm 4,5$. Nach insgesamt 30 min Reparaturzeit lag der OTM bei $12,0 \pm 4,4$.

Mit einem Signifikanzwert von $p \leq 0,001$ gegenüber der Ausgangsschädigung durch NDEA konnte der DNA-Schaden sowohl nach 15 min, als auch nach 30 min Reparatur, in signifikantem Maße durch die Zellen verringert werden.

3.2.3.2 DNA-Reparatur tonsillärer Schleimhautzellen von Spendern mit Tonsillenkarzinom

Nach Inkubation mit NDEA von Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarzinom wurde der Schadstoff ausgewaschen; nach 15 min bzw. 30 min Reparaturzeit wurde die verbliebene DNA-Schädigung bestimmt.

Die asymptotische Signifikanz im Friedman-Test ergab einen Wert von $p \leq 0,03$, so dass mit dem Wilcoxon-Test weiter verfahren wurde.

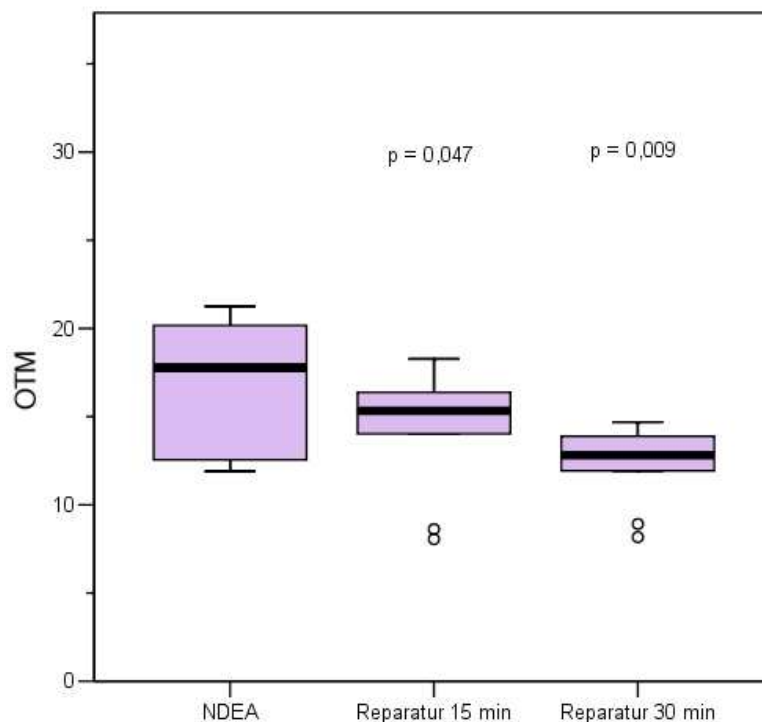


Abbildung 22: DNA-Reparatur tonsillärer Schleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarzinom (X-Achse: Reparaturzeit; Y-Achse: mittlerer OTM; n = 10)

Die Initialschädigung an Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarzinom nach Inkubation mit NDEA lag im Bereich von $OTM 16,9 \pm 3,7$. Nach Entfernen des Schadstoffes und einem Reparaturintervall von 15 min wurde ein OTM -Wert von $14,3 \pm 3,4$ bestimmt. Nach insgesamt 30 min Reparaturzeit wurde ein OTM von $12,3 \pm 2,2$ gemessen.

Gegenüber der Ausgangsschädigung durch NDEA zeigte sich mit $p = 0,047$ eine signifikante Verringerung der DNA-Schäden nach 15 min Reparaturzeit, nach 30 min ebenfalls eine signifikante Abnahme mit $p = 0,009$.

3.2.3.3 DNA-Reparatur laryngealer Schleimhautzellen von Spendern mit Larynx-Karzinom

Laryngeale Schleimhautzellen von Spendern mit Larynxkarzinom konnten nach Inkubation mit NDEA und Auswaschen der Substanz 15 min bzw. 30 min lang den entstandenen DNA-Schaden reparieren. Die verbliebene Schädigung wurde nach diesem Zeitraum bestimmt. Im Friedman-Test zeigte sich eine asymptotische Signifikanz von $p \leq 0,045$, so dass im Weiteren der Wilcoxon-Test angewandt wurde.

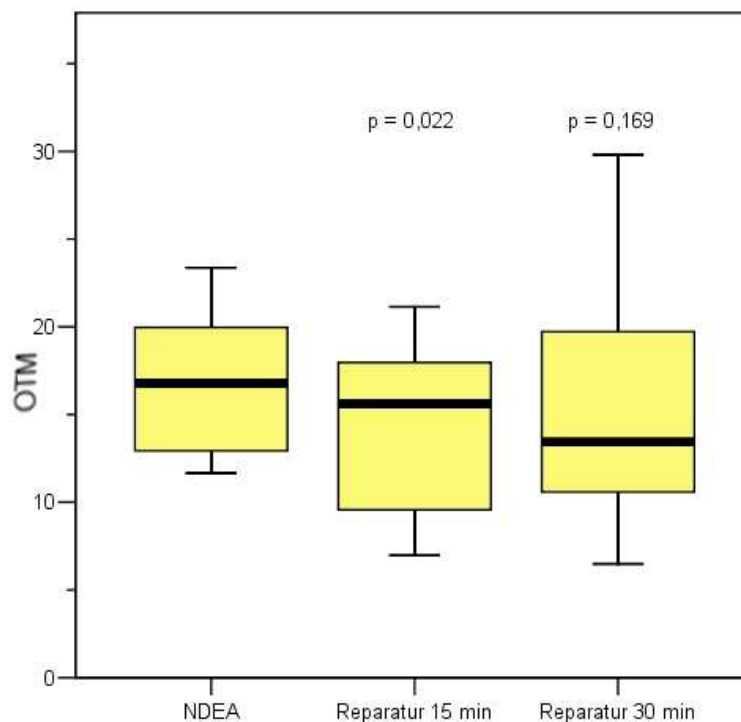


Abbildung 23: DNA-Reparatur von Larynxschleimhaut von Spendern mit Larynxkarzinom (X-Achse: Reparaturintervall; Y-Achse: mittlerer OTM; n = 10)

Nach Inkubation mit NDEA trat bei Larynxschleimhaut von Spendern mit Larynxkarzinom initial eine Schädigung von $OTM 16,9 \pm 3,8$ auf. Nach Auswaschen des Nitrosamins und einem Reparaturintervall von 15 min sank der *OTM*-Wert auf $14,6 \pm 4,5$. Nach insgesamt 30-minütiger Reparaturzeit lag der *OTM* bei $15,0 \pm 6,2$.

Mit $p = 0,022$ zeigte sich eine signifikante Reduzierung des DNA-Schaden gegenüber der Initialschädigung nach 15 min. Aufgrund der hohen Varianz war die Verringerung der DNA-Schäden während des 30 min dauernden Reparaturintervalls gegenüber der Ausgangsschädigung mit $p = 0,169$ jedoch nicht signifikant.

3.2.4 Vergleich der DNA-Reparatur verschiedener Kollektive

3.2.4.1 DNA-Reparaturfähigkeit von Tonsillenschleimhaut von gesunden Spendern und Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillenkarcinom

Das Verhalten von Tonsillenschleimhaut von Spendern mit und ohne Tonsillenkarcinom wurde nach 15 min bzw. 30 min DNA-Reparaturzeit verglichen.

Im Vergleich der beiden Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test ergaben sich zu den Mann-Whitney-U-Tests identische Signifikanzniveaus.

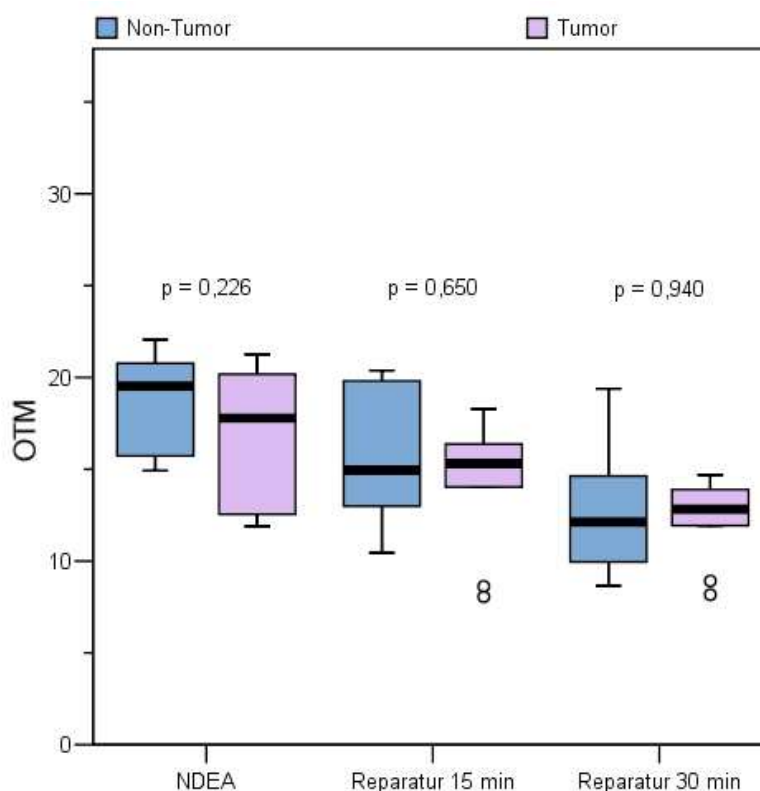


Abbildung 24: Reparaturverhalten von Spendern mit und ohne Tonsillenkarcinom anhand von Tonsillenschleimhaut (X-Achse: Reparaturintervall; Y-Achse: mittlerer OTM; n = 10)

Die DNA-Reparaturfähigkeit von Schleimhautzellen der Tonsille wurde an jeweils 10 Proben je Spenderkollektiv untersucht. Dabei ergaben sich für Spender ohne Tonsillenkarcinom die in Punkt 3.2.3.1, für Spender mit Tonsillenkarcinom die unter Punkt 3.2.3.2 aufgeführten OTM-Werte.

Im Vergleich des DNA-Reparaturverhaltens beider Patientengruppen unterschieden sich die Ausgangsschädigungen durch NDEA mit einem p-Wert von 0,226 statistisch nicht signifikant. Nach 15 min Reparaturzeit ergab der Vergleich der Schädigung mit $p = 0,650$ keinen signifikanten Unterschied, auch nach 30 min ergab sich mit $p = 0,940$ keine Signifikanz.

3.2.4.2 DNA-Reparaturfähigkeit von Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillienkarzinom und Larynxschleimhaut von Spendern mit Larynxkarzinom

Laryngeale Schleimhautzellen von Spendern mit Larynxkarzinom und Schleimhaut vom Tonsillengewebe von Spendern mit Tonsillienkarzinom wurden mit NDEA inkubiert. 15 min bzw. 30 min nach dem Auswaschen des Xenobiotikums wurde der DNA-Schaden bestimmt. Im Vergleich der beiden Gruppen mit dem Kruskal-Wallis-Test ergaben sich zu den Mann-Whitney-U-Tests identische Signifikanzniveaus.

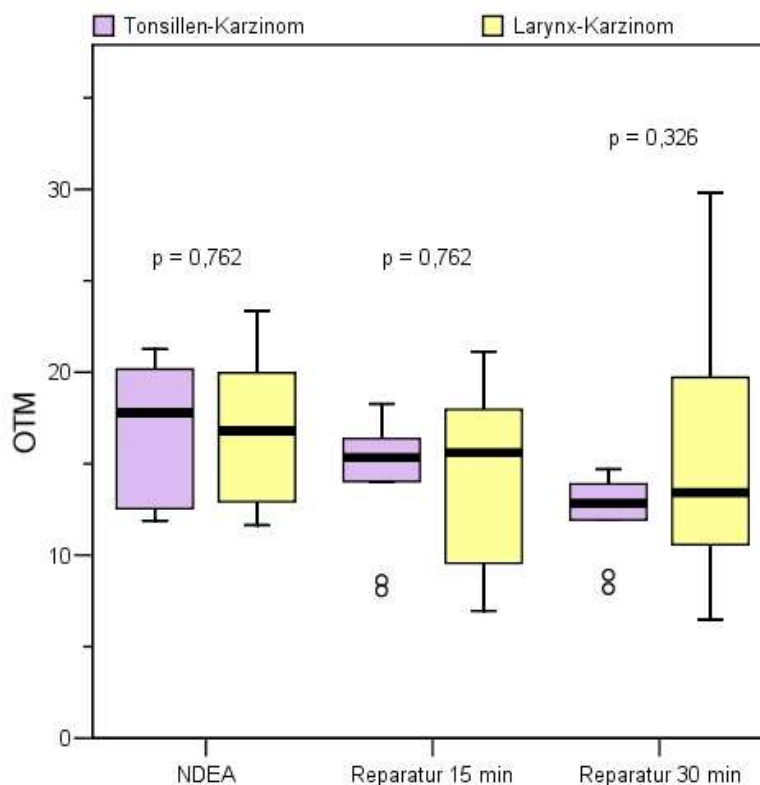


Abbildung 25: Reparaturverhalten von Tonsillenschleimhaut von Spendern mit Tonsillienkarzinom im Vergleich zu Larynxschleimhaut von Spendern mit Larynxkarzinom (X-Achse: Reparaturintervall; Y-Achse: mittlerer OTM; n = 10)

Die DNA-Reparaturuntersuchungen ergaben für Spender mit Tonsillienkarzinom die in Punkt 3.2.3.2 aufgeführten *OTM*-Werte. Die *OTM*-Werte für Spender mit Larynxkarzinom sind unter Punkt 3.2.3.3 zusammengefasst.

Das DNA-Reparaturverhalten beider Gruppen wurde verglichen. Die Ausgangsschädigung durch NDEA waren mit einem p-Wert von 0,762 nicht signifikant verschieden. Der Vergleich der Schädigung nach 15 min Reparaturzeit erreicht ein Signifikanzniveau von $p = 0,762$ und nach 30 min ein Niveau von $p = 0,326$.

Anhand der jeweils 10 Proben pro Spenderkollektiv ließen sich keine signifikanten Unterschiede im Reparaturverhalten nachweisen.

3.3 Ergebnisse von Comet/FISH

Die folgenden drei Abbildung zeigen analog zu Abbildung 15 mehrere Zellen, deren DNA durch genotoxische Substanzen fragmentiert ist. Zusätzlich ist neben der unspezifischen DNA-Färbung mit *DAPI-III* (blau) durch die FISH-Technik ein Chromosom mit einem spezifischen Marker (rot) angefärbt worden. Anhand der Anzahl und Position der markierten Chromosomenteile können Rückschlüsse auf den Schaden gezogen werden, den das markierte Chromosom erhalten hat.

Abbildung 26 A zeigt DNA, die in annähernd runder Form vorliegt, es zeigen sich zwei eng beieinander liegende rote Punkte. Dieses Muster ist typisch für ungeschädigte DNA: Ohne nachweisbare Fragmentierung ist sie während der Elektrophorese nicht migriert, die beiden Kopien des Chromosoms liegen im Zellkern. Die DNA der Zelle von Abbildung 26 B zeigt mäßige Schädigung: Teile der DNA sind aus dem Zellkern migriert und bilden einen deutlich erkennbaren Kometenschweif. Teile des markierten Chromosoms befinden sich noch im Zellkern, aber einige Bruchstücke sind auch im Kometenschweif nachweisbar. Abbildung 26 C zeigt DNA einer stark geschädigten Zelle. Ein wesentlich größerer Teil der DNA findet sich im Schweif, auch die Anzahl der Bruchstücke des markierten Chromosoms ist gestiegen. Zusätzlich hat auch die Migrationsstrecke deutlich zugenommen.

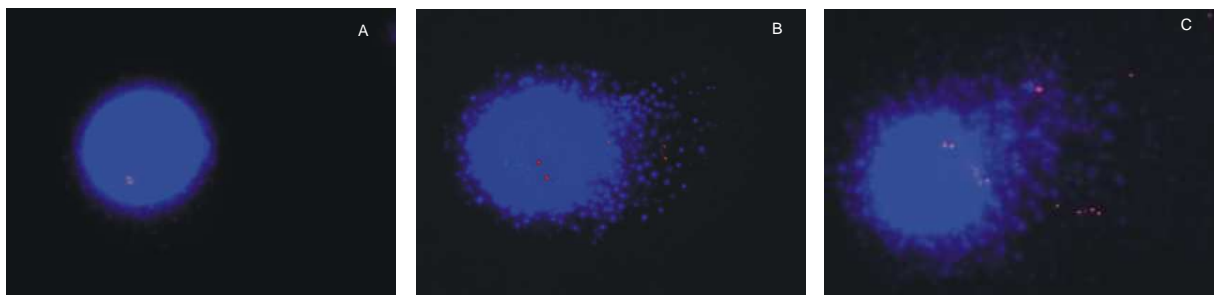


Abbildung 26: Mit *DAPI III* und einem Fluoreszenzmarker gefärbte Zellen; die DNA der Zelle unter (A) ist nicht geschädigt, unter (B) ist sie mäßig geschädigt. Die DNA unter (C) ist stark geschädigt. (Fluoreszenzmikroskopie bei 400-facher Vergrößerung)

Pro Versuch wurden 10 Zellen je Objektträger für die statistische Analyse untersucht. Der Schaden an der Gesamt-DNA wurde mit dem *Olive Tail Moment (OTM)* bestimmt. Spezifisch am untersuchten Chromosom aufgetretene Schädigung wurde mit dem neu etablierten *Munich chromosomal Tail Moment (MCTM)* quantifiziert (siehe 2.4.6). Beide sind im Folgenden mit Mittelwert und Standardabweichung (\pm) angegeben.

3.3.1 DNA-Schädigung durch BPDE

Zur Etablierung der Kombination Comet/FISH an Mukosazellen des oberen Aerodigestivtraktes wurden Zellen der Tonsillen von Kontrollpatienten mit BPDE und DMSO als Negativkontrolle inkubiert. Anschließend wurde der *MCTM* anhand des spezifischen Markers als Schädigungsmaß für das untersuchte Chromosom und an denselben Zellen anhand der *DAPI-III*-Verteilung der *OTM* als Maß für die Schädigung der gesamten DNA bestimmt.

Aufgrund der schwierigen Auswertung konnte nicht für jedes Chromosom die gleiche Fallzahl erreicht werden.

3.3.1.1 DNA-Schädigung an Chromosom 1

Die gesamte DNA der untersuchten Zellen wurde mit *DAPI-III* gefärbt und die Schädigung mit dem *OTM* bestimmt. Zusätzlich wurde spezifisch Chromosom 1 angefärbt und die Schädigung mittels *MCTM* quantifiziert.

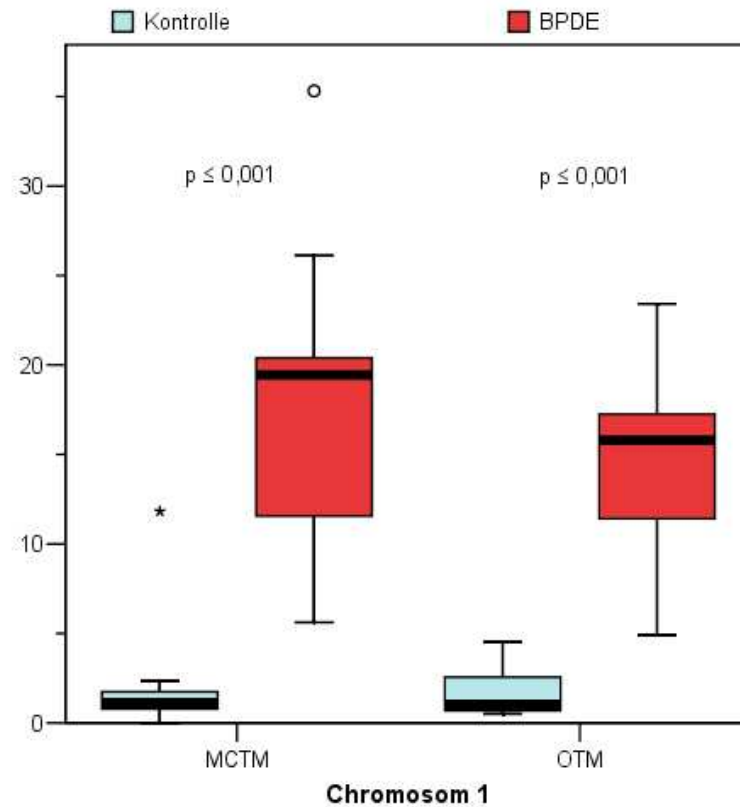


Abbildung 27: Gegenüberstellung der Schädigung von Chromosom 1 und der gesamten DNA anhand von Tonsillenschleimhaut von Kontrollpatienten (X-Achse: Vergleichswert; Y-Achse: mittlere Schädigung; n = 10)

Tonsillenschleimhaut von Kontrollpatienten zeigte für Chromosom 1 eine Schädigung von *MCTM* $17,4 \pm 9,1$ nach Inkubation mit BPDE, die Schädigung der Negativkontrolle lag bei *MCTM* $2,1 \pm 3,5$. Die Gesamt-DNA ergab einen *OTM*-Wert von $13,6 \pm 6,4$ nach Inkubation mit BPDE und einen *OTM* $1,6 \pm 1,3$ für die Negativkontrolle.

Der statistische Vergleich zeigte mit einem p-Wert von $\leq 0,001$ in *MCTM* als auch *OTM* eine signifikante Schädigung durch BPDE gegenüber der Negativkontrolle.

3.3.1.2 DNA-Schädigung an Chromosom 3

Chromosom 3 wurde spezifisch angefärbt und die Schädigung mittels *MCTM* quantifiziert. Zusätzlich wurde die gesamte DNA der untersuchten Zellen mit *DAPI-III* gefärbt und die Schädigung mit dem *OTM* bestimmt..

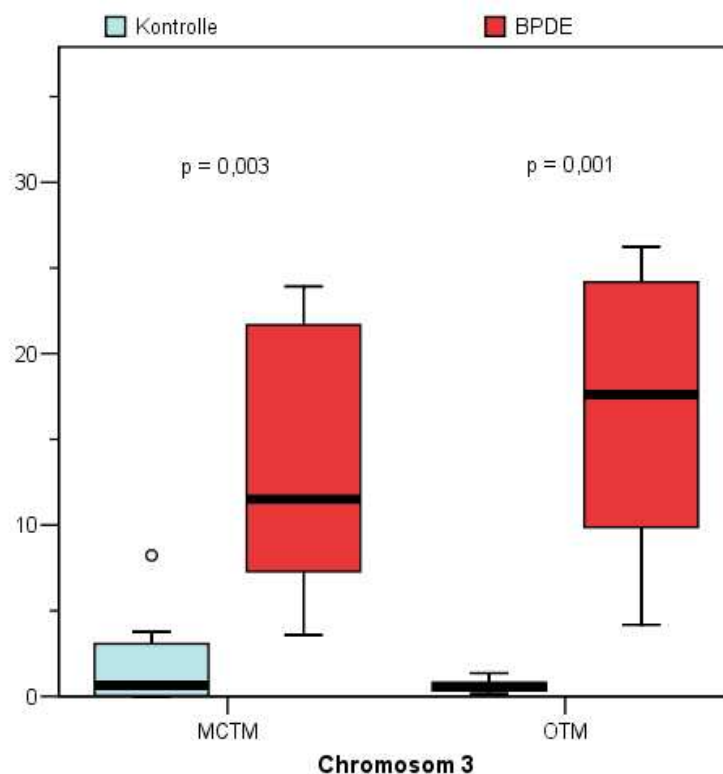


Abbildung 28: Gegenüberstellung der Schädigung von Chromosom 3 und der gesamten DNA anhand von Tonsillenschleimhaut von Kontrollpatienten (X-Achse: MCTM bzw. OTM; Y-Achse: mittlere Schädigung; n = 8)

Tonsillenschleimhaut Kontrollpatienten zeigte nach Inkubation mit BPDE eine Schädigung mit einem *MCTM* von $13,6 \pm 7,9$ an Chromosom 3, die Schädigung durch die Negativkontrolle lag bei einem *MCTM* von $3,0 \pm 2,9$. BPDE führte an der Gesamt-DNA zu einem *OTM*-Wert von $16,7 \pm 8,1$, die Negativkontrolle ergab einen *OTM* von $0,6 \pm 0,4$. Mit einem Signifikanzwert von $p \leq 0,001$ in der statistischen Analyse war die Schädigung von BPDE gegenüber der Negativkontrolle sowohl für den *OTM*, als auch für den *MCTM* signifikant.

3.3.1.3 DNA-Schädigung an Chromosom 5

Spezifische Anfärbung von Chromosom 5 und Quantifizierung der Schädigung mittels *MCTM*. Zusätzlich wurde die gesamte DNA der untersuchten Zellen mit *DAPI-III* gefärbt und die Schädigung mit dem *OTM* bestimmt.

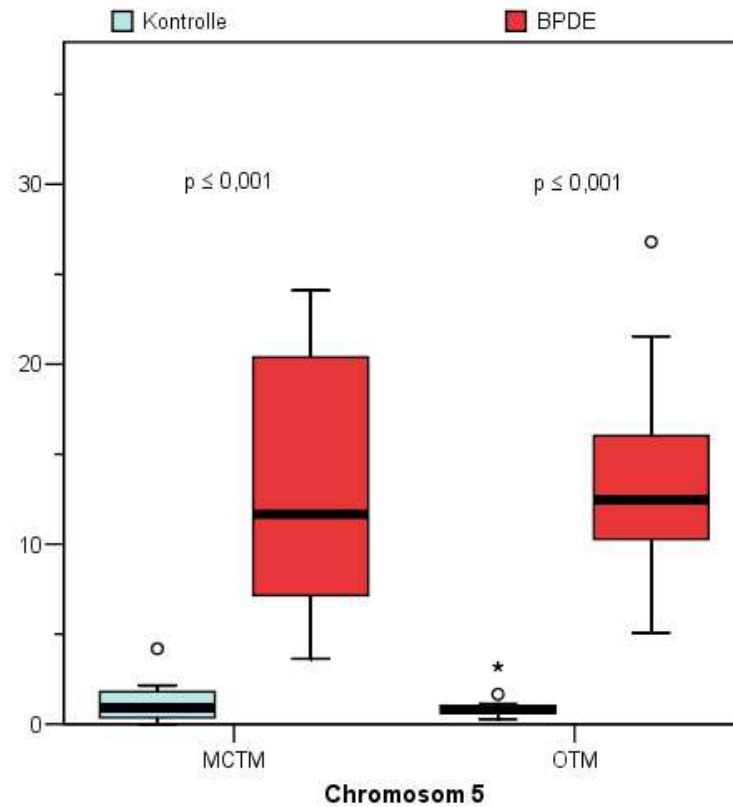


Abbildung 29: Gegenüberstellung der Schädigung von Chromosom 5 und der gesamten DNA anhand von Tonsillenschleimhaut von Kontrollpatienten (X-Achse: MCTM bzw. OTM; Y-Achse: mittlere Schädigung; n = 11)

Nach Inkubation mit BPDE zeigte sich an Chromosom 5 ein *MCTM* von $14,9 \pm 11,2$, der durch die Negativkontrolle bedingte *MCTM* lag bei $1,3 \pm 1,2$. Der *OTM* nach Inkubation mit BPDE lag bei $13,9 \pm 6,2$, nach Inkubation mit der Negativkontrolle bei $1,0 \pm 0,8$.

Die Schädigung von BPDE gegenüber der Negativkontrolle war in der statistischen Analyse einer Signifikanz von $p \leq 0,001$ sowohl für den *OTM*, als auch für den *MCTM* signifikant.

3.3.1.4 DNA-Schädigung an Chromosom 8

Die gesamte DNA von Tonsillenzellen von Kontrollpatienten wurde mit *DAPI-III* gefärbt und die Schädigung mit dem *OTM* bestimmt. Chromosom 8 wurde spezifisch angefärbt und die Schädigung mit dem *MCTM* quantifiziert.

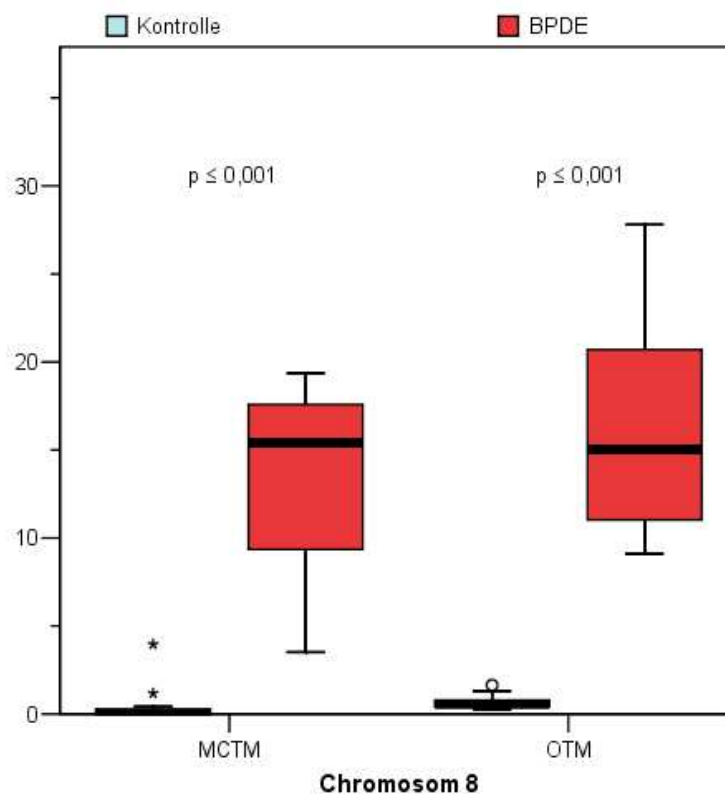


Abbildung 30: Gegenüberstellung Schädigung von Chromosom 8 und der gesamten DNA anhand von Tonsillenschleimhaut von Kontrollpatienten (X-Achse: MCTM bzw. OTM; Y-Achse: mittlere Schädigung; n = 11)

Die Quantifizierung von DNA-Schäden an Tonsillenschleimhaut tumorfreier Spender durch BPDE erbrachte für Chromosom 8 eine spezifische Schädigung von MCTM $13,3 \pm 6,6$, für die Negativkontrolle lag der MCTM bei $0,5 \pm 2,1$. Die Quantifizierung der Schäden an der Gesamt-DNA durch BPDE erbrachte einen OTM von $16,3 \pm 3,7$, die Negativkontrolle einen OTM von $0,7 \pm 0,3$.

Mit einem Signifikanzwert von $p \leq 0,001$ in der statistischen Analyse war die Schädigung von BPDE gegenüber der Negativkontrolle für MCTM und OTM statistisch signifikant.

3.3.2 Vergleich der untersuchten Chromosomen

Beim Vergleich der *MCTM*-Werte wurde abgeklärt, ob signifikante Unterschiede in der Schädigung der einzelnen Chromosomen zueinander bestehen. Zusammenfassend ergaben im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede in den *MCTM*.

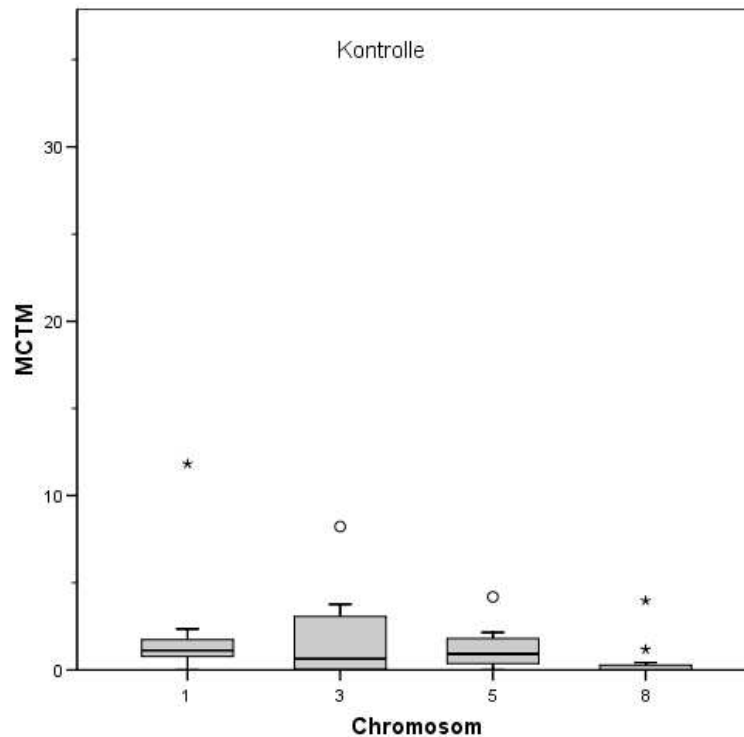


Abbildung 31: Gegenüberstellung aller *MCTM* für die Negativkontrollen (X-Achse: Chromosomen; Y-Achse: mittlere Schädigung; n = 8)

Der Kruskal-Wallis-Test hat für die Negativkontrollen eine asymptotische Signifikanz von $p = 0,059$ beim *MCTM* ergeben, daher zeigten sich kein signifikanter Unterschied in der Schädigung der untersuchten Chromosomen 1, 3, 5 und 8.

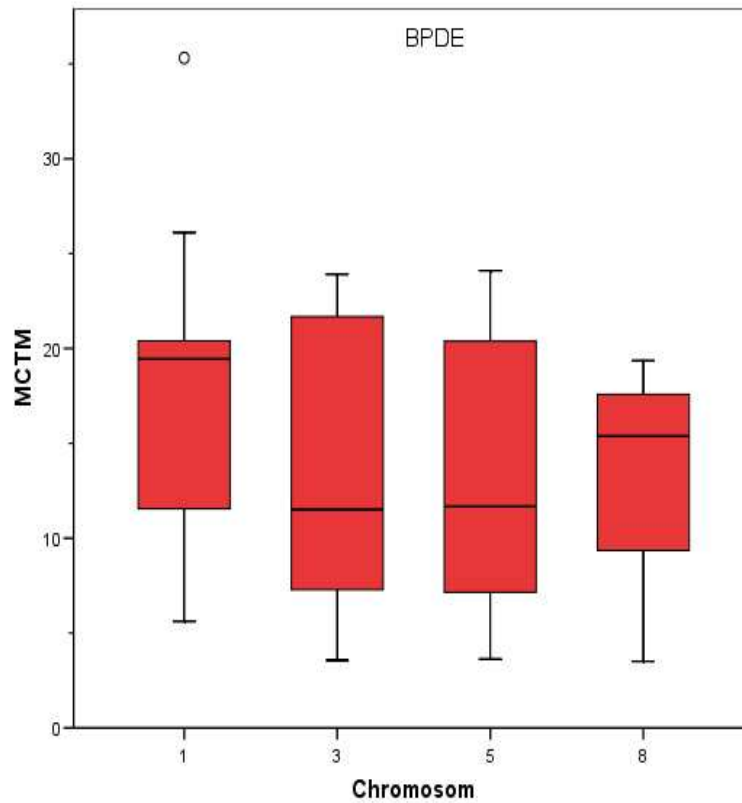


Abbildung 32: Gegenüberstellung aller MCTM für BPDE (X-Achse: Chromosomen; Y-Achse: mittlere Schädigung; n = 8)

Eine statistische Analyse der *MCTM* der Chromosomen 1, 3, 5 und 8 mit dem Kruskal-Wallis-Test ergab, wie bei den Negativkontrollen, keine signifikanten Unterschiede in der Schädigung der mit BPDE inkubierten Zellen (asymptotische Signifikanz bei $p = 0,419$). Auf weitere statistische Tests wurde deshalb verzichtet.

4 Diskussion

4.1 Auswahl und Epidemiologie des Spenderkollektivs

Die Spender der verwendeten Testgewebe entstammten allesamt dem Patientengut der Klinik und Poliklinik für Hals, Nasen- und Ohrenkrankheiten der Ludwig-Maximilians-Universität München. Anamnestisch wurden neben Alter, Geschlecht und Beruf auch Angaben zum Alkohol- und Tabakkonsum erhoben, um die Beeinflussung der Schleimhäute durch Fremdstoffe abzuschätzen. Um den Einfluss von Störgrößen auf das Ergebnis möglichst gering zu halten, wurden Patienten mit malignen Erkrankungen, Immundefekten oder langer Glukokortikoidtherapie von der Kontrollgruppe ausgeschlossen. Ebenfalls wurden Malignompatienten mit neoadjuvanten Therapieschemata (Radio- oder Chemotherapie vor der Entnahme des Testgewebes) nicht in das Testkollektiv aufgenommen. Blasiak et al. konnten im Comet Assay eine Abnahme des Reparaturverhaltens peripherer Lymphozyten aus dem Blut von Patientinnen mit Mammakarzinom nach Chemotherapie im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachweisen. Tumor- und Non-Tumor-Patienten wurden darüber hinaus nach Alter mit einer Abweichung von maximal +/- 2 Jahren gematcht [Blasiak et al., 2004].

Die Auswahl der Spender erbrachte eine dem Erkrankungsbild ähnliche Alters- und Geschlechtsverteilung. Der Missbrauch von Alkohol und Tabak als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung von malignen Erkrankungen im oberen Aerodigestivtrakt (siehe Punkt 1.2) spiegelte sich ebenfalls im durchschnittlichen Konsum der Spendergruppen wider [Genden et al., 2002; Jakse et Vinzenz, 1992; Pöschl et Seitz, 2004]. Besonders hervorzuheben ist dabei der weiter unten aufgeführte, überdurchschnittlich hohe Alkohol- und Tabakkonsum in der Gruppe der Patienten mit einem Karzinom des Larynx.

Von malignen Erkrankungen des Oropharynx sind Männer ca. drei bis vier mal häufiger betroffen, der Altersgipfel liegt im sechsten Lebensjahrzehnt [Jakse et Vinzenz, 1992]. Im untersuchten Spenderkollektiv lag das Verhältnis Männer zu Frauen bei 8 zu 2, das durchschnittliche Alter betrug 65 Jahre. Der Konsum von Alkohol lag im Durchschnitt bei 37,3 g/d, von Tabakprodukten bei 35,5 pack years (py).

Bei den Larynxkarzinomen sind Männer bis zu zehn mal häufiger betroffen, die Altersverteilung war derjenigen der malignen Oropharynxerkrankungen ähnlich [Jakse et Vinzenz, 1992]. Unter den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Spendern von Larynxgewebe gab es nur Männer, der Altersdurchschnitt betrug 63,6 Jahre. Der durchschnittliche Konsum von Alkohol lag bei 159 g/d, von Tabakprodukten bei 52,5 py.

Bei den Spendern von Testgewebe mit nichtmalignen Erkrankungen des oberen Aerodigestivtraktes werden die Versuchsreihen aus Gründen der Übersicht getrennt aufgeführt. Das Durchschnittsalter lag in einem niedrigeren Bereich von 52,7 (Comet) bzw. 30,1 (Comet/FISH) Jahren. Das Verhältnis von Männern zu Frauen war unter den malignomfreien Spendern von Tonsillengewebe 18 zu 2 für die Comet-Versuche bzw. 12 zu 6 für die Comet/FISH-Versuche. Im Vergleich zu den anderen Kollektiven wurden geringere

Mengen an Alkohol (im Durchschnitt 24,75 g/d bzw. 13 g/d) und Tabakprodukten (im Durchschnitt 17,8 py bzw. 5,67 py) konsumiert.

4.2 Diskussion des Testgewebes

Genotoxische Substanzen werden häufig in Tierversuchen untersucht. Aufgrund der hohen Generationszahl und der Nähe zum Menschen als Säuger dienen häufig Ratten oder Mäuse als Versuchstier [Peto et al., 1991; Waddell, 2002; Yoo et al., 1990]. Die Verwendung von Zellklonen etablierter Versuchstiere mit bestimmten Eigenschaften ermöglichen standardisierte Versuchsbedingungen, jedoch ist die Immortalisierung der untersuchten Zellen notwendig. Prinzipiell ist diese Methoden auch mit humanen Zelllinien möglich, diese neigen jedoch kaum zur spontanen Immortalisierung [Combes et al., 1998].

Die Beliebtheit von Lymphozyten als Testzellen für molekularbiologisch und toxikologische Untersuchungen beruht zum Teil auf ihrer einfachen Verfügbarkeit und Handhabung [Abdel-Rahman et El-Zein, 2000; Egeli et al., 1999; Li et al., 2001a]. In vitro führen diese Vorteile zur häufigen Verwendung dieser Zellart. In vivo sind Lymphozyten den verschiedenen Umweltschadstoffen jedoch häufig nicht direkt ausgesetzt, sondern kommen erst nach Aufnahme über andere Gewebe und entsprechende Metabolisierung mit diesen in Berührung. Die Studiengruppe um Kleinsasser konnte nachweisen, dass an Lymphozyten gemessene Genotoxizität grundsätzlich kein geeigneter Marker für genotoxische Effekte an Mukosazellen ist [Kleinsasser et al., 2000]. Diese Nachteile lassen eine Verwendung der direkten Zielzellen bzw. Schleimhautzellen als Testgewebe für Karzinogene favorisieren.

Die Lokalisation der Schleimhautzellen der Tonsillen- bzw. Larynxregion in der Einstrombahn der Atemluft bzw. an der Kreuzung von Luft- und Speiseweg führt hingegen auch in vivo zur bevorzugten Exposition gegenüber Fremdstoffen und potentiellen Karzinogenen [Harréus et al., 1999]. Im genannten Bereich konzentrieren sich die wichtigsten und bekanntesten Quellen für Xenobiotika aus Nahrung oder Atemluft. An dieser Lokalisation treten genotoxische Fremdstoffe wie Weichmacher auch aus eher unbekanntem Trägern, wie Beißringen für Kleinkinder oder Zahnpflegemittel, beim Kauen und Lutschen aus [Earls et al., 2003; Kleinsasser et al., 2005a].

So eignen sich die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Mukosazellen des oberen Aerodigestivtraktes besonders zum Nachweis durch Umweltschadstoffe induzierter genetischer Schäden und deren Reparatur.

4.3 Diskussion der Methoden

Der Entstehung von malignen Neoplasien liegt häufig die Exposition gegenüber genotoxischen Substanzen zugrunde, deren Identifikation deshalb wichtige Grundlage für Schutzmaßnahmen darstellt.

Eine der Herausforderungen beim Nachweis von Genotoxizität ist die Visualisierung der aufgetretenen Schäden. Treten einzelne Strangbrüche in der DNA auf oder ganze Fragmente brechen aus den Chromosomen, ist dies im Chromatin des Zellkerns nicht sichtbar.

4.3.1 Der Comet Assay

Zur Darstellung von durch Xenobiotika induzierte Schäden an der Erbsubstanz existieren mehrere etablierte Methoden. Die Bedeutung des Comet Assay im Vergleich zu anderen Methoden wird im Folgenden kurz beschrieben.

Der Mikrokern-Test zur Darstellung genomischer Instabilität beruht darauf, dass die DNA vor der Zellteilung durch den Spindelapparats auf die beiden Tochterzellen aufgeteilt wird. Fragmente von Chromosomen und andere DNA ohne Zentromer werden nicht korrekt positioniert und bilden einen oder mehrere eigene *Mikrokerne*, welche unter dem Lichtmikroskop erkennbar sind.

Beim Ames-Mutagenitätstest wird ein für die Aminosäure Histidin *auxotropher* Stamm des Bakteriums *Salmonella typhimurium* eingesetzt. Ist die zu untersuchende Substanz mutagen, kommt es mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit zur Rückmutation (*back mutation*), die Bildung von Histidin ist wieder möglich [Bloching et al., 2001].

Der Comet Assay wurde 1984 von Østling und Johanson beschrieben [Østling et Johanson, 1984]. Lebende, nicht fixierte Zellen werden aus dem Zellverband gelöst und können sofort analysiert werden. Durch verschiedene Modifikationen, wie der Verwendung von alkalischen Puffern in der vorliegenden Arbeit, konnte die Sensitivität des Assays für DNA-Strangbrüche erweitert werden [Singh et al., 1988]. Durch Inkubation mit verschiedenen Umweltstoffen konnte gezeigt werden, dass die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese zum Nachweis genotoxischer Schäden an humanen Zellen des oberen Aerodigestivtraktes geeignet ist [Harréus et al., 1999; Pool-Zobel et al., 1994].

Neben der *ex-vivo* Quantifizierung der Mutagensensitivität verschiedenen Schadstoffen gegenüber ermöglicht der Comet Assay durch Auswaschen der Testsubstanz und unterschiedlich lange Reparaturphasen auch eine Messung des DNA-Reparaturpotentials. Erste Reparaturversuche wurden an Zelllinien muraler Lymphome und CHO-Zellen durchgeführt, nachdem diese bestrahlt worden waren [Olive et Banath, 1993; Østling et Johanson, 1984]. Singh et al. führten Reparaturversuche mit humanen Lymphozyten durch, nachdem diese ebenfalls durch Strahlung geschädigt worden waren [Singh et al., 1988].

Der Comet Assay erlaubt im Vergleich zu anderen Mutagenitätstests, eine große Anzahl von Versuchen an allen Zellen mit Zellkern bei schneller und kostengünstiger Verfügbarkeit durchzuführen. Humane Zellen von Zielorganen der Kanzerogenese (Leber, Epithelien, ect.) können direkt *ex vivo* auf ihre Suszeptibilität hin untersucht werden, das Einfügen genetischer Alterationen wie die Aufhebung von Beschränkungen der Zellteilung sind keine zwangsläufigen Voraussetzung. Die Möglichkeit, durch geringen Mehraufwand mehrere Substanzen gleichzeitig zu testen und die geringe für die Versuche benötigte Zellzahl ($0,5 - 2 \times 10^5$) unterstreicht die Eignung unter anderem für Biomonitoring-Studien. Diese dienen zur Abschätzung des individuellen Risikos im Bezug auf eine Prädisposition ohne vorherige Inkubation mit einem bestimmten Xenobiotikum.

Beispielsweise wurde eine signifikant erhöhte Anzahl von Einzelstrangbrüchen der DNA von Lymphozyten von Arbeitern im Vergleich zu den Verwaltungsangestellten einer Reifenfabrik in Bratislava nachgewiesen, wo kanzerogene Arbeitsstoffe verwendet wurden [Collins et al.,

1997]. In der selben Studie konnte die einfache Auswertbarkeit der großen Datenmengen gezeigt werden.

Die Vorteile des Comet Assay haben zu einer weiten Verbreitung als Genotoxizitäts-Test geführt. Methodische Unterschiede bei den Studiengruppen, zum Beispiel in der Dauer und Spannung der Elektrophorese, wirken sich aber nachteilig auf die Vergleichbarkeit verschiedener Studien aus. Ein standardisiertes Verfahren, wie beim Mikrokern- oder Ames-Test, wird nicht in allen Fällen verwendet [Faust et al., 2003].

Die digitaler Auswertung der Zellen erfolgt unter dem Fluoreszenzmikroskop. Eine „manuelle“ Auswertung der Zellen durch Einteilung nach qualitativen Merkmalen ergibt allenfalls einen Überblick, das Vermessen nach in den Lichtweg eingebrachten Skalen wurde in den Anfängen des Comet Assays praktiziert [Singh et al., 1988]. Die Quantifizierung anhand des Kometenschweifs wird kontrovers diskutiert. Die Schweiflänge allein ergibt bei niedriger Schädigung eine Pseudokorrelation und ist nicht verlässlich, da wahrscheinlich kleinere DNA-Fragmente zur Akkumulation neigen [Kumaravel et Jha, 2006; McKelvey-Martin et al., 1993]. Neuere Literatur deutet darauf hin, dass die Messung des prozentualen DNA-Anteils im Schweif (% tail DNA) eine ebenso gute Korrelation mit der genotoxischen Schädigung aufweist wie der OTM [Kumaravel et Jha, 2006].

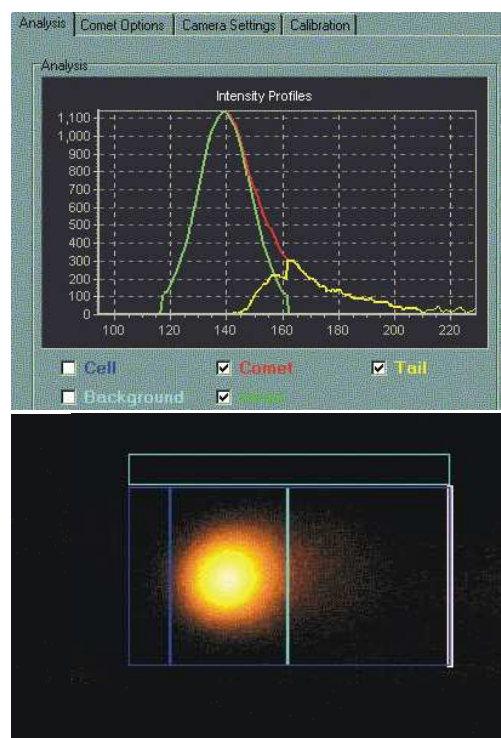


Abbildung 33: Unten das von der Mikroskopkamera eingespielte Bild; Einteilung in Kometenkopf und – Schweif sowie das Kalibrierungsfeld für Hintergrundrauschen. Oben das Profil der Leuchtintensität, vom Programm Comet 3.1 gemessen. Auf dessen Grundlage erfolgt die unter Anderem die Berechnung des *Olive Tail Moment (OTM)*

Die Quantifizierung der genotoxischen Schäden beruht dabei darauf, dass die Menge der DNA im Schweif proportional zur Anzahl der Strangbrüche ist [Olive et Banath, 1993], die 1993 von Olive und Banath vorgestellte Berechnungsmethode hat sich allgemein durchgesetzt. Der

Anteil der DNA im Kometenschweif wird hierbei in Relation zur gesamten zellulären DNA gesetzt und mit der medianen Migrationsstrecke multipliziert.

$$\text{Olive Tail Moment} = \frac{\text{DNA}[\text{Schweif}]}{(\text{DNA}[\text{Schweif}] + \text{DNA}[\text{Kopf}])} * \text{Mittl. Position DNA}[\text{Schweif}] - \text{Mittl. Position DNA}[\text{Kopf}]$$

Es ergibt sich der sogenannte *Olive Tail Moment (OTM)*. Die Berechnung des Wertes erfolgt dabei automatisch durch das verwendete Programm nach oben stehender Formel.

4.3.2 Die Kombination Comet/FISH

Bei der Untersuchung genotoxischer Schädigung ist man in den meisten Studien als Annäherung davon ausgegangen, dass die gesamte DNA in gleichem Maße betroffen ist. Es zeigte sich jedoch, dass sowohl die Schädigung, als auch die Reparatur ungleichmäßig über das Genom verteilt sind [McKelvey-Martin et al., 1998]. Mithilfe der quantitativen Polymerasekettenreaktion wurden an humanen Fibroblasten für verschiedene Gene Unterschiede in der durch UV-Strahlung verursachten DNA-Läsionen nachgewiesen. Die für die anschließende Reparatur von 50 % der induzierten Schäden benötigt Zeiträume unterschieden sich ebenfalls [Van Houten et al., 2000]. Grundlage für ein vertieftes Verständnis der Entstehung von Karzinomen ist deshalb eine eingehende Untersuchung der exogenen und endogenen Einflussfaktoren auf chromosomaler und genetischer Ebene.

Erste Schritte in diese Richtung wurden 1969 zum ersten Mal mit der *in situ Hybridisierung* an Speicheldrüsengewebe von *Drosophila* eingesetzt; dabei wurden durch Sonden Bereiche des Genoms markiert [John et al., 1969]. 1975 wurde die Technik erfolgreich bei der Entwicklung des Southern Blot eingesetzt, dabei diente radioaktiv markierte Einzelstrang-DNA zur Kennzeichnung von auf eine Membran übertragenen Genbanden. Im Verlauf ersetzten Fluoreszenzfarbstoffe die radioaktiven Marker, wodurch die Sicherheit, Haltbarkeit der Marker, Geschwindigkeit der Auswertung und Einfachheit der Handhabung erhöht wurden. Der gleichzeitige Einsatz verschiedener Fluoreszenzfarben an unterschiedlichen Sonden erleichterte den Einsatz der *in situ Hybridisierung* zusätzlich, so dass die *FISH* zu einer weiten Verbreitung gekommen ist; neben der Toxikologie wird die Technik in multiplen Anwendungsgebieten wie dem *Gen Mapping*, zum Nachweis von Translokationen und vielen Weiteren verwendet [Swiger et Tucker, 1996]. Bockmühl et al. verwendeten die *Fluoreszenz in situ Hybridisierung* zum Vergleich von Chromosomsequenzen von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich mit gesunden Spendern. Bei der sogenannten *komparativen Genomhybridisierung (CGH)* wurde ein *Color-Banding* (siehe Abbildung 9) der zu vergleichenden Metaphasen-Chromosomen durch fluoreszierend markierte Gensonden durchgeführt und die Unterschiede erfasst. Es zeigten sich bei über 50 % der Patienten Deletionen an Chromosom 1p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 11, 13q, 18q und 21q, außerdem DNA-Vermehrung an 3q, 8q, 16p, 17q, 19, 20q und 22q [Bockmühl et al., 1998]. Dies ist in Übereinstimmung mit dem Bericht von Gollin zu sehen, wonach sich bei Plattenepithelkarzinomen häufig die Bildung von Isochromosomen mit 3q, 5q und 8q nachweisen lässt [Gollin, 2001]. Anlehnend an diese Veröffentlichungen wurden die

Chromosomen 3, 5 und 8 in der vorliegenden Arbeit untersucht. Chromosom 1 wurde zur Kontrolle herangezogen.

Die Kombination des Comet Assay mit der *Fluoreszenz in situ Hybridisierung* wurde 1997erstmals beschrieben. In Agarose eingebettete humane Lymphozyten wurden einer Elektrophorese im neutralen Milieu unterzogen und mit Sonden für das Zentromer von Chromosom 7, Telomere und ein spezifisches Gen angefärbt [Santos et al., 1997]. Dadurch wurde die Aussagekraft beider Techniken erweitert, indem die Möglichkeit zu individuellen, schnellen und kostengünstigen Genotoxizitätsuntersuchung mit der Möglichkeit kombiniert wurde, bestimmte Gensequenzen spezifisch darzustellen und somit deren Suszeptibilität gegenüber Schädigung statistisch zu beschreiben. McKelvey-Martin führten im folgenden Jahr Comet/FISH-Studien mit Sonden für p53 durch. Unter anderem induzierten sie DNA-Schäden durch Bestrahlung von Zellen eines mutierten Blasenkarzinoms (HT1376), welche der alkalischen Version des Comet Assay unterzogen wurden [McKelvey-Martin et al., 1998]. Bei den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuchen wurden zum ersten Mal humane Mukosazellen von Frischbiopsaten aus dem oberen Aerodigestivtrakt verwendet. Nach alkalischer MGE wurden die untersuchten Chromosomen mit *Whole Chromosome Paint* im Ganzen markiert, so dass auch Fragmente dargestellt wurden.

Zur Quantifizierung der nachgewiesenen Schäden existierte, analog zu dem in Punkt 4.3.1 für den Comet Assay beschriebenen OTM, bis zur Vorlage dieser Arbeit kein vergleichbarer Maßstab. Dies lag unter anderem daran, dass keine Programme zur einheitlichen digitalen Auswertung verfügbar war. 1997 beschrieben Anderson et al. die Anwendung von Software der Firma *Kinetic Imaging Inc*, welche auch in dieser Arbeit Anwendung fanden. Genotoxische Schädigung an humanen Lymphozyten wurde mit dem Comet Assay und FISH getrennt erfasst, jedoch mit der selben Bildverarbeitung analysiert [Anderson et al., 1997].

4.3.2.1 Datengewinnung

Um die bislang fehlende Standardisierung in der Beschreibung des quantitativen Schadens einzelner Chromosome in Comet/FISH zu beseitigen, wurde in der vorliegenden Arbeit der *Munich Chromosomal Tail Moment (MCTM)* etabliert. Als Grundlage der Berechnung diente der *Olive Tail Moment*, welcher zur Quantifizierung von genotoxischer Schädigung der Gesamt-DNA etabliert ist.

Zur Präparation der Proben auf Objektträger wurde das von McKelvey-Martin verwendete Protokoll übernommen [McKelvey-Martin et al., 1998]. Es erfolgten Anpassungen im Bezug auf die Menge der verwendeten fluoreszenzmarkierten Sonden. Die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden mit der doppelte Menge durchgeführt, um eine bessere Darstellung der Chromosomen zu erzielen (siehe Punkt 2.4.2).

Durch die Verwendung von einer im Vergleich zu McKelvey-Martin ebenfalls etwas erhöhten Menge DAPI III konnte die Gegenfärbung der restlichen DNA verbessert werden. Nach manueller Kalibrierung zur Steigerung der Erkennungsrate konnte in Komet ++TM eine automatisierte Messung eingerichtet werden, wobei fluoreszenzmarkierte Zellen auf den

Objektträger in 100-facher Vergrößerung aufgesucht wurden und in 400-facher Vergrößerung ausgewertet wurden. Zuerst erfolgte dabei aufgrund der leichten Ausbleichbarkeit die Digitalisierung der Fluoreszenzmarkers (Anregung bei 509 nm bzw. 559 nm), anschließend die Auswertung der DAPI-III-Färbung ohne Lageveränderung des Objektträgers durch Vorschalten des entsprechenden Filters am Mikroskop (367 nm).

4.3.2.2 Quantifizierung von Genschäden mit dem Munich Chromosomal Tail Moment

Wie in Punkt 4.3.1 dargelegt, geschieht die Berechnung des OTM durch Multiplikation der DNA-Menge (Repräsentiert durch deren Leuchtintensität) im Schweif des Kometen in Relation zur Gesamt-DNA mit der medianen Migrationsstrecke. Analog dazu wurde die Formel für den *MCTM* konzipiert. Im Unterschied zum *OTM* wurde jedoch nicht die gesamte DNA, sondern nur die mit der jeweiligen Gensonde markierte DNA, in die Berechnung mit eingezogen. Dabei erfolgt die Berechnung des *MCTM* noch nicht automatisch durch das verwendete Programm Komet ++, Einzelwerte wie Leuchtintensität, Migrationsstrecke etc. wurden jedoch erfasst, so dass sie zur Berechnung mit Microsoft Excel™ zur Verfügung standen.

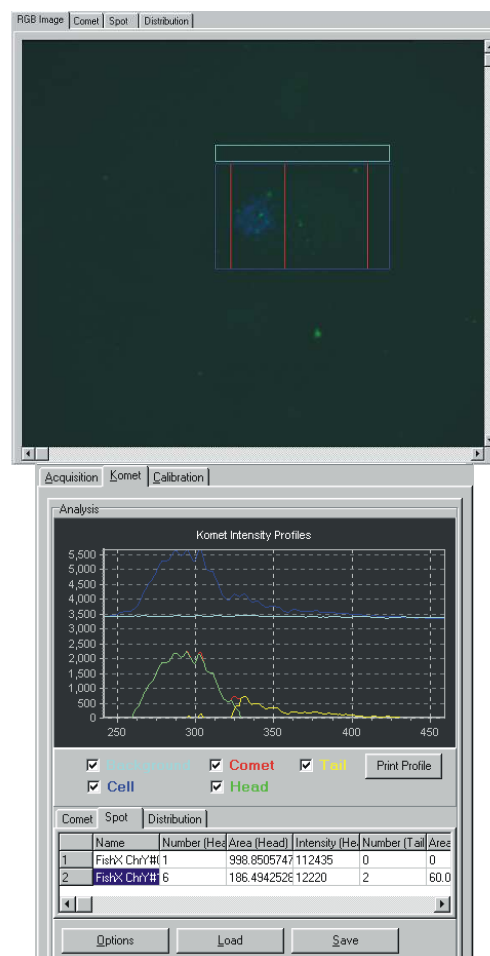


Abbildung 34: Oben sind DAPI III zur Darstellung der gesamten DNA und Spezifischer Chromosomenmarker übereinandergelegt. Einteilung in Kometenkopf und –Schweif ist erfolgt; Messfeld für das Hintergrundrauschen oberhalb des Kometen. Unten das Profil der Leuchtintensität.

Die Datenerfassung und Berechnung des *OTM* wurden von Komet ++ automatisch durchgeführt. Die Einteilung des Kometen in Kopf und Schweif geschah bereits bei der Messung des *OTM*, da aufgrund der größeren Menge der gemessenen DNA geringere Abweichungen zu erwarten waren.

Nach Beendigung der Messung und Datensicherung erfolgte in Microsoft Excel™ die Berechnung des MCTM nach folgender Formel:

$$MCTM = \frac{DNA[Schweif]^{Mar\ ker}}{(DNA[Schweif]^{Mar\ ker} + DNA[Kopf]^{Mar\ ker})} * Mittl. Position DNA[Schweif]^{Mar\ ker} - Mittl. Position DNA[Kopf]$$

Diese wurde an den von Olive und Banath 1993 vorgestellten *OTM* angelehnt [Olive et Banath, 1993].

Ob eine direkte Vergleichbarkeit vorliegt, muss jedoch in weiteren Untersuchungen geklärt werden, da eine gleichzeitige Anfärbung aller Chromosomen einer Zelle aufgrund von Limitationen der Sonden und folgende Auswertung ohne Verblässen der Fluoreszenzfarbstoffe nur unter Einschränkungen gewährleistet werden kann.

Aufgrund der nicht immer gleichen Lage des Chromosoms im Zellkern relativ zu den anderen DNA-Strukturen kann der Ursprung der Migration, also dem ungeschädigten Chromosom aus, nicht sicher bestimmt werden. Die Messung der Migrationsstrecke der markierten Gensequenz muss von dem Beginn der Migration erfolgen. Bei ungeschädigter DNA ist die Lage des Chromosoms ersichtlich, nachdem sich aber keine DNA im Schweif befindet, beträgt der MCTM null.

Weil keine genaue Bestimmung des Ursprungs der Migration festlegbar ist, wurde in Annäherung der Mittelpunkt des Zellkerns, gemessen in der DAPI-III-Färbung, festgelegt.

4.4 Diskussion der Testsubstanzen

4.4.1 BPDE

BPDE wurde von der International Agency for Research on Cancer allgemein als krebserregende Substanz der Klasse 2A (wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen) eingestuft [IARC, 2006]. Inzwischen wurden Hinweise für die Kanzerogenität am Menschen in epidemiologischen Studien gefunden, die eine erhöhte Inzidenz maligner Erkrankungen bei exponierten Menschen zeigen. Die IARC führt die Substanz inzwischen in der Klasse 1 der für Menschen kanzerogenen Substanzen. Anzumerken ist das bekannte, deutlich höhere Schädigungspotential von BPDE gegenüber B[a]P, welches wahrscheinlich auf eine unvollständige Umwandlung von B[a]P in sein Metabolit zurückzuführen ist [Kleinsasser et al., 2000]. Versuchsergebnisse von Studien, welche die unterschiedlichen Substanzen verwenden, lassen sich nicht von einander ableiten.

Die metabolische Giftung des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs B[a]P zum wirksamen BPDE und die DNA-Schädigungsmechanismen sind in Punkt 1.2.4.1 beschrieben worden. B[a]P entsteht durch Verbrennungsvorgänge; 96% der in die Umwelt abgegebenen Menge fallen bei der Verarbeitung von Kohle und Kohleprodukten, wie Bitumen, an [IARC, 2006]. Eine weitere wichtige Quelle für die Exposition von Menschen gegenüber der

Substanz ist Tabak, der geraucht oder gekaut wird [Bartsch et al., 1999]. Das insgesamt ubiquitäre Vorkommen von BPDE und anderen Vertretern aus der Gruppe der PAH, vor allem bei Verbrennungsprozessen oder in Kohle- und Teerprodukten, macht die Expositionsprophylaxe für den Menschen beinahe unmöglich. Deshalb ist die genaue Untersuchung des von BPDE ausgehenden Krebsrisikos für den Menschen unerlässlich.

Im Tierversuch erbrachte die Exposition gegenüber B[a]P eine erhöhte Rate an malignen Erkrankungen. In einem Versuch von Garry und Nesslany wurde Ratten B[a]P endotracheal verabreicht. Anschließend konnten sie mit dem Comet Assay DNA-Einzelstrangbrüche in Alveolarmakrophagen, Lungenzellen, peripheren Lymphozyten und Hepatozyten nachweisen [Garry et Nesslany, 2003].

In einer weiteren Versuchsreihe wurden weibliche Ratten Aerosolen von B[a]P und anderen PAH mit kumulativen Dosen zwischen 71 mg B[a]P pro m³ bis zu 312 mg B[a]P pro m³ ausgesetzt. Dadurch entwickelten sich nach 10 bzw. 20 Monaten Expositionszeit bei den Versuchstieren Lungentumoren. Die Quoten lagen, abhängig von der individuellen verabreichten Dosis, zwischen 4,2 % und 97,2 %. Die Tiere der Kontrollgruppe blieben alle tumorfrei [Heinrich et al., 1994]. Eine Metabolisation von B[a]P findet auch in der Plazenta statt. Tierversuche deuten darauf hin, dass die Konzentration von PAH im fetalen Blut ca. 10 % der Konzentration im mütterlichen Blut beträgt [Arnould et al., 1997].

Im Versuch an humane Fibroblasten der Lunge [Binkova et Sram, 2004] wies BPDE bei gleichzeitiger Applikation von verschiedenen Noxen ein deutlich geringeres genotoxisches Potential auf. Aufgrund der vergleichsweise geringen metabolischen Kapazität der verwendeten Zellen zeigte sich die Notwendigkeit der *Giftung* von BPDE durch Cytochrom P. Auch die Versuche von Rojas *et al.* wiesen den Einfluss der Phase-I- und Phase-II-Enzyme auf die Giftung bzw. Entgiftung von BPDE nach: Die Gruppe untersuchte genetische Polymorphismen bei den genannten Enzymen. Besonders Mutationen mit Defekten an GSTM bei normaler bzw. hoher Funktion von CYP1A1 konnten bei Individuen mit einer hohen Anzahl von BPDE-DNA-Addukten gefunden werden. Bei keiner der Versuchspersonen mit dem aktiven GSTM1-Genotyp waren Addukte nachweisbar [Rojas et al., 2000].

In zahlreichen Literaturstellen ist ein Zusammenhang zwischen Exposition gegenüber PAH und malignen Erkrankungen beschrieben [Godschalk et al., 2002; Li et al., 2001a]. Beispielsweise wurde eine Häufung von Ösophaguskarzinomen in Gegenden mit ausgeprägtem Konsum von fermentierter Fischsoße, welche hohe Konzentrationen an PAH enthält, beschrieben [Ke et al., 2002]. Ebenso zeigte sich ein deutlich erhöhtes Risiko für beruflich exponierte Personen, an Haut- oder Blasenkarzinom zu erkranken [Boffetta et al., 1997].

In der vorliegenden Arbeit wurde BPDE als Testsubstanz an Zellen des oberen Aerodigestivtraktes verwendet.

4.4.2 NDEA

Von der IARC werden Nitrosamine, wie das in der Testreihe verwendete N-Nitrosodiethylamin (NDEA), in die Klasse 2A der krebserzeugenden Substanzen eingeteilt

[IARC, 1999]. Dies ist definiert als „wahrscheinlich kanzerogen beim Menschen“. Im Tierversuch können Substanzen dieser Kategorie Krebs erzeugen, sie besitzen beim Menschen wahrscheinlich dieselbe Wirkung.

Die Metabolisation von NDEA und der Induktionsmechanismus für Mutationen wurde bereits in Punkt 1.2.4.2 besprochen. Die Bildung von NDEA erfolgt hauptsächlich bei der Reaktion von Nitrit unter hohen Temperaturen mit sekundären Aminen. Die leicht flüchtige Substanz wird hauptsächlich über Nahrung und Atemluft aufgenommen. Nitrosamine entstehen zu einem großen Teil in Industrieanlagen, die Gummi, Metalle oder Sprengstoffe. Ein weiterer, für den Menschen wichtiger, Aufnahmeweg führt über die Nahrung. Durch die zu Konservierungszwecken häufig angewandte Fleischpökellung und anschließendes Erhitzen der Nahrung im hohen Temperaturbereich um 200° C kommt es zur Bildung von Nitrosaminen. Nach wie vor ist jedoch der Genuss von Tabakrauch die Hauptquelle im Alltag [Abdel-Rahman et El-Zein, 2000].

Im Tierversuch wurde die Kanzerogenität von Nitrosaminen nachgewiesen. In einer großen Studie an 4080 Ratten, die mit den Nitrosaminen NDEMA und NDEA in verschiedenen Konzentrationen versetztes Trinkwasser erhielten, konnten die Gruppe um Peto die Entstehung von Tumoren in Abhängigkeit zur Konzentration nachweisen [Peto et al., 1991]. Aufgrund des sehr langen Untersuchungszeitraumes von mehreren Jahren waren Effekte schon bei niedriger Dosierung von 0,01 bis 0,02 mg / kg / Tag nachweisbar. Tumoren entstanden hauptsächlich an Leber und Ösophagus, abhängig vom verabreichten Nitrosamin. Andere Gruppen konnten ähnliche Ergebnisse erzielen, Eisenbrand und Metzler konnten dabei den Nachweis für eine konzentrationsabhängige Organotropie für das Versursachen von Tumoren in Ösophagus und Leber durch NDEA erbringen [Eisenbrand et Metzler, 1994a; Waddell, 2002].

Auch mit anderen Testmethoden als dem Comet Assay konnte das mutagene Potential von NDEA selbst bei niedriger Dosierung nachgewiesen werden [Aiub et al., 2003; Sierra et al., 2001]. Ein Langzeitversuch an Ratten erbrachte außerdem eine erhöhte Inzidenz von Tumoren der Leber, wo die Konzentration des Cytochrom-P-Enzymsystems am höchsten ist und am Ösophagus, dem Ort der Aufnahme [Peto et al., 1991; Waddell, 2002; Yoo et al., 1990]. Eine ähnliche Organotopie zeigte sich auch am Menschen. Ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an einem Ösophaguskarzinom aufgrund des Konsums von vergorener Fischsoße in Kombination mit Tabakprodukten [Ke et al., 2002].

Insgesamt liegen beim Menschen wenig Daten bezüglich des genotoxischen Potentials vor. Harréus et al. konnten an humanen Schleimhautzellen des oberen aerodigestiven Traktes vermehrte DNA-Fragmentierung durch Nitrosamine nachweisen [Harréus et al., 1999]. Von Kleinsasser [Kleinsasser et al., 2001a] wurden 2000 kombinierte Versuche an einzelnen Zellen und an Miniorgankulturen zur Genotoxizitätsbestimmung durchgeführt. Eine dreifache Inkubation mit NDEA hatte dabei gegenüber einer Einfachen keinen additiven Effekt zur Folge, jedoch traten an Einzelzellen im Vergleich zu Miniorgankulturen gesteigerte Schädigungen zutage.

4.5 Darstellung von DNA-Schäden mit dem Comet Assays

4.5.1 Diskussion der genotoxischen Schädigung

Im folgenden Teil werden die mit dem Comet Assay gewonnenen Ergebnisse besprochen. Wie bereits in Punkt 3.1 dargelegt, lagen die Zellvitalitäten bei allen Versuchen bei über 90 %, so dass keine Anpassung der Konzentration einer Testsubstanz erfolgen musste.

Für alle Versuche wurde als Negativkontrolle und gleichzeitig Lösungsmittel für die weiteren Noxen *DMSO* verwendet. Bei allen Versuchsansätzen lag der OTM für die Negativkontrolle deutlich < 2 . In diesem Bereich kann von keiner DNA-Schädigung ausgegangen werden, da auch während der normalen Replikation eingefügte Strangbrüche den OTM leicht erhöhen (siehe Punkt 3).

Aufgrund seiner alkylierenden Wirkung und folglich starken DNA-Schädigung wurde das Nitrosamid *MNNG* als Positivkontrolle verwendet. Das genotoxische Potential von *MNNG* ist seit längerem bekannt, erste Publikationen sind schon 1975 zu finden [Kartasheva et Bykorez, 1975]. Der Nachweis der Wirksamkeit der Substanz und ihr Einsatz an humanen Zellen des oberen Aerodigestivtraktes erfolgte ebenfalls in Vorversuchen. Die mittleren OTM-Werte nach Inkubation mit *MNNG* lagen zwischen 46,1 für Patienten mit Larynx-Karzinom und 50,8 für Patienten mit Larynx-Karzinom. Die OTM-Werte für die Positivkontrolle wurden nicht in die Ergebnisse übernommen.

Vor der automatisierte Messung von jeweils zwei Objektträgern mit je 40 Zellen beim Comet Assay wurden alle Objektträger bei einer geringeren Vergrößerung gesichtet.

4.5.1.1 DNA-Schädigung bei den Spendergruppen

An Zellen von Spendern ohne maligne Erkrankung zeigten BPDE wie auch NDEA eine signifikante Schädigung gegenüber der Negativkontrolle. Damit ergaben sich ähnliche Schädigungswerte wie von vorausgegangenen Publikationen aus diesem Labor [Kleinsasser et al., 2003]. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Thielen *et al.*, welche humanen Lymphozyten zur Genotoxizitätsbestimmung von Glycidamid verwendeten. Die Gruppe führte die Versuche unter anderem mit einer modifizierten Version der alkalischen Mikrogelelektrophorese durch [Thielen et al., 2006].

Auch bei Zellen von Spendern mit Karzinomen der Tonsille konnte eine deutliche Genotoxizität durch BPDE und NDEA nachgewiesen werden, es lagen gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöhte OTM-Werte nach der Inkubation vor. Diese Ergebnisse stimmen mit Studien überein, bei denen unter ähnlichen Bedingungen Schäden an der DNA von Zellen der Nase und der Nebenhöhlen, des Pharynx und Tonsillen nach Inkubation mit Nitrosaminen nachgewiesen werden konnten [Harréus et al., 1999].

Einem Ausreißer im Schädigungsmuster bei den Proben von Patienten mit Tonsillenkarcinom (siehe Punkt 3.2.1.2) liegt möglicherweise eine hohe mechanische Beanspruchung bei der Bearbeitung der Zellen oder eine tatsächliche, nicht vorbekannte erhöhte Suszeptibilität zugrunde.

Bei Mukosazellen des Larynx von Spendern mit Larynxkarzinom zeigten sich nach Inkubation mit BPDE und NDEA eine signifikante Zunahme von Schäden der DNA gegenüber der Negativkontrolle.

Auffällig in dieser Gruppe war jedoch die große Streuung der OTM-Werte. Eine ähnlich große Varianz der Werte zeigte sich auch in den Reparaturversuchen mit Zellen dieser Gruppe. Eine mögliche Erklärung ist die erhöhte Belastung der Zellen durch ihre exponierte Lage. Es ist bekannt, dass bei vermehrtem Konsum von Alkohol- und Tabakprodukten ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung an Karzinomen des Kopf-Hals-Bereiches besteht [Menvielle et al., 2004; Pöschl et Seitz, 2004]. In diesem Kollektiv mit bereits Erkrankten ist jeder einzelne Zellspender starker Raucher, was sich in der diskutierten Versuchsreihe jedoch nicht in insgesamt erhöhten Schädigungswerten äußerte. Möglicherweise ist die jedoch die große Streuung der Werte auf den hohen Tabakkonsum zurückzuführen.

Insgesamt führte die Inkubation mit BPDE und NDEA bei allen drei untersuchten Kollektiven zu signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöhten OTM-Werten als Zeichen genotoxischer Schäden.

4.5.2 Vergleich der DNA-Schädigung der einzelnen Spendergruppen

Der Vergleich erfolgte auf Grundlage der Ergebnisse von Spendern aus dem jeweiligen Gesamtkollektiv, welche im Bezug auf Alter und Geschlecht gematcht wurden.

4.5.2.1 Vergleich der DNA-Schädigung von Spendern mit und ohne Tonsillen-Karzinom

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse von Zell Spendern ohne maligne Erkrankungen und mit Tonsillen-Karzinom zeigte nur geringe Unterschiede nach Inkubation mit BPDE und NDEA. Die statistische Analyse erbrachte keine Signifikanz.

Li *et al.* führten 2001 eine große Fall-Kontrollstudie an Patienten mit Karzinomen der Lunge durch. Lymphozyten von Karzinompatienten wiesen nach *in vitro*-Inkubation mit BPDE im Vergleich zu denen gesunder Kontrollpersonen eine signifikant höhere Anzahl von DNA-Addukten auf. Die Arbeitsgruppe konnte einen hochsignifikanten Dosis-Wirkungs-Zusammenhang zwischen der Anzahl der Addukte und dem Risiko einer Erkrankung feststellen [Li et al., 2001b]. Ähnliche Versuchsreihen mit Bleomycin als Testsubstanz erbrachten ebenfalls eine signifikant höhere Suszeptibilität von Patienten mit Lungenkarzinom [Schmezer et al., 2001].

Eine Studie aus diesem Labor verglich die Mutagensensitivität von Schleimhautzellen und Lymphozyten von Spendern mit und ohne oropharyngealem Karzinom. In der statistischen Analyse ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen [Harréus et al., 2004]. Die divergenten Ergebnisse aus der Literatur beruhen möglicherweise auf Variationen in den Populationen, den untersuchten Geweben und Testsubstanzen. Aufgrund der geringen Fallzahl in der vorliegenden Arbeit kann die Frage nach Unterschieden in der Suszeptibilität für genotoxische Schädigung bei Tumor- und Non-Tumor-Patienten nicht abschließend beantwortet werden.

4.5.2.2 Vergleich der DNA-Schädigung von Spendern mit Karzinom der Tonsille und des Larynx

Der Vergleich der Schädigung and der zellulären DNA von Spendern mit Karzinomen der Tonsille bzw. des Larynx nach Exposition gegenüber den Umweltkanzerogenen BPDE und NDEA erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Eine ähnliche Gegenüberstellung zum Vergleich der Sensitivität verschiedener Karzinome konnte nicht in den üblichen Literaturstellen gefunden werden, weder im Bezug auf BPDE, noch auf NDEA.

Auffällig war die hohe Streuung der Werte bei den Spendern mit Larynx-Karzinom, besonders nach Inkubation mit BPDE. Mögliche Ursachen dafür wurden bereits in Punkt 4.5.1.1 diskutiert. Aufgrund der hohen Streuung ergibt sich nach Inkubation mit BPDE bei Spendern mit Larynxkarzinom ein höherer mittlerer OTM als bei den Spendern mit Tonsillenkarcinom, welcher jedoch nicht signifikant ist.

Im Bezug auf NDEA kamen Vorarbeiten zu dem selben Ergebnis. Ähnliche Studien führten Kleinsasser *et al.* mit Patienten mit malignen Neoplasien im Kopf-Hals-Bereich durch. Dabei wurde die DNA-Schädigung an Lymphozyten und Mukosazellen mit der von Patienten ohne malignen Neoplasien verglichen. Nach Inkubation mit NDEA zeigten die Lymphozyten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte OTM-Werte. Bei den Mukosazellen war dies jedoch nicht der Fall [Kleinsasser et al., 2001b].

4.5.3 Diskussion der DNA-Reparatur

Da sich eine Schädigung der DNA nicht sicher verhindern lässt, ist die Fähigkeit zur DNA-Reparatur ein essentieller Schutzmechanismus, um die Integrität der Erbinformation über einen längeren Zeitraum hinaus sicherzustellen. Eukaryote Zellen haben verschiedene Mechanismen entwickelt, welche die DNA fortwährend auf Fehler oder Strangbrüche überprüfen und diese gegebenenfalls beheben (siehe Punkt 1.2.2.1). Effektive Reparaturenzyme können somit vor den Auswirkungen von genotoxischen Substanzen schützen [Schmezer et al., 2001].

Im Alter nimmt die genetische Stabilität der DNA ab. Diese Tatsache äußert sich in einer Akkumulation somatischer Mutationen. Grund dafür ist laut Seluanov ein Nachlassen der Fähigkeit zur Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen [Seluanov et al., 2004]. In Versuchen konnte die Gruppe nachweisen, dass die Reparaturrate, mit der ältere menschlicher Fibroblasten die Enden von DNA-Strängen nach einem Doppelstrangbruch wieder richtig verbinden, im Vergleich mit jüngeren Zellen bis zu 4,5 mal schlechter ist. Dass ein Nachlassen der Fähigkeit, Doppelstrangbrüche zu reparieren, auch bei anderen Eukaryonten als beim Menschen Grund für eine Anreicherung von Mutationen ist, konnten Gravel und Jackson an Hefezellen nachweisen [Gravel et Jackson, 2003].

Erste publizierte Studien zur Fähigkeit humaner Zellen, induzierte DNA-Schäden zu beheben, wurden bereits 1968, beispielsweise von Lohmann oder von Humphrey et al., durchgeführt. Erste Versuche zur Ermittlung der Reparaturkapazität, denen der Comet Assay zugrunde lag, wurden von Olive und Banath durchgeführt. Dabei wurde die DNA dreier Zelllinien mit unterschiedlichen Strahlungsdosen bestrahlt. Anschließend wurde der Tail Moment bestimmt

und die Zeit bestimmt, welche die Zellen zur Reparatur der Hälfte der gesetzten Schäden benötigten [Olive et Banath, 1993].

Generell kann die Darstellung von DNA-Reparatur auf verschiedene Weise erfolgen. Wie von Olive *et al.* in obengenannter Studie durchgeführt, kann die Zeitdauer zur Verminderung der vorher gesetzten Schädigung um einen bestimmten Quotienten bestimmt werden, was jedoch das tatsächliche Erreichen des vorbestimmten Wertes erfordert.

Ein anderer Ansatz ist die Vorgabe der Zeit, welche nach Entfernen der Noxe zur Reparatur zur Verfügung steht. Bereits 1988 wurde die Beseitigung von DNA-Einzelstrangbrüchen dadurch nachgewiesen, dass die Migrationstrecke der DNA-Fragmente nach einer gewissen Zeit nach Entfernen der Testsubstanz wieder abnahm. Mehrere Gruppen wiesen nach, dass der Großteil der Reparatur während der ersten 15 min erfolgte [Schmezer et al., 2001; Singh et al., 1988]. Ähnliche Ergebnisse konnten der vorliegenden Arbeit erzielt werden.

Für die Darstellung kann der verringerte Schadenswert absolut oder als Prozentsatz der Ausgangsschädigung angegeben werden. Zur Veranschaulichung wurde die Darstellung mittels Boxplots und die Gegenüberstellung der absoluten Werte in der vorliegenden Arbeit verwendet. Die Reparaturuntersuchungen wurden ausschließlich mit dem Nitrosamin NDEA durchgeführt.

4.5.3.1 DNA-Reparatur der einzelnen Spendergruppen

Ausgehend von der Schädigung zeigte sich bei den Zellen malignomfreier Spender innerhalb von 15 min und 30 min Reparaturzeit eine signifikante Reduktion des OTM. Ähnliche Ergebnisse hatten bereits Vorarbeiten im Labor erbracht.

Bei einem Ansatz war innerhalb der ersten 15 min eine Erhöhung des OTM aufgetreten. Ursache hierfür war möglicherweise eine stark erhöhte Suszeptibilität der Zellen oder ein Versuchsfehler, da sich keine verminderte Zellvitalität, wie sie für eine stark überproportionale mechanische Belastung denkbar wäre, nachweisen ließ. Nach insgesamt 30 min zeigte sich eine, wenn auch geringe, Reduktion des OTM gegenüber der Ausgangsschädigung.

Ein ähnliches Ergebnis wurde auch nach einem Reparaturintervall von 15 min bei Mukosazellen von Spendern mit malignen Tonsillenerkrankungen erreicht. Nach dieser Zeit war eine signifikante ($p = 0,047$) Reduktion der Ausgangsschädigung durch NDEA erreicht worden. Nach den vollen 30 min Reparaturzeit wurde ebenfalls eine signifikante Reduktion der Schädigung erreicht.

Erneut zeigte sich bei einem Versuchsansatz eine Erhöhung des OTM gegenüber der Ausgangsschädigung nach 15 min Reparaturzeit, welche nach 30 min etwas reduziert war, jedoch immer noch über der Primärschädigung lag.

Bei Zellspendern mit einem Malignom des Larynx konnte nach einem Reparaturintervall von 15 min eine signifikante Reduktion der Schädigung durch NDEA beobachtet werden. Aufgrund der hohen Streuung war die Reparatur nach 30 min nicht signifikant. Zwei

Versuchsansätze zeigten keine Reduktion des Schadens über die gesamt Reparaturdauer hinaus und wurden mit 0 % Reparatur in die Statistik übernommen.

Bekannt ist, dass chronischer Alkoholkonsum zu einem stark erhöhtem relativen Risiko für eine maligne Erkrankung des Kopf-Hals-Bereiches führt. Es zeigen sich multiplikative Wirkung von Alkohol- und Tabakkonsum, wahrscheinlich aufgrund der Wirkung von Alkohol als Lösungsmittel für genotoxische Substanzen. Menvielle et al. konnten in einer Studie an französischen Alkoholtrinkern nachweisen, dass mit zunehmendem Alkoholkonsum die Gefahr für eine maligne Erkrankung des Hypopharynx signifikant höher war, als für ein Malignom der Glottis oder Supraglottis, wo die Wirkungsdauer beim Trinken ingestierter Noxen geringer ist [Menvielle et al., 2004].

Eine negative Auswirkungen von Ethanol auf die DNA-Reparatur konnte nachgewiesen werden. Nach Schädigung mit Bleomycin lag die Anzahl nicht reparierter DNA-Schäden bei Zellen, deren Nährmedium während dem Reparaturintervall 2 % Ethanol enthielt, signifikant über der Kontrolle. Nach Auswaschen des Ethanols glichen sich die Werte der Kontrollgruppe an [Hsu et Furlong, 1991].

Die hohe Streuung im Vergleich zu Spendern von Tonsillengewebe mit und ohne maligne Erkrankungen fand sich bereits bei den Werten für die Ausgangsschädigung. Die Anamnesen der Studienpatienten zeigen einen wesentlich erhöhten durchschnittlichen Alkoholkonsum dar, der bis zu vier mal höher lag als die anderen untersuchten Gruppen. Es ist daher davon auszugehen, dass die große Menge konsumierten Tabaks und Alkohols der Spender mitverantwortlich für das Ergebnis zeichnet.

4.5.4 Vergleich der DNA-Reparatur der einzelnen Spendergruppen

Der Vergleich der DNA-Reparatur erfolgte auf Grundlage der Ergebnisse der nach Alter und Geschlecht gematchten Spendern aus dem jeweiligen Gesamtkollektiv. NDEA diente als Testsubstanz für die Reparaturversuche.

Cheng *et al.* haben das DNA-Reparaturpotential peripherer Lymphozyten von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen untersucht [Cheng et al., 1998]. In der Studie hatten Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom eine signifikant niedrigere Reparaturrate als die Kontrollgruppe. Auch Schmezer et al. führten vergleichende Reparaturversuche von Tumor- und Non-Tumor-Spendern durch. Dabei zeigten Lymphozyten des peripheren Blutes von Patienten mit Tumoren eine signifikant geringere DNA-Reparaturkapazität im Vergleich zu denen von Non-Tumor-Patienten [Schmezer et al., 2001].

Insgesamt ergibt die Synopsis der bekannten Literatur kein einheitliches Bild im Bezug auf signifikante Unterschiede der Reparaturkapazität von Tumor- und Non-Tumor-Patienten.

Die vorliegende Arbeit erbrachte ein ähnlich unscharfes Bild. Die Beseitigung von DNA-Schäden in Zellen der Spender mit malignen Erkrankungen erfolgte zu einem geringeren prozentualen Anteil als bei Spendern der Kontrollgruppe, dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Eine mögliche Ursache hierfür ist die vergleichsweise geringe Fallzahl.

4.5.4.1 Vergleich der DNA-Reparatur von Tonsillengewebe von Patienten mit und ohne Tonsillenkarzinom

Die Initialschädigung durch das Nitrosamin lag bei der Non-Tumor-Gruppe hierbei etwas höher, jedoch ohne Signifikanzniveau zu erreichen. Eine signifikante Reparatur der Schädigung erfolgte bei beiden Gruppen.

Es zeigte sich, dass Non-Tumor-Patienten tendentiell die gesetzte Schädigung während des gesamten untersuchten Zeitraums zu einem höheren Anteil wieder reduzieren konnten. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch nicht erreicht. Mögliche endogene Ursachen für die Erkrankung an Karzinomen der Tonsille liessen sich somit im Rahmen dieser Arbeit nicht belegen.

Eine Studie aus diesem Labor kam bei höherer Fallzahl zu einem ähnlichen Ergebnis. Lymphozyten des peripheren Blutes von je 30 Spendern ohne maligne Erkrankungen bzw. mit Primärtumoren des Nasopharynx zeigten nach Schädigung mit NDEA keine signifikanten Unterschiede in der Reparaturkapazität [Kleinsasser et al., 2005b].

Eine Gegenüberstellung von Spendern mit und ohne Karzinome des Oropharynx erbrachte in einer anderen Studie bei Lymphozyten erneut keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Reparatur. Schleimhautzellen von Tumorpatienten zeigten jedoch eine signifikant geringere Reparaturkapazität als in der Kontrollgruppe [Harréus, 2004]. Eine Abhängigkeit von den untersuchten Zellen scheint also zu existieren.

4.5.4.2 Vergleich der DNA-Reparatur von Patienten mit Tonsillenkarzinom und Larynxkarzinom

Kleinsasser et al. haben bereits Genotoxizitätsuntersuchungen an Einzelzellen von Spendern mit Tumoren des Oropharynx und des Larynx mit substanzabhängig unterschiedlichem Ergebnis durchgeführt. Die Inkubation mit Dibutylphthalat (DBP) und Diisobutylphthalat (DiBP) ergab im Vergleich zum Non-Tumor-Kollektiv erhöhte OTM-Werten bei der Tumor-Gruppe. Bei dem auch in der vorliegenden Arbeit getesteten Nitrosamin NDEA kam es nicht zu signifikanten Differenzen im Schädigungsmuster. Eine Untersuchung bezüglich Unterschieden in der Reparatur wurde in der genannten Studie nicht durchgeführt [Kleinsasser et al., 1999].

Ein direkter Vergleich des Reparaturverhaltens von Spendergruppen mit Karzinomen der Tonsille und des Larynx konnte auch nach Durchsicht der bekannten Literatur nicht gefunden werden. Der Vergleich in der vorliegenden Arbeit sollte klären, ob Unterschiede in der Reparaturkapazität der genannten Spendergruppen bestehen. Für den Vergleich der DNA-Reparatur wurden Spendern aus dem jeweiligen Gesamtkollektiv im Bezug auf Alter und Geschlecht gematcht. Für die Reparaturversuche wurde NDEA als Testsubstanz verwendet.

Die Ausgangsschädigung lag bei dem Kollektiv der Spender mit Tonsillenkarzinom im Mittel insignifikant höher. Differenzen bei der DNA-Reparatur der beiden Gruppen waren insgesamt statistisch nicht signifikant. Fraglich ist, ob die geringfügigen Unterschiede ausreichen, bei einer Fallzahl von $n = 10$ einen Trend erkennen zu lassen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal die Reparaturkapazität von Spendern mit malignen Erkrankungen der Tonsille und des Larynx verglichen. Hierbei haben sich keine signifikanten Unterschiede ergeben. Untersuchungen an verschiedenen Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes sollten klären, ob bei höherer Fallzahl signifikante Unterschiede in der Reparaturkapazität erkennbar werden.

4.6 Darstellung von DNA-Schäden mit Comet/FISH

4.6.1 Diskussion der Schädigung durch BPDE

Die hier diskutierten Ergebnisse wurden mit Comet/FISH gewonnen. Für alle Versuche wurde das Umweltkanzerogen BPDE als Testsubstanz verwendet. Zur Negativkontrolle wurde das Lösungsmittel der Testsubstanz, DMSO, verwendet. *MCTM* und *OTM* aller untersuchten Chromosomen zeigten, dass es in den Negativkontrollen zu keiner nennenswerten Schädigung des Erbgutes gekommen war. Die Positivkontrolle mit MNNG wurde für alle Ansätze durchgeführt, aufgrund hoher Kosten wurde jedoch auf eine Hybridisierung verzichtet. Nach Färbung mit Ethidiumbromid wurden die Positivkontrollen visuell ausgewertet. Die erfolgreiche Inkubation konnte bei allen Ansätzen bestätigt werden und wurde nicht explizit aufgeführt.

Die Zellvitalität lag, wie in Punkt 3.1 dargelegt, bei allen Versuchen über 90 %. Zum Ausschluss übermäßiger Zellschädigung, z. B. durch mechanische Einflüsse, erfolgte die Sichtung der Objektträger unter geringer Vergrößerung. Bei Comet/FISH wurden jeweils zwei Objektträger pro Versuch mit je 10 Zellen ausgewertet, anschließend *MCTM* und *OTM* bestimmt.

Nach Inkubation mit BPDE war der *MCTM* signifikant erhöht, so dass vom Nachweis einer Schädigung am spezifisch markierten Chromosom 1 ausgegangen werden kann. Der signifikante Anstieg des *OTM* derselben Zellen wies gleichzeitig die Schädigung des gesamten Erbgutes der Zellen nach.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei Chromosom 3. Nach Inkubation mit BPDE zeigte sich ein signifikanter Anstieg des *MCTM* für Chromosom 3. Analog dazu war der *OTM* als Hinweis auf die Schädigung der gesamten zellulären DNA signifikant angestiegen.

Bei der spezifischen Markierung von Chromosom 5 ergab sich nach Inkubation mit BPDE ein signifikanter Anstieg von *MCTM* und *OTM*. Eine etwas größere Streuung bei dem *MCTM* fiel dabei auf. Wahrscheinlich lag der korrekte Nachweis unterschiedlicher chromosomaler Schädigung aufgrund der hohen Empfindlichkeit der Methodik zugrunde. Ein Artefakt durch hohe mechanische Belastung ist in diesem Falle unwahrscheinlich, da keine hohe Streuung im *OTM* auffiel.

Nach Schädigung mit der genotoxischen Substanz BPDE zeigte ein signifikant angestiegener *MCTM* eine Schädigung des spezifisch markierten Chromosom 8 auf. Der ebenfalls signifikant angestiegene *OTM* wies dabei eine Schädigung der Gesamt-DNA nach.

Zusammenfassend zeigte BPDE bei allen untersuchten Chromosomen von Zellen malignomfreier Spender eine signifikante Schädigung der DNA. Der Nachweis der Schädigung gelang für die untersuchten Chromosomen 1, 3, 5 und 8 mittels eines signifikanten Anstiegs des *MCTM*. Die Schädigung der Gesamt-DNA konnte mit dem bereits etablierten *OTM* nachvollzogen werden. Wie in Punkt 4.6.2 beschrieben, ergaben sich dabei keine signifikanten Unterschiede in der Schädigung einzelner Chromosome relativ zur Gesamtheit der Chromosomen. Da der *MCTM* in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal zur Quantifizierung genotoxischer Schädigung angewendet wurde, ließ sich der Wertebereich der gemessenen *MCTM* nicht im Zusammenhang anderer Arbeiten überprüfen.

Der Wertebereich des *OTM* lag während aller Versuche mit BPDE ähnlich zu Vorversuchen, so daß Versuchsfehler ausgeschlossen werden konnten [Harréus et al., 2004; Wallner et al., 2005].

4.6.2 Vergleich der chromosomalen Schädigung

Die bestehende Literatur zeigt für Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ein vermehrtes Auftreten von chromosomalen Alterationen. Bestimmte genetische Fehler, welche zu einem Verlust ganzer Arme an Chromosomen und der resultierenden Formierung von Isochromosomen führen können, treten gehäuft an den Chromosomen 3, 5, 7, 8 und 9 auf [Gollin, 2001].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Chromosomen 3, 5 und 8 mit dem Chromosom 1 verglichen. Nach statistischer Analyse mit dem Kruskal-Wallis-Test ergaben sich keine signifikanten Unterschiede des *MCTM* nach Inkubation mit BPDE. Dieses Ergebnis entsprach den Erwartungen, da die Untersuchung an Material von Spendern ohne maligne Erkrankungen erfolgt war. Es zeigte sich jedoch eine relativ hohe Streuung, welche im vorherigen Kapitel diskutiert wurde. Bei Patienten mit malignen Erkrankungen des Oropharynx zeigten sich in laborinternen Vergleichen erhöhte *MCTM* für die Chromosomen 3, 5 und 8 im Vergleich zu Chromosom 1 [Harréus et al., 2004]

Im Unterschied zu der von Bockmühl et al. verwendeten Technik des Color-Bandings in der Metaphase läßt Comet/FISH bis jetzt nicht die genaue Klassifizierung eines chromosomalen Schadens zu [Bockmühl et al., 1998]. So lassen sich mit der einfarbigen Markierung eines einzelnen Chromosoms keine Translokationen, Deletionen oder Insertionen nachweisen, sondern nur die Fragmentierung bzw. Multiplikation des Chromosoms. Mit Sonden für Chromosomenabschnitten bzw. einzelne Gensequenzen und unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe kann diese Einschränkung in Zukunft eventuell umgangen werden.

4.7 Ausblick

Durch die neu etablierte Kombination Comet/FISH wird die Untersuchung genotoxischer Schädigung prinzipiell auf dem Niveau der Gensequenz möglich. Abhängig von der verwendeten Gensonde ist damit der Schritt von der Untersuchung der Gesamt-DNA über die Ebene der Chromosomen bis zu kurzen Basensequenzen möglich. Aufgrund der aktuell erzielten unzureichenden Ergebnisse bei der gleichzeitigen Anfärbung mehrerer Chromosomen wurden in der vorliegenden Arbeit nur ein Chromosom je Ansatz untersucht. Durch die Entwicklung und Einführung langlebigerer Gensonden wird die Markierung durch mehrere Sonden gleichzeitig wahrscheinlich in Zukunft eingeführt werden. Die Vorstellung des *MCTM* erlaubt dabei die Quantifizierung des Schadens.

Aufgrund der gemeinsamen methodischen Grundlage von Comet Assay und Comet/FISH wird die Vertiefung der mit der etablierten Methode des Comet Assay gewonnenen Erkenntnisse auf das Niveau genetischer Sequenzen mit geringem Mehraufwand möglich. Neben Vergleichen von Tumor- und Non-Tumor-Patienten sind auch Tests zur Reparatur von DNA-Schäden möglich. Dafür scheint die Methodenkombination besonders geeignet zu sein. Durch entsprechende Sonden lassen sich die Folgen von Schäden an der DNA-Sequenz, welche für den Zellzyklus regulierende Proteine codieren, einfacher untersuchen.

5 Zusammenfassung

Der Mensch ist in seiner Umwelt und am Arbeitsplatz einer Vielzahl von Substanzen ausgesetzt, über deren genotoxisches Potential bislang nicht ausreichend Klarheit herrscht. Kontakt und Aufnahme dieser in fester, flüssiger oder gasförmiger Form vorliegenden Xenobiotika geschieht dabei zum größten Teil über den oberen Aerodigestivtrakt. Das Auftreten von malignen Erkrankungen wird neben diesen exogenen Risikofaktoren auch von endogenen Faktoren beeinflusst. Dazu zählen neben der individuellen Suszeptibilität auch die Effektivität der Reparaturmechanismen zur Beseitigung einmal gesetzter Schäden an der DNA. Die Bedeutung endogener Risikofaktoren bei der Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren ist ebenfalls nicht zufriedenstellend aufgeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Bedeutung verschiedener exogener und endogener Risikofaktoren für die Entstehung von Tumoren an Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes zu erforschen. Weiterhin sollten die methodischen Grundlagen für eine Identifizierung und Quantifizierung von Schädigungen auf Ebene der Gensequenz geschaffen werden.

Dazu wurden Umweltkanzerogene aus den Gruppen der Nitrosamine und der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe ausgewählt und an Zellen des oberen Aerodigestivtraktes auf ihr genotoxisches Potential hin untersucht. Zur Darstellung von Schäden an der DNA diente die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay), ein etabliertes Kurzzeittestverfahren zur Bestimmung von Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen im Erbgut. Als quantifizierender numerischer Ausdruck für die Schädigung der DNA wurde der *Olive Tail Moment* gewählt.

Die Untersuchungen zur Mutagensensitivität wurden an makroskopisch gesunden Schleimhautzellen von Spendern ohne maligne Erkrankung sowie Spendern mit Karzinomen der Tonsille beziehungsweise des Larynx durchgeführten. Die Genotoxizitätsmessung ergab für BPDE und NDEA an allen untersuchten Zellen eine signifikante Schädigung der DNA. Zum ersten Mal erfolgte ein direkter Vergleich der Mutagensensitivität von Spendern mit Karzinomen der Tonsille und des Larynx. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne maligne Erkrankungen zeigte sich keine signifikanten Abweichungen der Resultate.

Darüber hinaus wurden zur Abklärung endogener Risikofaktoren Reparaturversuche nach Inkubation mit NDEA durchgeführt. Hierfür wurden die Spendergruppen nach Alter und Geschlecht abgeglichen (gematcht). In den Reparaturversuchen zeigten alle untersuchten Gewebearten in den ersten 15 min gegenüber der Ausgangsschädigung signifikant verringerte Schädigungswerte. Bei Mukosazellen der Tonsille nahm die Schädigung auch nach 30 min Reparaturzeit gegenüber der Ausgangsschädigung ab. Aufgrund einer höheren Streuung der Resultate wurde bei Larynxschleimhaut nicht das Signifikanzniveau erreicht.

Im erstmals durchgeführten Vergleich der Kollektive mit Karzinomen der Tonsille und des Larynx zeigten sich im gemessenen Reparaturverhalten keine signifikanten Unterschiede. Eine Tendenz zu einer effektiveren Reparatur DNA-Schäden lässt sich in der Spendergruppe

ohne maligne Erkrankung erkennen. Aufgrund der Streuung und der geringeren Fallzahl wird das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht.

Zur Durchführung genotoxischer Untersuchungen an einzelnen Chromosomen wurde der etablierte Comet Assay mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung kombiniert. Comet/FISH erlaubte es, die Chromosomen 1, 3, 5, und 8 direkt und spezifisch in der DNA von Mukosazellen tumorfreier Spender zu markieren und die Schädigung durch den polizyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff BPDE darzustellen. Die Methode vereinte dabei die Vorteile des Comet Assay mit den Möglichkeiten der Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Die schnelle und kostengünstige Verfügbarkeit, die Durchführbarkeit mit geringer Zellzahl, die Möglichkeit der *ex vivo* Explantation und die Einsetzbarkeit für Screening-Untersuchungen des Comet Assay wurden mit der erhöhten Aussagekraft der in situ Hybridisierung durch Darstellung genotoxischer Schäden direkt auf dem Niveau der Basensequenz der DNA zusammengeführt.

Mit der Etablierung des *Munich Chromosomal Tail Moments* konnte für die Methode Comet/FISH eine schnelle und effektive Quantifizierung der dargestellten Schädigung geschaffen werden. Analog zum *Olive Tail Moment* konnte in den durchgeführten Versuchen ein signifikanter Anstieg des *MCTM* nach genotoxischer Schädigung des untersuchten Chromosoms nachgewiesen werden.

Dazu wurden Einzelzellen humaner Tonsillenmukosa von Spendern ohne maligne Grunderkrankung mit BPDE inkubiert. Bei allen im Rahmen der Arbeit spezifisch markierten Chromosomen 1, 3, 5 und 8 stieg der *MCTM* im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant an. Analog dazu verhielt sich der an den selben Zellen bestimmte *OTM*, so dass Messungsartefakte ausgeschlossen werden können.

Ein Vergleich der Schädigung der Chromosomen 3, 5, und 8, welche bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches im Vergleich zu Chromosom 1 laut Literatur häufiger Aberrationen aufweisen, erbrachte beim untersuchten Patientengut ohne maligne Vorerkrankung keine signifikanten Unterschiede zu Chromosom 1.

Die neu etablierte Methode Comet/FISH an Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes erwies sich als potentes Verfahren zur Untersuchung genotoxischer Schädigung einzelner Chromosomen innerhalb der Gesamt-DNA. Mit Entwicklung entsprechender Gensonden werden Untersuchungen bis auf das Niveau einzelner genetischer Sequenzen durchführbar. Dabei können Schädigung und Reparatur der DNA in deutlich genauerem Maß untersucht werden.

Zukünftig wird dadurch die Untersuchung exogener und endogener Risikofaktoren präzisere Informationen im Bezug auf die Karzinomentstehung im oberen Aerodigestivtrakt erbringen.

6 Literatur

- Abdel-Rahman S.Z. et El-Zein R.A.: The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.*, 2000; 159(1): 63-71.
- Abid-Essefi S., Baudrimont I., Hassen W., Ouanes Z., Mobio T.A., Anane R., Creppy E.E., Bacha H.: DNA fragmentation, apoptosis and cell cycle arrest induced by zearalenone in cultured DOK, Vero and Caco-2 cells: prevention by Vitamin E. *Toxicology*, 2003; 192(2-3): 237-248.
- Aiub C.A.F., Pinto L.F.R., Felzenzwalb I.: N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low levels. *Toxicol. Lett.*, 2003; 145(1): 36-45.
- Ambinder R.F.: Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders. *Rev. Clin. Exp. Haematol.*, 2003; 7(4): 362-374.
- Anderson D., Yu T.W., Browne M.A.: The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence in situ hybridisation (FISH) assays. *Mutat. Res.*, 1997; 390(1-2): 69-77.
- Aoyagi K., Kohfuji K., Yano S., Murakami N., Hori H., Takeda J., Tanaka M., Shirouzu K.: Morphological change in the MNNG-treated rat gastric mucosa. *Kurume Med. J.*, 2000; 47(1): 31-36.
- Arnould J.P., Kubiak R., Belowski J., Belegaud J., Szczeklik J.: Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in leukocytes of coke oven workers. *Pathol. Biol. (Paris)*, 2001; 48(6): 548-553.
- Arnould J.P., Verhoest P., Bach V., Libert J.P., Belegaud J.: Detection of benzo[a]pyrene-DNA adducts in human placenta and umbilical cord blood. *Hum. Exp. Toxicol.*, 1997; 16(12): 716-721.
- Ashkenazi M., Marouni M., Sarnat H.: In vitro viability, mitogenicity and clonogenic capacities of periodontal ligament fibroblasts after storage in four media supplemented with growth factors. *Dental Traumatology*, 2001; 17(1): 27-35.
- Baatout S. et Derradji H.: Cytometric methods to analyze radiation effects. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, 2004; 18(2): 101-105.
- Bartlett J.M.: Fluorescence in situ hybridization: technical overview. *Methods Mol. Med.*, 2004; 97: 77-87.
- Bartsch H., Rojas M., Nair U., Nair J.: Genetic cancer susceptibility and DNA adducts: Studies in smokers, tobacco chewers and coke oven workers. *Cancer Detect. Prev.*, 1999; 23(6): 445-453.
- Binkova B. et Sram R.J.: The genotoxic effect of carcinogenic PAHs, their artificial and environmental mixtures (EOM) on human diploid lung fibroblasts. *Mutat. Res.*, 2004; 547(1-2): 109-121.

- Blasiak J., Arabski M., Krupa R., Wozniak K., Rykala J., Kolacinska A., Morawiec Z., Drzewoski J., Zadrozny M.: Basal, oxidative and alkylative DNA damage, DNA repair efficacy and mutagen sensitivity in breast cancer. *Mutat. Res.*, 2004; 554(1-2): 139-148.
- Bloching M., Stephan D., Agha-Mir-Salim P., Berghaus A., Lautenschläger C., Grummt C.: Der Ames-Test als Biomarker. *HNO*, 2001; 49: 440-446.
- Bockmühl U., Wolf G., Schmidt S., Schwendel A., Jahnke V., Dietel M., Petersen I.: Genomic alterations associated with malignancy in head and neck cancer. *Head Neck*, 1998; 20(2): 145-151.
- Boffetta P. et Hashibe M.: Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.*, 2006; 7(2): 149-156.
- Boffetta P., Jourenkova N., Gustavsson P.: Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Causes Control*, 1997; 8(3): 444-472.
- Bofin A.M., Ytterhus B., Martin C., O'Leary J.J., Hagmar B.M.: Detection and quantitation of HER-2 gene amplification and protein expression in breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2004; 122(1): 110-119.
- Braithwaite E., Wu X., Wang Z.: Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro. *Carcinogenesis*, 1998; 19(7): 1239-1246.
- Brown T.A.: Veränderung des genetischen Materials, in: *Moderne Genetik*, 2(12): 205-221; Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 1999.
- Cai Y., Baer-Dubowska W., Ashwood-Smith M., DiGiovanni J.: Inhibitory effects of naturally occurring coumarins on the metabolic activation of benzo[a]pyrene and 7,12-dimethylbenz[a]anthracene in cultured mouse keratinocytes. *Carcinogenesis*, 1997; 18(1): 215-222.
- Cheng L., Eicher S.A., Guo Z., Hong W.K., Spitz M.R., Wei Q.: Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 1998; 7(6): 465-468.
- Collins A., Dusinska M., Franklin M., Somorovska M., Petrovska H., Duthie S., Fillion L., Panayiotidis M., Raslova K., Vaughan N.: Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ. Mol. Mutagen.*, 1997; 30(2): 139-146.
- Combes R., Balls M., Curren R., Fischbach M., Fusenig N., Kirkland D., Lasne C., Landolph J., LeBoef R., Marquardt H.: Cell Transformation Assays as Predictors of Human Carcinogenicity. *ATLA*, 1998; 27: 745-767.
- Duensing S. et Münger K.: Mechanisms of genomic instability in human cancer: insights from studies with human papillomavirus oncoproteins. *Int. J. Cancer*, 2004; 109(2): 157-162.

- Earls A.O., Axford I.P., Braybrook J.H.: Gas chromatography-mass spectrometry determination of the migration of phthalate plasticisers from polyvinyl chloride toys and childcare articles. *J. Chromatogr. A*, 2003; 983(1-2): 237-246.
- Egeli Ü., Özkan L., Tunca B., Kahraman S., Çeçener G., Ergül E., Engin K.: The relationship between genetic susceptibility to head and neck cancer with the expression of common fragile sites. *Head Neck*, 1999; 22(6): 591-598.
- Eisenbrand G. et Metzler M.: Toxikologie ausgewählter Substanzgruppen, in: Toxikologie für Chemiker: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. Mit einer Einführung in das Chemikalien- und Gefahrstoffrecht von Hennecke F.,(4): Hrsg.: Hennecke, F. J., Georg Thieme Verlag, 1994a.
- Eisenbrand, G. and Metzler, M.: Toxikologie für Chemiker: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. Mit einer Einführung in das Chemikalien- und Gefahrstoffrecht von Hennecke F, Georg Thieme Verlag, 1994b.
- Faust F., Kassie F., Knasmueller F., Bodecker R.H., Mann M., Mersch-Sundermann V.: The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 2003; 566(3): 209-229.
- Forawi H.A., Tchounwou P.B., McMurray R.W.: Xenoestrogen modulation of the immune system: effects of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Rev. Environ. Health*, 2004; 19(1): 1-13.
- Franz T.J., Lehman P.A., Franz S.F., North-Root H., Demetrulias J.L., Kelling C.K., Moloney S.J., Gettings S.D.: Percutaneous penetration of N-nitrosodiethanolamine through human skin (in vitro): comparison of finite and infinite dose applications from cosmetic vehicles. *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1993; 21(2): 213-212.
- Friedberg E.C.: Relationships between DNA repair and transcription. *Annu. Rev. Biochem.*, 1996; 65: 15-42.
- Garry S. et Nessler F.: Assessment of genotoxic effect of benzo[a]pyrene in endotracheally treated rat using the comet assay. *Mutat. Res.*, 2003; 534(1-2): 33-43.
- Genden E.M., Ferlito A., Scully C., Saha A.R., Higgins K., Rinaldo A.: Current Management of tonsillar Cancer. *Oral Oncol.*, 2002; 39: 337-342.
- Godschalk R., Nair J., van Schooten F.J., Risch A., Drings P., Kayser K., Dienemann H., Bartsch H.: Comparison of multiple DNA adduct types in tumor adjacent human lung tissue: effect of cigarette smoking. *Carcinogenesis*, 2002; 12: 2081-2086.
- Gollin S.M.: Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: Window to the biology of disease. *Head Neck*, 2001; 23(3): 238-253.
- Gravel S. et Jackson S.P.: Increased genome instability in aging yeast. *Cell*, 2003; 115(1): 1-2.
- Greim H.A.: Neues Einstufungskonzept der DFG für krebserzeugende Stoffe, in: BIA-Report 4/98,(11): 109-123; Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, 1998.

- Hall J., Hashibe M., Boffetta P., Gaborieau V., Moullan N., Chabrier A., Zaridze D., Shangina O., Szeszenia-Dabrowska N., Mates D., Janout V., Fabianova E., Holcatova I., Hung R.J., McKay J., Canzian F., Brennan P.: The association of sequence variants in DNA repair and cell cycle genes with cancers of the upper aerodigestive tract. *Carcinogenesis*, 2007; 28(3): 665-671.
- Harréus U.A.: Untersuchung exogener und endogener Risikofaktoren für die Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes. 2004;
- Harréus U.A., Kastenbauer E.R., Wallner B.C., Kleinsasser N.H.: Stellenwert der Einzelzell Mikrogelelektrophorese in der Ökogenotoxikologie. *Laryngorhinootologie*, 2002; 81(7): 528-533.
- Harréus U.A., Kleinsasser N.H., Zieger S., Wallner B.C., Reiter M., Schuller P., Berghaus A.: 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.*, 2004; 563(2): 131-138.
- Harréus U.A., Schmezer P., Kuchenmeister F., Maier H.: Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract. *Laryngorhinootologie.*, 1999; 78(4): 176-181.
- Harris C.C.: Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1996; 88(20): 1442-1455.
- Heinrich U., Roller M., Pott F.: Estimation of a lifetime unit lung cancer risk for benzo(a)pyrene based on tumour rates in rats exposed to coal tar/pitch condensation aerosol. *Toxicol. Lett.*, 1994; 72(1-3): 155-161.
- Held M., Engstrand L., Hansson L.E., Bergstrom R., Wadstrom T., Nyren O.: Is the association between *Helicobacter pylori* and gastric cancer confined to CagA-positive strains? *Helicobacter*, 2004; 9(3): 271-277.
- Hildebrandt H.: Mehrstufenhypothese, in: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 258: Hrsg.: Dornblüth, O. und Pschyrembel, W., Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, 1999.
- Hsie A.W., San Sebastian J.R., Perdue S.W., Schenley R.L., Waters M.D.: Multiple-endpoint mutagenesis with Chinese hamster ovary (CHO) cells: evaluation with eight carcinogenic and non-carcinogenic compounds. *Mol. Toxicol.*, 1987; 1(2-3): 217-234.
- Hsu T.C. et Furlong C.: The role of ethanol in oncogenesis of the upper aerodigestive tract; inhibition of DNA repair. *Anticancer Res.*, 1991; 11(6): 1995-1998.
- Hussain S.P., Hofseth L.J., Harris C.C.: Tumor suppressor genes: at the crossroads of molecular carcinogenesis, molecular epidemiology and human risk assessment. *Lung Cancer*, 2001; 34 Suppl. 2: 7-15.
- IARC.: MNNG, in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, Supplement 7: 248- International Agency for Research on Cancer, 1987.

- IARC.: Some *N*-Nitroso Compounds, in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 17: International Agency for Research on Cancer, 1998.
- IARC.: Acetaldehyde, in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 71: 319- International Agency for Research on Cancer, 1999.
- IARC.: Polycyclic aromatic Hydrocarbons, 92 listings, in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 92: 1-18; International Agency for Research on Cancer, 2006.
- Jakse R. et Vinzenz K.: Kopf-/Hals Malignome. 1992;
- John H.A., Birnstiel M.L., Jones K.W.: RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature*, 1969; 223(5206): 582-587.
- Kälble T.: Etiopathology, risk factors, environmental influences and epidemiology of bladder cancer. *Urologe. A*, 2001; 40(6): 447-450.
- Kartasheva L.A. et Bykorez A.I.: Induction of stomach tumors in rats by *N*-methyl-*N*-nitroso-*N*1-nitroguanidine. *Vopr. Onkol.*, 1975; 21(12): 50-55.
- Ke L., Yu P., Zhang Z.X.: Novel epidemiologic evidence for the association between fermented fish sauce and esophageal cancer in South China. *Int. J. Cancer*, 2002; 99(3): 424-426.
- Keck T., Leiacker R., Klotz M., Lindemann J., Riechelmann H., Rettinger G.: Detection of particles within the nasal airways during respiration. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2000; 257(9): 493-497.
- Kleinsasser N.H.: Toxikologische Bewertung von Inhalationsnoxen: Testmethoden, Einschätzung der toxischen Wirksamkeit und des Gefahrenpotentials, Grenzwerte. *Laryngorhinootologie.*, 2004; 83(1): 36-53.
- Kleinsasser N.H., Gamarra F., Bergner A., Wallner B.C., Harréus U.A., Juchhoff J., Kastenbauer E.R., Huber R.M.: Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL. J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.*, 2001a; 63(6): 141-147.
- Kleinsasser N.H., Kastenbauer E.R., Zieger S., Baluschko T., Wallner B.C., Harréus U.A.: Preservation of mucosal specimens before processing in the alkaline single cell microgel electrophoresis assay. *HNO*, 2003;(51): 134-139.
- Kleinsasser N.H., Schmidt K., Sassen A.W., Harréus U.A., Staudenmaier R., Folwaczny M., Glas J., Reichl F.X.: Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials*, 2005a; 27: 1762-1770.
- Kleinsasser N.H., Wagner C., Wallner B.C., Harréus U.A., Kastenbauer E.R.: Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients. *Mutat. Res.*, 2001b; 491: 151-161.
- Kleinsasser N.H., Wallner B.C., Kastenbauer E.R., Muenzenrieder R.K., Harréus U.A.: Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and

- mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutat. Res.*, 2000; 467(1): 21-30.
- Kleinsasser N.H., Wallner B.C., Wagner C., Kastenbauer E.R., Harréus U.A.: DNA repair capacity in lymphocytes of nasopharyngeal cancer patients. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 2005b; 262(7): 561-566.
- Kleinsasser N.H., Weissacher H., Kastenbauer E.R., Dirschedl P., Wallner B.C., Harréus U.A.: Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 1999; 257: 337-342.
- Knight T.M., Forman D., Ohshima H., Bartsch H.: Endogenous nitrosation of L-proline by dietary-derived nitrate. *Nutr. Cancer*, 1991; 15(3-4): 195-203.
- Kumaravel T.S. et Jha A.N.: Reliable Comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals. *Mutat. Res.*, 2006; 605(1-2): 7-16.
- Kushida H., Fujita K., Suzuki A., Yamada M., Nohmi T., Kamataki T.: Development of a *Salmonella* tester strain sensitive to promutagenic N-nitrosamines: expression of recombinant CYP2A6 and human NADPH-cytochrome P450 reductase in *S. typhimurium* YG7108. *Mutat. Res.*, 2000; 471(1-2): 135-143.
- Langer S., Kraus J., Jentsch I., Speicher M.R.: Multicolor chromosome painting in diagnostic and research applications. *Chromosome Res.*, 2004; 12(1): 15-23.
- Lee D.Y., Cho H.I., Kang Y.H., Yun S.S., Park S.Y., Lee Y.S., Kim Y., Lee D.S.: The role of fluorescence in situ hybridization (FISH) for monitoring hematologic malignancies with BCR/ABL or ETO/AML1 rearrangement: a comparative study with FISH and G-banding on 919 consecutive specimens of hematologic malignancies. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 2004; 152(1): 1-7.
- Li D., Firozi P.F., Hong W.K., Chang P., Wang L.E., Xiong P., Sturgis E.M., Eicher S.A., Spitz M.R.: In vitro BPDE induced DNA-Adducts in peripheral Lymphocytes as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Int. J. Cancer*, 2001a; 93: 436-440.
- Li D., Firozi P.F., Wang L.E., Bosken C.H., Spitz M.R., Hong W.K., Wei Q.: Sensitivity to DNA damage induced by Benzo(a)pyrene Diol Epoxide and risk of lung cancer: a case-control study. *Cancer Res.*, 2001b; 61: 1445-1450.
- Lieber C.S.: Cytochrome P-450E1: its physiological and pathological role. *Physiol. Rev.*, 1997; 77(2): 517-544.
- Lieber C.S., Lasker J.M., Alderman J., Leo M.A.: The microsomal ethanol oxidizing system and its interaction with other drugs, carcinogens, and vitamins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1987; 492: 11-24.
- Lin K., Shen Z.Y., Lu S.H., Wu Y.N.: Intake of volatile N-nitrosamines and their ability to exogenously synthesize in the diet of inhabitants from high-risk area of esophageal cancer in southern China. *Biomed. Environ. Sci.*, 2002; 15(4): 277-282.

- Lutz W.K.: Differences in individual susceptibility to toxic effects of chemicals determine the dose-response relationship and consequences of setting exposure standards. *Toxicol. Lett.*, 2002; 126(3): 155-158.
- McCarver D.G. et Hines R.N.: The ontogeny of human drug-metabolizing enzymes: phase II conjugation enzymes and regulatory mechanisms. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2002; 300(2): 361-366.
- McKelvey-Martin V.J., Green M.H., Schmezer P., Pool-Zobel B.L., De Meo M.P., Collins A.: The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat. Res.*, 1993; 288(1): 47-63.
- McKelvey-Martin V.J., Ho E.T., McKeown S.R., Johnston S.R., McCarthy P.J., Rajab N.F., Downes C.S.: Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis*, 1998; 13(1): 1-8.
- Menvielle G., Luce D., Goldberg P., Bugel I., Leclerc A.: Smoking, alcohol drinking and cancer risk for various sites of the larynx and hypopharynx. A case-control study in France. *Eur. J. Cancer Prev.*, 2004; 13(3): 165-172.
- Meskar A., Plee-Gautier E., Amet Y., Berthou F., Lucas D.: Alcohol-xenobiotic interactions. Role of cytochrome P450 2E1. *Pathol. Biol. (Paris)*, 2001; 49(9): 696-702.
- Monarca S., Feretti D., Zanardini A., Moretti M., Villarini M., Spiegelhalter B., Zerbini I., Gelatti U., Lebbolo E.: Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses. *Mutat. Res.*, 2001; 490(2): 159-169.
- Moscarini M., Lukic A., Franco C.: Anti human papillomavirus vaccine: the checkmate to human papillomavirus? *Eur. J. Gynaecol. Oncol.*, 2004; 25(2): 151-156.
- Olive P.L. et Banath J.P.: Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat. Res.*, 1993; 294(3): 275-283.
- Østling O. et Johanson K.J.: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1984; 123(1): 291-298.
- Pardue M.L. et Gall J.G.: Chromosomal localization of mouse satellite DNA. *Science*, 1970; 168(937): 1356-1358.
- Perlis C. et Herlyn M.: Recent advances in melanoma biology. *Oncologist*, 2004; 9(2): 182-187.
- Peto R., Gray R., Brantom P., Grasso P.: Dose and time relationships for tumor induction in the liver and esophagus of 4080 inbred rats by chronic ingestion of N-nitrosodiethylamine or N-nitrosodimethylamine. *Cancer Res.*, 1991; 51(23 Pt. 2): 6452-6469.

- Pfundstein B., Tricker A.R., Theobald E., Spiegelhalter B., Preussmann R.: Mean daily intake of primary and secondary amines from foods and beverages in West Germany in 1989-1990. *Food Chem. Toxicol.*, 1991;(11): 733-739.
- Philips H.J.: Dye exclusion tests for vitality In *Tissue Culture Methods and Applications*. Academic Press, 1973; 406-408.
- Pool-Zobel B.L., Lotzmann N., Knoll M., Kuchenmeister F., Lambertz R., Leucht U., Schröder H.G., Schmezer P.: Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ. Mol. Mutagen.*, 1994; 24(1): 23-45.
- Pöschl G. et Seitz H.K.: Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*, 2004; 39(3): 155-165.
- Poulsen H.E. et Loft S.: Early biochemical markers of effects: enzyme induction, oncogene activation and markers of oxidative damage. *Toxicology*, 1995; 101(1-2): 55-64.
- Praet M.: *Biomedical Apparatus 2003-2004*. 2003; 3-3.
- Putz, R. and Pabst, R.: Sobotta, *Atlas der Anatomie des Menschen*, 22(1): 136- Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München, 1997.
- Rapp A., Bock C., Dittmar H., Greulich K.O.: UV-A breakage sensitivity of human chromosomes as measured by COMET-FISH depends on gene density and not on the chromosome size. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2000; 56(2-3): 109-117.
- Riedel F., Goessler U., Hormann K.: Alcohol-related diseases of the mouth and throat. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.*, 2003; 17(4): 543-555.
- Rojas M., Cascorbi I., Alexandrov K., Kriek E., Auburtin G., Mayer L., Kopp-Schneider A., Roots I., Bartsch H.: Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis*, 2000; 21(1): 35-41.
- Routledge M.N., McLuckie K.I.E., Jones G.D.D., Farmer P.B.: 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*, 2001; 22(8): 1231-1238.
- Rowley J.D.: Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature*, 1973; 243(5405): 290-293.
- Santos S.J., Singh N.P., Natarajan A.T.: Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp. Cell Res.*, 1997; 232(2): 407-411.
- Schlesinger-Raab A., Lang S., Steur-Vogt M.K., et Hölzel D.: Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Malignome. www.krebsinfo.de, 1998.
- Schmezer P., Rajae-Behbahani N., Risch A., Thiel S., Rittgen W., Drings P., Dienemann H., Kayser K.W., Schulz V., Bartsch H.: Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 2001; 16(1): 25-30.

- Seluanov A., Mittelman D., Pereira-Smith O.M., Wilson J.H., Gorbunova V.: DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004; 101(20): 7624-7629.
- Shukla R., Geacintov N.E., Loechler E.R.: The major, N2-dG adduct of (+)-anti-B[a]PDE induces GA mutations in a 5'-AGA-3' sequence context. *Carcinogenesis*, 1999; 20(2): 261-268.
- Sierra L.M., Tosal L., Nivard M.J.M., Comendador M.A., Vogel E.W.: The importance of distinct Metabolites of N-Nitrosodiethylamine for its in vivo mutagenic specificity. *Mutat. Res.*, 2001; 483: 95-104.
- Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R., Schneider E.L.: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, 1988; 175(1): 184-191.
- Slamenova D., Gabelova A., Ruzekova L., Chalupa I., Horvathova E., Farkasova T., Bozsakyova E., Stetina R.: Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. *Mutat. Res.*, 1997; 383(3): 243-252.
- Song Q., Negrete G.R., Wolfe A.R., Wang K., Meehan T.: Synthesis and characterization of bay region halohydrins derived from Benzo[a]pyrene diol epoxide and their role as intermediates in halide-catalyzed cis adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.*, 1998; 11(9): 1057-1066.
- Speit G. et Hartmann A.: The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell test (comet assay). *Mutagenesis*, 1995; 10(6): 555-559.
- Statistisches Bundesamt.: Todesursachenstatistik 2005. Statistisches Bundesamt, 2006; 12(4):
- Straif K., Weiland S.K., Bungers M., Holthenrich D., Taeger D., Yi S., Keil U.: Exposure to high concentrations of nitrosamines and cancer mortality among a cohort of rubber workers. *Occup. Environ. Med.*, 2000; 57(3): 180-187.
- Swiger R.R. et Tucker J.D.: Fluorescence in situ hybridization: a brief review. *Environ. Mol. Mutagen.*, 1996; 27(4): 245-254.
- Syrjänen S.: HPV Infections and tonsillar carcinoma. *J. Clin. Pathol.*, 2004; 57(5): 449-455.
- Szeliga J. et Dipple A.: DNA adduct formation by polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiol epoxides. *Chem. Res. Toxicol.*, 1998; 11(1): 1-11.
- Szkaradkiewicz A., Kruk-Zagajewska A., Wal M., Jopek A., Wierzbicka M., Kuch A.: Epstein-Barr virus and human papillomavirus infections and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Clin. Exp. Med.*, 2002; 2(3): 137-141.
- Taylor C.F., Charlton R.S., Burn J., Sheridan E., Taylor G.R.: Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum. Mutat.*, 2003; 22(6): 428-433.

- Thielen S., Baum M., Hoffmann M., Loeppky R.N., Eisenbrand G.: Genotoxicity of glycidamide in comparison to (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide and alpha-acetoxy-N-nitroso-diethanolamine in human blood and in mammalian V79-cells. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 2006; 50(4-5): 430-436.
- Van Houten B., Cheng S., Chen Y.: Measuring gene-specific nucleotide excision repair in human cells using quantitative amplification of long targets from nanogram quantities of DNA. *Mutat. Res.*, 2000; 460(2): 81-94.
- Waddell W.J.: Threshold for carcinogenicity of N-Nitrosodiethylamine for esophageal tumors in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 2002; 41: 739-741.
- Wallner B.C., Harréus U.A., Gamarra F., Sassen F., Kleinsasser N.H.: Mini-organ cultures of human nasal mucosa. A model for eco-genotoxicological investigations. *HNO*, 2005; 53(12): 1037-1046.
- Wang L., Groves M.J., Hepburn M.D., Bowen D.T.: Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages. *Haematologia (Budap.)*, 2000; 85(6): 573-579.
- Watson J.D. et Crick F.H.: Molecular Structure of nucleic Acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature*, 1953; 171(4356): 737-738.
- Weinstein I.B., Jeffrey A.M., Jennette K.W., Blobstein S.H., Harvey R.G., Harris C., Autrup H., Kasai H., Nakanishi K.: Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo. *Science*, 1976; 193(4253): 592-595.
- Yoo J.S., Ishizaki H., Yang C.S.: Roles of cytochrome P450IIE1 in the dealkylation and denitrosation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in rat liver microsomes. *Carcinogenesis*, 1990; 11(12): 2239-2243.
- Zhu K.Q. et Zhang S.J.: Involvement of ATM/ATR-p38 MAPK cascade in MNNG induced G1-S arrest. *World J. Gastroenterol.*, 2003; 9(9): 2073-2077.

7 Anhang

7.1 Anamnesen der Patienten

Im Folgenden sind die Anamnesen der Patienten, deren Zellproben für die Versuche verwendet wurden, aufgeführt.

7.1.1 Tumorfremie Spender von Tonsillengewebe

Nr.	Alter	Geschlecht	BMI	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
1	64	m	25	10 g/d	-	Selbstständiger
2	59	m	28	10 g/d	-	Diplomingenieur
3	63	m	27	ehem. Alkoholsucht	-	Lagerfacharbeiter
4	39	m	26	10 g/d	20 py	Verkäufer
5	33	m	31	-	22 py	Bauarbeiter
6	47	m	38	10 g/d	25 py	o.A.
7	50	m	25	50 g/d	20 py	Hotelmeister
8	50	m	32	-	-	Unternehmensberater
9	35	w	26	< 5 g/d	2 py	Sachbearbeiterin
10	55	m	26	104 g/d	25 py	Selbstständiger
11	61	m	25	21 g/d	15 py	Angestellter
12	86	m	21	Alkoholsucht	75 py	o.A.
13	51	m	26	10 g/d	45 py	Promotions-/ Außendienstmitarbeiter
14	40	m	26	22 g/d	7 py	Angestellter im Außendienst
15	51	m	25	10 g/d	10 py	Elektroingenieur
16	50	m	29	130 g/d	30 py	Schlosser
17	51	w	25	o.A.	o.A.	Hausfrau
18	66	m	29	26 g/d	60 py	Rentner
19	52	m	28	26 g/d	-	OP-Pfleger
20	51	m	37	51 g/d	-	Verwaltungsangestellter

Tabelle 2: Anamnesen der tumorfreien Spender von Tonsillengewebe; m = männlich, w = weiblich; Alkoholkonsum gemittelt in Gramm pro Tag (g/d); Nikotinkonsum in Packungsjahren (py), 1 py entspricht 20 Zigaretten am Tag über den Zeitraum eines Jahres

7.1.2 Spender von Tonsillenschleimhaut mit Tonsillenkarcinom

Nr.	Alter	Geschlecht	BMI	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
1	76	m	26	75 g/d	45 py	Forstarbeiter
2	62	m	25	-	40 py	Spenglermeister *
3	65	m	34	44 g/d	40 py	Maurer
4	77	w	22	-	30 py	o.A.
5	63	m	27	44 g/d	20 py	Elektrotechniker **
6	89	m	21	12 g/d	70 py	Diplomingenieur
7	50	m	19	ehem. Alkoholsucht	35 py	Fernmeldemonteur
8	60	w	32	43 g/d	35 py	Hausfrau
9	44	m	24	104 g/d	-	KFZ-Mechaniker
10	65	m	28	51 g/d	40 py	Schallschutzmonteur
Besonderheiten:					* Leberzirrhose	
					** Prostatakarzinom	

Tabelle 3: Anamnesen der Spender von Tonsillenschleimhaut, die an einem Tonsillenkarcinom erkrankt sind; m = männlich, w = weiblich; Alkoholkonsum in Gramm pro Tag (g/d); Nikotinkonsum in Packungsjahren (py), 1 py entspricht täglich 20 Zigaretten über ein Jahr

7.1.3 Spender von Larynxschleimhaut mit Larynxkarzinom

Nr.	Alter	Geschlecht	BMI	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
1	72	m	26	156 g/d	30 py	Maurer
2	69	m	35	26 g/d	80 py	o.A.
3	65	m	23	52 g/d	30 py	Industriekaufmann
4	68	m	22	104 g/d	50 py	Landwirt
5	64	m	25	208 g/d	90 py	Masseur
6	63	m	33	52 g/d	> 40 py	Hydraulikmonteur
7	61	m	24	340 g/d	40 py	Rentner **

8	57	m	23	340 g/d	90 py	Angestellter
9	71	m	27	52 g/d	15 py	Beamter
10	46	m	26	260 g/d	60 py	Bäcker

Besonderheiten:

** Niereninsuffizienz

Tabelle 4: Anamnesen der Spender von Larynxgewebe mit Erkrankung an einem Larynxkarinom; m = männlich, w = weiblich; Alkoholkonsum in Gramm pro Tag (g/d); Nikotinkonsum in Packungsjahren (py), o.A. = ohne Angabe

7.1.4 Spender von tumorfreier Tonsillenschleimhaut für die Kombination Comet/FISH

Nr.	Alter	Geschlecht	BMI	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
1	28	w	27	-	-	Hausfrau
2	24	w	21	20 g/d	7 py	Hotelfachfrau
3	42	w	21	-	40 py	Reinigungskraft
4	18	m	20	-	-	Schüler
5	32	w	37	10 g/d	10 py	Sachbearbeiterin
6	9	m	16	-	-	Schüler
7	38	m	29	10 g/d	-	Sanitärinstallateur
8	23	m	20	10 g/d	-	Einzelhandelskaufmann
9	37	m	26	10 g/d	10 py	Verkäufer
10	24	m	20	52 g/d	2 py	Zivildienstleistender
11	37	m	23	52 g/d	11 py	Angestellter
12	44	m	29	-	3 py	Selbstständiger
13	25	w	23	10 g/d	3 py	Sekretärin
14	35	m	22	30 g/d	5 py	Steinmetz
15	55	m	27	10 g/d	-	Taxifahrer
16	30	m	31	10 g/d	11 py	o.A.
17	32	m	29	-	THC	Computertechniker
18	20	w	21	10 g/d	-	Büroangestellte

Tabelle 5: Anamnesen der tumorfreien Spender von Tonsillengewebe für die Kombinationsversuche Comet/FISH; m = männlich, w = weiblich; Alkoholkonsum in Gramm pro Tag (g/d); Nikotinkonsum in Packungsjahren (py)

7.2 Verwendete Abkürzungen

°C	-	Grad Celsius
A	-	Adenin
B[a]P	-	Benzo[a]pyren
BAT	-	Biologische Arbeitsstofftoleranz
bp	-	Basenpaare
BPDE	-	Benzo[a]pyren diol epoxid
C	-	Cytosin
ca.	-	circa
CHO	-	Chinese Hamster Ovary
Chr.	-	Chromosom
CML	-	Chronisch-Myeloische Leukämie
Comet	-	Comet Assay / Alkalische Mikrogelelektrophorese
CYPxy	-	Cytochrom P 450 Isoform xy
DAPI	-	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DDT	-	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
EU	-	Europäische Union
FISH	-	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
G	-	Guanin
g/d	-	Gramm pro Tag (die)
GSTxy	-	Glutathion-S-Transferase Isoform xy
HNO	-	Hals-, Nasen-, Ohren-
IARC	-	International Agency for Research on Cancer
m	-	männlich
MCTM	-	Munich Chromosomal Tail Moment
MGE	-	Mikrogelelektrophorese
min	-	Minute
MNNG	-	<i>N</i> -methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
N	-	Anzahl
NDEA	-	<i>N</i> -Nitrosodiethylamin
NSCLC	-	<i>Non-small-cell lung cancer</i> , Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
o.A.:	-	ohne Angabe
OT	-	Objektträger
OTM	-	Olive Tail Moment
p	-	Signifikanzniveau
PAH	-	Polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PBS	-	Phosphate buffered Saline
py:	-	Pack year

r	-	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RNA	-	Ribonukleinsäure
SSC	-	Saline Sodium Citrate
T	-	Thymin
TRK	-	Technische Richtkonstante
U	-	Uracil
V.	-	Version
w	-	weiblich
z. B.	-	Zum Beispiel

7.3 Publikationen aus der Arbeit

Harréus U.A., Kleinsasser N.H., Zieger S., Wallner B.C., Reiter M., Schuller P., Berghaus A.: 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.*, 2004; 563(2): 131-138.

7.4 Curriculum Vitae

Name: Paul Reinhart Schuller
Geburtsdatum: 05.10.1977
Geburtsort: Bukarest / Rumänien
Eltern: Willi Schuller
Dr. Gina Schuller, geb. Stepan

Schulbildung:

1984 – 1988 Grundschule West in Fürstenfeldbruck
1988 – 1997 Wittelsbacher Gymnasium München, Abitur
1995 – 1996 Ovando High School, Montana, USA

Universitätsausbildung:

1998 – 2000 Vorklinischer Studienabschnitt des Studiums der Humanmedizin
Ludwig-Maximilians-Universität München
Physikum März 2000
2000 – 2004 Klinischer Studienabschnitt des Studiums der Humanmedizin
Technische Universität München
1. Staatsexamen März 2002
2. Staatsexamen März 2003
3. Staatsexamen Oktober 2004

Wehrdienst:

1997 – 1998 4. Kompanie FlaRak-Staffel 3, Lenggries

Beschäftigungsverhältnis:

2005 – jetzt Assistenzarzt in der Allgemeinchirurgischen Abteilung
Krankenhaus Rothenburg o.d.T