

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

**Chromosomale Alterationen und Mutagensensitivität  
in humanen Lymphozyten und Schleimhautzellen  
des oberen Aerodigestivtrakts**

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

vorgelegt von  
Maximilian Reiter  
aus München  
(2007)

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

**1. Berichterstatter: Prof. Dr. Ch. Matthias**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Rupp**

**Mitberichterstatter: PD Dr. K. Radon  
PD Dr. H. Mückter  
PD Dr. F. Oduncu**

**Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. U. Harréus**

**Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt**

**Tag der mündlichen Prüfung: 24.05.2007**

Meiner Familie gewidmet

---

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>6</b>
1.1	Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt	6
1.2	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) als Karzinogene	9
1.3	Individuelle Vorbelastung und ihr Einfluss auf die Karzinogenese	10
1.4	Problemstellung und Zielsetzung	12
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
2.1	Material	14
2.1.1	Gewebeproben	14
2.1.2	Patientengut	14
2.1.3	Anamnesen der Probenspender	15
2.1.4	Chemikalien, Enzyme , Zellkulturmedien	17
2.1.5	Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör	19
2.2	Methoden	21
2.2.1	Comet Assay	21
2.2.2	Comet FISH	26
2.2.3	Übersicht zu Comet Assay/Comet FISH	29
2.2.4	Chromosomenpräparation an Lymphozyten	30
2.2.5	Etablierung eines Modells zur Chromosomenpräparation an Mukosazellen des oberen Aerodigestivtraktes	34
2.2.6	Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Metaphasen	47
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
3.1	Statistische Testverfahren	51
3.2	DNA-Schädigung an Interphasezellen	51
3.2.1	Kontrollexposition	54
3.2.2	Exposition mit BPDE	55
3.2.3	Schädigung der Gesamt-DNA der Schleimhautzellen	56
3.2.4	chromosomale Schädigung bei tumorfreien Patienten (Comet FISH)	57
3.2.5	chromosomale Schädigung bei Tumor-Patienten (Comet FISH)	58
3.2.6	Vergleich Tumor- und tumorfreien Patienten	59

---

3.3	DNA-Schädigung an Metaphasezellen	60
3.3.1	Metaphasechromosomenanalyse an Lymphozyten (Chr1)	61
3.3.2	Metaphasechromosomenanalyse an Lymphozyten (Chr3)	63
3.3.3	Metaphasechromosomenanalyse an Lymphozyten (Chr5)	65
3.3.4	Metaphasechromosomenanalyse an Lymphozyten (Chr8)	67
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
4.1	Auswahl der Patienten	69
4.1.1	Patienten als Spender von Schleimhaut des Oropharynx	69
4.1.2	Patienten als Spender von Lymphozyten	69
4.2	DNA-Schäden durch Benz[a]pyren-7,8-diol-epoxid	70
4.3	Diskussion der statistischen Auswertung	71
4.4	Diskussion der Methodik	72
4.4.1	Comet FISH	72
4.4.2	FISH	73
4.5	Auswahl der Chromosomen	74
4.6	Diskussion der Ergebnisse	76
4.6.1	Chromosomale Alterationen bei Interphasezellen	76
4.6.2	Chromosomale Alterationen an Metaphasezellen	77
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>81</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>96</b>
7.1	Abkürzungen	96
7.2	Lebenslauf	97
7.3	Danksagung	98
7.4	Publikationen aus der Arbeit	99

# 1 Einleitung

## 1.1 Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt

Der obere Aerodigestivtrakt ist eine der wichtigsten Lokalisationen für die Tabak assoziierte Karzinogenese (Hoffmann and Wynder, 1997). Legt man die Zahlen des Tumorzentrums München und des Krebsregisters des Saarlandes zugrunde, machten im Jahr 1998 Malignome im Kopf-Hals-Bereich 6,3% aller Krebserkrankungen in Deutschland aus. Wie bei keiner anderen Krebserkrankung stieg die Mortalitätsrate in den letzten 20 Jahren kontinuierlich bis etwa auf das Dreifache an und lag bei ca. 15,5%. Insbesondere Karzinome des Rachens und der Mundhöhle haben hierzu beigetragen, deren Mortalität 1998 zusammen etwa 47% aller Kopf-Hals-Karzinome ausmachte (Schlesinger-Raab et al., 2003).

Die Ätiologie der Plattenepithelkarzinome im oberen Aerodigestivtrakt ist bis heute nur teilweise geklärt. Viele der aktuellen Vorstellungen zum Mechanismus der Krebsentstehung wurden bereits in der zweiten Hälfte der 19. Jahrhunderts konzipiert. Virchow postulierte bereits 1863, dass Krebs durch chronische Gewebereizung ausgelöst wird. Boveri (1914) und Bauer (1928) erkannten die Bedeutung chromosomaler Veränderungen und somatischer Mutationen für die Karzinogenese (Manchester, 1995).

Aus verschiedenen Versuchsanordnungen folgte man ein Modell, das seine Gültigkeit noch bis heute erhalten hat. Der erste, tumorinduzierende Schritt wurde mit dem Begriff Initiation belegt, der zweite, die Tumorentstehung fördernde Prozess Promotion. Da sich anfangs häufig gutartige Papillome bildeten, wurde schließlich ein dritter Begriff hinzugefügt, der die Entwicklung vom (morphologisch) gutartigen zum bösartigen Tumor beschreibt: die Progression. Spätere Tierexperimente zeigten, dass die Tumorentstehung in den meisten Organen über die Stufen der Initiation, Promotion und Progression erfolgt (Weinberg, 1997).

Gleichzeitig wurde aber auch immer mehr deutlich, dass malignem Wachstum fast immer ein Zusammenwirken verschiedener exogener und endogener Ursachen

zugrunde liegt. Man geht bis heute davon aus, dass exogene Faktoren eine entscheidende Rolle spielen, das Zusammenwirken mit endogenen Einflüssen rückt aber aufgrund des besseren Verständnisses immer mehr in den Fokus der Beobachtungen. Zwar sind nach heutigen epidemiologischen Schätzungen 80-90% aller Krebsfälle des Menschen vorwiegend exogen bedingt (Perera, 1996), jedoch wird das genetische Risikoprofil immer mehr zum Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Exogene Faktoren wirken hauptsächlich in den Stufen der Initiation und Promotion. In den folgenden Schritten der Progression wird der Krebsprozess mehr und mehr unabhängig von äußeren Ursachen. Die Krebsentwicklung wird also meist von exogenen Einflüssen in Gang gesetzt, läuft dann jedoch zunehmend autonom in der Zelle ab.

Äußerliche, krebserzeugende Einflüsse können sehr unterschiedlicher Natur sein. Bekannt sind verschiedene Arten von Strahlen (z.B.  $\alpha$  - ,  $\beta$  - ,  $\gamma$  - Strahlen; UV-Licht), bestimmte Viren (z.B. Humanes Papilloma Virus 16, 18 beim Zervixkarzinom) (Nathke, 1990), aber auch Bakterien (*Helicobacter pylori* als Risikofaktor für das Magenkarzinom) (Parsonnet et al., 1991) und Parasiten (Bilharziose) (Kalble, 2001) können zur Krebsentstehung führen. Einen besonders großen Anteil nehmen auch die chemischen Noxen ein, wobei bis heute ca. 50 chemische Substanzen oder Substanzgemische als sicher humankarzinogen anerkannt sind (Huff, 1999). Grundsätzlich werden zwei Typen von Wechselwirkungen exogener Krebsfaktoren unterschieden. Zum einen genotoxische Effekte, die direkte Wirkung am Erbgut hinterlassen und so zur Initiation und weiteren Mutationen führen und zum anderen nicht-genotoxische Wirkungen. Mit letzteren sind Wechselwirkungen an anderen Zielmolekülen als der DNA, beispielsweise Proteinen der Signalketten gemeint. Sie verstärken häufig die Tumorpromotion.

Die Initiation, ausgelöst durch genotoxische Wirkungen, beschreibt chemische Veränderungen der DNA, z.B. die Bildung von Strangbrüchen, Addukten oder Vernetzungen. Der Begriff umfasst Mutationen, d.h. Austausch, Insertion oder Deletion von Basen, aber auch Änderung der Basensequenz inklusive Austausch von DNA-Abschnitten zwischen verschiedenen Chromosomen. Auch Chromosomenveränderungen und Zugewinn oder Verlust von Chromosomen werden in diesem Zusammenhang aufgeführt (Appel et al., 1990). Dies bewirkt, dass die

betroffene Zelle einen Wachstums- oder Überlebensvorteil gegenüber dem restlichen Gewebe gewinnt. Dieser ist aber in aller Regel so gering, dass klonales Wachstum nicht oder nur sehr langsam erfolgt, solange keine Tumorpromotion stattfindet.

Genotoxische Kanzerogene verursachen im Rahmen der Initiation Schäden an der DNA. Voraussetzung dafür ist, dass diese Substanzen selbst chemisch reaktiv sind (direkt wirkende Mutagene), oder in reaktive Metaboliten umgewandelt werden (indirekt wirkende Mutagene). Direkt wirkende Mutagene reagieren unmittelbar, oder nach Kontakt mit Wasser mit der DNA. Allerdings spielen sie eine eher untergeordnete Rolle in der Epidemiologie von Tumorerkrankungen. Zu ihnen zählt beispielsweise Senfgas, das in mehreren Kriegen als Kampfstoff eingesetzt wurde und bei dem direkte karzinogene Auswirkungen an Kriegsveteranen nachgewiesen werden konnten (Yamada, 1963). Die weitaus überwiegende Zahl von Kanzerogenen bedarf einer Umwandlung in ein reaktives Agens, bevor sie ihre krebsinduzierende Wirkung entfalten können. Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang Phase-I-Enzyme, wie Monooxygenasen der Cytochrom-P450-Familie. Dieses metabolisierende Enzymsystem führt reaktive Gruppen in das „Prokanzerogen“ ein. Im Rahmen dieser sogenannten Phase-I- Reaktion werden unter anderem Alkohol-, Phenol- oder auch Epoxidgruppen in das Substrat integriert und dieses somit aktiviert. Diese Enzyme binden Luftsauerstoff, reduzieren ihn und übertragen ihn auf die jeweiligen Ausgangsstoffe.

Bildung und Verweildauer der reaktiven Metaboliten in der Zelle bestimmen das Ausmaß der Bindung an die DNA. Rasche Inaktivierung durch Konjugationsreaktionen, z.B. mit Glucuronsäure, in der Phase II reduziert die Schädigung an der DNA. Daher ist die Balance zwischen Aktivitäten der Phase-I- und Phase-II-Reaktionen eine kritische Determinante für das kanzerogene Risiko. Die Enzymaktivitäten können infolge von ererbten Dispositionen oder Einwirkungen aus der Umwelt sehr stark variieren und haben so großen Einfluss auf das individuelle Krebsrisiko (Shimada et al., 1989; Matthias et al., 1998b; Matthias et al., 1998a).

## 1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) als Karzinogene

PAH umfassen eine große Gruppe von Substanzen, in deren Grundkörper mehrere Benzolringe kondensiert sind. Sie entstehen im Allgemeinen bei Verbrennungsprozessen, insbesondere bei Sauerstoffmangel (Schwelbrände, unvollständige Verbrennung) und kommen daher vor allem im Tabakrauch, aber auch in Abgasen von Hochöfen oder Autos vor (Smith et al., 2000). Vereinzelt können sie auch bei der Lebensmittelzubereitung auftreten, so z.B. beim Braten, Räuchern oder Grillen (Knize et al., 1999). Als Leitsubstanz der PAH wird im Allgemeinen Benzo[a]pyren gesehen, das in der letzten Bewertung durch das IARC (International Agency for Research on Cancer) im Jahre 1987 als mögliches humanes Karzinogen (2A) eingestuft wurde, da für den Menschen bislang keine ausreichenden, im Tierversuch jedoch hinreichend Beweise für eine Karzinogenität gefunden wurden (IARC, 1987; Smith et al., 2001).

Insbesondere als tumorinduzierender Faktor in der Tabakkarzinogenese finden PAH seit längerer Zeit Beachtung. Inhalationsversuche an Tieren haben gezeigt, dass der aus kleinen Partikeln bestehende Anteil des Tabakrauchs maligne Tumore induziert und dabei deutlich stärker karzinogen wirkt als die reine Gasphase (Dontenville, 1974; IARC, 1986). Zahlreiche epidemiologische Studien wiesen die Assoziation zwischen der gesteigerten Exposition gegenüber PAH und einer erhöhten Inzidenz von Malignomen nach (Maier et al., 1994). Auch an Tierversuchen mit Nagern wurden die mutagenen Eigenschaften von PAH bestätigt (Miller et al., 1983).

Für Benzo[a]pyren ist eine Vielzahl verschiedener Metaboliten bekannt. In dieser Arbeit soll im Speziellen auf die DNA-Strangbruch induzierende Wirkung des Benz[a]pyren-7,8-diol-epoxid (BPDE) eingegangen werden. BPDE entsteht durch Metabolisierung durch Cytochrom-P450 2E1, einem Isoenzym, das u.a. in der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes und in peripheren Lymphozyten anzutreffen ist (Tanaka et al., 2000). Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen DNA-Schäden, hervorgerufen durch BPDE, werden durch DNA-Adduktbildung hervorgerufen und können im Rahmen der DNA-Strangbruch-Induktion möglicherweise in Mutationen resultieren.

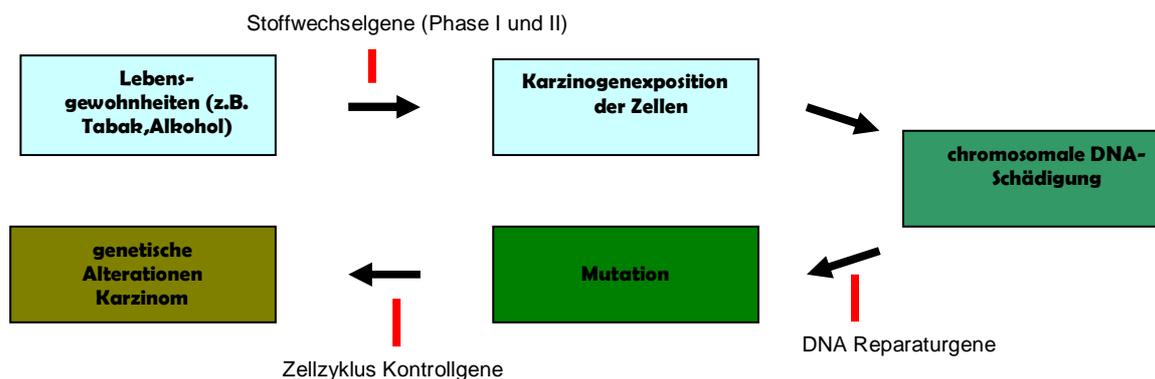
### **1.3 Individuelle Vorbelastung und ihr Einfluss auf die Karzinogenese**

Interindividuelle Unterschiede in der Entstehung von Tumoren im oberen Aerodigestivtrakt werden vielerorts beschrieben und auf verschiedene Ursachen überprüft. Sowohl exogene Vorbelastung als auch endogene Faktoren spielen hierbei eine Rolle.

Wie bereits erwähnt, sind heute exogene Ursachen, unter ihnen insbesondere chemische Agentien, bei der Auslösung von Krebs von besonderer Bedeutung. Wichtig sind hier Art und Dauer der Einwirkung bis zur Tumorentstehung. Allerdings sind von ca. 1100 tierexperimentell nachgewiesenen chemischen Kanzerogenen nur etwa 50 Stoffe bzw. Stoffgemische als krebserzeugend anerkannt (Tomatis et al., 1989). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass zahlreiche Stoffe in physiologischer Konzentration allein keinen karzinogenen Effekt besitzen, sich bei zusätzlicher chronischer oder akuter Belastung durch andere Chemikalien allerdings zu potenten Karzinogenen umwandeln können. Als besonders starkes „Kokarzinogen“ im Aerodigestivtrakt gilt insbesondere der Alkohol, der die Karzinogenese in verschiedene Stadien der Tumorinitiation und -promotion zu beeinflussen vermag (Maier et al., 1988; Seitz et al., 1992b; Seitz et al., 1992a). Ethanol ist bei chronischer Einwirkung in der Lage eine Enzyminduktion des Cytochrom P450-2E1, einer Unterform in der Mukosa des oberen Aerodigestivtraktes, herbeizuführen. Wie bereits oben beschrieben, führt dies zu einer gesteigerten Metabolisierung und damit zu einer erhöhten „Giftung“ verschiedenster Karzinogene (Seitz et al., 2004). Darüber hinaus sorgt Alkohol für lokale Schädigungen mit anschließender kompensatorischer Hyperregeneration (Mak et al., 1987). Durch Schädigung der Kopfspeicheldrüsen und damit verminderter Speichelproduktion, steigert Ethanol zusätzlich die Kontaktzeit des Karzinogens zur Mukosa. Schließlich spielt auch die Löslichkeit des Alkohols eine erhebliche Rolle. Mit seinen Solvenseigenschaften erleichtert Ethanol diversen Karzinogenen das Eindringen in die Schleimhaut des oberen Luft- und Verdauungstraktes (Maier et al., 1988) und steigert somit potenziell die intrazelluläre Präsenz verschiedener Chemikalien.

Dank verbesserter molekularbiochemischer Methoden rücken in den letzten Jahrzehnten immer mehr auch die individuellen, endogenen Risikofaktoren in den

Mittelpunkt des Interesses. Als gutes Beispiel dient hier die Mutation im BRCA 1/2-Gens, dass zu einem erhöhten Risiko von Brustkrebs führt (Davies, 1995). Mit Hilfe entsprechender DNA-Untersuchungen lässt sich eine Prädisposition diagnostizieren und das Risikopotential gut abschätzen. Ähnliches gilt auch für das APC-Gen (familiäre adenomatöse Polyposis coli) (Kinzler et al., 1991) oder auch den Wilms-Tumor beim Kind (Kolata, 1980). Ein vergleichbarer Einfluss genetischer Variationen konnte bei Kopf-Hals-Karzinomen bisher nicht nachgewiesen werden, obwohl risikobeeinflussende Genvariationen im Entgiftungsstoffwechsel Zigarettenrauch-assoziiertes Karzinogene, in der DNA-Reparatur, in der Zellzykluskontrolle und in Immunregulationsmechanismen beschrieben wurden (Matthias et al., 1998b; Matthias et al., 1998c; Matthias et al., 1998a; Matthias et al., 1999). So stellten sich beispielsweise in zytogenetischen Untersuchungen von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich karyotypische Veränderungen dar. Es zeigte sich, dass nicht das gesamte Genom gleichmäßig von Alterationen betroffen war, sondern dass sich Schäden signifikant häufig in einzelnen Chromosomen wiederholten (Bockmühl, 1996). Sehr häufig fanden sich Alterationen u.A. in den Chromosomen 3,5 und 8, etwas weniger häufig in den Chromosomen 9,11 und 17. Interessanterweise finden sich in diesen Bereichen mehrere Protoonkogene und Tumorsuppressorgene, also Gene, die in der Zelldifferenzierung eine wichtige Rolle spielen. Zu ihnen zählen VHL, FHIT oder Cyclin D, denen ein großer Effekt in der Karzinogenese der Kopf-Hals-Karzinome zugesprochen wird (Bockmühl, 2000; Singh et al., 2001; Matthias et al., 1999). Da das Auflösungsvermögen der herkömmlichen Zytogenetik relativ gering ist und statistische Aussagen nur schwer möglich sind, wurden in der Folgezeit aufwendigere Methoden zur chromosomalen Defektaufklärung angewandt. So wurde mit Hilfe der Comparative Genomic Hybridization (CGH) Tumormaterial untersucht und in Abhängigkeit von Differenzierung und Metastasierung verschiedene Muster der chromosomalen Schädigung gefunden. Wieder fanden sich Auffälligkeiten bei den Chromosomen 3,5 und 8, was sich einerseits sowohl in DNA-Verlusten (z.B. im langen Arm von Chromosom 3) (Schantz et al., 2000), als auch in DNA-Zugewinnen (in allen drei genannten Chromosomen) widerspiegelte (Bockmühl and Petersen, 2002). Auch in einigen anderen Chromosomen fanden sich signifikant häufiger DNA-Veränderungen. In der vorliegenden Arbeit werden chromosomale Veränderungen am Beispiel der Chromosomen 3,5 und 8 beschrieben, als Negativkontrolle dient Chromosom 1.



**Abb1:** mögliche Rolle chromosomaler, genetischer Sensitivität in der Kopf-Hals-Karzinogenese

## 1.4 Problemstellung und Zielsetzung

Mutationen an der DNA sind also nicht gleichmäßig über die gesamte DNA verteilt, sondern auf speziellen Chromosomen bzw. auf speziellen Genen lokalisiert (Friedberg, 1996). Da bisherige Untersuchungen an Tumorgewebe durchgeführt wurden, bleibt die Frage, ob die beobachteten Schäden Ursache oder aber Folgen der malignen Entartung sind. Einerseits wäre es denkbar, dass die DNA in definierten Bereichen ein sensibleres Schädigungsverhalten aufweist und Mutationen in genau diesen Bereichen eine größere Auswirkung haben als in anderen. Auf der anderen Seite ist es genauso gut möglich, dass die beobachteten DNA-Schäden Spätfolge der malignen Entartung der Zellen im Oropharynx sind.

Zu diesem Zweck wurde in dieser Arbeit erstmals Comet-FISH, eine Kombination aus Comet Assay und Fluoreszenz in situ Hybridisierung an makroskopisch gesunden, humanen Mukosazellen des Oropharynx durchgeführt. Untersucht wurden dabei Patienten ohne und mit Oropharynxkarzinom. Es sollte überprüft werden, ob sich mit dieser Methode ein unterschiedliches Schädigungsmuster innerhalb der DNA nachweisen lässt. Da diese Methode nur zur Quantifizierung am Interphase-Kern geeignet ist, wurde weiterhin Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Metaphasen-Chromosomen durchgeführt, um eventuelle strukturelle Schädigungen der DNA an den Chromosomen 3,5, und 8 qualitativ und quantitativ beschreiben zu können.

Da viele vorangegangene Untersuchungen zur Mutagensensitivität an Lymphozyten durchgeführt wurden (Palyvoda et al., 2002; Rajae-Bebahani et al., 2001; Sasiadek et al., 2002), sollten auch in der vorliegenden Arbeit Lymphozyten als Kontrollzellen herangezogen werden, um aufgetretene Schäden mit den Ergebnissen an Schleimhautzellen vergleichen zu können.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Gewebeproben**

Die in der Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden ausnahmslos im Rahmen operativer Eingriffe gewonnen, die aufgrund medizinischer Indikationen gestellt wurden. Durch die Entnahme entstand für die Patienten folglich kein zusätzliches Risiko. Blutproben wurden im Zusammenhang mit medizinisch notwendigen Venenpunktionen, z.B. zur Bestimmung laborchemischer Parameter, gewonnen, so dass hier ebenfalls eine zusätzliche Belastung vermieden werden konnte. Die Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität geprüft und genehmigt (Antrag-Nr.: 221 / 04).

#### **2.1.2 Patientengut**

Die Patienten wurden vor Entnahme und Untersuchung der Biopsien im Rahmen der Aufklärung eingehend befragt. Hier wurden insbesondere Fragen nach Tabak- und Alkoholkonsum, beruflicher Schadstoffexposition, sowie eventuell schädlichen Lebensgewohnheiten des Patienten gestellt, um eine etwaige Exposition gegenüber schädlichen Noxen zu evaluieren und bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigen zu können. Alle Daten zu den jeweiligen Spendern wurden mittels Codierung einer Pseudonymisierung unterworfen. Die Patientendaten waren lediglich dem Studienleiter zugänglich.

### 2.1.3 Anamnesen der Probenspender

**Tab.1:** Anamnesen der Spender oropharyngealer Schleimhaut für die Untersuchung mit Comet/Comet FISH ohne Oropharynx-Karzinom

Nr.	Alter	♀/♂	Alkohol	Nikotin	OP-Indikation	Beruf
1	30	♂	0	27 py	OSAS	Computertechniker
2	30	♂	25 g/d	20 py	chronische Tonsillitis	o.A.
3	34	♀	100 g/d	30 py	chronische Tonsillitis	o.A.
4	34	♀	0 g/d	20 py	Peritonsillarabszess	Informatiker
5	42	♂	75 g/d	20 py	chronische Tonsillitis	Einzelhandelskaufmann
6	44	♂	75 g/d	o.A.	OSAS	Lackierer
7	62	♂	100 g/d	20 py	Peritonsillarabszess	Vertreter
8	62	♂	25 g/d	120 py	OSAS	o.A.
9	71	♂	100 g/d	50 py	chronische Tonsillitis	Zimmermann
10	73	♂	75 g/d	50 py	chronische Tonsillitis	Bauarbeiter
11	50	♂	0 g/d	10 py	OSAS	o.A.
12	50	♂	25 g/d	0 py	OSAS	o.A.
13	46	♂	50 g/d	0 py	OSAS	Bankkaufmann
14	71	♀	300 g/d	30 py	chronische Tonsillitis	Hausfrau
15	58	♂	125 g/d	80 py	chronische Tonsillitis	Dreher

♀ weiblich, ♂ männlich, Alkoholkonsum in Gramm pro Tag, Nikotinkonsum in pack years, o.A. ohne Angabe, OSAS=obstruktives Schlafapnoesyndrom

**Tab.2:** Anamnesen der Spender oropharyngealer Schleimhaut für die Untersuchung mit Comet/Comet FISH mit Oropharynx-Karzinom

Nr.	Alter	♀/♂	Alkohol	Nikotin	Tumorlokalisation	Staging/Grading	Beruf
1	43	♂	400 g/d	27 py	Oropharynx-Ca	T2N0M0 G3	Bauarbeiter
2	46	♂	50 g/d	0 py	Vallecula-Ca	T3N2M0 G2	Bankkaufmann
3	50	♂	25 g/d	20 py	Oropharynx-Ca	T1N2M0 G2	o.A.
4	50	♂	0 g/d	10 py	Oropharynx-Ca	pT3N3M0 G2	o.A.
5	50	♂	25 g/d	0 py	Zungengrund-Ca	T3N1M0 G1	o.A.
6	51	♀	100 g/d	30 py	Oropharynx-Ca	pT4N1M0 G3	Informatiker
7	58	♀	0 g/d	20 py	Zungengrund-Ca	T1N0M0 G1	Apothekerin
8	58	♂	125 g/d	80 py	Oropharynx-Ca	T2N3M0 G3	Dreher
9	60	♂	75 g/d	20 py	Vallecula-Ca	T1N0M0 G1	Zimmermann
10	62	♂	75 g/d	o.A.	Vallecula-Ca	T3N3M0 G2	Bäcker
11	62	♂	100 g/d	20 py	Vallecula-Ca	T3N2M0 G2	Vertreter
12	62	♂	25 g/d	120 py	Oropharynx-Ca	T2N0M0 G2	o.A.
13	71	♂	100 g/d	50 py	Vallecula-Ca	pT1N1M0 G1	Zimmermann
14	71	♀	300 g/d	30 py	Oropharynx-Ca	PT2N3M0 G2	Hausfrau
15	73	♂	75 g/d	50 py	Tonsillen-Ca	T3N0M0 G2	Bauarbeiter

♀ weiblich, ♂ männlich, Alkoholkonsum in Gramm pro Tag, Nikotinkonsum in pack years, o.A. ohne Angabe, Ca=Karzinom

**Tab.3:** Anamnesen der Spender von Lymphozyten für FISH ohne Oropharynxkarzinom

Nr.	Alter	♀/♂	Alkohol	Nikotin	Beruf
1	25	♂	25 g/d	0 py	Student
2	25	♂	25 g/d	5 py	Student
3	27	♂	0 g/d	0 py	Student
4	30	♂	0 g/d	0 py	Ingeneur
5	36	♂	25 g/d	5 py	Arzt
6	44	♂	75 g/d	30 py	Maurer
7	50	♂	0g/d	20 py	Industriekaufmann
8	51	♂	25 g/d	120 py	Landwirt
9	51	♂	100 g/d	50 py	Architekt
10	62	♂	75 g/d	50 py	Kaufmann

♀ weiblich, ♂ männlich, Alkoholkonsum in Gramm pro Tag, Nikotinkonsum in pack years, o.A. ohne Angabe

**Tab.4:** Anamnesen der Spender von Lymphozyten für FISH mit Oropharynxkarzinom

Nr.	Alter	♀/♂	Alkohol	Nikotin	Tumorlokalisation	Staging/Grading	Beruf
1	38	♂	100 g/d	15 py	Zungengrund-Ca	T1N0M0 G1	Verkäufer
2	39	♂	150 g/d	30 py	Oropharynx-Ca	pT2N2M0 G2	Metzger
3	44	♂	o.A.	20 py	Oropharynx-Ca	T3N2M0 G2	o.A.
4	50	♂	0 g/d	10 py	Oropharynx-Ca	pT3N3M0 G2	o.A.
5	50	♂	25 g/d	0 py	Zungengrund-Ca	T3N1M0 G1	o.A.
6	51	♂	25 g/d	30 py	Oropharynx-Ca	pT4N1M0 G3	o.A.
7	53	♂	0 g/d	0 py	Tonsillen-Ca	T1N0M0 G1	Schaffner
8	58	♂	125 g/d	30 py	Tonsillen-Ca	pT2N3M0 G2	Brauer
9	60	♂	75 g/d	20 py	Vallecula-Ca	T1N0M0 G1	Maler
10	60	♂	25 g/d	o.A.	Tonsillen-Ca	T2N0M0 G2	Polizist

♀ weiblich, ♂ männlich, Alkoholkonsum in Gramm pro Tag, Nikotinkonsum in pack years, o.A. ohne Angabe, Ca=Karzinom

## 2.1.4 Chemikalien, Enzyme , Zellkulturmedien

**Tab.5:** verwendete Chemikalien

<b>Chemikalien</b>	
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	Midwest Research Institute, Kansas, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Eisessig	Merck, Darmstadt
Ethanol 70, 85, 100%	Klinikapotheke der LMU
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Colcemid	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na <sub>2</sub> EDTA)	Serva, Heidelberg
Eukitt	Klinikapotheke der LMU
Ficoll-Separationsmedium	Biochrom, Heidelberg
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Steinheim
Low-Melting-Agarose: Sea Plaque GTG	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-Laurylsacrosinnatriumsalz	Sigma, Steinheim
Normal-Melting-Agarose: Seakem LE	FMC-Bio Products, Rockland, USA
NP-40	Abbott, Illinois, USA
Saline sodium citrate buffer (SSC)	Abbott, Illinois, USA
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypanblau 0,4%	Merck, Darmstadt

**Tab.6:** verwendete Enzyme, Zellkulturen, Zusätze

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

## 2.1.5 Verbrauchsmaterialien, Geräte und Zubehör

**Tab.7:** verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
24-Well-Platte	Falcon, Heidelberg
96-Well-Mikrotiter-Platte CellStar	Greiner, Frickenhausen
Deckgläser zum Mikroskopieren Glasdicke 0,08 – 0,12mm	Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritzen (5ml, 10ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten steril 0,22 µm Filter Unit, Millex-GV, Millex-GS	Millipore, Eschborn
Farbfilme ISO 100, ISO 400	Kodak, New York, USA
Kryoröhrchen 2ml, steril	Nalgene, Rochester, USA
Objektträger 24x70mm	Merck, Darmstadt
Objektträger 24x70mm, je 5mm seitlich mattiert	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträgerkasten für 50 Objektträger	GLW, Würzburg
Pasteurpipetten, steril 7ml	Merck, Darmstadt
Pasteurpipetten, unsteril 7ml	Merck, Darmstadt
Pipetten (2µl, 10µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (5µl, 10µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (15ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50ml)	Greiner, Frickenhausen
Schreibdiamant	Renner, Darmstadt
Zellkulturfläschchen für Lymphozyten (25ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturfläschchen für adhärenente Zellen (25ml)	Sarstedt, Nümbrecht

**Tab.8:** Geräte und Zubehör

<b>Geräte und Zubehör</b>	
Analysenwaage Voyager (0,1mg – 62g)	Ohaus, Gießen
Programm Comet 3.1.	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Comet++	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Kromascan	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Excel	Microsoft
Elektrophoresegerät E865	Renner, Dannstadt
Gefrierschrank (-80°C)	New Brunswick Scientific, Nürtingen
horizontale Elektrophoresekammer (237 x 180mm)	Renner, Dannstadt
Kühlschrank (+4°C) und Gefrierschrank (-30°C)	Bosch, Stuttgart
Mikroskope:	
Standardmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop DMLB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem N2.1, BP 516-560	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem I3, BP 450-490	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Objektive 100x/1,25 Öl; 40x/0,5;	Leica, Heerbrugg, Schweiz
10x/0,22; 4x/0,1	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht, Schorndorf
Minishaker MS1	Clarkson Lab., Chula Vista, USA
Kryo -1°C-Freezing -Container	Nalgene, Rochester, USA
ph-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Spiegelreflexkamera	Minolta, Osaka, Japan
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Wasserbad	Reichert-Jung, Kiel
Waage 1419 (1mg – 600g)	Sartorius, Gießen
Zählkammer nach Neubauer	Merck, Darmstadt
Zentrifuge, Varifuge 3.0R	Heraeus, Darmstadt
Zentrifuge, Varifuge 3.0RS	Sartorius, Gießen

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Comet Assay**

#### **2.2.1.1 Grundlagen der Methode**

Die alkalische Version der Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet Assay) ist ein Verfahren zum Nachweis von DNA-Schäden an Einzelzellen. Hierbei werden überwiegend Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und inkomplette DNA-Exzisionsreparatur dargestellt. Nach Freilegung der DNA durch Lyse der Zell- und Kernmembranen folgt eine Inkubation in stark alkalischem Milieu, was zu einer Entspiralisierung und Denaturierung der DNA führt. Im Anschluss an die Wanderung der geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld ist es möglich, anhand der Migrationsstrecke der DNA und der Fluoreszenzintensität im Schweif des entstandenen „Kometen“ im Vergleich zur Intensität im Kopf das Ausmaß des DNA-Schadens zu quantifizieren (Speit and Hartmann, 2005; Tice et al., 2000). Hierzu wird die DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert.

#### **2.2.1.2 Isolation von Einzelzellen**

Zum Transport der Schleimhautresektate ins Labor wurden die Proben in Ringer-Lösung überführt, um dann unter sterilen Bedingungen weiterverarbeitet zu werden. Zur Vermeidung von UV-Schäden an der DNA wurden die Versuche in abgedunkelter Umgebung unter Rotlicht durchgeführt.

Die Zellisolation erfolgte mit einem sterilen, chirurgischen Skalpell, mit dem die Gewebestücke zerkleinert wurden. Diese Schleimhautfragmente wurden anschließend in einer steril-filtrierten Lösung proteolytischer Enzyme eine Stunde im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch einen zweilagigen Gazestreifen in ein 50ml Röhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde bei 400 U/min 10 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstands resuspendierte man das verbleibende Zellpellet in 1ml MEM-Joklik Medium, um anschließend die Zellzahl und die Vitalität zu bestimmen.

### **2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität**

Die Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität erfolgte mittels des „Trypanblau-Ausschluß-Tests“ (Phillips H.J., 1973).

50µl der Zellsuspension wurden mit der gleichen Menge Trypanblaulösung versetzt. Hiermit wurde eine Neubauer-Zählkammer gefüllt, um ein Zellauszählung unter dem Lichtmikroskop möglich zu machen. Vitale Zellen färbten sich aufgrund der intakten Zellmembran nicht. Avitale Zellen erschienen dagegen blau, da der Farbstoff durch die bereits geschädigte Membran in die Zelle eindringen konnte. Ermittelt wurde der Prozentsatz vitaler Zellen aus 16 Zählquadraten. Nach der Auszählung wurden Aliquots von  $0,5 - 1,0 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz gebildet.

### **2.2.1.4 Inkubation mit BPDE**

Je 100µl der Zellsuspension wurden in eine 96-Well Mikrotiterplatte gegeben. Zu jedem Ansatz wurden 10µl BPDE, gelöst in DMSO, in einer Konzentration von  $0,9\mu\text{mol/l}$  hinzugegeben. Als Negativ-Kontrolle wurde DMSO in einer Konzentration von  $166\text{mmol/l}$  verwendet, von dem ebenfalls jeweils 10µl zu jedem Kontrollansatz hinzugegeben wurde. Anschließend wurde eine Stunde lang im Schüttelwasserbad bei  $37\text{ }^\circ\text{C}$  inkubiert. Die Zellsuspension wurde in 10ml-Röhrchen überführt, wobei die einzelnen Wells im Anschluss nochmals mit 100µl Medium gespült wurden, um verbleibende Zellen aufnehmen zu können. Daraufhin wurden die Pellets bei Raumtemperatur 5 Minuten bei einer Geschwindigkeit von 400 U/min zentrifugiert.

### **2.2.1.5 Vorpräparation der Objektträger**

Um eine bessere Haftung der Zellen auf dem Objektträger zu gewährleisten wurden die an beiden Längsseiten mattierten Objektträger beschichtet, was eine bessere Haftung der folgenden Agaroseschichten ermöglichte. 85µl einer 0,5%igen Normal Melting Agarose wurde mindestens 48 Stunden vor dem Versuch auf die Objektträger gegeben.

### **2.2.1.6 Auftragen der Schleimhautzellen**

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand abpipettiert und das verbleibende Zellpellet in 75µl 0,7%iger Low Melting Agarose resuspendiert. Die Zellen wurden auf die vorbereiteten Objektträger aufgetragen und mit Hilfe eines Deckglases möglichst gleichmäßig verteilt. Nach ca. 10 Minuten wurde das Deckglas vorsichtig abgezogen und ein weiteres Mal 85µl der 0,7%igen Low Melting Agarose auf dem Objektträger verteilt und mit einem Deckglas abgedeckt.

### **2.2.1.7 Lyse und Elektrophorese**

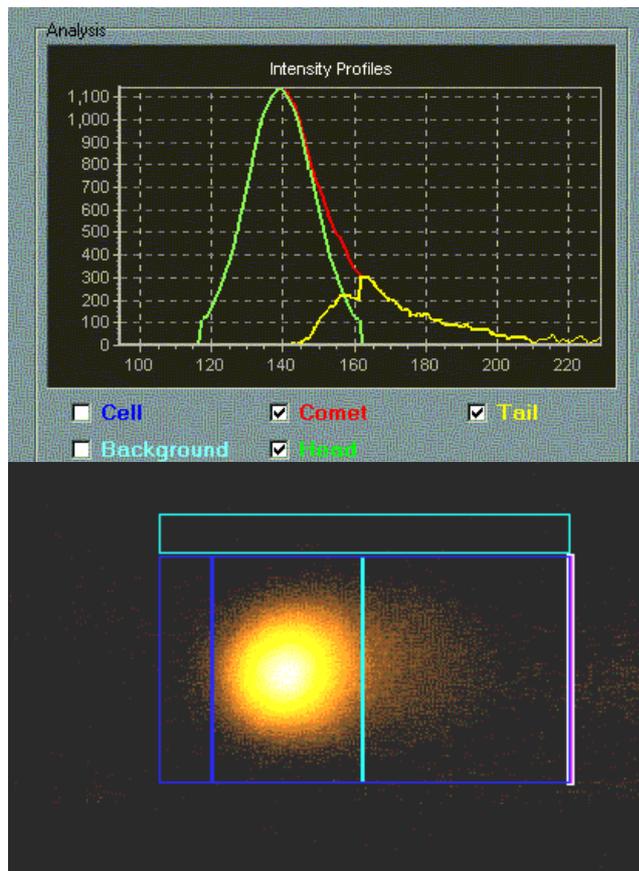
Zur Freilegung der DNA für die anschließende Elektrophorese wurden Zell- und Kernmembranen der eingebetteten Zellen mindestens eine Stunde lang bei 4° C lysiert. Dazu stellte man die Objektträger in eine Färbekammer, die mit 100ml einer frisch angesetzten Lyselösung gefüllt war. Im Anschluß wurden die Objektträger horizontal in eine dafür vorgesehene, eisgekühlte Elektrophoresekammer gelegt und dabei möglichst dicht an der Anode positioniert. Die Kammer wurde mit 4°C kaltem Elektrophoresepuffer aufgefüllt, bis die Objektträger vollständig bedeckt waren. Nach 20 Minuten alkalischer Denaturierung und Entspiralisierung wurde die Elektrophorese gestartet (20 min; 25V; 300 ±3mA). Anschließend wurden die Objektträger aus der Kammer entnommen und auf einer Färbebrücke dreimal mit Trisma-Base neutralisiert. Negativ-Kontrollen wurden mit Ethidiumbromid gefärbt, Objektträger mit geschädigten Zellen hingegen in 2x SSC aufbewahrt, um mit ihnen im Anschluss eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung durchzuführen.

### **2.2.1.8 Digitale Analyse der DNA-Migration**

Die Auswertung der mit Ethidiumbromid angefärbten DNA auf den Objektträger erfolgte mit Hilfe eines DMLB Fluoreszenzmikroskops und einer daran angeschlossenen CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (Komet 3.1).

Abhängig vom Ausmaß der induzierten Schädigung zeigten die DNA-Fragmente im elektrischen Feld verschiedene Migrationsmuster. Je stärker die Schädigung, d.h. je kleiner die Fragmente, desto schneller und damit weiter wanderte die DNA im

elektrischen Feld. Daraus resultierte ein kometenähnliches Bild, mit weitgehend intakter DNA im Kopf und fragmentierter DNA im Schweif des „Kometen“. Um das Ausmaß der Schädigung zu beschreiben, wurde das sogenannte „Olive Tailmoment“ (OTM) eingesetzt. Dieser beschreibt das Produkt aus der mittleren DNA-Wanderungsstrecke und dem Anteil der DNA im Schweif in Relation zur GesamtdNA einer Zelle (Olive and Banath, 1993). Es wurden jeweils 40 Zellen pro Objektträger ausgewertet.



**Abb.2.:** geschädigte DNA einer Epithelzelle in der Auswertung mit Comet 3.1.

### 2.2.1.9 Methodenspezifische Materialien

<b>Materialien für Comet Assay</b>	<b>Anleitung</b>
<b>proteolytische Enzymlösung (Harréus et al., 1999)</b> 10mg Hyaluronidase 10mg Kollagenase P 50mg Protease	in 10 ml Joklik auflösen, sterilfiltrieren
<b>Agarose 0,5 %</b> 0,5%ige Low-Melting Agarose PBS	unter kurzem Erhitzen in der Mirowelle in PBS auflösen und bis zur Weiterverwendung im Wasserbad bei 37°C aufbewahren
<b>Agarose 0,7%</b> 0,7%ige Normal-Melting Agarose PBS	unter kurzem Erhitzen in der Mirowelle in PBS auflösen und bis zur Weiterverwendung im Wasserbad bei 37°C aufbewahren
<b>Lysepuffer</b> 1ml Triton X-100 10ml DMSO 89ml Lysestammlösung	Triton X-100 und DMSO in 100ml Messzylinder geben; mit Lysestammlösung bis zum Eichstrich auffüllen
<b>Lysestammlösung</b> 146,4g NaCl (2,5M) 1,2g Trihydroxymethylaminomethan (19mM) 37,2g Na <sub>2</sub> EDTA (100 mM) 10g N-Laurylsarcosinnatriumsalz (1%) Aqua bidest.	NaCl, Trihydroxymethylamino-methan und N-Laurylsarcosin-natriumsalz in 500ml Aqua bidest. lösen, Na <sub>2</sub> EDTA in 160ml Aqua bidest. mit Zugabe von NaOH-Plätzchen lösen; nach Zugabe aller Komponenten pH auf 10 einstellen und mit Aqua bidest. auf 1 Liter auffüllen
<b>Elektrophoresepuffer</b> 24g NaOH –Plätzchen (300 mM) 0,744g Na <sub>2</sub> EDTA (1mM) Aqua bidest.	NaOH-Plätzchen und Na <sub>2</sub> EDTA in 2 Liter Aqua bidest. lösen, bei 4°C lagern
<b>Neutralisationspuffer</b> 48,5g Trihydroxymethylaminomethan Aqua bidest.	Trihydroxyaminomethan in 1l Aqua bidest. lösen, pH auf 7,5 einstellen, bei Raumtemperatur aufbewahren
<b>Ethidiumbromidlösung</b> 0,2mg/ml Ethidiumbromidlösung in Aqua bidest. (Stammlösung)	1:10 Verdünnung der Stammlösung mit Aqua bidest. (Färbelösung) sterilfiltrieren, bei 4°C lichtgeschützt aufbewahren
<b>2xSSC-Lösung</b> 100ml 20xSSC	20xSSC und 900ml Aqua bidest. mischen und auf pH 7,0 (± 0,2) einstellen

## **2.2.2 Comet FISH**

### **2.2.2.1 Grundlagen der Methode**

Zur optischen Darstellung einzelner Chromosomen oder chromosomaler Anteile eignet sich insbesondere die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH). In situ Hybridisierung wurde erstmals im Jahre 1969 beschrieben, bevor sie im Jahre 1986 mit der Fluoreszenzfärbung erweitert wurde (Swiger and Tucker, 1996). Die Kombination des Comet Assay und FISH wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Schädigung der Chromosomen 1,3,5 und 8 im Rahmen der Gesamtschädigung der Zell-DNA beurteilen zu können. Diese Chromosomen wurden in mehreren Vorarbeiten bereits als empfindliche Genloci beschrieben (Bockmühl, 1996;Götte et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die Kombination des Comet Assay und FISH basierend auf den Protokollen von Singh et al. und McKelvey et al. verwendet. Es wurden jedoch Modifikationen an Inkubationszeiten, Konzentrationen und Behandlung der Zellen vorgenommen (McKelvey-Martin et al., 1998;Singh et al., 1988).

### **2.2.2.2 Präparation der Objektträger**

Die Objektträger wurden für weitere 5 Minuten in eine Glasküvette mit 2xSSC-Lösung gegeben. Anschließend wurden sie in einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration (70%, 85%, 100%) jeweils 5 Minuten entwässert. Zum Trocknen legte man die Objektträger für 5 bis 10 Minuten auf eine 37°C warme Heizplatte, um die Gelschicht endgültig zu stabilisieren. Die zu hybridisierenden Stellen in der Größe von ca. 2 x 2cm wurden im Anschluß auf der Rückseite des Objektträger mit einem Diamantschreiber markiert.

In der Zwischenzeit wurden die zu verwendenden DNA-Sonden aufgetaut. 2µl von jeder Sonde pipettierte man mit je 4µl bidestilliertem Wasser und 14µl LSI-Puffer in ein 500µl-Eppendorf-Gefäß. Dieser Probenmix wurde für wenige Sekunden mit Hilfe eines Minishakers gemischt und anschließend mit einer Tischzentrifuge bei 1000 Umdrehungen zentrifugiert und bis zur Weiterverwendung bei 37°C aufbewahrt.

### **2.2.2.3 DNA-Hybridisierung**

20µl des DNA-Sondengemisches wurden auf die markierte Stelle des Objektträgers gegeben und mit einem Deckglas abgedeckt. Am Rand wurde das Deckglas mit Zementkleber versiegelt und die fertigen Objektträger auf eine 74°C heiße Wärmeplatte gelegt. Nach 6 Minuten Kodaturierung wurden die Objektträger für ca. 24 Stunden in einer Feuchtkammer im Brutschrank hybridisiert.

### **2.2.2.4 Färben der Objektträger**

Nach erfolgter Hybridisierung musste die gesamte DNA gegengefärbt werden. Hierzu wurde das Deckglas gelöst und die Objektträger für 10 Minuten senkrecht in 45°C warme Formamid-Waschlösung gestellt. Dieser Vorgang wurde im Anschluß noch zwei weitere Male wiederholt. Zum Entfernen unspezifischer Bindungen wurden die Objektträger für 10 Minuten in 2×SSC und im Anschluss für 5 Minuten in 2×SSC/NP-40 inkubiert. Auch diese Lösungen wurden jeweils auf 45°C vorgewärmt. Die Objektträger wurden dann aus der Lösung genommen und etwa 20 Minuten in Raumluft vollständig getrocknet. 15µl einer Dapi-Antifade-Lösung wurden dann auf die markierte Fläche gegeben und mit einem 2 × 2cm großen Deckglas abgedeckt. Nach ca. 25 Minuten wurde das Deckglas mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden bei -20°C im Gefrierfach aufbewahrt.

### **2.2.2.5 Digitale Auswertung der chromosomalen DNA-Migration**

Die Auswertung der hybridisierten DNA auf den Objektträgern erfolgte mit Hilfe eines DMLB Fluoreszenzmikroskops und einer daran angeschlossenen CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (Comet++<sup>TM</sup>).

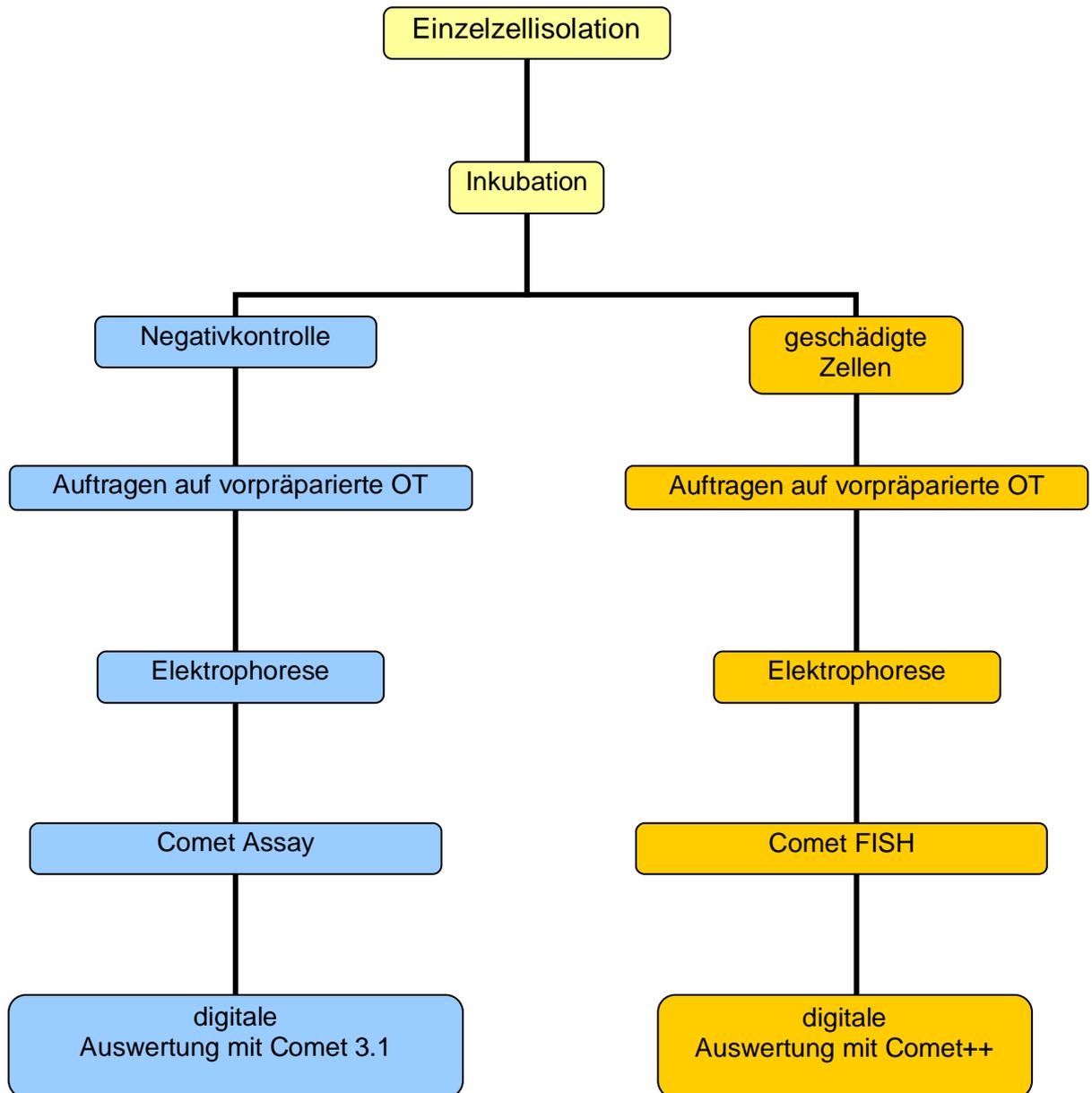
In Anlehnung an das OTM wurde für Comet FISH das Munich Chromosomal Tail Moment eingeführt. Dieses wird berechnet aus dem Produkt der mittleren chromosomalen Wanderungsstrecke und der chromosomalen Fluoreszenz im Kometenschweif, dividiert durch die gesamte Fluoreszenz des Chromosoms in der

Zelle. Die Wanderungstrecke wird hierfür vom ersten bis zum letzten Signal des Chromosoms berechnet und bezieht sich nicht auf die Mitte des Zellkerns, wie es für den OTM gültig ist. Ausgewertet wurden 20 Zellen pro Objektträger (Harréus et al., 2004).

### 2.2.2.6 Methodenspezifische Materialien

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

### 2.2.3 Übersicht zu Comet Assay/Comet FISH



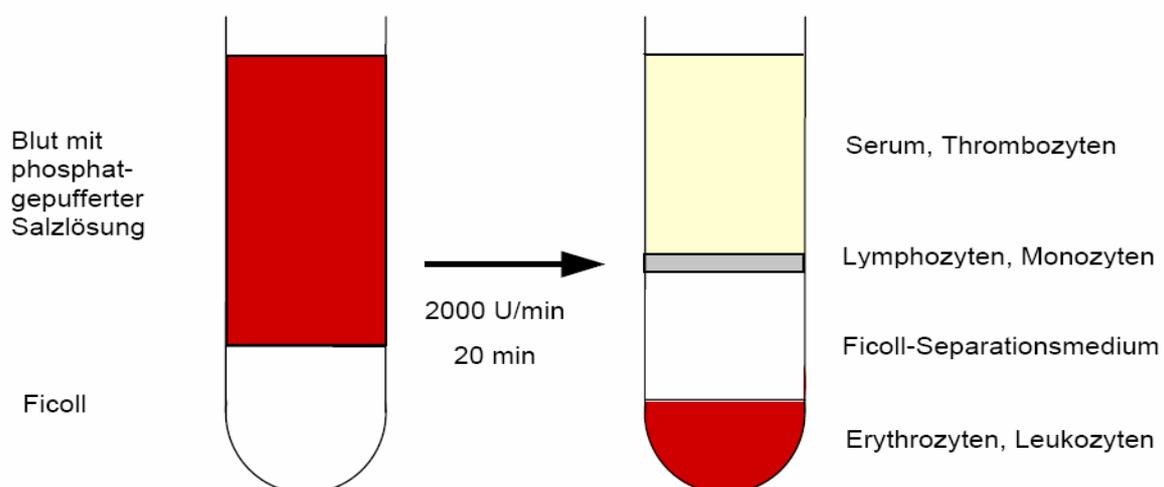
## 2.2.4 Chromosomenpräparation an Lymphozyten

### 2.2.4.1 Grundlagen der Methodik

Um eine Aussage über die Schädigung an Metaphase-Chromosomen treffen zu können, mussten diese aus den Zellen isoliert werden. Da Lymphozyten in vivo nicht-proliferative Zellen sind, müssen sie zum Erreichen der Mitose in vitro gesondert stimuliert und kultiviert werden. Behandelte Lymphozyten wurden mit Hilfe eines hypotonen Mediums zum Anschwellen und schließlich zum Platzen gebracht. Proteinreiche Zellteile und DNA wurden mit Hilfe eines Fixativs in ihrer Struktur erhalten, um anschließend eine Aussage über Art und Ausmaß der Schädigung treffen zu können.

### 2.2.4.2 Isolierung der Lymphozyten

Je 18ml heparinisieretes Vollblut der Patienten wurden mit 9ml PBS gemischt und vorsichtig in ein 50ml Röhrchen gegeben, in das ein Ficoll-Separationsmedium vorgelegt war. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation mit freiem Auslauf (20 Minuten, 2000 U/min, Raumtemperatur). Es bildeten sich im Röhrchen verschiedene Schichten, von denen die Lymphozyten/Thrombozyten-Schicht mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt wurde.



**Abb.3:** Schema zur Isolation von Lymphozyten

Die abgesaugten Zellen vermischte man mit 15ml PBS und zentrifugierte erneut (10 Minuten, 2000 U/min, Raumtemperatur, mit Bremse). Das entstandene Zellpellet wurde in 1ml FCS aufgenommen, um anschließend Zellzahl und Vitalität zu bestimmen. Die Lymphozyten wurden dann zu Aliquots von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml portioniert und in 10% DMSO und 90% FCS eingefroren. Dies geschah in 1ml-Kryogefäßen, die in einen mit Isopropanol gefüllten Behälter gestellt wurden. Dies gewährleistete eine Temperaturabnahme von  $1^\circ\text{C}/\text{h}$ . Nach 24h konnten die Kryogefäße bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden, ohne der Lymphozyten-DNA Schaden zuzufügen (Schmezer et al., 2001).

#### **2.2.4.3 Stimulation der Lymphozyten**

Zur Präparation der Metaphase-Chromosomen wurden die Lymphozyten wieder aufgetaut, um daraufhin so schnell wie möglich weiterverarbeitet zu werden. Man gab die Zellen zu 9ml PBS und zentrifugierte diese (1200 U/min, 5 Minuten, Raumtemperatur). Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zellpellet wieder in 10ml PBS gelöst und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Wieder verwarf man den Überstand und gab zu den gereinigten Zellen 1ml Kulturmedium. Daraufhin bestimmte man Zellzahl und Vitalität (siehe 3.3.1). Zu jeweils  $1 \times 10^6$  wurde 1ml Medium gegeben, maximal gab man  $5 \times 10^6$  Zellen in eine Kulturflasche. Zur Stimulation der Lymphozyten wurde nun 20 $\mu\text{l}$  PHA in einer Konzentration 0,24g/l auf je 1ml Medium hinzupipettiert. Die Zellen wurden dann für 71 Stunden im Brutschrank kultiviert. ( $37^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$ )

#### **2.2.4.4 Inkubation mit BPDE**

Nach 71 Stunden wurde zu den Zellen BPDE in einer Konzentration von  $0,45\mu\text{mol}/\text{l}$  bzw.  $0,225\mu\text{mol}/\text{l}$  hinzugegeben. Als Negativkontrolle benutzte man DMSO in einer Konzentration von  $166\text{mmol}/\text{l}$ . Die Zellen inkubierten 1 Stunde im Brutschrank ( $37^\circ\text{C}$ , 5% $\text{CO}_2$ ), bevor 20 $\mu\text{l}$  Colcemid in einer Konzentration von  $10\mu\text{g}/\text{ml}$  zu je 1 ml Kulturmedium gegeben wurde, um die Mitose der Lymphozyten in der Metaphase zu unterbrechen. Wieder wurde für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, woraufhin die Zellen in ein 10ml Zentrifugen-Röhrchen überführt wurden. Nach abgeschlossener Zentrifugation (5 Minuten, 1200 U/min, Raumtemperatur) wurde der Überstand

verworfen und das Pellet in 5 ml vorgewärmten (37°C) Kulturmedium gelöst. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und der Vorgang wiederholt, um verbleibendes BPDE und Colcemid aus der Zellsuspension zu entfernen.

#### **2.2.4.5 Präparation und Fixation**

Der Überstand wurde bis auf 1ml abgesaugt und das Pellet darin gelöst. 8ml vorgewärmte Kaliumchlorid-Lösung in einer Konzentration von 0,075mmol/l wurden tropfenweise zu jedem Ansatz hinzupipettiert. Während dieses Vorgangs wurden die Zellen vorsichtig geschüttelt, um ein Verkleben der Zellen zu verhindern. Die Lymphozyten wurden 45 Minuten in diesem hypotonen Medium inkubiert, bis die Zellen „aufgetrieben“ waren. Anschließend zentrifugierte man die Zellsuspension (5 Minuten, 1200 U/min, Raumtemperatur) und verwarf den Überstand. Zu den Zellen wurde eiskaltes Fixativ, bestehend aus Methanol und Eissessig im Verhältnis 3:1, zugegeben, wobei die Zellsuspension auch bei diesem Vorgang vorsichtig geschüttelt wurde. Die Zellen ruhten 30 Minuten lang bei 4°C, bevor sie wiederum zentrifugiert wurden (5 Minuten, 1200 U/min, 4°C). Diese Fixation wurde noch 3 weitere Male wiederholt, wobei die Wartezeit bei den folgenden Malen nur noch 10 Minuten betrug. Nach der letzten Zentrifugation wurde bis auf 1,5ml abgesaugt und die Zellen im Fixativ gelöst. Anschließend tropfte man die Zellsuspension mit einer sterilen Pasteurpipette auf nasse, gekühlte Objektträger. Es wurden jeweils 5-7 Tropfen auf jeden Objektträger gegeben, die Tropfhöhe betrug ca. 50 cm. Die Objektträger wurden daraufhin über Nacht bei Zimmertemperatur getrocknet.

### 2.2.4.6 Methodenspezifische Materialien

<b>Materialien für Chromosomenpräparation an Lymphozyten</b>	<b>Anleitung</b>
<b>Kulturmedium - RPMI</b> 500ml RPMI 1640 5ml Penicillin/Streptomycin-Lösung	Penicillin/Streptomycin-Lösung zu RPMI 1640 hinzufügen und vermischen
<b>Tieffrier-Medium</b> 10% DMSO 90% FCS	muss bei Gebrauch immer kühl sein
<b>Phytohämagglutinin (PHA 240 µg/ml)</b> 1,2mg Phytohämagglutinin 5ml PBS	PHA in PBS auflösen, zu je 1ml portionieren und bei -20°C lagern
<b>KCl-Lösung</b> 5,59g KCl 1l Aqua bidest.	KCl in Aqua bidest. lösen, bei Raumtemperatur lagern
<b>Methanol-Eisessig-Fixativ</b> 750ml Methanol 250ml Eisessig	Methanol und Eisessig unter Abzug mischen, bei -20°C aufbewahren

## **2.2.5 Etablierung eines Modells zur Chromosomenpräparation an Mukosazellen des oberen Aerodigestivtraktes**

### **2.2.5.1 Grundlagen der Methodik**

Zur Chromosomenpräparation an proliferativen Zellen liegen bislang nur wenige Arbeiten vor. Da keinerlei Versuchsprotokolle zur Präparation an Zellen des oberen Aerodigestivtraktes in der gängigen Literatur beschrieben sind, wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere, unterschiedliche Versuchsanordnungen entwickelt, bis schließlich ein adäquates Ergebnis in Anzahl und Morphologie der präparierten Chromosomen erreicht werden konnte. Im folgenden Teil sollen nun kurz die einzelnen Versuchsschritte und Überlegungen chronologisch aufgelistet werden, die schließlich zur endgültigen Versuchsanordnung führten.

### **2.2.5.2 Vorversuche der Präparation an frisch entnommenen Resektaten**

Die Vorlage für diesen Versuch bildete das Protokoll des Comet Assays. Als Grundlage diente die Hypothese, dass in frischem Biopsiematerial auch einige Stunden nach Entnahme immer noch Mitosen erfolgen, eine umgehende Inkubation des Mukosaresektats in Nährmedium vorausgesetzt. Zu diesem Zweck wurden die frischen Biopsien in BEGM überführt, bis es mit Hilfe eines sterilen, chirurgischen Skalpell so fein wie möglich zerkleinert wurde. Die Zellen wurden dann eine Stunde lang bei 37°C in einer proteolytischen Enzymlösung inkubiert, zu der Colcemid in einer Konzentration von 0,2µg/ml zugegeben wurde. Die Zellen konnten so schonend aus ihrem Zellverband gelöst werden. Gleichzeitig war es möglich bei denjenigen Zellen die Mitose zu stoppen, die sich gerade in der Metaphase befanden. Die Zellen wurden daraufhin durch einen doppellagigen Gazestreifen filtriert und anschließend bei 1200 U/min 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und Zellzahl und Vitalität der Schleimhautzellen bestimmt. Die Zugabe des hypotonen Mediums und die Fixation erfolgte analog wie bei Lymphozyten (siehe 2.2.4), wobei die Inkubationshäufigkeiten und -zeiten variiert und auf verschiedenste Weise kombiniert wurden. (siehe Tab.9)

**Tab 9.:** Kombination der Inkubationszeiten und -häufigkeiten bei der Chromosomenpräparation aus frischen Resektaten

<b>KCI-Zeit</b>	<b>Fixationshäufigkeit und –dauer</b>
5 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten
10 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten
25 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten
30 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten
45 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten 4x 30 Minuten 6x 10 Minuten
60 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten

Die Kombination der verschiedenen Zeiten und Fixationsschritte ergab in der Folge keine ausreichende Darstellung von Metaphase-Chromosomen. So waren meist schon nach der ersten Fixation keine Zellen mehr im Pellet nachzuweisen. Die Anzahl der präparierten Metaphasen war in keinem der abgeschlossenen Versuche für eine Auswertung ausreichend.

**Tab 10.:** methodenspezifische Materialien zur Chromosomenpräparation von Schleimhautzellen aus frischem Biopsat

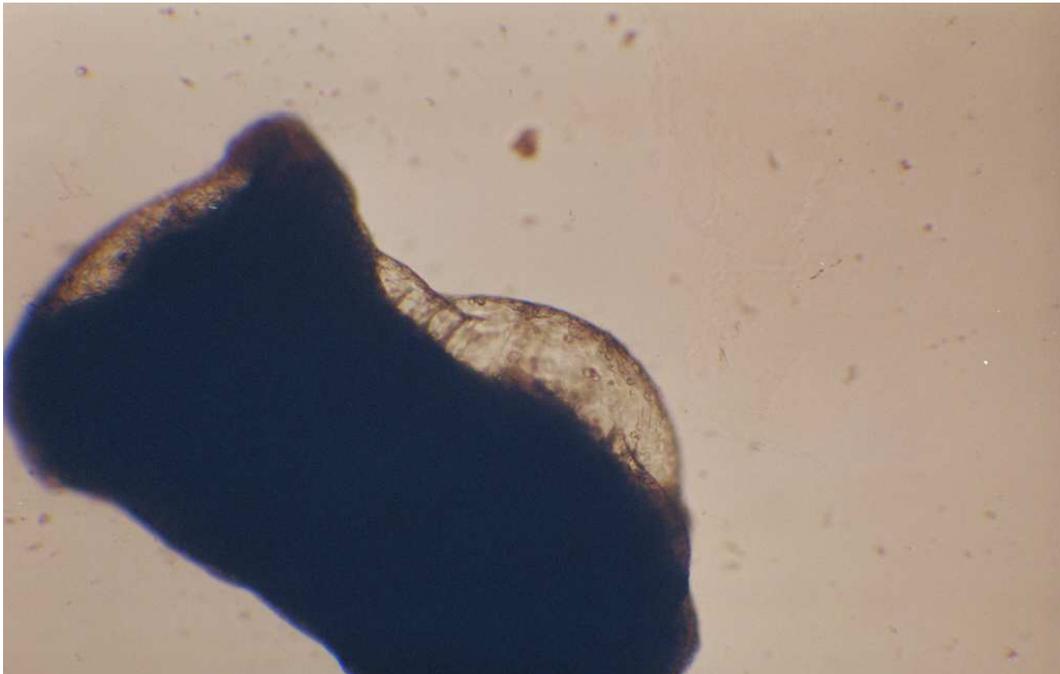
<b>Materialien für Chromosomenpräparation an Schleimhautzellen aus frischem Biopsat</b>	<b>Anleitung</b>
<b>Kulturmedium BEGM</b> (Bronchial Epithelial Growth Medium) 500ml Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM) Supplement Pack: BPE, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Triiodthyronin, Transferrin, Retinoic Acid	unter sterilen Bedingungen zugeben, mischen, bei 4°C lagern
<b>proteolytische Enzymlösung</b> 10mg Hyaluronidase 10mg Kollagenase P 50mg Protease	in 10ml MEM-Joklik lösen, sterilfiltrieren
<b>KCl-Lösung</b> 5,59g KCl 1l Aqua bidest.	KCl in Aqua bidest. lösen, bei Raumtemperatur lagern
<b>Methanol-Eisessig-Fixativ</b> 750ml Methanol 250ml Eisessig	Methanol und Eisessig unter Abzug mischen, bei -20°C aufbewahren

### 2.2.5.3 Versuch der Präparation aus Miniorgankulturen (MOK)

Das Anlegen von Miniorgankulturen wurde erstmal 1991 (Steinsvag et al., 1991) beschrieben und für nasale Schleimhaut von Kleinsässer et al. modifiziert (Kleinsässer et al., 2004). Die Präparation von Miniorgankulturen aus oropharyngealen Zellen war an diese Protokolle angelehnt.

Um eine höhere Ausbeute an Metaphasen zu erreichen, wurde in einem 2. Schritt die Oberfläche der Mukosaproben vergrößert, indem diese in kleinere Stücke zerteilt wurden. Mit diesen Schleimhautstücken wurden Miniorgankulturen angelegt, um eine möglichst hohe Zellzahl der Epithelien zu gewährleisten. Dazu wurden die Mukosastücke drei Mal in jeweils 5ml PBS gereinigt und anschließend auf einer mit

Agarose beschichteten 24-Well-Platte aufgeteilt. Zu jedem Probenstück wurden 250µl Nährmedium hinzugegeben, welches alle 2 Tage erneuert wurde, um optimale Wachstumsbedingungen für die Mucosa zu gewährleisten. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Organkulturen beobachtet, bis ein Maximum der Zellproliferation nach ca. 14-20 Tagen Inkubation feststellbar war.



**Abb.4:** Mucosastück 2 Wochen nach Beginn der Kultivierung (Vergrößerung 1:10)



**Abb.5:** Mucosastück 2 Wochen nach Beginn der Kultivierung (Vergrößerung 1:40)

War dieser Zeitpunkt erreicht, so wurde über Nacht Colcemid in einer Konzentration von 10µg/ml zu den Zellen hinzugegeben. Nach ca. 15 Stunden wurden 600µl proteolytischer Enzymlösung in je ein Eppendorfgefäß vorgelegt und anschließend 2-3 der Miniorgankulturen hinzugegeben. Diese Eppendorfgefäße wurden 45 Minuten im 37°C warmen Wasserbad inkubiert. Im Anschluss wurden die Gefäße mit Hilfe eines Minishakers gut durchgeschüttelt und auf Eis gestellt. Das makroskopisch erkennbar gelöste Bindegewebe wurde mit Hilfe einer sterilen Kanüle von den Epithelzellen getrennt und verworfen. Zu jedem Gefäß pipettierte man 600µl FCS, um die Wirkung der Enzyme aufzuheben. Im Anschluss wurden die Eppendorfgefäße bei 4°C 5 Minuten lang bei 800 Umdrehungen zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Hilfe einer sterilen Pipette abgesaugt und 1ml PBS zu den MOKs hinzugegeben. Ein zweites Mal wurde unter gleichbleibenden Bedingungen zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang mit 1ml PBS wurde noch ein weiteres Mal wiederholt. Nach Zentrifugation und Absaugen des Überstandes wurden die MOKs der endgültigen Chromosomenpräparation zugeführt.

Wieder wurde, ähnlich wie bei Lymphozyten, KCL und Fixativ in unterschiedlicher Dauer und Häufigkeit zu den Zellen hinzugefügt. (siehe Tab.11)

**Tab 11.:** Kombination der Inkubationszeiten und -häufigkeiten bei der Chromosomenpräparation aus Miniorgankulturen

<b>KCI-Zeit</b>	<b>Fixationshäufigkeit und –dauer</b>
5 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten
10 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten
25 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten
30 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten
45 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten 4x 30 Minuten 6x 10 Minuten
60 Minuten	4x 10 Minuten 1x 30 Minuten, 3 x 10 Minuten

Auch bei diesem Modell erbrachte die Kombination der verschiedenen Zeiten und Fixatinsschritte keine ausreichende Darstellung der Metaphasen. Die Anzahl der präparierten Metaphasen war auch in dieser Versuchsanordnung in keinem der abgeschlossenen Versuche ausreichend für eine Auswertung.

**Tab 12.:** methodenspezifische Materialien zur Chromosomenpräparation aus Schleimhautzellen an MOKs

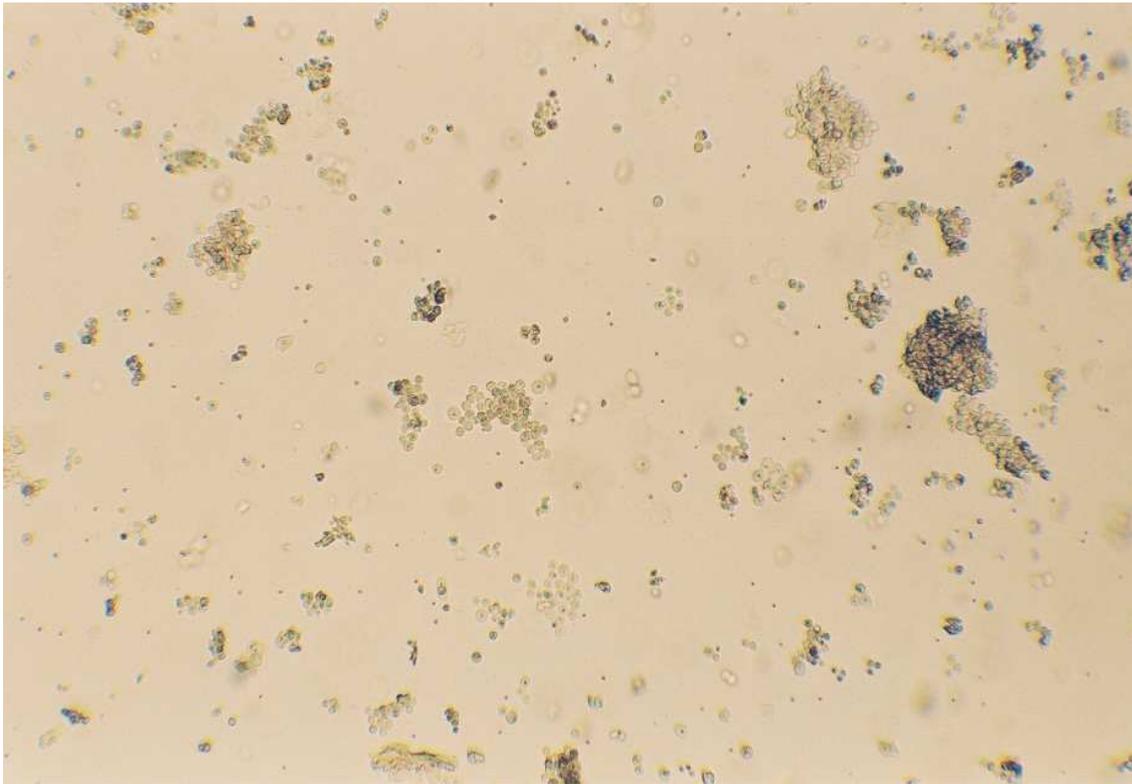
<b>Materialien für Chromosomenpräparation aus Schleimhautzellen an MOKs</b>	<b>Anleitung</b>
<b>Kulturmedium BEGM (Bronchial Epithelial Growth Medium)</b> 500 ml Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM) Supplement Pack: BPE, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Triiodthyronin, Transferrin, Retnoic Acid	unter sterilen Bedingungen zugeben, mischen, bei 4°C lagern
<b>proteolytische Enzymlösung</b> 10mg Hyaluronidase 10mg Kollagenase P 50mg Protease	in 10 ml MEM-Joklik lösen, sterilfiltrieren
<b>KCl-Lösung</b> 5,59g KCl 1l Aqua bidest.	KCl in Aqua bidest. lösen, bei Raumtemperatur lagern
<b>Methanol-Eisessig-Fixativ</b> 750ml Methanol 250ml Eisessig	Methanol und Eisessig unter Abzug mischen, bei -20°C aufbewahren
<b>Agar (24-Well-Platten)</b> 1,5% Agar Noble 30ml DMEM 6ml FCS 7,5µl nonessentielle Aminosäuren 120µl Penicillin/Streptomycin 240µl Amphotericin B	Substanzen mischen, Wells damit auffüllen und aushärten lassen

#### **2.2.5.4 Chromosomenpräparation aus kultivierten Schleimhautzellen**

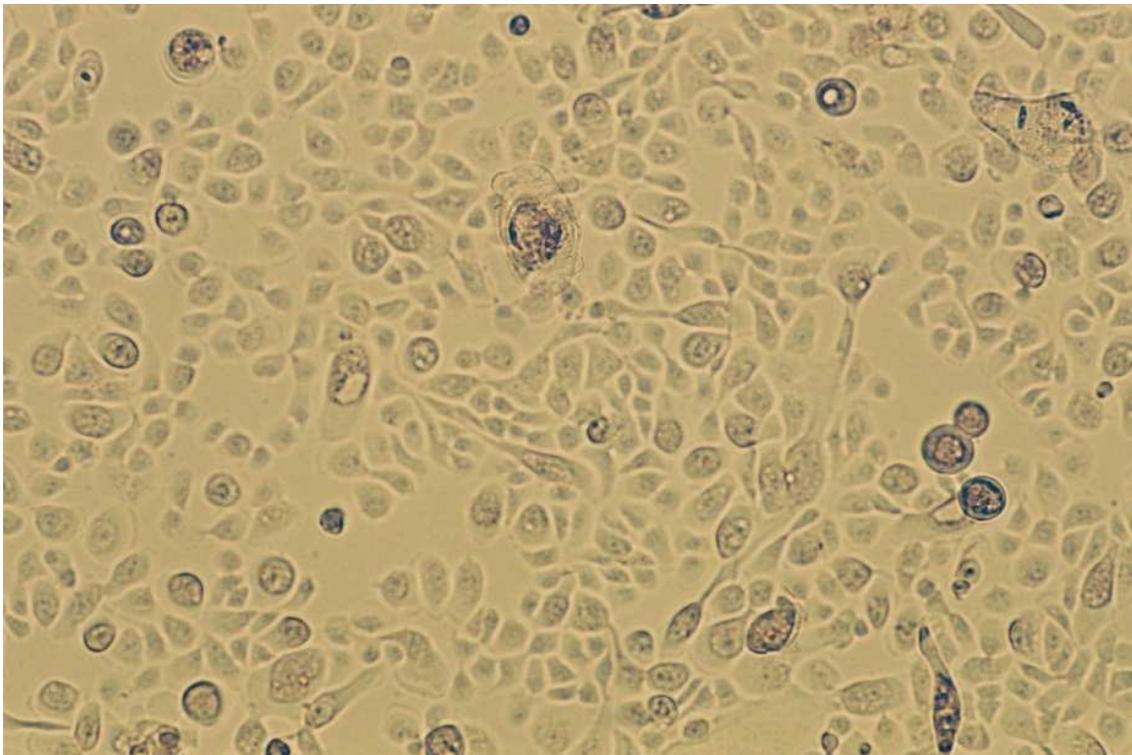
Die Chromosomenpräparationen an frischen Schleimhautresektaten und an Miniorgankulturen ergaben, dass Schleimhautzellen des Oropharynx auf die Präparation weitaus sensibler reagieren als Lymphozyten. Vor allem das mechanische Auslösen mittels Skalpell kurz vor der Präparation aus dem Zellverbund scheint für eine Darstellung der Metaphasen nicht geeignet zu sein. Aus diesem Grund wurden die Schleimhautzellen in Kulturflaschen angelegt, in denen sie über mehrere Wochen wachsen konnten und dann mit Hilfe von Enzymen in Einzelzellen aufgeteilt werden zu können.

Dazu wurden die Gewebestücke mit Hilfe eines sterilen Skalpells unter der Sterilbank in feine Stücke zerkleinert und 3-mal in kurzer Folge in 5ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 5ml erwärmtes Kulturmedium überführt und in dafür vorgesehene Kulturflaschen überführt. Um die Zellen vor Infektionen durch Bakterien und Pilzen zu schützen wurden einmalig 40µl Penicillin/Streptomycin in einer Konzentration von 250µg/ml und 40µl Amphotericin B in der gleichen Konzentration zu den Zellen hinzugegeben. Die Kulturflaschen wurden dann flach bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in den Brutschrank gelegt.

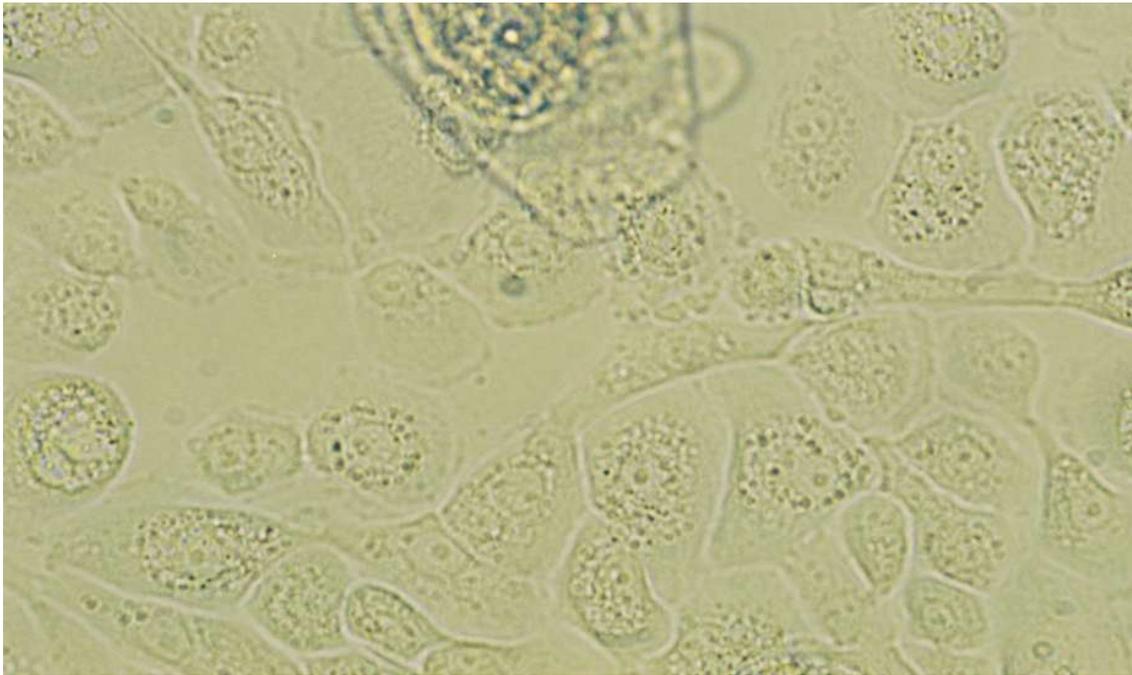
Die Zellen wurden dann für 5-6 Wochen im Brutschrank belassen, bis sich ein dichter Zellrasen aus mehreren Zellschichten gebildet hatte.



**Abb.6:** Mucosazellen kurz nach einbringen der Zellen in Kulturflasche (Vergrößerung 1:10)



**Abb.7:** Mucosazellen nach 4 Wochen Kultivierung, bereits deutlicher Zellverbund am Flaschenboden ersichtlich (Vergrößerung 1:40)



**Abb.8:** Mucosazellen nach 6 Wochen Kultivierung: bereits deutlicher Zellrasen, teilweise mehrschichtig (Vergrößerung 1:100)

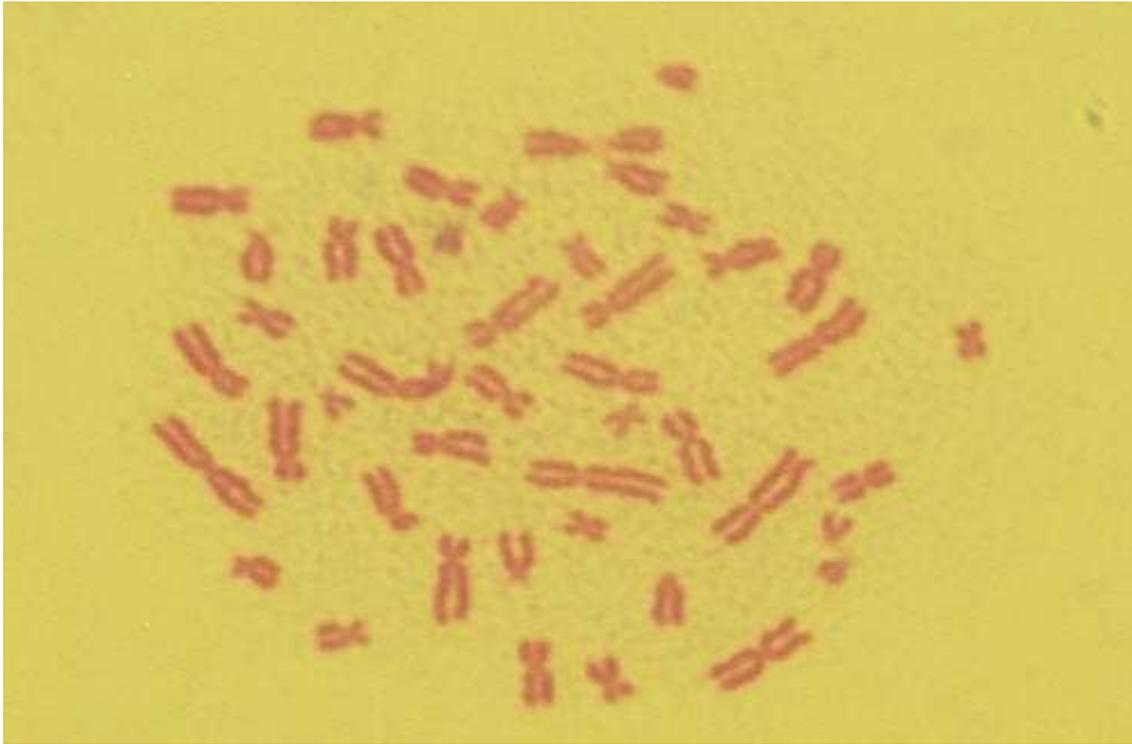
Bis zu diesem Zeitpunkt wurde das Kulturmedium alle 2-3 Tage gewechselt. Dazu stellte man die Kulturflaschen 15 Minuten aufrecht in den Brutschrank, um noch nicht angewachsene Zellen sedimentieren zu lassen. Mit einer sterilen Pasteurpipette wurden ca. 4ml des Mediums abgesaugt und mit der gleichen Menge frischen, angewärmten Mediums erneuert. Hierbei musste besonders auf steriles Arbeiten geachtet werden, um Infektionen auf jeden Fall zu vermeiden. Nach ca. 2-3 Wochen wurden die Zellen passagiert, d.h. auf neue Kulturflaschen aufgeteilt. Dazu wurde das komplette Medium aus den Kulturflaschen entfernt und mit 5ml PBS gespült. Angewärmtes Trypsin/EDTA wurde den Zellen zugegeben. Es war besonders darauf zu achten, dass das Kulturmedium komplett abgesaugt war, da auch kleine Reste die Aktivität des Trypsins deutlich herabsetzten. Nach ca. 3-10 Minuten lösten sich die Zellen vom Flaschenboden ab und konnten aus der Flasche steril abgesaugt werden. Dieser Prozess wurde unter dem Mikroskop verfolgt, da die Einwirkzeit des Trypsins sich als sehr variabel herausstellte. Die Zellen wurden in ein 10ml Gefäß überführt und mit 5ml angewärmtem Kulturmedium gemischt. Anschließend wurde bei 400 Umdrehungen 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 5ml frischem Medium aufgenommen. Dieses wurde dann auf 2-3 Kulturflaschen aufgeteilt, abhängig von Anzahl und Wachstumsraten der Zellen.

Die anschließende Chromosomenpräparation erfolgte auf 2 verschiedenen Wegen. Einerseits wurde die Präparation analog wie bei Miniorgankulturen (siehe 2.2.5.3) durchgeführt. Es konnte zwar ein etwas besseres, aber immer noch kein befriedigendes Ergebnis für eine Weiterverarbeitung erzielt werden. Die Anzahl der Metaphasen war durchaus ausreichend für eine Auswertung, die einzelnen Chromosomen lagen aber häufig zu weit „gestreut“ über den Objektträger, d.h. eine eindeutige Zuordnung der Chromosomen war nicht immer möglich.

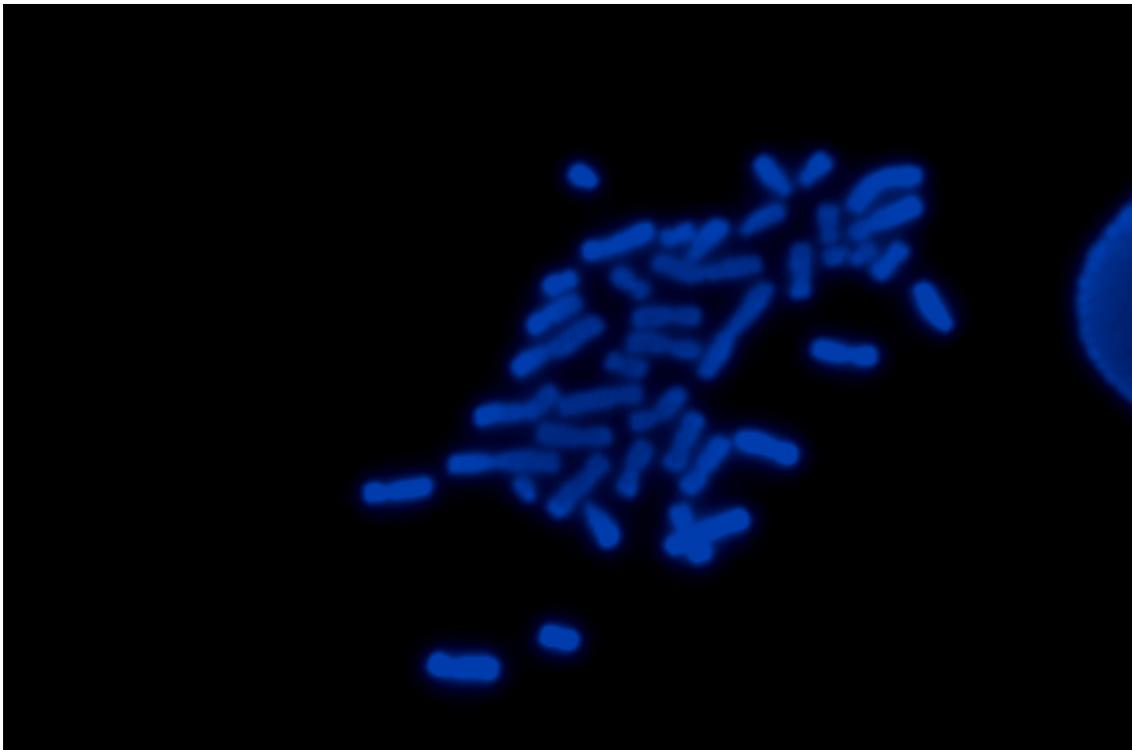
Aus diesem Grund ließ man die Zellen direkt auf Objektträger wachsen, anstatt die Zellen wie bisher auf Objektträger zu tropfen. So konnte eine schonendere Methode der Präparation etabliert werden.

Die Zellen wurden wie zur Passagierung aus den Kulturflaschen herausgelöst und anschließend sterile Objektträger in sogenannte Quadripermschalen eingebracht. 4 – 5 ml der Zellsuspension wurde auf die Objektträger pipettiert und diese wieder in den Brutschrank überführt. Die Zellen wuchsen ca. 10 Tage auf den Objektträger an, wobei das Medium alle 2 Tage vorsichtig gewechselt wurde. Zu den Zellen wurde über Nacht zum 10. Tag 25µl Colcemid in einer Konzentration von 0,1µg/ml zu den Zellen hinzupipettiert. Nach ca. 15 Stunden wurde das gesamte Medium abgesaugt und 5 ml vorgewärmte KCL-Lösung in einer Konzentration von 0,075mmol/l auf die Präparate gegeben. Die Objektträger wurden dann noch 25 Minuten bei 37°C aufbewahrt. Im Anschluss wurde das KCl entfernt und Fixativ, bestehend aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1, zu den Zellen gegeben. Die Objektträger wurden dann 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen, bis das Fixativ abgesaugt werden konnte. Dieser Vorgang wurde noch ein weiteres Mal wiederholt und die Objektträger geschützt 2-5 Tage getrocknet.

Das oben beschriebene Versuchsprotokoll ermöglichte erstmals die Darstellung von Metaphasechromosomen von humanen Schleimhautzellen des oberen Oropharynx. Die Objektträger wurden mit Giemsa bzw. DAPI gefärbt und nach Anzahl und Struktur beurteilt, ob eine Fortsetzung des Versuchs und somit eine Fluoreszenz in situ Hybridisierung möglich war.



**Abb. 9:** Metaphasenpräparation an Schleimhautzelle, abgefärbt mit Giemsa (Vergrößerung 1:100)



**Abb.10:** Metaphasenpräparation an Schleimhautzellen, angefärbt mit DAPI (Vergrößerung 1:100)

**Tab 13.:** methodenspezifische Materialien zur Chromosomenpräparation aus Schleimhautzellen aus kultivierten Zellen

<b>Materialien für Chromosomenpräparation an Schleimhautzellen aus kultivierten Zellen</b>	<b>Anleitung</b>
<b>Kulturmedium BEGM (Bronchial Epithelial Growth Medium)</b> 500ml Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM) Supplement Pack: BPE, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Triiodthyronin, Transferrin, Retinoic Acid	unter sterilen Bedingungen zugeben, mischen, bei 4°C lagern
<b>Trypsin/EDTA</b> 5g Trypsin 2g EDTA	in PBS 1:10 verdünnen, vor Gebrauch erwärmen
<b>KCl-Lösung</b> 5,59g KCl 1l Aqua bidest.	KCl in Aqua bidest. lösen, bei Raumtemperatur lagern
<b>Methanol-Eisessig-Fixativ</b> 750ml Methanol 250ml Eisessig	Methanol und Eisessig unter Abzug mischen, bei -20°C aufbewahren
<b>Giemsa-Färbung</b> 20%-ige Giemsa Lösung	Mit Weise-Puffer 5%ige Lösung herstellen
<b>DAPI-Färbung</b> Dapi Antifade III	beide Komponenten im Verhältnis 2:1 mischen

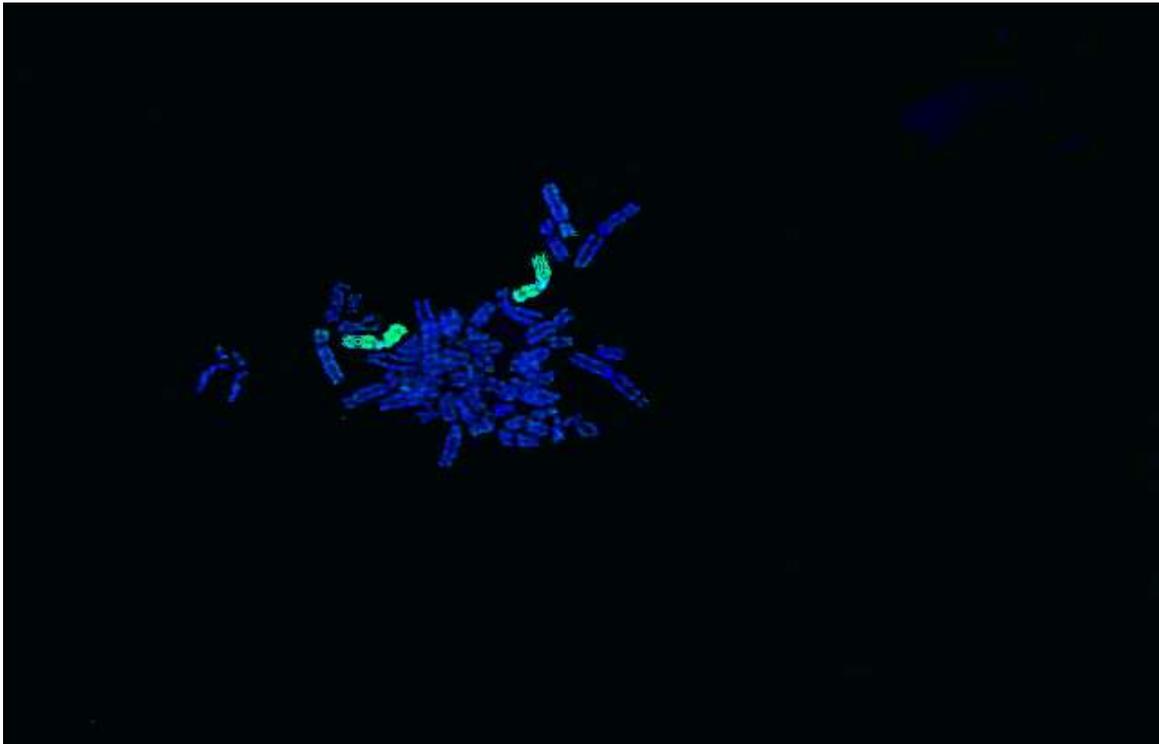
## 2.2.6 Fluoreszenz in situ Hybridisierung an Metaphasen

Damit Chromosomenpaare einzeln angefärbt werden konnten, wurden die präparierten Objektträger weiter mit FISH gefärbt und anschließend einer digitalen Auswertung zugeführt.

Dazu wurden die Objektträger für 5 Minuten in ein Galsküvette mit 2×SSC-Lösung gegeben. Im Anschluss denaturierte die DNA im Wasserbad bei 74°C. Die Objektträger wurden dazu 5 Minuten in 70%ige, im Wasserbad erwärmte Formamidlösung gestellt. Anschließend wurden sie in einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration (70%, 85%, 100%) jeweils 5 Minuten entwässert. Die zu hybridisierenden Stellen in der Größe von ca. 2cm × 2cm wurden im Anschluß auf der Rückseite des Objektträger mit einem Diamantschreiber markiert.

### 2.2.6.1 Hybridisierung

Gleichzeitig wurden die DNA-Sonden vorbereitet, indem sie aufgetaut und mit dem zugehörigen Puffer und destilliertem Wasser in ein kleines Eppendorfgesäß pipettiert wurden. Dieses Probengemisch denaturierte bei 74°C im Wasserbad für 5 Minuten, um dann auf die markierten Stellen der Objektträger aufgebracht zu werden. Die Fläche wurde mit einem Deckglas versehen und dieses mit Zementkleber luftdicht versiegelt. Die Hybridisierung der DNA erfolgte im Brutschrank (37°, 5%CO<sub>2</sub>) über Nacht.



**Abb.11:** Metaphasenpräparation an Lymphozyten, grün gefärbt sind die Chromosomen 3, die restlichen Chromosomen sind mit DAPI (blau) gegengefärbt

### 2.2.6.2 Färben der Objektträger

Nach erfolgter Hybridisierung musste die gesamte DNA gegengefärbt werden. Hierzu löste man vorsichtig das Deckglas und stellte die Objektträger für 10 Minuten senkrecht in 45°C warme Formamid-Waschlösung. Dieser Vorgang wurde im Anschluß noch zwei weitere Male wiederholt. Zum endgültigen Reinigen der Objektträger von der DNA-Sonde wurden diese für 10 Minuten in 2×SSC und im Anschluss für 5 Minuten in 2×SSC/NP-40 inkubiert, auch diese Lösungen jeweils auf 45°C vorgewärmt. Die Objektträger wurden dann aus der Lösung genommen und etwa 20 Minuten vollständig in Raumluft getrocknet. 15µl einer Dapi-Antifade-Lösung wurden dann auf die markierte Fläche gegeben und mit einem 2 × 2cm großen Deckglas abgedeckt. Nach ca. 25 Minuten wurde das Deckglas mit Nagellack versiegelt. Die Objektträger wurden bei -20°C im Kühlschrank aufbewahrt.

### **2.2.6.3 Digitale Auswertung der Objektträger**

Die Auswertung der hybridisierten Metaphasen auf den Objektträgern erfolgte mit Hilfe eines DMLB Fluoreszenzmikroskops und einer daran angeschlossenen CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (Kromascan™).

Das Ausmaß der DNA-Zugewinne oder -verluste wurde mit Hilfe des relativen Anteils der DNA der jeweiligen Chromosomenpaare an der Gesamt-DNA beschrieben. Austausch von Chromosomenarmen oder Insertion, die nicht mit Zugewinnen oder Verlusten an DNA einhergingen, wurden festgehalten und dokumentiert. Ausgewertet wurden 15 Metaphasen pro Objektträger.

### 2.2.6.4 Methodenspezifische Materialien

FISH	Anleitung
<b>2xSSC-Lösung</b> 100ml 20xSSC Aqua bidest.	20xSSC und Aqua bidest. mischen und auf 1000ml auffüllen, pH 7,0 ( $\pm$ 0,2) einstellen
<b>Denaturierungslösung</b> 49ml Formamid 7ml 20 x SSC 14ml Aqua dest.	Komponenten mischen und pH auf 7,0 bis 7,1 einstellen
<b>DNA-Sonden</b> für 1 Chromosomenpaar: 1 $\mu$ l DNA-Sonde 7 $\mu$ l Hybridisierungspuffer 2 $\mu$ l Aqua dest. für 2 Chromosomenpaare: je 1 $\mu$ l DNA-Sonde (verschieden gefärbt) 7 $\mu$ l Hybridisierungspuffer 2 $\mu$ l Aqua dest.	Komponenten in ein Eppendorf-Gefäß pipettieren und kurz mit Tischzentrifuge zentrifugieren
<b>Formamid-Waschlösung</b> 157,5ml Formamid 31,5ml 20 SSC 122 ml Aqua bidest.	Komponenten in einem 500 ml Standzylinder mischen und auf pH 7-7,5 einstellen (max. 7 Tage lagern)
<b>2xSSC/NP-40-Lösung</b> 1ml Tergitol NP-40 1000ml SSC	NP-40 im Wasserbad erhitzen, bis es flüssig ist; langsam in 1000ml SSC lösen und auf pH 7,0 ( $\pm$ 0,2) einstellen (6 Monate haltbar)

## **3 Ergebnisse**

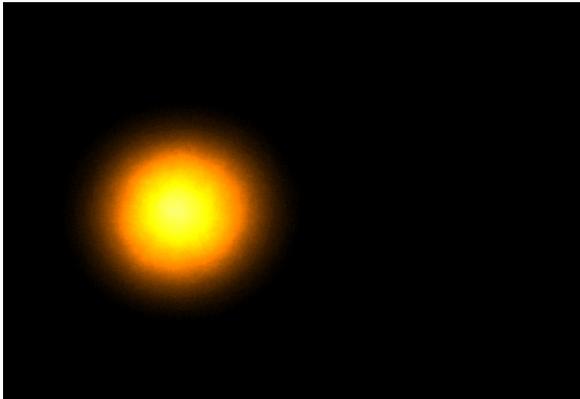
### **3.1 Statistische Testverfahren**

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS™13.0, für die Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots gewählt. Diese waren gekennzeichnet durch den Median und die Quartilen. Die Länge der Whisker betrug maximal das 1,5-fache des Interquartilsabstandes (IQR). Als Ausreißerwerte wurde solche bezeichnet, die außerhalb dieses Bereichs lagen, Extremwerte lagen außerhalb des 3-fachen IQR. Die unterschiedlichen OTM/MCTM-Werte wurden den jeweiligen Kontrollen gegenübergestellt und mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Daten geprüft. Für den Vergleich der tumorfreien Patienten mit den Werten der Patienten mit Oropharynxkarzinom wurde der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben verwendet.

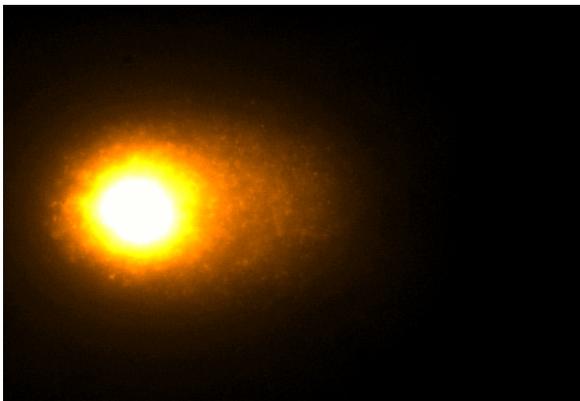
### **3.2 DNA-Schädigung an Interphasezellen**

Die von BPDE induzierten Strangbrüche an den Mukosazellen bilden im alkalischen Milieu einzelne DNA-Fragmente, die im elektrophoretischen Feld unterschiedliche Strecken in Richtung der Anode zurücklegen. Dieses Wanderungsverhalten ist abhängig vom molekularen Gewicht der Fragmente. Eine Vielzahl von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und DNA-Abschnitten inkompletter Exzisionsreparatur ergeben ein kometenförmiges Migrationsmuster. Im Kopf des Kometen finden sich dabei weitgehend intakte DNA-Bestandteile, im Schweif fragmentierte DNA.

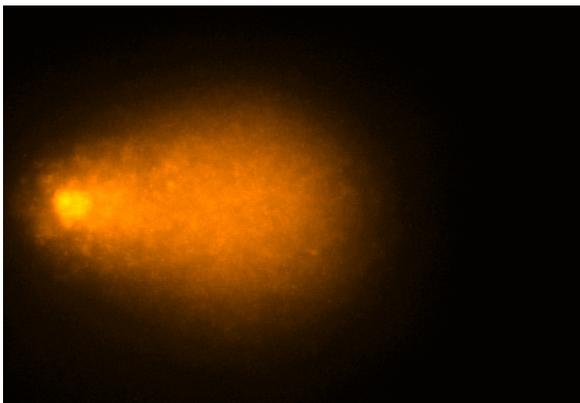
Dieses DNA-Wanderungsverhalten lässt sich für die gesamte DNA mittels Ethidiumbromid bzw. DAPI anfärben. Auch einzelne Chromosomen können mittels spezifischer DNA-Sonde markiert werden. Hier zeigt sich das gleiche Migrationsprinzip, einzig die Masse und damit die Intensität der gefärbten DNA ist deutlich geringer.



**Abb.12.:** DNA einer ungeschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet Assays und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid

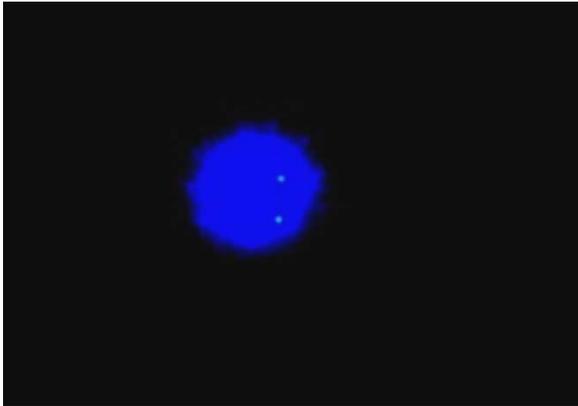


**Abb.13.:** DNA einer mittelgradig geschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet Assays und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid

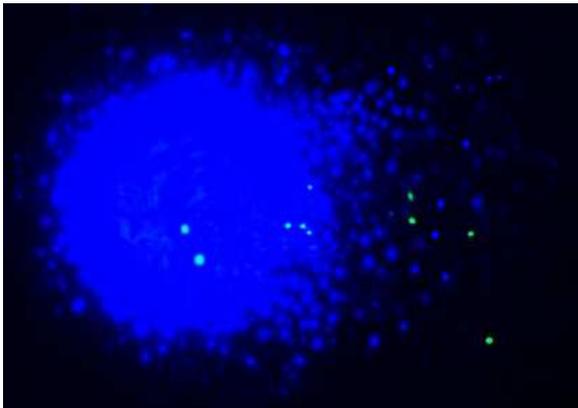


**Abb.14.:** DNA einer hochgradig geschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet Assays und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid

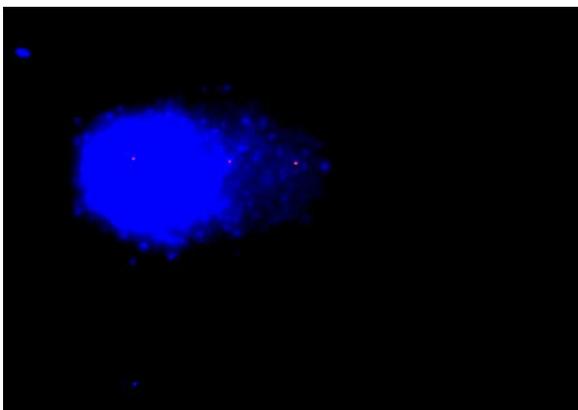
In der vorliegenden Arbeit wurden Schleimhautresektate von 29 Patienten mit Hilfe von Comet und Comet FISH untersucht. Unter ihnen waren 15 Tumorpatienten (12m; 3w) und 14 tumorfreie Patienten (13m;1w). Das Alter der Patienten reichte von 27 bis 73 Jahre und lag bei den Tumorpatienten im Mittel bei 56,0 Jahren, bei den Non-Tumorpatienten bei 48,7 Jahren. (Anamnesen der Spender siehe 2.1.3)



**Abb.15.:** DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Tumorpatienten nach Inkubation mit DMSO. Die Gesamt-DNA und Chromosom 3 (grün) weisen keine Schädigung auf.



**Abb.16.:** DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Tumorpatienten nach Inkubation mit BPDE. Die Gesamt-DNA (blau) und Chromosom 8 (grün) weisen Schädigung auf.



**Abb.17.:** DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Tumorpatienten nach Inkubation mit BPDE. Die Gesamt-DNA (blau) und Chromosom 5 (rot) weisen Schädigung auf.

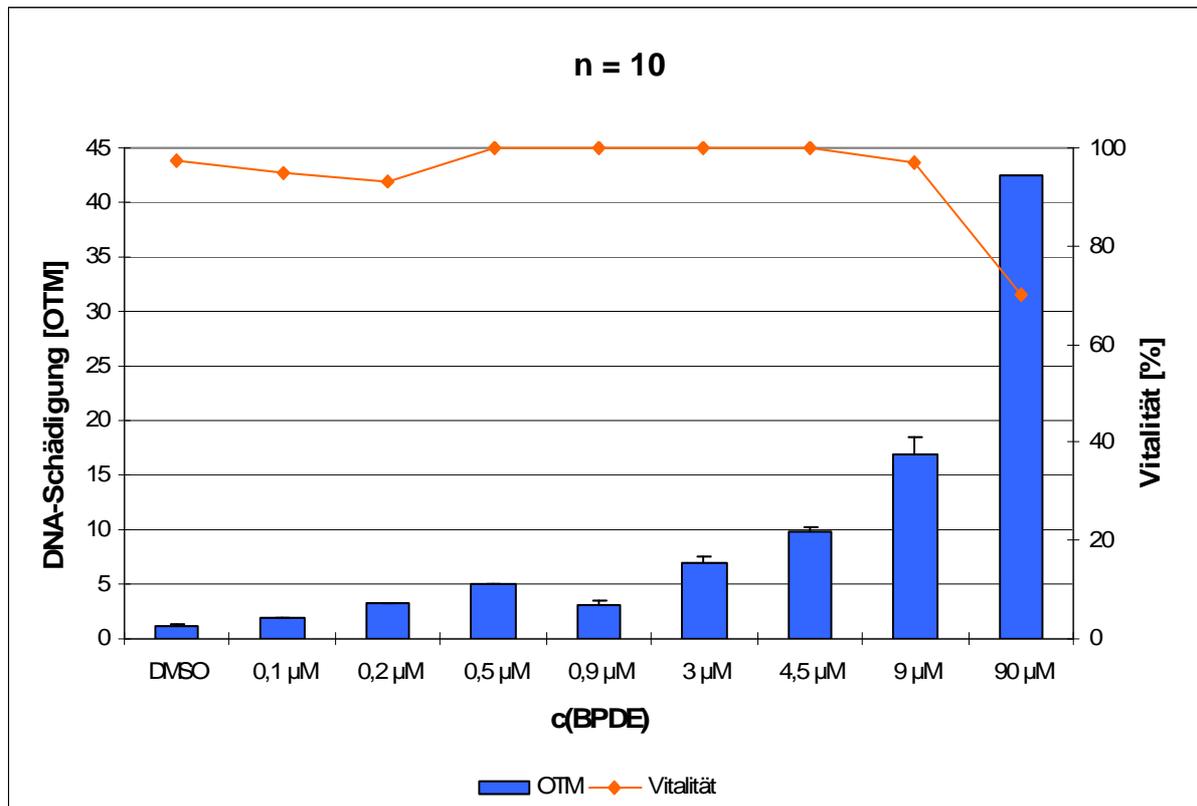
Schäden an der Gesamt-DNA wurden mit dem OTM beschrieben, chromosomale Schädigungen mit Hilfe des MCTM.

### **3.2.1 Kontrollexposition**

Als Negativkontrolle wurde den Schleimhautzellen DMSO in einer Konzentration von 166mM zugesetzt. Erwartungsgemäß konnte keine Schädigung der DNA festgestellt werden. Kontrollzellen wurden mit Hilfe der einfachen Mikrogel-Elektrophorese ausgewertet, auf eine Messung der chromosomalen Schädigung wurde verzichtet. (siehe 3.2.3)

### 3.2.2 Exposition mit BPDE

Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von BPDE wurden anhand folgender Dosiswirkungskurve (n=10) festgelegt:

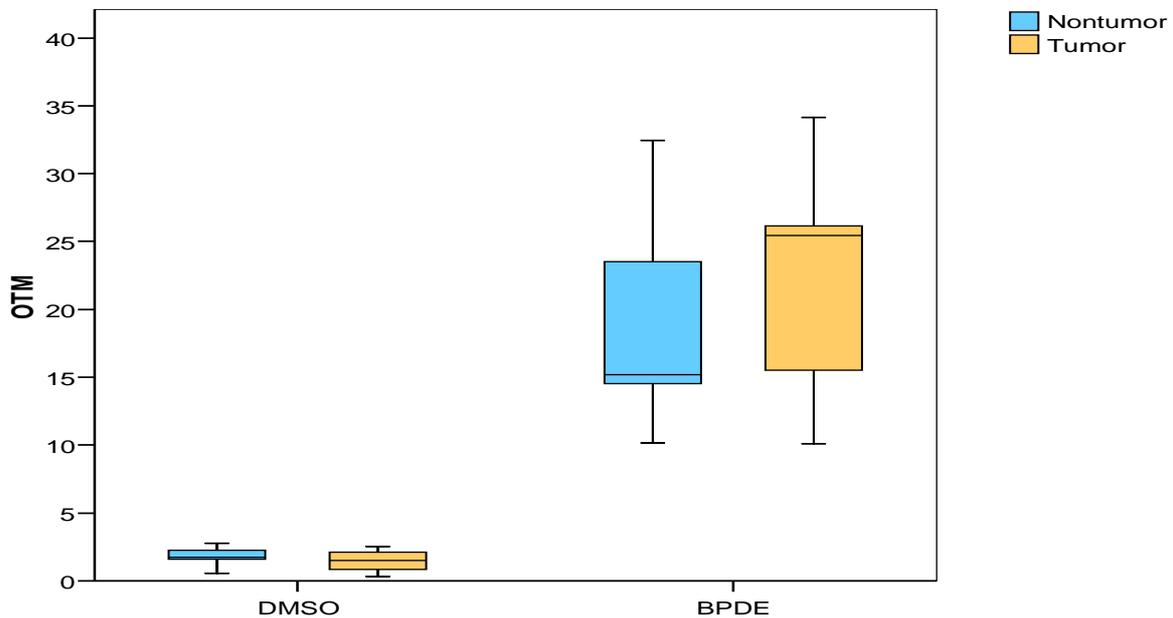


**Abb.18.:** Dosiswirkungskurve von BPDE (n=10)

DNA-Schädigung an oropharyngealen Schleimhautzellen durch BPDE (n=10, MW±SE)

Es wurden Konzentrationen gewählt, die zwar deutlich genotoxisch, gleichzeitig aber nicht zytotoxisch waren. Für die Versuche mit Comet/Comet-FISH und FISH wurde die Konzentration von 9 µM eingesetzt.

### 3.2.3 Schädigung der Gesamt-DNA der Schleimhautzellen



**Abb.19.:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei Tumor- bzw- tumorfreien Patienten. Vergleich der OTM-Werte nach Inkubation mit BPDE und Negativkontrolle DMSO (n=15 für Tumorpatienten, n=14 für Patienten ohne Oropharynxkarzinom)

BPDE verursachte sowohl bei Tumor-, als auch bei Non-Tumorpatienten signifikant höhere DNA Schäden als die Negativkontrolle DMSO. (Mittelwert des OTM-Non-TU: 1,81 bzw. 18,58; Mittelwert des OTM-TU: 1,46 bzw. 21,65) (vgl. Tab 14)

Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Patientenkollektiven konnte weder bei der Negativkontrolle DMSO, noch bei BPDE festgestellt werden. (vgl. Tab 15)

**Tab 14.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der Mittelwerte der DMSO- zu BPDE-Schädigung getrennt für Tumor bzw. tumorfreien Patienten

NON-TU DMSO / NON-TU BPDE	$p \leq 0,001$
TU DMSO / TU BPDE	$p \leq 0,001$

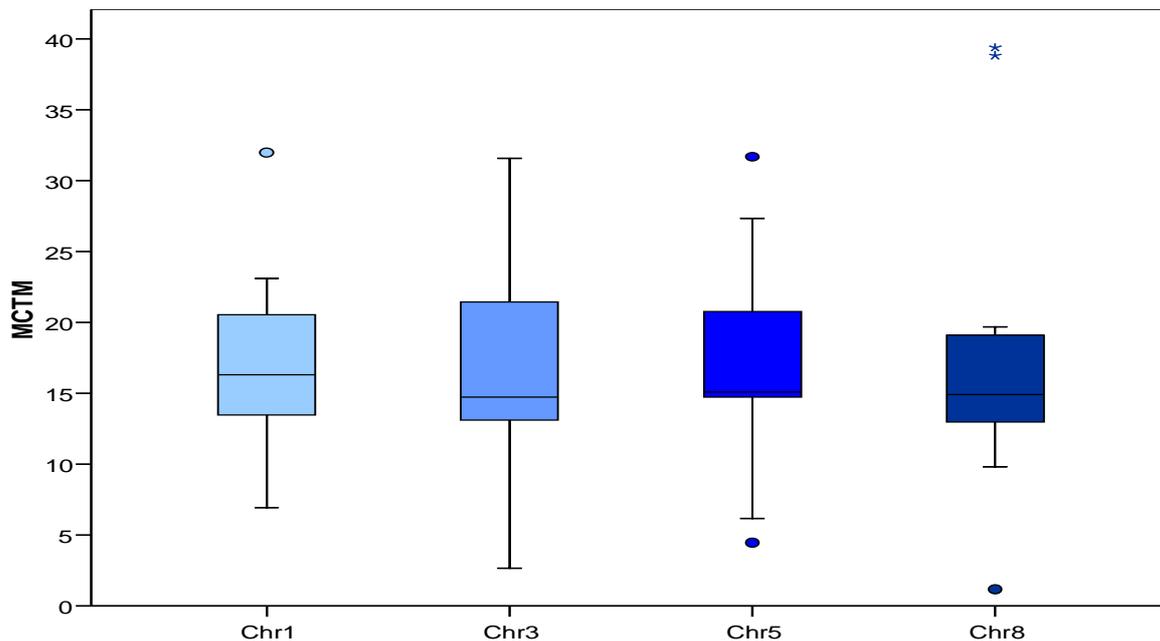
Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  definiert

**Tab 15.:** p-Werte im Mann-Whitney Test für den Vergleich der Mittelwerte der DMSO-Schädigung bei Tumor- / tumorfreien Patienten bzw. BPDE-Schädigung bei Tumor- / tumorfreien Patienten

NON-TU DMSO / TU DMSO	$p = 0,345$
NON-TU BPDE / TU BPDE	$p = 0,870$

Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  definiert

### 3.2.4 chromosomale Schädigung bei tumorfreien Patienten (Comet FISH)



**Abb.20.:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei Non-Tumorpatienten nach Inkubation mit BPDE. Vergleich der MCTM-Werte der Chromosomen 1,3,5 und 8. (n = 14)  
\* Ausreißerwert; ° Extremwert

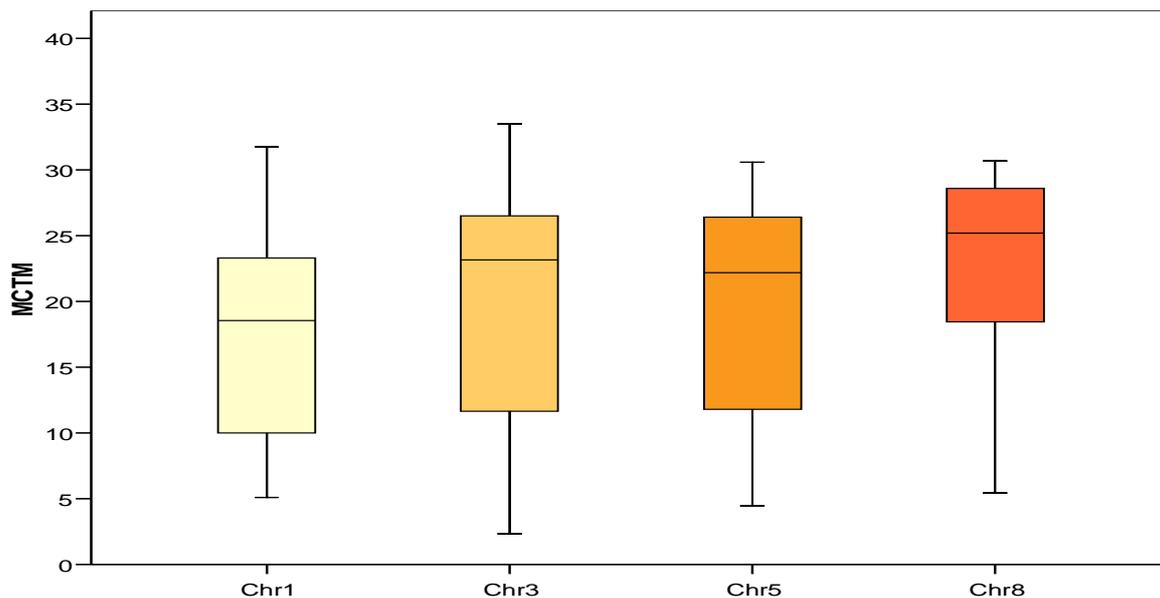
Das MCTM für die Chromosomen 1,3,5 und 8 ergab Mittelwerte von 16,86 (Chr1), 16,22 (Chr3), 16,64 (Chr5) und 17,37 (Chr8). Mittels Wilcoxon-Test wurde die Fragmentierung von Chromosom 1 mit der Schädigung der Chromosomen 3,5 und 8 verglichen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (vgl. Tab.16)

**Tab 16.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich Chromosom 1,3,5 und 8 bei tumorfreien Patienten (Chromosom 1 ist Vergleichschromosom)

Chromosom 1 / Chromosom 3	p = 0,609
Chromosom 1 / Chromosom 5	p = 0,865
Chromosom 1 / Chromosom 8	p = 0,173

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

### 3.2.5 chromosomale Schädigung bei Tumor-Patienten (Comet FISH)



**Abb.21.:** Ausmaß der DNA-Schädigung bei Tumorpatienten nach Inkubation mit BPDE. Vergleich der MCTM-Werte der Chromosomen 1,3,5 und 8. (n = 15)

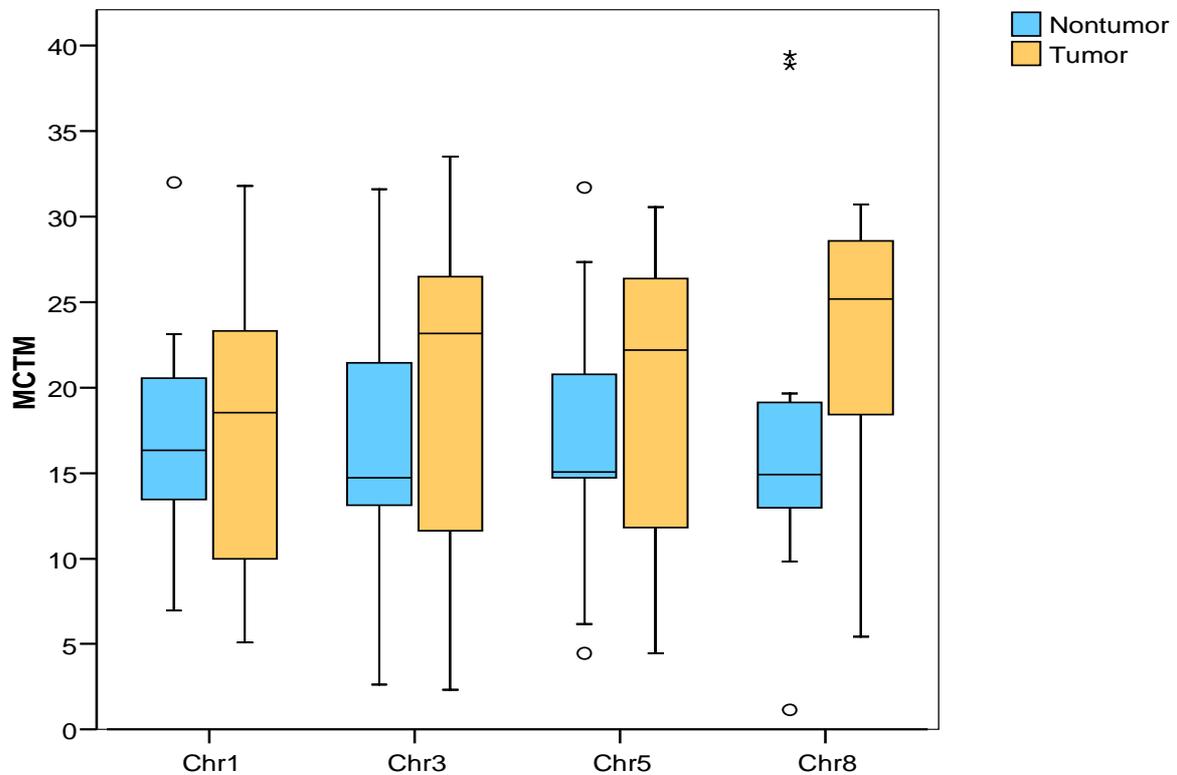
Das MCTM für die Chromosomen 1,3,5 und 8 ergab Mittelwerte von 16,83 (Chr1), 19,93 (Chr3), 19,26 (Chr5) und 22,34 (Chr8). Mittels Wilcoxon-Test wurde die Fragmentierung von Chromosom 1 mit der Schädigung der Chromosomen 3,5 und 8 verglichen. Ein signifikanter Unterschied konnte bei den Chromosomen 5 und 8, nicht aber bei Chromosom 3 gegenüber dem Vergleichschromosom 1 festgestellt werden. Die fehlende Signifikanz von Chromosom 3 ist Folge der relativ hohen Standardabweichung. Das MCTM ist allerdings vergleichbar mit Chromosom 5. (vgl. Tab.17)

**Tab 17.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich Chromosom 1,3,5 und 8 bei Tumorpatienten (Chromosom 1 ist Vergleichschromosom)

Chromosom 1 / Chromosom 3	p = 0,880
Chromosom 1 / Chromosom 5	p = 0,010
Chromosom 1 / Chromosom 8	p = 0,002

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

### 3.2.6 Vergleich Tumor- und tumorfreien Patienten



**Abb.22.:** Vergleich der DNA-Schädigung bei tumorfreien Patienten und Tumorpateinten nach Inkubation mit BPDE. Vergleich der MCTM-Werte der Chromosomen 1,3,5 und 8. (n=14 bzw. n=15)  
 ° Ausreißerwert; \* Extremwert

Das MCTM der Non-Tumorpateinten ergab Mittelwerte von 16,86 (Chr1), 16,22 (Chr3), 16,64 (Chr5) und 17,37 (Chr8). Bei Tumorpateinten wurden MCTM von 16,83 (Chr1), 19,93 (Chr3), 19,26 (Chr5) und 22,34 (Chr8) festgestellt. Im Vergleich der jeweiligen Chromosomen zwischen den beiden Patientengruppen mit Hilfe des Mann-Whitney Tests konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. (Tab.18)

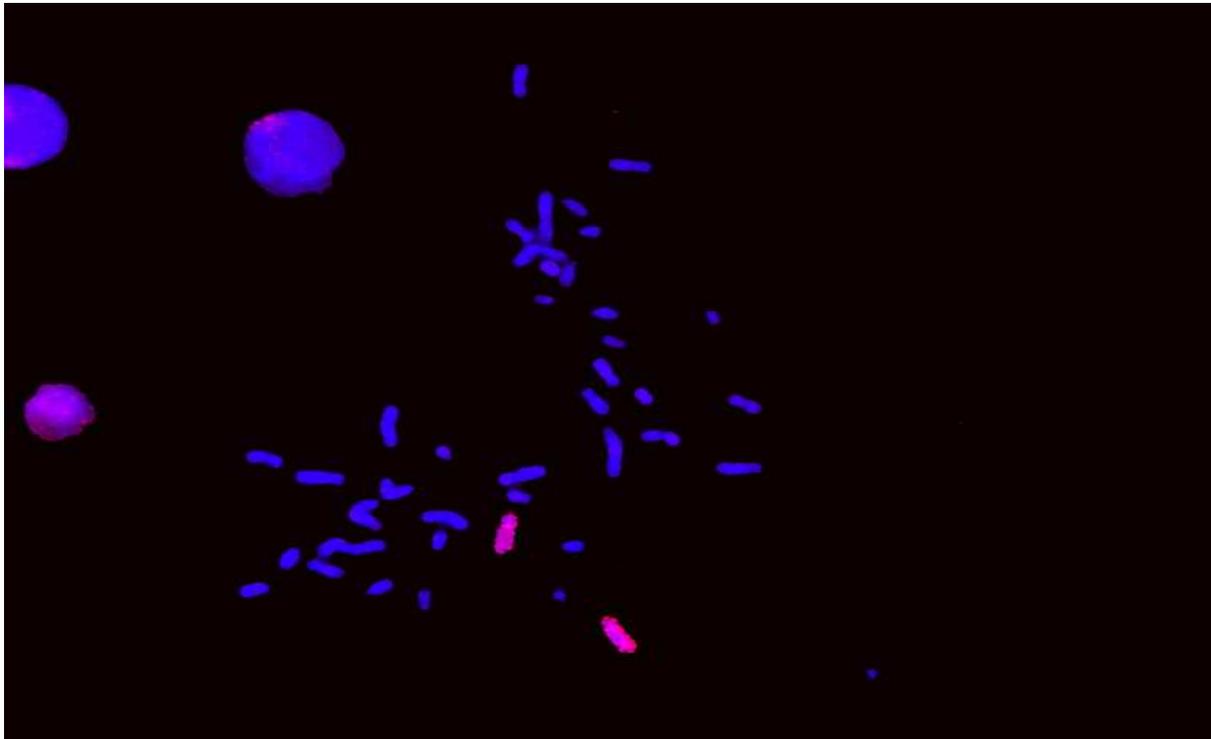
**Tab 18.:** p-Werte im Mann-Whitney Test für den Vergleich der Chromosomen 1,3,5 und 8 zwischen Tumorpateinten und Non-Tumorpateinten

Non-Tumor Chr 1 / Tumor Chr 1	p = 0,964
Non-Tumor Chr 3 / Tumor Chr 3	p = 0,310
Non-Tumor Chr 5 / Tumor Chr 5	p = 0,377
Non-Tumor Chr 8 / Tumor Chr 8	p = 0,112

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,013$

### 3.3 DNA-Schädigung an Metaphasezellen

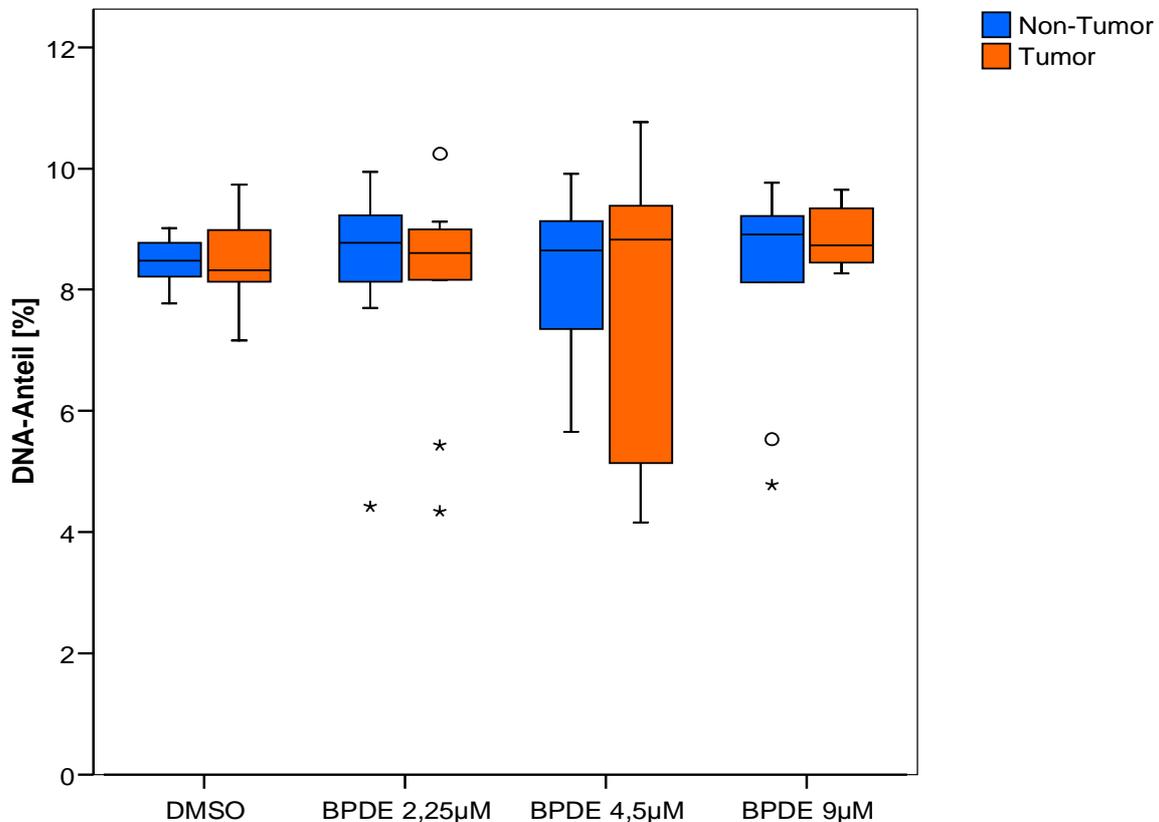
Die DNA-Menge der einzelnen Chromosomenpaare an der Gesamt-DNA beträgt beim gesunden Mann zwischen 8,3% (Chromosom 1) und 1,8% (Chromosom 21). Die Relation bei der Frau unterscheidet sich leicht aufgrund des größeren X-Chromosoms im Vergleich zum Y-Chromosom (Stephens et al., 1990). Mit Hilfe von FISH können Metaphasechromosomen speziell markiert und untersucht werden. Änderungen im Verhältnis der DNA-Anteile nach Inkubation mit BPDE sprechen für Deletionen bzw. Amplifikationen auf den jeweiligen Chromosomen und lassen u.U. auf sensible Genloci rückschließen.



**Abb.23.:** Metaphasenpräparation an Lymphozyten, rot dargestellt ist Chromosom 1

In der vorliegenden Arbeit wurden Lymphozyten von 20 männlichen Patienten mit Hilfe von FISH untersucht. Das Kollektiv teilte sich zu gleichen Teilen in Tumor- und tumorfreie Patienten auf. Das Alter der Patienten reichte von 25 bis 62 Jahre und lag bei den Tumorpatienten im Mittel bei 50,3 Jahren, bei den Non-Tumorpatienten bei 40,1 Jahren. (Anamnesen der Spender siehe 2.1.3)

### 3.3.1 Metaphasechromosomenanalyse an Lymphozyten (Chr1)



**Abb.24.:**

DNA-Schädigung bei Tumorpatienten und tumorfreien Patienten nach Inkubation mit BPDE/DMSO. Vergleich des DNA-Anteils an der Gesamt-DNA des Chromosoms 1. (n=10)

° Ausreißerwert; \* Extremwert

Der mittlere Anteil von Chromosom 1 an der Gesamt-DNA ergab Mittelwerte zwischen 7,88% und 8,91%. In keinem der beiden Kollektive konnten mittels Wilcoxon-Test signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen BPDE-Konzentrationen zur Negativkontrolle DMSO festgestellt werden. Auch der Vergleich von Tumor- zu tumorfreier Gruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ergab keine signifikanten Unterschiede. (vgl.Tab. 20-22)

**Tab 20.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung bei tumorfreien Patienten (Chr1)

NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 2,25µM	p = 0,541
NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 4,5µM	p = 0,508
NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 9µM	p = 0,799

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

**Tab 21.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung bei Tumor-Patienten (Chr1)

TU DMSO / TU BPDE 2,25µM	p = 0,721
TU DMSO / TU BPDE 4,5µM	p = 0,799
TU DMSO / TU BPDE 9µM	p = 0,139

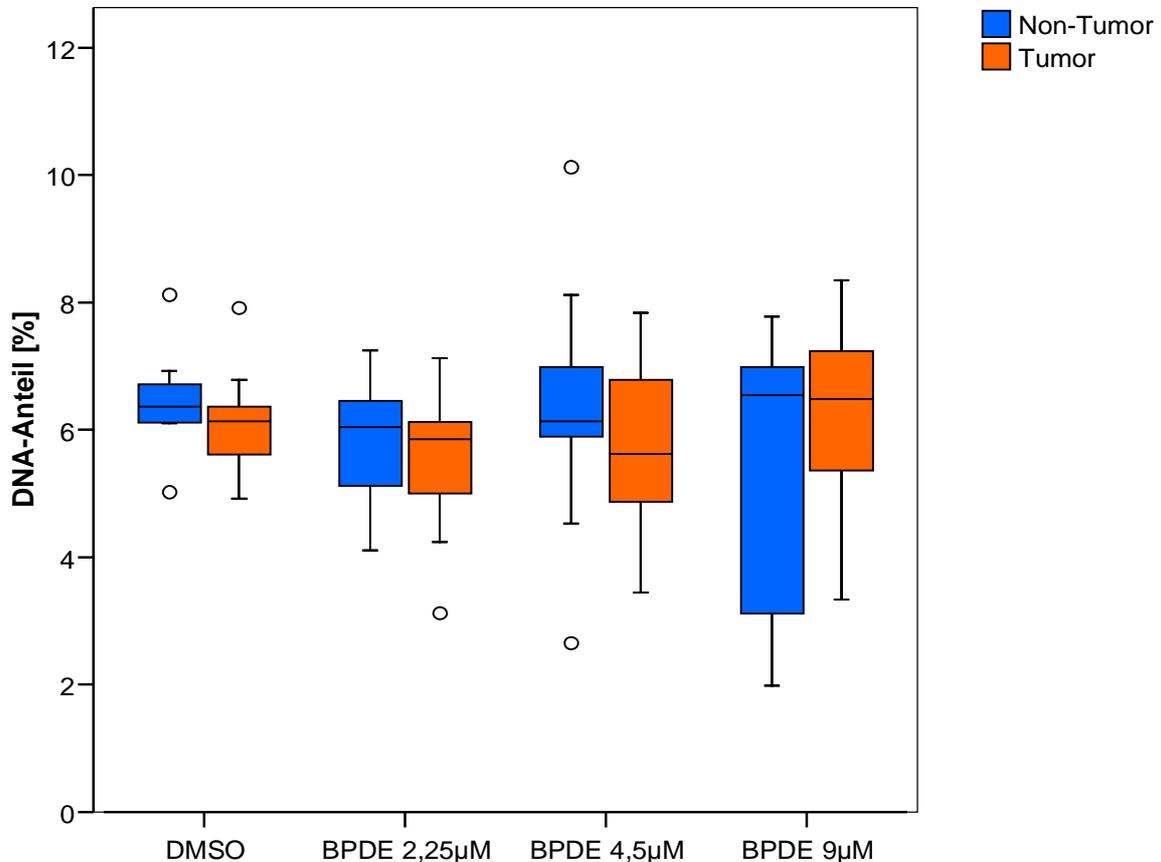
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

**Tab 22.:** p-Werte im Mann-Whitney Test für den Vergleich DMSO-Schädigung bei Tumor- / tumorfreien Patienten bzw. BPDE-Schädigung bei Tumor- / tumorfreien Patienten (Chr1)

NON-TU DMSO / TU DMSO	p = 0,796
NON-TU BPDE2,25µM / TU BPDE2,25µM	p = 0,739
NON-TU BPDE4,5µM / TU BPDE4,5µM	p = 0,971
NON-TU BPDE9µM / TU BPDE9µM	p = 0,739

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,013$

### 3.3.2 Metaphasechromosomenanalyse an Lymphozyten (Chr3)



**Abb.25.:**

DNA-Schädigung bei tumorfreien Patienten und Tumorpatienten nach Inkubation mit BPDE/DMSO. Vergleich des DNA-Anteils an der Gesamt-DNA des Chromosoms 3. (n = 10)

° Ausreißerwert; \* Extremwert

Der mittlere Anteil von Chromosom 3 an der Gesamt-DNA ergab Mittelwerte zwischen 5,57% und 6,43%. In keinem der beiden Kollektive konnten mittels Wilcoxon-Test signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen BPDE-Konzentrationen zur Negativkontrolle DMSO festgestellt werden. Auch der Vergleich zwischen Tumor- und tumorfreier Gruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ergab keine signifikanten Unterschiede. (Tab.23-25)

**Tab 23.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung bei tumorfreien Patienten (Chr3)

NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 2,25µM	p = 0,241
NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 4,5µM	p = 0,646
NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 9µM	p = 0,386

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

**Tab 24.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung bei Tumor-Patienten (Chr3)

TU DMSO / TU BPDE 2,25µM	p = 0,386
TU DMSO / TU BPDE 4,5µM	p = 0,241
TU DMSO / TU BPDE 9µM	p = 0,838

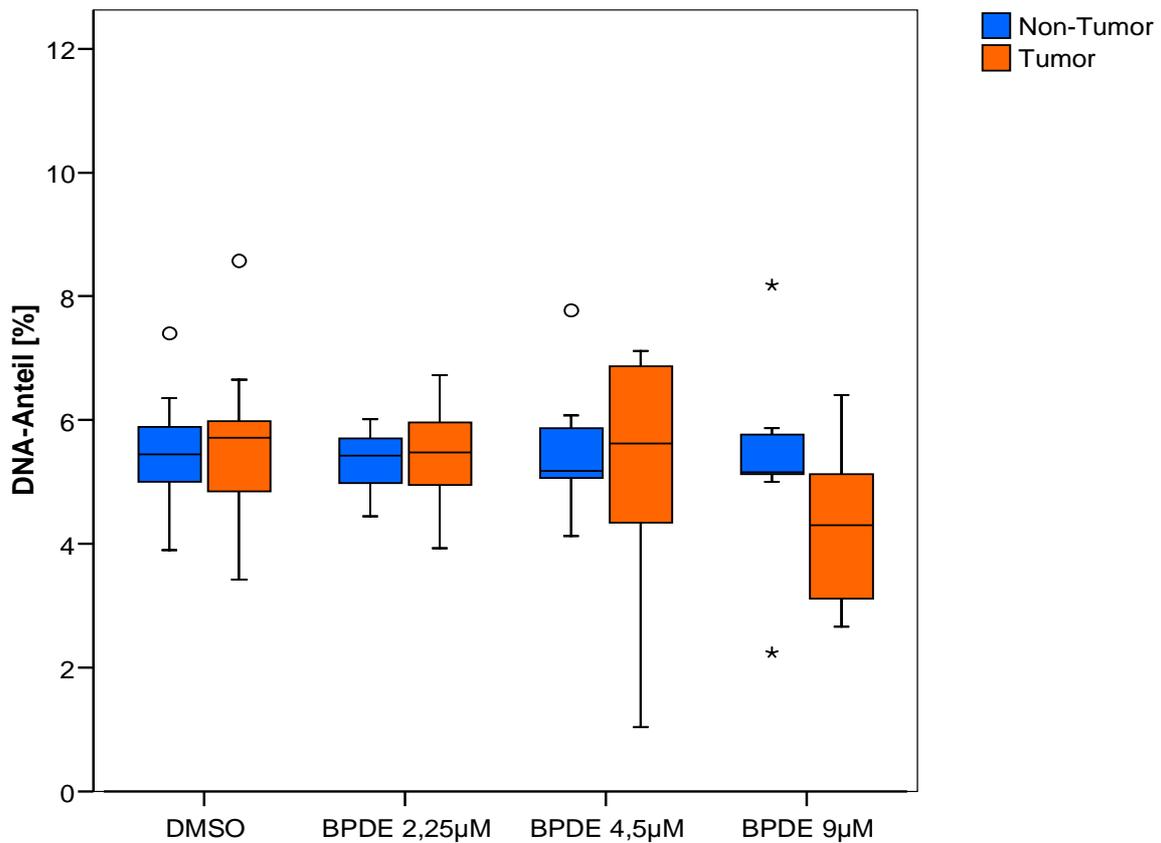
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

**Tab 25.:** p-Werte im Mann-Whitney Test für den Vergleich DMSO-Schädigung bei Tumor- / tumorfreien Patienten bzw. BPDE-Schädigung bei Tumor- / tumorfreien Patienten (Chr3)

NON-TU DMSO / TU DMSO	p = 0,315
NON-TU BPDE2,25µM / TU BPDE2,25µM	p = 0,631
NON-TU BPDE4,5µM / TU BPDE4,5µM	p = 0,529
NON-TU BPDE9µM / TU BPDE9µM	p = 0,481

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,013$

### 3.3.3 Metaphasechromosomenanalyse an Lymphozyten (Chr5)



**Abb.26.:**

DNA-Schädigung bei tumorfreien Patienten und Tumorpatienten nach Inkubation mit BPDE/DMSO. Vergleich des DNA-Anteils an der Gesamt-DNA des Chromosoms 5. (n =10)

° Ausreißerwert; \* Extremwert

Der mittlere Anteil von Chromosom 5 an der Gesamt-DNA ergab Mittelwerte zwischen 4,27% und 5,63%. In keinem der beiden Kollektive konnten mittels Wilcoxon-Test signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen BPDE-Konzentrationen zur Negativkontrolle DMSO festgestellt werden. Auch der Vergleich von Tumor- zu tumorfreier Gruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ergab keine signifikanten Unterschiede. (vgl. Tab.26-28)

**Tab 26.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung bei Non-Tumor-Patienten (Chr5)

NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 2,25µM	p = 0,721
NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 4,5µM	p = 0,799
NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 9µM	p = 0,646

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

**Tab 27.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung bei Tumor-Patienten (Chr5)

TU DMSO / TU BPDE 2,25µM	p = 0,646
TU DMSO / TU BPDE 4,5µM	p = 0,575
TU DMSO / TU BPDE 9µM	p = 0,037

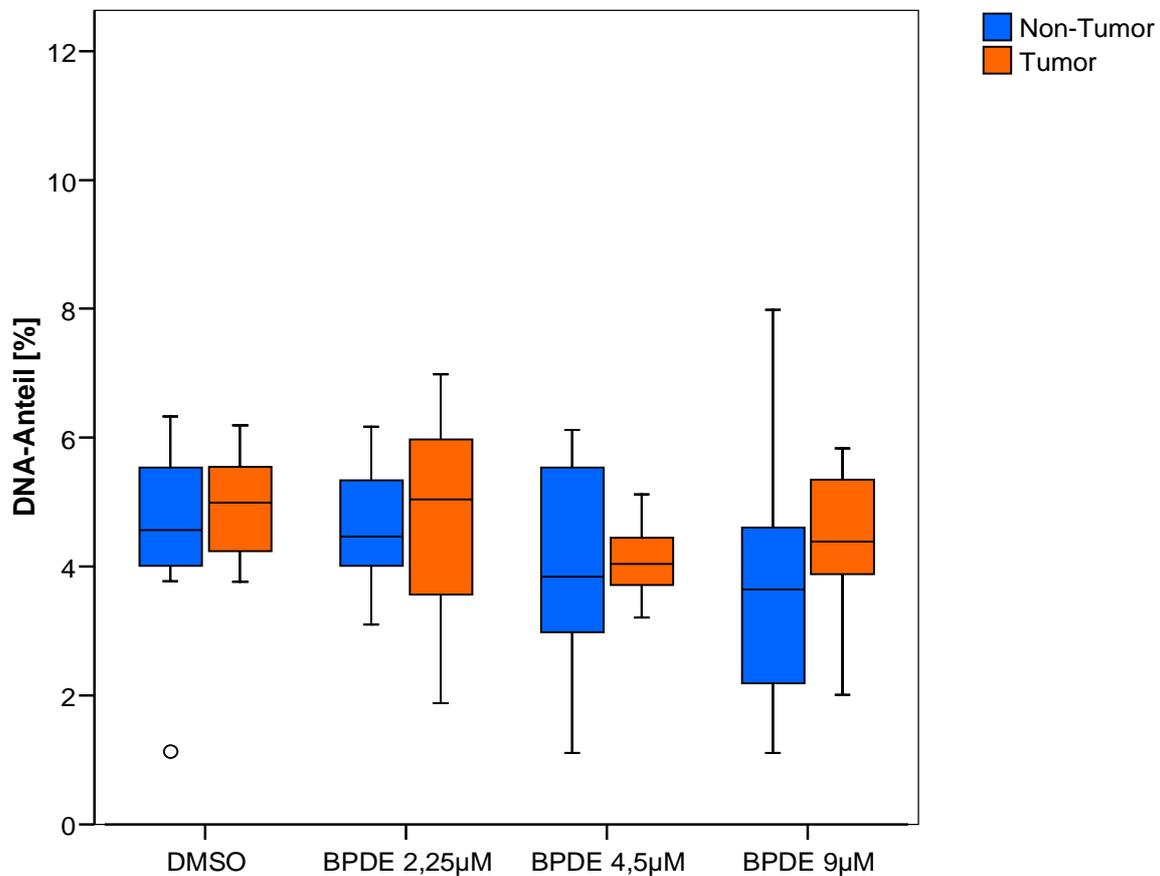
Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

**Tab 28.:** p-Werte im Mann-Whitney Test für den Vergleich DMSO-Schädigung bei Tumor / Nontumorpatienten bzw. BPDE-Schädigung bei Tumor / Nontumorpatienten (Chr5)

NON-TU DMSO / TU DMSO	p = 0,684
NON-TU BPDE2,25µM / TU BPDE2,25µM	p = 0,853
NON-TU BPDE4,5µM / TU BPDE4,5µM	p = 0,912
NON-TU BPDE9µM / TU BPDE9µM	p = 0,035

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,013$

### 3.3.4 Metaphasechromosomenanalyse an Lymphozyten (Chr8)



**Abb.27.:**

DNA-Schädigung tumorfreien Patienten und Tumorpatienten nach Inkubation mit BPDE/DMSO. Vergleich des DNA-Anteils an der Gesamt-DNA des Chromosoms 8. (n = 10)  
 ° Ausreißerwert

Der mittlere Anteil von Chromosom 8 an der Gesamt-DNA ergab Werte zwischen 4,11% und 4,96%. In keinem der beiden Kollektive konnte mittels Wilcoxon-Test signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen BPDE-Konzentrationen zur Negativkontrolle DMSO festgestellt werden. Auch der Vergleich von Tumor zu Non-Tumorgruppe mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests ergab keine signifikanten Unterschiede. (vgl.Tab 29-31)

**Tab 29.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung bei tumorfreien Patienten (Chr8)

NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 2,25µM	p = 0,959
NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 4,5µM	p = 0,285
NON-TU DMSO / NON-TU BPDE 9µM	p = 0,333

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

**Tab 30.:** p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung bei Tumor-Patienten (Chr8)

TU DMSO / TU BPDE 2,25µM	p = 0,878
TU DMSO / TU BPDE 4,5µM	p = 0,059
TU DMSO / TU BPDE 9µM	p = 0,308

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,017$

**Tab 31.:** p-Werte im Mann-Whitney Test für den Vergleich DMSO-Schädigung bei Tumor / Nontumorpatienten bzw. BPDE-Schädigung bei Tumor / Nontumorpatienten (Chr8)

NON-TU DMSO / TU DMSO	p = 0,631
NON-TU BPDE2,25µM / TU BPDE2,25µM	p = 0,796
NON-TU BPDE4,5µM / TU BPDE4,5µM	p = 0,739
NON-TU BPDE9µM / TU BPDE9µM	p = 0,529

Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur:  $p \leq 0,013$

## **4 Diskussion**

### **4.1 Auswahl der Patienten**

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

#### **4.1.1 Patienten als Spender von Schleimhaut des Oropharynx**

Schleimhautzellen des Oropharynx konnten aus schmalen Gewebestreifen gewonnen werden, die nach Tonsillektomien der Gaumenmandel operationsbedingt randständig anliegen. Diese Tonsillektomien wurden aufgrund chronisch rezidivierender Infektionen der Mandeln bzw. im Zusammenhang mit Hyperplasien der Tonsillen bei Schlafstörungen durchgeführt. Einerseits können entzündungsbedingte Veränderungen des Gewebes nicht vollständig vermieden werden, andererseits werden solche Eingriffe möglichst im infektfreien Intervall durchgeführt.

Die Patienten mit oropharyngealen Karzinomen wiesen unterschiedliche Schweregrade und Stadien der Erkrankung auf. Aufgrund der Zentrumsfunktion der Ludwig-Maximilians-Universität für solche Erkrankungen entsteht ein vergleichsweise hohes Aufkommen der zu behandelnden Fälle. Es handelte sich in dieser Arbeit ausnahmslos um erstdiagnostizierte Fälle, ohne vorausgegangene Radio- oder Chemotherapie.

#### **4.1.2 Patienten als Spender von Lymphozyten**

Die verwendeten Lymphozyten entstammten peripherem Vollblut. Die Blutspender wiesen zusätzlich zu ihrer Grunderkrankung keine chronischen Infektionserkrankungen oder systemische Erkrankungen auf.

## 4.2 DNA-Schäden durch Benz[a]pyren- 7,8-diol-epoxid

PAH kommen in der Luft an Feinstaubpartikel gebunden vor und werden durch Inhalation und Ingestion in den Körper aufgenommen. Hierbei ist die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes das erste Kontaktorgan für die Karzinogenese. PAH finden sich bevorzugt in Tabakrauch und zählen damit zu den bedeutendsten Kanzerogenen für den Menschen (Akin et al., 1976; DeMarini, 2004). Das Benzo[a]pyren (BaP) ist einer der wichtigsten Repräsentanten dieser Gruppe und ist als 2A-Kanzerogen eingestuft (Smith et al., 2001), d.h. wahrscheinlich krebserzeugend bei Menschen. BaP wird mittels Phase-1-Enzymen, wie den Cytochrom P450-abhängigen Peroxidasen, zu Benzo[a]pyren 7,8-diol,-9,10-epoxid (BPDE), dem eigentlichen, die DNA schädigenden Agens umgewandelt. Als ultimatives Karzinogen verursacht BPDE Adduktbildungen mit möglicherweise daraus resultierenden Mutationen während der DNA-Replikation und der Induktion von Strangbrüchen der DNA (Liang et al., 2003; Xie et al., 2003).

Ein erhöhtes Risiko für die Krebsentstehung bei Ingestion von BPDE wiesen Culp und Beland 1994 an Mäusen nach (Culp and Beland, 1994; Culp and Beland, 1994). Genotoxische und mutagene Effekte sind auch an humanen Zellsystemen untersucht (Conney et al., 1994). An humanen Lymphozyten konnte eine Assoziation von BPDE mit einer Erhöhung des Lungenkrebsrisikos beschrieben werden (Wei et al., 1996). Bei Untersuchungen an humanen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass BPDE nach Kurzzeitbehandlung DNA-Addukte und Einzelstrangbrüche hervorruft. Hier führte BPDE zu einem konzentrationsabhängigen Ansteigen der DNA-Migration im Comet Assay (Hanelt et al., 1997). Auch an humanen Miniorgankulturen von Nasenschleimhaut konnten nach Inkubation signifikante DNA-Schäden beobachtet werden (Wallner et al., 2005).

### **4.3 Diskussion der statistischen Auswertung**

Die Wahl des statistischen Testverfahrens wurde mit Dr. Dirschedl und Prof. Hölzel vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) abgestimmt. Zwei Testverfahren wurden ausgewählt, zum einen der Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben, zum anderen der Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben. Eine nicht-parametrische Varianzanalyse kam für die statistische Auswertung nicht in Frage, da jeweils nur ein Vergleichswert (z.B. Chromosom 1) als Referenz herangezogen wurde und nicht unterschiedlichen Werten gegenübergestellt wurde. Aufgrund der multiplen Testung innerhalb der Gruppen wurde zur Absicherung des Signifikanzniveaus der einzelnen Tests nach dem Bonferroni-Verfahren korrigiert. Hierbei wird das ursprüngliche Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  durch die Anzahl der Tests innerhalb der Gruppen dividiert.

## Diskussion der Methodik

### 4.3.1 Comet FISH

Die Methoden Comet Assay und Fluoreszenz in situ Hybridisierung wurden erstmals in der vorliegenden Arbeit basierend auf Vorarbeiten an Lymphozyten (McKelvey-Martin et al., 1997; Singh et al., 1988) an humanen Mukosazellen des Oropharynx in Kombination eingesetzt.

Gesunde Zellen profitieren von einem ausgewogenen Verhältnis von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen. Onkogene können durch die Bildung von DNA-Addukten, chromosomalen Transformationen oder Inversionen ausgelöst werden (Copper et al., 1995; Santos et al., 1997). Im Gegensatz dazu erfolgt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch DNA-Reduzierung, beispielsweise durch den Verlust eines Allels. Zur Lokalisierung dieser Veränderungen wurde in der vorliegenden Arbeit Comet FISH verwendet. In der Vergangenheit konnte Comet-FISH an Lymphozyten für die Markierung von p53 eingesetzt werden (McKelvey-Martin et al., 1998). Andere Gruppen untersuchten Ultrastrukturen von Lymphozytenkernen während der Interphase (Santos et al., 1997). Auch das Verhalten von Schleimhautzellen des Kolons zur Bestimmung endogener Risikofaktoren bei der Karzinogenese wurde bestimmt (Schaeferhenrich et al., 2003). Menke et al. konnten an Pflanzenzellen mit der Methodenkombination den Stellenwert verschiedener chromosomaler Domänen bei der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch mutagene Substanzen nachweisen (Menke et al., 2000).

### 4.3.2 FISH

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung stellt eine geeignete Methode zur Aufdeckung chromosomaler Alterationen dar (Obe et al., 2002). Im Gegensatz zum Comet FISH, einer Methode, bei der die Interphase-DNA untersucht wird, können bei FISH strukturelle DNA-Veränderungen in der Metaphase, wie z.B. Inversionen, Deletionen und Transformationen analysiert werden. Im Unterschied zur klassischen zytogenetischen Analytik liegen die Vorteile bei FISH in höherer Schnelligkeit, Sensitivität und Spezifität (Jain, 2004).

Erste in situ Hybridisationen wurden bereits in den späten 60er Jahren mit radioaktiv markierter DNA durchgeführt (Pardue and Gall, 1969), bevor im Jahre 1986 Pinkel et al. erstmals einen fluoreszierenden Farbstoff anstelle eines Radionuklids einsetzten (Pinkel et al., 1986). Anwendungsbereiche von FISH umfassen heutzutage die Diagnostik viraler Infektionen (Ohshima et al., 2002), aber auch zytogenetische Untersuchungen. Hierbei stehen vor allem die pränatale Diagnostik (Ogilvie, 2003), die Präimplantationsdiagnostik (Sermon et al., 2004), aber auch die Aufdeckung hereditärer Gendefekte bei Kindern im Mittelpunkt (Stefanou et al., 2002). Onkologische Anwendungsgebiete von Comet-FISH/FISH sind vielfältig, da beinahe sämtliche Genloci, die in Verdacht stehen in der Karzinogenese eine wichtige Rolle zu spielen, bis zu einer minimalen Größe von 1kB angefärbt werden können (Teixeira, 2002).

#### 4.4 Auswahl der Chromosomen

In dieser Arbeit standen die Vorarbeiten verschiedener Arbeitsgruppen im Vordergrund, die auf Veränderungen der Chromosomen 3,5 und 8 bei der Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt hinwiesen (Bockmühl, 2000;El Naggar et al., 1995;Götte et al., 2005). Insbesondere die Allele 3q21-29, 3p14.2, 3p25, 5q21, 5p15.33, (Bockmühl, 2000;Chakraborty et al., 2003;Nunn et al., 1999;Speicher et al., 1995) und 8p21-23 (Coon et al., 2004) spielen übergeordnete Rollen in der Karzinogenese des Oropharynx.

So gehören sogenannte heterozygote Deletionen (loss of heterozygosity = LOH) im Bereich von 3p zu den häufigsten Ereignissen, die in Tumorzelllinien von Kopf-Hals Karzinomen bisher nachgewiesen werden konnten (Lydiatt et al., 1994;Schantz et al., 2000). Man konnte diesen Verlust von DNA auf die Regionen 3p14.2 und 3p25 eingrenzen, die für die Tumorsuppressorgene FHIT (fragile-histidine-triad) bzw. VHL (von-Hippel-Lindau) kodieren (Martinez et al., 2001;Ong et al., 1997). Die Auswirkung von VHL auf die Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt ist nach heutigem Stand der Forschungen allerdings umstritten (Li et al., 1994;Waber et al., 1996). Eine verminderte oder gar fehlende Aktivität von FHIT dagegen geht mit einer signifikanten Risikoerhöhung für die Entwicklung von Plattenepitheltumoren im Kopf-Halsbereich einher (Götte et al., 2000;Mao et al., 1996;Virgilio et al., 1996). Die reduzierte Expression von FHIT scheint nicht nur in der Frühphase von Kopf-Hals-Karzinomen eine Rolle zu spielen (Mineta et al., 2003), sondern kann auch als aussagefähiger Prognosefaktor für den Krankheitsverlauf herangezogen werden (Pavelic et al., 2001). Allerdings lassen Korrelationen zwischen der Inaktivierung von FHIT und der hohen Rate an heterozygoten Deletionen im Allel 3p auf weitere Tumorsuppressorgene schliessen, die in diesem Bereich lokalisiert sind (Götte et al., 2000). So spielt z.B. RASSF1, ein Tumorsuppressorgen im Allel 3p21.3 eine entscheidende Rolle in der Steuerung der Zellproliferation (Hogg et al., 2002). Eine Inaktivierung dieses Genabschnitts führt zu einer gesteigerten Proliferation der Zelle und gleichzeitiger verminderter Stimulation der Zellapoptose (Crespo and Leon, 2000).

Auch am langen Arm des Chromosoms 3 treten Veränderungen auf, die für die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich von Bedeutung sein können. Im Gegensatz zu 3p steht hier allerdings die Amplifikation von DNA im Vordergrund (Riazimand et al., 2002; Singh et al., 2001). Vor allem im Bereich 3p26.3-28 konnten in bis zu 91% der untersuchten Tumorchromosomen eine Vervielfachung der Allele festgestellt werden (Hashimoto et al., 2001). Zwei Onkogene scheinen hier eine übergeordnete Bedeutung zu haben. Einerseits PIK3CA (Phosphatidylinositol-3-Kinase, catalytic, alpha-polypeptide), einem Onkogen, das bisher v.a. bei der Brustkrebskarzinogenese Beachtung fand (Redon et al., 2001). Zum anderen p63, einem Gen, das zur Familie der p53 Gene zählt und auch in Kombination mit diesem Tumorsuppressorgen wirkt. Seine letztliche Funktion ist zwar bis heute ungeklärt, der Beitrag zur Regulation der Zellproliferation gilt aber als gesichert (Yamaguchi et al., 2000).

Genau wie das Chromosom 3 stellt auch das Chromosom 5 einen mutagensensitiven Genlokus dar (Ah-See et al., 1994). Herterozygote Deletionen finden sich vor allem auf dem Allel 5q21 (Nunn et al., 1999; Rybicki et al., 2003). Interessanterweise befindet sich in dieser Lokalisation das APC-Gen (familiäre adenomatöse Polyposis coli), das in der Entstehung von Kolonkarzinomen eine herausragende Rolle spielt (Bodmer et al., 1989). Eine eindeutige Zuordnung zur Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich bleibt aber noch abzuwarten (Mancini et al., 2003).

Auch Amplifikation von DNA findet sich im Chromosom 5, v.a. in seinem kurzen Arm (Jin et al., 2002). So weisen neue Untersuchungen auf eine DNA-Vermehrung im Lokus 5p13.33 hin (Squire et al., 2002). Dieses Allel kodiert für hTERT (human telomerase reverse transcriptase), einer katalytischen Komponente der Telomerase, die mit der Tumorinduktion im oberen Aerodigestivtrakt in Verbindung gebracht wird (Bryce et al., 2000). In verschiedenen Tumorzelllinien konnte eine Überexpression von Telomerase, beruhend auf einer Veränderung im Lokus 5.13.33 nachgewiesen werden (Nguyen et al., 2003).

Für die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich ist auch der kurze Arm des Chromosoms 8 mitverantwortlich (Wu et al., 1997). Mutagensensitive Areale befinden sich auf den Allelen 8p21, 8p22 und 8p23.3 (Ishwad et al., 1999; Sunwoo et al., 1999). Untersuchungen deuten auf mehrere Tumorsuppressorgene hin, die sich in

diesen Regionen befinden, allerdings häufig noch nicht genauer definiert sind (Jin et al., 2001; Sun et al., 1999). Einem Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Familie, dem sogenannten KILLER/DR5-Gen, wird eine Rolle in der Tumorentstehung des Oropharynx zugesprochen. Durch verminderte Expression kommt es zur Abnahme der Apoptoserate im Gewebe und steigender Proliferation (Pai et al., 1998). Unumstritten führen Veränderungen in den genannten Bereich des Genoms bei Tumorpatienten zu einer schlechten Prognose der Erkrankung (Bockmühl et al., 2001; Coon et al., 2004).

Zusätzlich zu den in dieser Arbeit gewählten Chromosomen spielen eine Reihe weiterer Chromosomen in der Karzinogenese des Oropharynx eine Rolle. Aktuelle Ergebnisse deuten auch auf Chromosom 11 als empfindlichen Genlokus. Ebenso wird den Chromosomen 9 und 17 Bedeutung in diesem Zusammenhang zugeschrieben (Coon et al., 2004; Wolf et al., 2004).

Als Negativkontrolle zu den Chromosomen 3,5 und 8 wurde in dieser Arbeit das Chromosom 1 herangezogen. Für dieses Vergleichschromosom sprach in erster Linie, dass in der gängigen Literatur keine Beteiligung des Chromosoms 1 an der Karzinogenese im Oropharynx beschrieben ist und es sich bei diesem Chromosom um das größte im menschlichen Genom handelt.

## **4.5 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.5.1 Chromosomale Alterationen bei Interphasezellen**

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von Schleimhautproben des Oropharynx von Tumor- und Non-Tumorpatienten mit Hilfe von Comet-FISH untersucht. Die DNA-Fragmentierung der Gesamt-DNA durch BPDE war in beiden Spendergruppen vergleichbar (siehe Abb.19). Es wurden damit bereits bestehende Ergebnisse bestätigt (Kleinsässer et al., 2001). Im Vergleich zum Chromosom 1 ergab sich bei den Non-Tumorpatienten keine signifikant erhöhte Strangbruchrate bei den Chromosomen 3,5 und 8 (siehe Abb.20). Somit wurden bei tumorfreien Patienten keine empfindlichen Genloci auf den Testchromosomen aufgezeigt.

Bei Tumor-Patienten konnte dagegen bei den Chromosomen 5 und 8 eine erhöhte Schädigung nachgewiesen werden (Abb.21). Sensitive Genloci sind bei Tumorzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs bereits für diese Chromosomen beschrieben (Bryce et al., 2000; Mancini et al., 2003; Wu et al., 1997), so dass eine erhöhte DNA-Frakturierung in diesen Arealen in makroskopisch gesunder Schleimhaut plausibel erscheint. Da die vorliegenden Ergebnisse an makroskopisch tumorfreiem Material erzielt wurden, kann vermutet werden, dass DNA-Veränderungen in diesen Chromosomen bereits in der Frühphase der Karzinogenese eine entscheidende Rolle spielen. Möglicherweise sind Veränderungen im Bereich der Chromosomen 5 und 8 Ursache und weniger Folge der Tumorentstehung des oberen Aerodigestivtrakts. Bei Chromosom 3 zeigte sich zwar eine höhere Strangbruchrate als bei Chromosom 1, statistisch signifikante Unterschiede blieben aber aus. Dies war in erster Linie auf die hohe Standardabweichung zurückzuführen, die mittleren MCTM-Werte waren mit denen von Chromosom 5 und 8 vergleichbar. (Abb.21). Unter Berücksichtigung der zahlreichen, unterschiedlich beschriebenen Veränderungen an der DNA des Chromosoms 3 im Kopf-Hals-Bereich (Banham et al., 2001; Hashimoto et al., 2001; Hogg et al., 2002; Li et al., 1994; Martinez et al., 2001; Waber et al., 1996), spiegelt diese hohe Standardabweichung bei der Untersuchung mit Comet-FISH u.U. die hohe Bandbreite an genetischer Alteration an diesem Chromosom wieder.

#### **4.5.2 Chromosomale Alterationen an Metaphasezellen**

Zur Einschätzung der Mutagensensitivität bei der Karzinogenese im Oropharynx wurden in multiplen Vorarbeiten Lymphozyten als Kontrollzellen herangezogen (Palyvoda et al., 2002; Rajaei-Behbahani et al., 2001). Hierzu ist allerdings zu sagen, dass bisherige Ergebnisse die Korrelation zwischen Lymphozyten und Schleimhautzellen der Mukosa des oberen Aerodigestivtrakts im Comet Assay als schlecht bewerteten (Kleinsässer et al., 2000). Andererseits konnte an Lymphozyten das Allel 3p21.3 bereits als potentiell prognostisch-bedeutsamer Genloкус für die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich ausgemacht werden (Zhu et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit konnte an keinem der Chromosomen ein statistisch signifikanter Unterschied in der Schädigung zwischen Non-Tumor und

Tumorpatienten ausgemacht werden. Auch ansteigende Konzentrationen von BPDE hatten keinen signifikanten Einfluss auf die DNA innerhalb der einzelnen Gruppen. Damit ließen sich die Ergebnisse von Zhu et al., die DNA-Schädigung auch mit BPDE induziert hatten, nicht bestätigen. Bei den Chromosom 5 und 8 scheint ein Abfall des relativen DNA-Anteils sichtbar zu werden, signifikant ist dieser jedoch nicht.

Zusätzlich zur Analyse chromosomaler Alterationen von Lymphozyten-Metaphasen sollte in Zukunft auch auf die Untersuchung von Metaphase-Chromosomen von Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtrakts zurückgegriffen werden. Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Modell zur Präparation dieser Chromosomen bietet dafür einen geeigneten Ansatz. In Kombination mit der Analyse von Lymphozyten lassen sich u.U. weitere spezifische Gene lokalisieren, die für die Karzinogenese bei Kopf-Hals-Tumoren von Bedeutung sind. Selbst das Erarbeiten eines individuellen Risikoprofils für die Entstehung dieser Tumoren wäre denkbar. Wie in dieser Arbeit gezeigt, treten einige dieser Veränderungen bereits in makroskopisch gesunder Schleimhaut des oberen Aerodigestivtrakts auf. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob spezifische Veränderungen am Genom nicht schon vor Entstehung des Tumors nachweisbar sind. Aus solchen Veränderungen ließe sich eine umfangreiche Frühdiagnostik zur Einschätzung der individuellen Mutagensensitivität entwickeln.

## 5 Zusammenfassung

Der obere Aerodigestivtrakt ist das primäre Kontaktorgan für viele inhalative Karzinogene. Dies spielt insbesondere bei der tabak-assoziierten Karzinogenese eine entscheidende Rolle. Polyzyklische Kohlenwasserstoffe und der Metabolit des Benzo[a]pyrens, das Benz[a]pyren-7,8-diol-epoxid (BPDE) sind hierbei von herausragender Bedeutung.

Mutationen an der DNA sind dabei nicht gleichmäßig über die gesamte DNA verteilt, sondern auf speziellen Chromosomen bzw. Genen lokalisiert. Zur Erstellung eines individuellen Risikoprofils wurde in dieser Arbeit die alkalische Einzellzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay), eine etablierte Methode zur Quantifizierung von DNA-Schäden, erstmals mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an Mucosazellen des oberen Aerodigestivtraktes kombiniert. Nach Inkubation mit BPDE konnte so eine Bestimmung der DNA-Schädigung an den Chromosomen 3,5,8 und dem Vergleichschromosom 1 durchgeführt werden. Dabei wurden frisch entnommene, makroskopisch gesunde Mukosaproben von Patienten mit Oropharynxkarzinom und tumorfreien Patienten verglichen. Es stellte sich heraus, dass Tumorpatienten eine höhere Schädigung der Chromosomen 5 und 8 im Vergleich zu Chromosom 1 aufwiesen. Bei tumorfreien Patienten konnten keine Unterschiede der einzelnen Chromosomen untereinander und im Vergleich zur Gesamt-DNA nachgewiesen werden.

Neben einer quantitativen Bestimmung der DNA-Schädigung an Interphasezellen sollte in der vorliegenden Arbeit auch strukturelle DNA-Schädigungen an Metaphasechromosomen untersucht werden. Zur Einschätzung der Mutagensensitivität bei der Karzinogenese im Oropharynx wurden in multiplen Vorarbeiten Lymphozyten als Kontrollzellen herangezogen. Deshalb wurden auch in der vorliegenden Arbeit Metaphasechromosomen aus Lymphozyten präpariert und mit FISH untersucht. Zusätzlich wurde auch eine neue Methodik zur Präparation von Metaphasechromosomen aus Mucosazellen des oberen Aerodigestivtraktes etabliert. Es konnte jedoch an keinem der untersuchten Chromosomen ein statistisch

signifikanter Unterschied in der Schädigung zwischen tumorfreien- und Tumorpatienten ausgemacht werden.

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Modell zur Präparation von Chromosomen aus Mukosazellen bietet zur weiterführenden Erfassung des Risikoprofils für die Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes einen geeigneten Ansatz. Unter Umständen lassen sich zusätzliche Gene lokalisieren, die für die Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich von Bedeutung sind. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass einige dieser Veränderungen bereits in makroskopisch gesunder Schleimhaut des oberen Aerodigestivtrakts auftreten. Weitere Untersuchungen müssen ergeben, ob spezifische Veränderungen am Genom nicht schon vor Entstehung des Tumors nachweisbar sind. Aus solchen Veränderungen ließe sich eine umfangreiche Frühdiagnostik zur Einschätzung der individuellen Mutagensensitivität entwickeln. Dies eröffnet die Möglichkeit für künftige präventive und therapeutische Strategien für die Karzinogenese des oberen Aerodigestivtraktes.

## 6 Literatur

1. Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IR, Soutar D, Balmain A: An allelotype of squamous carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res* 54:1617-1621 (1994).
2. Akin FJ, Snook ME, Severson RE, Chamberlain WJ, Walters DB: Identification of polynuclear aromatic hydrocarbons in cigarette smoke and their importance as tumorigens. *J Natl Cancer Inst* 57:191-195 (1976).
3. Appel KE, Furstenberger G, Hapke HJ, Hecker E, Hildebrandt AG, Koransky W, Marks F, Neumann HG, Ohnesorge FK, Schulte-Hermann R: Chemical cancerogenesis: definitions of frequently used terms. *J Cancer Res Clin Oncol* 116:232-236 (1990).
4. Banham AH, Beasley N, Campo E, Fernandez PL, Fidler C, Gatter K, Jones M, Mason DY, Prime JE, Trougouboff P, Wood K, Cordell JL: The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p. *Cancer Res* 61:8820-8829 (2001).
5. Bockmühl U: Bedeutung der Analyse genetischer Alterationen bei Kopf-Hals-Karzinomen. *HNO* 46:74-83 (1996).
6. Bockmühl U: [Molecular cytogenetic characterization of squamous cell carcinoma of the head and neck region]. *Laryngorhinootologie* 79:249-250 (2000).
7. Bockmühl U, Ishwad CS, Ferrell RE, Gollin SM: Association of 8p23 deletions with poor survival in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 124:451-455 (2001).
8. Bockmühl U, Petersen I: DNA ploidy and chromosomal alterations in head and neck squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 441:541-550 (2002).

9. Bodmer WF, Cottrell S, Frischauf AM, Kerr IB, Murday VA, Rowan AJ, Smith MF, Solomon E, Thomas H, Varesco L: Genetic analysis of colorectal cancer. *Princess Takamatsu Symp* 20:49-59 (1989).
10. Bryce LA, Morrison N, Hoare SF, Muir S, Keith WN: Mapping of the gene for the human telomerase reverse transcriptase, hTERT, to chromosome 5p15.33 by fluorescence in situ hybridization. *Neoplasia* 2:197-201 (2000).
11. Chakraborty SB, Dasgupta S, Roy A, Sengupta A, Ray B, Roychoudhury S, Panda CK: Differential deletions in 3p are associated with the development of head and neck squamous cell carcinoma in Indian patients. *Cancer Genet Cytogenet* 146:130-138 (2003).
12. Conney AH, Chang RL, Jerina DM, Wei SJ: Studies on the metabolism of benzo[a]pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite. *Drug Metab Rev* 26:125-163 (1994).
13. Coon SW, Savera AT, Zarbo RJ, Benninger MS, Chase GA, Rybicki BA, Van Dyke DL: Prognostic implications of loss of heterozygosity at 8p21 and 9p21 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 111:206-212 (2004).
14. Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van der Wal AC, Snow GB: Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121:157-160 (1995).
15. Crespo P, Leon J: Ras proteins in the control of the cell cycle and cell differentiation. *Cell Mol Life Sci* 57:1613-1636 (2000).
16. Culp SJ, Beland FA: Comparison of DNA adduct formation in mice fed coal tar or benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 15:247-252 (1994).
17. Davies K: Breast cancer genes. Further enigmatic variations. *Nature* 378:762-763 (1995).
18. DeMarini DM: Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res* 567:447-474 (2004).

19. Dontenville W: Tumorgenetic effects of chronic cigarette smoke inhalation on Syrian golden hamsters. Experimental lung cancer carcinogenesis and bioassays Karbe, E. Park, J.F. (Hrsg.), Springer, Heidelberg:331-359 (1974).
20. El Naggar AK, Hurr K, Batsakis JG, Luna MA, Goepfert H, Huff V: Sequential loss of heterozygosity at microsatellite motifs in preinvasive and invasive head and neck squamous carcinoma. *Cancer Res* 55:2656-2659 (1995).
21. Friedberg EC: Relationships between DNA repair and transcription. *Annu Rev Biochem* 65:15-42 (1996).
22. Götte K, Hadaczek P, Coy JF, Wirtz HW, Riedel F, Neubauer J, Hörmann K: Fhit expression is absent or reduced in a subset of primary head and neck cancer. *Anticancer Res* 20:1057-1060 (2000).
23. Götte K, Tremmel SC, Popp S, Weber S, Hörmann K, Bartram CR, Jauch A: Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization. *Adv Otorhinolaryngol* 62:38-48 (2005).
24. Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G: A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res* 390:179-188 (1997).
25. Harréus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H: [Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract]. *Laryngorhinootologie* 78:176-181 (1999).
26. Harréus UA, Kleinsasser NH, Zieger S, Wallner B, 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* 563:131-138 (2004).

27. Hashimoto Y, Oga A, Kawauchi S, Furuya T, Shimizu N, Nakano T, Imate Y, Yamashita H, Sasaki K: Amplification of 3q26 approximately qter correlates with tumor progression in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 129:52-56 (2001).
28. Hoffmann D, Wynder EL: Active and passive smoking. Toxicology Marquardt H , Schäfer S G , McCellan R , Welch F (Hrsg ), Academic Press, San Diego, CA897-898 (1997).
29. Hogg RP, Honorio S, Martinez A, Agathangelou A, Dallol A, Fullwood P, Weichselbaum R, Kuo MJ, Maher ER, Latif F: Frequent 3p allele loss and epigenetic inactivation of the RASSF1A tumour suppressor gene from region 3p21.3 in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* 38:1585-1592 (2002).
30. Huff J: Long-term chemical carcinogenesis bioassays predict human cancer hazards. Issues, controversies, and uncertainties. *Ann N Y Acad Sci* 895:56-79 (1999).
31. IARC: Cumulative Index to IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *IARC* 39:379-403 (1986).
32. IARC: Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC Monographs volumes 1 to 42. *IARC* 7:1-440 (1987).
33. Ishwad CS, Shuster M, Bockmuhl U, Thakker N, Shah P, Toomes C, Dixon M, Ferrell RE, Gollin SM: Frequent allelic loss and homozygous deletion in chromosome band 8p23 in oral cancer. *Int J Cancer* 80:25-31 (1999).
34. Jain KK: Current status of fluorescent in-situ hybridisation. *Med Device Technol* 15:14-17 (2004).
35. Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Akervall J, Dictor M, Mertens F: Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Genet Cytogenet* 132:85-96 (2002).

36. Jin Y, Jin C, Wennerberg J, Hoglund M, Mertens F: Cytogenetic and fluorescence in situ hybridization characterization of chromosome 8 rearrangements in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Genet Cytogenet* 130:111-117 (2001).
37. Kalble T: [Etiopathology, risk factors, environmental influences and epidemiology of bladder cancer]. *Urologe A* 40:447-450 (2001).
38. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, .: Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253:661-665 (1991).
39. Kleinsässer NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F, Buhrlen M, Huber RM, Rettenmeier AW: The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res* 561:63-73 (2004).
40. Kleinsässer NH, Wagner C, Wallner BC, Harréus UA, Kastenbauer ER: Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients. *Mutat Res* 491:151-161 (2001).
41. Kleinsässer NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK, Harréus UA: Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutat Res* 467:21-30 (2000).
42. Knize MG, Salmon CP, Pais P, Felton JS: Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens. *Adv Exp Med Biol* 459:179-193 (1999).
43. Kolata GB: Genes and cancer: the story of Wilms tumor. *Science* 207:970-971 (1980).

44. Li X, Lee NK, Ye YW, Waber PG, Schweitzer C, Cheng QC, Nisen PD: Allelic loss at chromosomes 3p, 8p, 13q, and 17p associated with poor prognosis in head and neck cancer. *J Natl Cancer Inst* 86:1524-1529 (1994).
45. Liang Z, Lippman SM, Kawabe A, Shimada Y, Xu XC: Identification of benzo(a)pyrene diol epoxide-binding DNA fragments using DNA immunoprecipitation technique. *Cancer Res* 63:1470-1474 (2003).
46. Lydiatt WM, Davidson BJ, Shah J, Schantz SP, Chaganti RS: The relationship of loss of heterozygosity to tobacco exposure and early recurrence in head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg* 168:437-440 (1994).
47. Maier H, Born IA, Mall G: Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. *Klin Wochenschr* 66 Suppl 11:140-150 (1988).
48. Maier H, Fischer G, Sennewald E, Heller WD: [Occupational risk factors for pharyngeal cancer. Results of the Heidelberg Pharyngeal Cancer Study]. *HNO* 42:530-540 (1994).
49. Mak KM, Leo MA, Lieber CS: Effect of ethanol and vitamin A deficiency on epithelial cell proliferation and structure in the rat esophagus. *Gastroenterology* 93:362-370 (1987).
50. Manchester KL: Theodor Boveri and the origin of malignant tumours. *Trends Cell Biol* 5:384-387 (1995).
51. Mancini UM, Estecio MR, Gois JF, Fukuyama EE, Valentim PJ, Cury PM, Bertollo EM, Tajara EH: The chromosome 5q21 band minisatellite and head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 147:87-88 (2003).
52. Mao L, Fan YH, Lotan R, Hong WK: Frequent abnormalities of FHIT, a candidate tumor suppressor gene, in head and neck cancer cell lines. *Cancer Res* 56:5128-5131 (1996).

53. Martinez A, Walker RA, Shaw JA, Dearing SJ, Maher ER, Latif F: Chromosome 3p allele loss in early invasive breast cancer: detailed mapping and association with clinicopathological features. *Mol Pathol* 54:300-306 (2001).
54. Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, Harries LW, Wolf CR, Jones PW, Aldersea J, Worrall SF, Hand P, Fryer AA, Strange RC: The glutathione S-transferase GSTP1 polymorphism: effects on susceptibility to oral/pharyngeal and laryngeal carcinomas. *Pharmacogenetics* 8:1-6 (1998a).
55. Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, Jones PW, Hayes JD, Aldersea J, Gilford J, Bailey L, Bath J, Worrall SF, Hand P, Fryer AA, Strange RC: Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics* 8:91-100 (1998b).
56. Matthias C, Jahnke V, Fryer A, Strange R, Ollier W, Hajeer A: Influence of tumour necrosis factor microsatellite polymorphisms on susceptibility to head and neck cancer. *Acta Otolaryngol* 118:284-288 (1998c).
57. Matthias C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Aldersea JE, Worrall SF, Fryer AA, Strange RC: Cyclin D1, glutathione S-transferase, and cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8:815-823 (1999).
58. McKelvey-Martin VJ, Ho ET, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, Downes CS: Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* 13:1-8 (1998).

59. McKelvey-Martin VJ, Melia N, Walsh IK, Johnston SR, Hughes CM, Lewis SE, Thompson W: Two potential clinical applications of the alkaline single-cell gel electrophoresis assay: (1). Human bladder washings and transitional cell carcinoma of the bladder; and (2). Human sperm and male infertility. *Mutat Res* 375:93-104 (1997).
60. Menke M, Angelis KJ, Schubert I: Detection of specific DNA lesions by a combination of Comet Assay and FISH in plants. *Environ Mol Mutagen* 132-138 (2000).
61. Miller EC, Swanson AB, Phillips DH, Fletcher TL, Liem A, Miller JA: Structure-activity studies of the carcinogenicities in the mouse and rat of some naturally occurring and synthetic alkenylbenzene derivatives related to safrole and estragole. *Cancer Res* 43:1124-1134 (1983).
62. Mineta H, Miura K, Takebayashi S, Misawa K, Ueda Y, Suzuki I, Ito M, Wennerberg J: Low expression of fragile histidine triad gene correlates with high proliferation in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 39:56-63 (2003).
63. Nathke HE: [No cervix carcinoma without HPV infection? Intraepithelial neoplasia--prevention of invasive carcinoma]. *Fortschr Med* 108:18 (1990).
64. Nguyen DC, Parsa B, Close A, Magnusson B, Crowe DL, Sinha UK: Overexpression of cell cycle regulatory proteins correlates with advanced tumor stage in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Oncol* 22:1285-1290 (2003).
65. Nunn J, Scholes AG, Liloglou T, Nagini S, Jones AS, Vaughan ED, Gosney JR, Rogers S, Fear S, Field JK: Fractional allele loss indicates distinct genetic populations in the development of squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN). *Carcinogenesis* 20:2219-2228 (1999).
66. Obe G, Pfeiffer P, Savage JR, Johannes C, Goedecke W, Jeppesen P, Natarajan AT, Martinez-Lopez W, Folle GA, Drets ME: Chromosomal

- aberrations: formation, identification and distribution. *Mutat Res* 504:17-36 (2002).
67. Ogilvie CM: Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Pathol Biol (Paris)* 51:156-160 (2003).
68. Ohshima K, Ishiguro M, Yamasaki S, Miyagi J, Okamura S, Sugio Y, Muta T, Sasaki H, Tuchiya T, Kawasaki C, Kikuchi M: Chromosomal and comparative genomic analyses of HHV-8-negative primary effusion lymphoma in five HIV-negative Japanese patients. *Leuk Lymphoma* 43:595-601 (2002).
69. Olive PL, Banath JP: Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 294:275-283 (1993).
70. Ong ST, Fong KM, Bader SA, Minna JD, Le Beau MM, McKeithan TW, Rassool FV: Precise localization of the FHIT gene to the common fragile site at 3p14.2 (FRA3B) and characterization of homozygous deletions within FRA3B that affect FHIT transcription in tumor cell lines. *Genes Chromosomes Cancer* 20:16-23 (1997).
71. Pai SI, Wu GS, Ozoren N, Wu L, Jen J, Sidransky D, El Deiry WS: Rare loss-of-function mutation of a death receptor gene in head and neck cancer. *Cancer Res* 58:3513-3518 (1998).
72. Palyvoda O, Mukalov I, Polanska J, Wygoda A, Drobot L, Widel M, Rzeszowska-Wolny J: Radiation-induced DNA damage and its repair in lymphocytes of patients with head and neck cancer and healthy donors. *Anticancer Res* 22:1721-1725 (2002).
73. Pardue ML, Gall JG: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64:600-604 (1969).

74. Parsonnet J, Friedman GD, Vandersteen DP, Chang Y, Vogelman JH, Orentreich N, Sibley RK: Helicobacter pylori infection and the risk of gastric carcinoma. *N Engl J Med* 325:1127-1131 (1991).
75. Pavelic K, Krizanac S, Cacev T, Hadzija MP, Radosevic S, Crnic I, Levanat S, Kapitanovic S: Aberration of FHIT gene is associated with increased tumor proliferation and decreased apoptosis-clinical evidence in lung and head and neck carcinomas. *Mol Med* 7:442-453 (2001).
76. Perera FP: Molecular epidemiology: insights into cancer susceptibility, risk assessment, and prevention. *J Natl Cancer Inst* 88:496-509 (1996).
77. Phillips H.J.: Dye exclusion test for cell viability. *Tissue Culture* 407-408 (1973).
78. Pinkel D, Gray JW, Trask B, van den EG, Fuscoe J, Van Dekken H: Cytogenetic analysis by in situ hybridization with fluorescently labeled nucleic acid probes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:151-157 (1986).
79. Rajaei-Behbahani N, Schmezer P, Risch A, Rittgen W, Kayser KW, Dienemann H, Schulz V, Drings P, Thiel S, Bartsch H: Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 95:86-91 (2001).
80. Redon R, Muller D, Caulee K, Wanherdrick K, Abecassis J, du MS: A simple specific pattern of chromosomal aberrations at early stages of head and neck squamous cell carcinomas: PIK3CA but not p63 gene as a likely target of 3q26-qter gains. *Cancer Res* 61:4122-4129 (2001).
81. Riazimand SH, Welkoborsky HJ, Bernauer HS, Jacob R, Mann WJ: Investigations for fine mapping of amplifications in chromosome 3q26.3-28 frequently occurring in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncology* 63:385-392 (2002).

82. Rybicki BA, Saveria AT, Gomez JA, Patel SC, Ballard NE, Benninger MS, Zarbo RJ, Van Dyke DL: Allelic loss and tumor pathology in head and neck squamous cell carcinoma. *Mod Pathol* 16:970-979 (2003).
83. Santos SJ, Singh NP, Natarajan AT: Fluorescence in situ hybridization with comets. *Exp Cell Res* 232:407-411 (1997).
84. Sasiadek M, Schlade-Bartusiak K, Zych M, Noga L, Czermarmazowicz H: Opposite responses in two DNA repair capacity tests in lymphocytes of head and neck cancer patients. *J Appl Genet* 43:525-534 (2002).
85. Schaeferhenrich A, Sendt W, Scheele J, Kuechler A, Liehr T, Claussen U, Rapp A, Greulich KO, Pool-Zobel BL: Putative colon cancer risk factors damage global DNA and TP53 in primary human colon cells isolated from surgical samples. *Food Chem Toxicol* 41:655-664 (2003).
86. Schantz SP, Huang Q, Shah K, Murty VV, Hsu TC, Yu G, Andersen PE, Huvos AG, Chaganti RS: Mutagen sensitivity and environmental exposures as contributing causes of chromosome 3p losses in head and neck cancers. *Carcinogenesis* 21:1239-1246 (2000).
87. Schlesinger-Raab A, Lang S, Steuer-Vogt MK, Hölzel D: Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome. *Manual Kopf-Hals-Karzinome, Tumorzentrum München*:3-14 (2003).
88. Schmezer P, Rajaei-Behbahani N, Risch A, Thiel S, Rittgen W, Drings P, Dienemann H, Kayser KW, Schulz V, Bartsch H: Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 16:25-30 (2001).
89. Seitz HK, Simanowski UA, Osswald B: Gastrointestinal carcinogenesis: ethanol as a risk factor. *Eur J Cancer Prev* 1 Suppl 3:5-18 (1992a).

90. Seitz HK, Simanowski UA, Osswald BR: Epidemiology and pathophysiology of ethanol-associated gastrointestinal cancer. *Pharmacogenetics* 2:278-287 (1992b).
91. Seitz HK, Stickel F, Homann N: Pathogenetic mechanisms of upper aerodigestive tract cancer in alcoholics. *Int J Cancer* 108:483-487 (2004).
92. Sermon K, Van Steirteghem A, Liebaers I: Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 363:1633-1641 (2004).
93. Shimada T, Martin MV, Pruess-Schwartz D, Marnett LJ, Guengerich FP: Roles of individual human cytochrome P-450 enzymes in the bioactivation of benzo(a)pyrene, 7,8-dihydroxy-7,8-dihydrobenzo(a)pyrene, and other dihydrodiol derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Cancer Res* 49:6304-6312 (1989).
94. Singh B, Gogineni SK, Sacks PG, Shaha AR, Shah JP, Stoffel A, Rao PH: Molecular cytogenetic characterization of head and neck squamous cell carcinoma and refinement of 3q amplification. *Cancer Res* 61:4506-4513 (2001).
95. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191 (1988).
96. Smith CJ, Perfetti TA, Rumple MA, Rodgman A, Doolittle DJ: "IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chem Toxicol* 39:183-205 (2001).
97. Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer GP: Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 92:803-811 (2000).

98. Speicher MR, Howe C, Crotty P, du MS, Costa J, Ward DC: Comparative genomic hybridization detects novel deletions and amplifications in head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Res* 55:1010-1013 (1995).
99. Speit G, Hartmann A: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol* 291:85-95 (2005).
100. Squire JA, Bayani J, Luk C, Unwin L, Tokunaga J, MacMillan C, Irish J, Brown D, Gullane P, Kamel-Reid S: Molecular cytogenetic analysis of head and neck squamous cell carcinoma: By comparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and expression array analysis. *Head Neck* 24:874-887 (2002).
101. Stefanou EG, Hanna G, Foakes A, Crocker M, Fitchett M: Prenatal diagnosis of cri du chat (5p-) syndrome in association with isolated moderate bilateral ventriculomegaly. *Prenat Diagn* 22:64-66 (2002).
102. Steinsvag SK, Strand M, Berg O, Miaguchi M, Olofsson J: Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* 101:1323-1331 (1991).
103. Stephens JC, Cavanaugh ML, Gradie MI, Mador ML, Kidd KK: Mapping the human genome: current status. *Science* 250:237-244 (1990).
104. Sun PC, Schmidt AP, Pashia ME, Sunwoo JB, Scholnick SB: Homozygous deletions define a region of 8p23.2 containing a putative tumor suppressor gene. *Genomics* 62:184-188 (1999).
105. Sunwoo JB, Sun PC, Gupta VK, Schmidt AP, El Mofty S, Scholnick SB: Localization of a putative tumor suppressor gene in the sub-telomeric region of chromosome 8p. *Oncogene* 18:2651-2655 (1999).
106. Swiger RR, Tucker JD: Fluorescence in situ hybridization: a brief review. *Environ Mol Mutagen* 27:245-254 (1996).
107. Tanaka E, Terada M, Misawa S: Cytochrome P450 2E1: its clinical and toxicological role. *J Clin Pharm Ther* 25:165-175 (2000).

108. Teixeira MR: Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer* 38:1580-1584 (2002).
109. Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221 (2000).
110. Tomatis L, Aitio A, Wilbourn J, Shuker L: Human carcinogens so far identified. *Jpn J Cancer Res* 80:795-807 (1989).
111. Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM: FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9770-9775 (1996).
112. Waber PG, Lee NK, Nisen PD: Frequent allelic loss at chromosome arm 3p is distinct from genetic alterations of the Von-Hippel Lindau tumor suppressor gene in head and neck cancer. *Oncogene* 12:365-369 (1996).
113. Wallner BC, Harreus UA, Gamarra F, Sassen A, Kleinsasser NH: [Genotoxicity studies in mini-organ cultures of human nasal mucosa.]. *HNO* (2005).
114. Wei Q, Gu J, Cheng L, Bondy ML, Jiang H, Hong WK, Spitz MR: Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer. *Cancer Res* 56:3975-3979 (1996).
115. Weinberg RA: The cat and mouse games that genes, viruses, and cells play. *Cell* 88:573-575 (1997).
116. Wolf C, Flechtenmacher C, Dietz A, Weidauer H, Abel U, Maier H, Bosch FX: p53-positive tumor-distant squamous epithelia of the head and neck reveal selective loss of chromosome 17. *Laryngoscope* 114:698-704 (2004).
117. Wu CL, Roz L, Sloan P, Read AP, Holland S, Porter S, Scully C, Speight PM, Thakker N: Deletion mapping defines three discrete areas of allelic imbalance

- on chromosome arm 8p in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Genes Chromosomes Cancer* 20:347-353 (1997).
118. Xie Z, Braithwaite E, Guo D, Zhao B, Geacintov NE, Wang Z: Mutagenesis of benzo[a]pyrene diol epoxide in yeast: requirement for DNA polymerase zeta and involvement of DNA polymerase eta. *Biochemistry* 42:11253-11262 (2003).
119. Yamada A: on the late injuries following occupational inhalation of mustard gas, with special references to carcinoma of the respiratory tract. *Acta Pathol Jpn* 13:131-155 (1963).
120. Yamaguchi K, Wu L, Caballero OL, Hibi K, Trink B, Resto V, Cairns P, Okami K, Koch WM, Sidransky D, Jen J: Frequent gain of the p40/p51/p63 gene locus in primary head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 86:684-689 (2000).
121. Zhu Y, Spitz MR, Zheng YL, Hong WK, Wu X: BPDE-induced lymphocytic 3p21.3 aberrations may predict head and neck carcinoma risk. *Cancer* 95:563-568 (2002).

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungen

APC	adenomatöse Poliposis coli
BEGM	basal epithelial growth medium
BPDE	Benz[a]pyren- 7,8-diol-epoxid
BRCA ½	breast cancer gene 1/2
CGH	comparative genomic hybridisation
Chr	Chromosom
Comet-FISH	Comet Assay kombiniert mit FISH
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamitetraacetat
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FHIT	fragile-histidine-triad
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
LOH	loss of heterozygosity
MCTM	Munich chromosomal Tailmoment
MOK	Miniorgankultur (mini organ culture)
MW	Mittelwert
OTM	Olive Tailmoment
PAH	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate Buffered Saline
PHA	Phytohämagglutinin
PIK3Ca	Phosphoinositin-3-Kinase, catalytic, alpha-polypeptide
py	pack years
RASSF1	RAS association domain family 1
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SE	Standardfehler
SSC	saline sodium citrate buffer
VHL	von Hippel-Lindau

## 7.2 Lebenslauf

### Angaben zur Person

Name: Maximilian Josef Reiter  
Wohnort: Thalkirchner Str. 28  
80337 München

Geburtstag: 06.05.1978  
Geburtsort: München  
Nationalität: deutsch

Eltern: Karl und Rosa Maria Reiter

---

### Schulbildung

09/1984 – 07/1988 Grundschule an der Dorfstrasse in 82024 Taufkirchen  
09/1988 – 07/1997 Gymnasium Unterhaching  
05/1997 Gewinn des Regionalwettbewerbes „JUGEND FORSCHT“ im  
Fachbereich Chemie  
Abitur am Gymnasium

---

### Zivildienst

09/1997 – 10/1998 Zivildienst bei Maltheser Hilfsdienst e.V. im Bereich  
Behindertenfahrdienst und Mitgliederwesen

---

### Berufsausbildung

10/1998 - 07/2000 Vorklinischer Studienabschnitt Humanmedizin an der Ludwig-  
Maximilians- Universität  
07/2000 – 03/2004 Klinischer Studienabschnitt Humanmedizin an der Ludwig-  
Maximilians-Universität  
04/2004 – 03/2005 Praktisches Jahr  
06/2005 Abschluss des Studiums der Humanmedizin an der Ludwig-  
Maximilians-Universität

### 7.3 Danksagung

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

Ein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Ulrich Harréus, der mich in die Thematik der Arbeit einführte, sie betreute und stets ein offenes Ohr für alle Fragen hatte.

Vielen Dank an PD Dr. Christoph Matthias, der seit seinem Beitritt zur Klinik der Hals-Nasen- und Ohrenheilkunde tatkräftig unser Labor mit seiner Fachkenntnis unterstützte. Für seine Hilfeleistung und Unterstützung bin ich ihm sehr dankbar.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Hölzel und Dr. P.Dirschedl, IBE, für ihre Beratung bezüglich der Statistik dieser Arbeit.

Mein großer Dank gilt Sabina Zieger. Ihr unermüdlicher Einsatz bei der Probenbeschaffung und Ihre Gesprächsbereitschaft waren mir eine große Hilfe während der Zeit im Labor.

Vielen Dank vor allem meiner Familie, die immer hinter mir steht. Ohne ihre Unterstützung und ihr Verständnis wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

## 7.4 Publikationen aus der Arbeit

### Originalpublikationen:

*Harreus, U.A., Kleinsasser, N.H., Zieger, S., Wallner, B., Reiter, M., Schuller, P., and Berghaus, A. (2004)*

Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization

*Mutat. Res. 563, 131-138.*

### Kongressbeiträge:

*Harréus U, Reiter M, Kleinsasser N, Matthias C, München, Germany*

Chromosomal alterations in mucosa cells of patients with and without carcinoma of the oropharynx

*International symposium on advances in head and neck cancer; basic and clinical research, Marburg (2005)*