

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

**Direktor: Prof. Dr. A. Berghaus**

**Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität als  
endogene Risikofaktoren für die Entstehung von  
Kopf-Hals-Tumoren**

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

**Vorgelegt von  
Andreas Reiß  
aus  
München  
2011**

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

**Berichterstatter:** **Priv. Doz. Dr. Ulrich Harréus**

**Mitberichterstatter:** **Priv. Doz. Dr. Roland Kappler**

**Prof. Dr. Stefan Bohlander**

**Prof. Dr. Georg Bornkamm**

**Mitbetreuung durch die**

**promovierten Mitarbeiter:** **Dr. med. Philipp Baumeister**

**Dr. med. Maximilian Reiter**

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

**Tag der mündlichen Prüfung: 03.02.2011**

## Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung</b>	<b>5</b>
1.1 Kopf-Hals-Tumoren – Überblick und Epidemiologie	5
1.2 Mechanismen der Karzinomentstehung im Kopf-Hals-Bereich	6
1.3 Zur Ätiologie der Kopf-Hals-Tumore	7
1.3.1 Exogene Ursachen der Tumorgenese im Kopf-Hals-Bereich	9
1.3.2 Intrinsische Krebsursachen – Die individuelle genetische Suszeptibilität	11
1.4 Der Comet Assay zur Beurteilung von Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität	13
1.5 Kanzerogene Tabakrauchinhaltstoffe als Testsubstanzen	14
1.5.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs)	14
1.5.2 N-Nitrosamine	16
1.6 Aufgabenstellung der Arbeit	18
<b>2 Materialien und Methoden</b>	<b>19</b>
2.1 Patienten- und Kontrollgruppe	19
2.2 Materialien und Reagenzien	20
2.2.1 Zellmaterial	20
2.2.2 Testsubstanzen	20
2.2.3 Chemikalien und Lösungen	22
2.2.4 Enzyme, Medien und Zusätze	22
2.2.5 Lösungen	23
2.2.6 Verbrauchsmaterialien	25
2.2.7 Technische Geräte	26
2.3 Methodik	27
2.3.1 Gewinnung von Einzelzellen	27
2.3.2 Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut	27

2.3.3	Vitalitätsbestimmung und Zellzählung	29
2.3.4	Exposition und Reparatur an menschlichen Oropharynxepithelzellen	29
2.3.4.1	<i>Fremdstoffexpositionsversuch</i>	29
2.3.4.2	<i>DNA-Reparaturversuch mit oropharyngealen Epithelzellen</i>	31
2.3.5	Fremdstoffexpositions- und DNA-Reparaturversuche an Lymphozyten	31
2.3.5.1	<i>Fremdstoffexposition der Lymphozyten</i>	31
2.3.5.2	<i>DNA-Reparatur mit humanen Lymphozyten</i>	32
2.3.6	Vorbereitung der Objekträger	33
2.3.7	Einbettung und Lysierung der Einzelzellen	34
2.3.8	Die alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese	34
2.4	Digitale Auswertung der DNA	35
2.5	Statistische Auswertung der Daten	37

### 3 Ergebnisse 39

3.1	Charakteristika der Patienten und der Kontrollgruppe	39
3.2	Ermittlung des Schädigungspotentials der eingesetzten Substanzen	40
3.2.1	Mittleres Schädigungsniveau der verwendeten Substanzen in den Versuchen an Schleimhautzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe	40
3.2.2	Mittleres Schädigungsniveau der verwendeten Substanzen in den Versuchen an Lymphozyten im Verhältnis zur Kontrollgruppe	41
3.3	Mutagensensitivität von Schleimhautzellen und Lymphozyten	43
3.3.1	Vergleich der Zellvitalitäten von Patienten und Kontrollpersonen	43
3.3.2	DNA-Schädigung von Schleimhautzellen durch verschiedene Tabakinhaltstoffe	44
3.3.2.1	<i>Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch DMSO</i>	46
3.3.2.2	<i>Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BaP</i>	46
3.3.2.3	<i>Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BPDE</i>	47
3.3.2.4	<i>Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNN</i>	47

3.3.2.5 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNK	48
3.3.2.6 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch MNNG	48
3.3.2.7 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NDEA	49
3.3.2.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche zur DNA-Schädigung an Schleimhautzellen	50
3.3.3 DNA-Schädigung von Lymphozyten durch verschiedene Tabakinhaltsstoffe	51
3.3.3.1 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch DMSO	53
3.3.3.2 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BaP	53
3.3.3.3 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BPDE	54
3.3.3.4 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNN	54
3.3.3.5 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNK	55
3.3.3.6 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch MNNG	55
3.3.3.7 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NDEA	56
3.3.3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche zur DNA-Schädigung an Lymphozyten	58
3.3.4 Gegenüberstellung der Schädigung von Schleimhautzellen und Lymphozyten	58
3.3.5 Reparaturkapazität von Schleimhautzellen und Lymphozyten	62
3.3.6 Reparaturkapazität von Schleimhautzellen	63
3.3.6.1 Überblick über die Verteilung der Olive Tail Moments	63
3.3.6.2 Vergleich der ungeschädigten Zellen von Patienten und Kontrollpersonen	65
3.3.6.3 Reparaturkapazitäten der Versuchspersonen	66
3.3.7 Reparaturkapazität von Lymphozyten	67
3.3.7.1 Überblick über die Verteilung der Olive Tail Moments	67
3.3.7.2 Vergleich der ungeschädigten Zellen	69
3.3.7.3 Reparaturkapazitäten der Lymphozyten-DNA der Versuchspersonen	70
3.3.8 Vergleich der Reparaturkapazitäten von Schleimhautzellen und Lymphozyten	71
3.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Reparaturversuche	72

<b>4 Diskussion</b>	<b>73</b>
4.1     Patientengut – Vergleich einer Gruppe Oropharynxkarzinom-Patienten mit gesunden Probanden	73
4.2     Humane Einzelzellen zur Untersuchung genotoxischer Auswirkungen	74
4.3     Der Comet Assay als Testsystem zum Nachweis von genotoxischen Effekten und DNA-Reparaturvorgängen an humanen Zellen	75
4.4     Bestimmung der Mutagensensitivität mittels Comet Assay	78
4.5     Mutagensensitivität von humanen Zellen gegenüber kanzerogenen des Tabakrauches	80
4.5.1     Schädigung nach Inkubation mit DMSO	81
4.5.2     DNA-Fragmentation nach Exposition gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK)	81
4.5.3     Vergleich der DNA-Fragmentierung nach Inkubation mit den Nitrosaminen NNN, NNK, NDEA, sowie MNNG	83
4.5.4     Bewertung der Ergebnisse der Fremdstoffexpositionstests	84
4.6     DNA-Reparaturuntersuchung an humanen Lymphozyten und Epithelzellen	85
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>90</b>
<b>6 Literaturverzeichnis</b>	<b>92</b>
<b>7 Anhang</b>	<b>109</b>
7.1     Abkürzungsverzeichnis	109
7.2     Curriculum vitae	110
7.3     Danksagung	111

# 1 Einleitung

## 1.1 Kopf-Hals-Tumoren – Überblick und Epidemiologie

Während bösartige Neubildungen in der Statistik der Todesursachen in den Industrieländern bis zur Jahrhundertwende mit dem siebten Rang noch eine untergeordnete Rolle spielten, ist es seither zu einer stetigen Zunahme der Malignome an der Gesamtzahl der Todesursachen gekommen

Malignome waren im Jahr 2005 für 13 Prozent aller Todesfälle weltweit verantwortlich. Dies entspricht 7,6 Millionen Toten. 390.000 davon erlagen einem Kopf-Hals-Tumor. Schätzungen der WHO zufolge wird die Anzahl der Neuerkrankungen bis zum Jahr 2020 noch um 50 Prozent ansteigen [WHO, 2006].

Unter dem Begriff Kopf-Hals-Tumore wird eine Vielzahl unterschiedlichster Neoplasien im Bereich des Mund-Nasen-Rachen-Raumes und im Hals zusammengefasst. Im Einzelnen sind Lippen, Mundhöhle, Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen, Speicheldrüsen, Mittelohr, Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx betroffen. Bei mehr als 90% der Fälle von malignen Veränderungen handelt es sich um Plattenepithelkarzinome. Daneben finden sich unter anderem auch Adenokarzinome, adenoid-zystische Karzinome und Lymphoepitheliome [Vokes et al. 1993]. Der Anteil maligner Kopf-Hals-Tumoren, die vorwiegend in Mundhöhle, Pharynx und Larynx lokalisiert sind, macht weltweit 6 % aller Malignome aus. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 5. und 7. Lebensjahrzehnt. 90 % der Betroffenen sind älter als 45 Jahre [Silverman 2001]. Im Jahr 2002 starben in der Bundesrepublik 210.043 Menschen an einer bösartigen Neubildung. Die Malignome stehen damit auf dem zweiten Rang in der Todesursachenstatistik und sind für jeden vierten Todesfall in Deutschland verantwortlich [Statistisches Bundesamt]. Derzeit erkranken in Deutschland jährlich etwa 10.500 Personen neu an einem Malignom von Mundhöhle und Rachen (ICD 10 C00-C14). Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen beträgt beinahe 3:1 (7800: 2600). Die Tumore der Kopf-Hals-Region machen nahezu 5% aller Krebsneuerkrankungen der Männer aus. Die Wahrscheinlichkeit zu erkranken ist für Männer fünfmal größer als für Frauen. Die Zahl der Krebssterbefälle liegt hier bei

3700 für Männer bzw. 1000 bei Frauen. Insgesamt lassen sich seit Beginn der Statistik stetig steigende Inzidenzen und Mortalitäten verzeichnen. Für das Jahr 2002 wird die Inzidenz auf 17,0 je 100.000 Einwohner und die Mortalität auf 8,1 je 100.000 Einwohner geschätzt [GEKID 2006]. Bereits seit Mitte der neunziger Jahre zeichnet sich eine Stabilisierung auf diesem Niveau ab.

Die 5-Jahresüberlebensrate wird in der Literatur mit teilweise unter 30% und bis zu 55 % angegeben. Diese Werte sind von der primären Tumorlokalisierung und –ausbreitung abhängig. Die Prognose limitierenden Faktoren hierfür sind die hohe lymphogene Metastasierungstendenz, die Rezidivneigung und das häufige Auftreten von Zweitkarzinomen. Trotz der stetigen Weiterentwicklung der Behandlungsstrategien konnte bisher nur die Lebensqualität, nicht aber die Überlebensrate der Patienten verbessert werden [Reiter et al. 2009, Schön et al. 1999]. Die 5-Jahresüberlebensraten verhalten sich entsprechend dem TNM-Stadium, in welchem sich die Erkrankung zum Zeitpunkt der Diagnose befindet.

## 1.2 Mechanismen der Karzinomentstehung im Kopf-Hals-Bereich

Heute wird die Entstehung eines Malignoms als eine genetische Erkrankung angesehen, die über eine fortschreitende Veränderung des Genoms zur Transformation in maligne Zellen mit aufgehobenen Regulationsmechanismen der Zellproliferation führt. Die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich wird als multiphasischer und multifaktoriell beeinflusster Prozess verstanden, der über Jahre bis Jahrzehnte verlaufen kann. Durch kanzerogene Stoffe aus der Umwelt, aber auch durch Produkte des normalen Zellstoffwechsels körpereigener Zellen, werden kritische Veränderungen des Erbgutes hervorgerufen. Genotoxische Stoffe, wie zum Beispiel chemische Kanzerogene und deren aktive Metabolite und elektrophile Substanzen, die während des Zellstoffwechsels anfallen, reagieren mit der DNA und verursachen Einzelstrangbrüche, Desaminierungen, Purinbasenverluste, Adduktbildungen, Alkylierungen oder Doppelstrangbrüche. Diese Schäden werden zum Teil durch Reparaturenzyme wieder entfernt, können aber auch persistieren. Bei der Zellteilung können Mutationen resultieren, die an folgende Zellgenerationen weitergegeben werden. Durch wiederholte Schädigung und Proliferationsstimuli, wie inflammatorische Prozesse, kommt es zur klonalen Expansion der genetisch

veränderten Zellen. Im gesunden Zellverband gewährleistet die Expression zahlreicher Gene das Gleichgewicht zwischen Mutation und Reparatur. Führen die verursachten Veränderungen an der DNA zur Aktivitätsänderung oder Inaktivierung solcher Gene, kommt es zur progressiven Transformation der Zellen in einen malignen Tumor. Dessen Zellen besitzen nun alle eindeutig maligne Eigenschaften wie autarke Expression von Wachstumsfaktoren, Unempfänglichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Umgehung der Apoptose (programmierter Zelltod), unlimitiertes Replikationspotential und Fähigkeit zur Angiogenese, Gewebeinfiltration und Metastasenbildung [Hanahan et al. 2000, Harris 1991; Barrett 1993]. Aus einer unterbliebenen oder fehlerhaften Reparatur eines beschädigten Genomabschnittes kann ein Selektionsvorteil entstehen, welcher mit einer gesteigerten Proliferationsrate verbunden ist. Ein schnelleres Zellwachstum und eine gesteigerte Teilungsrate gehen mit einer erhöhten Instabilität der DNA einher. Damit verbundene weitere Genomschäden führen zur Inaktivierung zentraler Gene, die begrenzend auf unkontrolliertes Wachstum und Schädigung der DNA durch Zellzyklusarrest, Reparaturenzyminduktion und Einleitung der Apoptose wirken. Diese Vorgänge sind grundlegende Voraussetzungen, die auf dem Weg zur malignen Neoplasie erfüllt werden. Hierfür verantwortlich zeigen sich defiziente DNA-Reparaturenzyme, Aktivierung von Onkogenen und die Inaktivierung von Tumorsuppressorgen, wie dem p53-Tumorsuppressor, das gerade im Kopf-Hals-Bereich, im Zusammenhang mit tabak- und alkoholinduzierten Tumoren, eine wichtige Rolle spielt. [Bosch et al. 1999].

## 1.3 Zur Ätiologie der Kopf-Hals-Tumore

Durch seine Lage im Atem- und Nahrungsweg ist der obere Aerodigestivtrakt, abhängig von den persönlichen Lebensgewohnheiten, die wahrscheinlich am stärksten gegenüber schädlichen Umwelteinflüssen exponierte Körperregion. Flüssige und feste Nahrungsbestandteile, sowie in der Atemluft verteilte Partikel, mit zahllosen chemischen und auch biologischen Substanzen, gelangen an die Zielepithelien des Kopf-Hals-Bereichs und können dort zur Entstehung eines Malignoms führen. Daneben werden zunehmend präformierte, individuelle Eigenschaften auf molekulargenetischer Ebene als prädisponierend in Betracht

gezogen [Spitz 1995]. Nach der Ätiologie können somit chemische, physikalische, biologische, genetische und andere Faktoren (Ernährungsfaktoren, Immunsuppression und Hormone), die die Entstehung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich fördern, unterschieden werden. Bereits aus dieser Anzahl möglicher Faktoren, die auch nebeneinander ihre Wirkung entfalten, ist erkennbar, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt [Forastiere et al. 2001]. Dies soll in der nachfolgenden Abbildung 1 nochmals veranschaulicht werden.

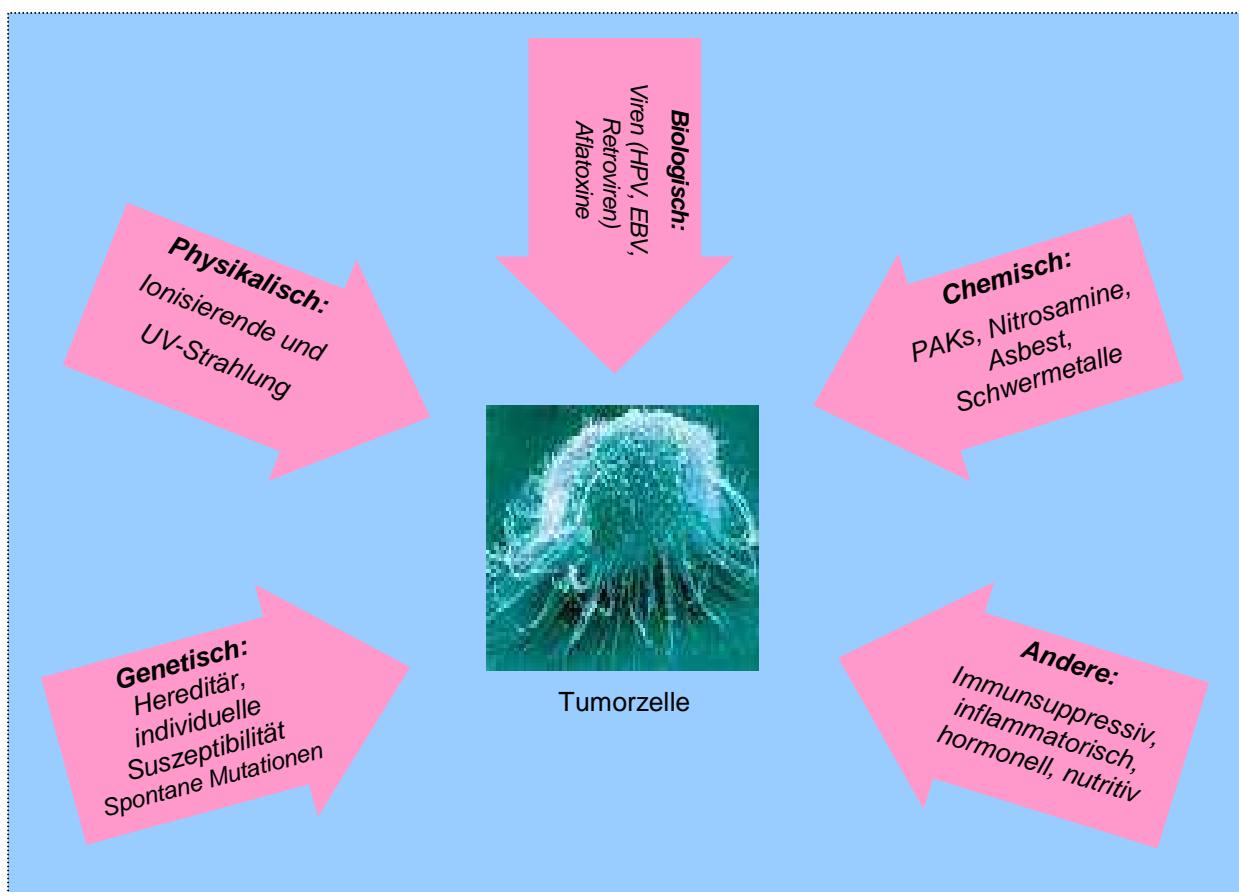


Abb. 1: Ursachen der Tumorentstehung nach Pitot und Dragan [Pitot, Dragan, 1991]

### 1.3.1 Exogene Ursachen der Tumorgenese im Kopf-Hals-Bereich

Alkoholkonsum und Rauchen sind die wichtigsten und bekanntesten exogenen Risikofaktoren im Rahmen der Karzinogenese des oberen Aerodigestivtraktes. Mehr als 80 % der Plattenepithelkarzinome von Mund, Rachen und Kehlkopf können auf den Einfluss von Alkohol und Tabak zurückgeführt werden [Thomas 1995].

Bisher wurden im Tabakrauch mehr als 4000 chemische Einzelkomponenten identifiziert [Green und Rodgman 1996], von denen mehr als 60 durch die International Agency for Research on Cancer (IARC) als krebserregend oder potentiell krebserregend eingestuft werden [IARC 2004, Smith 2003]. Zu den zahlreichen toxischen Verbindungen zählen unter anderem die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, mit ihrem bekanntesten Vertreter dem Benzo[a]pyren (B[a]P), sowie Nitrosamine und aromatische Amine, wie Toluidin und Naphtylamin. Des Weiteren enthält der Tabakrauch aliphatische Kohlenwasserstoffe, wie Formaldehyd, Chloroform und Acetaldehyd, außerdem Benzol, Vinylchlorid, Hydrazin, Ethylenoxid, Acrylamid, und weitere anorganische Substanzen und Metalle [Hoffmann et al. 1983, Hoffmann et al. 2001], die allesamt als potentiell krebserregend eingestuft werden. Dagegen besitzen alkoholische Getränke mit dem darin enthaltenen Ethanol sicher nachgewiesen direkte karzinogene Eigenschaften [IARC 2007c]. Weiterhin entfalten sich direkte karzinogene Effekte beim Alkoholgenuss einerseits durch Kontamination von alkoholischen Getränken mit z. B. B[a]P, N-Nitrosoverbindungen, Pestiziden oder Arsenverbindungen und andererseits durch Acetaldehyd, das beim Abbau des Alkohols durch die Alkoholdehydrogenase als Stoffwechselprodukt anfällt. Für Acetaldehyd sind sowohl eine mutagene, als auch eine karzinogene Wirkung nachgewiesen [IARC 1999]. Daneben besteht auch eine Wirkung als Kokarzinogen, das heißt es schädigt das Erbgut nicht direkt, trägt aber über zahlreiche Mechanismen entscheidend zur Krebsentstehung bei [Maier et al. 1990a]. Indirekte kanzerogene Effekte entstehen durch die Wirkung als Lösungsmittel für Karzinogene und dadurch bedingte erleichterte Penetration ins Zielgewebe [Hsu et al. 1991a]. Bei chronischem Alkoholkonsum kommt es zur Enzyminduktion (z. B. Zytochrom P450), die zur Katalyse der metabolischen Aktivierung von (Prä-)Karzinogenen führt. Zelluläre Reparaturmechanismen werden gehemmt, die Expositionsdauer des Zielgewebes gegenüber Noxen erhöht sich durch die alkoholisch bedingte Atrophie der Speicheldrüsen. Eine allgemeine

Immunsuppression durch chronischen Alkoholkonsum setzt ein. Die Aufnahme antikarzinogener Stoffe (Antioxidantien, Vitamine) ist durch Malnutrition bei starken Trinkern vermindert [Lieber et al. 1986, Poschl 2004], und es besteht eine Hyperregeneration im Gewebe, aufgrund von Zellschädigung durch Ethanol und seiner Metabolite. Durch diese Eigenschaften ist Alkohol als Kokarzinogen in der Lage, die Karzinogenese zu beeinflussen. Im Rahmen der Tumorinitiation, also zum Zeitpunkt, an dem ein initialer genetischer Schaden entsteht oder während der Tumorpromotion, die durch die Proliferation und klonale Expansion der genetisch veränderten Zelle gekennzeichnet ist, kann Ethanol durch seine besonderen Eigenschaften zu einer beschleunigten Tumorentwicklung führen [Riedel et al. 2004]. In zahlreichen Fall-Kontroll-Studien konnte als Ausdruck dieser Effekte ein überadditiver bzw. synergistischer Effekt von Alkohol und Rauchen im Bezug auf das Karzinomrisiko gefunden werden [Maier et al. 1990a, Maier et al 1999, Thomas 1995, Blot et al. 1988, Brugere et al. 1986]

Mögliche andere Umwelteinflüsse bestehen durch eine Vielzahl weiterer chemischer Kanzerogene (z. B. Asbest, Formaldehyd, Cadmium, Chrom und Nickel) oder in Form physikalischer Noxen, wie ionisierender oder UV-Strahlung, denen Einzelpersonen vor allem beruflich exponiert sind. Außerdem werden immer mehr onkogene Viren, zu denen unter anderem HPV-16, -18, -30, EBV, Hepadna-, Polyoma-, Herpes- und Retroviren zählen, entdeckt und als exogene biologische Faktoren angesehen, denen auch noch die Pilzgifte der Gruppe der Aflatoxine zugeordnet werden [Pitot et al. 1991]. Zudem geht man heute davon aus, dass etwa 30-40 % aller Krebserkrankungen durch eine ausgewogene Ernährung vermeidbar wären. Nach Studienlage ist eine adäquate Aufnahme an Retinol, Vitamin E, D<sub>3</sub>, C, Selen, Calcium, Ballaststoffen und mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie den Omega-3-Fettsäuren, mit niedrigeren Inzidenzen für unterschiedlichste Malignome verbunden [Divisi et al. 2006, Schantz et al 1997].

Für zahlreiche, im Tabakrauch enthaltene, Verbindungen und Elemente konnte bereits ein eindeutiger Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs nachgewiesen werden. Dennoch stehen diesen ebenso viele Tabakrauchbestandteile gegenüber, für die eine Karzinogenität noch nicht bewiesen oder ausgeschlossen worden ist.

### 1.3.2 Intrinsische Krebsursachen – Die individuelle genetische Suszeptibilität

Aufgrund epidemiologischer Studien weiß man, dass das Gros der Kopf-Hals-Tumore auf die anerkannten Karzinogene Tabakrauch und Alkohol [IARC 1986, 1988, 2004] zurückzuführen ist. Dennoch entwickelt der überwiegende Teil der Konsumenten kein Malignom. Aus dieser Erfahrung erwuchs die These, dass nicht allein äußere Einflüsse die Entstehung von bösartigen Tumoren bedingen, sondern dass auch endogene Faktoren auf den Prozess der Tumorgenese Einfluss nehmen. Diese interindividuellen Unterschiede in der genetischen und enzymatischen Ausstattung und Reaktion auf Umwelteinflüsse, die in einer höheren Empfänglichkeit der betroffenen Person gegenüber Karzinomen zum Ausdruck kommen, werden häufig unter dem Begriff genetische Suszeptibilität zusammengefasst. Auf der Basis molekularbiologischer Ergebnisse der vergangenen Jahrzehnte wurden des Weiteren die Begriffe der Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität als eigenständige ätiologische Mechanismen geprägt.

Die Mutagensensitivität beschreibt die Prädisposition zur Entstehung von DNA-Schäden. Erbgutschädigende Substanzen, Strahlung oder Viren können diese Schädigungen hervorrufen. Individuen mit einer erhöhten Mutagensensitivität tragen, bei gleicher Dosis, einen stärkeren Schaden als andere davon. Die genetische Suszeptibilität wird daher häufig als eigenständiger Risikofaktor für die Krebsentstehung angesehen [Hsu et al. 1991b]. Unterschiedliche, mögliche Pathomechanismen haben sich bisher in zahlreichen Studien als Ursachen identifizieren lassen:

- *Enzympolymorphismen*, die eine veränderte metabolische Aktivierung oder Detoxifikation von Xenobiotika zur Folge haben. So konnten für das Zytochrom-P450-System [Bartsch et al. 2000, Gattas et al. 2006], die Glutathion-S-Transferase (GST) [Cheng et al. 1999, Rojas et al. 2000, Jahnke et al. 1999], Alkohol- [Nishimoto et al. 2004] und Aldehyddehydrogenasen [Visapaa et al. 2004, Hashibe et al. 2006] genetische Enzymvarianten nachgewiesen werden, die mit einem erhöhten Krebsrisiko bzw. einer höheren Affinität zu (prä-) kanzerogenen Substraten und damit einer gesteigerten Konzentration an Mutagenen einhergehen.

- Eine *Expressionsänderung zellzyklusregulierender Gene* kann zur Funktionsänderung von Tumorsuppressorgenen, wie p53, führen. Deren Befähigung zum Zellzyklusarrest bei DNA-Schädigung, Induktion der DNA-Reparatur oder Einleitung der Apoptose wird infolge der Aktivitätsänderung abgeschwächt oder aufgehoben und begünstigt so die Persistenz von Mutationen [Friedlander 2001]. Bei etwa 60% der Kopf-Hals-Tumore konnte es mutiert nachgewiesen werden [Blons 2003]. Zudem zeigten Tumorpatienten mit p53-Mutationen ein signifikant höheres Risiko für lokale Rezidive [Brennan et al. 1995] und Zweitkarzinome [Homann et al. 2001]. Mit dem Li-Fraumeni-Syndrom ist auch ein hereditärer Defekt des p53-Gens bekannt, bei dem bereits in der Kindheit ein 20fach erhöhtes Risiko für die Entwicklung bösartiger Tumore besteht und mehr als 50% der Betroffenen Zweitumoren entwickeln. Auch für Sarkompatienten [Frebourg 1992] konnten bereits Keimbahnmutationen in p53 nachgewiesen werden.
- Unterschiede in der *DNA-Reparaturkapazität*, als Folge qualitativer oder quantitativer Mängel eines DNA-Reparatursystems, wurden 1983 durch Hsu [Hsu 1983] als Hypothese formuliert. Im Extremfall, wie bei der autosomal rezessiven Krankheit Xeroderma pigmentosum, besteht ein Defekt in der Nukleotidexzisionsreparatur und eine damit verbundene erhöhte Empfindlichkeit für UV-induzierte DNA-Schäden, weswegen die betroffenen Personen bereits in der Jugend multiple Hauttumoren entwickeln [de Boer et al. 2000]. Für die Kopf-Hals-Tumoren konnten in Fallkontrollstudien unterschiedliche Reparaturleistungen für DNA-Schäden, die durch Bleomycin [Wei et al. 1996] oder durch tabakspezifische Mutagene verursacht worden waren [Cheng et al. 1998, Harréus et al. 2001] in Lymphozyten zwischen Krebspatienten und der Kontrollgruppe gefunden werden. Zudem lies sich auch ein Zusammenhang zwischen genetischen Varianten des XRCC(X-ray repair cross complementing)-Genes und einem erhöhten Risiko für pharyngeale Tumore feststellen [Benhamou et al. 2004].

Stets muss man dabei jedoch berücksichtigen, dass die hier genannten endogenen Faktoren ebenfalls durch Umwelteinflüsse variabel sind. So kann z. B. eine regelmäßige Einwirkung von Noxen zur Induktion von Enzymen, wie der

Expressionsvariante CYP2E1 des Cytochrom P450 bei chronischem Alkoholgenuss [Seitz et al. 1998], führen, wodurch wiederum vermehrt mutagene Stoffe anfallen.

#### 1.4 Der Comet Assay zur Beurteilung von Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität

Im Jahre 1984 stellten Östling und Johanson mit der Einzelzellmikrogelektrophorese eine Methode vor, die es erlaubte mittels einer einfach und schnell durchführbaren Technik durch Bestrahlung entstandene DNA-Schäden sensitiv darzustellen. Siebetteten Zellen nach  $\gamma$ -Bestrahlung in eine dünne Agarose-Schicht und lysierten unter neutralen Bedingungen die Zellwände. Während der anschließenden Elektrophorese wanderten die negativ geladenen DNA-Bruchstücke

zur Anode. Dann färbten sie die DNA mit Acridin-Orange an und konnten so fluoreszenzmikroskopisch Doppelstrangfragmente nach Wanderung im elektrischen Feld darstellen [Östling et Johanson 1984]. In der Folgezeit wurde diese Technik zunehmend modifiziert. Durch Verlagerung weit ins alkalische Milieu hinein konnte eine stärkere Entwindung der DNA und somit eine verbesserte Darstellung von Einzelstrangbrüchen gelingen [Singh et al. 1988]. Olive prägte schließlich den Ausdruck „Comet“ Assay für die Einzelzellmikrogelektrophorese, da die gefärbten DNA-Fragmente nach der Elektrophorese einem Kometen ähneln. Die intakte DNA verbleibt im Bereich des ehemaligen Zellkerns. Die gewanderten Fragmente bilden einen „Kometenschweif“. Je stärker die Schädigung ausfällt bzw. je kleiner die DNA-Fragmente sind, desto schneller wandern sie im elektrischen Feld und umso prominenter erscheint der Schweif. Zur Beschreibung des Grades der Schädigung dient das (*Olive*) *Tail Moment*, für welches der prozentuale Anteil an DNA im Kometenschweif mit der mittleren DNA-Migrationsdistanz multipliziert wird [Olive et Banath 1983, Olive et al.



**Abb. 2:** Darstellung unterschiedlich stark geschädigter DNA im „Comet“ Assay.

et al. 1988]. Olive prägte schließlich den Ausdruck „Comet“ Assay für die Einzelzellmikrogelektrophorese, da die gefärbten DNA-Fragmente nach der Elektrophorese einem Kometen ähneln. Die intakte DNA verbleibt im Bereich des ehemaligen Zellkerns. Die gewanderten Fragmente bilden einen „Kometenschweif“. Je stärker die Schädigung ausfällt bzw. je kleiner die DNA-Fragmente sind, desto schneller wandern sie im elektrischen Feld und umso prominenter erscheint der Schweif. Zur Beschreibung des Grades der Schädigung dient das (*Olive*) *Tail Moment*, für welches der prozentuale Anteil an DNA im Kometenschweif mit der mittleren DNA-Migrationsdistanz multipliziert wird [Olive et Banath 1983, Olive et al.

1990]. Zudem konnte der Comet Assay auch zunehmend als Methode zur Detektion von DNA-Schäden und Reparaturvorgängen etabliert werden [Fairbairn et al. 1995]. Durch Pool-Zobel wurden erstmals Zellen des Kopf-Hals-Bereichs für die alkalische Einzelzellmikroelektrophorese verwendet [Pool-Zobel et al. 1994, Harréus et al. 1999]. Seit 1986 reifte der „Comet Assay“ zu einer schnellen, universell einsetzbaren Methode heran. In einer Zeit von zumeist weniger als 24 Stunden lassen sich DNA-Einzelstrangbrüche mit einer Sensitivität von annähernd 50 Brüchen je Zelle aus nahezu jedem menschlichen Gewebe darstellen. Durch Modifikation der Technik ist dies auch für Doppelstrangbrüche, Cross-Links, den Austausch von Basen und apoptotische Nuklei möglich. [Olive et al. 2006, Schmezer et al. 2001].

## 1.5 Kanzerogene Tabakrauchinhaltstoffe als Testsubstanzen

Tabakrauch ist als kanzerogenes Stoffgemisch, welches auch im Kopf-Hals-Bereich Tumore auslöst, bekannt [IARC 1986, 2004]. Um die genotoxischen Effekte des Tabakrauches an der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes und an Lymphozyten zu testen wurden mehrere Substanzen, die als kanzerogen eingestuft werden und zwei der wichtigsten Stoffgruppen in der tabakrauchvermittelten Karzinogenese des oberen Aerodigestivtraktes repräsentieren, ausgewählt.

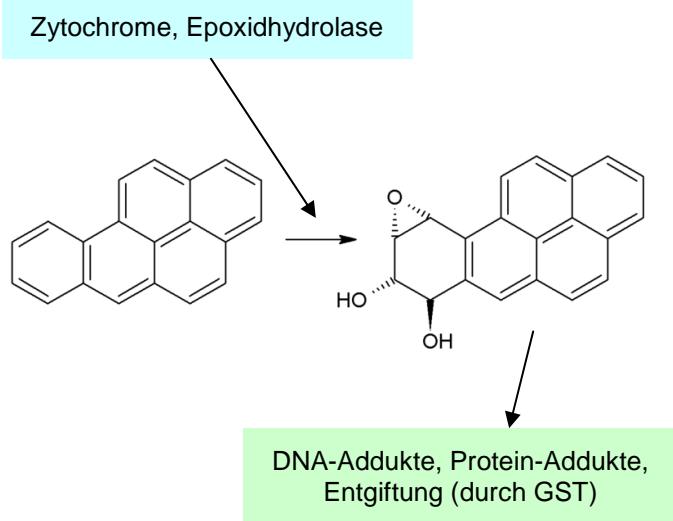
### 1.5.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAKs)

Die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe bilden eine Stoffgruppe organischer Verbindungen, die aus der Verbindung von Benzolringen hervorgehen und vorwiegend bei der unvollständigen Verbrennung organischer Materialien, wie Holz, Öl, Kohle und Tabak entstehen. Außerdem sind PAKs unter anderem in gebratenen, gegrillten und geräucherten Lebensmitteln und geröstetem Kaffee nachgewiesen worden [Sugimura 1982]. Die Leitsubstanz der PAKs ist das Benzo[a]pyren (B[a]P), welches aus fünf Benzolringen besteht. Die Aufnahme in den menschlichen Körper erfolgt hauptsächlich durch Inhalation mit dem Tabakrauch und abgasbelasteter Luft oder oral in Lebensmitteln. Daneben kann auch am Arbeitsplatz, vorwiegend bei der Verarbeitung von Öl, Kohle und Teerprodukten, eine Exposition stattfinden. Bereits in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts konnte

es in Abfallprodukten von Kokereien nachgewiesen werden, und wurde für erhöhte Inzidenzen bei Haut- und Lungenkrebs der Arbeiter in diesem Erwerbszweig verantwortlich gemacht. 1954 konnte es als erster PAK im Tabakrauch [Cooper et al. 1954] isoliert werden und wurde bald darauf in Verbindung mit der Entstehung von Karzinomen unterschiedlicher Lokalisationen gebracht. Heute weiß man, dass B[a]P selbst nicht reaktiv ist und bezeichnet es deshalb als Prokarzinogen, dessen kanzerogene Potenz sich erst nach metabolischer Aktivierung entfaltet [Yang et al. 1977]. Nach Aufnahme in die Zelle erfolgt durch die Enzyme CYP1A1 und CYP1B1 der Zytochrom-P450-Gruppe und Epoxidhydroxylasen in mehreren Schritten die Aktivierung [Shimada 2004] zum hochreaktiven und mutagenen Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE), das unter anderem auch spezifische DNA-Addukte bildet (Abbildung 3). So kann BPDE nach Deoxyguanosin-Adduktbildung zur Guanin-Thymin-Transversionsmutation unter anderem im p53-Tumorsuppressorgen

führen [Puisieux et al. 1991].

Über Glutathion-S-Transferasen ist eine Entgiftung möglich [Rubin 2001, Boström et al. 2002]. B[a]P wird seit kurzem als sicher karzinogen beim Menschen eingestuft (IARC Group 1) [IARC 2007b]. Labortechnisch konnte die DNA-schädigende Wirkung von B[a]P und BPDE sowohl an Lymphozyten [Wang et al. 1998, Cheng et al. 1998], als auch an Schleimhautzellen des oberen

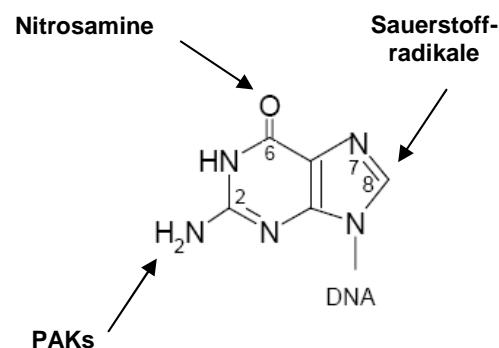


**Abb. 3:** Metabolische Aktivierung von Benzo[a]pyren zu Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE). Vereinfachte Darstellung

Aerodigestivtraktes [Harreus et al. 1999], bestätigt werden. Beide Stoffe wurden in der vorliegenden Arbeit zur Induktion von DNA-Schäden benutzt.

### 1.5.2 *N*-Nitrosamine

Die Nitrosamine sind eine große Gruppe kanzerogener Verbindungen, die aus der chemischen Verbindung sekundärer oder tertiärer Amine mit Nitrit hervorgehen. Im Tierversuch konnte für verschiedene Nitrosamine eine kanzerogene Wirkung an nahezu allen Geweben nachgewiesen werden [Schmäh et al. 1980]. Neben Tabakprodukten können auch Lebensmittel Nitrosamine enthalten. Diese treten vor allem einerseits aufgrund von Konservierungsverfahren, wie Pökeln oder Räuchern, auf und entstehen andererseits durch Erhitzen bei der Speisenzubereitung. Im Zigarettenrauch sind bisher mehr als 20 verschiedene Nitrosamine bekannt. Eine Sonderstellung nehmen 4-(*N*-Methylnitrosamino)-1-(3-Pyridyl)-1-Butanon (NNK) und *N*'-Nitrosonornicotin (NNN) ein. Sie gehen aus den im Tabak enthaltenen Aminen Nikotin und Nornikotin durch Nitrosierung hervor und werden deshalb auch als tabakspezifische Nitrosamine bezeichnet. Sie werden ausschließlich durch den Konsum von Tabakprodukten aufgenommen und entfalten ihre toxische Wirkung ebenfalls erst nach Cytochrom-P450-vermittelter Metabolisierung. Wobei die *N*-Nitrosamine durch die CYP2E1 Isoform des mehrere Isoenzyme umfassenden Cytochrom P450-Systems metabolisiert werden, die PAks dagegen durch die Isoformen CYP1A1 und CYP1B1. Durch CYP2E1 wird eine Hydroxylierung an einem der Aminogruppe benachbarten Kohlenstoffatom katalysiert. Die entstehenden Zwischenprodukte sind jedoch sehr instabil und zerfallen spontan zu Formaldehyd und einem ultimativen alkylierenden Karzinogen, das Addukte mit der DNA, vorzugsweise O<sup>6</sup>-Methylguanin, bildet und so zu DNA-Instabilität und Mutation führen kann [Hoffmann et al. 1985]. Neben NNN und NNK wurden in dieser Arbeit zwei weitere *N*-Nitrosoverbindungen eingesetzt. Zum einen das *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA), für das bereits eine genotoxische Potenz an Schleimhautzellen des Kopf-Hals-Bereiches nachgewiesen wurde [Harreus et al. 1999], und als zweites das *N*-Methyl-*N*'-Nitro-*N*-Nitrosoguanidin.



**Abb. 4:** Angriffspunkte verschiedener Kanzerogene am Guanin (nach Beach und Gupta [Beach, Gupta 1992])

(MNNG), welches ein direktes Karzinogen ist und durch Methylierung DNA-Addukte an Adenin oder Guanin bildet. MNNG wurde in dieser Studie als Positivkontrolle benutzt. NNK und NNN werden von der IARC als Karzinogene der Kategorie 1 (beim Menschen krebserregend), NDEA und MNNG als Karzinogene der Kategorie 2A (wahrscheinlich krebserregend) eingestuft [IARC 2007d].

## 1.6 Aufgabenstellung der Arbeit

Für die Entwicklung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich sind exogene Kanzerogene und eine individuelle Prädisposition verantwortlich. Diese genetische Suszeptibilität basiert im Besonderen auf den Variationen der enzymatischen Metabolisierung von Karzinogenen, der DNA-Stabilität und der Suffizienz von DNA-Reparaturmechanismen.

Ziele der vorliegenden Arbeit sind:

- Darstellung der genotoxischen Wirkung spezifischer Tabakrauchinhaltstoffe an humanen Schleimhautzellen und Lymphozyten mit Hilfe des Comet Assay.
- Nachweis eines möglichen Unterschiedes im Ausmaß der DNA-Schädigung zwischen Kontrollen und Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx als Ausdruck einer individuellen Mutagensensitivität.
- Bestimmung der DNA-Reparaturkapazitäten in vitro an Lymphozyten und Schleimhautzellen beider Versuchsgruppen.
- Können individuell unterschiedliche Suszeptibilitäten nach DNA-Schädigung durch Tabakkarzinogene bei Patienten mit versus ohne für Raucher typisches Plattenepithelkarzinom nachgewiesen werden?

Als Untersuchungsmaterialien dienen makroskopisch gesunde Schleimhautproben aus dem Oropharynbereich und Lymphozyten aus dem Vollblut derselben Probanden. Um typische DNA-Schädigungen zu induzieren, werden als Testsubstanzen Vertreter aus den Gruppen der *N*-Nitrosamine und polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, die spezifische Karzinogene des Tabakrauches darstellen, ausgewählt.

## **2 Materialien und Methoden**

### **2.1 Patienten- und Kontrollgruppe**

Insgesamt wurden 40 Personen für die Studie ausgewählt und konnten in zwei gleich große Gruppen aufgeteilt werden.

Die 20 Angehörigen des Kollektivs der Tumorpatienten befanden sich allesamt zur Operation eines Malignoms des Oropharynx in der Klinik. Im Rahmen der notwendigen Operation wurde jeweils eine makroskopisch gesunde Schleimhautprobe im Randbereich der Resektion nach R<sub>0</sub>-Schnellbiopsiebefund entnommen.

Die Personen der Kontrollgruppe stellten Schleimhaut- und Blutproben zur Verfügung, die im Rahmen einer Uvulopalatopharyngo-Plastik (16) oder einer Tonsillektomie (4) entnommen wurden.

Alle Proben wurden nur in Fällen entnommen, bei denen im Rahmen der OP randständige Schleimhaut anfiel. Zusätzliche Schleimhaut wurde nicht entnommen

Die freiwilligen Spender wurden gemäß Ethikkommissionsantrag (Nr. 073 / 00) präoperativ aufgeklärt. Zur Entnahme der Schleimhaut- und Blutproben für die durchgeführten Versuche willigten die Personen schriftlich ein.

In beiden Gruppen waren sämtliche Teilnehmer Tabakkonsumenten und tranken regelmäßig Alkohol. Über Art und Menge des konsumierten Alkohol und Nikotins gaben die Patienten in einem Anamnesebogen Auskunft. Auf diesem Wege wurden weitere relevante Informationen bezüglich schwerer Systemerkrankungen, vorausgangener Erkrankung an einem Malignom, Strahlentherapie oder Infektionserkrankungen, die als Ausschlußkriterien galten, erhoben werden.

## **2.2 Materialien und Reagenzien**

### **2.2.1 Zellmaterial**

Die verwendeten Schleimhautzellen stammen aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheit der Ludwig-Maximilians-Universität München und wurden operativ entnommen und für den Transport in das Labor in physiologischer Kochsalzlösung lichtgeschützt eingelegt. Gleichzeitig wurden jedem Probanden 20 ml Vollblut entnommen. Dem entnommenen Vollblut wurde Heparin zugesetzt, um seine Gerinnung zu verhindern.

### **2.2.2 Testsubstanzen**

Die eingesetzten Testsubstanzen waren:

<b>Testsubstanz</b>	<b>Hersteller</b>
4-( <i>N</i> -Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK)	Midwest Research Institute, Kansas, USA
Benzo[a]pyren (B[a]P)	Fluka, Neu-Ulm
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	Midwest Research Institute, Kansas, USA
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin (MNNG)	Fluka, Neu-Ulm
<i>N</i> -Nitrosodiethylamin (NDEA)	Sigma, Steinheim
<i>N</i> '-Nitrosonornicotin (NNN)	Midwest Research Institute, Kansas, USA

Für die Versuche an den Epithelzellen wurden Lösungen mit folgenden Konzentrationen der jeweiligen Substanz verwendet. Vorversuche der Arbeitsgruppe des Labors mit Miniorganen und Einzelzellen, Dosis-Wirkungskurven und Literaturangaben [Kleinsasser et al., 2001b] dienten als Grundlage für die Wahl dieser Konzentrationen. MNNG diente aufgrund seiner starken direkten alkylierenden Eigenschaften als Positivkontrolle. Als Negativkontrolle wurde DMSO, das Lösungsmittel für die Testsubstanzen, verwendet:

Benzo[a]pyren (B[a]P)	1 mM
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	9 µM
<i>N</i> '-Nitrosonornikotin (NNN)	10 mM
4-( <i>N</i> -Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK)	10 mM
<i>N</i> -Nitrosodiethylamin (NDEA)	50 µM
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin (MNNG)	0,035 mM

Zur Inkubation der Lymphozyten wurden folgende Konzentrationen verwendet:

Benzo[a]pyren (B[a]P)	0,5 mM
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	0,9 µM
<i>N</i> '-Nitrosonornikotin (NNN)	1 mM
4-( <i>N</i> -Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK)	1 mM
<i>N</i> -Nitrosodiethylamin (NDEA)	50 µM
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin (MNNG)	0,0035 mM

### 2.2.3 Chemikalien und Lösungen

Folgende Chemikalien und Lösungen wurden eingesetzt:

Chemikalie	Hersteller
Aqua ad injectabilia	Braun, Melsungen
Biocoll Separating Solution	Biochrom, Berlin
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethanol 96 %	Klinik-Apotheke der LMU-München
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethylendiaminetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na <sub>2</sub> EDTA)	Serva, Heidelberg
Low Melting Agarose: Sea-Plaque® GTG® (0,7 %)	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinhausen
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plätzchen (NaOH wasserfrei)	Merck, Darmstadt
N-Laurylsarcosin-Natrium-Salz (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> Br)	Sigma, Steinheim
Normal Melting Agarose: Seakem® LE (0,5 %)	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Trishydroxymethylaminomethan (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ), Trisma-Base	Merck, Darmstadt
Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethanol)	Sigma, Steinheim
Trypan Blue Stain 0,4 %: Trypanblau	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein

### 2.2.4 Enzyme, Medien und Zusätze

Folgende Enzyme, Medien und Zusätze wurden benutzt:

Enzyme, Medien und Zusätze	Hersteller
Fetal Bovine Serum (FCS)	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
Hyaluronidase aus Schafshoden	Roche, Mannheim
Kollagenase P aus Chlostridium histolyticum	Roche, Mannheim
MEM-Joklik (ohne L-Glutamin und NaHCO <sub>3</sub> )	Linaris, Bettingen am Main
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim

Phosphate buffered saline (PBS, ohne Ca, Mg und Natriumbikarbonat)	Gibco      BRL      Lifetechnologies, Eggenstein
Protease aus Streptomyces griseus	Roche, Mannheim
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI): W/NaHCO <sub>3</sub> , N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom, Berlin

### 2.2.5 Lösungen

#### Zusammensetzung und Herstellung der verwandten Lösungen:

##### Enzymlösung zur Gewinnung von Einzelzellen:

50 mg Protease

10 mg Hyaluronidase

10 mg Collagenase P

In 10 ml Joklik lösen, sterilfiltrieren und bis zur Verwendung im Wasserbad (37 °C) aufbewahren.

##### Elektrophoresepuffer:

24g NaOH (300 mM)

0,744 g Na2EDTA (1 mM)

In 2 Litern Aqua bidest. auflösen. Bei 4°C im Kühlschrank lagern.

##### Färbelösung:

50 ml Aqua bidest

10 ml Ethidiumbromid

Aufbewahrung bei 4 °C. Vor dem Färben entsprechende Portion nochmals im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. verdünnen.

### Lysepuffer:

1 ml Triton X-100  
10 ml DMSO

Im Messzylinder mit Lysestammlösung auf 100 ml auffüllen. Die Lösung wird unmittelbar vor der Anwendung hergestellt.

### Lysestammlösung:

146,4 g NaCl (2,5 M)  
1,2 g Trisma-.Base (10 mM)  
37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA (100 mM)  
10 g N-Lauroylsarcosin-Natrium-Salz

Zu 1 Liter Aqua bidest geben, anschließend mittels NaOH bzw. HCl pH-Wert auf 10 einstellen. Lagerung bei Raumtemperatur.

### MEM – Joklik:

10,98 g Pulvermedium: Joklik-MEM ohne L-Glutamin, ohne NaHCO<sub>3</sub>  
2 g NaHCO<sub>3</sub>  
10 ml Penecillin-Streptomycin

Bestandteile zu 1 Liter Aqua bidest geben, pH-Wert bei 7,20 – 7,25 einstellen und sterilfiltrieren.

### Neutralisationspufferlösung:

48,5 g Trisma-Base

990 ml Aqua bidest

Mit HCl bzw. NaOH auf pH-Wert 7,5 einstellen.

Lagerung bei Raumtemperatur.

### Tieffriermedium:

FCS

DMSO

Im Verhältnis 9:1 mischen

## 2.2.6 Verbrauchsmaterialien

### Folgende Verbrauchsmaterialien wurden gebraucht:

Materialie	Hersteller
Combitips (10 ml, 50 ml)	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser (24 x 70 mm), Glasdicke 0,08 0,12 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Diamantschreiber	Renner, Dannstadt
Einmalhandschuhe, Gentle Skin classic	Meditrade, Kiefersfelden
Einmalhandschuhe, Nitril powderfree	Latexha, Niederstotzingen
Einmalspritzen (10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten, steril, 0,22µm Filter, Millex®-GV, Millex®-GS	Millipore, Eschborn
Einmal-Wägeschalen aus Polystyrol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kryoröhrchen 2 ml	Nalgene, Rochester, USA
Mikrotiterplatte Cellstar® mit Abdeckplatte und 96 Vertiefungen, steril	Greiner, Frickenhausen
Objektträgerbox für 50 Objektträger	GLW, Würzburg
Objektträger geschnitten doppelseitiger Matrand mattiert (26 x 76 mm)	Langenbrinck, Emmendingen
Pasteurpipetten 5 ml	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	Renner, Dannstadt

Pipettenspitzen, steril, (20, 100, 1000 µl)	Brand GmbH, Wertheim
Reaktionsgefäß (1,5 ml, Safelock)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluß (13 ml, 15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluß (50 ml)	Greiner, Frickenhausen

### **2.2.7 Technische Geräte**

Folgende technische Geräte wurden benutzt:

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Analysenwaage Voyager	Ohaus, Gießen
Auswertungsprogramm Komet 3.1	Kinetic Imaging, Liverpool
Datenanalysesoftware SPSS 14.0	SPSS GmbH Software, München
Datenspeicherung: Excel	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Elektrophoresenetzteil E865	Consort nv, Turnhout, B
Elektrophoresekammer, horizontal	Renner, Dannstadt
Gefrierschrank ( - 80 °C)	New Brunswick Scientific , Nürtingen
Kühlschrank und Gefrierschrank (+4/-20 °C)	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer IKA-Combimag	IKA Labortechnik, Staufen
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Standartmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop DMLB	Leica, Heerbrugg, CH
Filtersystem N 2.1, Grünanregung BP 516-560, RKP 580 LP 580	Leica, Heerbrugg, CH
Objektive (40x/0,5; 10x/0,22; 4x/0,1)	Zeiss, Oberkochen
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht, Schorndorf
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Schüttler Vortex Genie2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage 1419	Sartorius, Gießen
Werkbank steril Herasafe	Heraeus, Hanau

Zählkammer nach Neubauer

Paul Marienfeld GmbH,

Lauda/Königshofen

Zentrifuge Varifuge 3,0 RS und 3,0 R

Heraeus, Hanau

### 2.3 Methodik

#### 2.3.1 Gewinnung von Einzelzellen

Die Schleimhautproben wurden zunächst mit dem Skalpell vom Bindegewebe getrennt und zu quadratischen Schleimhautstücken zurechtgeschnitten. Die Epithelstückchen wurden zur weiteren Aufspaltung in Einzelzellen für 45 Minuten in einer Enzymlösung inkubiert, welche aus 1 mg/ml Kollagenase P (Boehringer, Mannheim), 1 mg/ml Hyaluronidase (Boehringer, Mannheim) und 5 mg/ml Protease (Sigma, Steinheim), gelöst in 10 ml MEM-Joklik (Linaris, Bettingen am Main) bestand [Harreus et al. 1999]. Während dieser Inkubationsphase wurde die Zelllösung im Wasserschüttelbad bei 37 °C aufbewahrt.

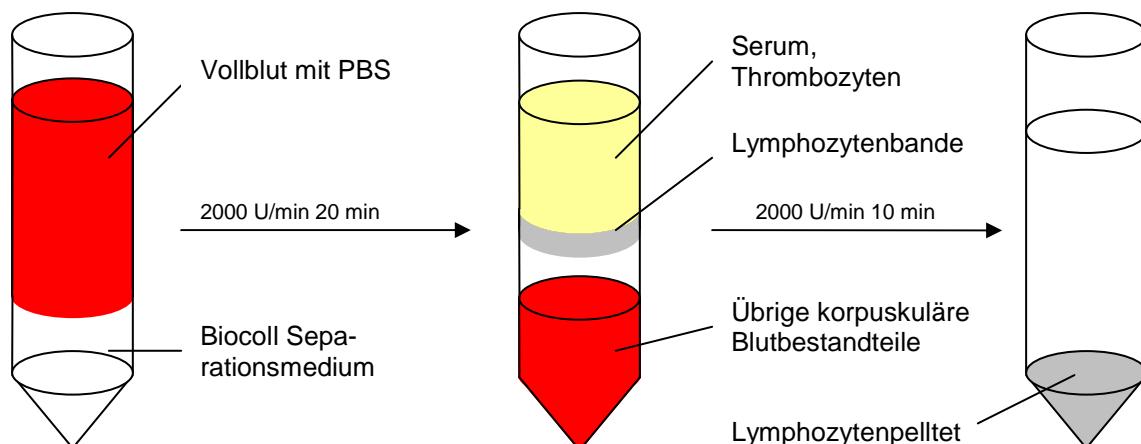
Nach dieser Zeit wurde die Zellsuspension durch eine sterile doppelagige Wundgaze in ein Zentrifugenröhrchen von 50 ml mit Schraubverschluss (Greiner, Frickenhausen) abgefiltert und bei 400 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml MEM-Joklik resuspendiert.

#### 2.3.2 Isolierung von Lymphozyten aus Vollblut

Zur Vorbereitung der Isolierung wurden in drei Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss (Greiner, Frickenhausen) jeweils 9 ml *Phosphat Buffered Saline* (PBS, Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenbstein), 15 ml *Biocoll Separating Solution* (Biochrom KG, Berlin) und nochmals 15 ml PBS vorgelegt.

Anschließend wurden 18 ml des heparinisierten Vollblutes in das erste Röhrchen, in dem sich gepufferte Salzlösung befand, gefüllt, und durch sanftes Schwenken gut vermischt. Die entstandene Suspension wurde, mittels Accujet und dazugehöriger Pipette (Greiner, Frickenhausen), vorsichtig in das zweite Zentrifugenröhrchen, mit darin befindlichem Separationsmedium (*Biocoll Separating Solution*, Biochrom KG,

Berlin), überführt. Dabei war zu beachten, dass sich die Vollblutlösung nicht mit dem darunter liegenden Separationsmedium vermischt, um für den anschließenden Zentrifugationsvorgang eine Trennschicht zu erhalten. Nach vollständigem Einfüllen der Vollblutsuspension wurde das Röhrchen 20 min bei 2000 U/min zentrifugiert. Um eine erneute Vermischung der korpuskulären Bestandteile zu verhindern, ließ man die Zentrifuge ohne Bremse auslaufen. Neben einer milchigen Schicht aus Lymphozyten und Monozyten, direkt über dem Separationsmedium, entstanden bei der Zentrifugation noch weitere Schichten. Direkt über den Lymphozyten bildete sich eine Bande bestehend aus Thrombozyten und Serum, den Bodensatz bildeten die Erythrozyten, die restlichen Leukozyten und Zelltrümmer.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung der Lymphozytenseparation

Mit einer Pasteurpipette (Merck, Darmstadt) wurde die Lymphozyten enthaltende Bande nun vorsichtig abpipettiert und in das dritte Gefäß überführt und anschließend bei 2000 U/min für 10 Minuten mit Bremse abzentrifugiert. Sämtliche Zentrifugationsvorgänge fanden bei 4 °C statt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Zellpellet in 1 ml fetalem Kälberserum (FCS, Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein) aufgelöst. Nach Auszählung von Vitalität und Zellmenge (siehe Kap. 2.2.3) wurde die Lymphozytensuspension mit Tieffriermedium, bestehend aus FCS und Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt), so verdünnt und portioniert, dass in einem Kryoröhrchen (1 ml, Nalgene, Rochester, USA) etwa  $2 \times 10^6$  Zellen/ml gelöst eingefroren werden konnten. Die

befüllten Kryoröhrchen wurden hierzu in einen speziellen Gefrierbehälter (Kryo –1 °C-Freezing-Container, Nalgene, Rochester, USA) gegeben, der eine geregelte Abkühlung des Inhaltes um 1 °C pro Stunde zulässt, und anschließend im –80 °C kalten Gefrierschrank gelagert.

### 2.3.3 Vitalitätsbestimmung und Zellzählung

In den Versuchen wurden festgesetzte Zellzahlen benutzt. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl diente die Neubauer-Zählkammer. Der Anteil vitaler Zellen wurde mit Hilfe des Trypanblauausschlusstest nach Philipps [Philipps 1973] bestimmt. Demnach kann die Färbelösung die Zellmembran avitaler Zellen durchdringen. Diese stellen sich dann blau dar. 50 µl der Zellsuspension wurden mit 50 µl Trypanblaulösung 0,4% vermischt und ein Tropfen des Gemischs auf der Zählkammer ausgebracht. Anschließend wurde unter dem Lichtmikroskop in 4 Eckquadranten die Anzahl der Zellen ausgezählt, durch 4 dividiert und anschließend mit dem Faktor  $2 \times 10^4$  multipliziert. Es ergibt sich die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension. Die Vitalität in Prozent wurde durch Division der Anzahl der vitalen Zellen durch Anzahl der avitalen und anschließende Multiplikation mit 100 errechnet.

Je nach erzählter Menge erfolgte daraufhin die Verdünnung des Zellpellets auf die gewünschte Konzentration mit dem jeweiligen Medium.

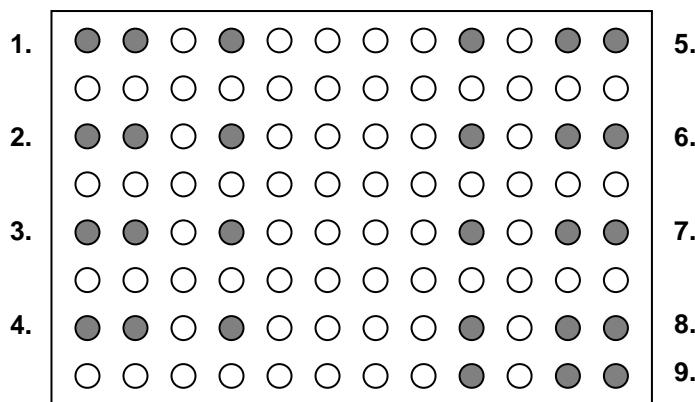
Die Vitalitätsbestimmung erfolgte außerdem im Anschluss an die Auswaschung der Fremdstoffe.

### 2.3.4 Exposition und Reparatur an menschlichen Oropharynxepithelzellen

#### 2.3.4.1 Fremdstoffexpositionsversuch

Nachdem durch enzymatische Aufspaltung Einzellzellen gewonnen und deren Vitalität bestimmt worden war, wurde die Zellsuspension mittels MEM-Joklik (Linaris, Bettingen am Main) soweit verdünnt, dass sich pro 100 µl Zellsuspension eine Zahl von  $5-10 \times 10^4$  Zellen ergab. Jeweils 100 µl der Zellsuspension wurden in die Wells einer Mikrowellplatte (Nunc, Wiesbaden) pipettiert und anschließend mit den

Fremdstoffen beimpft. Hierbei wurden jeweils drei Proben pro Agens angesetzt (siehe Abb.6), wovon jeweils zwei für den Comet-Assay bestimmt waren. Die dritte diente der erneuten Vitalitätsbestimmung nach Fremdstoffexposition.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Befüllung der Microwellplatten zur Testung der Oropharynxepithelzellen (grau hinterlegte Punkte kennzeichnen eine befüllte Vertiefung der Platte). Die Zahlen bezeichnen die jeweiligen Testsubstanzen. Die abgesonderten, befüllten Wells kennzeichnen die Suspension einer Testsubstanz, die der Vitalitätsbestimmung zugeführt wurde

Bei den getesteten Substanzen handelte es sich um:

1. DMSO (Dimethylsulfoxid, Merck, Darmstadt) als Kontrollsubstanz
  2. BaP (Benzo-[a]-pyren, Fluka, Neu-Ulm)
  3. BPDE (Benzo-[a]-pyren-r-7,t-8-dihydrodiol-t-9,10-expoid, Midwest Research Institute, Kansas, USA)
  4. NNN (*N*'-Nitrosonornikotin, Midwest Research Institute, Kansas, USA)
  5. NNK (4-(*N*-Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butonon, Midwest Research Institute, Kansas, USA)
  6. MNNG (*N*-Methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidin, [C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
  7. NDEA (*N*-Nitrosodiethylamin, [C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
  8. NDEA mit einer Reparaturzeit von 15 min
  9. NDEA mit einer Reparaturzeit von 30 min

Nachdem die Mikrowellplatte mit Zellsuspension und den Noxen gefüllt worden war, wurde diese für 60 Minuten bei 37 °C im Schüttelwas serbad platziert. Nach dieser

Zeit wurde die Mikrowellplatte dem Wasserbad entnommen und die Zellsuspensionen in vorbereitete und markierte Röhrchen mit Schraubverschluss (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Sodann wurden die Vertiefungen nochmals mit 100 µl Medium ausgespült, um noch in den Wells befindliche Zellen zu resuspendieren, und in die jeweiligen Röhrchen pipettiert. Nun wurden die Röhrchen für 5 min bei 400 U/min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde vom Zellpellet abpipettiert. Ein Pellet jeder Versuchssubstanz wurde der Vitalitätsbestimmung zugeführt. Die Zellen der übrigen Röhrchen wurden, in Low Melting Agarose (DIFCO, Detroit, USA) eingebettet und später der Elektrophorese zugeführt (siehe Kap. 2.3.7, 2.3.8).

### 2.3.4.2 DNA-Reparaturversuch mit oropharyngealen Epithelzellen

Die verbleibenden sechs Zellpellets wurden mit 200 µl Medium resuspendiert und ein zweites Mal für fünf Minuten bei 400 U/min zentrifugiert, um die Noxe auszuwaschen. Danach wurde erneut resuspendiert und die Zellsuspensionen für ihre jeweilige Reparaturdauer von 15 bzw. 30 Minuten in das Schüttelwasserbad verbracht. Nach entsprechender Zeitdauer wurden die Zellsuspensionen jeweils wiederum zentrifugiert und ebenfalls mittels Low Melting Agarose zur weiteren Bearbeitung auf Objektträgern fixiert.

## 2.3.5 Fremdstoffexpositions- und DNA-Reparaturversuche an Lymphozyten

### 2.3.5.1 Fremdstoffexposition der Lymphozyten

Sämtliche Expositions- und Reparaturversuche mit Lymphozyten, wie auch mit den Zellen der Schleimhautproben, wurden, zur Vermeidung einer DNA-Schädigung durch ultraviolette Strahlung, unter Rotlicht durchgeführt. Initial wurde dem -80 °C-Gefrierschrank ein Kryoröhrchen mit einer Portion Lymphozyten entnommen und bei Raumtemperatur aufgetaut. Die weitere Bearbeitung wurde begonnen, sobald sich die letzten Eiskristalle gelöst hatten. Diese frisch aufgetaute Lymphozytensuspension wurde in 9ml, 4 °C kaltem, PBS gelöst und bei 2000 U/min und 4 °C 10 min zentrifugiert, um die Lymphozyten vom Tieffriermedium und dem darin enthaltenen zytotoxischen DMSO zu trennen. Der entstandene Überstand wurde verworfen, und

das aus Lymphozyten bestehende Zellpellet in 1 ml Nährmedium, bestehend aus RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institute 1640: w/NaHCO<sub>3</sub>, N-Acetyl-L-Alanyl-L-Glutamin, Biochrom, Berlin) und einem 15-prozentigem Anteil an FCS (Fetal Calf Serum, Gibco Lifetechnologie, Eggenstein), resuspendiert, und mittels Trypanblau-Ausschlußtest Vitalität und Zellzahl bestimmt. Anschließend wurde die Zellsuspension mit dem Medium so weit verdünnt, dass sich eine Zellzahl von etwa 5 × 10<sup>4</sup> pro 100 µl Suspension ergab. Während des Zentrifugierens war in eine ausreichende Anzahl Zentrifugenröhrchen (13 ml, Sarstedt, Nümbrecht) jeweils 900 µl Nährmedium vorgelegt worden. Nun wurde diesen jeweils 100 µl der Zellsuspension hinzugefügt und abschließend die Ansätze mit 100 µl der Fremdstoffe, die in vorgegebener Konzentration in DMSO gelösten waren, beimpft. Es wurden die gleichen Fremdstoffe benutzt, wie auch bei dem toxikologischen Test an den Epithelzellen. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 °C wurde bei 2000 U/min und 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Einer der jeweils drei Ansätze je Fremdstoff diente der Bestimmung der Vitalität mittels Trypanblau. Die restlichen zwei Pellets wurden in Agarose eingebettet auf Objekträgern ausgebracht. Die Fixierung, Zellyse und Elektrophorese erfolgte, wie in den Kapiteln 2.3.7 bzw. 2.3.8 beschrieben.

### 2.3.5.2 DNA-Reparatur mit humanen Lymphozyten

Hierbei sollte anhand von Lymphozyten Fähigkeit und Ausmaß der Reparatur von DNA-Schäden verifiziert werden. Als Noxe diente NDEA (*N*-Nitrosodiethylamin, [C<sub>4</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>], Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim). Im Anschluss an eine Expositionsdauer von 60 Minuten wurde der Fremdstoff ausgewaschen und den Zellen Reparaturzeiten von 0, 15, 30 bzw. 60 Minuten gewährt. Wie bei der Fremdstoffexposition der Lymphozyten wurden die Zellen aus dem -80 °C-Gefrierschrank aufgetaut, und sofort in ein Lymphozytenröhrchen mit 9 ml 4 °C kaltem PBS überführt und bei 2000 U/min für 10 Minuten ohne Bremse zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und in 1000 µl Nährmedium (RPMI mit 15 %igem Anteil an FCS) resuspendiert. Unter dem Mikroskop wurden Zellzahl und Vitalität bestimmt. Dann wurde die Zellsuspension durch das Nährmedium so weit verdünnt, dass sich pro Versuchsansatz von 100 µl eine Zellzahl von etwa 5 × 10<sup>4</sup> ergab.

Während des Zentrifugierens war, durch Vorlegen von 900 µl des Nährmediums, eine entsprechende Anzahl an Versuchsröhrchen vorbereitet worden. Nun wurden jeweils 100 µl Zellsuspension hinzugefügt und anschließend dem Kontrollansatz 100 µl physiologische Kochsalzlösung zugegeben. In die restlichen Versuchsansätze wurden 100 µl einer 75 mmol NDEA-Lösung pipettiert. So ergaben sich insgesamt 15 Ansätze. Jeweils drei Röhrchen pro Reparaturzeitdauer und drei als Kontrolle, von denen eines für die Auszählung der Vitalität bestimmt war, die anderen zwei durchliefen den Comet Assay.

Alle Ansätze wurden im Schüttelwasserbad bei 37 °C für 60 Minuten mit den Versuchssubstanzen inkubiert. Nach Ablauf der Zeit, wurden die Zellen für 5 Minuten bei 2000 U/min und 4 °C abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert, und mit 5 ml 4 °C kaltem PBS resuspendiert. Mit den selben Vorgaben wurde nochmals zentrifugiert. Diese Prozedur des Auswaschens des Fremdstoffes wurde ein zweites Mal wiederholt. Bei drei der Versuchsansätze wurden die Zellpellets nach dem Waschen wieder in dem Medium gelöst und zurück ins Wasserschüttelbad verbracht. Dort verblieb die Zellsuspension bis zum Ablauf der jeweiligen Reparaturzeit von 15, 30 und 60 Minuten. Nach Vollendung der Reparaturdauer wurde für 5 Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert und, nach Abpipettieren des Überstandes, das Pellet auf Objekträgern für die nachfolgenden Arbeitsschritte fixiert (siehe Kap. 2.3.7, 2.3.8). Der Kontrollansatz und der Versuchsansatz ohne Reparatur wurden direkt im Anschluss an die Inkubationszeit nach dem ersten Zentrifugieren in Agarose eingebettet.

### 2.3.6 Vorbereitung der Objekträger

Zur Vorbereitung wurden Objekträger (Langenbrinck, Emmendingen) mit 24 x 70 mm, an den Längskanten jeweils 5 mm mattiert, mit 85 µl einer High Melting Agarose (DIFCO, Detroit, USA) beschichtet und für mindestens drei Tage zum Aushärten, bei Raumtemperatur, abgelegt. Die mattierten Ränder der Objekträger begünstigten durch ihre raue Oberfläche ein besseres Anhaften der Agarose. Zugleich diente diese erste Schicht den folgenden als Basis für besseren Halt.

### 2.3.7 Einbettung und Lysierung der Einzelzellen

Nach Beendigung der Fremdstoffexposition bzw. Abschluss des Reparaturintervalls wurden die Zellen in 75 µl Low Melting Agarose (DIFCO, Detroit, USA) aufgenommen und auf die vorbereiteten Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt, um eine gleichmäßige Verteilung der Suspension auf den Objektträgern zu gewährleisten. Es folgte eine zweite Agaroseschicht von 85 µl Low Melting Agarose. Vor dem aufbringen der letzten Schicht und nach Antrocknen ebendieser wurden die Deckgläschen jeweils vorsichtig entfernt. Die beschichteten Objektträger wurden senkrecht in Färbekammern mit 100 ml, einer frisch angesetzten alkalischen Lyselösung (2,5 M NaCl, 100 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 1 % N-Lauroyl-sarcosinsalz, 10 mM Trisma-Base, 1 % Triton-X und 10% DMSO, pH 10) überführt. Die Lyselösung ließ man so für die Dauer von mindestens einer Stunde lichtgeschützt in einen 4 °C kalten Kühlschrank (Bosch, Stuttgart) einwirken, bevor man die eingebetteten Zellen der Einzelzellmikrogelelektrophorese zuführte.

### 2.3.8 Die alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese

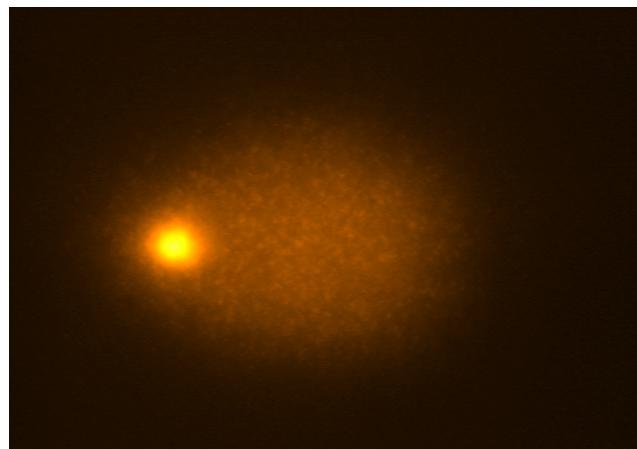
Um eine Abschätzung substanzinduzierter Schäden, im Sinne von Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen der DNA möglich zu machen, wurde die alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese, benutzt. Waren die Zellmembranen nach einer Stunde lysiert, wurden die Objektträger aus den Kammern entnommen und horizontal in Richtung Anode in einer eiswassergekühlten Elektrophoresekammer (Renner, Darmstadt) ausgelegt. Dann wurde die Kammer mit gekühlter Elektrophoresepufferlösung (300 mM NaOH, 1 mM NA2EDTA, pH 12) soweit aufgefüllt, dass die Objektträger durch die Lösung bedeckt waren. Nach 20-minütiger Wartezeit, die der Denaturierung der DNA durch die alkalische Pufferlösung diente, wurde die Elektrophorese für ebenfalls 20 min gestartet (300 mA, 25 V). In Färbekammern wurden die Objektträger in kurzen zeitlichen Abständen dreimal mit einer Neutralisationspufferlösung (400 mM Trisma-Base mit einem pH von 7,5) gewaschen.

Aus der Ethidiumbromid-Stammlösung wurde, durch Verdünnung mit Aqua bidest im Verhältnis 1:10 und anschließende Mikrofiltrierung (Einwegfilter 0,22 µm, Milipore,

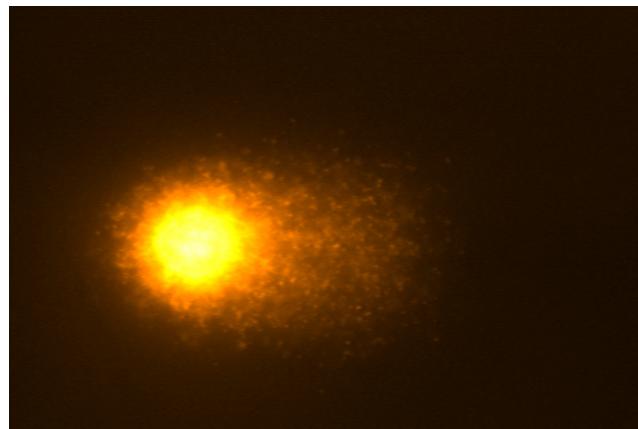
Eschborn) die gebrauchsfertige Färbelösung hergestellt. Die Färbung der Objektträger erfolgte mit 75 µl Ethidiumbromid (Sigma, Steinheim). Diese wurden bis zur digitalen Auswertung in Objektträgerkästen lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt. In die Objektträgerkästen war zusätzlich ein mit Aqua bidest angefeuchtetes Zellstofftuch gelegt worden, um durch ein feuchtes Klima ein Austrocknen der Träger zu verhindern. Die Lagerung erfolgte für maximal 7 Tage.

## 2.4 Digitale Auswertung der DNA

Die digitale Auswertung der präparierten Objektträger erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop DMLB (Leica, Heerburg, CH) mit daran angebrachter CCD-Kamera. Dabei wurde ein digitales Bildverarbeitungsprogramm (Comet 3.1, Kinetic Imaging, Liverpool, UK) verwendet. Die Nukleinsäuren der DNA waren bereits zuvor mittels Ethidiumbromidfärbung markiert worden und fluoreszierten im UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm orange-rot. So ließen sich unterschiedliche Zellfragmente bei der Auswertung erfassen.



*Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopisch dargestellter Komet stark geschädigter DNA*



*Abb. 8:* Mittelgradig geschädigte DNA in der Fluoreszenzmikroskopie



*Abb. 9:* Zelle mit ungeschädigter DNA in der Fluoreszenzmikroskopie

Geschädigte Zellen stellen sich unter dem Mikroskop kometenähnlich dar. Abhängig von Anzahl und Größe der entstandenen DNA-Fragmente ergaben sich Kometen mit unterschiedlich großem Schweif. Zahlreiche DNA-Strangbrüche mit kurzer Fragmentlänge begünstigten rasches Wandern im elektrischen Feld der Elektrophorese. Wenig oder nicht geschädigte DNA dagegen wandert aufgrund der Größe der Fragmente langsamer. So stellen sich Zellkerne mit einer geringen Schädigung der DNA punktförmig dar.

Um eine quantitative Aussage über den Schädigungsgrad der DNA zu erlauben, wurde der Olive Tail Moment (OTM) als Produkt der mittleren DNA-

Wanderungsstrecke und der relativen Fluoreszenzdichte im Kometenschweif berechnet [Olive 2002]. Hierbei erhält man die relative Fluoreszenzdichte, indem die DNA-Intensität im Kometenschweif durch die gesamte DNA-Intensität dividiert wird (Formel Abb. 10).

$$OTM = \frac{DNA \text{ im Kometenschweif}}{Gesamt - DNA} \times \text{Mittlere Wanderungsstrecke der DNA}$$

**Abb. 10:** Formel zur Berechnung des Olive Tail Moments

Im Rahmen der Auswertung wurden je Objektträger 40 Zellen mit Hilfe des Auswertungsprogramms Komet 3.1 (Kinetic Imaging, Liverpool) erfasst und der OTM computergestützt ermittelt und gespeichert. Insgesamt ergaben sich so, bei zwei Objektträgern je getester Substanz bzw. Reparaturzeit, 80 OTM-Werte über die der Mittelwert und Median berechnet wurde. Auf diese Weise konnte ein Durchschnitts-OTM pro Versuchsansatz ermittelt werden. Im Falle der Reparaturversuche erfolgte zusätzlich eine Unterteilung der 80 erfassten OTM-Werte in mehrere Gruppen, von Intervallen mit folgenden Grenzen: OTM  $0 < x < 2$ , OTM  $2 < x < 5$ , OTM  $5 < x < 10$ , OTM  $10 < x < 20$ , OTM  $20 < x < 30$ , OTM  $x > 30$ , wobei  $x$  den erhobenen OTM-Wert repräsentiert. Im Rahmen eines internationalen Workshops für Tests zur Erfassung von Genotoxizität (*International Workshop on Genotoxicity Test Procedures [IWGTP]*) wurden durch Comet-Assay-Group Werte des OTM  $< 2$  für Zellen ohne bzw. mit vernachlässigbarer Schädigung festgelegt [Tice et al. 2000]. Die übrigen Intervalle beinhalteten Zellen mit zunehmender Schädigungsstärke. Die Speicherung der Daten, sowie das Errechnen der Mittelwerte, der Mediane und die Verteilung der OTM-Werte erfolgte durch das Tabellenkalulationsprogramm Excel™ (Microsoft Deutschland GmbH).

## 2.5 Statistische Auswertung der Daten

Die weitere statistische Auswertung wurde mit Hilfe der Analysesoftware SPSS 14.0 durchgeführt. Die OTM-Werte der Kontroll- und der Tumorgruppe wurden zunächst

gegenüber gestellt und mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors auf Normalverteilung untersucht. Es ergaben sich signifikante ( $p < 0,05$ ), nicht normalverteilte, und nicht signifikante, normalverteilte Werte (Tab. 2 und 3).

So waren zur weiteren Auswertung nichtparametrische Tests am besten geeignet. Der Vergleich von Mittelwerten und Medianen von Patienten und Kontrollpersonen erfolgte durch den Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben. Dieser Test wurde für die Vergleiche der Mutagenensensitivitäten und Reparaturkapazitäten angewendet.

Für Normalverteilte Werte wurde der t-Test angewendet. Zum Vergleich der Schleimhautproben- und Lymphozytenwerte des Patientenkollektivs wurde der Korrelationskoeffizient benutzt.

Ein signifikanter Unterschied sollte jeweils dann vorliegen, wenn die von SPSS errechnete Irrtumswahrscheinlichkeit  $p$  unter dem Signifikanzniveau von 5% liegt, d. h. wenn  $p \leq 0,05$ .

Die statistische Analyse erfolgte nach Prüfung und Freigabe durch das Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

## 3 Ergebnisse

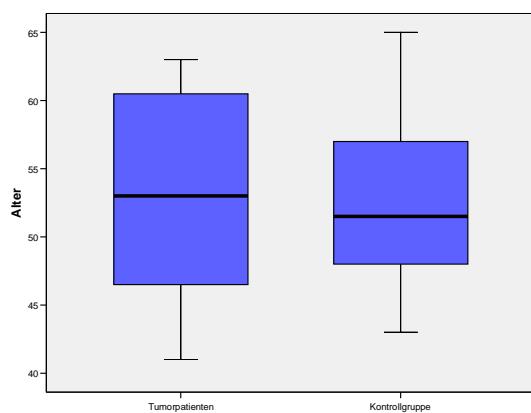
### 3.1 Charakteristika der Patienten und der Kontrollgruppe

Für die Tests wurden ausschließlich Zellen von männlichen Versuchspersonen verwendet, die zum Zeitpunkt der Teilnahme an dieser Studie Raucher waren und regelmäßig Alkohol konsumierten. Die Patientengruppen waren nach Geschlecht, Alter, Alkohol- und Tabakkonsum gematcht.

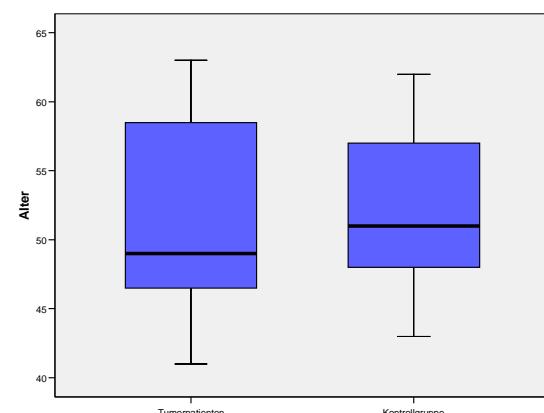
Für die Untersuchung der Schleimhautzellen standen 20 Patienten und 20 Kontrollpersonen zur Verfügung, während für die Versuche an Lymphozyten die Daten von jeweils 15 Patienten und 15 Kontrollpersonen ausgewertet wurden.

Bei den Versuchen mit Schleimhautzellen lagen Altersdurchschnitt und -median der Patienten beide bei 53 Jahren, während diese Werte bei der Kontrollgruppe bei 52 Jahren lagen.

Die für die Lymphozytenuntersuchung hinzugezogenen Patienten hatten einen Altersmittelwert von 52 und einen Median von 49 Jahren. Die zugehörige Kontrollgruppe wies ebenfalls einen Mittelwert von 52 Jahren auf und einen Median von 51 Jahren. Einen genaueren Einblick in die Altersstrukturen der jeweiligen Gruppen liefern nachfolgende Boxplot-Diagramme.



**Grafik 1:** Altersverteilung im Schleimhautversuch.



**Grafik 2:** Altersverteilung in der Gruppe des Lymphozytenversuchs.

Der Boxplot (auch Box-Whisker-Plot) ist ein Diagramm, das zur graphischen Darstellung einer Reihe numerischer Daten verwendet wird. Die „Box“ umfasst 50 % der Daten. Die breite horizontale Linie in der Box bezeichnet den Median der Werte. Die vertikalen Linien oberhalb und unterhalb der Box stellen jeweils 25%, also jeweils ein Quartil der Werte dar. Werte die mehr als 3 Boxlängen vom äußeren Ende der Box entfernt sind heißen Extremwerte und werden als Sternchen gekennzeichnet. Ausreißer sind mehr als 1,5 und weniger als 3 Boxlängen vom Boxende entfernt und werden mit einem Kreis markiert.

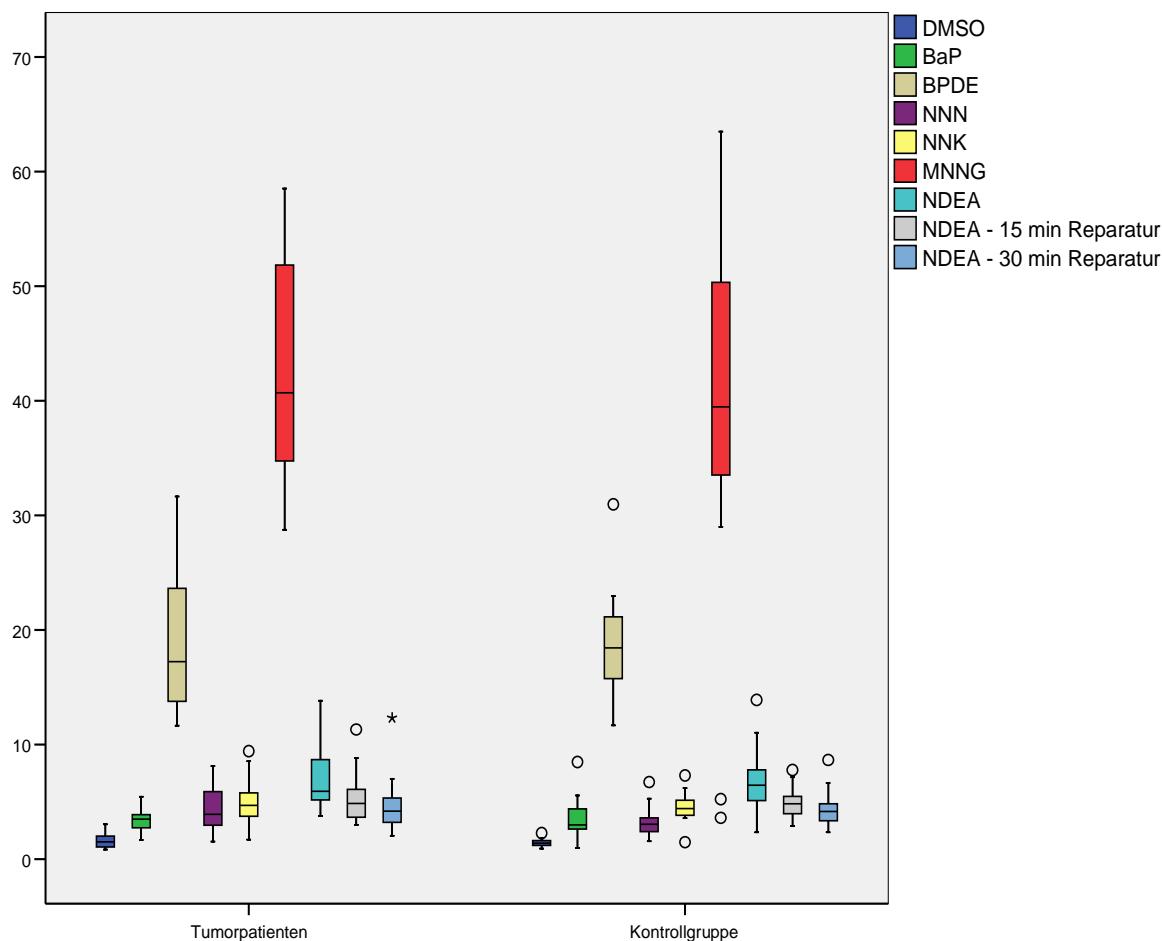
### 3.2 Ermittlung des Schädigungspotentials der eingesetzten Substanzen

Zur Ermittlung des genotoxischen Schädigungspotentials der eingesetzten Fremdstoffe wurden die Mittelwerte der Schädigungen zu den in der Negativkontrolle mit DMSO ermittelten Werten ins Verhältnis gesetzt. Zur Berechnung eines Signifikanzniveaus wurde der Mann-Whitney-U-Test herangezogen. Aus den folgenden Tabellen und Grafiken ist ersichtlich, dass die eingesetzten Substanzen stets hoch signifikante Schädigungswerte auslösten.

#### 3.2.1 Mittleres Schädigungsniveau der verwendeten Substanzen in den Versuchen an Schleimhautzellen im Vergleich zur Kontrollgruppe

	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA (0min)	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Tumorpatienten	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Kontrollgruppe	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

**Tab. 1:** Signifikanzniveau der Schädigungsstärke der Substanzen in den Schleimhautversuchen ( $p<0,001$  entspricht einem sehr hohen Signifikanzniveau.)

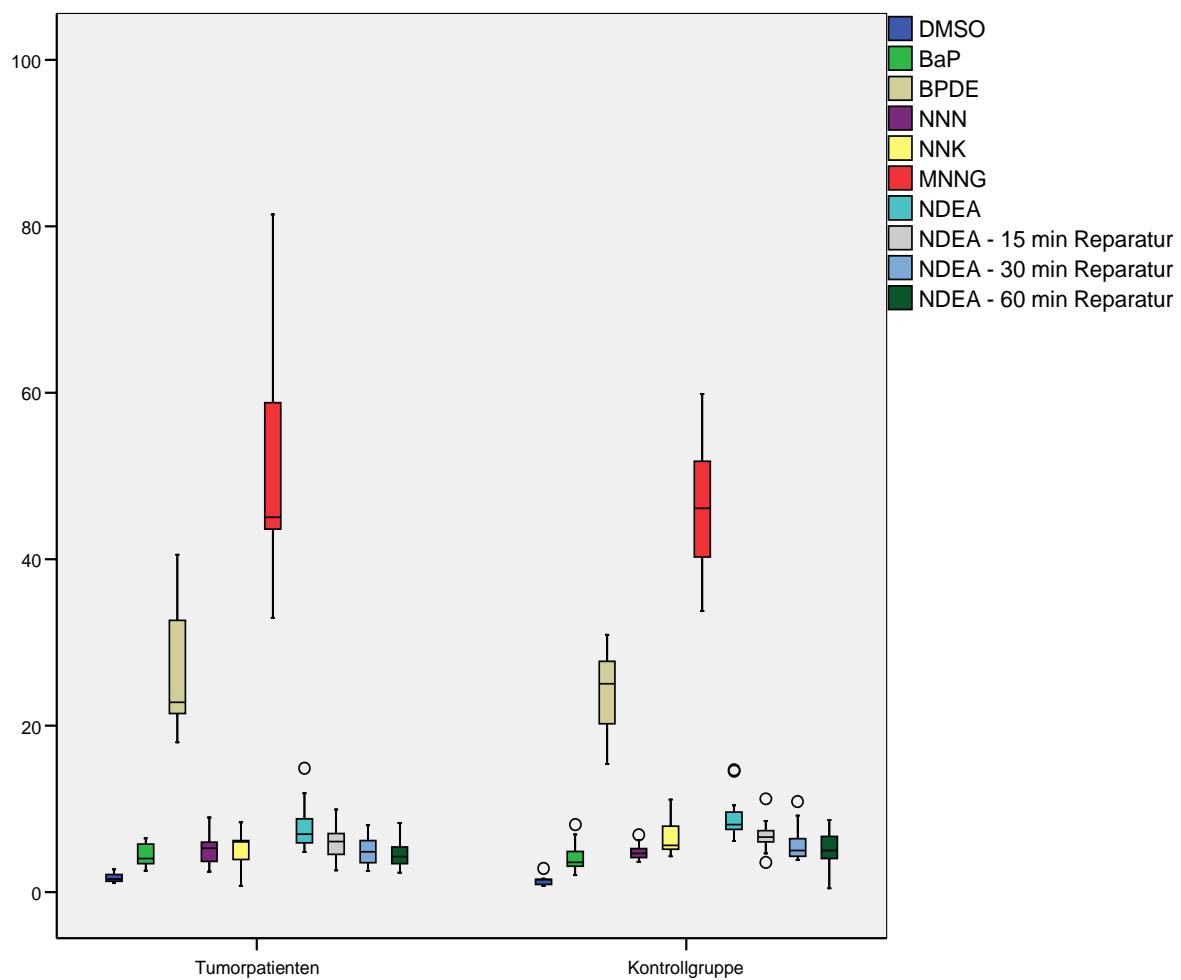


**Grafik3:** Vergleich des Schädigungsniveaus der Fremdsubstanzen in den Versuchen an Schleimhautzellen

### 3.2.2 Mittleres Schädigungsniveau der verwendeten Substanzen in den Versuchen an Lymphozyten im Verhältnis zur Kontrollgruppe

	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA (0min)	NDEA (15min)	NDEA (30min)	NDEA (60min)
Tumorpatienten	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Kontrollgruppe	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

**Tab. 2:** Signifikanzniveau der Schädigungsstärke der Substanzen in den Lymphozytenversuchen ( $p<0,001$  entspricht einem sehr hohen Signifikanzniveau).



Grafik 4: Vergleich des Schädigungsniveaus der Fremdsubstanzen in den Versuchen an Lymphozyten.

### 3.3 Mutagensensitivität von Schleimhautzellen und Lymphozyten

#### 3.3.1 Vergleich der Zellvitalitäten von Patienten und Kontrollpersonen

Die Tests mit Schleimhautzellen erfolgten ausschließlich an Frischbiopsien. Die Zellen hatten initial immer eine Vitalität von 100%.

Die Lymphozyten hingegen waren größtenteils zunächst eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt getestet worden. Demzufolge waren hier die Zellvitalitäten unterschiedlich. Proben mit einem Anteil vitaler Zellen von unter 80% wurden ausgeschlossen.

Es wurde mittels t-Test geprüft, ob die Vitalitäten von Patienten und Kontrollpersonen signifikant anders verteilt waren oder nicht, da ein signifikanter Unterschied eventuell auch Auswirkungen auf die OTM-Mittelwerte und –Mediane der geschädigten Zellen gehabt hätte.

Getesteter Fremdstoff	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA	NDEA (15min)	NDEA (30min)	NDEA (60min)
Signifikanz	0,667	0,260	0,060	0,940	0,342	0,563	0,647	0,489	0,937	0,654

**Tab. 3:** Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeiten des t-Tests für die Mittelwertgleichheit bei unabhängigen Stichproben für die Gegenüberstellung der Vitalitäten in Schleimhautzell- und Lymphozytenversuchen.

Für keinen der betrachteten Stoffe ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Vitalitäten von Patienten und Kontrollpersonen.

### 3.3.2 DNA-Schädigung von Schleimhautzellen durch verschiedene Tabakinhaltstoffe

Die Schleimhautzellen wurden verschiedenen Tabakinhaltstoffen ausgesetzt. In der Auswertung des Versuchs wurden für jeden Versuchsansatz eines Patienten jeweils 80 Zellen digital erfasst und deren OTM-Werte errechnet. Anhand dieser 80 Olive Tail Moments pro Versuchsperson und getestetem Fremdstoff wurde jeweils ein Mittelwert und ein Median errechnet.

Nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die Mittelwerte und Mediane der einzelnen Gruppen.

	<u>Mittelwerte</u>		<u>Mediane</u>	
	Tumorpatienten	Kontrollgruppe	Tumorpatienten	Kontrollgruppe
DMSO	1,57	1,41	0,94	0,89
BaP	3,42	3,51	1,07	0,98
BPDE	18,92	18,50	15,90	17,14
NNN	4,33	3,22	1,11	1,00
NNK	4,81	4,51	1,15	1,19
MNNG	42,52	39,63	40,84	41,29
NDEA	7,02	6,75	1,48	1,49
NDEA – 15min	5,28	4,89	1,35	1,12
NDEA – 30min	4,55	4,32	1,31	1,24

**Tab. 4:** Mittelwerte und Mediane der Olive Tail Moments von Tumorpatienten und Kontrollgruppe nach Schädigung durch verschiedene Fremdstoffe.

Der OTM-Mittelwert der Tumorpatienten lag bei BaP etwas niedriger, als der Mittelwert der OTM der Kontrollgruppe.

Bei den Medianen lagen die Werte für BPDE, NNK, MNNG und NDEA bei den Tumorpatienten unter denen der Kontrollgruppe, wobei die Unterschiede sehr gering ausfielen. Um herauszufinden, ob sich Mittelwerte und Mediane der beiden Gruppen

signifikant unterschieden, wurden diese durch statistische Tests miteinander verglichen. Dazu mussten sämtliche Werte zunächst auf Normalverteilung getestet werden, um festzustellen, welche statistischen Auswertungsverfahren anwendbar waren.

Die Tests auf Normalverteilung erfolgten mit dem Kolmogorov-Smirnov-Test mit Korrektur nach Lilliefors und ergaben teils signifikante (d.h. Wert ist kleiner oder gleich 0,05) und damit nicht normalverteilte, teils nicht signifikante und somit normalverteilte Werte (siehe nachfolgende Tabellen).

Getesteter Fremdstoff	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Tumorgruppe	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,108	0,038	0,105	0,028
Kontrollgruppe	0,200*	0,122	0,200	0,080	0,177	0,200*	0,128	0,200*	0,157

\* ≈ Einer unteren Grenze der echten Signifikanz

**Tab. 5:** Signifikanzen für die Prüfung der OTM-Mittelwerte von Patienten und Kontrollpersonen auf Normalverteilung.

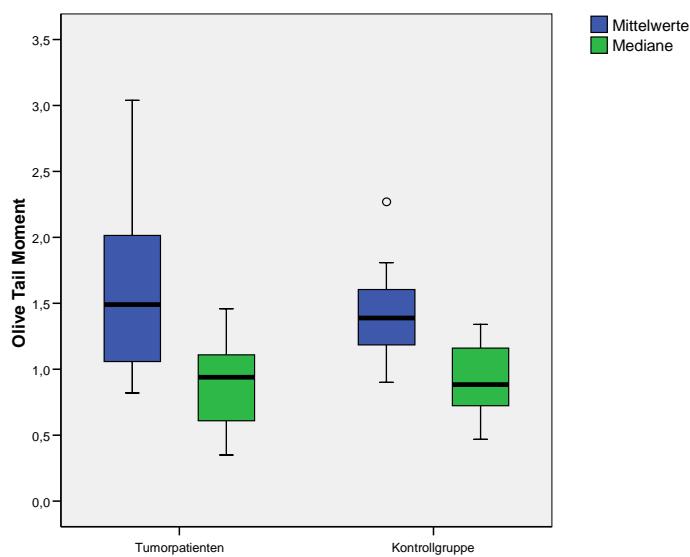
Getesteter Fremdstoff	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Patienten	0,200*	0,028	0,200*	0,002	0,042	0,200*	0,007	0,200*	0,200*
Kontrollgruppe	0,200*	0,005	0,200*	0,002	0,134	0,200*	0,002	<0,001	<0,001

**Tab. 6:** Errechnete Signifikanzen für die Prüfung der OTM-Mediane von Patienten und Kontrollpersonen auf Normalverteilung.

Zur weiteren Auswertung wurden deshalb nichtparametrische Tests hinzugezogen. Der Vergleich von Mittelwerten und Medianen von Patienten und Kontrollpersonen erfolgte durch den U-Test nach Mann und Whitney für zwei unabhängige Stichproben. Ein signifikanter Unterschied sollte hierbei dann vorliegen, wenn die errechnete Irrtumswahrscheinlichkeit p unter dem Signifikanzniveau von 5% liegt, d. h. wenn  $p \leq 0,05$ .

### 3.3.2.1 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch DMSO

Alle Zellen wurden, bevor sie den einzelnen Tabakinhaltstoffen ausgesetzt wurden, in DMSO gelöst. Deshalb wurde auch untersucht, ob die Schädigung durch DMSO bei Tumorpatienten und Kontrollgruppe signifikante Unterschiede aufwiesen. Die Mittelwerte und Mediane der OTMs ergaben folgende Boxplotdiagramme:

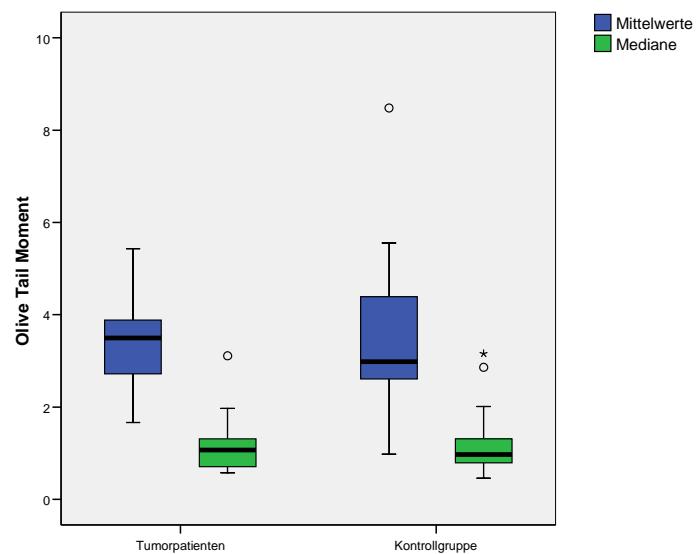


Der Mann-Whitney-U-Test ergab für die Mittelwerte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,565$ . Für die Mediane ergab sich  $p=0,758$  (Beide p-Werte sind nicht signifikant).

**Grafik 5:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch DMSO.

### 3.3.2.2 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BaP

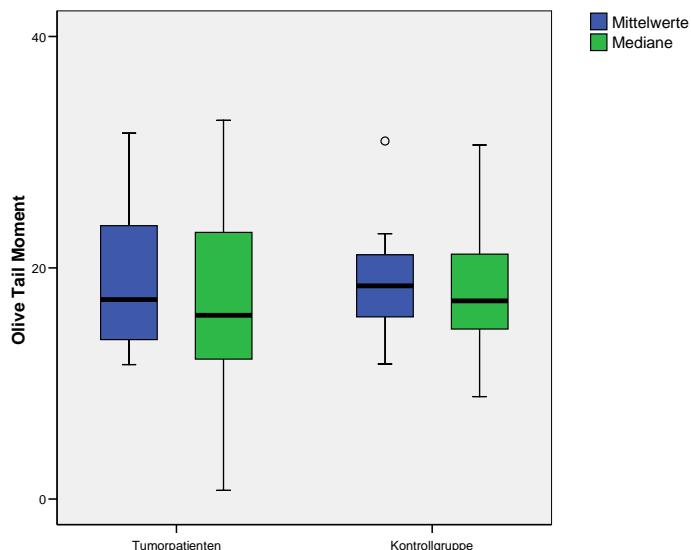
Die Irrtumswahrscheinlichkeit des Mann-Whitney-U-Tests für die Mittelwerte liegt hier bei  $p=0,758$ . Für die Mediane liegt sie bei  $p=0,925$ . (Beide p-Werte sind ebenfalls nicht signifikant).



**Grafik 6:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BaP

### 3.3.2.3 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BPDE

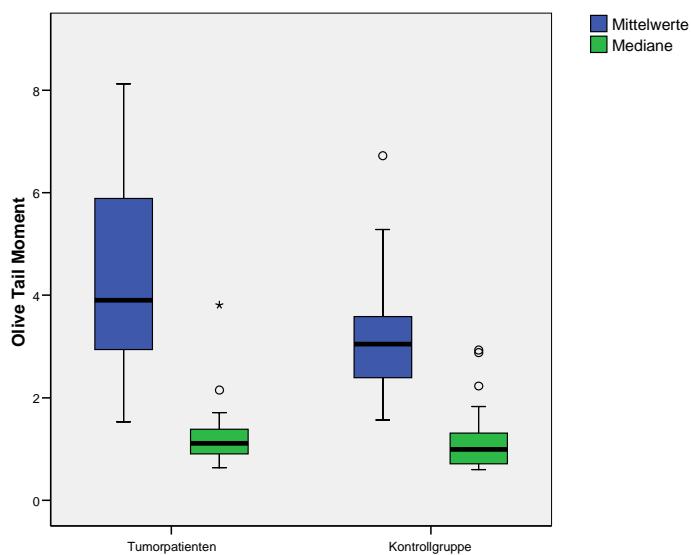
Auch bei der Schädigung durch BPDE zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen, weder bei den Mittelwerten ( $p=0,947$ ), noch bei den Medianen ( $p=0,738$ ).



**Grafik 7:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Medianen bei Schädigung durch BPDE.

### 3.3.2.4 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNN

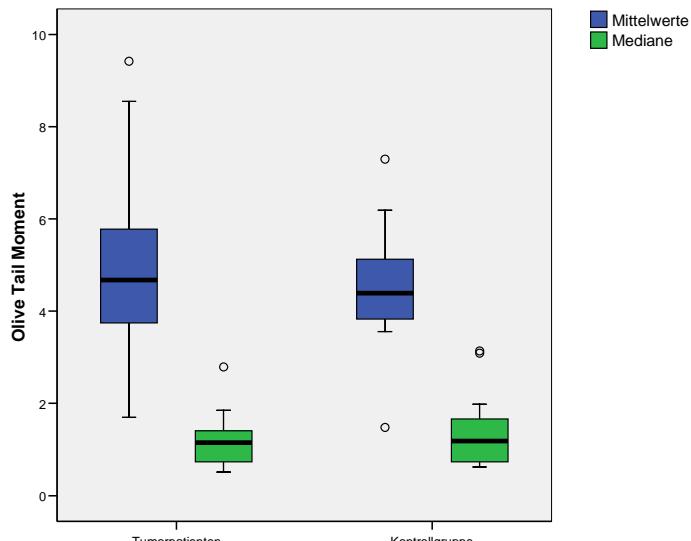
Der Mann-Whitney-U-Test ergab für die Mittelwerte eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p=0,040$ . Für die Medianen ergab sich  $p=0,429$ . Dies bedeutet, dass bei Zugabe von NNN die Schleimhautzellen der Patienten im Durchschnitt signifikant stärker geschädigt werden, als die Zellen der Kontrollpersonen. Der Vergleich der Medianen ergab hier wiederum keine signifikanten Unterschiede.



**Grafik 8:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Medianen bei Schädigung durch NNN.

### 3.3.2.5 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNK

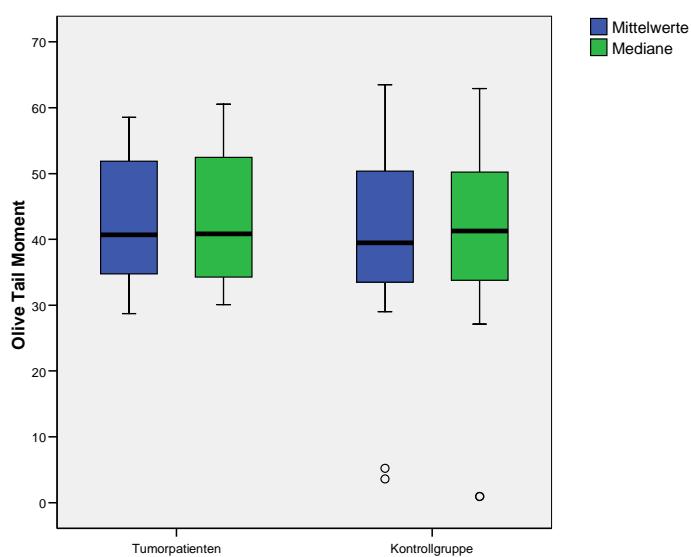
Die Schädigung durch NNK ergab hier wiederum keine signifikanten Unterschiede bei Patienten und Kontrollpersonen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit bei den Mittelwerten lag bei  $p=0,602$ , bei den Medianen lag ebendiese bei  $p=0,512$ .



**Grafik 9:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Medianen bei Schädigung durch NNK.

### 3.3.2.6 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch MNNG

Auch bei MNNG trat kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen auf. Der p-Wert für die Mittelwerte lag bei 0,883, für die Medianen bei 0,883.



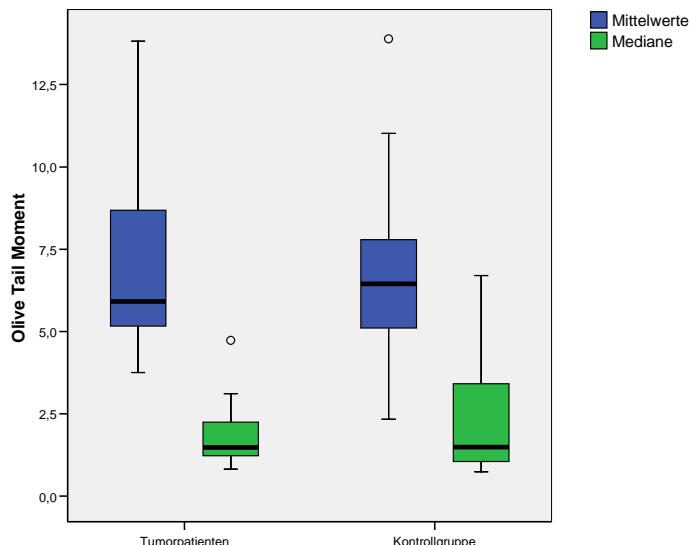
**Grafik 10:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Medianen bei Schädigung durch MNNG.

### 3.3.2.7 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NDEA

Die Schädigung durch NDEA wurde zu drei verschiedenen Zeitpunkten überprüft:

#### a) Unmittelbar nach Zugabe von NDEA

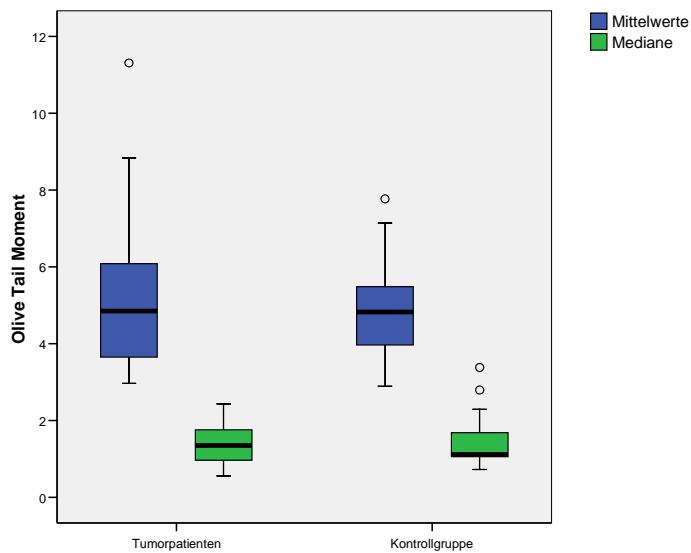
Zu Versuchsbeginn zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollpersonen. Für die Mittelwerte erhielt man  $p=904$ , für die Medianen  $p=0,904$ .



**Grafik 11:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Medianen bei Schädigung durch NDEA(0min).

#### b) Nach einer Reparaturzeit von 15 Minuten

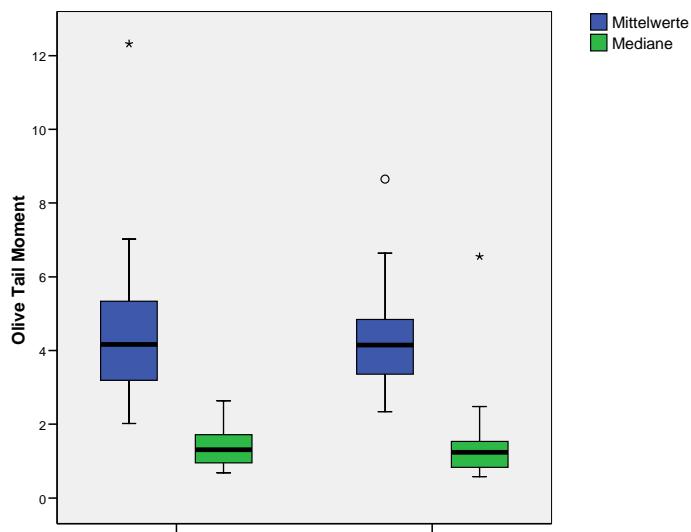
Auch nach 15-minütiger Reparaturzeit konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden, weder bei den Mittelwerten ( $p=0,779$ ), noch bei den Medianen ( $p=0,718$ ).



**Grafik 12:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Medianen bei Schädigung durch NDEA(15min).

c) Nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten

30 Minuten nach Versuchsbeginn lag die Irrtumswahrscheinlichkeit des Mann-Whitney-U-Test für die Mittelwerte bei  $p=1,000$ , für die Mediane bei  $p=0,583$ . Beide p-Werte sind nicht signifikant.



**Grafik 13:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NDEA(30min)

### 3.3.2.8 der Ergebnisse der Versuche zur DNA-Schädigung an Schleimhautzellen

Die Schleimhautzellen von Tumorpatienten wurden durch NNN signifikant stärker geschädigt als die der Kontrollpersonen. Der errechnete p-Wert für die OTM-Mittelwerte dieser Substanz betrug hier 0,04. Bei allen anderen Fremdstoffen konnten keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden. Nachfolgende Tabelle liefert hierzu nochmals die zusammengefassten Ergebnisse des Mann-Whitney-U-Tests für Mittelwerte und Mediane der getesteten Substanzen.

Getesterter Fremdstoff	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Mittelwerte	0,565	0,758	0,947	0,040	0,602	0,883	0,904	0,779	1,000
Mediane	0,758	0,925	0,738	0,429	0,512	0,883	0,904	0,718	0,583

**Tab. 7:** Zusammenfassende Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeiten des Mann-Whitney-U-Tests für die geprüften Tabakinhaltstoffe

### 3.3.3 DNA-Schädigung von Lymphozyten durch verschiedene Tabakinhaltstoffe

Mit den Lymphozyten wurden dieselben Versuche durchgeführt, wie mit den Schleimhautzellen, mit dem Unterschied, dass nach der Schädigung durch NDEA zusätzlich noch nach 60 Minuten Reparaturdauer die verbliebene Schädigung der Zellen betrachtet wurde. Nachstehende Tabelle gibt einen Überblick über die OTM-Mittelwerte und –Mediane. Die Tabelle enthält zusätzlich noch die durchschnittlichen Zellvitalitäten der einzelnen Versuchsgruppen (Auf die Vitalitäten wurden bei den Schleimhautzellen nicht genauer eingegangen, da diese stets bei 100% lagen).

	Vitalität (in %)		Mittelwerte		Mediane	
	Patienten	Kontrollen	Patienten	Kontrollen	Patienten	Kontrollen
DMSO	87	88	1,71	1,35	0,84	0,77
BaP	88	86	4,50	4,04	0,97	0,89
BPDE	85	88	26,81	23,11	22,68	24,51
NNN	87	87	5,14	4,73	0,94	0,90
NNK	87	86	5,17	6,48	1,05	0,99
MNNG	86	85	51,54	45,27	45,85	47,55
NDEA	86	85	7,74	7,79	0,82	1,46
NDEA – 15min	86	87	6,05	6,24	0,95	1,04
NDEA – 30min	87	87	4,88	5,24	0,78	0,88
NDEA – 60min	88	88	4,60	4,61	0,73	0,99

**Tab. 8:** Durchschnittliche Vitalität, OTM-Mittelwerte und OTM-Mediane im Überblick.

Die durchschnittlichen Vitalitäten lagen in einem kleinen Intervall von 85% bis 88%.

Die Mittelwerte für NNK zeigten bei den Patienten eine geringere Schädigung. Während die OTM-Mediane der Patienten für BPDE und MNNG niedriger waren als die der Kontrollgruppe. Bei NDEA verhält es sich so, dass die Patienten sowohl niedrigere OTM-Mittelwerte als auch –Mediane aufwiesen und zwar zu allen vier

betrachteten Versuchszeitpunkten. Auch hier wurden zunächst die Mittelwerte und Mediane und zusätzlich noch die Vitalitäten auf Normalverteilung geprüft, bevor weitere Tests gemacht werden konnten.

Nachstehende Tabellen geben einen Überblick über die Ergebnisse des Kolmogorov-Smirnov-Tests:

<b>Getesteter Fremdstoff</b>	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA	NDEA (15min)	NDEA (30min)	NDEA (60min)
Patienten	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*
Kontrollen	0,191	0,200*	0,122	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,084	0,200*	0,200*

**Tab. 9:** Prüfung der Lymphozytenvitalitäten von Patienten und Kontrollpersonen auf Normalverteilung. Die angegebenen Werte in Tabelle 6 - 8 entsprechen der asymptotischen Signifikanz.

<b>Getesteter Fremdstoff</b>	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA	NDEA (15min)	NDEA (30min)	NDEA (60min)
Patienten	0,200*	0,120	0,021	0,200*	0,103	0,035	0,087	0,200*	0,200*	0,200*
Kontrollgr	0,017	0,011	0,200*	0,200*	0,019	0,200*	0,200*	0,200*	0,046	0,200*

**Tab. 10:** Prüfung der OTM - Mittelwerte von Patienten und Kontrollpersonen auf Normalverteilung.

<b>Getesteter Fremdstoff</b>	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA	NDEA (15min)	NDEA (30min)	NDEA (60min)
Patienten	0,200*	0,200*	0,052	0,077	0,200*	0,092	<0,001	0,152	0,027	0,048
Kontrollgr	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,200*	0,001	0,200*	0,200*	0,200*

**Tab. 11:** Prüfung der OTM - Mediane von Patienten und Kontrollpersonen auf Normalverteilung

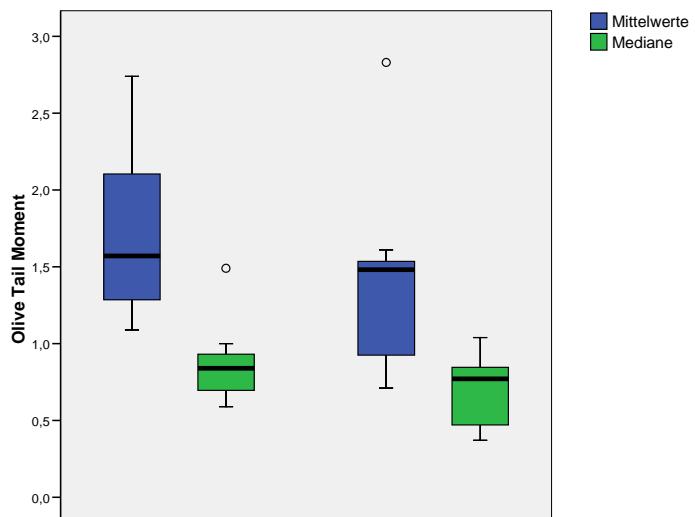
Der Kolmogorov-Smirnov-Test ergab für die OTM-Mittelwerte und Mediane teils signifikante und damit nicht normalverteilte Werte, teils insignifikante, also normalverteilte Werte. Deshalb wurden für die weiteren statistischen Berechnungen nicht parametrische Test verwendet.

Für die Lymphozytenvitalitäten erhielt man stets nicht signifikante und somit normalverteilte Werte.

Der Vergleich der Vitalitäten erfolgte somit mittels t-Test bei unabhängigen Stichproben, während die OTM-Mittelwerte und –Mediane von Patienten und Kontrollpersonen wiederum mit Hilfe des Mann-Whitney-U-Tests verglichen wurden.

### 3.3.3.1 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch DMSO

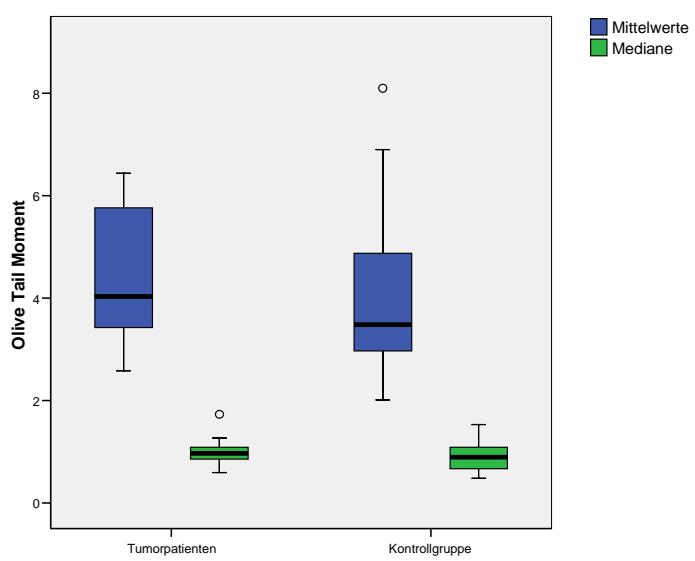
Der Mann-Whitney-U-Test ergab für die Mittelwerte  $p=0,106$ , für die Mediane  $p=0,137$ .



**Grafik 14:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch DMSO.

### 3.3.3.2 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BaP

Bei Schädigung durch BaP konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen nachgewiesen werden (Mittelwerte  $p=0,233$ , Mediane  $p=0,436$ ).

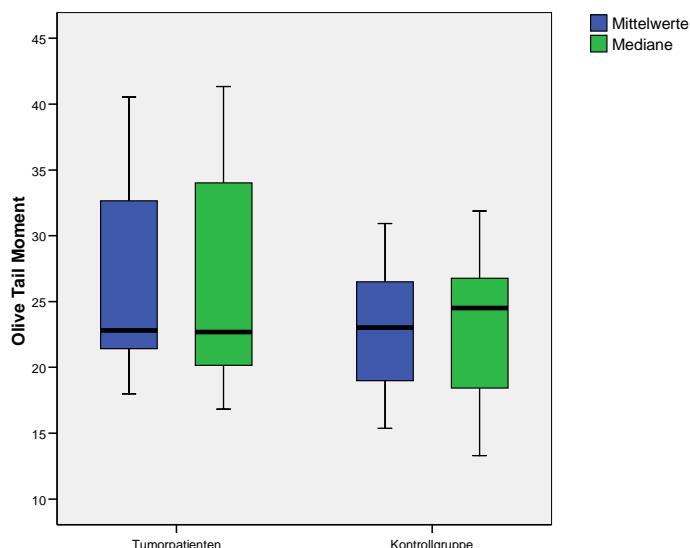


**Grafik 15:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BaP.

### 3.3.3.3 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BPDE

Auch bei Schädigung durch BPDE konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Mittelwerte  $p=0,267$ , Mediane  $p=0,325$ ).

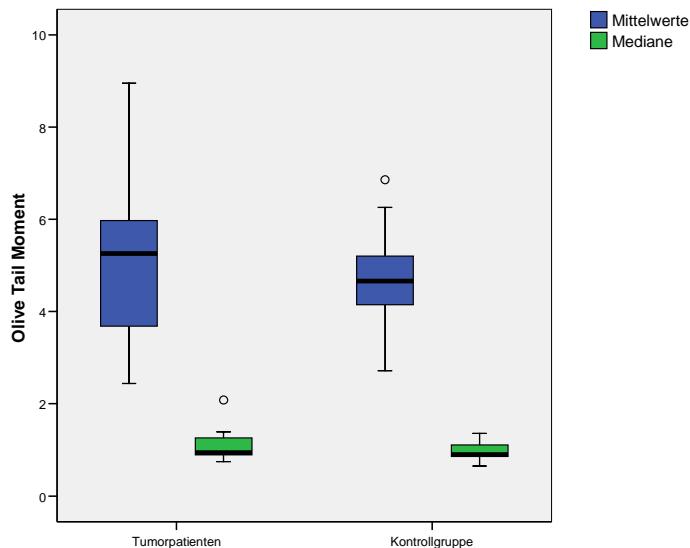
**Grafik 16:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch BPDE.



### 3.3.3.4 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNN

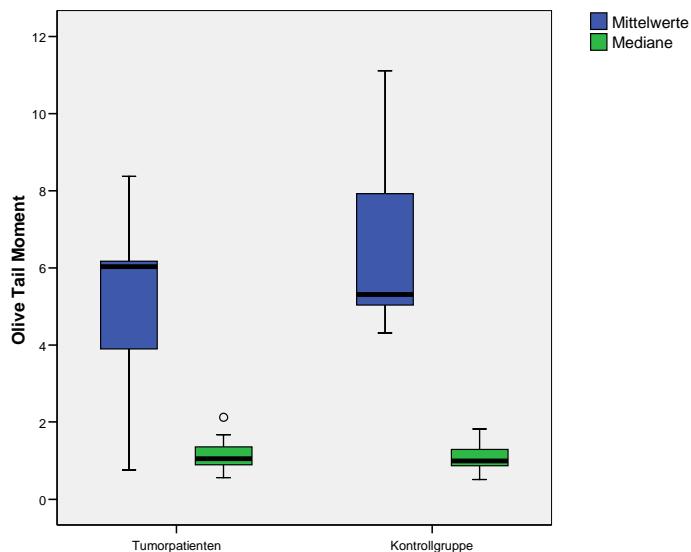
Die Irrtumswahrscheinlichkeit lag hier bei  $p=0,744$  für die Mittelwerte und bei  $p=0,325$  für die Mediane.

**Grafik 17:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNN.



### 3.3.3.5 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNK

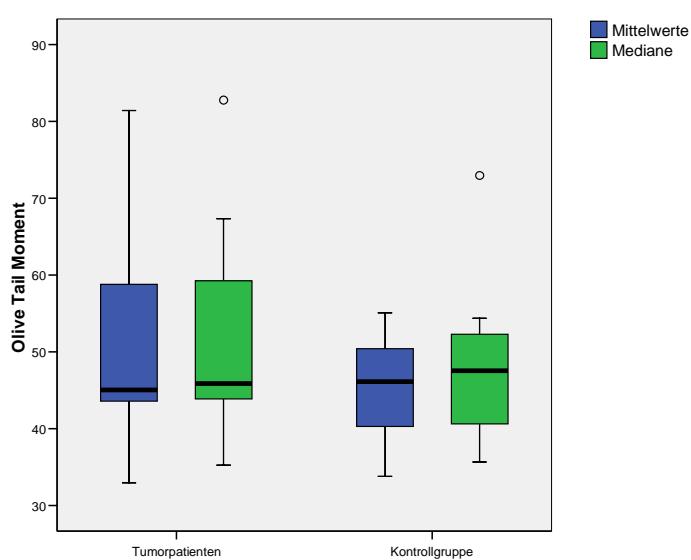
Weder die Mittelwerte mit  $p=0,217$  noch die Mediane mit  $p=0,775$  zeigten signifikante Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollpersonen (siehe Grafik 18).



**Grafik 18:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NNK.

### 3.3.3.6 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch MNNG

Auch bei MNNG trat kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen auf. Der p-Wert für die Mittelwerte lag hier bei 0,187, für die Mediane bei 0,595.

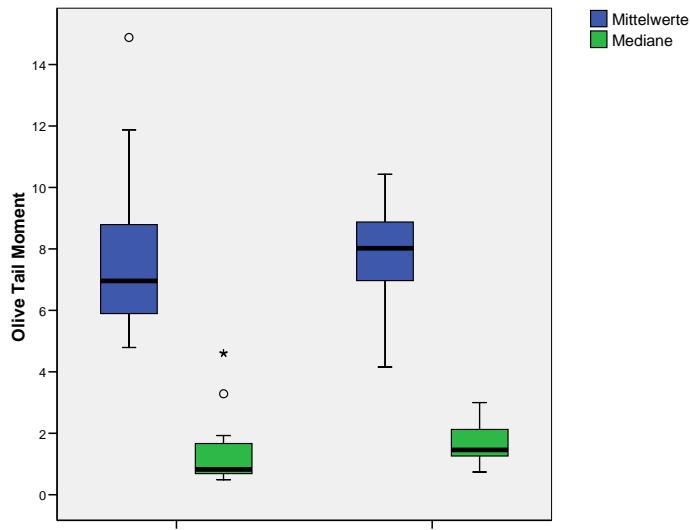


**Grafik 19:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch MNNG.

### 3.3.3.7 Vergleich der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NDEA

#### a) Unmittelbar nach Zugabe von NDEA

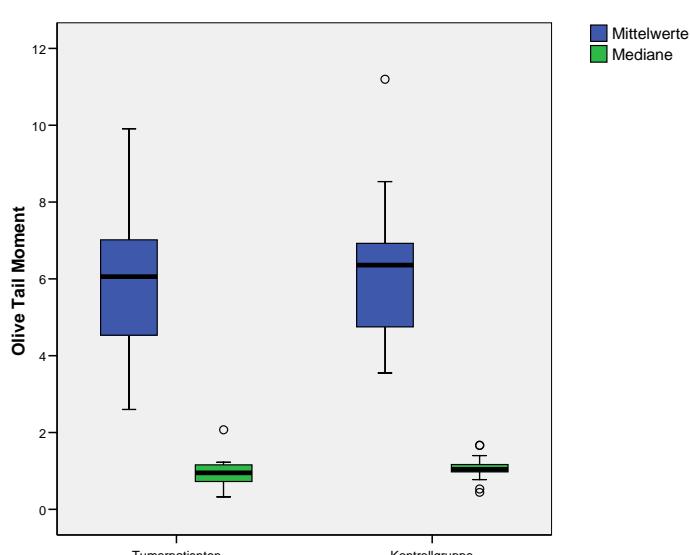
Am Versuchsbeginn betrug die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Mittelwerte  $p=0,486$ , für die Mediane  $p=0,081$ .



**Grafik 20:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NDEA (0 min).

#### b) Nach einer Reparaturzeit von 15 Minuten

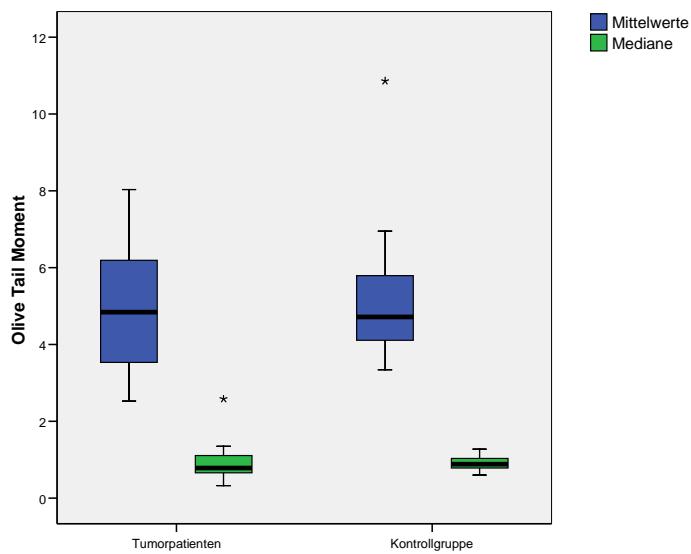
Nach 15-minütiger Reparaturzeit errechnete sich für die Mittelwerte  $p= 0,838$ , für die Mediane  $p=0,345$ . Wiederum konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden.



**Grafik 21:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NDEA (15 min).

c) Nach einer Reparaturzeit von 30 Minuten

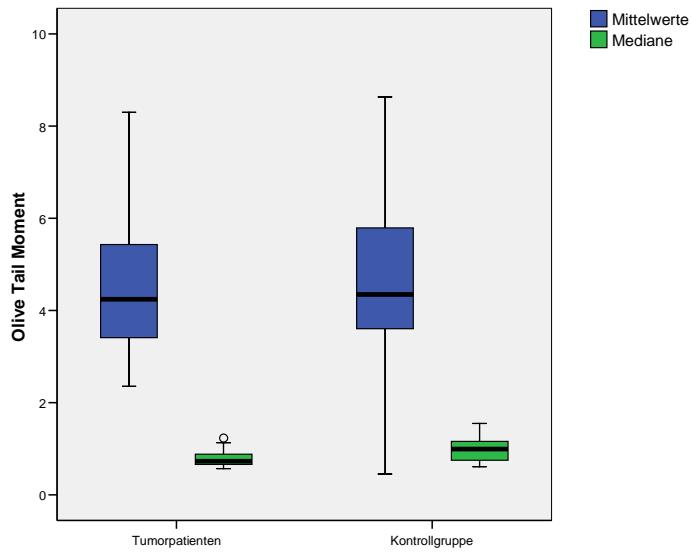
30 Minuten nach Zugabe von NDEA erhält man für die Mittelwerte  $p=0,902$ , für die Mediane  $p=0,436$ , also erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten und Kontrollgruppe.



**Grafik 22:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NDEA (30 min).

d) Nach einer Reparaturzeit von 60 Minuten

Nach 60-minütiger Reparaturzeit zeigten die Mittelwerte mit  $p=0,838$  und die Mediane mit  $p=0,056$  keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen.



**Grafik 23:** Boxplotdarstellung der Mittelwerte und Mediane bei Schädigung durch NDEA(60 min).

### 3.3.3.8 Zusammenfassung der Ergebnisse der Versuche zur DNA-Schädigung an Lymphozyten

Die Schädigung der Lymphozyten von Patienten und Kontrollpersonen zeigten für keine der zugesetzten Substanzen signifikante Unterschiede. Auch die Vitalitäten der beiden Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant

<b>Getesteter Fremdstoff</b>	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA	NDEA (15min)	NDEA (30min)	NDEA (60min)
Mittelwerte	0,106	0,233	0,267	0,744	0,217	0,187	0,486	0,838	0,902	0,838
Mediane	0,137	0,436	0,325	0,32	0,775	0,595	0,081	0,345	0,436	0,056

**Tab. 12:** Zusammenfassende Darstellung der Irrtumswahrscheinlichkeiten des Mann-Whitney-U-Tests für die überprüften Tabakinhaltstoffe.

### 3.3.4 Gegenüberstellung der Schädigung von Schleimhautzellen und Lymphozyten

Bisher wurden Schleimhautzellen und Lymphozyten getrennt voneinander betrachtet, wobei die Unterschiede zwischen Tumorpatienten und Kontrollgruppe untersucht wurden. Im folgenden Teil wurden nun Unterschiede zwischen Schleimhautzellen und Lymphozyten untersucht:

Berechnet wurden die Korrelationskoeffizienten nach Pearson. Damit kann man z. B. herausfinden, ob Versuchspersonen mit hoher Schädigung der Schleimhautzellen auch eine hohe Schädigung der Lymphozyten aufweisen (für die gleiche Testsubstanz).

Man erhält so Werte zwischen –1 und 1. Diese Werte sind ein Maß für den linearen Zusammenhang beider Merkmale. –1 bedeutet negativer Zusammenhang, d.h. je mehr Schädigung bei dem einen Zelltyp, desto weniger Schädigung bei dem anderen Zelltyp. +1 bedeutet je mehr Schädigung bei einem Zelltyp, desto stärker auch die Schädigung bei dem anderen. 0 bedeutet kein linearer Zusammenhang.

Von einem statistischen Zusammenhang zwischen beiden Größen kann man nur ausgehen, wenn der ermittelte Korrelationskoeffizient signifikant, d. h. hier signifikant von Null verschieden ist. Je höher die Anzahl der Wertepaare ist, desto geringer darf

der Absolutbetrag des Korrelationskoeffizienten sein, um auf einen linearen Zusammenhang schließen zu können. Hier sind es 15 Wertepaare bei Patienten und Kontrollgruppe und 30 wenn man alle Versuchspersonen insgesamt betrachtet.

#### Korrelationskoeffizienten der Mittelwerte in der Patientengruppe:

Mittelwerte	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA (0min)	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Korrelationskoeffizient	0,481	0,386	-0,064	0,383	-0,317	-0,207	-0,369	-0,361	-0,113
Signifikanz (2-seitig)	0,070	0,155	0,820	0,159	0,249	0,459	0,176	0,187	0,687

**Tab. 13:** Korrelationskoeffizienten und dazugehörige Signifikanz der Mittelwerte der Schädigungen in der Patientengruppe.

#### Korrelationskoeffizienten der Mediane in der Patientengruppe:

Mediane	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA (0min)	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Korrelationskoeffizient	0,319	0,431	-0,015	0,105	-0,041	-0,262	0,131	0,175	0,336
Signifikanz (2-seitig)	0,247	0,109	0,957	0,708	0,886	0,345	0,641	0,533	0,221

**Tab. 14:** Korrelationskoeffizienten und dazugehörige Signifikanz der Mediane der Schädigungen in der Patientengruppe.

### Korrelationskoeffizienten der Mittelwerte in der Kontrollgruppe:

Mittelwerte	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA (0min)	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Korrelationskoeffizient	0,075	0,086	0,098	0,508	0,033	0,365	0,250	0,410	-0,158
Signifikanz (2-seitig)	0,790	0,759	0,728	0,053	0,906	0,181	0,368	0,129	0,573

**Tab. 15:** Korrelationskoeffizienten und dazugehörige Signifikanz der Mittelwerte der Schädigungen in der Kontrollgruppe.

### Korrelationskoeffizienten der Mediane in der Kontrollgruppe:

Mediane	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA (0min)	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Korrelationskoeffizient	-0,138	0,366	-0,105	0,363	0,372	0,617(*)	0,479	-0,213	-0,273
Signifikanz (2-seitig)	0,623	0,179	0,709	0,184	0,172	0,014	0,071	0,447	0,325

\* Die Korrelation ist auf dem Niveau von 0,05 (2-seitig) signifikant

**Tab. 16:** Korrelationskoeffizienten und dazugehörige Signifikanz der Mediane der Schädigungen in der Kontrollgruppe.

### Korrelationskoeffizienten der Mittelwerte des gesamten Versuchskollektivs:

Mittelwerte	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA (0min)	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Korrelationskoeffizient	0,349	0,207	-0,001	0,425(*)	-0,185	0,007	-0,132	-0,075	-0,138
Signifikanz (2-seitig)	0,059	0,273	0,998	0,019	0,328	0,971	0,487	0,692	0,466

**Tab. 17:** Korrelationskoeffizienten und dazugehörige Signifikanz der Mittelwerte der Schädigungen im Gesamtkollektiv.

Korrelationskoeffizienten der Mediane des gesamten Versuchskollektivs:

<b>Mediane</b>	DMSO	BaP	BPDE	NNN	NNK	MNNG	NDEA (0min)	NDEA (15min)	NDEA (30min)
Korrelationskoeffizient	0,032	0,330	-0,042	0,169	0,196	0,124	0,264	-0,002	-0,048
Signifikanz (2-seitig)	0,868	0,075	0,826	0,371	0,299	0,515	0,159	0,993	0,800

**Tab. 18:** Korrelationskoeffizienten und dazugehörige Signifikanz der Mediane der Schädigungen im Gesamtkollektiv.

Somit ergibt sich beim direkten Vergleich der Schädigungen der Lymphozyten und Schleimhautzellen einzelner Patienten in der Kontrollgruppe eine positive Korrelation für MNNG. Eine hohe Schädigung der Schleimhautzellen eines Spenders entsprach einer ebenfalls hohen DNA-Fragmentierung im Lymphozytenversuch desselben Probanden. Dasselbe gilt für NNK bei Betrachtung des Gesamtkollektivs.

### 3.3.5 Reparaturkapazität von Schleimhautzellen und Lymphozyten

Zur Prüfung der Reparaturkapazität wurden die 80 OTMs jeder Versuchsperson der Größe nach in folgende sechs Gruppen aufgeteilt: OTM<2, 2<OTM<5, 5<OTM<10, 10<OTM<20, 20<OTM<30, OTM>30. Anschließend wurde gezählt, wie viele Werte in jeder Gruppe lagen.

Zellen mit einem OTM<2 galten entsprechend der durch die Comet-Assay-Group festgelegten Werte als vernachlässigbar geschädigt [Tice et al. 2000].

Die Reparaturkapazität nach einer 15minütigen Reparaturdauer errechnete man als Quotient von ungeschädigten Zellen nach Zusatz von NDEA und einer nachfolgenden Reparaturzeit von 15 Minuten und den ungeschädigten Zellen der Negativkontrolle mit DMSO:

$$\text{Reparaturkapazität}_{15 \text{ min}} = \frac{\text{Anzahl der ungeschädigten Zellen nach Zugabe von NDEA und 15 Minuten Reparatur}}{\text{Anzahl der ungeschädigten Zellen der Negativkontrolle}}$$

**Abb. 11:** Formel zur Berechnung der Reparaturkapazität nach Harréus (Harréus et al. 2001)

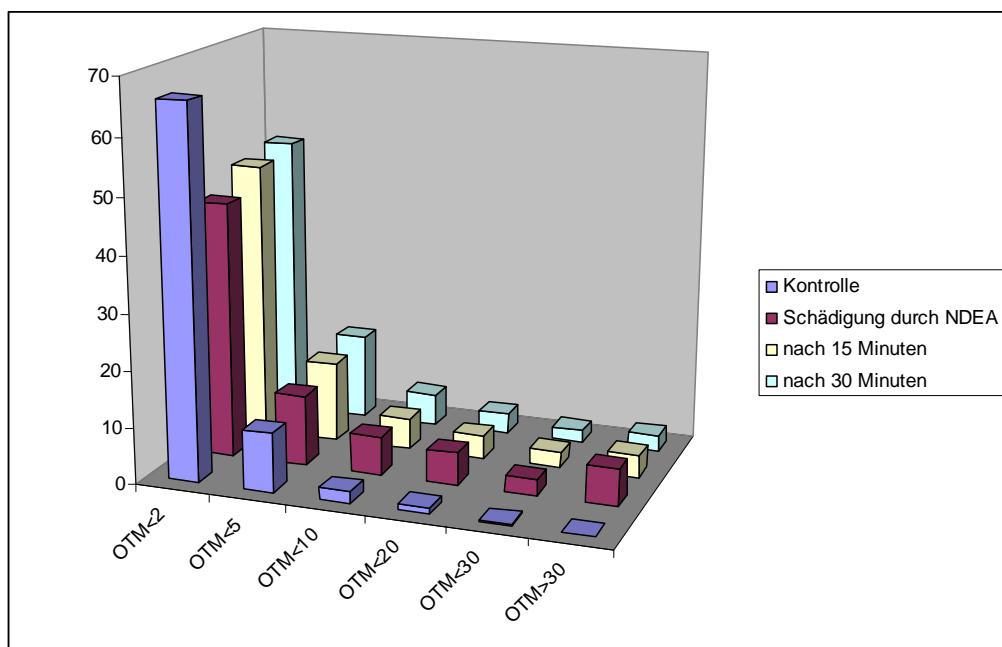
Analog erhielt man die Reparaturkapazität nach 30 bzw. 60 Minuten Reparaturdauer in dem man in obiger Formel den Zähler ersetzte mit der Anzahl der Zellen nach Zugabe von NDEA und 30 bzw. 60 Minuten Reparatur.

Zu jeder Versuchsperson konnte man mit Hilfe obiger Formel die Reparaturkapazität nach 15 und 30 Minuten errechnen (Bei den Lymphozytenversuchen zusätzlich noch nach 60 Minuten). Anschließend wurden die Reparaturkapazitäten von Patienten und Kontrollpersonen gegenübergestellt und auf signifikante Unterschiede getestet.

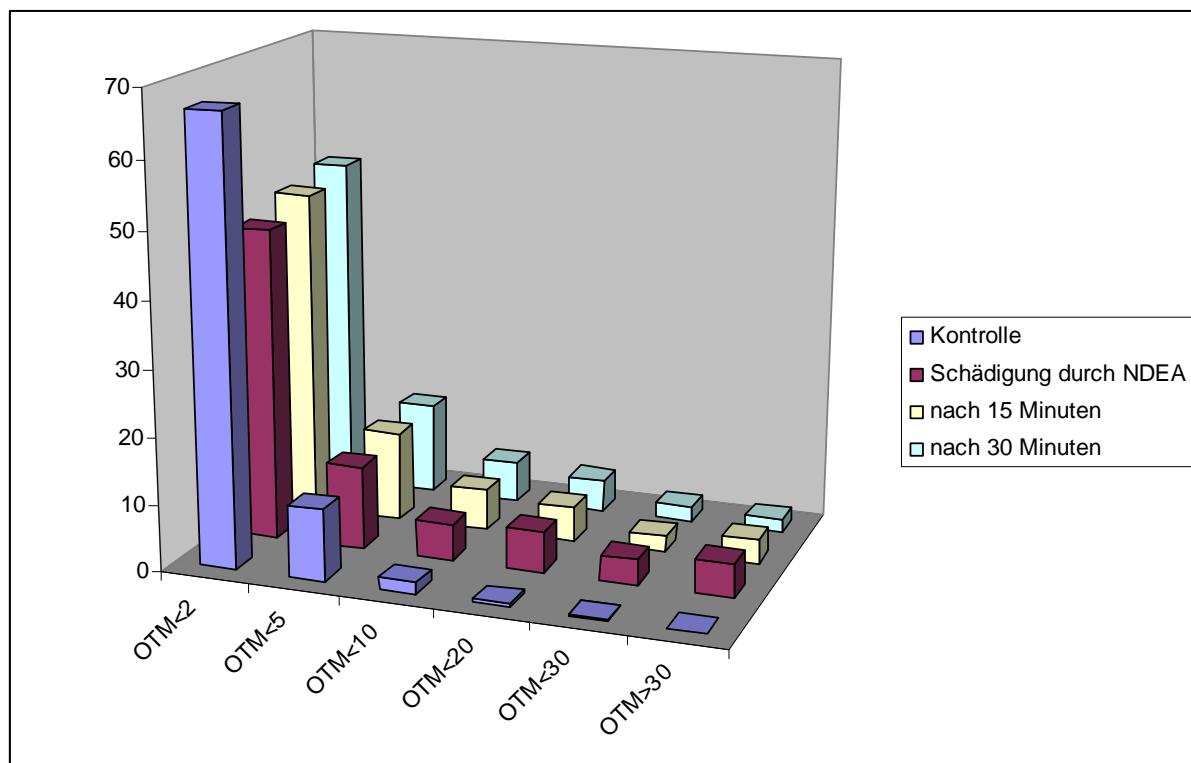
### 3.3.6 Reparaturkapazität von Schleimhautzellen

#### 3.3.6.1 Überblick über die Verteilung der Olive Tail Moments

Nachstehende Grafiken geben einen Überblick über die Verteilung der Olive Tail Moments bei Schädigung durch DMSO (vordere Reihe) und NDEA zu den drei betrachteten Versuchszeitpunkten. Besonders deutlich erkennt man an den ersten beiden und der letzten Gruppe, dass die Zellen repariert wurden. Die Balken mit OTM<2 und OTM<5 werden mit fortschreitender Zeit immer größer, d.h. die Zahl der nicht oder nur schwach geschädigten Zellen nahm zu, die Zahl der sehr stark geschädigten Zellen mit einem OTM>30 dagegen ab.



**Grafik 33:** Verteilung der Olive Tail Moments der Tumorpatienten.

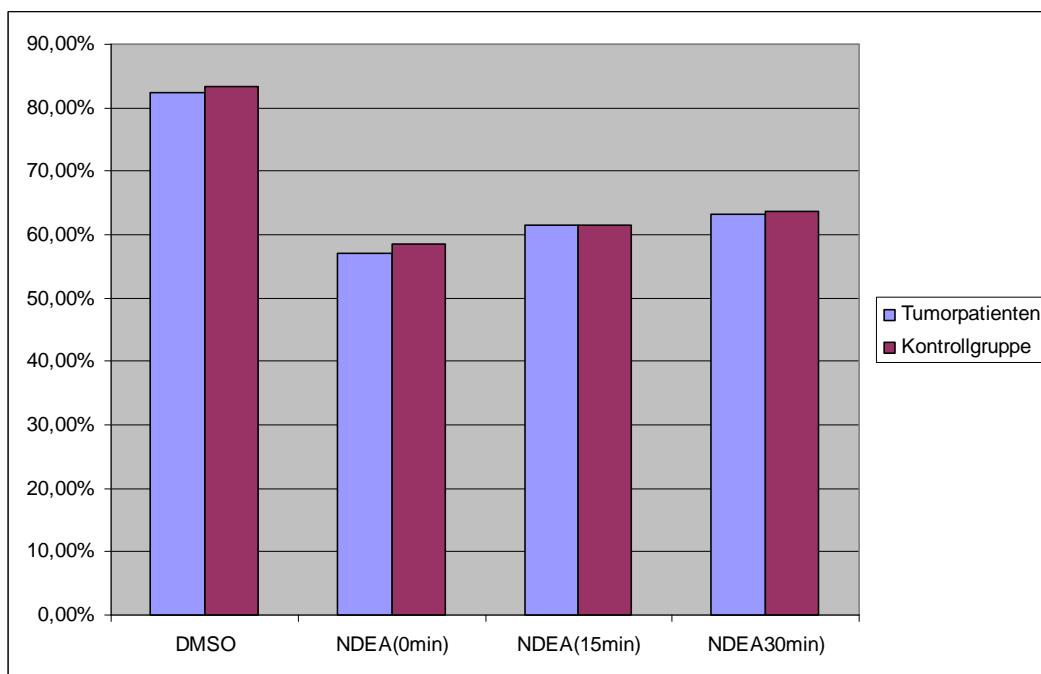


**Grafik 34:** Verteilung der Olive Tail Moments der Kontrollgruppe.

### 3.3.6.2 Vergleich der ungeschädigten Zellen von Patienten und Kontrollpersonen

Für die Berechnung der Reparaturkapazität benötigte man nur die Anzahl der ungeschädigten Zellen, deshalb wurde auch das Vorkommen derselben genauer untersucht.

Nachstehende Grafik liefert einen Überblick über den prozentualen Anteil der ungeschädigten Zellen von Patienten und Kontrollpersonen der Negativkontrolle sowie zu den drei beobachteten Versuchszeitpunkten nach Zugabe von NDEA:



**Grafik 35:** Vergleich der ungeschädigten Zellen von Tumorpatienten und Kontrollgruppe.

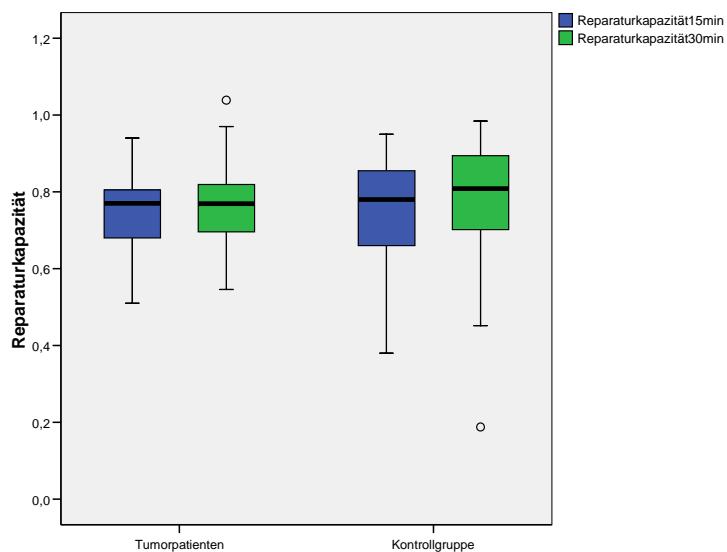
Schon auf den ersten Blick fällt auf, dass die Unterschiede zwischen beiden Gruppen sehr gering sind. Einen Überblick über die genauen Werte gibt folgende Tabelle:

	DMSO	NDEA(0min)	NDEA (15min)	NDEA(30min)
Tumorpatienten	82,31%	56,94%	61,50%	63,23%
Kontrollen	83,31%	58,56%	61,38%	63,69%

**Tab. 19:** Gegenüberstellung der Reparaturkapazitäten von Tumorpatienten und Kontrollpersonen.

### 3.3.6.3 Reparaturkapazitäten der Versuchspersonen

Nach oben genannter Formel (Abb. 11) wurden die Reparaturkapazitäten nach 15 und 30 Minuten für sämtliche Versuchspersonen berechnet und im folgenden Boxplotdiagramm dargestellt.



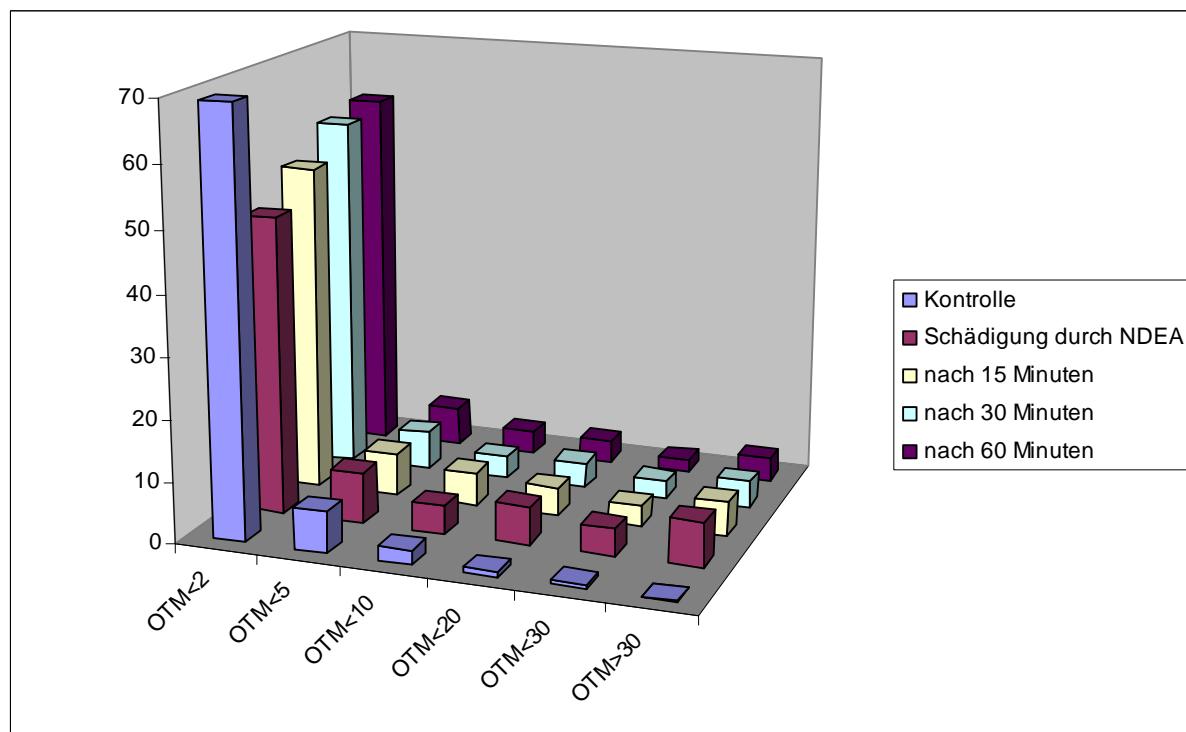
**Grafik 36:** Darstellung der Reparaturkapazitäten von Tumorpatienten und Kontrollpersonen nach 15 und 30 Minuten.

Die Reparaturkapazität nach 15 Minuten betrug für die Tumorpatienten im Durchschnitt 0,75, für die Kontrollgruppe 0,73. 30 Minuten nach Versuchsbeginn hatten die Tumorpatienten durchschnittlich eine Reparaturkapazität von 0,77, die Kontrollgruppe von 0,76. Der Kolmogorov-Smirnov-Test zeigte, dass die Reparaturkapazitäten nach 15 und 30 Minuten jeweils normalverteilt sind. Deshalb wurde mittels t-Test bei unabhängigen Stichproben geprüft, ob beide Versuchsgruppen signifikante Unterschiede aufweisen. Man erhält so für die Reparaturkapazität nach 15 Minuten  $p=0,741$  und nach 30 Minuten  $p=0,840$ . Beide Werte sind nicht signifikant.

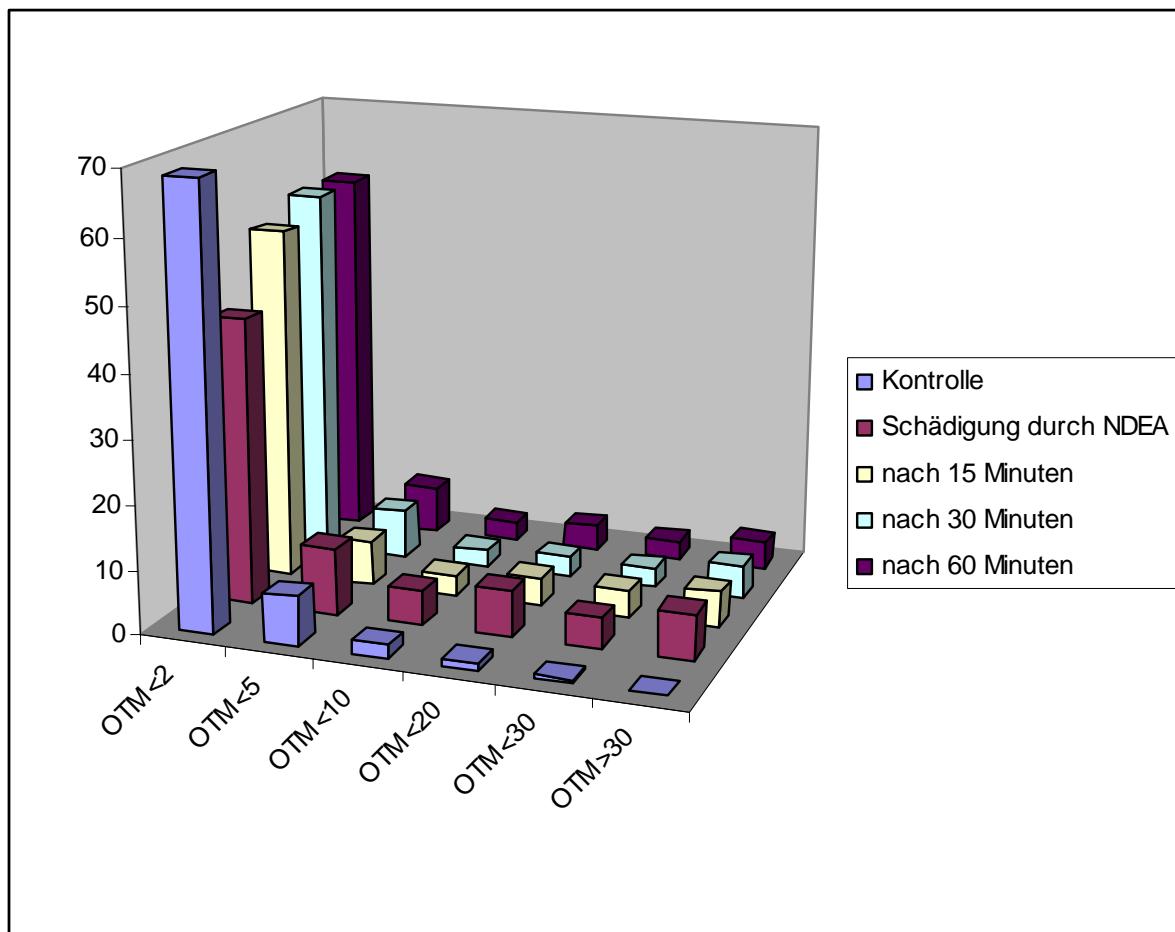
### 3.3.7 Reparaturkapazität von Lymphozyten

#### 3.3.7.1 Überblick über die Verteilung der Olive Tail Moments

Zunächst soll ein Überblick über die Verteilung der Olive Tail Moments in den sechs Gruppen gegeben werden:



Grafik 37: Verteilung der Olive Tail Moments der Tumorpatienten

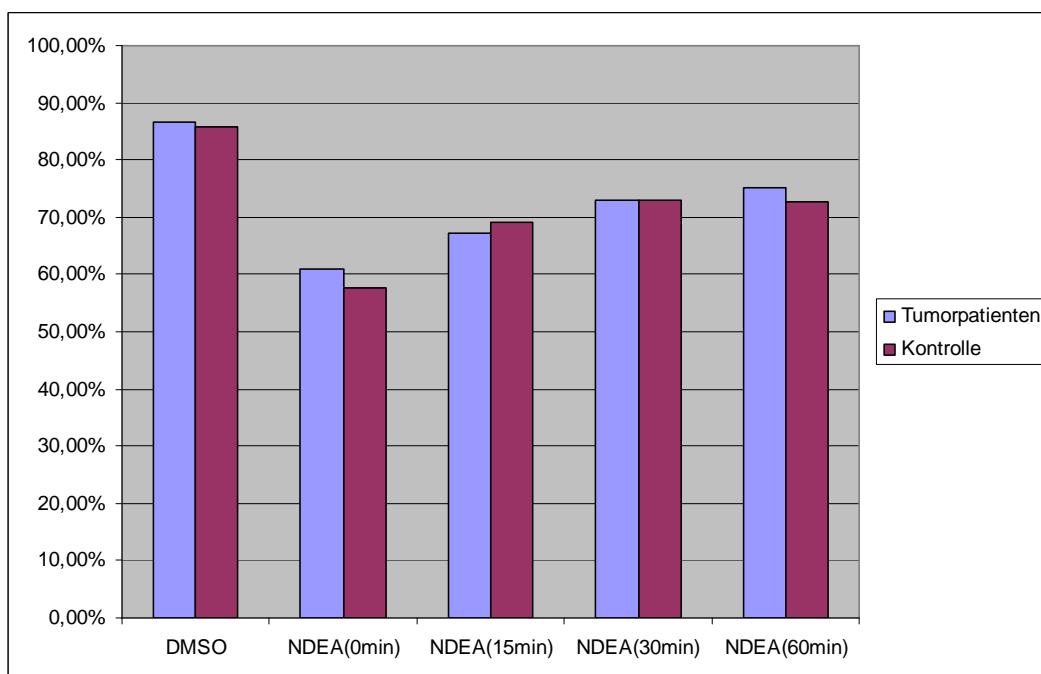


Grafik 38: Verteilung der Olive Tail Moments der Kontrollgruppe.

Deutlich erkennt man die Reparatur der Zellen hier nur an der ersten Gruppe mit OTM<2, wobei die ungeschädigten Zellen der Kontrollgruppe nach 30 und 60 Minuten Reparatur nahezu gleich geblieben sind.

### 3.3.7.2 Vergleich der ungeschädigten Zellen

Bei genauerer Betrachtung der ungeschädigten Zellen (siehe nachfolgende Grafik) fielen auch bei den Lymphozyten kaum Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen auf. Auffällig war jedoch, dass die Tumorpatienten bei der Negativkontrolle sowie 0 und 60 Minuten nach Zugabe von NDEA mehr ungeschädigte Zellen aufwiesen als die Kontrollgruppe. Nach 30 Minuten hatten Tumorpatienten und Kontrollgruppe gleich viel ungeschädigte Zellen.



**Grafik 39:** Vergleich der ungeschädigten Zellen von Tumorpatienten und Kontrollgruppe.

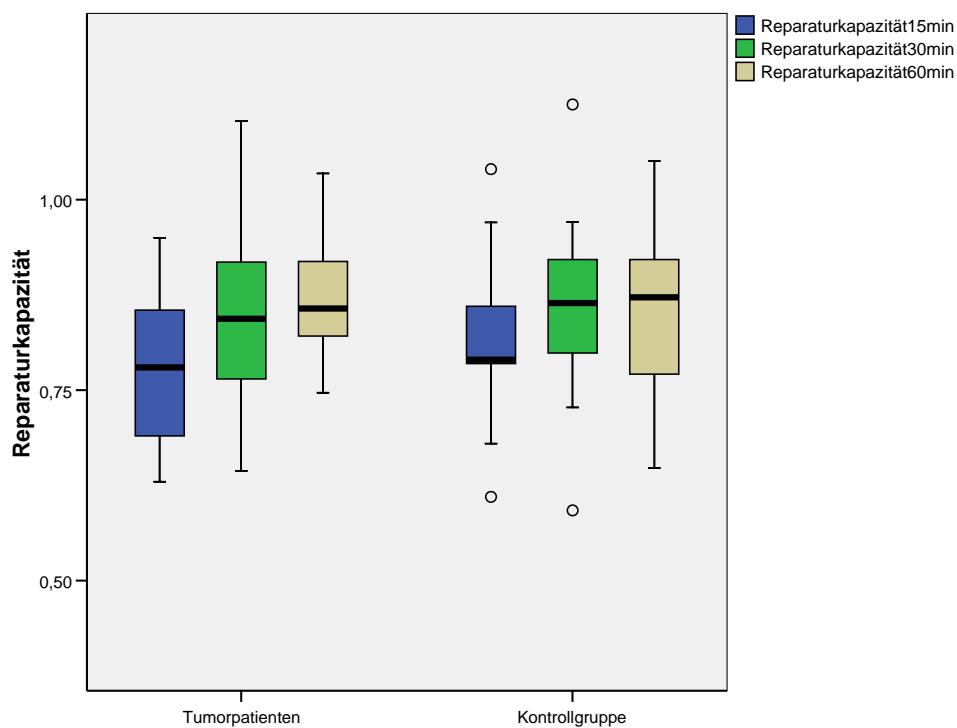
Nachfolgende Tabelle liefert einen Überblick über die entsprechenden Prozentsätze.

	DMSO	NDEA(0min)	NDEA(15min)	NDEA(30min)	NDEA(60min)
<b>Tumorpatienten</b>	86,67%	60,83%	67,08%	72,92%	75,08%
<b>Kontrollen</b>	85,83%	57,58%	69,08%	72,92%	72,75%

**Tab. 20:** Gegenüberstellung des prozentualen Anteils ungeschädigter Zellen von Tumorpatienten und Kontrollpersonen

### 3.3.7.3 Reparaturkapazitäten der Lymphozyten-DNA der Versuchspersonen

Nach der Formel in Abbildung 15 wurden die Reparaturkapazitäten nach 15, 30 und 60 Minuten für sämtliche Versuchspersonen berechnet und im folgenden Boxplotdiagramm dargestellt.



**Grafik 40:** Darstellung der Reparaturkapazitäten von Tumorpatienten und Kontrollpersonen nach 15, 30 und 60 Minuten.

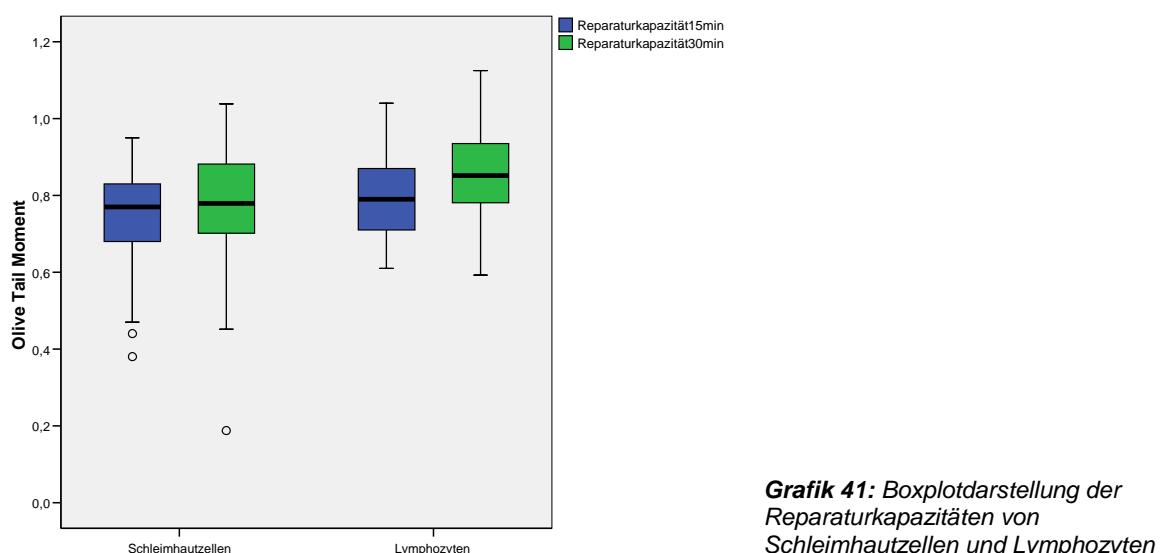
Die durchschnittliche Reparaturkapazität nach 15 Minuten betrug 0,78 für die Tumorpatienten und 0,81 für die Kontrollgruppe. Nach 30 Minuten lag die Reparaturkapazität für die Tumorpatienten bei 0,85 und für die Kontrollgruppe bei 0,86. 60 Minuten nach Zugabe von NDEA hatten die Tumorpatienten im Durchschnitt eine Reparaturkapazität von 0,87, die Kontrollgruppe von 0,85.

Laut Kolmogorov-Smirnov-Test waren die Reparaturkapazitäten zu den drei betrachteten Zeitpunkten jeweils normalverteilt.

Deshalb wurde mittels t-Test bei unabhängigen Stichproben geprüft, ob beide Versuchsgruppen signifikante Unterschiede aufweisen. Für die Reparaturkapazität nach 15 Minuten erhielt man  $p=0,371$ , nach 30 Minuten  $p=0,807$  und nach 60minütiger Reparaturdauer  $p=0,680$ . Keiner der drei Werte ist signifikant.

### 3.3.8 Vergleich der Reparaturkapazitäten von Schleimhautzellen und Lymphozyten

Nach der getrennten Betrachtung von Schleimhautzellen und Lymphozyten wurden abschließend die Reparaturkapazitäten für die beiden Zelltypen miteinander verglichen. Nachfolgendes Boxplotdiagramm liefert einen Überblick über die Verteilung der Reparaturkapazitäten der Versuchspersonen nach 15 und 30 Minuten Reparaturdauer:



Die durchschnittliche Reparaturkapazität für Schleimhautzellen betrug 0,74 nach 15 Minuten und 0,77 nach 30 Minuten Reparaturdauer.

Für die Lymphozyten erhielt man eine durchschnittliche Reparaturkapazität von 0,79 nach 15 Minuten und von 0,85 nach 30minütiger Reparaturdauer.

Die Reparaturkapazität der Lymphozyten zu den beiden betrachteten Zeitpunkten war also im Durchschnitt höher als die der Schleimhautzellen.

Nach Vergleich der Reparaturkapazitäten der einzelnen Versuchspersonen mittels Mann-Whitney-U-Test, so erhielt man  $p=0,165$  für die Reparaturkapazität nach 15 Minuten, was nicht signifikant ist. Für die Reparaturkapazität nach 30 Minuten erhielt man allerdings ein signifikantes Ergebnis mit  $p=0,027$ , d.h. die Reparaturkapazität nach 30 Minuten war für Lymphozyten signifikant größer als die der Schleimhautzellen.

### **3.3.9 Zusammenfassung der Ergebnisse der Reparaturversuche**

Die statistische Auswertung der Reparaturkapazitäten erbrachte weder für die Schleimhautzellen noch für die Lymphozyten eine signifikant unterschiedliche Reparaturleistung zwischen Tumorpatienten und Kontrollgruppe.

Ein Vergleich von Schleimhautzellen mit Lymphozyten lieferte allerdings eine signifikant bessere Reparaturkapazität der Lymphozyten für die Reparaturdauer von 30 Minuten. Eine Unterscheidung zwischen Tumor- und Kontrollgruppe wurde hier nicht vorgenommen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Patientengut – Vergleich einer Gruppe Oropharynxkarzinom-Patienten mit gesunden Probanden

Der obere Aerodigestivtrakt stellt ein wichtiges Zielorgan toxischer Inhaltsstoffe dar. Tabakrauch und alkoholische Getränke sind anerkannte Kanzerogene [IARC 1986, 1988, 2004]. Mehr als 80 % der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches können auf diese beiden Risikofaktoren zurückgeführt werden. Der Tabakrauch enthält mehr als 4000 chemische Substanzen, von denen mehr als 60 als kanzerogen eingestuft werden [Smith et al. 2003, IRAC 2004].

Die Einwirkung und Verstoffwechselung der Noxen kann DNA-Schädigungen der lokalen Zellen hervorrufen. Unterbleibt unter anderem die Einleitung der Apoptose geschädigter Zellen, kann dies zur Entstehung eines gut- oder bösartigen Tumors führen [Barrett 1993, Hanahan 2000]. Nach Ingestion kann es je nach Substanz, mit oder ohne enzymatische Aktivierung, zur Induktion von DNA-Addukten und DNA-Strangbrüchen kommen [Yang et al. 1977, Wang et al. 1998, Hoffmann et al. 1985].

Endogene Unterschiede werden für die interindividuell differierende Prädisposition zur Entwicklung eines Karzinoms bei gleicher Expositionsduer und -menge verantwortlich gemacht [Perera et al. 2000, Schantz et al. 1997]. Eine solche Mutagensensitivität sowie die Reparaturkapazität der DNA spielen hier eine wichtige Rolle.

Das Probenmaterial entstammte zwei Gruppen von männlichen Spendern. Alle konsumierten regelmäßig alkoholische Getränke und Tabak. In der einen Gruppe waren dies Patienten, die an einem Plattenepithelkarzinom des Oropharynx erkrankt waren. Es handelte sich in allen Fällen um die Erstdiagnose, so dass eine vorangegangene Behandlung durch Strahlentherapie oder Chemotherapie ausgeschlossen werden konnte. Die andere Gruppe bestand aus Spendern bei denen zum Zeitpunkt der Studie keine Karzinomerkranzung bekannt war.

So konnten erstmalig die genotoxischen Auswirkungen kanzerogener Tabakrauchinhaltsstoffe an einer Gruppe Oropharynxkarzinompatienten und einer

Kontrollgruppe getestet werden, wobei beide Gruppen nach Geschlecht, Alter und chronischem Konsum von Tabak und Alkohol zueinander gematcht waren.

Die Mutagensensitivität und Reparaturkapazität von Epithelzellen und Lymphozyten von Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom konnten zueinander in Verhältnis gesetzt werden.

## **4.2 Humane Einzelzellen zur Untersuchung genotoxischer Auswirkungen**

In der vorliegenden Arbeit wurden die Untersuchungen an vitalen Einzelzellen aus Proben oropharyngealer Schleimhaut und vom Vollblut separierten Lymphozyten der jeweiligen Spender durchgeführt. Das Probenmaterial wurde bewusst gewählt, um die lokalen und systemischen Einwirkungen der Testsubstanzen auf die Zielorgane mit deren spezifischem Zellmetabolismus möglichst lebensnah simulieren zu können. Da das Zellmaterial von verschiedenen Spendern stammt, bestehen individuell differierende genetische Eigenschaften in z. B. den Cytochrom P450-Isoenzymen, welche die Aufnahme und Verstoffwechselung der Substanzen beeinflussen [Rojas et al. 2000]. Die Epithelzellen wurden sofort getestet, um zu gewährleisten, dass das zelleigene Enzymsystem intakt ist. Die Arbeitsgruppe um Kinnula konnte einen Abfall der Enzymaktivität in kultivierten Zellen feststellen [Kinnula et al. 1992], die mit einem Anstieg der Konzentration des mutagenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verbunden war. Zudem konnte mit zunehmenden Alter der Kulturen eine Entdifferenzierung der Zellstrukturen beobachtet werden [Jorissen et al. 2000]. In den vergangenen Jahren wurden auch erfolgreich Versuche unternommen, komplexere Zellkultursysteme zu schaffen. So gelang die Anzüchtung humarer nasaler Schleimhaut aus Frischbiopsien [Kleinsasser et al. 2001]. Diese wies auch nach bis zu 4 Wochen noch eine komplexe Oberflächenstruktur mit aktiv beweglichem Flimmerepithel auf. Zuletzt gelang auch die Kultivierung von vitalen Zellverbänden auch für die Schleimhaut des Oropharynx [Reiter et al. 2009].

Die Lymphozyten konnten zwischenzeitlich kryokonserviert werden. Chang et al. (2006) und Schmezer et al. (2001) konnten nachweisen, dass humane Lymphozyten auch nach dem Auftauen weiterhin valide Ergebnisse in der Untersuchung zur Genotoxizität und DNA-Reparatur liefern.

### 4.3 Der Comet Assay als Testsystem zum Nachweis von genotoxischen Effekten und DNA-Reparaturvorgängen an humanen Zellen

Der Comet Assay, wie die alkalische Mikrogelelektrophorese auch genannt wird, stellt eine seit Jahren erprobte und etablierte Methode zum sensitiven Nachweis DNA-schädigender Effekte an Einzelzellen dar. Prinzipiell ist das Verfahren universell einsetzbar. Die Anwendung des Comet Assay zur Detektion von DNA-Veränderungen benötigt vitale Zellen, aber kein Wachstum, ist also unabhängig vom Zellzyklus einsetzbar [Fairbairn et al. 1995]. Er kann für jedes Gewebe oder jede Zelllinie, von denen Einzelzellen suspendiert werden können, verwendet werden [Collins et al. 1997]. Er lässt sich mit anderen Methoden der Molekularbiologie wie Mikrokerntest und Schwesterchromatidaustausch kombinieren [Fairbairn et al. 1995]. Auch im Bereich des Biomonitorings und Screenings wird sein Einsatz zunehmend erprobt [Szeto et al. 2005; van Delft 2001, Sergerie et al. 2005, Møller et al. 2000]. Gegenüber anderen Methoden zur Untersuchung von DNA-Schäden, wie dem Schwesterchromatidaustausch oder dem Mikrokerntest, zeigt sich der Comet Assay durch eine höhere Sensitivität überlegen [Lee und Steinert, 2003]. Ein weiterer Vorteil besteht somit darin, dass nur eine geringe Zellzahl pro Versuch benötigt wird. Daneben zeichnet sich diese Methode durch relativ geringe Kosten aus und erlaubt eine strukturierte, ökonomische Arbeit. So sind auch größere Testreihen mit mehreren verschiedenen Testsubstanzen gleichzeitig möglich. Unter guten Bedingungen kann mit dieser Methode für einen Spender rasch eine Aussage über die Genotoxizität und Reaktion der Zellen auf mehrere unterschiedliche Substanzen gleichzeitig getroffen werden.

Die Versuche wurden unter alkalischen Bedingungen durchgeführt. So können Einzelstrangbrüche, Crosslinks und alkalilabile Stellen gemessen werden [Collins et al. 1997]. Auch Genomschäden durch Addukt-Bildung, wie sie zahlreiche tabakspezifische Kanzerogene nach Metabolisierung verursachen, werden nach Fragmentbildung durch die Exzisionsreparatur im Comet Assay darstellbar [Speit et al. 1995].

Die jeweilige Art der DNA-Schädigung lässt sich dadurch jedoch nicht feststellen. Nach Modifikation der Methode ist es bereits gelungen, spezifische Schädigungen zu untersuchen. Mithilfe der *high-performance liquid chromatography* (HPLC) und Einsatz von markierten Reparaturenzymen konnten typische DNA-Veränderungen

durch z. B. oxidativen Stress dargestellt werden [Lemiere et al 2005; Collins et al. 1997].

Die Messung der Stärke der Schädigungen erfolgt fluoreszenzmikroskopisch mit Hilfe des Auswertungsprogrammes Komet 3.1™ (Kinetic Imaging, Liverpool), welches automatisch die relevanten Messpunkte erfasst und neben anderen Werten auch der Olive-Tail-Moment (OTM) als quantitatives Maß der DNA-Schädigung berechnet. Der OTM wird als Produkt aus der mittleren Migrationsstrecke der DNA und der relativen Fluoreszenzdichte im Kometenschweif berechnet (Formel siehe Abb. 10). Der OTM deckt Variablen wie die DNA-Migrationsstrecke und Intensitätsunterschiede im Schweif durch unterschiedliche Verteilung der Fragmente ab. Außerdem ermöglicht er eine Einteilung der untersuchten Zellen in unterschiedliche Schädigungsstufen [Olive et al. 1990]. In dieser Arbeit wurde stets für je 80 Zellen eines Versuchsansatzes der OTM bestimmt, um so eine mittlere Schädigung durch Mittelwertbestimmung errechnen zu können. Die Zellen wurden manuell ausgewählt, daher muss eine gewisse Einflussnahme auf die Selektion der gemessenen Zellen durch den Auswertenden in Betracht gezogen werden. Bestimmte Abschnitte der auszuwertenden Objektträger konnten gelegentlich Ansammlungen von Zellen mit demselben Schädigungsgrad aufweisen, während andere Areale für denselben Fremdstoff geringer oder stärker geschädigte Zellen aufwiesen. Um eine möglichst repräsentative Stichprobe zu erreichen wurden am Mikroskop in zwei parallelen Bahnen Zellen auf dem Objektträger ausgewählt. Hierbei sollten auf jeder Bahn gleich viele Zellen ausgewählt werden und deren Verteilung auf der jeweiligen Bahn möglichst gleichmäßig sein. Bereiche ohne Zellen oder Zellansammlungen bei denen die Einzelzellen nicht sicher von einander abgrenzbar waren mussten ausgelassen werden. Die Erfahrung zeigte zudem, dass die verschiedenen Fremdstoffe charakteristische Schädigungsmuster hervorrufen, was wiederum zu einer bewussten Auswahl bestimmter Zellen führen kann. Eine Steigerung der Objektivität bei der Auswertung konnte für Stichproben durch mehrere auswertende Personen und Verblindung der Proben erreicht werden.

Zur Bestimmung von DNA-Schädigungen, die durch Kanzerogene des Tabakrauches an Lymphozyten verursacht werden, wurde der Comet Assay bereits mehrfach eingesetzt [Schabath et al 2003, Yang et al. 1999]. Die Anwendung dieses Versuchsmodells konnte auch auf die Untersuchung genotoxischer Effekte an

Schleimhautzellen des Pharynxbereiches erfolgreich übertragen werden [Harréus et al 1999].

In der vorliegenden Arbeit wurden kanzerogene Leitsubstanzen des Tabakrauches aus der Gruppe der *N*-Nitrosamine und PAKs zur Induktion von DNA-Schäden eingesetzt. Dabei besteht ein umgekehrt proportionaler Zusammenhang zwischen verabreicherter Dosis und Latenzzeit bis zum Auftreten maligner Transformation [Lewis et al., 1997]. Da es sich hier um einen Kurzzeittest an vitalen Zellen handelte, mussten höhere Einzeldosen benutzt werden um eine Schädigung des Erbgutes zu erreichen. Eine Dosiserhöhung führt jedoch in der Regel nicht nur zu einer Verstärkung der genotoxischen, sondern auch der zytotoxischen Effekte [Tice et al. 2000]. In der alkalischen Einzelzellmikroelektrophorese (MGE) treten vermehrt nekrotische Zellen mit stark fragmentierter DNA auf. Durch charakteristische morphologische Unterschiede können sie von apoptotischen Zellen unterschieden werden. Die Basenlänge apoptotisch und nekrotisch veränderter DNA-Fragmente liegt bei Apoptose bei 180-200 Basenpaaren, im Fall der Nekrose kommt es zum unspezifischen Abbau der DNA mit einer stark unterschiedlichen Länge der Bassenpaare [Olive et al. 1995]. Daraus folgte für die MGE, dass sich apoptotische Zellen mit kleinem oder nicht mehr erkennbarem Zellkern (dem Kopf), dafür aber mit einem langen weit aufgefächerten Schwanz, darstellen. Sie nannten diese Kometen daher *Ghost cells* oder *Hedgehogs* [Olive et al. 1993, 1995, Fairbairn et al. 1996]. Nekrotisch veränderte Zellen weisen dagegen noch einen Zellkern bei unterschiedlich langem Schweif auf. Beiden Formen gemeinsam sind die hohen OTM-Werte von zumeist weit über 40 [Bacso et al 2000, Fairbairn et al. 1996, Wilkins et al. 2002]. Die Einbeziehung dieser *ghost cells* in die Auswertung kann zu falsch positiven Werten im Comet Assay führen [Hartmann et al. 2003, Tice et al 2000]. Insbesondere für die Reparaturversuche war es notwendig den Anteil afunktioneller apoptotischer Zellen niedrig zu halten. Andere Untersuchungen gehen davon aus, dass der Anteil der apoptotischen Zellen in Fremdstoffexpositionstests wohl eher niedriger einzustufen ist. Arbeitsgruppen um Wesierska-Gadek und Roser stellten hohe Schädigung der Zellen im Comet Assay fest, ohne dass sich molekularbiologisch Hinweise auf apoptotische Vorgänge ergaben. [Wesierska-Gadek et al. 2003, Roser et al. 2001]. Als mutagene Testsubstanz verwendeten sie jeweils MNNG, das auch in dieser Arbeit benutzt wurde. Es ist daher davon

auszugehen, dass apoptische Vorgänge in den hier durchgeführten Versuchen als Einflussfaktor weitgehend ausgeschlossen werden können.

Um den Anteil an avitaler Zellen dennoch möglichst gering zu halten, wurden bei allen Versuchen Testungen der Vitalität durchgeführt und nur Zellreihen mit einer Gesamtvitalität von mindestens 80% zugelassen. In der Gegenüberstellung der Proben von Patienten und Kontrollgruppe konnten weder für die Lymphozyten noch für die Schleimhautzellen signifikante Unterschiede in der Verteilung der Vitalitäten festgestellt werden. Zudem wurden bei der digitalen Auswertung die *ghost cells* nicht berücksichtigt und flossen so nicht in das Ergebnis mit ein.

#### 4.4 Bestimmung der Mutagensensitivität mittels Comet Assay

Ein vermehrtes Auftreten kritischer Mutationen kann die Entstehung eines Karzinoms in allen Stufen der Karzinogenese begünstigen. Die genetische Suszeptibilität eines Individuums wird zunehmend als eigenständiger Faktor in der Karzinogenese angesehen [Hsu et al. 1991b]. Die Empfänglichkeit des Erbmaterials gegenüber Mutationen, welche durch exogene Einwirkung entstehen, wird als Mutagensensitivität bezeichnet. Die Mutagensensitivität einer Zelllinie wird durch eine individuelle Prädisposition bestimmt. Diese beruht im Wesentlichen auf Unterschieden in der Aufnahme, Aktivierung und dem Abbau von krebserregenden Stoffen aus der Umwelt in den Zellen eines Organismus. Die Aktivität von Enzymen, wie der Zytochrom P450-Gruppe, welche kanzerogene Xenobiotika metabolisieren, steigern zum Einen die intrazelluläre Konzentration dieser Substanzen und zum Anderen deren mutagene Potenz. Detoxifizierende Enzyme können diesen Prozessen entgegen wirken. Die Aktivität solcher Enzyme beziehungsweise derer einzelner Isoformen kann anlagebedingt variieren und in einer erhöhten Inzidenz von tabakassoziierten Tumoren resultieren [Bartsch et al. 2000]. Alkohol kann solche Voraussetzungen durch Enzyminduktion zusätzlich steigern und auch Zytochrome wie das CYP 2E1 betreffen, das unter anderem an der Verstoffwechselung der Nitrosamine zu ihren aktiven Metaboliten beteiligt ist [Poschl und Seitz 2004]. Als Studienteilnehmer wurden daher nur Personen ausgesucht, die regelmäßig Alkohol zu sich nahmen, um eine unterschiedliche Enzyminduktionsrate möglichst gering zu halten. Panayiotidis und Collins (1997) konnten eine verminderte Mutagensensitivität

der DNA durch Vitamin C nachweisen. Es muss daher davon ausgegangen werden, dass die individuelle Aufnahme von Antioxidantien die Ergebnisse der MGE beeinflussen. Weitere Einflussfaktoren der Mutagensensitivität können Variationen in der Expression von Transmembran-Transportern für die Xenobiotika und interindividuelle Unterschiede in der inflammatorischen Reaktion sein. Außerdem können Veränderungen der Aktivität von Tumor-Suppressor-Genen, welche die Integrität der DNA schützen, eine Häufung und Persistenz von Mutationen begünstigen. Mutationen und *Loss of heterozygosity* des rezessiven p53 Tumor-Suppressor-Gens konnten mehrfach in Tumorzellen nachgewiesen werden [Blons und Laurent-Puig 2003].

Solche genetischen Unterschiede beeinflussen die interindividuelle Empfindlichkeit gegenüber mutagenen und kanzerogenen Einflüssen. Daraus resultiert eine stärkere Instabilität der DNA mit gehäuftem Auftreten von Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen, Punktmutationen, Translokationen und anderen Arten der DNA-Schädigung. Diese Veränderungen entstehen durch direkte Einwirkung einer Noxe oder nach Adduktbildung.

Die Arbeitsgruppen um Cloos et al. (1995) und Hsu et al. (1991b) konnten für Probanden mit einem Kopf-Hals-Karzinom eine erhöhte Mutagensensitivität nachweisen. In einer weiteren Studie mit Kopf-Hals-Tumor-Patienten korrelierte eine erhöhte Mutagensensitivität mit einem erhöhten Rezidivrisiko [Cloos et al. 2000]. Als Maß diente ihnen die Anzahl der Chromatidbrüche pro Zelle, die nach Zugabe von Bleomycin zur Zellkultur auftraten. Die Anzahl der Chromatidbrüche war bei den Tumorpatienten signifikant höher. Wang et al. (1998) benutzten das Tabakkarzinogen BPDE als Testsubstanz und konnten ebenfalls bei Karzinompatienten eine höhere Bruchrate feststellen. Außerdem kam es bei Patienten mit einer stärkeren Sensitivität gegenüber Bleomycin vermehrt zur Entstehung von Zweitkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches (Spitz et al. 1998). Allerdings erfasst diese Methode nur einen geringen Bruchteil an induzierten DNA-Schäden. Zudem sind diese auch nur während der Metaphase darstellbar.

Ward (1988) konnte durch  $\gamma$ -Bestrahlung etwa 20 DNA-Doppelstrangbrüche, ca. 600-1000 DNA-Einzelstrangbrüche und ca. 250 Thyminveränderungen in einzelnen Zellen auslösen. Dies verdeutlicht die Vielzahl genetischer Aberrationen, die durch

schädigende Umwelteinflüsse entstehen können. Bei chemischen Kanzerogenen wie den PAks und Nitrosaminen entstehen die DNA-Schäden vornehmlich durch Adduktbildung und Alkylierung. Es entstehen ebenfalls mehr Einzelstrangbrüche als Doppelstrangbrüche [Hoffmann et al. 1985, Cloutier et al 2001, Hecht 2002]. Mit der Methode des Comet Assay lassen sich diese Formen der Genomschäden gut erfassen. Die individuelle Schädigungsstärke wurde anhand des Fragmentierungsgrad der DNA festgestellt. Der Olive Tail Moment diente hier als quantitatives Maß des Fragmentierungsgrades [Olive et al. 1993]. Dieses zeigte sich gegenüber anderen Methoden zur Berechnung des DNA-Schadens an Sensitivität und Spezifität überlegen [Lee und Steinert 2003].

Olive et al. (1990) nutzten dies zum Nachweis differenter Schädigungsstärken. Sie konnten durch ionisierende Strahlen in Tumorzellen eine stärkere Fragmentierung der DNA als in Gesunden auslösen. Trenz et al. (2000) verglichen mit dieser Methode Trägerinnen des Tumorsuppressorgens BRCA 1 mit denen des BRCA 2. An Lymphozyten konnten sie keine Unterschiede in der Induktion von DNA-Schädigung durch  $\gamma$ -Strahlung oder  $H_2O_2$  nachweisen.

Neben einer stärkeren Schädigung der DNA von Karzinompatienten zeigten sich auch die Vorteile des Comet Assay. Er ist unabhängig vom Zellzyklus anwendbar und zeigt eine hohe Sensitivität in der Detektion von Einzelstrangbrüchen. Diese stellen eine sehr häufig auftretende Form der Schädigung dar und eignen sich daher gut als Messgröße zur Bestimmung der Mutagensensitivität. Variationen in der Mutagensensitivität stellen sich als unterschiedlich starke Schädigung der Zellen und somit differente OTM-Werte dar.

#### 4.5 Mutagensensitivität von humanen Zellen gegenüber kanzerogenen des Tabakrauches

In dieser Arbeit wurden fünf typische Vertreter aus 2 Stoffgruppen benutzt um mögliche Unterschiede in der genetischen Suszeptibilität zu untersuchen. Der Vergleich wurde zwischen gesunden Probanden und bereits an einem malignen Tumor des Oropharynxbereiches erkrankten Personen angestellt. Als Zellmaterial standen Lymphozyten und oropharyngeale Epithelzellen zur Verfügung.

#### 4.5.1 Schädigung nach Inkubation mit DMSO

Das nichtwässrige DMSO diente aufgrund seiner guten Lösungseigenschaften in den Versuchen als Lösungsmittel für die zum Teil schwer löslichen Substanzen, wie das B[a]P. Gleichzeitig wurde es als Negativkontrolle benutzt, um einen Vergleich zwischen Zellen mit und ohne DNA-Schädigung zu ermöglichen. Außerdem sollte damit eine zusätzlich schädigende Wirkung durch das Lösungsmittel und somit Beeinflussung der Messergebnisse ausgeschlossen werden. Für alle Versuche mit DMSO als Testsubstanz liegen sowohl die Mittelwerte als auch die Mediane der OTM-Werte unter 2. Dies wird so auch von Olive et al. (1993) beschrieben, wonach eine relevante genotoxische Reaktion auf eine Substanz erst ab einem gemessenen OTM > 2 stattgefunden hat. Somit konnte DMSO als geeignetes Lösungsmittel für die Noxen bestätigt werden.

#### 4.5.2 DNA-Fragmentation nach Exposition gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK)

Die PAK kommen in der heutigen Umwelt ubiquitär vor. Sie entstehen nach unvollständiger Verbrennung organischer Stoffe wie beim Heizen mit fossilen Brennstoffen, im motorisierten Straßenverkehr, beim Tabakrauchen oder beim Braten von Speisen [Boström et al. 2002]. Im Tabakrauch weist Benzo[a]pyren (B[a]P) die höchste Konzentration der PAK auf [Hecht 1999]. Die IARC stuft B[a]P für den Menschen als sicher karzinogen (Gruppe 1) ein [IARC 2007b]. In epidemiologischen Studien konnte eine gesteigerte Inzidenz von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes bei Exposition gegenüber PAKs nachgewiesen werden [Maier et al. 1990]. Nach enzymatischer Aktivierung durch das Zytochrom-P450-Isoenzym CYP 1A1 entsteht das ultimative Kanzerogen Benzo[a]pyren-7,8-dihydrdiol-9,10-epoxid (BPDE). BPDE bildet DNA-Addukte mit Deoxyguanosin aus, die zu Transversionsmutationen GC → AT führen können [Jernström und Gräslund 1994]. Diese Form der Mutation konnte bei Tumorerkrankungen häufig im p53 Tumorsuppressorgen nachgewiesen werden [Harris 1991].

In der vorliegenden Untersuchung zeigten sowohl B[a]P als auch BPDE signifikante Schädigungswerte im Vergleich zur Vehikelsubstanz DMSO. Dies deckt sich mit Untersuchungen an Lymphozyten und weiteren humanen Zellarten durch Wang et al.

(1998), Cheng et al. (1998) und Harréus et al. (1999). B[a]P wurde in einer mehr als 100fach höheren Konzentration als BPDE verwendet. Dennoch lagen die OTM-Werte für die Exposition gegenüber BPDE in den Versuchen mit Lymphozyten und Epithelzellen für beide Gruppen erheblich über denen von B[a]P. Es wird daher angenommen, dass zum Zeitpunkt der Lyse und Mikrogelelektrophorese (MGE) nur ein geringer Teil des eingesetzten B[a]P metabolisch aktiviert worden ist bzw. die Metabolisierung nicht abgeschlossen war. Auch an Fibroblasten konnte dieser unterschiedliche Dosis-Wirkungs-Effekt nachgewiesen werden [Hanelt et al. 1997]. Nach Testung mit B[a]P und BPDE waren weder an den Lymphozyten noch an den Schleimhautzellen statistisch signifikante Unterschiede in der DNA-Fragmentierung zwischen Tumorgruppe und gesunden Kontrollen erkennbar.

Die Arbeitsgruppe Wang et al. (1998) konnte durch Bleomycin in der Lymphozyten-DNA von Probanden mit einem Kopf-Hals-Tumor mehr Chromatidbrüche auslösen als dies in der Kontrollgruppe der Fall war. Zum einen handelt es sich bei der Testsubstanz um ein Chemotherapeutikum, zum anderen wurde eine andere Testmethodik verwandt. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist somit nur eingeschränkt möglich. Auch Wu et al. (2005) konnte beim Bronchialkarzinom eine erhöhte Mutagensensitivität der Tumorpatienten gegenüber BPDE feststellen. Harreus et al. (1999) konnte eine gesteigerte DNA-Fragmentierung durch B[a]P nachweisen. Ein Vergleich von Probandengruppen unterblieb. Es zeigt sich jedoch eine signifikant höhere Schädigung durch B[a]P bei Probanden mit einem erhöhten Alkoholkonsum. Auch Ethanol führt bekanntlich zur Induktion des Zytochrom-P450-Systems, wenn auch vornehmlich des Isoenzym CYP 2E1. Smith et al. (2000) konnten bei Ratten durch Ethanol auch eine Induktion von CYP 1A1 erreichen. Somit ist eine vermehrte metabolische Aktivierung von B[a]P zu BPDE bei chronischem Alkoholkonsum denkbar und erklärt so den gesteigerten genotoxischen Effekt. In der aktuellen Studie tranken alle Teilnehmer regelmäßig alkoholische Getränke. Solche Unterschiede in Abhängigkeit vom Konsumverhalten konnten hier jedoch aufgrund der Größe der Stichprobe nicht sicher statistisch erfasst werden. Vollständig lassen sich interindividuelle Unterschiede in der Enzymaktivität aufgrund der genetischen Vielfalt nicht ausschließen [Yang et al. 1977]. Hinweise darauf ergeben sich in den genotoxikologischen Untersuchungen zu B[a]P und BPDE hier nicht.

#### 4.5.3 Vergleich der DNA-Fragmentierung nach Inkubation mit den Nitrosaminen NNN, NNK, NDEA, sowie MNNG

Der Zigarettenrauch enthält zahlreiche Nitrosamine [Hoffmann et al. 2001]. Für die meisten von ihnen konnten in Studien kanzerogene Eigenschaften nachgewiesen werden [Pfeifer et al. 2002, Schmäl et al. 1980]. Die tabakspezifischen Nitrosamine *N*<sup>1</sup>-Nitrosonornikotin (NNN) und 4-(*N*-Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) nehmen eine Sonderstellung ein, da sie aus Nikotin und Nornikotin hervorgehen. Diese Substanzen kommen nahezu ausschließlich in Tabakprodukten vor, woraus sich die Bezeichnung ableitet. Für sie konnte in Tierversuchen mehrfach ein eindeutiger Zusammenhang mit der Entstehung von Karzinomen des Atemtraktes über Nase hin zur Lunge und anderen Organen festgestellt werden [Hoffmann und Hecht 1985, Hecht 1999]. Die IARC (2007a) stuft sie als karzinogen für den Menschen ein. *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) und *N*-Methyl-*N*<sup>1</sup>-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) als weitere Vertreter werden als wahrscheinlich kanzerogen in die Gruppe 2 A eingestuft.

Die Nitrosamine werden nach Ingestion ebenfalls in einer Zytochrom-P450-abhängigen Reaktion durch CYP 2E1 aktiviert. Die hochreaktiven Produkte bilden durch Alkylierung Addukte mit der DNA und können so Strangbrüche induzieren [Pfeifer et al. 2002].

Nach Inkubation mit den Nitrosaminen NNN, NNK und NDEA zeigten die Lymphozyten und Mukosazellen der beiden Probandengruppen im Comet Assay signifikante DNA-Schädigungen. Eine signifikant stärkere DNA-Fragmentierung fiel anhand der OTM-Werte allein für die Epithelzellen der Tumorpatienten nach Fremdstoffinkubation mit NNN auf. In den übrigen Versuchen zur Mutagensensitivität konnte kein statistisch bedeutsamer Unterschied zwischen den Karzinompatienten und der tumorfreien Gruppe festgestellt werden. Insbesondere der Test mit NNN an den Lymphozyten zeigte ebenfalls keinen signifikanten Unterschied in der DNA-Schädigung auf. Eine Korrelation zwischen DNA-Fragmentierung der oropharyngealen Schleimhautzellen und Lymphozyten besteht nicht.

MNNG zeigte durchweg höchste Schädigungswerte und bewährte sich so als Positivkontrolle der Untersuchung.

Für die Nitrosamine NNN und NNK konnte bereits durch Pool-Zobel et al. (1992) die genotoxische Potenz an nasaler Schleimhaut von Ratten nachgewiesen werden. Kleinsasser et al. (2001) verglichen Genotoxizität des *N*-Nitrosamines NDEA an Lymphozyten-DNA von Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom und gesunden Personen. Die Auslösung einer signifikanten DNA-Schädigung deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Untersuchung an oropharyngealer Schleimhaut und Lymphozyten. Außerdem konnten sie eine höhere DNA-Migration unter den Tumorpatienten verzeichnen. Diese Ergebnisse differieren mit den aktuellen. Eine mögliche Erklärung ist ein unterschiedliches Alkoholkonsumverhalten des damals getesteten Kollektivs. Alkohol führt in der gleichen Zytochrom-P450-Gruppe zur Enzyminduktion, welche auch für die metabolische Aktivierung der Nitrosamine verantwortlich ist. In der aktuellen Untersuchung wurde das Trinkverhalten der Probanden daher berücksichtigt. Für die übrigen getesteten Substanzen, die von diesem Aktivierungsweg unabhängig sind, konnten Kleinsasser et al. keine signifikanten Unterschiede in der DNA-Schädigung nachweisen.

#### 4.5.4 Bewertung der Ergebnisse der Fremdstoffexpositionstests

Die vorliegenden Ergebnisse zur Untersuchung der Mutagensensitivität und Reparaturkapazität zeigen die genotoxische Potenz typischer Tabakinhaltstoffe an oropharyngealer Schleimhaut und Lymphozyten auf. Eine erhöhte Mutagensensitivität von Patienten mit einem Oropharynxkarzinom konnte wider Erwarten nicht nachgewiesen werden. Ähnlichen Studien zu Kopf-Hals-Tumoren zeigten eine erhöhte Suszeptibilität des Patientenklientels [Wang et al. 1998, Harreus et al. 1999, Cheng et al. 1998, Cloos et al. 1996]. Die Daten erwiesen sich jedoch aufgrund alterierender Zelllinien und Substanzen mit unterschiedlichem Reaktionsverhalten an der DNA nicht immer als übertragbar.

Defekte bestimmter Gene, seien sie angeboren oder erworben, führen zur Entstehung maligner Tumore. Für einen Teil dieser Schlüsselgene sind bereits Defekte beschrieben, die im Zusammenhang mit der Entwicklung von Malignomen einhergehen. Für die Kopf-Hals-Region sind vermehrte Mutationen im p53 Tumorsuppressorgen beschrieben [Blons 2003] Von BPDE weiß man, dass es zu Defekten in diesem Gen führt [Harris 1991] und so die individuelle Empfindlichkeit

gegenüber dieser Substanz sicherlich einen entscheidenden Faktor für das eigene Krebsrisiko darstellt. So kann die Effektivität des zellulären Metabolismus eine entscheidende Rolle bei der Entstehung solcher Läsionen spielen. Der zuständige Enzympolymorphismus wird zunehmend erforscht [Thier et al. 2003]. Eine möglichst realitätsgestreue Abbildung der Vorgänge bei der genotoxischen Wirkung von Noxen aus der Umwelt auf die betroffenen Gewebe des menschlichen Organismus soll erreicht werden. Die Auswirkungen der direkten Exposition von Zellen des Bronchialsystems gegenüber Tabakrauch konnte mittels der MGE im Versuch realisiert werden [Wolz et al. 2002]. Des Weiteren wird versucht die natürlichen Umgebungsbedingungen des Zielorgans möglichst detailgetreu nachzuahmen. Für humane nasale und oropharyngeale Schleimhaut konnten im Versuch Zellverbände, so genannte Miniorgankulturen, mit Ausbildung eines intakten Flimmerepithels und interzellulärer Verbindungen angezüchtet werden [Kleinsasser et al. 2001, Reiter et al. 2009]. Eine über mehrere Wochen bestehende Vitalität konnte anhand der Flimmerbewegungen der Miniorgankulturen der nasalen Schleimhaut nachgewiesen werden. So lassen sich Expositionsversuche gegenüber Noxen mit den verursachten mittelfristigen Auswirkungen gut untersuchen. Die Permeation der Substanzen in die Zellen durch z. B. Membrantransporter und der Metabolismus im Zellinneren wird dem Organ im lebenden Organismus gut nachempfunden. Es handelt sich hierbei jedoch um kein Kurzzeittestverfahren das ähnlich dem Comet Assay eine größere Anzahl an Versuchsreihen in einem überschaubaren Zeitrahmen zu lässt. Die Schleimhautprobe wird *in vitro* kultiviert was mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden ist. Zudem können die Auswirkungen auf subepitheliale Zellschichten der Schleimhaut nur unzureichend beurteilt werden.

#### **4.6 DNA-Reparaturuntersuchung an humanen Lymphozyten und Epithelzellen**

Die Fähigkeit zur DNA-Reparatur ist ein unabdingbarer Mechanismus menschlicher Zellen, um die Intaktheit des Genoms zu garantieren. Einige hereditäre Erkrankungen sind mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Karzinome vergesellschaftet, das auf einer Defizienz körpereigener Reparaturmechanismen beruht. Bei der Xeroderma pigmentosum kommt es aufgrund einer fehlerhaften Nukleotidexcisionsreparatur zum vermehrten Auftreten von UV-Induzierten Hauttumoren [de Boer et al. 2000]. Für das hereditäre nicht-polypöse kolorektale

Karzinom (HNPPC) konnte eine Mutation in einem Mismatch-Reparatur-Gen als Ursache gehäufter Dickdarmkarzinome unter den Trägern identifiziert werden [Peltomaki 2001]. Auch für die Entstehung von Karzinomen des Kopf-Hals-Bereichs wurden Mutationen und damit verbundene Fehler in der DNA-Reparatur immer wieder als Kofaktor vermutet. So konnten bestimmte Varianten des *X-ray repair cross complementing* (XRCC) Gens, welches für die Basenexzisions-Reparatur kodiert, mit einem erhöhten Risiko zur Entwicklung pharyngealer Karzinome in Zusammenhang gebracht werden [Benhamou et al. 2004].

Müller et al. (1994) verglichen mit Hilfe der MGE die Zeitdauer die nach einer DNA-Schädigung durch Strahlung bis vollständigen Reparatur des Schadens verstrich. Er konnte eine unterschiedliche Dauer in verschiedenen Tumorzelllinien feststellen. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls ein Vergleich der Reparaturleistung zweier unterschiedlicher Zelllinien vorgenommen. Sie wird hier als DNA-Reparaturkapazität (DRC) bezeichnet und als Anteil reparierter DNA innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls nach Exposition gegenüber genotoxischen Substanz gemessen.

Die zeitliche Dauer war auf 30 bzw. 60 Minuten begrenzt. Hier fand die Reparaturkinetik innerhalb der Zellen Berücksichtigung. Durch genotoxische Substanzen oder ionisierende Strahlung verursachte DNA-Schäden, insbesondere Einzelstrangbrüche, werden mehrheitlich innerhalb von 10-15 Minuten durch Reparaturenzyme behoben [Lankinen et al. 1996; Singh et al. 1991, Ward 1999]. In einer zweiten, bis zu 120 Minuten dauernden, Phase werden weitere Schäden repariert. In diesem Rahmen kann es zu einer neuerlichen Zunahme der Schädigungen, unter anderem durch die Neuausbildung von Einzelstrangbrüchen durch die Exzisionsreparatur von Basen, kommen [Singh et al. 1990]. Bei längerer Reparaturdauer nehmen die Schäden auch aufgrund von Nährstoffmangel und dem Anfallen von toxischen Stoffwechselprodukten wieder zu.

Zur Bestimmung der DRC von Lymphozyten wurde der Comet Assay bereits eingesetzt [Schmezer et al. 2001, Spitz et al. 2003]. Harréus et al. (2001) konnten in ihren Experimenten die Methode auf humanes nasales Schleimhautgewebe übertragen.

In den aktuellen Versuchen wurden erstmals die DRC von oropharynghealen Epithelzellen und Lymphozyten bestimmt, und ein Vergleich zwischen zwei

Patientengruppen angestellt. Unterscheidendes Merkmal war die Erkrankung oder Nichterkrankung an einem Plattenepithelkarzinom des Oropharynx. In den bisher durchgeführten Studien anderer Arbeitsgruppen waren zumeist Lymphozyten benutzt worden. Um eine gewisse Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu ermöglichen wurde jetzt an Lymphozyten und Epithelzellen parallel getestet.

Nach Berechnung der DNA-Reparaturkapazitäten (Formel siehe Abb. 11) ergeben sich ansteigende Werte von 56,9% auf 63,2% für die Tumorpatienten und von 58,7% auf 63,7% für die Kontrollpatienten. Sowohl in den oropharyngealen Schleimhautzellen als auch Lymphozyten konnte in den aktuellen Versuchen nach initialer signifikanter Schädigung durch NDEA ein Reparaturerfolg nachgewiesen werden. Ein signifikanter Unterschied in der DRC stellte sich in der Population der vorliegenden Arbeit weder für die Lymphozyten noch die Epithelzellen zwischen Tumorgruppe und Kontrollen heraus.

Cheng et al. (1998) und Cloos et al. (1996) wiesen in ihren Versuchen eine verminderte DNA-Reparaturkapazität (DRC) nach genotoxischer Einwirkung von Bleomycin für Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen nach. Für Patienten mit einem Nasopharynxkarzinom konnte mit dem Comet Assay wiederum keine reduzierte DRC der Lymphozyten für die Tumorgruppe festgestellt werden [Kleinsasser et al. 2005]. Ähnliche Ergebnisse berichtet Palyvoda et al. (2002) und Saha et al. (2008) für Kopf-Hals-Tumor-Patienten nach  $\gamma$ -Bestrahlung von Lymphozyten. Deutliche interindividuelle Unterschiede in der Reparaturleistung von Tumorpatienten wurden von Müller et al (2001) beobachtet, ohne jedoch einen deutlichen Unterschied zu gesunden Studienteilnehmern ausmachen zu können. Für Bronchialkarzinom-patienten konnte dagegen mehrfach eine reduzierte DRC nachgewiesen werden [Wu et al. 2005, Rajaee-Behabani et al 2001]. Ebenso verhält es sich für Untersuchungen an Mammakarzinompatientinnen [Trenz et al. 2002, Jaloszynski et al. 1997]. Die bestehende heterogene Studienlage zur Bestimmung der individuellen Reparaturleistung der DNA mit dem Comet Assay könnte mit den unterschiedlichen Tumorentitäten begründet werden. Zum einen spielt die Einwirkung exogener mutagener Substanzen bei Tumorgruppen, wie dem Mammakarzinom eine sicher geringere Rolle. Ein direkter Kontakt des Zielgewebes findet nicht statt. Zudem wird ein Großteil der genotoxischen Substanzen im Organismus durch chemisch und enzymatisch gestützte Reaktionen um- oder abgebaut bevor sie lokal wirken.

Dagegen ist gerade für die hier benutzen Stoffgruppen der PAKs und Nitrosamine bekannt, dass es nach oraler oder inhalativer Aufnahme zur Verteilung und Auslösung von Tumoren an nahezu jedem Organ kommen kann. Ein Vergleich dieser Substanzen in Versuchen zur DRC von Karzinompatienten anderer Körperregionen könnte hier sicher zum Gewinn neuer Erkenntnisse der Tumorentstehung beitragen.

Berwick und Vineis (2000) verglichen diesbezüglich in einer Metaanalyse mehrere Studien zur DNA-Reparatur. Die meisten der Studien zeigten zwar eine verminderte DNA-Reparatur bei Karzinompatienten auf, aber es ließen sich auch unberücksichtigte Fehlerquellen erkennen. Eine weitere Standardisierung der Methode und Abgleich der Probandengruppen ist notwendig.

So ist auch eine weitere Einsicht in die intrazellulären Stoffwechselvorgänge notwendig. Durch Behandlung mit Vitamin E und  $\beta$ -Karotin konnten Weitberg und Corvese (1997) eine Reduktion des durch tabakspezifische Nitrosamine induzierten DNA-Schadens erreichen und vermuteten somit protektive Effekte von Antioxidantien gegenüber der mutagenen Wirkung von Nitrosaminen. Astley et al. (2002) konnten auf diesem Wege sogar eine Verkürzung der Reparaturdauer für DNA-Schäden erreichen. Hier kann man die Möglichkeiten neuer Therapien und Prophylaxen nur erahnen. Der Comet Assay stellt eine effektive Methode dar, um die protektive Wirkung derartiger Substanzen zu quantifizieren.

Auch die Reparaturvorgänge und Lokalisationen zuvor entstandener Schäden am Erbgut können durch *in situ* Hybridisierung bzw. mit der FISH-Technik im Comet Assay genauer untersucht werden [Horvathova et al. 2004, McKelvey-Martin et al. 1998, Harréus et al. 2004, Rapp et al. 2005]. Bei Betrachtung der Überlegung von Pletomaki (2003) erscheinen solche Ansätze umso wichtiger. Danach tragen Defekte im DNA-Reparatursystem bei der Entstehung von 15-25 % aller Tumore eine Mitverantwortung. Beim Vergleich der Allele verschiedener DNA-Reparaturgene zeigte sich, dass bestimmte genetische Konstellationen mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung eines Karzinoms des oberen Aerodigestivtraktes einhergehen [Elahi et al. 2002, Benhamou et al. 2004]. Die Beurteilung dieser Variationen hat begonnen [Li et al. 2007], benötigt aber noch weitere, größere Studien um genauere Aussagen zu ermöglichen. Die detaillierte Betrachtung der Reparaturmechanismen

und zuständigen Gene wird weiter zum Verständnis der individuellen Reparaturkapazität beitragen.

Die Primärprophylaxe durch Vermeidung von Tabak, Alkohol und anderen karzinogenen Umweltstoffen stellt weiter die wichtigste Grundlage der Prävention dar. Wissenschaftliche Untersuchungen zur Entstehung und individueller Veranlagung können weitere Möglichkeiten für die Prophylaxe und Therapie offenbaren.

### 5 Zusammenfassung

Neben den anerkannten Risikofaktoren Alkohol und Rauchen gewinnt die individuelle Suszeptibilität, als zusätzlicher Risikofaktor für die Entwicklung von Kopf-Hals-Tumoren zunehmend an Bedeutung. Eine genetische Disposition zur DNA-Instabilität oder präformierte Defizite im Bereich der DNA-Reparaturmechanismen begünstigen das Auftreten und die Persistenz kritischer Mutationen. Durch diese „endogenen“ Risikofaktoren wird eine Tumorenstehung begünstigt, so dass manche Personen, bei gleicher Expositionsstärke und -dauer gegenüber exogenen kanzerogenen Einflüssen, leichter ein Karzinom entwickeln, als andere.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob Unterschiede in der Mutagensensitivität und/oder der DNA-Reparaturkapazität zwischen einer Versuchsgruppe aus Patienten mit einem Karzinom des oberen Aerodigestivtraktes und einer gesunden Probandengruppe feststellbar sind. Die beiden Gruppen wurden nach Geschlecht, Alter, Tabak- und Alkoholkonsum abgeglichen. Das Kollektiv der Karzinompatienten umfasste 20 Personen, die an einem oropharyngealen Karzinom erkrankt waren. Der Kontrollgruppe gehörten ebenfalls 20 Personen an, die jedoch alle frei von einem Tumorleiden waren. Perioperativ wurden zur Testung jeweils 20 Schleimhautproben gewonnen. an Lymphozyten standen aus beiden Gruppen jeweils 15 Proben zur Verfügung.

Die anerkannt karzinogenen Inhaltsstoffe des Tabakrauchs Benzo[a]pyren, BPDE, NDEA, NNN, NNK, NDEA wurden als Testsubstanzen verwendet, um Schäden an der DNA zu induzieren. MNNG und die Lösungssubstanz DMSO dienten als Positiv- und Negativkontrolle.

Schleimhautzellen und Lymphozyten wurden jeweils für 60 Minuten mit den genannten Fremdstoffen inkubiert. Der Reparaturversuch wurde ausschließlich mit NDEA durchgeführt. Nach Auswaschung des Fremdstoffes wurde den Schleimhautzellen 15 und 30 Minuten und den Lymphozyten 15, 30 und 60 Minuten Zeit zur Reparatur entstandener DNA-Schäden gewährt. Zur quantitativen Darstellung der fremdstoffinduzierten DNA-Schädigungen und Reparaturleistung wurde der Comet Assay benutzt.

Alle getesteten Substanzen zeigten im Vergleich zur Kontrollsubstanz DMSO ein signifikantes Schädigungsniveau. Die Ergebnisse der Versuche zur

Mutagensensitivität zeigten eine signifikant höhere Schädigung der Schleimhautzellen der Tumorgruppe durch NNN. In den weiteren Versuchen zur Mutagensensitivität konnte durch keine weitere Substanz, weder in Schleimhautzellen, noch in Lymphozyten, eine Schädigung ausgelöst werden, die einen signifikanten Unterschied zwischen Tumor- und Kontrollgruppe aufzeigt.

Für Schleimhautzellen und Lymphozyten konnte ein Ansteigen der DRC im zeitlichen Verlauf von 0 bis 30, bzw. 0 bis 60 Minuten erfasst werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe bestand nicht.

Alle benutzten Testsubstanzen verursachen nachweisbare DNA-Schäden in unterschiedlicher Stärke und Homogenität. Sowohl in Lymphozyten, als auch Epithelzellen fand unter den eingesetzten In-vitro-Bedingungen eine zeitabhängige zunehmende Reparatur der geschädigten DNA statt. In der statistischen Auswertung der Ergebnisse konnte ausschließlich für das Agens NNN ( $p = 0,04$ ) eine erhöhte Sensitivität der Schleimhautzellen von Karzinompatienten nachgewiesen werden. Zur Bestätigung dieses Ergebnisses müssen weitere Versuche folgen. Insgesamt ließ sich die Hypothese einer unterschiedlichen Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität beim Vergleich von Patienten mit einem Karzinom des Kopf-Hals-Bereiches und in der Population der vorliegenden Arbeit nicht bestätigen.

## 6 Literaturverzeichnis

Astley SB, Elliott RM, Archer DB, Southon S: Increased cellular carotenoid levels reduce the persistence of DNA single-strand breaks after oxidative challenge. *Nutr Cancer*. 2002; 43:202-13.

Barrett JC: Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. *Environ Health Perspect* 1993; 100:9-20.

Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov K: Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9:3-28.

Bacsó Z, Everson RB, Eliason JF: The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res*. 2000; 60:4623-4628.

Beach AC, Gupta RC: Human biomonitoring and the  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay. *Carcinogenesis* 1992; 13:1053-1074.

Benhamou S, Tuimala J, Bouchardy C, Dayer P, Sarasin A, Hirvonen A: DNA repair gene XRCC2 and XRCC3 polymorphisms and susceptibility to cancers of the upper aerodigestive tract. *Int J Cancer* 2004; 112:901-4

Berwick M, Vineis P: Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:874-97.

Blons H, Laurent-Puig P: TP53 and head and neck neoplasms. *Hum Mutat* 2003; 21:252-7.

Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S, Bernstein L, Schoenberg JB, Stemhagen A, Fraumeni JF J: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 1988; 48:3282-3287.

- Cloos J, Snow GB, Braakhuis BJ: Determination of genetic susceptibility for development of squamous epithelial carcinomas of the head and neck with bleomycin-induced chromosome instability. *Laryngorhinootologie* 1995; 74:742-7.
- Cloos J, Spitz MR, Schantz SP et al: Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88:530-535.
- Cloos J, Steen I, Timmerman AJ, van der Schans GP, Snow GB, Braakhuis BJ; DNA-damage processing in blood lymphocytes of head-and-neck-squamous-cell-carcinoma patients is dependent on tumor site. *Int J Cancer*. 1996; 68:26-9.
- Cloos J, Leemans CR, van der Sterre ML, Kuik DJ, Snow GB, Braakhuis BJ: Mutagen sensitivity as a biomarker for second primary tumors after head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9:713-7.
- Cloutier JF, Drouin R, Weinfeld M, O'Connor TR, Castonguay A; Characterization and mapping of DNA damage induced by reactive metabolites of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) at nucleotide resolution in human genomic DNA. *J Mol Biol*. 2001; 313:539-57.
- Collins AR, Dobson VL, Kennedy G, Stetina R: The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res*. 1997; 375:183-93.
- Cooper RL, Lindsey AJ, Waller RE: The presence of 3,4-benzopyrene in cigarette smoke. *Chemistry and Industry* 1954; 46:1418.
- de Boer J, Hoeijmakers JH: Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 2000; 21:453-60

Elahi A, Zheng Z, Park J, Eyring K, McCaffrey T, Lazarus P: The human OGG1 DNA repair enzyme and its association with orolaryngeal cancer risk. *Carcinogenesis* 2002; 23:1229-34.

Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL: The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995; 339:37-59

Fairbairn DW, Walburger DK, Fairbairn JJ, O'Neill KL: Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* 1996, 18:407-16.

Forastiere A, Koch W, Trott A, Sidransky D: Head and Neck Cancer. *N Engl J Med* 2001; 345:1890-900.

Frebourg T, Friend SH: Cancer risks from germline p53 mutations. *J Clin Invest* 1992; 90:1637-41

Friedlander PL: Genomic instability in head and neck cancer patients. *Head Neck* 2001; 23:683-91.

Divisi D, Di Tommaso S, Salvemini S, Garramone M, Crisci R: Diet and cancer. *Acta Biomed* 2006;77:118-23.

Gattas GJ, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V: Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1, and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head Neck* 2006; 28:819-26.

Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID). Krebs in Deutschland 5. aktualisierte, überarbeitete Ausgabe. *Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID) und das Robert-Koch-Institut (RKI), Saarbrücken* 2006.

Green, C. R. und Rodgman, A.: The tobacco chemists' research conference: a half century forum for advances in analytical methodology of tobacco and its products. *Recent Advances in Tobacco Science* 1996; 22: 131 – 304.

Hashibe M, Boffetta P, Zaridze D, Shangina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Janout V, Fabianova E, Bencko V, Moullan N, Chabrier A, Hung R, Hall J, Canzian F, Brennan P: Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15:696-703.

Hanahan D, Weinberg RA: The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000; 100:57-70.

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-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res.* 1997; 390:179-88.

Harréus UA, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H: Genotoxische Wirkung auf menschliche Schleimhautbiopsien des oberen Aerodigestivtraktes. *Laryngorhinootologie* 1999; 78:176-81.

Harréus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER, Kleinsasser NH: Untersuchungen zur DNA-Reparatur von Schleimhautzellen und Lymphozyten mit dem Comet Assay. *Laryngorhinootologie* 2001; 80:23-26.

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.* 2004; 563:131-8.

Harris, CC: Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* 1991; 51:5023-5044.

Hecht SS: Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention. *Lancet Oncol* 2002; 3:461–469.

Hecht SS: Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999; 91:1194-210.

Hoffmann D, Hecht SS, Wynder EL: Tumor promoters and cocarcinogens in tobacco carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 1983; 50:247-57.

Hoffmann D, Hecht SS: Nicotine-derived N-nitrosamines and tobacco-related cancer: current status and future directions. *Cancer Res* 1985; 45:935-44.

Hoffmann D, Hoffmann I, El-Bayoumy K: The less harmful cigarette: a controversial issue. a tribute to Ernst L. Wynder. *Chem Res Toxicol* 2001; 14:767-90.

Homann N, Nees M, Conradt C, Dietz A, Weidauer H, Maier H, Bosch FX: Overexpression of p53 in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients is associated with an increased incidence of second primary carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001; 7:290-6

Horváthová E, Dusinská M, Shaposhnikov S, Collins AR: DNA damage and repair measured in different genomic regions using the comet assay with fluorescent in situ hybridization. *Mutagenesis* 2004; 19:269-76.

Hsu TC: Genetic instability in the human population: a working hypothesis. *Hereditas* 1983; 98:1-9.

Hsu TC, Furlong C: The role of ethanol in oncogenesis of the upper aerodigestive tract; inhibition of DNA repair. *Anticancer Res* 1991a; 11:1995-1998.

Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP: Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1991b; 1:83-9.

International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Tobacco Smoking. IARC 1986; Vol. 38.

International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Alkohol Drinking. IARC 1988; Vol. 44.

International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Re-Evaluation of Some Organic Chemicals, Hydrazine and Hydrogen Peroxide. IARC 1999; Vol. 72.

International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. IARC 2004, Vol. 83.

International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines. IARC 2007a; Vol. 89

International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Polycyclic aromatic hydrocarbons. IARC 2007b; Vol. 92.

International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Ethanol in alcoholic beverages. IARC 2007c; Vol. 96.

International Agency for Research on Cancer: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Overall Evaluations of Carcinogenicity to Humans - List of all agents, mixtures and exposures evaluated to date. IARC 2007d; <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Listagentsalphorder.pdf>

Jahnke V, Matthias C, Bockmühl U, Strange RC: Genetische Prädisposition für die Entstehung von Kopf- und Halskarzinomen, *Laryngo-Rhino-Otol* 1999; 78:24-27.

Jałoszyński P, Kujawski M, Czub-Swierczek M, Markowska J, Szyfter K: Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. *Mutat Res.* 1997; 385:223-33.

Jernström B, Gräslund A: Covalent binding of benzo[a]pyrene 7,8-dihydrodiol 9,10-epoxides to DNA: molecular structures, induced mutations and biological consequences. *Biophys Chem.* 1994; 49:185-99.

Jorissen M, van der Scheuren B, van der Berghe H: Ciliogenesis in cultured human nasal epithelium. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1990; 52:368-374.

Kinnula VL, Chang L, Everitt JI, Crapo JD: Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have significant antioxidative capacity in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 1994; 11:568-76.

Kleinsasser NH, Harreus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER: Mutagen sensitivity of patients with laryngeal and oropharyngeal carcinoma. *Laryngorhinootologie* 1999; 78:679-84.

Kleinsasser NH, Weissacher H, Kastenbauer ER, Dirschedl P, Wallner BC, Harreus UA: Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2000; 257:337-42.

Kleinsasser NH, Wagner C, Wallner BC, Harreus UA, Kastenbauer ER: Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients. *Mutat Res* 2001a; 491:151-61.

Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harréus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER, Huber RM: Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*; 2001b; 63:141-147.

Kleinsasser NH, Wallner BC, Wagner C, Kastenbauer ER, Harreus UA: DNA repair capacity in lymphocytes of nasopharyngeal cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2005; 262:561-6.

Kuchenmeister F: Etablierung und Erprobung einer Technik, die erlaubt, DNA-Schäden an einzelnen Nasenschleimheutzellen der Ratte und des Menschen nachzuweisen. *Inauguraldissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades der Fakultät für Theoretische Medizin der Medizinischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg* 1994

Lankinen MH, Vilpo LM, Vilpo JA: UV- and gamma-irradiation-induced DNA single-strand breaks and their repair in human blood granulocytes and lymphocytes. *Mutat Res* 1996; 352:31-8.

Lee E Oh E Lee J Sul D Lee J: Use of the tail moment of the lymphocytes to evaluate DNA damage in human biomonitoring studies. *Toxicol Sci.* 2004; 81:121-132.

Lee RF, Steinert S: Use of the single gel electrophoresis/Comet Assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat Res* 2003; 544:43-64.

Lemiere S, Cossu-Leguille C, Charissou AM, Vasseur P.: DNA damage (comet assay) and 8-oxodGuo (HPLC-EC) in relation to oxidative stress in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Biomarkers* 2005; 10:41-57.

Lewis DF, Brantom PG, Ioannides C, Walker R, Parke DV: Nitrosamine carcinogenesis: rodent assays, quantitative structure-activity relationships, and human risk assessment. *Drug Metab Rev* 1997, 1055-1078.

Li C, Hu Z, Lu J, Liu Z, Wang LE, El-Naggar AK, Sturgis EM, Spitz MR, Wei Q: Genetic polymorphisms in DNA base-excision repair genes ADPRT, XRCC1, and APE1 and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 2007; 110:867-75.

Lieber CS, Garro A, Leo MA, Mak KM, Worner T: Alcohol and Cancer. *Hepatology* 1986; 6:1005-1019.

Maier H, Dietz A, Zielinski D, Jünnemann KH, Heller WD: Risikofaktoren bei Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle, des Oropharynx, des Hypopharynx und des Larynx. *DMW* 1990a;115:843-850

Maier H, Dietz A: Gewelke U, Seitz HK, Heller WD; Tabak- und alkohlassoziiertes Krebsrisiko im Bereich des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes. *Laryngorhinootologie* 1990b;69:505-511

Maier H, Tisch M, Conradt C, Pötschke-Langer M: Alkoholkonsum und Krebs des oberen Aerodigestivtraktes bei Frauen. *DMW* 1999; 124:851-854.

McKelvey-Martin V.J., Ho E.T.S., McKeown S.R., Johnston S.R., McCarthy P.J., Rajab N.F., Downes C.S. Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis*. 1998; 13: 1-8.

Møller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H: The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2000; 9:1005-15.

Müller WU, Bauch T, Streffler C, Niedereichholz F, Böcker W: Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumour cell lines. *Int J Radiat Biol*. 1994 Mar;65(3):315-9.

Müller WU, Bauch T, Stüben G, Sack H, Streffer C: Radiation sensitivity of lymphocytes from healthy individuals and cancer patients as measured by the comet assay. *Radiat Environ Biophys*. 2001 Mar;40(1):83-9.

- Nishimoto IN, Pinheiro NA, Rogatto SR, Carvalho AL, de Moura RP, Caballero OL, Simpson A, Kowalski LP: Alcohol dehydrogenase 3 genotype as a risk factor for upper aerodigestive tract cancers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2004; 130:78-82.
- Olive PL, Banáth JP, Durand RE: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 1990; 122:86-94.
- Olive PL, Frazer G, Banáth JP: Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay. *Radiat Res* 1993; 136:130-6.
- Olive PL, Durand RE, Le Riche J, Olivotto IA, Jackson SM: Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. *Cancer Res.* 1993; 53:733-736.
- Olive PL, Banáth JP: Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA crosslinking agent. *Exp Cell Res.* 1995; 221:19-26.
- Olive PL, Vikse CM, Vanderbyl S: Increase in the fraction of necrotic, not apoptotic, cells in SiHa xenograft tumours shortly after irradiation, *Radiother Oncol* 1999; 50:113-9.
- Olive PL: The comet assay. An overview of techniques. *Methods Mol Biol* 2002; 203:179–194.
- Olive PL, Banath JP: The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat Protoc* 2006; 1:23-9.
- Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984; 123:291-8.

Östling O, Johanson KJ: Bleomycin, in contrast to gamma irradiation, induces extreme variation of DNA strand breakage from cell to cell. *Int J Radiat Biol* 1987; 52:683-691.

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.* 2002; 22:1721-5.

Panayiotidis M, Collins AR: Ex vivo assessment of lymphocyte antioxidant status using the comet assay. *Free Radic Res.* 1997; 27:533-7.

Peltomaki P: Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer. *Hum Mol Genet* 2001;10:735-40.

Perera PF, Weinstein IB: Molecular epidemiology: recent advances and future directions. *Carcinogenesis* 2000;21:517-524.

Pfeifer GP, Denissenko MF, Olivier M, Tretyakova N, Hecht SS, Hainaut P: Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*. 2002 Oct 21;21(48):7435-51.

Phillips H.J: Dye exclusion tests for all viability. In: *Tissue Culture*. Kruse P.F. (Hrsg.), *Academic Press, New York* 1973: 407-408.

Pitot HC, Dragan YP: Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis. *FASEB J* 1991; 5:2280-6.

Pool-Zobel BL, Klein RG, Liegibel UM, Kuchenmeister F, Weber S, Schmezer P: Systemic genotoxic effects of tobacco-related nitrosamines following oral and inhalational administration to Sprague-Dawley rats. *Clin Investig* 1992; 70:299-306.

- Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U, Schroder HG, Schmezer P: Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ Mol Mutagen* 1994; 24:23-45.
- Poschl G, Seitz HK: Alcohol and cancer; *Alcohol Alcohol* 2004;39:155-65.
- Puisieux A, Lim S, Groopman J, Ozturk M: Selective targeting of p53 gene mutational hotspots in human cancers by etiologically defined carcinogens. *Cancer Res.* 1991; 51:6185-6189.
- Rapp A, Hausmann M, Greulich KO: The comet-FISH technique: a tool for detection of specific DNA damage and repair. *Methods Mol Biol.* 2005; 291:107-19.
- Rajaee-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* 2001; 95:86-91.
- Reiter M, Harréus U, Matthias C, Hözel D: Manual Kopf-Hals-Malignome. Epidemiologie der Kopf-Hals-Malignome. *W. Zuckschwerdt Verlag, München* 2009;4. Auflage:9-17.
- Reiter M, Sawicka A, Baumeister P, Welz C, Schwenk-Zieger S, Harréus U: Chromosomal alterations in mini organ cultures of human oropharyngeal mucosa cells caused by hydrogen peroxide. *Cancer Genomics Proteomics.* 2009; 6:275-80.
- Riedel F, Hörmann K: Alkoholinduzierte Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich. *HNO* 2004; 52:590-598.
- Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L, Kopp-Schneider A, Roots I, Bartsch H: Modulation of benzo[a]pyrene dioleopoxide-DNA adduct

levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* 2000; 21:35-41.

Roser S, Pool-Zobel BL and Rechkemmer G: Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat Res* 2001; 497:169-75.

Rubin H: Synergistic mechanisms in carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and by tobacco smoke: a bio-historical perspective with updates. *Carcinogenesis* 2001; 22:1903-30.

Saha DT, Davidson BJ, Wang A, Pollock AJ, Orden RA, Goldman R: Quantification of DNA repair capacity in whole blood of patients with head and neck cancer and healthy donors by comet assay. *Mutat Res.* 2008; 650:55-62.

Schabath MB, Spitz MR, Grossman HB, Zhang K, Dinney CP, Zheng PJ, Wu X; Genetic instability in bladder cancer assessed by the comet assay. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:540-7.

Schantz SP, Hsu TC. Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. *Head Neck* 1989; 11:337-42.

Schantz SP, Zhang Z, Spitz MS et al.: Genetic Susceptibility to Head and Neck Cancer: Interaction Between Nutrition and Mutagen Sensitivity. *The Laryngoscope* 1997; 107:765-81

Schmäh D; Habs M: Carcinogenicity of N-Nitroso Compounds. *Oncology* 1980; 37:237-242.

Schmezer P, Rajaee-Behbahani N, Risch A, et al.: Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 2001; 16: 25-30

Schön D, Bertz J, Görsch B et al.: Entwicklung der Überlebensraten von Krebspatienten in Deutschland. *Gesundheitsberichterstattung für Deutschland, Schwerpunkt-bericht, Robert Koch-Institut, Berlin* 1999.

Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA: Alcohol and cancer. *Recent Dev Alcohol* 1998; 14: 67-95

Sergerie M, Bleau G, Teulé R, Daudin M, Bujan L: Sperm DNA integrity as diagnosis and prognosis element of male fertility. *Gynecol Obstet Fertil.* 2005; 33:89-101

Shimada T, Fujii-Kuriyama Y: Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. *Cancer Sci.* 2004; 95:1-6.

Silverman s Jr: Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Dent Assoc* 2001;132: 7-11

Singh NP, Danner DB, Tice RR, Brant L, Schneider EL: DNA damage and repair with age in individual human lymphocytes. *Mutat Res* 1990; 237:123-130.

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* 1988; 175:184-91

Singh NP, Tice RR, Stephens RE, Schneider EL: A microgel electrophoresis technique for the direct quantitation of DNA damage and repair in individual fibroblasts cultured on microscope slides. *Mutat Res* 1991; 252:289-296.

Smith CJ, Perfetti TA, Garg R, Hansch C: IARC carcinogenes reported in cigarette mainstream smoke and their calculated log P values. *Food Chem Toxicol* 2003, 41:807-817

Speit G, Hartmann A: The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*. 1995; 10:555-9.

Spitz MR: Risk factors and genetic susceptibility. *Cancer Treat Res* 1995;74:73-87

Spitz MR, Lippman SM, Jiang H, Lee JJ, Khuri F, Hsu TC, Trizna Z, Schantz SP, Benner S, Hong WK: Mutagen Sensitivity as a predictor of tumor recurrence in patients with cancer of the upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:243-5.

Spitz MR, Wei Q, Dong Q, Amos CI, Wu X: Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Aug;12(8):689-98

Statistisches Bundesamt: Todesursachen in Deutschland, *Statistisches Bundesamt, Wiesbaden* 2004

Sugimura T: Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. *Cancer* 1982; 49:1970-83.

Szeto YT, Benzie IF, Collins AR, Choi SW, Cheng CY, Yow CM, Tse MM: A buccal cell model comet assay: development and evaluation for human biomonitoring and nutritional studies. *Mutat Res* 2005; 578:371-81.

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* 2000; 35:206-21.

Thier R, Brüning T, Roos PH, Rihs HP, Golka K, Ko Y, Bolt HM: Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int J Hyg Environ Health*. 2003; 206:149-71.

Thomas DB: Alcohol as a cause of cancer. *Environ Health Perspect* 1995;103:153-60

Trenz K, Rothfuss A, Schütz P, Speit G; Mutagen sensitivity of peripheral blood from women carrying a BRCA1 or BRCA2 mutation. *Mutat Res.* 2002; 500:89-96.

van Delft JH, Steenwinkel MS, van Asten JG, de Vogel N, Bruijntjes-Rozier TC, Schouten T, Cramers P, Maas L, van Herwijnen MH, van Schooten F, Hopmans PM: Biological monitoring the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of coke oven workers in relation to smoking and genetic polymorphisms for GSTM1 and GSTT1. *Ann Occup Hyg* 2001; 45:395-408.

Visapaa JP, Gotte K, Benesova M, Li J, Homann N, Conradt C, Inoue H, Tisch M, Horrmann K, Vakevainen S, Salaspuro M, Seitz HK: Increased cancer risk in heavy drinkers with the alcohol dehydrogenase 1C\*1 allele, possibly due to salivary acetaldehyde. *Gut* 2004; 53:871-6

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lipmann SM, Hong WK: Head and neck cancer. *N engl J Med* 1993; 328:184-194.

Wang LE, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Hong WK, Wei Q: Mutagen sensitivity to benzo(a)pyrene diol epoxide and the risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1998; 4:1773-8.

Ward JF: DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 1988; 35:95-125

Wei Q, Spitz MR, Gu J, Cheng L, Xu X, Strom SS, Kripke ML, Hsu TC: DNA repair capacity correlates with mutagen sensitivity in lymphoblastoid cell lines. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1996; 5:199-204.

Weitberg AB, Corvese D. Effect of vitamin E and beta-carotene on DNA strand breakage induced by tobacco-specific nitrosamines and stimulated human phagocytes. *J Exp Clin Cancer Res.* 1997; 16:11-4.

Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Schloffer D, Uhl M, Wojciechowski J: Non-apoptogenic killing of hela cervical carcinoma cells after short exposure to the alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *J Cell Biochem.* 2003; 89:1222-34.

Wilkins RC, Kutzner BC, Truong M, Sanchez-Dardon J, McLean JR: Analysis of radiation-induced apoptosis in human lymphocytes: flow cytometry using Annexin V and propidium iodide versus the neutral comet assay. *Cytometry* 2002; 48:14-19.

WHO: World Health Statistics 2006. *World Health Organization*. 2006. ISBN 92 4 156321 4

Wolz L, Krause G, Scherer G, Aufderheide M, Mohr U: In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line. *Food Chem Toxicol.* 2002;40:845-850.

Wu X, Gu J, Hong WK, Lee JJ, Amos CI, Jiang H, Winn RJ, Fu KK, Cooper J, Spitz MR: Benzo[a]pyrene diol epoxide and bleomycin sensitivity and susceptibility to cancer of upper aerodigestive tract. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:1393-9.

Wu X, Roth JA, Zhao H, Luo S, Zheng YL, Chiang S, Spitz MR: Cell cycle checkpoints, DNA damage/repair, and lung cancer risk. *Cancer Res* 2005; 65:349-57.

Yang SK, Gelboin HV, Trump BF, Autrup H, Harris CC: Metabolic activation of benzo(a)pyrene and binding to DNA in cultured human bronchus. *Cancer Res* 1977; 37:1210-5.

Yang Q, Hergenhahn M, Weninger A, Bartsch H: Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji. *Carcinogenesis* 1999; 20:1769-75.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

B[a]P	Benzo[a]pyren
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
CYP	Zytochrom P450
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (Deoxyribonucleic acid)
DRC	DNA-Reparaturkapazität (DNA repair capacity)
EBV	Epstein-Barr-Virus
FCS	Fetal calf serum
HPV	Humanes Papilloma-Virus
H2O2	Wasserstoffperoxid
IARC	International Agency for Research on Cancer
GST	Glutathion-S-Transferase
MGE	(Einzelzell-) Mikrogelelektrophorese
MNNG	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
NDEA	<i>N</i> -Nitrosodiethylamin
NNN	<i>N</i> '-Nitrosonornikotin
NNK	4-( <i>N</i> -Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
OTM	Olive Tail Moment
PAK	Polyzyklischer aromatischer Kohlenwasserstoff
PBS	Phosphate buffered saline
XRCC	X-ray repair cross complementing (Gen)

## 7.2 Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name: Reiß  
Vorname: Andreas  
Geboren am: 02.09.1975  
Geburtsort: München  
Familienstand Verheiratet seit 2005 mit Natascha Reiß, geb. Morber.  
4 Söhne: Moritz geb. 2003, Ludwig geb. 2006,  
Johannes geb. 2008 und Korbinian geb. 2010  
Staatangehörigkeit: deutsch

### Schulbildung:

1982 – 86 Volksschule Hohenroth  
1986 – 95 Rhön-Gymnasium Bad Neustadt/S.

### Studium:

1996 – 2003 Studium der Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität München  
2003 – 2004 Praktisches Jahr:  
Medizinische Poliklinik der Universität München  
Chirurgische Klinik – Innenstadt der Universität München  
Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Universität München  
2005 Staatsexamen im Fach Humanmedizin

### Berufliche Tätigkeit:

2005 - 2008 Assistenzarzt in der Abteilung für innere Medizin des Krankenhaus Waldkirchen/Ndby.  
Seit 2008 Assistenzarzt der Medizinischen Klinik I am Klinikum Deggendorf

### **7.3 Danksagung**

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. A Berghaus, Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Ermöglichung dieser Studie durch Bereitstellung der Räumlichkeiten und finanziellen Mittel.

Vielen Dank auch an Herrn PD Dr. med. Ulrich Harréus für die Übernahme der Betreuung meiner Arbeit, unermüdlichen Anregungen und freundschaftliche Anteilnahme.

Ebenso möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. N. Kleinsasser, der mich für die experimentelle Arbeit begeisterte und in das Labor für klinisch-experimentelle Onkologie einführte.

Mein besonderer Dank gilt Sabina Zieger für Ihren Beistand, nicht nur in fachlichen Fragen.

Außerdem danke ich Dipl. biol. B. Wallner und Tatjana Baluschko für ihre immerwährende Unterstützung bei der Laborarbeit.

Weiterhin gilt mein Dank meinen Mitdoktoranden dafür, dass sie immer ein freundschaftliches und fröhliches Klima während der Arbeit schufen.

Mein Dank gilt auch im Besonderen meiner Frau Natascha, weil sie mich immer wieder motivierte und mir mit ihrem fachlich-mathematischem Rat zur Seite stand.

Ich danke meinen Eltern, die mir mein Studium und somit auch diese Arbeit ermöglichten.