

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

**Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität in
Abhängigkeit der EGFR Aktivität bei Patienten mit einem
Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes**

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

vorgelegt von

Felicitas Heiß

aus

München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Martin Canis
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Hjalmar Hagedorn
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv.-Doz. Dr. med. Christian Welz
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	31.01.2019

Eidesstattliche Versicherung

Heiß, Felicitas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität in Abhängigkeit der EGFR Aktivität bei Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 31.01.2019

Ort, Datum

Felicitas Heiß

Unterschrift Doktorandin

Meinen lieben Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes.....	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.2.1	Exogene Risikofaktoren	2
1.1.2.1.1	Nikotinabusus und Alkoholkonsum.....	2
1.1.2.1.2	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	3
1.1.2.1.3	Einfluss von Arbeits- und Umweltstoffen.....	3
1.1.2.1.4	Virale Infektionen	4
1.1.2.2	Endogene Risikofaktoren	5
1.1.2.2.1	Mutagensensitivität	5
1.1.2.2.2	DNA-Reparaturkapazität	6
1.2	Molekulare Karzinogenese	7
1.2.1	Tumorsuppressorgene.....	7
1.2.2	Protoonkogene	8
1.2.3	Tumorprogressionsmodell.....	9
1.2.4	Prozess der Feldkanzerisierung.....	10
1.3	Epidermal Growth Factor Receptor	11
1.3.1	Die Rolle des EGFR in der Karzinogenese und als Therapieziel	11
1.3.2	Struktur und Klassifikation des EGFR	12
1.3.3	Signalkaskade	13
1.3.4	Stimulation und Hemmung des EGFR.....	14
1.3.4.1	Stimulation des EGFR durch den transforming growth factor alpha.....	14
1.3.4.2	Hemmung des EGFR durch Cetuximab (Erbix TM)	15
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	17
2	Material und Methoden	18

2.1	Material.....	18
2.1.1	Patientenkollektiv und Gewebeprobe.....	18
2.1.2	Anamneseerhebung	19
2.1.2.1	Anamneseerhebung der tumorfreien Kontrollgruppe.....	19
2.1.2.2	Anamneseerhebung der Karzinomgruppe	20
2.1.3	Materialien und Geräte	21
2.1.3.1	Chemikalien, Enzyme, Zellkulturmedien	21
2.1.3.2	Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.3.3	Geräte	23
2.2	Methoden	26
2.2.1	Übersicht über den Versuchsablauf.....	26
2.2.2	Miniorgankulturen.....	27
2.2.3	Anlegen und Kultivieren von Miniorgankulturen.....	28
2.2.4	Inkubation mit den aktivitätsmodulierenden Substanzen des EGFR, Cetuximab und TGF α	28
2.2.5	Inkubation mit Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid	29
2.2.6	Isolierung von Einzelzellen aus Miniorgankulturen	29
2.2.7	Bestimmung der Zellvitalität	30
2.2.8	Einzelzell- Gelelektrophorese (Comet Assay).....	31
2.2.8.1	Vorbereitung der Objektträger und Zelllyse	31
2.2.8.2	Durchführung der Elektrophorese.....	32
2.2.8.3	Digitale Auswertung der DNA-Migration.....	32
2.2.9	Kryoschnitte.....	33
2.2.9.1	Kryokonservierung der Miniorgankulturen.....	33
2.2.9.2	Anfertigung der Kryoschnitte	34
2.2.10	Hämalaun- Eosin-Färbung der Kryoschnitte	34
2.2.11	Immunhistochemische Darstellung des EGFR	35
2.2.12	Methodenspezifische Materialien	37

2.2.12.1	Herstellung des Kulturmediums für Miniorgankulturen	37
2.2.12.2	Herstellung der Lösungen für die Einzelzell- Gelelektrophorese	38
2.2.12.3	Materialien zur Durchführung der HE-Färbung	40
2.2.12.4	Materialien zur Durchführung der immunhistochemischen Färbung des EGFR ..	41
3	Ergebnisse.....	43
3.1	Vitalität der Zellen	43
3.2	Statistische Analyse.....	43
3.3	DNA-Schädigung mit BPDE und DNA-Reparatur.....	44
3.4	Einfluss der Stimulation (TGF α) und der Blockade (Cetuximab) des EGFR auf die Mutagensensitivität und die Reparaturfähigkeit in der tumorfreien Kontrollgruppe und in der Karzinomgruppe	46
3.4.1	Tumorfreie Kontrollgruppe.....	46
3.4.1.1	DNA-Schädigung	46
3.4.1.2	DNA-Reparatur und DNA- Reparaturkapazität.....	48
3.4.2	Karzinomgruppe.....	51
3.4.2.1	DNA-Schädigung	51
3.4.2.2	DNA-Reparatur und DNA-Reparaturkapazität.....	53
3.4.3	Vergleich zwischen tumorfreier Kontrollgruppe und Karzinomgruppe	56
3.4.3.1	DNA-Schädigung	56
3.4.3.2	DNA-Reparaturkapazität	58
3.5	Ergebnisse der immunhistochemischen Darstellung des EGFR.....	60
3.5.1	Tumorfreie Kontrollgruppe.....	61
3.5.2	Karzinomgruppe.....	62
3.5.3	Vergleich der EGFR-Expression zwischen tumorfreier Kontrollgruppe und Karzinomgruppe.....	63
4	Diskussion	66
4.1	Auswahl der Patienten	66
4.2	Gewinnung oropharyngealer Schleimhaut	66

4.3	Schädigung der DNA durch Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid.....	67
4.4	Auswahl des EGFR-Proteins und Modulation des Aktivitätszustandes	68
4.5	Diskussion der Ergebnisse	69
4.5.1	Mutagensensitivität	69
4.5.1.1	Einfluss von Cetuximab auf die Mutagensensitivität.....	70
4.5.1.2	Einfluss von TGF α auf die Mutagensensitivität	71
4.5.2	DNA-Reparaturkapazität	72
4.5.2.1	Reparaturkapazität nach der Schädigung durch BPDE	73
4.5.2.2	Reparaturkapazität unter dem Einfluss von Cetuximab und TGF α	74
4.5.3	Expression des EGFR in der Schleimhaut der tumorfreien Kontrollgruppe und in präkanzerös veränderter Schleimhaut der Karzinompatienten	76
4.5.4	Schlussfolgerung	77
5	Zusammenfassung	79
6	Literaturverzeichnis	81
7	Abkürzungsverzeichnis	96
8	Danksagung	99

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes

1.1.1 Epidemiologie

Weltweit bilden Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes die sechsthäufigste Tumorentität. Jedes Jahr erkranken rund 500 000 Menschen an einem solchen Karzinom [Martin et al., 2014]. Im Jahr 2014 gab es 12 830 Neuerkrankungen in Deutschland und für das Jahr 2018 ist vom „Zentrum für Krebsregisterdaten (ZfKD)“ des Robert Koch-Institutes (RKI) eine steigende Tendenz prognostiziert [RKI/ZfKD, 2016]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt zwischen 63 und 66 Jahren, wobei Frauen im Schnitt später erkranken. Die Prognose hängt maßgeblich von der Lokalisation des Karzinoms und dem Tumorstadium bei Erstdiagnose ab. Im Tumorstadium T1 werden Plattenepithelkarzinome des Hypopharynx in lediglich 11,6 % der Fälle diagnostiziert. Beinahe die Hälfte der Karzinome ist einem T4 Stadium zuzuordnen. Die Diagnose eines Oro- und Nasopharynxkarzinomes wird im Schnitt bei 22 % der Patienten früh festgestellt. Mundhöhlen- und Larynxkarzinome werden in knapp 40 % in einem frühen Tumorstadium erkannt. Diese Unterschiede bezüglich des Zeitpunktes der Erstdiagnose sind auch auf das frühe oder späte Auftreten von Symptomen zurückzuführen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate liegt für Männer bei 48 % und für Frauen bei 59 %. Wird das relative Überleben in Bezug auf die Tumorlokalisierung betrachtet, so hat ein Patient mit einem Karzinom des Hypopharynx mit 33 % die schlechteste Prognose, wohingegen Patienten mit einem Oropharynxkarzinom eine relative 5-Jahres-Überlebensrate von 50 % aufweisen. Kommt es zu einem Progress des Tumorleidens im Sinne einer Fernmetastasierung oder eines lokoregionären Rezidives, so beträgt das mediane Überleben sowohl beim Hypopharynx- als auch beim Oropharynxkarzinom sechs Monate. Dies zeigt die Wichtigkeit einer gut geplanten, interdisziplinär durchgeführten Ersttherapie [Tumorzentrum München, 2014; RKI, 2015].

1.1.2 Ätiologie

Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes, die die Mundhöhle, den Nasenrachenraum, den Mundrachenraum, den unteren Schlund sowie den Kehlkopf betreffen können, sind bösartige Tumore, deren Entartung vom Oberflächenepithel ausgeht und die abhängig von der Lokalisation mit unterschiedlicher Häufigkeit vorkommen [Wittekind et al., 2001]. Über 90 % der malignen Tumoren im Kopf-Hals-Bereich nehmen ihren Ursprung von den Plattenepithelzellen [Reuter et al., 2007]. Als Hauptrisikofaktoren für die Entstehung der Ma-

lignome gelten der Alkoholkonsum und der Nikotinabusus, wobei auch eine Reihe anderer exogener Risikofaktoren identifiziert werden konnten. Hierzu zählen beispielsweise virale Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) oder dem humanen Papilloma-Virus (HPV). Insbesondere beim Oropharynxkarzinom stellen die HPV assoziierten Tumore eine eigene Tumorentität dar. Der Nachweis von HPV bedingt einen günstigeren Verlauf [Dreyer und Niedobitek, 2017].

Zusätzlich zu diesen Komponenten sind vielfältige endogene Risikofaktoren wie die individuelle Empfindlichkeit gegenüber Schadstoffen und die DNA-Reparaturfähigkeit eines Individuums in der Tumorentstehung nicht außer Acht zu lassen [Harréus et al., 2004]. Diese endogenen Faktoren scheinen insbesondere bei Patienten mit hohem Nikotin- und Alkoholkonsum, die keinen Tumor entwickeln, eine wichtige Rolle zu spielen [Koch et al., 1999].

1.1.2.1 Exogene Risikofaktoren

1.1.2.1.1 Nikotinabusus und Alkoholkonsum

In 75 % der Fälle sind Tabakgenuss und Alkoholkonsum für die Entstehung der Plattenepithelkarzinome im oberen Aerodigestivtrakt verantwortlich [Conway et al., 2009].

Es wurde gezeigt, dass Raucher, die keinen Alkohol trinken, ein höheres Risiko haben einen Kopf-Hals-Tumor zu entwickeln als Alkoholkonsumenten, die Nichtraucher sind. Hierbei wird eine essentielle Rolle der Frequenz und Dauer des Rauchens sowie der Anzahl der Zigaretten (pack years) zugeschrieben [Hashibe et al., 2007].

Auch Kauprodukte, die entweder mit Tabak gemischt oder pur konsumiert werden und die es vor allem in Ländern wie Indien vermehrt zu kaufen gibt, haben eine karzinogene Wirkung [Sapkota et al., 2007]. Eine Analyse der International Agency for Research on Cancer (IARC) zeigte, dass das Kauen der Betelnuss, sowohl mit als auch ohne Tabak versetzt, eine krebserzeugende Wirkung auf die Mundhöhle hat [IARC Monograph Vol. 89, 2007].

Bei ausschließlichem Alkoholkonsum ist das Risiko der Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms nur mäßig gesteigert. Jedoch erhöht sich bei dem Konsum von mehr als 90 g reinem Alkohol pro Tag das Risiko um das Fünffache [Rodriguez et al., 2004]. Werden sowohl Tabak als auch Alkohol konsumiert, ist die Wirkung der beiden nicht additiv, sondern multiplikativ und es kommt zu einer Steigerung des Risikos sogar auf das Zweihundertfache [Conway et al., 2009].

1.1.2.1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAHs) bezeichnen eine Gruppe von Substanzen, die bei Verbrennungsprozessen unter Sauerstoffmangel entstehen. Nach Aufnahme in den Körper über die Haut oder den Aerodigestivtrakt werden diese metabolisiert und weisen dann im aktivierten Zustand ein hohes karzinogenes Potential auf [Maier et al, 1994].

Sie kommen zu großen Teilen im Hauptstrom des Tabakrauchs, aber auch in Abgasen von Hochöfen und Autos vor [Smith et al., 2000]. Auch beim Braten, Grillen und Räuchern von Nahrungsmitteln entstehen PAHs, die ebenso wie beim Rauchen eine direkte Wirkung auf den Menschen haben [Knize et al., 1999]. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen in der Atmosphäre besteht für den Menschen auch eine geringe indirekte Belastung, jedoch entsteht die Hauptbelastung durch die direkte Aufnahme der Schadstoffe [Li et al., 2010].

Als Hauptvertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe gilt das Benzo[a]pyren, das von der International Agency for Research on Cancer in die Gruppe 1 der Karzinogene eingeordnet wurde. Somit stellt es für den Menschen einen sicher krebserregenden Stoff dar [IARC Monograph Vol. 92, 2007].

Um die DNA zu schädigen und somit karzinogen wirken zu können, muss das Benzo[a]pyren erst in seinen aktivierten Metaboliten mittels enzymatisch katalysierter Reaktionen durch das Cytochrom-P450-System umgewandelt werden. Dies geschieht durch zwei Epoxidierungen. Das Produkt aus diesen Reaktionen ist das +(anti)-Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE). Dieses ist das Isomer, welches bei der Karzinomentstehung die höchste Aktivität aufweist [Luch, 2001; Reiter et al., 2010].

In dieser Arbeit wurde BPDE angewandt, um die DNA der Zellen zu schädigen.

1.1.2.1.3 Einfluss von Arbeits- und Umweltstoffen

Auch der tägliche Einfluss von einigen Stoffen, denen Personen während ihrer Arbeitszeit oder im täglichen Leben ausgesetzt sind, kann das Risiko an einem Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes zu erkranken erhöhen.

Zu diesen Schadstoffen zählen beispielsweise Kohle- und Holzstäube [Laforest et al., 2000], Asbest, organische Lösungsmittel, Formaldehyd und Mineralöl [Berrino et al., 2003].

Das Risiko an einem Karzinom zu erkranken, ist besonders dann gesteigert, wenn eine Kombination von beruflicher und nicht-beruflicher Exposition gegenüber Schadstoffen besteht, da hier ein Zusammenwirken der beiden Risikofaktoren zum Tragen kommt [Maier et al., 1999].

1.1.2.1.4 Virale Infektionen

Virale Infektionen gelten als anerkannte Risikofaktoren für die Entstehung von Kopf-Hals-Tumoren. Dazu zählen insbesondere die Infektionen mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV) und dem Humanen Papillomavirus (HPV).

1966 wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen einer EBV Infektion und der Entstehung eines Karzinoms des Nasenrachenraumes erkannt [Mehanna et al., 2010].

Obwohl die Durchseuchung mit dem Epstein-Barr-Virus 95 % der Erwachsenen betrifft, tritt die Erkrankung weltweit sehr selten auf [Breda et al., 2010]. Auffällig häufig jedoch ist der asiatische Raum betroffen, und hier vor allem Südchina mit einer jährlichen Inzidenz von 25-30/100 000 Einwohnern [Wei und Sham, 2005].

Da sich in nahezu jeder Gewebeprobe von Tumoren im Nasen-Rachen-Raum und auch in präkanzerösen Veränderungen EBV nachweisen ließ, wurden seit 1970 in Südchina EBV-assoziierte Antikörper zum Screening verwendet, da diese eine sehr hohe Spezifität und Sensitivität für Nasenrachenkarzinome aufweisen [Breda et al., 2010; Cao et al., 2011]. Mit Hilfe dieser Screening-Verfahren wurde eine Möglichkeit geschaffen, das Überleben der Patienten zu steigern, da die 5-Jahres-Überlebensrate signifikant vom Zeitpunkt der Diagnosestellung abhängt. So beträgt die Überlebensrate in den Stadien I und II der Erkrankung über 94 %, hingegen in den Stadien III und IV nur noch unter 80 % [Mao et al., 2009].

Eine Beteiligung der Humanen Papillomaviren (HPV) an der Entstehung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich wurde seit etwa 1980 untersucht. Es stellte sich heraus, dass insbesondere HPV- Infektionen der Typen 16 und 18, welche zu den „high risk“ HPV-Typen gehören nicht nur die Entstehung des Zervixkarzinoms begünstigen, sondern auch die Entwicklung der Karzinome des Oropharynx beeinflussen. Die Inzidenz des HPV-positiven Oropharynxkarzinoms stieg von 1988 bis 2004 um etwa 225 % an, was auf die Zunahme der Infektionsrate zurückgeführt wird [Leinmüller, 2012].

Es konnten folgende Unterschiede bezüglich des Patientengutes, der Histologie, des Ansprechens auf die Therapie und der Prognose bei bestehender simultaner Infektion mit HPV festgestellt werden:

Meist sind jüngere (< 40 Jahren), häufig unverheiratete Männer betroffen. Die Tumore stellen sich in der Histologie als gut differenziert dar und sprechen besser auf eine Radiochemotherapie oder auf eine zielgerichtete Therapie und/oder immunstimulierende Strategie an [Ha und Califano, 2004]. HPV-positive Tumore des Mundrachenraumes haben auch eine günstigere

Prognose in Bezug auf das Überleben und eine geringere Wahrscheinlichkeit der Rezidiventstehung als HPV-negative Karzinome [Gillison et al., 2000; Fakhry et al., 2008].

1.1.2.2 Endogene Risikofaktoren

1.1.2.2.1 Mutagensensitivität

Nicht jeder, der sich exogenen Risikofaktoren in seinem Leben aussetzt, entwickelt ein Malignom des oberen Aerodigestivtraktes. Dies zeigt, dass auch eine genetische Prädisposition die Entstehung beeinflusst, sowie die individuelle Empfindlichkeit gegenüber DNA schädigenden Substanzen, was als Mutagensensitivität bezeichnet wird [Reiter et al., 2010].

Cherry et al. entwickelten eine Methode, die es ermöglichte, die individuelle Mutagensensitivität nachzuweisen, wobei die Anzahl der DNA- Einzelstrangbrüche pro Zelle, die durch DNA- schädigendes Bleomycin induziert wurden, ermittelt wurde. Es stellte sich heraus, dass Patienten, die an einem medullären Schilddrüsenkarzinom erkrankt waren, eine signifikant höhere Bruchrate aufwiesen als die der Kontrollgruppe [Cherry und Hsu, 1983].

In weiteren Studien zeigte sich, dass die Bruchrate auch ein nützlicher Biomarker für andere Krebsarten, wie Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes oder der Lunge, sein kann [Spitz et al., 1989, 1995; Cloos et al., 1996].

Diese Methode wurde von Wang et al. in einer Studie modifiziert, bei der das Bleomycin durch den polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren ersetzt wurde. Der Austausch der schädigenden Substanz sollte dazu dienen, die Ergebnisse auf Tumore im Bereich des oberen Aerodigestivtraktes, deren Entstehung auf den Genuss von Tabak zurückzuführen ist, übertragen zu können.

Dabei zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede in den Ergebnissen wie auch schon zuvor als Bleomycin als schädigendes Agens verwendet wurde [Wang et al., 1998]. Auch Patienten mit einer präkanzerösen Veränderung der Mundschleimhaut, zu denen die Leukoplakie und die Erythroplasie zählen, wiesen ebenfalls eine höhere Sensitivität gegenüber der Schädigung durch BPDE auf [Wu et al., 2002].

Die Ergebnisse dieser und weiterer Studien führten dazu, dass BPDE-induzierte DNA-Strangbrüche als ein Marker für die genetische Suszeptibilität, ein Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches zu entwickeln, verwendet werden kann [Wang et al., 2008].

Die individuelle Mutagensensitivität wird durch Polymorphismen von Enzymen mitbeeinflusst, die der Entgiftung von krebserregenden Stoffen, der Nukleotidexzisionsreparatur, der Zellzykluskontrolle und der Apoptose dienen [Ho et al., 2006].

1.1.2.2.2 DNA-Reparaturkapazität

Die DNA-Reparaturkapazität ist die Fähigkeit der Zellen eines Individuums DNA-Schäden zu reparieren. Sie wird ebenso wie die Mutagensensitivität als Biomarker für die genetische Suszeptibilität und als endogener Risikofaktor, ein Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches zu entwickeln, betrachtet. Es konnte gezeigt werden, dass Schleimhautzellen von Patienten mit einem Tumor des oberen Aerodigestivtraktes eine geringere DNA-Reparaturkapazität aufweisen als die einer gesunden Kontrollgruppe [Harréus et al., 2001]. Als eine mögliche Ursache für eine verminderte Reparaturkapazität gilt ein genetischer Polymorphismus der Proteine, die in die DNA-Reparaturmechanismen involviert sind [Slyskova et al., 2011]. So sammeln sich im Vergleich zu Personen mit normalen Reparaturmöglichkeiten bei Patienten mit eingeschränkter Reparaturfähigkeit unter dem Einfluss von exogenen Risikofaktoren vermehrt DNA-Schäden an [Wu et al., 2002].

Beispielsweise bildet der aktivierte Metabolit des im Tabakrauch vorkommenden Benzo[a]pyrens, BPDE, DNA-Addukte [Gelboin, 1980]. Diese Addukte können in den Zellen die Transkription blockieren, wenn die DNA nicht effizient repariert wird. Dies geschieht mit Hilfe der Nukleotidexzisionsreparatur [Reiter et al., 2010; Tang et al., 1992].

Die Nukleotidexzisionsreparatur umfasst zwei mögliche Wege: zum einen die globale Genomreparatur, zum anderen eine an die Transkription gekoppelte Reparatur [Wang et al., 2007]. Die globale Genomreparatur kommt bei Läsionen, die das ganze Genom betreffen zum Einsatz, während die transkriptionsgekoppelte Reparatur sich derer Läsionen annimmt, welche die Transkription einzelner DNA-Stränge blockieren [Rastogi et al., 2010].

Diese beiden Reparaturwege umfassen folgende Schritte: a) Erkennung des geschädigten Anteils der DNA, b) beidseitige Inzision des DNA-Stranges, der die Läsion enthält, c) Entfernung des DNA-Fragmentes, d) Synthese und Einfügen eines neuen passenden DNA-Stückes, e) Verknüpfung der freien Enden [de Laat et al., 1999].

Um die Reparaturfähigkeit der Zellen in dieser Arbeit beurteilen zu können, wurde ein Teil der Zellen, die mit BPDE geschädigt wurden, einer 24- stündigen Reparaturphase zugeführt.

1.2 Molekulare Karzinogenese

Die molekulare Karzinogenese ist bislang nicht vollständig verstanden. Jedoch gibt es eine Vielzahl an Theorien, die die molekulare Entstehung von Malignomen zu erklären versuchen. Hierzu zählen unter anderem die Multistep-Theorie, die monoklonale Krebsentstehungstheorie, das Tumorprogressionsmodell und der Prozess der Feldkanzerisierung.

Bei der Multistep-Theorie ist der Ausgangspunkt eine irreversible Änderung im Erbgut, gefolgt durch einen in mehreren Schritten ablaufenden Prozess, der in die Tumorprogression mündet.

Ein weiterer möglicher Weg der molekularen Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches ist die monoklonale Krebsentstehungstheorie. Hierbei entarten prä-maligne Zellen, die mehrere genetische Veränderungen aufweisen, in der Folge phänotypisch maligne [Califano et al., 2000]. Diese genetischen Veränderungen können beispielsweise eine Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und eine Aktivierung von Protoonkogenen zu Onkogenen beinhalten [Califano et al., 1996; Reiter et al., 2010]. Dies geschieht durch Deletion, Punktmutation, Methylierung des Promoters und Genamplifikation [Perez-Ordoñez et al., 2006]. Durch diese Schritte kommt es zu einer übermäßigen Zellproliferation mit vermehrter Angiogenese sowie einer Resistenz gegenüber wachstumshemmender Signale [Hanahan und Weinberg, 2000].

Das Tumorprogressionsmodell führt die Karzinogenese auf ein Zusammenspiel aus einer bestimmten genetischen Veränderung mit einer krankhaften Veränderung des Gewebes zurück. In der Summe kommt es dann zu einem invasiven Karzinom [Califano et al., 1996]. Bei der Theorie der Feldkanzerisierung handelt es sich um die Annahme, dass sich ein Karzinom aus mehreren zunächst voneinander getrennten prä-malignen Läsionen (Feldern) entwickelt, die im Verlauf jedoch miteinander verschmelzen [Slaughter et al., 1953].

1.2.1 Tumorsuppressorgene

Die Genprodukte der Tumorsuppressorgene sind an der Regulation des Zellzyklus und des programmierten Zelltodes beteiligt. Sie wirken hemmend auf das Zellwachstum.

Da die Tumorsuppressoren rezessiv sind, müssen beide Allele inaktiviert sein, damit die wachstumshemmende Wirkung auf die Zelle aufgehoben ist [Rassow et al., 2006]. Dies wird auch als „loss of heterozygosity“ (LOH) bezeichnet.

Die Tabelle 1 gibt eine Übersicht über die von LOH betroffenen Chromosomen und die Häufigkeit, mit der diese bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs nachweisbar sind.

Loss of Heterozygosity	Häufigkeit [%]
LOH 9p	70–80 %
LOH 3p	60–70 %
LOH 17p	50–70 %
LOH 11q	30 %
LOH 13q	30 %
Inaktivierung von p16 ^{ink4A} (homozygote Deletion, Promotermethylierung, Punktmutation)	80 %

Tabelle 1. Loss of Heterozygosity (LOH) [Perez-Ordoñez et al., 2006]

Im Folgenden wird beispielhaft auf zwei der oben aufgeführten Chromosomenveränderungen und ihre Auswirkungen eingegangen.

LOH des Chromosoms 9p21 spielt hauptsächlich in der frühen Karzinomentwicklung eine Rolle und wurde in präneoplastischen Veränderungen nachgewiesen. Es kodiert zwei verschiedene Transkripte, p16 und p14^{ARF}, die für die Regulation der G1-Phase des Zellzyklus verantwortlich sind. Eine Inaktivierung führt zu unkontrolliertem Zellwachstum [Rosin et al., 2000; van der Riet et al., 1994].

LOH des Chromosoms 17p13, auf dem das TP53-Gen liegt, ist an der Entwicklung von einer epithelialen Dysplasie hin zu einem invasiven Karzinom beteiligt [Shahnavaz et al., 2000]. Das Genprodukt von TP53 ist das p53 und ist im Nukleus der Zelle lokalisiert. Dort überwacht es die Intaktheit der DNA. Treten DNA-Schäden auf, blockiert p53 den Zellzyklus bis die DNA repariert ist. Bei zu schwerwiegenden Schäden leitet p53 die Apoptose, den programmierten Zelltod, ein [Rassow et al., 2006].

1.2.2 Protoonkogene

Protoonkogene regulieren die Zellteilung, das Zellwachstum sowie die Zelldifferenzierung. Werden diese durch somatische Mutationen zu Onkogenen aktiviert, kommt es durch eine gesteigerte Aktivität oder eine Überexpression ihrer Genprodukte zu unkontrollierten Wachstums- und Differenzierungsprozessen der Zellen.

Im Gegensatz zu den Tumorsuppressoren sind die Onkogene dominant, was bedeutet, dass bereits die Aktivierung eines der beiden Allele ausreicht, um die Wirkung vollständig zu entfalten [Rassow et al., 2006].

Zu der Gruppe der Onkogene gehören unter anderem die der ras- und myc-Familie, die auf Chromosom 11q13 liegen, CyclinD1/PRAD-1, sowie die ErbB-Familie mit ErbB-1 (epidermal growth factor receptor (EGFR)) [Hardisson, 2003].

Auch hier sollen zwei Onkogene als Beispiele dienen.

Das CyclinD1 Protoonkogen ist ein wichtiger Regulator des Übergangs von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus. Es bewirkt eine Phosphorylierung des Retinoblastoma-Proteins (Rb), wodurch der Zellzyklus von der G1-Phase in die S-Phase übergehen kann. Wird das CyclinD1 amplifiziert oder überexprimiert, kommt es zu einer erhöhten Phosphorylierung des Rbs, wodurch die G1-Phase verkürzt wird und die Progression der Zelle im Zellzyklus unterstützt wird [Hardisson, 2003]. Eine Amplifikation des CyclinD1 wurde in 36 % der Fälle eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches identifiziert, eine Überexpression in 32 % der Fälle [Rousseau et al., 2001].

Der EGFR gehört zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen und befindet sich auf der Zelloberfläche. Er besitzt eine extrazelluläre, eine transmembranöse und eine intrazelluläre Domäne, die die Tyrosinkinaseaktivität beinhaltet. Die Aktivierung des EGFR erfolgt durch extrazelluläre Liganden, wie den epidermal growth factor (EGF) oder den transforming growth factor-alpha (TGF α), wodurch es zu einer Autophosphorylierung des Rezeptors kommt [O-Charoenrat et al., 2000]. Es konnte eine Überexprimierung und eine Amplifizierung des EGFR nicht nur in Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes, sondern auch in der Schleimhaut, die das Karzinom umgibt, nachgewiesen werden [Kalyankrishna et al., 2006; Reiter et al., 2010]. Ergebnisse retrospektiver Analysen ergaben eine signifikant schlechtere Überlebensrate im Falle einer Überexpression des EGFR in Tumorgewebe [Dassonville et al., 1993].

In dieser Arbeit wurde makroskopisch gesunde Schleimhaut, die das Plattenepithelkarzinom umgab und bei der wir von einer Überexpression des EGFR ausgehen konnten, verwendet.

1.2.3 Tumorprogressionsmodell

Die Entwicklung eines Plattenepithelkarzinoms des Kopf-Hals-Bereiches wird im sogenannten Tumorprogressionsmodell vor allem auf zwei Faktoren zurückgeführt: eine bestimmte genetische Veränderung in Verbindung mit einer krankhaften Veränderung des Gewebes [Califano et al., 1996].

Histopathologisch entsteht ein Malignom aus einer gutartigen Hyperplasie, die sich über eine Dysplasie zum Carcinoma in situ entwickelt und letztendlich in ein das Gewebe infiltrierendes Karzinom übergeht.

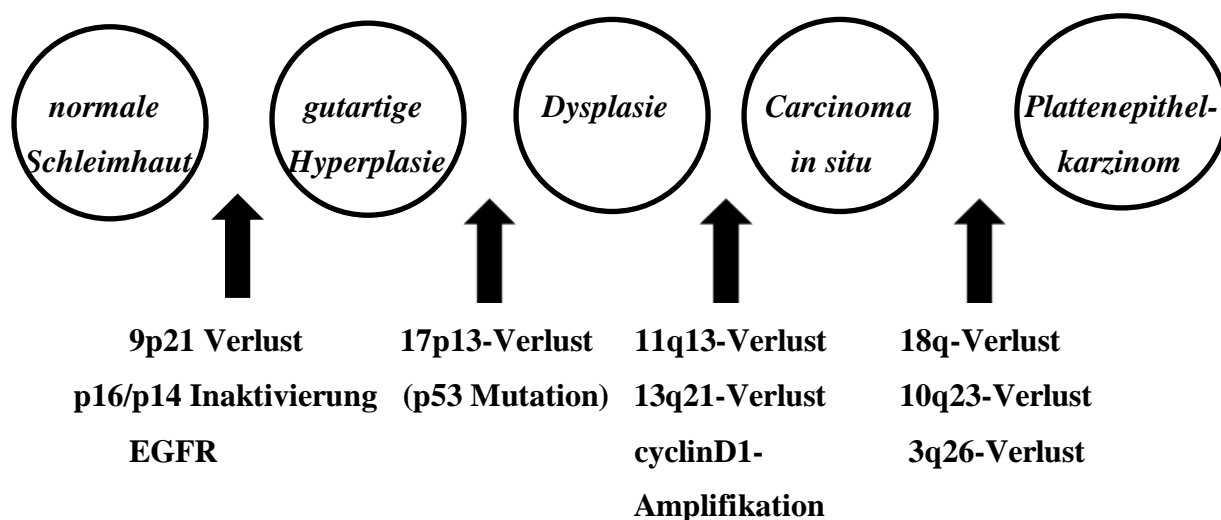


Abbildung 1. Modifiziertes Tumorprogressionsmodell [Califano et al., 1996]

Die Abbildung 1 zeigt das Tumorprogressionsmodell, in dem eine Vielzahl an genetischen Veränderungen der Tumorsuppressorgene und Onkogene mit einem jeweiligen histopathologischen Stadium in der Karzinomentwicklung in Verbindung gebracht werden kann. Eine Ansammlung genetischer Ereignisse beziehungsweise Mutationen geht mit einem Fortschreiten des histologischen Stadiums bis hin zur Malignität einher, wobei festgestellt wurde, dass die genetischen Veränderungen in der Karzinogenese früher nachweisbar sind als das Auftreten klinischer Anzeichen einer malignen Erkrankung [Califano et al., 2000]. Bezogen auf die EGFR-Expression konnte unter Verwendung des „Syrian golden hamster cheek pouch models“ ein stetiges Ansteigen der Expression während des Prozesses der Karzinogenese eines Plattenepithelkarzinoms im Bereich des Mundes gezeigt werden [Vairaktaris et al., 2008].

1.2.4 Prozess der Feldkanzerisierung

Der Prozess der Feldkanzerisierung wurde erstmals 1953 von Slaughter et al. beschrieben. Er spielt eine wichtige Rolle in der Karzinomentstehung in molekularer Hinsicht und umfasst folgende Gesichtspunkte: a) Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches entwickeln sich aus prä-malignen Läsionen, die multifokal auftreten. b) Anormales Gewebe umgibt den Tumor. c) Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches bestehen zunächst aus mehreren voneinander unabhängigen Läsionen und können im Verlauf miteinander verschmelzen. d) Nach einer operativen Entfernung des Tumors bleibt anormales Gewebe bestehen, was eine Erklärung für Rezidive und Zweitmalignome sein könnte [Slaughter et al., 1953].

Eine neuere Definition basierend auf molekularen Befunden beschreibt die Feldkanzerisierung als das Dasein von einem oder mehreren Bereichen (Feldern), bestehend aus Epithelzel-

len mit genetischen Veränderungen. Dabei stammt die „Feldläsion“ von einer einzigen Zelle ab und weist weder ein invasives Wachstum noch ein metastasierendes Verhalten auf, was die Hauptmerkmale von invasiven Karzinomen wären. Nach dieser Definition ist die Feldläsion präneoplastisch. Jedoch kann die Feldläsion so starke histologische Abweichungen aufweisen, dass sie in eine Dysplasie und im Folgenden in ein invasives Karzinom übergehen kann [Brakke et al., 2003].

1.3 Epidermal Growth Factor Receptor

1.3.1 Die Rolle des EGFR in der Karzinogenese und als Therapieziel

Trotz bemerkenswerter Fortschritte in der Entwicklung nicht chirurgischer Therapieoptionen, wie der Chemotherapie und der Radiotherapie zur Behandlung von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes hat sich die Prognose insbesondere für Patienten in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium in den letzten dreißig Jahren nur minimal verbessert [Reuter et al., 2007; Ang et al., 2010; Reiter et al., 2010; Herchendorn et al., 2011]. Für diese Patientengruppe steht die Möglichkeit einer palliativen hoch toxischen, systemischen Therapie zur Verfügung. In der Regel kommt hier eine Kombination aus Cisplatin und 5-Fluoruracil zum Einsatz, wodurch jedoch bei rezidivierender oder metastasierter Erkrankung lediglich ein progressionsfreies Intervall von etwa zwei Monaten erreicht werden kann [Burtneff et al., 2005]. Deshalb wird der Forschung nach neuen Therapieoptionen mit dem Wunsch nach höherer Selektivität für ein bestimmtes molekulares Ziel und geringerer Toxizität großes Interesse gewidmet.

Ein solches Therapieziel stellt der epidermal growth factor receptor (EGFR) dar. In gesundem Gewebe ist er an der Regulation der Proliferation, der Differenzierung und dem Überleben von Epithelzellen beteiligt. Im Tumorgewebe wird durch aberrante Signale des EGFR den Tumorzellen eine verringerte Apoptoserate, eine gesteigerte Invasivität, eine Angiogenese und Metastasierung ermöglicht [Reuter et al., 2007].

Karzinome epithelialen Ursprungs des Kopf-Hals-Bereiches weisen in über 90 % der Fälle eine Überexpression des EGFR auf. Jedoch lässt sich ein vermehrtes Vorkommen des Rezeptors nicht nur in den Tumorzellen selbst, sondern auch in umgebendem Gewebe nachweisen [Grandis et al., 1993; Reiter et al., 2010]. Entweder kann die Überexpression des EGFR als frühes Ereignis während der Feldkanzerisierung angesehen werden oder auch als physiologische Reaktion des Gewebes auf jahrelang einwirkende Noxen [Baumeister et al., 2011]. Die Überexpression des Rezeptors in Tumorgewebe ist mit einer schlechteren Prognose in Hin-

blick auf das Überleben, das krankheitsfreie Intervall, die Rezidivrate sowie die Entwicklung von Metastasen verbunden [Ang et al., 2002; Scaltriti und Baselga, 2006].

Bei Adenokarzinomen der Lunge konnte festgestellt werden, dass Mutationen des EGFR eine ligandenunabhängige Aktivierung der Signaltransduktion bewirken [Lynch et al., 2004; Pao et al., 2004]. Dies gilt jedoch nicht für Karzinome des Kopf-Hals-Bereiches und ist somit keine Erklärung für die Rolle des EGFR in der Malignomentwicklung [Loeffler-Ragg et al., 2006; Sheikh et al., 2008]. Folglich scheint die gesteigerte Aktivität des EGFR und die zugehörigen Signaltransduktionswege in Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes ligandenabhängig oder durch die Überexpression des Rezeptors selbst bedingt zu sein [Tejani et al., 2010; Boerner et al., 2003].

Die Mechanismen, die zu einer Überexpression des EGFR führen, sind jedoch weitestgehend ungeklärt und Gegenstand aktueller Forschungen.

1.3.2 Struktur und Klassifikation des EGFR

Der Epidermal Growth Factor Receptor ist ein 170 kD großes, transmembranöses Glykoprotein. Er gehört zur Familie der ErbB/HER-Rezeptoren, die aus vier Mitgliedern besteht: ErbB1/HER1 (EGFR), ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3 und ErbB4/HER4. Diese stellen eine Gruppe von transmembranösen Rezeptortyrosinkinasen dar, welche sich aus einem extrazellulären ligandenbindenden Anteil, einer einfachen transmembranösen Helix und einem intrazellulären Anteil mit Tyrosinkinaseaktivität zusammensetzen.

Die extrazelluläre Region besteht aus vier einzelnen Proteindomänen, von denen die Regionen I und III reich an der Aminosäure Leucin sind und den Liganden, wie beispielsweise den Wachstumsfaktoren, als bindende Region dienen [Tejani et al., 2010].

Die Struktur des EGFR und die Aktivierung durch die Bindung des EGF an die Regionen I und III sind in der folgenden Abbildung 2 dargestellt.

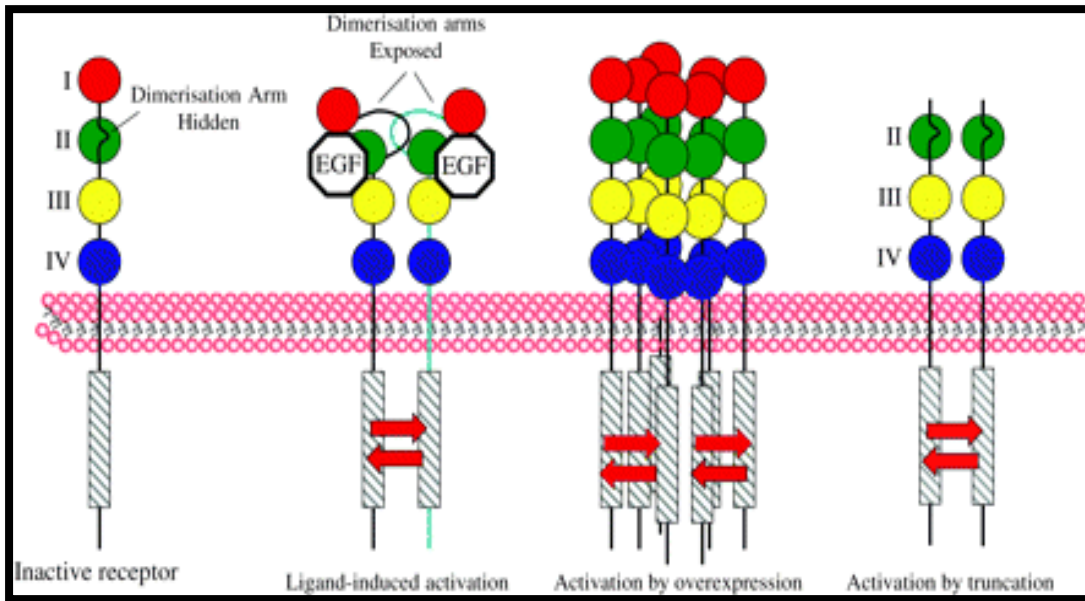


Abbildung 2. Aufbau des EGFR und Aktivierungsmechanismen [Cruz et al., 2007]

1.3.3 Signalkaskade

Zu den aktivierenden Liganden des EGFR zählen der epidermal growth factor (EGF), der transforming growth factor alpha (TGF α), der heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF), das Betacellulin, das Amphiregulin, das Epiregulin und das Epigen. Bindet einer dieser stimulierenden Liganden an die extrazelluläre Domäne des EGFR, der inaktiv als Monomer vorliegt, führt dies zu einer Dimerisierung des Rezeptors [Harris et al., 2003]. Hierbei lassen sich Homodimere von Heterodimeren unterscheiden. Homodimere werden aus zwei EGF-Rezeptoren gebildet, Heterodimere aus einem EGF-Rezeptor und einem anderen Mitglied der ErbB/HER-Familie.

Dadurch kommen zwei Tyrosinkinasedomänen benachbart zu liegen und können sich gegenseitig phosphorylieren, was als Autophosphorylierung bezeichnet wird. Es kommt zu einer Steigerung der Kinaseaktivität. In der Folge werden dann durch die Kinase die Tyrosinreste phosphoryliert, die sich an dem carboxyterminalen Ende der zytosolischen Domäne des Rezeptors befinden [Schlessinger, 2000]. Die neu gebildeten Phosphotyrosinreste dienen als Bindungsstellen für intrazelluläre Signaltransduktionsmoleküle, die verschiedene Signalkaskaden einleiten, einschließlich der Ras/MAPK-, PI3K/Akt-, PLC γ /PKC und STAT-Kaskade [Marmor et al., 2004].

Diese Signalwege enden damit, dass ein Effektormolekül in den Zellkern gelangt und dort Einfluss auf die Transkriptionsfaktoren beziehungsweise die Transkription nimmt. Dadurch werden die Proliferation, die Differenzierung, die Angiogenese, das Überleben sowie der programmierte Zelltod (Apoptose) mitgesteuert.

Im Falle einer Dysregulation eines dieser Signalwege kommt es zu einer Unabhängigkeit der Zellen gegenüber externen Wachstumssignalen und einer übermäßigen Zellteilungsrate.

Abbildung 3 gibt eine Übersicht über die Aktivierung des EGFR und die dadurch in Gang gesetzten Signalkaskaden.

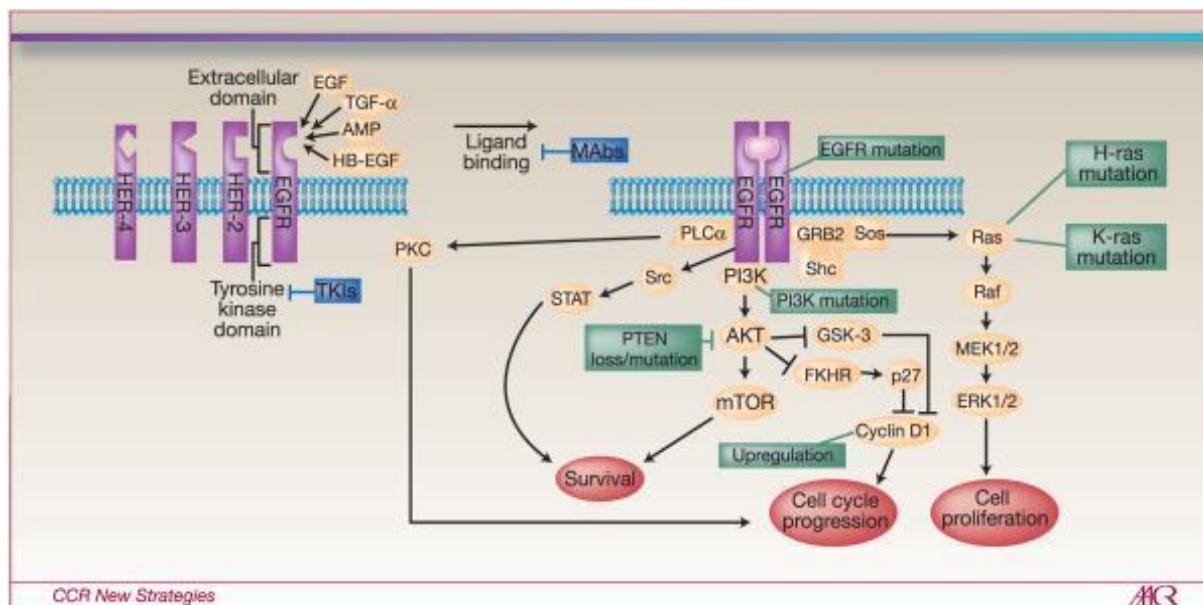


Abbildung 3. Aktivierung und Signalkaskade des EGFR [Chen et al., 2010]

1.3.4 Stimulation und Hemmung des EGFR

1.3.4.1 Stimulation des EGFR durch den transforming growth factor alpha

Der transforming growth factor alpha ($TGF\alpha$) ist neben dem epidermal growth factor (EGF) der wichtigste stimulierende Ligand des EGFR.

$TGF\alpha$ ist ein Wachstumsfaktor, der aus einem größeren membrangebundenen Glykoprotein (pro- $TGF\alpha$) entsteht und schließlich als lösliches, 50 Aminosäuren langes Polypeptid ($TGF\alpha$) freigesetzt wird. Es spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung des Wachstums und der Entwicklung verschiedenster Zelltypen, wie beispielsweise der Haut, der Schleimhaut, des Gastrointestinaltrakts oder der Nieren [Barrandon und Green, 1987; Thomas et al., 1992; Gomella et al., 1989].

Es wird sowohl von normalen Zellen als auch von neoplastischen Zellen produziert und hat durch die Bindung an den EGFR die Fähigkeit die Proliferation normaler, aber eben auch neoplastischer Epithelzellen zu beeinflussen [Coffey et al., 1987; Wong et al., 1990].

In Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes ließ sich im Vergleich zu gesunden epithelialen Schleimhautzellen neben der gesteigerten EGFR-Expression auch eine erhöhte Expression des $TGF\alpha$ nachweisen [Grandis et al., 1996]. Diese erhöhten Expressionslevel des $TGF\alpha$ führen zu einer vermehrten Signalübermittlung über die Stimulierung des EGFR,

was wiederum mit einer gesteigerten Zellproliferation und somit einer Tumorprogression einhergeht und negative Auswirkungen auf die Prognose der Erkrankung hat [Grandis et al., 1998; Dassonville et al., 1993; Kalyankrishna et al., 2006].

In präkanzerös veränderter Schleimhaut, die einem dauerhaften Einfluss von karzinogenen Xenobiotika ausgesetzt ist und in der eine Überexpression des EGFR vorliegt, reduziert die Stimulation des EGFR die schädigende Wirkung des BPDE [Baumeister et al., 2010; Baumeister et al., 2011].

1.3.4.2 Hemmung des EGFR durch Cetuximab (ErbixTM)

Da bei über 90 % der Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes eine erhöhte Expression des EGFR beobachtet werden kann und dies mit einer schlechten klinischen Prognose assoziiert ist, stellt der Rezeptor einen therapeutischen Angriffspunkt dar.

Cetuximab ist ein rekombinanter chimärer monoklonaler Antikörper, der an ein Immunglobulin-G1-Gerüst gebunden ist und kompetitiv an ein Epitop der extrazellulären Domäne des EGFR bindet und diesen blockiert [Goldstein et al., 1995].

Die Blockade des EGFR bewirkt eine Hemmung des Tumorwachstums, der Metastasierung, der Reparatur von DNA-Schäden sowie der Angiogenese [Blick und Scott, 2007; Ciardiello und Tortora, 2001].

Verschiedene Mechanismen tragen zur Antitumorwirkung von Cetuximab bei.

Ein Hauptmechanismus besteht darin, dass Cetuximab eine höhere Affinität zum EGFR aufweist als seine natürlichen Liganden, wie TGF α . Dadurch kommt es zu einem Ausbleiben der nachfolgenden Signalwege, die die Transkription aktivieren würden [Li et al., 2005]. Ein weiterer Mechanismus beinhaltet die Entfernung von Rezeptoren aus der Zelloberfläche durch Endozytose. Dies führt zu einer Verminderung der Rezeptorexpression [Sigismund et al., 2005]. Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, dass Cetuximab durch seine Bindung an ein IgG1-Gerüst eine antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität bewirkt. Dabei werden natürliche Killerzellen und Makrophagen rekrutiert [López-Albaitero und Ferris, 2007].

Cetuximab ist in Kombination mit einer Strahlentherapie oder Chemotherapie zur Behandlung von Patienten mit einem fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches zugelassen. Es konnte gezeigt werden, dass sich bei der Anwendung dieser Kombinationen das progressionsfreie Überleben signifikant verlängert. Jedoch liegen die Ansprechraten lediglich bei 10-20 % [Bonner et al., 2006].

Verabreicht wird Cetuximab als intravenöse Initialdosis von 400 mg/m² und dann als einmalige Dosis von 250 mg/m² pro Woche beispielsweise in Kombination mit einer Chemotherapie.

Die Therapie mit Cetuximab weist eine akzeptable Verträglichkeit auf. Als häufigste Nebenwirkung tritt ein Akne ähnlicher, pustulöser Ausschlag der Haut auf, oft begleitet von einer Hauttrockenheit (Xerosis), Nagelveränderungen, einer Entzündung des Nagelwalls (Paronychie) und Rissbildungen an den Fingern. Dies wird bei über 80 % der Patienten beobachtet, lässt sich jedoch gut behandeln. Die Erklärung für diese Hautreaktion liegt in der Lokalisation des EGFR an der basalen Schicht der Epidermis [Yano et al., 2003]. Je ausgeprägter diese Reaktion ist, desto höher ist die Ansprechrate auf Cetuximab und desto besser ist die Überlebensrate [Baselga et al., 2005]. Weitere Nebenwirkungen sind Infusionsreaktionen, eine Beteiligung der Augen und eine Hypomagnesämie [O'Neil et al., 2007; Chung et al., 2008; Forster et al., 2008; Tejani et al., 2010].

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

In vorausgegangenen Studien der Arbeitsgruppe konnte eine Überexpression des EGFR in tumorumgebender, nicht maligner Schleimhaut von Patienten mit einem Plattenepithelkarzinom des oberen Aerodigestivtraktes gezeigt werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass die Stimulation des Rezeptors nicht wie anzunehmen zu einer erhöhten Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Stoffen führt. Vielmehr bewirkt die Rezeptorstimulation eine geringere Mutagensensitivität tumorumgebender Schleimhaut gegenüber Xenobiotika. Diese Erkenntnisse können unter anderem als eine physiologische Reaktion tumorumgebender Schleimhaut auf den meist langjährigen Reiz von Karzinogenen erklärt werden [Baumeister et al., 2011].

Da die genetische Suszeptibilität neben der DNA-Mutagensensitivität auch durch die DNA-Reparaturkapazität definiert wird, ergaben sich folgende Ziele für die vorliegende Arbeit:

- Kann die DNA-Reparaturfähigkeit in prämaligmem Gewebe durch eine Stimulation bzw. Blockade des EGF-Rezeptors beeinflusst werden?
- Beeinflusst die Modulation der Aktivität des EGF-Rezeptors sein Expressionsverhalten?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden tumornahe Gewebeprobe zu “Miniorgankulturen“ kultiviert, die EGFR-Aktivität durch Stimulation bzw. Blockade moduliert und im Anschluss die DNA-Reparaturkapazität mit Hilfe des Comet Assay bestimmt. Des Weiteren wurde an Paraffinschnitten des gleichen Gewebes die Expression des EGFR immunhistochemisch quantifiziert. Zur Einordnung der Ergebnisse erfolgten vergleichende Untersuchungen mit einer schleimhautgesunden tumorfreien Kontrollgruppe. Als aktivitätsmodulierende Substanzen des EGFR wurde für die Stimulation TGF α und für die Blockade Cetuximab verwendet. Die Schädigung der DNA erfolgte durch BPDE.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientenkollektiv und Gewebeproben

Alle Patienten, die in diese Studie eingeschlossen wurden, befanden sich in Behandlung in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München. Vor den operativen Eingriffen erfolgte eine schriftliche Aufklärung über die wissenschaftliche Verwendung der Schleimhautproben, die im Rahmen der Operation entnommen wurden.

Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 40 Patienten. 20 Patienten waren tumorfrei und bildeten die Kontrollgruppe. Die anderen 20 Patienten waren an einem Karzinom des oberen Aerodigestivtraktes erkrankt.

Von den 20 Patienten ohne Tumor waren elf weiblich und neun männlich in einem Alter zwischen 18 und 70. Das durchschnittliche Alter betrug 34,4 Jahre. Von den Karzinompatienten waren vier weiblich und 16 männlich in einem Alter zwischen 52 und 80. Das durchschnittliche Alter betrug 66,0 Jahre.

Von allen Patienten wurden Anamnesen bezüglich des Tabak- und Alkoholkonsums sowie eventueller Schadstoffexpositionen am Arbeitsplatz und im alltäglichen Umfeld erhoben. Die Ergebnisse der Befragungen wurden bei der Interpretation der Studienergebnisse berücksichtigt. Die Anamnesen sind in den Tabellen 2 und 3 dargestellt. Sämtliche Patientendaten wurden anonymisiert und waren lediglich dem Studienleiter zugänglich.

Alle operativen Eingriffe, die zur Gewinnung der Schleimhautproben führten, waren medizinisch indiziert und stellten somit kein zusätzliches Risiko für die Patienten dar. In der Spendergruppe ohne Tumor wurden Gewebeproben von Tonsillen, Gaumenmandeln und während Uvulopalatopharyngoplastiken entnommen. Bei den Patienten mit einem Tumor erfolgte die Entnahme nicht direkt aus dem Tumorgewebe, sondern aus makroskopisch tumorfreier Schleimhaut, welche den Tumor umgab. Die gewonnenen Resektate wurden durch den Operateur in 0,9 %-NaCl-Lösung eingelegt und innerhalb von fünf Stunden in das Labor überführt, wo die Proben weiter verarbeitet wurden.

Die an den Schleimhautproben durchgeführten Untersuchungen wurden von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München geprüft und als solche genehmigt (Antragsnummer: 221/04).

2.1.2 Anamneseerhebung

2.1.2.1 Anamneseerhebung der tumorfreien Kontrollgruppe

<i>Probe</i>	<i>Alter</i>	♀/♂	<i>Diagnose</i>	<i>Nikotin (py)</i>	<i>Alkohol (g/d)</i>
1	22	♀	chron. Tonsillitis	0	0
2	19	♀	chron. Tonsillitis	1,5	0
3	30	♀	chron. Tonsillitis	n.e.	72
4	34	♂	Nasenmuschel	0	0
5	27	♂	chron. Tonsillitis	n.e.	0
6	26	♂	chron. Tonsillitis	0	0
7	23	♀	chron. Tonsillitis	0	72
8	24	♀	chron. Tonsillitis	5	72
9	57	♀	Resttonsillektomie	15	72
10	39	♀	chron. Tonsillitis	n.e.	72
11	47	♂	Rhonchopathie	n.e.	25
12	44	♂	Rhonchopathie	25	88
13	44	♂	chron. Tonsillitis	n.e.	72
14	70	♂	Resttonsillektomie	0	0
15	19	♀	chron. Tonsillitis	0	72
16	38	♂	chron. Tonsillitis	1	72
17	21	♀	chron. Tonsillitis	n.e.	0
18	45	♂	Schlafapnoe	0	0
19	35	♀	chron. Tonsillitis	0	72
20	23	♀	chron. Tonsillitis	0	11

Tabelle 2. Anamnesen: tumorfreien Kontrollgruppe

2.1.2.2 Anamneseerhebung der Karzinomgruppe

<i>Probe</i>	<i>Alter</i>	♀♂	<i>Diagnose</i>	<i>Staging</i>	<i>Nikotin</i> (py)	<i>Alkohol</i> (g/d)
1	69	♀	Tonsillenkarcinom	pT2pN0M0G2R0	30	0
2	75	♂	Tonsillenkarcinom	pT2pN2M0G2R0	50	ex
3	58	♂	Tonsillenkarcinom	cT4cN2bM0G2	40	ex
4	78	♂	Tonsillenkarcinom	pT2pN0MxG3R0	n.e.	n.e.
5	59	♂	Tonsillenkarcinom	pT1pN2bM0G3R0	70	308
6	65	♂	Oro-Hypopharynx-Karcinom	pT2cN0cM0G3R0	n.e.	50
7	54	♂	Tonsillenkarcinom	pT2pN0M0G2R0	40	250
8	62	♂	Tonsillenkarcinom	pT2pN0MxG3	ex	ex
9	67	♂	Larynx-Hypopharynx-Karcinom	pT4cN3ccM1	70	400
10	68	♂	Weichgaumen-karcinom	pT2pN2acM0G3R0	60	72
11	67	♀	Tonsillenkarcinom	pT3pN2cMxG2R0	60	ex
12	74	♂	Zungenrandkarcinom	pT2pN0cM0	60	100
13	70	♂	Zungengrund-Mundboden-Karcinom	pT3pN2cM0G3R0	50	ex
14	52	♂	Zungengrund-Karcinom	pT2pN0M0L0V0G3R0	n.e.	n.e.
15	80	♂	Uvulakarcinom	pT1cN0cM0G2	44	0
16	76	♂	Oropharynxkarcinom	pT2pN1M0G2R0	50	462
17	57	♀	Tonsillenkarcinom	pT1pN0L0V0G2R0	20	ex
18	52	♂	Zungenrandkarcinom	pT4cN2bcM0	40	400
19	73	♀	Tonsillenkarcinom	pT3pN2bcM0G2	6	75

20	63	♂	Mundbodenkarzinom	pT4cN2bcM0	40	400
----	----	---	-------------------	------------	----	-----

Tabelle 3. Anamnesen: Karzinompatienten

2.1.3 Materialien und Geräte

2.1.3.1 Chemikalien, Enzyme, Zellkulturmedien

<i>Chemikalien, Enzyme, Zellkulturmedien</i>	<i>Hersteller</i>
Agar Noble	DIFICO, Detroit, USA
Aminosäuren, non-essential	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Amphotericin B	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Antifade	Vysis-Abbot, Illinois, USA
Aqua bidestillata (Aqua bidest)	LMU-Klinikapotheke
Bronchial Epithelial Basal Medium+ Supplementpack für BEGM	Promocell, Hamburg
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	Midwest Research Institute, Kansas, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM-Pulver	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Fötale Kälberserum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Formamid	Sigma, Steinheim
Gentamycin	Promocell, Hamburg
Hämatoxylin	Dianova, Hamburg
Hepes-Pulver	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Hyaluronidase	Sigma, Steinheim

Kollagenase P	Roche, Mannheim
Low-Melting-Agarose; Sea Plaque GTG	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Mounting-Medium (Dako's Faramount)	Dako Germany, Mannheim
Natriumchlorid	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Darmstadt
N-Laurosylosacrosin-Natriumsalz	Sigma, Steinheim
Normal-Melting-Agarose; Seakem LE	FMC-Bio Products, Rockland, USA
NP-40	Vysis-Abbot, Illinois, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Protease	Sigma, Steinheim
Saline Sodium Citrate Buffer (20×SSC)	Vysis-Abbot, Illinois, USA
Salzsäure 1,0 N	Sigma, Steinheim
Tri(s)hydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypanblau 0,4 %	Merck, Darmstadt
Xylol (Dimethylbenzol)	Merck, Darmstadt

Tabelle 4. Chemikalien, Enzyme, Zellkulturmedien

2.1.3.2 Verbrauchsmaterialien

<i>Verbrauchsmaterialien</i>	<i>Hersteller</i>
24-Wellplatte	Falcon, Hamburg
Combitipps	Eppendorf, Hamburg

Deckgläser zum Mikroskopieren (Glasdicke 0,08-0,12 mm)	Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten steril 0,22 µm Filter Unit, Millex-GV, Millex-GS	Millipore, Eschborn
Farbfotofilme ISO 100, ISO 400	Kodak, New York
Objektträger 24×70 mm , je 5 mm seitlich mattiert	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträgerkasten für max. 50 Objektträger	GLW, Würzburg
Pasteurpipetten, steril 7 ml	Merck, Darmstadt
Pasteurpipetten, unsteril 7 ml	Merck, Darmstadt
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Pinzetten (einweg)	Angiokard, Friedeburg
Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen (5 µl, 10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten aus Polystyrol (2 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäß (500 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schreibdiamant	Renner, Darmstadt
Skalpelle	FEATHER, Osaka, Japan

Tabelle 5. Verbrauchsmaterialien

2.1.3.3 Geräte

<i>Geräte</i>	<i>Hersteller</i>
Analysenwaage Voyager (0,1 mg – 62 g)	Ohaus, Gießen
Brutschrank Function Line	Heraeus, Hanau

Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau
Elektrophorese Netzgerät E865	Renner, Dannstadt
Gefrierschrank (-30 °C)	Bosch, Stuttgart
Horizontale Elektrophoresekammer (237×180 mm)	Renner, Dannstadt
Kryo-1°C-Freezing-Container	Nalgene, Rochester, USA
Kühlschrank (+4 °C)	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer Combimag RCT	IKA, Staufen
Mikroskope: Standardmikroskop Inversmikroskop DMIRB Fluoreszenzmikroskop BMLB Filtersystem N2.1, BP 516-560 Filtersystem I3, BP 450-490 Objektive 100×/1,25 Öl; 40×/0,5; 10×/0,22; 4×0,1	Zeiss, Oberkochen Leica, Heerbrugg, Schweiz Leica, Heerbrugg, Schweiz Leica, Heerbrugg, Schweiz Leica, Heerbrugg, Schweiz Leica, Heerbrugg, Schweiz
Mikrowelle MS1	Bauknecht, Schorndorf
Minishaker MS1	Clarkson Lab., Chula Vista, USA
ph-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Software (digitale Auswertung und Datenspeicherung) Programm Kinetic 3.1 Programm Excel	Kinetic Imaging, Liverpool Microsoft
Spiegelreflexkamera	Minolta, Osaka, Japan
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Waage 1419 (1 mg- 600 g)	Sartorius, Gießen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zählkammer nach Neubauer	Merck, Darmstadt

Zentrifuge Varifuge 3.0 R und 3.0 RS	Heraeus, Hanau
--------------------------------------	----------------

Tabelle 6. Geräte

2.2 Methoden

2.2.1 Übersicht über den Versuchsablauf

In der Abbildung 4 wird der Versuchsablauf schematisch dargestellt. Auf die einzelnen Schritte wird dann in den nachfolgenden Kapiteln näher eingegangen.

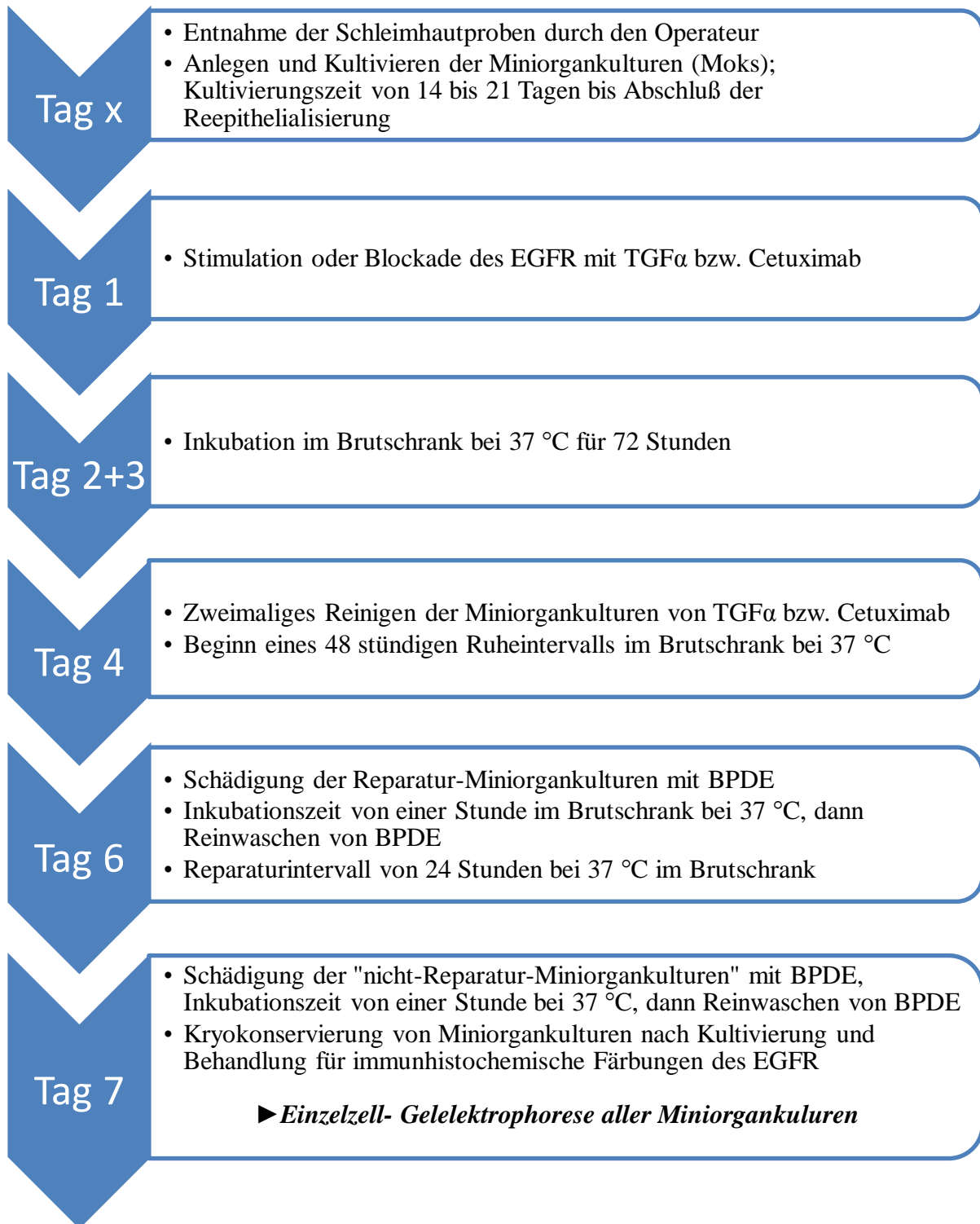


Abbildung 4. Schematische Darstellung des Versuchsablaufes

2.2.2 Miniorgankulturen

Als Miniorgankulturen (Moks) werden Gewebestücke von 1 mm^3 bezeichnet, die nach einer Kultivierungsphase wieder eine Epithelzellschicht aus zwei bis fünf Zellschichten aufweisen. In den Abbildungen 5 a) und b) ist eine solche reepithelialisierte Miniorgankultur dargestellt. Dieses dreidimensionale in vitro Modell bietet eine gute Möglichkeit in vivo Verhältnisse nachzuahmen. Die Zellen können in einem vitalen Zellverband leben und weiterhin interagieren, was bei der Kultivierung von Einzelzellen nicht der Fall wäre. Dadurch ist es möglich anhand von Miniorgankulturen beispielsweise flüchtige und ingestive Fremdstoffe, die für den Menschen schädlich sein könnten, zu identifizieren sowie zytologische und immunologische Studien durchzuführen [Wallner et al., 2005].

Das Anlegen und Kultivieren von Miniorgankulturen aus adenoidem Gewebe wurde erstmals 1991 beschrieben. Dabei betrug die Kultivierungszeit 40 Tage. Nach dieser Zeit ließ sich unter dem Lichtmikroskop ein mehrschichtiges, pseudostratifiziertes Flimmerepithel erkennen. Diese gezüchteten Gewebefragmente konnten als Modell für normale Atemwegsmukosa angesehen werden [Steinsvag et al., 1991].

Inzwischen wurde diese Methode für nasale und oropharyngeale Schleimhaut modifiziert [Kleinsasser et al., 2001; Harréus et al., 2004].

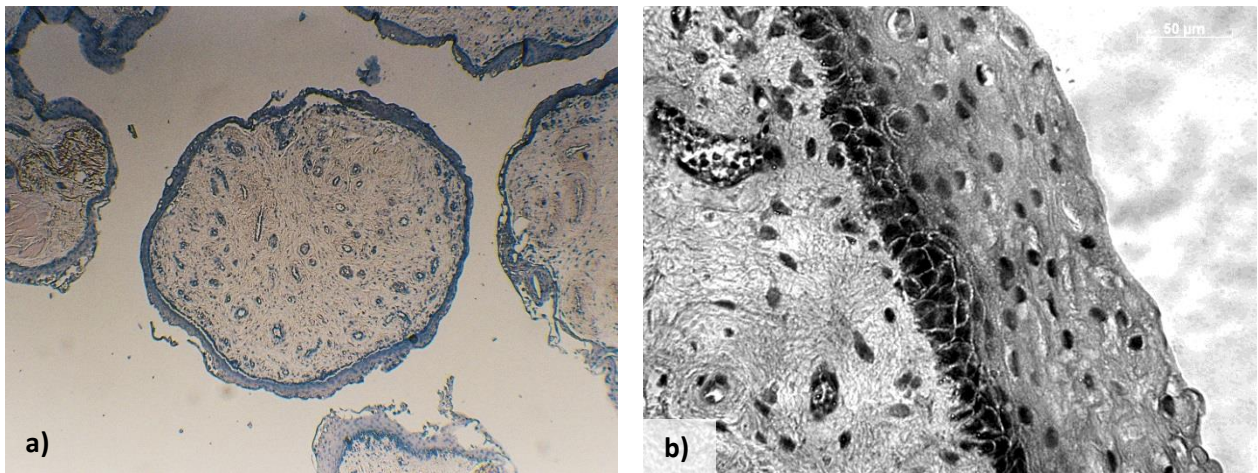


Abbildung 5. Miniorgankultur nach HE-Färbung a) Übersichtsaufnahme, b) 40 fache Vergrößerung

2.2.3 Anlegen und Kultivieren von Miniorgankulturen

Die Schleimhautproben wurden unter sterilen Bedingungen auf einer Petrischale mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette von Drüsengewebe und nekrotischen Anteilen befreit. Die präparierte Schleimhaut wurde in 1 mm³ große Stücke zerteilt, wobei darauf zu achten war, dass diese Fragmente möglichst glatt begrenzte Ränder hatten. Dadurch sollte eine schnelle, vollständige Epithelialisierung erreicht werden.

Nach dreimaligem Reinigen in jeweils 5 ml Phosphate Buffered Saline (PBS) wurden immer maximal drei Schleimhautstücke in ein Well einer 24-Wellplatte gegeben. Die Platten wurden mindestens 48 Stunden vor ihrer Verwendung mit 250 µl einer 1,5 % Agar Noble beschichtet, die wiederum mit einer Mischung aus DMEM, fötalem Kälberserum (FCS), nicht-essentiellen Aminosäuren, Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B versetzt war.

In jedes Well wurden 250 µl eines Nährmediums, Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM), pipettiert.

Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Nach 48 Stunden erfolgte der Austausch des alten Nährmediums gegen frisches. Nach sieben Tagen wurden die heranwachsenden Miniorgankulturen in eine neue 24-Wellplatte gegeben, um die Versorgung mit ausreichend Nährstoffen zu gewährleisten.

Einmal pro Woche wurden alle Platten unter einem Lichtmikroskop inspiziert, um die Zellproliferation zu beurteilen und eine Infektion der Miniorgankulturen mit Bakterien oder Pilzen auszuschließen.

Im Durchschnitt war eine vollständige Reepithelialisierung nach einer 21-tägigen Kultivierungszeit erreicht.

2.2.4 Inkubation mit den aktivitätsmodulierenden Substanzen des EGFR, Cetuximab und TGF α

Nachdem die Kultivierung der Miniorgankulturen abgeschlossen war, begann die Inkubation mit den aktivitätsmodulierenden Substanzen Cetuximab und TGF α . Als Lösungsmittel beider Substanzen diente Aqua bidest. Es kamen immer 25 µl Cetuximab in einer Konzentration von 10 µg/ml und 25 µl TGF α in einer Konzentration von 50 ng/ml zum Einsatz.

Am Tag eins erhielten alle Miniorgankulturen, außer denen, die zur Quantifizierung der reinen Schädigung durch BPDE dienten, entweder 25 µl Cetuximab oder 25 µl TGF α . Die Inkubation mit diesen Stoffen erfolgte über 72 Stunden, um eventuelle transkriptionelle oder posttranskriptionelle Veränderungen nachweisen zu können. Nach dieser Zeit wurde zur Reinigung der Miniorgankulturen in den entsprechenden Wells das Nährmedium BEGM zweimal

ausgewechselt, um die aktivitätsmodulierenden Substanzen des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) möglichst vollständig zu entfernen.

Es folgte ein Ruheintervall von 48 Stunden im Brutschrank bei 37 °C, um einen eventuellen Einfluss von Cetuximab und TGF α auf die Kernaktivität zu ermöglichen.

Zum Ausschluss einer schädigenden Wirkung der verwendeten Testsubstanzen wurden Negativkontrollen mit je 25 μ l Cetuximab bzw. TGF α mitgeführt.

2.2.5 Inkubation mit Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid

Am Tag sechs erfolgte die Inkubation mit Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE). BPDE wurde ausschließlich mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) verdünnt verwendet. Auch hier wurde das Lösungsmittel zum Ausschluss einer toxischen Wirkung einzeln getestet.

Alle Miniorgankulturen, die zur späteren Bestimmung der DNA-Reparaturkapazität vorgesehen waren, wurden mit 25 μ l BPDE inkubiert. Die 24-Wellplatte verweilte für eine Stunde im Brutschrank. Danach wurde das Nährmedium zweimal ausgewechselt, um die Schädigung der Zellen zu stoppen.

Das Reparaturintervall für die bereits geschädigten Miniorgankulturen betrug 24 Stunden. Die noch nicht inkubierten Miniorgankulturen erhielten nach Ablauf der 24 Stunden 25 μ l BPDE. Diese Miniorgankulturen dienten zur Messung der Mutagensensitivität. Für die einstündige Inkubationszeit wurde die 24-Wellplatte in ein 37 °C warmes Schüttelwasserbad gestellt, woraufhin alle Wells, in denen BPDE war, zweimal mit BEGM gereinigt wurden.

2.2.6 Isolierung von Einzelzellen aus Miniorgankulturen

Für die Durchführung der zellbiologischen Untersuchungen war es notwendig die Einzelzellen aus dem sphäroidalen Zellverband zu gewinnen. Hierzu wurde ein Enzymgemisch bestehend aus Protease, Hyaluronidase und Kollagenase P in BEGM gelöst, steril filtriert und jeweils 600 μ l in ein Eppendorf Tube vorgelegt. Jedes Tube wurde mit ein bis drei der zuvor gereinigten Miniorgankulturen versehen, mit den Enzymen versetzt und in einem Tubeständer für 45 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert.

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter rotem Licht, um ungewollte DNA- Schäden durch UV-Licht zu vermeiden.

Um die einzelnen Zellen endgültig aus ihrem bindegewebigen Verband zu lösen, wurden die Eppendorf Tubes für mindestens 20 Sekunden auf einen Minischüttler gestellt. Die Tubes wurden dann in eine Wanne mit Eis gegeben, um die enzymatische Proteolyse zu stoppen.

Die Überreste des Bindegewebes wurden mit einer sterilen Kanüle aus den Eppendorfgefäßen entfernt. Um die enzymatische Wirkung zu neutralisieren, wurden in die übriggebliebenen Zellsuspensionen jeweils 600 µl fötales Kälberserum (FCS) pipettiert. Zur Beschleunigung der Zellsedimentation wurden die Eppendorfgefäße bei 800 U/min und 4 °C für fünf Minuten zentrifugiert, dann der Überstand entfernt, 1 ml des 4 °C kalten Phosphate Buffered Saline (PBS) hinzugefügt und nochmal zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt, um eine ausreichende Reinigung der Zellen zu erzielen.

Die Zellpellets wurden dann nach der Entfernung des Überstandes entweder der Bestimmung der Zellvitalität oder der Einzelzell- Gelelektrophorese zugeführt.

2.2.7 Bestimmung der Zellvitalität

Die Zellvitalität wurde anhand des „Trypanblau-Ausschluss-Testes“ nach Phillips ermittelt [Phillips H.J., 1973]. Dabei lag der Grenzwert für die Vitalität der Zellen bei 80 %. Andernfalls konnte der Comet Assay mit diesen Proben nicht durchgeführt werden. Jeweils 50 µl Trypanblaulösung wurden mit derselben Menge Zellpellets aus jeder Versuchsreihe vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer gegeben.

Bei 400facher Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop stellten sich im Gegensatz zu den vitalen Zellen die avitalen Zellen blau dar, da aufgrund der beschädigten Zellmembran der Farbstoff ins Zellinnere gelangen konnte.

Aus 16 Quadranten der Zählkammer wurde sowohl die Anzahl der vitalen als auch der avitalen Zellen ermittelt. Daraus ließ sich dann die Vitalität der Zellen prozentual mittels folgender Formel berechnen:

$$\frac{\text{Anzahl der vitalen Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \times 100 = \text{Vitalität}[\%]$$

2.2.8 Einzelzell- Gelelektrophorese (Comet Assay)

Die Erstbeschreibung der Einzelzell- Gelelektrophorese zur Quantifizierung von DNA-Schäden erfolgte 1984 unter der Verwendung eines pH-neutralen Elektrophoresepuffers. Dabei konnten zunächst nur Doppelstrangbrüche dargestellt werden [Östling und Johanson, 1984]. Erst der Austausch des zuvor verwendeten Puffers durch einen alkalischen Puffer führte dazu, dass auch alkalilabile Stellen, Einzelstrangbrüche und inkomplette Exzisionsreparaturstellen nachgewiesen werden konnten [Singh et al., 1988; Singh et al., 1989].

Die alkalische Einzelzell- Gelelektrophorese, die in dieser Arbeit Anwendung fand, stellt eine sehr sensitive, schnelle und kostengünstige Methode dar, um auch geringe genotoxische Effekte an Einzelzellen zu quantifizieren [Tice et al., 2000]. Nach der Auflösung der Zell- und Kernmembran durch die Lyselösung wird die freigelegte DNA einem stark alkalischen Milieu zugeführt, wodurch es zur vollständigen Denaturierung und Entspiralisierung der DNA kommt. Die unterschiedlich stark geschädigten DNA-Fragmente wandern in einem elektrischen Feld verschieden weit in Richtung der Anode. Mit Hilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes werden die Fragmente sichtbar gemacht, wobei unbeschädigte Anteile den Kopf und die restlichen geschädigten Fragmente den Schweif eines Kometen bilden. Vergleicht man die Intensität des Kopfes mit der des Schweifes, lässt sich so das Ausmaß der DNA-Schädigung bestimmen [Speit und Hartmann, 2005].

2.2.8.1 Vorbereitung der Objektträger und Zellyse

Die Objektträger, die an beiden Längsseiten mattiert waren, wurden mit 85 µl einer 0,5 % Normal Melting Agarose beschichtet. Diese musste für mindestens 48 Stunden vor dem Versuch aushärten.

Die Zellpellets, die nach dreifacher Zentrifugierung und Entfernung des Überstandes übrig blieben, wurden mit 75 µl einer 0,7 % Low Melting Agarose resuspendiert. Die Suspension wurde dann auf die Objektträger aufgebracht, mit Deckgläsern versehen und für zehn Minuten auf eine Kühlplatte gelegt. Dadurch kam es zu einer schnellen Aushärtung der Agarose. Danach wurden die Deckgläser vorsichtig entfernt, nochmals mit 85 µl der 0,7 % Low Melting Agarose beschichtet und erneut mit Deckgläsern bedeckt. Nach wiederum zehn Minuten Aushärtungszeit wurden die Deckgläser abgenommen.

Diese dreischichtige „Sandwich“-Agarose gewährleistete durch die unterste Schicht eine optimale Haftung der Zellen auf den Objektträgern und durch die oberste eine Versiegelung der mittleren Schicht, um die Zellen optimal einzubetten.

Um die DNA freizulegen, kamen die Objektträger vertikal in eine Glasküvette, die mit 100 ml einer Lyselösung gefüllt wurde. Die Objektträger blieben in dieser Lösung für eine Stunde bei 4 °C im Kühlschrank, wodurch die Zell- und Kernmembran aufgelöst wurde. Anschließend erfolgte die Elektrophorese.

2.2.8.2 Durchführung der Elektrophorese

Die aus der Lyselösung entnommenen Objektträger wurden horizontal, nahe der Anode in eine eisgekühlte Elektrophoresekammer lückenlos aneinander gelegt. Die Elektrophoresekammer wurde mit einem 4 °C kalten Puffer, dessen pH-Wert bei > 13 lag, befüllt. Um eine Störung des elektrischen Feldes zu vermeiden und eine gleichmäßige Migration der DNA zu gewährleisten, wurden Luftblasen aus der Elektrophoresekammer entfernt.

Es folgte eine 20minütige Inkubation, während der es zur Denaturierung und Entspiralisierung der DNA aufgrund des alkalischen Milieus kam. Daran schloss sich die 20minütige Elektrophorese an, die bei 300 mA und 25 V ablief.

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Objektträger auf einer Färbepbank dreimal mit fünfminütiger Einwirkzeit mit einer Trisma-Base neutralisiert.

Auf die Objektträger wurden jeweils 75 µl Ethidiumbromid zum Anfärben der DNA pipettiert. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger in einem feuchten Objektträgerkästchen bei 4 °C im Kühlschrank verwahrt.

2.2.8.3 Digitale Auswertung der DNA-Migration

Für die Auswertung der Objektträger wurde ein DMBL Fluoreszenzmikroskop verwendet, das an eine CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung gekoppelt war (Komet 3.1).

Von jedem Objektträger wurden achtzig Zellen ausgewertet, wobei in Abhängigkeit der Schädigung das Migrationsmuster variierte. Das heißt, dass bei einer geringen Schädigung die großen DNA-Fragmente eine kurze Strecke wanderten, während im Falle einer hohen Schädigung die kleinen Fragmente eine längere Strecke zurücklegten. Daraus ergab sich das Bild eines Kometen mit weitestgehend intakter DNA im Kopf und fragmentierter DNA im Schweif.

Um das Ausmaß der DNA-Schädigung zu quantifizieren wurde der „% tail DNA“ verwendet. Dieser wird aus dem prozentualen Anteil der DNA im Schweif gebildet.

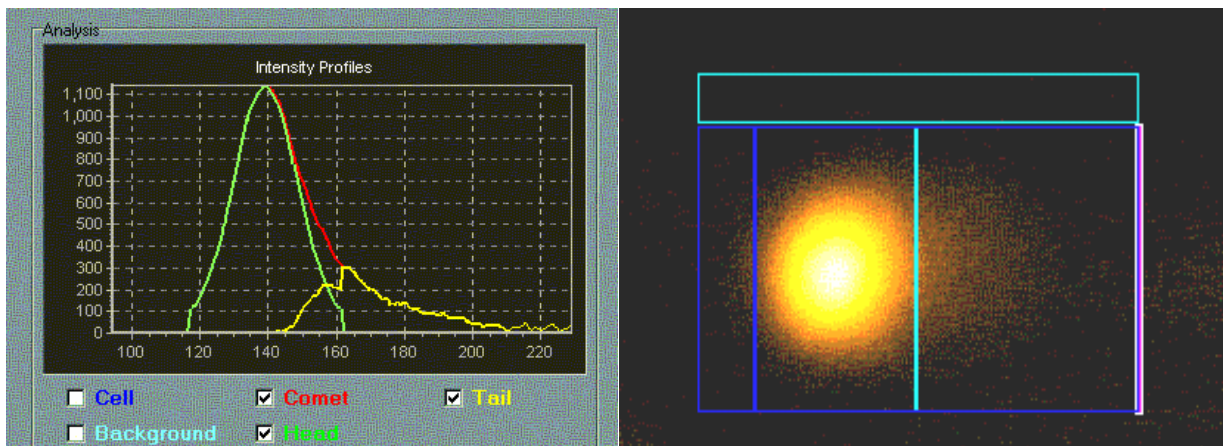


Abbildung 6. Comet 3.1 Auswertung: Epithelzelle mit geschädigter DNA

2.2.9 Kryoschnitte

2.2.9.1 Kryokonservierung der Miniorgankulturen

Kryokonservierung bedeutet, dass Zellen oder Zellverbände auf Temperaturen von $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt werden und nach dem Auftauen die Gewebestrukturen wie vor dem Einfrieren erhalten geblieben sind. Dies ist möglich, da bei solch niedrigen Temperaturen der Stoffwechsel der Zellen auf ein Minimum reduziert wird [Mazur et al., 1966].

Prinzipiell wird bei der Kryokonservierung eine Miniorgankultur in ein Plastikschälchen (Tissue-Tek[®] Cryomold[®]) eingebracht. Das Behältnis wird mit einem Medium zum Einbetten von Gewebeproben, welches aus wasserlöslichen Glycolen und Harzen besteht (Optimal Cutting Temperature (O.C.T.) - Compound), luftblasenfrei aufgefüllt. Die eingebetteten Gewebestücke werden dann langsam in flüssigem Stickstoff eingefroren. Um Gewebeschäden durch Gefrierbrand zu vermeiden, werden die Gewebestücke in Alufolie eingewickelt und bis zur Anfertigung der Gefrierschnitte in einem Gefrierschrank bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ verwahrt.

Für die Kryokonservierung von Miniorgankulturen, die für die immunhistochemische Darstellung der Expression des EGFR verwendet werden sollten, wurden am Tag der Inkubation mit den aktivitätsmodulierenden Substanzen des EGFR von jeder Versuchsreihe Miniorgankulturen auf jeweils drei Wells einer 24-Wellplatte verteilt. Die Miniorgankulturen in den drei Wells erfuhren unterschiedliche Behandlungen, wobei die erste der Betrachtung des Expressionsmusters nach Abschluss der Kultivierung diente. In das zweite Well wurde Cetuximab zugegeben, um die Aktivität des EGFR zu blockieren. Die Miniorgankulturen des dritten Wells wurden mit TGF α inkubiert, um die Aktivität zu stimulieren. Diese Stoffe wirkten 72

Stunden auf die Miniorgankulturen ein. Daraufhin wurden die Miniorgankulturen zweimal mit BEGM gereinigt und einem 48stündigen Ruheintervall zugeführt.

Am Tag der Inkubation mit BPDE wurden die Miniorgankulturen wie zuvor beschrieben eingefroren.

2.2.9.2 Anfertigung der Kryoschnitte

Mit Hilfe eines Mikrotoms wurden die Gefrierblöcke in 5 µm dicke Scheiben geschnitten, wobei die Umgebungstemperatur -19 bis -25 °C betrug. Diese Schnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und über eine Dauer von zwölf Stunden luftgetrocknet.

Um die Gewebeschnitte auf den Objektträgern zu fixieren, wurden diese nach der vollständigen Trocknung für zehn Minuten in 4 °C kaltes Aceton gestellt und über Nacht bei Raumluft trocknen gelassen.

2.2.10 Hämalaun- Eosin-Färbung der Kryoschnitte

Die Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) ist die Standardfärbung in der Histologie, die einen Überblick über die Struktur des Gewebes liefert. Dabei lässt sich normales Gewebe von entzündlich oder degenerativ verändertem Gewebe sowie von dysplastischem Gewebe unterscheiden [Avwioro et al., 2011].

Mit dem basischen Farbstoff Hämalaun werden die Zellkerne blau angefärbt und der saure Farbstoff Eosin dient zur Darstellung des Zytoplasmas, welches unter dem Lichtmikroskop rot erscheint.

Für die Hämalaun-Eosin-Färbung wurden die Gefrierschnitte durch Aceton auf den Objektträgern fixiert. Diese wurden in eine Glasküvette mit Aqua bidest für fünf Minuten gestellt. Daraufhin erfolgte die Färbung der Zellkerne mit Hilfe der Hämalaunlösung nach Mayer für vier Minuten. Anschließend wurden die Kerne unter fließendem Leitungswasser in zehn Minuten gebläut. Um die überschüssigen Farbreste von den Objektträgern zu entfernen, wurden die Objektträger für zwei Minuten in Aqua bidest gereinigt.

Zur Gegenfärbung des Zytoplasmas wurden die Schnitte einer Eosinlösung für drei Minuten zugeführt, woraufhin die Farbreste wiederum durch Aqua bidest entfernt wurden.

Die Proben wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 85 %, 100 %) für jeweils fünf Minuten entwässert. Die Aushärtung durch Xylol war nach zehn Minuten erreicht.

Um die gefärbten Schnitte mikroskopisch begutachten zu können, wurden die Objektträger mit einem neutralen Kunstharz (Eukit[®]) eingedeckt.

2.2.11 Immunhistochemische Darstellung des EGFR

Bei der Immunhistochemie handelt es sich um ein Verfahren, das dazu dient, Zellproteine in Gewebeschnitten mit Hilfe einer Antigen-Antikörperreaktion histologisch zu lokalisieren und zu identifizieren. Dabei fungiert das nachzuweisende Protein als Antigen. Der spezifische Antikörper (Primärantikörper) stammt meist aus dem Serum eines Versuchstieres, welches mit diesem Stoff geimpft und somit immunisiert wurde.

Für die Darstellung und Quantifizierung des EGFR wurde in dieser Arbeit die indirekte Methode der Immunhistochemie angewendet. Hierbei wird der gebundene Primärantikörper mittels eines markierten Sekundärantikörpers nachgewiesen und sichtbar gemacht. Nach der darauffolgenden Gegenfärbung erfolgt eine semiquantitative Auswertung mit dem Lichtmikroskop.

Im Folgenden sowie in der Tabelle 10 sind die einzelnen Schritte dieser indirekten Methode der Immunhistochemie beschrieben.

a) Demaskierung der EGFR-Antigenstellen durch Proteinase K

Die Proteinase K wirkt proteolytisch und bewirkt so eine Andauung des Gewebeverbandes, was die EGFR-Antigenstellen demaskiert. Durch diese Maßnahme wird es dem Primärantikörper ermöglicht, das Antigen als Bindungsstelle zu erkennen. Hierfür wurden die Objektträger aus dem destillierten Wasser entfernt und mit einem Zellstofftuch getrocknet. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit 100 µl Proteinase K für fünf Minuten. Die Andauung des Gewebes wurde durch die Spülung und einer sich anschließenden fünfminütigen Inkubation der Objektträger mit Aqua bidest gestoppt.

b) Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität

Die verwendete Färbemethode liefert einen indirekten Nachweis des Antigens, indem der Antikörper, der mit Peroxidaseketten markiert ist, an den EGFR bindet. Dies bewirkt nach der Substrat- und Chromogenumsetzung einen Farbniederschlag, so dass vor der Substrat-Chromogen-Reaktion die endogene Peroxidaseaktivität ausgeschaltet werden muss.

Es erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität durch eine fünfminütige Inkubation mit 100 µl 3 % H₂O₂. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte eine Spülung und Inkubation der Objektträger mit einer Pufferlösung für fünf Minuten.

c) Inkubation mit dem Primärantikörper bzw. dem Negativkontrollreagenz

Um eine Austrocknung der Gewebeschnitte zu verhindern, erfolgten dieser und der darauffolgende Färbeschritt in einer feuchten Kammer. Die Inkubationszeit mit jeweils 100 µl des Pri-

märantikörpers (monoklonaler Maus-IgG-Antikörper) beziehungsweise des Negativkontrollreagenzes (monoklonaler Maus IgG₁-Antikörper) betrug 30 Minuten. Daran schloss sich wiederum eine Reinigung von den Substanzen mit Pufferlösung und einer Inkubationszeit von fünf Minuten an.

d) Inkubation mit dem Dextranpolymer

Die Objektträger wurden 30 Minuten mit 100 µl des Sekundärantikörpers inkubiert. Dieser war an ein Dextran-Polymermolekül gebunden und mit Meerrettich-Peroxidase markiert. Es schloss sich wieder eine Spülung mit Pufferlösung und eine fünfminütige Inkubationszeit an.

e) Inkubation mit der DAB+ Substrat-Chromogen-Lösung

Die Gewebeschnitte wurden für zehn Minuten mit 100 µg der DAB+ Substrat-Chromogen-Lösung inkubiert und die Überreste daraufhin mit destilliertem Wasser abgewaschen und für fünf Minuten in eine Küvette mit Aqua bidest überführt.

f) Gegenfärbung mit Hämalaun

Die Gegenfärbung der Zellkerne schloss sich an die immunhistochemische Färbung der Gewebeschnitte an. Dafür wurden die Objektträger für vier Minuten in eine Hämalaunlösung gegeben und anschließend für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut.

g) Versiegelung der Objektträger

Nachdem die Feinschnittpräparate luftgetrocknet waren, wurden die Gewebeschnitte mit Kaiser-Gelatine eingedeckt und mit einem Deckgläschen versehen. Die Objektträger wurden bis zur Auswertung lichtgeschützt und bei Raumtemperatur aufbewahrt, um eine Signalabschwächung zu verhindern.

h) Semiquantitative Auswertung

Die immunhistochemisch gefärbten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Lichtmikroskops ausgewertet, wobei die Expression des EGFR semiquantitativ festgestellt wurde.

Hierfür wurde folgende Gradeinteilung zur Einstufung der Expression verwendet [Taoudi et al., 2010]:

Grad 0: keine Färbung; Grad 1: schwache Färbung; Grad 2: moderate Färbung; Grad 3: starke Färbung

2.2.12 Methodenspezifische Materialien

2.2.12.1 Herstellung des Kulturmediums für Miniorgankulturen

<i>Kulturmedium für Miniorgankulturen</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
<p>Nährmedium Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM): 500 ml Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM) + Supplement Pack (BPE, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Trijodthyronin, Transferrin, Retinoic Acid) + Antimikrobieller Zusatz (100 µl Amphotericin B, 5 µl Gentamycin)</p>	<p>Epidermal Growth Factor aus dem Supplement Pack entfernen, Supplement Pack und antimikrobiellen Zusatz unter sterilen Bedingungen zum BEBM zugeben, gut durchmischen, bei 4 °C lagern</p>
<i>Agar 1,5 % für 24 Wellplatten</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
<p>0,45 g Agar Noble, 30 ml Aqua bidest</p>	<p>Agarosepulver mit Aqua bidest mischen Aufkochen in Mikrowelle Sterile Filtration</p>
<i>DMEM Lösung für 24- Wellplatten</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
<p>9,99 g DMEM- Pulver 11,96 g HEPES- Pulver 500 ml Aqua bidest</p>	<p>DMEM- und HEPES-Pulver in Aqua bidest auflösen, pH auf 7,2 einstellen, steril filtrieren</p>
<i>Agar für 24-Wellplatten</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
<p>30 ml 1,5 % Agar Noble 30 ml DMEM 6 ml FCS 7,5 µl nicht essentielle Aminosäuren 120 µl Penicillin/Streptomycin 240 µl Amphotericin B</p>	<p>DMEM, FCS, nicht essentielle Aminosäuren, Penicillin/Streptomycin, Amphotericin B mischen und gut schwenken, Agarose in Mikrowelle aufkochen, beide Komponenten zusammengeben, in jedes Well je 250 µl geben, bei 4 °C im Kühlschrank aushärten lassen</p>

Tabelle 7. Methodenspezifische Materialien: Herstellung des Kulturmediums für Miniorgankulturen

2.2.12.2 Herstellung der Lösungen für die Einzelzell- Gelelektrophorese

<i>Einzelzell- Gelelektrophorese</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
Agarose 0,5 %: 0,05 g 0,5 % Low-Melting Agarose 10 ml PBS	Agarosepulver einwiegen, PBS dazugeben, in Mikrowelle aufkochen, bei 37 °C im Wasserbad bis zur Weiterverarbeitung aufbewahren
Agarose 0,7 %: 0,07 g 0,7 % Normal-Melting Agarose 10 ml PBS	Agarosepulver einwiegen, PBS dazugeben, in Mikrowelle aufkochen, bei 37 °C im Wasserbad bis zur Weiterver- arbeitung aufbewahren
Lysestammlösung: 146,4 g NaCl [2,5 M] 1,2 g Trihydroxymethylaminomethan [19 mM] 37,2 g Na ₂ EDTA [100 mM] 10 g N-Laurylsacrosinnatriumsalz (1 %) Aqua bidest	NaCl, Trihydroxymethylaminomethan, N-Laurylsacrosinnatriumsalz in 500 ml Aq- ua bidest geben, Na ₂ EDTA und NaOH-Plätzchen in 160 ml Aqua bidest lösen, pH auf 10 einstellen, auf 1 l mit Aqua bidest auffüllen
Lysepuffer: 1 ml Triton X-100 10 ml DMSO 89 ml Lysestammlösung	Triton X-100 und DMSO in Messzylinder geben, auf 100 ml mit Lysestammlösung auffüllen
Elektrophoresepuffer: 24 g NaOH-Pellets [300 mM] 0,744 g Na ₂ EDTA [1 mM] Aqua bidest	NaOH-Pellets, Na ₂ OH-Plätzchen einwiegen, auf 2 l mit Aqua bidest auffüllen, Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C
Neutralisationspuffer: 48,5 g Trihydroxymethylaminomethan Aqua bidest	Trihydroxymethylaminomethan in 1 l Aqua bidest geben, pH auf 7,5 einstellen, Aufbewahrung bei Raumtemperatur
Ethidiumbromidlösung: 0,2 mg/ml Ethidiumbromidstammlösung Aqua bidest	Verdünnung der Ethidiumbromidstammlö- sung mit Aqua bidest im Verhältnis 1:10, steril filtrieren,

	lichtgeschützte Aufbewahrung im Kühlschrank bei 4 °C
--	--

Tabelle 8. Methodenspezifische Materialien: Herstellung der Lösungen für die Einzelzell- Gelelektrophorese

2.2.12.3 Materialien zur Durchführung der HE-Färbung

<i>HE-Färbung</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
Aceton 100 %	Fixierung der Gewebeschnitte auf Objektträgern durch 4°C kaltes Aceton für zehn Minuten, Spülung mit Aqua bidest für fünf Minuten
Hämalaun-Gebrauchslösung	gebrauchsfertig Objektträger für fünf Minuten in Hämalaun-Gebrauchslösung nach Mayer
Leitungswasser	Bläuen der Objektträger für zehn bis fünfzehn Minuten unter fließendem Leitungswasser, Spülung mit Aqua bidest für zwei Minuten
Eosin-Lösung:	gebrauchsfertig 1 Tropfen Eisessig auf 100 ml Eosinlösung, Gegenfärbung für drei Minuten in der Eosinlösung, kurz mit Aqua bidest spülen
Aufsteigende Alkoholreihe: 70 % 85 % 100 %	Entwässern für jeweils fünf Minuten in aufsteigender Alkoholreihe
Xylol	Für zehn Minuten in Xylol Aushärten lassen
Neutralharz (Eukit®)	Eindecken der Objektträger mit Eukit®

Tabelle 9. Methodenspezifische Materialien: Durchführung der HE-Färbung

2.2.12.4 Materialien zur Durchführung der immunhistochemischen Färbung des EGFR

<i>Immunhistochemische Färbung des EGFR</i>	<i>Kurzbeschreibung</i>
Paraformaldehyd 3,5 %	7 g Paraformaldehyd mit 100 ml Aqua bidest unter Hitze rühren, klären der Lösung mit Natrium-Hydroxid-Lösung, Zugabe von 100 ml doppelkonzentrierter PBS-Lösung, ph-Wert auf 7,0-7,4 einstellen (Messung mit Teststreifen), Filtration, Reifen der Lösung in lichtgeschützter Flasche bei 4 °C über Nacht (Haltbarkeit maximal vier bis fünf Tage)
HBS-Puffer	78,8 g Natriumchlorid, 7,4 g Kaliumchlorid, 0,81 g Magnesiumdichlorid, 1,1 g Calciumdichlorid, 23,6 g Hepes 1 l Aqua bidest mit NaOH auf ph 7,4 einstellen, HBS-Puffer 1:10 mit Aqua bidest verdünnen
EGFR pharmDx™ Kit: Proteinase K: <0,1 % Proteinase K in Tris-HCl-Puffer verdünnt Peroxidase Block: 3 % Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	gebrauchsfertig- jeden Objektträger mit 100 µl Proteinase K inkubieren gebrauchsfertig- jeden Objektträger mit 100 µl Peroxidase Block inkubieren

<p>EGFR-Primärantikörper: Monoklonaler Maus-IgG-Antikörper gegen humanes EGFR-Protein</p>	<p>gebrauchsfertig- jeden Objektträger mit 100 µl EGFR- Primärantikörper inkubieren</p>
<p>Negativkontrollreagenz: Monoklonaler Maus-IgG₁</p>	<p>gebrauchsfertig- jeden Objektträger mit 100 µl Negativkon- trollreagenz inkubieren</p>
<p>Dextran-Polymer: Dextran-Polymer mit Meerrettich-Peroxidase und anti-Maus Sekundärantikörper von der Ziege konjugiert</p>	<p>gebrauchsfertig- jeden Objektträger mit 100 µl Dextran- Polymer inkubieren</p>
<p>DAB+ Substrat-Chromogen-Lösung: 1 ml Diaminobenzidin (DAB) + Substratpuf- fer ein Tropfen flüssiges DAB + Chromogen</p>	<p>DAB+ Substratpuffer in ein Reaktionsge- fäß geben, einen Tropfen DAB+ Chromogen-Lösung hinzufügen, gut durchmischen</p>
<p>Waschpuffer: 1 l Tri-gepufferte-Kochsalzlösung versetzt mit Polysorbat 20 Aqua bidest.</p>	<p>Waschpuffer mit Aqua bidest im Verhält- nis 1:10 in einem Standzylinder anmischen</p>

Tabelle 10. Methodenspezifische Materialien: Durchführung der immunhistochemischen Färbung des EGFR

3 Ergebnisse

3.1 Vitalität der Zellen

Um eine zytotoxische Wirkung der verwendeten Testsubstanzen auf die Zellen und um apoptotische Vorgänge auszuschließen, wurde nach der Inkubation der Miniorgankulturen eine Vitalitätsbestimmung mit dem Trypanblau-Ausschluss-Test durchgeführt. Es wurden ausschließlich Proben dem Comet Assay zugeführt, bei denen eine Vitalität von über 80 % vorlag.

3.2 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogrammes SPSSTM Version 21.

Aufgrund einer Normalverteilung der ermittelten Werte konnte der T-Test für verbundene Stichproben angewendet werden. Um die % tail DNA-Werte innerhalb einer Gruppe gegenüberstellen zu können, wurde der T-Test für verbundene Stichproben verwendet, zum Vergleich von Werten zwischen den Gruppen kam der unverbundene T-Test zur Anwendung.

Das globale Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ festgelegt. Bei mehrfachen Testungen entsteht das multiple Testproblem. Um diesem zu entgegnen, wurde für jede Nullhypothese ein lokales Signifikanzniveau definiert, indem das globale Signifikanzniveau mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur ermittelt wurde.

Zur graphischen Darstellung wurden Boxplots angefertigt. In Boxplots werden zentrale Tendenzen, Streuung, Schiefe und Spannweite einer Verteilung inklusive Ausreißern in einem Bild zusammengefasst. Die obere Begrenzung eines Boxplots ist die 75. Perzentile, die untere Begrenzung die 25. Perzentile. Die horizontale Linie in der Box stellt den Median dar. Der obere und untere Whisker sind die beiden Linien ober- und unterhalb der Box. Diese spiegeln Werte wider, die außerhalb der Box liegen. Ausreißerwerte, die mehr als eineinhalb Boxplotlängen außerhalb liegen, werden mit einem Kreis [°] versehen; welche, die mehr als drei Längelängen außerhalb liegen mit einem Stern [*].

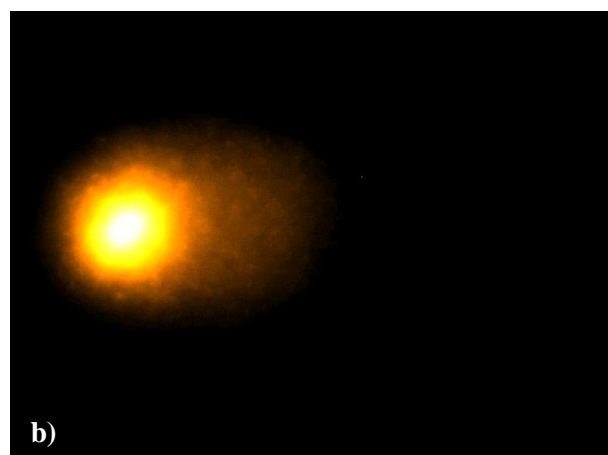
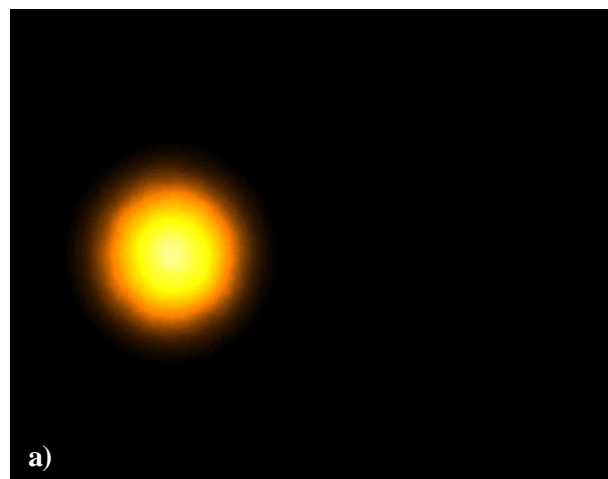
Zur graphischen Darstellung des Expressionsverhaltens des EGFR wurden Säulendiagramme mit Microsoft Excel[®] erstellt.

3.3 DNA-Schädigung mit BPDE und DNA-Reparatur

Durch die Exposition mit BPDE werden DNA-Strangbrüche induziert, die im alkalischen Milieu des Comet Assay DNA-Fragmente bilden. Diese Fragmente wandern entsprechend ihres molekularen Gewichtes im elektrischen Feld unterschiedlich weit in Richtung der Anode. Kleine und leichte Fragmente legen die größte Migrationsstrecke zurück, während große und schwere Fragmente im Zellkern bleiben. Es entsteht das Bild eines Kometen mit intakter DNA im Kopf und klein-fragmentierter DNA-Teile im Schweif.

In der Abbildung 7 a)- c) sind unterschiedliche Schweregrade der DNA-Fraktionierung nach der Schädigung mit BPDE dargestellt.

Die DNA-Fragmente lassen sich mit Ethidiumbromid anfärben und unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen. Das Ausmaß der Schädigung wurde anhand des „% tail DNA“, der den prozentualen Anteil der DNA im Schweif widerspiegelt, ermittelt.



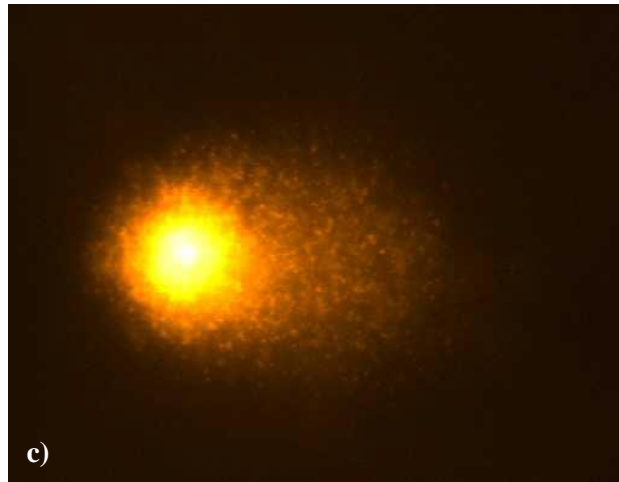


Abbildung 7. Unterschiedliche Schweregrade der DNA-Fraktionierung nach der Durchführung des Comet Assay und der Färbung mit Ethidiumbromid: a) DNA einer unbeschädigten Schleimhautzelle, b) DNA einer mittelgradig geschädigten Schleimhautzelle, c) DNA einer stark geschädigten Schleimhautzelle

In dieser Arbeit wurden Schleimhautproben von insgesamt 40 Patienten (n=40) unter Verwendung des Comet Assay untersucht. Die eine Hälfte der Proben (n=20) war an einem Oropharynxkarzinom erkrankt (vier ♀, 16 ♂; in einem Alter zwischen 52 und 80 Jahren, Durchschnittsalter 66,0 Jahre), während die andere Hälfte (n=20) keine Karzinomerkrankung hatte (elf ♀, neun ♂; in einem Alter zwischen 18 und 70 Jahren, Durchschnittsalter 34,4 Jahre) und als Kontrollgruppe diente.

3.4 Einfluss der Stimulation (TGF α) und der Blockade (Cetuximab) des EGFR auf die Mutagensensitivität und die Reparaturfähigkeit in der tumorfreien Kontrollgruppe und in der Karzinomgruppe

3.4.1 Tumorfreie Kontrollgruppe

3.4.1.1 DNA-Schädigung

<i>Agens</i>	<i>DNA-Schädigung Mittelwerte [% tail DNA]</i>
Aquabidestillata & DMSO (neg. Kontrolle)	4,86
BPDE	20,92
Cetuximab + BPDE	16,74
TGF α + BPDE	16,40

Tabelle 11. DNA-Schädigung in der tumorfreie Kontrollgruppe (n=20): % tail DNA-Mittelwerte nach Inkubation mit Aquabidestillata, DMSO, BPDE, Cetuximab und TGF α

Bei jeder Schleimhautprobe wurde eine Negativkontrolle mit den Lösungsmitteln Aquabidestillata und Dimethylsulfoxid (DMSO) durchgeführt, um eine toxische Wirkung der Einzelsubstanzen auszuschließen. Es konnte keine relevante DNA-Schädigung nachgewiesen werden.

Ebenso wurde bei jedem Versuch eine Miniorgankultur mit BPDE inkubiert, um den DNA-schädigenden Einfluss zu quantifizieren. Es zeigte sich im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante DNA-Schädigung. Die alleinige Gabe der stimulierenden und blockierenden Substanzen, TGF α und Cetuximab, auf die Schleimhautproben der tumorfreien Patienten induzierte keine relevante DNA-Schädigung (hier nicht dargestellt).

Wurden die Miniorgankulturen nicht nur mit BPDE, sondern zusätzlich mit Cetuximab beziehungsweise TGF α inkubiert, konnte im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante DNA-Fragmentierung beobachtet werden.

Im Vergleich mit der alleinigen BPDE-Inkubation führten sowohl die Stimulation als auch die Blockade des EGFR zu einer signifikanten Reduktion des BPDE induzierten DNA-Schadens. Betrachtet man die DNA-Schädigung nach der Inkubation mit Cetuximab verglichen mit der Schädigung nach der Gabe von TGF α , so lässt sich kein signifikanter Unterschied verzeichnen.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in den Tabellen 11 und 12 sowie in der Abbildung 8 dargestellt.

<i>Agens</i>	<i>p-Werte</i>
neg. Kontrolle vs BPDE	$\leq 0,001$
neg. Kontrolle vs Cetuximab + BPDE	$\leq 0,001$
neg. Kontrolle vs TGF α + BPDE	$\leq 0,001$
BPDE vs Cetuximab + BPDE	0,002
BPDE vs TGF α + BPDE	$\leq 0,001$
Cetuximab + BPDE vs TGF α + BPDE	0,541

Tabelle 12. DNA-Schädigung in der tumorfreien Kontrollgruppe (n=20): p-Werte im T-Test für verbundene Stichproben (Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur $p \leq 0,007$)

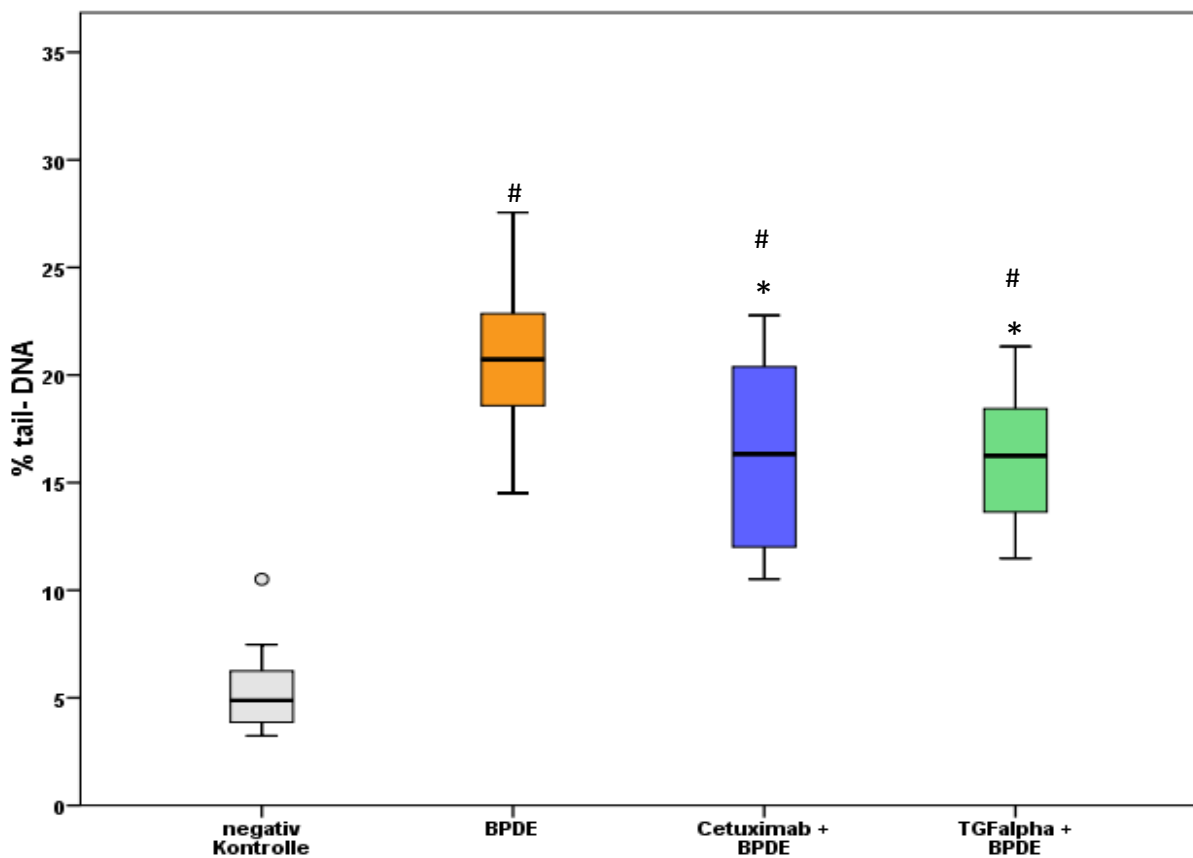


Abbildung 8. Darstellung der DNA-Schädigung in der tumorfreien Kontrollgruppe (n=20). Vergleich der % tail DNA Werte. Eine Markierung mit einem Stern (*) beschreibt einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Schädigung mit BPDE. Eine Markierung mit einer Raute (#) beschreibt einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle.

3.4.1.2 DNA-Reparatur und DNA- Reparaturkapazität

<i>Agens</i>	<i>DNA-Reparatur Mittelwerte [% tail DNA]</i>
BPDE	20,92
Cetuximab + BPDE	16,74
TGF α + BPDE	16,40
Reparatur BPDE	14,50
Reparatur Cetuximab + BPDE	12,52
Reparatur TGF α + BPDE	12,44

Tabelle 13. DNA-Reparatur in der tumorfreien Kontrollgruppe (n=20): % tail DNA-Mittelwerte nach 24- stündiger Reparatur nach Inkubation mit BPDE und nach Zugabe von Cetuximab und TGF α

<i>Agens</i>	<i>DNA-Reparaturkapazitäten [%]</i>
Reparaturkapazität BPDE	29,7 %
Reparaturkapazität Cetuximab + BPDE	18,6 %
Reparaturkapazität TGF α + BPDE	22,2 %

Tabelle 14. DNA-Reparaturkapazität in der tumorfreien Kontrollgruppe (n=20): %-Mittelwerte nach 24- stündiger Reparatur nach Inkubation mit BPDE und nach Zugabe von Cetuximab und TGF α

Die Reparaturfähigkeit wurde ermittelt, indem die DNA-Schädigung nach einer 24 stündigen Reparaturphase gemessen wurde. Die Reparaturfähigkeit der Zellen wurde nach der Inkubation mit BPDE alleine oder zusätzlich mit TGF α beziehungsweise mit Cetuximab betrachtet. Zudem wurden die DNA-Reparaturkapazitäten erhoben. Die Reparaturkapazitäten werden in Prozent angegeben und zeigen an, wie viel DNA-Schaden in Relation zur Ausgangsschädigung durch BPDE alleine oder unter dem zusätzlichen Einfluss von Cetuximab beziehungsweise TGF α repariert werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass die Schädigung im Vergleich zur Ausgangsschädigung nach der 24 stündigen Reparaturphase signifikant reduziert war.

Die Miniorgankulturen, deren EGFR Aktivität durch Cetuximab beziehungsweise TGF α moduliert wurde, wurden nach der 24 stündigen Reparaturphase betrachtet und mit der Ausgangsschädigung, hervorgerufen durch BPDE, verglichen. Die DNA-Fragmentierung war

nach der Reparaturphase sowohl unter dem Einfluss von Cetuximab als auch unter dem von TGF α signifikant geringer als die Ausgangsschädigung.

Die Zellen, die vor der Reparaturphase mit Cetuximab beziehungsweise TGF α inkubiert und mit BPDE geschädigt worden waren, wurden mit der DNA-Schädigung nach dem Reparaturintervall verglichen. Die DNA-Schäden wurden unter dem Einfluss der EGFR-aktivitätsmodulierenden Substanzen signifikant gesenkt.

Verglichen wurde auch die DNA-Schädigung unter dem Einfluss von Cetuximab mit der Schädigung nach der Inkubation mit TGF α nach Ablauf des Reparaturintervalls. Es zeigte sich kein signifikantes Ergebnis.

Der Mittelwert der Reparaturkapazitäten nach der Inkubation mit BPDE betrug 29,7 %, unter dem zusätzlichen Einfluss von Cetuximab ergab sich ein Mittelwert von 18,1 % und unter dem Einfluss von TGF α anstelle von Cetuximab ließ sich ein Mittelwert von 22,2 % erheben. Die Reparaturkapazität der DNA nach der Schädigung mit BPDE verglichen mit der Reparaturkapazität unter dem zusätzlichen Einfluss von Cetuximab beziehungsweise TGF α ließ sich nicht signifikant beeinflussen. Wurden die Reparaturkapazitäten unter einerseits dem Einfluss von Cetuximab und andererseits von TGF α miteinander verglichen, ergab sich kein signifikantes Ergebnis.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in den Tabellen 13, 14, 15 und 16 sowie in der Abbildung 9 dargestellt.

<i>Agens</i>	<i>p-Werte</i>
BPDE vs Rep BPDE	$\leq 0,001$
BPDE vs Rep Cetuximab + BPDE	$\leq 0,001$
BPDE vs Rep TGF α + BPDE	$\leq 0,001$
Cetuximab + BPDE vs Rep Cetuximab + BPDE	0,003
TGF α + BPDE vs Rep TGF α + BPDE	$\leq 0,001$
Rep Cetuximab + BPDE vs Rep TGF α + BPDE	0,916

Tabelle 15. DNA-Reparatur in der tumorfreien Kontrollgruppe (n=20): p-Werte im T-Test für verbundene Stichproben (Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur $p \leq 0,007$)

<i>Agens</i>	<i>p-Werte</i>
RepKap BPDE vs RepKap Cetuximab + BPDE	0,264
RepKap BPDE vs RepKap TGF α + BPDE	0,228
RepKap Cetuximab + BPDE vs RepKap TGF α + BPDE	0,744

Tabelle 16. DNA-Reparaturkapazität in der tumorfreien Kontrollgruppe (n=20):p-Werte im T-Test für verbundene Stichproben (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$)

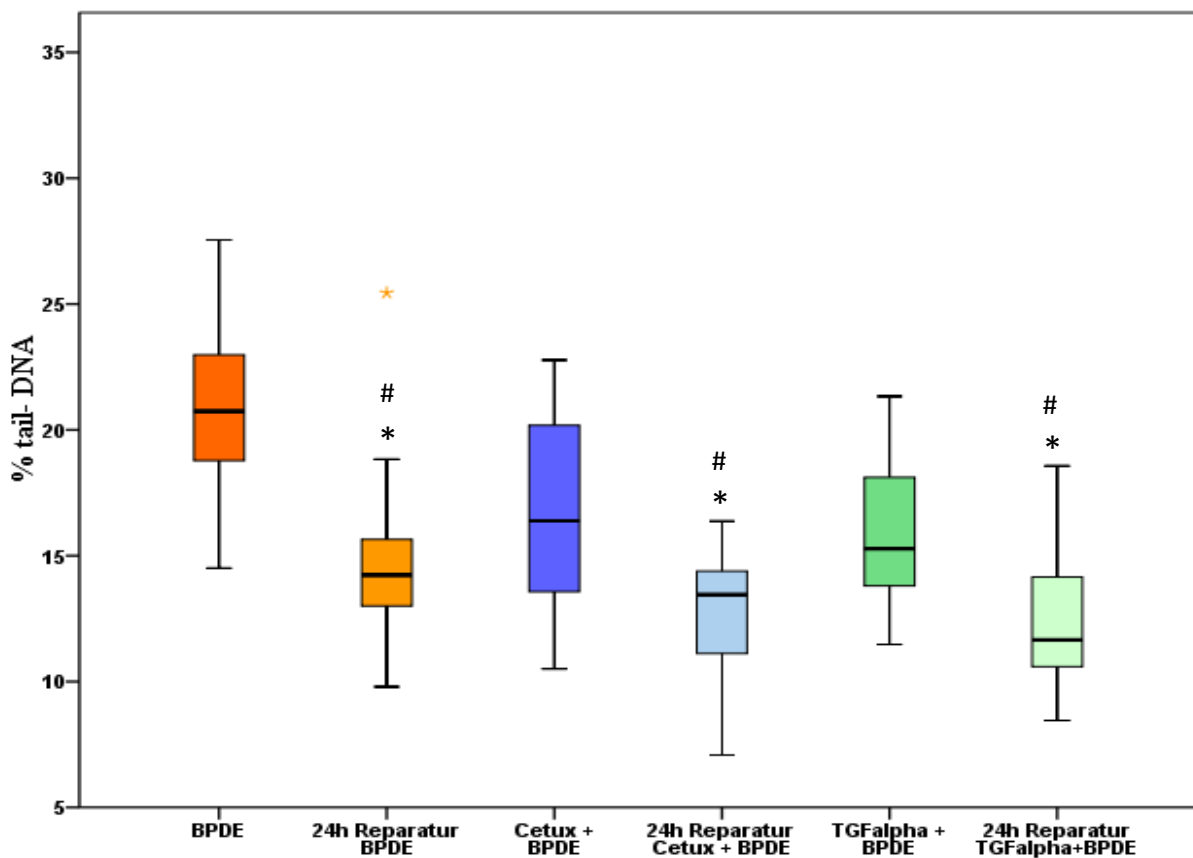


Abbildung 9. Darstellung der DNA-Reparatur in der tumorfreien Kontrollgruppe (n=20): Vergleich der % tail DNA-Werte: Eine Markierung mit einem Stern (*) beschreibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Reparatur und der jeweiligen dazugehörigen Ausgangsschädigung. Eine Markierung mit einer Raute (#) beschreibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Reparatur und der Schädigung mit BPDE.

3.4.2 Karzinomgruppe

3.4.2.1 DNA-Schädigung

<i>Agens</i>	<i>DNA-Schädigung Mittelwerte [% tail DNA]</i>
Aquabidestillata & DMSO (neg. Kontrolle)	4,30
BPDE	21,50
Cetuximab + BPDE	16,15
TGF α + BPDE	13,39

Tabelle 17. DNA-Schädigung in der Karzinomgruppe (n=20): % tail DNA-Mittelwerte nach Inkubation mit Aquabidestillata, DMSO, BPDE, Cetuximab und TGF α

Auch in der Karzinomgruppe wurden die Lösungsmittel Aqua bidestillata und DMSO auf ihre DNA schädigende Wirkung getestet. Es konnte bei keiner der Kontrollen eine relevante Schädigung nachgewiesen werden.

Die Inkubation mit BPDE zeigte im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante DNA-Schädigung. Wurden die Schleimhautproben nur mit Cetuximab bzw. TGF α inkubiert, konnte kein DNA schädigender Einfluss festgestellt werden (hier nicht dargestellt).

Im Vergleich zur Negativkontrolle war durch das Zufügen von Cetuximab beziehungsweise TGF α zu BPDE eine signifikante DNA-Fragmentierung zu verzeichnen. Im Vergleich zur DNA-Schädigung, die alleine durch BPDE hervorgerufen wurde, konnte durch Zugabe von Cetuximab beziehungsweise TGF α der DNA-Schaden signifikant reduziert werden. Wurde die Schädigung durch BPDE einmal unter dem Einfluss von Cetuximab und einmal unter der Wirkung von TGF α betrachtet, zeigte sich ein signifikant geringerer DNA-Schaden nach der Inkubation mit TGF α . (siehe Tabelle 17 und 18)

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in den Tabellen 17 und 18 sowie in der Abbildung 10 dargestellt.

<i>Agens</i>	<i>p-Werte</i>
neg. Kontrolle vs BPDE	$\leq 0,001$
neg. Kontrolle vs Cetuximab + BPDE	$\leq 0,001$
neg. Kontrolle vs TGF α + BPDE	$\leq 0,001$
BPDE vs Cetuximab + BPDE	$\leq 0,001$
BPDE vs TGF α + BPDE	$\leq 0,001$
Cetuximab + BPDE vs TGF α + BPDE	0,004

Tabelle 18. DNA-Schädigung in der Karzinomgruppe (n=20): p-Werte im T-Test für verbundene Stichproben (Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur $p \leq 0,007$)

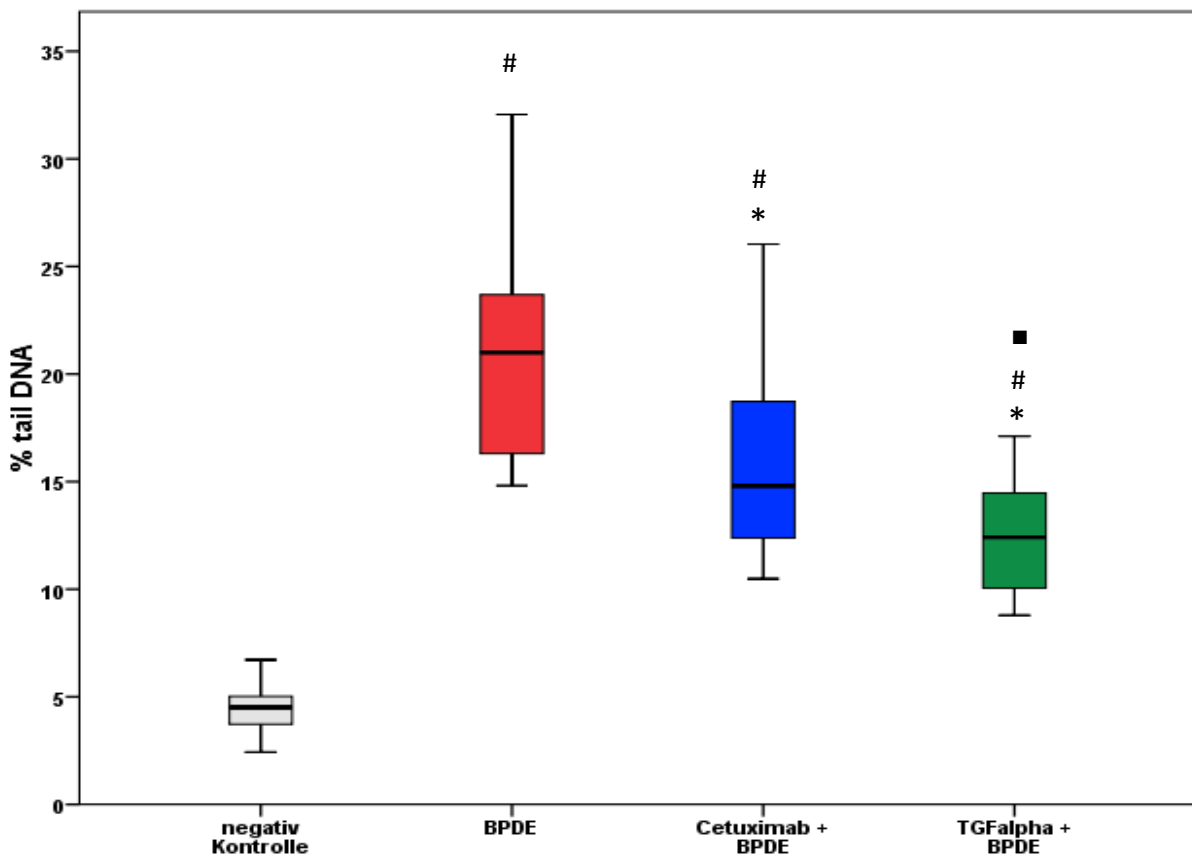


Abbildung 10 Darstellung der DNA-Schädigung in der Karzinomgruppe (n=20): Vergleich der % tail DNA-Werte: Eine Markierung mit einem Stern (*) beschreibt einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Schädigung mit BPDE. Eine Markierung mit einer Raute (#) beschreibt einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle. Eine Markierung mit einem Quadrat (■) beschreibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Schädigung mit BPDE unter dem Einfluss von TGF α verglichen mit der Wirkung von Cetuximab auf die Schädigung mit BPDE.

3.4.2.2 DNA-Reparatur und DNA-Reparaturkapazität

<i>Agens</i>	<i>DNA-Reparatur Mittelwerte [% tail DNA]</i>
BPDE	21,50
Cetuximab + BPDE	16,15
TGF α + BPDE	13,39
Reparatur BPDE	12,66
Reparatur Cetuximab + BPDE	12,06
Reparatur TGF α + BPDE	10,83

Tabelle 19. DNA-Reparatur in der Karzinomgruppe (n=20): % tail DNA-Mittelwerte nach 24- stündiger Reparatur nach Inkubation mit BPDE und nach Zugabe von Cetuximab und TGF α

<i>Agens</i>	<i>DNA-Reparaturkapazitäten [%]</i>
Reparaturkapazität BPDE	38,5 %
Reparaturkapazität Cetuximab + BPDE	19,4 %
Reparaturkapazität TGF α + BPDE	16,0 %

Tabelle 20. DNA-Reparaturkapazität in der Karzinomgruppe (n=20): %-Mittelwerte nach 24- stündiger Reparatur nach Inkubation mit BPDE und nach Zugabe von Cetuximab und TGF α

Wie auch in der tumorfreien Kontrollgruppe wurden die tumorfreien Schleimhautzellen der Karzinompatienten einem 24-stündigen Reparaturintervall zugeführt. Das Reparaturverhalten wurde nach der Inkubation mit BPDE alleine und nach der zusätzlichen Gabe von Cetuximab bzw. TGF α eruiert. Äquivalent zur tumorfreien Kontrollgruppe erfolgte auch in der Karzinomgruppe die Erhebung der Reparaturkapazitäten.

Nach dem 24-stündigen Reparaturintervall war die DNA-Schädigung nach Inkubation mit BPDE alleine im Vergleich zum Ausgangswert der BPDE-Schädigung signifikant gesenkt.

Auch wurden die Werte der Zellen nach der 24 stündigen Reparaturphase betrachtet, die unter dem Einfluss von Cetuximab oder TGF α standen und mit BPDE inkubiert wurden, verglichen mit der Ausgangsschädigung durch BPDE. Es zeigte sich eine signifikant geringere DNA-Fragmentierung nach der Reparaturphase sowohl unter dem Einfluss von Cetuximab als auch unter dem von TGF α verglichen mit der Ausgangsschädigung.

Zudem wurde ein Vergleich der Werte der Zellen, die vor der Reparaturphase mit BPDE und Cetuximab beziehungsweise TGF α inkubiert worden waren, mit den Werten der Zellen nach dem Reparaturintervall verglichen. Hierbei konnte keine signifikante Senkung der DNA-Fragmentierung festgestellt werden.

Verglichen wurde auch die DNA-Schädigung unter dem Einfluss von Cetuximab mit der Schädigung nach der Inkubation mit TGF α nach dem Reparaturintervall. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied.

Der Mittelwert der DNA-Reparaturkapazitäten unter dem Einfluss von BPDE betrug 38,5 %. Die Reparaturkapazitäten nach der zusätzlichen Inkubation mit Cetuximab bzw. TGF α ergaben Mittelwerte von 19,4 % bzw. 16,0 %. Der Vergleich der Reparaturkapazität nach der Schädigung mit BPDE mit der Kapazität sowohl nach der zusätzlichen Inkubation mit Cetuximab als auch mit TGF α ergab eine signifikant reduzierte Reparaturkapazität nach der Gabe der EGFR-aktivitätsmodulierenden Substanzen. Wurde die Reparaturkapazität unter dem Einfluss von Cetuximab mit der Reparaturkapazität unter der Wirkung von TGF α verglichen, ergab sich kein signifikantes Ergebnis.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind den Tabellen 19, 20, 21, 22 sowie in der Abbildung 11 dargestellt.

<i>Agens</i>	<i>p-Werte</i>
BPDE vs Rep BPDE	$\leq 0,001$
BPDE vs Rep Cetuximab + BPDE	$\leq 0,001$
BPDE vs Rep TGF α + BPDE	$\leq 0,001$
Cetuximab + BPDE vs Rep Cetuximab + BPDE	0,009
TGF α + BPDE vs Rep TGF α + BPDE	0,019
Rep Cetuximab + BPDE vs Rep TGF α + BPDE	0,093

Tabelle 21. DNA-Reparatur in der Karzinomgruppe (n=20): p-Werte im T-Test für verbundene Stichproben (Signifikanzniveau nach Bonferroni-Korrektur $p \leq 0,007$)

<i>Agens</i>	<i>p-Werte</i>
RepKap BPDE vs RepKap Cetuximab + BPDE	0,011
RepKap BPDE vs RepKap TGF α + BPDE	0,021
RepKap Cetuximab + BPDE vs RepKap TGF α + BPDE	0,749

Tabelle 22. DNA-Reparaturkapazität in der Karzinomgruppe (n=20): p-Werte im T-Test für verbundene Stichproben (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$)

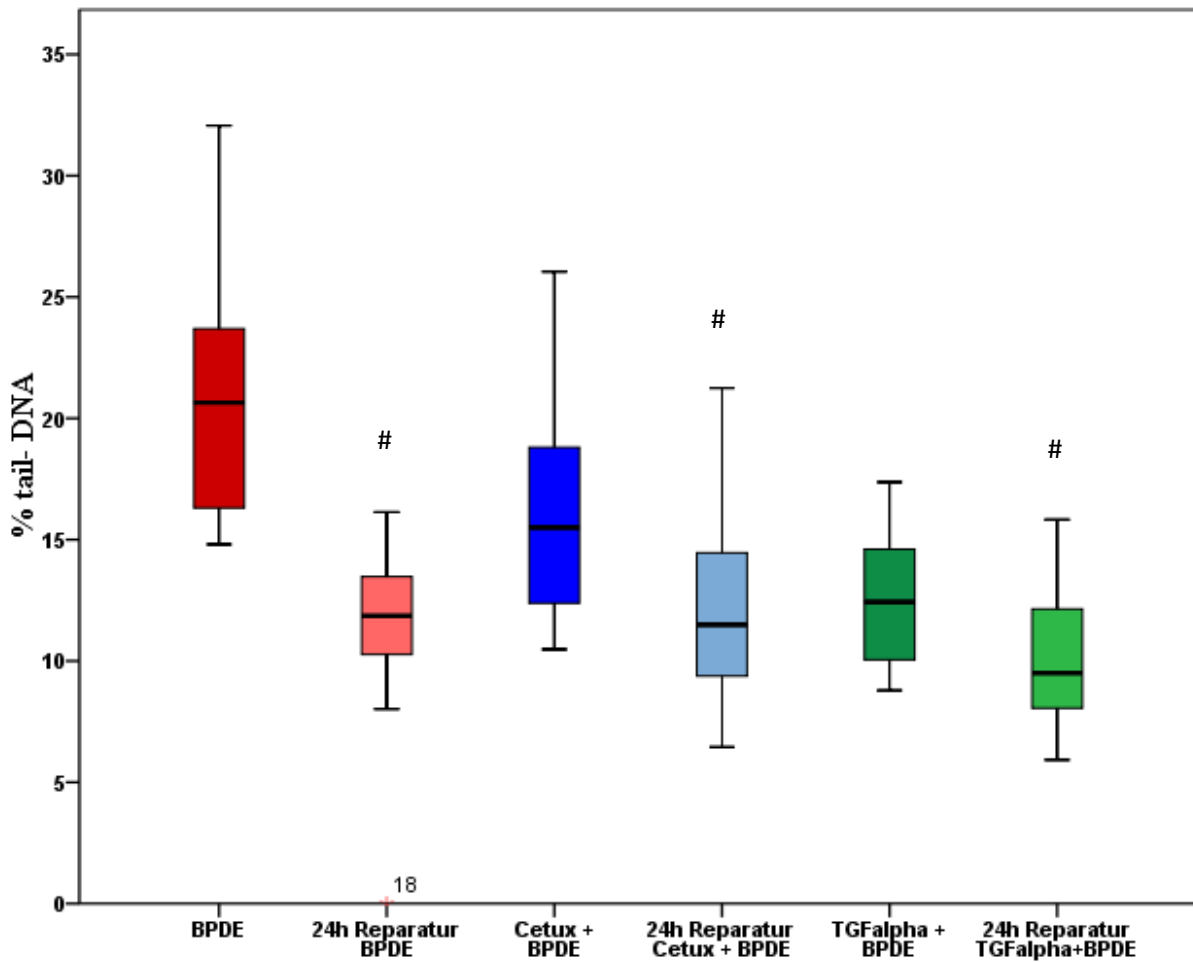


Abbildung 11. Darstellung der DNA-Reparatur in der Karzinomgruppe (n=20): Vergleich der % tail DNA-Werte: Eine Markierung mit einer Raute (#) beschreibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Reparatur und der Schädigung mit BPDE

3.4.3 Vergleich zwischen tumorfreier Kontrollgruppe und Karzinomgruppe

3.4.3.1 DNA-Schädigung

<i>Agens</i>	<i>Kontrollgruppe Mittelwerte [% tail DNA]</i>	<i>Karzinomgruppe Mittelwerte [% tail DNA]</i>
BPDE	20,92	21,50
BPDE + Cetuximab	16,74	16,15
BPDE + TGF α	16,40	13,39

Tabelle 23. Vergleich tumorfreie Kontrollgruppe (n=20) vs Karzinomgruppe (n=20): % tail DNA- Mittelwerte der DNA-Schädigung nach Inkubation mit BPDE und nach Inkubation mit Cetuximab und TGF α

Der Vergleich der reinen Schädigung mit BPDE in der Kontrollgruppe und in der Karzinomgruppe ergab keinen signifikanten Unterschied. Im Vergleich der tumorfreien Kontrollgruppe mit der Karzinomgruppe ergab sich kein signifikanter Unterschied im Falle der zusätzlichen Inkubation mit Cetuximab. Bei der Inkubation mit TGF α hingegen konnte in der Karzinomgruppe eine signifikant geringere DNA-Fraktionierung festgestellt werden als in der tumorfreien Kontrollgruppe.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in den Tabellen 23 und 24 sowie in der Abbildung 12 dargestellt.

<i>Agens- Vergleich Kontrollgruppe vs Karzinomgruppe</i>	<i>p-Werte</i>
BPDE (Kontrollgruppe) vs BPDE (Karzinomgruppe)	0,697
Cetuximab + BPDE (Kontrollgruppe) vs Cetuximab + BPDE (Karzinomgruppe)	0,655
TGF α + BPDE (Kontrollgruppe) vs TGF α + BPDE (Karzinomgruppe)	0,006

Tabelle 24. Vergleich tumorfreie Kontrollgruppe (n=20) vs Karzinomgruppe (n=20): p-Werte im T-Test für unverbundene Stichproben (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$)

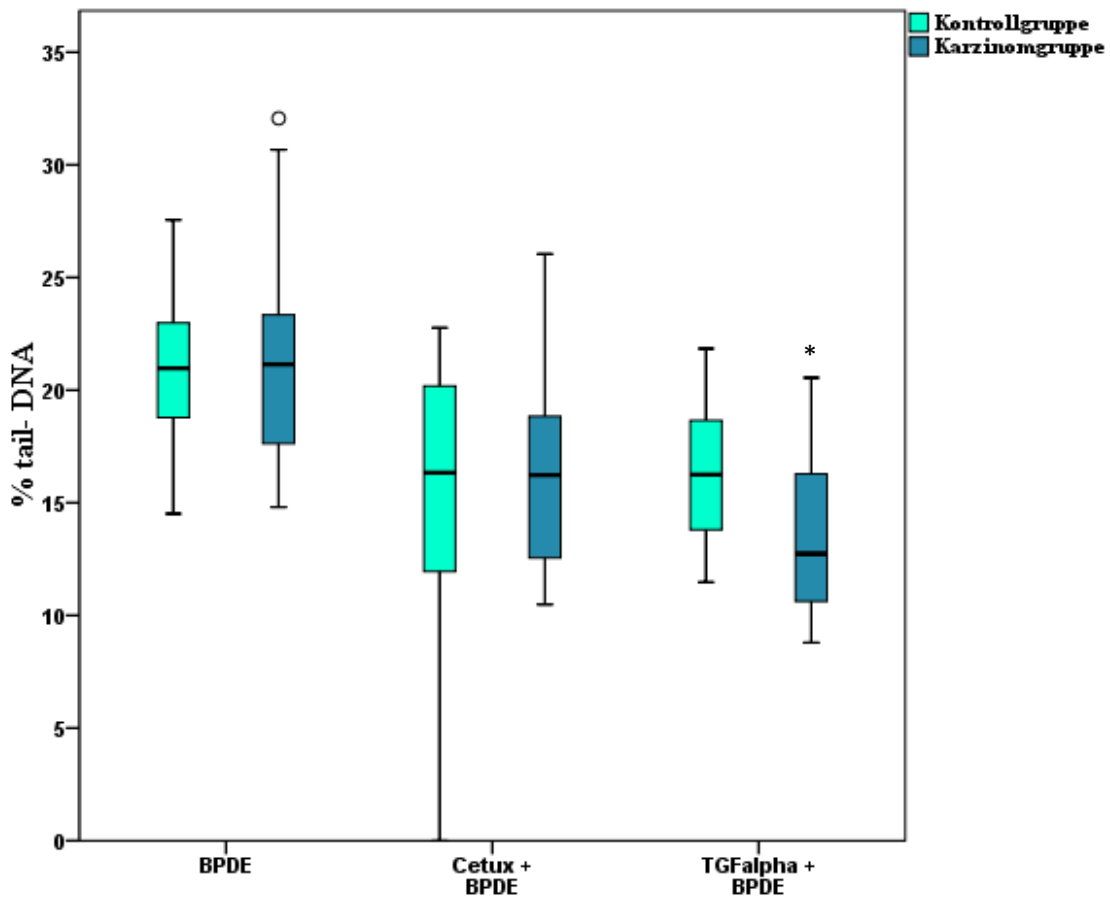


Abbildung 12. Vergleich tumorfreie Kontrollgruppe (n=20) vs Karzinomgruppe (n=20) bezüglich der DNA-Schädigung: Vergleich der % tail DNA Werte: Eine Markierung mit einem Stern (*) beschreibt einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Karzinomgruppe.

3.4.3.2 DNA-Reparaturkapazität

<i>Agens</i>	<i>Kontrollgruppe</i> <i>Mittelwerte Reparaturkapazität</i> <i>[%]</i>	<i>Karzinomgruppe</i> <i>Mittelwerte Reparaturkapazität</i> <i>[%]</i>
RepKap BPDE	29,7	38,5
RepKap Cetuximab + BPDE	18,6	19,4
RepKap TGF α + BPDE	22,2	16,0

Tabelle 25. Vergleich Reparaturkapazität [%] tumorfreie Kontrollgruppe (n=20) vs Karzinomgruppe (n=20): nach Inkubation mit BPDE und nach Zugabe von Cetuximab oder TGF α

Im Vergleich der tumorfreien Kontrollgruppe mit der Karzinomgruppe bezüglich der DNA-Reparaturkapazität der Zellen konnte weder nach der Inkubation mit BPDE alleine noch nach der zusätzlichen Inkubation mit Cetuximab oder mit TGF α ein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in den Tabellen 25 und 26 sowie in der Abbildung 13 dargestellt.

<i>Vergleich Reparaturkapazität Kontrollgruppe</i> <i>vs Karzinomgruppe</i>	<i>p-Werte</i>
RepKap BPDE (Kontrollgruppe) vs RepKap BPDE (Karzinomgruppe)	0,115
RepKap Cetuximab + BPDE (Kontrollgruppe) vs RepKap Cetuximab + BPDE (Karzinomgruppe)	0,940
RepKap TGF α + BPDE (Kontrollgruppe) vs RepKap TGF α + BPDE (Karzinomgruppe)	0,434

Tabelle 26. Vergleich DNA-Reparaturkapazität tumorfreie Kontrollgruppe (n=20) vs Karzinomgruppe (n=20): p-Werte im T-Test für unverbundene Stichproben (Signifikanzniveau $p \leq 0,05$)

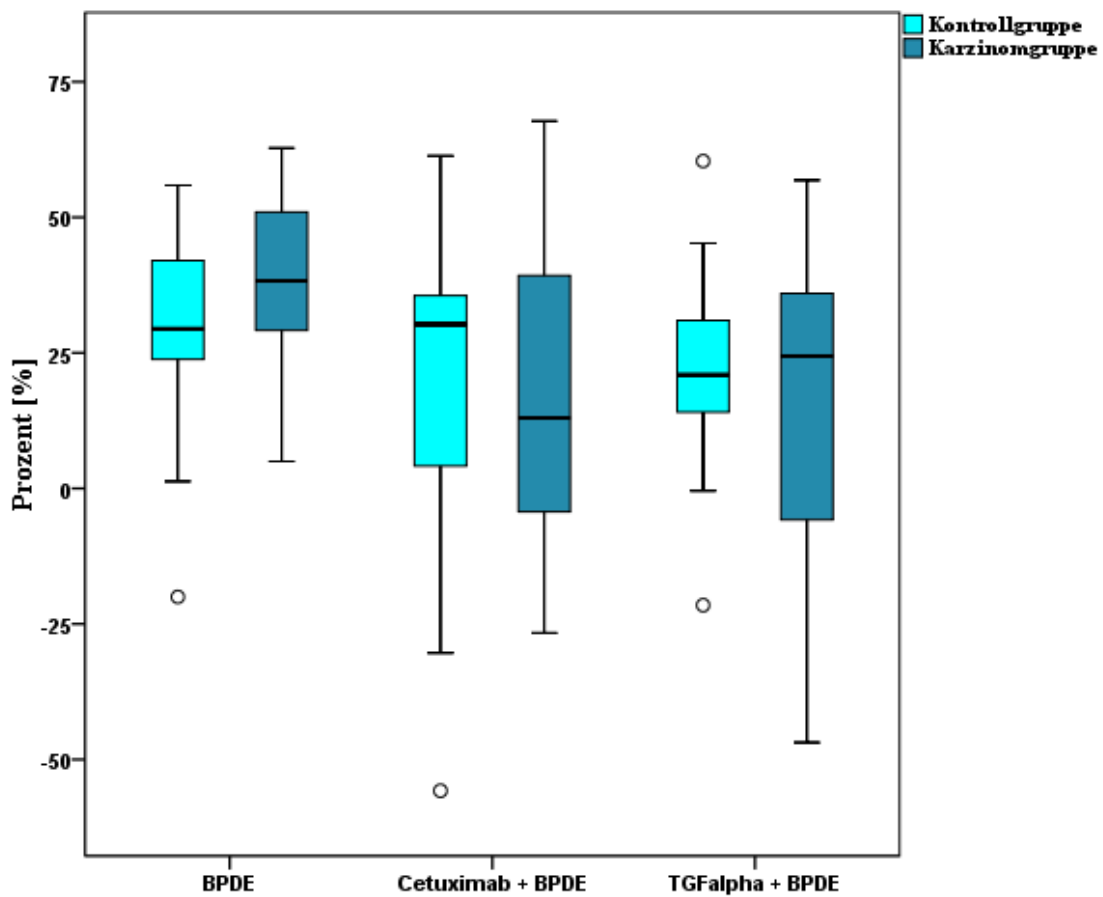


Abbildung 13. Tumorfremie Kontrollgruppe (n=20) vs Karzinomgruppe (n=20) bezüglich der DNA-Reparaturkapazität: Vergleich der %-Werte

3.5 Ergebnisse der immunhistochemischen Darstellung des EGFR

Zur Darstellung der Expression des EGFR wurde ein indirektes immunhistochemisches Färbeverfahren an Kryoschnitten durchgeführt. Es kommt letztendlich zu einem bräunlichen Niederschlag, der die Antigen-Antikörperbindungsstellen indirekt sichtbar macht. Nach der Gegenfärbung mit Hämalaun kann die Expression unter einem Lichtmikroskop beurteilt werden. Je höher die Expression des EGFR im Gewebe ist, desto intensiver ist die bräunliche Färbung. Die Abbildung 14a) zeigt ein moderates Expressionsmuster, während der Kryoschnitt auf Abbildung 14b) eine hohe Expression aufweist.

Die Proben, bei denen keine Expression oder eine schwache Expression (Grad 0/+) nachweisbar war, wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und als niedrig- bis normal exprimiert bezeichnet. Auch wurden die Gewebeprobe mit einer moderaten und starken Expression (Grad ++/+++) zusammengefasst und als hoch exprimiert bezeichnet.

Jede Schleimhautprobe wurde hinsichtlich ihres EGFR-Expressionsmusters nach der Kultivierungszeit der Miniorgankulturen (Gruppe 1) sowie nach der Inkubation mit Cetuximab (Gruppe 2) und mit TGF α (Gruppe 3) betrachtet. Dies sollte dazu dienen einen möglichen Einfluss auf das Expressionsmuster des EGF-Rezeptors durch seine Blockade und Stimulation darzustellen. Die drei Aktivierungszustände des EGFR wurden anhand von Gewebeprobe der tumorfreien Patienten und der Karzinompatienten untersucht:

Tumorfreie Kontrollgruppe:

Gruppe 1: nach Kultivierung [n=20]

Gruppe 2: nach Inkubation mit Cetuximab [n=19]

Gruppe 3: nach Inkubation mit TGF α [n=20]

Karzinomgruppe:

Gruppe 1: nach Kultivierung [n=20]

Gruppe 2: nach Inkubation mit Cetuximab [n=20]

Gruppe 3: nach Inkubation mit TGF α [n=20]

Die Stärke der Expression des EGFR wurde semiquantitativ in vier Expressionsgrade eingeteilt [Taoudi et al., 2010]:

- Grad 0: keine Färbung → 0 - 10 % der Zellen gefärbt
- Grad 1 +: schwache Färbung → 10 - 25 % der Zellen gefärbt
- Grad 2 ++: moderate Färbung → 25 - 75 % der Zellen gefärbt
- Grad 3 +++: starke Färbung → > 75 % der Zellen gefärbt

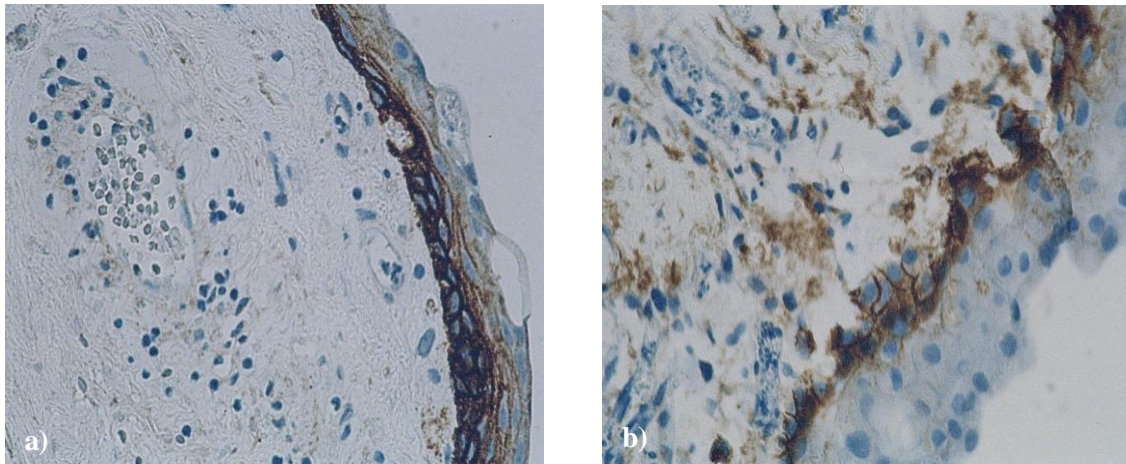


Abbildung 14. Immunhistochemische Darstellung des EGFR: a) moderate Expression Grad 2 ++, b) starke Expression Grad+++ [Verwendung der Abbildung 14 a) und b) mit freundlicher Genehmigung des klinisch-experimentellen HNO-Onkologie Labors des Universitätsklinikums, Campus Innenstadt, München]

3.5.1 Tumorfremie Kontrollgruppe

In der tumorfremie Kontrollgruppe konnte in allen drei Gruppen (Gruppe 1 nach Kultivierung ohne Behandlung mit Cetuximab oder TGF α [n=20], Gruppe 2 nach Inkubation nur mit Cetuximab [n=19] und Gruppe 3 nach Inkubation nur mit TGF α [n=20]) eine Expression des EGFR nachgewiesen werden. In den Gruppen 1 und 2 wiesen jeweils 18 Proben eine schwache EGFR-Expression auf. In der Gruppe 3 waren 19 Proben schwach exprimiert. Eine starke Expression konnte in Gruppe 1 bei zwei Patienten und in Gruppe 2 und 3 bei jeweils einem Patienten gefunden werden. Hier scheinen die aktivitätsmodulierenden Substanzen keinen Einfluss auf die Expression des EGFR zu haben.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in der Tabelle 27 und in der Abbildung 15 dargestellt.

Anzahl [n]		0	+	++ und +++
n=20	Gruppe 1	0	18	2
[%]	nach Kultivierung	0 %	90,0 %	10 %
n=19	Gruppe 2	0	18	1
[%]	Inkubation mit Cetuximab	0 %	94,7 %	5,3 %
n=20	Gruppe 3	0	19	1
[%]	Inkubation mit TGF α	0 %	95 %	5,0 %

Tabelle 27. Tumorfremie Kontrollgruppe (Gruppe 1 [n=20]; Gruppe 2 [n=19]; Gruppe 3 [n=20]): Immunhistochemischer Nachweis der EGFR-Expression

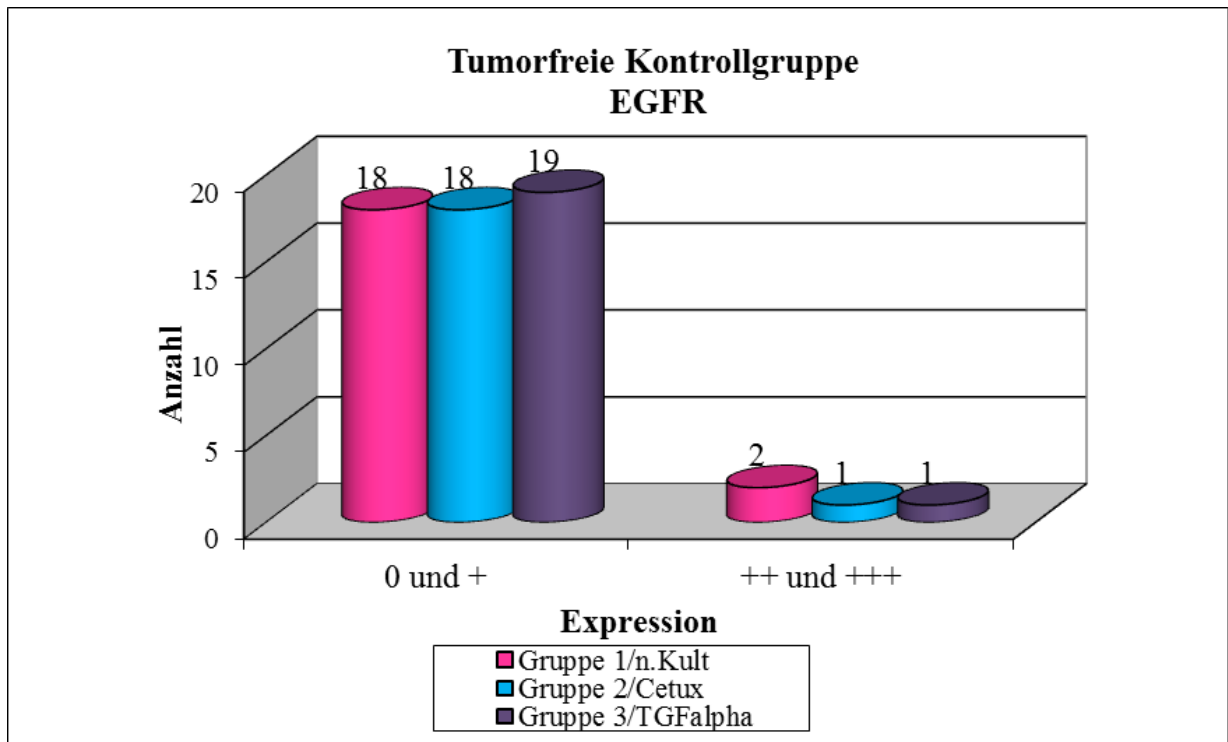


Abbildung 15. Tumorfreie Kontrollgruppe: Immunhistochemischer Nachweis der EGFR-Expression

3.5.2 Karzinomgruppe

Auch in der Karzinomgruppe konnte in allen drei Gruppen (Gruppe 1 nach Kultivierung ohne Behandlung mit Cetuximab oder TGF α [n=20], Gruppe 2 nach Inkubation nur mit Cetuximab [n=20] und Gruppe 3 nach Inkubation nur mit TGF α [n=20]) eine Expression des EGFR nachgewiesen werden. Eine schwache Expression konnte in Gruppe 1 bei elf, in Gruppe 2 bei zwölf und in Gruppe 3 bei neun Patienten gezeigt werden. Moderat und stark waren neun Schleimhautproben in Gruppe 1, acht Proben in Gruppe 2 und elf Proben in Gruppe 3 exprimiert. Hier scheint es keinen Einfluss des Aktivitätszustandes des EGFR auf die Expression zu geben.

Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in der Tabelle 28 und in der Abbildung 16 dargestellt.

Anzahl [n]		0	+	++ und +++
n=20 [%]	Gruppe 1 nach Kultivierung	0 0 %	11 55,0 %	9 45,0 %
n=20 [%]	Gruppe 2 Inkubation mit Cetuximab	0 0 %	12 60,0 %	8 40,0 %
n=20 [%]	Gruppe 3 Inkubation mit TGF α	0 0 %	9 45,0 %	11 55,0 %

Tabelle 28. Karzinomgruppe: Immunhistochemischer Nachweis der EGFR-Expression

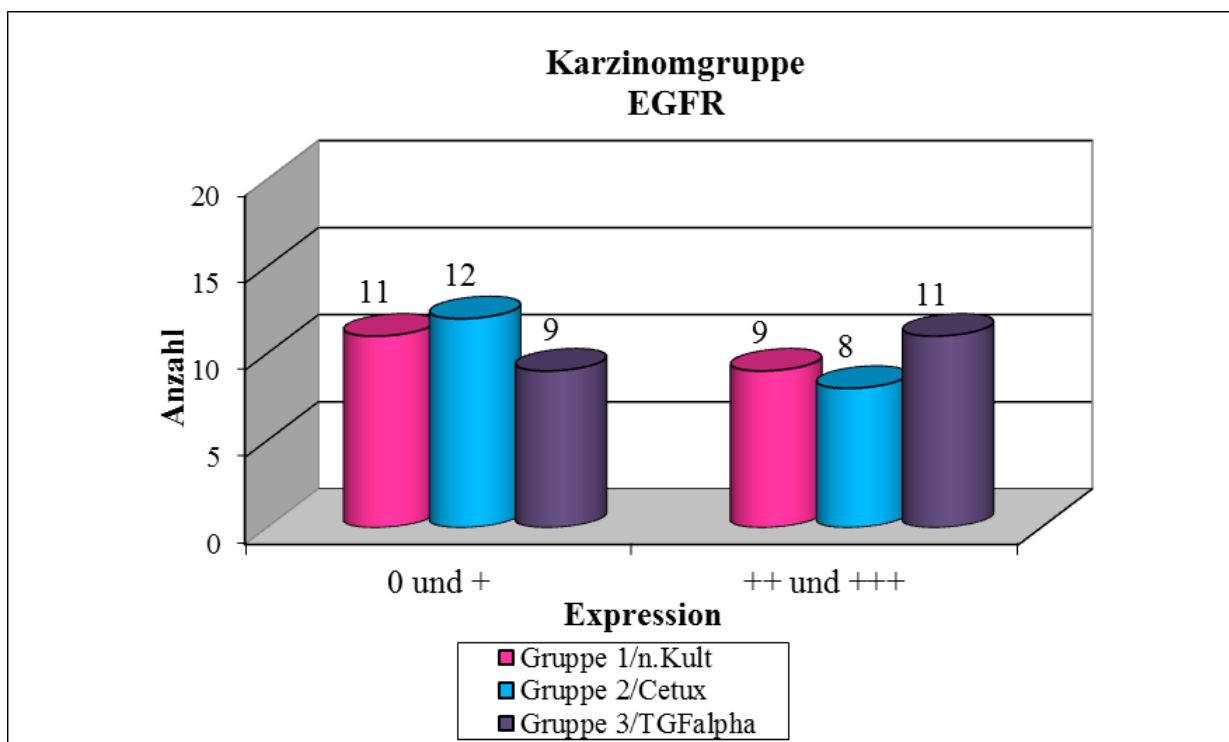


Abbildung 16. Karzinomgruppe: Immunhistochemischer Nachweis der EGFR-Expression

3.5.3 Vergleich der EGFR-Expression zwischen tumorfreier Kontrollgruppe und Karzinomgruppe

Zum Vergleich der beiden Patientenkollektive wurden die Patienten mit keiner und mit einer schwachen Expression (Grad 0/+) zu einer Gruppe zusammengefasst. Diese Gruppe gilt als niedrig- bis normal exprimiert. In der zweiten Gruppe wurden die Patienten mit einer moderaten und starken Expression (Grad ++/+++) zusammengefasst und als hoch exprimiert bezeichnet. Es wurden die drei Gruppen (Gruppe 1 nach Kultivierung ohne Behandlung mit

Cetuximab oder TGF α , Gruppe 2 nach Inkubation nur mit Cetuximab und Gruppe 3 nach Inkubation nur mit TGF α) zwischen der Kontrollgruppe und der Karzinomgruppe verglichen. Die hier beschriebenen Ergebnisse sind in der Abbildung 17 dargestellt.

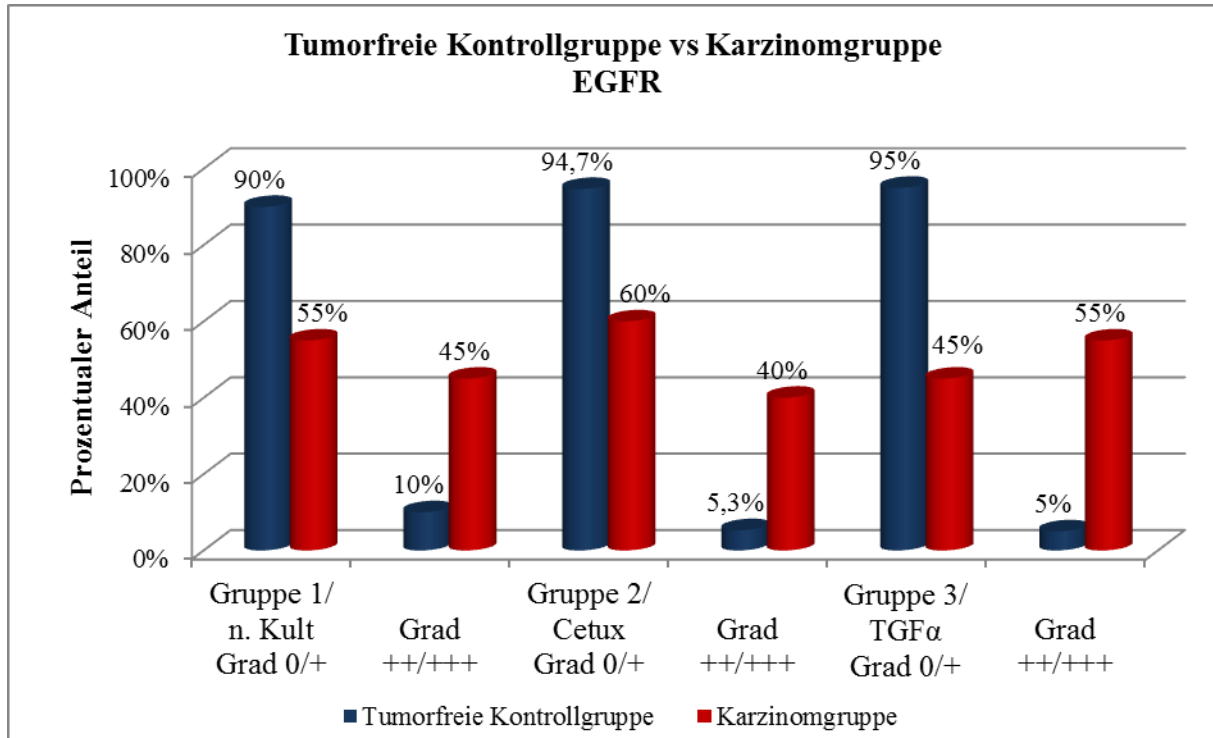


Abbildung 17. Vergleich tumorfreie Kontrollgruppe vs Karzinomgruppe: Immunhistochemische Darstellung der EGFR-Expression

In der Gruppe 1 war der EGFR der tumorfreien Patienten bei 90 % schwach exprimiert und lediglich bei 10 % moderat bis stark exprimiert. In der Karzinomgruppe lag eine schwache Expression in 55 % der Fälle und eine starke Expression in 45 % der Fälle vor.

Nach der Inkubation mit Cetuximab (Gruppe 2) zeigte sich bei 94,7 % der tumorfreien Patienten ein schwach exprimierter EGFR- und nur in 5,3 % ein stark exprimierter EGFR-Status. In der Karzinomgruppe lag in 60 % eine schwache und in 40 % eine starke Expression vor.

Nach der EGFR-Stimulation mit TGF α konnte eine schwache Expression in der tumorfreien Gruppe bei 95 % der Proben und bei 5 % eine starke Expression gezeigt werden; in der Karzinomgruppe war die Expression in 45 % der Fälle schwach und in 55 % stark.

Auch im Vergleich der beiden Studiengruppen miteinander kann kein großer Einfluss der Modulation der Aktivität auf das Expressionsverhalten des EGFR festgestellt werden.

Jedoch zeigte sich unabhängig von der Aktivitätsmodulation des EGFR, dass in der Karzinomgruppe deutlich häufiger eine starke Expression vorlag als in der Kontrollgruppe. In der

Karzinomgruppe ließ sich eine starke Expression in 45 bis 55 % nachweisen und der Kontrollgruppe in nur 5 bis 10 %.

4 Diskussion

4.1 Auswahl der Patienten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Schleimhautproben wurden von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München gespendet. Es wurden ausschließlich solche Patienten für die Studie ausgewählt, die außer an der Grunderkrankung, die zur Operationsindikation führte, an keiner weiteren chronischen oder systemischen Erkrankung litten. Durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München wurden die Untersuchungen an den Schleimhautproben geprüft und als solche genehmigt (Antragsnummer: 221/04).

4.2 Gewinnung oropharyngealer Schleimhaut

Die Gewinnung der oropharyngealen Schleimhautproben tumorfreier Patienten erfolgte im Rahmen der Tonsillektomie. Hierbei wurde die Schleimhaut, die dem Operationsgebiet randständig anlag, entfernt und für diese Studie verwendet. Die Indikation zur Operation wurde aufgrund von chronisch rezidivierenden Entzündungen oder Hyperplasien der Tonsillen mit obstruktivem Schlafapnoesyndrom gestellt. Die Entfernung der Gaumenmandeln wurde zwar nach Möglichkeit in einem entzündungsfreien Intervall durchgeführt, jedoch ließen sich entzündliche Veränderungen der entnommenen Schleimhaut nicht gänzlich ausschließen.

Bei Oropharynxkarzinomen ist das Spektrum der Erkrankungsstadien in einem Zentrum wie der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München sehr weit gefächert. In diese Arbeit wurden nur Krankheitsfälle eingeschlossen, die erstdiagnostiziert wurden und zuvor keine onkologische Therapie wie eine Radio- oder Chemotherapie erhalten hatten. Auch hier wurde die Schleimhaut am Resektionsrand entnommen, um ein möglichst tumorfreies Gewebestück zu erhalten, was zusätzlich histopathologisch gesichert wurde.

4.3 Schädigung der DNA durch Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid

Das Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid ist der Hauptvertreter der polyzyklischen aromatischen Wasserstoffe und wurde von der International Agency for Research on Cancer der Gruppe 1-Karzinogene zugeteilt. In dieser Gruppe befinden sich die Karzinogene, die für den Menschen sicher karzinogen sind [IARC Monograph Vol.92, 2007].

Die polyzyklischen aromatischen Wasserstoffe kommen in der Umwelt ubiquitär vor und entstehen bei Verbrennungsprozessen. Sie befinden sich im Zigarettenrauch, in geräucherten und verkohlten Lebensmitteln sowie in Abgasen, die bei der unvollständigen Verbrennung von fossilen Brennstoffen entstehen [Baird et al., 2005; Boström et al., 2002]. Die Aufnahme in den menschlichen Körper erfolgt hauptsächlich über die Nahrung und die Luft. Dabei stellt auf beiden Wegen die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes die erste Kontaktstelle dar und ist somit der karzinogenen Wirkung ausgesetzt [DeMarini, 2004].

Benzo[a]pyren wird durch die Enzyme des Cytochrom-P450-Systems in zwei Epoxidierungsschritten zu dem +(anti)-Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) metabolisiert, das in dieser Form seine hochgradig zytotoxische, mutagene und karzinogene Wirkung hat [Smith et al., 2000]. Es bindet kovalent an verschiedene Basen der DNA, was zu Einzelstrangbrüchen oder Punktmutationen führt. Diese DNA-Schäden können dann eine Aktivierung der Onkogene oder eine Inaktivierung der Tumorsuppressorgene bewirken, was wiederum die Entstehung eines Malignoms begünstigt [Liang et al., 2003].

Die Auswirkungen auf die Gesundheit der polyzyklischen aromatischen Wasserstoffe sind aufgrund ihrer potentiell karzinogenen und mutagenen Eigenschaften gut untersucht. In mehreren toxikologischen Studien mit Tieren und in Studien mit Menschen mit einer beruflich inhalativen Exposition konnte ein deutlich gesteigertes Risiko, Lungenkrebs zu entwickeln, nachgewiesen werden [WHO-IPCS, 1998; Armstrong et al., 2004]. Bei Mäusen begünstigte die Aufnahme von Benzo[a]pyren mit der Nahrung die Krebsentstehung ebenfalls [Culp et al., 1998].

An humanen Fibroblasten-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass BPDE DNA-Addukte und Einzelstrangbrüche hervorruft. Das Ausmaß der DNA-Fragmentierung wurde mit Hilfe des Comet Assays bestimmt. Es konnte festgestellt werden, dass die Migrationsstrecke der DNA-Fragmente mit der Konzentration des BPDE korrelierte [Hanelt et al., 1997]. BPDE kann zum einen durch eine direkte Interaktion mit der DNA die Strangbrüche bewirken. Zum anderen

können, hervorgerufen durch Reparaturenzyme, Fragmentierungen entstehen [Vande Loock et al., 2010].

4.4 Auswahl des EGFR-Proteins und Modulation des Aktivitätszustandes

Bei über 90 % der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich liegt eine Überexpression des EGFR vor. Auch in lediglich dysplastischem und umliegenden makroskopisch gesundem Gewebe von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen findet sich ein erhöhter EGFR-Expressionsstatus [Grandis et al., 1993; Reiter et al., 2010]. Dies lässt vermuten, dass die Aktivierung des EGFR-Gens früh in der Signaltransduktion der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt. Ein hohes Expressionslevel ist mit einer schlechten Prognose und einer Resistenz gegenüber der Strahlentherapie assoziiert [Grandis et al., 1993; Ang et al., 2002; Ang et al., 2004; Scaltriti und Baselga, 2006; Baumeister et al., 2011]. Durch seine Überexpression und seine wohl zentrale Rolle in der Karzinogenese bietet der EGFR ein gutes Therapieziel.

Ein Therapeutikum ist Cetuximab. Cetuximab ist der einzige monoklonale Antikörper, der für die Behandlung von lokal fortgeschrittenen Plattenepithelkarzinomen und von rezidivierenden oder metastasierten Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich zugelassen ist [Specenier et al., 2012]. Es handelt sich um einen rekombinanten chimären monoklonalen Antikörper, der zu den Immunglobulinen der Klasse G1 gehört und an die extrazelluläre Domäne des EGFR etwa fünf- bis zehnmal stärker bindet als seine Liganden. Dadurch kommt es zu einer Blockade des EGFR, was zu einer Inhibierung der Rezeptorfunktion führt. Außerdem wird die Dichte der Rezeptoren auf der Zellmembran verringert [Marshall, 2006; Specenier et al., 2011]. In einer Phase III Studie, in der eine Therapie mit Cisplatin entweder in Verbindung mit oder ohne Cetuximab verabreicht wurde, konnte gezeigt werden, dass Patienten mit der höchsten EGFR-Expression schlechter auf eine Therapie mit Cetuximab ansprechen, als die mit einem geringeren Level [Burtneß et al., 2005].

Im klinischen Alltag wird Cetuximab therapeutisch aufgrund seiner langen Halbwertszeit einmal wöchentlich als intravenöse Infusion verabreicht [FDA 2004; EMA Europa, 2011].

In dieser Arbeit wurden die Miniorgankulturen mit Cetuximab 72 Stunden vor der Schädigung durch BPDE inkubiert.

TGF α ist ein natürlicher, stimulierender Ligand des EGFR, der sowohl von gesunden als auch von neoplastischen Zellen exprimiert wird. Neben der Überexpression des EGFR lässt sich auch TGF α bereits in präkanzerösem Gewebe, welches dem Prozess der Feldkanzerisierung

unterliegt, vermehrt nachweisen. Somit könnte die Stimulation des EGFR durch TGF α Einfluss auf den Tumorprogress haben [Kalyankrishna et al., 2006]. Bei der Schädigung der tumorfreien Schleimhaut, die das Karzinom umgibt, ist durch polyzyklische aromatische Wasserstoffe (PAHs) die DNA-fragmentierende Wirkung unter Zugabe von TGF α verringert. Am ehesten kann diese reduzierte Empfindlichkeit der Schleimhaut auf den jahrelangen Einfluss von Noxen zurückgeführt werden. In einer tumorfreien Kontrollgruppe konnte keine solche Wirkung festgestellt werden [Baumeister et al., 2009; Baumeister et al., 2010]. Folglich hätte die DNA eine höhere Stabilität und wäre auf den schädigenden Einfluss von BPDE weniger sensibel als die DNA von gesunden Schleimhautzellen.

Die Inkubation der Miniorgankulturen mit TGF α erfolgte in dieser Arbeit im gleichen Zeitintervall wie die Gabe von Cetuximab. Die Dauer bis zur Schädigung mit BPDE betrug folglich ebenfalls 72 Stunden.

4.5 Diskussion der Ergebnisse

4.5.1 Mutagensensitivität

Als Mutagensensitivität wird die individuelle Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Substanzen bezeichnet. Wu et al. zeigten, dass eine erhöhte Mutagensensitivität von Lymphozyten, die mit Bleomycin und mit BPDE geschädigt worden waren, ein geeigneter prädiktiver Marker zur Identifizierung eines erhöhten Risikos für die Entwicklung einer Präkanzerose wie einer Leukoplakie oder Erythroplasie an der Schleimhaut der Mundhöhle oder des Oropharynx ist [Wu et al., 2002]. Es wurde auch ein gehäuftes Auftreten von Zweitmalignomen beispielsweise im Bereich des Ösophagus oder der Lunge im Rahmen einer erhöhten Mutagensensitivität beobachtet [Spitz et al., 1994; Cloos et al., 2000]. In einer neueren Studie, in der sowohl Lymphozyten als auch Schleimhautzellen von tumorfreien Patienten und von Patienten mit einem Oropharynxkarzinom untersucht wurden, konnte kein signifikanter Unterschied in der Mutagensensitivität beider Gruppen gefunden werden [Reiter et al., 2012].

Die oropharyngeale Schleimhaut stellt die erste Kontaktstelle mit den DNA-schädigenden Substanzen dar. Deshalb wurden in dieser Arbeit Schleimhautproben des Oropharynx von tumorfreien Patienten und makroskopisch tumorfreie Schleimhaut, die das Karzinom umgibt, untersucht. Die DNA wurde durch BPDE geschädigt und das Ausmaß der Schädigung mit Hilfe des Comet Assay quantifiziert.

Die DNA-Schädigung, gemessen in „% tail DNA“, war in der tumorfreien Kontrollgruppe und in der Karzinomgruppe annähernd gleich (siehe Tabellen 11 und 17). Somit konnten die

Ergebnisse früherer Studien zur Mutagensensitivität der DNA von Lymphozyten und auch von Miniorgankulturen bestätigt werden [Harréus et al., 1999; Harréus et al., 2004; Kleinsasser et al. 2004; Reiter et al., 2012].

4.5.1.1 Einfluss von Cetuximab auf die Mutagensensitivität

In dieser Studie wurde sowohl in der tumorfreien Kontrollgruppe als auch in der Karzinomgruppe die durch BPDE hervorgerufene DNA-Schädigung durch die Inkubation mit Cetuximab, verglichen mit der Schädigung durch BPDE alleine, signifikant gesenkt. Jedoch war im Vergleich der beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied nachweisbar.

Bereits in einer früheren Studie an Schleimhautzellen des Oropharynx wurde gezeigt, dass es durch die Gabe von Cetuximab zu einer signifikanten Verringerung des % tail DNA einer tumorfreien Kontrollgruppe kam. Eine denkbare Erklärung hierfür wäre, dass in gesunden Schleimhautzellen, die keiner genetischen Veränderung unterliegen, dem Rezeptor nachgeschaltete Mechanismen für die reduzierte Schädigung verantwortlich sind. Folglich könnte Cetuximab eine schützende Wirkung auf gesunde Schleimhaut ausüben. Jedoch war in der Karzinomgruppe der genannten Studie keine Reduktion der Schädigung zu verzeichnen [Baumeister et al., 2011].

In der vorliegenden Arbeit ließ sich jedoch auch in der Karzinomgruppe eine signifikant geringere DNA-Schädigung nach Blockade des EGFR vermerken. Durch die Bindung von Cetuximab an den EGFR ist die intrazelluläre Phosphorylierung inhibiert und es kommt in der Folge zu einem Zellzyklus-Arrest mit verringerter Zellproliferation, Zellteilung und somit einem gehemmten Tumorwachstum. Auch wird die Produktion von VEGF reduziert, was zu einer vaskulären Minderversorgung des Tumors führt. Des Weiteren erhöht Cetuximab nachgewiesenermaßen den zytotoxischen Effekt von Chemotherapeutika und ionisierender Strahlen auf die Tumorzellen [Baselga, 2001; Fan et al., 1993; Mendelsohn, 1997; Milas et al.; 2000]. Durch die erhöhte Chemo- und Radiosensibilität wäre eigentlich zu erwarten, dass die DNA-Schädigung, hervorgerufen durch das zytotoxisch wirkende BPDE, nach der Inkubation mit Cetuximab erhöht wird. In dieser Arbeit wurde tumorfreie Schleimhaut von Patienten mit einem Karzinom verwendet, sprich die Schleimhaut, die schon genetischen Veränderungen, wie dem Prozess der Feldkanzerisierung und somit einer erhöhten EGFR-Aktivität unterliegen könnte. Wie die Daten in der vorliegenden Arbeit zeigen, scheint es auch in diesem Gewebe Mechanismen zu geben, die zu einer Verringerung des DNA-Schadens führen.

Die geringere DNA-Schädigung in der Karzinomgruppe könnte dadurch erklärt werden, dass die erhöhte Aktivität des EGFR in makroskopisch gesunder Schleimhaut eine physiologische

Reaktion ist. So könnte Cetuximab auch einen schützenden Effekt auf die Schleimhaut haben, die den Tumor umgibt, wie auch in der gesunden Kontrollgruppe [Baumeister et al., 2011].

Auch wäre eine Resistenz gegenüber Cetuximab denkbar. In einigen Studien wurden verschiedene Mechanismen beschrieben, die zu einer Resistenzentwicklung gegenüber Cetuximab führen. In bis zu 40 % der Fälle von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich liegt eine Mutation des EGFR vor, nämlich die EGFR variant III (EGFRvIII) [Sok et al., 2006]. Bindet Cetuximab an EGFRvIII wird letztendlich die Zellmigration und -invasion nicht gehemmt [Wheeler et al., 2010]. Ein anderer Mechanismus der Resistenzentwicklung ist die vermehrte Bildung von Liganden, die mit Cetuximab um die Bindung an den Rezeptor konkurrieren. Auch die Heterodimerisierung von anderen Mitgliedern der ErbB Rezeptor-Familie, insbesondere von HER2 und HER3, kann eine Signalübertragung auf den EGFR durch ein Interagieren der Rezeptoren miteinander bewirken [Brand et al., 2011; Wheeler et al., 2008; Yonesaka et al., 2011]. Allerdings würde man im Falle des Vorliegens einer Resistenz gegen Cetuximab nicht von einer Verringerung des DNA-Schadens ausgehen, sondern lediglich von einem gleichbleibenden Schaden.

Zur Evaluierung der Ergebnisse sind weitere Studien notwendig.

4.5.1.2 Einfluss von TGF α auf die Mutagensensitivität

Die Inkubation der Miniorgankulturen mit TGF α bewirkte sowohl in der tumorfreen Kontrollgruppe als auch in der Karzinomgruppe eine signifikante Reduktion des DNA-Schadens, verglichen mit der Schädigung durch BPDE alleine. Im Vergleich der beiden Studiengruppen miteinander ließ sich eine signifikant stärkere Reduktion der DNA-Fragmentierung in der Karzinomgruppe feststellen. Im direkten Vergleich der DNA-Schädigung einerseits unter dem Einfluss von Cetuximab und andererseits unter dem von TGF α , so fällt auf, dass auch hier lediglich in der Karzinomgruppe die DNA-Schädigung durch TGF α signifikant reduziert wird.

In präkanzerösem Gewebe von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich liegt nicht nur eine Überexpression des EGFR vor, sondern es lässt sich auch ein erhöhtes Vorkommen des stimulierenden Liganden TGF α beobachten [Grandis et al., 1993; Kalyankrishna et al., 2006]. Dies könnte zeigen, dass die Überexpression des EGFR und des TGF α in der frühen Phase der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt, oder die Überexpression eine physiologische Reaktion auf den jahrelangen Einfluss von Noxen darstellt.

In früheren Studien konnte bereits beschrieben werden, dass die Stimulation des EGFR durch TGF α den DNA-Schaden, hervorgerufen durch BPDE oder durch Cisplatin, in präkanzerös

verändertem Gewebe signifikant verringern kann. In einer tumorfreien Kontrollgruppe konnte diese Wirkung nicht verzeichnet werden. Diese durch TGF α geförderte Resistenz gegenüber BPDE könnte auf die jahrelange Exposition der Schleimhaut gegenüber Noxen zurückgeführt werden [Baumeister et al., 2009; Baumeister et al., 2010]. Somit hätte die DNA eine höhere Stabilität und wäre dem schädigenden Einfluss von BPDE gegenüber nicht so empfindlich wie die DNA von gesunden Schleimhautzellen.

Eine andere Erklärung für die Verringerung des DNA-Schadens in der Karzinomgruppe könnte sein, dass die Signalkaskade, die nach der Stimulierung des EGFR abläuft, auch die Transkription von Multidrug-Resistance-Effluxpumpen reguliert. BPDE ist ein Substrat der p-Glykoprotein-Effluxpumpe, die wiederum von dem Multidrug-Resistance-1 Gen kodiert wird und BPDE aus der Zelle heraus befördert [Ferguson et al., 2005; Scotto, 2003].

In dieser Studie fiel jedoch auch eine signifikante Verringerung des DNA-Schadens in der tumorfreien Kontrollgruppe auf. TGF α wirkt ebenfalls als natürlicher Ligand des EGFR an gesunden Schleimhautzellen. Da Multidrug-Resistance Proteine auch in gesunden Zellen vorkommen, könnte BPDE zu gewissen Anteilen durch die Effluxpumpen detoxifiziert werden, jedoch wahrscheinlich nicht in dem Maße wie bei Schleimhautzellen, die bereits einer Überexpression des EGFR und des TGF α unterliegen. Auch könnte das Rauchverhalten des gesunden Patientenkollektivs eine Rolle spielen. In dieser Studie haben die erhobenen Anamnesen bezüglich des Nikotinabusus ergeben, dass fünf der untersuchten zwanzig Patienten aktiv geraucht haben. Bei weiteren sieben Patienten konnte das Rauchverhalten nicht eruiert werden. Da jedoch bei schon lange bestehendem Abusus eine Abschwächung der Wirkung von BPDE bestehen könnte, wäre dies auch eine mögliche Erklärung für die signifikante Verringerung des DNA-Schadens in der tumorfreien Kontrollgruppe.

4.5.2 DNA-Reparaturkapazität

Neben der Mutagensensitivität spielt auch die individuelle Fähigkeit, DNA Schäden zu reparieren, die Reparaturkapazität, eine wichtige Rolle für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes [Blot et al., 1988; Hashibe et al., 2007].

Wie bereits beschrieben, bewirkt das karzinogen wirkende BPDE des Zigarettenrauchs die Bildung von DNA-Addukten [Gelboin, 1980; Phillips, 1983]. Wenn der durch BPDE hervorgerufene DNA-Schaden nicht durch die Nukleotidexzisionsreparatur behoben werden kann, kommt es durch die DNA-Addukte zu einer Blockade der Transkription wichtiger Gene [Tang et al., 1992]. Harréus et al. zeigten, dass Schleimhautzellen von Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom eine geringere Reparaturfähigkeit aufwiesen als Patienten einer tumor-

freien Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass genetische Veränderungen in den Enzymen vorliegen, die an der Reparatur beteiligt sind [Harréus et al., 2001]. Die individuellen, genetisch bedingten Unterschiede in der Durchführung der Nukleotidexzisionsreparatur sind maßgeblich an der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes beteiligt [Hung et al., 2005; Parking et al., 2005; Wood et al., 2001].

Die Reparaturkapazität beschreibt den prozentualen Anteil der reparierten DNA nach einer festgelegten Fremdstoffschädigung innerhalb eines definierten Zeitraumes. In der vorliegenden Arbeit wurde die Schädigung der DNA durch die Inkubation mit BPDE hervorgerufen und das Reparaturintervall auf 24 Stunden festgelegt. Die Berechnung der Reparaturkapazität erfolgt prozentual aus den % tail DNA-Werten der Mutagensensitivität, die vor und nach dem 24 stündigen Reparaturintervall erhoben werden.

Die Miniorgankulturen wurden nach der Inkubation mit den aktivitätsmodulierenden Substanzen des EGFR, Cetuximab oder TGF α , der Reparaturphase für 24 Stunden zugeführt. Die absoluten Reparaturwerte wurden dann anhand des % tail DNA gemessen und die relativen Reparaturkapazitäten in Prozent daraus errechnet. Der Vergleich erfolgte sowohl innerhalb einer Gruppe als auch zwischen den Gruppen.

4.5.2.1 Reparaturkapazität nach der Schädigung durch BPDE

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl in der tumorfreien Kontrollgruppe als auch in der Karzinomgruppe der durch die Inkubation mit BPDE alleine hervorgerufene Schaden signifikant repariert wurde. Jedoch wurde kein signifikanter Unterschied im Vergleich der Reparaturkapazitäten zwischen beiden Studiengruppen festgestellt.

In einer früheren Studie konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied der Reparaturkapazität im Vergleich einer Patientengruppe mit Nasopharynxkarzinom und einer Kontrollgruppe gezeigt werden. Dabei wurde die DNA-Reparaturkapazität von Lymphozyten nach der Schädigung mit dem Nitrosamin NDEA nach unterschiedlich langen Reparaturintervallen betrachtet [Kleinsasser et al., 2005]. Folglich scheint laut der genannten Studie und den hier erhobenen Ergebnissen die Karzinomentstehung nicht mit einer reduzierten Reparaturfähigkeit assoziiert zu sein. Jedoch ist die Studienlage sehr kontrovers. Die meisten Studien, die sich mit der Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden beschäftigen, werden anhand von Lymphozyten durchgeführt. Cheng et al. konnten an Lymphozyten von Patienten mit einem Karzinom im Kopf-Hals-Bereich im Vergleich mit einem gesunden Kontrollkollektiv eine signifikant geringere Reparaturkapazität nachweisen. Dies wiederum unterstützt die Bedeutung der hereditär verminderten Reparaturkapazität als Risikofaktor für die Entstehung von Karzinomen

[Cheng et al., 1998; Schantz, et al 1997]. In einer anderen Studie wurde nach der Schädigung mit Nitrosaminen sowohl die Reparaturkapazität von Lymphozyten als auch von Epithelzellen bei Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom nach unterschiedlich langen Reparaturintervallen untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der DNA-Reparaturkapazität der Lymphozyten. Lediglich in den Mukosazellen, die aus Tumor umgebendem Gewebe entnommen wurden, konnte nach einem Intervall von dreißig Minuten eine signifikant niedrigere Reparaturkapazität, verglichen mit der tumorfreien Kontrollgruppe, nachgewiesen werden [Reiter et al., 2012]. Dass in der Studie von Reiter et al. bereits nach einem Reparaturintervall von dreißig Minuten eine reduzierte Reparaturkapazität in der Karzinomgruppe nachweisbar war, jedoch nicht nach einem Reparaturintervall von 24 Stunden, wie in der vorliegenden Arbeit, unterstützt die These, dass nicht alleine eine reduzierte Reparaturfähigkeit für die Karzinogenese verantwortlich ist. Für die interindividuellen Unterschiede in der Reparaturkapazität und damit auch in der Tumorentstehung könnten genetische Polymorphismen der an der Reparatur beteiligten Proteine mitverantwortlich sein. Für einige dieser Proteine, wie dem XPD oder dem XRCC1, wurden solche Polymorphismen beschrieben, wobei auch der Einfluss dieser Veränderungen kontrovers diskutiert wird [Caldecott, 2003; Spitz et al., 2003; Shen et al., 2006].

4.5.2.2 Reparaturkapazität unter dem Einfluss von Cetuximab und TGF α

Die Reparaturkapazität der Zellen, die nur mit BPDE inkubiert worden waren, verglichen mit den Reparaturkapazitäten, die unter dem zusätzlichen Einfluss von Cetuximab oder TGF α standen, ergab in der tumorfreien Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied.

In der Karzinomgruppe ließ sich ein statistisch signifikantes Ergebnis feststellen. Unter dem Einfluss beider aktivitätsmodulierender Substanzen des EGFR war die Reparaturkapazität signifikant geringer als die Reparaturkapazität der Zellen, die nur mit BPDE inkubiert worden waren. Wurden die Reparaturkapazitäten einmal unter dem Einfluss von Cetuximab und einmal unter dem von TGF α direkt miteinander verglichen, konnte weder in der tumorfreien Kontrollgruppe noch in der Karzinomgruppe ein signifikantes Ergebnis erhoben werden.

Die Reparaturkapazitäten unter dem Einfluss von Cetuximab bzw. TGF α im Vergleich zwischen beiden Studiengruppen zeigten kein signifikantes Ergebnis.

Der EGFR hat auch einen Einfluss auf die Reparaturfähigkeit der Zellen. Nach der Aktivierung des EGFR kann entweder die Ras/RAF/MEK/ERK- Signalkaskade oder die PI3K/AKT-Kaskade ablaufen. Durch diese Signalkaskaden kann einerseits beispielsweise die Transkription des Reparaturproteins XRCC1 beeinflusst werden und andererseits die Phosphorylierung

der Reparaturproteine und somit die Aktivität der Reparaturproteine kontrolliert werden. Außerdem können durch die Aktivierung des EGFR direkt Reparaturproteine intrazellulär freigesetzt werden [Meyn et al., 2009]. In der vorliegenden Studie konnte die Reparaturkapazität des gesunden Patientenkollektives durch die aktivitätsmodulierenden Substanzen nicht signifikant beeinflusst werden. Dies lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass in den gesunden Schleimhautzellen eine physiologische Expression und Aktivität des EGFR vorliegt und die DNA-Reparaturmechanismen regulär ablaufen, unabhängig vom Aktivierungszustand des EGFR.

Bei Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes führt eine Blockade des EGFR zu einer erhöhten Radiochemosensibilität der Zellen und die Reparaturmechanismen funktionieren nicht mehr adäquat [Huang et al., 2000; Chinnaiyan et al., 2005; Friedmann et al., 2006; Vermorken et al., 2008]. Zudem ist in diversen Studien eine deutlich eingeschränkte Reparaturkapazität bei Patienten mit einem Karzinom im Kopf-Hals-Bereich im Vergleich zu einer Kontrollgruppe nachgewiesen worden [Cheng et al., 1998; Harréus et al., 2001; Reiter et al., 2012]. In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikant reduzierte Reparaturkapazität in der Karzinomgruppe nach der Inkubation mit Cetuximab im Vergleich zur Reparaturkapazität der Zellen, die nur mit BPDE inkubiert worden waren. Allerdings ließ sich kein signifikantes Ergebnis im Vergleich beider Studiengruppen miteinander erheben. Jedoch wurden hier die Versuche an Gewebe, welches den Tumor umgibt, durchgeführt und nicht direkt an Tumorgewebe. Früheren Erkenntnissen zufolge liegt nicht nur eine Überexpression des EGFR sondern auch ein vermehrtes Vorkommen des stimulierenden Liganden TGF α in Gewebe, welches dem Prozess der Feldkanzerisierung unterliegt, vor. TGF α scheint einen schützenden Effekt vor schädigenden Einflüssen zu haben und an der Entwicklung einer Chemoresistenz in prämaligmem Gewebe beteiligt zu sein [Kalyankrishna et al., 2006; Baumeister et al., 2009; Baumeister et al., 2010]. Unter der Stimulation mit TGF α fällt auf, dass die Karzinomgruppe eine signifikant geringere Reparaturkapazität aufweist, jedoch nicht statistisch signifikant im Vergleich beider Studiengruppen. In einer früheren Studie konnte ebenfalls die Tendenz einer verminderten Reparaturkapazität unter dem stimulierenden Einfluss an tumorumgebendem Gewebe festgestellt werden. Diese Untersuchung wurde an einer sehr geringen Fallzahl durchgeführt und es konnte ebenfalls kein signifikantes Ergebnis im Vergleich beider Studiengruppen festgestellt werden [Baumeister et al., 2009]. TGF α scheint einen negativen Einfluss auf die Reparaturfähigkeit der Zellen zu haben. Geht man davon aus, dass die Stimulierung des EGFR die Reparaturfähigkeit der Zellen negativ beeinflusst, so könnte dies einen Faktor darstellen, der das Fortschreiten des Prozesses der Feldkanzerisierung erklärt. Zur wei-

teren Evaluierung des Einflusses von TGF α auf die Reparaturkapazität sollten Untersuchungen anhand einer größeren Fallzahl durchgeführt werden.

4.5.3 Expression des EGFR in der Schleimhaut der tumorfreien Kontrollgruppe und in präkanzerös veränderter Schleimhaut der Karzinompatienten

Eine erhöhte Expression des EGFR bei Patienten mit einem Karzinom des oberen Aerodigestivtraktes konnte bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden [Grandis et al., 1996; Taoudi et al., 2010]. Hier erfolgte nun die Evaluierung der Expression des EGFR anhand eines indirekten immunhistochemischen Färbeverfahrens an Kryoschnitten. Es wurde nicht nur die Expression nach Abschluss der 21tägigen Kultivierungszeit der Miniorgankulturen betrachtet, sondern auch nach Inkubation mit den aktivitätsmodulierenden Stoffen Cetuximab bzw. TGF α , um einen möglichen Einfluss der Substanzen auf das Expressionsverhalten zu erheben. Die Quantifizierung der Expression des EGFR wurde mit Hilfe eines semiquantitativen Verfahrens, welches bereits in früheren Studien verwendet wurde, ermittelt [Grandis et al., 1996; Perrone et al., 2006; Hiriyashi et al., 2006]. In der vorliegenden Studie wurden die Gefrierschnitte aus den Miniorgankulturen der tumorfreien Kontrollgruppe und der Karzinomgruppe angefertigt. Es konnte kein Einfluss der beiden Substanzen auf das Expressionsverhalten festgestellt werden.

In der tumorfreien Kontrollgruppe und in der Karzinomgruppe war bei 100 % der Proben eine EGFR- Expression nachzuweisen. In der tumorfreien Kontrollgruppe zeigte sich, dass die schwache Expression der starken Expression mit jeweils ≥ 90 % deutlich überlegen ist. Im Gegensatz dazu lässt sich in der Karzinomgruppe ein relativ ausgewogenes Verhältnis zwischen schwacher und starker Expression nachweisen. Jedoch im Vergleich zwischen tumorfreier Kontrollgruppe und Karzinomgruppe liegt die eindeutige Mehrheit der stark exprimierten Zellen seitens der Karzinomgruppe mit Werten zwischen 40-55 % in jeder Untergruppe (nach Kultivierung, nach Blockade mit Cetuximab und nach Stimulation mit TGF α). (Siehe auch Kapitel 4.5.1)

Dies bestätigt die Beobachtungen, dass nicht nur eine Überexpression des EGFR in den Karzinomen selber, sondern auch in der tumorumgebenden Schleimhaut von Patienten mit einem Karzinom des oberen Aerodigestivtraktes vorliegt [Grandis et al., 1993; Grandis, 2007]. Somit können Ergebnisse früherer Studien bestätigt werden, in denen die Überexpression des EGFR entweder als ein frühes Geschehen in der Karzinogenese im Rahmen der Feldkanzerisierung oder als eine physiologische Reaktion des Gewebes auf den dauerhaften Einfluss von karzinogenen Xenobiotika gesehen wurden [Baumeister et al., 2011].

4.5.4 Schlussfolgerung

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF α sowohl in der Karzinomgruppe als auch in der Kontrollgruppe das Ausmaß der DNA-Fragmentierung reduziert. Im Vergleich der beiden Studiengruppen miteinander war jedoch nur in der Karzinomgruppe die DNA-Fragmentierung signifikant geringer, womit das Ergebnis früherer Studien bestätigt werden konnte. So scheint TGF α einen schützenden Effekt vor schädigenden Einflüssen auf die makroskopisch gesunde Schleimhaut von Karzinompatienten zu haben und an der Entwicklung einer Chemoresistenz beteiligt zu sein. Folglich könnte es sich bei der Überexpression des EGFR und des TGF α um eine physiologische Reaktion der tumorumgebenden Schleimhaut auf den jahrelangen Einfluss von Noxen handeln [Baumeister et al., 2009; Baumeister et al., 2010]. Dieses Ergebnis könnte auf die Signalkaskade, die nach der Stimulation des EGF-Rezeptors abläuft, zurückgeführt werden. Der EGF-Rezeptor ist auch an der Transkription von Multidrug-Resistance-Effluxpumpen beteiligt. Das auch im Tabakrauch vorkommende +(anti)-Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) ist ein Substrat der p-Glykoprotein-Effluxpumpe, die wiederum von dem Multidrug-Resistance-1 Gen kodiert wird. Somit kann BPDE aus der Zelle heraus befördert werden und es kommt dadurch zu einer detoxifizierenden Wirkung auf die Zelle [Ferguson et al., 2005; Scotto, 2003].

Die Reparaturkapazität war nur in der Karzinomgruppe nach der Inkubation sowohl mit Cetuximab als auch mit TGF α signifikant geringer. Im Vergleich beider Studiengruppen miteinander ergab sich kein signifikantes Ergebnis. Der EGF-Rezeptor hat nachgewiesenermaßen einen Einfluss auf die Reparaturfähigkeit der Zellen. Zum einen über die Signalkaskade, die nach seiner Stimulation abläuft und zum anderen durch seine Fähigkeit, Reparaturproteine intrazellulär freizusetzen [Meyn et al., 2009]. So können unter dem Einfluss von Cetuximab DNA-Schäden nicht mehr adäquat repariert werden und es kommt in der Folge zu einer erhöhten Radiochemosensibilität [Chinnaiyan et al., 2005; Friedmann et al., 2006]. Jedoch spricht nicht jeder Patient gleich gut auf eine Therapie mit Cetuximab an, was nahelegt, dass die Reparaturfähigkeit der Zellen nicht ausschließlich von der Aktivität des EGFR abhängt. Die Stimulation des EGFR scheint in prämaligmem Gewebe einen negativen Einfluss auf die Reparaturkapazität zu haben. In dieser und einer früheren Studie ließ sich jeweils eine tendenziell reduzierte Reparaturkapazität in tumorumgebender Schleimhaut unter dem Einfluss von TGF α nachweisen [Baumeister et al., 2009]. Sollte die EGF-Rezeptorstimulation eine reduzierte Reparaturkapazität bewirken, könnte dies die Überexpression von TGF α früh in der Karzinogenese erklären und somit auch einen Faktor darstellen, der das Fortschreiten des Pro-

zesses der Feldkanzerisierung begünstigt. Um diesen Einfluss weiter zu untersuchen, sind Studien mit größeren Fallzahlen nötig.

Die immunhistochemische Darstellung des EGFR zeigte, dass in makroskopisch gesunder Schleimhaut von Karzinompatienten eine erhöhte Expression des EGF-Rezeptors nachweisbar ist. Jedoch lässt sich durch die Modulation der Rezeptoraktivität das Expressionsverhalten nicht beeinflussen. Somit stellt die Überexpression möglicherweise ein frühes Geschehen in der molekularen Karzinogenese dar. Eine andere Erklärung hierfür wäre, dass die Überexpression eine physiologische Reaktion auf die jahrelang einwirkenden Noxen ist. Somit könnte die Evaluierung des EGFR- Expressionsstatus eine Option der frühzeitigen Erkennung von präkanzerösem Gewebe sein.

5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes stellen weltweit die sechsthäufigste Tumorentität dar. Die Risikofaktoren für die Entwicklung dieses Karzinoms werden in endogene und exogene Faktoren unterteilt. Zu den exogenen Hauptrisikofaktoren zählen der Nikotinabusus und der Alkoholkonsum. Insbesondere beim Tabakkonsum entstehen polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und der Metabolit +(anti)-Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE), der in der Karzinogenese eine wichtige Rolle spielt.

Zu den endogenen Risikofaktoren zählt man vor allem die genetische Suszeptibilität, zu der die Mutagensensitivität und die DNA-Reparaturkapazität gehören. Liegt eine erhöhte individuelle Empfindlichkeit gegenüber Schadstoffen vor oder ist die individuelle Fähigkeit DNA-Schäden zu reparieren eingeschränkt, kann die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Aktivierung oder Überexpression von Protoonkogenen zu der Entstehung eines Karzinoms führen. Zu den Onkogenen zählt auch der epidermal growth factor receptor (EGFR), eine Rezeptortyrosinkinase, die sich auf der Zelloberfläche befindet. In den Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes kann in über 90 % der Fälle eine Überexpression des EGFR gefunden werden. Seine Aktivierung besitzt physiologischer Weise eine wichtige Bedeutung für die Proliferation, Differenzierung und das Überleben der Zellen. In Tumorgewebe kommt es über aberrante Signalwege zu einer verringerten Apoptoserate, einer gesteigerten Invasivität und einer erhöhten Angiogenese, was das Karzinomwachstum fördert und eine Metastasierung ermöglicht. Neben der Überexpression des EGFR ist auch ein vermehrtes Vorkommen seines stimulierenden Liganden TGF α beobachtet worden, nicht nur in dem karzinomatösen Gewebe selber, sondern auch in tumorumgebendem Gewebe. Aufgrund seiner herausragenden Rolle in der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes, bietet der EGFR ein geeignetes Therapieziel. Eine Therapieoption stellt die extrazelluläre Blockade der Ligandenbindungsstelle durch den monoklonalen Antikörper Cetuximab dar.

In dieser Arbeit wurde an Schleimhautkulturen des oberen Aerodigestivtraktes untersucht, ob die DNA-Reparaturfähigkeit in prämaligmem Gewebe durch eine Stimulation bzw. Blockade des EGF-Rezeptors beeinflusst werden kann. Zudem wurde ein möglicher Einfluss auf das Expressionsverhalten des EGF-Rezeptors durch die Modulation seiner Aktivität anhand einer immunhistochemischen Darstellung betrachtet.

Alle Versuche wurden an Miniorgankulturen durchgeführt. Miniorgankulturen sind Gewebekulturen von 1 mm³ Größe. Diese wurden aus Mukosagewebe hergestellt und kultiviert bis

eine vollständige Reepithelialisierung der Oberfläche erreicht war. Die Gewebeproben wurden aus tumorumgebendem Mukosagewebe von Patienten mit einem Oropharynxkarzinom (n=20) entnommen und mit den Schleimhautkulturen eines gesunden Kontrollkollektivs (n=20) verglichen. Nach der Aktivitätsmodulation des EGFR erfolgte die Inkubation mit dem schädigenden Agens BPDE. Im Anschluss wurden die DNA-Schädigung und die DNA-Reparaturkapazität mit Hilfe der Einzelzell-Gelelektrophorese, auch Comet Assay genannt, quantifiziert.

Im Vergleich der beiden Gruppen lässt sich lediglich nach der Stimulation des EGFR eine signifikant geringere DNA-Fragmentierung in der Karzinomgruppe feststellen. Dies könnte einen Hinweis darauf geben, dass durch die Stimulation des EGFR in prämaligen Schleimhautzellen, die einem jahrelangen Einfluss von karzinogenen Xenobiotika ausgesetzt sind, die schädigende Wirkung des BPDEs abgeschwächt wird und es sich bei der Überexpression des EGF-Rezeptors und des TGF α um eine physiologische Reaktion der Schleimhaut auf chronisch einwirkende Karzinogene handelt [Baumeister et al., 2009].

Im Vergleich der beiden Gruppen hinsichtlich der Reparaturkapazität unter der Stimulation bzw. Blockade des EGF-Rezeptors konnte kein signifikanter Unterschied erhoben werden. Folglich scheint die Aktivitätsmodulation des EGFR in Bezug auf die Reparaturkapazität eine untergeordnete Rolle in tumorumgebender Schleimhaut zu spielen.

Die immunhistochemischen Untersuchungen zur Evaluierung des Expressionsverhaltens wurden unter Stimulation und Blockade des EGF-Rezeptors durchgeführt. Die Inkubation des EGFR mit den aktivitätsmodulierenden Substanzen hatte keinen Einfluss auf die Expression des EGFR.

Die Daten in dieser Studie wurden anhand von Versuchen an tumorumgebender Schleimhaut erhoben. Da der EGF-Rezeptor eine maßgebliche Rolle in der Entwicklung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes spielt und somit seine Aktivitätsmodulation ein geeignetes Ziel für neue Therapieansätze bietet, sollten weitere Studien, die nicht tumorumgebende Schleimhaut, sondern natives Tumorgewebe direkt betrachten, durchgeführt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Ang KK, Andratschke NH, Milas L. Epidermal growth factor receptor and response of head-and-neck carcinoma to therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 58(3):959-65. . 2004.
- Ang KK, Berkey BA, Tu X, Zhang HZ, Katz R, Hammond EH, Fu KK, Milas L. Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. *Cancer Res.* 62(24): 7350-7356 . 2002.
- Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tan PF, Westra WH, Chung CH, Jordan RC, Lu C, Kim H, Axelrod R, Silverman CC, Redmond KP, Gillison ML. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med,* 363: 24-35. 2010.
- Armstrong B, Hutchinson E, Unwin J, Fletcher T. Lung cancer risk after exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review and meta-analysis. *Environ Health Perspect* 112(9): 970-978. 2004.
- Avwioro, Godwin. Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review. *International Journal of Research and Reviews in Applied Sciences.* Bd. 1, S. 24-34. 2011.
- Baird WM, Hooven LA, Mahadevan B. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts and mechanism of action. *Environ Mol Mutagen* 45(2-3): 106-114. 2005.
- Barrandon Y, Green H. Cell migration is essential for sustained growth of keratinocyte colonies: the roles of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor. *Cell* 50(7): 1131-1137. 1987.
- Baselga J, Trigo JM, Bourhis J, Tortochaux J, Cortés-Funes H, Hitt R, Gascón P, Amellal N, Harstrick A, Eckardt A. Phase II multicenter study of the antiepidermal growth factor receptor monoclonal antibody cetuximab in combination with platinum-based chemotherapy. *J Clin Oncol.* 23(24): 5568-5577. 2005.
- Baselga, J. The EGFR as a target for anticancer therapy--focus on cetuximab. *Eur J Cancer* 37(4): 16-22. 2001.
- Baumeister P, Heinrich K, Märte M, Reiter M, Schwenk-Zieger S, Harréus U. The impact of EGFR stimulation and inhibition on BPDE induced DNA fragmentation in oral/oropharyngeal mucosa in vitro. *Oral Oncol.* 47(12):1141-7. 2011.
- Baumeister P, Reiter M, Schwenk-Zieger S, Harréus U. Transforming growth factor alpha stimulation of mucosal tissue cultures from head and neck squamous cell carcinoma patients increases chemoresistance to cisplatin. *Chemotherapy.* 56(4):268-74. . 2010.

- Baumeister P, Schwenk-Zieger S, Reiter M, Welz C, Harréus U. Transforming Growth Factor-alpha reduces carcinogen-induced DNA damage in mini-organ cultures from head-and-neck cancer patients. *Mutat Res.* 677(1-2):42-5. 2009.
- Berrino F, Richiardi L, Boffetta P, et al. Occupation and larynx and hypopharynx cancer: a job-exposure matrix approach in an international case-control study in France, Italy, Spain and Switzerland. *Cancer Causes Control* 14: 213-223. 2003.
- Blick SK, Scott LJ. Cetuximab: a review of its use in squamous cell carcinoma of the head and neck and metastatic colorectal cancer. *Drugs* 67(17): 2585-2607. 2007.
- Boerner JL, Danielsen A, Maihle NJ. Ligand-independent oncogenic signaling by the epidermal growth factor receptor: v-ErbB as a paradigm. *Exp Cell Res.* 284(1):111-121. 2003.
- Bonner JA, Harari PM, Giralt J, Azarnia N, Shin DM, Cohen RB, Jones CU, Sur R, Raben D, Jassem J, Ove R, Kies MS, Baselga J, Yousoufian H, Amellal N, Rowinsky EK, Ang KK. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 354(6): 567-578. 2006.
- Bosetti C, Boffetta P, La Vecchia C. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol* 18(3): 431-446. 2007.
- Boström CE, Gerde P, Hanberg A, Jernström B, Johansson C, Kyrklund T, Rannug A, Törnqvist M, Victorin K, Westerholm R. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ Health Perspect* 110(3):451-488. 2002.
- Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res.* 63(8):1727-1730. 2003.
- Brand TM, Iida M, Wheeler DL. Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Biol Ther.* 11(9):777-92. . 2011.
- Breda E, Catarino RJ, Azevedo I, Lobão M, Monteiro E, Medeiros R. Epstein-Barr virus detection in nasopharyngeal carcinoma: implications in a low-risk area. *Braz J Otorhinolaryngol.* 76(3): 310-315. 2010.
- Burtneß B, Bourhis JP, Vermorken JB, Harrington KJ, Cohen EE. Afatinib versus placebo as adjuvant therapy after chemoradiation in a double-blind, phase III study (LUX-Head & Neck 2) in patients with primary unresected, clinically intermediate-to-high-risk head and neck cancer: study protocol for a randomized control. 2014.
- Burtneß B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA, und Eastern Cooperative Oncology Group. Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol.*23(34): 8646-8654. 2005.

- Burtneß B., Meredith A. Goldwasser, William Flood, Bassam Matter and Arlene A. Forastiere. Phase III Randomized Trial of Cisplatin Plus Placebo Compared With Cisplatin Plus Cetuximab in Metastatic/Recurrent Head and Neck Cancer: An Eastern Cooperative Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 2005; 24: 8646-8654. 2005.
- Caldecott, KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst).* 2(9):955-69. 2003.
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.*56(11): 2488-2492. 1996.
- Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res.* 6(2): 347-352. 2000.
- Cao C, Zhang YM, Wang R, Sun SF, Chen ZB, Ma HY, Yu YM, Ding QL, Shu LH, Deng ZC. Excision repair cross complementation group 1 polymorphisms and lung cancer risk: a meta-analysis. *Chin Med J (Engl)* 124(14): 2203-2208. 2011.
- Cao SM, Simons MJ, Qian CN. The prevalence and prevention of nasopharyngeal carcinoma in China. *Chin J Cancer* 30(2): 114-119 . 2011.
- Chen LF, Cohen EE, Grandis JR. New strategies in head and neck cancer: understanding resistance to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Clin Cancer Res* 16(9): 2489-2495. 2010.
- Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, Wei Q. Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 7(6):465-8. 1998.
- Cherry LM, Hsu TC. Bleomycin-induced chromosome damage in lymphocytes of medullary thyroid carcinoma patients and their family members. *Anticancer Res* 3(6): 367-372. 1983.
- Chinnaiyan P, Huang S, Vallabhaneni G, Armstrong E, Varambally S, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Harari PM. Mechanisms of enhanced radiation response following epidermal growth factor receptor signaling inhibition by erlotinib (Tarceva). *Cancer Res.* 15;65(8):3328-35. . 2005.
- Chung CH, Mirakhur B, Chan E, Le QT, Berlin J, Morse M, Murphy BA, Satinover SM, Hosen J, Mauro D, Slebos RJ, Zhou Q, Gold D, Hatley T, Hicklin DJ, Platts-Mills TA. Cetuximab-induced anaphylaxis and IgE specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *N Engl J Med* 358(11): 1109-1117. 2008.
- Ciardiello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. *Clin Cancer Res* 7(10): 2958-2970. 2001.

- 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.* 9(7):713-7. 2000.
- Cloos J., Margaret R. Spitz, Stimson P. Schantz, T. C. Hsu, Zuo-feng Zhang, Hilde Tobi, Boudewijn J. M. Braakhuis, Gordon B. Snow. Genetic Susceptibility to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88(8): 530-535. 1996.
- Coffey RJ Jr, Derynck R, Wilcox JN, Bringman TS, Goustin AS, Moses HL, Pittelkow MR. Production and auto-induction of transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Nature.* 328(6133): 817-820. 1987.
- Conway DI, Hashibe M, Boffetta P, und Wunsch-Filho V, Muscat J, La Vecchia C, Winn DM INHANCE consortium. Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE - The international head and neck cancer epidemiology consortium. *Oral Oncol* 45(9): 743-746 . 2009.
- Cruz JJ, Ocaña A, Del Barco E, Pandiella A. Targeting receptor tyrosine kinases and their signal transduction routes in head and neck cancer. *Ann Oncol.* 18(3): 421-430. 2007.
- Culp SJ, Gaylor DW, Sheldon WG, Goldstein LS, Beland FA. A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay. *Carcinogenesis* 19(1): 117-124. 1998.
- Cummings M, Higginbottom K, McGurk CJ, Wong OG, Köberle B, Oliver RT, Masters JR. XPA versus ERCC1 as chemosensitising agents to cisplatin and mitomycin C in prostate cancer cells: role of ERCC1 in homologous recombination repair. *Biochem Pharmacol* 72(2): 166-175. 2006.
- Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, Santini J, Schneider M, Demard F, Milano G. Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract cancer. *J Clin Oncol.*11(10): 1873-1878. 1993.
- de Laat WL, Jaspers NGJ, Hoeijmakers JHJ. Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes and Dev.* 13:768-785. 1999.
- DeMarini, DM. Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res* 567(2-3): 447-474. 2004.
- Dreyer Johannes, Niedobitek Gerald. *TumorDiagn u Ther*; 38(05): 297-301. Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York, 2017.
- EMA/944051/2011. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Summary_for_the_public/human/000558/WC500029111.pdf. 2011.
- Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 100(4): 261-269. 2008.

- Fan Z, Baselga J, Masui H, Mendelsohn J. Antitumor effect of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies plus cis-diamminedichloroplatinum on well established A431 cell xenografts. *Cancer Res.* 53(19): 4637-42. 1993.
- FDA, (2004) FDA Label Information Cetuximab.
http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/125084s168lbl.pdf. Stand 10/2013.
- Ferguson LR, De Flora S. Multiple drug resistance, antimutagenesis and anticarcinogenesis. *Mutat Res.* 591(1-2):24-33. 2005.
- Foerster CG, Cursiefen C, Kruse FE. Persisting corneal erosion under cetuximab (Erbix) treatment (epidermal growth factor receptor antibody). *Cornea* 27(5): 612-614. 2008.
- Friedmann BJ, Caplin M, Savic B, Shah T, Lord CJ, Ashworth A, Hartley JA, Hochhauser D. Interaction of the epidermal growth factor receptor and the DNA-dependent protein kinase pathway following gefitinib treatment. *Mol Cancer Ther.* 5(2):209-18. 2006.
- Gelboin, HV. Benzo[α]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 60: 1107-1166. 1980.
- Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, Zahurak ML, Daniel RW, Viglione M, Symer DE, Shah KV, Sidransky D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 92(9): 709-720. 2000.
- Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, Rockwell P, Mendelsohn J. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1(11): 1311-1318. 1995.
- Gomella LG, Sargent ER, Wade TP, Anglard P, Linehan WM, Kasid A. Expression of transforming growth factor alpha in normal human adult kidney and enhanced expression of transforming growth factors alpha and beta 1 in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 49(24 Pt 1): 6972-6975. 1989.
- Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Twardy DJ. Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer* 78(6): 1284-1292. 1996.
- Grandis JR, Melhem MF, Gooding WE, Day R, Holst VA, Wagener MM, Drenning SD, Twardy DJ. Levels of TGF-alpha and EGFR protein in head and neck squamous cell carcinoma and patient survival. *J Natl Cancer Inst.* 90(11): 824-832. 1998.
- Grandis JR, Twardy DJ. Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 53(15):3579-84. 1993.

- Grandis, JR. Established and emerging concepts in epidermal growth factor receptor biology. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 69(2 Suppl):S22-4. 2007.
- Ha PK, Califano JA. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 15(4): 188-196. 2004.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1): 57-70. 2000.
- Handra-Luca A, Hernandez J, Mountzios G, Taranchon E, Lacau-St-Guily J, Soria JC, Fouret P. Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by Cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.*13(13):3855-9.2007.
- Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G. A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res.*1997 Apr 24;390(1-2):179-88. 1997.
- Hardisson, D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.*260(9): 502-508. 2003.
- Harréus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H. [Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract]. *Laryngorhinootologie.* 78(4):176-81. 1999.
- Harréus UA, Kleinsasser NH, Zieger S, Wallner B, Reiter M, Schuller P, Berghaus A. Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res.* 563:131-138. 2004.
- Harréus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER, Kleinsasser NH. [DNA repair in mucous membrane cells and lymphocytes with the comet assay]. *Laryngorhinootologie* 80(1): 23-26. 2001.
- Harris RC, Chung E, Coffey RJ. EGF receptor ligands. *Exp Cell Res* 284(1): 2-13. 2003.
- Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E, Fernandez L, Wünsch-Filho V, Franceschi S, Hayes RB, Herrero R, Koifman S, La Vecchia C, Lazarus P, Levi F, Mates D, Matos E, Menezes A, Muscat J et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* 99: 777-789. 2007.
- Heck JE, Berthiller J, Vaccarella S, Winn DM, Smith EM, Shan'gina O, Schwartz SM, Purdue MP, Pilarska A, Eluf-Neto J, Menezes A, McClean MD, Matos E, Koifman S, Kelsey KT, Herrero R, Hayes RB, Franceschi S, Wünsch-Filho V, Fernández L, Daudt AW et.al. Sexual behaviours and the risk of head and neck cancers: a pooled analysis in the

- International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) consortium. *Int J Epidemiol* 39(1): 166-181. 2009.
- Herchenhorn D, Ferreira CG. Targeting epidermal growth factor receptor to optimize chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer: has biology been taken into account? *J Clin Oncol*.29(10). 2011.
- Hiraishi Y1, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. *Pathol Oncol Res*.12(2):87-91. 2006.
- Ho T, Wei Q, Sturgis EM. Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck* 29(7): 682-699. 2006.
- Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res*. 6(6):2166-74. 2000.
- Hung RJ, Hall J, Brennan P, Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a HuGE review. *Am J Epidemiol*. 162(10):925-42. . 2005.
- IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines; Volume 89. 2007.
- IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. Vol.92. 2007.
- Jun HJ, Ahn MJ, Kim HS, Yi SY, Han J, Lee SK, Ahn YC, Jeong HS, Son YI, Baek JH, Park K. ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation. *Br J Cancer*. 99(1):167-72. 2008.
- Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*.24(17): 2666-2672. 2006.
- 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.*, 63: 141-147. 2001.
- Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F, Bührle M, Huber RM, Rettenmeier AW. The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res*. 561(1-2):63-73. . 2004.
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Wagner C, Kastenbauer ER, Harréus UA. DNA repair capacity in lymphocytes of nasopharyngeal cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 262(7):561-6. 2005.

- Kleinsasser, NH, et al. Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.*, 63: 141-147. 2001.
- Knize MG, Salmon CP, Pais P, Felton JS. Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon. *Adv Exp Med Biol* 459:179-193. 1999.
- Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. *Laryngoscope* 109(10): 1544-1551. 1999.
- Laforest L, Luce D, Goldberg P, et al. Laryngeal and hypopharyngeal cancers and occupational exposure to formaldehyde and various dusts: a case-control study in France. *Occup Environ Med* 57: 767-773. 2000.
- Leinmüller, Renate. Oropharynxkarzinom: Patienten mit viraler Genese haben bessere Prognose; *Dtsch Arztebl*; 109(24): A-1236 / B-1062 / C-1049. 2012.
- Li S, Schmitz KR, Jeffrey PD, Wiltzius JJ, Kussie P, Ferguson KM. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. *Cancer Cell* 7(4): 301-311. 2005.
- Li Z, Mulholland JA, Romanoff LC, Pittman EN, Trinidad DA, Lewin MD, Sjödin A. Assessment of non-occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons through personal air sampling and urinary biomonitoring. *J Environ Monit* 12(5): 1110-1118. 2010.
- Liang Z, Lippman SM, Kawabe A, Shimada Y, Xu XC. Identification of benzo(a)pyrene diol epoxide-binding DNA fragments using DNA immunoprecipitation technique. *Cancer Res* 63(7):1470-1474. 2003.
- Loeffler-Ragg J, Witsch-Baumgartner M, Tzankov A, Hilbe W, Schwentner I, Sprinzl GM, Utermann G, Zwierzina H. Low incidence of mutations in EGFR kinase domain in Caucasian patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 42(1): 109-111. 2006.
- López-Albaitero A, Ferris RL. Immune activation by epidermal growth factor receptor specific monoclonal antibody therapy for head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 133(12): 1277-1281. 2007.
- Luch, A. Chemisch induzierter Krebs und genetisch bedingte Unterschiede in der Empfindlichkeit: Kanzerogene Chemikalien. *Chemie in unserer Zeit* 35(5): 294-305. 2001.
- Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying

- responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med.* 350(21): 2129-2139. 2004.
- Maier H, Fischer G, Sennewald E, Heller WD. [Occupational risk factors for pharyngeal cancer. Results of the Heidelberg Pharyngeal Cancer Study]. *HNO* 42(9):530-540 . 1994.
- Maier H, Tisch M. [Occupation and cancer of the head-neck area]. *HNO* 47(12): 1025-1037. 1999.
- Mao YP, Li WF, Chen L, et al. A clinical verification of the Chinese 2008 staging system for nasopharyngeal carcinoma.[J]. *Ai Zheng* 28(10): 1022-1028. 2009.
- Margaret R. Spitz¹, John J. Fueger, Nancy A. Beddingfield, John F. Annegers, T. C. Hsu, Guy R. Newell, and Stimson P. Schantz. Chromosome Sensitivity to Bleomycin-induced Mutagenesis, an Independent Risk Factor for Upper Aerodigestive Tract Cancers. *Cancer Res.* 49: 4626-4628. 1989.
- Marmor MD, Skaria KB, Yarden Y. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 58(3): 903-913. 2004.
- Marshall, J. Clinical implications of the mechanism of epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer.* 107(6):1207-18. 2006.
- Martin D¹, Abba M², Molinolo A¹, Vitale-Cross L¹, Wang Z¹, Zaida M¹, Delic N³, Samuels Y⁴, Lyons JG³, Gutkind JS¹. The head and neck cancer cell oncogenome: A platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget.* 5(19):8906-23. 2014.
- Mazur, P. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. *Cryobiology*, edited by H.T. Meryman: 213-315. London: Academic Press. 1966.
- Mehanna H, Paleri V, West CM, Nutting C. Head and neck cancer--Part 1: Epidemiology, presentation, and prevention. *BMJ* 341: c4684. 2010.
- Mendelsohn, J. Epidermal growth factor receptor inhibition by a monoclonal antibody as anticancer therapy. *Clin. Cancer Res.* 3: 2703-2707. 1997.
- Meyn RE, Munshi A, Haymach JV, Milas L, Ang KK. Receptor signaling as a regulatory mechanism of DNA repair. *Radiother Oncol.* 92(3):316-22. 2009.
- Milas L, Mason K, Hunter N, Petersen S, Yamakawa M, Ang K, Mendelsohn J, Fan Z. In vivo enhancement of tumor radioresponse by C225 anti-epidermal growth factor receptor antibody. *Clin Cancer Res.* 6(2):701-8. 2000.
- Niedernhofer LJ, Odijk H, Budzowska M, van Drunen E, Maas A, Theil AF, de Wit J, Jaspers NG, Beverloo HB, Hoeijmakers JH, Kanaar R. The structure-specific endonuclease

- Erccl1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks. *Mol Cell Biol* 24(13): 5776-5787. 2004.
- O-Charoenrat P, Rhys-Evans P, Eccles S. Expression and regulation of c-ERBB ligands in human head and neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer* 88(5): 759-765. 2000.
- O'Neil BH, Allen R, Spiegel DR, Stinchcombe TE, Moore DT, Berlin JD, Goldberg RM. High incidence of cetuximab-related infusion reactions in Tennessee and North Carolina and the association with atopic history. *J Clin Oncol* 25(24): 3644-3648. 2007.
- Östling O, Johanson KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298. 1984.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, Doherty J, Politi K, Sarkaria I, Singh B, Heelan R, Rusch V, Fulton L, Mardis E, Kupfer D, Wilson R, Kris M, Varmus H. EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from "never smokers" and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(36): 13306-13311. 2004.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*. 2005; 55: 74–108. 2005.
- Perez-Ordoñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol*. 59(5): 445-453. 2006.
- Perrone F, Suardi S, Pastore E, Casieri P, Orsenigo M, Caramuta S, Dagrada G, Losa M, Licitra L, Bossi P, Staurengo S, Oggionni M, Locati L, Cantu G, Squadrelli M, Carbone A. Molecular and Cytogenetic Subgroups of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *ClinCancRes*10.1158/1078-0432.CCR-06-1759 . 2006.
- Peters ES, Lockett BG, Applebaum KM, Marsit CJ, McClean MD, Kelsey KT. Dairy products, leanness, and head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 30(9): 1193-1205. 2008.
- Phillips, DH. Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature*. 303(5917):468-72. 1983.
- Phillips, H.J. Dye exclusion test for cell viability. *Tissue Culture* 407-408. 1973.
- Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164: 666. 1949.
- Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. *Duale Reihe Biochemie*, 1.Auflage. 2006.
- Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*.2010: 592980. 2010.
- Reardon JT, Vaisman A, Chaney SG, Sancar A. Efficient nucleotide excision repair of cisplatin, oxaliplatin, and Bis-aceto-ammine-dichloro-cyclohexylamine-platinum(IV) (JM216) platinum intrastrand DNA diadducts. *Cancer Res*. 59(16):3968-71. 1999.

- Reed, E. Platinum-DNA adduct, nucleotide excision repair and platinum based anti-cancer chemotherapy. *Cancer Treat Rev.* 24(5):331-44. 1998.
- Reiter M, Baumeister P, Jaiser S, Reiss A, Schwenk-Zieger S, Kleinsasser N, Harréus U. DNA repair and mutagen sensitivity of epithelial cells and lymphocytes in oropharyngeal cancer. *Oncol Lett.* 3(1):100-106. 2012.
- Reiter M, Welz C, Baumeister P, Schwenk-Zieger S, Harréus U. Mutagen sensitivity and DNA repair of the EGFR gene in oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2010 Jul;46(7):519-24. doi: 10.1016/j.oraloncology.2010.03.019. Epub 2010 Apr 18. 2010.
- Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *BrJ Cancer* 96(3): 408-416. 2007.
- Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). *Krebs in Deutschland 2011/2012.* Berlin, 2015.
- Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, Gallus S, Bosetti C, Negri E, Franceschi S, Levi F, Talamini R, La Vecchia C. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.* 40(2): 207-213. 2004.
- Rosin MP, Cheng X, Poh C, Lam WL, Huang Y, Lovas J, Berean K, Epstein JB, Priddy R, Le ND, Zhang L. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res.* 6(2): 357-62. 2000.
- Rousseau A, Lim MS, Lin Z, Jordan RC. Frequent cyclin D1 gene amplification and protein overexpression in oral epithelial dysplasias. *Oral Oncol.* 37(3): 268-275. 2001.
- Sapkota A, Gajalakshmi V, Jetly DH, Roychowdhury S, Dikshit RP, Brennan P, Hashibe M, Boffetta P. Smokeless tobacco and increased risk of hypopharyngeal and laryngeal cancers: a multicentric case-control study from India. *Int J Cancer* 121(8): 1793-1798. 2007.
- Scaltriti M, Baselga J. The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res.* 12(18): 5268-5272. 2006.
- Schantz SP, Zhang ZF, Spitz MS, Sun M, Hsu TC. Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity. *Laryngoscope.* 107(6):765-81. 1997.
- Schlessinger, J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell* 103(2): 211-225. 2000.
- Scotto, KW. Transcriptional regulation of ABC drug transporters. *Oncogene.* 22(47):7496-511. 2003.
- Shahnavaz SA, Regezi JA, Bradley G, Dubé ID, Jordan RC. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *J Pathol.* 190(4): 417-422. 2000.

- Sheikh Ali MA, Gunduz M, Nagatsuka H, Gunduz E, Cengiz B, Fukushima K, Beder LB, Demircan K, Fujii M, Yamanaka N, Shimizu K, Grenman R, Nagai N. Expression and mutation analysis of epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Sci.* 99(8):1589-1594. 2008.
- Shen J, Desai M, Agrawal M, Kennedy DO, Senie RT, Santella RM, Terry MB. Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and DNA repair capacity phenotype in sisters discordant for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(9):1614-9. . 2006.
- Sigismund S, Woelk T, Puri C, Maspero E, Tacchetti C, Transidico P, Di Fiore PP, Polo S. Clathrin-independent endocytosis of ubiquitinated cargos. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(8): 2760-2765 . 2005.
- Singh N.P., D. Banner, und R.R. et al. Tice. Abundant alkali sensitive sites in DNA of human and mouse sperm. *Exp Cell Res*, 184:461-470. 1989.
- Singh N.P., M.T. Mc Coy, und R.R. et al. Tice. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191. 1988.
- Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 6(5): 963-968. 1953.
- Slyskova J, Naccarati A, Polakova V, Pardini B, Vodickova L, Stetina R, Schmutzerova J, Smerhovsky Z, Lipska L, Vodicka P. DNA damage and nucleotide excision repair capacity in healthy individuals. *Environ Mol Mutagen* doi: 10.1002/em.20650. 2011.
- Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer GP. Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst.*92(10): 803-811. 2000.
- Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, Lango MN, Xi S, Hunt JL, Freilino ML, Graner MW, Wikstrand CJ, Bigner DD, Gooding WE, Furnari FB, Grandis JR. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res.* 12(17):5064-73. . 2006.
- Specenier P, Vermorken JB. Biologic therapy in head and neck cancer: a road with hurdles. *ISRN Oncol.*2012:163752. 2012.
- Specenier P, Vermorken JB. Cetuximab in the treatment of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Expert Rev Anticancer Ther.* 11(4):511-24. 2011.
- Speit G., und A. Hartmann. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol* 291: 85-95. 2005.
- Spitz MR, Hoque A., Trizna Z., Schantz S. P., Amos C. I., King T. M., Bondy M. L., Hong W. K., Hsu T. C. Mutagen sensitivity as a risk factor for second malignant tumors following malignancies of the upper aerodigestive tract. *J. Natl. Cancer Inst.*, 86: 1681-1684. 1994.

- Spitz MR, Hsu TC, Wu X, Fueger JJ, Amos CI, Roth JA. Mutagen sensitivity as a biological marker of lung cancer risk in African Americans. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4: 99-103. 1995.
- 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.* 12(8):689-98. 2003.
- Steinsvag S.K., M. Strand, O. Berg, M. Miaquchi, und J. Olofsson. Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope*, 101: 1323-1331. 1991.
- Syrjänen KJ, Pyrhönen S, Syrjänen SM, Lamberg MA. Immunohistochemical demonstration of human papilloma virus (HPV) antigens in oral squamous cell lesions. *Br J Oral Surg.* 21(2): 147-153. 1983.
- Tang MS, Pierce JR, Doisy RP, Nazimiec ME, MacLeod MC. Differences and similarities in the repair of two benzo[a]pyrene diol epoxide isomers induced DNA adducts by uvrA, uvrB, and uvrC gene products. *Biochemistry* 31(36): 8429-8436. 1992.
- Taoudi Benchekroun M1, Saintigny P, Thomas SM, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Lang W, Fan YH, Huang J, Feng L, Lee JJ, Kim ES, Hong WK, Johnson FM, Grandis JR, Mao L. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in the risk of oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 3(7):800-9. 2010.
- Tejani MA, Cohen RB, Mehra R. The contribution of cetuximab in the treatment of recurrent and/or metastatic head and neck cancer. *Biologics* 4:173-185. 2010.
- Thomas DM, Nasim MM, Gullick WJ, Alison MR. Immunoreactivity of transforming growth factor alpha in the normal adult gastrointestinal tract. *Gut* 33(5): 628-631. 1992.
- Tice, R.R., et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. 2000.
- Tumorzentrum München, Ludwig-Maximilians-Universität und Technische Universität München. *Manual Kopf-Hals-Malignome*; 5. Auflage. 2014.
- Vairaktaris E, Spyridonidou S, Papakosta V, Vylliotis A, Lazaris A, Perrea D, Yapijakis C, Patsouris E. The hamster model of sequential oral oncogenesis. *Oral Oncol.* 44(4):315-24. 2008.
- van der Riet P, Nawroz H, Hruban RH, Corio R, Tokino K, Koch W, Sidransky D. Frequent loss of chromosome 9p21-22 early in head and neck cancer progression. *Cancer Res.* 54(5): 1156-1158. 1994.
- Vande Loock K, Decordier I, Ciardelli R, Haumont D, Kirsch-Volders M. An aphidicolin-block nucleotide excision repair assay measuring DNA incision and repair capacity. *Mutagenesis.* 25(1):25-32. 2010.

- Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kaweckki A, Rottey S, Erfan J, Zabolotnyy D, Kienzer HR, Cupissol D, Peyrade F, Benasso M, Vynnychenko I, De Raucourt D, Bokemeyer C, Schueler A, Amellal N, Hitt R. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med.* 2008 Sep 11;359(11):1116-27. 2008.
- Wallner BC, Harréus UA, Gamarra F, Sassen A, Kleinsasser NH. Mini-organ cultures of human nasal mucosa. A model for eco-genotoxicological investigations. *HNO* 53: 1037-1046. 2005.
- 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* 4: 1773-1778. 1998.
- Wang LE, Xiong P, Zhao H, Spitz MR, Sturgis EM, Wei Q. Chromosome instability and risk of squamous cell carcinomas of head and neck. *Cancer Res.* 68(11): 4479-4485. 2008.
- Wang Y, Spitz MR, Lee JJ, Huang M, Lippman SM, Wu X. Nucleotide excision repair pathway genes and oral premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 13(12): 3753-3758. 2007.
- Wei KR, Liu Q, Wang DK, et al. Incidence trend and prediction of nasopharyngeal carcinoma in Zhongshan during 1970- 1999. *Chin J Cancer* 20(10): 1065-1068. 2001.
- Wei WI, Sham JS. Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 365 (9476): 2041-2054. 2005.
- Wheeler DL, Huang S, Kruser TJ, Nechrebecki MM, Armstrong EA, Benavente S, Gondi V, Hsu KT, Harari PM. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene.* 27(28):3944-56. 2008.
- Wheeler SE, Suzuki S, Thomas SM, Sen M, Leeman-Neill RJ, Chiosea SI, Kuan CT, Bigner DD, Gooding WE, Lai SY, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene.* 29(37):5135-45. 2010.
- WHO-IPCS, World Health Organization-International Programme on Chemical Safety. Polycyclic aromatic hydrocarbons, selected non-heterocyclic (EHC 202). 1998.
- Wittekind C, Weber A, Weidenbach H. Pathologie und Prognosefaktoren von Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereiches. *Der Onkologe* 2001/5: 498-504. 2001.
- Wong DT, Weller PF, Galli SJ, Elovic A, Rand TH, Gallagher GT, Chiang T, Chou MY, Matossian K, McBride J. Human eosinophils express transforming growth factor alpha. *JEM* 172(3):673-681. 1990.
- Wood RD, Mitchell M, Sgouros J, Lindahl T. Human DNA repair genes. *Science.* 291(5507):1284-9. 2001.

- Wood, RD. DNA repair. Variants on a theme. *Nature* 399(6737): 639-640. 1999.
- Wu X, Lippman SM, Lee JJ, et al. Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions. *Cancer Res* 62: 2813-2818. 2002.
- Wu X, Lippman SM, Lee JJ, Zhu Y, Wei QV, Thomas M, Hong WK, Spitz MR. Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions. *Cancer Res* 62(10):2813-2818. 2002.
- Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A, Averbuch S, Wadsworth P. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. *Anticancer Res.* 23(5A): 3639-3650 . 2003.
- Yonesaka K, Zejnullahu K, Okamoto I, Satoh T, Cappuzzo F, Souglakos J, Ercan D, Rogers A, Roncalli M, Takeda M, Fujisaka Y, Philips J, Shimizu T, Maenishi O, Cho Y, Sun J, Destro A, Taira K, Takeda K, Okabe T, Swanson J, Itoh H, Takada M, Lifshits E. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med.* 3(99):99ra86. 2011.

7 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Aqua bidest	Aqua bidestillata
B[a]P	Benzo[a]pyren
BEGM	Bronchial epithelial growth medium
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
bzw.	beziehungsweise
CCD	Charge-coupled device
Cetux.	Cetuximab
chron.	chronisch
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAB	Diaminobenzidin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EGFRvIII	Epidermal growth factor receptor variant III
EMA	European Medicines Agency
ex	Ehemaliger Alkohol-/Nikotinabusus
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
g/d	Gramm pro Tag
h	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE-Färbung	Hämalaun-Eosin-Färbung
HER	Human Epidermal Growth Factor Receptor
HEPES	N-2-Hydroxaethylpiperazin-N-2-ethansulfonsäure
HPV	Humanes Papillomavirus
IARC	International Agency for Research on Cancer
IgG	Immunglobulin
IPCS	International Programme on Chemical Safety

kD	Kilo Dalton
l	Liter
LOH	Loss of Heterozygosity
LSAB	Labelled Streptavidin-Biotin
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
mg/ml	Milligramm pro Milliliter
MOK	Miniorgankultur
µl	Mikroliter
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NDEA	N-Nitrosodiethylamin
n.e.	nicht erhoben
ng/ml	Nanogramm pro Milliliter
n.Kult	nach Kultivierung
O.C.T.	Optimal Cutting Temperature
PAHs	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate buffered saline
pH	potentia hydrogenii
PI3	Phosphatidylinositol3-Kinase
PLC	Phospholipase C
py	pack years
Ras	Rat sarcoma
Rb	Retinoblastoma-Protein
Rep	Reparatur
RepKap	Reparaturkapazität
RKI	Robert Koch-Institut
SSC	Standard sodium citrate
STAT	Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription
TGFα	Transforming growth factor-alpha
U/min	Units pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt

VEGF	Vascular endothelial growth factor
vs	versus
WHO	World Health Organization
XPD	Xeroderma pigmentosum group D
XRCC1	X-ray repair cross-complementing group 1
ZfKD	Zentrum für Krebsregisterdaten

8 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Martin Canis für die Bereitstellung der nötigen Räumlichkeiten, der finanziellen Mittel und die Hilfe bei der Korrektur und Vervollständigung der Arbeit.

Vielen Dank auch an PD. Dr. med. Christian Welz, der mir als Betreuer zur Seite stand und mit seiner mehrfachen Korrektur dieser Arbeit maßgeblich an der Fertigstellung beteiligt war.

In ganz besonderem Maße gilt Frau Sabina Schwenk-Zieger mein Dank. Sie führte mich in die notwendige Methodik im Labor und in die statistische Auswertung ein. Ohne ihre Unterstützung während der gesamten Zeit, wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen. Neben Ihrer fachlichen Kompetenz möchte ich Ihre lebenswürdige, hilfsbereite Art und Ihr immer offenes Ohr für alle Arten von Problemen hervorheben.

Mein Dank gilt auch dem Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE), für die Beratung bezüglich der Statistik dieser Arbeit.

Herzlichst möchte ich mich auf diesem Wege bei meinen Eltern, Steffi und Wolfgang Heiß, und bei meinem Bruder, Dr. jur. Maximilian Heiß, bedanken. Meine Familie stand während meiner Schulausbildung, dem Studium, der Dissertation und bei allen anderen Entscheidungen des bisherigen Lebens hinter mir, wofür ich sehr dankbar bin und worauf ich mich auch in Zukunft freuen darf. Ohne Ihre Hilfe wäre ich mit Sicherheit nicht dort, wo ich heute bin.

Neben der uneingeschränkten Unterstützung durch meine Familie erhielt ich von Herrn Dr. med. Maximilian Hungbauer immer die nötige Bestärkung die Arbeit zu Ende zu bringen, wofür auch kein Aufwand gescheut wurde. Dafür und für vieles mehr bin ich unendlich dankbar.