

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

**Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität in
humanen Schleimhautzellen und Analyse der DNA-
protektiven Wirkung von pflanzlichen Phenolen**

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

vorgelegt von
Katrin Susanne Fuchs
aus Pfaffenhofen a. d. Ilm
2008

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

Berichterstatter: PD Dr. med. U. Harréus

Mitberichterstatter: PD Dr. med. C.-P. Cornelius
PD Dr. med. H. Hagedorn

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 03.04.2008

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 Kopf-Hals-Karzinome	7
1.1.1 Epidemiologie	7
1.1.2 Exogene Risikofaktoren	7
1.1.3 Endogene Risikofaktoren	9
1.2 Zusammenhang zwischen DNA-Schädigung und Reparatur	11
1.3 Karzinogenese	12
1.4 Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) als Vertreter der polzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH)	14
1.5 Pflanzliche Phenole als zytoprotektive Substanzen	16
1.5.1 (+)-Catechin als Vertreter der Flavonoide	17
1.5.2 Tanninsäure (Chinesisches Tannin) als Vertreter der Tannine	19
1.6 Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)	21
1.7 Einsatz von Miniorgankulturen	21
1.8 Aufgabenstellung	22
2. PATIENTENGUT, MATERIAL UND METHODEN	23
2.1 Patientengut	23
2.1.1 Zellspender für die Versuchsreihen an Einzelzellen	23
2.1.2 Zellspender für die Versuchsreihen an Miniorgankulturen	24
2.2 Methodenspezifisches Labormaterial und Geräte	25
2.2.1 Chemikalien, Medien, Enzyme und Testsubstanzen	25
2.2.2 Lösungen	27
2.2.3 Verbrauchsmaterial	29
2.2.4 Technische Geräte	30
2.3 Einzelzellinkubation	31
2.3.1 Gewinnung von Einzelzellen	31
2.3.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest	31
2.3.3 Schadstoffinkubation und DNA-Reparatur	32

2.4 Miniorgankulturen	34
2.4.1 Schleimhautpräparation	34
2.4.2 Kultivierung von Miniorganen	34
2.4.3 Fremdstoffexposition der kultivierten Schleimhautzellen	35
2.4.4 Einzelzellisolierung aus Miniorgankulturen	37
2.5 Alkalische Mikrogelektrophorese (Comet Assay)	38
2.5.1 Präparation der Objektträger	38
2.5.2 Zellfixierung und Lyse	38
2.5.3 Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung	38
2.6 Digitale Auswertung	39
2.7 Ergebnisdarstellung und statistische Analyse	41
3. ERGEBNISSE	42
3.1 Mutagensensitivität gegenüber BPDE, DNA-Reparatur und Reparaturkapazität	42
3.1.1 DNA-Schädigung und Reparatur BPDE induzierter DNA-Schäden an oropharyngealen Mukosazellen von tumorfreien Patienten	42
3.1.2 DNA-Schädigung und Reparatur BPDE induzierter DNA-Schäden an oropharyngealen Mukosazellen von Tumorpatienten	44
3.1.3 Mutagensensitivität und DNA-Reparatur: Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom	45
3.1.4 DNA-Reparaturkapazität von tumorfreien Patienten	47
3.1.5 DNA-Reparaturkapazität von Tumorpatienten	48
3.1.6 Vergleich der DNA-Reparaturkapazitäten von Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom	49
3.2 Protektive Wirkung der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure	50
3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung der Substanzen (+)-Catechin und Tanninsäure an nasalen Miniorganen	50
3.2.2 Protektive Wirkung von (+)-Catechin und Tanninsäure gegenüber BPDE induzierten DNA-Schäden an oropharyngealen Miniorganen	54

4. DISKUSSION	57
4.1 Auswahl des Patientenkollektivs	57
4.1.1 Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom als Spender von oropharyngealem Epithel für die Versuchreihen an Einzelzellen	57
4.1.2 Spender von oropharyngealem bzw. nasalem Epithel für die Versuchsreihen an Miniorganen	58
4.2 Genotoxizität und Mutagensensitivität gegenüber BPDE	59
4.2.1 Genotoxizität von BPDE als Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe	59
4.2.2 Mutagensensitivität gegenüber BPDE als endogener Risikomarker	60
4.3 DNA-Reparatur und DNA-Reparaturkapazität	63
4.3.1 Reparatur BPDE induzierter DNA-Schäden	63
4.3.2 DNA-Reparaturkapazität als endogener Risikomarker	64
4.4 Protektive Wirkung der Pflanzenphenole (+)-Catechin und Tanninsäure	66
4.4.1 Protektive Wirkung von (+)-Catechin gegenüber BPDE induzierten DNA-Schäden an Miniorganen	67
4.4.2 Protektive Wirkung von Tanninsäure gegenüber BPDE induzierten DNA-Schäden an Miniorganen	69
5. ZUSAMMENFASSUNG	72
5.1 Hintergrund und Zielsetzung	72
5.2 Methoden und Ergebnisse	72
5.3 Schlussfolgerung	73
6. LITERATUR	74
7. ANHANG	86
7.1 Patientenanamnesen	86
7.2 Abkürzungen	89
7.3 Veröffentlichungen aus der Arbeit	90
7.4 Lebenslauf	91
7.5 Danksagung	92

Für meine lieben Eltern

1. EINLEITUNG

1.1 Kopf-Hals-Karzinome

1.1.1 Epidemiologie

Im Jahr 1998 erkrankten in Deutschland nach den Inzidenzdaten des Saarländischen Krebsregisters ca. 347.000 Menschen an Krebs. Es ergab sich eine altersstandardisierte Inzidenz von 389 pro 100.000 Männern und 301 pro 100.000 Frauen.

Kopf-Hals-Karzinome der Männer machten einen Anteil von 6,3 % aller jährlichen Krebsneuerkrankungen aus. Sie nahmen damit in der Häufigkeitsverteilung der Malignome zusammen mit dem Harnblasen-Karzinom die vierte Stelle hinter dem Prostata-, Lungen- und kolorektalen Karzinom ein. Im Hinblick auf die zeitliche Entwicklung kann man einen 3-fachen Anstieg der Mortalität in den letzten 20 Jahren erkennen. Dieser Anstieg konnte bei keiner anderen Krebserkrankung beobachtet werden. Die rohe Mortalitätsrate von Kopf-Hals-Karzinomen, die sich aus der jährlichen Anzahl der Todesfälle bezogen auf 100.000 der Bevölkerung ergibt, betrug unter den Männern 12,3. Bezüglich der Verteilung der Tumorlokalisierungen im Kopf-Hals-Bereich war bei Männern mit 27 % am häufigsten der Larynx betroffen, gefolgt von Oropharynx, Mundhöhle und Hypopharynx. Der Altersmittelwert bei Diagnosestellung lag bei 58 Jahren.

Für Frauen ergab sich bei den Kopf-Hals-Karzinomen ein Anteil an der Neuerkrankungsrate von 2,1 %. Die rohe Mortalitätsrate betrug 3,2. Als häufigster Tumor im Kopf-Hals-Bereich wurde bei Frauen das Oropharynxkarzinom festgestellt. Der Altersmittelwert bei Diagnosestellung war 62 Jahre (Schlesinger-Raab et al., 2003).

1.1.2 Exogene Risikofaktoren

Als bedeutendste Risikofaktoren für Kopf-Hals-Karzinome sind Tabakrauch und übermäßiger Alkoholkonsum anerkannt. Beide Faktoren sind schätzungsweise für drei Viertel aller oralen und pharyngealen Karzinome verantwortlich. Durch Konsum beider Genussmittel besteht ein multiplikativ erhöhtes Risiko für Kopf-Hals-Karzinome (Blot et al., 1988). Eine Analyse des tabakassoziierten Krebsrisikos für unterschiedliche Tumorlokalisierungen ergab die höchsten Risikowerte für das Mundhöhlen- und Larynxkarzinom. Das alkoholassoziierte Krebsrisiko lag bei Karzinomen im Oropharynx und Larynx am höchsten (Maier et al., 1990).

Die beim Abrauchen von Tabak entstehenden Verbrennungsprodukte werden eingeteilt in Hauptstromrauch, der durch Mundinhalation während eines Zuges aufgenommen wird, und in Nebenstromrauch, der sich beim Verglimmen des Tabaks während der Zugpausen bildet. Die Gasphase des Hauptstromes besteht hauptsächlich aus Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid und Kohlenmonoxid, die Partikelphase enthält als Hauptkomponenten Nicotiana-Alkaloide wie Nikotin. Als wichtigste Karzinogene des Tabakrauches gelten Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe wie Benzo[a]pyren, N-Nitrosamine wie N'-Nitrosonornikotin (NNN) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK), Aldehyde, aromatische Amine und Benzol (Hoffmann D. und Wynder El, 1994). Jedoch scheint auch das Alkaloid Nikotin selbst zur Tumorinitiation und Karzinogenese beizutragen (Kleinsasser et al., 2006; Sassen et al., 2005; Semmler et al., 2006). Um die lebenslang gerauchte Mengen an Zigaretten abzuschätzen, werden Packungsjahre (packyear) berechnet. Dabei entspricht ein packyear 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr.

Der genaue Pathomechanismus der alkoholassoziierten Karzinogenese ist noch nicht endgültig geklärt. Alkohol scheint lokal eine physikochemische Veränderung der Zellmembranen im oberen Aerodigestivtrakt zu bewirken und dadurch die Aufnahme von Karzinogenen oder Prokarzinogenen zu erleichtern. Außerdem fungiert er als Solvens, was die Penetration karzinogener Substanzen steigert (Seitz und Simanowski, 1988). Eine genotoxische Wirkung ist für Azetaldehyd, dem Hauptmetaboliten von Ethanol nachgewiesen. Von der International Agency for Research on Cancer IARC wurde Azetaldehyd als 2b Karzinogen eingestuft, d.h. als möglicherweise karzinogen (International Agency for Research on Cancer, 1999). Boffetta und Hashibe geben eine Übersicht über die karzinogenen Effekte ausgelöst durch Alkoholkonsum. Auch eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen durch Alkohol spielt wohl bei der Tumorentstehung eine Rolle. Genpolymorphismen von DNA-Reparaturgenen und von alkoholmetabolisierenden Enzymen scheinen die Alkoholeffekte zu beeinflussen (Boffetta und Hashibe, 2006).

Daneben gilt die Exposition gegenüber Schadstoffen in Umwelt und Beruf als Risikofaktor. Zu diesen, auch Xenobiotika genannten Fremdstoffen zählen unter anderem Asbestfeinstaub, Glasfaserstaub, Senfgas, Säuredämpfe, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Benzindämpfe, Zementstaub, Holzstaub, Kühl-schmierstoffe, Eisen, Zement, Steinkohle- und Teerprodukte, sowie Farben, Lacke und Lösungsmittel (Maier et al., 1997; Maier und Tisch, 1999). Als besonders gefährdete Berufsgruppen für die Entstehung von Mundhöhlen- und Pharynxkarzinomen werden Beschäftigte im Baugewerbe, Maler und Lackierer, Arbeiter in metallverarbeitenden Berufen, in der Papierindustrie und in der Gummiindustrie angesehen. Die Gefährdung

in der Textilindustrie und in holzverarbeitenden Betrieben wird diskutiert (Riechelmann, 2002).

Ein weiterer Einflussfaktor sind die Ernährungsgewohnheiten. In einer Fall-Kontrollstudie zwischen 1995 und 2002 wurde der Einfluss von Ernährungsfaktoren auf das Risiko von Mundhöhlen- und Pharynxkarzinomen untersucht. Ein niedriger Konsum an frischen Früchten und Gemüse und gleichzeitig eine hohe Aufnahme von Risikonahrungsmitteln wie Fleisch, gekochtem Gemüse und Kartoffeln ging mit einem erhöhten Tumorrisko einher (De Stefani et al., 2005). Eine obst- und gemüsereiche Ernährung reduzierte signifikant das Risiko für Oropharynxkarzinome bei Rauchern (Kreimer et al., 2005).

Schließlich scheinen virale Infektionen eine Rolle bei der Tumorentstehung zu spielen. Humane Papillomaviren (HPV) konnten im Kopf-Hals-Bereich vor allem bei Karzinomen der Lippen, aber auch im Mundbereich und Larynx nachgewiesen werden und haben somit wohl Anteil an der multifaktoriellen Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt (Atula et al., 1997). Dabei wurde in 84 % der HPV positiven Tumoren HPV 16 gefunden (Syrjanen, 2005). Die Rolle des Epstein-Barr Virus (EBV) in Bezug auf Nasopharynxkarzinome ist noch nicht eindeutig geklärt. Während Atula et al. 1997 keine Assoziation fand (Atula et al., 1997), wurde das von EBV abgeleitete LMP-1 Gen in 96 % der Nasopharynxkarzinome nachgewiesen (Tsang et al., 2003).

1.1.3 Endogene Risikofaktoren

Neben der exogenen Schadstoffbelastung bestimmt die individuelle Empfindlichkeit (Suszeptibilität) das Risiko, an einem Tumor im Kopf-Hals-Bereich zu erkranken. Die Suszeptibilität wird von verschiedenen genetischen Faktoren beeinflusst, wie der Empfindlichkeit gegenüber Mutagenen (Mutagensensitivität), der DNA-Reparaturkapazität und genetischen bzw. enzymatischen Polymorphismen (Ho et al., 2007; Hsu et al., 1991; Schmezer et al., 2001).

Die Mutagensensitivität beschreibt die individuelle Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Auswirkungen von Fremdstoffen. Cloos et al. brachte sie als endogenen Risikomarker mit der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen in Verbindung. An kultivierten Lymphozyten wurde die Rate an Bleomycin induzierten Chromatidbrüchen als Parameter der Mutagensensitivität untersucht (Cloos et al., 1996). Der Zusammenhang zwischen familiärer Tumorbelastung und Bleomycin induzierter Mutagensensitivität wurde an Patienten mit Tumoren im oberen Aerodigestivtrakt getestet. Dabei wurden Patienten ab einem Chromosomenbruch pro Zelle als mutagensensitive Individuen klassifiziert (Bondy et al., 1993).

Im Zusammenhang mit der individuellen Suszeptibilität wurde die DNA-Reparaturkapazität (DRC) an Lymphozyten von Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom bestimmt. Als Nachweismethode diente der Comet Assay (Schmezer et al., 2001). Die DNA-Reparaturkapazität beschreibt die Fähigkeit in einem vorgegebenen Zeitintervall DNA-Schäden zu reparieren.

Auch Polymorphismen in Karzinogen-metabolisierenden Genen, DNA-Reparaturgenen und Zell-Zyklus-Kontroll-Genen beeinflussen die Suszeptibilität. Die Genvariationen haben unterschiedliche Aktivitäten von Enzymen bzw. eine unterschiedliche Proteinexpression zur Folge. Polymorphismen von Karzinogen-metabolisierenden Enzymen, die den Phasen I bzw. II der Biotransformation angehören, wurden beispielsweise für das Cytochrom P 450-System (Hong und Yang, 1997), für die Alkoholdehydrogenasen ADH1C und ADH3, die am Metabolismus von Ethanol zu Azetaldehyd beteiligt sind (Coutelle et al., 1997; Homann et al., 2005), sowie für die Gluthation-S-Transferasen GSTM1, GSTP1 und GSTT1 identifiziert (Hashibe et al., 2003). Ho et al. gibt eine Übersicht über die Assoziation zwischen Karzinomen im oberen Aerodigestivtrakt und verschiedenen Karzinogen-metabolisierenden Enzymen (Ho et al., 2007). Daneben konnte eine unterschiedliche Genexpression der Reparaturenzyme XRCC1, XPD, und ERCC1 mit einem erhöhten Risiko für Kopf-Hals-Karzinome in Verbindung gebracht werden (Sturgis et al., 1999; Sturgis et al., 2002). Variationen in Genen der Zell-Zyklus-Kontrolle konnten für p 53 und Cyklin D1 nachgewiesen werden (McWilliams et al., 2000; Nishimoto et al., 2004).

1.2 Zusammenhang zwischen DNA-Schädigung und Reparatur

Schäden in der Erbsubstanz können entweder endogen entstehen, häufig indem reaktive Sauerstoffspezies als Nebenprodukte des Zellstoffwechsels oxidative DNA-Schäden verursachen, oder exogen durch Einwirkung genomschädigender Substanzen. Diese Karzinogene wirken entweder direkt genotoxisch ohne metabolische Aktivierung oder indirekt genotoxisch, indem sie vom Organismus metabolisiert und aktiviert werden.

Bei den induzierten DNA-Schäden handelt es sich um Einzel- oder Doppelstrangbrüche, Basenmodifikationen, Deletionen, DNA–DNA, Inter- und Intrastrang Crosslinks sowie DNA-Protein Crosslinks (Moustacchi, 2000).

Moustacchi gibt einen Überblick über die verschiedenen Reparatsysteme der Zelle. Um die schadhaften Veränderungen der DNA zu beseitigen, verfügt die Zelle über verschiedene Reparatsysteme, die dafür sorgen, die Basenpaarungen der DNA konstant zu halten. Mit der Basen-Exzisions-Reparatur werden fehlerhafte Basen nach Erkennen durch DNA-Glycasen ausgetauscht. Außerdem können DNA-Strangbrüche repariert werden. Durch Veränderung der helikalen Struktur identifiziert die Nukleotid-Exzisions-Reparatur mit Hilfe der Erkennungsproteine XPC, XPA und RPA DNA-Addukte, die beispielsweise durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder UV-Licht verursacht werden. Bei Patienten mit Xeroderma pigmentosum liegt ein Defekt im XPA-Gen der Nukleotid-Exzisions-Reparatur vor, so dass eine erhöhte Sensitivität gegenüber Sonnenlicht und Addukt induzierenden Chemikalien besteht. Die Mismatch-Reparatur dient der Eliminierung falsch gepaarter Nukleotide. An deren Erkennung sind die Proteine MSH2 und MSH6 beteiligt (Goode et al., 2002; Moustacchi, 2000).

Bei Versagen dieser Reparaturmechanismen können Proteine der Zellzykluskontrolle den Zellzyklus stoppen oder Apoptose, also den programmierten Zelltod einleiten. Auch eine genomische Instabilität kann die Folge sein, welche die Bildung von Mutationen begünstigt.

1.3 Karzinogenese

Laut dem Mehrstufenmodell der Karzinogenese verläuft die maligne Entartung einer gesunden Zelle in mehreren Stufen. Bei der Initiation wird durch chemische und physikalische Noxen sowie onkogene Viren eine Mutation in einer Zelle ausgelöst und ein irreversibler DNA-Schaden verursacht. Die bis zu 20 Jahre dauernde Latenzphase beschreibt den Zeitraum zwischen dem Einfluß einer Noxe und der Tumormanifestation. In der Promotionsphase kommt es zu einem zellschädigenden Prozess, der die Latenzzeit bis zur Tumorprogression verkürzt. Dabei wird durch bestimmte Noxen (Promotoren), die ohne vorherige Initiation keine Entartung der Zelle hervorrufen würden, eine Steigerung der Zellproliferation eingeleitet. Kofaktoren (Kokarzinogene) können den Verlauf beschleunigen. Im Stadium der Progression kommt es zur irreversiblen Proliferation veränderter Zellklone, zur Karzinomentstehung (vgl. Abbildung 1).

Auslöser für die maligne Transformation einer Zelle sind zwei oder mehr Mutationen in Proto-Onkogenen bzw. Tumorsuppressorgenen. Proto-Onkogene kodieren Proteine, die das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung fördern. Mutationen dieser Gene können eine übermäßige Aktivität wachstumsstimulierender Proteine bewirken, wobei die Proto-Onkogene zu Onkogenen aktiviert werden. Tumorsuppressorgene kodieren Proteine, die das Zellwachstum unterdrücken. Durch Mutationen können diese Gene inaktiviert werden und die Zelle verliert wachstumshemmende Proteine. Unkontrolliertes Zellwachstum ist die Folge.

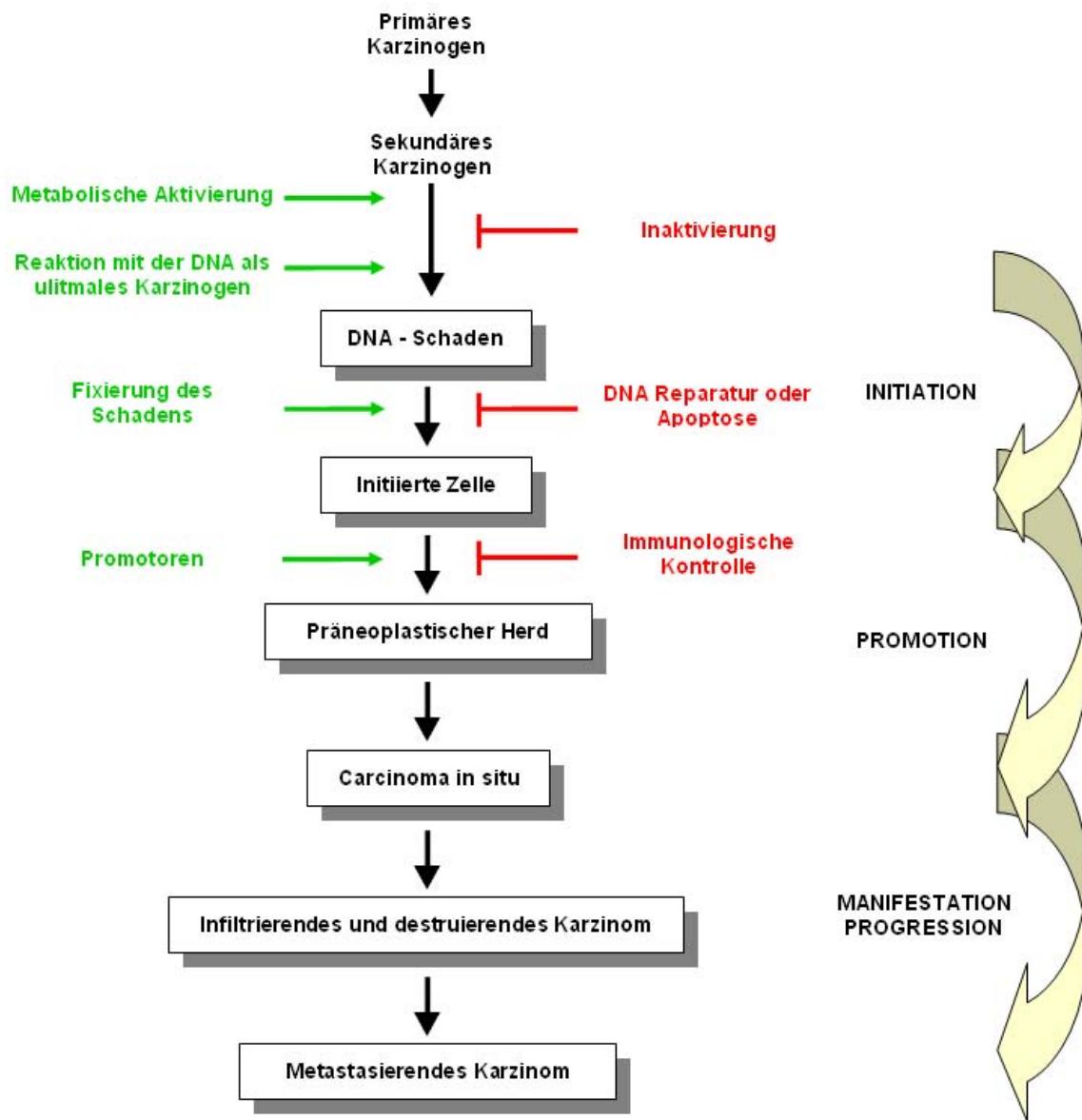


Abbildung 1: Mehrstufenmodell der Karzinogenese

Darstellung der Karzinogenesestufen bei zu Grunde liegender chemischer Karzinogenese: Bei der Initiation reagiert ein primäres oder nach metabolischer Aktivierung ein ultimales Karzinogen mit der DNA. Es kann die Inaktivierung des Karzinogens erfolgen oder, falls bereits ein DNA-Schaden vorliegt, die Reparatur oder Apoptose eingeleitet werden. Bei Versagen dieser Mechanismen kommt es zur Fixierung des Schadens. In der Phase der Promotion kann durch den Einfluß von Promotoren eine initiierte Zelle einen präneoplastischen Herd oder ein Carcinoma in situ bilden. Bei der Progression entsteht ein infiltrierendes und destruierendes Karzinom. Es kommt zur Metastasierung (Neumann, 1992).

1.4 Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) als Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH)

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) sind organische Verbindungen mit zwei miteinander verbundenen, annellierte Benzolringen. Sie bilden ein kondensiertes Ringsystem. Die Leitsubstanz der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) ist Benzo[a]pyren (BaP), das im Körper zu Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) metabolisiert wird.

PAH entstehen durch unvollständige Verbrennung organischen Materials. Sie kommen in Kokereien (Popp et al., 1997), in der Eisen- und Stahlindustrie, im Steinkohleteer, in Bitumen (Maier et al., 1994) und in Dieselabgasen vor (Ono-Ogasawara und Smith, 2004). Außerdem können sie bei Waldbränden entstehen (Gabos et al., 2001). Auch beim Grillen und Rösten von Nahrungsmitteln können sich PAH bilden (Lijinsky, 1991). Beim Verbrennen von Zigarettentabak sind hauptsächlich in der Partikelphase PAH nachweisbar. An Staub- und Rußpartikel, sowie an Pollen gebunden werden PAH in der Luft verteilt. Durch Inhalation PAH-belasteter Einatemluft und die Aufnahme kontaminierten Lebensmittel gelangen sie in den oberen Aerodigestivtrakt des Menschen. Dort entfalten sie ihre karzinogene Wirkung. Von der International Agency for Research on Cancer (IARC) wurde Benzo[a]pyren als Karzinogen 2A eingestuft, also als „wahrscheinlich“ krebserregend (International Agency for Research on Cancer, 1983; Smith et al., 2001).

In experimentellen Studien konnten durch Exposition gegenüber PAH Tumore bei Versuchstieren induziert werden. An Nagern wurden durch BaP Tumore an Haut, Kehlkopf und Lunge und Magen verursacht (Hoffmann D. und Wynder EI, 1994; Sharma et al., 1997). Bei *in vitro*-Versuchen an menschlichen Lymphozytenkulturen wurden durch BPDE Chromosomenaberrationen ausgelöst (Wei et al., 1996), in Mucosazellen des oberen Aerodigestivtraktes wurden durch Benzo[a]pyren Einzelstrangbrüche induziert, insbesondere bei Zellspender mit hohem Alkoholkonsum (Harréus et al., 1999).

Bevor die PAH im Körper ihre karzinogene Wirkung entfalten, werden sie hauptsächlich durch Enzyme des Cytochrom P 450-Systems metabolisiert und dadurch aktiviert. Dies entspricht der Phase I der Biotransformation. Das Benzo[a]pyren wird durch Monoxidasen und durch Epoxidhydratases zum reaktiven Epoxid oxidiert, dem BPDE (vgl. Abbildung 2). Dieses reagiert mit der DNA; Adduktbildung und Strangbrüche sowie eine inkomplette Exzisionsreparatur sind die Folge.

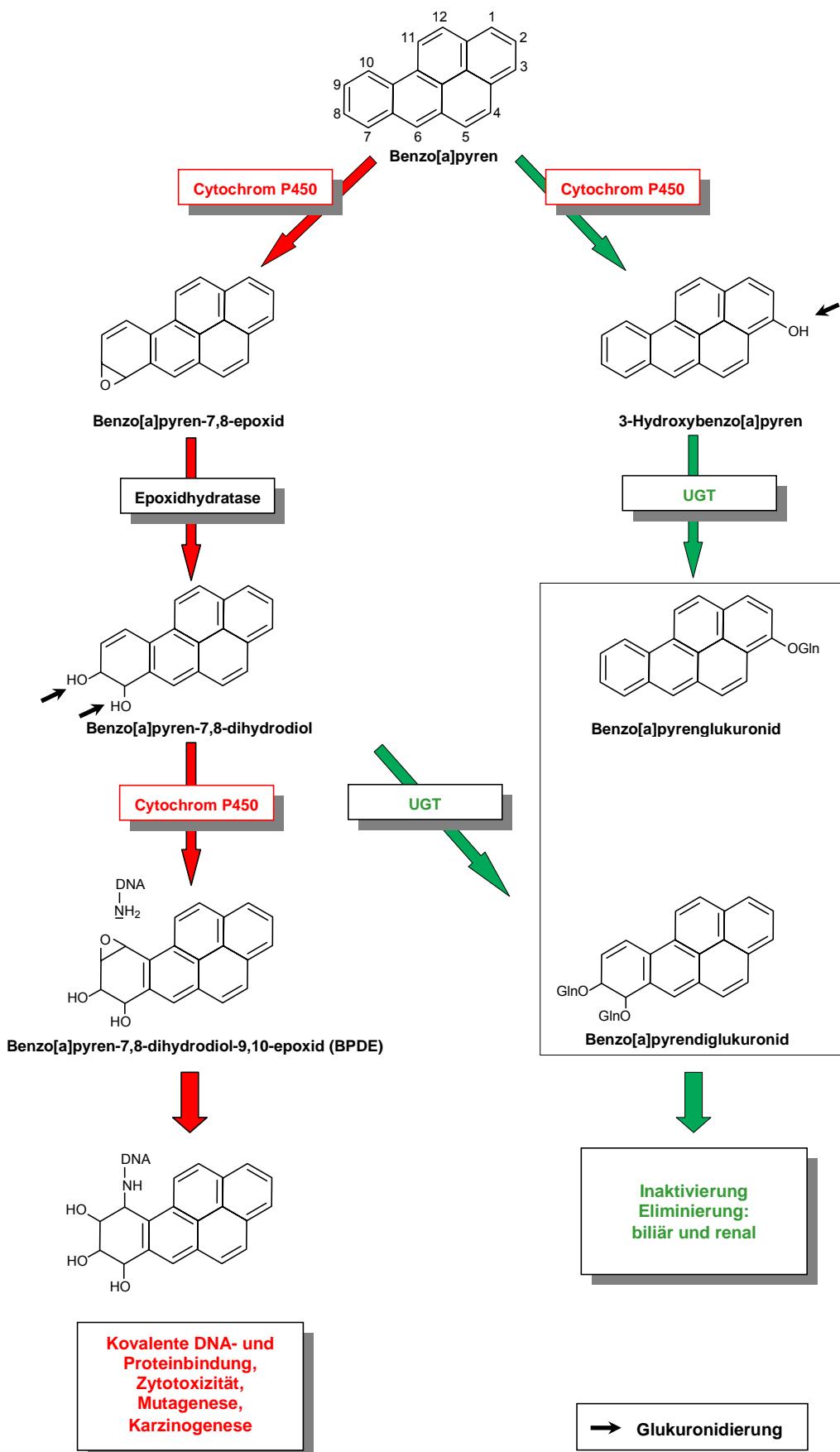


Abbildung 2: Metabolismus von Benzo[a]pyren, der Leitsubstanz der PAH

Metabolisierung und Aktivierung des Prokarzinogens Benzo[a]pyren in das ultimale Karzinogen BPDE; Inaktivierung durch eine UDP-Glucuronyltransferase (UGT) in Benzo[a]pyrenglukuronid und Benzo[a]pyrendiglukuronid.

1.5 Pflanzliche Phenole als zytoprotektive Substanzen

Regelmäßige Aufnahme von Obst und Gemüse mit der Nahrung schützt vor chronischen Erkrankungen und reduziert unter anderem das Risiko für die Entwicklung von Tumoren, kardiovaskulären Erkrankungen, Schlaganfall, Diabetes und Morbus Alzheimer (Liu, 2003). Ein protektiver Effekt von obst- und gemüsereicher Ernährung konnte für Tumoren von Lunge, Mundhöhle, Pharynx, Oesophagus, Magen, Pankreas, Colon, Mamma, Zervix, Endometrium, Ovar und für Leukämie in epidemiologischen Studien festgestellt werden (Block et al., 1992; Steinmetz und Potter, 1996). Als Ursache für die tumorprotektive Wirkung dieser Pflanzenstoffe werden neben der antioxidativen Wirkung eine Inhibition der Zellproliferation, der Expression von Onkogenen, der Signaltransduktionswege sowie eine Enzyminhibition von Phase I Enzymen und damit Minderung der Aktivierung von Karzinogenen diskutiert. Außerdem scheinen eine Induktion der Zelldifferenzierung, der Expression von Tumorsuppressorgenen, der Apoptose sowie eine Enzyminduktion von Phase II Enzymen und damit Steigerung der Detoxifikation eine Rolle zu spielen. Auch eine Modulation des Immunsystems und ein Schutz vor DNA-Bindung sind vermutlich für die tumorprotektiven Eigenschaften der Phenolen verantwortlich (Liu, 2004).

Eine Untergruppe dieser *Phytochemicals* sind pflanzliche Phenole, die aus einem oder mehreren aromatischen Ringen mit einer oder mehreren gebundenen Hydroxylgruppen bestehen. Diese Pflanzenphenole werden eingeteilt in phenolische Säuren, Flavonoide, Stilbene, Coumarine und Tannine (Liu, 2004). Die in dieser Arbeit untersuchten zytoprotektiven Pflanzenphenole gehören der Gruppe der Flavonoide bzw. Tannine an. Eine Übersicht der Stoffgruppen ist in Abbildung 3 bzw. 4 dargestellt.

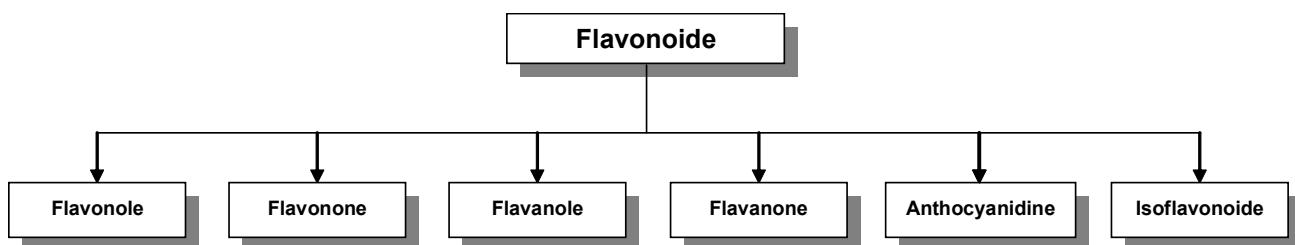


Abbildung 3: Übersicht über die Stoffgruppe der Flavonoide

Flavonole, Flavonone, Flavanole (Catechine), Flavanone, Anthocyandine und Isoflavonoide als Untergruppen der Flavonoide (Liu, 2004).

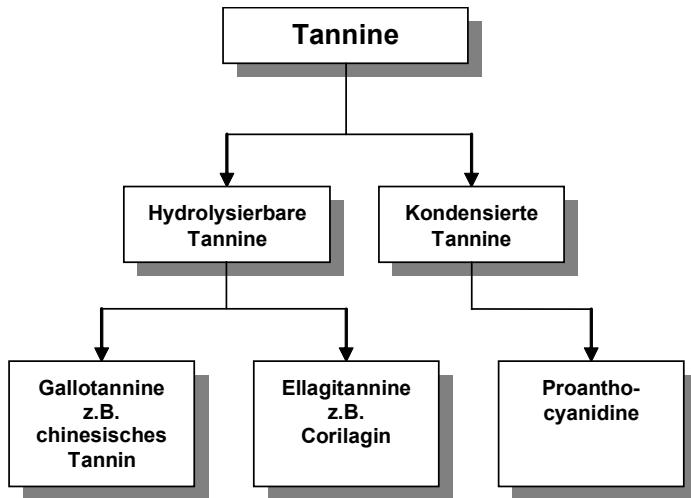


Abbildung 4: Übersicht über die Stoffgruppe der Tannine

Unterteilung in hydrolysierbare und kondensierte Tannine. Hydrolysierbare Tannine werden in Gallotannine, wie z.B. das chinesische Tannin (Tanninsäure), und Ellagitannine, wie z.B. Corilagin, differenziert. Kondensierte Tannine werden in Proanthocyanidine differenziert.

1.5.1 (+)-Catechin als Vertreter der Flavonoide

Mit einem Anteil von zwei Dritteln aller mit der Nahrung aufgenommener Phenole und mehr als 4000 identifizierten Einzelstoffen, stellen die Flavonoide die größte Gruppe der Pflanzenphenole dar. Ihr Name leitet sich von ihrer gelben Farbe ab (lat. *flavus* - gelb). Sie bestehen grundsätzlich aus zwei aromatischen Ringen A und B, und einem heterozyklischen Ring C (vgl. Abbildung 5). An Hand von Unterschieden in der Grundstruktur des C-Ringes werden die Flavonoide eingeteilt in Flavonole (z.B. Quercetin, Kämpferol), Flavone (z.B. Luteolin, Apigenin), Flavanole (z.B. Catechine), Flavanone (z.B. Naringenin), Anthocyanidine und Isoflavonoide (z.B. Genistein).

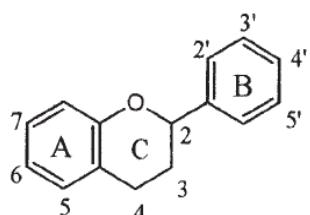


Abbildung 5: Grundstruktur der Flavonoide

Zwei aromatische Ringe A und B, und ein heterozyklischer C-Ring als Grundstruktur (Liu, 2004).

In der Natur kommen die Flavonoide als Konjugate in veresterter oder glykosylierter Form vor. Eine Ausnahme bilden hier Flavanole, die in freier Form als Aglykone vorliegen. Flavonoide sind in Pflanzen vor allem in den Außenschichten zu finden und dienen den Pflanzen als Antioxidantien, Fraßschutz, Farb- und Lockstoff. Die tägliche Flavonoidaufnahme des Menschen wird auf wenige Hundert Milligramm bis 650 mg/d geschätzt (Hollman und Katan, 1999; Liu, 2004). Im Körper erfolgt jedoch eine

Metabolisierung der Polyphenole, wobei glukuronidierte und sulfatierte Konjugate mit oder ohne Methylierung entstehen. Die maximalen Polyphenolkonzentrationen im Plasma nach dem Verzehr von polyphenolhaltigen Lebensmitteln liegt im Bereich von 0,1-10 µmol/l (Kroon et al., 2004). Die Plasmakonzentrationen speziell von Flavanolen überschreiten selten 1 µmol/l, da nur eine geringe Resorption und rasche Elimination stattfindet (Manach et al., 2004). Im Körper wirken sie unter anderem tumorprotektiv, antioxidativ, entzündungshemmend, gerinnungshemmend, lipidsenkend, hypotensiv, antidiabetogen. Jedoch besteht bei manchen Flavonoiden in hohen Konzentrationen auch eine toxische Wirkung (Mennen et al., 2005).

(+)-Catechin zählt zusammen mit (-)-Epicatechin (EC), (-)-Epicatechin Gallat (ECG), (-)-Epigallocatechin (EGC) und (-)-Epigallocatechin Gallat (EGCG) zu den Flavanolen bzw. Catechinen. Abbildung 6 gibt die Strukturformeln der Catechine wieder.

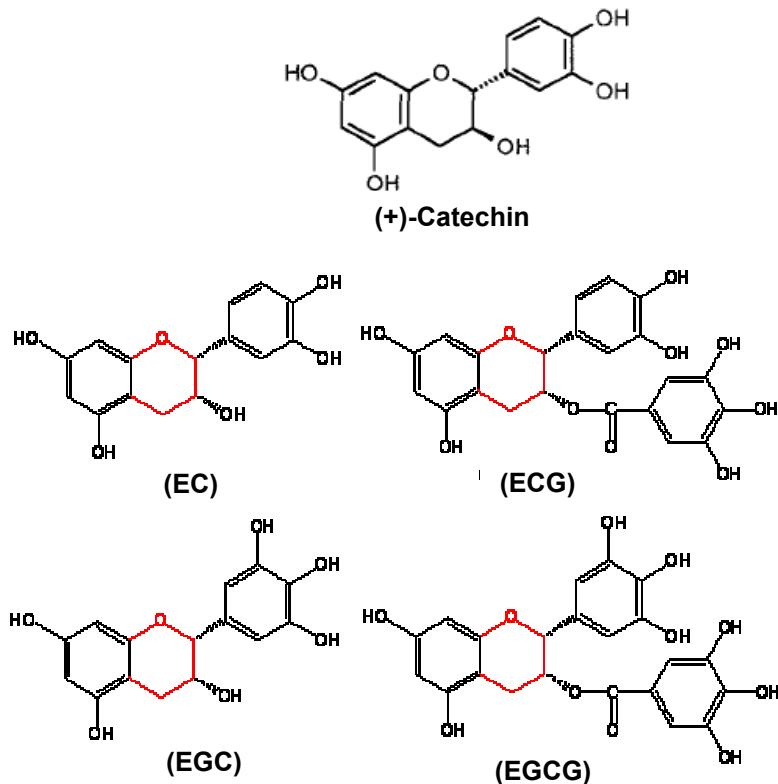


Abbildung 6: Catechin-Strukturformeln (Flavanole)

(Scalbert und Williamson, 2000)

(+)-Catechin findet sich vor allem in Äpfeln, Aprikosen, Süßkirschen, Weintrauben, Nektarinen, Pflaumen, Erdbeeren, außerdem in Bohnen, in dunkler Schokolade und in Rotwein. Auch in grünem und schwarzem Tee ist (+)-Catechin enthalten, aber der Hauptcatechingehalt wird durch EC, ECG, EGC und EGCG bestimmt (Arts et al., 2000a; Arts et al., 2000b).

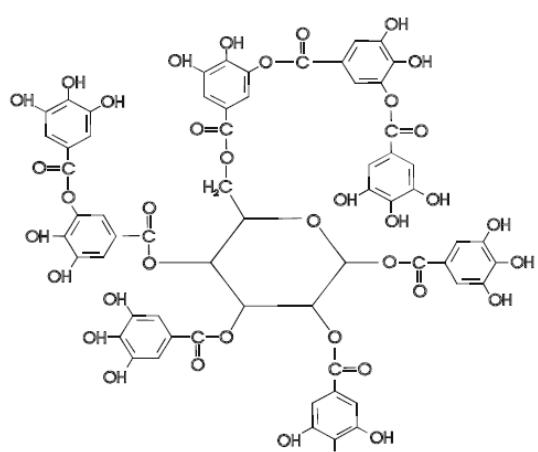
In tierexperimentellen Versuchen konnte durch Catechine aus grünem Tee die Inzidenz von Mutagen induzierten Tumoren vermindert werden. Crespy und Williamson geben einen Überblick über Catechinwirkungen an Tiermodellen. Unter anderem konnte die Inzidenz von oralen Tumoren reduziert werden, die durch 7,12-Dimethylbenz[a]anthracen hervorgerufen wurden. Auch Magentumoren durch Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon induzierte Lungentumore konnten vermindert werden. Eine Reduktion von Lebertumoren konnte erzielt werden, wenn Diethylnitrosamin als genotoxische Substanz eingesetzt wurde (Crespy und Williamson, 2004). Bei *in vitro*-Versuchen an humanen Hepatomazelllinien Hep G2 konnten Benzo[a]pyren und BPDE induzierte DNA-Strangbrüche durch Catechin vermindert werden (Dauer et al., 2003).

1.5.2 Tanninsäure (Chinesisches Tannin) als Vertreter der Tannine

Zu den pflanzlichen Phenolen gehören auch die als Gerbstoffe bekannten Tannine. Gerbstoffe sind pflanzliche Substanzen, die in der Lage sind, Tierhaut in Leder zu verwandeln. Aufgrund vieler Hydroxyl- und anderer funktioneller Gruppen können sie Querverbindungen mit Proteinen und Makromolekülen eingehen und Präzipitate, d.h. Niederschläge bilden. Alle Tannine weisen ein Molekulargewicht zwischen 500 und 3000 D auf.

Man unterscheidet hydrolysierbare von kondensierten Tanninen. Hydrolysierbare Tannine enthalten einen Kern aus polyhydriertem Alkohol, z.B. Glucose, und Hydroxylgruppen, die entweder mit Gallic acid verestert sind (Gallotannine) oder mit Hexahydroxy diphenic acid (Ellagitannine). Zu den Gallotanninen zählen beispielsweise Chinesisches Tannin (Tanninsäure), Türkisches Tannin und Hamamelis Tannin (vgl. Abbildung 7). Ein Vertreter der Ellagitannine ist das Corilagin.

Kondensierte Tannine sind als Flavanolderivate mit Catechinen verwandt. Sie werden als Proanthocyanidine bezeichnet.



Tanninsäure

Abbildung 7: Strukturformel des hydrolysierbaren Tannines Tanninsäure als Vertreter der Gallotannine (Labieniec und Gabryelak, 2005).

Tannine kommen unter anderem in Hirse, Gerste, Erbsen, Bohnen, Äpfeln, Bananen, Brombeeren, Trauben, Pfirsichen, Birnen, Pflaumen, Erdbeeren, Himbeeren und in Kakao vor. Auch in Tee und Wein sind sie enthalten. Die tägliche Tanninaufnahme des Menschen wird auf 1 g/d geschätzt. Zu den Effekten, die Tannine im Organismus hervorrufen, werden unter anderem adstringierende, mutagene, antimutagene, antioxidative, antimikrobielle, blutgerinnungsfördernde, blutdrucksenkende, lipidsenkende und immunmodulatorische Wirkungen diskutiert (Chung et al., 1998; Sanyal et al., 1997). Tannin besitzt also einerseits antimutagene Eigenschaften und wirkt protektiv gegenüber genotoxischen Schäden. Andererseits kann Tannin in hohen Konzentrationen selbst genotoxische Schäden induzieren.

Im Salmonella Assay konnte die antimutagene Aktivität von Tanninsäure gegenüber polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (Huang et al., 1985), N-Nitroso-Verbindungen wie MNNG (Gichner et al., 1987) und Nitropyrenen (Kuo et al., 1992) nachgewiesen werden. Das hydrolysierbare Hamamelis Tannin zeigte im Comet Assay an Hepatomazelllinien Hep G2 eine antigenotoxische Wirkung gegenüber Benzo-[a]pyren und BPDE (Dauer et al., 2003). Jedoch konnten auch genotoxische Effekte von Tannin anhand von DNA-Migrationen im Comet Assay nachgewiesen werden (Dauer et al., 2003; Wu et al., 2004). Als Ursache für genotoxische Effekte wurde eine mögliche prooxidative Wirkung von Tanninsäure durch Bildung von Hydroxylradikalen diskutiert (Khan et al., 2000).

1.6 Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)

Die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) wurde 1984 von Østling und Johanson entwickelt, um das Migrationsverhalten von Einzelzellen nach Bestrahlung zu untersuchen (Østling und Johanson, 1984). Diese ursprünglich neutrale Version der Mikrogelelektrophorese wurde später modifiziert und im alkalischen Milieu bei pH > 13 durchgeführt. Dies ermöglichte den Nachweis von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen, DNA-Crosslinks und inkompletten Exzisionsreparaturstellen (Singh et al., 1988; Tice et al., 2000).

Mit der alkalischen Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) können durch Fremdstoffinkubationen ausgelöste DNA-Schäden quantifiziert werden. Durch das alkalische Milieu wird die DNA zunächst denaturiert. In der anschließenden Elektrophorese erfolgt eine Wanderung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld. Dabei ist die Wanderungsstrecke umso größer, je stärker die DNA fragmentiert ist. Fluoreszenzmikroskopisch zeigt sich ein kometenähnliches Verteilungsmuster mit weitgehend intakter DNA im Kometenkopf und fragmentierter DNA im Kometenschweif. Zur Quantifizierung dient das *Olive Tail Moment*, das Produkt aus DNA-Wanderungsstrecke und relativer Fluoreszenzdichte im Kometenschweif (Olive und Banath, 1993). Der Comet Assay findet unter anderem Anwendung in der Genotoxizitätstestung neuer Chemikalien, in der Darstellung von Umweltbelastung mit bestimmten Genotoxinen, im Biomonitoring und in der Messung von DNA-Schäden und Reparatur (Collins, 2004).

1.7 Einsatz von Miniorgankulturen

Basierend auf der Technik von Steinsvåg (Steinsvåg et al., 1991) entwickelte Kleinsasser et al. das Modell der Miniorgankulturen an humaner nasaler Mukosa weiter und kombinierte es zur Analyse der DNA-Schäden mit dem Comet Assay. Wiederholte Expositionen der Kulturen gegenüber Nitrosoverbindungen, Natriumdichromat, Phtalaten und BPDE ermöglichen die Beurteilung von kumulativen Toxizitäten (Kleinsasser et al., 2001a; Kleinsasser et al., 2004). Auch zur Untersuchung von Reparaturvorgängen ist ein solches Modell geeignet (Resau et al., 1987). Durch die Kultivierung im Epithelverband und die bestehenden metabolischen Eigenschaften imitiert dieses *in vitro*-Verfahren die *in vivo* Bedingungen besser als ein Einzelzellmodell. Jedoch sind die genauen metabolischen Vorgänge der Miniorgankulturen noch größtenteils unklar.

1.8 Aufgabenstellung

Die Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich wird von endogenen und exogenen Risikofaktoren beeinflußt. Vor allem die individuelle Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität scheinen als endogene Risikomarker von Bedeutung und bestimmen die individuelle Empfindlichkeit (Suszeptibilität), an einem Malignom im oberen Aerodigestivtrakt zu erkranken. Daneben existieren jedoch auch Substanzen, die protektiv wirken und die DNA vor genotoxischen Einflüssen schützen (Dauer et al., 2003; Masuda et al., 2001). Diese Stoffe zu identifizieren und deren Wirksamkeit zu bewerten, ist für chemopräventive und chemotherapeutische Ansätze von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde an oropharyngealen Epithelzellen von Patienten mit Oropharynxkarzinom bzw. von tumorfreien Personen die Mutagensensitivität gegenüber BPDE, die DNA-Reparatur nach genotoxischer Schädigung mit BPDE sowie die DNA-Reparaturkapazität der beiden Kollektive untersucht und verglichen. Dabei standen folgende Fragen im Vordergrund:

- Wie ist die genotoxische Wirkung des Tabakkarzinogens BPDE (9 µM) auf die DNA oropharyngealer Schleimhautzellen von tumorfreien Personen bzw. Patienten mit Oropharynxkarzinom, und bestehen Unterschiede in der Mutagensensitivität?
- In welchem Umfang können die induzierten DNA-Schäden an Epithelzellen von Kontrollpersonen bzw. Tumorpatienten in vorgegebenen Zeitintervallen von 15 bzw. 30 Minuten repariert werden, und können Unterschiede im Reparaturverhalten zwischen beiden Spendergruppen nachgewiesen werden?

Außerdem wurde die protektive Wirkung der Pflanzenphenole (+)-Catechin und Tanninsäure gegenüber BPDE induzierten DNA-Schäden an oropharyngealen Miniorganen nachgewiesen. Folgende Fragestellungen wurden untersucht:

- Wie wirken die Pflanzenphenole (+)-Catechin bzw. Tanninsäure in zwei gewählten Konzentrationen (1 und 5 µM) auf oropharyngeale Miniorgane?
- Bestehen protektive Effekte von (+)-Catechin bzw. Tanninsäure in zwei Konzentrationen gegenüber BPDE induzierten DNA-Schäden, und gibt es Unterschiede in der Wirkung beider Stoffe?

Als Methode zum Nachweis von DNA-Schäden, zur Bestimmung der Mutagensensitivität und der DNA-Reparaturkapazitäten wurde in dieser Arbeit die alkalische Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) gewählt.

2. PATIENTENGUT, MATERIAL UND METHODEN

2.1 Patientengut

Das für die Versuchsreihen verwendete Schleimhautgewebe wurde im Rahmen von operativen Eingriffen gewonnen. Die Operationen wurden in der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der LMU München durchgeführt. Durch die Biopsiegewinnung entstand kein zusätzliches Risiko. Nur Gewebe, welches operationsbedingt entfernt wurde, fand in der vorliegenden Arbeit Verwendung. Als Spender wurden nur Patienten ausgewählt, bei denen keine chronischen Infektions- oder Systemerkrankungen vorlagen. Die Patienten wurden über die Probenentnahme und ihre wissenschaftliche Verwendung schriftlich und mündlich aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Studie wurde gemäß den Richtlinien der Ethikkommission der LMU-München durchgeführt (Ethikantrag, Projekt Nr. 221/04). Die Biopsate wurden in physiologischer Kochsalzlösung gekühlt aufbewahrt und schnellstmöglich in das Labor *Klinisch Experimentelle Onkologie* der HNO-Klinik der LMU München transportiert.

2.1.1 Zellspender für die Versuchsreihen an Einzelzellen

Als Kontrollpersonen für die Versuchsreihen an Einzelzellen dienten 17 männliche Patienten zwischen 28 und 61 Jahren, bei denen chronisch rezidivierende Gaumenmandelentzündungen oder Vergrößerungen der Tonsillen vorlagen, und eine Entfernung der Mandeln klinisch indiziert war. Aus dem erhaltenen Operationspräparat wurde anhängende Gaumenbogenschleimhaut reseziert. Das Durchschnittsalter dieser Personengruppe betrug 42,9 Jahre, der Altersmedian 38,5 Jahre.

Für das Kollektiv der Tumorpatienten wurden 15 Männer zwischen 39 und 67 Jahren mit der Diagnose Oropharynx-, Zungengrund- oder Tonsillenkarzinom ausgewählt. Bei der operativen Tumorresektion konnte aus dem resezierten Gewebe tumorferne Oropharynxschleimhaut gewonnen werden. Das Durchschnittsalter dieser Patientengruppe betrug 57,2 Jahre, der Altersmedian 53,5 Jahre.

Bei allen Spendern wurde eine Anamnese erhoben mit besonderem Augenmerk auf Rauchen, Alkoholkonsum und beruflich bedingte Exposition gegenüber Fremdstoffen, um Vorbelastungen der Schleimhäute bewerten zu können (siehe Anhang 7.1).

2.1.2 Zellspender für die Versuchsreihen an Miniorgankulturen

Als Spender von Oropharynxschleimhaut für die Anzüchtung von Miniorgankulturen dienten zehn Patienten zwischen 16 und 66 Jahren, bei denen eine Tonsillektomie oder Uvulaentfernung durchgeführt werden musste. Es waren neun Männer und eine Frau darunter vertreten. Das Durchschnittsalter dieser Personen lag bei 34,9 Jahren, der Altersmedian bei 33,5 Jahren.

Für das Erstellen von Dosis-Wirkungskurven der getesteten Polyphenole wurden Miniorgane aus nasalen Epithelien kultiviert. Die Schleimhaut hierfür stammte von 6 Patienten, die infolge einer Hyperplasie der Concha nasalis inferior, also der unteren Nasenmuschel, unter einer behinderten Nasenatmung litten und sich deswegen einer Conchotomie unterziehen mussten.

2.2 Methodenspezifisches Labormaterial und Geräte

2.2.1 Chemikalien, Medien, Enzyme und Testsubstanzen

Chemikalien	Hersteller
Agar Noble	DIFCO, Detroit, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethyldiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na ₂ -EDTA)	Serva, Heidelberg
Low-Melting Agarose, Sea Plaque GTG	FMC-Bioproducts, Rockland, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
Normal Melting Agarose, Seakem LE	FMC-Bioproducts, Rockland, USA
N-Lauroyslsarcosin Natrium Salz	Sigma, Steinheim
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trishydroxymethylaminomethan (Trisma-Base)	Merck, Darmstadt
Trypanblau 0,4 %	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein

Medien und Zusätze	Hersteller
Airway Epithelial Cell Basal Medium	Promocell, Heidelberg
Aminosäuren, nicht essentiell	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
Amphotericin B	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
DMEM-Medium	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure)	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
MEM-Joklik (ohne L-Glutamine und NaHCO ₃)	Linaris, Bettingen am Main
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim
Phosphate buffered saline (PBS, ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat)	Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein
Supplement Pack	Promocell, Heidelberg

Enzyme	Hersteller
Hyaluronidase aus Schafshoden	Roche Diagnostics, Mannheim
Kollagenase P aus Clostridium histolyticum	Roche Diagnostics, Mannheim
Protease aus Streptomyces griseus	Sigma, Steinheim

Testsubstanzen	Hersteller
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	Midwest Research Institute, Kansas
(+)-Catechin	Roth, Karlsruhe
Tanninsäure (Chinesisches Tannin)	Roth, Karlsruhe

2.2.2 Lösungen

MEM-Joklik

10,98 g Pulvermedium Joklik-MEM, ohne Glutamine, ohne NaHCO₃

2 g NaHCO₃

10 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung

Ad 1 l Aqua bidest, pH-Wert 7,20-7,25, sterilfiltrieren und portionsweise lagern

Enzymlösung zur Zellisolierung

50 mg Protease

10 mg Hyaluronidase

10 mg Kollagenase P

In 10 ml Joklik oder BEGM lösen, sterilfiltrieren und bis zur Verwendung im Wasserbad aufbewahren

Agarherstellung für Miniorgankulturen

0,45 g Agarpulver (Agar Noble)

mit 30 ml Aqua bidest. mischen, in der Mikrowelle erhitzen und sterilisieren

DMEM-Medium Herstellung

9,99 g DMEM-Pulver

1,96 g HEPES-Pulver

In 500 ml Aqua bidest. lösen, pH-Einstellung auf 7,2, Sterilfiltration, Abfüllen in 250 ml Portionen

Gießen von DMEM-Agarplatten

30 ml DMEM

6 ml FCS

75 µl nicht essentielle Aminosäuren

120 µl Amphotericin B

240 µl Penicillin-Streptomycin-Lösung

in einem sterilen Gefäß vermischen;

30 ml Agar Noble in der Mikrowelle erhitzen, mit supplementiertem Medium versetzen und 24-Well-Platten mit 250 µl beschichten

Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM)

Zu 500 ml Airway Epithelial Cell Basal Medium

Supplement Pack: BPE, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison Epinephrin, Trijodthyronin, Transferrin, Retinoic Acid

Unter sterilen Bedingungen zugeben, mischen, bei 4 °C aufbewahren

Agarose

0,5 %ige Low-Melting-Agarose

0,7 %ige Normal-Melting-Agarose

Unter kurzem Erhitzen in der Mikrowelle mit PBS lösen und bis zur weiteren Verwendung im Wasserbad (37 °C) aufbewahren

Lysestammlösung

146,4 g NaCl (2,5 M)

1,2 g Trizma-Base (10 mM)

37,2 g NA₂-EDTA (100 mM)

10 g N-Lauroylsarcosinnatriumsalz (1%)

Ad 1 l Aqua bidest., pH-Wert auf 10 einstellen

Lysepuffer

1 ml Triton-X

10 ml DMSO

89 ml Lysestammlösung

Elektrophoresepuffer

24 g NaOH-Plätzchen (300 mM)

0,744 g Na₂-EDTA (1 mM)

Ad 2 l Aqua bidest.

Neutralisationspuffer (400 mM)

48,5 g Trizma-Base in

1 l Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 7,5 einstellen, bei Raumtemperatur lagern

Ethidiumbromid-Färbelösung

0,2 mg/ml Ethidiumbromid in Aqua bidest. (Stammlösung) bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahren,
1:10 mit Aqua bidest. verdünnen (Färbelösung) und sterilfiltrieren

2.2.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Deckgläser zum Mikroskopieren (24 x 70 mm) Glasdicke 0,08-0,12 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton, Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltriereinheiten, steril 0,22 µm Filter Unit, MillexR-GV, MillexR-GS	Millipore, Eschborn
Microtiterplatte Cellstar, mit Abdeckplatte und 96 Vertiefungen	Greiner, Frickenhausen
24-Multiwellplatte	Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA
Objektträgerkasten aus Polyesterol für 50 Objektträger (76 x 26)	GLW, Würzburg
Objektträger zum Mikroskopieren (76 x 26 mm), je 5 mm seitlich mattiert	Langenbrinck, Emmendingen
Pipettenspitzen steril	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluß (13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluß (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Stabpipetten (2, 10, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen

2.2.4 Technische Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Voyager	Ohaus, Gießen
Auswertung/Datenspeicherung:	
Programm Komet 3.1.	Kinetic Imaging
Datenspeicherung	Microsoft Excel
Brutschrank 37 °C, 5 % CO ₂ , 100 %	Heraeus, Hanau
Luftfeuchtigkeit	
Elektrophoresenetzgerät E865	Renner, Darmstadt
Horizontale Elektrophoresekammer (237 x 180 mm)	Renner, Darmstadt
Kühlschrank (+4 °C) und Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart
Magnetruhrer Combimag RCT	IKA, Staufen
Mikroskop:	
Standardmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop DMLB, Filtersystem N2.1,	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Grünanregung BP 516-560, RKP 580 LP 580,	
Objektive 40x/0,5, 10x/0,22, 4x/0,1	
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht, Schondorf
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Sterilbank, Herasafe	Heraeus, Hanau
Waage 1419	Sartorius, Gießen
Zellzählkammer nach Neubauer	Marienfeld
Zentrifuge Varifuge 3,0RS und 3,0R	Heraeus, Hanau

2.3 Einzelzellinkubation

2.3.1 Gewinnung von Einzelzellen

Zunächst wurden blutige und bindegewebige Anteile vom Biopsat entfernt und Schleimhautstreifen mit einem sterilen Skalpell in 1 mm³ große Stücke zerkleinert. Um nun die Einzelzellen aus dem Epithelverband herauszulösen, wurden die Mukosafragmente in einer steril filtrierten Enzymlösung inkubiert, bestehend aus 5 mg/ml Protease aus Streptomyces griseus, 1 mg/ml Hyaluronidase aus Schafshoden, und 1 mg/ml Kollagenase P aus Clostridium histolyticum in 10 ml Joklik-Medium (60 min, Schüttelwasserbad: Frequenz 140 U/min, bei 37°C) (Pool-Zobel et al., 1994). Ab diesem Zeitpunkt wurden alle Versuchsschritte im Rotlicht durchgeführt, um zusätzliche Schäden der DNA durch UV-Licht zu vermeiden. Die erhaltene Zellsuspension wurde durch einen zweilagigen Gazestreifen in ein 50 ml-Zentrifugenrörchen filtriert, das verwendete Becherglas mit 1000 µl Joklikmedium gespült und auch diese Suspension zugegeben. Anschließend erfolgte eine zehnminütige Zentrifugation (400 U/min, 24°C, mit Bremse). Nun konnte der Überstand dekantiert und das Zellpellet in 1 ml Joklik resuspendiert werden.

2.3.2 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest

Mit dem Trypanblau-Ausschlusstest (Phillips H.J., 1973) wurden Zellzahl und Vitalität bestimmt, indem 50 µl der Zellsuspension in 50 µl der Trypanblau-Färbelösung aufgenommen und ein Tropfen auf eine Neubauer-Zählkammer aufgetragen wurde. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran stellten sich im Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerung farblos dar, während sich avitale Zellen mit geschädigter Zellmembran blau anfärbten. Es wurden zunächst alle Epithelzellen in 16 Kleinquadrate der Zählkammer ausgezählt. Eine entsprechende Menge Joklik-Medium wurde zur Zellsuspension gegeben, um Aliquots zwischen 50.000 und 100.000 pro 100 µl zu erhalten. Anschließend wurde aus dem Prozentsatz vitaler Zellen zur Gesamzellzahl die Vitalität in % bestimmt.

2.3.3 Schadstoffinkubation und DNA-Reparatur

Die Fremdstoffinkubation wurde mit dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) als Negativkontrolle und mit 9 µM Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) als Ausgangsschädigung bzw. zur Bestimmung der Mutagensenitivität durchgeführt. Die verwendete Konzentration von BPDE basierte auf Dosiswirkungskurven aus dem Labor und auf Literaturangaben (Harréus et al., 1999). Wie in mehreren anderen Studien zur Darstellung der Reparaturkapazität wurden Reparaturzeiten von 15 und 30 Minuten gewählt (Kleinsasser et al., 2005; Schmezer et al., 2001). Für die Negativkontrolle, die Ausgangsschädigung und die beiden Reparaturzeiten von 15 und 30 min wurden jeweils drei Ansätze angelegt. Zwei Ansätze dienten der Genotoxizitätsbestimmung und einer wurde für einen Vitalitätstest bereitgestellt, um mögliche zytotoxische Effekte durch BPDE nachzuweisen. Insgesamt kam man auf 12 Ansätze (vgl. Abbildung 8).

Auf einer 96-Multiwellplatte wurden jeweils 100 µl der Zellsuspension mit 10 µl des Teststoffs eine Stunde lang im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Im Anschluß überführte man einen Teil dieser Ansätze in 12 ml-Zentrifugenröhrchen und spülte jedes Well mit 100 µl Joklikmedium. Es wurde für 5 min bei 24 °C und 400 U/min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig vom Rand abpipettiert. Nach erneuter Zugabe von Joklikmedium wurde auf gleicher Stufe zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets der Negativkontrolle und der Ausgangsschädigung konnten gleich für die alkalische Mikrogelektrophorese (Comet Assay) auf Objekträger gebracht werden.

Die Ansätze, die für die Reparaturzeiten 15 und 30 min vorgesehen waren, wurden nochmals einem Waschschritt unterzogen, um ein anhaltendes Einwirken von BPDE auf die Zellen während der folgenden Inkubation zu vermeiden. Die Zentrifugenröhrchen wurden für die jeweilige Reparaturdauer bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt. Nach der abschließenden Zentrifugation stellte man auch diese Zellen für den Comet Assay bereit (vgl. Abbildung 8).

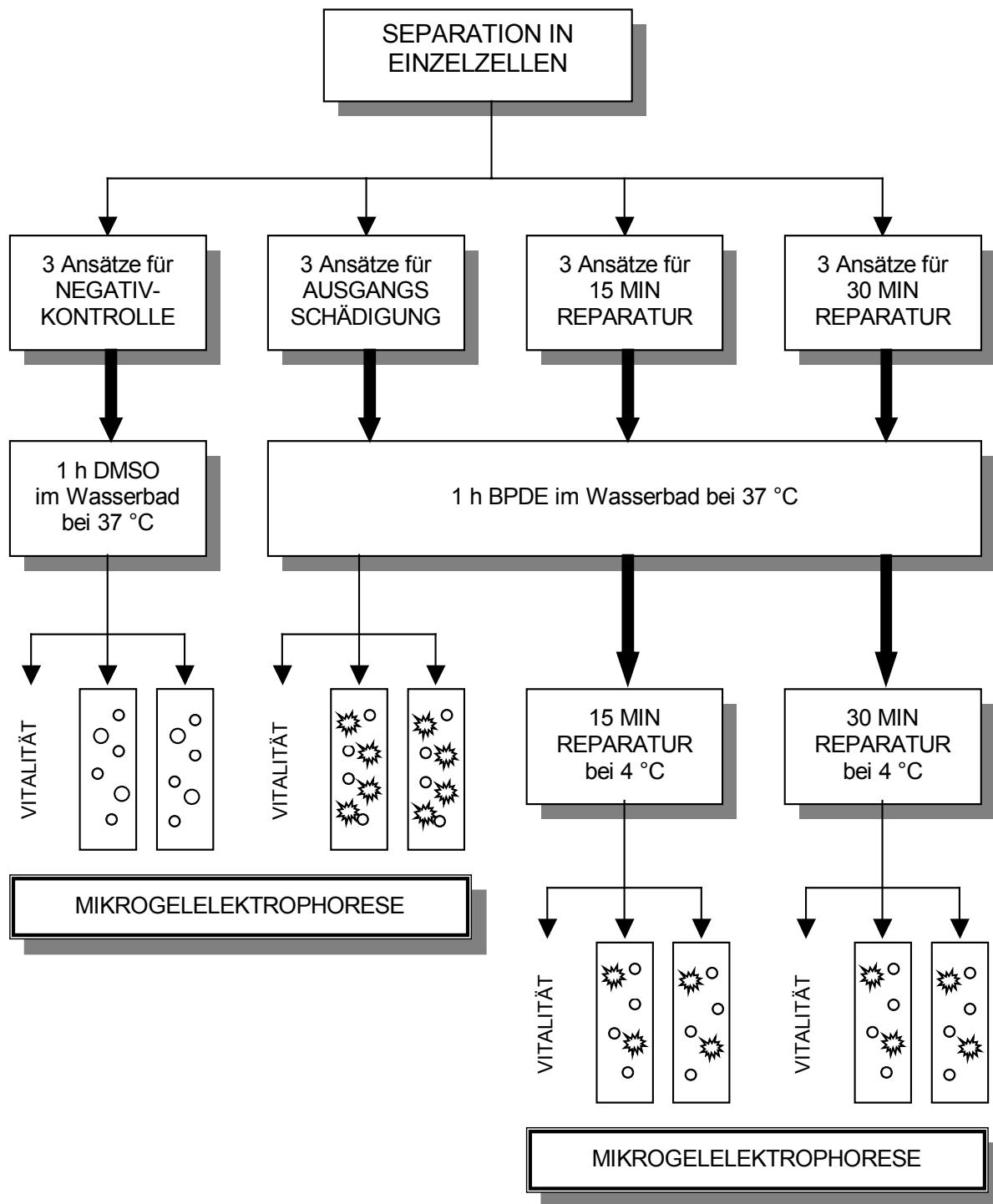


Abbildung 8: Ablaufdiagramm der Einzelzellinkubationen

Nach Erstellen von jeweils drei Ansätzen für Negativkontrolle, Ausgangsschädigung und Reparaturen von 15 min bzw. 30 min, erfolgte bei 37 °C eine einstündige Inkubation der Zellen mit DMSO für die Negativkontrolle, oder mit BPDE für die anderen Ansätze. Die Ansätze der Negativkontrolle und Ausgangsschädigung wurden anschließend für den Comet Assay auf Objektträger aufgetragen oder standen für einen Vitalitätstest bereit. Mit den Reparaturansätzen wurde nach 15 bzw. 30 min Reparaturzeit bei 4 °C wie oben beschrieben verfahren.

2.4 Miniorgankulturen

Die Untersuchungen zur protektiven Wirkung der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure wurden an Miniorgankulturen vorgenommen, die erstmals von Steinsvåg (Steinsvåg et al., 1991) beschrieben und von Kleinsasser für den Einsatz an Schleimhautzellen der Nase modifiziert wurde (Kleinsasser et al., 2004).

2.4.1 Schleimhautpräparation

Für die Gewinnung von Miniorgankulturen musste unter sterilen Bedingungen gearbeitet werden. Es wurde sowohl oropharyngeales als auch nasales Gewebe kultiviert. Das Resekta wurde von Bindegewebe und blutigen Anteilen befreit und die Mucosa sorgfältig in Gewebestücke von 1 mm Kantenlänge geschnitten. Anschließend erfolgten drei Waschschrifte in Phosphate Bufferd Saline-Medium. Jeweils zwei bis drei Fragmente wurden auf zuvor agarbeschichtete 24-Multiwellplatten übertragen und in 250 µl Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM) angezüchtet, das mit Bovine Pituitary Extract, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Trijodthyronin, Transferrin und Retinoic Acid versetzt war. Zweieinhalb 24-Multiwellplatten wurden auf diese Weise für eine Versuchsreihe angelegt.

Für die Kultivierung waren die 24-Wellplatten wie folgt vorbereitet worden: Eine Lösung aus 1,5 % Agar Noble in Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM) war mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), nicht essentiellen Aminosäuren und den Antibiotika Streptomycin, Amphotericin B und Fungizin versetzt worden. Mit dieser Lösung waren die Platten beschichtet und bis zum Gebrauch lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt worden.

2.4.2 Kultivierung von Miniorganen

Bis zum Entstehen von fertigen Miniorganen aus Oropharynxgewebe bedurfte es einer drei- bis vierwöchigen Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Die Kulturdauer von nasalem Epithel betrug hingegen nur sieben Tage. Nach dieser Zeitspanne konnte mit einem Mikroskop eine ausreichende Epithelialisierung erkannt werden (Abbildung 9). Jeden zweiten Tag wurde ein Austausch des BEGM-Mediums vorgenommen und einmal wöchentlich ein Plattenwechsel, um eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen und einen Schutz vor Infektionen zu gewähren.

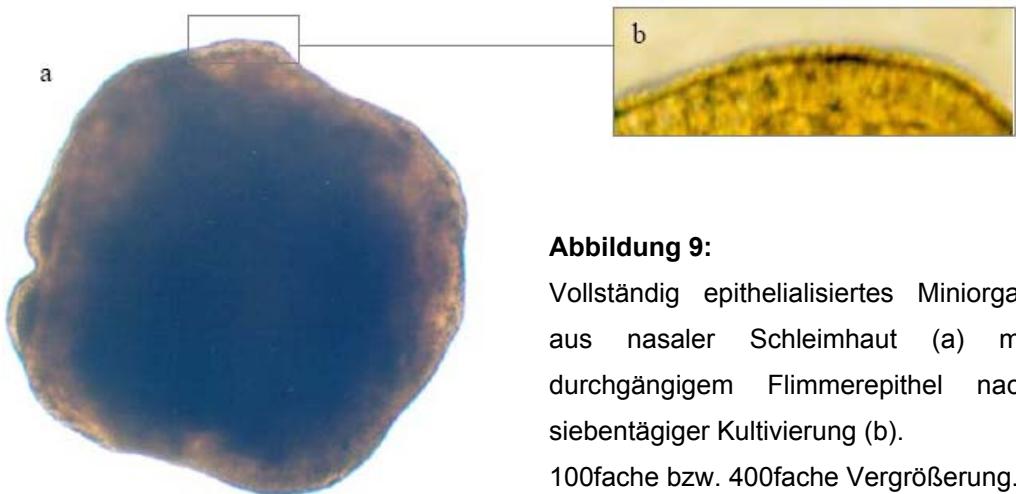


Abbildung 9:

Vollständig epithelialisiertes Miniorgan aus nasaler Schleimhaut (a) mit durchgängigem Flimmerepithel nach siebtägiger Kultivierung (b).
100fache bzw. 400fache Vergrößerung.

2.4.3 Fremdstoffexposition der kultivierten Schleimhautzellen

Nach drei bis vier Wochen standen die Miniorgane für die weiteren Experimente bereit. Als Teststoffe zur DNA-Protektion wurden (+)-Catechin und Tanninsäure (Chinesisches Tannin) in Konzentrationen von 1 μM und 5 μM verwendet. Die Konzentrationen basierten auf zuvor erstellten Dosis-Wirkungskurven an nasalen Miniorganen und auf Publikationen (Dauer et al., 2003; Wu et al., 2004). Als Negativkontrolle und als Lösungsmittel für die Substanzen diente DMSO. Die abschließende Schädigung der Kulturen erfolgte mit BPDE (9 μM).

Die Fremdstoffexposition erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die Miniorgane von jeweils zwei Reihen der 24-Multiwellplatten mit 25 μl der Testsubstanzen (+)-Catechin bzw. Tanninsäure in 250 μl BEGM inkubiert (60 min, 37 °C im Schüttelwasserbad). Nach der ersten Inkubationsphase wurden die Überstände abpipettiert und die Testsubstanzen zweimal mit 250 μl BEGM ausgewaschen.

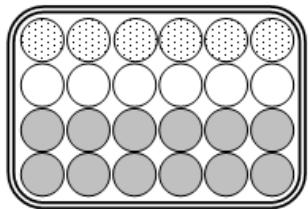
Im zweiten Schritt wurde pro Testsubstanz und Konzentration auf die Miniorgane einer Reihe der 24-Multiwellplatte zusätzlich 25 μl BPDE aufgetragen. Die Kulturen wurden unter gleichen Bedingungen für eine Stunde inkubiert und wieder mit BEGM gewaschen.

Das Inkubationsschema ist in Abbildung 10 dargestellt.

1. INKUBATIONSPHASE

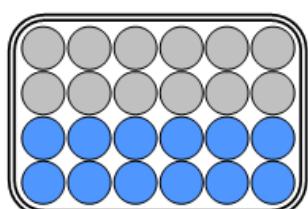
Inkubation mit den Teststoffen für 60 min

24 Wellplatte

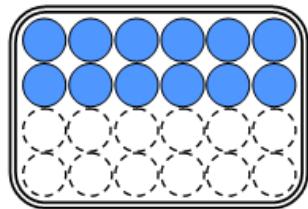


Teststoffe

Ca 1 μ M



Ca 5 μ M



Ta 1 μ M

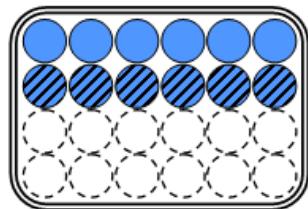
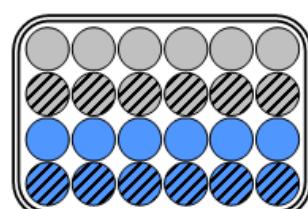
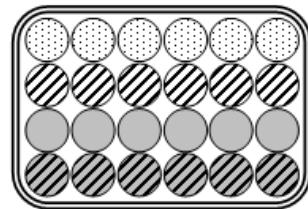
Ta 5 μ M



2. INKUBATIONSPHASE

Inkubation mit DMSO bzw. BPDE für 60 min

24 Wellplatte



○ Medium

● (+)-Catechin (=Ca)

● Tanninsäure (=Ta)

○ leere Wells

● DMSO

○ BPDE

● (++)-Catechin mit BPDE

● Tanninsäure mit BPDE

Abbildung 10: Darstellung der Teststoffinkubationen der Miniorgane

In der ersten Inkubationsphase: Einstündige Exposition der Miniorgane von jeweils 2 Reihen (= 12 Wells) gegenüber (+)-Catechin 1 μ M (Ca 1 μ M), (+)-Catechin 5 μ M (Ca 5 μ M), Tanninsäure 1 μ M (Ta 1 μ M) oder Tanninsäure 5 μ M (Ta 5 μ M). Anschließendes Auswaschen der Teststoffe.

In der zweiten Inkubationsphase: Für die Negativkontrolle einstündige Exposition der Kulturen gegenüber DMSO. Für die Schädigung einstündige Inkubation der Miniorgane mit BPDE. Jeweils eine Reihe (= 6 Wells) pro Teststoff und Konzentration wurde zusätzlich mit BPDE inkubiert. Anschließendes Auswaschen der Teststoffe.

2.4.4 Einzelzellisolierung aus Miniorgankulturen

Die Zellseparation aus dem Epithelverband wurde durch Inkubation in einem in BEGM gelösten Enzymmix erzielt (vgl. 2.2.1). Dazu wurden die Miniorgane aus jeweils zwei Wells in ein Eppendorf-Gefäß, versehen mit 600 µl der Enzymlösung, überführt. Für 45 Minuten inkubierte man die Gefäße im Schüttelwasserbad bei 37 °C. Bei allen weiteren Schritten wurde im Rotlicht gearbeitet, die Pipettievorgänge fanden auf Eis statt. Nach kurzem Rütteln auf dem Minishaker konnte das überschüssige Bindegewebe mit einer sterilen Kanüle aus der Zellsuspension entfernt werden. Zur Neutralisation wurde jeweils 600 µl FCS hinzugefügt, für zehn Minuten bei 800 U/min und 4 °C zentrifugiert und 1 ml Überstand vorsichtig vom Rand abpipettiert. Anschließend gab man 1 ml gekühltes PBS hinzu, zentrifugierte erneut und verwarf den Überstand. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Das Zellpellet wurde nun entweder für die Mikrogelektrophorese bereitgestellt oder für die Vitalitätstestung verwendet (vgl. Abbildung 11).

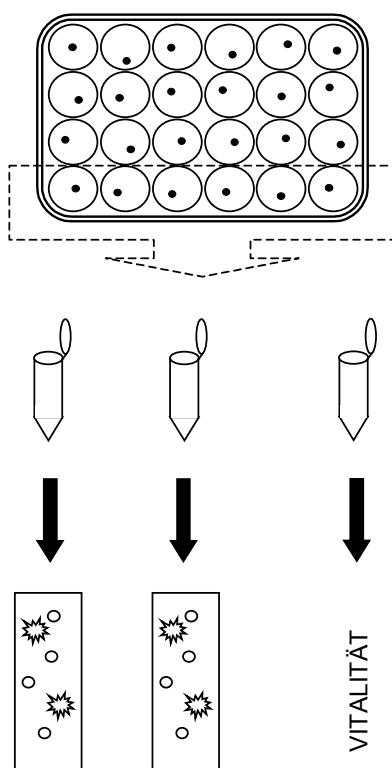


Abbildung 11: Zellseparation der Miniorgane

Die Miniorgane einer Reihe (= 6 Wells) wurden in drei Eppendorf-Gefäße überführt und mittels Enzymmix in Einzelzellen isoliert. Nach den folgenden Neutralisations- und Waschschriften wurden die Zellen aus zwei Eppendorf-Gefäßen auf Objektträger aufgetragen und standen für die Mikrogelektrophorese bereit. Mit den Zellen aus dem dritten Gefäß wurde ein Vitalitätstest durchgeführt.

2.5 Alkalische Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)

Um durch die Fremdstoffe induzierte DNA-Schäden erkennen und quantifizieren zu können, wurde die alkalische Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) angeschlossen.

2.5.1 Präparation der Objektträger

Um eine optimale Haftung der Zellen zu erzielen, wurde auf nummerierte und an den Längsseiten mattierte Objektträger eine erste Agaroseschicht aus 85 µl einer 0,5 % Normal Melting Agarose aufgebracht, die in PBS gelöst und in der Mikrowelle erhitzt wurde. Anschließend wurden Deckgläser aufgelegt. Darunter verteilte sich die Agarose gleichmäßig und die Objektträger wurden für 2 Tage getrocknet. Kurz vor dem weiteren Gebrauch wurden die Deckgläser wieder entfernt.

2.5.2 Zellfixierung und Lyse

Zur Fixierung der Zellen für die Mikrogelelektrophorese wurde das Zellpellet in 75 µl 0,7 % Low Melting Agarose resuspendiert und auf die vorpräparierten Objektträger aufgetragen. Nach dem Aushärten auf einer mit Eis gekühlten Metallplatte wurden nochmals 85 µl 0,7 % Low Melting Agarose aufgebracht.

Die Objektträger wurden für mindestens eine Stunde lichtgeschützt bei 4 °C in einer alkalischen Lyselösung bestehend aus 1 ml Triton X-100, 10 ml DMSO und 89 ml Lysestammlösung aufbewahrt. Dies diente der Auflösung der Zell- und Kernmembranen und damit der DNA-Freilegung.

2.5.3 Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung

Für die elektrophoretische DNA-Auf trennung wurden die Objektträger anodenwärts in eine horizontal ausgerichtete und mit Eiswasser gekühlte Elektrophoresekammer geschichtet. Diese wurde mit 4 °C kaltem Elektrophoresepuffer aufgefüllt. Zur Denaturierung und Entspiralisierung der DNA wurde eine Wartezeit von 20 Minuten eingehalten, bevor eine 20-minütige Elektrophorese bei 25 V und 300 mA angeschlossen wurde. Nach Wanderung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld wurden die Objektträger auf Färbebrücken gelegt und dreimal mit Neutralisationspuffer gespült.

Zum Anfärben der DNA wurde eine 1:10 Verdünnung einer Ethidiumbromid-Stammlösung angesetzt und diese steril filtriert. 75 µl dieses Fluoreszenzfarbstoffes wurden schließlich auf jeden Objektträger aufgetragen und Deckgläser aufgelegt. Bis zur Auswertung wurden sie lichtgeschützt bei 4 °C gelagert und feucht gehalten.

2.6 Digitale Auswertung

Zur Analyse der DNA-Migration wurde mit einem Fluoreszenzmikroskop und der Software Komet 3.1. (Kinetic Imaging, Liverpool, Großbritannien) gearbeitet. Abhängig vom Schädigungsgrad zeigte sich ein unterschiedliches Migrationsverhalten. Dabei ließen sich Zellen, deren DNA durch die Fremdstoffbehandlung nicht geschädigt und somit bei der Elektrophorese nicht aufgetrennt wurde, im Mikroskop als Punktstrukturen erkennen (vgl. Abbildung 12). Zellen mit einer hohen Rate induzierter Strangbrüche und einer stärkeren Wanderung im elektrischen Feld stellten sich als sogenannte Kometen dar. Den Kopf dieser Kometen bildete die vorwiegend ungeschädigte DNA. Der Schweif bestand aus fragmentierten Anteilen (vgl. Abbildung 13).



Abbildung 12:
Schleimhautzelle ohne genotoxische Einflüsse.
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung in 400-facher Vergrößerung



Abbildung 13:
Schleimhautzelle mit DNA-Schädigung: Darstellung eines Kometen
Fluoreszenzmikroskopische Darstellung in 400-facher Vergrößerung

Zur quantitativen Analyse der DNA-Schädigung wurde das Olive-Tail-Moment (OTM) als Maß herangezogen (Olive und Banath, 1993). Dieses ergibt sich aus dem Produkt der mittleren DNA-Wanderungsstrecke und der relativen Dichte im Kometenschweif (Quotient aus der DNA im Kometenschweif und der Gesamt-DNA). Pro Substanz bzw. Kontrolle wurden 80 Zellen auf jeweils zwei Objekträgern analysiert.

Zur Bestimmung der DNA-Reparaturkapazitäten (DRC^{15} bzw. DRC^{30}) wurden die Ergebnisse nach 15 Minuten bzw. 30 Minuten in ein Verhältnis zur Ausgangsschädigung gesetzt:

$$DRC^{15/30} = \frac{100 - (100 \times OTM \text{ nach } 15 / 30 \text{ min Reparatur})}{OTM \text{ nach Ausgangsschädigung durch BPDE}}$$

Zur Speicherung der Daten kam das Programm Microsoft Excel zum Einsatz (vgl. Abbildung 14).

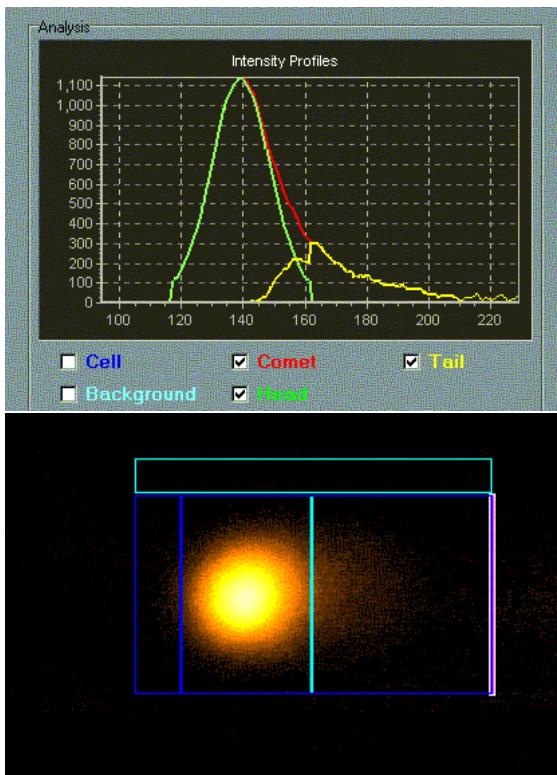


Abbildung 14:
Digitale Bildanalyse eines „Kometen“:
Software Komet 3.1.

2.7 Ergebnisdarstellung und statistische Analyse

Mit dem Datenanalyseprogramm SPSS 13.0 wurden zur graphischen Darstellung der Ergebnisse Boxplots erstellt. Dabei steht der mittlere Querstreifen im Kasten für den Median. Die Hälfte aller Werte liegt darüber bzw. darunter. Als untere Begrenzung des Kastens findet sich das 1. Quartil wieder. 25 Prozent aller Werte sind kleiner als dieses Quartil. Die obere Begrenzung des Kastens wird durch das 3. Quartil gebildet. Es wird von 25 Prozent aller Werte überschritten. Der geringste Wert wird durch die untere umgekehrte T-Linie, der Höchste durch die obere T-Linie in der Graphik vermerkt. Dabei finden weder Extrem- noch Ausreißerwerte Berücksichtigung. Mehr als drei Boxlängen außerhalb liegende Extremwerte werden gesondert mit einem Stern gekennzeichnet und mehr als eineinhalb Boxlängen außerhalb liegende Ausreißerwerte mit einem Kreis.

Für die statistische Ergebnisanalyse fanden der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben und der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben Anwendung. Bei der Analyse der Reparaturversuche diente der Wilcoxon-Test dem Vergleich der DNA-Fragmentierungen innerhalb des gleichen Kollektives, während bei der Gegenüberstellung der DNA-Fragmentierungen von Kontrollpersonen und Tumorpatienten der Mann-Whitney-U-Test angewendet wurde. Bei der Analyse der Polyphenolversuche wurde der Wilcoxon-Test eingesetzt.

Auf eine Korrektur nach Bonferroni wurde verzichtet, da es sich um eine explorative Studie handelt.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuchsreihen zur Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität sowie zur protektiven Wirkung der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure dargestellt.

Zur quantitativen Analyse wurde das Olive Tail Moment (OTM) bestimmt, das sich aus dem Produkt der mittleren DNA-Wanderungsstrecke und der relativen Dichte im Kometenschweif ergibt. Die folgenden OTM-Werte sind als Mediane angegeben.

Die OTM-Mediane nach den Reparaturintervallen wurden zu den Werten nach Ausgangsschädigung ins Verhältnis gesetzt, um die DNA-Reparaturkapazitäten (DRC^{15} und DRC^{30}) für beide Kollektive ermitteln und eine Aussage bezüglich des Malignomrisikos im oberen Aerodigestivtrakt treffen zu können.

Für die Ergebnisdarstellung wurden Boxplots gewählt (vgl. 2.7.), die mit dem Statistikprogramm 13.0 erstellt wurden.

Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3.1 Mutagensensitivität gegenüber BPDE, DNA-Reparatur und Reparaturkapazität

Als Lösungsmittel für BPDE und damit auch als Negativkontrolle diente DMSO. Die Schädigung erfolgte durch einstündige Inkubation mit 9 μM BPDE. Es wurden Reparaturzeiten von 15 und 30 Minuten gewählt.

3.1.1 DNA-Schädigung und Reparatur BPDE induzierter DNA-Schäden an oropharyngealen Mukosazellen von tumorfreien Patienten

In Abbildung 15 sind die Ergebnisse für das Kollektiv der Kontrollpersonen ($n = 17$) mittels Boxplot dargestellt. Die Negativkontrolle (DMSO) wies einen Median von 3,05 auf. Für die Ausgangsschädigung mit BPDE ergab sich ein OTM-Median von 17,75. Bei der Reparaturzeit von 15 Minuten erhielt man einen Median von 14,45, bei der Reparaturzeit von 30 Minuten einen von 13,7.

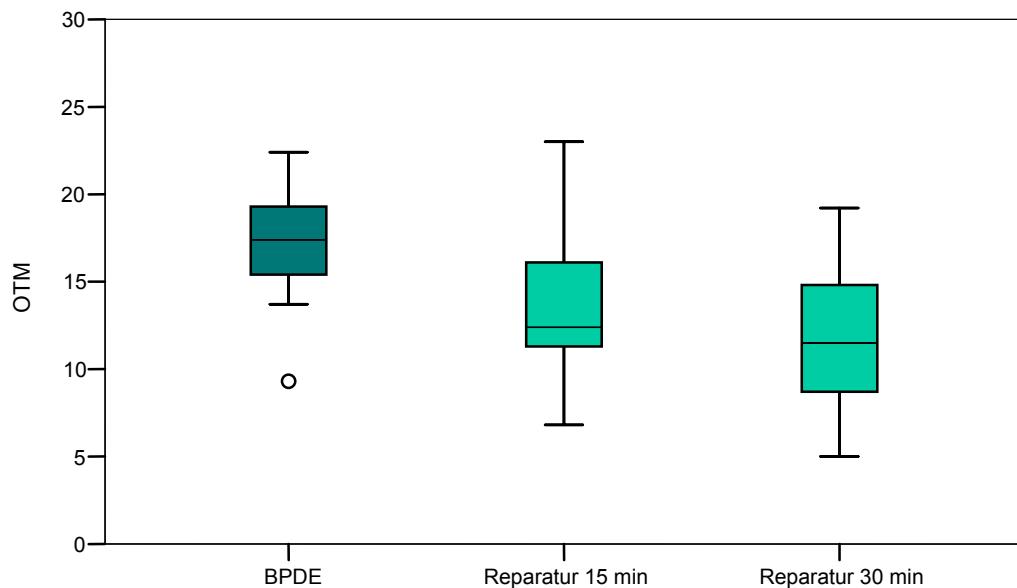


Abbildung 15:

DNA-Schädigung und Reparatur BPDE induzierter DNA-Schäden: Kontrollgruppe

X-Achse: Darstellung der Ausgangsschädigung durch BPDE und der DNA-Migrationen nach Reparaturzeiten von 15 Minuten bzw. von 30 Minuten. **o:** Ausreißerwert.

Y-Achse: OTM (Olive Tail Moment) als quantitatives Maß.

Beide Reparaturzeiten zeigten einen signifikanten Unterschied zur Ausgangsschädigung. Die zugehörigen p-Werte sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1:

p-Werte innerhalb der Kontrollgruppe

Vergleich	p-Werte
BPDE vs. Negativkontrolle	< 0,001
15 min Reparatur vs. BPDE	0,001
30 min Reparatur vs. BPDE	< 0,001

3.1.2 DNA-Schädigung und Reparatur BPDE induzierter DNA-Schäden an oropharyngealen Mukosazellen von Tumorpatienten

Bei den Versuchen an tumorfreien Schleimhautzellen von Patienten mit Oropharynxkarzinom ($n = 15$) ergab sich für die Negativkontrolle mit DMSO ein Median von 2,50. Die Ausgangsschädigung mit BPDE zeigte einen OTM-Median von 18,00. Die Ausgangsschädigung konnte nach den Reparaturzeiten nicht signifikant reduziert werden: Bei der Reparaturzeit von 15 Minuten betrug der OTM-Median 17,90 und bei der Reparaturzeit von 30 Minuten 17,00 (vgl. Tabelle 2). Die Verteilung der OTM-Werte zeigt die Abbildung 16.

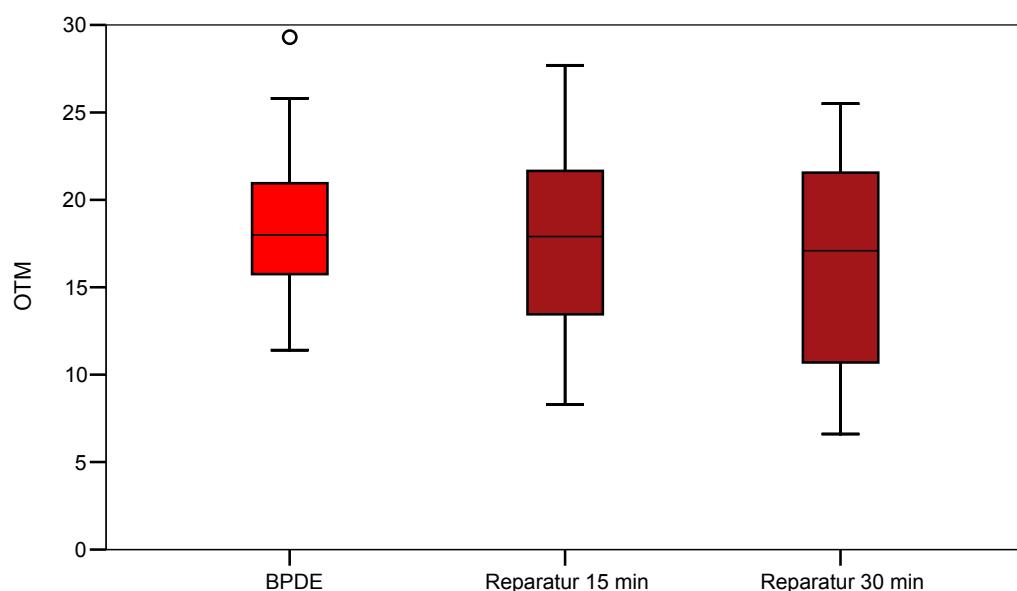


Abbildung 16:

Reparatur BPDE induzierter DNA-Schäden: Tumorgruppe

X-Achse: Darstellung der Ausgangsschädigung (BPDE) und der DNA-Migrationen nach Reparaturzeiten von 15 Minuten bzw. 30 Minuten. ○: Ausreißerwert.

Y-Achse: OTM (Olive Tail Moment) als quantitatives Maß.

Tabelle 2:

p-Werte innerhalb der Tumorgruppe

Vergleich	p-Werte
BPDE vs. Negativkontrolle	0,001
15 min Reparatur vs. BPDE	0,394
30 min Reparatur vs. BPDE	0,088

3.1.3 Mutagensensitivität und DNA-Reparatur: Vergleich zwischen Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom

Die DNA-Fragmentierungen durch DMSO wurden für das Kontrollkollektiv und das Tumorkollektiv nicht-signifikant getestet (OTM-Mediane 3,05 und 2,50). Beim Vergleich der Ausgangsschädigung mit BPDE konnte kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Kollektiven erkannt werden (17,75 und 18,00). Die Mutagensensitivität war in beiden Kollektiven vergleichbar. Bei der Gegenüberstellung der Reparaturzeiten 15 und 30 Minuten zeigten sich signifikant niedrigere Werte bei den tumorfreien Spendern (OTM-Mediane 14,45 und 13,7) verglichen mit den Tumorpatienten (17,90 und 17,00). Abbildung 17 stellt die Ergebnisse für beide Kollektive gegenüber. In Tabelle 3 sind die zugehörigen p-Werte aufgelistet.

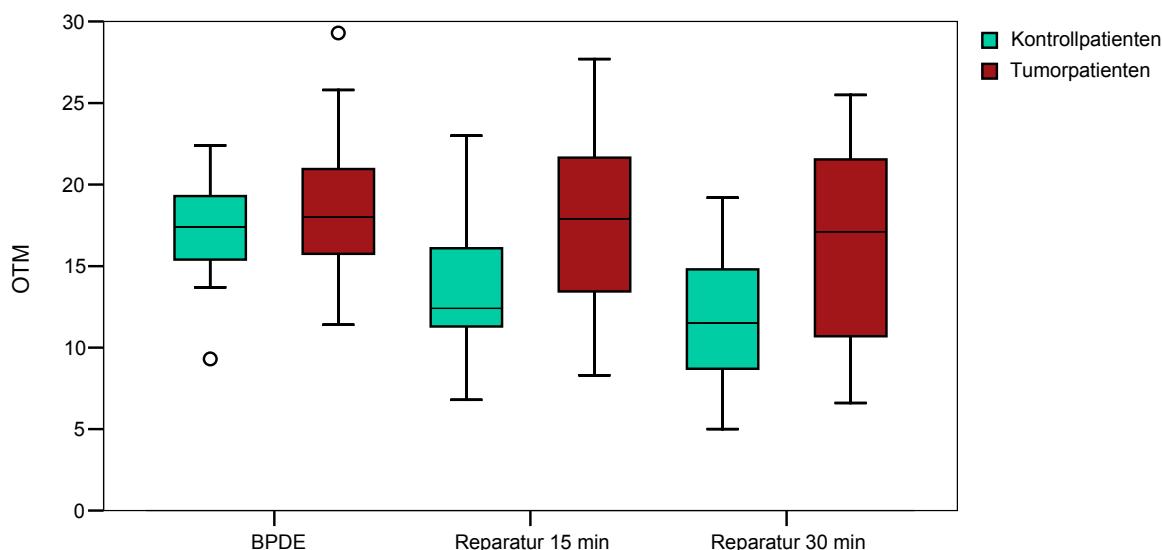


Abbildung 17:
Darstellung der Mutagensensitivität gegenüber BPDE und Vergleich der DNA-Reparatur zwischen Kontroll- und Tumorkollektiv

X-Achse: Vergleichende Darstellung der Ausgangsschädigung bzw. Mutagensensitivität gegenüber BPDE und der DNA-Migrationen nach Reparaturzeiten von 15 Minuten bzw. 30 Minuten mittels Boxplot für Kontrollpersonen (grüne Balken) und Tumorpatienten (rote Balken). ○: Ausreißerwerte.

Y-Achse: OTM (Olive Tail Moment) als quantitatives Maß.

Tabelle 3:
p-Werte für den Vergleich der OTM-Werte zwischen Kontroll- und Tumorgruppe

Vergleich	p-Werte
Negativkontrolle	0,198
Ausgangsschädigung	0,365
15 min Reparatur	0,016
30 min Reparatur	0,012

3.1.4 DNA-Reparaturkapazität von tumorfreien Patienten

Bei den tumorfreien Spendern konnte nach einer Reparaturzeit von 15 Minuten die Ausgangsschädigung mit BPDE (OTM-Median 17,75) auf 14,45 gesenkt werden, was einer Reparaturkapazität in % (DRC¹⁵) von 20,85 entsprach. Nach 30 Minuten konnte noch ein OTM-Median von 13,70 gemessen werden, was eine DRC³⁰ von 25,55 ergab (vgl. Abbildung 18).

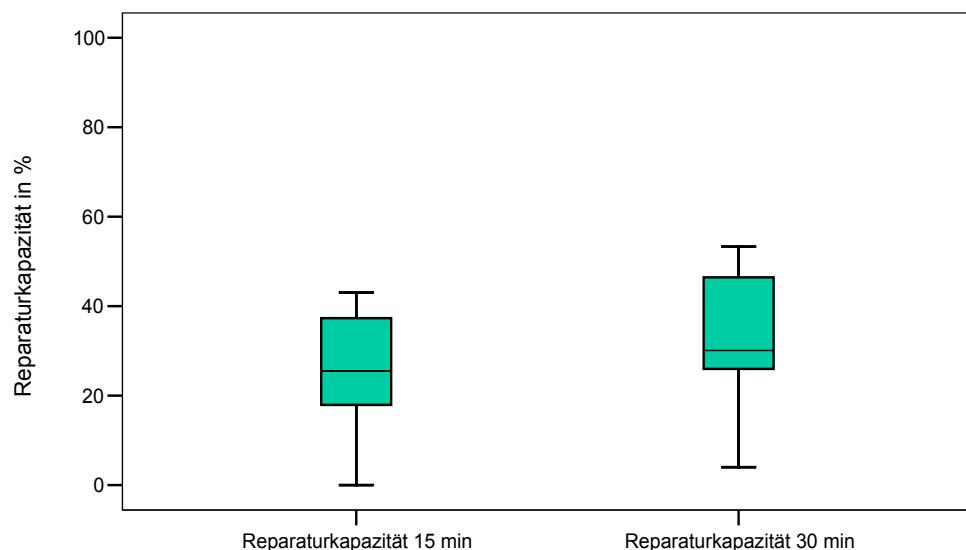


Abbildung 18:

Reparaturkapazitäten für 15 min (DRC¹⁵) und 30 min (DRC³⁰): Kontrollpatienten

X-Achse: Darstellung der Reparaturkapazitäten nach Reparaturzeiten von 15 und 30 Minuten für die Kontrollpersonen.

Y-Achse: Reparaturkapazität in %.

3.1.5 DNA-Reparaturkapazität von Tumorpatienten

Bei dem Kollektiv der Tumorpatienten konnte nach DNA-Fragmentierung durch BPDE (OTM-Median 18,00) für die 15-Minuten-Reparatur ein OTM-Median von 17,90 und für die 30-Minuten-Reparatur ein OTM-Median von 17,00 nachgewiesen werden. Es wurde eine DRC¹⁵ von 7,26 und eine DRC³⁰ von 17,75 bestimmt (Abbildung 19).

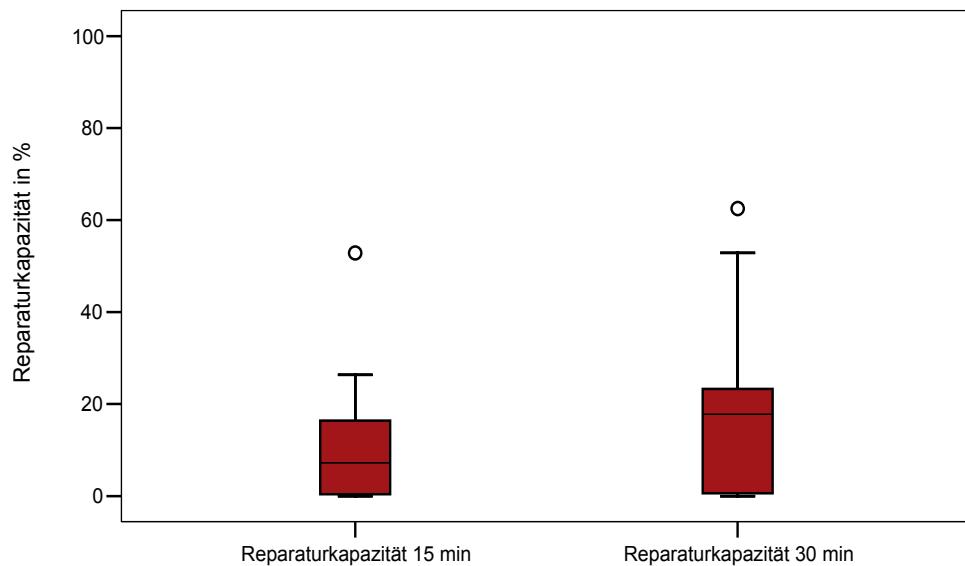


Abbildung 19:

Reparaturkapazitäten für 15 min (DRC¹⁵) und 30 min (DRC³⁰): Tumorpatienten

X-Achse: Darstellung der Reparaturkapazitäten nach Reparaturzeiten von 15 und 30 Minuten für die Tumorpatienten. ○: Ausreißerwerte.

Y-Achse: Reparaturkapazität in %.

3.1.6 Vergleich der DNA-Reparaturkapazitäten von Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom

Der Vergleich der Reparaturkapazitäten von tumorfreien Spendern und Tumopatienten ergab sowohl für die DRC¹⁵ einen niedrigeren Wert für das Kollektiv der Tumopatienten (20,85 und 7,26), als auch für die DRC³⁰ (25,55 und 17,75) (vgl. Abbildung 20 und Tabelle 4).

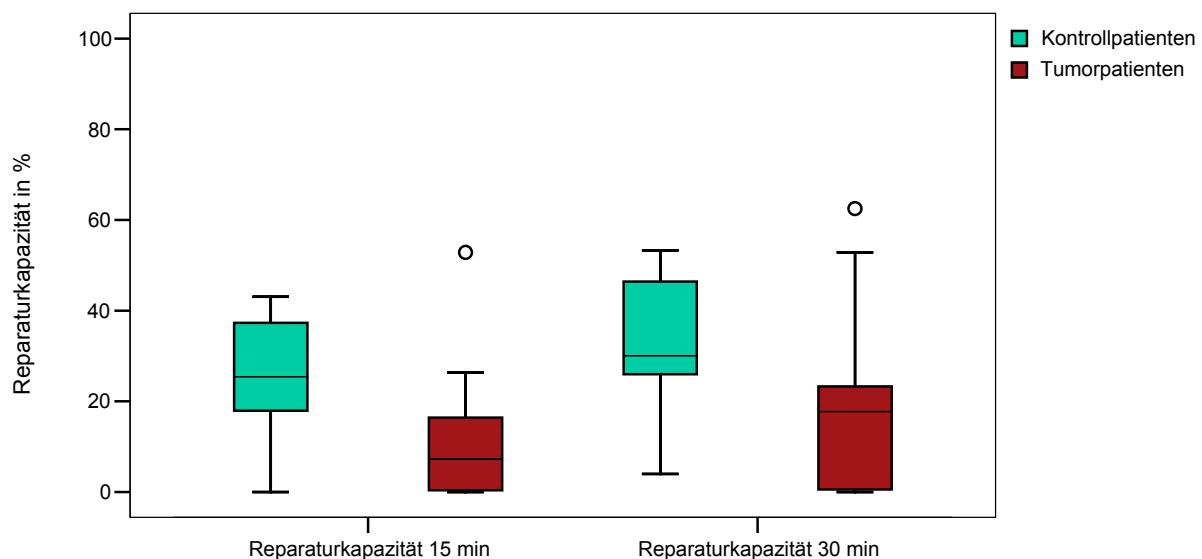


Abbildung 20:

Vergleich der Reparaturkapazitäten 15 min (DRC¹⁵) und 30 min (DRC³⁰)

X-Achse: Gegenüberstellung der Reparaturkapazitäten nach Reparaturzeiten von 15 und 30 Minuten für Kontroll- (grüne Balken) und Tumorkollektiv (rote Balken). ○: Ausreißerwerte.

Y-Achse: Reparaturkapazität in %.

3.2 Protektive Wirkung der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure

Als Negativkontrolle und als Lösungsmittel für die Teststoffe wurde DMSO verwendet, als Ausgangsschädigung diente 9 µM BPDE. Ein Teil der Kulturen wurde nur den Teststoffen (+)-Catechin bzw. Tanninsäure für eine Stunde ausgesetzt. Der andere Teil der Miniorgane wurde zunächst für eine Stunde mit den Teststoffen inkubiert. Anschließend erfolgte eine einstündige Exposition mit der Noxe BPDE.

3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung der Substanzen (+)-Catechin und Tanninsäure an nasalen Miniorganen

Für die Erstellung der Dosiswirkungskurven der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure wurden Miniorgane aus nasalem Epithel herangezogen. Es wurden jeweils die Konzentrationen 1 µM, 5 µM, 10 µM, 15 µM und 30 µM getestet. Für Tanninsäure zusätzlich auch 50 µM. Ein Teil der Miniorgane wurde nur mit den Teststoffen inkubiert, der andere Teil wurde zusätzlich mit BPDE inkubiert. Tabelle 5 gibt die OTM-Mittelwerte für die verschiedenen Versuchsansätze für (+)-Catechin bzw. Tanninsäure an. Die Negativkontrolle sowie die Teststoffe alleine ergaben einen OTM < 2, lagen also im nicht-genotoxischen Bereich. Bei der Teststoffinkubation mit anschließender BPDE-Exposition ließ sich eine dosisabhängige Wirkung der Polyphenole erkennen: Mit steigenden Konzentrationen der Testsubstanzen kam es zu einer stetigen Reduktion des OTM-Wertes der Ausgangsschädigung. Lediglich bei Tanninsäure in einer Konzentration von 50 µM kam es wieder zu einem leichten Anstieg. Für die weiteren Versuche mit (+)-Catechin und Tanninsäure wurden die Konzentrationen 1 µM und 5 µM gewählt.

Tabelle 5:
OTM-Mittelwerte für die Teststoffe (+)-Catechin und Tanninsäure

Versuchsansätze	n	OTM	Versuchsansätze	n	OTM
DMSO	6	1,37	DMSO	5	1,04
Catechin 1 µM	4	1,56	Tanninsäure 1 µM	3	1,46
Catechin 5 µM	5	1,36	Tanninsäure 5 µM	5	1,57
Catechin 10 µM	5	1,65	Tanninsäure 10 µM	5	1,38
Catechin 15 µM	5	1,58	Tanninsäure 15 µM	5	1,20
Catechin 30 µM	3	1,98	Tanninsäure 30 µM	3	1,30
BPDE 9 µM	6	13,72	Tanninsäure 50 µM	2	1,06
Catechin 1 µM + BPDE	4	10,82	BPDE 9 µM	5	10,52
Catechin 5 µM + BPDE	5	10,86	Tanninsäure 1 µM + BPDE	3	9,20
Catechin 10 µM + BPDE	5	8,09	Tanninsäure 5 µM + BPDE	5	7,99
Catechin 15 µM + BPDE	5	7,57	Tanninsäure 10 µM + BPDE	5	7,65
Catechin 30 µM + BPDE	3	7,11	Tanninsäure 15 µM + BPDE	5	7,12
			Tanninsäure 30 µM + BPDE	3	5,81
			Tanninsäure 50 µM + BPDE	2	6,81

Die Dosiswirkungskurven für (+)-Catechin sind in Abbildung 21 und 22 dargestellt, für Tanninsäure in Abbildung 23 und 24.

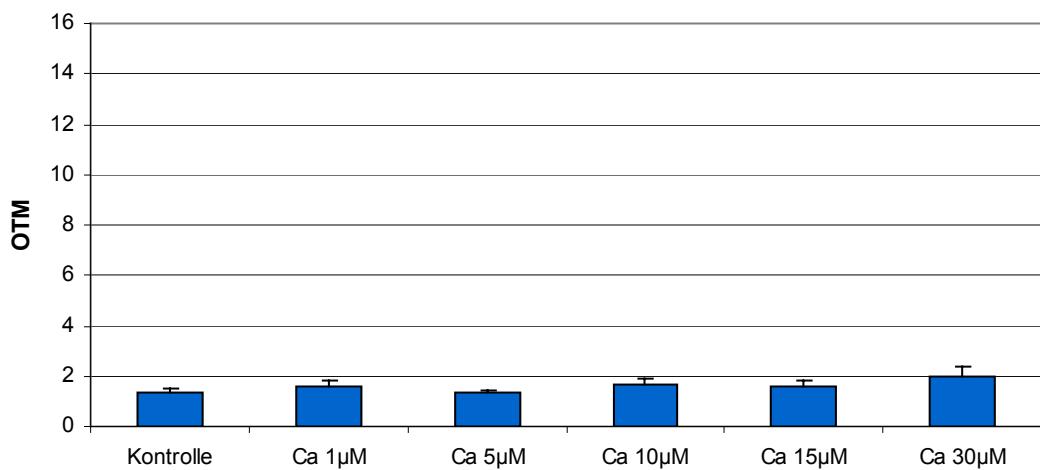


Abbildung 21:
Dosiswirkungskurve für (+)-Catechin

X-Achse: Balkendarstellung der verschiedenen Versuchsansätze für (+)-Catechin (Ca).
Y-Achse: OTM (Olive Tail Moment) als quantitatives Maß.

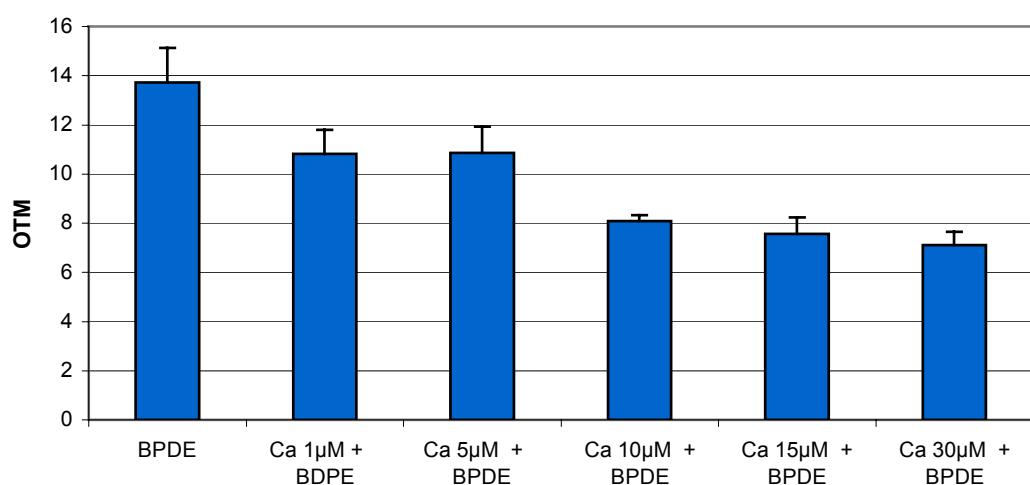


Abbildung 22:
Dosiswirkungskurve für (+)-Catechin: kombinierte Inkubation

X-Achse: Balkendarstellung der verschiedenen Versuchsansätze für (+)-Catechin (Ca).
Y-Achse: OTM (Olive Tail Moment) als quantitatives Maß.

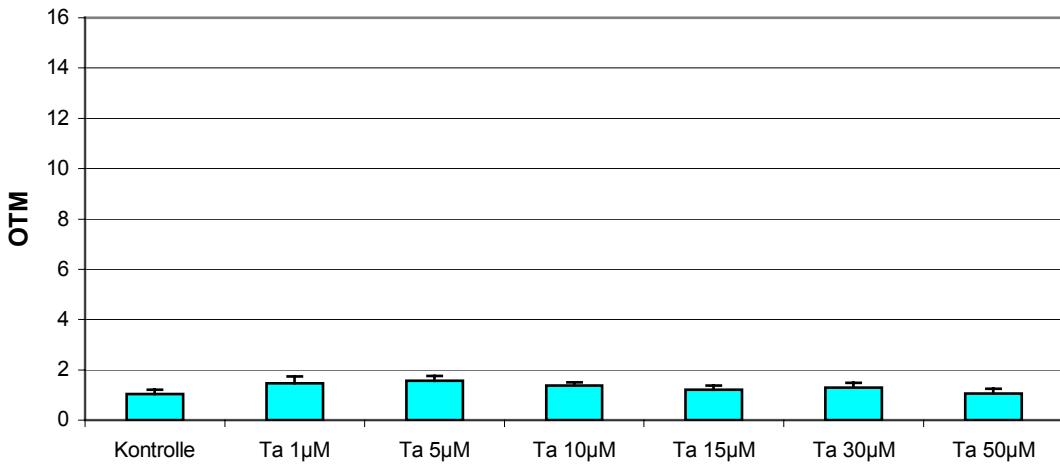


Abbildung 23:

Dosiswirkungskurve für Tanninsäure

X-Achse: Balkendarstellung der verschiedenen Versuchsansätze für Tanninäure (Ta).

Y-Achse: OTM (Olive Tail Moment) als quantitatives Maß.

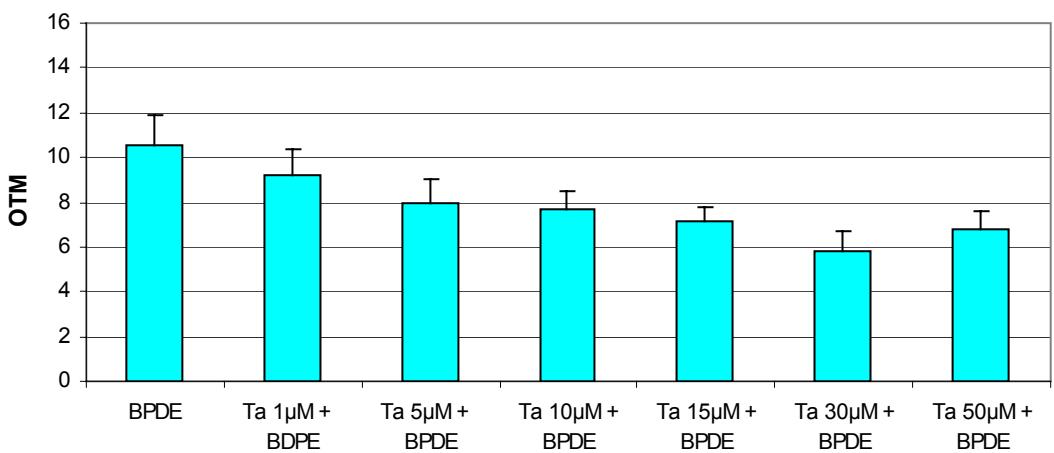


Abbildung 24:

Dosiswirkungskurve für Tanninsäure: kombinierte Inkubation

X-Achse: Balkendarstellung der verschiedenen Versuchsansätze für Tanninsäure (Ta).

Y-Achse: OTM (Olive Tail Moment) als quantitatives Maß.

3.2.2 Protektive Wirkung von (+)-Catechin und Tanninsäure gegenüber BPDE induzierten DNA-Schäden an oropharyngealen Miniorganen

Für die Versuchsreihe zur protektiven Wirkung von (+)-Catechin und Tanninsäure wurden Miniorgane aus oropharyngealem Epithel verwendet. Nach Erstellen der Dosiswirkungskurven wurden jeweils die Konzentrationen 1 µM und 5 µM ausgewählt. Die ermittelten OTM-Mediane sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6:
OTM-Mediane für die Versuchsansätze

Versuchsansätze	OTM
DMSO	1,30
Catechin 1 µM	1,55
Catechin 5 µM	1,26
Tanninsäure 1 µM	1,45
Tanninsäure 5 µM	1,04
BPDE 9 µM	7,85
Catechin 1 µM + BPDE	7,09
Catechin 5 µM + BPDE	5,14
Tanninsäure 1 µM + BPDE	5,40
Tanninsäure 5 µM + BPDE	4,31

Die Negativkontrolle mit DMSO und die Testsubstanzen (+)-Catechin und Tanninsäure wiesen einen OTM < 2 auf, lagen also im nicht-genotoxischen Bereich. In Kombination der Teststoffe mit BPDE konnte die Ausgangsschädigung in allen Konzentrationen reduziert werden. Die Ergebnisse wurden in Form von Boxplots dargestellt: Abbildung 25 für die Negativkontrolle und die Teststoffinkubationen, Abbildung 26 für die Ausgangsschädigung und die Teststoffe mit kombinierter BPDE-Exposition.

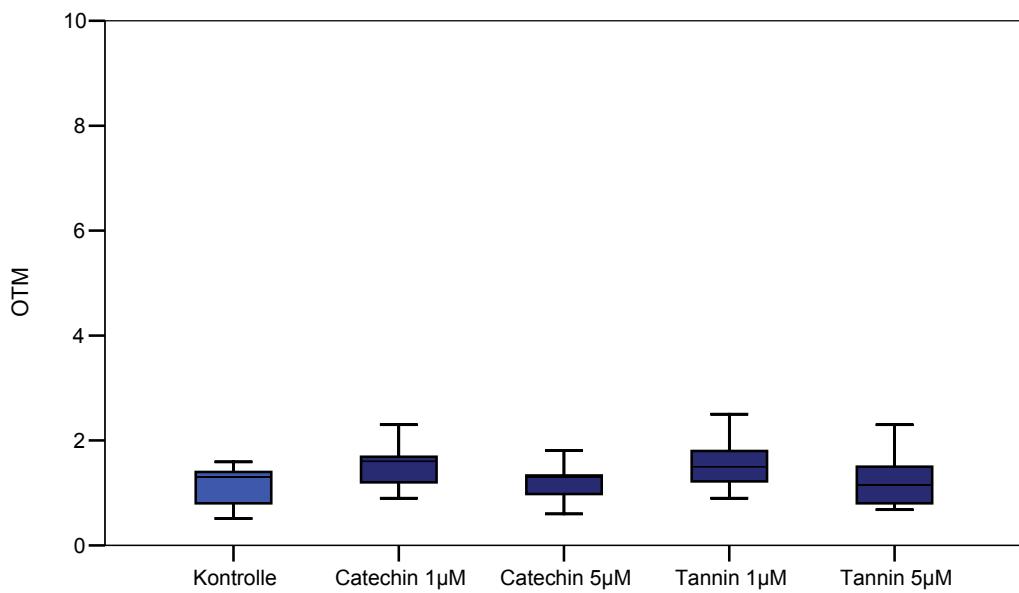


Abbildung 25:

Nicht-genotoxische Wirkung von (+)-Catechin und Tanninsäure

X-Achse: Darstellung der Negativkontrolle (DMSO) und der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure in Konzentrationen von 1 µM und 5 µM.

Y-Achse: OTM (Olive Tail Moment) als quantitatives Maß.

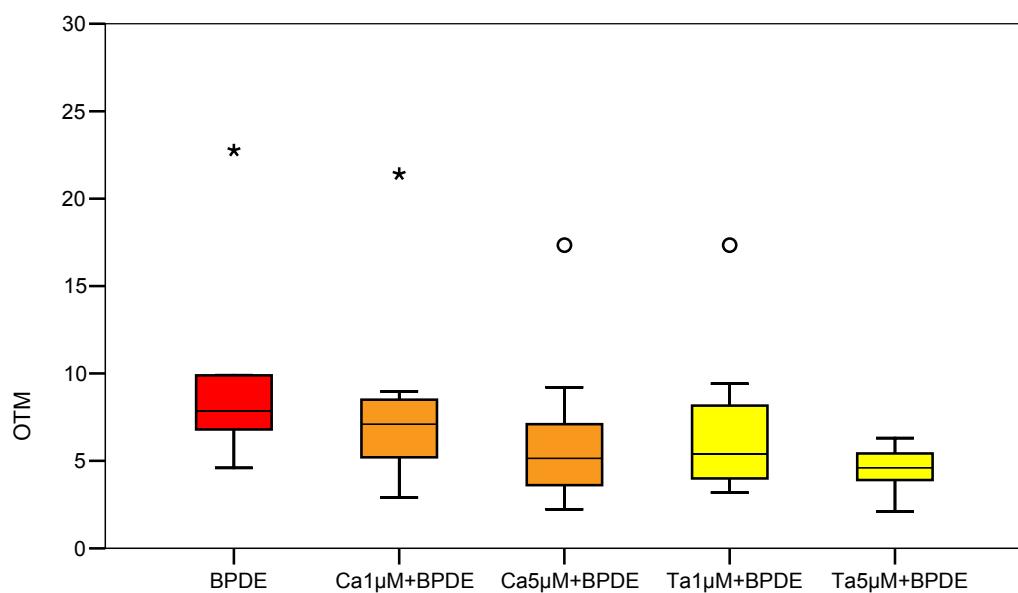


Abbildung 26:

Protektive Wirkung der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure

X-Achse: Darstellung der Ausgangsschädigung sowie der Inkubation der Teststoffe und BPDE. Ca+BPDE: Inkubation mit (+)-Catechin und anschließend mit BPDE; Ta+BPDE: Inkubation mit Tanninsäure und anschließend BPDE.

Y-Achse: OTM (Olive Tail Moment) als quantitatives Maß.

Bei der Berechnung der p-Werte ergab sich ein signifikanter Unterschied der Ausgangsschädigung im Vergleich zur Negativkontrolle. Auch Catechin 1 µM und Tanninsäure 1 µM zeigten sich signifikant, blieben aber dennoch kleiner 2, also im nicht-genotoxischen Bereich. Die 5 µM-Konzentrationen blieben unter dem Signifikanzniveau (vgl. Tabelle 7). Die Versuche mit kombinierten Inkubationen ergaben alle einen signifikanten Unterschied zur Ausgangsschädigung (vgl. Tabelle 8).

Tabelle 7:

p-Wert des Vergleichs der DNA-Migrationen von BPDE bzw. den Teststoffen mit der Negativkontrolle

Vergleich	p-Werte
BPDE	0,008
Catechin 1 µM	0,044
Catechin 5 µM	0,779
Tanninsäure 1 µM	0,008
Tanninsäure 5 µM	0,362

Tabelle 8:

p-Wert des Vergleichs der DNA-Migrationen der kombinierten Inkubationen mit der Ausgangsschädigung BPDE

Vergleich	p-Werte
Catechin 1 µM + BPDE	0,037
Catechin 5 µM + BPDE	0,014
Tanninsäure 1 µM + BPDE	0,022
Tanninsäure 5 µM + BPDE	0,008

4. DISKUSSION

4.1 Auswahl des Patientenkollektivs

Das für die vorliegende Arbeit verwendete Schleimhautgewebe wurde im Rahmen von operativen Eingriffen an der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der LMU München gewonnen. Es wurden nur Patienten ausgewählt, bei denen keine chronischen Infektions- oder Systemerkrankungen vorlagen. Bei den Zellspendern erfolgte eine Anamneseerhebung mit besonderem Augenmerk auf Rauchen, Alkoholkonsum und beruflich bedingte Exposition gegenüber Fremdstoffen. Dadurch konnten Vorbelastungen der Schleimhäute in die Beurteilung der Ergebnisse miteinbezogen werden.

4.1.1 Patienten mit und ohne Oropharynxkarzinom als Spender von oropharyngealem Epithel für die Versuchsreihen an Einzelzellen

Für die Reparaturversuche an Einzelzellen wurden nur Gewebeproben von männlichen Patienten zwischen 28 und 67 Jahren verwendet.

Als tumorfreie Kontrollpersonen wurden 17 männliche Patienten mit einem Durchschnittsalter von 42,9 Jahren ausgewählt, bei denen aufgrund chronisch rezidivierender Gaumenmandelentzündungen oder Tonsillenhyperplasien bei Schlaferkrankungen eine Indikation zur Entfernung der Mandeln gegeben war. Die Resektion der Mandeln wurde in einem infektionsfreien Intervall vorgenommen. Infektionsbedingte Gewebeveränderungen konnten jedoch nicht völlig vermieden werden. Vom Operationspräparat wurden nur das oropharyngeale Epithel separiert und daraus Einzelzellen isoliert.

Im Vergleich hierzu dienten 15 männliche Patienten mit der Diagnose Oropharynxkarzinom als Spender von ebenfalls makroskopisch tumorfreiem oropharyngealem Epithel. Ihr Durchschnittsalter betrug 57,2 Jahre. Innerhalb des Kollektivs der Karzinompatienten variierten Schweregrade und Stadium der Erkrankung. Bei allen Patienten handelte es sich um Erstdiagnosen ohne Vorbehandlung mit Strahlen- oder Chemotherapie. Randständig tumorfreies Oropharynxepithel konnte bei der operativen Tumorresektion im Gesunden gewonnen werden. Es entstand durch die Spende der Gewebeprobe kein zusätzliches Risiko für die Patienten.

Malignome des oberen Aerodigestivtraktes befinden sich in der Häufigkeitsverteilung aller Krebserkrankungen an vierter Stelle, wobei Karzinome des Oropharynx an zweiter Stelle hinter den Larynxkarzinomen stehen. Vor allem exogene Faktoren wie hoher

Nikotin- und Alkoholkonsum spielen eine bedeutende Rolle in der Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren. Jedoch erkranken auch Patienten ohne oben genannte Risikofaktoren an Karzinomen im oberen Aerodigestivtrakt. Deswegen ist es neben der Evaluierung anderer exogener Noxen von Bedeutung, endogene Risikomarker zu identifizieren, die für die individuelle Suszeptibilität verantwortlich sind.

4.1.2 Spender von oropharyngealem bzw. nasalem Epithel für die Versuchsreihen an Miniorganen

Für die Versuchsreihen zur zytoprotektiven Wirkung von pflanzlichen Phenolen wurden Miniorgane aus oropharyngealem Epithel angelegt. Als Zellspender dienten neun Männer und eine Frau mit einem Durchschnittsalter von 34,9 Jahren. Aufgrund chronischer Mandelentzündungen oder Vergrößerungen der Gaumenmandeln bestand bei allen Spendern die klinische Indikation zu einer Entfernung der Tonsillen. Das Oropharynxepithel wurde aus dem resezierten Gewebe gewonnen.

Für das Erstellen von Dosiswirkungskurven der Phenole wurden Miniorgane aus nasalem Epithel kultiviert. Das nasale Epithel stammte von Patienten, bei denen zur Verbesserung der Nasenatmung eine sogenannte Konchotomie der unteren Nasenmuschel durchgeführt wurde. Dabei wird ein überschüssiger Schleimhautstreifen der Concha nasalis inferior reseziert. Es wurde nur tumorfreies Gewebe für die Versuchsreihen verwendet.

Da die oropharyngealen und nasalen Schleimhäute das primäre Kontaktorgan im oberen Aerodigestivtrakt gegenüber karzinogenen Umweltschadstoffen darstellen, sind diese Epithelien zur Untersuchung protektiver Effekte z.B. von Phenolen besonders geeignet.

4.2 Genotoxizität und Mutagensensitivität gegenüber BPDE

4.2.1 Genotoxizität von BPDE als Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe

Von der International Agency for Research on Cancer (IARC) wurde Benzo[a]pyren (BaP), die Leitsubstanz der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, als Karzinogen 2A eingestuft, also als „wahrscheinlich“ krebserzeugend (International Agency for Research on Cancer, 1983; Smith et al., 2001). Das Benzo[a]pyren wird als Prokarzinogen im Körper durch Phase I Enzyme wie Monoxidasen und Epoxidhydratasen in Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) metabolisiert. Nach der Inaktivierung zum Glukuronid erfolgt die Ausscheidung über Harn und Fäces. Als ultimatives Karzinogen kann BPDE durch kovalente Bindung und Oxidation DNA-Schäden hervorrufen (Cosman et al., 1992; MacLeod und Tang, 1985). DNA-Addukte werden gebildet, die während der Replikation Mutationen verursachen oder DNA-Strangbrüche induzieren können (Liang et al., 2003; Xie et al., 2003). 80-90 % dieser Addukte sind an der N²-Position des Guanin gebunden (Cheng et al., 1989). Auch die Exzisionsreparatur zur Beseitigung von DNA-Addukten wird beeinflusst. Ein Teil der genotoxischen Schädigung durch BPDE entgeht dem Comet Assay, da Adduktbildungen in der alkalischen Mikrogelelektrophorese nicht direkt nachgewiesen werden können, sondern Einzel- und Doppel-Strangbrüche sowie DNA-Schäden, die durch eine inkomplette Exzisionsreparatur bedingt sind.

In den durchgeföhrten Versuchsreihen konnten durch BPDE signifikante DNA-Schäden in Schleimhautzellen von Tumorpatienten und Kontrollpersonen induziert und mittels Comet Assay nachgewiesen werden.

Benzo[a]pyren, die Leitsubstanz der PAH, entsteht vor allem bei der Verbrennung von organischem Material. Auch beim Verbrennen von Tabak bildet sich BaP und findet sich vor allem in der Partikelphase des Tabakrauches. Beim Grillen und Rösten von Lebensmitteln bilden sich ebenfalls PAH. Messungen ergaben für gegrilltes Fleisch BaP-Konzentrationen von bis zu 50 Mikrogramm/kg (Lijinsky, 1991). Seit 2005 bestehen innerhalb der Europäischen Union Grenzwerte für den BaP-Gehalt in Ölen und Fetten von 2 Mikrogramm/kg, in geräuchertem Fleisch und Fisch von 5 Mikrogramm/kg sowie in Babynahrung von 1 Mikrogramm/kg. Dabei wurde BaP als Marker für das Vorkommen von karzinogenen PAH in der Nahrung genutzt (EU, 2005). Bei Arbeitern in der Eisen- und Stahlindustrie sowie in der Steinkohle- und Teerproduktion, die in ihrem Arbeitsbereich vermehrt PAH ausgesetzt waren, konnte ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen nachgewiesen werden (Maier et al., 1994). Im Urin von Koksofenarbeitern wurden erhöhte

Konzentrationen von Abbauprodukten des BaP nachgewiesen. Lymphozyten dieser Arbeiter zeigten eine signifikant erhöhte Rate an DNA-Strangbrüchen (Popp et al., 1997). An Feinstaubpartikel gebunden, verteilen sich PAH in der Luft. Durch Inhalation belasteter Atemluft und Ingestion kommen die karzinogenen PAH mit der Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes in Kontakt.

In tierexperimentellen Studien konnten durch Exposition gegenüber PAH Tumore in Kehlkopf, Lunge, Magen und Haut hervorgerufen werden (Hoffmann D. und Wynder El, 1994; Sharma et al., 1997). Bei *in vitro*-Versuchen an humanen Fibroblastenzelllinien konnten DNA-Addukte, DNA-Strangbrüche und Genmutationen durch BaP bzw. BPDE induziert werden (Hanelt et al., 1997). An Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes und an Lymphozyten konnten mittels Comet Assay genotoxische Effekte durch BaP nachgewiesen werden (Harréus et al., 1999; Kleinsasser et al., 2000).

4.2.2 Mutagensensitivität gegenüber BPDE als endogener Risikomarker

Als endogener Risikomarker beschreibt die Mutagensensitivität die individuelle Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Auswirkungen eines Fremdstoffes (Cloos et al., 1996). Zusammen mit anderen Faktoren bestimmt sie das Risiko, an einem Tumor im oberen Aerodigestivtrakt zu erkranken.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mutagensensitivität gegenüber BPDE an tumorfreier oropharyngealer Schleimhaut von Kontrollpersonen und von Patienten mit Oropharynxkarzinom untersucht. Die Methode des Comet Assay wurde bereits in mehreren Studien zur Bestimmung der Mutagensensitivität eingesetzt und gilt als etabliertes gentoxikologisches Testverfahren (Rajaei-Behbahani et al., 2001; Wu et al., 2005).

Der Vergleich der Mutagensensitivität beider Spendergruppen gegenüber BPDE ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen Tumor- und Kontrollgruppe. Die Mutagensensitivität gegenüber BPDE wurde nicht als Risikomarker für die Entstehung von Oropharynxkarzinomen identifiziert. Bereits in einer früheren Studie, in der die Sensitivität gegenüber DNA-Schäden und Chromosomenaberrationen bei Patienten mit und ohne Tumor im Oropharynx mittels Comet-FISH untersucht wurde, kam man zum gleichen Ergebnis. Auch hier ergab sich für beide Kollektive kein signifikanter Unterschied bezüglich der DNA-Schädigung durch BPDE (Harréus et al., 2004). Auch Kleinsasser et al. fand keinen Unterschied in der Mutagensensitivität bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom gemessen an Lymphozyten (Kleinsasser et al., 2001b). An Lymphozyten konnte im Gegensatz dazu eine erhöhte Sensitivität gegenüber BPDE und Bleomycin als endogener Risikomarker für praemaligne Läsionen des oberen

Aerodigestivtraktes identifiziert werden (Wu et al., 2002). Eine Assoziation zwischen der Empfindlichkeit von Lymphozyten gegenüber Bleomycin und dem Auftreten von Zweitkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich konnte gefunden werden (Cloos et al., 2000). Auch das Risiko für die Entstehung von Lungenkarzinomen wurde mit einer erhöhten Mutagensensitivität in Zusammenhang gebracht, nachdem Lymphozyten durch BPDE oder γ -Strahlung geschädigt wurden. Bei Lymphozyten mit starken Schäden durch γ -Strahlung wurde eine Verkürzung der S- und G2-Phase beobachtet (Wu et al., 2005). Die chromosomale Empfindlichkeit gegenüber BPDE wurde mittels Comet-FISH an oropharyngealen Zellen von Patienten mit und Patienten ohne Oropharynxkarzinom ermittelt werden. Bei Tumorpatienten ergab sich eine stärkere Fragmentierung der Chromosomen 3, 5 und 8 im Vergleich zu Kontrollpersonen (Harréus et al., 2004). 3p21.3-Aberrationen, die durch BPDE an Lymphozyten induziert wurden, zeigten eine Assoziation mit einem erhöhten Karzinomrisiko im Kopf-Hals-Bereich (Zhu et al., 2002). Demgegenüber stehen die vorliegenden Ergebnisse, in denen kein signifikanter Unterschied der Mutagensensitivität zwischen der Kontroll- und Karzinomgruppe gemessen an der Gesamt-DNA festgestellt werden konnte.

Neben möglichen Unterschieden auf chromosomaler Ebene könnten die Testbedingungen Einfluß auf das Ergebnis nehmen. Zum einen könnte das gewählte Patientenkollektiv für den Nachweis der Mutagensensitivität ausschlaggebend sein. Dabei spielen wohl Alter, Geschlecht, Alkohol- und Nikotinkonsum der Patienten eine Rolle. Während Raucher eine erhöhte Mutagensensitivität gegenüber Bleomycin und eine verminderte Reparaturkapazität im Comet Assay aufwiesen (Rajaee-Behbahani et al., 2001), bestand bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen keine Assoziation zwischen Rauchen und der Bleomycin induzierten Mutagensensitivität (Bondy et al., 1993). In einer Studie zum Biomonitoring genotoxischer Effekte konnte ebenfalls kein Zusammenhang zwischen der Anzahl der gerauchten Zigaretten und der DNA-Migration im Comet Assay hergestellt werden (Hoffmann et al., 2005). Chronischer Alkoholkonsum hingegen beeinflusste den genotoxischen Schaden von BaP im Comet Assay (Harréus et al., 1999). Auch die gewählte genotoxische Substanz und das Testverfahren zur Darstellung des DNA-Schadens könnten Einfluß nehmen auf die gemessene Mutagensensitivität. BPDE induziert hauptsächlich DNA-Addukte, die nicht direkt im Comet Assay dargestellt werden können. Vermutlich ist die gemessene DNA-Migration im Comet Assay abhängig von der Persistenz der Addukte und der Aktivität der Exzisionsreparatur (Speit und Hartmann, 1995). Viele Studien untersuchten die Mutagensensitivität statt mit BPDE mit Bleomycin als genotoxische Substanz (Bondy et al., 1993; Wu et al., 2002). Ein weiterer Einflussfaktor bezüglich der Mutagensensitivität ist schließlich wohl das untersuchte Zellmaterial. Wie auch in vorliegender Studie

verwendete Harréus et al. 2004 Oropharynxzellen zur Darstellung der Mutagensensitivität (Harréus et al., 2004). In beiden Studien konnte übereinstimmend die Mutagensensitivität nicht als endogener Risikomarker für Kopf-Hals-Karzinome erkannt werden. Studien an Lymphozyten ergaben abweichende Ergebnisse (Cloos et al., 2000; Wu et al., 2002). Die schlechte Korrelation zwischen Lymphozyten und Mukosazellen hinsichtlich der Mutagensensitivität wurde bereits beschrieben (Kleinsasser et al., 2000). Zusammenfassend bedingt wohl ein unterschiedliches Studiendesign die divergierenden Ergebnisse.

Unseren Untersuchungen zufolge liegt die Ursache für eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Oropharynxkarzinomen nicht in erster Linie an einer generell erhöhten Mutagensensitivität. Zusätzliche endogene Risikomarker wie interindividuelle Unterschiede der DNA-Reparatur scheinen eine bedeutende Rolle zu spielen.

4.3 DNA-Reparatur und DNA-Reparaturkapazität

4.3.1 Reparatur BPDE induzierter DNA-Schäden

Die DNA-Reparatur dient dazu, schadhafte Veränderungen der DNA zu beseitigen und die Basenpaarungen konstant zu halten. Sie ist als ubiquitärer Schutzmechanismus für das Überleben der Zelle und die Zellzykluskontrolle essentiell (Hartwell und Weinert, 1989).

Von den Genom-Schäden, die durch BPDE induziert werden, können mittels Comet Assay nur Einzel- und Doppel-Strangbrüche sowie Schäden durch eine inkomplette Exzisionsreparatur nachgewiesen werden, während die typischen DNA-Addukte nicht detektiert werden. Hinsichtlich der Genom-Schädigung durch BPDE kann also nur ein Teil der Reparaturvorgänge mittels Comet Assay dargestellt werden.

Induzierte Einzelstrangbrüche können direkt durch die DNA-Ligase oder durch die Basen-Exzisionsreparatur korrigiert werden, wobei letztgenannte vor allem fehlerhafte Basen beseitigt (Frankenberg-Schwager, 1989; Lopez-Larrazá et al., 1990). Schwerwiegende DNA-Schäden wie Doppelstrangbrüche und Crosslinks werden durch den Mechanismus der homologen Rekombination beseitigt (Moustacchi, 2000). Zur Reparatur BPDE induzierter DNA-Addukte dient vor allem die Nukleotid-Exzisions-Reparatur, die DNA-Addukte anhand von Veränderung der helikalen Struktur erkennt (Goode et al., 2002). Es wird die Globale-Genom-Reparatur von der Transkriptions-gekoppelten Reparatur unterschieden. Die erste entfernt DNA-Addukte im gesamten Genom, während die Transkriptions-gekoppelte Reparatur selektiv die DNA-Addukte im transkribierten DNA-Strang von exprimierten Genen berichtet (Hanawalt et al., 1994; Mitchell et al., 2003). Daneben können auch Crosslinks und oxidative Genomschäden über dieses Reparaturverfahren korrigiert werden (Tang et al., 1992). Vermutlich spielt die Basen-Exzisions-Reparatur bei der Entfernung von DNA-Addukten auch eine Rolle (Braithwaite et al., 1998).

Zur quantitativen Untersuchung der Reparatur BPDE induzierter DNA-Schäden wurden Reparaturzeiten von 15 und 30 min gewählt. Ähnliche Zeiten wurden auch in mehreren anderen Studien zur Darstellung der Reparaturkapazität verwendet (Kleinsasser et al., 2005; Schmezer et al., 2001). Diese Zeiten sind wohl optimal für die mittels alkalischer Mikrogelelektrophorese gemessene Reparatur von Einzelstrangbrüchen (Schmezer et al., 2001). Während die Halbwertszeit für die Reparatur dieser Schäden nur wenige Minuten beträgt, ist die Halbwertszeit zur Reparatur von Doppelstrangbrüchen, mehr als eine Stunde (Frankenberg-Schwager, 1989; Lopez-Larrazá et al., 1990). Im Gegensatz zu den meisten Studien zur DNA-Reparatur, die an Lymphozyten stattfanden (Gajecka et al., 2005; Schmezer et al., 2001; Wu et al., 1998; Wu et al.,

2005), wurden die Versuche an oropharyngealer Schleimhaut von Patienten mit und ohne Tumor im oberen Aerodigestivtrakt durchgeführt. Es besteht durch die Verwendung von Zielgewebe der Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich eine stärkere Aussagekraft. Ein Vergleich der genotoxischen Sensitivität zwischen Lymphozyten und Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes zeigte eine schlechte Korrelation zwischen beiden Zelltypen (Kleinsasser et al., 2000). Die Reparatur fand bei 4°C statt, um eine ausreichende Zellvitalität zu gewährleisten.

Nach Reparaturzeiten von 15 und 30 min konnte für beide Spenderkollektive eine Reduktion der DNA-Schäden gemessen werden. Das Reparaturverhalten unterschied sich jedoch signifikant zwischen tumorfreien Kontrollpersonen und den Karzinompatienten. In der Kontrollgruppe wurden signifikant niedrigere OTM-Mediane ermittelt. Tumorfreie Zellspender konnten somit DNA-Schäden in den vorgegebenen Reparaturintervallen stärker reduzieren. Die Zellen gesunder Patienten scheinen über eine effizientere DNA-Reparatur zu verfügen. Dieses Ergebnis stimmt mit mehreren Studien zur Evaluierung von endogenen Risikofaktoren überein. Patienten mit Larynxkarzinom und nicht-kleinzeligem Lungenkarzinom zeigten Unterschiede im Reparaturverhalten verglichen mit Kontrollpatienten (Gajecka et al., 2005; Rajaee-Behbahani et al., 2001).

4.3.2 DNA-Reparaturkapazität als endogener Risikomarker

Zur Evaluierung des individuellen Risikos für eine Krebserkrankung ist die DNA-Reparaturkapazität ein wichtiger Faktor. Die DNA-Reparaturkapazität (DRC) bietet Schutz gegenüber genotoxischen Karzinogenen. Eine Verminderung der Reparaturkapazität führt zu einer erhöhten Suszeptibilität von Mutationen und genomischer Instabilität. Die DRC kann in Zellen auf verschiedene Arten gemessen werden: Als Anteil der Schadensabnahme, als Substrataufnahme für die unkontrollierte DNA-Synthese oder als Expression geschädigter Reportergene in Wirtszellen (Schmezer et al., 2001). In einer Übersicht von Studien zur DNA-Reparaturkapazität und Tumorsuszeptibilität konnte gezeigt werden, dass in den meisten Fällen eine Assoziation zwischen verringriger DNA-Reparaturkapazität und erhöhtem Tumorrisiko bestand (Berwick und Vineis, 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA-Reparaturkapazität wie auch in einigen anderen Studien (Harréus et al., 2001; Kleinsasser et al., 2005; Rajaee-Behbahani et al., 2001; Schmezer et al., 2001; Spitz et al., 2003) mittels Comet Assay gemessen. Jedoch wurde hier nicht an Lymphozyten gearbeitet, sondern erstmals an Schleimhautzellen aus dem oberen Aerodigestivtrakt. Die DRC wurde als Anteil der

DNA bestimmt, die nach Ausgangsschädigung mittels BPDE in den Zeitintervallen von 15 und 30 min repariert wurde.

Sowohl für die Kontrollpersonen als auch für Patienten mit Kopf-Hals-Karzinom konnte ein Unterschied zwischen der DRC¹⁵ und DRC³⁰ festgestellt werden, wobei nach 30 min eine höhere Reparaturkapazität vorlag. Der Vergleich zwischen beiden Spendergruppen ergab eine signifikant verminderte DRC für das Kollektiv der Karzinompatienten. Dieses Ergebnis lässt den Rückschluss zu, dass eine verminderte DNA-Reparaturkapazität in den Zielzellen des oberen Aerodigestivtraktes nach Schädigung durch ein Tabakkarzinogen als endogener Risikomarker für die Entstehung von Karzinomen im Kopf-Hals-Bereich zu werten ist. In einigen Studien wurde bereits eine reduzierte DRC mit einem Risiko für die Entstehung Karzinome im oberen Aerodigestivtrakt assoziiert (Gajecka et al., 2005; Schantz et al., 1997). Daneben konnte ein Zusammenhang zwischen einer familiären Tumorbelastung und einer mangelhaften DRC bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen im Mutagensensitivitäts Assay nachgewiesen werden (Bondy et al., 1993). Auch in der mitochondrialen DNA von Kopf-Hals-Karzinom-Zelllinien konnte mit dem Verfahren der quantitativen PCR ein Reparaturdefizit beobachtet werden, das für die Entstehung von Malignomen im oberen Aerodigestivtrakt eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Kim et al., 2006). Als Ursache für die individuell unterschiedliche Suszeptibilität für Karzinome im oberen Aerodigestivtrakt wurden Variationen in der Genexpression der Reparaturenzyme XRCC1, XPD, ERCC1 und den Genen der Zellzykluskontrolle p 53 und Cyklin D1 diskutiert. (McWilliams et al., 2000; Nishimoto et al., 2004; Sturgis et al., 1999; Sturgis et al., 2002). Diese genetischen Variationen könnten die beobachtete Verminderung der DNA-Reparaturkapazität bedingen (Goode et al., 2002). Bei Patienten mit Nasopharynxkarzinom konnte die Reparaturkapazität gemessen an Lymphozyten jedoch nicht als endogener Risikomarker erkannt werden (Kleinsasser et al., 2005). Außer im Kopf-Hals-Bereich wurden Reparaturdefizite bei Patienten mit Lungentumoren ermittelt. An Lymphozyten von Patienten mit nicht-kleinzeligem Lungenkarzinom zeigte sich im Comet Assay eine verminderte Reparaturkapazität für 15 min (Rajaee-Behbahani et al., 2001).

Zusammenfassend scheint also ein Zusammenhang zu bestehen zwischen einem Defizit der Reparaturkapazität und einer erhöhten Suszeptibilität für Malignome im oberen Aerodigestivtrakt, speziell für Karzinome des Oropharynx. Die Ursachen hierfür sind noch nicht eindeutig geklärt. Zur genauen Identifizierung endogener Risikomarker für die Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt sind weitere Untersuchungen erforderlich, in denen vor allem die Ursachen für das Reparaturdefizit bei Patienten mit Oropharynxkarzinom auf chromosomaler bzw. genetischer Ebene zu klären sind.

4.4 Protektive Wirkung der Pflanzenphenole (+)-Catechin und Tanninsäure

Neben zahlreichen genotoxischen Umweltstoffen, die an der Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt beteiligt sind, gibt es auch Stoffe die protektiv gegenüber schädigenden Einflüssen wirken. Ein protektiver Effekt von obst- und gemüsehaltiger Ernährung konnte unter anderem für Karzinome von Mundhöhle, Pharynx, Ösophagus und Lunge beobachtet werden (Block et al., 1992; Steinmetz und Potter, 1996).

Für diese protektiven Effekte werden unter anderem pflanzliche Phenole verantwortlich gemacht. Vertreter dieser Pflanzenphenole sind sowohl das Flavonoid (+)-Catechin als auch das Tannin Tanninsäure. Beide dienen in der vorliegenden Untersuchung als Teststoffe. Ihnen werden vor allem antioxidative Eigenschaften zugeschrieben. Als Antioxidantien können sie bei oxidativem Stress reaktive Sauerstoffradikale abfangen und so die Zellen vor Genomschäden schützen. Als Ursache für die tumorprotektive Wirkung dieser Pflanzenstoffe werden neben der antioxidativen Wirkung eine Inhibition der Zellproliferation, der Expression von Onkogenen, der Signaltransduktionswege sowie eine Enzyminhibition von Phase I Enzymen und damit Minderung der Aktivierung von Karzinogenen diskutiert. Außerdem scheinen eine Induktion der Zelldifferenzierung, der Expression von Tumorsuppressorgenen, der Apoptose sowie eine Enzyminduktion von Phase II Enzymen und damit Steigerung der Detoxifikation eine Rolle zu spielen. Auch eine Modulation des Immunsystems und ein Schutz vor DNA-Bindung sind vermutlich für die tumorprotektiven Eigenschaften der Phenolen verantwortlich (Liu, 2004).

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure auf oropharyngeale Miniorgane geprüft. Dabei wurden mögliche genotoxische Eigenschaften der Teststoffe als auch protektive Effekte der Polyphenole gegenüber dem Mutagen BPDE untersucht. Hierfür wurden die Miniorgane vor einer Exposition gegenüber BPDE mit den Polyphenolen vorbehandelt. Als Testverfahren diente, wie auch in einigen anderen Studien, der Comet Assay (Dauer et al., 2003; Labieniec und Gabryelak, 2003; Wu et al., 2004). In vielen Studien wurde als Standardmethode zur Untersuchung der Mutagenität auch der Ames Test an *Salmonella typhimurium* Stämmen eingesetzt (Catterall et al., 2000; Chen und Chung, 2000; Huang et al., 1983; Kaur et al., 1998). Demgegenüber bietet der Comet Assay unter anderem den Vorteil, mutagene Effekte an humanen Zellen untersuchen zu können. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Wirkung von (+)-Catechin und Tanninsäure auf oropharyngeale Epithelzellen dargestellt. Durch die Inkubation der Zellen im natürlichen Epithelverband ist ein *in vitro*-Modell gewählt worden, das der Situation *in vivo* sehr nahe kommt, da die Miniorgane metabolische Eigenschaften

aufweisen. Das Verfahren zur Herstellung von Miniorgankulturen ist zuvor in unserem Labor etabliert und erstmals mit dem Comet Assay kombiniert worden (Kleinsasser et al., 2001a).

Als Konzentrationen für (+)-Catechin und Tanninsäure wurden 1 und 5 µM verwendet. *In vivo* liegen Polyphenole in Plasmakonzentrationen von 0,1-10 µmol/l (0,1-10 µM) vor (Kroon et al., 2004), wobei Flavanole selten 1 µmol/l (1µM) überschreiten (Manach et al., 2004). Die gewählten Konzentrationen liegen also im physiologisch relevanten Bereich. Bezüglich der gewählten Teststoffe ist anzumerken, dass es sich um Aglykone handelt. *In vivo* hingegen finden Metabolisierungsvorgänge statt und die Polyphenole liegen wohl als glukuronidierte und sulfatierte Konjugate vor (Kroon et al., 2004; Manach et al., 2004).

4.4.1 Protektive Wirkung von (+)-Catechin gegenüber BPDE induzierten DNA-Schäden an Miniorganen

Als ein Repräsentant der Flavonoide wurde (+)-Catechin gewählt. Außer in verschiedenen Obstsorten wie Äpfeln, Aprikosen und Weintrauben ist (+)-Catechin in dunkler Schokolade, in Rotwein, in grünem und schwarzem Tee enthalten (Arts et al., 2000a; Arts et al., 2000b). Neben einer antioxidativen, entzündungshemmenden, gerinnungshemmenden, lipidsenkenden, hypotensiven und antidiabetogenen Wirkung besitzen Catechine im Körper auch chemopräventive Eigenschaften (Mennen et al., 2005). Dorai et al. lieferten eine Übersicht über die chemopräventiven Wirkungsmechanismen von Catechin in der Zelle (Dorai und Aggarwal, 2004).

Bei der Untersuchung des genotoxischen Potentials von (+)-Catechin an oropharyngealen Miniorganen ergab sich zwar für die Konzentration von 1 µM (ca. 3 µg/ml) eine Signifikanz, jedoch blieb der OTM-Mittelwert < 2, also definitionsgemäß im nicht-genotoxischen Bereich. In der Konzentration 5 µM (ca. 16 µg/ml) bestand kein signifikanter Unterschied zur Negativkontrolle. Es zeigten sich letztlich also keine genotoxischen Effekte von (+)-Catechin in der vorliegenden Studie. Im Comet Assay konnte an Hep G2 Zelllinien durch (+)-Catechin in Konzentrationen bis zu 500 µg/ml nur ein leichter Anstieg an DNA-Strangbrüchen verzeichnet werden (Dauer et al., 2003). Genotoxische Effekte durch (+)-Catechin scheinen erst in höheren Konzentrationen eine Rolle zu spielen.

Die BPDE-induzierten Genomschäden konnten in unserer Untersuchung durch die Vorbehandlung der Miniorgane mit 1 µM bzw. 5 µM (+)-Catechin signifikant reduziert werden. Es konnten somit protektive Effekte gegenüber DNA-Schäden durch ein Tabakkarzinogen an oropharyngealen Miniorganen nachgewiesen werden. Bei *in vitro*-Versuchen an humanen Hepatomazelllinien Hep G2 wurden durch Vorbehandlung der

Zellen mit 18 µg/ml (+)-Catechin Benzo[a]pyren induzierte DNA-Strangbrüche bis zu 50 % reduziert werden. BPDE induzierte DNA-Schäden konnten durch Vorbehandlung der Zellen mit (+)-Catechin bis zu 90 % vermindert werden. Als Ursache wurden eine direkte Interaktion mit BPDE und antioxidative Effekte von (+)-Catechin diskutiert (Dauer et al., 2003). Auch eine Inhibition von Cytochrom-P450-abhängigen Monoxygenasen wurde für den antimutagenen Effekt von Catechinen verantwortlich gemacht (Apostolides et al., 1997). Darüber hinaus wurde berichtet, dass Catechin direkt mit BaP-Metaboliten interagieren kann und die Bindung von [3H]-BaP Metaboliten an die DNA von Kalbsthymus inhibieren kann (Nagabhushan et al., 1988). Dagegen existieren auch einige Studien, in denen kein antimutagener Effekt von (+)-Catechin beobachtet werden konnte. So wurde beispielsweise im Ames Test kein protektiver Effekt von (+)-Catechin gegenüber Benzo[a]pyren nachgewiesen (Catterall et al., 2000). Ebenso zeigte (+)-Catechin in einer Konzentration von 1 µM keinen Effekt auf die Mutagenität von heterozyklischen Aminen im *Salmonella typhimurium* Test (Apostolides et al., 1996). Weiterhin wurde diskutiert, dass Catechine für die antimutagenen Effekte von grünem und schwarzen Tee nicht hauptsächlich verantwortlich sind. Es zeigte sich im Vergleich verschiedener Teesorten keine Korrelation zwischen dem jeweiligen Catechingehalt und dem antigenotoxischen Potential (Bu-Abbas et al., 1996; Ohe et al., 2001). Trotzdem konnten in der vorliegenden Untersuchung protektive Effekte nachgewiesen werden. Vermutlich sind neben der antioxidativen Wirkung unter anderem auch die Inhibition von Onkogenen, die Induktion von Tumorsuppressorgenen, eine Minderung der Karzinogenaktivierung und ein Schutz vor DNA-Bindung für die antimutagenen Eigenschaften von Catechinen verantwortlich (Liu, 2004). Künftige Studien sind notwendig, um die protektiven Eigenschaften der Catechine genauer zu erforschen.

An humanen Kopf-Hals-Karzinom Zelllinien wurde bereits ein wachstumsemmender Effekt von Epigallocatechin Gallat (EGCG), einem Catechinbestandteil in grünem Tee gezeigt (Masuda et al., 2001). Diese *in vitro*-Studie legte den Nutzen einer chemopräventiven bzw. therapeutischen Anwendung von EGCG bei Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen nahe. Eine Übersicht verschiedener klinischer Studien zur Chemoprävention von Oropharynxkarzinomen ergab hingegen keinen Beweis für den Nutzen einer Gabe von Antioxidantien im Kopf-Hals-Bereich (Scheer et al., 2004). Allerdings wurden bei diesen Studien als Antioxidantien nur verschiedene Vitamine untersucht, während Pflanzenphenole wie Catechine unberücksichtigt blieben. Anders als im oberen Aerodigestivtrakt zeigte die klinische Anwendung von Catechinen in grünem Tee bei Patienten mit intraepithelialer Prostataneoplasie einen chemopräventiven Effekt gegenüber Prostatakarzinomen (Bettuzzi et al., 2006). Im

Tiermodell konnte neben der Inzidenz von Lungen- und gastrointestinalen Tumoren, auch die Inzidenz von oralen Tumoren durch Catechine aus grünem Tee bzw. EGCG reduziert werden (Crespy und Williamson, 2004; Ju et al., 2005). In Tierversuchen an Mäusen konnte eine Wachstumsinhibition und Regression von humanen Prostata- und Mammatumoren durch EGCG beobachtet werden (Liao et al., 1995).

Inwieweit ein chemopräventiver oder therapeutischer Nutzen von (+)-Catechin besteht ist noch weitgehend ungeklärt. Die vorliegenden Ergebnisse geben Anlass für weitere Untersuchungen, um die Wirkung und protektiven Mechanismen von (+)-Catechin auf Epithelien im Kopf-Hals-Bereich zu untersuchen.

4.4.2 Protektive Wirkung von Tanninsäure gegenüber BPDE induzierten DNA-Schäden an Miniorganen

Als Vertreter der Tannine wurde Tanninsäure ausgewählt. Tanninsäure ist in den meisten pflanzlichen Nahrungsmitteln enthalten (Chung et al., 1998), wobei vom Menschen täglich ca. 1 g aufgenommen wird (Sanyal et al., 1997). Neben adstringierenden, antioxidativen, antimikrobiellen, blutgerinnungsfördernden, blutdrucksenkenden, lipidsenkenden und immunmodulatorischen Wirkungen werden Tanninen auch tumorprotektive Eigenschaften zugeschrieben (Chung et al., 1998; Sanyal et al., 1997). Untersuchungen an Nagern zeigten einen protektiven Effekt von Tanninsäure auf die PAH induzierte Tumorgenese in Lunge, Magen und Haut (Athar et al., 1989; Mukhtar et al., 1988). *In vitro* konnte ein wachstumshemmender Effekt von Tanninsäure auf humane maligne Cholangiozyten festgestellt werden (Marienfeld et al., 2003).

Die Untersuchung eines möglichen genotoxischen Potentials von Tanninsäure zeigte sich für die Konzentration von 5 µM (ca. 10 µg/ml) nicht signifikant. In der Konzentration von 1 µM (ca. 2 µg/ml) ergab sich zwar eine Signifikanz, jedoch blieb der OTM-Mittelwert < 2, also definitionsgemäß im nicht-genotoxischen Bereich. In einigen anderen Studien zuvor konnte hingegen ein genotoxischer Effekt durch Tannin nachgewiesen werden. Durch 100 µg/ml Tanninsäure wurden mittels Comet Assay DNA-Strangbrüche in humanen Lymphozyten induziert (Wu et al., 2004). An Hep G2 Zelllinien konnte mit der gleichen Methode ein genotoxischer Effekt von Hamamelistannin in Konzentrationen von 2 – 166 µg/ml beobachtet werden (Dauer et al., 2003). Ein Anstieg der Micronuklei von 50% wurde durch 500 µg/ml Tanninsäure in Hep G2 Zellen induziert (Sanyal et al., 1997). An chinesischen Hamsterzelllinien konnten DNA-Strangbrüche durch 15 µM Tannin verursacht werden (Labieniec und Gabryelak, 2003). Eine mögliche Ursache für die beobachteten genotoxischen Effekte könnte in der prooxidativen Wirkung von Tanninsäure durch Bildung von

Hydroxylradikalen liegen (Khan et al., 2000). Im Gegensatz zu diesen Studien zeigte sich in einer niedrigen Konzentration von 0.2 µmol Tanninsäure im Ames Test kein mutagener Effekt (Chen und Chung, 2000). In der vorliegenden Untersuchung wurden ebenfalls niedrige Konzentrationen an Tanninsäure von 1 µM und 5 µM gewählt. In niedrigen Konzentrationen scheinen also genotoxische und mutagene Effekte keine Rolle zu spielen.

Durch eine Vorbehandlung der Miniorgane mit Tanninsäure (1 µM und 5 µM) konnten die genotoxischen Schäden durch BPDE signifikant reduziert werden. Ein protektiver und antimutagener Effekt von Tanninsäure wurde also an oropharyngealen Epithelzellen festgestellt. Protektive Effekte von Tanninsäure wurden bereits gegenüber verschiedenen Mutagenen beschrieben (Chen und Chung, 2000; Gichner et al., 1987; Huang et al., 1985; Sanyal et al., 1997; Wu et al., 2004). Auch Dauer et al. wiesen im Comet Assay an Hep G2 Zelllinien eine protektive Wirkung von Hamamelistannin gegenüber polzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen nach. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Genotoxizität von BaP um 33 % nach Vorbehandlung mit 2 – 166 µg/ml Hamamelistannin. Ein protektiver Effekt gegenüber BPDE mit einer Inhibitionsrate von bis zu 90 % konnte bei Vorbehandlung der Zellen mit Hamamelistannin beobachtet werden. Als Ursache wurden neben geringen antioxidativen Effekten vor allem Adduktbildungen mit dem ultimativen Karzinogen BPDE angenommen, während eine Beeinflussung von Reparaturmechanismen ausgeschlossen wurde (Dauer et al., 2003). Bereits in früheren Studien konnte der antimutagene Effekt von Tanninsäure, Ellagic acid und anderen hydrolysierbaren Tanninen auf eine direkte Interaktion der Polyphenole mit dem Diol-Epoxid und eine Bildung von Phenol-Mutagen-Addukten zurückgeführt werden (Huang et al., 1985; Wood et al., 1982). In tierexperimentellen Studien zur Inhibition der Benzo[a]pyren induzierten Haut-Tumorgenese durch Tanninsäure wurden eine Reduktion der promotorinduzierten Lipoxygenaseaktivität, eine Inhibition von Cytochrom-P450-abhängigen Monoxygenasen und antioxidative Eigenschaften diskutiert (Gali et al., 1991; Mukhtar et al., 1988). Wie für die protektive Wirkung von Tanninsäure gegenüber oxidativen DNA-Schäden durch H₂O₂ vermutet wurde (Wu et al., 2004), könnte die Fähigkeit, freie Radikale sowie Eisen- und Kupferionen einzufangen, auch für die antimutagene Wirkung gegenüber BPDE von Bedeutung sein. Die Untersuchung verschiedener Tanninfraktionen zeigte einen abnehmenden antimutagenen Effekt ausgehend von der Fraktion der oligomeren Tannine wie Tanninsäure (Kaur et al., 1998). Als Ursache hierfür wurde eine stärkere Enzyminhibition Cytochrom-P450-abhängiger Monoxygenasen durch oligomere Tannine diskutiert. Für die Enzyminhibition schien die Anzahl an Hydroxylgruppen maßgeblich (Wang et al.,

1988). Zusammenfassend erscheinen für die protektiven Effekte von Tanninsäure an oropharyngalen Epithelien in der vorliegenden Versuchsreihe eine Reihe chemischer und metabolischer Interaktionen verantwortlich.

Studien für die Anwendung von Tanninsäure in der Chemoprävention von Kopf-Hals-Karzinomen existieren zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht. Tierversuche an Nagern ergaben einen protektiven Effekt von Tanninsäure auf die PAH induzierte Tumorgenese in Lunge, Magen und Haut (Athar et al., 1989; Mukhtar et al., 1988). Ein wachstumshemmender Effekt von Tanninsäure auf humane maligne Cholangiozyten zeigte sich auch bei *in vitro*-Versuchen an Mäusen (Marienfeld et al., 2003). Inwieweit ein protektiver Effekt auf die Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt des Menschen besteht, soll in künftigen Studien geklärt werden, um einen präventiven und chemotherapeutischen Nutzen im Zusammenhang mit Kopf-Hals-Karzinomen ableiten zu können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Hintergrund und Zielsetzung

Der Entstehung von Karzinomen im oberen Aerodigestivtrakt liegen zahlreiche exogene Risikofaktoren wie anhaltender Alkohol- und Tabakkonsum, und eine Exposition gegenüber verschiedenen Karzinogenen in Umwelt und am Arbeitsplatz zu Grunde. Neben den exogenen Faktoren bestimmt die individuelle Empfindlichkeit (Suszeptibilität) das Risiko, an einem Tumor im Kopf-Hals-Bereich zu erkranken. Die Suszeptibilität wird von verschiedenen genetischen Faktoren beeinflusst, wie der Empfindlichkeit gegenüber DNA-schädigenden Fremdstoffen (Mutagensensitivität) und der DNA-Reparaturkapazität. Daneben existieren jedoch auch Substanzen, die protektiv wirken und die DNA vor genotoxischen Einflüssen schützen. Diese Stoffe zu identifizieren und deren Wirksamkeit zu bewerten, ist für chemopräventive und chemotherapeutische Ansätze von großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurden mögliche Unterschiede in der Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität zwischen Schleimhautzellen von Patienten mit und Patienten ohne Oropharynxkarzinom evaluiert. Daneben sollten protektive Wirkungen der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure an oropharyngealen Miniorganen geprüft werden.

5.2 Methoden und Ergebnisse

Zur Quantifizierung induzierter DNA-Schäden wurde die alkalische Einzelzell-Mikrogel-elektrophorese (Comet Assay) eingesetzt. Bei diesem etablierten Kurzzeittestverfahren ergeben sich im elektrischen Feld abhängig von der Bruchstückgröße unterschiedliche Wanderungsstrecken von DNA-Fragmenten. Das kometenähnliche Verteilungsmuster kann fluoreszenzmikroskopisch beurteilt und mit dem Olive Tail Moment quantifiziert werden. Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, DNA-Crosslinks und inkomplette Exzisionsreparaturstellen werden mit dieser etablierten Methode dargestellt.

Zur Identifizierung endogener Risikofaktoren wurden an oropharyngealen Schleimhautzellen von 15 Patienten mit und 17 Patienten ohne Oropharynxkarzinom die Mutagensensitivität, d.h. die individuelle Empfindlichkeit gegenüber Fremdstoffen, und DNA-Reparaturkapazität, d.h. die Fähigkeit in einem vorgegebenen Zeitintervall DNA-Schäden zu reparieren, bestimmt. Als genotoxische Substanz diente das bekannte Tabakkarzinogen BPDE. Im Gegensatz zu einigen anderen Studien konnten keine Unterschiede in der Mutagensensitivität zwischen beiden Gruppen gefunden

werden. Die Messung der Mutagensensitivität scheint entscheidend vom gewählten Testverfahren, dem Patientenkollektiv, der Testsubstanz und den zu untersuchenden Zellen abhängig zu sein. Die DNA-Reparaturkapazität, gemessen als prozentualer Anteil der reparierten DNA in 15 und 30 min, war bei Schleimhautzellen von Tumorpatienten signifikant niedriger. Somit konnte eine verminderte DNA-Reparaturkapazität als endogener Risikomarker für die Entstehung von Oropharynxkarzinomen identifiziert werden.

An oropharyngealen Miniorganen tumorfreier Kontrollpatienten wurden erstmals protektive Effekte der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure in zwei Konzentrationen mittels Comet Assay untersucht. Eigene genotoxische Effekte der Teststoffe konnten ausgeschlossen werden. Durch Vorbehandlung der oropharyngealen Zellen mit den Phenolen (+)-Catechin und Tanninsäure konnten hingegen durch das Tabakkarzinogen BPDE hervorgerufene DNA-Schäden signifikant reduziert werden. Neben der antioxidativen Wirkung der Phenole scheinen eine Reihe chemischer und metabolischer Interaktionen für die protektiven Effekte verantwortlich zu sein.

5.3 Schlußfolgerung

Als endogene Risikomarker für die Tumorentstehung im oberen Aerodigestivtrakt konnte eine reduzierte DNA-Reparaturkapazität in Epithelzellen, dem Zielorgan der Karzinogenese, beschrieben werden. Unterschiede in der Mutagensensitivität spielten in vorliegenden Untersuchungen keine Rolle. Variationen in der Genexpression könnten die beobachtete Verminderung der DNA-Reparaturkapazität bedingen und sollten in weiteren Studien untersucht werden. Hierdurch könnten künftige präventive und therapeutische Ansätze im Zusammenhang mit der Kopf-Hals-Karzinogenese geschaffen werden.

Eine protektive Wirkung der Polyphenole (+)-Catechin und Tanninsäure konnte an Schleimhautzellen des Oropharynx gezeigt werden. Die klinische Bedeutung der protektiven Wirkungen dieser Stoffe gegenüber Karzinogenen im Kopf-Hals-Bereich und ein möglicher tumorpräventiver bzw. therapeutischer Nutzen dieser Stoffe sollte in weiterführenden Studien evaluiert werden.

6. LITERATUR

Apostolides Z, Balentine DA, Harbowy ME, Hara Y, Weisburger JH:
Inhibition of PhIP mutagenicity by catechins, and by theaflavins and gallate esters.
Mutat Res 389:167-172 (1997).

Apostolides Z, Balentine DA, Harbowy ME, Weisburger JH:
Inhibition of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) mutagenicity by black
and green tea extracts and polyphenols.
Mutat Res 359:159-163 (1996).

Arts IC, van De PB, Hollman PC:
Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 1. Fruits, vegetables,
staple foods, and processed foods.
J Agric Food Chem 48:1746-1751 (2000a).

Arts IC, van De PB, Hollman PC:
Catechin contents of foods commonly consumed in The Netherlands. 2. Tea, wine, fruit
juices, and chocolate milk.
J Agric Food Chem 48:1752-1757 (2000b).

Athar M, Khan WA, Mukhtar H:
Effect of dietary tannic acid on epidermal, lung, and forestomach polycyclic aromatic
hydrocarbon metabolism and tumorigenicity in Sencar mice.
Cancer Res 49:5784-5788 (1989).

Atula S, Auvinen E, Grenman R, Syrjanen S:
Human papillomavirus and Epstein-Barr virus in epithelial carcinomas of the head and neck
region.
Anticancer Res 17:4427-4433 (1997).

Berwick M, Vineis P:
Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review.
J Natl Cancer Inst 92:874-897 (2000).

Bettuzzi S, Brausi M, Rizzi F, Castagnetti G, Peracchia G, Corti A:
Chemoprevention of human prostate cancer by oral administration of green tea catechins in
volunteers with high-grade prostate intraepithelial neoplasia: a preliminary report from a one-
year proof-of-principle study.
Cancer Res 66:1234-1240 (2006).

Block G, Patterson B, Subar A:
Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence.
Nutr Cancer 18:1-29 (1992).

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

Boffetta P, Hashibe M:
Alcohol and cancer.
Lancet Oncol 7:149-156 (2006).

Bondy ML, Spitz MR, Halabi S, Fueger JJ, Schantz SP, Sample D, Hsu TC:
Association between family history of cancer and mutagen sensitivity in upper aerodigestive tract cancer patients.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2:103-106 (1993).

Braithwaite E, Wu X, Wang Z:
Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms in vitro.
Carcinogenesis 19:1239-1246 (1998).

Bu-Abbas A, Nunez X, Clifford MN, Walker R, Ioannides C:
A comparison of the antimutagenic potential of green, black and decaffeinated teas: contribution of flavanols to the antimutagenic effect.
Mutagenesis 11:597-603 (1996).

Catterall F, Souquet JM, Cheynier V, Pascual-Teresa S, Santos-Buelga C, Clifford MN, Ioannides C:
Differential modulation of the genotoxicity of food carcinogens by naturally occurring monomeric and dimeric polyphenolics.
Environ Mol Mutagen 35:86-98 (2000).

Chen SC, Chung KT:
Mutagenicity and antimutagenicity studies of tannic acid and its related compounds.
Food Chem Toxicol 38:1-5 (2000).

Cheng SC, Hilton BD, Roman JM, Dipple A:
DNA adducts from carcinogenic and noncarcinogenic enantiomers of benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide.
Chem Res Toxicol 2:334-340 (1989).

Chung KT, Wong TY, Wei CI, Huang YW, Lin Y:
Tannins and human health: a review.
Crit Rev Food Sci Nutr 38:421-464 (1998).

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 9:713-717 (2000).

Cloos J, Reid CB, Snow GB, Braakhuis BJ:
Mutagen sensitivity: enhanced risk assessment of squamous cell carcinoma.
Eur J Cancer B Oral Oncol 32B:367-372 (1996).

Collins AR:
The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations.
Mol Biotechnol 26:249-261 (2004).

Cosman M, de los SC, Fiala R, Hingerty BE, Singh SB, Ibanez V, Margulis LA, Live D, Geacintov NE, Broyde S, :
Solution conformation of the major adduct between the carcinogen (+)-anti-benzo[a]pyrene diol epoxide and DNA.
Proc Natl Acad Sci U S A 89:1914-1918 (1992).

Coutelle C, Ward PJ, Fleury B, Quattrochi P, Chambrin H, Iron A, Couzigou P, Cassaigne A:
Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms.
Hum Genet 99:319-325 (1997).

Crespy V, Williamson G:
A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models.
J Nutr 134:3431S-3440S (2004).

Dauer A, Hensel A, Lhoste E, Knasmuller S, Mersch-Sundermann V:
Genotoxic and antigenotoxic effects of catechin and tannins from the bark of Hamamelis virginiana L. in metabolically competent, human hepatoma cells (Hep G2) using single cell gel electrophoresis.
Phytochemistry 63:199-207 (2003).

De Stefani E, Boffetta P, Ronco AL, Correa P, Oreggia F, Deneo-Pellegrini H, Mendilaharsu M, Leiva J:
Dietary patterns and risk of cancer of the oral cavity and pharynx in Uruguay.
Nutr Cancer 51:132-139 (2005).

Dorai T, Aggarwal BB:
Role of chemopreventive agents in cancer therapy.
Cancer Lett 215:129-140 (2004).

EU:
Commission regulation (EC) No. 208/2005 of 4 February 2005.
Official J EU 208/2005: L34-3-L34/5 (2005).

Frankenberg-Schwager M:
Review of repair kinetics for DNA damage induced in eukaryotic cells in vitro by ionizing radiation.
Radiother Oncol 14:307-320 (1989).

Gabos S, Ikonomou MG, Schopflocher D, Fowler BR, White J, Prepas E, Prince D, Chen W:
Characteristics of PAHs, PCDD/Fs and PCBs in sediment following forest fires in northern Alberta.
Chemosphere 43:709-719 (2001).

Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskula-Sztul R, Wierzbicka M, Szyfter W, Szyfter K:
Reduced DNA repair capacity in laryngeal cancer subjects. A comparison of phenotypic and genotypic results.
Adv Otorhinolaryngol 62:25-37 (2005).

Gali HU, Perchellet EM, Perchellet JP:
Inhibition of tumor promoter-induced ornithine decarboxylase activity by tannic acid and other polyphenols in mouse epidermis in vivo.
Cancer Res 51:2820-2825 (1991).

Gichner T, Pospisil F, Veleminsky J, Volkeova V, Volke J:
Two types of antimutagenic effects of gallic and tannic acids towards N-nitroso-compounds-induced mutagenicity in the Ames Salmonella assay.
Folia Microbiol (Praha) 32:55-62 (1987).

Goode EL, Ulrich CM, Potter JD:
Polymorphisms in DNA repair genes and associations with cancer risk.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 11:1513-1530 (2002).

Hanawalt PC, Donahue BA, Sweder KS:
Repair and transcription. Collision or collusion?
Curr Biol 4:518-521 (1994).

Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G:
A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells.
Mutat Res 390:179-188 (1997).

Harréus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H:
[Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract].
Laryngorhinootologie 78:176-181 (1999).

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 80:23-26 (2001).

Hartwell LH, Weinert TA:
Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events.
Science 246:629-634 (1989).

Hashibe M, Brennan P, Strange RC, Bhisey R, Cascorbi I, Lazarus P, Oude Ophuis MB, Benhamou S, Foulkes WD, Katoh T, Coutelle C, Romkes M, Gaspari L, Taioli E, Boffetta P:
Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 12:1509-1517 (2003).

Ho T, Wei Q, Sturgis EM:
Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck.
Head Neck (2007).

Hoffmann D., Wynder El:
Aktives und passives Rauchen. aus: Lehrbuch der Toxikologie. Hrsg.: Marquardt H., Schäfer S. BI-Wiss.-Verlag, Mannheim.
589-604 (1994).

Hoffmann H, Hogel J, Speit G:
The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis.
Mutagenesis 20:455-466 (2005).

Hollman PC, Katan MB:
Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability.
Food Chem Toxicol 37:937-942 (1999).

Homann N, Stickel F, Konig IR, Jacobs A, Junghanns K, Benesova M, Schuppan D, Himsel S, Zuber-Jerger I, Hellerbrand C, Ludwig D, Caselmann WH, Seitz HK:
Alcohol dehydrogenase 1C*1 allele is a genetic marker for alcohol-associated cancer in heavy drinkers.
Int J Cancer (2005).

Hong JY, Yang CS:
Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity.
Environ Health Perspect 105 Suppl 4:759-762 (1997).

Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP:
Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility.
Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1:83-89 (1991).

Huang MT, Chang RL, Wood AW, Newmark HL, Sayer JM, Yagi H, Jerina DM, Conney AH:
Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by tannic acid, hydroxylated anthraquinones and hydroxylated cinnamic acid derivatives.
Carcinogenesis 6:237-242 (1985).

Huang MT, Wood AW, Newmark HL, Sayer JM, Yagi H, Jerina DM, Conney AH:
Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol-epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by phenolic plant flavonoids.
Carcinogenesis 4:1631-1637 (1983).

International Agency for Research on Cancer:
Benzo[a]pyren. Monographs on the evaluation of the carcinogenic of chemicals to humans.
IARC 32:211-237 (1983).

International Agency for Research on Cancer:
Acetaldehyde. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans.
IARC 71:319 (1999).

Ju J, Hong J, Zhou JN, Pan Z, Bose M, Liao J, Yang GY, Liu YY, Hou Z, Lin Y, Ma J, Shih WJ, Carothers AM, Yang CS:
Inhibition of intestinal tumorigenesis in Apcmin/+ mice by (-)-epigallocatechin-3-gallate, the major catechin in green tea.
Cancer Res 65:10623-10631 (2005).

Kaur S, Grover IS, Singh M, Kaur S:
Antimutagenicity of hydrolyzable tannins from Terminalia chebula in *Salmonella typhimurium*.
Mutat Res 419:169-179 (1998).

Khan NS, Ahmad A, Hadi SM:
Anti-oxidant, pro-oxidant properties of tannic acid and its binding to DNA.
Chem Biol Interact 125:177-189 (2000).

Kim MM, Glazer CA, Mambo E, Chatterjee A, Zhao M, Sidransky D, Califano JA:
Head and neck cancer cell lines exhibit differential mitochondrial repair deficiency in
response to 4NQO.
Oral Oncol 42:201-207 (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 (2001a).

Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F, Buhrlen M,
Huber RM, Rettenmeier AW:
The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in
ecogenotoxicology.
Mutat Res 561:63-73 (2004).

Kleinsasser NH, Sassen AW, Semmler MP, Staudenmaier R, Harréus UA, Richter E:
[Does nicotine add to the carcinogenic strain of tobacco smoke?].
HNO 54:369-375 (2006).

Kleinsasser NH, Wagner C, Wallner BC, Harreus UA, Kastenbauer ER:
Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients.
Mutat Res 491:151-161 (2001b).

Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK, Harréus UA:
Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa
cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay.
Mutat Res 467:21-30 (2000).

Kleinsasser NH, Wallner BC, Wagner C, Kastenbauer ER, Harréus UA:
DNA repair capacity in lymphocytes of nasopharyngeal cancer patients.
Eur Arch Otorhinolaryngol 262:561-566 (2005).

Kreimer AR, Randi G, Herrero R, Castellsague X, Vecchia CL, Franceschi S:
Diet and body mass, and oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: Analysis from
the IARC multinational case-control study.
Int J Cancer (2005).

Kroon PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, Williamson G:
How should we assess the effects of exposure to dietary polyphenols in vitro?
Am J Clin Nutr 80:15-21 (2004).

Kuo ML, Lee KC, Lin JK:
Genotoxicities of nitropyrenes and their modulation by apigenin, tannic acid, ellagic acid and indole-3-carbinol in the *Salmonella* and CHO systems.
Mutat Res 270:87-95 (1992).

Labieniec M, Gabryelak T:
Effects of tannins on Chinese hamster cell line B14.
Mutat Res 539:127-135 (2003).

Labieniec M, Gabryelak T:
Oxidatively modified proteins and DNA in digestive gland cells of the fresh-water mussel *Unio tumidus* in the presence of tannic acid and its derivatives.
Mutat Res (2005).

Liang Z, Lippman SM, Kawabe A, Shimada Y, Xu XC:
Identification of benzo(a)pyrene diol epoxide-binding DNA fragments using DNA immunoprecipitation technique.
Cancer Res 63:1470-1474 (2003).

Liao S, Umekita Y, Guo J, Kokontis JM, Hiipakka RA:
Growth inhibition and regression of human prostate and breast tumors in athymic mice by tea epigallocatechin gallate.
Cancer Lett 96:239-243 (1995).

Lijinsky W:
The formation and occurrence of polynuclear aromatic hydrocarbons associated with food.
Mutat Res 259:251-261 (1991).

Liu RH:
Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals.
Am J Clin Nutr 78:517S-520S (2003).

Liu RH:
Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action.
J Nutr 134:3479S-3485S (2004).

Lopez-Larraz D, De Luca JC, Bianchi NO:
The kinetics of DNA damage by bleomycin in mammalian cells.
Mutat Res 232:57-61 (1990).

MacLeod MC, Tang MS:
Interactions of benzo(a)pyrene diol-epoxides with linear and supercoiled DNA.
Cancer Res 45:51-56 (1985).

Maier H, Dietz A, Gewelke U, Seitz HK, Heller WD:
[Tobacco- and alcohol-associated cancer risk of the upper respiratory and digestive tract].
Laryngorhinootologie 69:505-511 (1990).

Maier H, Fischer G, Sennewald E, Heller WD:
[Occupational risk factors for pharyngeal cancer. Results of the Heidelberg Pharyngeal Cancer Study].
HNO 42:530-540 (1994).

Maier H, Tisch M:
[Occupation and cancer of the head-neck area].
HNO 47:1025-1037 (1999).

Maier H, Tisch M, Enderle G, Dietz A, Weidauer H:
[Occupational exposure to paint, lacquer and solvents, and cancer risk in the area of the upper aero-digestive tract].
HNO 45:905-908 (1997).

Manach C, Scalbert A, Morand C, Remesy C, Jimenez L:
Polyphenols: food sources and bioavailability.
Am J Clin Nutr 79:727-747 (2004).

Marienfeld C, Tadlock L, Yamagiwa Y, Patel T:
Inhibition of cholangiocarcinoma growth by tannic acid.
Hepatology 37:1097-1104 (2003).

Masuda M, Suzui M, Weinstein IB:
Effects of epigallocatechin-3-gallate on growth, epidermal growth factor receptor signaling pathways, gene expression, and chemosensitivity in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines.
Clin Cancer Res 7:4220-4229 (2001).

McWilliams JE, Evans AJ, Beer TM, Andersen PE, Cohen JI, Everts EC, Henner WD:
Genetic polymorphisms in head and neck cancer risk.
Head Neck 22:609-617 (2000).

Mennen LI, Walker R, Bennetau-Pelissero C, Scalbert A:
Risks and safety of polyphenol consumption.
Am J Clin Nutr 81:326S-329S (2005).

Mitchell JR, Hoeijmakers JH, Niedernhofer LJ:
Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing.
Curr Opin Cell Biol 15:232-240 (2003).

Moustacchi E:
DNA damage and repair: consequences on dose-responses.
Mutat Res 464:35-40 (2000).

Mukhtar H, Das M, Khan WA, Wang ZY, Bik DP, Bickers DR:
Exceptional activity of tannic acid among naturally occurring plant phenols in protecting against 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-, benzo(a)pyrene-, 3-methylcholanthrene-, and N-methyl-N-nitrosourea-induced skin tumorigenesis in mice.
Cancer Res 48:2361-2365 (1988).

Nagabhushan M, Maru GB, Amonkar AJ, Nair UJ, Santhanam U, Ammigan N, D'Souza AV, Bhide SV:
Catechin as an antimutagen: its mode of action.
J Cancer Res Clin Oncol 114:177-182 (1988).

Nishimoto IN, Pinheiro NA, Rogatto SR, Carvalho AL, Simpson AJ, Caballero OL, Kowalski LP:
Cyclin D1 gene polymorphism as a risk factor for squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive system in non-alcoholics.
Oral Oncol 40:604-610 (2004).

Neumann HG: Entstehung und Behandlung von Tumoren. Aus: Pharmakologie und Toxikologie Forth W., Henschler D. 6. Auflage. Wissenschaftsverlag, Mannheim (1992).

Ohe T, Marutani K, Nakase S:
Catechins are not major components responsible for anti-genotoxic effects of tea extracts against nitroarenes.
Mutat Res 496:75-81 (2001).

Olive PL, Banath JP:
Induction and rejoicing of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle.
Mutat Res 294:275-283 (1993).

Ono-Ogasawara M, Smith TJ:
Diesel exhaust particles in the work environment and their analysis.
Ind Health 42:389-399 (2004).

Ostling O, Johanson KJ:
Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells.
Biochem Biophys Res Commun 123:291-298 (1984).

Phillips H.J.:
Evaluation of culture dynamics. Dye exclusion test for cell viability. In Kruse, P.K. and Petterson, M.K. (eds.).
Tissue Culture Methods and Application Academic Press, New York 407-408 (1973).

Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U, Schroder HG, Schmezer P:
Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples.
Environ Mol Mutagen 24:23-45 (1994).

Popp W, Vahrenholz C, Schell C, Grimmer G, Dettbarn G, Kraus R, Brauksiepe A, Schmeling B, Gutzeit T, von Bulow J, Norpeth K:
DNA single strand breakage, DNA adducts, and sister chromatid exchange in lymphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers.
Occup Environ Med 54:176-183 (1997).

Rajaee-Behbahani N, Schmezer P, Risch A, Rittgen W, Kayser KW, Dienemann H, Schulz V, Drings P, Thiel S, Bartsch H:
Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer.
Int J Cancer 95:86-91 (2001).

Resau JH, Cottrell JR, Elligett KA, Hudson EA:
Cell injury and regeneration of human epithelium in organ culture.
Cell Biol Toxicol 3:441-458 (1987).

Riechelmann H:
[Occupational exposure and cancer of the oral cavity and pharynx].
Laryngorhinootologie 81:573-579 (2002).

Sanyal R, Darroudi F, Parzefall W, Nagao M, Knasmuller S:
Inhibition of the genotoxic effects of heterocyclic amines in human derived hepatoma cells by dietary bioantimutagens.
Mutagenesis 12:297-303 (1997).

Sassen AW, Richter E, Semmler MP, Harreus UA, Gamarra F, Kleinsasser NH:
Genotoxicity of nicotine in mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia.
Toxicol Sci 88:134-141 (2005).

Scalbert A, Williamson G:
Dietary intake and bioavailability of polyphenols.
J Nutr 130:2073S-2085S (2000).

Schantz SP, Zhang ZF, Spitz MS, Sun M, Hsu TC:
Genetic susceptibility to head and neck cancer: interaction between nutrition and mutagen sensitivity.
Laryngoscope 107:765-781 (1997).

Scheer M, Kuebler AC, Zoller JE:
Chemoprevention of oral squamous cell carcinomas.
Onkologie 27:187-193 (2004).

Schlesinger-Raab A, Lang S, Steuer-Vogt MK, Hözel D:
Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Karzinome.
Manual Kopf-Hals-Karzinome, Tumorzentrum München:3-14 (2003).

Schmezer P, Rajaee-Behbahani N, Risch A, Thiel S, Rittgen W, Drings P, Dienemann H, Kayser KW, Schulz V, Bartsch H:
Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes.
Mutagenesis 16:25-30 (2001).

Seitz HK, Simanowski UA:
Alcohol and carcinogenesis.
Annu Rev Nutr 8:99-119 (1988).

Semmler MP, Driemel O, Staudenmaier R, Froelich K, Kleinsasser NH:
[Effects of nicotine with special consideration given to tumorigenesis in the head and neck region.].
Mund Kiefer Gesichtschir 10:395-401 (2006).

Sharma R, Haque AK, Awasthi S, Singh SV, Piper JT, Awasthi YC:
Differential carcinogenicity of benzo[a]pyrene in male and female CD-1 mouse lung.
J Toxicol Environ Health 52:45-62 (1997).

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL:
A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells.
Exp Cell Res 175:184-191 (1988).

Smith CJ, Perfetti TA, Rumple MA, Rodgman A, Doolittle DJ:
"IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke.
Food Chem Toxicol 39:183-205 (2001).

Speit G, Hartmann A:
The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test
(comet assay).
Mutagenesis 10:555-559 (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 12:689-698 (2003).

Steinmetz KA, Potter JD:
Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review.
J Am Diet Assoc 96:1027-1039 (1996).

Steinsvåg SK, Strand M, Berg O, Miaguchi M, Olofsson J:
Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system.
Laryngoscope 101:1323-1331 (1991).

Sturgis EM, Castillo EJ, Li L, Zheng R, Eicher SA, Clayman GL, Strom SS, Spitz MR, Wei Q:
Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck.
Carcinogenesis 20:2125-2129 (1999).

Sturgis EM, Dahlstrom KR, Spitz MR, Wei Q:
DNA repair gene ERCC1 and ERCC2/XPD polymorphisms and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 128:1084-1088 (2002).

Syrjanen S:
Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer.
J Clin Virol 32 Suppl 1:S59-S66 (2005).

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 31:8429-8436 (1992).

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF:
Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing.
Environ Mol Mutagen 35:206-221 (2000).

Tsang NM, Chang KP, Lin SY, Hao SP, Tseng CK, Kuo TT, Tsai MH, Chung TC:
Detection of Epstein-Barr virus-derived latent membrane protein-1 gene in various head and neck cancers: is it specific for nasopharyngeal carcinoma?
Laryngoscope 113:1050-1054 (2003).

Wang ZY, Das M, Bickers DR, Mukhtar H:
Interaction of epicatechins derived from green tea with rat hepatic cytochrome P-450.
Drug Metab Dispos 16:98-103 (1988).

Wei Q, Gu J, Cheng L, Bondy ML, Jiang H, Hong WK, Spitz MR:
Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer.
Cancer Res 56:3975-3979 (1996).

Wood AW, Huang MT, Chang RL, Newmark HL, Lehr RE, Yagi H, Sayer JM, Jerina DM, Conney AH:
Inhibition of the mutagenicity of bay-region diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons by naturally occurring plant phenols: exceptional activity of ellagic acid.
Proc Natl Acad Sci U S A 79:5513-5517 (1982).

Wu LT, Chu CC, Chung JG, Chen CH, Hsu LS, Liu JK, Chen SC:
Effects of tannic acid and its related compounds on food mutagens or hydrogen peroxide-induced DNA strands breaks in human lymphocytes.
Mutat Res 556:75-82 (2004).

Wu X, Gu J, Hong WK, Lee JJ, Amos CI, Jiang H, Winn RJ, Fu KK, Cooper J, Spitz MR:
Benzo[a]pyrene diol epoxide and bleomycin sensitivity and susceptibility to cancer of upper aerodigestive tract.
J Natl Cancer Inst 90:1393-1399 (1998).

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 62:2813-2818 (2002).

Wu X, Roth JA, Zhao H, Luo S, Zheng YL, Chiang S, Spitz MR:
Cell cycle checkpoints, DNA damage/repair, and lung cancer risk.
Cancer Res 65:349-357 (2005).

Xie Z, Braithwaite E, Guo D, Zhao B, Geacintov NE, Wang Z:
Mutagenesis of benzo[a]pyrene diol epoxide in yeast: requirement for DNA polymerase zeta and involvement of DNA polymerase eta.
Biochemistry 42:11253-11262 (2003).

Zhu Y, Spitz MR, Zheng YL, Hong WK, Wu X:
BPDE-induced lymphocytic 3p21.3 aberrations may predict head and neck carcinoma risk.
Cancer 95:563-568 (2002).

7. ANHANG

7.1 Patientenamnesen

Tumorfreie Patienten als Spender oropharyngealer Schleimhaut zur Einzelzellgewinnung

Nr.	Alter	♂/♀	Diagnose	Nikotin in Zig/d od. py	Alkohol in g/d	Beruf
1	28	♂	Chron.Tonsillitis	gelegentlich	10 g	Sozialpädagoge
2	37	♂	Schlafapnoe	20/d	–	Fußballtrainer
3	48	♂	Chron.Tonsillitis	o.A.	o.A.	o.A.
4	39	♂	Chron.Tonsillitis	27/d	10g	Taxiunternehmer
5	41	♂	Chron.Tonsillitis	30/d	10 g	Handwerker
6	61	♂	Tonsillenhyperplasie	–	10 g	LKW-Fahrer
7	32	♂	Chron.Tonsillitis	18/d	–	Reinigungsfirma
8	34	♂	Tonsillenhyperplasie	1-3/d	10 g	Lokführer
9	54	♂	Chron.Tonsillitis	–	–	o.A.
10	48	♂	Chron.Tonsillitis	30 py	75-125	Lagerarbeiter
11	43	♂	Chron.Tonsillitis	–	–	Staplerfahrer
12	39	♂	Chron.Tonsillitis	20/d	10 g	Schreiner
13	35	♂	Tonsillenhyperplasie	5/d	10 g	selbständig
14	57	♂	Chron.Tonsillitis	–	–	Lehrer
15	37	♂	Chron.Tonsillitis	18/d	10g	Vertrieb
16	48	♂	Chron.Tonsillitis	Bis 30/d	10g	Tech. Angestellter
17	50	♂	Schlafapnoe	–	–	Computerfachm.

Menge des Nikotinkonsums: in Zigaretten pro Tag (Zig/d) oder

Packungsjahren (py): 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr

Menge des Alkoholkonsums: in Gramm

–: kein Nikotin- oder Alkoholkonsum

o.A.: ohne Angabe

Tumorpatienten als Spender oropharyngealer Schleimhaut zur Einzelzellgewinnung

Nr.	Alter	♂/♀	Diagnose	TNM/ Histo	Nikotin in Zig/d od. py	Alkohol in g/d	Beruf
1	51	♂	Tonsillen-CA	pT ₃ N ₀ M _x G ₂	8-10 / d	75-125 g	Elektroniker
2	62	♂	Tonsillen-CA	o.A.	o.A.	o.A.	o.A.
3	61	♂	Oropharynx-CA	pT ₂ N _{2b} M ₀ G ₃	Gelegentlich	10 g	Soz.Päd.
4	67	♂	Tonsillen-CA	pT _{1S} N ₀ M ₀	45 py	C ₂ -Abusus	o.A.
5	55	♂	Zungengrund-CA	pT ₂ N ₀ M ₀ G ₂	40 / d	o.A.	arbeitslos
6	39	♂	Mundboden-CA	o.A.	40 / d	C ₂ -Abusus	o.A.
7	55	♂	Oropharynx-CA	pT ₂ N ₀ M _X G ₃	–	–	o.A.
8	54	♂	Oropharynx-CA	pT ₁ N ₀ M _X G ₂	30-40 / d	–	Dipl.Ing.
9	56	♂	Mundboden-CA	pT ₃ N ₀ M ₀ G ₃	40 py	50-75 g	Schweißer
10	60	♂	Mundboden-CA	pT ₂ N ₀ M _X	40 py	22 g	Rentner
11	64	♂	Tonsillen-CA	pT ₁ N ₀ M ₀ G ₂	–	150 g	Rentner
12	61	♂	Tonsillen-CA	pT ₂ N _x M _X G ₃	60-70 py	10 g	Bankkaufm.
13	54	♂	Oropharynx-CA	pT ₁ N _{2b} M _X G ₃	–	47-72 g	Autor
14	63	♂	Zungengrund-CA	cT ₃ N _{2c} M ₀ G ₃	20 / d	C ₂ -Abusus	Rentner
15	56	♂	Tonsillen-CA	pT ₂ N ₀ M ₀ G ₂	20 / d	C ₂ -Abusus	o.A.

Menge des Nikotinkonsums: in Zigaretten pro Tag (Zig/d) oder

Packungsjahren (py): 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr

Menge des Alkoholkonsums: in Gramm

–: kein Nikotin- oder Alkoholkonsum

o.A.: ohne Angabe

**Tumorfreie Patienten als Spender oropharyngealer Schleimhaut zur Kultivierung
von Miniorganen**

Nr.	Alter	♂/♀	Diagnose	Nikotin in Zig/d od. py	Alkohol in g/d	Beruf
1	26	♂	Chron.Tonsillitis	–	–	o.A.
2	33	♂	Chron.Tonsillitis	–	–	o.A.
3	18	♂	Tonsillenhyperplasie	–	–	o.A.
4	34	♂	Chron.Tonsillitis	o.A.	o.A.	o.A.
5	44	♂	Schlafapnoe	–	–	Putzfirma
6	17	♂	Chron.Tonsillitis	–	–	Einzelhandel
7	45	♂	Chron.Tonsillitis	o.A.	o.A.	o.A.
8	45	♂	Schlafapnoe	–	–	KFZ-Mechaniker
9	29	♀	Chron.Tonsillitis	o.A.	o.A.	o.A.
10	58	♂	Schlafapnoe	12/d	10 g	arbeitslos

Menge des Nikotinkonsums: in Zigaretten pro Tag (Zig/d) oder

Packungsjahren (py): 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr

Menge des Alkoholkonsums: in Gramm

–: kein Nikotin- oder Alkoholkonsum

o.A.: ohne Angabe

7.2 Abkürzungen

BaP	Benzo[a]pyren
BEGM	Bronchial Epithelial Cell Basal Medium
BPDE	Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
°C	Grad Celsius
Ca	Catechin
ca.	circa
D	Dalton
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DRC ¹⁵	DNA-Reparaturkapazität nach 15 Minuten
DRC ³⁰	DNA-Reparaturkapazität nach 30 Minuten
EC	(–)-Epicatechin
ECG	(–)-Epicatechin Gallat
EGC	(–)-Epigallocatechin
EGCG	(–)-Epigallocatechin Gallat
EDTA	Ethyldiamintetraacetat
FCS	Fetales Kälberserum
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
min	Minute
mA	Milliampere
mM	Millimolar
MNNG	Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
OTM	Olive Tail Moment
p	Signifikanzniveau
PAH	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphat gepuffertes Salz
Py	Pack year (20 Zigaretten/Tag, 365 Tage/Jahr)
Ta	Tannin
U/min	Umdrehungen/Minute
UGT	UDP-Glucuronyltransferase
V	Volt

7.3 Veröffentlichungen aus der Arbeit

Kongressbeiträge:

V. Siedek, C. Matthias, K. Fuchs, E. Hilgert, A. Berghaus, U. Harréus

Reparaturkapazität von geschädigter DNA gesunder Oropharynxschleimhaut bei Tumor- und Nichttumorpatienten

7.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

-Name-	Katrin Susanne Fuchs Geboren am 08.02.1981 in Pfaffenhofen a.d. Ilm
-Eltern-	Peter Karl Fuchs Ottilie Anna Fuchs
-Familienstand-	ledig

Schulausbildung

1987-1991	Gerhardinger Grundschule, Pfaffenhofen a.d. Ilm
1991-2000	Schyren-Gymnasium, Pfaffenhofen a.d. Ilm

Universitätsausbildung

2000 - 2007	Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München
-vorklinisches Studium-	
September 2002	Ärztliche Vorprüfung
-klinisches Studium-	
September 2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 2005	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
-Promotion-	
Seit 2004	An der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München

7.5 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Alexander Berghaus, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde der LMU München für die Ermöglichung dieser Dissertation und die Bereitstellung der Forschungsmittel und Räumlichkeiten.

Herr PD. Dr. med. Ulrich Harréus hat mich während des gesamten Zeitraumes meiner Dissertation hervorragend wissenschaftlich betreut und beraten, und mich bei der Beschaffung der Schleimhautbiopsate sehr unterstützt. Für sein Engagement bedanke ich mich besonders.

Seit seinem Eintritt in die Hals-Nasen Ohrenklinik der LMU München hat Herr PD Dr. med. Christoph Matthias unser Labor mit großem Einsatz unterstützt. Für seine Mithilfe bin ich sehr dankbar.

Ganz herzlich danke ich der Medizinisch Technischen Assistentin Frau Sabina Zieger für die umfassende Unterstützung bei den Versuchen, die große organisatorische Hilfe bei der Probenbeschaffung und die Durchsicht des Textes. Die freundschaftliche Zusammenarbeit und außerordentliche Hilfsbereitschaft haben die Zeit im Labor sehr positiv gestaltet. Das gesamte Laborteam hatte großen Anteil an der angenehmen Arbeitsatmosphäre.

Allen freiwilligen Probenspendern und den Mitarbeitern der Klinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde gilt mein großer Dank für die freundliche Unterstützung bei der Bereitstellung der Schleimhautbiopsate.

Herr Bernhard Deurer hat mich mit großer Zuversicht und Geduld unterstützt. Für die Mithilfe bei der Formatierung dieser Arbeit danke ich ihm sehr.

Abschließend danke ich sehr herzlich meinen Eltern, die mir immer wohlwollend zur Seite standen und mein Studium und diese Dissertation möglich gemacht haben.