

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

**Mutagensensitivität und DNA-Reparatur von EGFR in
Schleimhautzellen von Patienten mit Plattenepithelkarzinom
des oberen Aerodigestivtraktes**

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

vorgelegt von

Christian Welz

aus München

(2009)

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

Berichterstatter: PD Dr. med. U. Harréus

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Gunnar Schotta
Priv.- Doz. Dr. med. Iris Bittmann

**Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:** Dr. M. Reiter

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

Tag der mündlichen Prüfung: 26.11.2009

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis:

1	EINLEITUNG	7
1.1	Karzinome im Kopf und Halsbereich.....	7
1.1.1	Epidemiologie	7
1.1.2	Ätiologie.....	8
1.2	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe als exogene Risikofaktoren.....	11
1.3	Endogene Risikofaktoren	12
1.3.1	Mutagensensitivität	12
1.3.2	DNA-Reparaturkapazität.....	13
1.4	Molekulare Karzinogenese.....	14
1.4.1	Tumorsuppressorgene	14
1.4.2	Onkogene	15
1.4.3	Molekulare Progression.....	15
1.5	Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)	17
1.5.1	EGFR und Karzinome.....	17
1.5.2	Einteilung und Aufbau	18
1.5.3	Aktivierung und Signaltransduktion	19
1.5.4	Therapeutische Angriffspunkte.....	20
1.6	Problemstellung und Zielsetzung.....	21
2	MATERIAL UND METHODEN	22
2.1	Material	22
2.1.1	Patientengut und Gewebeproben.....	22
2.1.2	Anamnesen der Probenspender	23
2.1.3	Methodenübergreifende Materialien und Geräte	24

2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Methodenübersicht	27
2.2.2	Miniorgankultutren.....	28
2.2.3	Inkubation mit BPDE	31
2.2.4	Einzelzellisolation aus dem MOK-Zellverband.....	31
2.2.5	Vitalitätsbestimmung	32
2.2.6	Verwendete Materialien	32
2.2.7	Comet Assay	33
2.2.8	Comet-FISH	37
2.2.9	Übersicht Comet Assay / Comet FISH	40
2.2.10	Interphase-Fish an histologischen Feinschnitten der Miniorgankulturen	41
2.2.11	Immunhistochemische Evaluierung der EGFR-Expression.....	44
3	ERGEBNISSE	49
3.1	Statistische Testverfahren und graphische Darstellung	49
3.2	DNA-Schädigung und Reparatur nach Exposition mit BPDE.....	49
3.2.1	DNA-Schädigung und Reparatur in der tumorfreien Kontrollgruppe	52
3.2.2	DNA-Schädigung und Reparatur in der Karzinomgruppe.....	56
3.2.3	Vergleich der Karzinomgruppe mit der tumorfreien Kontrollgruppe in Bezug auf DNA-Schädigung und Reparaturverhalten.....	60
3.3	Untersuchung zur Amplifikation des EGFR-Gens an makroskopisch gesunder Schleimhaut von Tumorpatienten	63
3.4	Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zur EGFR-Expression	65
4	DISKUSSION	69
4.1	Patienten	69
4.1.1	Auswahl der Patienten.....	69
4.1.2	Patienten als Spender oropharyngealer Schleimhaut	69

4.2	DNA-Schäden durch Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid.....	70
4.3	Diskussion der Methodik	71
4.3.1	Comet FISH.....	71
4.3.2	Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	72
4.4	Auswahl des EGFR-Gens.....	73
4.5	Diskussion der Ergebnisse	75
4.5.1	Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität des EGFR-Gens als endo- gener Risikofaktor bzw. Ursache der Rezeptorüberexpression.....	75
4.5.2	Nachweis der EGFR-Genamplifikation	78
4.5.3	EGFR-Expression an makroskopisch benigner Schleimhaut von Tumorpatienten.....	79
4.5.4	Schlussfolgerung	79
5	ZUSAMMENFASSUNG	81
6	LITERATURVERZEICHNIS	83
7	ANHANG	100
7.1	Abkürzungsverzeichnis	100
7.2	Lebenslauf	101
7.3	Danksagung.....	102
7.4	Publikationen aus dieser Arbeit.....	103

1 Einleitung

1.1 Karzinome im Kopf und Halsbereich

1.1.1 Epidemiologie

Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes, unter denen man v.a. die Malignome der Mundhöhle und des Rachens (ICD-10 C00-14) sowie des Larynx (ICD-10 C32) versteht, stellen einen relativen Anteil von 6-7% an allen malignen Tumoren. Weltweit stehen sie damit an sechster Stelle aller Tumorneuerkrankungen [Stewart et al., 2003; Jemal et al., 2005].

Basierend auf den Zahlen der "Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (GEKID)", erkrankten im Jahr 2002 hierzulande 13650 Menschen an einem Karzinom des oberen Aerodigestivtraktes. Dies entspricht einem Anteil von 3,2% an allen Krebsneuerkrankungen.

Unter den Männern machten sie mit einer geschätzten absoluten Zahl von 10600 Fällen und einer rohen Inzidenzrate von 26,2/100 000 Menschen einen Anteil von 4,9% aller jährlichen Krebsneuerkrankungen aus und standen so an sechster Stelle der Häufigkeitsverteilung der malignen Tumoren. Mit 5095 krebsbedingten Todesfällen hatten sie einen Anteil von 4,65% und platzieren sich somit als die Tumorgruppe mit der sechstgrößten Mortalität.

Die Neuerkrankungsrate bei den Frauen betrug dagegen 1,5% (n = 3050) und die Mortalität lag bei 1,2% (n = 1187). Die rohe Inzidenzrate betrug 7,2/100 000 weiblicher Personen.

Trotz rückläufiger Inzidenzen und Fortschritten in der Diagnose und Therapie liegt die gesamtgeschlechtliche Mortalitätsrate bei 15,4/100 000 Personen, was einen Anstieg um das Dreifache seit Anfang der 80er Jahre bedeutet [Schlesinger-Raab et al., 2003].

1.1.2 Ätiologie

Bei etwa 90% der Malignome des oberen Aerodigestivtraktes handelt es sich um Plattenepithelkarzinome [Reuter et al., 2007], deren Entwicklung einem multifaktoriellen Geschehen unterliegt. Dennoch konnten in der Vergangenheit zahlreiche Risikofaktoren identifiziert werden.

1.1.2.1 Tabak und Alkoholkonsum

Tabakkonsum ist der wichtigste anerkannte Risikofaktor in der Entstehung von Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes.

In den Entwicklungsländern nimmt die Anzahl an Rauchern jährlich um etwa 2% zu, wohingegen sie in den Industrieländern einen Rückgang von etwa 1,5% im Jahr zu verzeichnen hat. Doch der Genuss von Kautabak oder Snuff-Tabak stellt besonders bei Jugendlichen ein wachsendes internationales Problem dar [Martin et al., 1999]. In Teilen Indiens zum Beispiel, wo die Samen der Betelpalme (Betelnuß) mit Tabak vermischt und so als "pano" von einem Großteil der Bevölkerung gekaut wird, machen Kopf-Hals-Tumore fast ¼ aller jährlichen Krebsneuerkrankten aus [Mehrotra et al., 2005].

Das Risiko an einem Karzinom des oberen Aerodigestivtraktes zu erkranken wird durch starken (>20Zig./d) inhalativen Tabakkonsum um das Zwanzigfache erhöht, wobei die Kontinuität bzw. die Dauer des Rauchens einen höheren Stellenwert besitzt als die Intensität, mit der der Zigarettenkonsum betrieben wird [Rodriguez et al., 2004].

Der alleinige Genuss von Alkohol scheint einen moderateren Einfluss auf die Kanzerogenese zu haben als der separate Konsum von Tabak [Spitz et al., 1988]. Dennoch erhöht sich das Risiko von starken Alkoholkonsumenten (>90 g/d), an einem Malignom des oberen Aerodigestivtraktes zu erkranken, um etwa das Fünffache [Rodriguez et al., 2004].

Da Konsumenten von Alkohol jedoch meist auch Tabak rauchen, ist besonders vorzuheben, dass sich durch den gemeinsamen Konsum beider Genussmittel die Einzelrisiken nicht addieren, vielmehr stehen sie in einem multiplikativen Verhältnis zueinander [Blot et al., 1988], sodass sich Personen mit einem kombinierten Tabak- und Alkoholkonsum gegenüber Nichtrauchern einem bis zu 50fachen Risiko für die Entstehung eines Malignoms aussetzen [Rodriguez et al., 2004].

1.1.2.2 Arbeits- und Umweltstoffe

Obwohl Tabak- und Alkoholkonsum für über 80% der Plattenepithelkarzinome des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes verantwortlich gemacht werden können [Blot et al.,1988], erkrankt dennoch jährlich eine nicht zu verachtende Anzahl von Personen an einem Kopf-Hals-Karzinom, die nicht bzw. nur gering einem der bisher genannten Risikofaktoren ausgesetzt waren. Hierzu konnten in der Vergangenheit zahlreiche Umwelt- und Arbeitsstoffe, wie zum Beispiel Asbest und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe als Kanzerogene identifiziert werden [Übersicht in Maier und Tisch 1999]. Insbesondere Arbeiter, die häufig einer Vielzahl anorganischer und organischer chemischer Substanzen und verschiedenen Arten von Staub exponiert sind, weisen ein hohes Krebsrisiko auf.

Eine kombinierte Exposition gegenüber außerberuflichen Risikofaktoren, insbesondere Rauchen, und beruflichen Schadstoffexpositionen, wie polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, erhöht das Krebsrisiko in einem überadditiven Maß [Maier et al., 1999].

1.1.2.3 Virale Infektionen

Die Rolle des Humanen Papilloma Virus in der Pathogenese von Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes ist derzeit noch unklar und wird kontrovers diskutiert. Neuere Studien zeigen vor allem bei Oropharynxkarzinomen eine hohe Koinzidenz mit HPV-Infektionen der Typen 16 und 18, welche zu den "high risk" HPV Typen gehören und auch hauptverantwortlich für die Entstehung des Cervixkarzinoms sind [Kreimer et al., 2005].

Eine etablierte Kausalitätskette zwischen einer high-risk HPV-Infektion und der Entstehung eines Kopf-Hals-Karzinoms gibt es derzeit noch nicht, jedoch sind HPV Infektionen im Zusammenhang mit einer CyclinD1 Amplifikation beschrieben, welche bekanntermaßen eine Rolle in der molekularen Karzinogenese derartiger Tumoren spielt [Almadori et al., 2002].

Eine Beteiligung des Epstein-Barr Virus in der Entstehung des Nasopharynxkarzinoms ist mittlerweile unumstritten. Trotz weltweiter hoher Durchseuchungsrate kommt dieses Malignom in der westlichen Welt nur sporadisch vor, hat aber im asiatischen Raum und vor allem in Teilen Chinas eine Inzidenz von bis zu 30/100000 Einwohnern [Wei und Sham, 2005]. In nahezu allen Tumorzellen und auch in prämaligener Nasopharynxmukosa konnte eine Infektion mit EBV gezeigt werden. Eine durch virale Onkoproteine hervorgerufene Einflussnahme auf die zelluläre Genexpression und das Wachstum wird mit der Karzinomentstehung in Verbindung gebracht [Wei und Sham, 2005].

1.1.2.4 Genetische Suszeptibilität

Obwohl Tabakkonsum den dominantesten Risikofaktor in der Ätiologie der Kopf-und-Hals-Karzinome repräsentiert, erkrankt dennoch nur ein Anteil von 10-15% der Raucher im Verlauf ihres Lebens an einem derartigen Malignom [Hsu et al.,1991]. Dies gibt Variationen in der individuellen genetischen Empfindlichkeit (Suszeptibilität) gegenüber exogenen Kanzerogenen eine überaus entscheidende Bedeutung in der Entwicklung von malignen Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes. Besonderes Augenmerk muss hierbei auf die *Mutagensensitivität*, d.h. auf die personenbezogene Empfindlichkeit gegenüber exogenen Risikofaktoren gelegt werden. Ein weiterer Faktor könnte die individuelle Fähigkeit DNA-Schäden zu reparieren, die so genannte *DNA-Reparaturkapazität* sein. Eine mögliche Beteiligung der genetische Suszeptibilität in der Kanzerogenese von Kopf-Hals-Tumoren ist in Abbildung 1 dargestellt.

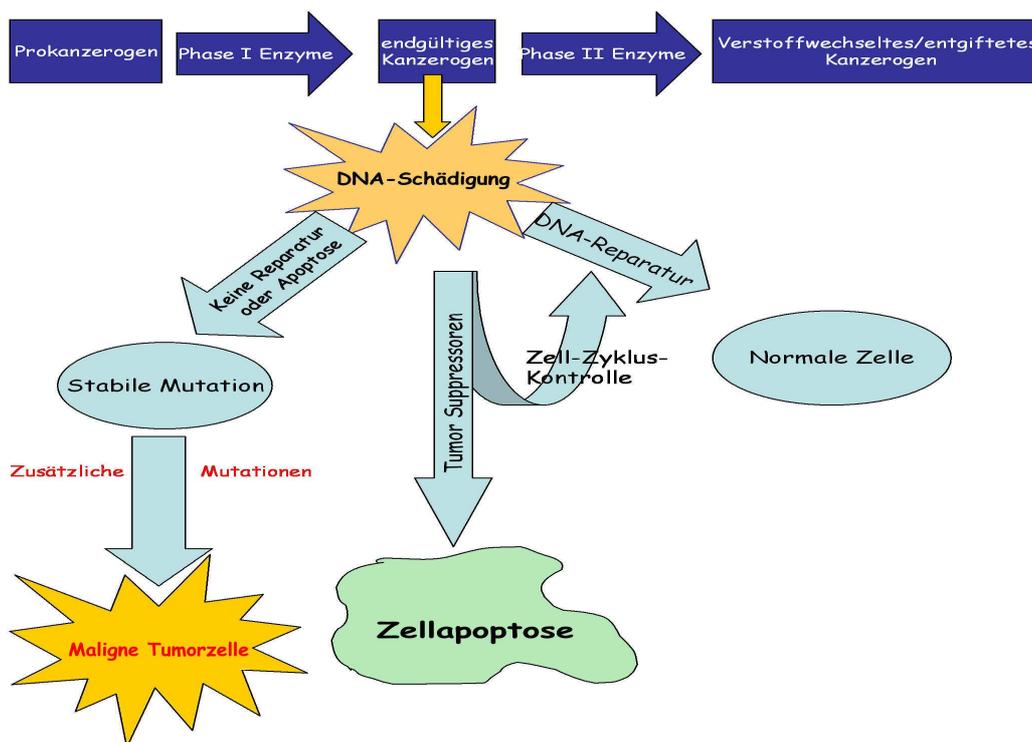


Abb. 1: Denkbare Rolle der genetischen Suszeptibilität in der Kanzerogenese

Eine erhöhte Mutagensensitivität, herabgesetzte DNA-Reparaturkapazität, eine nicht funktionierende Zell-Zyklus-Kontrolle oder ein nicht mehr intaktes Zell-Apoptose-System sowie eine Kombination dieser Faktoren beeinflusst so das Risiko für einen Tabakkonsumenten an einem Karzinom des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes zu erkranken [Sturgis et al., 2002].

Für das Verständnis der Karzinogenese des Kopf-Hals-Bereichs ist es somit von Bedeutung zwischen exogenen und endogenen Risikofaktoren zu unterscheiden.

1.2 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe als exogene Risikofaktoren

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) stellen eine Substanzgruppe dar, die nach Aufnahme in den Organismus und nach dortiger metabolischer Aktivierung ein starkes kanzerogenes Potential aufweist. Sie werden vor allem mit den durch Tabakrauch induzierten Kopf-Hals-Karzinomen und dem Lungenkarzinom in Verbindung gebracht [Maier H. et al., 1994; Wei Q. et al., 1996].

PAH entstehen im Allgemeinen bei Verbrennungsvorgängen, insbesondere bei unvollständigen Prozessen unter Sauerstoffmangel. So stellen der Haupt- und Nebenstrom des Tabakrauches und Abgase aus Verbrennungsmotoren (Hochöfen oder Kraftfahrzeuge) die direkten Hauptkontaminationsquellen für den Menschen dar [Smith et al., 2000].

Partikuläre Emissionen bei der Verbrennung fossiler Energieträger führen über eine Belastung des Erdreichs und Wassers zu einer indirekten menschlichen Belastung.

Eine weitere Quelle für PAH stellt die Zubereitung von gegrillten, geräucherten oder gerösteten Lebensmitteln dar [Knize et al., 1999].

Auf Grund seiner hohen biologischen Aktivität wird das aus fünf Benzolringen bestehende Benzo[a]pyren (BaP) als Leitsubstanz der PAHs gesehen, das in der letzten Bewertung durch das IARC (International Agency for Research on Cancer) im Jahr 2007 als humanes Karzinogen der Gruppe 1 eingestuft wurde und damit als sicheres Karzinogen für den Menschen gilt [IARC-Monograph Vol. 92].

Um seine karzinogenen Eigenschaften zu entfalten, muss das BaP erst in aktive Metabolite umgewandelt werden. Von besonderem Interesse ist dabei die Metabolisierung von BaP zu einem hochreaktiven Diol-epoxid. Dies geschieht über mehrere Cytochrom P450 abhängige Epoxidierungen und durch mikrosomal gebundene Hydroxylasen. Das hieraus entstehende +(anti)-Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) ist dabei der Metabolit des BaP mit der höchsten karzinogenen Aktivität [Luch A., 2005].

1.3 Endogene Risikofaktoren

1.3.1 Mutagensensitivität

Neben exogenen Risikofaktoren für die Entwicklung eines Karzinoms des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes rücken individuelle, genetisch prädisponierende Faktoren zunehmend in den Mittelpunkt des Interesses.

Mutagensensitivität beschreibt die individuelle Empfindlichkeit des Organismus gegenüber DNA-schädigenden Auswirkungen von Xenobiotika.

In einer von Hsu entwickelten experimentellen Methode zur Messung der individuellen Mutagensensitivität konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden, dass bei Patienten, die an einem Kopf-Hals-Karzinom erkrankt waren, eine signifikant höhere Anzahl von DNA-Einzelstrangbrüchen durch die mutagene Substanz Bleomycin induziert werden konnte als bei Kontrollgruppen [Schantz und Hsu, 1989; Cloos et al., 1996]. Weitere Studien zeigten, dass langjährige Raucher, die aber keinen tabakassozierten Krebs entwickelt hatten, eine mit der Allgemeinbevölkerungen vergleichbare Mutagensensitivität aufwiesen [Hsu et al., 1991]. Um diese Ergebnisse auf die Ätiologie der Kopf- und Halskarzinome besser übertragen zu können, wurde das schädigende Agens Bleomycin, das nicht zu den Tabakinhaltsstoffen gehört, durch BPDE ersetzt, was zu vergleichbaren Ergebnissen führte. Folgend konnte eine durch BPDE nachgewiesene erhöhte Mutagensensitivität als individueller Risikofaktor für die Entstehung und als Biomarker für eine genetische Suszeptibilität tabakassoziierter Karzinome postuliert werden [Wang et al., 1998].

Beeinflusst wird die Mutagensensitivität durch eine Vielzahl von Faktoren. Unter anderem sind Polymorphismen metabolisierender Enzyme von Bedeutung, die für die Aktivierung oder die Detoxifizierung einzelner Schadstoffe verantwortlich sind. Vielfach untersuchte und mit einem erhöhten Karzinomrisiko in Verbindung gebrachte Enzym polymorphismen, sind für das karzinogenaktivierende Cytochrom-P450-System (CYP 450) [Tanimato et al., 1999; Sato et al., 1999; Matthias et al., 1998], die entgiftenden Glutathion-S-Transferasen (GST) [Gattas et al., 2006; Matthias et al., 1999] und die Alkoholdehydrogenase-1C (ehemals ADH 3) [Hashibe et al., 2006] beschrieben. Im Einzelnen betrachtet, konnten für die genannten Enzyme mit Ausnahme der Glutathion-S-Transferasen keine signifikanten Ergebnisse geliefert werden, so dass singulären Polymorphismen eines Enzyms nur ein moderates Risiko für die Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen zugeschrieben werden kann [Ho et al., 2007]. Durchweg signifikante Ergebnisse lieferten jedoch kombinierte Enzym polymorphismen von z.B. CYP1A1 und GSTM1 [Gattas et al., 2006].

Neben zahlreichen anderen Einflüssen auf den Stoffwechsel der Zellen können die aufgezählten Enzyme aus Prokanzerogenen aktive Kanzerogene wie beispielsweise das BPDE metabolisieren. Dieses schädigt letztendlich die DNA über die Adduktbildung und ruft Mutationen hervor. Ob und in wie weit die so entstandenen Mutationen an die nächste Generation von Zellen weitergegeben werden und es zur nächsten Stufe in der Karzinomentwicklung kommt, hängt u.a. von einem intakten DNA-Reparatursystem ab.

1.3.2 DNA-Reparaturkapazität

Ein ausgewogenes Verhältnis zwischen DNA-Schädigung und DNA-Reparatur ist eine Grundvoraussetzung für das Überleben von Zellen.

Als DNA-Reparaturkapazität (DRC) beschreibt man die individuelle Fähigkeit bestehende DNA-Schäden zu reparieren. Ähnlich zur Mutagensensitivität konnte eine herabgesetzte DRC als Risikofaktor und als endogener Biomarker für die Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes identifiziert werden. So zeigten durch BPDE geschädigte periphere Lymphozyten von Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom eine signifikant geringere DRC als Patienten, die nicht an einem Karzinom erkrankt waren [Cheng et al. 1998, Gajecka et al., 2005]. Im Gegensatz hierzu stehen Arbeiten, die keine herabgesetzte DRC an Lymphozyten von Patienten mit Oropharynxkarzinomen feststellen konnten. Dies gelang jedoch an Schleimhautzellen von Tumorpatienten [Harréus et al., 2001]. Als mögliche Ursache einer herabgesetzten DRC werden Polymorphismen bestimmter DNA-Reparatur-Gene, wie z.B. XPD oder XRCC1, diskutiert [Sturgis et al.2000; Ramachandran et al. 2006].

1.4 Molekulare Karzinogenese

Die Grundlage für die maligne Transformation einer gesunden Zelle in eine Tumorzelle ist die Akkumulation einer Mehrzahl von Veränderungen im genetischen Material. Dieser Prozess wird auch als “multistep“ Karzinogenese bezeichnet [Califano et al., 1996]. Veränderungen in Genen, die entweder durch ihre Aktivierung (Onkogene) oder durch einen Verlust ihrer Funktion (Tumorsuppressorgene) die Tumorprogression positiv beeinflussen, spielen hier die entscheidende Rolle [Hanahan und Weinberg, 2000].

1.4.1 Tumorsuppressorgene

Tumorsuppressorgene (TSG) bzw. deren Genprodukte übermitteln negative Wachstumssignale und sind damit erheblich an der Regulation des Zellzyklus beteiligt. Eine Inaktivierung der TSG kann durch Punktmutation, Deletion und Methylierung erfolgen [Braakhuis et al., 2004]. Tumorsuppressorgene wirken rezessiv, d.h. sowohl das Gen auf dem väterlichen Allel wie auch das auf dem mütterlichen müssen inaktiviert sein, damit die wachstumssupprimierende Funktion des Gens aufgehoben wird.

Dieser sog. “*loss of heterozygosity*“ (LOH) wurde bei Kopf-Hals-Karzinomen hauptsächlich auf den Chromosomen 3p, 5q, 8p, 9p+q, 11p und 17q nachgewiesen und wird mit der Entwicklung und der Progression dieser Malignome in Verbindung gebracht [Ah-See et al., 1994; Califano et al., 1996]. Zwei der genannten Regionen beinhalten die Tumorsuppressorgene *TP53* (17q) und *p16* (9p).

TP53 kodiert für ein Kernprotein, das in der Regulation von Gentranskription, DNA-Synthese und Reparatur sowie in der Zellzykluskoordination involviert ist und eine entscheidende Rolle im Apoptoseprozess spielt [Sionov und Haupt, 1999]. Eine *p53* Mutation wurde in bis zu 60% aller Kopf-Hals-Karzinome gefunden [Wallace-Brodeur und Lowe, 1999].

Das *p16* Gen gehört zur Gruppe von cyclinabhängigen Kinase Inhibitoren (CDKIs) und reguliert die G1-Phase des Zellzyklus auf negative Weise. Eine Inaktivierung führt zu unkontrolliertem Zellwachstum. Eine hohe LOH-Rate konnte beim Kopf-Hals-Karzinom und dessen Vorstufen nachgewiesen werden [Califano et al., 1996; van der Riet et al., 1994].

1.4.2 Onkogene

Protoonkogene sind Vorstufen von Onkogenen, die für das normale Zellwachstum, die Zellteilung und die Zelldifferenzierung verantwortlich sind. Erst durch Mutationen werden sie zu Onkogenen aktiviert, was entweder zu einer Überproduktion oder zu einer gesteigerten Funktion der kodierten Proteine führt. Das Resultat sind unkontrollierte Wachstums- und Zelldifferenzierungsprozesse. Die Wirkung aktivierter Onkogene ist im Gegensatz zu den Tumorsuppressorgenen dominant, d.h. sie wird bereits manifest, wenn das zweite Allel noch nicht aktiviert bzw. mutiert ist.

Auch wird eine Vielzahl von Onkogenen mit der Entstehung von Kopf-Hals-Karzinomen in Verbindung gebracht. Hierzu gehören unter anderem die *ras* und *myc* Onkogenfamilie, *int-2*, *hast-1*, *cyclin D1* und *epidermal growth factor receptor* (EGFR) [Hardisson, 2003].

Der *epidermal growth factor receptor* (EGFR) ist ein transmembranes Glykoprotein und gehört zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren. Eine Aktivierung des Rezeptors durch extrazelluläre Liganden, wie epidermal growth factor (EGF) oder transforming growth factor (TGF) α , bewirkt eine Autophosphorylierung des EGFR. Der aktivierte Rezeptor spielt eine entscheidende Rolle im Zellwachstum, -metabolismus, -differenzierung und Zellüberleben [Arteaga et al., 2002]. Im Tumorgewebe von Patienten mit einem Kopf-Hals-Karzinom konnte schon eine Überexpression des EGFR mehrfach nachgewiesen werden [Herbst et al., 2002; Hynes und Lane, 2005]. Sowohl eine erhöhte Lokalrezidiv- wie auch eine verminderte Überlebensrate werden mit der Überexpression dieses Rezeptors in Zusammenhang gebracht [Dassonville et al., 1993].

1.4.3 Molekulare Progression

Auch histologisch kann man von einem „*multistep progress*“ bei der Entstehung von Malignomen des oberen Aerodigestivtraktes sprechen. Eine anfangs bestehende **Hyperplasie** entwickelt sich über eine **Dysplasie** zum **Carcinoma in situ**, um letztendlich in ein **invasives Karzinom** überzugehen. Ein bedeutende Theorie in diesem Zusammenhang ist die der „*field cancerization*“. Diese erstmals durch *Slaughter et al.* (1953) aufgestellte Theorie basiert auf Hypothesen und Beobachtungen, dass: a) sich Kopf-Hals-Karzinome auf multifokalen Arealen mit präkanzerösen Läsionen entwickeln, wobei diese makroskopisch unsichtbar sind oder sich als Leukoplakien präsentieren, b) genetisch alteriertes Gewebe den Tumor umgibt, c) Karzinome häufig aus multiplen, voneinander unabhängigen Läsionen bestehen, die manchmal fusionieren, und d) dass postoperativ persistierendes, abnormales Gewebe

Zweitmaligome und Lokalrezidive erklären kann [Braakhuis et al.,2003].

Den Beweis für die Feldkanzerisation, d.h. dass Karzinogene auf die gesamte Schleimhaut bzw. auf ein Schleimhautfeld einwirken und dort ein genetisch alteriertes Feld entsteht, aus dem sich maligne oder prä maligne Veränderungen entwickeln, lieferte die Arbeitsgruppe um *J. Califano*. Sie konnte eine Korrelation zwischen der Anzahl genetischer Veränderungen und dem histologischen Malignitätsgrad nachweisen und postulierte ein genetisches Modell, das die “multistep progress“ Karzinomentstehung beschreibt.

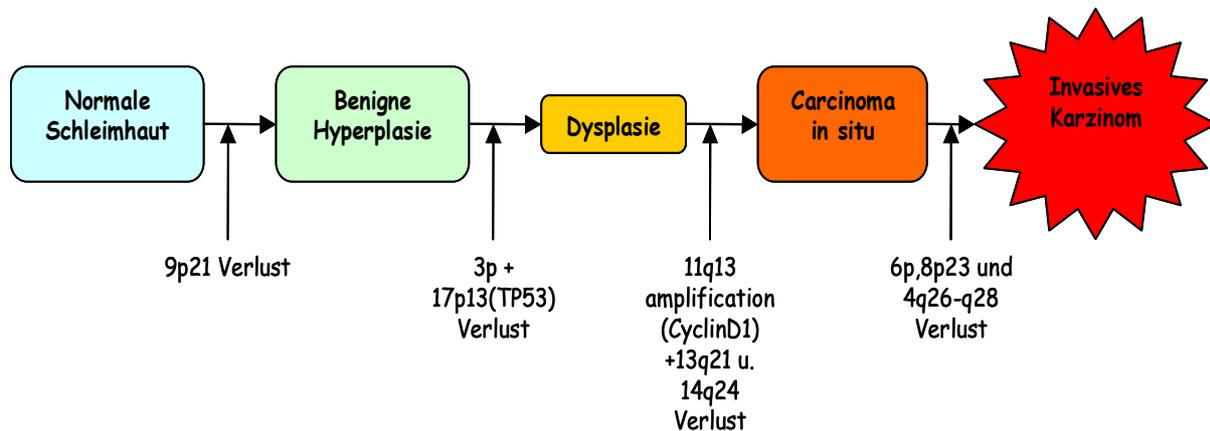


Abb. 2: modifiziertes Molekulares Modell für die Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren

Abbildung 2 zeigt ein modifiziertes Modell, in dem z.B. ein früher Verlust von p16 einen Übergang der normalen Schleimhaut in eine benigne Hyperplasie verursacht. Ein Hinzukommen weiterer Veränderungen in Tumorsuppressorgenen und Onkogenen bewirkt ein Fortschreiten zur Dysplasie bis hin zum invasiven Karzinom. Trotz dieser vorläufigen Erkenntnisse ist es die Akkumulation genetischer Schäden, und nicht zwingend deren Reihenfolge, die die Tumorprogression festlegt [Califano et al., 1996].

Durch genetische Analysen der Feldkanzerisierung gibt es ein aktuelles Modell [Braakhuis et al., 2004], das die molekulare Karzinogenese wie folgt beschreibt: In der initialen Phase wird eine basal liegende Stammzelle genetisch geschädigt. Durch Vererbung dieser veränderten genetischen Information an Tochterzellen bildet sich ein sogenanntes klonales “patch“. Durch weitere Schädigungen der DNA in diesem patch bildet sich ein sich ausbreitendes Feld genetisch veränderter Zellen. Dieses Feld verdrängt die umliegende gesunde Schleimhaut und kann letztendlich eine Größe von etwa 10 cm erlangen. Durch weitere Noxeneinwirkung entwickelt sich erst die präneoplastische Läsion. Im nächsten Schritt entwickelt sich hieraus ein invasives Karzinom und möglicherweise eine neue präneoplastische Läsion an anderer Stelle des Feldes. Bei einer Operation des Tumors verbleibt also der Rest des Feldes im Patienten und bildet so den Boden für einen neuen Tumor.

Dies erklärt unter anderem die hohe Rezidiv- und Zweitmalignomrate wie auch die größtenteils schlechte Prognose der Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen.

1.5 Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

1.5.1 EGFR und Karzinome

Während Frühstadien der Kopf-Hals-Karzinome durch eine operative Therapie alleine oder in Kombination einer Radiotherapie in fast 80% geheilt werden können, liegt die, seit 30 Jahren unverbesserte, 5 Jahres-Überlebensrate bei fortgeschrittenen Tumoren unter 10%. Erklärungen dafür sind unter anderem die beschriebene Häufigkeit an lokalen Rezidiven (bis 60%) und Zweitmalignomen sowie die Metastasierung (ca. 20%) des Malignoms [Reuter et al., 2007].

Auf Grund dieser Tatsache rücken neue Therapieansätze in den Vordergrund aktueller Forschung. Eines der interessantesten Ziele neuer Therapiemöglichkeiten ist der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR), da er eine überaus wichtige Rolle in der Proliferation, dem Wachstum, der Differenzierung und dem Überleben von Zellen epithelialen Ursprungs spielt. Zusätzlich bewirkt eine aberrante Signaltransduktion des EGFR bei Tumorzellen eine herabgesetzte Apoptoserate, eine erhöhte Invasivität, Angiogenese und Metastasierung [Reuter et al., 2007].

Des Weiteren konnte man in wenigstens 90% aller Kopf-Hals-Karzinome eine Überexpression des Onkoproteins finden [Santini et al., 1991; Dassonville, 1993]. Ergebnisse jüngerer Studien konnten eine Korrelation zwischen einer EGFR-Überexpression und einem kürzeren krankheitsfreiem Intervall, einer höheren Rezidivrate und einer schlechteren allgemeinen Überlebensrate aufzeigen [Ford und Grndis, 2003; Scaltriti und Baselga, 2006]. Deshalb sind die bisher weitgehend ungeklärten Mechanismen, die zu einer überhöhten Expression des EGF-Rezeptors führen, Gegenstand aktueller Forschung. So könnte eine Amplifikation des EGFR-Gens als naheliegender Ursache eine Rolle spielen [Mhralova et al., 2005]. Doch müssen auch andere Möglichkeiten der EGFR-Überexpression in Betracht gezogen werden, die eine erhöhte Aktivität in der Promoter-Region des EGFR oder eine Dysregulation auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene beinhalten [Zhandi et al., 2007]. So konnte an Brustkrebs-Zelllinien gezeigt werden, dass eine erhöhte Anzahl von CA-Dinukleotiden im Intron 1 des EGFR-Gens nahe der Enhancerregion einen negativen Einfluss auf die Transkriptionsaktivität hat, was zu verminderten EGFR-Expressionsgraden führte [Buerger et al., 2004].

Über diesen verschiedenen molekularen Mechanismen müssen noch die individuelle Mutagensensitivität und die DNA-Reparaturkapazität genannt werden, da eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber Xenobiotika auf alle genannten Möglichkeiten der Überexpression Einfluss nehmen kann.

1.5.2 Einteilung und Aufbau

Der EGFR ist ein 170 kDa großes Glykoprotein, dessen Gen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 lokalisiert ist (Chr. 7p). Er gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren, die sich aus 4 Mitgliedern zusammensetzt: EGFR (HER1/ErbB1), HER2-neu (ErbB2), HER3 (ErbB3) und HER4 (ErbB4). Die ErbB-Rezeptoren lassen sich wiederum in die Superfamilie der Tyrosin-Kinase-Rezeptoren einordnen. Allesamt sind sie in der Zytoplasmamembran von Zellen mesodermalen und ektodermalen Ursprungs verankert und zeigen einen ähnlich strukturellen Aufbau (s. Abb. 3): Eine extrazelluläre, ligandenbindende Domäne, eine kurze hydrophobe, transmembranöse Region und eine zytoplasmatische Domäne mit Tyrosin-Kinase-Aktivität [Hynes und Lane, 2005; Yarden und Sliwkowski, 2001].

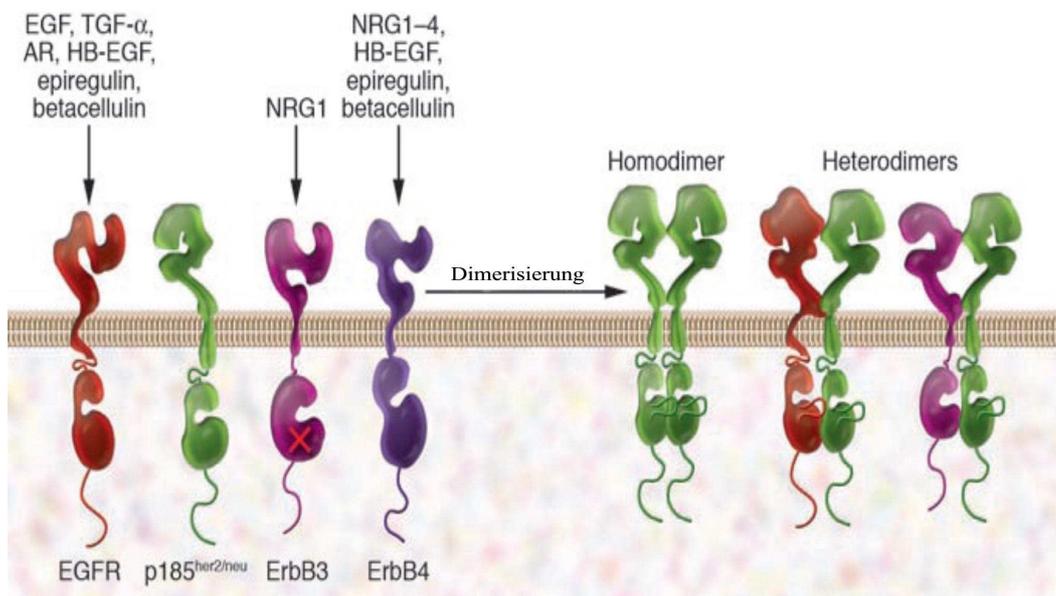


Abb. 3: Aufbau und Dimerisierung des EGFR [Zhang et al., 2007]

1.5.3 Aktivierung und Signaltransduktion

Unter physiologischen Bedingungen wird die Aktivierung der ErbB-Rezeptoren durch eine räumliche und temporäre Expression ihrer Liganden kontrolliert. Bisher sind 12 Liganden der ErbB-Familie bekannt wobei die für den EGFR wichtigsten und meist untersuchten der *epidermal growth factor* (EGF) und der *transforming growth factor α* (TGF α) sind.

Eine Ligandenbindung an den als Monomer vorliegenden Rezeptor induziert eine Konformitätsänderung zu Homo- oder Heterodimeren unter den Mitgliedern der erbB-Familie, was eine Autophosphorylierung mehrerer Tyrosinkinasereste des COOH-terminalen Zytoplasmaanteils des Rezeptors bewirkt (s. Abb 3 u. 4).

Die phosphorylierten Tyrosinreste stellen spezifische Bindungsstellen für zytoplasmatische Proteine dar, die sogenannte SH₂-Domänen besitzen und auf diese Weise aktiviert werden [Kalyankrishna und Grandis, 2006; Scaltriti und Baselga, 2006].

Diese aktivierten Proteine initiieren spezifische Signalwege, die als onkogenetische Regulatoren für die Tumorzellen bedeutsam sind (s. Abb. 4b).

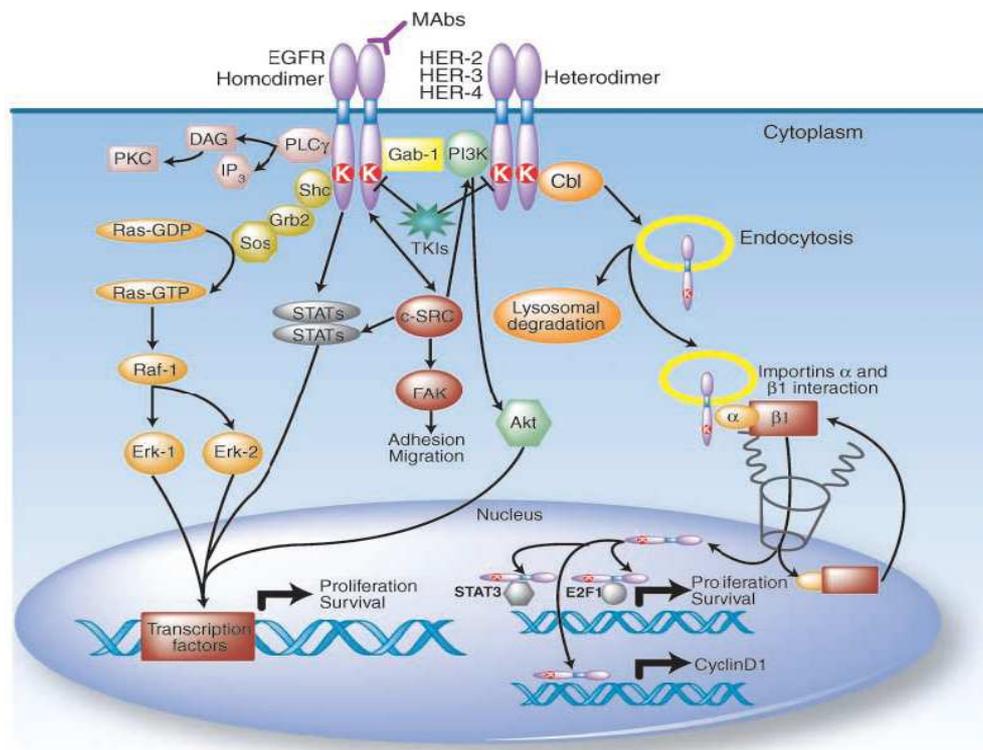


Abb. 4b: Signalwege des EGFR [Scaltriti und Baselga, 2006]

Der *Ras/Raf/MAPK*-Signalweg ist ein wichtiger Pfad, der die Proliferation und das Überleben von Zellen reguliert. Durch Adapterproteine, die an die aktiven Rezeptorstellen binden, wird über mehrere Zwischenschritte erst das Ras-System aktiviert und als letzter Schritt einer weiteren Kaskade die *miogen-activated-protein-kinase* (MAPK) phosphoryliert.

Diese kann nun in den Nukleus der Zelle importiert werden und verschiedene Transkriptionsfaktoren der Zellproliferation beeinflussen.

Ein weiterer Weg der EGFR-Aktivierung ist der **Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt**-Signalweg, der das Zellwachstum, die Apoptoseresistenz, die Invasion und die Migration von Zellen beeinflusst. Das durch PI3-Kinase generierte second-messenger Phosphatidyl-Inositol-3-Phosphat phosphoryliert und aktiviert die Serin/Threonin-Kinase **Akt**, die im Zellkern ähnlich der MAPK fungiert. Entscheidender Faktor dieses Signalwegs ist die Heterodimerisierung des EGFR mit dem HER-3 Rezeptor, da der EGFR-Homodimer keine Bindungsstelle für die PI3K besitzt.

Eine dritte Möglichkeit der Interaktion mit den aktiven EGFR-Resten ist die direkte Bindung der **Phospholipase C γ** (PLC γ). Diacylglycerin, das als Produkt aus der durch PLC γ katalysierten Reaktion hervorgeht, aktiviert die Proteinkinase C, was eine Phosphorylierung von Rezeptoren und einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren zur Folge hat.

Als nicht zu vernachlässigende weitere Route der EGFR-Phosphorylierung ist der **Signal transducers and activation of transcription** (STAT)-Signalweg hervorzuheben. Einerseits binden STATs direkt oder indirekt an den EGFR und beeinflussen auf gleichartige Weise wie die MAPK die Transkriptionsprozesse der Zelle. Andererseits kann der EGFR durch Endozytose in den Kern gelangen. Dort kann er als Kofaktor für STAT3 oder als eigenständiger Transkriptionsfaktor für z.B. CyclinD1 wirken [Lin et al., 2001].

1.5.4 Therapeutische Ansatzpunkte

Bislang finden zwei Therapiestrategien zur Inhibierung der Signalwege des EGFR klinische Relevanz.

Die erste adjuvante Option ist die Blockierung des Rezeptors durch monoklonale Antikörper (z.B. Cetuximab). Durch die Bindung der Antikörper an die Rezeptoroberfläche verhindern sie die Anlagerung der Liganden und somit die Rezeptoraktivierung. Andererseits kann eine antikörperabhängige, zellvermittelnde Zytotoxizität induziert werden [Reuter et al., 2007].

Die zweite Möglichkeit, die klinisch erprobt wird, sind Tyrosin-Kinase-Inhibitoren (TKI). Diese richten sich entweder spezifisch gegen die Kinase des EGFR-Dimers (z.B. Gefitinib) oder weisen zusätzlich eine Affinität zu Heterodimeren des EGFR mit Mitgliedern der ErbB-Familie auf (z.B. Erlotinib) [Reuter et al., 2007].

1.6 Problemstellung und Zielsetzung

Die eben genannten, adjuvanten Therapieansätze nutzen die Erkenntnis der EGFR-Überexpression in malignem Gewebe und greifen deshalb explizit auf Proteinebene an. Doch kommt es zu wechselnden Ergebnissen der eben genannten Therapien. Immer mehr wird deutlich, dass nicht die alleinige Proteinüberexpression das Ansprechen der Therapie determiniert [Wild et al., 2006].

Auf Grund dieser Tatsache rücken die bisher wenig verstandenen Ursachen und Mechanismen der Überexpression des Rezeptors in den Fokus gegenwärtiger Untersuchungen. Intrazelluläre Regulationsmechanismen, Gen-Amplifikation, eine verminderte DNA-Reparaturkapazität oder eine erhöhte Mutagensensitivität im Bereich des EGFR-Gens könnten dabei eine Rolle spielen [Mrhalova et al., 2005, Zhandi et al., 2007].

Für ein besseres Verständnis der zu Grunde liegenden Ursachen wurde in dieser Arbeit die makroskopisch gesunde Schleimhaut von Patienten mit Oropharynxkarzinomen mit der Schleimhaut von Patienten ohne Malignom verglichen.

Nach Schädigung mit Benz[*o*]apyren-diol-epoxid (BPDE) wurden mit Hilfe des Comet-FISH, eine Kombination aus dem Comet Assay und der Fluoreszenz in situ Hybridisierung, die individuelle Mutagensensitivität und das DNA-Reparaturverhalten nach 24h Reparatur, im EGFR-Gen gemessen. Des Weiteren wurde an Paraffinschnitten des gleichen Gewebes das Expressionsverhalten des EGFR-Gens unter Verwendung immunhistochemischer Anfärbung dargestellt und eine eventuelle EGFR-Genamplifikation als weitere Möglichkeit der EGFR-Überexpression durch das Verfahren des Interphase-FISH untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Patientengut und Gewebeproben

Das Patientengut der vorliegenden Arbeit umfasste 30 Personen, die in eine Tumorgruppe und eine Nontumorgruppe mit jeweils 15 Patienten aufgeteilt war. In Bezug auf das Alter und das Geschlecht wurde -soweit möglich- ein Matching durchgeführt.

Alle Studienteilnehmer waren aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München und wurden präoperativ über die wissenschaftliche Verwendung ihrer Gewebeproben aufgeklärt. Um eine eventuelle Exposition mit exogenen Noxen zu evaluieren und diese bei der Interpretation der Ergebnisse beurteilen zu können, wurden die Patienten eingehend über eine mögliche berufliche Schadstoffexposition sowie über den Konsum von Tabak und Alkohol befragt. Alle erhobenen Daten wurden mittels Codierung einer Pseudoanonymisierung unterworfen. Die zuordnungsfähigen Daten waren nur dem Studienleiter zugänglich.

Die verwendeten Schleimhautproben wurden ausnahmslos im Rahmen medizinisch indizierter operativer Eingriffe gewonnen, so dass durch die Entnahme des Gewebes ein zusätzliches Risiko für die Patienten vermieden werden konnte. Bei den Proben aus der tumorfreien Gruppe handelte es sich um Schleimhaut, die im Rahmen von Tonsillektomien, Gaumenmandelhyperplasien oder Uvulopalatopharyngoplastiken gewonnen wurde. Das Gewebe der Patienten mit einem Karzinom des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes wurde während des tumorchirurgischen Eingriffs aus der tumorumgebenden, makroskopisch gesunden Schleimhaut entfernt. Anschließend wurden die Proben in steriler Kochsalzlösung konserviert und binnen maximal fünf Stunden im onkologischen Labor weiterverarbeitet.

Die durchgeführten Untersuchungen wurden gemäß des Ethikkommissionsantrags (Auftagsnr.: 221/04) durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität geprüft und genehmigt.

2.1.2 Anamnesen der Probenspender

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

Nr	Alter	♀/♂	OP-Indikation	Nikotin*	Alkohol*	Beruf
1	35	♂	chronische Tonsillitis	0 py	0 g/d	Kaufmännischer Angestellter
2	55	♂	OSAS	0 py	0 g/d	o.A.
3	39	♂	chronische Tonsillitis	5 py	20 g/d	Außenhandelskaufmann
4	45	♂	OSAS	20 py	0 g/d	o.A.
5	57	♂	OSAS	20 py	0 g/d	Bauarbeiter
6	38	♀	chronische Tonsillitis	10 py	0 g/d	Hausfrau
7	32	♂	chronische Tonsillitis	0 py	0 g/d	Hausmann
8	45	♀	Peritonsillarabszess	0 py	0 g/d	Krankenschwester
9	52	♂	chronische Tonsillitis	0 py	20 g/d	Bauingenieur
10	44	♂	chronische Tonsillitis	0 py	0 g/d	Arzt
11	67	♂	OSAS	0 py	0g/d	Maler
12	56	♀	OSAS	0 py	0 g/d	Altenpflegerin
13	49	♂	Peritonsillarabszess	10 py	0 g/d	Verwaltungsangestellter
14	59	♂	OSAS	8 py	20 g/d	o.A.
15	30	♀	chronische Tonsillitis	0 py	0 g/d	Studentin

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

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

Nr	Alter	♀/♂	Tumorlokalisation	Staging/Grading	Nikotin*	Alkohol*	Beruf
1	65	♂	Hypopharynx-Ca	pT1N3M0 G1	25 py	60g/d	o.A.
2	62	♂	Zungengrund-Ca	pT2N2M0 G1	40 py	<20 g/d	Deponiewart
3	47	♀	Tonsillen-Ca	pT3N2Mo G2	30 py	220 g/d	Verwaltungsangestellter
4	47	♂	Oropharynx-Ca	pT2N2M0 G2	25 py	120 g/d	o.A.
5	67	♂	Zungengrund-Ca	T3N2MO G2	35 py	50 g/d	o.A.
6	71	♂	Mundboden-Ca	T1N0M0 G1	60 py	40 g/d	Städt. Angestellter
7	70	♂	Mundboden-Ca	pT1NoMO G1	20 py	40 g/d	o.A.
8	57	♂	Zungengrund-Ca	T3NOMO G3	30 py	120 g/d	o.A.
9	51	♂	Tonsillen-Ca	o.A.	5 py	0 g/d	Bankkaufmann
10	82	♀	Zungengrund-Ca	pT2N1M0 G2	50 py	0 g/d	Hausfrau
11	68	♀	Tonsillen-Ca	T3N0M0 G2	20 py	30 g/d	Hausfrau
12	64	♂	Mundboden-Ca	T2N3M0 G1	40 py	60 g/d	Grafikdesigner
13	53	♂	Zungengrund-Ca	T2N0M0 G2	20 py	20 g/d	Verwaltungsangestellter
14	54	♂	Vallecula-Ca	T1N0M0 G1	40py	0 g/d	Architekt
15	53	♂	Mundboden-Ca	T2NoM0 G2	40 py	120 g/d	k.A.

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

2.1.3 Methodenübergreifende Materialien und Geräte

2.1.3.1 Chemikalien, Enzyme, Zellkulturmedien

Chemikalien, Zellkulturmedien, Enzyme	Hertseller
Agar Noble	DIFICO, Detroit, USA
Aminosäuren, non-essential	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Amphotericin B	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Antifade	Vysis-Abbot, Illinois, USA
Aqua bidest.	LMU-Klinikapotheke
Bronchial Epithelial Basal Medium + Supplementpack für BEGM	Promocell, Hamburg
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	Midwest Research Institute, Kansas, USA
DAPI	Vysis-Abbot, Illinois, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
DMEM-Pulver	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
DNA-Sonde (LSI EGFR Dual Color Probe-Hyb Set)	Vysis-Abbot, Illinois, USA
EGFR pharmDx™	Dako-Germany, Hamburg
Ethanol 70, 85, 95, 100%	LMU-Klinikapotheke
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat-di-Natriumsalz (Na ₂ EDTA)	Serva, Heidelberg
Fötale Kälber Serum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Formalin (4%, 10%)	Sigma, Steinheim
Formamid	Sigma, Steinheim
Gentamycin	Promocell, Hamburg
Hämatoxylin	Dianova, Hamburg
HEPES-Pulver	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Hyaluronidase	Sigma, Steinheim
Kollagenase P	Roche, Maanheim
Low-Melting Agarose; Sea Plaque GTG	FMC-Bio Products, Rockland, USA

Mounting-Medium (Dako's Faramount)	Dako-Germany, Hamburg
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Natriumhydroxid-Plättchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
N-Lauroylsacrosinnatriumsalz	Sigma, Steinheim
Normal-Melting-Agarose; Seakem LE	FMC-Bio Products, Rockland, USA
NP-40	Vysis-Abbot, Illinois, USA
Paraffin Pretreatment Reagent Kit	Vysis-Abbot, Illinois, USA
Penicillin/Streptomycin	Sigma, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Protease	Sigma, Steinheim
Saline Sodium Citrate Buffer (20xSSC)	Vysis-Abbot, Illinois, USA
Salzsäure 1,0 N	Sigma, Steinheim
Tri(s)hydroxymethylaminomethan	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Tryptanblau 0,4%	Merck, Darmstadt
Xylol (Dimethylbenzol)	Merck, Darmstadt

2.1.3.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hertseller
24-Well-Platte	Flacon, Heidelberg
Combitipps	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser zum Mikroskopieren, (Dicke 0,08 – 0,12 mm)	Lagenbrick, Emmendingen
Deckgläser 2x2 cm	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmallspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten steril 0,22µm Filter Unit, Millex-GV, Millex-GS	Millipore, Eschborn
Fotofilme ISO 100, ISO 400	Kodak, New York, USA
Montagekleber (Fixogum)	Marabu, Tamm
Objektträger 24 x 70 mm, seitlich mattiert	Lagenbrick, Emmendingen
Objektträgerkasten für max. 50 Objektträger	GLW, Würzburg
Pasteurpipetten 7 ml (steril + unsteril)	Merck, Darmstadt
Pertrischalen	nunc, Wiesbaden
Pinzetten (einweg)	Angiokard, Friedeburg

Pipetten (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pittenspitzen (5 µl, 10 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetten aus Polystyrol (2 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner, Frickenhausen
Eppendorf-Standardreaktionsgefäße (500 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Skalpelle	FEATHER, Osaka, Japan

2.1.3.3 Geräte und Zubehör

Geräte und Zubehör	Hersteller
Analysenwaage Voyager (0,1 mg – 62 g)	Ohaus, Gießen
Brutschrank Funktion Line	Heraeus, Hanau
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hanau
Elektrophoresenetzgerät E865	Renner, Darmstadt
Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart
Horizontale Elektrophoresekammer	Renner, Darmstadt
Kühlschrank	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer Combimag RCT	IKA, Staufen
Mikroskope	
Standardmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Inversmikroskop DMIRB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop BMLB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem N2.1, BP 516-560	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem I3, BP 450-490	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Objektive 100x/1,25Öl; 40x/0,5; 10x/0,22; 4x/0,1	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Mikrowelle MS1	Bauknecht, Schorndorf
Minishaker MS1	IKA-WORKS, Wilmington, USA
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Präzisionsheizplatte PZ 28-1	Harry Gestigkeit, Düsseldorf
Präzisionsheizplatte SP 13	Reichert-Jung, Wien-A
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Software (digitale Auswertung + Datensicherung)	
Programm Komet 3.1	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Komet ++	Kinetic Imaging, Liverpool
Programm Excel	Microsoft

Spiegelreflexkamera	Minolta, Osaka, Japan
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Waage 1419 (1 mg – 600 g)	Sartorius, Gießen
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Zählkammer nach Neubauer	Merck, Darmstadt
Zentrifuge Varifuge 3.ORS und 3.OR	Heraeus, Hanau

2.2 Methoden

2.2.1 Methodenübersicht

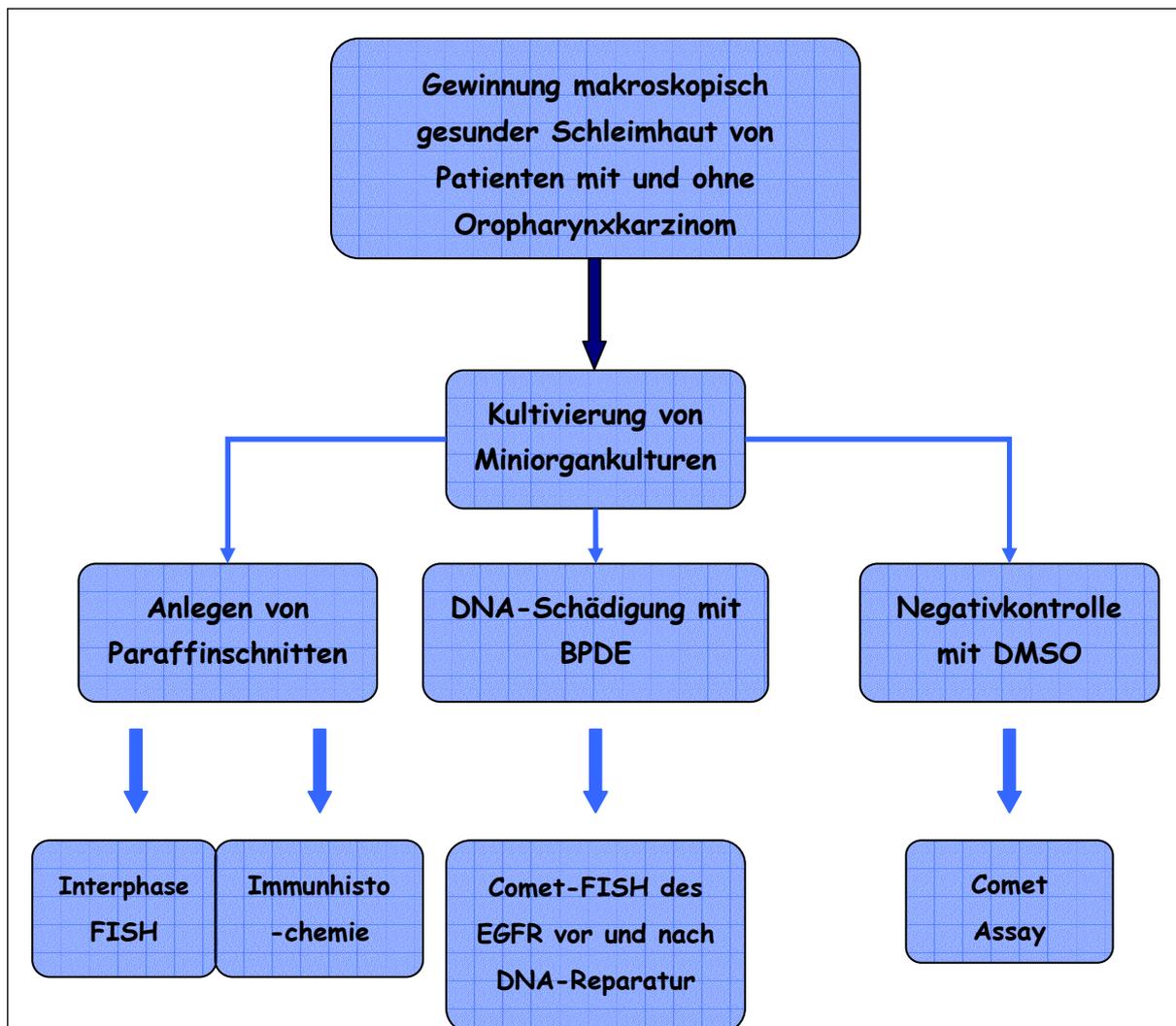


Abb. 5: Methodenübersicht

2.2.2 Miniorgankultutren

Das Anlegen von Miniorgankulturen (MOKs) wurde erstmals 1991 [Steinsvag et al., 1991] an adenoidem Gewebe beschrieben und mittlerweile für nasale und oropharyngeale Schleimhaut modifiziert [Kleinsasser et al., 2001; Harréus et al., 2004]. Bei diesem dreidimensionalen in vitro Modell handelt es sich um einen Zellverband, der nach einer Kultivierungsphase komplett mit Epithelzellen bedeckt ist und physiologische Zilienstrukturen/-aktivitäten aufweist. Durch zelluläre Interaktion besitzt dieses in-vivo-nahe Modell höhere metabolische Kompetenzen als Einzellmodelle [Kleinsasser et al., 2004; Wallner et al., 2005].

2.2.2.1 Präparation der Mukosaproben

Alle Schritte der Präparation der Schleimhautproben und der nachfolgenden Kultivierung zu Miniorgankulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen (Sterilbank, sterile Handschuhe, Einmalwerkzeug). Nach Überführung des Gewebestücks auf eine Petrischale, wurde die oropharyngeale Schleimhaut mittels Skalpell und einer Pinzette von Gefäßen, Drüsengewebe und nekrotischen Arealen befreit und anschließend in etwa 1mm³ große Stücke geschnitten. Um die Kultivierung nicht zu verzögern, wurde auf möglichst glatte Schnittränder geachtet. Nach dreimaligem Waschen in 3 x 5ml *Phosphate Buffered Saline* (PBS) konnten die angefertigten Gewebeschnitte auf eine 24-Well-Platte gebracht werden. Jedes Well einer Platte wurde mindestens 48h zuvor mit 250µl einer Lösung aus DMEM, 1,5% Agar Noble, fötalem Kälber Serum (FCS), nicht essentiellen Aminosäuren, Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B beschichtet. Um ein ausreichendes Nährmilieu zu gewährleisten, war jedes Well mit maximal 3 Gewebeschnitten gefüllt. Anschließend wurden sie mit 250µl *Bronchial Epithelial Growth Medium* (BEGM, Nährmedium) bedeckt.

2.2.2.2 Kultivierung

Die Kultivierungsphase fand in einem Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit statt. Alle 48 h Stunden wurde das Nährmedium erneuert, um optimale Wachstumsbedingungen für die Mukosa zu gewährleisten. Zusätzlich wurden die entstehenden Miniorgankulturen alle 7 Tage auf eine neue 24-Well-Platte übertragen, um eine optimale Nährstoffversorgung zu gewährleisten.

Eine regelmäßige Kontrolle mittels inversem Mikroskop erlaubte die Evaluierung des Reepithelialisierungsgrades der Kulturen. Etwaige mikrobielle Besiedelungen konnten mit

dieser Methode ebenfalls früh erkannt werden und befallene Platten gegebenenfalls aus der Studie genommen werden.

Die Kultivierungsphase war abgeschlossen, wenn sich eine ganzheitliche Reepithelialisierung der Miniorgankulturen vollzogen hatte (siehe Abb. 6 u.7). Die Kultivierungsdauer betrug durchschnittlich 21 Tage.

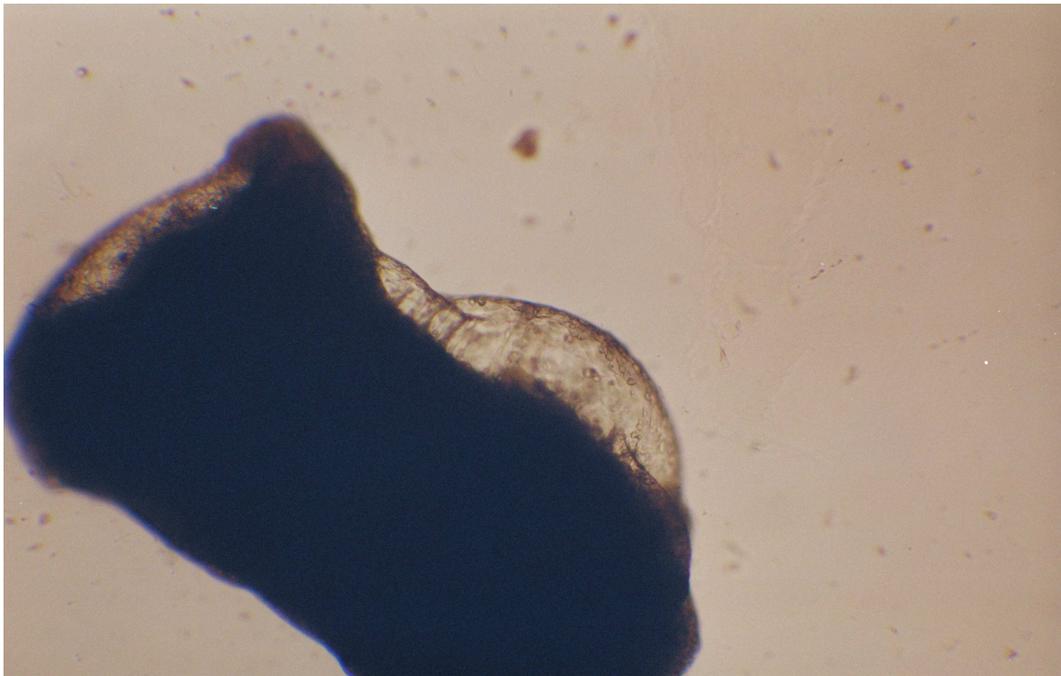


Abbildung 6 : Mukosastück nach 21 Tagen Kultivierung (10facheVergrößerung)

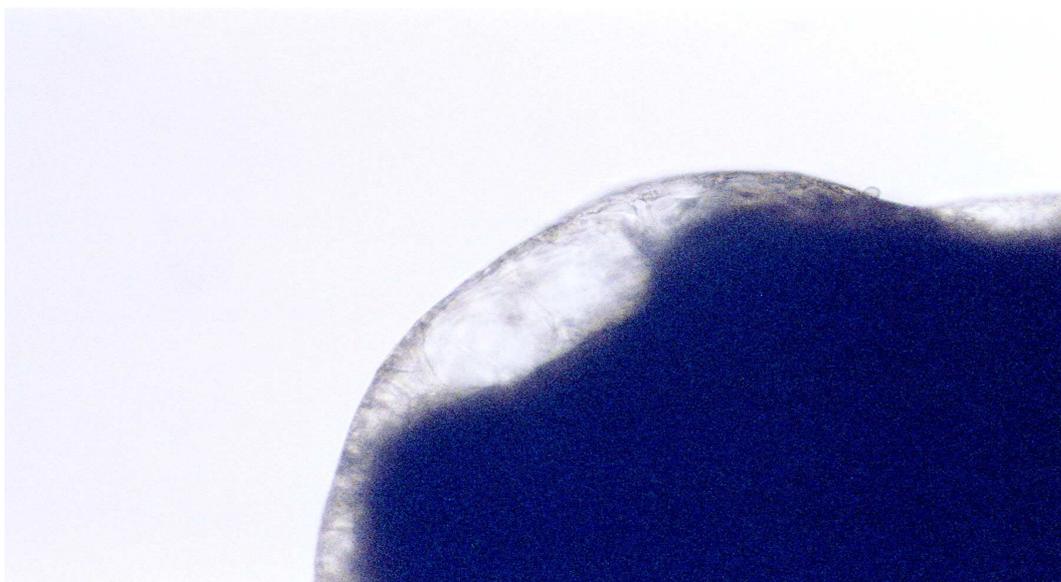


Abbildung 7 : Mukosastück nach 21 Tagen Kultivierung (40fache Vergrößerung)

2.2.2.3 Verwendetes Material

Materialien für die Miniorgankulturen	Anleitung
<p>Kulturmedium BEGM (Brochial Epithelial Growth Medium)</p> <p>500ml Bronchial Epithelial Basalmedium (BEBM)</p> <p><u>Supplement Pack:</u></p> <p>BPE, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Trijodthyronin, Transferrin, Retinoic Acid</p> <p><u>Antimikrobiller Zusatz:</u></p> <p>100 µl Amphotericin B, 5 µl Gentamycin</p>	<p>unter sterilen Bedingungen zugeben und gut mischen, bei 4°C lagern</p>
<p>DMEM-Medium</p> <p>500 ml Aqua bidest.</p> <p>9,99 g DMEM Pulver</p> <p>11,96 g HEPES Pulver</p>	<p>DMEM und HEPES in Aqua bidest. auflösen, Einstellung auf pH 7,2; Sterilfiltration und zu 2x 250 ml portionieren</p>
<p>Agar 1,5%</p> <p>0,45 g Agarosepulver (Agar Noble)</p> <p>30ml Aqua bidest.</p>	<p>Beide zusammenführen. In der Mikrowelle aufkochen und anschließend sterilfiltrieren</p>
<p>DMEM-Agar (24-Well-Platten)</p> <p>30 ml 1,5% Agar Noble</p> <p>30 ml DMEM</p> <p>6 ml FCS</p> <p>75 µl nicht essentielle Aminosäuren (NEAS)</p> <p>240 µl Penicillin/Streptomycin</p> <p>120 µl Amphotericin B</p>	<p>Flüssige Substanzen mischen, Agarose in der Mikrowelle aufkochen, beide Komponenten vermischen, gut schwenken und jedes Well mit 250 µl Agar befüllen, bei 4°C mind. 2 Stunden aushärten lassen</p>

2.2.3 Inkubation mit BPDE

Nach abgeschlossener Kultivierungsphase konnte die Inkubation mit Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10epoxid (BPDE) erfolgen. Am ersten Tag der Inkubationsphase wurden, zur späteren Bestimmung der Reparaturkapazität, jeweils 25 µl des BPDE auf eine Reihe der 24-Well-Platte aufgebracht und für 1 Stunde im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden der Überstand entfernt und die Miniorgankulturen durch zweimaliges Waschen mit dem Nährmedium BEGM von möglichen Resten der genotoxischen Substanz befreit. Im Anschluss daran erfolgte eine vierundzwanzigstündige Phase im Brutschrank, in der dem Zellverband die Möglichkeit zur DNA-Reparatur gegeben wurde.

Für die spätere Messung der Mutagensensitivität wurde nach 24stündiger Reparaturphase jedes Well einer weiteren Reihe der 24-Well-Platte, mit 25 µl des frisch verdünnten BPDE, beimpft. Als Negativkontrolle diente eine zusätzliche Reihe, bei der jedem Kontrollansatz jeweils 25 µl des reinen Lösungsmittels DMSO mit einer Konzentration von 166 mmol/l hinzugegeben wurde. Die unmittelbar anschließende Inkubation erfolgte im Schüttelwasserbad bei 37°C für eine Stunde. Die Überstände der Negativkontrolle wie auch die der BPDE Reihe wurden nach 60 Minuten entfernt und eventuelle Reste des Xenobiotikums zweimal mit dem Nährmedium (BEGM) heruntergewaschen.

2.2.4 Einzelzellisolation aus dem MOK-Zellverband

Im direkten Anschluss an die Inkubationsphase erfolgte die Gewinnung von Einzelzellen aus dem Zellverband durch ein in BEGM gelöstes und steril filtriertes Enzymgemisch aus Protease, Hyaluronidase und Kollagenase P. Hierzu wurde in ein Eppendorf Reaktionsgefäß ein 600 µl Enzymgemisch vorgelegt und jeweils 2-3 Miniorgankulturen hinzugegeben. Daraufhin erfolgte die Inkubation der Eppendorfgefäße für 45 Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C. Im Folgenden wurde das restliche Bindegewebe mechanisch von den Einzelzellen getrennt und auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden jedem Eppendorfgefäß 600 µl FCS beigemischt und dadurch die Enzymmischung neutralisiert. Eine beschleunigte Sedimentation der Zellen erreichte man durch das Zentrifugieren für 5 Minuten bei 4°C mit 800 U/min. Um eine eventuelle DNA-Schädigung durch UV-Licht zu vermeiden, wurden alle kommenden Arbeitsschritte bis hin zur digitalen Auswertung unter Rotlicht durchgeführt. Nach Absaugen des Überstandes wurde 1ml PBS zu jedem Zellpellet hinzugefügt. Zentrifugation und Resuspension wurden zweimal wiederholt, um die Zellsuspensionen der Vitalitätsbestimmung und der Mikrogelelektrophorese zuzuführen.

2.2.5 Vitalitätsbestimmung

Die Bestimmung der Vitalität erfolgte mittels “Trypanblau-Ausschluss-Test“ (Phillips H.J., 1973).

Aus jeder Versuchsreihe wurden 50 µl Zellsuspension mit der gleichen Menge Trypanblaulösung vermengt. Mit dieser Zell-Farbstoffmischung wurde eine Neubauer-Zählkammer aufgefüllt. Auf Grund einer intakten Zellmembran färbten sich vitale Zellen bei der lichtmikroskopischen Auswertung nicht. Avitale Zellen erschienen dagegen blau, da der Farbstoff durch die beschädigte Zellmembran eindringen konnte. Aus 16 Zählquadranten konnte nun der Prozentsatz vitaler Zellen ermittelt werden. Bei allen Versuchen dieser Arbeit lag die Vitalität >80%. Vitalitäten < 80% galten als Ausschlusskriterium.

2.2.6 Verwendete Materialien

2.2.6.1 BPDE Inkubation

Material für die Inkubation mit BPDE	Anleitung
BPDE 100 µl BPDE (90 µmol/l) 900 µl DMSO	BPDE mit DMSO zusammengeben und mit Hilfe eines Minishakers gut durchmischen

2.2.6.2 Einzelzellisolation

Material für die Einzelisolation	Anleitung
Proteolytische Enzymlösung 50 mg Protease 10 mg Hyaluronidase 10 mg Protease P 10 ml BEGM	Enzyme mit Präzisionswaage abwiegen, in 10 ml BEGM lösen, anschließende Sterilfiltration

2.2.7 Comet Assay

2.2.7.1 Grundlagen der Methode

Die in dieser Arbeit angewandte alkalische Version der Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) ist ein schnelles und sensitives Verfahren zum Nachweis und zur Quantifizierung von DNA-Schäden an Einzelzellen. Hierbei werden überwiegend Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und eine inkomplette DNA-Nukleotidbasenexisionsreparatur dargestellt.

Die meisten Xenobioika verursachen bis zu 2000mal mehr Einzel- als Doppelstrangbrüche der DNA [Bradley und Kohn, 1979]. Mit dem ursprünglichen Comet Assay, der erstmals 1984 unter pH-neutralen Bedingungen durchgeführt wurde [Ostling und Johanson, 1984], konnten lediglich DNA-Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden [Olive et al., 1991]. Erst die Alkalisierung der Methode im Jahr 1988 machte es möglich, DNA-Einzelstrangbrüche mit einer ausreichenden Sensitivität nachzuweisen [Singh et al., 1988].

Nach der Freilegung des genetischen Materials durch Lysierung der Zell- und Kernmembranen erfolgt eine DNA-Entspiralisierung durch Inkubation in einem stark alkalischen Milieu. Durch das Anlegen eines elektrischen Feldes kommt es zur Wanderung geschädigter DNA Fragmente. Ungeschädigte DNA wandert nicht. Dadurch entsteht das Bild eines „Kometen“, mit ungeschädigter DNA im Kopf und geschädigter DNA im Schweif. Durch Markierung der DNA mit einem Fluoreszenzfarbstoff ist es möglich, anhand der Migrationstrecke der DNA und des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität im Schweif zu der im Kopf, das Ausmaß der DNA-Schädigung zu quantifizieren [Speit und Hartmann, 2005].

2.2.7.2 Vorpräparation der Objektträger

Um eine bessere Haftung der Zellen auf den Objektträgern zu gewährleisten und damit eine höhere Zellausbeute zu erreichen, wurde jeder der an den Längsseiten mattierten Objektträger mit 85 µl einer 0,5%igen Normal Melting Agarose beschichtet. Dies geschah mindestens 48h vor Versuchsbeginn, um die Agaroseschicht bei Zimmertemperatur zur Aushärtung zu bringen.

2.2.7.3 Auftragen der Schleimhautzellen auf die Objektträger

Nach dem letzten Absaugen des Überstands wurde jedes Zellpellet mit 75 µl 0,7%iger Low Melting Agarose resuspendiert. Die Zell-Agarose-Suspension wurde nun auf einen Objektträger aufgebracht und mit einem Deckglas möglichst gleichmäßig auf diesem verteilt.

Um eine rasche Aushärtung zu gewährleisten, wurden die Objektträger 10 Minuten auf eine gekühlte Metallplatte gelegt.

Nach Entfernung des Deckglases wurde jeder Objektträger ein weiteres Mal mit 85 µl der 0,7%igen Low Melting Agarose beschichtet, mit einem Deckglas versehen und abschließend 10 Minuten auf der Metallplatte zur Aushärtung gebracht.

2.2.7.4 Lyse und Elektrophorese

Zur Freilegung der DNA für die anschließende Elektrophorese wurden Zell- und Kernmembranen mindestens 1 Stunde lang bei 4°C lysiert. Hierzu wurden die Objektträger von ihrem Deckglas befreit und vertikal in eine Glasküvette gestellt, die daraufhin mit 100ml einer frisch angesetzten und gekühlten Lyselösung gefüllt wurde.

Im Anschluss daran wurden die Objektträger horizontal in die dafür vorgesehene eisgekühlte Elektrophoresekammer gegeben. Um ein homogenes elektrisches Feld und damit eine gleichmäßige und horizontale DNA-Migration erzielen zu können, mussten die Objektträger möglichst lückenlos und nahe der Anode platziert werden. Die Elektrophoresekammer wurde mit 4°C kaltem alkalischen Elektrophoresepuffer befüllt, bis die Objektträger vollständig bedeckt waren. Nach einer Wartezeit von 20 Minuten, in der sich die alkalische Denaturierung und Entspiralisierung der DNA vollzog, konnte die Elektrophorese begonnen werden (20 min, 300 mA, 25 V).

Im Anschluss daran wurden die Objektträger dreimal im Abstand von 5-10 Minuten mit Trisma-Base neutralisiert.

Die Negativkontrollen wurden mit Ethidiumbromid gefärbt. Objektträger mit geschädigten Zellen hingegen wurden in einer Färbekammer, gefüllt mit 100ml 2xSSC, für mindestens 10 min aufbewahrt, um mit ihnen zeitnah die Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) durchzuführen.

2.2.7.5 Digitale Auswertung der DNA-Migration

Die Auswertung der mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbten Negativkontrollen erfolgte mit Hilfe eines DMLB Fluoreszenzmikroskops, das mit einer CCD-Kamera zur digitalen Bildverarbeitung verbunden war (Comet 3.1).

Je nach Ausmaß der induzierten DNA-Schädigung zeigten die DNA-Fragmente unterschiedliche Migrationsmuster. Eine hohe Schädigung/Fragmentierung hatte eine schnellere und damit weitere Wanderung im elektrischen Feld zur Folge. Ungeschädigte

DNA wanderte nicht. Daraus resultierte das Bild eines “Kometen“ mit ungeschädigter DNA im Kopf und geschädigter DNA im Schweif (s. Abb.9).

Um das Ausmaß der DNA-Schädigung quantifizieren zu können, wurde der “Olive Tailmoment“ (OTM) eingesetzt. Dieser beinhaltet das Produkt aus der mittleren DNA-Migrationsstrecke und dem Quotienten des DNA-Anteils im Schweif zur gesamt DNA einer Zelle. [Olive an Banath, 1993]. Pro Patient wurde 80 Zellen (max. 40 Zellen/Objektträger) ausgewertet.

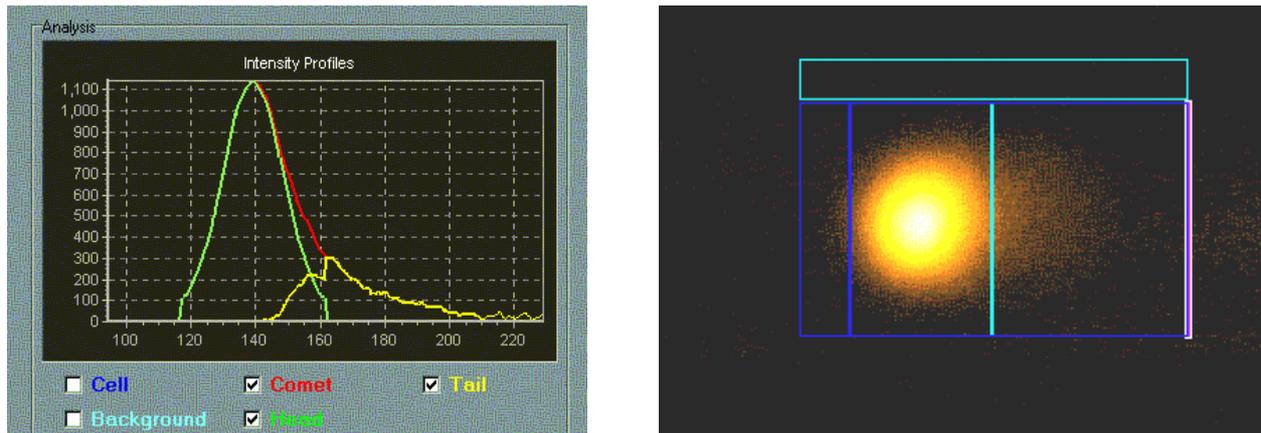


Abb. 9: Epithelzelle mit geschädigter DNA in der Comet 3.1 Auswertung

2.2.7.6 Methodenspezifische Materialien

Materialien für den Comet Assay	Anleitung
Agarose 0,5% 0,5%ige Low-Melting Agarose PBS	Unter kurzem Erhitzen in der Mikrowelle in PBS auflösen und bis zur Weiterverarbeitung im Wasserbad bei 37°C aufbewahren
Agarose 0,7% 0,7%ige Normal Melting Agarose PBS	Unter kurzem Erhitzen in der Mikrowelle in PBS auflösen und bis zur Weiterverarbeitung im Wasserbad bei 37°C aufbewahren
Lysestammlösung 146,4 g NaCl (2,5M) 1,2 g Trihydroxymethylaminomethan (19mM) 37,2 g Na ₂ EDTA (100mM) 10g N-Lauroylsacrosinnatriumsalz (1%) Aqua bidest	NaCl, Trihydroxymethylaminomethan und N-Lauroylsacrosinnatriumsalz in 500 ml Aqua bidest. lösen, Na ₂ EDTA in 160 ml Aqua bidest. mit Zugabe von NaOH-Plätzchen lösen; alles mischen, mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen, pH-Wert 10 einstellen
Lysepuffer 1 ml Triton X-100 10 ml DMSO 89 ml Lysestammlösung	Triton X-100 und DMSO in 100 ml Messzylinder geben; mit Lysestammlösung bis zum Eichstrich auffüllen
Elektrophoresepuffer 24 g NaOH-Plätzchen (300mM) 0,744 g Na ₂ EDTA (1mM) Aqua bidest.	NaOH-Plätzchen und EDTA abwiegen, in 2 l Aqua bidest. lösen, bei 4°C lagern
Neutralisationspuffer 48,5 g Trihydroxymethylaminomethan Aqua bidest.	Trihydroxyaminomethan in 1 l Aqua bidest. lösen, pH auf 7,5 einstellen; bei Raumtemperatur aufbewahren
Ethidiumbromidlösung 0,2 mg/ml Ethidiumbromidstammlösung Aqua bidest.	1:10 Verdünnung der Stammlösung mit Aqua bidest. sterilfiltrieren, bei 4°C lichtgeschützt aufbewahren
2xSSC-Lösung 100ml 20x SSC Aqua bidest.	20xSSC und 900 ml Aqua bidest. mischen, pH 7,0 (\pm 0,2) einstellen, Lagerung bei Raumtemperatur

2.2.8 Comet-FISH

2.2.8.1 Grundlagen der Methodik

Bei der Methode der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) handelt es sich um ein Verfahren, das die Darstellung einzelner Chromosomen und chromosomaler Anteile (Gene) ermöglicht. Die in situ Hybridisierung wurde erstmals im Jahr 1969 beschrieben [Pardue und Gall, 1969]. Erst durch die Erweiterung mittels Fluoreszenzfärbung 1986 wurde der Grundstein zur heutigen breiten medizinischen Anwendung dieser Methodik gelegt [Pinkel et al., 1986].

Die Kombination des Comet Assay mit der FISH wurde in dieser Arbeit verwendet, um die Schädigung des EGFR-Gens im Vergleich zur Gesamtschädigung der Zell-DNA beurteilen zu können. Die Versuchsdurchführung des Comet FISH erfolgte in dieser Arbeit basierend auf den Protokollen von Singh et al. und McKelvey et al., die den Comet FISH an Lymphozyten erprobten [Singh et al., 1988; McKelvey-Martin et al., 1998]. In Anlehnung an Vorarbeiten aus dem eigenen Labor wurden für die Untersuchung an oropharyngealen Schleimhautzellen jedoch Inkubationszeiten, Konzentrationen und die Behandlung der Zellen entsprechend modifiziert [Harréus et al., 2004].

2.2.8.2 Präparation der Objektträger

Die Objektträger wurden für weitere 5-10 Minuten in eine Glasküvette mit 100ml 2xSSC gestellt. In einer Ethanolreihe mit aufsteigenden Konzentrationen (70%, 85%, 100%) wurden die Objektträger jeweils 5 Minuten dehydriert. Die zu hybridisierenden Stellen, die eine besondere Homogenität der Agarose aufwiesen und damit eine besonders hohe Zellzahl erwarten ließen, wurden markiert. Für die endgültige Stabilisierung der Gelschichten wurden die Objektträger für 10 Minuten auf eine 37°C warme Heizplatte zum Trocknen gelegt.

2.2.8.3 DNA-Hybridisierung

Die DNA-Sonde wurde von -20°C aufgetaut und jeweils 10µl auf die zuvor markierte Stelle des Objektträgers gegeben und mit einem Deckglas (2x2 cm) abgedeckt. Die Ränder wurden mit einem Montagekleber auf Kautschukbasis versiegelt und zur Codenaturierung für 4-6 Minuten auf eine 74°C heiße Präzisionsheizplatte gelegt. Zum Schluss wurden die fertigen Objektträger für 16-24 h in einer verdunkelten Feuchtkammer im Brutschrank bei 37°C hybridisiert.

Dabei bildeten sich Verbindungen der DNA mit der Sonde am Zentromer des Chromosoms 7 (Band-Region 7p11.1-q11.1, Lokus D7Z1) und am EGFR (Band Region 7p12) aus.

2.2.8.4 Färben der Objektträger

Nach Beendigung der Hybridisierungsphase wurden die Deckgläser abgelöst und die Objektträger für 10 Minuten vertikal in 45°C warme Formamid-Waschlösung gestellt. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Danach folgte ein 10-minütiges Bad in 2xSSC und eine 5-minütige Inkubation in 2xSSC/NP40. Beide Lösungen waren ebenfalls auf 45°C erwärmt. Damit wurden unspezifische DNA-Sondenbindungen gelöst.

Nach der Inkubation in 2xSSC/NP40 wurden die Objektträger für 15-20 Minuten luftgetrocknet. Zwischenzeitlich wurden die tiefgefrorenen Reagenzien für die DNA-Gegenfärbung aufgetaut und in einem Verhältnis von 2 DAPI zu 1 Antifade gemischt.

Je 18 µl der DAPI-Antifade-Lösung wurden auf die hybridisierte Stelle gegeben und mit einem 2x2cm großen Deckglas abgedeckt und homogen verteilt. Abschließend wurden die Ränder der Deckgläser mit Nagellack versiegelt und die Objektträger bis zur digitalen Auswertung bei -20°C im Gefrierfach aufbewahrt.

2.2.8.5 Digitale Auswertung der DNA Migration

Die Auswertung der hybridisierten DNA erfolgt mit Hilfe eines DMLB Fluoreszenzmikroskops und einer daran angeschlossenen CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (Comet ++TM). Für die Berechnungen in dieser Arbeit wurde das, an das OTM angelehnte, "Munich Chromosomal Tail Moment" (MCTM) [Harréus et al., 2004] verwendet. Dieses wird berechnet aus dem Produkt der mittleren DNA-Sonden-Wanderungstrecke und der Sondenfluoreszenz im Kometenschweif, dividiert durch die gesamte Fluoreszenz der DNA-Sonde in der Zelle. Die Wanderungstrecke wird hierfür vom ersten bis zum letzten Signal der DNA-Sonde berechnet und bezieht sich nicht auf die Mitte des Zellkerns, wie es für den OTM gültig ist. Ausgewertet wurden 20 Zellen pro Objektträger.

2.2.8.6 Methodenspezifische Materialien

Materialien für Comet-FISH	Anleitung
2xSSC-Lösung 100 ml 20xSSC Aqua bidest.	20xSSC und 900 ml Aqua bidest. mischen, pH-Wert auf 7,0 (\pm 0,2) einstellen, Lagerung bei Raumtemperatur; Haltbarkeit: 6 Monate
Formamid-Waschlösung 157,5ml Formamid 31, ml 20xSSC 122 ml Aqua bidest.	Komponenten in einem 500ml Standzylinder mischen, pH auf 7-8 einstellen, Lagerung bei 4°C; Haltbarkeit: 7 Tage
2xSSC/NP-40-Lösung 1 ml Tergitol NP-40 1000 ml 2xSSC	NP-40 im Wasserbad bis zum Schmelzpunkt erhitzen, langsam mit 1000 ml 2xSSC mischen, pH-Wert auf 7,0 (\pm 0,2) einstellen, Lagerung bei Raumtemperatur; Haltbarkeit: 6 Monate
DNA Sonde 10 μ l DNA Sonde	DNA-Sonde auftauen und je 10 μ l auf die Objektträger geben
DAPI-Antifade-Gegenfärbung DAPI Antifade	Tiefgerorene Komponenten auftauen und in einem Verhältnis von 2:1 (DAPI: Antifade) mischen

2.2.9 Übersicht Comet Assay / Comet FISH

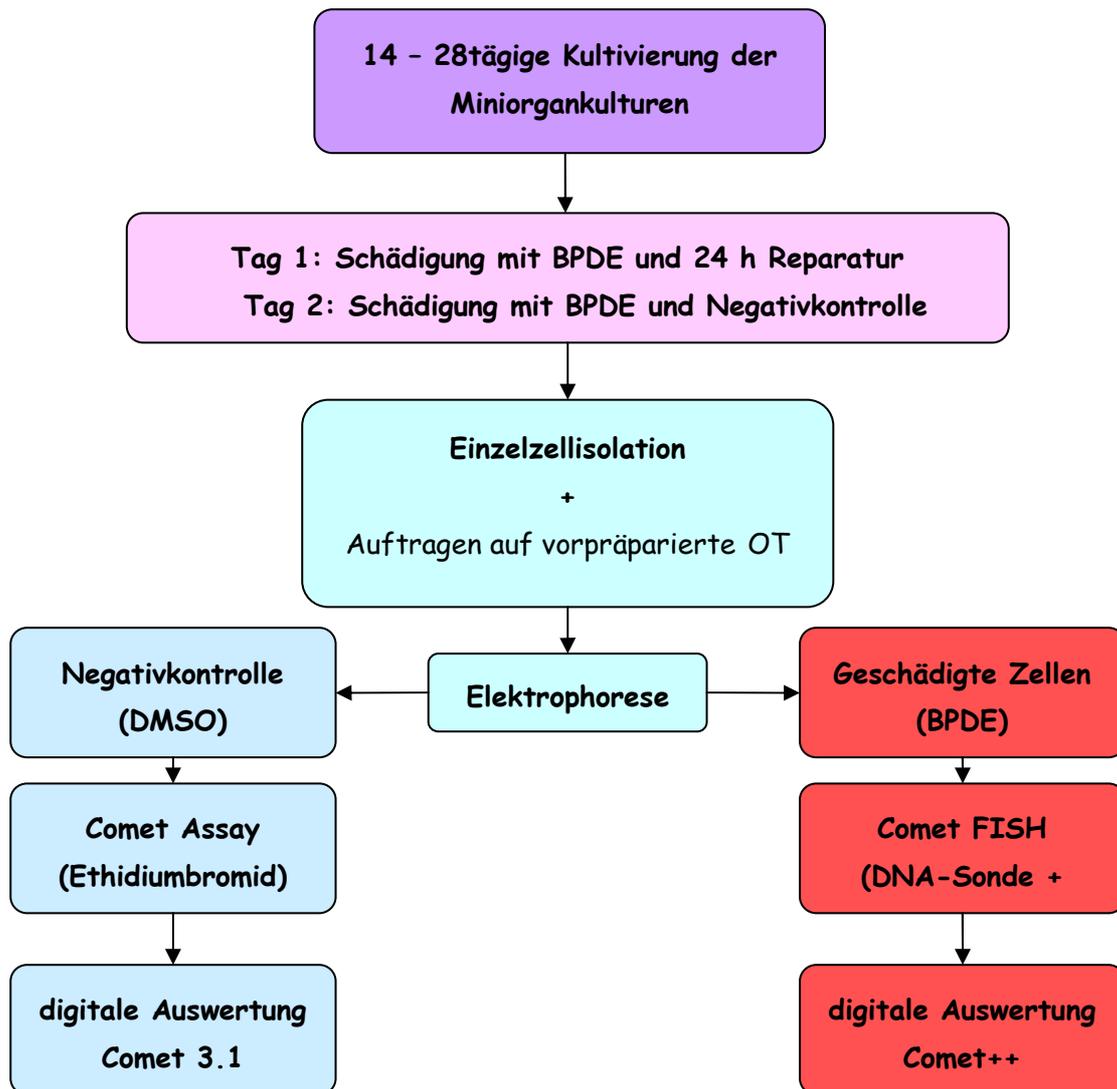


Abb. 10 : Übersicht Comet-Assay / Comet-FISH

2.2.10 Interphase-FISH an histologischen Feinschnittpräparaten der Miniorgankulturen

2.2.10.1 Grundlagen der Technik

Die Technik der "Interphase Fluoreszenz in situ Hybridisierung" erlaubt den Nachweis von numerischen Chromosomenaberrationen, aber auch von strukturellen Chromosomen- und Genveränderungen, wie Translokation, Deletion oder Amplifikation, in zytologischen Ausstrich- und histologischen Schnittpräparaten. Anders als in der klassischen Zytogenetik ("Metaphase Technik"), werden die Untersuchungen in der Interphase durchgeführt ("Interphasen-Zytogenetik"), da es sich um nicht mehr teilungsbereite Zellen handelt und keine spezifischen Chromosomenregionen identifiziert werden müssen.

In dieser Arbeit wurde dieses Verfahren dazu verwendet, um eine eventuelle Genamplifikation im EGFR-Gen gegebenenfalls nachzuweisen, beziehungsweise diese auszuschließen.

2.2.10.2 Vorbereitung der Proben

Nach dem Abschluss der Kultivierungsphase wurden von jedem Studienteilnehmer 2-4 Miniorgankulturen separiert und anschließend für mindestens 24-48 Stunden in Formalin fixiert. In Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der LMU München wurden die Miniorgankulturen in Paraffin eingebettet, in 4-5 µm dicke Schichten geschnitten und auf Objektträger fixiert.

2.2.10.3 Vorbehandlung der Objektträger

Um einen Erfolg der Methode zu erzielen, war es notwendig, dass der DNA-Sonde eine ausreichende Zugänglichkeit zu den Zellkernen gewährleistet war. Hierzu mussten die Objektträger deparaffinisiert werden und der Zellverband durch eine Proteasereaktion eine optimale Permeabilität erreichen. Zu diesem Zweck wurde das Paraffin Pretreatment Reagent Kid der Firma Vysis verwendet.

2.2.10.3.1 Deparaffinisierung

Als erster Arbeitsschritt der Deparaffinisierung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur für 10 Minuten in eine mit 100 ml Xylol gefüllte Coplin-Küvette gestellt. Dies wurde unter gleichen Bedingungen wiederholt. Anschließend wurden die Objektträger für 5 Minuten in 100% Ethanol dehydriert. Nach nochmaliger Dehydrierung für weitere 5 Minuten in einer Ethanolküvette konnten die Objektträger zum Trocknen auf eine 45-50°C warme Heizplatte gelegt werden.

2.2.10.3.2 Vorbehandlung für die Proteasereaktion

Um die Proteasereaktion zu optimieren und damit eine maximale Hybridisierung der Proben zu sichern, mussten die Objektträger vorbehandelt werden. Zu diesem Zweck wurden diese für 20 Minuten einem Bad aus 0,2 %iger Salzsäure zugeführt und daraufhin für 3 Minuten in destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurden die Proben 3 Minuten in eine Küvette mit 2xSSC (Waschpuffer) gestellt. Nun erfolgte die eigentliche Vorbehandlung für die Proteasereaktion durch ein 30minütiges, 80°C heißes Wasserbad in Natriumdicyanat (Vorbehandlungslösung). Als nächstes wurden die Objektträger für eine Minute in eine Küvette mit destilliertem Wasser getaucht. Nach zweimaligem Waschen in 2xSSC für jeweils 5 Minuten konnten die Proben der Proteasereaktion zugeführt werden.

2.2.10.3.3 Behandlung mit Protease

Die Objektträger wurden von dem Überschuss des Waschpuffers befreit und für 10 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad mit der Proteaselösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 2xSSC erfolgte das Trocknen auf einer 45-50°C warmen Heizplatte für 4-5 Minuten.

2.2.10.3.4 Fixierung der Probe

Um die Proben auf den Objektträger zu fixieren, wurden sie für 10 Minuten in eine 10 %ige Formalinlösung gegeben, 5 Minuten in 2xSSC gewaschen und zum Trocknen im letzten Schritt vor der Fluoreszenz in situ Hybridisierung 2-5 Minuten auf eine 45-50°C warme Heizplatte platziert.

2.2.10.4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die nun deparaffinisierten Objektträger und die für die DNA-Sonde zugänglich gemachten histologischen Feinschnitte wurden wie in 2.2.7.3 – 2.2.7.4 der 16 bis 20-stündigen Hybridisierung mit der EGFR-Sonde zugeführt, im Anschluss den verschiedenen Waschvorgängen unterzogen und die DNA am Ende mit DAPI gegengefärbt.

2.2.10.5 Analoge Auswertung der Signale

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines DMLB Fluoreszenzmikroskops. In Anlehnung an bereits bestehende Arbeiten zur Amplifikation bestimmter Gene, wurde in dieser Arbeit die so genannte Gen/Zentromer-Ratio zur Identifikation einer Vermehrung des EGFR-Gens herangezogen [Pugh et al., 2007; Hirsch et al., 2007]. Hierzu wurde von jedem Studienteilnehmer die Anzahl der spezifisch gefärbten DNA-Signale an 20 Zellen ausgezählt. Aus dem Verhältnis der Signale des EGFR-Gens zu denen des Zentromers von Chromosom 7 ließ sich nun die EGFR-Gen/Zentromer-Chr.7- Ratio für jeden Patienten errechnen. Lag die ermittelte Ratio ≥ 2 , war das Kriterium für eine Amplifikation erfüllt.

2.2.10.6 Methodenspezifische Materialien

Materialien für den Interphase FISH	Anleitung
<p>Deparaffinierung und Dehydrierung</p> <p><u>Dimethylbenzol</u> 100 ml Xylol</p> <p><u>Ethanol</u> 100 ml Ethanol</p>	<p>Xylol in eine 100 ml Küvette füllen, Verwendung bei Raumtemperatur</p> <p>Ethanol in eine 100 ml Küvette füllen, Verwendung bei Raumtemperatur</p>
<p>Paraffin Pretreatment Reagent Kit</p> <p><u>Vorbehandlungslösung:</u> 50 ml Natriumthiocyanat</p>	<p>50 ml Natriumthiocyanat in eine Küvette füllen und im Wasserbad auf $80 \pm 1^\circ\text{C}$ erhitzen; Haltbarkeit: 1 Tag</p>

<p><u>Protease-Lösung (pH 2):</u> 50 ml NaCl 25 mg Protease</p>	<p>pH-Wert verifizieren, ggf. mit 1,0 N HCl oder 1,0 N NaOH korrigieren; NaCl im Wasserbad auf $37 \pm 1^\circ\text{C}$ erwärmen und erst direkt vor Gebrauch 2 5mg Protease zugeben und gut vermischen</p>
<p><u>Waschpuffer:</u> 6x50 ml 2xSSC</p>	<p>pH-Wert auf 7 einstellen und in 6 Küvetten aufteilen; Haltbarkeit: 1 Tag</p>

2.2.11 Immunhistochemische Evaluierung der EGFR-Expression

2.2.11.1 Grundlagen der Methodik

Bei der Methode der Immunhistochemie handelt es sich um ein etabliertes Verfahren, um an histologischen Feinschnitt- oder zytologischen Ausstrichpräparaten Zellproteine mittels Antigen-Antikörper-Färbereaktion sichtbar zu machen. Allen Variationen der Immunhistologie gemeinsam ist die Inkubation mit einem Primärantikörper, der gegen das Antigen des gesuchten Proteins gerichtet ist. Zur Evaluierung der EGFR-Expression beider Studiengruppen wurde in dieser Arbeit die so genannte Polymer-Methode verwendet. Hierbei handelt es sich um ein indirektes Färbeverfahren, bei dem mit Hilfe eines Sekundärantikörpers die Antigenstrukturen sichtbar gemacht werden. Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (Maus-anti-Mensch), der gegen ein Epitop nahe der Ligandenbindungsstellen der extra-zellulären Domäne des Rezeptors gerichtet ist (Spaulding und Spaulding, 2002), wird ein Sekundärantikörper (Ziege-anti-Maus) zugesetzt. Dieser ist mit einem Dextran-Polymer bestückt, an das wiederum Peroxidase-Enzymketten gebunden sind. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid als Substrat für die Peroxidase und des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) bilden sich durch die Enzym-Substrat-Reaktion freie Protonen, die das zuvor farblose Chromogen DAB in ein farbiges Endprodukt oxidieren, was zu einem Farbniederschlag in der Umgebung der Peroxidase führt. Auf diese Weise wird indirekt die Antigen-Antikörper-Bindungsstelle sichtbar gemacht. Nach anschließender Gegenfärbung erfolgte eine semiquantitative Auswertung mittels Lichtmikroskop.

2.2.11.2 Vorbereitung der Proben

Nach dem Abschluss der Kultivierungsphase wurden von jedem Studienteilnehmer 2-4 Miniorgankulturen separiert und anschließend für mindestens 24-48 Stunden in Formalin fixiert. In Zusammenarbeit mit dem Pathologischen Institut der LMU-München wurden die Miniorgankulturen in Paraffin eingebettet, in 4-5 µm dicke Schichten geschnitten und auf Objektträger fixiert.

2.2.11.3 Deparaffinisierung und Rehydratation

Vor der immunhistochemischen Färbung mussten die Feinschnittpräparate deparaffinisiert und rehydriert werden. Hierzu wurden die Objektträger für 5 Minuten in einer mit Xylol gefüllten Küvette inkubiert. Dieser Vorgang wurde unter gleichen Bedingungen mit frischem Xylol wiederholt. Durch ein jeweils 2x3 minütiges Bad in einer absteigenden Ethanolreihe (Konzentrationen 100%, 100%, 95%, 95%), wurde die notwendige Rehydrierung der histologischen Feinschnitte erreicht. Daraufhin wurden die Objektträger für 5 Minuten in destilliertes Wasser getaucht.

2.2.11.4 Immunhistochemische Färbung

Das Färbeverfahren wurde mit Hilfe des EGFR pharmDX™ Kit's (Dako-GmbH) unter Verwendung der mitgelieferten Chemikalien und des Herstellerprotokolls durchgeführt. Um die einzelnen Färbeschritte zu validieren, wurden dem Kit enthaltene Objektträger mit Positiv- und Negativkontrollen aus Zelllinien zusätzlich zu jedem Färbeschritt unterzogen.

2.2.11.4.1 Enzymatische Andauung durch Proteinase K

Überfixation der Miniorgankulturen in Formalin verursacht die Bildung übermäßiger Aldehydquervernetzungen, die die EGFR-Antigene maskieren und deren Nachweis durch den Primärantikörper verhindern. Um die Antigenstellen zu demaskieren, mussten die Aldehydvernetzungen mit einem proteolytischen Enzym, der Proteinase K, angedaut werden. Zu diesem Zweck wurden die Objektträger aus der Küvette mit dem destillierten Wasser entfernt und mit einem Zellstofftuch getrocknet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit 100 µl Proteinase K für 5 ±0,5 Minuten. Durch das Abspülen der Objektträger mit destilliertem Wasser und einem folgenden 5-minütigen Bad mit frischem Aqua bidest. wurde die enzymatische Andauung gestoppt.

2.2.11.4.2 Peroxidase Block

Die Substrat-Chromogenreaktion, die verwendet wird, um die an das Polymer gebundene Peroxidase sichtbar zu machen, lässt keine Unterscheidung zu, ob es sich bei dem nachgewiesenen Enzym um jenes handelt, das indirekt den Antigen-Antikörper-Komplex markiert, oder ob es sich um endogene Peroxidaseaktivität handelt, die im Präparat schon vor der Anwendung vorhanden war. Deshalb erfolgte im zweiten Arbeitsschritt der Färbung eine Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität durch das Aufbringen von 100 µl Peroxidase Block (3% H₂O₂) und anschließender Inkubation für 5 Minuten. Zuvor wurde das überschüssige destillierte Wasser entfernt. Nach Ablauf der Inkubation wurden die Objektträger mit Waschlösung abgespült und daraufhin für 5 Minuten in ein Bad aus Waschlösung gestellt.

2.2.11.4.3 Inkubation mit dem Primärantikörper oder der Negativkontrollreagenz

Die Objektträger wurden abermals von Flüssigkeitsresten befreit und daraufhin je nachdem mit 100 µl des primären Antikörpers oder der Negativkontrollreagenz für 30 Minuten inkubiert. Um ein Austrocknen der Gewebsschnitte zu verhindern, wurde diese Inkubation wie auch die des Polymers in einer Feuchtkammer vollzogen. Im nächsten Schritt wurden die Reagenzien mit der Waschlösung abgespült und für weitere 5 Minuten in eine Küvette mit frischem Puffer getaucht.

2.2.11.4.4 Inkubation des Dextran-Polymers

Überständiger Puffer wurde von den Objektträgern abgetupft. In einer Feuchtkammer erfolgte die anschließende 30-minütige Inkubation mit 100 µl des mit der Meerrettich-Peroxidase und dem Sekundärantikörper konjugierten Dextran-Polymers. Die Entfernung des Polymers erfolgte äquivalent zu der Entfernung des primären Antikörpers.

2.2.11.4.5 Inkubation mit der DAB+ Substrat-Chromogen Lösung

Nach dem obligaten Abtrocknen der Feinschnitte wurden diese im letzten Arbeitsschritt der Färbung mit 100 µl der zuvor angemischten DAB+ Substrat-Chromogen Lösung für einen Zeitraum von 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Reagenzien mit destilliertem Wasser abgespült und für 5 Minuten in eine Küvette mit frischem Aqua bidest. überführt.

2.2.11.5 Gegenfärbung

Nach Beendigung der Hauptfärbung wurden die Feinschnitte zur Gegenfärbung ihrer Zellkerne für 5 Minuten in ein Bad aus Hämatoxylin gegeben und anschließend so lange mit destilliertem Wasser abgespült, bis kein restliches Hämatoxylin mehr sichtbar war. Vor dem Versiegeln der Objektträger erfolgte ein letztes Bad in destilliertem Wasser.

2.2.11.6 Versiegelung

Zur Versiegelung der nun gegengefärbten Feinschnittpräparate wurde ein wässriges Einschluss-Medium (Mounting-Medium) verwendet. Um eine Signalabschwächung zu verhindern, wurden die fertigen Objektträger, bis zur Auswertung bei Raumtemperatur und vor direktem Licht geschützt, aufbewahrt.

2.2.11.7 Semiquantitative Auswertung der immunhistochemischen Färbung

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbung geschah mit Hilfe eines Lichtmikroskops. Die Interpretation der EGFR-Expression erfolgte semiquantitativ nach folgendem Schema: Grad 0: keine Färbung; Grad 1: schwache Anfärbung; Grad 2: moderate Färbung; Grad 3: starke Färbung.

2.2.11.8 Methodenspezifische Materialien

Material für die immunhistochemische Färbung	Anleitung
Deparaffinierung und Rehydrierung <u>Dimethylbenzol</u> 200 ml Xylol <u>Ethanol</u> 200 ml Ethanol (100%) 200 ml Ethanol (95%)	200ml Xylol auf zwei Färbeküvetten aufteilen, Verwendung bei Raumtemperatur Ethanol auf 4 Färbeküvetten aufteilen, Verwendung bei Raumtemperatur
EGFR pharmDx™ Kit <u>Proteinase K</u> < 0,1% Proteinase K in Tris-HCl-Puffer verdünnt	gebrauchsfertig; jeweils einen Objektträger mit 100 µl Enzym inkubieren

<p><u>Peroxidase Block</u> 3% Wasserstoffperoxid (H₂O₂)</p>	<p>gebrauchsfertig; jeweils einen Objektträger mit 100µl Enzym inkubieren</p>
<p><u>EGFR-Primärantikörper</u> Monoklonaler Maus IgG-AK gegen das humane EGFR-Protein (clone 2-18C9)</p>	<p>gebrauchsfertig; jeweils einen Objektträger mit 100µl Enzym inkubieren</p>
<p><u>Negativkontrollreagenz</u> Monoklonaler Maus-IgG₁</p>	<p>gebrauchsfertig; jeweils einen Objektträger mit 100µl Enzym inkubieren</p>
<p><u>Dextran-Polymer</u> Dextran-Polymer konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase und dem anti-Maus Sekundärantikörper von der Ziege;</p>	<p>gebrauchsfertig; jeweils einen Objektträger mit 100µl Enzym inkubieren</p>
<p><u>DAB+ Substrat-Chromogen-Lösung</u> 1 ml Diaminobenzidin (DAB) + Substratpuffer 1 Tropfen flüssiges DAB+ Chromogen</p>	<p>DAB+Substratpuffer-Lösung in ein Reaktionsgefäß geben, einen Tropfen der DAB+Chromogen-Lösung zugeben und gut vermischen</p>
<p><u>Waschpuffer</u> 1 l Tri-gepufferte-Kochsalzlösung, versetzt mit Polysorbat 20 Aqua bidest</p>	<p>je nach Bedarf konzentrierten Waschpuffer im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidest. in einem Standzylinder anmischen</p>

3 Ergebnisse

3.1 Statistische Testverfahren und graphische Darstellung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms SPSS 15.0TM durchgeführt. Die OTM/MCTM-Werte innerhalb einer Studiengruppe wurden einander gegenübergestellt und mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben geprüft. Der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben diente zum Vergleich der Daten aus der Tumorgruppe mit denen aus der Kontrollgruppe. Auf Grund der Mehrfachtestungen und des daraus entstehenden multiplen Testproblems, wurde für jede Nullhypothese das globale Signifikanzniveau ($p \leq 0,05$) mit der Bonferroni-Holm-Korrektur angepasst und jeweils ein lokales Signifikanzniveau definiert.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung der genetischen Suszeptibilität und der Amplifikation des EGFR-Gens erfolgte durch Boxplots, die mit dem Datenanalyseprogramm SPSS 15.0TM angefertigt wurden. Die obere Begrenzung einer Box ergibt sich durch das 75. Perzentil (75% aller Werte sind kleiner), die untere durch das 25. Perzentil (25% aller Werte sind kleiner). Der Median wird durch die Horizontale Linie in der Box repräsentiert. Der jeweils kleinste und der jeweils größte Wert werden durch die umgekehrte bzw. durch die obere T-Linie (Whisker) visualisiert. Ausreißerwerte, die um mehr als eineinhalb Kastenlängen außerhalb liegen, werden durch einen Kreis [°] markiert. Extremwerte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb der Box liegen, sind durch einen Stern [*] gekennzeichnet.

Die graphische Darstellung der Ergebnisse zur Untersuchung des EGFR-Expressionsverhaltens der beiden Studiengruppen, erfolgte durch Säulendiagramme die mit Hilfe des Programms Microsoft Excel[®] erstellt wurden.

3.2 DNA-Schädigung und Reparatur nach Exposition mit BPDE

Die durch die Exposition mit BPDE entstandenen DNA-Strangbrüche bilden unter alkalischen Bedingungen, wie sie beim Comet Assay/Comet-FISH gegeben sind, DNA-Fragmente. Diese zeigen im elektrischen Feld, je nach molekularem Gewicht, eine unterschiedliche Migrationsstrecke in Richtung der Anode. Die Vielzahl von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und DNA-Abschnitten inkompletter DNA-Nukleotidbasenexcisionsreparatur ergeben ein kometenartiges Migrationsmuster mit weitgehend intakter DNA im

Kopf und fragmentierten DNA-Bestandteilen im Schweif des Kometen.

Dieses Wanderungsverhalten lässt sich durch Anfärben der DNA mit Ethidiumbromid (Comet-Assay) bzw. mit DAPI (Comet-FISH) sichtbar machen. Die Abbildungen 11-13 zeigen Einzelzellen mit unterschiedlichen Migrationsmustern nach Durchführung des Comet-Assay und einer DNA-Färbung mit Ethidiumbromid.

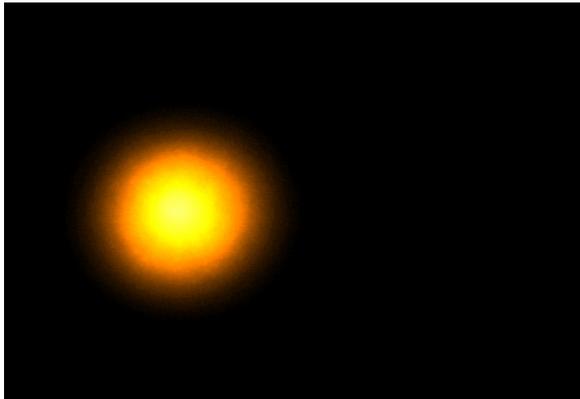


Abb.11: DNA einer ungeschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet-Assay und Färbung mit Ethidiumbromid

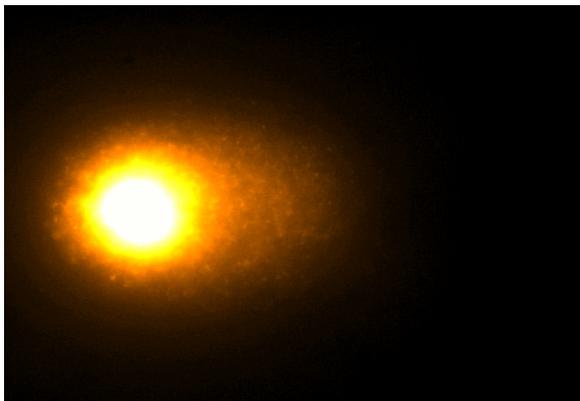


Abb.12: DNA einer mittelgradig geschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet-Assay und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid

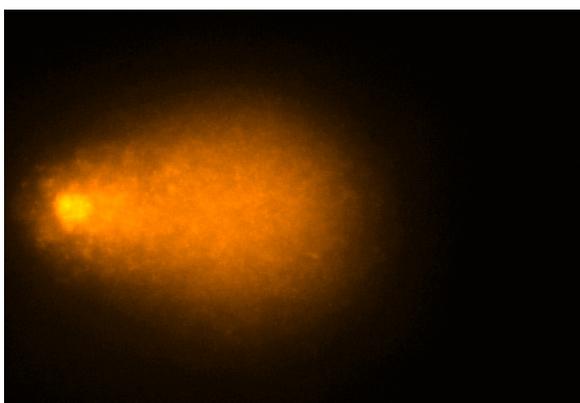


Abb.13: DNA einer hochgradig geschädigten Schleimhautzelle nach Durchführung des Comet-Assay und anschließender Färbung mit Ethidiumbromid

Die Markierung einzelner Gene mit einer spezifischen DNA-Sonde lässt die Beurteilung des Migrationsverhaltens nach dem gleichem Prinzip zu. Jedoch müssen Abstriche in der Intensität der Färbung gemacht werden, da es sich um Fragmente mit weitaus kleinerem Molekulargewicht handelt. Die Abbildungen 14-16 zeigen Schleimhautzellen nach Durchführung des Comet-Fish und einer DNA-Gegenfärbung mit DAPI. Die Gesamt DNA präsentiert sich in der Farbe Blau, das EGFR-Gen stellt sich als rotes Signal dar und das Zentromer von Chromosom 7 leuchtet grün.

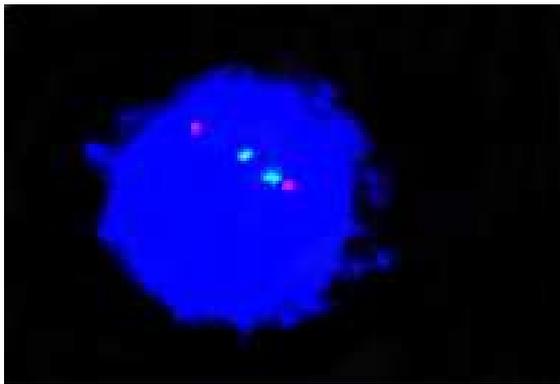


Abb. 14: DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Tumorpatienten nach Inkubation mit DMSO. Nach Durchführung des Comet-Fish und einer DNA-Gegenfärbung mit DAPI weisen weder die Gesamt-DNA (blau) noch das EGFR-Gen (rot) bzw. das Zentromer Chr.7 (grün) eine Schädigung auf.

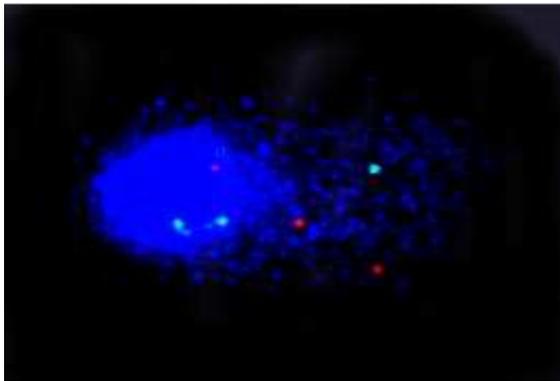


Abb. 15: DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Tumorpatienten nach Inkubation mit BPDE. Sowohl die Gesamt-DNA als auch das EGFR-Gen/ Zentromer Chr. 7 weisen eine Schädigung auf.

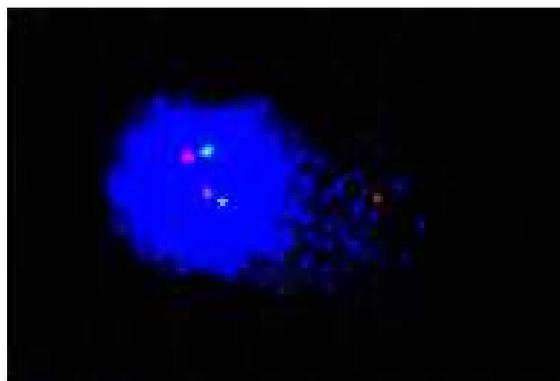


Abb. 16: DNA einer oropharyngealen Schleimhautzelle eines Tumorpatienten nach Inkubation mit BPDE und anschließender 24 h Reparaturphase. Sowohl bei der Gesamt-DNA als auch im EGFR-Gen zeigt sich eine deutliche Reduktion der Schädigung.

In der vorliegenden Arbeit wurden Schleimhautproben von 30 Patienten mit Hilfe von Comet und Comet FISH untersucht. Unter ihnen waren 15 Tumorpatienten (12m; 3w) und 15 tumorfreie Patienten (10m; 5w). Das Alter der Patienten reichte von 28 bis 81 Jahre und lag bei den Tumorpatienten im Mittel bei 61,4 Jahren, bei den Non-Tumorpatienten bei 45,7 Jahren. (s. Anamnesen der Spender siehe 2.1.2)

Schäden der Gesamt-DNA wurden mit dem OTM, genetische Schäden mit dem MCTM beschrieben. Als Negativkontrolle wurden die Miniorgankulturen mit DMSO ($c = 166\text{mM}$) inkubiert und die Schädigung der Gesamt-DNA mit Hilfe der einfachen Mikrogelelektrophorese, die Schädigung im EGFR-Gen/Zentromer Chr.7 einmalig unter Anwendung des Comet-FISH ausgewertet. Erwartungsgemäß kam es zu keiner relevanten genotoxischen DNA-Schädigung durch DMSO ($\text{OTM} < 2$ [Olive et al., 1993]). Für die Fremdstoffexposition wurde BPDE mit einer Konzentration von 9mM gewählt.

3.2.1 DNA-Schädigung und Reparatur in der tumorfreien Kontrollgruppe

3.2.1.1 DNA-Schädigung

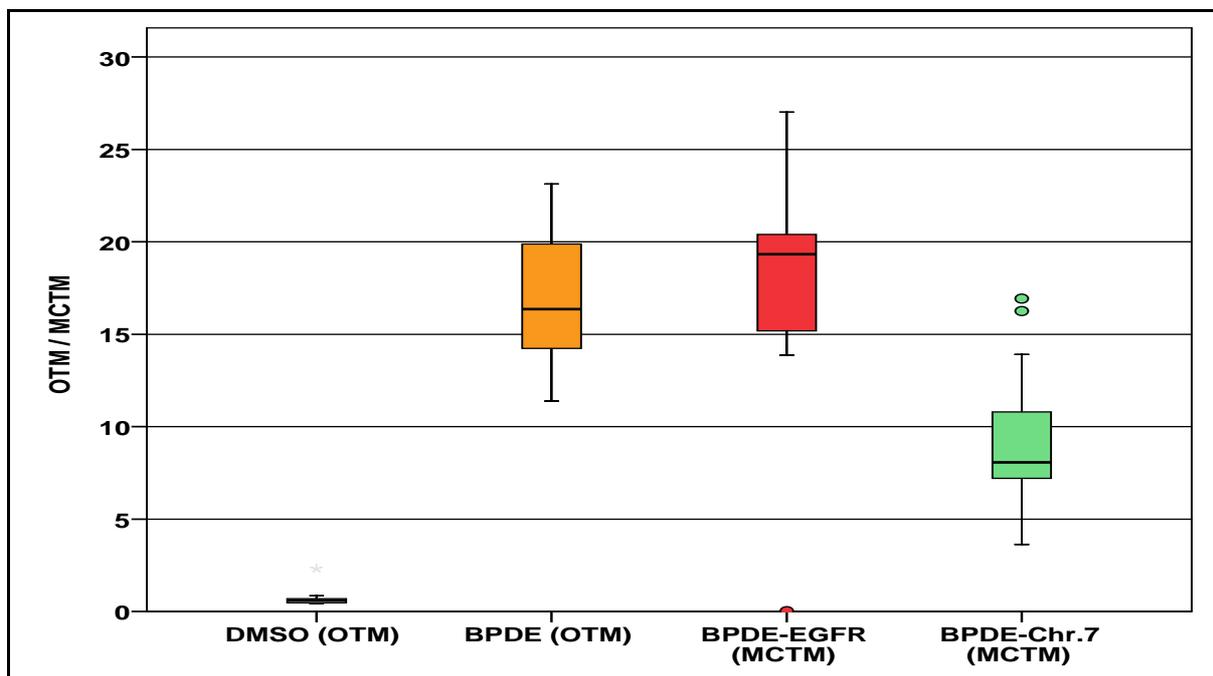


Abb. 17: Ausmaß der DNA-Schädigung bei tumorfreien Patienten ($n=15$). Vergleich der OTM-Werte mit den MCTM-Werten nach Inkubation mit BPDE und Vergleich der OTM- bzw. MCTM-Werte nach BPDE-Inkubation mit der Negativkontrolle DMSO.

BPDE verursachte sowohl in der Gesamt-DNA als auch im EGFR-Gen und im Zentromer von Chromosom 7 signifikant höhere DNA-Schäden als die Negativkontrolle mit DMSO. (vgl. Tab 3 + 4)

Tab. 3: OTM-Mittelwerte nach Inkubation mit BPDE bzw. DMSO (tumorfremie Kontrollgruppe)

Geschädigter DNA-Abschnitt	Schädigendes Agens	Quantifizierungseinheit	OTM/MCTM-Mittelwert
<i>Gesamt-DNA</i>	BPDE	OTM	<i>16,7</i>
<i>EGFR-Gen</i>	BPDE	MCTM	<i>18,9</i>
<i>Zentromer Chr.7</i>	BPDE	MCTM	<i>9,3</i>
<i>Gesamt-DNA</i>	DMSO	OTM	<i>0,7</i>

Tab. 4: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung der tumorfremie Studiengruppe

Non-Ca DMSO vs. Non-Ca BPDE	$p \leq 0,001$
Non-Ca DMSO vs. Non-Ca BPDE-EGFR	$p \leq 0,001$
Non-Ca DMSO vs. Non-Ca BPDE-Chr.7	$p \leq 0,001$
Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,05$ definiert	
<u>Erläuterungen:</u> <p>Non-Ca DMSO = OTM-Mittelwerte der Negativkontrollen mit DMSO bei der tumorfremie Studiengruppe</p> <p>Non-Ca BPDE = OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach Inkubation mit BPDE bei der tumorfremie Studiengruppe</p> <p>Non-Ca BPDE-EGFR = MCTM-Mittelwerte des EGFR-Gens nach Inkubation mit BPDE bei der tumorfremie Studiengruppe</p> <p>Non-Ca BPDE Chr.7 = MCTM-Mittelwerte des Zentromers von Chromosom 7 nach Inkubation mit BPDE bei der tumorfremie Studiengruppe</p>	

Ein signifikanter Unterschied zwischen der Gesamt-DNA-Schädigung und der genetischen Schädigung im EGFR-Gen konnte nicht nachgewiesen werden, wohl aber bei dem Vergleich zwischen der Gesamt-DNA-Schädigung und der des Zentromers von Chromosom 7. Eine statistische Signifikanz bestand auch beim Vergleich der DNA-Schädigung des EGFR-Gens und der des Vergleichschromosoms 7. (vgl.Tab 5)

Tab. 5: P-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich BDPE-Schädigung der Gesamt-DNA zu BPDE-Schädigung im EGFR und Chr.7, sowie Vergleich der Schädigung im EGFR-Gen und im Zentromer von Chr.7

Non-Ca BPDE-EGFR vs. Non-Ca BPDE	$p = 0,307$
Non-Ca BPDE-Chr.7 vs. Non-Ca BPDE	$p \leq 0,001$
Non-Ca BPDE-EGFR vs. Non-Ca BPDE Chr.7	$p \leq 0,001$
Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,05$ definiert	

3.2.1.2 DNA-Reparatur und DNA-Reparaturkapazität

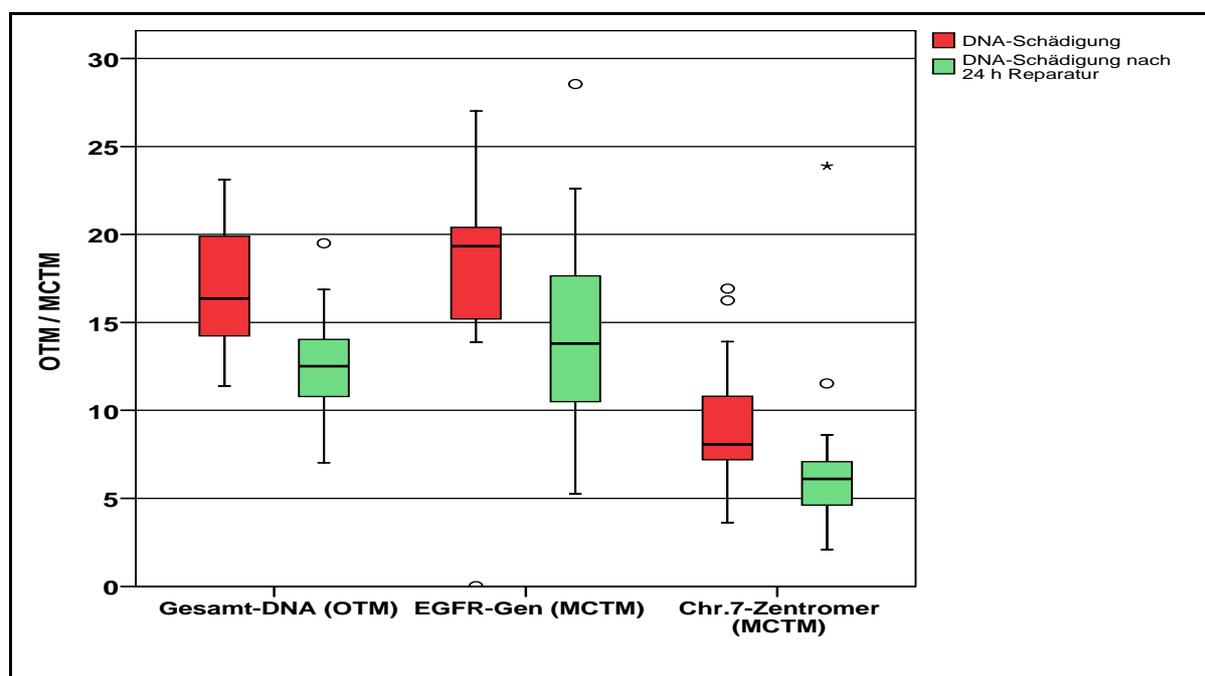


Abb. 18: Ausmaß der 24h DNA-Reparatur der Gesamt-DNA, des EGFR-Gens und des Zentromers von Chr.7 bei tumorfreien Patienten ($n = 15$). Vergleich der OTM-/MCTM-Werte nach BPDE-Inkubation und anschließender 24h Reparatur mit den OTM-/MCTM-Werten nach Inkubation mit BDPE ohne Reparatur

Der OTM-Mittelwert der Gesamt-DNA nach 24-stündiger Reparaturphase lag bei 12,7. Der MCTM für das EGFR-Gen und das Zentromer von Chromosom 7 ergab Mittelwerte von 14,8 (EGFR-Gen) und 7,0 (Zentromer-Chr.7). Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben wurden diese Mittelwerte mit den OTM- bzw. MCTM-Werten der BPDE-Inkubation ohne anschließende Reparaturphase verglichen. Allein die Gesamt-DNA reparierte die induzierten DNA-Schäden mit statistischer Signifikanz. (vgl. Tab 6)

Tab. 6: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der BPDE induzierten DNA/Gen-Schädigung mit und ohne 24h Reparatur (tumorfremie Studiengruppe n = 15)

Non-Ca Reparatur vs. Non-Ca BPDE	$p \leq 0,01$
Non-Ca Reparatur EGFR vs. Non-Ca BPDE EGFR	$p = 0,026$
Non-Ca Reparatur Chr.7 vs. Non-Ca BPDE Chr.7	$p = 0,041$
Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,025$ definiert	
<u>Erläuterungen:</u>	
<p>Non-Ca Reparatur = OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach Inkubation mit BDPE und anschließender 24 h Reparatur bei der tumorfreien Studiengruppe</p> <p>Non-Ca Reparatur EGFR = MCTM-Mittelwerte des EGFR-Gens nach Inkubation mit BDPE und anschließender 24 h Reparatur bei der tumorfreien Studiengruppe</p>	

Die Reparaturkapazität ist die individuelle Fähigkeit DNA-Schäden zu reparieren. Die Quantifizierung erfolgt in Prozent, d.h. der Prozentwert gibt an, wie viel DNA-Schaden in Relation zur Ausgangsschädigung repariert werden konnte. Die Kapazitäten in der tumorfreien Vergleichsgruppe hatten Mittelwerte von 24,0% für die Gesamt-DNA, 21,5% im EGFR-Gen und 25,1% im Zentromer-Chr.7. Im Vergleich der Reparaturkapazität für die Gesamt-DNA mit den Kapazitäten für das EGFR-Gen und das Zentromer-Chromosom7, wie auch bei der Gegenüberstellung der Reparaturfähigkeit des EGFR-Gens mit der des Zentromers 7, ergab sich keine statistische Signifikanz (vgl. Tab7).

Tab. 7: Vergleich der Reparaturkapazitäten der Gesamt-DNA, des EGFR-Gens und des Zentromers 7 (tumorfremie Kontrollgruppe)

Non-Ca RC EGFR vs. Non-Ca RC Gesamt-DNA	$p = 0,691$
Non-Ca RC Chr.7 vs. Non-Ca RC Gesamt-DNA	$p = 0,096$
Non-Ca RC EGFR vs. Non-Ca RC Chr.7	$p = 0,125$
Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,0167$ definiert	
<u>Erläuterungen:</u>	
<p>Non-Ca RC Gesamt-DNA = Mittelwerte DNA-Reparaturkapazität der Gesamt-DNA bei der tumorfreien Studiengruppe</p> <p>Non Ca RC EGFR = DNA-Reparaturkapazität des EGFR-Gens bei der tumorfreien Studiengruppe</p> <p>Non Ca RC Chr.7 = DNA-Reparaturkapazität des Zentromers von Chr.7 bei der tumorfreien Studiengruppe</p>	

3.2.2 DNA-Schädigung und Reparatur in der Karzinomgruppe

3.2.2.1 DNA-Schädigung

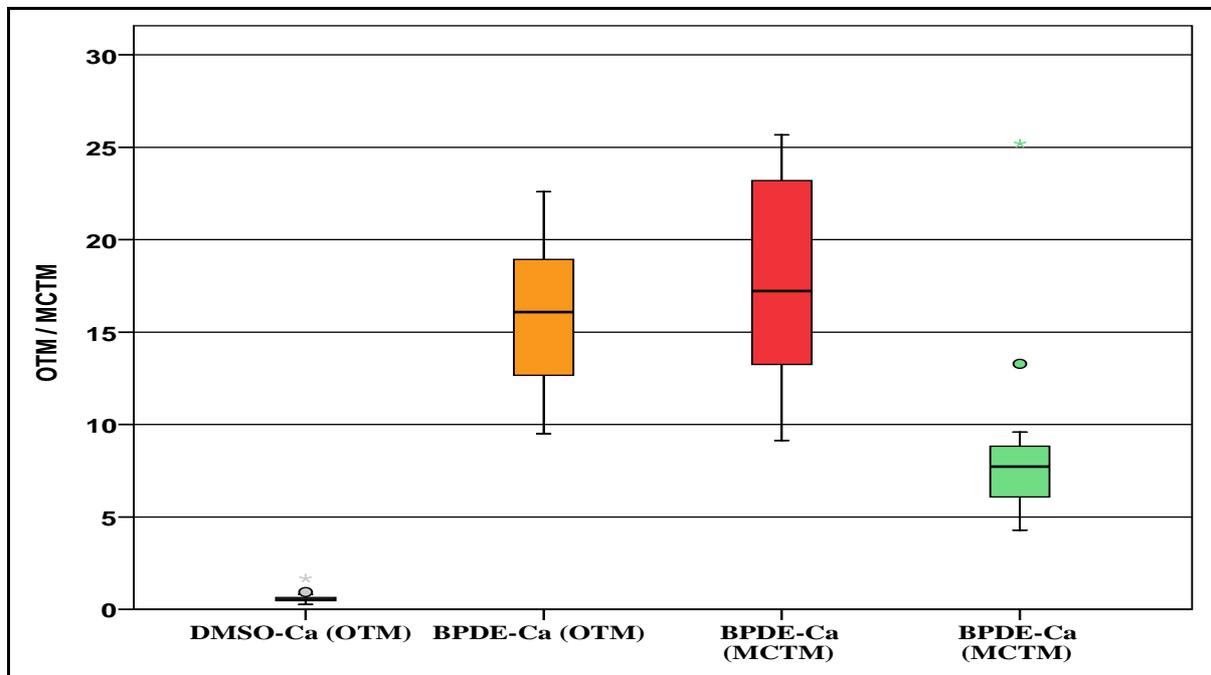


Abb. 19: Ausmaß der DNA-Schädigung bei Karzinompatienten (n=15). Vergleich der OTM-Werte mit den MCTM-Werten nach Inkubation mit BPDE und Vergleich der OTM- bzw. MCTM-Werte nach BPDE-Inkubation mit der Negativkontrolle DMSO.

BPDE verursachte sowohl in der Gesamt-DNA als auch im EGFR-Gen und im Zentromer von Chromosom 7 signifikant höhere DNA-Schäden als die Negativkontrolle mit DMSO (vgl. Tab 8 + 9).

Tab. 8: OTM-Mittelwerte nach Inkubation mit BPDE bzw. DMSO (Karzinomgruppe)

Geschädigter DNA-Abschnitt	Schädigendes Agens	Quantifizierungseinheit	OTM/MCTM-Mittelwert
<i>Gesamt-DNA</i>	BPDE	OTM	15,6
<i>EGFR-Gen</i>	BPDE	MCTM	17,5
<i>Zentromer Chr.7</i>	BPDE	MCTM	8,7
<i>Gesamt-DNA</i>	DMSO	OTM	0,6

Tab. 9: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DMSO- zu BPDE-Schädigung (Karzinomgruppe)

Ca DMSO vs. Ca BPDE	$p \leq 0,001$
Ca DMSO vs. Ca BPDE-EGFR	$p \leq 0,001$
Ca DMSO vs. Ca BPDE-Chr.7	$p \leq 0,001$
Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,05$ definiert	
<u>Erläuterungen:</u> Ca DMSO = OTM-Mittelwerte der Negativkontrollen mit DMSO bei der Karzinomgruppe Ca BPDE = OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach Inkubation mit BDPE bei der Karzinomgruppe Ca BPDE-EGFR = MCTM-Mittelwerte des EGFR-Gens nach Inkubation mit BDPE bei der Karzinomgruppe Ca BPDE Chr.7 = MCTM-Mittelwerte des Zentromers von Chromosom 7 nach Inkubation mit BDPE bei der Karzinomgruppe	

Der Vergleich zwischen der BPDE-Schädigung der Gesamt-DNA und der Schädigung im EGFR-Gen ergab keinen statistisch signifikanten Unterschied. Signifikante Ergebnisse ergab jedoch die Gegenüberstellung der OTM-Mittelwerte der Schädigung der Gesamt-DNA mit den MCTM-Mittelwerten des Zentromers von Chromosom 7. Auch der Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben mit den MCTM-Mittelwerten des EGFR-Gens und den Werten der Schädigung des Zentromers 7 ergab eine statistische Signifikanz (vgl. Tab 10).

Tab. 10: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich BDPE-Schädigung der Gesamt-DNA zu BPDE-Schädigung im EGFR und Chr.7 sowie Vergleich zwischen der Schädigung im EGFR-Gen und im Zentromer von Chr.7 (Karzinomgruppe)

Ca BPDE-EGFR vs. Ca BPDE	$p = 0,140$
Ca BPDE-Chr.7 vs. Ca BPDE	$p \leq 0,001$
BPDE-EGFR vs. Ca BPDE Chr.7	$p \leq 0,001$
Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,05$ definiert	

3.2.2.2 DNA-Reparatur und DNA-Reparaturkapazität

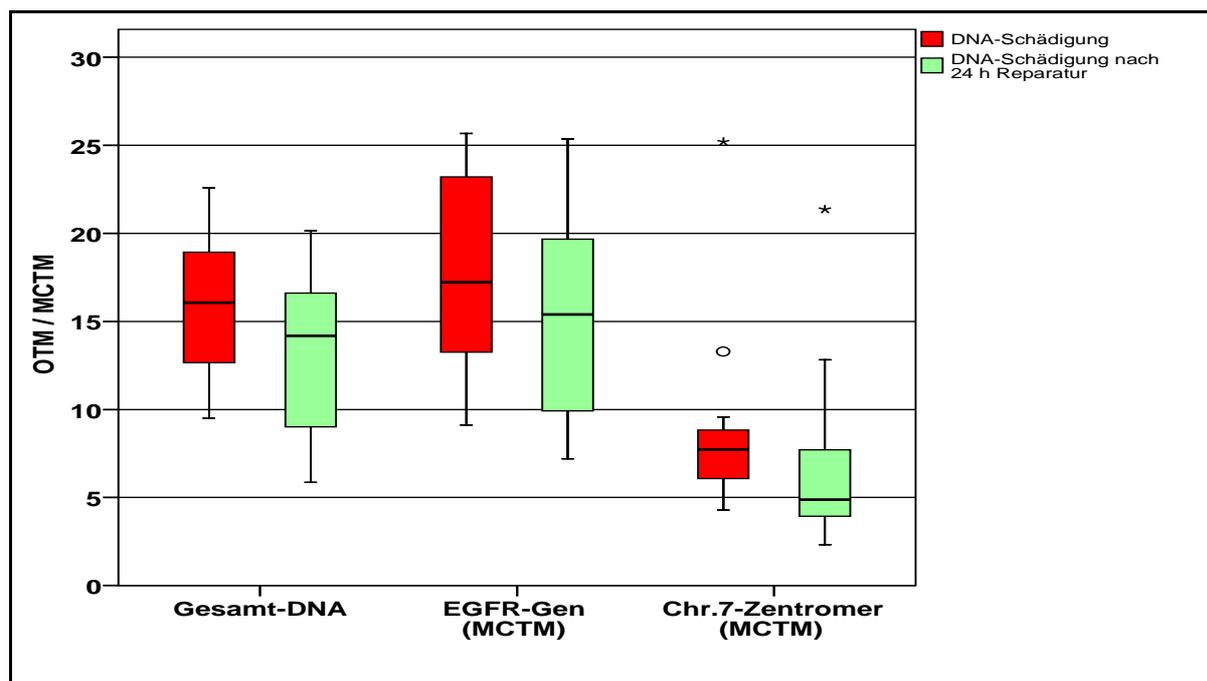


Abb. 20: Ausmaß der 24h DNA-Reparatur der Gesamt-DNA, des EGFR-Gens und des Zentromers von Chr.7 bei Karzinompatienten (n = 15). Vergleich der OTM-/MCTM-Werte nach BPDE-Inkubation und anschließender 24h Reparatur mit den OTM-/MCTM-Werten nach Inkubation mit BPDE ohne Reparatur

Der OTM-Mittelwert der Gesamt-DNA nach 24-stündiger Reparaturphase lag bei 13,0. Der MCTM für das EGFR-Gen und das Zentromer von Chromosom 7 ergab Mittelwerte von 15,2 (EGFR-Gen) und 6,7 (Zentromer-Chr.7). Mittels Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben wurden diese Mittelwerte mit den OTM- bzw. MCTM-Werten der BPDE-Inkubation ohne anschließende Reparaturphase verglichen (vgl. Tab. 8). Nur die Gesamt-DNA, nicht aber das EGFR-Gen und das Zentromer von Chromosom 7, reparierte die induzierten DNA-Schäden mit statistischer Signifikanz. (vgl. Tab. 11)

Tab.11: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich DNA/Gen-Schädigung mit und ohne 24h Reparatur bei der Karzinomgruppe

Ca Reparatur vs. Ca BPDE	$p \leq 0,001$
Ca Reparatur EGFR vs. Ca BPDE EGFR	$p = 0,026$
Ca Reparatur Chr.7 vs. Ca BPDE Chr.7	$p = 0,041$
Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,025$ definiert	

Erläuterungen:

Ca Reparatur = OTM-Mittelwerte der Gesamt-DNA nach Inkubation mit BDPE und anschließender 24 h Reparatur bei der Karzinomgruppe

Ca Reparatur EGFR = MCTM-Mittelwerte des EGFR-Gens nach Inkubation mit BDPE und anschließender 24 h Reparatur bei der Karzinomgruppe

Die DNA-Reparaturkapazitäten in der Studiengruppe mit Karzinompatienten hatten Mittelwerte von 17,1% für die Gesamt-DNA, 13,3% im EGFR-Gen und 23,7% im Zentromer-Chr.7. Im Vergleich der Reparaturkapazitäten für die Gesamt-DNA mit den Kapazitäten für das EGFR-Gen und das Zentromer-Chromosom7 zeigte sich keine statistische Signifikanz. Auch die Durchführung des Wilcoxon-Tests mit der Reparaturfähigkeit des EGFR-Gens und mit der Kapazität des Zentromers 7 ergab keine statistisch signifikant geringere Reparaturkapazität für das Gen des EGFR (vgl. Tab 12).

Tab. 12: Vergleich der Reparaturkapazitäten der Gesamt-DNA, des EGFR-Gens und des Zentromers 7 (Karzinomgruppe)

Ca RC EGFR vs. Ca RC Gesamt-DNA	p = 0,221
Ca RC Chr.7 vs. Ca RC Gesamt-DNA	p = 0,158
Ca RC EGFR vs. Ca RC Chr.7	p = 0,046

Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,0167$ definiert

Erläuterungen:

Ca RC Gesamt-DNA = Mittelwerte DNA-Reparaturkapazität der Gesamt-DNA bei der Karzinomgruppe

Ca RC EGFR = DNA-Reparaturkapazität des EGFR-Gens bei der Karzinomgruppe

Ca RC Chr.7 = DNA-Reparaturkapazität des Zentromers von Chr.7 bei der Karzinomgruppe

3.2.3 Vergleich der Karzinomgruppe mit der tumorfreien Kontrollgruppe in Bezug auf DNA-Schädigung und Reparaturverhalten

3.2.3.1 Vergleich der DNA-Schädigung zwischen Karzinomgruppe und Kontrollgruppe

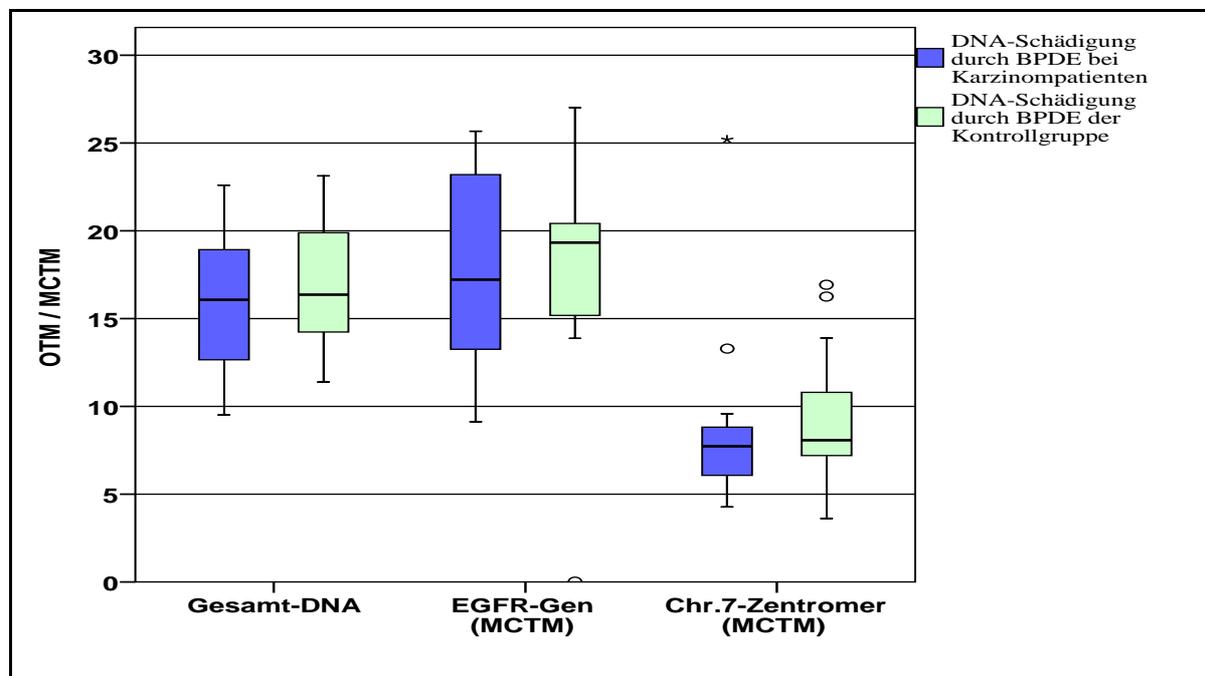


Abb. 21: Ausmaß der BPDE induzierten DNA-Schädigung bei Tumorpatienten (n = 15) und tumorfreien Patienten (n = 15).

Die Durchführung des Mann-Whitney U-Tests für verbundene Stichproben ergab weder in der Schädigung der Gesamt-DNA, noch in der genetischen Schädigung des EGFRs bzw. des Zentromers von Chromosom 7 statistisch signifikante Unterschiede zwischen der Karzinomgruppe und der tumorfreien Kontrollgruppe (vgl. Tab 13).

Tab. 13: p-Werte im Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der BPDE-Schädigungen der Gesamt-DNA, des EGFR-Gens und des Zentromers von Chromosom 7 in der Karzinomgruppe mit den Schädigungen in der tumorfreien Kontrollgruppe

Ca BPDE vs. Non-Ca BPDE	p = 0,389
Ca BPDE-EGFR vs. Non-Ca BPDE-EGFR	p = 0,595
Ca BPDE-Chr.7 vs. Non-Ca BPDE-Chr.7	p = 0,461
Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,0167$ definiert	

3.2.3.2 Vergleich der DNA-Reparaturen zwischen Karzinomgruppe und Kontrollgruppe

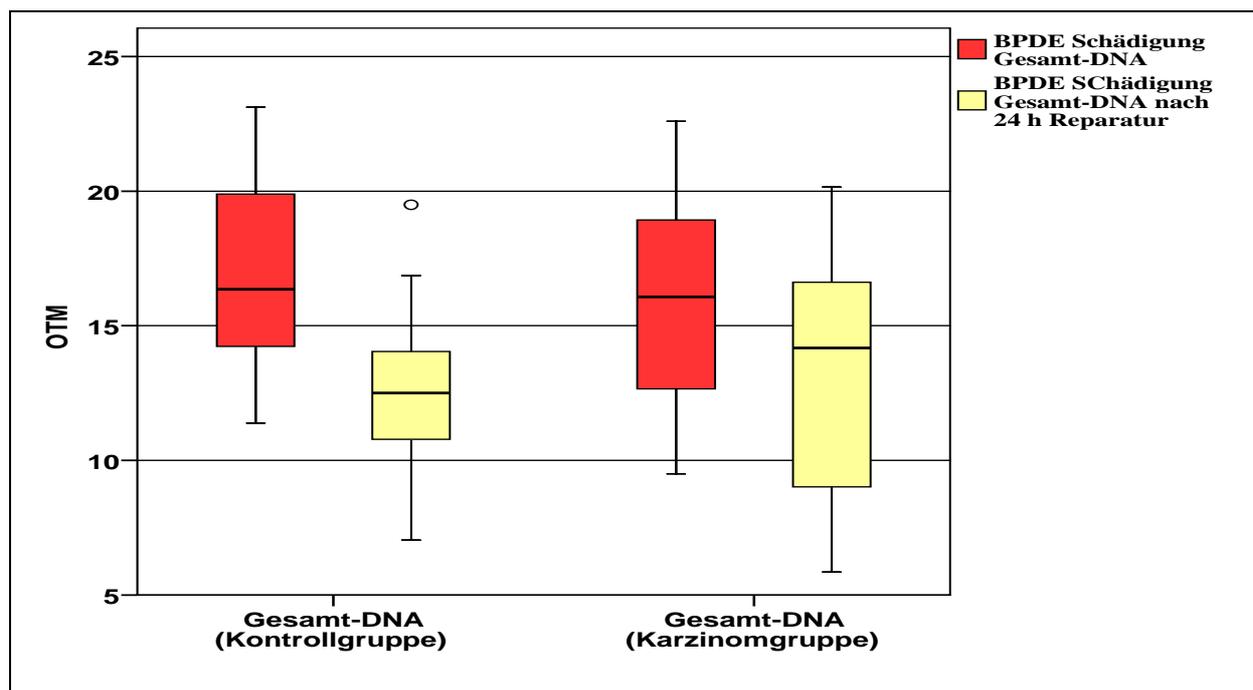


Abb.22: Vergleich des Reparaturverhaltens der Gesamt-DNA zwischen den Karzinompatienten und den tumorfreien Patienten

Bei der Gesamt-DNA konnte im Hinblick auf die DNA-Reparaturkapazitäten kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Karzinomgruppe und der Kontrollgruppe gefunden werden (vgl. Tab 14).

Tab. 14: p-Werte im Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der Reparaturkapazitäten der Gesamt-DNA in der Karzinomgruppe mit den Reparaturkapazitäten in der tumorfreien Kontrollgruppe

RC Non-Ca Gesamt-DNA vs. RC Ca Gesamt-DNA	p = 0,436
Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ definiert	

Sowohl für das EGFR-Gen, als auch für das Zentromer von Chromosom 7 konnte beim Vergleich der beiden Studiengruppen kein signifikanter Unterschied der jeweiligen DNA-Reparaturkapazitäten festgestellt werden (vgl. Abb. 23 u. Tab. 15).

Tab. 15: p-Werte im Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der Reparaturkapazitäten der Gesamt-DNA in der Karzinomgruppe mit den Reparaturkapazitäten in der tumorfreien Kontrollgruppe

RC EGFR Non-Ca vs. RC EGFR Ca	p = 0,285
RC Chr.7 Non-Ca vs. RC Chr.7 Ca	p = 0,806
Das lokale Signifikanzniveau nach Bonferroni-Holm-Korrektur wurde mit $p \leq 0,025$ definiert	

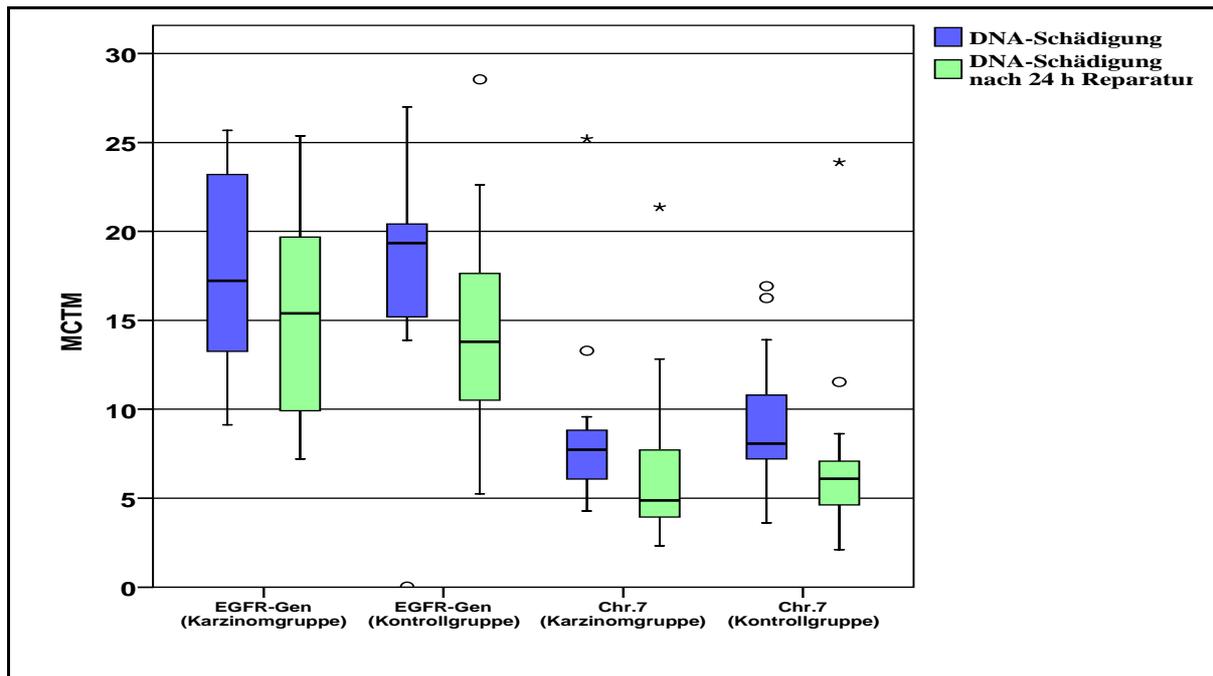


Abb.23: Vergleich der DNA-Reparaturen im EGFR-Gen bzw. Chr.7 zwischen Karzinomgruppe und tumorfreier Kontrollgruppe

3.3 Untersuchung zur Amplifikation des EGFR-Gens an makroskopisch gesunder Schleimhaut von Tumorpatienten

Für den Nachweis bzw. den Ausschluss einer Amplifikation des EGFR-Gens wurden die mikroskopischen Schnittpräparate deparaffinisiert und die Zellmembranpermeabilität für die DNA-Präparation optimiert. Anschließend wurde die Fluoreszenz in situ Hybridisierung mit einer speziellen DNA-Sonde für das EGFR-Gen durchgeführt. Die restliche DNA wurde mit DAPI gegengefärbt.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop entstand somit das Bild eines Zellverbandes, bei dem sich das Gen des EGFR als rotes Signal, das zum Vergleich dienende Zentromer von Chromosom 7 als grünes Signal darstellt (vgl. Abb. 24).

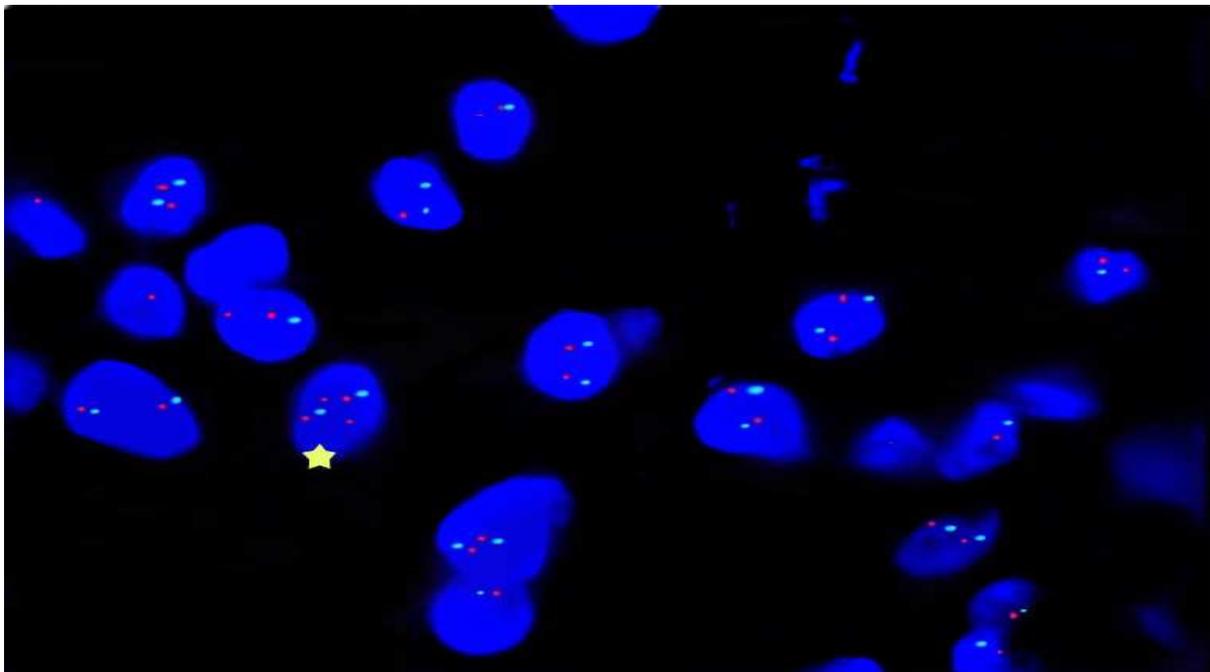


Abb.24: Oropharyngeale Schleimhautschnitte eines Tumorpatienten nach Durchführung des Interphase-FISH. Der gelbe Stern markiert eine Zelle mit einer Amplifikation im EGFR-Gen (EGFR-Gen/Zentromer Chr.7 Ratio ≥ 2). Die übrigen Zellen weisen kein Amplifikationsmuster auf (EGFR-Signale = 2, Chr.7-Signale = 2 bzw. EGFR/Chr7 Ratio < 2).

Für die Evaluierung einer eventuellen Gen-Amplifikation wurden von jedem Patienten 20 Zellen und deren Signale für das EGFR-Gen und das Zentromer von Chromosom 7 ausgezählt. Anschließend wurde die Gen/Zentromer-Ratio für jeden Patienten berechnet. Als Einschlusskriterium für eine Amplifikation wurde eine Ratio von ≥ 2 festgelegt. Die gebildeten Verhältnisse beider Studiengruppen wurden mit dem Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben verglichen und bzgl. statistischer Signifikanz geprüft.

Ausgewertet wurden insgesamt 26 von 30 Studienpatienten. Bei 4 Patienten verhinderten schwache Gen-Signale eine zuverlässige Interpretation.

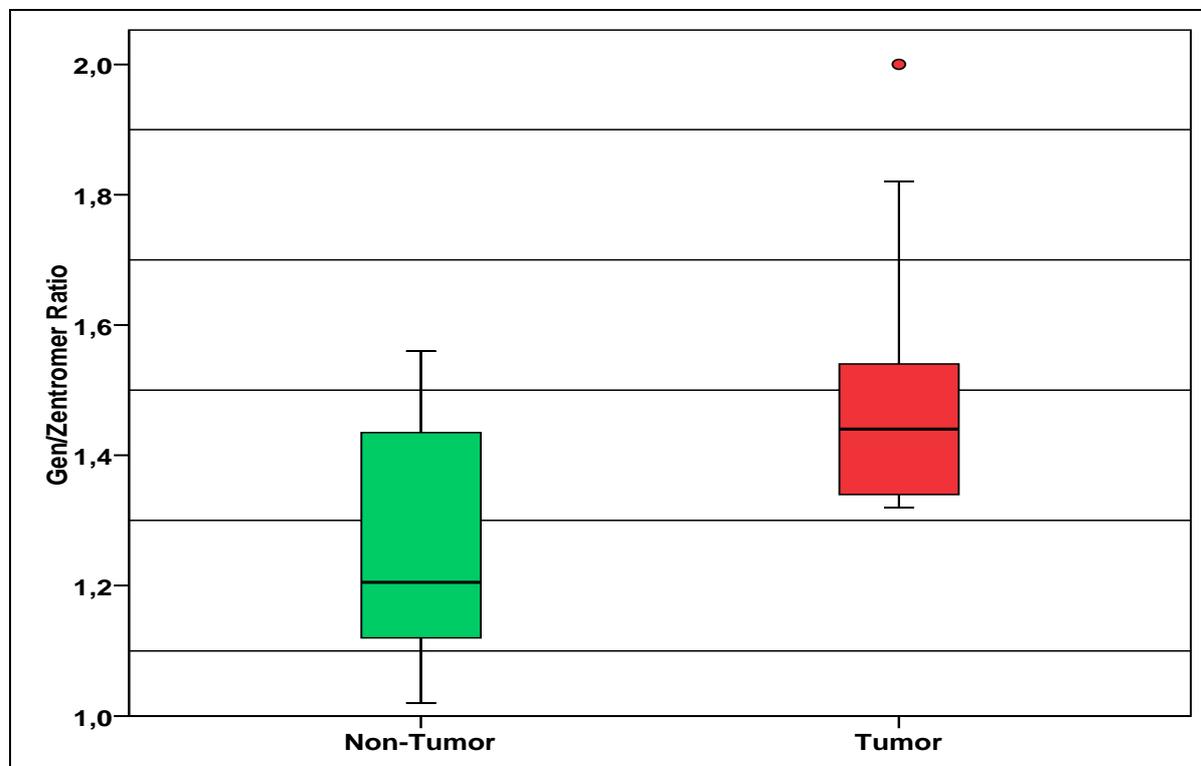


Abb.25 : EGFR-Gen/Zentromer CHR.7 Ratio bei tumorfreien Kontroll- (n = 13) bzw. der Karzinomgruppe (n = 13)

Der Mittelwert der Gen/Zentromer Ratio lag in der tumorfreien Kontrollgruppe bei 1,26, in der Gruppe mit Karzinompatienten bei 1,5. Die Gegenüberstellung beider Ratio's ergab statistisch signifikant höhere Werte für die Tumorgruppe (vgl. Tab 16). Der Anteil von Patienten mit einer Amplifikation im EGFR-Gen lag in der Kontrollgruppe bei 0%. Dagegen war eine Amplifikation bei 7,7% der Karzinompatienten zu finden.

Tab. 16: p-Werte im Mann-Whitney-U-Test für den Vergleich der Gen/Zentromer Ratio's in der Tumorgruppe mit denen der tumorfreien Kontrollgruppe

Ratio Non-Ca vs. Ratio Ca	p = 0,012
Das Signifikanzniveau wurde mit $p \leq 0,05$ definiert	

3.4 Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung zur EGFR-Expression

In der vorliegenden Arbeit wurden Feinschnittpräparate von 30 Patienten (makroskopisch gesunde Schleimhaut von Tumorpatienten n = 15; Schleimhaut tumorfreier Patienten n = 15) der immunhistochemischen Untersuchung zur EGFR-Expression unterzogen. Nach vorausgegangener Deparffinisierung der Objektträger und der Freilegung der Antigenbindestellen durch Spaltung von formalinbedingten Aldehydquervernetzungen, wurde die endogene Peroxidaseaktivität der Schleimhautproben durch Zugabe von Wasserstoffperoxid geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Die Darstellung der Antigene geschah indirekt über die Zugabe eines gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörpers, der bei der Polymer-Methode mit einem Dextran-Polymer bestückt ist. Dieses Polymer war wiederum mit Peroxidase beladen. Nach Zugabe von Wasserstoffperoxid reagierten die aus der Substrat-Peroxidase-Reaktion entstandenen Protonen mit dem Chromogen DAB, was zu einem bräunlichen Niederschlag an der Bindungsstelle des primären Antikörpers führte. Je höher die EGFR-Expression war, desto intensiver stellte sich eine bräunliche Färbung des Gewebes ein.

Als Maß für die EGFR-Expression wurde unter Anlehnung an das EGFR pharmDx™ Interpretationsmanual eine semiquantitative Einstufung in vier Expressionsgrade vorgenommen:

- Grad 0 = **keine** oder unspezifische Anfärbung / Expression des EGFR's
- Grad +1 = **schwache** Anfärbung / Expression des EGFR's
- Grad +2 = **mittelmäßige** Anfärbung / Expression des EGFR's
- Grad +3 = **starke Anfärbung** / Expression des EGFR's

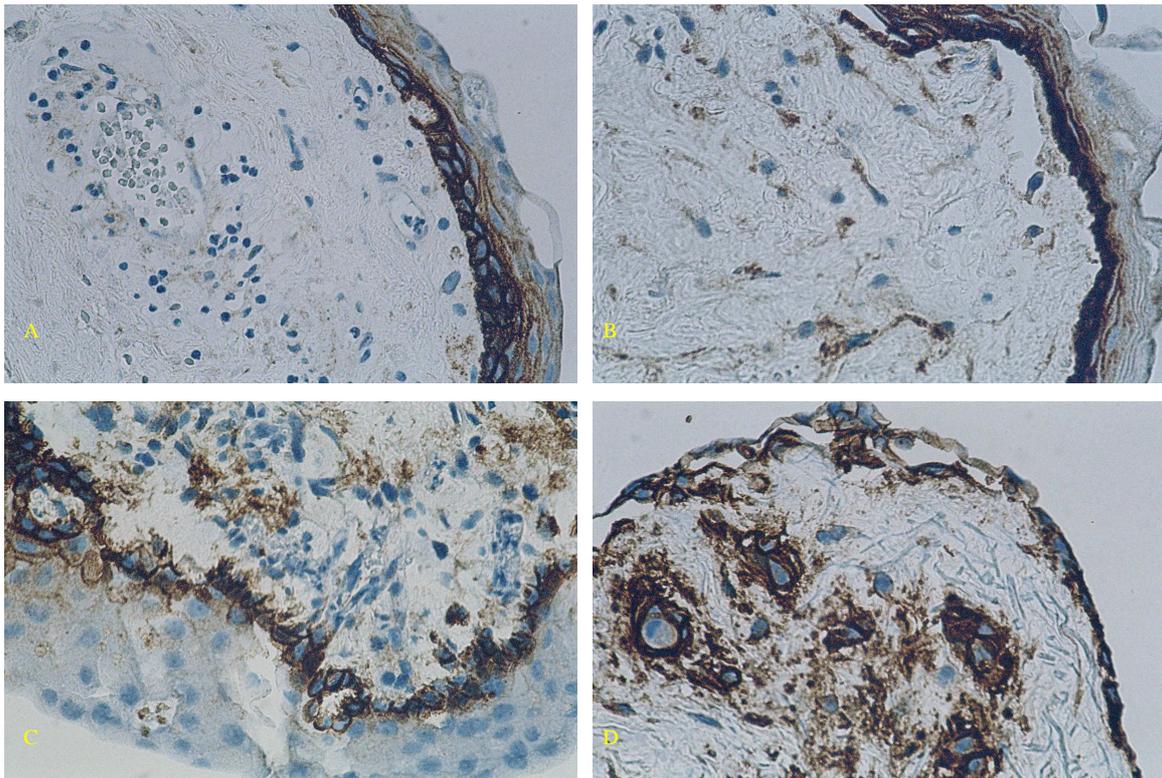


Abb. 26: Feinschnitte von Miniorgankulturen nach immunohistochemischer Färbung und semiquantitative Einstufung der EGFR-Expression.

Die Bilder A bis D zeigen mikroskopische Bilder von Feinschnittpräparaten oropharyngealer Schleimhaut, nach Durchführung der immunohistochemischen Färbung mit dem EGFR pharm Dx™. Mukosazellen stellen sich durch eine Hämatoxylingegegenfärbung blau dar. Der EGFR lässt sich durch die Protonen-Chromogenreaktion als brauner Niederschlag erkennen. Dem Interpretationsmanual zufolge und nach eigener Erfahrung färbt sich die Basalmembran des Oropharynxepithels unabhängig vom individuellen Expressionsgrad regelmäßig mit einer dem Grad +3 zu vergleichenden Intensität an. Bild A zeigt den Feinschnitt einer Miniorgankultur aus Tonsillenschleimhaut eines tumorfreien Patienten mit dem EGFR-Expressionsgrad 0. Auf Bild B erkennt man Mukosa eines tumorfreien Patienten mit einem schwach exprimierten Rezeptor (Grad +1). Ein Beispiel für eine mittlere Expression vom Grad +2 zeigt Bild C, mit einem Feinschnitt eines Patienten mit Oropharynxkarzinom. Bild D veranschaulicht eine starke Expression mit intensiver Braunfärbung nahezu jeder Zelle.

Der Vergleich der EGFR-Expressionsgrade von tumorfreien Patienten und Tumorpatienten ergab folgendes Bild:

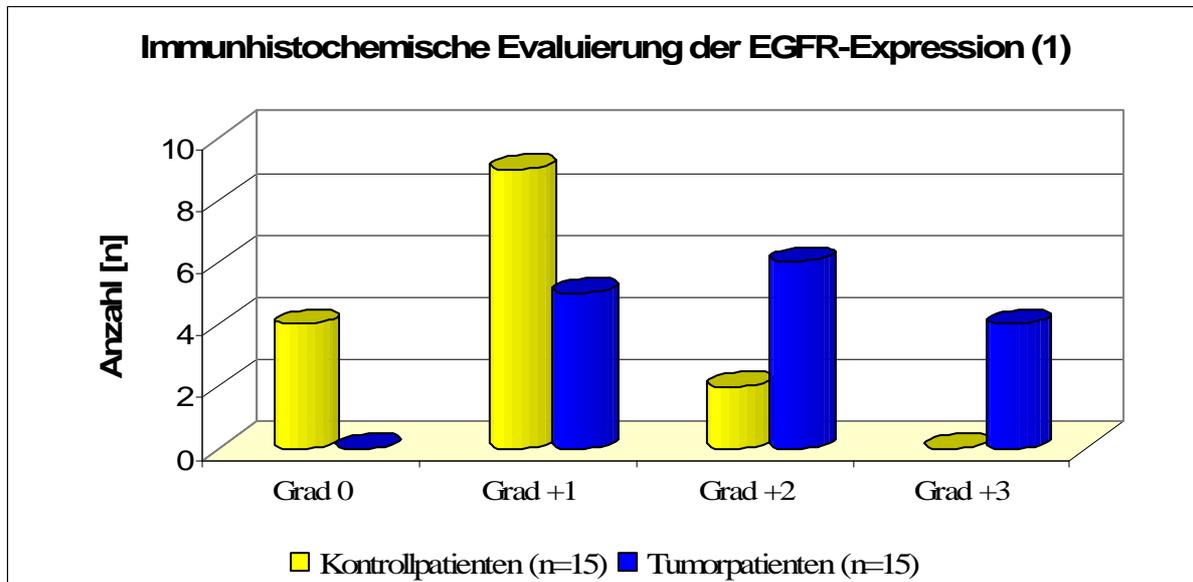


Abb.27: Semiquantitative Darstellung der EGFR-Expression in makroskopisch gesunder Oropharynxschleimhaut von Tumorpatienten und tumorfreien Patienten

In der tumorfreien Kontrollgruppe zeigten 4 Patienten keine (Grad = 0), 9 Patienten eine schwache Expression des EGFR (Grad = +1). 2 Patienten wiesen eine mittelgradige Expression auf (Grad = +2) und bei keinem der Kontrollpatienten konnte eine Rezeptorpräsenz im Sinne eines Expressionsgrades +3 gefunden werden (vgl. Abb. 30 + Tab 17).

Tab. 17: EGFR-Expression in Schleimhaut tumorfreier Patienten (n = 15)

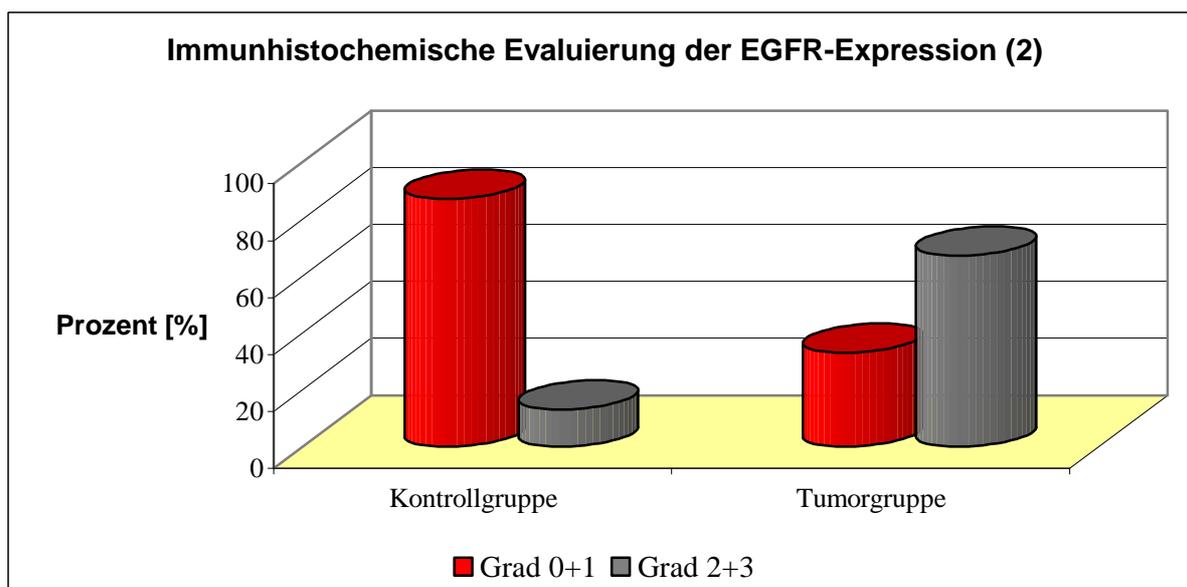
	n	%
EGFR- Expressionslevel		
Grad 0	4	26,6
Grad +1	9	60,0
Grad +2	2	13,3
Grad +3	0	0

In der Studiengruppe mit Karzinompatienten zeigten 0 Patienten keine Expression (Grad = 0) und lediglich 5 Patienten hatten eine schwache Expression (Grad = +1). 6 Patienten konnte eine mittelmäßige (Grad = +2) und 4 Patienten eine starke Expression des EGFR zugeschrieben werden (vgl. Abb. 30 + Tab 18).

Tab. 18: EGFR-Expression in makroskopisch gesunder Oropharynxschleimhaut von Tumorpatienten (n = 15)

	n	%
EGFR-Expressionslevel		
Grad 0	0	0
Grad +1	5	33,3
Grad +2	6	40
Grad +3	4	26,6

Die Patienten mit Expressionsgrad 0 und +1 wurden in jeder der beiden Gruppen als niedrig- bis normalexprimierte Patienten und diejenigen mit den Graden +2 und +3 als hochexprimierte Patienten zusammengefasst und der prozentuale Anteil dieser beiden Untergruppen zwischen den beiden Studienkollektiven verglichen (vgl. Abb. 28)

**Abb 28:** Prozentualer Anteil niedrig- und hochexprimierter Patienten in der tumorfreien Kontrollgruppe und in der Karzinomgruppe

In der tumorfreien Kontrollgruppe hatten 86,6 % der Patienten einen Expressionsgrad 0 oder +1, in der Karzinomgruppe waren dies lediglich 33%, wobei dieser Anteil allein auf den Expressionsgrad +1 abfiel. 66,6% der Karzinompatienten wiesen eine erhöhte Expression (Grad +2 o. +3) des EGFR auf. Dies war bei nur 13% der tumorfreien Patienten der Fall (vgl. Abb. 28).

4 Diskussion

4.1 Patienten

4.1.1 Auswahl der Patienten

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Gewebeproben wurden von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München gespendet. Zur Vermeidung koexistenzieller Einflussfaktoren auf die Untersuchungsergebnisse wurde nur das Gewebe von Patienten verwendet, die neben der zur Operation indizierten Grunderkrankung unter keinen weiteren chronischen Infektions- bzw. Systemerkrankungen litten.

4.1.2 Patienten als Spender oropharyngealer Schleimhaut

Die oropharyngealen Schleimhautzellen tumorfreier Patienten konnten aus schmalen Gewebestreifen gewonnen werden, die nach Tonsillektomien dem Operationsgebiet randständig anliegen. Diese operativen Entfernungen der Gaumenmandeln erfolgten zum einen auf Grund chronisch rezidivierender Infektionen, sodass eine entzündungsbedingte Veränderung des Spendergewebes nicht vollkommen ausgeschlossen werden konnte. Jedoch derartige Eingriffe in einem möglichst infektfreien Intervall durchgeführt. Eine weitere medizinische Indikation zur Operation wurde im Zusammenhang mit Hyperplasien der Tonsillen bei obstruktiven Schlafstörungen gestellt.

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

4.2 DNA-Schäden durch Benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid

Eine Kontamination des Menschen mit polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen erfolgt häufig über Inhalation von Zigarettenrauch, wobei die partikuläre Phase und nicht die reine Gasphase des Tabakrauches tumorinduzierend wirkt [Dontenville M., 1974; Hoffmann et al., 1983]. Eine weitere Möglichkeit der aerogenen Aufnahme ist die Inhalation von PAH, die in der Luft an Feinstaubpartikel gebunden sind und hauptsächlich bei Verbrennungsprozessen fossiler Energieträger entstehen. Andererseits können diese in der Luft vorkommenden PAHs auf den Boden absinken und damit das Erdreich, das Trinkwasser und letztendlich Futter- und Lebensmittel belasten, was zu einer Kontamination des Menschen via Ingestion führen kann [Shabad LM, 1967].

Sowohl bei der inhalativen als auch bei der ingestiven Aufnahme in den menschlichen Körper ist die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes das erste Kontaktorgan für die Karzinogenese. Durch ihr ubiquitäres Vorkommen in der Luft und im Tabakrauch gehören die PAH zu den bedeutendsten Karzinogenen für den Menschen [Akin et al., 1976; Hoffmann et al., 1983; De Marini, 2004].

Als Leitsubstanz der PAH mit der höchsten biologischen Aktivität gilt das Benzo[a]pyren (BaP), das jüngst zum Gruppe 1- Karzinogen hochgestuft wurde und somit als sicheres humanes Karzinogen gilt [IARC Monograph Vol.92, 2007]. BaP wird im Organismus in der Phase 1 der Biotransformation über Cytochrom-P450 abhängige Reaktionen an verschiedenen Positionen epoxidiert und durch mikrosomal gebundene Epoxidhydroxylasen zu Dihydrodiolen hydrolysiert. Befindet sich ein Dihydrodiol an einem terminalen Benzo-Ring, kann das Intermediat durch weitere Cytochrom P450-abhängige Epoxidierungen zum Dihydrodirolepoxid umgesetzt werden. Bei dieser Reaktion handelt es sich um den pathobiologisch relevantesten Vorgang, da das hieraus entstehende (+)-anti-Benz[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE) den Metabolit des BaP mit der höchsten genotoxischen Aktivität darstellt.

Durch kovalente Bindung des BPDE mit verschiedenen DNA-Basen, vor allem aber mit 2'-Desoxyguanin, entsteht das stabile DNA-Addukt (+)anti-B[*a*]P-diol-epoxid-trans-dGuanosin [Luch A., 2005;]. Durch eine inkomplette oder fehlende Nukleotidexzisionsreparatur kann es nun in der nächsten Replikationsphase der DNA zu Einzelstrangbrüchen oder durch einen Fehleinbau von Nukleobasen zu einer Punktmutation kommen. Diese können, wenn sie in bestimmten Sequenzen der DNA vorkommen, Tumorsuppressorgene deaktivieren oder Protoonkogene aktivieren und so maßgeblich zur Malignomenstehung beitragen [Liang et al., 2003; Denissenko et al., 1996].

In zahlreichen epidemiologischen Studien konnte ein Zusammenhang zwischen dem Verzehr von gegrillten bzw. geräucherten und somit PAH-haltigen Speisen und der Entstehung von Karzinomen des Pankreas und des Magen-Darm-Traktes festgestellt werden [Fritz und Soos, 1980; Li et al., 2007]. Ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Malignomen durch Inhalation von BaP wies die Arbeitsgruppe um Ketkar et al. 1978 an Hamstern nach [Ketkar et al., 1978]. Auch die ingestive Aufnahme von BPDE verursachte bei Mäusen ein erhöhtes Risiko für die Krebsentstehung [Culp und Beland, 1994].

An humanen Lymphozyten konnte eine Assoziation von BPDE mit einer Erhöhung des Lungenkrebsrisikos beschrieben werden [Wie et al., 1996]. Hanelt et al. konnten bei Untersuchungen an humanen Fibroblasten zeigen, dass BPDE nach Kurzzeitbehandlung DNA-Addukte und Einzelstrangbrüche hervorruft. Hier führte BPDE zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der DNA-Migration im Comet Assay [Hanelt et al., 1997]. Auch an humanen Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut konnten nach Inkubation mit BPDE signifikante DNA-Schäden beobachtet werden [Wallner et al., 2005].

4.3 Diskussion der Methodik

4.3.1 Comet FISH

Die Grundlage für die Transformation einer gesunden Zelle in eine maligne Tumorzelle ist die Akkumulation einer Mehrzahl von Alterationen im genetischen Material. Dieser Prozess wird auch als "multistep" Karzinogenese bezeichnet [Califano et al., 1996]. Gesunde Zellen profitieren von einem ausgewogenen Verhältnis von Protoonkogenen und Tumorsuppressorgenen, die die Zellfunktionen, wie Proliferation, Apoptose, genetische Stabilität, Angiogenese, Invasion und Metastasierung positiv (Protoonkogene) bzw. negativ (Tumorsuppressorgene) beeinflussen [Hanahan und Weinberg, 2000]. Die Akkumulation genetischer Alterationen, die eine Aktivierung von Onkogenen oder einen Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen bewirken, sind somit der Grundstein der Karzinomentstehung.

Onkogene können durch Bildung von DNA-Addukten, chromosomalen Transformationen oder Inversion aktiviert werden [Copper et al., 1995]. Im Gegensatz dazu erfolgt die Deaktivierung der Tumorsuppressorgene durch DNA-Reduzierung, beispielsweise einen Allelverlust.

Die Lokalisierung solcher Veränderungen erfordert Techniken, die den Nachweis genetischer bzw. chromosomaler Alterationen ermöglicht. Basierend hierauf wurde der Comet Assay mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) kombiniert, um das Schädigungs- und DNA-

Reparaturverhalten des EGFR-Onkogens an humanen Schleimhautzellen zu untersuchen.

In der Vergangenheit konnte die kombinierte Methode des Comet-FISH an Lymphozyten für die Markierung von p53 eingesetzt werden [McKelvey-Martin et al. 1998]. Menke et al. konnten an Pflanzenzellen mit der Methodenkombination den Stellenwert verschiedener chromosomaler Domänen bei der Induktion von DNA-Strangbrüchen durch mutagene Substanzen nachweisen [Menke et al., 2000]. Im Zusammenhang mit der Genese von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes wurde an humanen Schleimhautzellen die Mutagensensitivität der Chromosomen 1,3,5 und 8 durch den Comet-Fish evaluiert [Harréus et al., 2004]. Des Weiteren wurde die Methodik angewandt um oxidativen Stress für relevante Gene des Kolonkarzinoms zu untersuchen [Glei et al., 2007]. Die Arbeitsgruppe um Escobar konnte einen schädigenden Effekt verschiedener Chemotherapeutika auf spezifische Chromosomenregionen, die bei der Entstehung der akuten myeloischen Leukämie beteiligt sind, nachweisen [Escobar et al., 2007].

4.3.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Erste in situ Hybridisierungen wurden bereits in den späten 60er Jahren mit radioaktiv markierter DNA durchgeführt [Pardue und Gall, 1969], bevor im Jahre 1986 Pinkel et al. erstmals einen fluoreszierenden Farbstoff anstelle eines Radionuklids einsetzten [Pinkel et al., 1986]. Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung stellt eine moderne molekularzytogenetische Methode dar, die zur Aufdeckung von Alterationen ganzer Chromosomen und spezifischer chromosomaler Regionen (Gene) dient. Im Unterschied zur klassischen zytogenetischen Analytik liegen die Vorteile der FISH in einer schnelleren Prozessdauer und sie besitzt zudem eine höhere Sensitivität und Spezifität [Jain, 2004].

Zur Untersuchung struktureller DNA-Veränderung in der Metaphase, wie z.B. Inversion, Deletion und Transformation, kommt die Technik der Metaphase-FISH zum Einsatz, da nur in diesem Abschnitt des Zellzyklus die Chromosomen spiralisiert vorliegen und so als Ganzes sichtbar gemacht werden können. Für alle anderen Fragestellungen, bei denen es auf die Anzahl von Chromosomen bzw. bestimmter chromosomaler Regionen ankommt, wird die Interphase-FISH angewendet. Ein großer Vorteil dieser Methode liegt darin, dass die Untersuchung von Proben möglich ist, die keine oder wenig teilungsbereite Zellen enthalten. Das ist vor allem bei Fruchtwasser der Fall, welches beim pränatalen Schnelltest verwendet wird, oder bei Paraffinschnitten für tumorzytogenetische Untersuchungen.

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung findet in der medizinischen Diagnostik eine facettenreiche Anwendung. In der pränatalen Diagnostik können vor allem die Trisomien 13,

18 und 21 schnell und mit einer hohen Sensitivität sowie einer hohen Spezifität nachgewiesen werden [Ogilvie, 2003; Tepperberg et al., 2001]. Eine äußerst wichtige Rolle spielt die FISH auch bei der Präimplantationsdiagnostik [Ogilvie et al., 2005] und der Aufdeckung hereditärer Gendefekte bei Kindern [Steafnou et al., 2002]

Onkologisch wird die Methode dazu benutzt, Patientinnen, die an einem Mammakarzinom erkrankt sind, standardmäßig auf eine Amplifikation im Her2/neu-Gen zu screenen, um sie bei positivem Befund einer lebensverlängernden Trastuzumab (Herceptin®)-Therapie zu unterziehen [Ramond et al., 2005; Wolff et al., 2007].

An sich sind die onkologischen Anwendungsgebiete von Comet-Fish/FISH nahezu unbegrenzt, da beinahe sämtliche Genloci, die in Verdacht stehen, in der Karzinogenese mitzuwirken, bis zu einer minimalen Größe von 1 kB angefärbt werden können [Teixera, 2002].

4.4 Auswahl des EGFR-Gens

Das Protein des in dieser Arbeit ausgewählten EGFR-Gens spielt eine wichtige Rolle in der Proliferation, dem Wachstum, der Zelldifferenzierung und dem Überleben von Zellen epithelialen Ursprungs [Reuter et al., 2007]. Die Bedeutung für das Zellwachstum und das Überleben und letztlich die Komplexität der EGFR-Signaltransduktionswege unterstreichen die potentielle Rolle von EGFR-Alterationen in der Genese von Plattenepithelkarzinomen [Bianco et al., 2007].

Die ersten Hinweise dafür, dass Störungen in den EGFR-Signalwegen zur malignen Transformation von Zellen beitragen, lieferten Studien der Arbeitsgruppen von De Larco 1980 und Downward 1984. Sie konnten nachweisen, dass das "avian erthroblastosis virus" eine onkogene Version der EGFR, das v-erbB-Onkogen trägt. Dieses Gen kodiert für ein verkürztes Protein, das strukturell dem humanen EGFR sehr ähnlich ist. Es besitzt eine transmembrane Domäne sowie eine Dömane, die bei der Stimulation der Zellproliferation mitwirkt [De Larco et al., 1980; Downward et al., 1984].

Aktuellere Untersuchungen beweisen, dass eine aberrante EGFR-Signalkaskade Epithelzellen alle Schlüsseleigenschaften zur karzinomatösen Entartung und zum Tumorwachstum, wie z.B. autonome Zellproliferation, Invasion, Angiogenesen und die Fähigkeit zur Metastasierung, verleiht [Herbst und Shin, 2002; Mendelsohn, 2001; Yarden und Sliwkowski 2001; Reuter et al., 2007].

Die Dysregulation im Sinne einer Überaktivierung des EGFR kann mehrere Ursachen haben. Zu nennen sind hier die permanente Aktivierung durch Mutationen im EGFR, die autokrine Aktivierung durch Ligandenüberexpression, eine ligandenunabhängige Aktivierung durch andere Rezeptorsysteme, der Verlust negativer Regulationsmechanismen, eine Amplifikation des EGFR-Gens und die intensiv untersuchte Überexpression des Rezeptorproteins [Rogers, 2005; Kalyankrishna und Grandis, 2006; Reuter et al., 2007]. Eine Überexpression des EGFR konnte bei einer Vielzahl von humanen Tumoren, wie den Plattenepithelkarzinomen des oberen Aerodigestivtraktes, dem Glioblastom, dem nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, dem kolorektalen Karzinom und bei urogenitalen Karzinomen gefunden werden [Mendelsohn und Baselga, 2006; Salomon et al., 1995]. Bei Kopf-Hals-Karzinomen weisen 80-90% der Patienten eine EGFR-Überexpression auf [Ford und Grandis, 2003; Dassonville, 1993]. Eine erhöhte Expression des EGFR korreliert mit einem verkürzten krankheitsfreien Intervall, einer schlechteren Prognose und einem erhöhten Rezidiv- und Metastasierungsrisiko [Nicholson et al., 2001; Scaltriti und Baselga, 2006]. Eine Studie zeigte, dass die Überexpression des EGFR einen größeren Einfluss auf das Überleben der Patienten hat als das Tumorsuppressorgen p53 [Etienne, 1999]. Des Weiteren konnte eine Überexpression des EGFR bzw. eine vermehrte mRNA in histologisch gesunder Schleimhaut und in dysplastischem Gewebe von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen gefunden werden, was darauf hinweist, dass die Aktivierung des EGFR-Onkoproteins ein frühes Ereignis in der Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes ist [van Oijen et al., 1998; Grandis et al., 1993].

4.5 Diskussion der Ergebnisse

4.5.1 Mutagensensitivität und DNA-Reparaturkapazität des EGFR-Gens als endogener Risikofaktor bzw. Ursache der Rezeptorüberexpression

4.5.1.1 Mutagensensitivität

Mutagensensitivität beschreibt die individuelle Empfindlichkeit eines Patienten gegenüber einer Fremdstoffexposition [Cloos et al. 1996]. Aufgrund seiner Eigenschaft als primäres Kontaktorgan für Xenobiotika wurden Schleimhautzellen des Oropharynx als Testmaterial in dieser Fall-Kontroll-Studie gewählt.

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von Schleimhautproben des Oropharynx von Tumor- und tumorfreien Kontrollpatienten mit Hilfe von Comet-FISH untersucht. Die DNA-Fragmentierung der Gesamt-DNA durch BPDE war in beiden Spendergruppen vergleichbar. Damit konnten die Ergebnisse bisheriger Studien zur Mutagensensitivität der Gesamt-DNA von Lymphozyten und von Schleimhautzellen aus Miniorgankulturen bestätigt werden [Kleinsasser et al., 2001; Harréus et al., 2004]. Im Gegensatz hierzu stehen einige Lymphozytenstudien, die eine erhöhte Mutagensensitivität gegenüber Xenobiotika postulieren. So beschrieben Wu et al. eine erhöhte Mutagensensitivität als endogenen Risikomarker für prämaligne Läsionen des Kopf-Hals-Bereichs, nachdem sie Lymphozyten mit BPDE und Bleomycin geschädigt hatten [Wu et al. 2002]. Eine erhöhte Sensitivität von Lymphozyten gegenüber Bleomycin bzw. BPDE wurde auch bei Patienten mit Lungenkarzinom festgestellt und als Biomarker für das Auftreten von Zweitmalignomen nach Karzinomen des oberen Aerodigestivtrakts identifiziert [Wu et al., 2006; Wu et al., 2007]. Diese Unterschiede zwischen den Studien mit Lymphozyten und Schleimhautzellen aus Miniorgankulturen unterstreichen die metabolische Kompetenz und der in vivo nahen Situation der Miniorgankulturen [Wallner et al., 2005].

In der vorliegenden Arbeit wurde die Mutagensensitivität erstmals auf Genebene, im Speziellen auf der des EGFR-Gens, untersucht. Grundlage hierfür waren vorausgegangene Arbeiten auf chromosomaler Ebene und Untersuchungen spezieller Chromosomenloci, die signifikante Erhöhungen der Mutagensensitivität aufzeigten. So konnte in einem zu dieser Arbeit analogen Methodenaufbau eine erhöhte BPDE-Sensitivität für die Chromosomen 5 und 8 in makroskopisch gesunder Schleimhaut von Patienten mit oropharyngealen Karzinomen nachgewiesen werden [Harréus et al., 2004]. Bestehende Lymphozytenstudien von Tumorpatienten zeigten eine erhöhte Sensitivität des Chromosomenlocus 3p21.3 nach DNA-Schädigung mit BPDE bzw. Bleomycin und beschrieben diesen Locus als endogenen

Risikomarker für Karzinome des oberen Aerodigestivtraktes [Wu et al., 2002; Zhu et al., 2002]. Ähnliche Ergebnisse konnten für den Abschnitt 21 des kurzen Arms von Chromosom 9 für Patienten mit Blasenkarzinomen festgestellt werden [Hazra et al., 2004].

Für das Gen des EGFR konnte zwischen den beiden Studiengruppen kein signifikanter Unterschied der Mutagensensitivität für BPDE gefunden werden. Auch innerhalb der Gruppen war eine vergleichbare DNA-Fragmentierung in der Gesamt-DNA und im EGFR festzustellen. Da die vorliegenden Ergebnisse an makroskopisch tumorfreiem Material von Karzinompatienten erzielt wurden und eine Überexpression des EGFR in einem solchen Material beschrieben und auch im Tumorgewebe vorherrschend ist, lässt sich vermuten, dass eine erhöhte Mutagensensitivität eher eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese einer solchen Überexpression des Onkoproteins spielt. Des Weiteren scheint die Mutagensensitivität des EGFR-Gens wohl mit geringer Wahrscheinlichkeit ein endogener Risikomarker für die frühe Karzinogenese von Kopf-Hals-Tumoren zu sein.

4.5.1.2 DNA Reparaturkapazität

Während die Mutagensensitivität im EGFR wider Erwarten wohl keine Ursache für eine Proteinüberexpression in unserem Testsystem war, wurde die DNA Reparatur als ein weiterer möglicher Grund für die erhöhte EGFR-Expression untersucht.

Als DNA-Reparaturkapazität (DRC) bezeichnet man die individuelle Fähigkeit bestehende DNA-Schäden zu reparieren. Sie beschreibt den Anteil reparierter DNA nach einer definierten Fremdstoffschädigung innerhalb eines festgelegten Zeitraums.

Zur Quantifizierung der Reparaturkapazität wurden in dieser Arbeit oropharyngeale Schleimhautzellen nach der BPDE-Inkubation einer 24-stündigen Reparaturphase zugeführt und anschließend die OTM-Werte der Gesamt-DNA bzw. die MCTM mit dem Comet-FISH ermittelt. Durch den Vergleich der OTM- bzw. MCTM-Werte für die Mutagensensitivität ließ sich die DNA-Reparaturkapazität prozentual errechnen.

In der vorliegenden Fall-Kontroll-Studie wurden in beiden Studiengruppen die BPDE induzierten Schäden sowohl in der Gesamt DNA als auch im EGFR-Gen mit statistischer Signifikanz repariert.

Beim Vergleich der Karzinomgruppe mit der tumorfreien Kontrollgruppe ergab sich für die Gesamt-DNA kein signifikanter Unterschied im DNA-Reparaturverhalten. Dies steht im Einklang mit Studien an humanen Lymphozyten von Patienten mit und ohne Nasopharynx tumor, wobei hier die DNA der Zellen mit dem Nitrosamin NDEA geschädigt und im Anschluss an variierende Reparaturintervalle die DRC mit dem Comet-Assay ermittelt

wurde [Kleinsasser et al., 2005]. Andererseits existieren zahlreiche Studien, die eine herabgesetzte DNA-Reparaturkapazität bei Tumorpatienten belegen und diese als endogenen Risikomarker für die Karzinogenese des oberen Aerodigestivtraktes empfehlen. Harréus et al. zeigten eine signifikant geringere DNA-Reparaturkapazität für Schleimhautzellen von Patienten mit Oropharynxkarzinom, wobei dies bei der Untersuchung der Lymphozyten nicht der Fall war [Harréus et al., 2001]. Außerdem wiesen Cheng et al. 1998 durch Schädigung von Lymphozyten mit BPDE eine signifikant geringere DNA-Reparaturkapazität für Patienten mit Oropharynxkarzinomen nach [Cheng et al., 1998]. Des Weiteren wurden Polymorphismen von Proteinen, wie dem XPD und XRCC1, beschrieben, die eine bedeutende Rolle in der DNA-Reparatur im Zusammenhang mit der Karzinogenese im Kopf-Hals-Bereich spielen [Übersicht in Spitz et al. 2003, Caldecott 2003]. Doch existieren aktuelle Studien, die den bekannten Polymorphismen nur einen geringen Einfluss auf die individuelle DRC zuschreiben [Shen et al., 2006]. Diese Erkenntnis und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen es nicht uneingeschränkt zu, eine herabgesetzte DNA-Reparaturkapazität als endogenen Risikofaktor für die Karzinogenese des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes zu bezeichnen.

Erste Hinweise auf unterschiedliche Kapazitäten im Reparaturverhalten auf chromosomaler Ebene konnte unsere Arbeitsgruppe bereits liefern. Patienten, die ein Oropharynxkarzinom aufwiesen, zeigten dabei ein signifikant schlechteres Reparaturverhalten der Chromosomen 3, 5, 8 und 11 als Patienten, die an keinem Malignom des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes erkrankt waren [Harréus et al., 2007]. In dieser Arbeit wurde erstmals das DNA-Reparaturverhalten auf Gen-Ebene auf individuelle Unterschiede evaluiert. Bei dieser Untersuchung des EGFR-Gens ergab sich sowohl beim Vergleich der beiden Studien-gruppen als auch bei der Gegenüberstellung des Onokogens zur Gesamt-DNA innerhalb der beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied im DNA-Reparaturverhalten. Diese Ergebnisse veranlassen dazu, die Wahrscheinlichkeit eher als gering einzustufen, dass die individuelle Reparaturkapazität im EGFR-Gen einen Beitrag zur Rezeptorüberexpression leistet. Die Verwendung der DNA-Reparaturkapazität des EGFR-Gens als endogener Risikomarker für die Karzinogenese von Kopf-Hals-Karzinomen kann uneingeschränkt empfohlen werden.

4.5.2 Nachweis der EGFR-Genamplifikation

Die DNA-Amplifikation im EGFR-Gen wurde als eine weitere denkbare Ursache für die erhöhte Expression des EGF-Rezeptors evaluiert. In der hier durchgeführten Fall-Kontroll-Studie wurde erstmals makroskopisch tumorfreie Schleimhaut von Tumorpatienten mit Hilfe des Interphase-FISH auf eine Amplifikation im EGFR-Gen untersucht. Dabei wiesen 7,7% der Tumorpatienten eine Amplifikation auf, wohingegen bei keinem Patienten der tumorfreien Kontrollgruppe eine Vermehrung des EGFR-Gens nachgewiesen werden konnte. Diese Ergebnisse sind mit denen von Studien an der Tumorschleimhaut von Patienten mit Kopf-Hals-Karzinomen vereinbar. Hier zeigten sich Amplifikationsraten von 10-17% [Freier et al., 2003; Koynova et al., 2005; Temam et al., 2007]. Somit scheint eine EGFR-Amplifikation bei Entstehung der häufig beobachteten EGFR-Überexpression in einem gewissen Maß beteiligt zu sein. Auf Grund der jedoch geringen Prozentsätze der Amplifikationen ist es unabdingbar, dass weitere Faktoren in die Überlegungen eines erhöhten Onkoproteinorkommens mit einbezogen werden.

Des Weiteren konnte mehrfach eine Korrelation zwischen einer EGFR-Genamplifikation und einer schlechteren Überlebensrate von Patienten mit Kopf- und Halskarzinomen nachgewiesen werden [Chung et al., 2006; Temam et al., 2007], was eine zukünftige Integration des EGFR-Amplifikationsstatus in die Risikostratifizierung als Prognosemarker für Tumorpatienten als möglich erscheinen lässt.

Darüber hinaus steht eine EGFR-Amplifikation als möglicher Prognosefaktor für ein Ansprechen auf eine Tyrosinkinase-Inhibitor-Therapie (z.B Gefitinib) bei Patienten mit nicht-kleinzelligem Lungenkarzinom im Mittelpunkt aktueller Forschung. So wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen, dass Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom und einer zuvor festgestellten EGFR-Amplifikation besser auf einer Gefitinib-Therapie ansprechen und eine längere Überlebensrate haben als Patienten ohne eine Vermehrung der Gensequenz [Cappuzzo et al., 2005; Hirsch et al., 2005; Hirsch et al., 2007]. In Anlehnung an diese Arbeiten erscheint es sinnvoll, die EGFR-Amplifikation bei Kopf-Hals-Karzinomen als einen möglichen Prognosefaktor für das Ansprechen ähnlicher Therapieansätze mit Tyrosinkinase-Inhibitoren in Fragestellungen zukünftiger Studien mit einzubeziehen.

4.5.3 EGFR-Expression an makroskopisch benigner Schleimhaut von Tumorpatienten

Zur Untersuchung des EGFR-Expressionsverhaltens wurden Feinschnittpräparate der Miniorgankulturen angefertigt und mit Hilfe der immunhistochemischen Methodik gefärbt. In unserer Untersuchung ergab sich bei 67% der Tumorpatienten eine erhöhte Expression des EGFR. Dem gegenüber standen 86% der tumorfreien Patienten, die keine oder eine geringe Expression aufwiesen. Diese Ergebnisse eines erhöhten Onkoproteinvorkommens in tumorumgebender Schleimhaut stehen im Einklang mit bereits bestehenden Arbeiten, die eine erhöhte mRNA und erhöhte EGFR-Levels in dyplastischem und histologisch gesundem Gewebe von Patienten mit Oropharynxkarzinomen feststellen konnten [Grandis et al., 1993; Grandis et al., 1996]. Diese Erkenntnisse lassen darauf schließen, dass die EGFR-Expression und ihre Ursachen schon früh in der Karzinogenese des oberen Aerodigestivtraktes mitwirken. So wäre es denkbar, die Detektion einer EGFR-Überexpression zukünftig als Risikomarker für die Manifestation von aerodigestiven Erst- und sogar Zweitmalignomen zu nutzen.

4.5.4 Schlussfolgerung

Sowohl die Mutagensensitivität als auch die individuelle Reparaturkapazität im EGFR-Gen scheinen einen geringen Einfluss auf das Expressionsverhalten des Rezeptors zu haben. Eine Genamplifikation trägt zur Genese eines erhöhten Proteinvorkommens bei; jedoch ist dieser Effekt eher als moderat einzustufen. Deshalb müssen weitere Ursachen der Überexpression des Epidermal Groth Factor Rezeptors untersucht werden, um eventuell Hinweise zur Optimierung therapeutischer Strategien liefern zu können. Mögliche Mechanismen könnten eine erhöhte Aktivität der EGFR Promoterregion oder eine Dysregulation auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene sein [Zandi et al., 2007]. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass der Wildtyp und mutierte Varianten des p53 Proteins an spezifische Bindungsstellen des EGFR-Promoters binden können und so die EGFR-Transkription aktivieren [Ludes-Meyers et al., 1996; Sheikh et al., 1997]. Da p53 Mutationen üblicherweise häufig in Tumorzellen vorkommen [Bykov et al., 2003], könnte dies zu einer erhöhten Aktivierung der EGFR-Promoterregion führen, was eine Überexpression des Rezeptors zur Folge haben könnte. Des Weiteren ließ sich an Brustkrebs-Zelllinien, die eine Überexpression des EGFR aufwiesen, eine spezifische Region im EGFR-Gen nachweisen, der die Funktion eines Transkriptionsverstärkers (=Enhancer) zugeschrieben werden konnte [McInerney et al., 2001]. Zusätzlich zeigte sich bei diesen Zelllinien, dass das Intron 1 des

EGFR-Gens mehr DNase H1 Stellen beinhaltet als Zelllinien, die nur eine geringe EGFR-Expression hatten. Dies gab Anlass zur Vermutung, dass die Chromatinstruktur der EGFR-Regulationsabschnitte eine Rolle bei dessen Expression spielt. Darüber hinaus scheinen Wiederholungen von CA Dinukleotiden im Intron 1 des EGFR-Gens, wenn sie nahe der Enhancerregion liegen, einen Einfluss auf die Expression des EGFR zu haben, da die Transkriptionsaktivität mit ansteigender Zahl von CA Wiederholungen abnimmt [Buerger et al., 2004; Amador et al., 2004].

5 Zusammenfassung

Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes stellen mit 6-7% aller Malignome weltweit die sechsthäufigste Art von Karzinomen dar. Als exogener Risikofaktor für derartige Malignome gilt insbesondere der kombinierte Tabak- und Alkoholkonsum. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und das Benzo(a)pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) sind dabei Tabaksinhaltsstoffe mit herausragender Bedeutung in der Karzinogenese.

Die Bedeutung endogener Voraussetzungen für die Entstehung von malignem Wachstum im Kopf-Hals-Bereich ist bisher weitgehend ungeklärt. Allerdings scheint die individuelle genetische Empfindlichkeit (sog. Suzeptibilität) von besonderer Bedeutung zu sein. Entsteht ein Ungleichgewicht zwischen beiden Faktoren, kann dies zu Mutationen in Onkogenen und/oder Tumorsuppressorgenen mit nachfolgender Karzinomentstehung führen.

EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptors*) gehört als Onkogen zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren und spielt im aktivierten Zustand eine entscheidende Rolle für Zellwachstum, -metabolismus, -differenzierung und -überleben. Zusätzlich verleiht eine aberrante EGFR-Signal-transduktion den betroffenen Zellen alle Schlüsseleigenschaften zur karzinomatösen Entartung, sodass die verstärkte Expression von EGFR in oropharyngealen Karzinomen mit einer schlechten Prognose verbunden ist. Diese Tatsache wird bereits klinisch für eine adjuvante Behandlung bei Patienten mit Oropharynxkarzinomen ausgenutzt. Erste Therapieversuche mit monoklonalen Antikörpern (z.B. Cetuximab) oder spezifischen Tyrosinkinase-Inhibitoren (z.B. Gefitinib) sind vielversprechend. Studien zeigten jedoch auch, dass nicht die alleinige Überexpression des Rezeptors das Ansprechen der Therapie bestimmt und deshalb die bisher wenig verstandenen Ursachen der Überexpression in den Fokus der Forschung rücken.

Zur Evaluierung der genetischen Empfindlichkeit in der Genese einer EGFR-Überexpression wurde in dieser Arbeit die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) an Mukosazellen des oberen Aerodigestivtraktes kombiniert. Nach Inkubation mit BPDE konnte eine Bestimmung der DNA-Schädigung und der DNA-Reparaturkapazität am EGFR-Gen durchgeführt werden. Dabei wurden frisch entnommene, makroskopisch gesunde Mukosaprobe von Patienten mit Oropharynxkarzinom (n=15) und tumorfreien Patienten (n=15) verglichen. Im Ergebnis konnten weder für die Mutagensensitivität noch für die individuelle DNA-Reparaturkapazität signifikante Unterschiede zwischen den Tumorpatienten und den tumorfreien Kontrollen nachgewiesen werden.

Die Zellen wurden zusätzlich an histologischen Feinschnittpräparaten mit der Methode des Interphase-FISH auf eine Amplifikation im EGFR-Gen untersucht, die für eine Überexpression des EGFR in Frage kommt. Bei 7,7% der Tumorpatienten konnte eine Amplifikation im EGFR-Gen aufgezeigt werden, wobei dies bei keinem Patienten der tumorfreien Kontrollgruppe gelang. Darüber hinaus zeigte sich in Karzinomen ein signifikant höheres EGFR-Gen/Zentromer Chr.7 Verhältnis als in tumorfreien Kontrollen.

Zusätzlich wurde die Schleimhaut beider Gruppen auf ihr EGFR-Expressionsverhalten untersucht. Zur Darstellung des Onkoproteins wurden die angefertigten Feinschnittpräparate mit Hilfe der immunhistochemischen Präparation angefärbt und unter dem Lichtmikroskop semiquantitativ ausgewertet. Dabei wies die tumorfreie Schleimhaut von Tumorpatienten in 67% einen erhöhten Expressionsgrad des EGFR auf. Im Gegensatz hierzu wiesen lediglich 13% der tumorfreien Kontrollgruppe ein erhöhtes Expressionsmuster auf.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass eine Überexpression des EGFR-Proteins schon in makroskopisch gesunder Schleimhaut von Tumorpatienten zu finden ist und diese somit einen Risikomarker in der frühen Karzinogenese von Erst- bzw. Zweitmalignomen des Kopf-Hals-Bereichs darstellt. Die genetische Suszeptibilität im EGFR-Gen scheint hierbei nur von untergeordneter Rolle zu sein. Die Amplifikation trägt zur Überexpression des EGFR's bei, jedoch ist ihr Anteil an jener Genese moderat. Weitere Untersuchungen müssen ergeben, inwiefern andere Mechanismen, wie z.B. Mutationen im EGFR-Gen oder eine aberrante Transkriptionsregulation, an der Entstehung einer EGFR-Überexpression teilhaben, um Möglichkeiten für künftige präventive und therapeutische Strategien für Karzinogenese des oberen Aerodigestivtraktes zu eröffnen.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Ah-See KW, Cooke TG, Pickford IR, Soutar D, Balmain A: An allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck using microsatellite markers. *Cancer Res* 54: 1617–1621 (1994)
- 2 Akin FJ, Snook ME, Severson RE, Chamberlain WJ, Walters DB: Identification of polynuclear aromatic hydrocarbons in cigarette smoke and their importance as tumorigens. *J Natl Cancer Inst* 57:191-195 (1976)
- 3 Almadori G, Galli J, Candoni G, Busso F, Maurizi M: Human Papillomavirus infection and CylinD1 amplification in laryngeal squamous cell carcinoma: Biologic function and clinical significance. *Head and Neck* 24:597-604, (2002)
- 4 Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusati G, Iacobuzio-Donahue C, Baker SD, Ashfaq R, Takimoto C, Forastiere A, Hidalgo M: An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res* 64(24):9139-43 (2004)
- 5 Bianco R, Gelardi T, Damiano V, Ciardiello F, Tortora G: Rational bases for the development of EGFR inhibitors for cancer treatment. *Int J Biochem Cell Biol.* 39(7-8):1416-31 (2007)
- 6 Blot WJ, McLaughlin JK, and Winn DM, et al.: Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res* 48: 3282 (1988)
- 7 Braakhuis BJ, Leemans CR, Brakenhoff RH: A genetic progression model of oral cancer: current evidence and clinical implications. *J Oral Pathol Med* 33(6):317-22 (2004)
- 8 Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH: A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res* 63(8):1727-30 (2003)

- 9 Bradley MO, Kohn KW: X-ray induced DNA double strand break production and repair in mammalian cells as measured by neutral filter elution. *Nucleic Acids Res* 7(3):793-804 (1979)
- 10 Buerger H, Packeisen J, Boecker A, Tidow N, Kersting C, Bielawski K, Isola J, Yatabe Y, Nakachi K, Boecker W, Brandt B: Allelic length of a CA dinucleotide repeat in the egfr gene correlates with the frequency of amplifications of this sequence--first results of an inter-ethnic breast cancer study. *J Pathol* 203(1):545-50 (2004)
- 11 Bykov VJ, Selivanova G, Wiman KG: Small molecules that reactivate mutant p53. *Eur J Cancer* 39(13):1828-34 (2003)
- 12 Caldecott KW: XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)*. 2(9):955-69 (2003)
- 13 Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D: Genetic Progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56: 2488-2492 (1996)
- 14 Cappuzzo F, Hirsch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, Haney J, Witts S, Danenberg K, Domenichini I, Ludovini V, Magrini E, Gregorc V, Doglioni C, Sidoni A, Tonato M, Franklin WA, Crino L, Bunn PA Jr, Varella-Garcia M: Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst*. 97(9):643-55 (2005)
- 15 Cheng L, Eicher SE, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, Wei Q: Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 7:465-468 (1998)

- 16 Chung CH, Ely K, McGavran L, Varella-Garcia M, Parker J, Parker N, Jarrett C, Carter J, Murphy BA, Netterville J, Burkey BB, Sinard R, Cmelak A, Levy S, Yarbrough WG, Slebos RJ, Hirsch FR: Increased epidermal growth factor receptor gene copy number is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Oncol.* 24(25):4170-6 (2006)
- 17 Cloos J, Spitz MR, Stimson P, Hsu TC, Zhang Z, Tobi H, Boudewijn M, Braakhuis M : Genetic Susceptibility to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 88:530-535 (1996)
- 18 Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, Braakhuis BJ, de Vries N, van dW, I, Snow GB: Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 121:157-160 (1995).
- 19 Culp SJ, Beland FA: Comparison of DNA adduct formation in mice fed coal tar or benzo[a]pyrene. *Carcinogenesis* 15:247-252 (1994)
- 20 Dassonville O, Formento JL, Francoual M, Ramaioli A, SantiniJ, Schneider M, Demard F, Milano G: Expression of epidermal growth factor receptor and survival in upper aerodigestive tract. *J Clin Oncol* 11: 1873–1878 (1993)
- 21 De Larco JE, Reynolds R, Carlberg K, Engle C, Todaro GJ : Sarcoma growth factor from mouse sarcoma virus-transformed cells. Purification by binding and elution from epidermal growth factor receptor-rich cells. *J Biol Chem.* 255(8):3685-90 (1980)
- 22 DeMarini DM: Genotoxicity of tobacco smoke and tobacco smoke condensate: a review. *Mutat Res* 567:447-474 (2004).
- 23 Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP: Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 18;274(5286):430-2 (1996)

- 24 Dontenville W: Tumorgenetic effects of chronic cigarette smoke inhalation on Syrian golden hamsters. Experimental lung cancer carcinogenesis and bioassays. Karbe, E. Park, J.F. (Hrsg.), Springer, Heidelberg:331-359 (1974)
- 25 Downward J, Yarden Y, Mayes E, Scrace G, Totty N, Stockwell P, Ullrich A, Schlessinger J, Waterfield MD: Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. *Nature* 307(5951):521-7 (1984)
- 26 Escobar PA, Smith MT, Vasishta A, Hubbard AE, Zhang L: Leukaemia-specific chromosome damage detected by comet with fluorescence in situ hybridization (comet-FISH). *Mutagenesis* 22(5):321-7 (2007)
- 27 Etienne MC, Pivot X, Formento JL, Bensadoun RJ, Formento P, Dassonville O, Francoual M, Poissonnet G, Fontana X, Schneider M, Demard F, Milano G: A multifactorial approach including tumoural epidermal growth factor receptor, p53, thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase to predict treatment outcome in head and neck cancer patients receiving 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 79(11-12):1864-9 (1999)
- 28 Ford AC, Grandis JR: Targeting epidermal growth factor receptor in head and neck cancer. *Head Neck*. 25(1):67-73 (2003)
- 29 Freier K, Joos S, Flechtenmacher C, Devens F, Benner A, Bosch FX, Lichter P, Hofele C: Tissue microarray analysis reveals site-specific prevalence of oncogene amplifications in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*. 63(6):1179-82 (2003)
- 30 Fritz W, Soós K: Smoked food and cancer. *Bibl Nutr Dieta*. (29):57-64 (1980)
- 31 Gajecka M, Rydzanicz M, Jaskula-Szutul 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)

- 32 Gattas J, de Carvalho MB, Siraque MS, Curioni OA, Kohler P, Eluf-Neto J, Wunsch-Filho V: Genetic polymorphisms of CYP1A1, CYP2E1, GSTM1 and GSTT1 associated with head and neck cancer. *Head and Neck* 28:819-826 (2006)
- 33 Gleis M, Schaeferhenrich A, Claussen U, Kuechler A, Liehr T, Weise A, Marian B, Sendt W, Pool-Zobel BL: Comet fluorescence in situ hybridization analysis for oxidative stress-induced DNA damage in colon cancer relevant genes. *Toxicol Sci.* 96(2):279-84 (2007)
- 34 Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ: Quantitative immunohistochemical analysis of transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer.* 78(6):1284-92 (1996)
- 35 Grandis JR, Tweardy DJ: Elevated levels of transforming growth factor alpha and epidermal growth factor receptor messenger RNA are early markers of carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 53(15):3579-84 (1993)
- 36 Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70 (2000)
- 37 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)
- 38 Hardisson D: Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 260: 502-508 (2003)
- 39 Harréus et al., 2007: (Publikation in Vorbereitung)
- 40 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(2):131-8 (2004)

- 41 Harréus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER, Kleinsasser NH: [DNA repair in mucous membrane cells and lymphocytes with the comet assay]. *Laryngorhinootologie* 80(1):23-6 (2001)
- 42 Hashibe M, Bofetta P, Zaridze D, Shagina O, Szeszenia-Dabrowska N, Mates D, Janout V, Fabianova E, Bencko V, Moullan N, Chabrier A, Hung R, Hall J, Canzian F, Brennan P: Evidence for an important role of alcohol- and aldehyde-metabolizing genes in cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15:969-703 (2006)
- 43 Hazra A, Grossman HB, Zhu Y, Luo S, Spitz MR, Wu X: Benzo[a]pyrene diol epoxide-induced 9p21 aberrations associated with genetic predisposition to bladder cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 41(4):330-8 (2004)
- 44 Herbst RS, Shin DM: Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor positive tumors: A new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 94:1593-1611, (2002)
- 45 Herbst RS, Shin DM: Monoclonal antibodies to target epidermal growth factor receptor-positive tumors: a new paradigm for cancer therapy. *Cancer* 94(5):1593-611 (2002)
- 46 Hirsch FR, Varella-Garcia M, Cappuzzo F, McCoy J, Bemis L, Xavier AC, Dziadziuszko R, Gumerlock P, Chansky K, West H, Gazdar AF, Crino L, Gandara DR, Franklin WA, Bunn PA Jr: Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Ann Oncol.* 18(4):752-60 (2007)
- 47 Hirsch FR, Varella-Garcia M, McCoy J, West H, Xavier AC, Gumerlock P, Bunn PA Jr, Franklin WA, Crowley J, Gandara DR: Increased epidermal growth factor receptor gene copy number detected by fluorescence in situ hybridization associates with increased sensitivity to gefitinib in patients with bronchioloalveolar carcinoma subtypes: a Southwest Oncology Group Study. *J Clin Oncol.* 23(28):6838-45 (2005)

- 48 Ho T, Wei Q, Sturgis EM: Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head and Neck* 29(7):682-99 (2007)
- 49 Hoffmann D, Hecht SS, Wynder EL: Tumor promoters and cocarcinogens in tobacco carcinogenesis. *Environ Health Perspect.* 50:247-57 (1983)
- 50 Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP: Mutagen sensitivity: a biological marker of cancer susceptibility. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1:83-89 (1991)
- 51 Hynes NE, Lane HA: ERBB receptors and cancer: The complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5:341-354, 2005
- 52 IARC-Monograph Volume.92: (Publikation in Vorbereitung, Stand: 01/09).
online: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/crthgr01.php>
- 53 Jain KK: Current status of fluorescent in-situ hybridisation. *Med Device Technol* 15:14-17 (2004)
- 54 Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics,2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10–30.
- 55 Kalyankrishna S, Grandis JR: Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol* 24(17):2666-72 (2006)
- 56 Ketkar M, Reznik G, Schneider P, Mohr U: Investigations on the carcinogenic burden by air pollution in man. Intratracheal instillation studies with benzo(a)pyrene in bovine serum albumin in Syrian hamsters. *Cancer Lett.* 4(4):235-9 (1978)
- 57 Kleinsasser N., Wallner B., Kastenbauer E., Muenzenrieder R., Harréus U. Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutat. Res.* (2000) 467: 21-30

- 58 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(3):141-7 (2001)
- 59 Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F, Bührlen M, Huber RM, Rettenmeier AW: The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res* 561(1-2):63-73 (2004)
- 60 Kleinsasser NH, Wagner C, Wallner BC, Harréus UA, Kastenbauer ER: Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients. *Mutat Res* 491:151-161 (2001).
- 61 Kleinsasser NH, Wallner BC, Wagner C, Kastenbauer ER, Harréus UA: DNA repair capacity in lymphocytes of nasopharyngeal cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 262(7):561-6 (2005)
- 62 Knize MG, Salmon CP, Pais P, Felton JS: Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens. *Adv Exp Med Biol* 459:179-193 (1999).
- 63 Koynova DK, Tsenova VS, Jankova RS, Gurov PB, Toncheva DI: Tissue microarray analysis of EGFR and HER2 oncogene copy number alterations in squamous cell carcinoma of the larynx. *J Cancer Res Clin Oncol.* 131(3):199-203 (2005)
- 64 Krebs in Deutschland. 5.überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. und das RKI. Saarbrücken, 2006.
- 65 Kreimer A.R., Clifford G.M., Boyle P., Franceschi S., Human Papillomavirus Types in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Worldwide: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2):467–75

- 66 Li D, Day RS, Bondy ML, Sinha R, Nguyen NT, Evans DB, Abbruzzese JL, Hassan MM: Dietary mutagen exposure and risk of pancreatic cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16(4):655-61 (2007)
- 67 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)
- 68 Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Wen Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC: Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3(9):802-808 (2001)
- 69 Luch A., Nature and nature-lessons from chemical carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer*, 5, 113-125 (2005)
- 70 Ludes-Meyers JH, Subler MA, Shivakumar CV, Munoz RM, Jiang P, Bigger JE, Brown DR, Deb SP, Deb S: Transcriptional activation of the human epidermal growth factor receptor promoter by human p53. *Mol Cell Biol.* 16(11):6009-19 (1996)
- 71 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).
- 72 Maier H, Tisch M, Dietz A, Conradt C: Arbeiter in der Bauindustrie: Eine Hochrisikogruppe für Karzinome des oberen Atmungs- und Verdauungstraktes? *HNO* 47: 730-736 (1999)
- 73 Maier H., Tisch M. Beruf und Krebs im Kopf-Hals-Bereich. *HNO* (1999) 47: 1025-1037.
- 74 Martin GC, Brown JP, Eifler CW, Houston GD: Oral leukoplakia status six weeks after cessation of smokeless tobacco use. *J Am Dent Assoc.* 130(7) :945-54 (1999)

- 75 Matthias C, Bockmühl U, Jahnke V, Jones PW, Hayes JD, Alldersea J, Gilford J, Bailey L, Bath J, Worrall SF, Hand P, Fryer AA, Strange RC: Polymorphism in cytochrome P450 CYP2D6, CYP1A1, CYP2E1 and glutathione S-transferase, GSTM1, GSTM3, GSTT1 and susceptibility to tobacco-related cancers: studies in upper aerodigestive tract cancers. *Pharmacogenetics* 8(2):91-100 (1998)
- 76 Matthias C, Jahnke V, Jones PW, Hoban PR, Alldersea JE, Worrall SF, Fryer AA, Strange RC: Cyclin D1, glutathione S-transferase, and cytochrome P450 genotypes and outcome in patients with upper aerodigestive tract cancers: assessment of the importance of individual genes using multivariate analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8(9):815-23 (1999)
- 77 McInerney JM, Wilson MA, Strand KJ, Chrysogelos SA: A strong intronic enhancer element of the EGFR gene is preferentially active in high EGFR expressing breast cancer cells. *J Cell Biochem* 80(4):538-49 (2001)
- 78 McKelvey-Martin VJ, Ho ET, McKeown SR, Johnston SR, McCarthy PJ, Rajab NF, Downes CS: Emerging applications of the single cell gel electrophoresis (Comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization Comets for the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells. *Mutagenesis* 13:1-8 (1998).
- 79 Mehrotra R, Singh M, Gupta RK, Singh M, Kapoor AK: Trends of prevalence and pathological spectrum of head and neck cancers in North India. *Indian J Cancer* 42(2):89-93 (2005)
- 80 Mendelsohn J, Baselga J: Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol.* 33(4):369-85 (2006)
- 81 Mendelsohn J: The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. *Endocr Relat Cancer* 8(1):3-9. (2001)

- 82 Menke M, Angelis KJ, Schubert I: Detection of specific DNA lesions by a combination of Comet Assay and FISH in plants. *Environ Mol Mutagen* 132-138 (2000).
- 83 Mrhalova M, Plzak J, Betka J, Kodet R: Epidermal growth factor receptor--its expression and copy numbers of EGFR gene in patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Neoplasma* 52(4): 338-343 (2005)
- 84 Nicholson RI, Gee JM, Harper ME: EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer*. 37 Suppl 4:S9-15 (2001)
- 85 Ogilvie CM, Braude PR, Scriven PN: Preimplantation genetic diagnosis--an overview. *J Histochem Cytochem*. 53(3):255-60 (2005)
- 86 Ogilvie CM: Prenatal diagnosis for chromosome abnormalities: past, present and future. *Pathol Biol (Paris)* 51:156-160 (2003).
- 87 Olive PL, Banath JP: Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 294:275-283 (1993).
- 88 Olive PL, Wlodek D, Banáth JP: DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res* 51(17):4671-6 (1991)
- 89 Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123(1):291-298 (1984)
- 90 Pardue ML, Gall JG: Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 64(2):600-4 (1969)
- 91 Phillips H.J.: Dye exclusion test for cell viability. *Tissue Culture* 407-408 (1973)

- 92 Pinkel D, Straume T, Gray JW: Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(9):2934-8 (1986)
- 93 Pugh TJ, Bebb G, Barclay L, Sutcliffe M, Fee J, Salski C, O'connor R, Ho C, Murray N, Melosky B, English J, Vielkind J, Horsman D, Laskin JJ, Marra MA: Correlations of EGFR mutations and increases in EGFR and HER2 copy number to gefitinib response in a retrospective analysis of lung cancer patients. *BMC Cancer*. 7(1):128 (2007)
- 94 Ramachandran S, Ramadas K, Hariharan R, Rejnish Kumar R, Radhakrishna Pillai M: Single nucleotide polymorphism of DNA repair genes XRCC1 And XPD and its molecular mapping in Indian oral cancer. *Oral Oncology* 42:350-362 (2006)
- 95 Reuter CW, Morgan MA, Eckardt A: Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Br J Cancer* 96(3):408-16. (2007)
- 96 Rodriguez, T. *et al.* Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. *Oral Oncol.* 40, 207–213 (2004).
- 97 Rogers SJ, Harrington KJ, Rhys-Evans P, O-Charoenrat P, Eccles SA: Biological significance of c-erbB family oncogenes in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 24(1):47-69 (2005)
- 98 Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE Jr, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM, Pisansky TM, Fehrenbacher L, Kutteh LA, Vogel VG, Visscher DW, Yothers G, Jenkins RB, Brown AM, Dakhil SR, Mamounas EP, Lingle WL, Klein PM, Ingle JN, Wolmark N: Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 353(16):1673-84 (2005)
- 99 Salomon DS, Brandt R, Ciardiello F, Normanno N: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol.* 19(3):183-232 (1995)

- 100 Santini J, Formento JL, Francoual M, Milano G, Schneider M, Dassonville O, Demard F: Characterization, quantification, and potential clinical value of the epidermal growth factor receptor in head and neck squamous cell carcinomas. *Head and Neck* 13(2):132-139 (1991)
- 101 Sato M, Sato T, Izumo T, Amagaza T: Genetic Polymorphism of drug-metabolizing enzymes and susceptibility to oral cancer. *Carcinogenesis* 20:1927-1931 (1999)
- 102 Scaltriti M, Baselga J: The epidermal growth factor receptor pathway: a model for targeted therapy. *Clin Cancer Res* 12(18):5268-72 (2006)
- 103 Schantz SP, Hsu TC: Mutagen-induced chromosome fragility within peripheral blood lymphocytes of head and neck cancer patients. *Head and Neck* 11:337-342 (1989)
- 104 Schlesinger-Raab A, Lang S, Steuer-Vogt M.K., Hölzel D. Zur Epidemiologie der Kopf-Hals-Malignome. In: Manual Kopf-Hals-Malignome (2003), Tumorzentrum München: 3-14.
- 105 Shabad LM: Studies in the U.S.S.R. on the distribution, circulation, and fate of carcinogenic hydrocarbons in the human environment and the role of their deposition in tissues in carcinogenesis: a review. *Cancer Res.* 27(6):1132-7 (1967)
- 106 Sheikh MS, Carrier F, Johnson AC, Ogdon SE, Fornace AJ Jr: Identification of an additional p53-responsive site in the human epidermal growth factor receptor gene promoter. *Oncogene* 15(9):1095-101 (1997)
- 107 Shen J, Desai M, Agrawal M, Kennedy DO, Senie RT, Santella RM, Terry MB: Polymorphisms in nucleotide excision repair genes and DNA repair capacity phenotype in sisters discordant for breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15(9):1614-9 (2006)
- 108 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(1):184-91 (1988)

- 109 Sionov RV, Haupt Y: The cellular response to p53: the decision between life and death. *Oncogene* 18: 6145–6157 (1999)
- 110 Smith LE, Denissenko MF, Bennett WP, Li H, Amin S, Tang M, Pfeifer GP: Targeting of lung cancer mutational hotspots by polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Natl Cancer Inst* 92:803-811 (2000).
- 111 Spaulding DC, Spaulding BO: Epidermal growth factor receptor expression and measurement in solid tumors. *Semin Oncol.* 29(5 Suppl 14):45-54 (2002)
- 112 Speit G, Hartmann A: The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol* 291:85-95 (2005)
- 113 Spitz M.R., Fueger J.J., Goepfert H., Hong W.K., and Newell G.R. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a case comparison analysis. *Cancer* 61:203 (1988)
- 114 Spitz M.R., Wei Q., Dong Q., Amos C.I., Wu X. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12: 689-698 (2003)
- 115 Stefanou EG, Hanna G, Foakes A, Crocker M, Fitchett M: Prenatal diagnosis of cri du chat (5p-) syndrome in association with isolated moderate bilateral ventriculomegaly. *Prenat Diagn.* 22(1):64-6 (2002)
- 116 Steinsvåg SK, Strand M, Berg O, Miaguchi M, Olofsson J: Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* 101(12 Pt 1):1323-31 (1991)
- 117 Stewart BW, Kleihues P, editors: World Cancer Report, Lyon, France. *IARC Press* (2003)
- 118 Sturgis EM, Zheng R, Li L, Castillo EJ, Eicher SA, Chen M, Strom SS, Spitz MR, Wei Q: XPD/ERCC2 polymorphism and risk of head and neck cancer: a case control analysis. *Carcinogenesis* 21:2219-2223 (2000)

- 119 Tanimato K, Hayshi S, Yoshiga K, Ichikawa T: Polymorphism of the CYP1A1 and GSTM1 gene involved in oral squamous cell carcinoma in association with a cigarette dose. *Oral Oncol* 35:191-196 (1999)
- 120 Teixeira MR: Combined classical and molecular cytogenetic analysis of cancer. *Eur J Cancer* 38:1580-1584 (2002).
- 121 Temam S, Kawaguchi H, El-Naggar AK, Jelinek J, Tang H, Liu DD, Lang W, Issa JP, Lee JJ, Mao L: Epidermal growth factor receptor copy number alterations correlate with poor clinical outcome in patients with head and neck squamous cancer. *J Clin Oncol*. 25(16):2164-70 (2007)
- 122 Tepperberg J, Pettenati MJ, Rao PN, Lese CM, Rita D, Wyandt H, Gersen S, White B, Schoonmaker MM: Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of the literature. *Prenat Diagn*. 21(4):293-301 (2001)
- 123 van Oijen MG, Rijkse G, ten Broek FW, Slootweg PJ: Increased expression of epidermal growth factor receptor in normal epithelium adjacent to head and neck carcinomas independent of tobacco and alcohol abuse. *Oral Dis*. 4(1):4-8 (1998)
- 124 Wallace-Brodeur RR, Lowe SW: Clinical implications of p53 mutations. *Cell Mol Life Sci*. 55: 64–75 (1999)
- 125 Wallner BC, Harréus UA, Gamarra F, Sassen A, Kleinsasser NH: Mini-organ cultures of human nasal mucosa. A model for eco-genotoxicological investigations. *HNO* 53(12):1037-46 (2005)
- 126 Wang LE, Sturgis EM, Eicher SA, Spitz MR, Hong WK, Wei Q: Mutagen Sensitivity to Benzo(a)pyrene Diol Epoxide and the Risk of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Clinical Cancer Research* 4:1773-1778 (1998)

- 127 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)
- 128 Wei WI, Sham JS: Nasopharyngeal carcinoma. *Lancet* 365 (9476): 2041-54 (2005)
- 129 Wild R, Fager K, Flefleh C, Kan D, Inigo I, Castaneda S, Luo FR, Camuso A, McGlinchey K, Rose WC: Cetuximab preclinical antitumor activity (monotherapy and combination based) ist not predicted by relative total or activated epidermal growth factor receptor tumor expression levels. *Mol Cancer Ther* 5: 104-113 (2006)
- 130 Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 131(1):18 (2007)
- 131 Wu X, Gu J, Dong Q, Huang M, Do KA, Hong WK, Spitz MR: Joint effect of mutagen sensitivity and insulin-like growth factors in predicting the risk of developing secondary primary tumors and tumor recurrence in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 12(23):7194-201 (2006)
- 132 Wu X, Lin J, Etzel CJ, Dong Q, Gorlova OY, Zhang Q, Amos CI, Spitz MR: Interplay between mutagen sensitivity and epidemiological factors in modulatings lung cancer risk. *Int J Cancer.* 120(12):2687-95 (2007)
- 133 Wu X., Lippman S.M., Lee J.J., Zhu Y., Wei Q.V., Thomas M., Hong W.K., Spitz M.R. Chromosome instability in lymphocytes: a potential indicator of predisposition to oral premalignant lesions. *Cancer Res.* 62: 2813-2818. (2002)
- 134 Yarden Y, Sliwkowski MX: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(2):127-37 (2001)

- 135 Zandi R, Larsen AB, Andersen P, Stockhausen MT, Poulsen HS: Mechanisms for oncogenic activation of the epidermal growth factor receptor. *Cell Signal.* 19(10):2013-23 (2007)
- 136 Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, Greene MI: ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies. *J Clin Invest.* 117(8):2051-8 (2007)
- 137 Zhu Y, Spitz MR, Zheng YL, Hong WK, Wu X: BPDE-induced lymphocytic 3p21.3 aberration may predict head and neck carcinoma risk. *Cancer* 95: 563-568. (2002)

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

B[a]P	Benzo[a]pyren
BEGM	Basal Epithelial Groth Medium
BPDE	Benz[a]pyren- 7,8-diol-epoxid
CA-Nukleotide	DNA-Nuleotide aus den Nukleobasen Cytosin und Adenin
Chr	Chromosom
Comet-FISH	Comet Assay kombiniert mit FISH
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRC	DNA-Reparaturkapazität (dna repiar capacity)
EDTA	Ethylendiamitetraacetat
EGFR	Epidermal Grwoth Factor Receptor
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
GEKID	Gesellschaft epidemiologischer Krebsregister in Deutschland
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICD 10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (10. Revision)
LOH	Loss of heterozygosity
MCTM	Munich chromosomal Tailmoment
MOK	Miniorgankultur (mini organ culture)
NDEA	N- Nitrosodiethylamin
OTM	Olive Tailmoment
OT	Objekträger
PAH	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate Buffered Saline
SSC	Saline Sodium Citrate buffer
TSG	Tumorsuppressorgen
TKI	Tyrosinkinase-Inhibitor

7.2 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Christian Welz
Wohnort: Dresdner Straße 51
80993 München

Geburtsdatum: 20.01.1982
Geburtsort: München
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/88-07/92 Grundsule an der Leipziger Straße, München-Moosach
09/92-07/98 Gymnasium München Moosach
09/98-06/01 Lion-Feuchtwanger-Gymnasium, München
Juni 2001 Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife
Leistungskurse: Physik, Biologie

Universität

10/01-heute Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians –
Universität München
09/03 Erhalt der Ärztlichen Vorprüfung (Physikum) an der Ludwig –
Maximilians-Universität München
08/06 – 07/07 Praktisches Jahr:
- Chirurgie, Krankenhaus Dritter Orden, München
- Innere Medizin, Zentralklinikum Augsburg
- Wahlfach: HNO, Klinikum Großhadern

Abschluss 09.06.2008 mit dem 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
(Note:1,0)

Berufliche Tätigkeit seit 07/08 Assistenzarzt am Klinikum Großhadern in der
Abteilung für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde

7.3 Danksagung

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

Ein besonderer Dank gilt *Dr. Maximilian Reiter*, der mich in die Thematik einführte, meine Arbeit betreute und immer Zeit fand, mir bei bestehenden Fragen und zahlreichen Problemen in Rat und Tat zur Seite zu stehen. Für seine Hilfe und Unterstützung bin ich ihm sehr dankbar

Vielen Dank an PD Dr. Ulrich Harréus, der mir es ermöglichte im Labor für klinisch experimentelle Onkologie zu promovieren. Er war stets am Fortgang dieser Arbeit interessiert und stand mir mit seiner Fachkenntnis zur Seite.

Frau Dr. Doris Mayr, Pathologisches Institut München, möchte ich für die Anfertigung der histologischen Feinschnittpräparate danken.

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

Mein spezieller Dank gilt Sabina Zieger. Sie führte mich in die Methodik im Labor ein. Ohne ihre grenzenlose Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Vielen Dank vor allem meinen Eltern, die immer hinter mir stehen. Ohne ihre Unterstützung und konstruktive Kritik wäre diese Arbeit nicht zu Stande gekommen.

7.4 Publikationen aus dieser Arbeit

Kongressbeiträge:

Reiter MJ, Welz C, Mathias C, Harréus UA

Mutagensensitivität im EGFR-Gen in humanen Mukosazellen bei Kopf-Hals-Karzinomen

78.Jahresversammlung der deutschen Gessellschaft für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., München (2007)

Orginalpublikationen:

Reiter MJ, Welz C, Harréus UA

Mutagen sensitivity and dna-repair of EGFR in patients with HNSCC.

Cancer Genomics & Proteonomics (2008) (in review)