

Aus der Klinik und Poliklinik für
Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen
des Universitätsklinikums Würzburg
Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Dr. h.c. R. Hagen



Toxizität von Salinomycin
in Miniorgankulturen der Nasenschleimhaut und Lymphozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Carolin Seelig, geb. Schramm
aus Coburg

Würzburg, November 2017

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Helga Stopper

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Eyrich

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2018

Die Promovendin ist Ärztin.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region und die Bedeutung von Tumorstammzellen	1
1.2	Salinomycin- ein Ionophor-Antibiotikum als Wachstumsinhibitor für Tumorstammzellen	4
1.2.1	Eigenschaften und Wirkmechanismen	4
1.2.2	Anwendung	5
1.3	Zellbiologische Grundlagen	8
1.3.1	Zellzyklus	8
1.3.2	DNA-Schäden	10
1.3.3	Apoptose	12
1.4	Fragestellung und Ziel der Arbeit	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Methodenspezifische Labormaterialien	16
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	16
2.1.2	Reagenzien	17
2.1.3	Lösungen	19
2.1.4	Geräte und Computerprogramme	21
2.2	Gewebeproben	22
2.3	Kultivierung primärer, adhärenter Nasenschleimhautzellen	23
2.3.1	Gewinnung und Kultivierung von Einzelzellen	23
2.3.2	Salinomycinexposition und Zellablösung	24
2.4	Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa	24

2.4.1 Gewinnung und Kultivierung von Miniorgankulturen	24
2.4.2 Salinomycinexposition und Einzelzellgewinnung	25
2.5 Lymphozyten	26
2.5.1 Lymphozytenisolierung nach dem Dichtegradient-Verfahren	26
2.5.2 Salinomycinexposition	27
2.6 Untersuchung genotoxischer Effekte mit der Einzelzellmikrogelelektrophorese	28
2.6.1 Grundlagen der Einzelzellmikrogelelektrophorese	28
2.6.2 Durchführung der Einzelzellmikrogelelektrophorese	28
2.7 Untersuchung der Zytotoxizität mit dem MTT-Test	30
2.7.1 Grundlagen des MTT-Tests	30
2.7.2 Durchführung des MTT-Tests	30
2.8 Apoptosedetektion durch die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie	31
2.8.1 Grundlagen der Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie	31
2.8.2 Durchführung der Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie	32
2.9 IL-8-Nachweis durch den ELISA	32
2.9.1 Grundlagen des ELISA	32
2.9.2 Durchführung des IL-8-ELISA	33
2.10 Graphische Darstellung der Ergebnisse	33
2.11 Statistische Auswertung	34
3 Ergebnisse	35
3.1 Genotoxizitätsuntersuchung	35
3.1.1 Ergebnisse der Einzelzellmikrogelelektrophorese in adhären- ten Nasenschleimhautzellen	35

3.1.2	Ergebnisse der Einzelzellmikrogelelektrophorese in Miniorgankulturen	36
3.1.3	Ergebnisse der Einzelzellmikrogelelektrophorese in Lymphozyten	37
3.2	Zytotoxizitätsnachweis durch den MTT-Test	38
3.3	Apoptosenachweis durch die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie	40
3.4	Ergebnisse des IL-8-ELISA	42
3.5	Zusammenfassung der Ergebnisse	43
4	Diskussion	44
4.1	Diskussion der Methodik	44
4.1.1	Gewebeproben und Präparationsmethoden	44
4.1.2	Einzelzellmikrogelelektrophorese	45
4.1.3	MTT-Test	48
4.1.4	Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie	48
4.1.5	IL-8-ELISA	49
4.2	Diskussion der Ergebnisse	50
4.2.1	Geno- und Zytotoxizität von Salinomycin	50
4.2.2	Einfluss von Salinomycin auf die Apoptose	52
4.3	Mögliche Anwendung von Salinomycin in der experimentellen Onkologie	53
5	Zusammenfassung	58
6	Anhang	60

6.1	Abkürzungsverzeichnis	60
6.2	Tabellen	64
6.3	Kongressbeiträge und Publikationen	67
7	Literaturverzeichnis	68

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region und die Bedeutung von Tumorstammzellen

Tumore der Kopf-Hals-Region stellen mit ca. 500.000 neuen Fällen pro Jahr die sechsthäufigste Krebsart weltweit dar. [Torre et al., 2015] Ca. 90% dieser Kopf-Hals-Tumore sind Plattenepithelkarzinome. Es handelt sich um Erkrankungen des mittleren bis höheren Lebensalters, wobei das durchschnittliche Erkrankungsalter je nach Manifestationsort zwischen 61 und 70 Jahren liegt. [Hayat et al., 2007] Männer sind zwar dreimal häufiger betroffen als Frauen, die Inzidenzrate bei Frauen nahm allerdings in den letzten Jahrzehnten deutlich zu. Dieser Anstieg wurde bereits Ende der 1970er bzw. Anfang der 1980er Jahre beobachtet und ist wahrscheinlich auf den zunehmenden Tabakkonsum bei Frauen zurückzuführen. [McGuirt, 1983; Simard et al., 2014] Zudem ist aber auch allgemein eine Zunahme sowohl der Inzidenz- als auch der Mortalitätsrate, die mittlerweile bei etwa 6/100000 jährlich liegt, zu verzeichnen. [Torre et al., 2015] Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome stellen somit ein wachsendes Problem in unserer Gesellschaft dar. Neben einer möglicherweise vorhandenen genetischen Prädisposition [Cloos et al., 1996], spielen vor allem exogene Noxen wie Tabak eine wichtige Rolle für die Genese. Tabak wirkt insbesondere durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, N-Nitrosoverbindungen und aromatische Amine mutagen. [Hecht & Hoffmann, 1988; Lofroth, 1989; Van Duuren & Goldschmidt, 1976] Ein langjährig bestehender Alkoholabusus, besonders der Konsum hochprozentiger Spirituosen, kann diesen Effekt noch zusätzlich unterstützen. Zum einen dient der Alkohol als Lösungsmittel für die Kanzerogene des Tabaks, zum anderen erhöht er die Suszeptibilität der Schleimhaut gegenüber diesen Noxen. [Hashibe et al., 2009; Maier et al., 1992; Schottenfeld, 1979] Weitere Risikofaktoren sind schlechte Mundhygiene [Maier et al., 1993; Rosenquist, 2005], eine chronische mechanische Belastung der Mundschleimhaut z. B. durch scharfe Zahnränder oder Prothesen, HPV- und EBV-Infektionen [Gillison et al., 2000], die

Exposition gegenüber Metallstaub (Chrom, Nickel), Holzstaub (Eichen- und Buchenholz), Lederstaub, Kohle- und Stahlstaub sowie organischen Lösungsmitteln und berufliche Tätigkeit in der Gummi-, Kautschuk, Blei- und Asbestindustrie [Dietz et al., 1995; Gustavsson et al., 1998; Maier & Tisch, 1997]. Die klinischen Symptome variieren je nach Lokalisation und Ausbreitung des Tumors. Beispielsweise können Schmerzen, Veränderung der Sprache, Heiserkeit, Globus- bzw. Fremdkörpergefühl, Schluckbeschwerden, Hirnnervenpareesen, Ohrenschermerzen, Riechstörungen, einseitige blutige Rhinorrhoe oder eine indolente zervikale Lymphknotenvergrößerung Anzeichen für ein Karzinom der Kopf-Hals-Region sein. Auch die Therapie richtet sich nach dem jeweiligen Tumorstadium und reicht von primärer Radiochemotherapie bis zur radikalen chirurgischen Exstirpation mit Neck Dissection und adjuvanter Radiotherapie.

Einen möglichen neuen Ansatz der Tumorthherapie könnte das Modell der Tumorstammzellen liefern. Diese Theorie geht auf Bonnet und Dick zurück, die 1997 erstmals Tumorstammzellen bei akuten Leukämien identifizieren konnten. [Bonnet & Dick, 1997] Mittlerweile wurden diese auch bei weiteren Krebsarten, wie Hirntumoren [Singh et al., 2003], Darm- [Dalerba et al., 2007], Brust- [Al-Hajj et al., 2003] und Prostatakarzinomen [Collins et al., 2005] sowie Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich [Prince et al., 2007] isoliert.

Unter Tumorstammzellen versteht man Krebszellen, die Eigenschaften von Stammzellen besitzen. Hier sind besonders die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, das Differenzierungspotenzial sowie eine hohe Proliferationskapazität zu nennen. [Reya et al., 2001] Man geht deshalb davon aus, dass Tumorstammzellen verantwortlich für das Tumorstadium sind. Weiterhin sind sie aufgrund von Resistenzmechanismen gegenüber konventionellen Therapien möglicherweise Ursache von Rezidiven und Metastasen. Zum einen liegt diese Resistenz darin begründet, dass Tumorstammzellen häufig im Stadium der Quieszenz vorliegen, d. h., die Zellen treten aus dem Zellzyklus aus und begeben sich in eine Ruhephase. Zytostatika schädigen allerdings vor allem aktive, sich teilende Zellen. Zum anderen besteht eine Überexpression von membrangebundenen Effluxpumpen (ABCG, MDR-1) [Guan et al., 2015; Ho et al., 2008] sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptosestimuli durch eine höhere Ausprägung von Genen, die für

antiapoptotische Proteine kodieren (z.B. BCL 2) [Liu et al., 2006]. Neben dieser Resistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie unterscheiden sich Tumorstammzellen von gewöhnlichen Tumorzellen durch eine erhöhte Expression bestimmter Oberflächenmarker. Im Fall der Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich konnten 2007 erstmalig Zellen mit Tumorstammzell-Eigenschaften isoliert werden, die eine erhöhte Expression des Oberflächenmarkers CD44 aufwiesen. [Prince et al., 2007] Als weitere mögliche Tumorstammzell-Marker sind CD133 [Zhou et al., 2007], ALDH (Aldehyd-Dehydrogenase) [Clay et al., 2010], CD10 [Fukusumi et al., 2014], CD98 [Martens-de Kemp et al., 2013], CD271 [Murillo-Sauca et al., 2014], CD166 [Yan et al., 2013] und ABCG2 [Wang et al., 2010] zu nennen. Diese Oberflächenmarker dienen sowohl der Identifikation der Tumorstammzellen als auch als möglicher Angriffspunkt neuer Therapieansätze. So konnten beispielsweise onkolytische Masernviren, die gezielt CD133⁺ Zellen infizieren und zerstören, erzeugt werden. [Bach et al., 2013] Weitere Ansatzpunkte für Therapiestrategien gegen Tumorstammzellen sind u. a. spezifische Signalwege [Hong et al., 2015] oder bestimmte metabolische Eigenschaften von Tumorstammzellen [Yuan et al., 2013] sowie die Störung der Interaktion zwischen Tumorstammzellen und ihrer speziellen Mikroumgebung [Fatima & Nawaz, 2015]. In den letzten Jahren konnten so verschiedene Therapiestrategien und Medikamente entdeckt und entwickelt werden, deren genaue Wirkmechanismen allerdings teilweise noch nicht vollständig verstanden wurden und weiterer Forschung bedürfen.

Im Hinblick auf neuartige Therapiemöglichkeiten in der Onkologie ist das Konzept der Tumorstammzellen somit von großer Bedeutung. Durch die gezielte Behandlung von Tumorstammzellen kann einerseits die toxische Wirkung auf nicht maligne Zellen im Vergleich zu konventionellen Therapiemaßnahmen reduziert werden, andererseits können die Heilungs- sowie Überlebensraten durch eine erhöhte Effektivität verbessert werden.

1.2 Salinomycin- ein Ionophor-Antibiotikum als Wachstumsinhibitor für Tumorstammzellen

1.2.1 Eigenschaften und Wirkmechanismen

Salinomycin ist ein Polyether-Antibiotikum, das von *Streptomyces albus* gebildet wird und erstmals 1974 isoliert wurde. [Miyazaki et al., 1974] Seine chemische Struktur enthält ein trizyklisches Spiroketalringsystem und seine Summenformel lautet $C_{42}H_{70}O_{11}$ (s. Abb. 1).

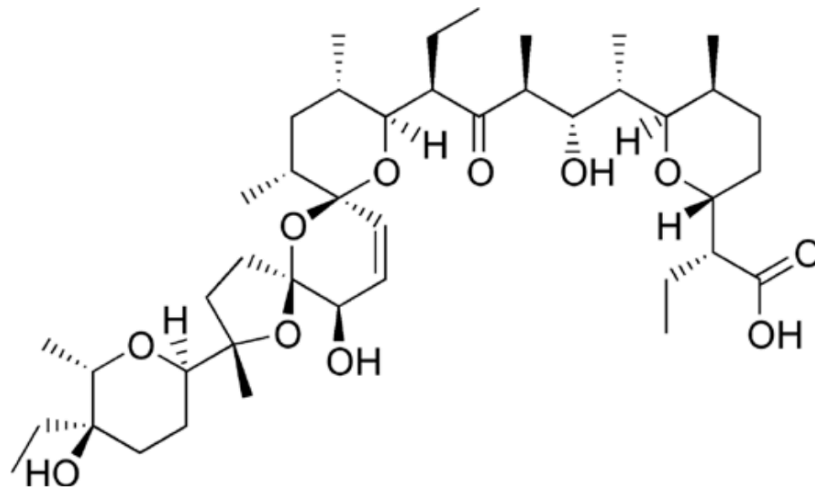


Abbildung 1: Strukturformel von Salinomycin [Naujokat & Fuchs, 2010]

Es handelt sich um eine lipophile Verbindung, die leicht durch Zellmembranen diffundiert und sich deshalb vor allem im Gewebe anreichert.

Salinomycin wirkt als K^+ -Ionophor, d. h., es erhöht die Permeabilität von Membranen für K^+ -Ionen. Durch die Einlagerung in Lipidphasen der Zellmembranen kommt es zum passiven Ausstrom monovalenter Kationen, vor allem K^+ , aus dem Zytoplasma und aus Mitochondrien. Die verminderte intrazelluläre K^+ -Konzentration führt zu einer Verschiebung des osmotischen wie auch elektrochemischen Gleichgewichts der jeweiligen Zellen, wodurch es zu einer Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und somit zur Induktion der Apoptose kommt. [Mitani et al., 1975; Mitani et al., 1976]

1.2.2 Anwendung

Salinomycin wird pharmazeutisch als Natrium-Salz ($C_{42}H_{69}NaO_{11}$) verwendet und wurde bisher vor allem in der Veterinärmedizin eingesetzt. Es wirkt gegen bestimmte grampositive Bakterien, einige Fadenpilze, Plasmodium falciparum sowie Eimeria spp.. [Mehlhorn et al., 1984; Miyazaki et al., 1974] Diese Protozoen verursachen bei Vögeln und Säugetieren die sog. Kokzidiose, eine parasitäre Erkrankung, die vor allem den Darm, aber auch Leber und Niere, befallen kann. Klinisch äußert sie sich durch Verdauungsstörungen, wässrige, übelriechende Durchfälle, Appetit- und Teilnahmslosigkeit sowie Tympanie, worunter man eine Gasansammlung in Magen und/oder Darm versteht. Die Erkrankung kann bis zum Tod führen. Zur Prophylaxe der Kokzidiose wird Salinomycin hauptsächlich bei Masthühnern, Mastkaninchen und Rindern angewandt. [Danforth et al., 1977] Weiterhin dient es als Futtermittelzusatz in der Schweinemast über eine Stabilisierung der Darmflora der Wachstums- und Leistungsförderung. [Butaye et al., 2003; Callaway et al., 2003; Lindemann et al., 1985]

Ein mögliches neues Einsatzgebiet von Salinomycin ist die Humanmedizin. In einem Screening-Verfahren konnte es kürzlich als selektiver Inhibitor epithelialer Tumorstammzellen identifiziert werden. Dazu wurden in einem komplexen Versuchsaufbau zunächst onkogene, immortalisierte, humane Brustgewebezellen (HMLER) durch Knockdown von E-Cadherin infolge von RNA-Interferenzen einer epithelial-mesenchymalen Transition unterzogen (EMT). Die daraus resultierenden Zellen (HMLER^{shEcad}) wiesen Tumorstammzell-Eigenschaften auf und exprimierten vermehrt das für Brustkrebstammzellen typische Oberflächenmarkerprofil CD44^{high}/CD24^{low}. In einem nächsten Schritt wurden rund 16.000 Substanzen in einem High-Throughput-Screening auf ihre Toxizität gegenüber HMLER^{shEcad}-Zellen und Kontrollzellen, an denen keine EMT durchgeführt wurde, untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass Salinomycin den Anteil an Tumorstammzellen 100fach stärker reduzierte als das Chemotherapeutikum Paclitaxel. Weiterhin konnte Salinomycin im Tierversuch mit Mäusen das Tumorstammzellwachstum sowie die Metastasierung verlangsamen und induzierte vermehrt eine epitheliale Differenzierung der Tumorzellen. Eine globale Genexpressionsanalyse zeigte, dass die Behandlung mit Salinomycin zu einem Verlust von charakteristischen

Brustkrebsstammzellgenen, die vorher aus humanem Brustkrebsgewebe isoliert wurden, führte. [Gupta et al., 2009]

Salinomycin wirkt allerdings nicht nur auf Tumorstammzellen, sondern auch auf Krebszellen verschiedenen Ursprungs und Krebszellen mit multiplen Resistenzmechanismen gegenüber Medikamenten und Apoptose, welche durch Überexpression verschiedener Multidrug-Resistance-Proteine, wie P-Glykoprotein, oder anti-apoptotischer Proteine, z. B. Bcl-2, vermittelt werden. Fuchs et al. zeigten beispielsweise, dass Salinomycin zwar in humanen CD4⁺ T-Zell-Leukämie-Zellen, nicht aber in nicht-malignen CD4⁺ T-Zellen zu einer Apoptose-Induktion führte. [Fuchs et al., 2009]

Der genaue Wirkmechanismus von Salinomycin im Bezug auf menschliche Tumorstammzellen und Krebszellen ist bisher noch nicht vollständig verstanden. Es gibt allerdings verschiedene Studien, die zur Aufklärung beitragen. So konnte gezeigt werden, dass Salinomycin in Leukämiezellen einen Caspase-unabhängigen Apoptoseweg aktiviert. [Fuchs et al., 2010; Fuchs et al., 2009] In humanen PC3 Prostata-Krebs-Zellen jedoch konnte eine Apoptose-Induktion über den mitochondrialen Signalweg nachgewiesen werden. Die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt zu einer Caspase 3-vermittelten Spaltung der Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP), welche eine wichtige Rolle in der Reparatur einzelsträngiger DNA spielt. [K. Y. Kim et al., 2011]

Ein weiterer Mechanismus zur Apoptose-Induktion durch Salinomycin scheint die Inhibierung des WNT/ β -Catenin-Signalwegs zu sein. Dieser Signalweg spielt vor allem in der Embryogenese eine wichtige Rolle und liegt in adulten Zellen meist inaktiviert vor. In diesem Fall ist das Substrat β -Catenin im sog. „destruction complex“, unter anderem bestehend aus Axin, der Kinase GSK3- β und dem Tumorsuppressor-Protein APC, gebunden. Es kann anschließend über weitere Schritte ubiquitiniert und im Proteasom abgebaut werden. Wenn allerdings das Signalprotein WNT an seinen Rezeptor „Frizzled“ und seinen Co-Rezeptor „LRP“ bindet, wird der „destruction-Komplex“ durch das Protein „DVL“ (Dishevelled) inhibiert, so dass β -Catenin nicht mehr abgebaut werden kann und akkumuliert. Es gelangt in den Zellkern und aktiviert dort die Transkription bestimmter Gene, die für die Regulation des Zellzyklus und die Proliferation von Bedeutung sind. In

Tumorstammzellen und Krebszellen kann diese Signalkaskade konstitutiv aktiviert vorliegen und ist deshalb mitverantwortlich für die Selbsterneuerung und Proliferation der Zellen. Lu et al. haben gezeigt, dass Salinomycin in chronisch lymphatischen Leukämie-Zellen den WNT-Signalweg inhibiert, indem es die Phosphorylierung des Co-Rezeptors LRP6 blockiert, dadurch zu dessen Abbau führt und die Expression bestimmter WNT-Ziel-Gene (LEF1, Cyclin D1 und Fibronectin) herunterreguliert. [Lu et al., 2011]

Die Ausbildung von membrangebunden Efflux-Pumpen, wie ABC-Transportern, ist eine der wichtigsten Ursachen der Multidrug-Resistenz von Tumorstammzellen. Salinomycin umgeht diesen Resistenzmechanismus. Zum einen kann sich Salinomycin als transmembraner Ionophor in Membranen einlagern und sich so den ABC-Transportern als Substrat entziehen. [Fuchs et al., 2010] Zum anderen wirkt Salinomycin als Inhibitor des ABC-Transporters P-Glykoprotein/MDR-1 in verschiedenen Krebszellen. [Kim et al., 2012; Riccioni et al., 2010] So konnten Riccioni und Kollegen zeigen, dass MDR-Krebszell-Linien mit einer Überexpression von P-Glykoprotein nach Behandlung mit Salinomycin wieder eine normale Sensitivität gegenüber Medikamenten aufwiesen. Diese inhibitorische Wirkung wird wahrscheinlich über eine Konformationsänderung des P-Glykoproteins vermittelt. [Riccioni et al., 2010]

Weitere Wirkmechanismen von Salinomycin auf Tumorstammzellen bzw. Krebszellen leiten sich von seiner Eigenschaft als Ionophor ab. So fördert es den transmembranen K^+ -Ausstrom aus Mitochondrien und Zytoplasma. Die Abnahme der intrazellulären K^+ -Konzentration wirkt direkt zytotoxisch und Apoptose induzierend auf die Tumorstammzellen. [Andersson et al., 2006] Außerdem kommt es dadurch auch zu einer Inhibierung der oxidativen Phosphorylierung, die zusätzlich zur Einleitung der Apoptose in Tumorstammzellen beitragen könnte. [Mitani et al., 1976] Salinomycin wirkt also über vielfältige Mechanismen auf Tumorstammzellen, die noch nicht alle aufgedeckt und vollkommen verstanden wurden.

1.3 Zellbiologische Grundlagen

1.3.1 Zellzyklus

Da Veränderungen in den Wachstumseigenschaften benigner Zellen und somit Störungen im Zellzyklus häufig die Grundlage für die Entstehung von Tumorzellen bilden, soll dieser im Folgenden näher betrachtet werden. Der Zellzyklus beschreibt den Zeitraum vom Entstehen einer Zelle durch Mitose bis zu ihrer erneuten Teilung in zwei Tochterzellen. Man unterscheidet 4 Phasen (s. Abb. 2): die M-Phase, also die Phase in der die Mitose stattfindet, die G₁-Phase, die S-Phase und die G₂-Phase. Die drei letztgenannten werden als Interphase zusammengefasst. In der ersten Phase der Interphase, der G₁-Phase, findet das Zellwachstum statt. Hier werden Proteine synthetisiert, die für die DNA-Replikation nötig sind. In der S-Phase erfolgt dann die Replikation der DNA. Ist diese abgeschlossen, kommt es in der G₂-Phase zur Kontrolle der replizierten Chromosomen und zur Vorbereitung der Zelle auf die bevorstehende Zellteilung. Anschließend beginnt die Mitose. Auch hier werden verschiedene Stadien beschrieben. Zunächst spiralisieren und verdichten sich die Chromosomen und der Spindelapparat bildet sich an den Zentriolen. Die Phase wird Prophase genannt. In der darauffolgenden Pro-Metaphase kommt es durch Translokation des Cyclin B1/Cdk1-Komplexes (mitosis-promoting factor) zum Zerfall der Kernmembran. Die Chromosomen ordnen sich nun in der Metaphase in der Äquatorialebene an. In der Anaphase erfolgt dann die Trennung der Tochterchromatiden durch Verkürzung der Mikrotubuli und durch die Wanderung der Spindelpole. Nach Abschluss der Trennung wird in der Telophase eine neue Kernmembran und Nukleoli gebildet, die Chromosomen entspiralisieren sich. In der nun folgenden Cytokinese teilt sich das Zytoplasma, so dass zwei neue Tochterzellen entstehen. [Scholey et al., 2003]

Um eine unkontrollierte Teilung zu verhindern, unterliegt der Zellzyklus einem strengen Regulationssystem. Ein wichtiger Teil dieses Systems sind die Zellzyklus-Kontrollpunkte (checkpoints/restriction points), an denen eine Arretierung des Zellzyklus und Reparatur der eventuell vorhandenen DNA-Schäden oder die Einleitung der Apoptose möglich ist. Der erste Kontrollpunkt befindet sich am Ende der G₁-Phase und bestimmt den Übergang in die S-Phase und somit den Beginn

der DNA-Replikation. Am zweiten Kontrollpunkt am Ende der G_2 -Phase wird dann die replizierte DNA auf Fehler überprüft. Außerdem gibt es noch einen zusätzlichen Kontrollpunkt am Ende der Metaphase der Mitose, an dem die Chromosomentrennung kontrolliert wird. Ob ein Kontrollpunkt durchschritten wird oder nicht, ist von externen Stimuli, wie z.B. den Wachstumsfaktoren, abhängig. [Kaufmann, 1995] Diese Wachstumsfaktoren beeinflussen aber nicht nur das Zellwachstum, sondern auch die Differenzierung einer Zelle. Bei einem Entzug von Wachstumsfaktoren, tritt die Zelle in die teilungsinaktive G_0 -Phase ein. Die Signaltransduktion erfolgt über die Bindung an membranständige Tyrosinkinase-Rezeptoren. Dadurch kommt es über eine Signalkaskade zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die die Expression von Cyclinen regulieren. Cycline sind bestimmte Proteine, die während eines Zellzyklus zyklisch auf- und wieder abgebaut werden und verschiedene cyclinabhängige Kinasen (CDKs) aktivieren. Diese bilden zusammen einen Cyclin/CDK-Komplex und phosphorylieren weitere Enzyme und Transkriptionsfaktoren. [Nigg, 1995] Im Zentrum steht dabei das Protein Rb, das in ruhenden Zellen aktiv vorliegt. Es inhibiert den Transkriptionsfaktor E2F und verhindert dadurch eine Progression im Zellzyklus. Wird Rb durch den Cyclin D/CDK 4/6- und den Cyclin E/CDK 2-Komplex phosphoryliert, wird E2F freigesetzt und kann an die Zielsequenzen verschiedener Gene, die für das Zellwachstum von Bedeutung sind, binden. [Golias et al., 2004] Die Zelle tritt somit von der G_1 -Phase in die S-Phase über. Das Protein Rb spielt also eine zentrale Rolle bei der Regulation des Zellzyklus und ist daher auch ein wichtiges Tumorsuppressorgen. Eine Mutation im Rb-Gen kann zu einem unkontrollierten Zellwachstum und so zur Ausbildung eines Tumors führen. Ein weiterer Tumorsuppressor ist das Protein p53, das auch „Wächter des Genoms“ genannt wird. Eine Akkumulation von p53 führt zu einem Anhalten des Zellzyklus und zur Induktion von DNA-Reparatur-Mechanismen oder zur Apoptoseeinleitung bei einer zu großen DNA-Schädigung. Ein Funktionsverlust von p53 führt somit ebenfalls zu einer unkontrollierten Zellteilung und wird häufig bei der Entstehung von Tumoren beobachtet. [Shaw, 1996]

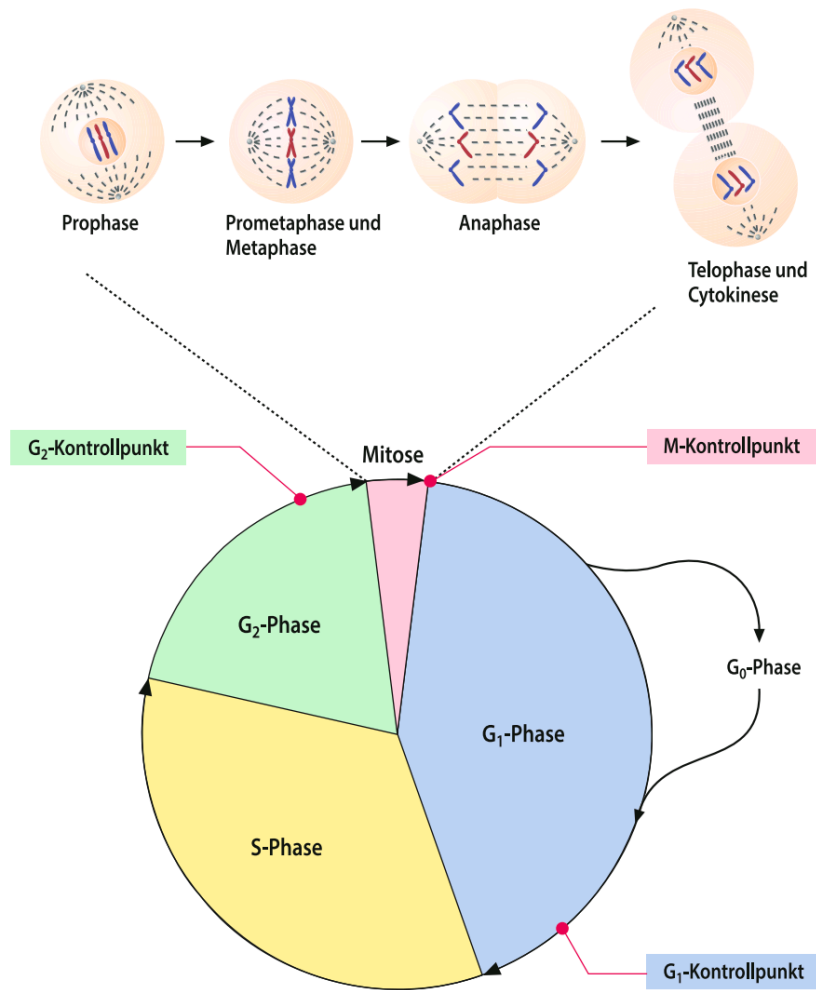


Abbildung 2: Ablauf des Zellzyklus [Heinrich et al., 2014]

1.3.2 DNA-Schäden

Im menschlichen Genom treten innerhalb eines Tages ca. 20.000 DNA-Schäden pro Zelle auf. Diese Schäden treten entweder spontan, z. B. durch Desaminierung oder thermische Depurinierung, durch Fehler bei der Replikation oder durch externe Noxen induziert auf. Externe Noxen können zum einen physikalische Faktoren, wie UV-, Röntgen- oder radioaktive Strahlung, zum anderen chemische Stoffe, wie Nitrit, salpetrige Säure oder Stickstoff-Lost-Derivate sein. Nicht

jeder DNA-Schaden führt zu einer Mutation, da sehr effektive DNA-Reparatursysteme existieren. So finden im menschlichen Körper täglich ca. 10^6 - 10^9 Reparaturereignisse statt. [Ciccia & Elledge, 2010]

Die Aktivierung des Reparatursystems erfolgt über einen Anstieg von p53, wodurch entweder der Zellzyklus angehalten oder bei zu großen Schäden die Apoptose eingeleitet wird. [Shaw, 1996] Kleinere Schäden können durch eine direkte Reparatur behoben werden. Hier erkennt ein Enzym den Fehler und beseitigt ihn. Die O6-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase ist beispielsweise für die Reparatur von Alkylschäden zuständig. Bei größeren Basenschäden besteht die Möglichkeit der Basen- oder Nukleotid-Exzisionsreparatur.

Im Falle eines Doppelstrangschadens unterscheidet man zwischen der nicht homologen und der homologen Reparatur. Die nicht homologe Reparatur erfolgt vor allem in der G1- oder frühen S-Phase und besteht in einer End-zu-End-Verbindung der beiden Endstücke. Diese Art der Reparatur geht häufig mit Fehlern einher. Bei der homologen Rekombination, die während oder kurz nach der S-Phase durchgeführt werden kann, wird der komplementäre Strang im Schwesterchromatid zur Rekonstruktion des geschädigten Stranges genutzt.

Werden DNA-Schäden von diesen Reparaturmechanismen nicht erkannt, kommt es zu einer Mutation. Man unterscheidet hier zwischen Genommutationen, Chromosomenmutationen und Genmutationen. Bei der Genommutation handelt es sich um eine numerische Chromosomenaberration, d. h., die Anzahl der Chromosomen ist verändert, wie z. B. bei der Trisomie 21. Im Gegensatz dazu versteht man unter einer Chromosomenmutation eine strukturelle Chromosomenaberration, welche durch Brüche an einzelnen Chromosomen entsteht. Eine Genmutation bezeichnet eine Veränderung der DNA in nur einem Gen. Diese wird z. B. durch Substitution, Deletion oder Insertion einer Base hervorgerufen. Mutationen können für den Organismus ohne Konsequenz sein (sog. stille Mutation), wenn ein Codon entsteht, das für die gleiche Aminosäure kodiert. Es können aber auch Vorteile oder Nachteile entstehen. Eine Punktmutation in einem Tumorsuppressorgen beispielsweise kann zu einer ungehemmten Zellteilung und dadurch zur Entstehung eines Tumors führen.

1.3.3 Apoptose

Sind die DNA-Schäden zu gravierend und können nicht mehr repariert werden, so besteht für die Zelle noch die Möglichkeit der Apoptose (griech. „Laubfall“). Die Apoptose dient in einem vielzelligen Organismus zudem einer genauen Regulation der Zellzahl. So finden sowohl Zellteilung als auch Apoptosevorgänge in allen Organen statt, um die Zellzahl konstant zu halten. Auch während der Embryonalentwicklung kommt es zur bewussten Entfernung von Zellen, z. B. bei der Entstehung der Fingerstrahlen einer Hand. Hier werden die Zellen zwischen den einzelnen Fingern durch Apoptose eliminiert. [Fernandez-Teran et al., 2006]

Die Apoptose wird auch als „programmierter Zelltod“ bezeichnet, da es sich um ein in jeder Zelle gleich ablaufendes „Programm“ handelt. Morphologisch zeigen sich dabei folgende Veränderungen: Zunächst kommt es zu einer Kondensation des Chromatins und somit zu einer Schrumpfung des Zellkerns. Anschließend folgt die Blasenbildung der Plasmamembran sowie die Fragmentierung des Zellkerns und daraufhin die Fragmentierung der gesamten Zelle in apoptotische Partikel. Diese können dann durch Makrophagen und Granulozyten phagozytiert werden. Im Gegensatz zur Nekrose laufen diese Vorgänge ohne die Auslösung immunologischer oder entzündlicher Reaktionen ab. [Kanduc et al., 2002]

Die Einleitung der Apoptose kann über zwei verschiedene Signalwege erfolgen, den intrinsischen (=mitochondrienabhängigen) und den extrinsischen (=rezeptorabhängigen) Signalweg. Beide führen zur Aktivierung bestimmter proteolytischer Enzyme, den Caspasen. Diese **Cysteiny-Aspartyl-Proteasen** spalten ihr Substrat hinter Aspartylresten und liegen häufig intrazellulär als inaktive Procaspasen vor, die durch limitierte Proteolyse aktiviert werden. Man unterscheidet zwischen Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Zu den Initiatorcaspasen zählen die Caspasen 2, 8, 9 und 10. Sie können sowohl durch extrazelluläre Faktoren (extrinsischer Weg), wie den Fas-Ligand oder Tumornekrosefaktor (TNF), als auch intrazelluläre Vorgänge (intrinsischer Weg) aktiviert werden und vermitteln kaskadenartig das Apoptose-induzierende Signal an die Effektorcaspasen. Die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 sind anschließend für die eigentlichen morphologischen Veränderungen in der Zelle durch Abbau zellulärer Proteine zuständig. [Kumar, 2007]

Wie bereits beschrieben erfolgt die Induktion der Apoptose über den extrinsischen Weg durch die Bindung von Liganden an sog. „Todesrezeptoren“. Dadurch kommt es zur Trimerisierung der Rezeptoren und zu deren Bindung an ein intrazelluläres Adaptermolekül. Der somit entstandene Komplex wird DISC (= death-inducing signaling complex) genannt. Dieser bindet wiederum an Procaspase 8, aus welcher autokatalytisch Caspase 8 freigesetzt wird. Caspase 8 aktiviert anschließend die Effektorcaspasen. Der intrinsische Weg kann durch intrazelluläre Signale, wie DNA-Schäden oder oxidativen Stress, unabhängig von Membranrezeptoren ausgelöst werden. Eine entscheidende Rolle spielen dabei die Mitochondrien, deren Membranpermeabilität erhöht wird. Es kommt zur Freisetzung proapoptotischer Proteine, wie Cytochrom C und Smac/Diablo, ins Cytoplasma. Cytochrom C bindet an Apaf-1 (Apoptotic Protease activating Factor 1) und es kommt zur Bildung des Apoptosoms. Dieses bindet an Procaspase 9, welche dadurch zur Caspase 9 aktiviert wird und wiederum die Effektorcaspasen aktiviert. Smac/Diablo inhibiert IAP (Inhibitor of Apoptosis)- Proteine, welche Caspase 3 und 9 blockieren, und wirkt dadurch caspaseaktivierend. Die Integrität der Mitochondrien wird durch Proteine der Bcl-2 Familie reguliert. Bcl-2 selbst wirkt antiapoptotisch, die Proteine Bak und Bax proapoptotisch. Intrazelluläre Stress-Signale führen zu einer Überexpression der proapoptotischen Proteine, so dass die Proteine Bak und Bax in der Mitochondrien-Membran oligomerisieren und sog. Permeabilitäts-Transitions-Poren bilden können, durch die Apoptose-Mediator-Proteine, wie Cytochrom C, in das Cytoplasma freigesetzt werden können. [Elmore, 2007]

Die Apoptose spielt auch hinsichtlich der Entstehung von Krebserkrankungen eine wichtige Rolle. So sind diese häufig Folge einer gehemmten Apoptose, z. B. durch Mutationen in Tumorsuppressorgenen wie p53.

1.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Vor einem möglichen Einsatz von Salinomycin in der Onkologie müssen vor allem auch Wechselwirkungen mit benignen Zellen evaluiert werden. Bisher existieren kaum Studien über toxische Effekte von Salinomycin in nicht malignen, humanen Zellen. In der vorliegenden Arbeit sollen geno- und zytotoxische Effekte

von Salinomycin in Zellen humaner nasaler Mukosa und Lymphozyten untersucht werden.

Dabei stellen sich folgende Fragen:

- Werden geno- und/oder zytotoxische Schäden in Zellen humaner nasaler Mukosa und/oder humanen Lymphozyten durch Inkubation mit Salinomycin hervorgerufen?
- Entsprechen geno- oder zytotoxische Konzentrationen denen, für die eine Wirkung von Salinomycin auf Tumorstammzellen beschrieben wurde?
- Welche Auswirkung hat die Inkubation von humanen Lymphozyten mit Salinomycin auf die Apoptose- bzw. Nekroserate?
- Hat Salinomycin eine proinflammatorische Wirkung auf Zellen humaner nasaler Mukosa?

2 Material und Methoden

In der vorliegenden Versuchsreihe wurden aus 10 Proben nasaler Mukosa Miniorgankulturen (MOKs) und Einzelzellen gewonnen. Zudem wurde von jedem Patienten eine Blutprobe entnommen, aus der Lymphozyten isoliert wurden. Nach Inkubation der Zellen mit Salinomycin für 24h wurde zur Untersuchung der Genotoxizität der Comet Assay mit allen drei Zellarten durchgeführt. Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurden der MTT-Test an adhärennten Nasenschleimhautzellen sowie die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie an Lymphozyten angewendet. Ein möglicher proinflammatorischer Effekt von Salinomycin wurde mit dem IL-8-ELISA an den Überständen der mit Salinomycin behandelten bzw. der unbehandelten Miniorgnakulturen untersucht (s. Abb. 3).

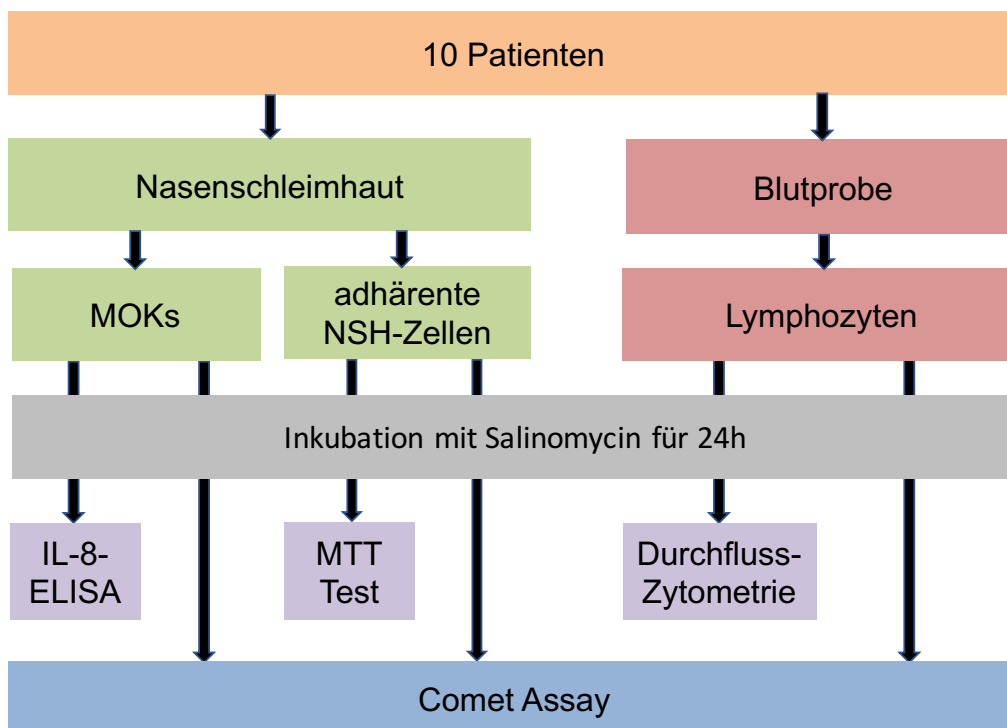


Abbildung 3: Darstellung des Versuchsablaufs: Nach Zellgewinnung und Inkubation der Zellen mit Salinomycin wurde mit allen drei Zellarten der Comet Assay durchgeführt. Zudem erfolgte der IL-8-ELISA mit den Überständen der Miniorgankulturen, der MTT-Test an adhärennten Nasenschleimhautzellen und die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie an Lymphozyten.

2.1 Methodenspezifische Labormaterialien

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma, Ort
CASY-Cups (Cellcountergefäße)	Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
Deckgläser (24x32mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Einmalpipetten: 5 ml, 10 ml und 25 ml	Corning Incorporated, NY, USA
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Pipettenspitzen, 200 µl und 1000 µl	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen, 0,5-10 µl	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Objektträger (ca. 76x26mm/3x1 inch; cut edges, frosted end)	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Reaktionsgefäße 0,5 ml	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße, braun 1,5 ml	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Reaktionsgefäße 2 ml	A. Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Steril-Filter 45 µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickendorf, Deutschland

2.1.2 Reagenzien

Chemikalien	Firma, Ort
Aqua bidestillata	Eigenherstellung
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Agarose Type VII, low melting point (LMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Agarose (MEE0)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aminosäuren (nicht essentiell) 100fach	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Annexin-V-APC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Annexin-V-Binding-Buffer, 10x	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Propidiumiodid Staining Solution (50 µg/ml)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
CASY-Ton	Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim, Deutschland

Material und Methoden

Ethidiumbromid	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Linaris, Wertheim, Deutschland
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Methylmethansulfonat (MMS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Natriumhydroxid-Plättchen	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Natrium-Pyruvat	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natronlauge	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz 30%	Serva, Heidelberg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (1000U/1000µg/ml)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10fach	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Salinomycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Salzsäure 1M	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Salzsäure 5M	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Trishydroxymethyl-aminomethan (TRIS)	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypan 0,4% Blue Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Nährmedien	Firma, Ort
Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM) mit Supplement Packung	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM)	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, Deutschland
Minimum Essential Medium (MEM)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

Enzyme	Firma, Ort
Collagenase P	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DNase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Protease	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin 2,5%	Biochrom AG, Berlin, Deutschland

2.1.3 Lösungen

Agaroselösung für Objektträger

Die Agaroselösung für die Beschichtung der Objektträger wurde aus 1,5 g Normal-Melting-Agarose (1,5 %) und 100 ml einfach konzentriertem PBS durch Erhitzen in der Mikrowelle hergestellt.

Agaroselösung für Zellen

Für die Agaroselösung für das Auftragen der Zellen wurde 50 mg Low-Melting-Agarose (0,5 %) in 10 ml einfach konzentriertem PBS gelöst und in der Mikrowelle erhitzt.

Elektrophoresepuffer

Die Herstellung des Elektrophoresepuffers erfolgte durch Mischen von 120 ml 5M NaOH mit 10 ml EDTA-0,2M-Stammlösung. Anschließend wurde der Puffer mit Aqua bidestillata auf 2 Liter aufgefüllt und kaltgestellt.

Ethidiumbromid-Färbelösung

Für die Ethidiumbromid-Färbelösung wurden 10 mg Ethidiumbromid mit 50 ml Aqua bidestillata vermischt und lichtgeschützt im Kühlschrank gelagert.

Lyselösung

Die Lyselösung wurde durch Vermischen von 0,75 ml Triton X-100, 7,5 ml DMSO (99,5%) und 66,75 ml Lysepuffer hergestellt und daraufhin kaltgestellt.

Lysepuffer

Für den Lysepuffer wurden 67 ml (20 g) N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz, 292,8 g NaCl, 2,4 g Tris und 74,4 g EDTA in 1,8 l Aqua bidestillata gelöst und anschließend mit 5M NaOH auf den pH-Wert 10 eingestellt. Die Lösung wurde dann mit Aqua bidestillata auf 2 Liter aufgefüllt.

TRIS-Neutralisationspuffer (0,4M)

Zur Herstellung des TRIS-Neutralisationspuffers wurden 97 g TRIS mit 1950 ml Aqua bidestillata gemischt, mit 10M HCl auf pH 7,5 eingestellt und anschließend mit Aqua bidestillata auf 2 Liter aufgefüllt.

2.1.4 Geräte und Computerprogramme

Geräte	Firma, Ort
Autoklav	SHP Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland
CO ₂ Inkubator mit Heißluftsterilisation CB210	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Elektrophoresekammern	Renner, Dannstadt, Deutschland
Elektrophoresenetzgerät, EV202	Consort, Turnhout, Belgien
FACSCanto TM flow cytometer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzlampen, ebq 100 ISOLATED	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop SFL 7000	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Heizplatte, M6	CAT/M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Küvetten	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Membran-Vakuumpumpe	ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz, Deutschland
MiniSpin Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Inverses Mikroskop, 473028	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg, Deutschland

Multistepper	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	Brand GmbH, Wertheim, Deutschland
Shaker, ELMI S3	Rose Scientific Ltd, Edmonton, AB, Kanada
Sterile Werkbank, HERAsafe	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Titertek Multiskan PLUS	Labsystems, Helsinki, Finnland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zellzählgerät CASY INNOVATIS	Innovatis AG, Reutlingen, Deutschland
Zentrifuge Hettich UNIVERSAL 16R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

Software	Firma, Ort
Komet 5.5	Kinetic Imaging, Liverpool, UK
Microsoft Excel	Microsoft, Redmond, WA, USA
SPSS Statistics 23	IBM, Armonk, NY, USA

2.2 Gewebeproben

Für die Gewebeproben wurde Nasenschleimhaut der unteren Nasenmuscheln verwendet, die im Rahmen von Conchotomieoperationen an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, plastische und ästhetische Operati-

onen des Universitätsklinikums Würzburg von insgesamt 10 Patienten entnommen wurde. Von den Patienten waren 7 weiblich und 3 männlich, das Alter lag zwischen 21 und 72, wobei das Durchschnittsalter 42,8 Jahre betrug. Zusätzlich wurde von jedem Patienten eine 15 ml Blutprobe entnommen. Die Patienten wurden präoperativ über die Versuchsreihe und die wissenschaftliche Verwendung des Gewebes aufgeklärt und willigten schriftlich ein. Die Studie fand nach Genehmigung durch die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg, Aktenzeichen 16/06, Februar 2006, statt.

2.3 Kultivierung primärer, adhärenter Nasenschleimhautzellen

2.3.1 Gewinnung und Kultivierung von Einzelzellen

Zur Gewinnung der Einzelzellen wurde ein Enzym-Verdau durchgeführt. Dazu wurde der Teil der Nasenschleimhautprobe, der nicht zum Anlegen von Minor-gankulturen verwendet wurde, zunächst mit DMEM-Medium abgespült und von Blutkoageln sowie möglichen Knochenfragmenten befreit. Anschließend wurde das jeweilige Gewebestück in ein 15 ml-Falcon-Tube, in das vorher 9 ml NSH-Medium und 100 µl Enzym „E“ gegeben worden waren, überführt. Das Röhrchen wurde mit Alu-Folie umwickelt und für 24 h bei 4°C auf einer Schüttelplatte gelagert. Zum Abstoppen des Verdau wurden 2 ml FCS in eine Petrischale gegeben und der Inhalt des 15 ml-Tubes hinzugefügt. Die Zellen wurden mit einem Skalpell von der Nasenschleimhautoberfläche abgelöst und die verbleibende Suspension über eine sterile Kompresse in ein 50 ml-Falcon-Röhrchen filtriert. Nach Zentrifugation bei 500 x g und 4°C für 5 Minuten, wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 12 ml BEGM aufgenommen. Jeweils 500 µl der so entstandenen Zellsuspension wurden danach pro Vertiefung auf eine 24-Well-Platte verteilt und zur Kultivierung in den Inkubator gegeben. Daraufhin wurde für 2-3 Wochen unter mikroskopischer Kontrolle des Zellwachstums alle 2 Tage das Medium steril abgesaugt und durch 500 µl frisches Medium ersetzt.

2.3.2 Salinomycinexposition und Zellablösung

Nachdem unter dem Lichtmikroskop zu erkennen war, dass der Boden der Well-Platte dicht bewachsen war, wurden die Zellen mit Salinomycin behandelt. Dazu wurde das Nährmedium abgesaugt und durch 2 ml neues Medium ersetzt. Anschließend wurde Salinomycin in den Konzentrationen 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM , 20 μM und 40 μM hinzugegeben. Für den MTT-Test wurden Konzentrationen bis 175 μM verwendet. Als Negativkontrolle diente das unversetzte BEGM, als Positivkontrolle für die Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet Assay) MMS in einer Konzentration von 175 μM und für den MTT-Test t-BHP in einer Konzentration von 2 mM. Zur Inkubation wurde die 24-Well-Platte für 24 h bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Für die Einzelzellmikrogelelektrophorese wurde am nächsten Tag der Überstand der einzelnen Vertiefungen je in ein 15 ml Falcon-Tube pipettiert. Danach wurde jedes Well mit 500 μl PBS gespült, welches ebenfalls in das jeweilige Röhrchen überführt wurde. Zur Ablösung wurde zu den adhären Zellen jeweils 250 μl Trypsin gegeben und die Platte für 3-5 Minuten im Brutschrank verwahrt. Um die Reaktion im Anschluss daran abzu- stoppen, wurden 750 μl RPMI hinzugefügt und nach Resuspension der abgelösten Zellen zu den bereits in den 15 ml-Tubes gesammelten Überständen gegeben. Diese wurden dann für 5 Minuten bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) und Raumtemperatur zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das erhaltene Zellpellet in 500 μl Medium resuspendiert, um so in 1 ml-Eppendorf-Cups überführt zu werden. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 100 μl abgenommen und mit der Nährmedium-Zell-Suspension ein Comet Assay durchgeführt.

2.4 Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa

2.4.1 Gewinnung und Kultivierung von Miniorgankulturen

Der restliche Teil der gesäuberten Nasenschleimhaut wurde zu Miniorgankulturen verarbeitet. Dazu wurde das Gewebe mit einem sterilen Skalpell in 36 möglichst gleiche Stücke von einer Größe von ca. 1 mm x 1 mm geschnitten. Diese

wurden auf zwei 24-Well-Platten verteilt, so dass sich je ein Miniorgan in einer Vertiefung befand. In jede Vertiefung wurde zuvor 400 μl BEGM gegeben. Die Platten wurden für 2-3 Wochen im Brutschrank aufbewahrt, wobei auch hier das Medium alle 2 Tage steril abgesaugt und durch 500 μl frisches ersetzt wurde.

2.4.2 Salinomycinexposition und Einzelzellgewinnung

Nach einem Zeitraum von 2-3 Wochen wurden die Miniorgankulturen mit Salinomycin behandelt. Die Konzentrationen waren äquivalent zu den für die Behandlung der adhärennten Nasenschleimhautzellen verwendeten Konzentrationen (0,1 μM – 0,5 μM – 1 μM – 5 μM – 10 μM – 20 μM – 40 μM). Als Negativkontrolle diente ebenfalls unversetztes BEGM, als Positivkontrolle MMS in einer Konzentration von 175 μM . Im Anschluss an die Inkubation für 24 h bei 37°C im Brutschrank erfolgte ein Enzym-Verdau zur Gewinnung von Einzelzellen aus den Miniorgankulturen. Dazu wurden je 4 Miniorgane und 600 μl eines Enzym-Mixes, für den 12,5 mg Hyaluronidase, 12,5 mg Collagenase P und 62,5 mg Protease in 10 ml BEGM gelöst und anschließend steril filtriert wurden, in Eppendorf-Cups gegeben. Diese wurden dann für eine Stunde abgedunkelt bei 37°C im Schüttelwasserbad aufbewahrt. Nach Ablösung der Zellen vom Bindegewebe mit Hilfe eines Vortex-Gerätes und Entfernung eventuell noch vorhandener Gewebestücke mit einer Pipettenspitze wurde zur Inaktivierung des Enzym-Mixes 600 μl kaltes FCS zugegeben und die Eppendorf-Cups auf Eis gelagert. Daraufhin wurden diese für 10 Minuten bei 800 rpm und 4°C zentrifugiert, der resultierende Überstand vorsichtig abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 8 Minuten unter oben genannten Bedingungen, wurde der Überstand bis auf 100 μl abgenommen und die so entstandene Zellsuspension zur Durchführung eines Comet Assays verwendet.

2.5 Lymphozyten

2.5.1 Lymphozytenisolierung nach dem Dichtegradient-Verfahren

Die Isolierung von Lymphozyten aus der von jedem Patienten entnommenen Blutprobe erfolgte mit einer Methode nach dem Dichtegradient-Verfahren. Dabei werden die einzelnen Blutbestandteile aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte mit Hilfe eines Separationsmittels durch Zentrifugation voneinander getrennt. Die Bestandteile mit der höchsten Dichte (hier: Erythrozyten und Granulozyten) bilden dabei die unterste Phase, die Bestandteile mit der niedrigsten Dichte (hier: Plasma und Thrombozyten) befinden sich in der obersten Phase. Zur Durchführung wurden zunächst 15 ml des Separationsmediums Biocoll in ein Zentrifugationsröhrchen mit einer speziellen Trennscheibe pipettiert und für 30 Sekunden bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert, so dass sich das Separationsmedium unterhalb dieser Scheibe befand. Die Trennscheibe verhindert zum einen das Vermischen von Medium und Blutprobe, zum anderen auch die Rekontamination der Lymphozyten mit Erythrozyten und Granulozyten nach erfolgter Trennung. Anschließend wurden 15 ml Vollblut hinzugefügt. Nach Zentrifugation für 10 Minuten ohne Bremse bei 1000 x g und Raumtemperatur, kam es zur Auftrennung des Blutes in folgende Phasen: Plasma – Lymphozyten – Separationsmedium – Trennscheibe - Separationsmedium – Erythrozyten und Granulozyten (s. Abb. 4). Zunächst wurde mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig die Plasmaschicht abgetragen, um anschließend den Phasenring der Lymphozyten zu ernten und in ein 15 ml-Falcon-Tube zu überführen.

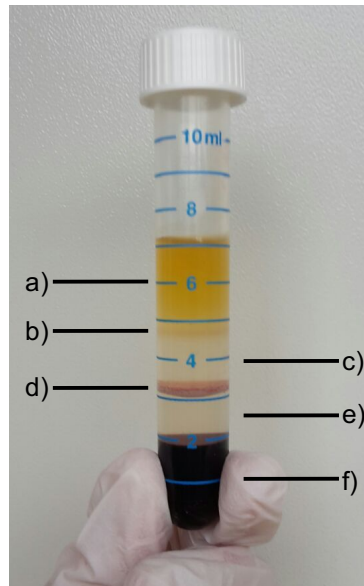


Abbildung 4: Schichtung nach Zentrifugation der Blutprobe: a) Plasma – b) Lymphozyten – c) Separationsmedium – d) Trennscheibe – e) Separationsmedium – f) Erythrozyten und Granulozyten

Die Lymphozyten wurden in 10 ml PBS resuspendiert und für 10 Minuten bei 250 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend verworfen. Dieser Waschschritt wurde zwei Mal mit je 5 ml PBS wiederholt und das daraus resultierende Zellpellet in 5 ml RPMI aufgenommen.

2.5.2 Salinomycinexposition

Vor der Inkubation mit Salinomycin wurde zunächst am CASY-Zellzählgerät die Zellzahl bestimmt und auf 10^5 Zellen pro ml eingestellt. Von dieser Zell-Nährmedium-Suspension wurden dann je 2 ml in eine Vertiefung einer 24-Well-Platte gegeben und mit Salinomycin in den bereits vorher verwendeten Konzentrationen behandelt.

2.6 Untersuchung genotoxischer Effekte mit der Einzelzellmikrogelelektrophorese

2.6.1 Grundlagen der Einzelzellmikrogelelektrophorese

Die Einzelzellmikrogelelektrophorese (Comet Assay) wurde 1984 von Östling und Johanson als Screening-Verfahren zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen eingeführt. [O. Ostling & K.J. Johanson, 1984] Nach Weiterentwicklung durch Singh 1988 konnte sie durch den Einsatz basischer Puffer auch zum Nachweis von Einzelstrangbrüchen verwendet werden. [Singh et al., 1988] Das Prinzip beruht auf einer Wanderung der in Agarose eingebetteten, negativ-geladenen DNA-Bruchstücke innerhalb eines elektrischen Feldes zum Plus-Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Größe des jeweiligen Bruchstückes. Kleinere DNA-Fragmente wandern schneller und deshalb weiter als größere Fragmente, während chromosomale DNA gar nicht erst in der Lage ist den Zellkern zu verlassen. Nach Anfärben der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid kann man somit unter dem UV-Mikroskop intakte runde, von kometenartigen Zellen, die einen Schweif aus fragmentierter DNA besitzen, unterscheiden. Die Größe dieses Schweifes - und damit die Menge der freigesetzten DNA - ist dabei direkt proportional zum Ausmaß des DNA-Schadens. Dieses Verfahren zum Nachweis von Genotoxizität kann also bei allen kernhaltigen Zellen verwendet werden und fand hier Anwendung bei Lymphozyten, adhärennten Nasenschleimhautzellen und Zellen, die aus Miniorgankulturen der Nasenschleimhaut gewonnen wurden.

2.6.2 Durchführung der Einzelzellmikrogelelektrophorese

Zu Beginn wurden die Lyselösung und der Elektrophoresepuffer frisch angesetzt und bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt. Weiterhin wurde die 0,5%ige Agaroselösung II aufgekocht bis sie sich verflüssigt hatte und anschließend bis zur Verwendung ins 30°C warme Schüttelwasserbad gestellt. Auf einer Heizplatte wurden die zur Mischung der Zellsuspension und der Agaroselösung notwendigen Eppendorf-Cups vorgewärmt. Außerdem wurden 18 mit Agarose beschichtete Objektträger bereitgelegt und durchnummeriert, wobei für jede Konzentration je

2 Objektträger vorbereitet wurden. Nach Ernte der jeweiligen Zellart, wurden 180 μl der Agaroselösung und 20 μl der Zellsuspension gemischt, je 60 μl der so entstandenen Agarose-Zellsuspension auf 2 Objektträger aufgetragen und mit einem Deckglas abgedeckt. Diese Schritte wurden für jeden der 9 Ansätze wiederholt. Nach 3-5 Minuten wurde das Deckglas vorsichtig abgenommen und die Präparate zur Lyse für eine Stunde bei 4°C in einer mit Lyselösung gefüllten Küvette lichtgeschützt aufbewahrt. In der Zwischenzeit wurde die Elektrophoresekammer vorbereitet. Dazu wurde sie zunächst mit Eis umgeben und anschließend mit einem Teil des Elektrophoresepuffers gefüllt. Dann wurden die lysierten Präparate mit der Agaroseschicht nach oben der Länge nach in die Elektrophoresekammer gelegt und mit dem Elektrophoresepuffer leicht überschichtet. Leere Plätze wurden mit unbeschichteten Objektträgern aufgefüllt. Um die DNA-Strukturen freizulegen und zu entwinden, wurden die Objektträger für 20 Minuten lichtgeschützt in der Elektrophoresekammer gelagert. Anschließend erfolgte die Elektrophorese, wobei für 20 Minuten eine konstante Spannung von 25 V und eine Stromstärke von 300 mA, die über den Elektrophoresepuffer eingestellt wurde, angelegt wurde. Nach dem Abtropfen der Objektträger, wurden diese zur Neutralisation für 5 Minuten in eine mit TRIS-Neutralisationspuffer gefüllte Küvette gegeben, erneut abgetropft, mit je 20 μl Ethidiumbromidlösung angefärbt und mit einem Deckglas bedeckt. Die Präparate wurden dann in einer feuchten Kammer bei 4°C für maximal eine Woche aufbewahrt. Die Auswertung erfolgte anschließend unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 40facher Vergrößerung. Pro Konzentration wurden jeweils 50 Zellen auf je 2 Objektträgern untersucht und mit der Komet 5.5 Software analysiert. Zur Bewertung der DNA-Schädigung wurden folgende Parameter verwendet (s. Abb. 5):

- Olive Tail Moment (OTM): Produkt aus der Strecke zwischen Kopfmittle und Schweifmitte (Tail Moment Strecke) und dem Anteil der DNA im Schweif
- Tail Length: Strecke der DNA-Migration vom Körper des Zellkerns aus
- Tail DNA: prozentualer Anteil der DNA im Schweif

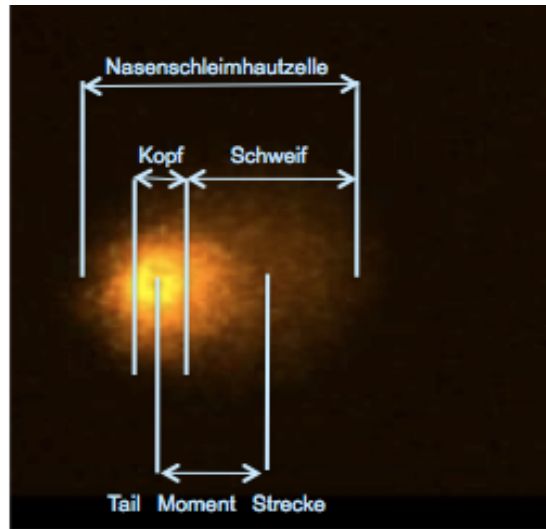


Abbildung 5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Zellkerns nach elektrophoretischer Auftrennung im Comet Assay

2.7 Untersuchung der Zytotoxizität mit dem MTT-Test

2.7.1 Grundlagen des MTT-Tests

Der MTT-Test ist ein Viabilitätstest und wird verwendet, um den Anteil lebender Zellen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle zu bestimmen. Das Prinzip dieses Testes beruht auf der Reduktion des löslichen gelben Tetrazoliumsalses 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu blauem unlöslichen Formazan. Diese Reaktion ist von der Aktivität sowohl der Enzyme des Endoplasmatischen Retikulums als auch der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase abhängig, da als Reduktionsäquivalente vor allem NADH und NADPH und teilweise auch Succinat dienen.

2.7.2 Durchführung des MTT-Tests

Zur Durchführung des MTT-Tests musste zunächst 5 mg MTT abgewogen und in 10 ml DMEM ohne Zusätze gelöst werden. Dann wurde die Inkubationslösung

der vorbehandelten Zellen steril abgesaugt und je 500 µl der vorbereiteten Lösung pro Vertiefung auf der 24-Well-Platte verteilt. Die so behandelten Zellen wurden anschließend für 4 h bei 37°C im Brutschrank aufbewahrt. Daraufhin wurde die MTT-Lösung abgesaugt und je 500 µl Isopropanol zu den Zellen gegeben. Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 100 µl der Farbstofflösung in eine Vertiefung einer 96-Well-Platte pipettiert. Pro Konzentration wurden 3 Vertiefungen gefüllt. Anschließend wurde mit dem ELISA-Reader die optische Dichte bei 570 nm bestimmt.

2.8 Apoptosedetektion durch die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie

2.8.1 Grundlagen der Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie

Der Annexin-Test bietet die Möglichkeit, Zellen in frühen Formen der Apoptose zu erkennen und von lebenden sowie nekrotischen Zellen zu unterscheiden.

In der intakten Zelle befindet sich Phosphatidyl-Serin (PS), ein Glycerophospholipid, auf der Innenseite der Zellmembran. Kommt es nun zur Einleitung der Apoptose, wird es auf die Außenseite transloziert. Dieser Mechanismus dient der Erkennung und Phagozytose der apoptotischen Zelle durch Makrophagen, so dass Entzündungsreaktionen im Organismus verhindert werden können. Annexin V, ein Ca^{2+} abhängiges Phospholipid-bindendes Protein, weist eine hohe Affinität für PS auf, d. h., es bindet an das außenliegende PS und kann so mit dem Reaktivfarbstoff Fluoresceinisothiocyanat (FITC-Annexin V) markiert zur Apoptosedetektion genutzt werden. Bei nekrotischen Zellen allerdings kommt es dazu, dass die Zellmembran instabil und dadurch durchlässig wird. FITC-Annexin kann so in die Zellen eindringen und an das PS an der Innenseite binden. Würde man die Zellen nur mit FITC-Annexin färben, wäre also keine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen möglich. Deshalb kombiniert man Annexin V mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid, der nur Zellen mit durchlässiger Membran anfärben kann. Somit können Annexin-negative und Propidiumiodid-negative (→lebende Zellen), Annexin-positive und Propidiumiodid-negative

(→apoptotische Zellen) sowie Annexin-positive und Propidiumiodid-positive Zellen (→nekrotische Zellen) unterschieden werden.

2.8.2 Durchführung der Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie

Zur Apoptosebestimmung wurden die behandelten Zellen zunächst geerntet und in ein FACS-Röhrchen überführt. Dieses wurden bei 500 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl Annexin-Binding-Buffer resuspendiert. Anschließend wurden je 5 µl Annexin-V-APC sowie Propidiumiodid-Lösung hinzugefügt, die Röhrchen vorsichtig gevortext und für 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Nach Zugabe von 400 µl Binding-Buffer und erneutem Vortexen konnte die Apoptose rate mit dem FACS-Gerät bestimmt werden.

2.9 IL-8-Nachweis durch den ELISA

2.9.1 Grundlagen des ELISA

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein immunologisches Verfahren zum Nachweis von Proteinen und Viren sowie einiger niedermolekularer Verbindungen. Das Prinzip beruht auf der Bildung bestimmter Antigen-Antikörper-Komplexe. Für den Sandwich-ELISA werden zwei für das nachzuweisende Antigen spezifische Antikörper benötigt. Der erste Antikörper, auch capture antibody genannt, ist an eine feste Phase, hier an eine Mikrotiterplatte, gebunden. Durch Zugabe der Probe und Inkubation wird das Antigen an den Antikörper gebunden, ungebundene Bestandteile werden durch mehrere Waschschrte entfernt. Anschließend wird ein zweiter Antikörper, der detection antibody, hinzugefügt. Dieser bindet ebenfalls an das Antigen, so dass ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. An diesen zweiten Antikörper ist die Meerrettichperoxidase als Enzym gebunden. Nach Zugabe eines passenden chromogenen Substrats, wird dieses vom Enzym zu einem Reaktionsprodukt umgesetzt, welches durch Farbumschlag zur Detektion und Quantifizierung des zu bestimmenden Antigens verwendet werden kann.

2.9.2 Durchführung des IL-8-ELISA

Für den IL-8-ELISA-Test wurden die bei -20°C tiefgefrorenen Überstände der mit Salinomycin behandelten bzw. der unbehandelten Miniorgankulturen am Versuchstag bei Raumtemperatur aufgetaut und unverdünnt verwendet. Die Durchführung des Tests erfolgte mit dem IL-8-ELISA-Kit von Diaclone SAS. Zur Auswertung wurde die Farbintensität bei 450 nm mit dem ELISA-Reader gemessen.

2.10 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden Boxplots verwendet, welche mit der Software SPSS Statistics 23.0 erstellt wurden. Boxplots bieten einen guten Überblick über Lage und Streuung einer Datenverteilung. Sie bestehen aus einer Box, in der 50% der Daten liegen. Die untere Grenze dieser Box entspricht dabei dem unteren Quartil, die obere dem oberen Quartil. 25% der Werte liegen unterhalb des unteren Quartils, 75% aller Werte liegen unterhalb des oberen Quartils. Die Länge der Box entspricht somit dem Interquartilabstand (IQR) und ist ein Maß für die Streuung der Daten. Der Median unterteilt das gesamte Diagramm in 2 Hälften, in denen je 50% der Werte liegen. Werte außerhalb der Box werden durch „Whiskers“ bis zu einem Abstand von 1,5 Interquartilabständen angezeigt (s. Abb. 5). Ein „Whisker“ endet dabei beim letzten Wert, der noch innerhalb dieser Grenze liegt. Werte außerhalb dieser Grenze werden als Ausreißer bezeichnet und durch einen Kreis dargestellt,

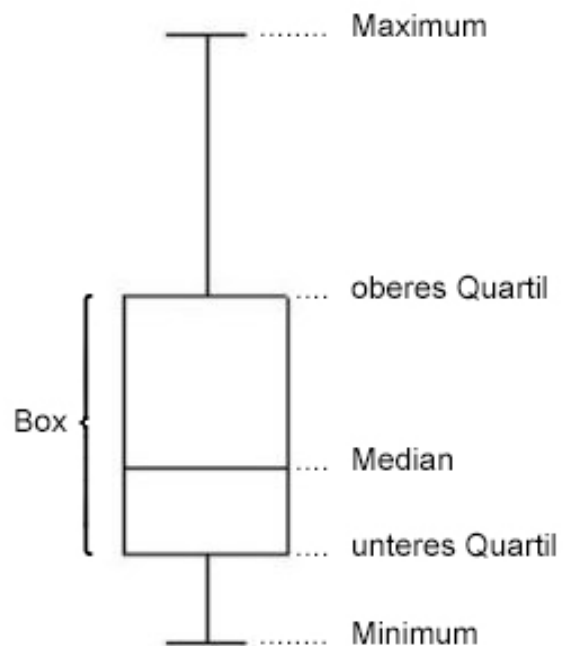


Abbildung 6: Aufbau eines Boxplots

Werte mit einem Abstand von mehr als 3 Interquartilabständen bezeichnet man als Extremwerte gekennzeichnet durch einen Stern.

2.11 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte ebenfalls mit dem Programm SPSS Statistics 23.0. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Als statistische Testverfahren wurden der Wilcoxon-Test und der Friedman-Test verwendet. Der Wilcoxon-Test ist ein nichtparametrischer statistischer Test, der dem Vergleich zweier abhängiger Stichproben bzgl. ihrer zentralen Tendenzen (Mediane) dient. Die Werte einer Verteilung müssen dabei nicht normalverteilt sein. Hier wurde er zur Überprüfung der Signifikanz der Werte der jeweiligen Salinomycin-Konzentration im Vergleich zur Negativkontrolle eingesetzt. Der Friedman-Test ist ebenfalls ein nichtparametrisches Testverfahren und dient der Untersuchung von mehr als zwei abhängigen Stichproben auf Gleichheit des Lageparameters. Verwendet wurde er zum Vergleich der Durchschnittswerte der einzelnen Salinomycin-Konzentrationen und der Negativkontrolle.

3 Ergebnisse

Im folgenden Teil der Arbeit werden zunächst die Ergebnisse der Genotoxizitätsuntersuchung mit dem Comet Assay an adhärennten Nasenschleimhautzellen, Miniorgankulturen und Lymphozyten dargestellt. Im Anschluss erfolgt die Beschreibung der zytotoxischen Effekte und des Apoptoseverhaltens sowie der Ergebnisse des IL-8-ELISA.

3.1 Genotoxizitätsuntersuchung

Die genotoxischen Effekte von Salinomycin werden im Folgenden anhand der statistischen und graphischen Auswertung der Olive Tail Momente (OTM) dargestellt. Die Werte sowohl der OTMs als auch der Tail DNS und Tail Length werden im Anhang unter 6.2 mit Mittelwert, Median und Standardabweichung angegeben.

3.1.1 Ergebnisse der Einzelzellmikrogelelektrophorese in adhärennten Nasenschleimhautzellen

Wie in Abbildung 7 ersichtlich lagen die OTM-Medianwerte der jeweiligen Salinomycin-Konzentrationen zwischen 0,684 und 1,258. Im Wilcoxon-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Negativkontrolle und den einzelnen Salinomycin-Konzentrationen. Lediglich die Positivkontrolle zeigte eine signifikante DNA-Schädigung. Der Friedman-Test war mit $p=0,321$ nicht signifikant.

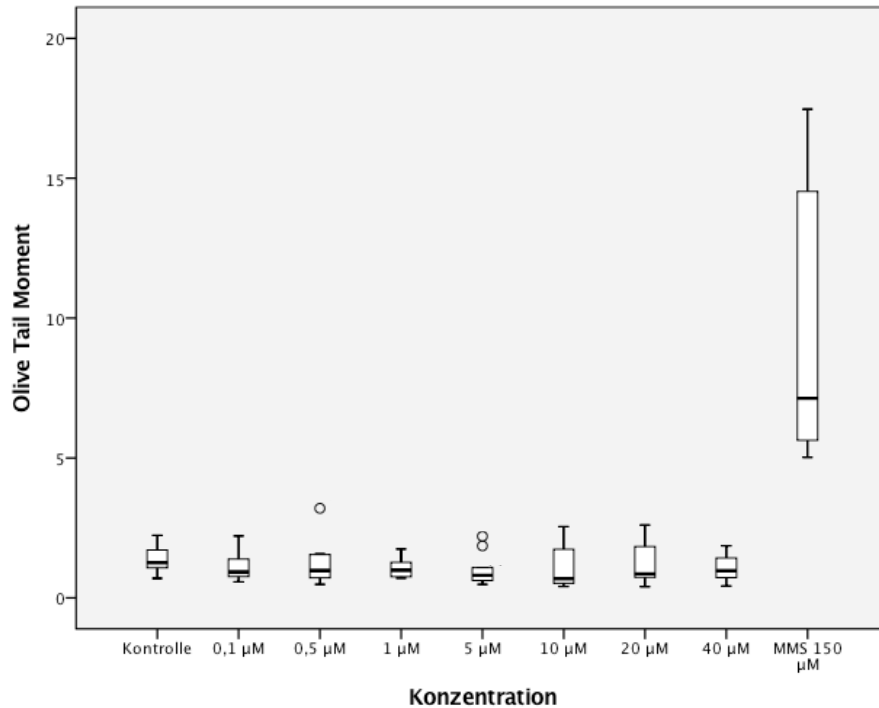


Abbildung 7: DNA-Schädigung in adhärennten Nasenschleimhautzellen nach Inkubation mit Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 µM bis 40 µM für 24 h; °: Ausreißer, *: Extremwert

3.1.2 Ergebnisse der Einzelzellmikroelektrophorese in Miniorgankulturen

Bei der Untersuchung der OTM-Medianwerte der Miniorgankulturen zeigte sich im Wilcoxon-Test kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Friedman-Test war mit $p=0,444$ ebenfalls nicht signifikant. Die OTM-Mediane lagen zwischen 0,953 und 0,696 (s. Abb. 8).

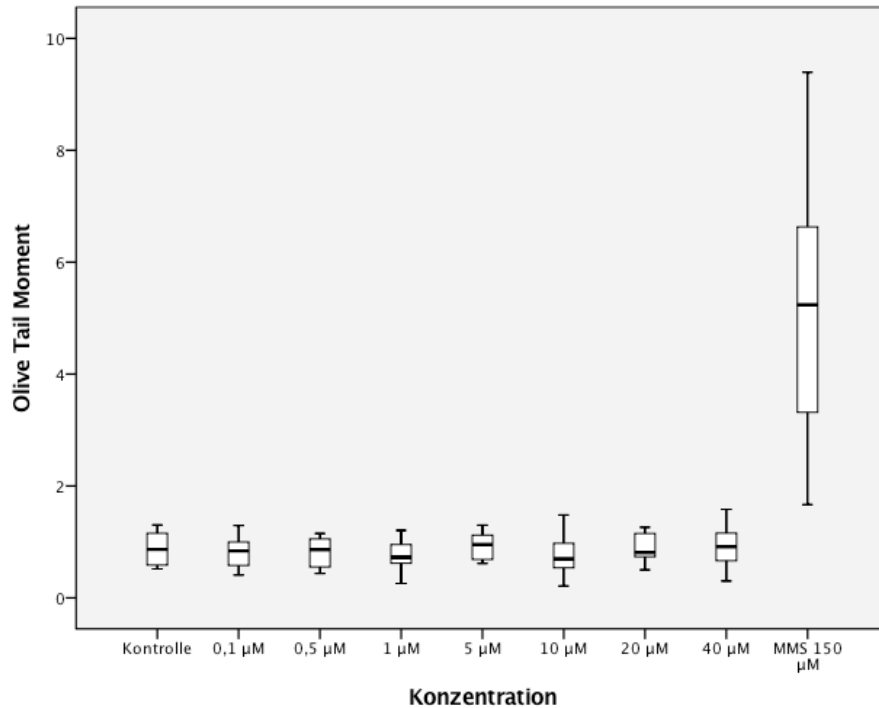


Abbildung 8: DNA-Schädigung in Miniorgankulturen nach Inkubation mit Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 µM bis 40 µM für 24 h; °: Ausreißer, *: Extremwert

3.1.3 Ergebnisse der Einzelzellmikrogelelektrophorese in Lymphozyten

Bei der Untersuchung der DNA-Schädigung in Lymphozyten zeigte sich kein signifikanter Unterschied der Median-Werte der einzelnen Stoffkonzentrationen im Vergleich zur Negativkontrolle. Die Mediane lagen zwischen 1,229 und 0,590 (s. Abb. 9). Der Friedman-Test war mit $p=0,051$ nicht signifikant.

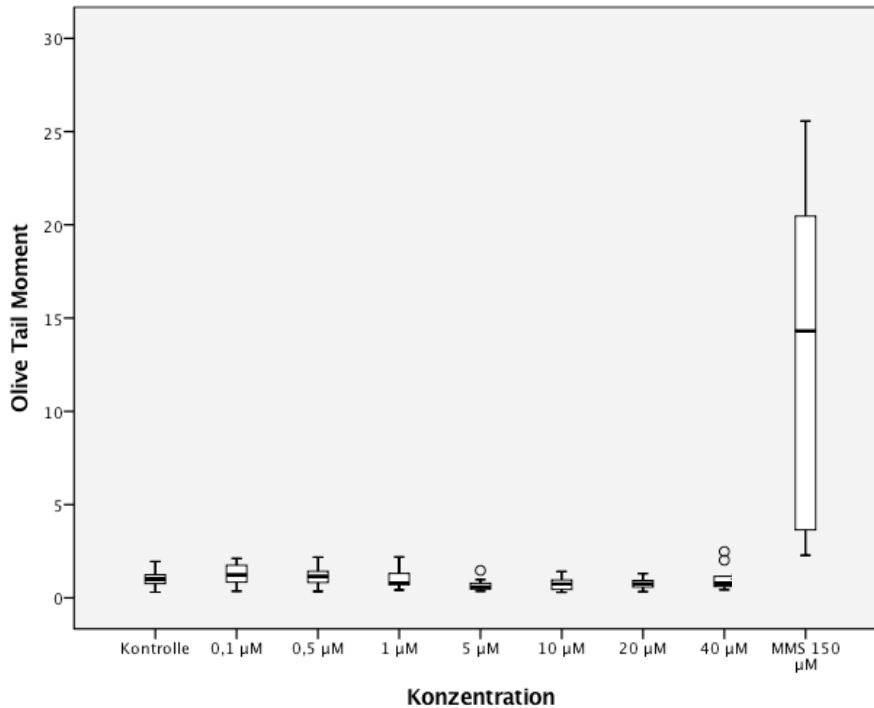


Abbildung 9: DNA-Schädigung in Lymphozyten nach Inkubation mit Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 µM bis 40 µM für 24 h; °: Ausreißer, *: Extremwert

3.2 Zytotoxizitätsnachweis durch den MTT-Test

In der Hellfeld-Mikroskopie wiesen die für den MTT-Test mit Salinomycin inkubierten Nasenschleimhautzellen im Vergleich zu den unbehandelten Nasenschleimhautzellen apoptotische bzw. nekrotische Veränderungen auf. Wie in Abbildung 10 zu erkennen, imponierten die mit 175 µM Salinomycin behandelten Zellen abgerundet und aufgetrieben im Sinne einer Nekrose. Die unbehandelten Zellen dagegen wirkten spitz zulaufend und adhärent (s. Abb. 10 und Abb. 11). Bei der statistischen Auswertung des MTT-Tests zeigte sich ab einer Salinomycin-Konzentration von 20 µM ein signifikant höherer zytotoxischer Effekt im Vergleich zur Negativkontrolle. Der Anteil lebender Zellen sank mit zunehmender Konzentration (s. Abb. 12). Der Friedman-Test war mit $p < 0,05$ signifikant.

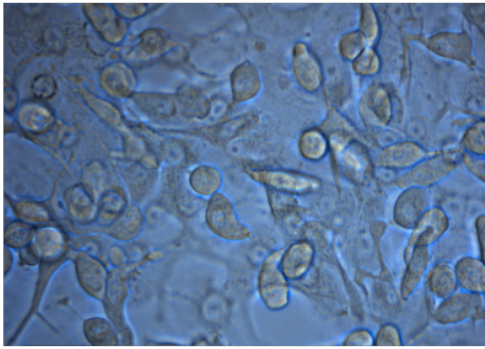


Abbildung 10: Hellfeldmikroskopische Aufnahme von vitalen Nasenschleimhautzellen kultiviert in Nährmedium

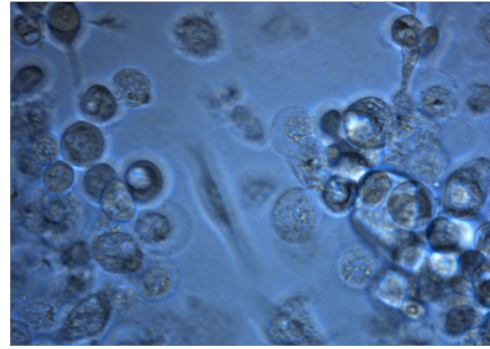


Abbildung 11: Hellfeldmikroskopische Aufnahme von Nasenschleimhautzellen kultiviert mit 175 µM Salinomycin; die Zellen zeigen sich nekrotisch verändert

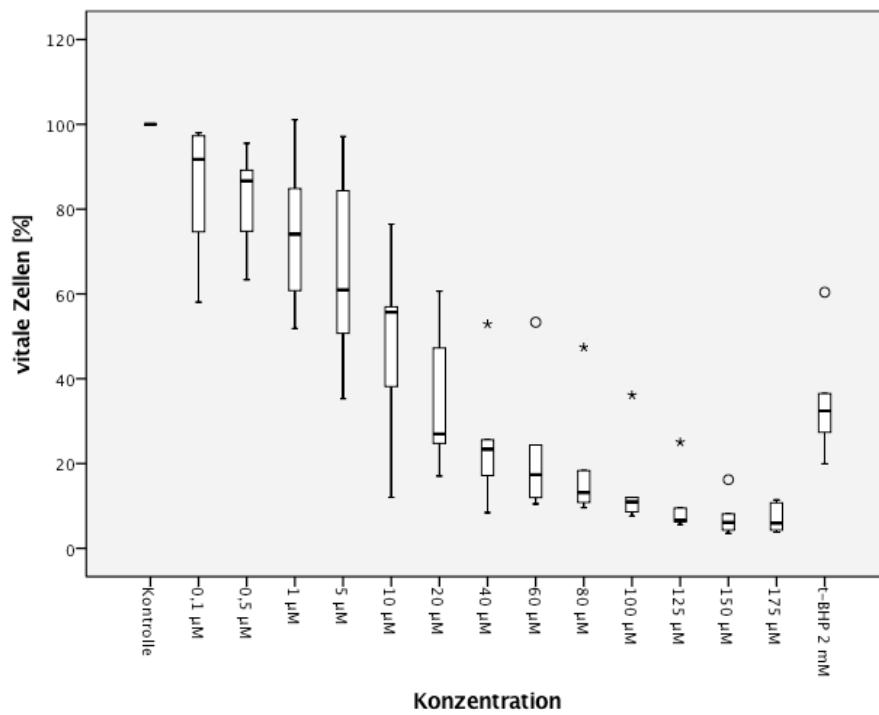


Abbildung 12: Darstellung der zytotoxischen Wirkung von Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 µM bis 175 µM; °: Ausreißer, *: Extremwert

3.3 Apoptosenachweis durch die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie

Wie bereits beschrieben, kann durch die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie zwischen lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. Nach Analyse mit dem FACS-Gerät erhält man sog. Dotplots, die in vier Quadranten unterteilt sind (s. Abb. 13). Der Anteil der lebenden Zellen wird dabei in Quadrant 3 dargestellt, der Anteil der apoptotischen in Quadrant 4 und der Anteil der nekrotischen in Quadrant 2. Ab einer Salinomycin-Konzentration von 10 μM zeigten sich bereits ein signifikanter Anstieg sowohl der apoptotischen (s. Abb. 15) als auch der nekrotischen Zellen (s. Abb. 16) sowie eine Abnahme der vitalen Zellen (s. Abb. 14). Dabei nahm zunächst bis zu einer Konzentration von 20 μM der Anteil der apoptotischen Zellen stärker zu, danach überwog der Anteil der nekrotischen Zellen. Der Friedman-Test war mit $p < 0,05$ signifikant.

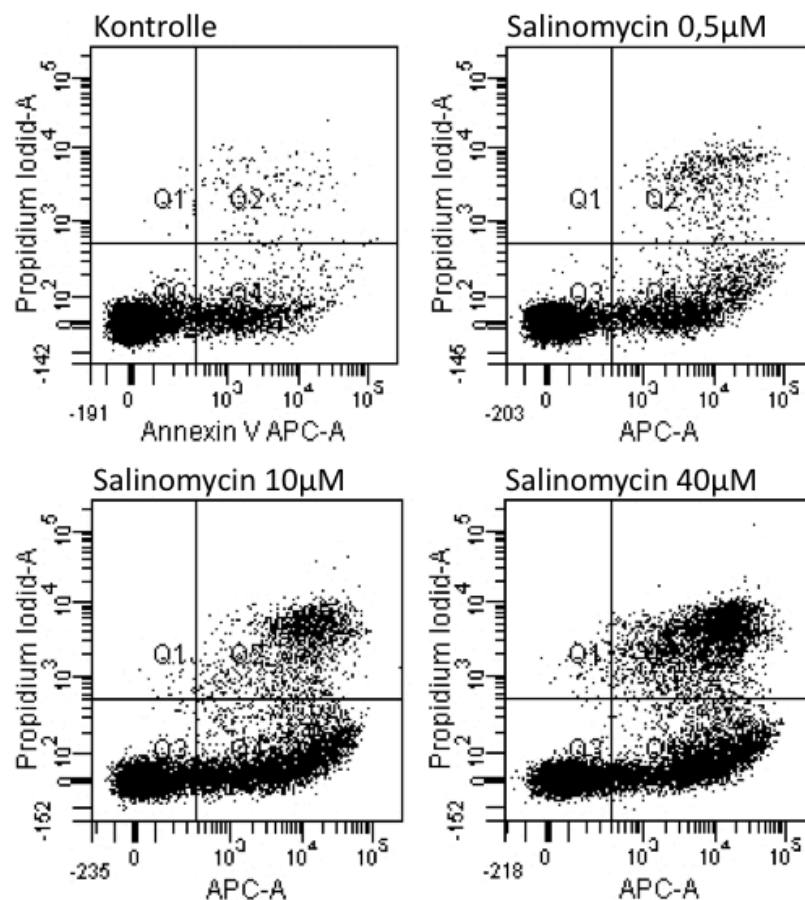


Abbildung 13: Dotplots zu den Ergebnissen der Annexin-Propidiumjodid-Durchfluss-Zytometrie nach Behandlung von Lymphozyten mit Salinomycin in verschiedenen Konzentrationen

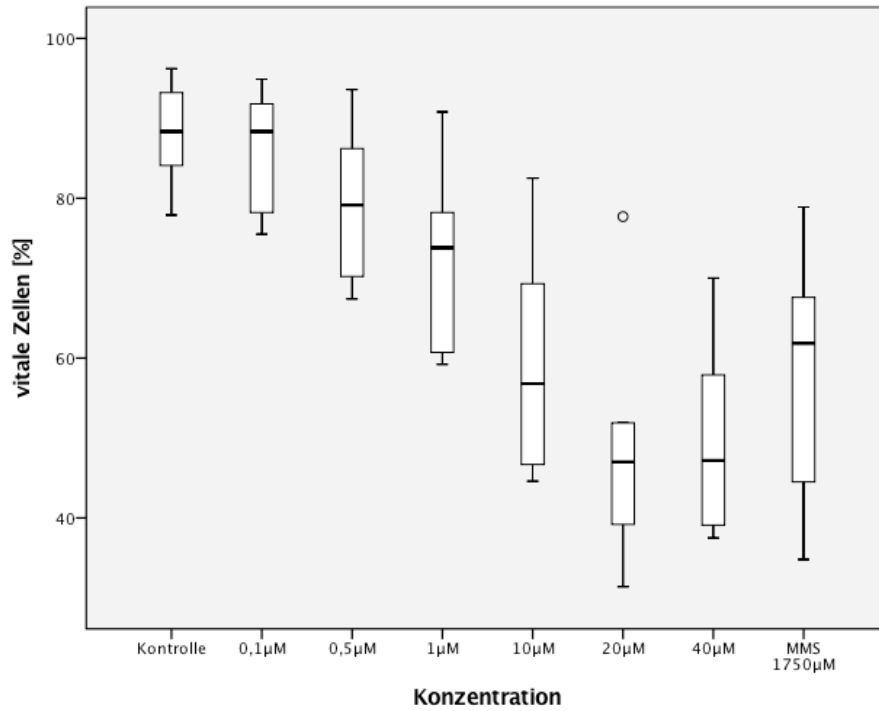


Abbildung 14: Darstellung der Wirkung von Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 µM bis 40 µM auf den Anteil vitaler Zellen; °: Ausreißer, *: Extremwert

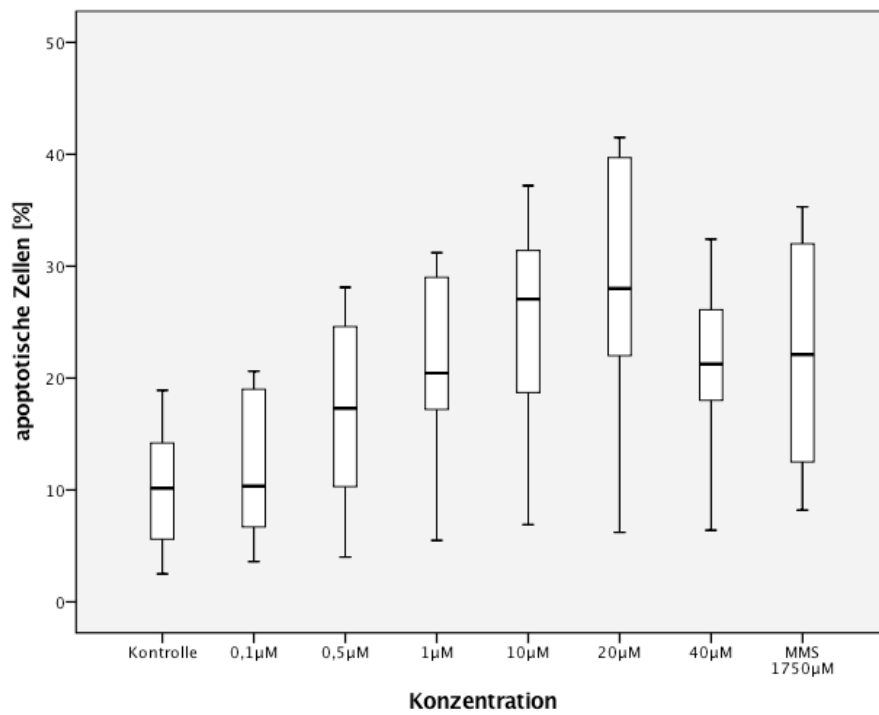


Abbildung 15: Darstellung der Wirkung von Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 µM bis 40 µM auf den Anteil apoptotischer Zellen; °: Ausreißer, *: Extremwert

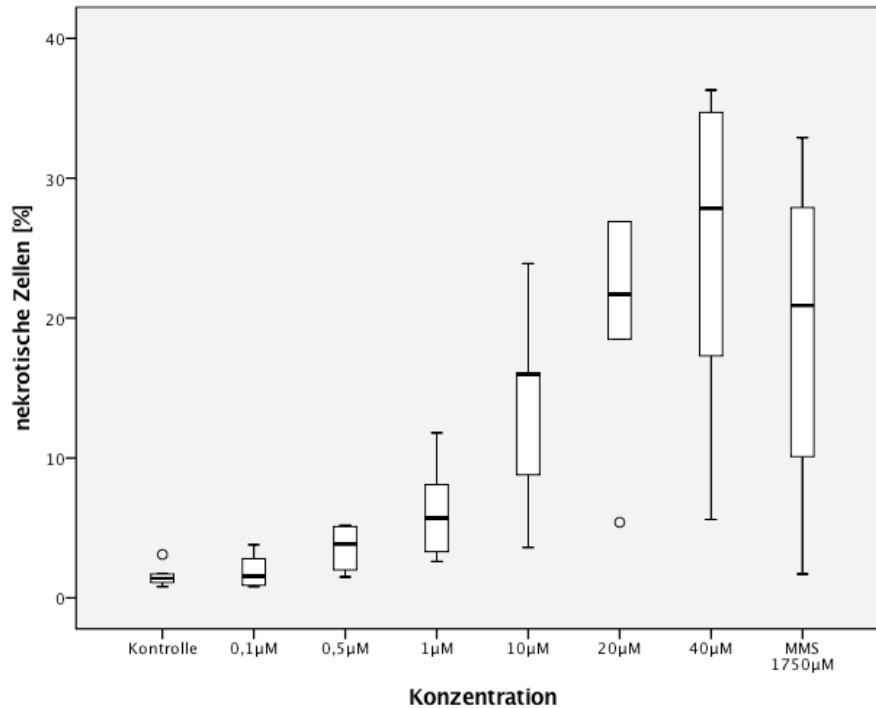


Abbildung 16: Darstellung der Wirkung von Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 μM bis 40 μM auf den Anteil nekrotischer Zellen; °: Ausreißer, *: Extremwert

3.4 Ergebnisse des IL-8-ELISA

Zum Nachweis einer möglichen proinflammatorischen Wirkung von Salinomycin wurde die Konzentration des Entzündungsmediators IL-8 in den Überständen der Miniorgankulturen mittels ELISA bestimmt. Es konnte kein signifikanter Anstieg von IL-8 in den Überständen der mit Salinomycin behandelten Miniorgankulturen im Vergleich zu den Überständen der nur mit BEGM kultivierten Miniorgankulturen nachgewiesen werden (s. Abb. 17). Der Friedman-Test war allerdings mit $p=0,023$ signifikant.

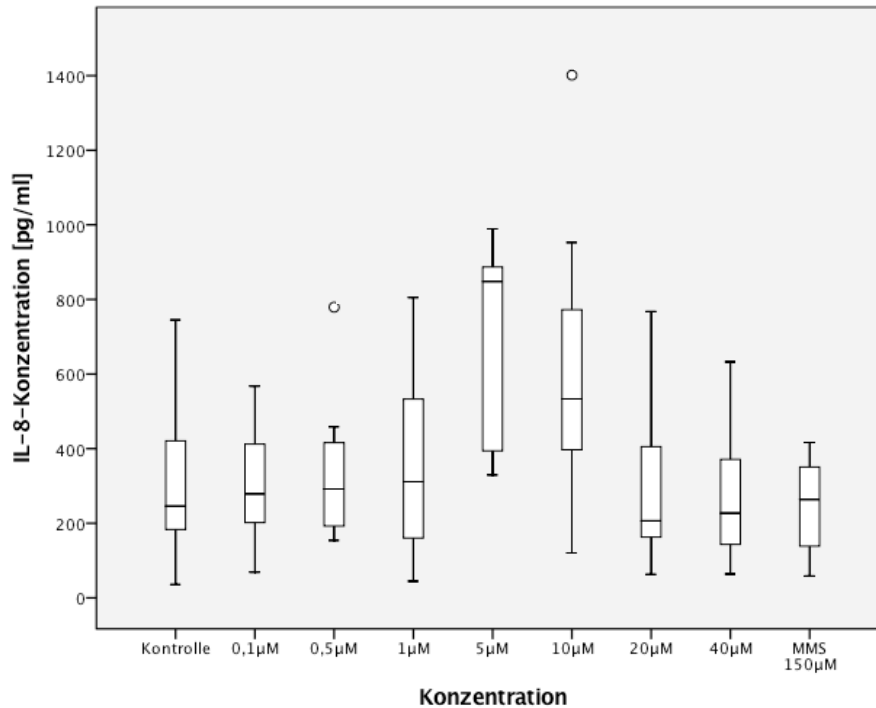


Abbildung 17: IL-8-Konzentration in den Überständen der mit Salinomycin inkubierten Miniorgankulturen; °: Ausreißer, *: Extremwert

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde die Geno- und Zytotoxizität sowie eine mögliche proinflammatorische Wirkung von Salinomycin in Lymphozyten, Miniorgankulturen nasaler Mukosa und adhärenen Nasenschleimhautzellen untersucht. In der Einzelzellmikrogelelektrophorese konnte für keine der drei Zellarten eine genotoxische Wirkung von Salinomycin in den verwendeten Konzentrationen nachgewiesen werden. Im MTT-Test zeigte sich ab einer Konzentration von 20 µM ein zytotoxischer Effekt von Salinomycin. Dieser konnte auch in der Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie belegt werden. Ab einer Konzentration von 10 µM nahm der Anteil der vitalen Zellen signifikant ab und der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen zu. Im IL-8-ELISA wurde bei Salinomycin-Konzentrationen von 5 µM und 10 µM ein Anstieg der IL-8-Konzentration beobachtet, was für eine proinflammatorische Wirkung von Salinomycin in diesen Konzentrationen spricht.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Gewebeproben und Präparationsmethoden

In der vorliegenden Arbeit wurde die Geno- und Zytotoxizität von Salinomycin in nicht-malignen humanen Zellen untersucht. Die Einzelzellmikrogelelektrophorese wurde an adhärennten Nasenschleimhautzellen, Miniorgankulturen der Nasenschleimhaut und an Lymphozyten durchgeführt. Für den MTT-Test wurden ebenfalls adhärennte Nasenschleimhautzellen und für die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie Lymphozyten verwendet.

Repräsentativ für die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes wurde für die Durchführung der Versuche dieser Arbeit Nasenschleimhaut ausgewählt, die intraoperativ gewonnen und auf zwei verschiedene Arten aufbereitet wurde. Ein Teil des Gewebes wurde zur Gewinnung von Einzelzellen verwendet (s. 2.5), der andere für die Anlage von Miniorgankulturen (s. 2.4). Die Kultivierung von adhärennten Einzelzellen ist zwar ein etabliertes Modell, es birgt aber auch Nachteile, wie die geringe Lebensdauer der Zellen und der Verlust der Zellinteraktionen, die die Imitation einer *in vivo*-ähnlichen Situation verhindert. [Merkle et al., 1998]

Miniorgankulturen als Zellkultur-Modell für respiratorisches humanes Epithel wurden erstmals 1991 von Steinsvag et al. beschrieben. Fragmente aus adenoidem Gewebe wurden für 40 Tage kultiviert. Während dieses Zeitraumes konnte ein intakter Zilienschlag beobachtet werden. [Steinsvag et al., 1991] Neben der langen Lebensdauer, stellt auch die *in vivo*-ähnliche Situation, die durch den Verbleib der Zellen in ihrem epithelialen Strukturverband geschaffen wird, einen Vorteil dieser Kultivierungsmethode dar. So konnten Kleinsasser et al. zeigen, dass Miniorgankulturen im Vergleich zu Einzelzellen v. a. gegenüber repetitiver Fremdstoffexposition unempfindlicher waren. [Kleinsasser et al., 2004] Aufgrund der lebensnahen Bedingungen, die dieses Modell bietet, werden Miniorgankulturen auch in anderen Gewebearten zur Untersuchung von Gewebeeigenschaften oder zur Beurteilung toxischer Effekte verschiedener Xenobiotika verwendet. So

wurde z.B. die Hormonproduktion von Schilddrüsengewebe anhand von Miniorgankulturen untersucht. [Hayakawa et al., 1993] Weitere Beispiele für die Anwendung von Miniorgankulturen sind die Untersuchung der Genotoxizität von Nikotin in Miniorgankulturen der Glandula parotis [Ginzkey et al., 2010], die Beurteilung der Genotoxizität von Tamoxifen in Endometriumgewebe [Carmichael et al., 1996] oder die Darstellung der Sekretion, Proliferation und Differenzierung von Bronchialepithel [Bals et al., 1998]. Auch wenn diese Form der Zellkultur den *in vivo*-Bedingungen sehr nahekommt, besteht dennoch eine Diskrepanz zu lebenden Organismen. Eine Vielzahl äußerer Faktoren, wie beispielsweise die Versorgung der Zellen durch den Organismus, spielt hier eine wichtige Rolle. Um diese Umgebung so gut wie möglich nachzuahmen, wurden die Miniorgankulturen in einem Nährmedium kultiviert, das alle 2 Tage gewechselt wurde. Dadurch wurden die Versorgung mit Nährstoffen und die Entfernung möglicher Stoffwechselabbauprodukte gewährleistet. Unter dem inversen Mikroskop konnte während der gesamten Kultivierungszeit ein intakter Zilienschlag beobachtet werden, so dass von einer erhaltenen Vitalität auszugehen war.

Zusätzlich zu den Versuchen an Nasenschleimhautgewebe, wurde die Toxizität von Salinomycin auch in Lymphozyten untersucht. Diese Zellart wurde gewählt, da sie zum einen durch eine Blutentnahme einfach zu gewinnen ist und zum anderen hinsichtlich einer systemischen Medikamentengabe als Bestandteil des peripheren Blutes von der Toxizität eines Medikamentes unmittelbar betroffen ist.

4.1.2 Einzelzellmikrogelelektrophorese

Die Einzelzellmikrogelelektrophorese ist eine relativ schnelle, einfache und sensitive Methode zur Analyse von DNA-Schäden in kernhaltigen Zellen. Dieses Testverfahren wurde erstmals 1984 zum Nachweis strahleninduzierter DNA-Schäden an Brustdrüsenzellen vorgestellt. Es handelte sich dabei um die neutrale Form des Comet Assays, die dem Nachweis von Doppelstrangbrüchen diente. [O. Ostling & K. J. Johanson, 1984] Mit der Weiterentwicklung des Comet Assays durch Verwendung von basischen Puffern konnten auch Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen detektiert werden. [Olive et al., 1990; Singh et al.,

1988] Die Einzelzellmikrogelelektrophorese gewann dadurch immer mehr an Bedeutung und wurde so zu einem Standardverfahren zur Beurteilung von DNA-Schäden in Bereichen wie Genotoxikologie, Ökotoxikologie und im Biomonitoring. Neben dem Nachweis von DNA-Strangbrüchen, kann der Comet Assay auch zur Untersuchung der Reparaturkapazität der Zellen verwendet werden. [Harréus et al., 2001] So konnten beispielsweise in mit H_2O_2 behandelten Lymphozyten Reparaturmechanismen bzw. deren Geschwindigkeit genauer untersucht werden. [Torbergsen & Collins, 2000]

Unter alkalischen Bedingungen kann es zur Ausbildung sog. „hedgehog comets“ kommen. Das sind Kometen mit einem sehr kleinen oder nicht vorhandenen Kopf und einem diffusen Kometenschweif, die häufig als apoptotische oder nekrotische Zellen gedeutet werden. Gegen diese Interpretation sprechen allerdings mehrere Gründe. Zum einen hat sich gezeigt, dass Zellen, die mit nicht-letalen Konzentrationen von H_2O_2 behandelt wurden zwar „hedgehog comets“ ausbilden, diese nach DNA-Reparatur aber nicht mehr zu sehen waren. [Collins et al., 1995] Da die Apoptose als irreversibel gilt, dürfen die „hedgehog comets“ hier nicht als Ausdruck dieser gewertet werden. Zum anderen ist die Apoptose durch eine DNA-Fragmentierung in Nukleosom-Oligomere gekennzeichnet. Man geht davon aus, dass so kleine DNA-Fragmente wohl während der Lyse oder der Elektrophorese verloren gehen würden und deshalb die Ausbildung von „hedgehog comets“ nicht möglich wäre. [Morley et al., 2006]

Zum Ausschluss von avitalen Zellen wird dennoch häufig vor der Durchführung eines Comet Assays der Trypanblauausschlusstest angewendet. Auch für die Versuche in dieser Arbeit wurde die Zellvitalität mittels Casy-Zellzähler und stichprobenartig mittels Trypanblauausschlusstest bestimmt und Zellproben mit einer geringen Vitalität verworfen, so dass eine Verfälschung der Ergebnisse durch avitale Zellen ausgeschlossen werden konnte. Die Einzelzellmikrogelelektrophorese ist somit eine sehr sensitive Methode zur Detektion von DNA-Schäden.

Es gibt allerdings noch weitere Tests zum Nachweis von Genotoxizität, im Folgenden werden einige von ihnen kurz erläutert. Der am häufigsten eingesetzte Genotoxizitätstest ist der sog. „Ames-Test“ oder auch Rückmutationstest. Er wird an verschiedenen Bakterienstämmen von *Salmonella typhimurium* durchgeführt,

die aufgrund von Mutationen bestimmte Aminosäuren nicht selbst herstellen können. Kommt es nun durch Hinzufügen einer Testsubstanz zu einer Rückmutation, können die Bakterien diese Aminosäure wiederherstellen. Zwar handelt es sich hierbei um eine schnelle und günstige Methode zur Detektion von Genotoxizität, mit dem „Ames-Test“ können allerdings nur Genmutationen und somit keine Chromosomen- oder Genommutationen nachgewiesen werden. Auch lassen sich die Ergebnisse nicht ohne weiteres auf den Menschen oder andere Organismen übertragen, da die Pharmakokinetik und Metabolisierung der Testsubstanz beachtet werden muss. Anders als in unserer Versuchsreihe ist keine Differenzierung der Wirkung von Salinomycin auf verschiedene Zellarten möglich. Der Chromosomenaberrationstest dient der Quantifizierung von mikroskopisch sichtbaren strukturellen Chromosomenveränderungen, die anhand von Metaphase-Chromosomen-Präparaten untersucht werden. Es handelt sich dabei im Gegensatz zur Einzelzellmikrogelelektrophorese um ein sehr aufwendiges Testverfahren. Der Mikrokerntest beruht auf dem Nachweis sog. Mikrokerne und kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt werden. Diese entstehen, wenn bei der Mitose Chromosomenstücke oder selten auch ganze Chromosomen nicht auf einen der neuen Tochterkerne verteilt werden. In der Tochterzelle bildet sich dann eine eigene Membran um das Chromatin. Nach Fixierung und Färbung kann der so entstandene Mikrokern im Zytoplasma als DNA-haltige Struktur mikroskopisch detektiert werden. Wie die Einzelzellmikrogelelektrophorese zählt auch der Mikrokerntest mittlerweile zu den standardmäßigen Testverfahren zum Nachweis von Genotoxizität. Er ist allerdings nur für proliferierende Zellen anwendbar und aufgrund der Auswertung am Fluoreszenzmikroskop durch eine Person aufwendiger und weniger objektiv. Die in dieser Studie angewandte Einzelzellmikrogelelektrophorese bietet durch die computergestützte Auswertung eine höhere Genauigkeit, sie ist einfach und schnell durchzuführen und günstig. Eine Einschränkung des Comet Assays besteht darin, dass zwar DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen detektiert werden können, andere Aspekte der Genotoxizität, wie beispielsweise Quervernetzungen der DNA, allerdings nicht erkannt werden.

4.1.3 MTT-Test

Der MTT-Test zählt zu den Zellviabilitätstests und ist somit zur Untersuchung der Zytotoxizität einer Testsubstanz geeignet. Sein Vorteil besteht darin, dass sich die Zellviabilität und damit auch die Zytotoxizität schnell und mit großen Probenmengen bestimmen lassen. Der Nachweis der Zellviabilität erfolgt durch Reduktion des namensgebenden Farbstoffs 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu einem blauen, unlöslichen Formazan. [Mosmann, 1983] Diese Reaktion ist hauptsächlich von den Reduktionsäquivalenten NADH und NADPH abhängig. [Berridge et al., 2005; Berridge & Tan, 1993] Der MTT-Test dient also genau genommen der Bestimmung der metabolischen Aktivität einer Zelle, da die Menge des umgesetzten Farbstoffes der Glykolyserate entspricht. Zellen mit einer geringen metabolischen Aktivität, wie z. B. Thymozyten oder Splenozyten, setzen daher weniger MTT um als Zellen mit einer hohen metabolischen Aktivität. Dies gilt es bei der Vorbereitung und Durchführung des Testverfahrens zu bedenken, um ein messbares und verwertbares Ergebnis zu erzielen. Die in unserer Versuchsreihe verwendeten Nasenschleimhautzellen sind metabolisch aktive Zellen und daher für den MTT-Test gut geeignet. Weitere Faktoren, die den Farbstoff-Umsatz beeinflussen, sind die MTT-Konzentration sowie die Inkubationszeit. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurde bei jeder Durchführung des Tests pro Well 500µl einer MTT-Lösung mit einer Konzentration von 0,5 mg/ml zu den vorbehandelten Zellen hinzugefügt und eine Inkubationszeit von 4 h eingehalten.

4.1.4 Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie

Die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie zählt ebenfalls zu den Zytotoxizitätstests und dient der Apoptosedetektion. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges, Phospholipid bindendes Protein. [Andree et al., 1990] Es wurde erstmals 1984 aus einer humanen Placenta isoliert [Inaba et al., 1984] und scheint eine Rolle in der Inhibition der Blutkoagulation sowie der Phospholipase A1-Aktivität zu spielen. Seine hohe Affinität für Phosphatidylserin wird zum Nachweis der Apoptose bei der Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie genutzt. Phosphatidylserin

ist in vitalen Zellen auf der Membraninnenseite eingelagert, so dass eine Asymmetrie der Plasmamembran besteht. Während der Apoptose kommt es zu einer Verlagerung des Phosphatidylserins auf die Außenseite der Plasmamembran. Fluoresceinisothiocyanat-markiertes AnnexinV kann nun an das außen gebundene Phosphatidylserin binden, wodurch apoptotische Zellen mittels Durchflusszytometrie erkannt werden können. [Koopman et al., 1994] Durch Hinzufügen des Farbstoffes Propidiumjodid, kann zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden. In spätapoptotischen und nekrotischen Zellen verringert sich die Integrität der Plasma- und der Kernmembran, so dass Propidiumjodid in die Zelle eindringen und sich dort anreichern kann. [Darzynkiewicz et al., 1992] Durch die Annexin V-Durchflusszytometrie konnte in dieser Versuchsreihe somit nicht nur eine mögliche zytotoxische Wirkung von Salinomycin bestimmt werden, auch konnte differenziert werden, ab welcher Salinomycin-Konzentration eine Apoptose-Induktion nicht mehr möglich war und die Nekrose der Zelle erfolgen musste. Aufgrund der einfachen und schnellen Durchführung ist die Annexin V-Durchflusszytometrie eine sehr häufig angewandte und sehr verbreitete Methode zur Bestimmung der Apoptoserate in einer Einzelzellsuspension. Mit Hilfe des FACS-Gerätes ist eine standardisierte und genaue Analyse möglich.

4.1.5 IL-8-ELISA

Das Verfahren des ELISA wurde 1971 von Engvall und Perlmann entwickelt. [Engvall & Perlmann, 1971] Es handelt sich dabei um ein immunologisches Nachweisverfahren für ein bestimmtes Antigen, das auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Der hier durchgeführte Sandwich-ELISA wurde zum Nachweis von IL-8 in den Überständen der mit Salinomycin behandelten Miniorgankulturen verwendet. IL-8 ist ein chemotaktisches Zytokin, das von vielen Zellarten, wie z. B. Monozyten, Granulozyten, T-Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen und Keratinozyten, synthetisiert wird. Es stimuliert als Entzündungsmediator neutrophile Granulozyten und fungiert zudem als Angiogenesefaktor. [Baggiolini & Clark-Lewis, 1992; Brat et al., 2005] Eine vermehrte Sekre-

tion von IL-8 konnte auch in Nasenschleimhautzellen nach Inkubation mit verschiedenen Xenobiotika beobachtet werden [Comer et al., 2014], so dass es sich als Parameter zur Untersuchung einer möglichen proinflammatorischen Wirkung von Salinomycin eignet. Der IL-8-ELISA bietet eine hohe Sensitivität und eine gute Quantifizierung der Ergebnisse. Weitere Vorteile dieses Testverfahrens liegen in der einfachen und schnellen Auswertung sowie der hohen Standardisierung. [Crowther, 2000]

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Geno- und Zytotoxizität von Salinomycin

Seit der Publikation von Gupta et al. über die inhibitorischen Eigenschaften von Salinomycin auf Tumorstammzellen [Gupta et al., 2009] besteht großes Interesse an der weiteren Erforschung dieses Ionophor-Antibiotikums. Eine Vielzahl von Arbeiten über die Wirkung von Salinomycin auf Tumorstammzellen und Krebszellen wurde seither veröffentlicht. [Al Dhaheri et al., 2013; Fuchs et al., 2009; Huczynski, 2012; Wang et al., 2012; Wu et al., 2014] Es finden sich allerdings kaum Untersuchungen über die Toxizität von Salinomycin in nicht-malignen humanen Zellen. Boehmerle und Endres konnten zeigen, dass Salinomycin in Konzentrationen, in denen es auch gegen Tumorstammzellen wirkt, eine neuronale und muskuläre Toxizität aufweist. Dieser toxische Effekt wird über eine Erhöhung des zytosolischen Na^+ und Ca^{2+} vermittelt, welche zu einer Calpain-Aktivierung und somit zur Einleitung der Caspase-abhängigen Apoptose führt. [Boehmerle & Endres, 2011] Neurotoxische Nebenwirkungen von Salinomycin zeigten sich auch in einem Fallbericht über eine akzidentelle Salinomycin-Ingestion in Form von Polyneuropathie und Rhabdomyolyse. [Story & Doube, 2004]

In der vorliegenden Arbeit sollten nun genotoxische und zytotoxische Effekte von Salinomycin untersucht werden. Als Testverfahren zum Nachweis von DNA-Schäden wurde der Comet Assay ausgewählt und mit adhärenenten Nasenschleimhautzellen, Zellen aus Miniorgankulturen der Nasenschleimhaut und Lymphozyten durchgeführt. Im Wilcoxon-Test zeigte sich bei keiner der drei Zellarten ein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung in den mit Salinomycin behandelten

Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Auch im Friedman-Test konnte beim Vergleich der OTM-Werte der verschiedenen Konzentrationen untereinander kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der zytotoxischen Wirkung von Salinomycin wurde der MTT-Test an adhärenenten Nasenschleimhautzellen und die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie an Lymphozyten durchgeführt. Im MTT-Test zeigte sich ab einer Konzentration von 20 μM eine signifikante Zytotoxizität. In der Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie konnte ab einer Konzentration von 10 μM eine Abnahme des Anteils der vitalen Zellen sowie eine Zunahme des Anteils der apoptotischen Zellen beobachtet werden. Der Anteil der nekrotischen Zellen war bei einer Konzentration von 40 μM am höchsten. In den von uns durchgeführten Versuchen konnte somit zwar keine genotoxische Wirkung von Salinomycin in Konzentration zwischen 0,1 μM und 40 μM beobachtet werden, ab einer Konzentration von 10 μM allerdings wirkte Salinomycin zytotoxisch. Diese Zytotoxizität scheint nicht über DNA-Schäden, sondern über die ionophorischen Eigenschaften von Salinomycin vermittelt zu sein. Wie bereits beschrieben führt der Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration und der daraus folgende Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration zur Einleitung der Apoptose. [Boehmerle & Endres, 2011; Dorne et al., 2013]

Zusätzlich zu den geno-und zytotoxischen Effekten wurde in dieser Arbeit auch noch eine mögliche proinflammatorische Wirkung von Salinomycin untersucht. Im IL-8-ELISA zeigte sich eine Erhöhung der IL-8-Konzentration bei Konzentrationen von 5 μM und 10 μM . Diese war im Wilcoxon-Test nicht signifikant. Der Friedman-Test war allerdings mit $p=0,023$ signifikant, was sich durch die relativ hohe IL-8-Konzentration nach Inkubation mit Salinomycin in Konzentration von 5 μM und 10 μM im Vergleich zu Salinomycin in höheren Konzentrationen, nicht aber im Vergleich zur Negativkontrolle erklären lässt. Nach Inkubation mit höheren Salinomycin-Konzentrationen kam es zu einer Abnahme der IL-8-Konzentration in den Überständen. Dies ist Folge der hier beobachteten zytotoxischen Wirkung von Salinomycin. Der Anteil der apoptotischen Zellen nimmt ab einer Konzentration von 20 μM stark zu, was zu einer Reduktion der IL-8-Produktion führt.

4.2.2 Einfluss von Salinomycin auf die Apoptose

In unseren Versuchen zeigte sich in der Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie ab einer Salinomycin-Konzentration von 10 μM ein signifikanter Anstieg der Apoptoserate, so dass eine Zytotoxizität von Salinomycin nachgewiesen werden konnte. Der genaue Mechanismus der Apoptose-Induktion durch dieses Ionophor-Antibiotikum ist allerdings noch nicht genau geklärt.

In nicht-malignen Zellen scheint ein intrazellulärer Ca^{2+} -Anstieg ursächlich für die Einleitung eines Caspase-abhängigen Apoptosewegs zu sein. [Boehmerle & Endres, 2011] Auch in malignen Zellen spielt die intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Rolle bei der Apoptose-Induktion durch Salinomycin. So beschreiben Wang und Kollegen die Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs durch eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration als einen möglichen Mechanismus der Apoptose-Einleitung bei Zellen eines hepatozellulären Karzinoms nach Inkubation mit Salinomycin. [Wang et al., 2012] Lu et al. konnten in Brust- und Prostatakrebszellen nach Behandlung mit Salinomycin ebenfalls eine Inhibierung des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs und zusätzlich eine Inhibierung der mTORC1-Signalkaskade, die eine wichtige Rolle bei der Proteinsynthese und Proliferation in Tumorzellen spielt, feststellen. Salinomycin verhindert hier die Phosphorylierung des Wnt-Co-Rezeptors LRP6, der eine essentielle Rolle in der Wnt/ β -Catenin-Signalkaskade spielt und dessen Überexpression zu einer Aktivierung des mTORC1-Signals in Tumorzellen führt. [Lu & Li, 2014]

Salinomycin scheint aber auch einen anderen Signaltransduktionsweg, den Hedgehog-Signalweg, zu blockieren. Dieser spielt eine zentrale Rolle in der Stammzell-Entwicklung und kann bei einer Fehlregulierung zu Tumorerkrankungen führen. Nach Bindung des Liganden Hedgehog an seinen Rezeptor „Patched“ (Ptch) leitet das membranständige Protein „smoothened“ (smo) ein Signal ins Zellinnere weiter, das dazu führt, dass der Transkriptionsfaktor „Ci“ nicht mehr abgebaut wird und im Zellkern die Expression seiner Zielgene reguliert. Hier ist besonders das Cyclin D1 zu nennen, das im Zellzyklus für den Übergang von der G₁- in die S-Phase verantwortlich ist. Lu et al. fanden heraus, dass Salinomycin über eine Herunterregulierung der Hedgehog-Signalproteine eine

Inhibierung von Proliferation, Invasion und Migration sowie eine Apoptose-Induktion in Brustkrebszellen bewirkt. [Lu et al., 2015]

Eine weitere Möglichkeit der Apoptose-Induktion durch Salinomycin scheint die Erhöhung des intrazellulären Levels an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu sein. Dadurch kommt es zu einer Aktivierung pro-apoptotischer Enzyme, wie Caspase-3, -8, -9 und Bax, und einer Abnahme des anti-apoptotischen Bcl-2. Dieser Mechanismus konnte in Zellen von Prostatakarzinomen, kolorektalen und hepatozellulären Karzinomen nachgewiesen werden. [K.-Y. Kim et al., 2011; Klose et al., 2014; Zhou et al., 2013]

Koo et al. beschreiben eine Zellwachstumsinhibition und Apoptose-Induktion über einen Zell-Zyklus-Arrest in der G₁-Phase. Dieser wird über eine Inaktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 und der damit einhergehenden Abnahme der Expression seiner Zellzyklus-assoziierten Zielgene Cyclin D1, Skp2 und Survivin induziert. [Koo et al., 2013] Fuchs et al. dagegen schildern einen Apoptosemechanismus, der unabhängig von einem Zell-Zyklusarrest und unabhängig von Tumor-Suppressor-Protein p53, Caspase-Aktivierung, Cd95/CD95L-System und dem Proteasom abläuft. [Fuchs et al., 2009]

Salinomycin induziert also die Apoptose auf verschiedenen Wegen, welche noch nicht im Detail verstanden sind und weiterer Forschung bedürfen. Der Unterschied in der Apoptose-Induktion bei malignen und nicht-malignen Zellen stellt dabei einen interessanten Ansatzpunkt für die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Reduktion der Zyto- und Neurotoxizität von Salinomycin ohne Beeinflussung seiner Antitumor-Aktivität dar. So konnte bereits gezeigt werden, dass durch Kombination mit CGP37157, einem Inhibitor des mitochondrialen Na⁺/Ca²⁺-Austauschers, die Neurotoxizität von Salinomycin reduziert werden konnte, ohne dass es zu einer Abnahme der Tumortoxizität kam. [Boehmerle et al., 2014; Scherzed et al., 2015]

4.3 Mögliche Anwendung von Salinomycin in der experimentellen Onkologie

In den letzten Jahren erschienen viele Studien zur Hypothese der Tumorstammzellen. Diese kleine Gruppe von Zellen innerhalb einer Tumorzellpopulation soll

verantwortlich sein für Tumorwachstum, Metastasen, Therapieresistenz und Rezidive. [Reya et al., 2001] Tumorstammzellen stellen daher ein attraktives Ziel in der Krebstherapie dar. Mit der Entdeckung von Salinomycin als Inhibitor von Tumorstammzellen wurde ein neuer vielversprechender Therapieansatz gefunden. Die toxische Wirkung von Salinomycin konnte bisher für eine Vielzahl von Krebszellen und Tumorstammzellen verschiedener Tumorarten nachgewiesen werden. So konnten Gupta et al. als erste einen inhibitorischen Effekt von Salinomycin in niedrigen Konzentrationen (ab 0,5 μM) auf Brustkrebsstammzellen feststellen. [Gupta et al., 2009] Fuchs et al. beschrieben eine Apoptose induzierende Wirkung auf Leukämiezellen mit einer ABC-Transporter vermittelten Medikamenten- und Apoptoseresistenz. [Fuchs et al., 2010] Weitere tumortoxische Effekte konnten z. B. auch bei Zellen von Adenokarzinomen der Lunge [Wang, 2011], Tumorstammzellen von kolorektalen Karzinomen [Dong et al., 2011], von Osteosarkomen [Tang et al., 2011], Prostatakarzinomzellen [K.-Y. Kim et al., 2011], Plattenepithelkarzinomstammzellen der Kopf-Hals-Region [Kuo et al., 2012], Ovarialkarzinomzellen [Parajuli et al., 2013], Zellen von hepatozellulären Karzinomen [Klose et al., 2014] und weiteren Krebszellen des Gastro-Intestinal-Traktes [Lieke et al., 2012; Zhang et al., 2011; Zhi et al., 2011] beobachtet werden. Nicht nur die Wirkung von Salinomycin als Monotherapie, auch seine Anti-Tumor-Aktivität in Kombination mit bisher etablierten Chemotherapeutika wurde untersucht. Kim et al. konnten zeigen, dass Salinomycin die Empfindlichkeit verschiedener Krebszellen gegenüber der Wirkung von Doxorubicin und Etoposid durch eine Steigerung der DNA-Schädigung und eine Reduktion des anti-apoptischen Proteins p21 verstärkt. [J.-H. Kim et al., 2011] Durch Kombination von Salinomycin und Gemcitabin konnten Zhang et al. die Effektivität der Elimination von Pankreaskarzinomzellen deutlich verbessern. [Zhang et al., 2011] Und auch eine kombinierte Behandlung von HER2-positiven Brustkrebszellen und Brustkrebsstammzellen mit Salinomycin und Trastuzumab war einer Behandlung mit nur einem der beiden Medikamente überlegen. [Oak et al., 2012] Hinsichtlich einer möglichen Anwendung in der Onkologie müssen vor allem die Nebenwirkungen von Salinomycin beachtet werden. In unseren Versuchen konn-

ten wir nach einer Inkubationszeit von 24 h eine Zytotoxizität in humanen Lymphozyten und Nasenschleimhautzellen ab einer Konzentration von 10 μM nachweisen. Auch in anderen Studien konnten zytotoxische und neurotoxische Effekte von Salinomycin auf verschiedene nicht-maligne Zellen beobachtet werden. [Boehmerle & Endres, 2011; Klose et al., 2014; Scherzed et al., 2013] Obwohl der inhibitorische Effekt von Salinomycin auf Tumorstammzellen schon ab niedrigeren Konzentrationen beschrieben wird, sollten auch möglich weitere unerwünschte Nebenwirkungen, die in subtoxischen Konzentrationen auftreten könnten, beachtet werden. Deshalb wurde in dieser Arbeit eine mögliche proinflammatorische Wirkung von Salinomycin untersucht. Diese konnte in nasaler Mukosa bei 5 μM und 10 μM beobachtet werden, was für ein mäßiges proinflammatorisches Potential von Salinomycin in subtoxischen Konzentrationen spricht. Verschiedene Studien haben sich bereits mit möglichen Strategien zur Reduktion der Nebenwirkungen von Salinomycin beschäftigt. Eine Möglichkeit die Toxizität von Salinomycin zu verringern, ist die Blockade des mitochondrialen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers. [Boehmerle et al., 2014; Scherzed et al., 2015] Antoszczak und Kollegen synthetisierten eine Reihe von Salinomycin-Ester-Derivaten, von denen 3 eine höhere antiproliferative Wirkung gegen Therapie-resistente Krebszellen sowie eine geringere Toxizität gegenüber nicht malignen Zellen als Salinomycin und einige Standard-Chemotherapeutika, wie z. B. Cisplatin und Doxorubicin, aufwiesen. [Antoszczak et al., 2014] Einen anderen Ansatz zur Reduktion der systemischen Effekte von Salinomycin lieferten Zhang et al. durch die Entwicklung einer zielgerichteten Tumorstammzelltherapie über die Aufnahme von Salinomycin in Mizellen. Sie synthetisierten Salinomycin beladene PEG-b-PCL Polymer-Mizellen, die *in vivo* effektiver als freies Salinomycin die Proliferation von Tumorstammzellen unterdrückten. [Zhang et al., 2012] Auch die Synthese von Salinomycin enthaltenden, Herceptin markierten Nanopartikeln zur Therapie von Brustkrebszellen stellt ein weiteres Beispiel für eine solche gezielte Wirkstoffabgabe dar. [Aydin, 2013] Diese Studien sind ein erster Ansatzpunkt zur Entwicklung von Therapiestrategien zur Steigerung der Effektivität von Salinomycin und gleichzeitigen Reduktion seiner systemischen Nebenwirkungen.

In Bezug auf die zu Beginn der vorliegenden Arbeit gestellten Fragen, kann also festgestellt werden, dass in unseren Versuchen keine genotoxische Wirkung, aber eine zytotoxische und proinflammatorische Wirkung von Salinomycin in Konzentrationen, die auch gegen Tumorstammzellen wirksam sind, gefunden werden konnte. Die Untersuchung dieser Effekte erfolgte hier allerdings lediglich nach einmaliger Exposition mit Salinomycin für 24 h. Die Folgen einer repetitiven Exposition, wie sie in einem möglichen therapeutischen Setting vorliegen würde, wurden nicht beurteilt. Diese sollten in weiteren Versuchen evaluiert werden, um die Sicherheit einer onkologischen Therapie mit Salinomycin abschätzen zu können. Zudem sollte eine Untersuchung der toxischen Wirkung von Salinomycin auf andere Zellarten mit unterschiedlichen strukturellen und funktionellen Eigenschaften erfolgen. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass Zellen mit einer hohen Expression des MDR-1-Rezeptors sensibler gegenüber Salinomycin sind als Zellen ohne diesen Rezeptor. [Riccioni et al., 2010; Scherzed et al., 2015] Nicht nur Krebszellen, sondern auch nicht-malignen Zellen des menschlichen Organismus, wie z. B. Leber-, Nieren- und Darmzellen, exprimieren MDR-1. [Hoffmann & Kroemer, 2004] Zellen dieser Organe sind daher möglicherweise auch sensibler gegenüber der toxischen Wirkung von Salinomycin als die von uns verwendeten Zellarten, so dass hier eventuell bereits geringere Konzentrationen zu einer Zellschädigung führen könnten. Die Toxizität von Salinomycin ist neben der Zellart auch abhängig von der Spezies. Während es bei Geflügel und Vieh eine vergleichsweise geringe toxische Wirkung hat, führen bei Pferden bereits Salinomycin-Konzentrationen von mehr als 0,2 mg/kg Körpergewicht zu einer Intoxikation mit Muskelschwäche, Herzinsuffizienz und Zellschäden an Leber und Nieren. Mögliche Ursachen hierfür könnten eine höhere Resorptionsrate bzw. ein Mangel an Toxizitätsmindernden Enzymen sein. [Nicpon et al., 1997] Daten zur Toxizität beim Menschen sind bisher sehr begrenzt. Im Falle eines mit Salinomycin intoxikierten Farmers wurde eine Plasma-Konzentration von 1 mg/kg Körpergewicht geschätzt. [Story & Doube, 2004] In einigen wenigen klinischen Pilotstudien konnte bereits gezeigt werden, dass eine intravenöse Therapie mit Salinomycin in Konzentrationen von 200 bis 250 µg/kg zu einer partiellen Remission bei Patientinnen mit vorbehandelten und therapieresistenten Mammakarzinomen

und Plattenepithelkarzinomen der Vulva führte. Dabei wurden nur milde, akute Nebenwirkungen wie Tachykardie und Tremor für 30-60 Minuten beobachtet. [Naujokat & Steinhart, 2012] Insgesamt müssen allerdings vor einem möglichen klinischen Einsatz weitere Untersuchungen bezüglich des genauen Wirkmechanismus von Salinomycin sowohl in malignen als auch in nicht-malignen Zellen durchgeführt werden. Ein besseres Verständnis über die Wirkungsweise und Wege der Apoptose-Induktion bietet Möglichkeiten zur Verbesserung der Wirksamkeit einer Therapie mit Salinomycin und Verringerung seiner Nebenwirkungen.

5 Zusammenfassung

Das Polyether-Antibiotikum Salinomycin stammt ursprünglich aus der Tierzucht und wurde kürzlich als Inhibitor epithelialer Tumorstammzellen identifiziert. Vor einem möglichen Einsatz in der Onkologie müssen zunächst toxische Effekte von Salinomycin in nicht malignen humanen Zellen evaluiert werden. Hierzu existieren bisher nur wenige Studien, so dass in dieser Arbeit die geno- und zytotoxische Wirkung von Salinomycin auf Zellen humaner nasaler Mukosa und Lymphozyten untersucht werden sollte.

Dazu wurden aus 10 Proben nasaler Mukosa zum einen Miniorgankulturen und zum anderen Einzelzellkulturen angelegt. Zudem wurde von jedem Patienten eine Blutprobe entnommen, aus der Lymphozyten gewonnen wurden. Zur Untersuchung der Genotoxizität wurde die Einzelzellmikrogelelektrophorese angewendet, ein Testverfahren mit dem sowohl Doppelstrang- als auch Einzelstrangbrüche und alkalilabile Stellen in eukaryontischen Zellen nachgewiesen werden können. Alle drei Zellarten wurden hierfür mit Salinomycin-Konzentrationen von 0,1 μM bis 40 μM für 24 h inkubiert. Als Positivkontrolle dienten mit 150 μM Methylmethansulfonat (MMS) behandelte Zellen. Zur Untersuchung der Zytotoxizität wurden der MTT-Test sowie die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie durchgeführt. Für den MTT-Test wurden die adhärenenten Nasenschleimhautzellen für 24 h mit Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 μM bis 175 μM behandelt, hier diente 2 mM t-BHP als Positivkontrolle. Mit den für 24 h mit Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 μM bis 40 μM inkubierten Lymphozyten wurde die Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie durchgeführt, auch hier wurde MMS als Positivkontrolle verwendet. Zusätzlich wurde mit einem Sandwich-ELISA die IL-8-Konzentration in den Überständen der Miniorgankulturen gemessen, um die proinflammatorische Wirkung von Salinomycin bewerten zu können.

Es zeigte sich kein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung der behandelten Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Im MTT-Test ließ sich ab einer Konzentration von 20 μM eine signifikante Reduktion der Vitalität der behandelten Zellen nachweisen. In der Annexin-Propidiumjodid-Durchflusszytometrie nahm ab einer

Konzentration von 10 μM der Anteil der vitalen Zellen signifikant ab und der Anteil der apoptotischen Zellen stieg signifikant. Der Anteil der nekrotischen Zellen war bei einer Konzentration von 40 μM am höchsten. Der Sandwich-ELISA zeigte einen Anstieg der IL-8-Konzentration bei einer Salinomycin-Konzentration von 5 μM und 10 μM .

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass Salinomycin in den verwendeten Konzentrationen zytotoxisch und proinflammatorisch aber nicht genotoxisch wirkt. Eine toxische Wirkung auf Tumorstammzellen konnte schon ab 0,5 μM beobachtet werden. Dennoch sollten weitere Untersuchungen folgen, um den genauen Wirkmechanismus von Salinomycin zu klären und dessen zytotoxische Wirkung auf nicht maligne Zellen reduzieren zu können.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Verwendete Abkürzungen und chemische Formeln	
ABC	ATP-binding cassette
Apaf-1	Apoptotic Protease activating Factor 1
APC	Aktiviertes Protein C
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BEGM	Bronchial Epithelial Growth Medium
C	Kohlenstoff
Ca ²⁺	Calcium
CDK	Cyclinabhängige Kinasen
CD4 ⁺	cluster of differentiation 4
°C	Grad Celsius
d. h.	das heißt
DISC	death-inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
DVL	Dishevelled
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
et al.	et alii, et aliae oder et alia
FCS	fetales Kälberserum

FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Fallbeschleunigung bzw. Gramm
H	Wasserstoff
h	Stunden
HCl	Salzsäure
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HMLER	human mammary epithelial cells
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
IAP	Inhibitor of Apoptosis
IL-8	Interleukin-8
IQR	Interquartilabstand
K ⁺	Kalium
LMP	low melting point
LRP	low density lipoprotein receptor-related protein
M	Molar
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MMS	Methylmethansulfonat
ml	Milliliter
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
MTT	Tetrazoliumsalz3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
µg	Mikrogramm

μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
Na^+	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
O	Sauerstoff
OTM	Olive Tail Moment
p-Wert	Signifikanzwert (von englisch: propability)
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PEG-b-PCL	poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone)
PS	Phosphatidyl-Serin
Ptch	patched
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
Rb	Retinoblastom
s.	siehe
Skp2	S-phase kinase-associated protein 2
smo	smoothened
sog.	sogenannt
t-BHP	tert-Butylhydroperoxid
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Trishydroxymethyl-aminomethan
U	Internationale Einheit
u. a.	unter anderem
v. a.	vor allem
x	mal
z. B.	zum Beispiel

6.2 Tabellen

Tabelle 1: Werte der Einzelzellmikroelektrophorese für Nasenschleimhautzellen behandelt mit Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 μM bis 40 μM für 24h mit Angabe von Mittelwert (MW), Median (Med) und Standardabweichung (SD); TD: Tail DNA, OTM: Olive Tail Moment, TL: Tail Length

Patient	Kontrolle			Salinomycin 0,1 μM			Salinomycin 0,5 μM			Salinomycin 1 μM			Salinomycin 5 μM			Salinomycin 10 μM			Salinomycin 20 μM			Salinomycin 40 μM			MMS 150 μM		
	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL
1	4,58	2,24	78,83	3,63	1,44	58,86	3,48	1,57	69,48	3,16	1,27	62,09	2,62	1,08	61,55	4,80	2,22	67,32	4,01	1,84	68,44	3,04	1,43	74,88	14,44	6,97	101,2
2	2,35	0,70	37,63	2,24	0,58	37,51	3,57	0,83	36,27	3,90	0,98	32,32	2,59	0,78	35,29	2,19	0,50	29,64	2,73	0,74	33,94	3,23	0,85	32,71	13,66	5,02	59,16
3	3,34	1,32	46,02	2,10	0,77	38,26	2,05	0,57	40,09	2,63	0,75	40,47	1,88	0,48	39,93	2,19	0,63	39,48	2,72	0,91	44,04	3,64	1,66	43,79	23,69	14,52	92,48
4	2,54	0,81	38,93	2,83	1,08	41,2	3,27	1,17	44,25	2,75	1,07	53,21	2,62	0,96	44,77	2,37	0,84	44,42	3,07	1,26	46,82	2,94	1,07	45,06	12,56	5,63	78,87
5	2,82	1,07	53,63	1,95	0,59	49,58	1,48	0,48	47,51	2,19	0,70	52,97	1,84	0,60	49,05	1,42	0,40	42,69	1,98	0,60	52,15	2,42	0,87	58,13	18,88	12,70	90,01
6	3,32	1,11	47,72	2,81	0,85	44,49	3,66	1,13	45,82	3,27	0,89	38,54	2,93	0,71	36,88	2,18	0,57	34,9	3,20	0,82	37,54	2,62	0,72	37,31	15,30	5,51	75,47
7	4,32	1,71	57,34	2,82	0,87	48,71	2,55	0,81	48,91	3,03	1,00	51,13	2,84	0,84	46,02	2,29	0,74	41,33	2,58	0,74	46,51	2,36	0,67	43,19	14,09	6,19	75,49
8	3,33	1,20	58,54	2,83	0,98	53,37	2,39	0,72	45,92	2,33	0,71	50,9	2,08	0,62	44,98	2,06	0,52	40,88	1,47	0,40	40,55	1,48	0,43	42,25	33,64	17,47	107,98
9	3,41	1,31	42,44	4,13	1,39	44,06	4,13	1,55	50,87	3,89	1,75	42,83	4,61	1,86	56,31	4,23	1,74	53,32	4,97	2,19	51,17	3,55	1,37	47,46	17,00	7,29	97,2
10	3,82	1,91	50,03	4,70	2,21	49,41	7,01	3,20	55,18	3,74	1,62	47,19	4,70	2,20	54,49	5,99	2,55	54,84	6,60	2,61	49,95	4,85	1,86	47,6	33,85	15,91	100,72
MW	3,38	1,34	51,11	3,00	1,08	46,55	3,36	1,20	48,43	3,09	1,07	47,17	2,87	1,01	46,93	2,97	1,07	44,88	3,33	1,21	47,11	3,01	1,09	47,24	19,71	9,72	87,86
Med	3,34	1,26	48,88	2,83	0,93	46,60	3,38	0,98	46,72	3,10	0,99	49,05	2,62	0,81	45,50	2,24	0,69	42,01	2,90	0,87	46,67	2,99	0,97	44,43	16,15	7,13	91,25
SD	0,72	0,48	12,08	0,89	0,49	6,75	1,52	0,80	9,09	0,62	0,37	8,70	1,01	0,57	8,55	1,49	0,79	10,89	1,51	0,75	9,56	0,91	0,47	11,79	8,06	4,86	15,17

Tabelle 2: Werte der Einzelzellmikroelektrophorese für Lymphozyten behandelt mit Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 μM bis 40 μM für 24h mit Angabe von Mittelwert (MW), Median (Med) und Standardabweichung (SD); TD: Tail DNA, OTM: Olive Tail Moment, TL: Tail Length

Patient	Kontrolle		Salinomycin 0,1 μM		Salinomycin 0,5 μM		Salinomycin 1 μM		Salinomycin 5 μM		Salinomycin 10 μM		Salinomycin 20 μM		Salinomycin 40 μM		MMS 150 μM										
	TD	OTM	TL	TL	TD	OTM	TL	TL	TD	OTM	TL	TL	TD	OTM	TL	TL	TD	OTM	TL								
1	2,41	0,82	36,46	4,70	2,12	45,31	3,25	1,47	37,21	2,79	1,13	40	1,75	0,48	36,07	1,27	0,30	29,89	2,03	0,76	29,01	1,84	0,60	31,51	30,09	15,26	108,68
2	3,81	0,98	44,62	3,77	1,05	37,66	4,20	1,37	42,03	2,64	0,71	37,02	1,65	0,35	29,98	2,78	0,95	31,43	3,44	1,30	32,84	3,13	0,90	34,99	45,79	20,46	111,45
3	3,42	1,24	46,47	4,10	1,41	53,97	3,37	1,12	54,1	3,68	1,30	49,66	2,60	0,77	44,14	2,28	0,58	41,81	2,99	0,93	40,53	6,05	2,48	49,09	8,82	3,25	59,53
4	4,22	1,56	56,31	5,04	1,75	54,83	4,13	1,42	48,95	5,59	2,19	53,76	4,24	1,47	44,85	4,14	1,41	59,35	2,68	0,75	54,9	5,53	2,02	53,97	46,14	21,76	157,21
5	5,14	1,95	51,31	4,46	1,51	49,04	2,76	0,82	35,95	1,68	0,42	37,78	1,61	0,38	37,36	1,81	0,45	38,46	2,11	0,57	39,62	1,62	0,43	35,01	30,01	14,20	92,52
6	1,48	0,30	26,23	1,51	0,36	25,71	1,53	0,35	28,98	1,74	0,51	25,95	1,90	0,47	30,47	1,59	0,45	26,87	2,05	0,67	26,49	2,06	0,62	27,79	7,42	2,28	57,63
7	2,79	1,04	60,27	2,90	0,99	49,05	3,05	1,19	58,26	2,66	0,89	50,98	2,24	0,79	54,2	2,44	0,93	47,11	1,80	0,58	49,71	1,85	0,65	48,01	8,95	3,64	60,46
8	1,81	0,56	46,8	2,05	0,78	50,77	2,75	1,05	56,29	2,11	0,70	46,54	1,86	0,50	45,26	2,44	0,91	47,05	1,97	0,77	42,17	2,74	1,07	45,73	46,73	25,57	121,95
9	3,74	1,22	53,55	4,63	1,75	59,21	6,02	2,18	59,78	4,07	1,37	52,02	2,36	0,68	47,46	3,43	1,17	48,6	3,01	1,01	51,82	3,45	1,15	51,93	31,55	14,42	103,9
10	2,47	0,76	40,35	2,61	0,84	33,04	1,90	0,41	33,48	2,53	0,74	36,67	2,95	0,98	36,16	1,90	0,52	30,87	1,55	0,33	30,81	1,77	0,47	29,74	25,10	12,46	103,75
MW	3,13	1,04	46,24	3,58	1,26	45,86	3,30	1,14	45,50	2,95	1,00	43,04	2,32	0,69	40,60	2,41	0,77	40,14	2,36	0,77	39,79	3,00	1,04	40,77	28,06	13,33	97,71
Med	3,11	1,01	46,64	3,94	1,23	49,05	3,15	1,16	45,49	2,65	0,82	43,27	2,07	0,59	40,75	2,36	0,75	40,14	2,08	0,76	40,08	2,40	0,78	40,37	30,05	14,31	103,82
SD	1,14	0,48	10,06	1,23	0,54	10,58	1,27	0,54	11,35	1,20	0,53	8,95	0,81	0,34	7,82	0,87	0,36	10,46	0,62	0,27	10,00	1,59	0,69	9,93	15,56	8,14	31,61

Tabelle 3: Werte der Einzelzellmikroelektrophorese für Miniorgankulturen der Nasenschleimhaut behandelt mit Salinomycin in Konzentrationen von 0,1 μM bis 40 μM für 24h mit Angabe von Mittelwert (MD), Median (Med) und Standardabweichung (SD); TD: Tail DNA, OTM: Olive Tail Moment, TL: Tail Length

Patient	Kontrolle		Salinomycin 0,1 μM		Salinomycin 0,5 μM		Salinomycin 1 μM		Salinomycin 5 μM		Salinomycin 10 μM		Salinomycin 20 μM		Salinomycin 40 μM		MMS 150 μM										
	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL	TD	OTM	TL						
1	2,52	0,90	38,66	2,55	1,00	46,99	2,06	0,87	41,21	1,88	0,66	48,55	3,07	1,18	41,34	2,22	0,69	43,82	2,36	0,78	40,17	4,06	1,58	42,72	16,97	6,63	78,54
2	3,80	1,16	39,26	2,02	0,58	35,19	2,42	0,86	32,94	2,82	0,69	36,51	2,67	0,89	40,93	2,95	0,71	34,99	3,09	0,89	38,86	2,39	0,66	36,13	13,11	5,13	62,84
3	1,66	0,52	33,94	1,42	0,41	31,24	1,25	0,43	31,06	0,98	0,26	30,02	2,01	0,71	33,35	0,91	0,21	28,94	2,06	0,76	35,29	2,65	0,91	33,94	15,35	6,52	61,38
4	3,66	1,24	55,63	4,02	1,29	58,85	3,23	1,05	49,91	3,62	1,20	57,25	3,99	1,30	50,93	4,15	1,48	54,57	3,67	1,26	49,24			23,64	9,39	94,68	
5	1,63	0,59	49,69	2,49	0,87	56,69	2,03	0,67	47,03	2,17	0,75	43,99	2,24	0,69	46,10	2,43	0,86	50,11	2,02	0,73	58,42	2,24	0,73	54,08	16,73	6,98	81,55
6	2,74	0,81	32,74	2,16	0,56	32,21	2,53	0,86	31,36	1,94	0,62	29,95	2,10	0,65	30,71	2,41	0,54	29,51	1,87	0,54	32,11	1,54	0,46	31,46	4,49	1,67	40,38
7	3,01	1,14	51,76	2,57	0,91	54,86	3,04	1,15	61,25	3,16	1,21	58,38	3,03	1,12	57,23	2,67	0,97	58,82	3,32	1,15	54,85	3,34	1,22	56,07	12,95	5,35	74,34
8	1,80	0,52	38,42	1,94	0,61	39,13	1,87	0,51	37,7	1,47	0,43	35,22	1,88	0,61	36,9	1,57	0,47	34,10	1,69	0,50	36,30	1,24	0,30	32,88	13,59	4,89	65,62
9	3,32	0,83	33,75	2,84	0,81	36,15	2,51	0,55	31,59	3,37	0,95	33,95	3,92	1,04	38,54	2,31	0,58	33,7	3,07	0,84	35,87	4,10	1,16	38,05	9,00	3,00	55,26
10	4,01	1,30	38,52	3,10	1,06	40,4	3,14	1,07	41,62	2,74	0,80	39,1	3,13	1,01	46,52	3,72	1,20	44,22	3,77	1,22	46,13	3,22	0,96	45,77	9,48	3,32	62,08
MW	2,82	0,90	41,24	2,51	0,81	43,17	2,41	0,80	40,57	2,42	0,76	41,29	2,80	0,92	42,26	2,53	0,77	41,28	2,69	0,87	42,72	2,75	0,89	41,23	13,53	5,29	67,67
Med	2,88	0,87	38,59	2,52	0,84	39,77	2,47	0,86	39,46	2,46	0,72	37,80	2,85	0,95	41,14	2,42	0,70	39,41	2,72	0,81	39,52	2,65	0,91	38,05	13,35	5,24	64,23
SD	0,90	0,30	8,14	0,72	0,27	10,43	0,63	0,25	9,89	0,86	0,30	10,43	0,76	0,25	8,10	0,94	0,37	10,63	0,78	0,27	8,98	1,02	0,40	9,10	5,24	2,25	15,21

6.3 Kongressbeiträge und Publikationen

Kongressbeitrag:

Schramm C., Hackenberg S., Scherzed A., Kleinsasser N. H. Toxizität von Salinomycin in Miniorgankulturen der Nasenschleimhaut und Lymphozyten. 84. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Nürnberg, 2013.

Publikation:

Scherzed A., Hackenberg S., Schramm C., Froelich K., Ginzkey C., Hagen R., Kleinsasser N. (2015). Geno- and cytotoxicity of salinomycin in human nasal mucosa and peripheral blood lymphocytes. *Toxicol In Vitro* 29(4): 813-8

7 Literaturverzeichnis

- Al Dhaheri, Y., Attoub, S., Arafat, K., Abuqamar, S., Eid, A., Al Faresi, N., & Iratni, R. (2013). Salinomycin induces apoptosis and senescence in breast cancer: upregulation of p21, downregulation of survivin and histone H3 and H4 hyperacetylation. *Biochim Biophys Acta*, 1830(4), 3121-3135.
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7), 3983-3988.
- Andersson, B., Janson, V., Behnam-Motlagh, P., Henriksson, R., & Grankvist, K. (2006). Induction of apoptosis by intracellular potassium ion depletion: using the fluorescent dye PBFI in a 96-well plate method in cultured lung cancer cells. *Toxicol In Vitro*, 20(6), 986-994.
- Andree, H. A., Reutelingsperger, C. P., Hauptmann, R., Hemker, H. C., Hermens, W. T., & Willems, G. M. (1990). Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC alpha) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem*, 265(9), 4923-4928.
- Antoszczak, M., Popiel, K., Stefanska, J., Wietrzyk, J., Maj, E., Janczak, J., Michalska, G., Brzezinski, B., & Huczynski, A. (2014). Synthesis, cytotoxicity and antibacterial activity of new esters of polyether antibiotic - salinomycin. *Eur J Med Chem*, 76, 435-444.
- Aydin, R. S. (2013). Herceptin-decorated salinomycin-loaded nanoparticles for breast tumor targeting. *J Biomed Mater Res A*, 101(5), 1405-1415.
- Bach, P., Abel, T., Hoffmann, C., Gal, Z., Braun, G., Voelker, I., Ball, C. R., Johnston, I. C. D., Lauer, U. M., Herold-Mende, C., Mühlebach, M. D., Glimm, H., & Buchholz, C. J. (2013). Specific Elimination of CD133+ Tumor Cells with Targeted Oncolytic Measles Virus. *Cancer research*, 73(2), 865-874.
- Baggiolini, M., & Clark-Lewis, I. (1992). Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*, 307(1), 97-101.

- Bals, R., Gamarra, F., Kaps, A., Grundler, S., Huber, R. M., & Welsch, U. (1998). Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. *Cell Tissue Res*, 293(3), 573-577.
- Berridge, M. V., Herst, P. M., & Tan, A. S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 127-152.
- Berridge, M. V., & Tan, A. S. (1993). Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys*, 303(2), 474-482.
- Boehmerle, W., & Endres, M. (2011). Salinomycin induces calpain and cytochrome c-mediated neuronal cell death. *Cell Death Dis*, 2, e168.
- Boehmerle, W., Muenzfeld, H., Springer, A., Huehnchen, P., & Endres, M. (2014). Specific targeting of neurotoxic side effects and pharmacological profile of the novel cancer stem cell drug salinomycin in mice. *J Mol Med (Berl)*, 92(8), 889-900.
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine*, 3, 730-737.
- Brat, D. J., Bellail, A. C., & Van Meir, E. G. (2005). The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro Oncol*, 7(2), 122-133.
- Butaye, P., Devriese, L. A., & Haesebrouck, F. (2003). Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. *Clin Microbiol Rev*, 16(2), 175-188.
- Callaway, T. R., Edrington, T. S., Rychlik, J. L., Genovese, K. J., Poole, T. L., Jung, Y. S., Bischoff, K. M., Anderson, R. C., & Nisbet, D. J. (2003). Ionophores: their use as ruminant growth promotants and impact on food safety. *Curr Issues Intest Microbiol*, 4(2), 43-51.

- Carmichael, P. L., Ugwumadu, A. H., Neven, P., Hewer, A. J., Poon, G. K., & Phillips, D. H. (1996). Lack of genotoxicity of tamoxifen in human endometrium. *Cancer Res*, *56*(7), 1475-1479.
- Ciccia, A., & Elledge, S. J. (2010). The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell*, *40*(2), 179-204.
- Clay, M. R., Tabor, M., Owen, J. H., Carey, T. E., Bradford, C. R., Wolf, G. T., Wicha, M. S., & Prince, M. E. (2010). Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*, *32*(9), 1195-1201.
- Cloos, J., Spitz, M. R., Schantz, S. P., Hsu, T. C., Zhang, Z. F., Tobi, H., Braakhuis, B. J., & Snow, G. B. (1996). Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*, *88*(8), 530-535.
- Collins, A. R., Ma, A. G., & Duthie, S. J. (1995). The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. *Mutat Res*, *336*(1), 69-77.
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., & Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*, *65*(23), 10946-10951.
- Comer, D. M., Elborn, J. S., & Ennis, M. (2014). Inflammatory and cytotoxic effects of acrolein, nicotine, acetaldehyde and cigarette smoke extract on human nasal epithelial cells. *BMC Pulm Med*, *14*, 32.
- Crowther, J. R. (2000). The ELISA guidebook. *Methods Mol Biol*, *149*, lii-iv, 1-413.
- Dalerba, P., Dylla, S. J., Park, I. K., Liu, R., Wang, X., Cho, R. W., Hoey, T., Gurney, A., Huang, E. H., Simeone, D. M., Shelton, A. A., Parmiani, G., Castelli, C., & Clarke, M. F. (2007). Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(24), 10158-10163.
- Danforth, H. D., Ruff, M. D., Reid, W. M., & Miller, R. L. (1977). Anticoccidial activity of salinomycin in battery raised broiler chickens. *Poult Sci*, *56*(3), 926-932.

- Darzynkiewicz, Z., Bruno, S., Del Bino, G., Gorczyca, W., Hotz, M. A., Lassota, P., & Traganos, F. (1992). Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*, *13*(8), 795-808.
- Dietz, A., Senneweld, E., & Maier, H. (1995). Indoor air pollution by emissions of fossil fuel single stoves: possibly a hitherto underrated risk factor in the development of carcinomas in the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*, *112*(2), 308-315.
- Dong, T. T., Zhou, H. M., Wang, L. L., Feng, B., Lv, B., & Zheng, M. H. (2011). Salinomycin selectively targets 'CD133+' cell subpopulations and decreases malignant traits in colorectal cancer lines. *Ann Surg Oncol*, *18*(6), 1797-1804.
- Dorne, J. L., Fernandez-Cruz, M. L., Bertelsen, U., Renshaw, D. W., Peltonen, K., Anadon, A., Feil, A., Sanders, P., Wester, P., & Fink-Gremmels, J. (2013). Risk assessment of coccidostatics during feed cross-contamination: animal and human health aspects. *Toxicol Appl Pharmacol*, *270*(3), 196-208.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, *35*(4), 495-516.
- Engvall, E., & Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, *8*(9), 871-874.
- Fatima, F., & Nawaz, M. (2015). Stem cell-derived exosomes: roles in stromal remodeling, tumor progression, and cancer immunotherapy. *Chin J Cancer*, *34*(3), 46.
- Fernandez-Teran, M. A., Hinchliffe, J. R., & Ros, M. A. (2006). Birth and death of cells in limb development: a mapping study. *Dev Dyn*, *235*(9), 2521-2537.
- Fuchs, D., Daniel, V., Sadeghi, M., Opelz, G., & Naujokat, C. (2010). Salinomycin overcomes ABC transporter-mediated multidrug and apoptosis resistance in human leukemia stem cell-like KG-1a cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *394*(4), 1098-1104.

- Fuchs, D., Heinold, A., Opelz, G., Daniel, V., & Naujokat, C. (2009). Salinomycin induces apoptosis and overcomes apoptosis resistance in human cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 390(3), 743-749.
- Fukusumi, T., Ishii, H., Konno, M., Yasui, T., Nakahara, S., Takenaka, Y., Yamamoto, Y., Nishikawa, S., Kano, Y., Ogawa, H., Hasegawa, S., Hamabe, A., Haraguchi, N., Doki, Y., Mori, M., & Inohara, H. (2014). CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*, 111(3), 506-514.
- Gillison, M. L., Koch, W. M., Capone, R. B., Spafford, M., Westra, W. H., Wu, L., Zahurak, M. L., Daniel, R. W., Viglione, M., Symer, D. E., Shah, K. V., & Sidransky, D. (2000). Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst*, 92(9), 709-720.
- Ginzkey, C., Friehs, G., Koehler, C., Hackenberg, S., Voelker, H. U., Richter, E., & Kleinsasser, N. H. (2010). Nicotine and methyl methane sulfonate in mini organ cultures of human parotid gland tissue. *Toxicol Lett*, 197(2), 69-74.
- Golias, C. H., Charalabopoulos, A., & Charalabopoulos, K. (2004). Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. *Int J Clin Pract*, 58(12), 1134-1141.
- Guan, G. F., Zhang, D. J., Zheng, Y., Wen, L. J., Yu, D. J., Lu, Y. Q., & Zhao, Y. (2015). Abnormal Wnt signaling and overexpression of ABCG2 contributes to drug efflux properties of side population cells in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Med Rep*, 12(3), 4352-4357.
- Gupta, P. B., Onder, T. T., Jiang, G., Tao, K., Kuperwasser, C., Weinberg, R. A., & Lander, E. S. (2009). Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell*, 138(4), 645-659.
- Gustavsson, P., Jakobsson, R., Johansson, H., Lewin, F., Norell, S., & Rutkvist, L. E. (1998). Occupational exposures and squamous cell carcinoma of the oral cavity, pharynx, larynx, and oesophagus: a case-control study in Sweden. *Occup Environ Med*, 55(6), 393-400.
- Harréus U. A., Wallner B. C., Kastenbauer E. R., Kleinsasser N. H. (2001). Untersuchungen zur DNA-Reparatur von Schleimhautzellen und Lymphozyten mit dem Comet Assay. *Laryngo-Rhino-Otol*, 80(1), 23-26.

- Hashibe, M., Brennan, P., Chuang, S. C., Boccia, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Kelsey, K., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Lence, J. J., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., McClean, M. D., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A. F., Purdue, M., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D. M., Shangina, O., Pilarska, A., Zhang, Z. F., Ferro, G., Berthiller, J., & Boffetta, P. (2009). Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(2), 541-550.
- Hayakawa, N., Hirakawa, S., Nakai, H., Suzuki, S., & Ota, Z. (1993). The effects of thyroid-stimulating hormone and thyroid microsomal antibody on thyroid peroxidase activity in human follicular cells: a mini organ culture study. *Endocr J*, 40(1), 149-161.
- Hayat, M. J., Howlader, N., Reichman, M. E., & Edwards, B. K. (2007). Cancer statistics, trends, and multiple primary cancer analyses from the Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program. *Oncologist*, 12(1), 20-37.
- Hecht, S. S., & Hoffmann, D. (1988). Tobacco-specific nitrosamines, an important group of carcinogens in tobacco and tobacco smoke. *Carcinogenesis*, 9(6), 875-884.
- Heinrich, P. C., Müller, M., Graeve, L., Löffler, G., Petrides, P. E., Löffler, P., & Heinrich Müller, G. (2014). *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (9., vollst. überarb. Aufl. ed.). Berlin [u.a.]: Springer.
- Ho, M. M., Hogge, D. E., & Ling, V. (2008). MDR1 and BCRP1 expression in leukemic progenitors correlates with chemotherapy response in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, 36(4), 433-442.
- Hoffmann, U., & Kroemer, H. K. (2004). The ABC transporters MDR1 and MRP2: multiple functions in dispositions of xenobiotics and drug resistance. *Drug Metab Rev*, 36(3-4), 669-701.
- Hong, I. S., Jang, G. B., Lee, H. Y., & Nam, J. S. (2015). Targeting cancer stem cells by using the nanoparticles. *Int J Nanomedicine*, 10(Spec Iss), 251-260.

- Huczynski, A. (2012). Salinomycin: a new cancer drug candidate. *Chem Biol Drug Des*, 79(3), 235-238.
- Inaba, N., Sato, N., Ijichi, M., Fukazawa, I., Nito, A., Takamizawa, H., Luben, G., & Bohn, H. (1984). The immunocytochemical location of two membrane-associated placental tissue proteins in human and cynomolgus monkey placentae. *Tumour Biol*, 5(2), 75-85.
- Kanduc, D., Mittelman, A., Serpico, R., Sinigaglia, E., Sinha, A. A., Natale, C., Santacroce, R., Di Corcia, M. G., Lucchese, A., Dini, L., Pani, P., Santacroce, S., Simone, S., Bucci, R., & Farber, E. (2002). Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol*, 21(1), 165-170.
- Kaufmann, W. K. (1995). Cell cycle checkpoints and DNA repair preserve the stability of the human genome. *Cancer Metastasis Rev*, 14(1), 31-41.
- Kim, J.-H., Chae, M., Kim, W. K., Kim, Y.-J., Kang, H. S., Kim, H. S., & Yoon, S. (2011). Salinomycin sensitizes cancer cells to the effects of doxorubicin and etoposide treatment by increasing DNA damage and reducing p21 protein. *British journal of pharmacology*, 162, 773-784.
- Kim, K.-Y., Yu, S.-N., Lee, S.-Y., Chun, S.-S., Choi, Y.-L., Park, Y.-M., Song, C. S., Chatterjee, B., & Ahn, S.-C. (2011). Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochemical and biophysical research communications*, 413, 80-86.
- Kim, K. Y., Yu, S. N., Lee, S. Y., Chun, S. S., Choi, Y. L., Park, Y. M., Song, C. S., Chatterjee, B., & Ahn, S. C. (2011). Salinomycin-induced apoptosis of human prostate cancer cells due to accumulated reactive oxygen species and mitochondrial membrane depolarization. *Biochem Biophys Res Commun*, 413(1), 80-86.
- Kim, W. K., Kim, J. H., Yoon, K., Kim, S., Ro, J., Kang, H. S., & Yoon, S. (2012). Salinomycin, a p-glycoprotein inhibitor, sensitizes radiation-treated cancer cells by increasing DNA damage and inducing G2 arrest. *Invest New Drugs*, 30(4), 1311-1318.

- Kleinsasser, N. H., Juchhoff, J., Wallner, B. C., Bergner, A., Harreus, U. A., Gamarra, F., Buhrlen, M., Huber, R. M., & Rettenmeier, A. W. (2004). The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res*, *561*(1-2), 63-73.
- Klose, J., Stankov, M. V., Kleine, M., Ramackers, W., Panayotova-Dimitrova, D., Jager, M. D., Klempnauer, J., Winkler, M., Bektas, H., Behrens, G. M., & Vondran, F. W. (2014). Inhibition of autophagic flux by salinomycin results in anti-cancer effect in hepatocellular carcinoma cells. *PloS one*, *9*(5), e95970.
- Koo, K. H., Kim, H., Bae, Y. K., Kim, K., Park, B. K., Lee, C. H., & Kim, Y. N. (2013). Salinomycin induces cell death via inactivation of Stat3 and downregulation of Skp2. *Cell Death Dis*, *4*, e693.
- Koopman, G., Reutelingsperger, C. P., Kuijten, G. A., Keehnen, R. M., Pals, S. T., & van Oers, M. H. (1994). Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood*, *84*(5), 1415-1420.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, *14*(1), 32-43.
- Kuo, S. Z., Blair, K. J., Rahimy, E., Kiang, A., Abhold, E., Fan, J.-B., Wang-Rodriguez, J., Altuna, X., & Ongkeko, W. M. (2012). Salinomycin induces cell death and differentiation in head and neck squamous cell carcinoma stem cells despite activation of epithelial-mesenchymal transition and Akt. *BMC cancer*, *12*, 556.
- Lieke, T., Ramackers, W., Bergmann, S., Klempnauer, J., Winkler, M., & Klose, J. (2012). Impact of Salinomycin on human cholangiocarcinoma: induction of apoptosis and impairment of tumor cell proliferation in vitro. *BMC cancer*, *12*, 466.
- Lindemann, M. D., Kornegay, E. T., Stahly, T. S., Cromwell, G. L., Easter, R. A., Kerr, B. J., & Lucas, D. M. (1985). The efficacy of salinomycin as a growth promotant for swine from 9 to 97 kg. *J Anim Sci*, *61*(4), 782-788.

- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I. R., Lu, L., Irvin, D., Black, K. L., & Yu, J. S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer*, 5, 67.
- Lofroth, G. (1989). Environmental tobacco smoke: overview of chemical composition and genotoxic components. *Mutat Res*, 222(2), 73-80.
- Lu, D., Choi, M. Y., Yu, J., Castro, J. E., Kipps, T. J., & Carson, D. a. (2011). Salinomycin inhibits Wnt signaling and selectively induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 13253-13257.
- Lu, W., & Li, Y. (2014). Salinomycin suppresses LRP6 expression and inhibits both Wnt/beta-catenin and mTORC1 signaling in breast and prostate cancer cells. *J Cell Biochem*, 115(10), 1799-1807.
- Lu, Y., Ma, W., Mao, J., Yu, X., Hou, Z., Fan, S., Song, B., Wang, H., Li, J., Kang, L., Liu, P., Liu, Q., & Li, L. (2015). Salinomycin exerts anticancer effects on human breast carcinoma MCF-7 cancer stem cells via modulation of Hedgehog signaling. *Chem Biol Interact*, 228, 100-107.
- Maier, H., Dietz, A., Gewelke, U., Heller, W. D., & Weidauer, H. (1992). Tobacco and alcohol and the risk of head and neck cancer. *Clin Investig*, 70(3-4), 320-327.
- Maier, H., & Tisch, M. (1997). Epidemiology of laryngeal cancer: results of the Heidelberg case-control study. *Acta Otolaryngol Suppl*, 527, 160-164.
- Maier, H., Zoller, J., Herrmann, A., Kreiss, M., & Heller, W. D. (1993). Dental status and oral hygiene in patients with head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 108(6), 655-661.
- Martens-de Kemp, S. R., Brink, A., Stigter-van Walsum, M., Damen, J. M., Rustenburg, F., Wu, T., van Wieringen, W. N., Schuurhuis, G. J., Braakhuis, B. J., Slijper, M., & Brakenhoff, R. H. (2013). CD98 marks a subpopulation of head and neck squamous cell carcinoma cells with stem cell properties. *Stem Cell Res*, 10(3), 477-488.

- McGuirt, W. F. (1983). Head and neck cancer in women--a changing profile. *Laryngoscope*, 93(1), 106-107.
- Mehlhorn, H., Ganster, H. J., & Raether, W. (1984). Effect of salinomycin-Na on malaria parasites (*Plasmodium falciparum* and *P. berghei*). *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A*, 256(3), 305-313.
- Merkle, H. P., Ditzinger, G., Lang, S. R., Peter, H., & Schmidt, M. C. (1998). In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Deliv Rev*, 29(1-2), 51-79.
- Mitani, M., Yamanishi, T., & Miyazaki, Y. (1975). Salinomycin: a new monovalent cation ionophore. *Biochem Biophys Res Commun*, 66(4), 1231-1236.
- Mitani, M., Yamanishi, T., Miyazaki, Y., & Otake, N. (1976). Salinomycin effects on mitochondrial ion translocation and respiration. *Antimicrob Agents Chemother*, 9(4), 655-660.
- Miyazaki, Y., Shibuya, M., Sugawara, H., Kawaguchi, O., & Hirsoe, C. (1974). Salinomycin, a new polyether antibiotic. *J Antibiot (Tokyo)*, 27(11), 814-821.
- Morley, N., Rapp, A., Dittmar, H., Salter, L., Gould, D., Greulich, K. O., & Curnow, A. (2006). UVA-induced apoptosis studied by the new apo/necro-Comet-assay which distinguishes viable, apoptotic and necrotic cells. *Mutagenesis*, 21(2), 105-114.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65, 55-63.
- Murillo-Sauca, O., Chung, M. K., Shin, J. H., Karamboulas, C., Kwok, S., Jung, Y. H., Oakley, R., Tysome, J. R., Farnebo, L. O., Kaplan, M. J., Sirjani, D., Divi, V., Holsinger, F. C., Tomeh, C., Nichols, A., Le, Q. T., Colevas, A. D., Kong, C. S., Uppaluri, R., Lewis, J. S., Ailles, L. E., & Sunwoo, J. B. (2014). CD271 is a functional and targetable marker of tumor-initiating cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 5, 6854-6866.
- Naujokat, C., & Fuchs, D. (2010). Salinomycin in cancer : A new mission for an old agent. *Mol Med Rep*, 3, 555-559.

- Naujokat, C., & Steinhart, R. (2012). Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells. *J Biomed Biotechnol*, 2012, 950658.
- Nicpon, J., Czerw P., Harps, O., Deegen, E. (1997). Salinomycin poisoning in a Polish stud horse. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*, 25(5), 438-41.
- Nigg, E. A. (1995). Cyclin-dependent protein kinases: key regulators of the eukaryotic cell cycle. *Bioessays*, 17(6), 471-480.
- Oak, P. S., Kopp, F., Thakur, C., Ellwart, J. W., Rapp, U. R., Ullrich, A., Wagner, E., Knyazev, P., & Roidl, A. (2012). Combinatorial treatment of mammospheres with trastuzumab and salinomycin efficiently targets HER2-positive cancer cells and cancer stem cells. *Int J Cancer*, 131(12), 2808-2819.
- Olive, P. L., Banath, J. P., & Durand, R. E. (1990). Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res*, 122(1), 86-94.
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123(1), 291-298.
- Ostling, O., & Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. 123, 291-298.
- Parajuli, B., Shin, S. J., Kwon, S. H., Cha, S. D., Chung, R., Park, W. J., Lee, H. G., & Cho, C. H. (2013). Salinomycin induces apoptosis via death receptor-5 up-regulation in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Anticancer Res*, 33(4), 1457-1462.
- Prince, M. E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G. T., Kaplan, M. J., Dalerba, P., Weissman, I. L., Clarke, M. F., & Ailles, L. E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3), 973-978.
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414, 105-111.

- Riccioni, R., Dupuis, M. L., Bernabei, M., Petrucci, E., Pasquini, L., Mariani, G., Cianfriglia, M., & Testa, U. (2010). The cancer stem cell selective inhibitor salinomycin is a p-glycoprotein inhibitor. *Blood Cells Mol Dis*, 45(1), 86-92.
- Rosenquist, K. (2005). Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl*(179), 1-66.
- Scherzed, A., Hackenberg, S., Froelich, K., Rak, K., Ginzkey, C., Hagen, R., Schendzielorz, P., & Kleinsasser, N. (2015). Effects of salinomycin and CGP37157 on head and neck squamous cell carcinoma cell lines in vitro. *Molecular Medicine Reports*, 12, 4455-4461.
- Scherzed, A., Hackenberg, S., Froelich, K., Rak, K., Technau, A., Radeloff, A., Noth, U., Koehler, C., Hagen, R., & Kleinsasser, N. (2013). Effects of salinomycin on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Toxicol Lett*, 218(3), 207-214.
- Scholey, J. M., Brust-Mascher, I., & Mogilner, A. (2003). Cell division. *Nature*, 422(6933), 746-752.
- Schottenfeld, D. (1979). Alcohol as a co-factor in the etiology of cancer. *Cancer*, 43(5 Suppl), 1962-1966.
- Shaw, P. H. (1996). The role of p53 in cell cycle regulation. *Pathol Res Pract*, 192(7), 669-675.
- Simard, E. P., Torre, L. A., & Jemal, A. (2014). International trends in head and neck cancer incidence rates: Differences by country, sex and anatomic site. *Oral oncology*, 50(5), 387-403.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., & Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175(1), 184-191.
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer research*, 63, 5821-5828.

- Steinsvag, S. K., Strand, M., Berg, O., Miaguchi, M., & Olofsson, J. (1991). Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope*, *101*(12 Pt 1), 1323-1331.
- Story, P., & Doube, A. (2004). A case of human poisoning by salinomycin, an agricultural antibiotic. *N Z Med J*, *117*(1190), U799.
- Tang, Q.-L., Zhao, Z.-Q., Li, J.-C., Liang, Y., Yin, J.-Q., Zou, C.-Y., Xie, X.-B., Zeng, Y.-X., Shen, J.-N., Kang, T., & Wang, J. (2011). Salinomycin inhibits osteosarcoma by targeting its tumor stem cells. *Cancer letters*, *311*, 113-121.
- Torbergson, A. C., & Collins, A. R. (2000). Recovery of human lymphocytes from oxidative DNA damage; the apparent enhancement of DNA repair by carotenoids is probably simply an antioxidant effect. *Eur J Nutr*, *39*(2), 80-85.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*, *65*, 87-108.
- Van Duuren, B. L., & Goldschmidt, B. M. (1976). Cocarcinogenic and tumor-promoting agents in tobacco carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, *56*(6), 1237-1242.
- Wang, B., Yang, H., Huang, Y. Z., Yan, R. H., Liu, F. J., & Zhang, J. N. (2010). Biologic characteristics of the side population of human small cell lung cancer cell line H446. *Chin J Cancer*, *29*(3), 254-260.
- Wang, F., He, L., Dai, W.-Q., Xu, Y.-P., Wu, D., Lin, C.-L., Wu, S.-M., Cheng, P., Zhang, Y., Shen, M., Wang, C.-F., Lu, J., Zhou, Y.-Q., Xu, X.-F., Xu, L., & Guo, C.-Y. (2012). Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo. *PloS one*, *7*, e50638.
- Wang, Y. (2011). Effects of salinomycin on cancer stem cell in human lung adenocarcinoma A549 cells. *Med Chem*, *7*(2), 106-111.

- Wu, D., Zhang, Y., Huang, J., Fan, Z., Shi, F., & Wang, S. (2014). Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cell in vitro and suppresses tumor growth in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 443(2), 712-717.
- Yan, M., Yang, X., Wang, L., Clark, D., Zuo, H., Ye, D., Chen, W., & Zhang, P. (2013). Plasma membrane proteomics of tumor spheres identify CD166 as a novel marker for cancer stem-like cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cell Proteomics*, 12(11), 3271-3284.
- Yuan, S., Wang, F., Chen, G., Zhang, H., Feng, L., Wang, L., Colman, H., Keating, M. J., Li, X., Xu, R. H., Wang, J., & Huang, P. (2013). Effective elimination of cancer stem cells by a novel drug combination strategy. *Stem Cells*, 31(1), 23-34.
- Zhang, G.-N., Liang, Y., Zhou, L.-J., Chen, S.-P., Chen, G., Zhang, T.-P., Kang, T., & Zhao, Y.-P. (2011). Combination of salinomycin and gemcitabine eliminates pancreatic cancer cells. *Cancer letters*, 313, 137-144.
- Zhang, Y., Zhang, H., Wang, X., Wang, J., Zhang, X., & Zhang, Q. (2012). The eradication of breast cancer and cancer stem cells using octreotide modified paclitaxel active targeting micelles and salinomycin passive targeting micelles. *Biomaterials*, 33(2), 679-691.
- Zhi, Q. M., Chen, X. H., Ji, J., Zhang, J. N., Li, J. F., Cai, Q., Liu, B. Y., Gu, Q. L., Zhu, Z. G., & Yu, Y. Y. (2011). Salinomycin can effectively kill ALDH(high) stem-like cells on gastric cancer. *Biomed Pharmacother*, 65(7), 509-515.
- Zhou, J., Li, P., Xue, X., He, S., Kuang, Y., Zhao, H., Chen, S., Zhi, Q., & Guo, X. (2013). Salinomycin induces apoptosis in cisplatin-resistant colorectal cancer cells by accumulation of reactive oxygen species. *Toxicol Lett*, 222(2), 139-145.
- Zhou, L., Wei, X., Cheng, L., Tian, J., & Jiang, J. J. (2007). CD133, one of the markers of cancer stem cells in Hep-2 cell line. *Laryngoscope*, 117(3), 455-460.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bedanken:

- Bei Herrn Univ.-Professor Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen für die Möglichkeit, diese Dissertation an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg durchführen zu können.
- Bei Herrn Univ.-Professor Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA, meinem Doktorvater, für die interessante Themenstellung, stetige Motivation und Förderung meiner Arbeit.
- Bei meinen Betreuern, Herrn PD Dr. med. Stephan Hackenberg und Herrn PD Dr. med. Agmal Scherzad, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen.
- Bei Herrn Michael Kessler für seine geduldige Hilfe bei labortechnischen Fragen und seine Kollegialität.
- Bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und dem Laborteam um Frau Petra Joa.
- Bei den Operateuren und OP-Assistenten der Klinik und Poliklinik für Hals-, -Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastischen und ästhetischen Operationen der Universität Würzburg für die Gewinnung der Gewebeprobe.
- Bei meinem Ehemann, meiner Familie und meinen Freunden für die vielfältige Unterstützung, Geduld und Motivation bei der Erstellung dieser Arbeit.