Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des Universitätsklinikums Halle (Saale) (Direktor: Prof. Dr. med. habil. Stefan Plontke)

Genexpressionsanalysen der Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13 in refluxexponierten Miniorgankulturen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Franziska Schwarzer geboren am 18.03.1986 in Halle (Saale)

Betreuer:	PD Dr. med. Kerstin Hoffmann
Gutachter:	PD Dr. med. Kerstin Hoffmann
	Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Dittmer
	Prof. MD PhD Karl-Heinz Herzig
Verteidigungsdatum:	18.11.2013

<u>Referat</u>

Einleitung: Laryngopharyngealer Reflux wird neben exogenen Noxen (Tabak, Alkohol) und Infektionen (HPV, EBV) als ein Risikofaktor für die Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtraktes gemutmaßt. Ausgehend von der Tatsache, dass Matrix-Metalloproteinasen, eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen unterschiedlicher Struktur, an verschiedenen Differenzierungsprozessen humanen Gewebes beteiligt sind und eine besondere Rolle bei malignen Tumoren des OADT einnehmen, lag der Fokus dieser Studie auf der Untersuchung refluxassoziierter Expressionsmuster ausgewählter Metalloproteinasen: MMP 9, 12 und 13.

<u>Material und Methoden</u>: Nach Conchotomie wurden die Conchae nasales inferiores von 19 Patienten standardisiert 7 Tage als Miniorgankultur bzw. als ausgewachsene Epithelzellen kultiviert und anschließend mit humanem bzw. artifiziellem Magensaft der pH-Werte 4,5 und 5,5 eine Stunde inkubiert. "Positiv-" und "Negativprobe" wurden mitgeführt. Nach Isolierung der mRNA aus diesen Geweben mit darauffolgender cDNA-Synthese erfolgte die Amplifikation mittels PCR. Über die anschließende Gelelektrophorese wurden die amplifizierten DNA-Fragmente identifiziert und die Bandenintensität quantifiziert. Ausgewählte PCR-Produkte wurden sequenziert. Eine vergleichende Genexpressionsanalyse erfolgte durch die DNA-Hybridisierung mittels Microarray. GAPDH diente in allen Experimenten als Referenzgen.

Ergebnisse: Nach Konditionierung der Mukosa mit Magensaft zeigten MMP 9, 12 und 13 im Gegensatz zur "Negativprobe" keine signifikanten Expressionsveränderungen. Humaner und artifizieller Magensaft verhielten sich gleichsinnig. MMP 13 stellte sich in einigen Fällen als Doppelbande dar. Diese wurde nach Sequenzierung als genomische DNA identifiziert. Kultivierung und Konditionierung der Epithelzellen erwies sich als diffizil, die Ergebnisausbeute war gering. Für zwei Patientenproben wurde vergleichend ein DNA-Microarray durchgeführt. Die Ergebnisse decken sich mit denen der semiquantitativen PCR.

Signifikante Expressionsunterschiede zeigten innerhalb der "Negativproben" MMP 9 bei Patienten mit dem anamnestisch ermittelten Risikomerkmal "Tabakkonsum" sowie MMP 12 bei Patienten mit dem Risikomerkmal "Refluxbeschwerden".

Diskussion und Schlussfolgerung: Mit dem vorliegenden Modell war es möglich, auf molekularer Ebene den Einfluss sauren Magensaftes auf die Mukosa des OADT zu untersuchen sowie Expressionsanalysen der Matrix-Metalloproteinasen durchzuführen. Dabei zeigten MMP 9, 12 und 13 im Modell keine Reflux-induzierten Expressionsunterschiede.

Der Einfluss einzelner Komponenten des Magensaftes sowie die Rolle anderer Matrix-Metalloproteinasen sollen in weiteren Studien untersucht werden.

Schwarzer, Franziska: Genexpressionsanalysen der Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13 in refluxexponierten Miniorgankulturen. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 65 Seiten, 2012

<u>Inhalt</u>

1.	Einleitung1
1.1.	Noxen im oberen Aerodigestivtrakt1
1.2.	Reflux im oberen Aerodigestivtrakt2
1.3.	Matrix-Metalloproteinasen5
1.3.1.	Aufbau5
1.3.2.	Funktion6
1.3.3.	Bedeutung in Tumoren7
1.3.4.	MMP 9 (Gelatinase B)7
1.3.5.	MMP 12 (Makrophagen Metalloelastase)8
1.3.6.	MMP 13 (Collagenase 3)9
1.3.7.	Expression und Regulation10
1.4.	GAPDH12
1.5.	Modellsystem
2.	Zielstellung13
3.	Material und Methodik14
3.1.	Material14
3.1.1.	Reagenzien14
3.1.2.	Kits15
3.1.3.	Oligonukleotide16
3.1.4.	Kulturmedium und Gelelektrophorese16
3.1.5.	Geräte17
3.2.	Patientengut und Materialgewinnung18
3.3.	Methodik19
3.3.1.	Präparation von Miniorganen19
3.3.2.	Kultivierung
3.3.3.	Schädigung
3.3.3.	Isolierung der mRNA
3.3.4.	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion23
3.3.5.	Gelelektrophorese24
3.3.6.	Sequenzierung24
3.3.7.	DNA-Microarray25
3.3.8.	Statistische Auswertung der Ergebnisse

4.	Ergebnisse	27
4.1.	RNA-Isolation	27
4.1.1.	Kits	27
4.1.2.	Qualitätskontrolle der RNA-Isolation	27
4.2.	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	
4.2.1.	GAPDH	
4.2.2.	Matrix-Metalloproteinasen, Kollektiv I	
4.2.3.	Matrix-Metalloproteinasen, Kollektiv II	
4.3.	DNA-Microarray	
4.4.	Anamnestische Merkmale	
5.	Diskussion	41
5.1.	Modellsystem	41
5.2.	Genregulation im Refluxmodell	46
5.3.	Statistische Auswertung	47
6.	Zusammenfassung	
7.	Literaturverzeichnis	
8.	Anlagen	56
8.1.	RNA-Isolations-Kits	56
8.2.	Kollektiv I	
8.2.1.	Signalintensitäten nach Gelelektrophorese	57
8.2.2.	Statistik: Vergleichsbasis "Nativprobe"	
8.2.3.	Statistik: Vergleichsbasis "Negativprobe"	
8.2.4.	Statistik: Genregulation	60
8.2.5.	Statistik: Vergleichsbasis "Magensaftproben"	61
8.3.	Kollektiv II	62
8.3.1.	Signalintensitäten nach Gelelektrophorese	62
8.3.2.	Statistik: Vergleichsbasis "Negativprobe"	62
8.4.	DNA-Microarray	63
9.	Thesen	65

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung	
ADAM	A desintegrin and metalloproteinase	
ADAMTS	ADAM-Proteinase mit Thrombospondin-Motiv	
AECG	Airway epithelial cell growth medium	
AP-1	Aktivator Protein-1	
ARDS	Acute respiratory distress syndrome	
art. MS	Artifizieller Magensaft	
ATF	Activating transcription factor	
AU	Arbitrary units	
BAEE	Benzoylargininethylester	
bp	Basenpaar	
BSA	Bovine serum albumin	
°C	Grad Celsius	
CA-MMP	Cystein Array MMP	
cDNA	Complementary DNA	
cm	Zentimeter	
CO ₂	Kohlendioxid	
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung	
d	Tag	
DEPC	Diethylpyrocarbonat	
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	
DNA	Desoxyribonukleinsäure	
DNase	Desoxyribonuklease	
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphate	
EBV	Epstein-Barr-Virus	
ECM	Extrazellularmatrix	
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure	
EGF	Epidermal growth factor	
EpC	Epithelzellen (Einzelzellen)	
et al.	Und andere	
FKS	Fötales Kälberserum	
g	Erdbeschleunigung	
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	
CDCC	Gev's balanced salt solution	

gDNA	Genomic DNA	
GER	Gastroösophagealer Reflux	
GERD	Gastroesophageal reflux disease	
GUSB	β-Glucuronidase	
H ₂ O	Wasser	
H_2O_2	Wasserstoffperoxyd	
HCl	Chlorwasserstoff	
HNO	Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde	
HPV	Humanes-Papilloma-Virus	
IL	Interleukin	
KGF	Keratinocyte growth factor	
LPR	Laryngopharyngealer Reflux	
min	Minute	
ml	Milliliter	
μg	Mikrogramm	
μl	Mikroliter	
mm	Millimeter	
MMP	Matrix-Metalloproteinase	
MOC	Miniorgankultur	
mRNA	Messenger RNA	
MS	Magensaft	
MT-MMP	Membran-Typ MMP	
MW	Mittelwert	
NaCl	Natriumchlorid	
neg.	Negativprobe	
ng	Nanogramm	
NGF	Nerve growth factor	
nm	Nanometer	
OADT	Oberer Aerodigestivtrakt	
OD	Optical density	
OÖS	Oberer Ösophagussphinkter	
PBS	Phosphate buffered saline	
PCR	Polymerase chain reaction	
PDGF	Platelet-derived growth factor	
PenStrep	Penicillin-Streptomycin-Lösung	

pH	Negativer dekadischer Logarithmus der	
	Protonenkonzentration	
pos.	Positivprobe	
proMMP	Inaktives Proenzym der Matrix-Metalloproteinase	
RA	Rheumatoide Arthritis	
RNA	Ribonukleinsäure	
RNase	Ribonuklease	
S	Standardabweichung	
SCC	Squamous cell carcinoma	
SPSS	Statistical package for social sciences	
Tab.	Tabelle	
TAE	Tris-Acetat-EDTA	
TBP	TATA-binding protein	
TGF	Tumor growth factor	
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase	
TNF	Tumornekrosefaktor	
UÖS	Unterer Ösophagussphinkter	
V	Volt	
VEGF	Vascular endothelial growth factor	

1. Einleitung

1.1. Noxen im oberen Aerodigestivtrakt

Der obere Aerodigestivtrakt (OADT) des Menschen, zu welchem die Mundhöhle, Epi-, Meso-, Hypopharynx sowie Larynx zählen, ist im Laufe des Lebens zahlreichen Noxen ausgesetzt. Zu den exogenen Noxen zählen dabei Tabak- und Alkoholkonsum, chemische Schadstoffe, meist unter beruflicher Exposition sowie Infektionen mit dem Epstein-Barr- oder dem Humanen-Papilloma-Virus. Als endogener Faktor mit pathogener Wirkung auf das Epithel im Kopf- und Halsbereich wird zusätzlich der gastroösophageale (GER) bzw. der laryngopharyngeale Reflux (LPR) gezählt.

Da der OADT verschiedene anatomische Bezirke unterschiedlicher physiologischer Funktion inkludiert, können diese Noxen, welche im OADT oft ubiquitär präsent sind, eine Bandbreite an histopathologischen Veränderungen hervorrufen. Nicht selten bestehen dabei simultane Veränderungen in ungleicher Lokalisation (Feldkanzerisierung). Diese Veränderungen können selbstlimitierend und reversibel sein, sie können jedoch auch persistieren und in maligne Prozesse übergehen. Von squamösen Hyperplasien über Carcinomata in situ bis hin zu invasiven Karzinome kann ein Spektrum an intraepithelialen Läsionen im Kopf- und Halsbereich verzeichnet werden [Crissmann et al., 1993]. Der Übergang von gesundem zu geschädigtem Epithel und der späteren Entwicklung maligner Zellen ist assoziiert mit einer Akkumulation von genetischen Veränderungen der Einzelzelle und späterer klonaler Expansion [Ha und Califano, 2002].

Endoskopische Befunde sind als Indikator für zugrunde liegende Epithelschäden nicht aussagekräftig genug. Daher gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen bezüglich der zytogenetischen Veränderungen in Läsionen des OADT. Zuverlässige genetische Marker von diagnostischem und prognostischem Wert sind jedoch noch weitgehend unerschlossen.

Da der Abbau von Extrazellulärmatrix ein Schlüsselgeschehen in Progression, Invasion und Metastasierung von potentiell malignen sowie malignen Läsionen der Kopf-Hals-Region darstellt, besteht in der Literatur bereits die Assoziation zwischen Krankheitsgeschehen und Expression von Matrix Metalloproteinasen und deren Inhibitoren [Chaudhary et al., 2010].

Diese Studie untersucht im Modellversuch die Bedeutung von Matrix-Metalloproteinasen als genetische Marker in Epithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes, nachdem diese, im Sinne eines Refluxgeschehens, einer potentiellen Schädigung mit Magensäure ausgesetzt wurden.

1.2. Reflux im oberen Aerodigestivtrakt

Der gastroösophageale Reflux (GER) bezeichnet einen Rückfluss von saurem Mageninhalt in die Speiseröhre, bedingt durch eine Insuffizienz des unteren Ösophagussphinkters. Hierbei muss bezüglich der Häufigkeit und Dauer des Refluxes sowie der Art des Refluxates zwischen dem physiologisch vorkommenden Reflux beim Gesunden und dem pathologischen gastroösophagealem Reflux differenziert werden.

Eine gastroösophageale Refluxkrankheit (engl.: gastroesophageal reflux disease, GERD) liegt per definitionem vor, "wenn ein Risiko für organische Komplikationen durch einen gesteigerten gastroösophagealen Reflux und/oder eine signifikante Störung des gesundheitsbezogenen Wohlbefindens infolge der Refluxbeschwerden besteht" [Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten, 2005]. Bereits im Jahr 1906 deklarierte Wilder Tileston, Pathologe der Harvard University, als einer der Ersten in der Literatur den Zusammenhang zwischen dem Rückfluss von Magensaft und damit verbundener Schäden der Ösophagusmukosa als eigenständige Erkrankung [Tileston, 1906]. In der aktuellen Literatur, über ein Jahrhundert später, geht man davon aus, dass circa 10% der Bevölkerung von der gastroösophagealen Refluxkrankheit betroffen sind [Deutsche Gesellschaft für Verdauungsund Stoffwechselkrankheiten, 2005]. Anamnestisch berichten die betroffenen Patienten in Klinik und Praxis über Symptome wie Sodbrennen, vor allem postprandial und im Liegen, brennende retrosternale und epigastrische Schmerzen, saures Aufstoßen sowie Regurgitationen. Überzufällig häufig werden auch extraösophageale Symptome wie Heiserkeit, Dysphonie oder chronischer Reizhusten verzeichnet. Diesen extraösophagealen Manifestationen der GERD obliegt zunehmendes wissenschaftliches Interesse. Erstmalig beschrieb Kennedy 1962 in seiner Publikation "Silent gastroesophageal reflux: an important but little known cause of pulmonary complications" die Möglichkeit, dass der Rückfluss von Magensaftbestandteilen ursächlicher oder beitragender Faktor verschiedener Atemwegserkrankungen sein kann [Kennedy, 1962]. Vor allem im Zuge der Einführung der ambulanten 24-h-pH-Metrie in den 70er Jahren, welche heute als Goldstandard in der Refluxdiagnostik anzusehen ist, folgten zahlreiche weitere Arbeiten [Groen und Smout, 2003].

Nach derzeitigen Erkenntnissen sieht man die im Folgenden tabellarisch dargestellten Symptome und klinische Bilder in engem Zusammenhang mit dem pathologischen Reflux von Mageninhalt (siehe *Tab. 1*). Sie schließen Mundhöhle, Naso-, Oro-, Laryngopharynx, Larynx und sogar den Sinus maxillaris sowie das Mittelohr ein.

	Orale	HNO-	Pulmonale
	Manifestationen	Manifestationen	Manifestationen
Symptome	-Brennender Schmerz	-Chronischer Husten	-Chronischer Husten
	-Juckreiz	-Heiserkeit	-Haemoptysis
	-Hypersensitivität	-Postnasal-Drip-Syndrom	
	von Zähne und Zunge	-Räusperzwang	
	-Foetor ex ore	-Globusgefühl	
		-Dysphagie	
		-Dysphonie	
		-Laryngospasmus	
		-Apnoe	
Klinische	-Ulzerationen	-Ödem u. Hyperämie des	-Asthma bronchiale
Zeichen	-Zahnerosionen	Larynx	-Bronchiektasien
		-Hyperämie u. Hyperplasie	-Lungenfibrose
		des posterioren Larynx-	
		abschnittes ("Cobblestone")	
		-Granulome	
		-Kontaktulzerationen	
		-Polypen des Larynx	
		-Reinke-Ödem	
		-Subglottische Stenose	
Entzündungen		-Sinusitis	-Bronchitis
		-Otitis media	-Pneumonie
		-Pharyngitis	
		-Laryngitis	
Tumoren	- SCC der Mundhöhle	-Pharynxkarzinom	
		-Larynxkarzinom	

Tab. 1: Extraösophageale Manifestationen bei Refluxkrankheit. Modifiziert nach Farrokhi et al., 2007.

Für interdisziplinär klarere Definitionen zwischen refluxassoziierten gastroenterologischen Krankheitsbildern (Ösophagitis, Barrett-Ösophagus) und extraösophageal relevanten Manifestationen ist der Begriff des laryngopharyngealen Refluxes (LPR) geprägt worden. Der gastroösophageale Reflux stellt zwar die Basis für Erkrankungen beider anatomischer Bereiche, Verdauungstrakt und Atemwege, dar, jedoch müssen in Hinblick auf unterschiedliche Refluxmechanismen und -auswirkungen GER und LPR getrennt voneinander betrachtet werden [Lipan et al., 2006].

Ist beim gastroösophagealen Reflux die Insuffizienz des unteren Ösophagussphinkters (UÖS) als anatomisch grundlegender Mechanismus anzusehen, so ist beim laryngpharyngealen

Reflux von einer zusätzlichen funktionellen Schwäche des oberen Ösophagussphinkters (OÖS) auszugehen. Ebenso gibt es Unterschiede in den Mechanismen der Säureneutralisation. So sorgen beispielsweise im Ösophagus intermittierend geschluckte Speichelmengen nicht nur für peristaltische Wellen, welche möglichen Mageninhalt antegrad weitertransportieren, sondern sie sorgen auch, aufgrund des Flüssigkeitsfilmes, für geringere Kontaktzeiten zwischen Magensäure und Mukosa sowie aufgrund des vorherrschenden pH-Wertes zwischen 5,8 und 7,1 für eine gewisse Säureneutralisation [Helm et al., 1982].

Innerhalb der Atemwege entfallen diese Antirefluxmechanismen bzw. sind beim Gesunden nicht notwendig, da im physiologischen Zustand saurer Mageninhalt mit dem oberen Aerodigestivtrakt nicht in Kontakt kommt. Diesbezüglich geht man davon aus, dass bereits ein einzelnes Refluxereignis innerhalb von 24 Stunden epitheliale Schäden im OADT bedingen kann, wohingegen im Ösophagus bis zu 50 Refluxepisoden pro Tag als physiologisch anzusehen sind [Postma et al., 2001]. Rezidivierende Refluxereignisse bedingen dementsprechend rezidivierende Epithelschäden. Gewebsdestruktionen, Entzündungen und sogar maligne Prozesse werden darauf zurückgeführt. Die exakte zelluläre Antwort auf den laryngopharyngealen Reflux ist dabei in der Forschung noch weitgehend ungeklärt.

Als eines der häufigsten refluxassoziierten Krankheitsbilder wird die Laryngitis posterior bzw. Laryngitis gastrica angesehen, eine Sonderform der chronischen Kehlkopfentzündung. Symptomatisch bestimmen (therapierefraktäre) Heiserkeit, Räusperzwang, Globusgefühl und Dysphonie das klinische Bild. Laryngoskopisch zeigt sich vor allem im Bereich der posterioren Larynxabschnitte, der Interarytenoidregion, der hinteren Kommissur sowie des Postkrikoidbezirkes eine ödematöse, hyperämische, hyperplastische Schleimhaut im Sinne eines "Cobblestone"-Musters (dt.: Pflasterstein) sowie Kontaktulzerationen und -granulome [Groen und Smout, 2003; Farrokhi und Vaezi, 2007].

Neben der chronischen Laryngitis posterior liegt ein weiteres Hauptaugenmerk auf dem Zusammenhang von LPR und dem Larynxkarzinom. Das Larynxkarzinom stellt mit circa 40% das häufigste Malignom im Kopf-Hals-Bereich dar. In der Gesamtheit aller Karzinome macht es circa 1-2% aus. Männer sind bis zu zehnmal häufiger betroffen als Frauen, wobei der Altersgipfel zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr liegt [Probst et al., 2008]. 95% der Larynxkarzinome sind Plattenepithelkarzinome, welche durch das rezidivierende und kontinuierliche Einwirken von Noxen hervorgerufen werden. Primär werden hierzu der Alkohol- und Tabakkonsum (vor allem in Kombination) gezählt. Weitere Noxen sind bei beruflicher Exposition Karzinogene wie Asbest, Chromate, Benzol und aromatische Kohlenwasserstoffe. Aber auch Infektionen mit dem Humanen-Papilloma-Virus (HPV) oder dem Epstein-Barr-Virus (EBV) werden mit der Entstehung des Larynxkarzinoms in Verbindung gebracht. Als endogene Noxe wird in der Literatur der laryngopharyngeale Reflux erst seit wenigen Jahren zu möglichen Risikofaktoren des Kehlkopfkrebses gezählt [Thurnher, 2010].

Obwohl der kausale Zusammenhang von Reflux und Karzinogenese keinesfalls gesichert ist, gibt es Hinweise auf refluxinduzierte Schäden des Zellverbandes mit verbundenen Modifikationen in der Genexpression.

1.3. Matrix-Metalloproteinasen

1.3.1. Aufbau

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) sind proteolytische Enzyme mit katalytischer Aktivität, welche über Hydrolyse Peptidbindungen spalten können. Sie zählen innerhalb der Familie der Metzincins, welcher ebenso die ADAM- (a disintegrin and metalloproteinase) und ADAMTS-Proteinasen (ADAM-Proteinase mit Thrombospondin-Motiv) sowie die Serralysinund Astacin-Metalloproteasen angehören, zu den substratspezifischen, Zink-(II)-abhängigen Endopeptidasen [Klein und Bischoff, 2011]. Im Gegensatz zu Exopeptidasen, welche endständige Aminosäuren abspalten, trennen MMPs die Peptidbindungen im Inneren einer Polypeptidkette und lassen so Fragmente kleinerer Kettenlängen entstehen. Sie werden im menschlichen Organismus ubiquitär exprimiert.

Bis dato sind 23 MMPs in humanem Gewebe identifiziert worden (siehe *Tab.* 2). Allen MMPs gemeinsam ist die aminoterminale Region mit Signalpeptid und Propeptiddomäne sowie das ionisierte Zinkatom, welches in der katalytischen Domäne an einen Aminosäurerest gebunden ist [Wagener und Müller, 2010].

Wie bei einem Großteil anderer Proteinasen werden auch die MMPs in Form von inaktiven Proenzymen (proMMP) bzw. Zymogenen synthetisiert, welche über Autoproteolyse oder über die Aktivierung durch andere Proteinasen in deren biologisch aktive Form überführt werden. Bei dem sogenannten "Zystein-Switch" erfolgt die proteolytische Spaltung des Propeptids, wodurch die Zystein-Zink-Interaktion gestört wird und die Aktivierung der jeweiligen Matrix-Metalloproteinase erfolgt [van Wart und Birkedal-Hansen, 1990].

Außer den Matrix-Metalloproteinasen 7, 23 und 26 besitzen zusätzlich alle MMPs eine C-terminale Hämopexin-ähnliche Domäne, welche für die Substratbindung essentiell ist [Murphy und Nagase, 2011]. Es ist davon auszugehen, dass es zwischen den verschiedenen Metalloproteasen zu Überschneidung hinsichtlich der Substratspezifität kommt und eine klare Einteilung nicht immer möglich ist. Jedoch kristallisieren sich vier Untergruppen der MMPs heraus: die Collagenasen, welche fibrilläres Kollagen abbauen; die Gelatinasen, deren Substrate denaturierte bzw. hydrolysierte Kollagene sind; die Stromelysine, welche Proteoglykane und Glykoproteine spalten können; Membran-Typ MMPs (MT-MMP), welche in proteolytische Prozesse der Zelloberfläche involviert sind; sowie eine heterogene Gruppe aus MMPs, welche sich den drei zuerst genannten Substratspezifitäten nicht zuordnen lassen.

MMP	Name(n)	chromosomale	zelluläre
#		Lokalisation	Lokalisation
1	Collagenase 1 interstitielle Collagenase	11q22.2-22.3	sezerniert
8	Collagenase 2 neutrophile Kollagenase	11q22.2-22.3	sezerniert
13	Collagenase 3	11q22.2-22.3	sezerniert
2	Gelatinase A 72-kDa Gelatinase	16q13	sezerniert
9	Gelatinase B 92-kDa Gelatinase	20q11.2-q13.1	sezerniert
3	Stromelysin 1 Transin-1	11q22.2-22.3	sezerniert
10	Stromelysin 2	11q22.2-22.3	sezerniert
11	Stromelysin 3	22q11.2	sezerniert
14	MT1-MMP	14q12.2	membranständig
15	MT2-MMP	16q12.2	membranständig
16	MT3-MMP	8q21	membranständig
17	MT4-MMP	12q24	membranständig
24	MT5-MMP	20q11.2	membranständig
25	MT6-MMP	16q13.3	membranständig
7	Matrilysin-1 Pump-1	11q22.2-22.3	sezerniert
26	Matrilysin-2 Endometase	11q22.2	
12	Makrophagen Metalloelastase	11q22.2-22.3	sezerniert
19	RASI-1	12q14	
20	Enamelysin		sezerniert
21	X-MMP		sezerniert
23	Cystein Array MMP (CA-MMP)	1p36.3	membranständig
27	C-MMP	11q24	
28	Epilysin	17q11.2	sezerniert

Tab. 2: Humane Matrix-Metalloproteinasen. Modifiziert nach Chaudhary et al., 2010 sowie Klein und Bischoff, 2011.

1.3.2. Funktion

Matrix-Metalloproteinasen sind extrazelluläre Endopeptidasen. Sie werden von den entsprechenden Zellen entweder in löslicher Form sezerniert oder befinden sich in gebundener Form an der zellulären Plasmamembran. MMPs sind in der Lage, Extrazellulärmatrix zu hydrolysieren und spielen damit eine wichtige Rolle in Embryonalentwicklung, Organo- und Morphogenese, Wundheilung, Gewebereparatur, Remodeling, aber auch in Krankheitsprozessen wie z.B. der Arthritis, neurodegenerativen Erkrankungen, chronischen Gewebsulzerationen sowie Krebsentstehung und -progression [Murphy und Nagase, 2011]. Essentiell ist dabei die Fähigkeit, Komponenten des interstitiellen Bindegwebes und der Basalmembran abbauen zu können. Sie sind in der Lage, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte zu verändern und damit beispielsweise Apoptose auszulösen. Aber nicht nur Abbau, sondern auch Remodeling- sowie Wachstumsprozesse werden mit den Metalloproteasen in Verbindung gebracht. Letzteres wird induziert, indem matrixgebundene Wachstumsfaktoren während des MMP-induzierten, bindegewebigen Umbaus freigesetzt werden [Wagener und Müller, 2010]. Diese zählen neben Serpinen, Zytokinen und Chemokinen ebenso zu den Substraten der Metalloproteinasen wie die Komponenten der ECM [Murphy und Nagase, 2011].

Im Umkehrschluss können Zytokine, Chemokine und Wachstumsfaktoren sowie veränderte Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte auf die Genexpression der MMPs Einfluss nehmen [Nagase und Woessner, 1999]. Inhibiert wird die Expression sowohl über den Protease-Inhibitor α -Makroglobulin, als auch über die vier TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) [Nagase et al., 2006].

1.3.3. Bedeutung in Tumoren

Die Expression von Matrix-Metalloproteinasen ist in zahlreichen verschiedenen Tumorarten nachgewiesen worden. Das Expressionsniveau unterscheidet sich dabei in fast allen Tumorarten von dem des Normalgewebes [Wagener und Müller, 2010]. Innerhalb eines Karzinoms können allerdings die MMP-Muster, je nach Zellart und Lage im Tumor, nochmals variieren [Wagener und Müller, 2010]. Studien haben belegt, dass Karzinomzellen in Kopf-Hals-Tumoren zwar selbst MMPs synthetisieren können, die Hauptexpression jedoch über die den Tumor umgebende Fibroblasten und Entzündungszellen erfolgt [Rosenthal et al., 2004].

Aufgrund der Fähigkeit, Extrazellulärmatrix, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte sowie die Basellamina abbauen zu können, wird deutlich, welche Rolle MMPs bezüglich Malignität und Aggressivität eines Karzinoms spielen können: sie fördern Wachstum und Angiogenese, bis hin zur Invasion in das Blut- und Lymphgefäßsystem, der Metastasierung.

1.3.4. MMP 9 (Gelatinase B)

Neben MMP 2 zählt MMP 9 zur Gruppe der Gelatinasen. Diese Metalloprotease wird kontinuierlich in neutrophilen Granulozyten exprimiert [Klein und Bischoff, 2011]. Serin-Proteasen, andere Matrix-Metalloproteinasen sowie direkter oxidativer Stress können MMP 9 aktivieren [Maeda et al., 1998]. Strukturell besitzt ihre katalytische Domäne drei Wiederholungssequenzen eines Fibronectin-II-Motivs, welches die Interaktion mit Extrazellulärmatrix, z.B. die Spaltung von denaturiertem Kollagen (Decorin, Elastin, Laminin, Gelatin, Fibrillin) sowie der Typ IV, V, XI und XVI Kollagene vermitteln kann [Nagase et al., 2006; Murphy und Nagase, 2011]. Außerdem interagiert MMP 9 mit Zytokinen und Chemokinen und kann dabei IL-8, IL-1 β sowie TGF- β aktivieren [Chakrabarti und Patel, 2005].

Diesbezüglich wird ihr eine dominante Rolle in entzündlichen Krankheitsprozessen, v.a. innerhalb der Atemwege zugeschrieben: Durch inflammatorische Stimuli soll MMP 9 die Migration von Immunzellen innerhalb des Respirationstraktes initiieren und leiten [Corry et al., 2004]. Dies wurde in der Literatur anhand des Krankheitsbildes Asthma bronchiale vielfach belegt. So konnten bei Patienten mit Asthma erhöhte Konzentrationen von Gelatinasen im Sputum, in der Spülflüssigkeit bei bronchoalveolärer Lavage (BAL) sowie in bronchoalveolären Biopsien nachgewiesen werden [Sampsonas et al., 2007]. Aber auch andere Pathologien der Lunge, wie die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD), das Acute respiratory distress syndrome (ARDS), Pneumonien oder das Bronchialkarzinom sind mit erhöhter Expression von MMP 9 assoziiert [Elkington und Friedland, 2006].

In der Kopf-Hals-Region wurde die Gelatinase B mehrfach in Verbindung mit Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle [Tu et al., 2007], der Tonsillen [Rosenthal et al., 2004], des Nasopharynx [Nasr et al., 2007] sowie im weiteren onkologischen Bereich in Brust-, Urogenital-, Hirn-, Haut- und kolorektalen Karzinomen beschrieben [Klein und Bischoff, 2011]. Dabei ist MMP 9 zur Freisetzung von VEGF sowie zum proteolytischen Abbau vaskulärer Membranproteine fähig [Bergers et al., 2000]. Beides sind begünstigende Faktoren für Neubildung und Wachstum eines tumoreigenen Gefäßbettes.

1.3.5. MMP 12 (Makrophagen Metalloelastase)

Wie der Bezeichnung dieser Proteinase vermuten lässt, findet die Expression von MMP 12 größtenteils in Makrophagen statt. Sie wurde jedoch auch in Chrondrozyten und Osteoklasten detektiert [Hou et al., 2004]. Das korrelierende Substrat von MMP 12 ist das Faserprotein Elastin. Der Abbau von Elastin befähigt Makrophagen u.a. zur Penetration durch die Basallamina und somit zur Migration der Zellen sowie zum Gewebsremodeling [Klein und Bischoff, 2011]. Ebenso wie MMP 9 wird dadurch auch MMP 12 mit der COPD assoziiert. Im Pathomechanismus der COPD induziert eine kontinuierlich vorherrschende Noxe innerhalb der Atemwege (z.B. Tabakrauch) eine chronische Inflammation. Hierdurch werden sowohl neutrophile Granulozyten (siehe MMP 9) als auch Makrophagen rekrutiert. Das ubiquitäre Vorkommen von Elastin im Lungengewebe und die Fähigkeit von rekrutierten Makrophagen zum Abbau des Elastins über die Matrix Metalloproteinase 12 lässt somit in der Literatur vielfach die Vermutung zu, dass MMP 12 im Krankheitsprogress der COPD, im krankheitsbedingten Remodeling der Atemwege sowie in der Entwicklung von Emphysemen eine entscheidende Rolle spielt. Ebenso wird in der Literatur mehrfach der Zusammenhang zwischen MMP 12 und Asthma bronchiale beschrieben. Hierbei wird die rezidivierende Aspiration von Magensaft bei GERD-Patienten als ein Einflussfaktor für chronische Inflammation und Progression des Asthmas angesehen, wenn auch der Mechanismus zwischen Reflux, Inflammation und Überexpression von MMP 12 ätiologisch nicht geklärt ist [Cheng et al., 2010].

Im Tumorgeschehen scheint MMP 12 eine Sonderstellung einzunehmen: Es besitzt die Fähigkeit zur proteolytischen Freisetzung des Spaltproduktes Angiostatin aus Plasminogen. Hierbei scheint MMP 12 eine der wenigen und vor allem die am effizientesten Angiostatinproduzierende Matrix-Metalloproteinase zu sein [Cornelius et al., 1998]. Angiostatin hemmt die endotheliale Zellproliferation und somit die Angiogenese innerhalb des Tumorgewebes.

Diese antiproliferative und antiangiogenetische Funktion überrascht insofern, als dass MMPs im Tumorprogress hauptsächlich als Promotor für Tumorwachstum, -invasivität sowie Angiogenese beschrieben wurden. MMP-exprimierende Makrophagen scheinen allerdings sowohl in die Initiierung als auch in die Hemmung von Angiogenese involviert zu sein [Dong et al., 1997].

Somit kann MMP 12 eine für den menschlichen Organismus protektive Rolle in der Tumorentwicklung einnehmen. Auf dieser Grundlage bestätigt beispielsweise eine Studie von Cheng et al. ein höheres Langzeitüberleben von Patienten mit MMP 12-Überexpression in Magenkarzinomen [Cheng et al., 2010].

Neben dem Magenkarzinom wurde die Makrophagen Metalloelastase auch in hepatozellulären [Ng et al., 2011], in Larynx- [Ma et al., 2009] sowie Nasopharynxkarzinomen [Zhai et al., 2007] detektiert.

1.3.6. MMP 13 (Collagenase 3)

Die Matrix-Metalloproteinase 13 ist die in der Literatur zuletzt beschriebene Collagenase. Bisher konnte eine nur restriktive Expression in wenigen gesunden Geweben sowie Tumoren erforscht werden. Zu den Substraten der Hämopexin-Bindungsstelle der Collagenase 3 gehören das Typ II Kollagen, Aggrecan, Perlecan und Gelatin. Durch die Interaktion mit Typ II Kollagen und Aggrecan erklärt sich die Bedeutung von MMP 13 in Knochenentwicklung und -remodeling, aber auch in Knochenerkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (RA) [Klein und Bischoff, 2011]. Im inflammatorischen Krankheitsgeschehen der RA werden Zytokine, wie IL-1 und TNF- α , freigesetzt, welche die Expression von MMP 13 durch Chrondrozyten stimulieren. Knorpelabbau und Knochendestruktion sind die Folge [Burrage et al., 2006].

Im Tumorprogress stellen diese Fähigkeiten eine Verbindung von Collagenase 3 und Knochenmetastasierung her. Vor allem im Mammakarzinom, der zuerst identifizierten Lokalisation von MMP 13, soll die Interaktion von MMP 13 exprimierenden Stroma- und Tumorzellen zu Osteolysen und Knochenmetastasen verhelfen [Balbín et al., 1999].

Auch im Chondrosarkom, Melanom und in Kopf-Hals-Tumoren, wie dem Nasopharynx- und Larynxkarzinom, wurden hohe MMP 13 Expressionen verzeichnet und zwar häufig in Assoziation mit Invasivität und Metastasierung [Balbín et al., 1999; Culhaci et al., 2004].

1.3.7. Expression und Regulation

Zytokine und Wachstumsfaktoren, einschließlich Interleukine, Interferone, EGF, KGF, NGF, VEGF, PDGF, TNF- α , TNF- β , Zellstress, bakterielle oder virale Infektionen sowie onkogenetische Transformationen können transkriptionelle Stimuli in der Expression von Matrix-Metalloproteinasen darstellen [Westermarck und Kähäri, 1999]. Sie mobilisieren das sogenannte Aktivator Protein-1 (AP-1). Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ein heterodimeres Protein, welches aus Untereinheiten von c-Fos, c-Jun oder ATF (Activating Transcription Factor) bestehen kann [Karin et al., 1997]. Wird AP-1 aktiviert, bindet es mit seinen Untereinheiten an die AP-1 Bindungsstelle der DNA und reguliert damit, als Antwort auf einen Stimulus, die Expression von Zielgenen. Diese sind meist mit exekutiven biologischen Funktionen verknüpft: Proliferation, Differenzierung, Apoptose. Auch die Promotorregionen der Genabschnitte für MMPs unterliegen dem Einfluss von AP-1 [Chaudhary et al., 2010]. Auf diese Weise werden Matrix-Metalloproteinasen auf der Transkriptionsebene reguliert.

Das Transkriptionsniveau in der Genexpression kann genetischen Varianten unterliegen und Ausdruck für Entstehung und Progression verschiedener Krankheitsbilder sein. So sind in der Kopf-Hals-Region beispielsweise Polymorphismen von MMP 9 in oralen Plattenepithel-[Tu et al., 2007] und Nasopharynxkarzinomen [Nasr et al., 2007] beschrieben worden. Expressionslevel und detektierte Polymorphismen können dementsprechend in der Klinik als potentielle Biomarker in der Diagnostik und zur Prognoseeinschätzung hinzugezogen werden. Ebenso würde eine frühe therapeutische Intervention ermöglicht.

Die Abb. 1 illustriert die Regulation der Matrix-Metalloproteinasen auf Molekularebene.



Abb. 1: Regulation von Matrix-Metalloproteinasen

(1) Induktive und suppressive Zellsignale, (2) intrazelluläre Signaltransduktion, (3) Aktivierung oder Repression der Transkription, (4) posttranskriptionales mRNA-Processing, (5) mRNA-Abbau, (6) intrazelluläre Aktivierung von MMPs, (7) konstitutive Sekretion, (8) regulierte Sekretion, (9) Zelloberflächen-Expression, (10) proteolytische Aktivierung, (11) proteolytisches Processing und Inaktivierung, (12) Proteinhemmung, (13) ECM-Lokalisation, (14) Zelloberflächen-Lokalisation, (15) Endozytose und intrazellulärer Abbau.

Nach Sternlicht und Werb, 2001.

1.4. GAPDH

Als sogenanntes Referenzgen diente in allen Experimenten die Glycerinaldehyd-3phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, welches die Reaktion von Glycerinaldehyd-3-Phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert, wodurch eine energiereiche Phosphatbindung entsteht.

Da die Glykolyse ein zentraler Prozess im Energiestoffwechsel des Menschen ist, findet sich das Enzym GAPDH ubiquitär im menschlichen Organismus. Laborchemisch ist es als interne Kontrolle ein vielfach eingesetztes Referenzgen, auf welches sich auch diese Studie bezog [Hatano et al., 2008].

1.5. Modellsystem

Für die Fragestellung nach refluxinduzierten Expressionsmustern von Matrix-Metalloproteinasen im oberen Aerodigestivtrakt bediente sich diese Studie im Modellversuch sogenannter Miniorgankulturen (MOCs) aus humaner Mukosa der Conchae nasales inferiores.

Miniorgankulturen bezeichnen Gewebewürfel von circa einem Kubikmillimeter Größe, welche mit respiratorischem Epithel bedeckt sind. Die MOCs bestehen aus metabolisch kompetenten Zellen, welche sich standardisiert kultivieren und konditionieren lassen [Kleinsasser et al., 2004]. Die wiederholte bzw. kontinuierliche Expositionen mit einer oder mehrerer Noxen, als auch die anschließende Untersuchung genotoxikologischer Effekte sind mit diesem *in vitro*-Modell möglich.

Aufgrund der Beibehaltung eines organspezifischen Gewebeverbandes findet man eine der *in vivo*-Situation gleichende Struktur für Forschungsansätze vor.

Als weitere Vorteile des Modellsystems, bei möglicher Anwendung in der Klinik, lassen sich der gute anatomische und klinisch-praktische Zugang zu humaner Nasenmuschelmukosa sowie die für Patienten mit geringem gesundheitlichen Risiko verbundene Biopsiemöglichkeit nennen.

Bei Etablierung eines solchen Modellsystems wären dadurch sowohl die klinische Durchführbarkeit, als auch die molekulare Diagnostik in standardisierter Form als möglich anzusehen.

2. Zielstellung

Laryngopharyngealer Reflux wird neben exogenen Noxen wie Tabak- und Alkoholkonsum, karzinogener Stoffe in beruflicher Exposition und Infektionen mit HPV oder EBV, als ein Risikofaktor für die Entstehung von Karzinomen des oberen Aerodigestivtrakt angenommen. Die refluxassoziierte zelluläre Antwort mit den entsprechenden molekularen Pathways ist dabei noch weitgehend ungeklärt.

Matrix-Metalloproteinasen In der Annahme. dass (MMP), eine Familie substratspezifischer Endopeptidasen unterschiedlicher Struktur, verschiedenen an Umbauprozessen humanen Gewebes beteiligt sind und in Inflammation, Atemwegsremodeling sowie in malignen Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes eine besondere Rolle spielen, lag der Fokus dieser Studie auf der Untersuchung refluxassoziierter Expressionsmuster ausgewählter Matrix-Metalloproteinasen: MMP 9, 12 und 13.

Dazu erfolgte eine standardisierte Kultivierung von Nasenmuschelepithelien der Conchae nasales inferiores, mit anschließender Schädigung der Mukosa durch Magensaft der pH-Werte 4,5 und 5,5. Über RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Amplifikation mittels PCR wurden entsprechende Expressionen auf Transkriptionsebene detektiert. Als Referenzgen diente GAPDH. Ausgewählte Proben wurden mittels Microarray überprüft und verglichen.

Diese experimentelle Studie hatte das Ziel, ein Modellsystem aus Miniorgankulturen (MOC) zu etablieren, durch welches auf molekularer Ebene der Einfluss sauren Magensaftes auf die Mukosa des OADT untersucht werden kann.

Zu erörtern sind diesbezüglich die Durchführbarkeit und Stabilität des Systems, die Übertragbarkeit auf die *in vivo*-Situation sowie die Stärke des Einflusses sauren Magensaftes auf die MMP-Expression in Hinblick auf Zellintegrität und -stabilität im refluxassoziierten Krankheitsgeschehen.

3. Material und Methodik

3.1. Material

3.1.1. Reagenzien

Tab. 3: Reagenzien

Reagenz	Firma, Sitz
AECG-Medium	PromoCell, Heidelberg
Agarose LE (low electroendosmosis)	Biozym, Erlangen
Agar NMA	Biozym, Erlangen
Biotin-11 CTP	Enzo Life Sciences Inc.,
	Farmingdale (USA)
Biotin-16 UTP	Roche, Basel (Schweiz)
BSA (3x50mg)	Invitrogen, Karlsruhe
DEPC	Roth, Karlsruhe
DMEM	Invitrogen, Karlsruhe
DNA Leiter, 100 bp	Fermentas, St. Leon-Rot
6x DNA Loading Dye	Fermentas, St. Leon-Rot
dNTP Mix, 10 mM	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP Mix	Promega, Mannheim
Dulbecco's PBS	PromoCell, Heidelberg
E.coli DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
E.coli DNA Polymerase I	Invitrogen, Karlsruhe
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Sigma, Steinheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
FKS	Biochrom AG, Berlin
Gallensäure-Mix	Sigma, Steinheim
GBSS	Sigma, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Ferak Berlin GmbH, Berlin
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Promega, Mannheim
M-MLV Reverse Transkriptase 5x Puffer	Promega, Mannheim
Natriumchlorid	Applichem, Darmstadt
Natronlauge	Roth, Karlsruhe
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Promega, Mannheim
PBS	Invitrogen, Karlsruhe
Pepsin (2000 U/ml)	Sigma, Steinheim
PenStrep	Biochrom AG, Berlin
PCR Green Master Mix	Promega, Mannheim

QPCR SYBR Green Fluorescein Mix	Thermo Fisher Scientific Inc., Surrey (UK)
Rnase H	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
5x Second Strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe
Special Agar Noble	DIFCO Laboratories, Detroit (USA)
SuperscriptII R	Invitrogen, Karlsruhe
Supplement	PromoCell, Heidelberg
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypanblau	Sigma, Steinheim
Trypsin	Sigma, Steinheim
Wasserstoffperoxyd 6%	Sigma, Steinheim

3.1.2. Kits

Tab. 4: Reagenz-	Kits
------------------	------

Kit	Firma, Sitz
Big Dye Terminator v3.1 and v1.1 Cycle	Applied Biosystems, Carlsbad (USA)
Sequencing Kit	
Fast Pure RNA Kit	Takara Bio Inc., Ōtsu (Japan)
GeneChip Expression Hybridization	Affymetrix, Santa Clara (USA)
Control Kit	
InviTrap Spin Tissue RNA Mini Kit	Invitek, Stratec Molecular GmbH, Berlin
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
NucleoSpin RNA II	Macherey-Nagel, Düren
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
SurePrep TrueTotal RNA Purification Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Surrey (UK)

3.1.3. Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz	Länge des PCR- Produktes
MMP9senseMMP9antisense	5'-AAG ATG CTG CTG TTC AGC GGG-3'5'-GTC CTC AGG GCA CTG CAG GAT-3'	256 bp
MMP 12 sense MMP 12 antisense	5'-ACA CAT TTC GCC TCT CTG CT-3' 5'-CCT TCA GCC AGA AGA ACC TG-3'	192 bp
MMP 13 sense MMP 13 antisense	5'-TTG AGC TGG ACT CAT TGT CG-3' 5'-GGA GCC TCT CAG TCA TGG AG-3'	171 bp
GAPDH sense GAPDH antisense	5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3' 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3'	450 bp

 Tab. 5: Primer
 (Alle Primer sind Produkte der Firma Eurofins MWG Operon, Ebersberg.)

3.1.4. Kulturmedium und Gelelektrophorese

Agarlösung in DMEM:	0,75	g	Spezial-Agar, Noble
(Plattenbeschichtung)	50,00	ml	DMEM
1%iges Agarosegel:	0,80	g	Agarose
(Kontrolle	80,00	ml	1x TAE-Puffer
RNA-Integrität)	2,00	μl	Ethidiumbromid
1,5% iges Agarosegel:	4,80	g	Agarose
(Gelelektrophorese)	320,00	ml	1x TAE-Puffer
	6,00	μl	Ethidiumbromid
50x TAE-Puffer:	242,00	g	Tris
(Gelelektrophorese)	57,10	ml	Eisessig
	100,00	ml	EDTA 0,5M, pH 8,0
	ad 1000,00	ml	Aqua bidest
1x TAE-Puffer:	20,00	ml	50x TAE-Puffer
(Gelelektrophorese)	980,00	ml	Aqua bidest

3.1.4. Geräte

Tab. 6: Geräte

Reagenz	Firma, Sitz		
AIDA Image Analyzer, Version 3.52	Raytest GmbH, Straubenhardt		
Autoklav, V-95	Systec, Wettenberg		
Brutschrank, Function Line	Heraeus, Hanau		
Citavi, Version 3.1.15	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil		
	(Schweiz)		
Cycler, MyiQ Single-Color Real-Time PCR	Bio-Rad, Hercules (USA)		
Einmalskalpell (steril)	Servoprax, Wesel		
Elektrophoresekammer, Sub-Cell GT	Bio-Rad, Hercules (USA)		
Elektrophoresekammer, Whatman	Biometra, Göttingen		
Feinwaage, MC1 Analytic. AC 210 S	Sartorius AG, Göttingen		
Gefrierschrank -20°C, GTS 3012	Liebherr, Lienz (Österreich)		
Gefrierschrank -80°C, Revco Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Karlsruhe		
GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0	Affymetrix, Santa Clara (USA)		
Handschuhe, Sempercare	Semprit, Wien (Österreich)		
Heizplatte mit Rührer, PMC	NeoLab, Heidelberg		
IBM SPSS Statistics, Version 19	IBM Deutschland GmbH, Ehningen		
ImageQuant, LAS 4000	Fujifilm Corporation, Tokio (Japan)		
Kleinschüttler, MS 3 basic	IKA Werke GmbH, Staufen		
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft Corporation, Redmont (USA)		
Microsoft Office Word 2003	Microsoft Corporation, Redmont (USA)		
Mikroskop, Eclipse TS 100	Nikon, Tokio (Japan)		
Mikroskop, S88	Carl Zeiss, Jena		
Mikrowelle	Bosch, München		
Mini-Zentrifuge, Rotilabo	Roth, Karlsruhe		
Neubauer-Zählkammer	Fuchs-Rosenthal, Bad Blankenburg		
Nitrilhandschuhe, Rotiprotect	Roth, Karlsruhe		
pH-Meter, Multi Cal	WTW, Weilheim		
Pipetten	Eppendorf, Hamburg		
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg		
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen		
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg		
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Biometra, Göttingen		
Schüttler, Promax 1020	Heidolph Instruments, Schwabach		
Sterilbank, Herasafe	Heraeus, Hanau		
Thermocycler, T-Personal	Biometra, Göttingen		

Tube Strips 0,2 ml & Cap Strips	Peqlab, Erlangen
Wasserbad	Binz GmbH & Co. KG, Illmenau
6-Well-Platten	Dr. I. Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Zellkulturflaschen 75 cm ²	Dr. I. Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Zellkulturschalen 100 x 20 mm	Dr. I. Schubert Laborfachhandel, Leipzig
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

3.2. Patientengut und Materialgewinnung

Als Material für die erfolgten Experimente dienten Nasenmuscheln von Patienten der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde Halle-Wittenberg. Aufgrund der bestehenden Symptomatik einer behinderten Nasenatmung durch Hyperplasie der Nasenmuscheln wurde bei diesen Patienten während eines korrigierenden operativen Eingriffes (Conchotomie) die untere Nasenmuschel (Concha nasalis inferior) durch Teilentfernung verkleinert. Im Gegensatz zur primär destruktiven Laserconchotomie wird bei der hier durchgeführten Streifenconchotomie ein schmaler Streifen makroskopisch gesunder Mukosa entnommen.

Eingeschlossen wurden 19 Patienten im Alter von 16 bis 52 Jahren. Der Altersdurchschnitt liegt bei 30 Jahren. Von 19 Patienten waren zehn weiblich sowie neun männlich. Die präoperative Beurteilung von Pharynx und Larynx (Endoskopie) zeigte in allen Fällen ein physiologisches klinisches Bild. Kein Anhalt für Malignität.

Die Experimente wurden mit einem positiven Votum der Ethikkommission genehmigt.

Anamnestisch wurden die Patienten u.a. nach Alter, Beruf, Alkohol- und Zigarettenkonsum sowie nach subjektiven Refluxbeschwerden gefragt. Dies wird im Folgenden tabellarisch aufgeschlüsselt (siehe *Tab. 7*).

Tab. 7: Patientengut

Nr.	8	Ŷ	Alter	Beruf	Alkohol	Zigaretten	Reflux
01	6		21	Mechatroniker	nein	20/d	nein
02	8		46	Büroangestellter	nein	nein	nein
03		9	48	arbeitslos	nein	10/d	nein
04	8		18	FK f. Lagerlogistik	nein	nein	nein
05	8		25	Student	nein	nein	nein
06	8		36	Bauleiter	ja	nein	nein
07		Ŷ	24	Krankenschwester	nein	nein	nein
08		9	23	Bankkauffrau	nein	nein	ja
09		9	46	Büroangestellte	nein	nein	nein
10		Ŷ	23	Studentin	nein	nein	ja
11		Ŷ	24	Bäckerin	nein	5/d	nein
12	8		38	Elektromechaniker	nein	20/d	nein
13		Ŷ	27	Ärztin	nein	nein	ja
14		Ŷ	41	Kaufmann	ja	7/d	ja
15		Ŷ	18	Schülerin	nein	nein	ja
16		Ŷ	23	Altenpflegerin	nein	24/d	nein
17	8		16	Schüler	nein	nein	nein
18	8		28	selbstständig	nein	20/d	ja
19	8		52	Vermessungstechniker	nein	10/d	ja

Aufbewahrt und gekühlt in einem 15 ml PP - Röhrchen, mit einem Transportmedium aus GBSS und 1%igem PenStrep, diente die entfernte Nasenmuschel-Mukosa, nach postoperativem Transport vom Operationssaal zum Labor, den folgenden Experimenten.

3.3. Methodik

3.3.1. Präparation von Miniorganen

Zunächst wurde im Labor das Transportmedium der im OP entnommenen Mukosa verworfen und die Nasenmuscheln unter der Sterilbank in einer Lösung aus GBSS und 2% igem PenStrep mittels Skalpell in Fragmente von circa einem Kubikmillimeter geschnitten. Es erfolgten zwei antibiotische Waschschritte: im ersten Schritt mit GBSS und 1% igem PenStrep, im zweiten mit AECG und 1% igem PenStrep.

In Bezug auf die Ergebnisauswertung geschädigter Miniorgankulturen (MOCs) wurden nach diesen Waschschritten pro Nasenmuschel zwei Tubes zu jeweils 3 MOCs (ca. 30 mg) als "Nativpräparate" zunächst in Flüssigstickstoff eingefroren und anschließend bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Dies erfolgte in gleicher Weise bei allen Proben, welche kultiviert und anschließend geschädigt wurden.

3.3.2. Kultivierung

Kultivierung der Miniorgane

Der Kultivierung dienten 6-Well-Platten, welche mit 1,5% igem, in DMEM gelöstem, Agar beschichtet waren. Pro Well wurden 10 bis 12 MOCs in einem Nährmedium von 450 μ l, bestehend aus AECG, Supplement und PenStrep, im Brutschrank (Temperatur: 37°C, Luftfeuchtigkeit 95% bei 5% CO₂-Gehalt) über 7 Tage kultiviert. Drei Mal pro Woche erfolgte ein Wechsel des Mediums sowie die mikroskopische Beurteilung der Kultur.

Kultivierung der Epithelzellen

Analog der Miniorgankulturen erfolgte zunächst die Kultivierung der MOCs auf unbeschichteten 6-Well-Platten, wie oben beschrieben. Durch engmaschige mikroskopische Kontrollen des Auswachsens einzelner Epithelzellen in die Umgebung der Miniorgane entschied sich die individuelle Kultivierungsdauer. Diese belief sich im Mittel auf 14 Tage. Die Miniorgane wurden aus den 6-Well-Platten entfernt und die folgenden Experimente mit den mikroskopisch sichtbaren Epithelzellen fortgeführt.

3.3.3. Schädigung

Schädigungslösungen

Gewonnen wurde der native Magensaft, üblicherweise verworfen, im Rahmen der gastrointestinalen Diagnostik (Ösophago-Gastro-Duodenoskopie) des Universitätsklinikums Halle. Ein Votum der Ethikkommission der medizinischen Fakultät lag vor.

Die biochemische Analyse der verwendeten Magensäfte erfolgte im Zentrallabor des Universitätsklinikums (siehe Tabelle).

Die analysierten Magensäfte wurden mit HCl auf die pH-Werte 4,5 und 5,5 eingestellt, aliquotiert (à 0,4 ml) und bei -80°C gelagert.

Der artifizielle Magensaft wurde aus 25 μ l Pepsin (2000 U/ml), 5 μ l Gallensäure-Mix (120 mg/ml \triangleq 250mM) sowie 430 μ l PBS / HCl der pH-Werte 4,5 bzw. 5,5 hergestellt (orientiert an [Thomas, 2005]).

Zur Etablierung des Modellsystems wurde in der ersten Versuchsreihe (Probanden 1 bis 10) der Magensaft I mit einer niedrigen proteolytischen Aktivität eingesetzt und das Schädigungspotential mit dem synthetischen Magensaft verglichen. Diese Experimente erfolgten bei pH-Wert 4,5 und 5,5.

Der in der zweiten Versuchsreihe (Probanden 11 bis 19) verwendete Magensaft II zeichnete sich sowohl durch einen höheren Anteil an Gallensäuren, als auch durch höhere peptische bzw. tryptische Aktivität aus (siehe *Tab. 8*). Diese Experimente erfolgten ausschließlich bei pH 4,5. Der artifizielle Magensaft wurde im II. Kollektiv nicht mitgeführt.

Magensäfte Gallensäuren Proteol. Aktivität Pepsin Trypsin µmol/l BAEE units/mg mg/ml mg/ml Magensaft I 0.068 0.050 32,10 65,270 Magensaft II 1,489 0,145 356,00 189,130

Tab. 8: Bestandteile der experimentell verwendeten Magensäfte.

Schädigung der Miniorgankulturen

In Vorbereitung der Schädigung wurden mithilfe der Pipette die kultivierten MOCs den Agar-Platten entnommen und jeweils 3 Miniorgane (ca. 30 mg) in ein steriles Tube übertragen. Nach zwei Waschschritten mit PBS wurden den Miniorganen 300 µl der jeweiligen Schädigungslösung bzw. im Falle der "Negativkontrolle" 300 µl PBS hinzugefügt und diese über 1 Stunde im Brutschrank inkubiert.

Eine 5 minütige Inkubation auf Eis mittels 300 µl 0,06% iger Wasserstoffperoxidlösung diente der "Positivkontrolle".

Nach dem Ende der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Überstand der Schädigungslösung mit der Pipette abgenommen, einmal mit PBS gewaschen, der Überstand erneut abgenommen und die Miniorgane bis zur weiteren Aufarbeitung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Schädigung der Epithelzellen

In Vorbereitung der Schädigung wurde zur Ablösung der Epithelzellen von der Zellkulturschale mit Trypsin 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, die Reaktion mit 10% FKS in PBS abgestoppt und die Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

Die Anzahl vitaler Zellen wurde in der Neubauer-Zählkammer, nach entsprechender Verdünnung, unter Zugabe von Trypanblau, bestimmt.

Pro experimenteller Kondition wurde ein Aliquot von 1 bis 1,5 x 10⁵ Zellen verwendet.

Die Schädigung der Epithelzellen mit Magensaft erfolgte analog zu der der MOCs. Ebenso wurden Positiv- und Negativkontrolle mitgeführt.

Nach Abstoppen der Reaktion mittels 500 μ l PBS wurden die Zellen durch Zentrifugation (8 Minuten, 63 x g) pelletiert, der Überstand abgetragen und das Pellet bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert.

3.3.4. Isolierung der mRNA

Zur Etablierung des Versuchsprotokolls wurden zunächst verschiedene Kits zur RNA-Isolierung getestet (siehe *Tab. 10*). Die Isolierung wurde entsprechend der Protokolle der Firmen Invitek, Macherey-Nagel, Takara, Thermo Fisher Scientfic Inc. und Qiagen durchgeführt. Nach RNA-Isolation wurde durch UV-spektrometrische Messung die RNA-Quantität bestimmt und der Quotient der RNA-Absorptionswerte der Wellenlängen $\lambda = 260$ nm und $\lambda = 280$ nm als Reinheitsquotient ermittelt. Die Kontrolle der RNA-Integrität erfolgte durch Gelelektrophorese.

Auf der Basis dieser Experimente wurde das "RNeasy Plus Mini Kit" der Firma Qiagen als Standardprotokoll ausgewählt.

Nach Entnahme aus der Lagerung bei -80°C erfolgte die sofortige Lyse der MOCs durch Zugabe einer Pufferlösung aus 600 µl RLT Puffer Plus und 6 µl β-Mercaptoethanol. Das Gewebe wurde mithilfe eines Homogenisators zerkleinert. Das Lysat wurde 3 Minuten bei 8.000 x g zentrifugiert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Standard-Microzentrifuge bei einer Temperatur von 20 bis 25°C. Der Überstand wurde vorsichtig mit der Pipette abgenommen und auf die gDNA Eliminator Spin Column in einem 2 ml Collection Tube gegeben und für 30 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Die Säule mit eliminierter DNA wurde verworfen, der Durchfluss gesichert. Anschließend wurden 600 µl von 70% igem Ethanol hinzugefügt und durch Auf- und Abpipettieren mit dem Durchfluss gut gemischt. In zwei identischen Schritten wurden hiervon 600 µl auf die RNeasy Spin Column in einem 2 ml Collection Tube gegeben und 15 Sekunden bei 8.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen. Zur Aufreinigung der an der Säule gebundenen RNA folgten drei Waschschritte entsprechend des Herstellerprotokolls. Zur Eliminierung von Pufferresten wurde die gewaschene Säule in ein neues, steriles 2 ml Collection Tube gegeben und 1 Minute bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit haftender RNA in ein neues 1,5 ml Tube gegeben, zur Elution der RNA die Säulenmembran mit 30 µl RNAse freiem Wasser benetzt und für 1 Minute bei 8.000 x g zentrifugiert. Zur Verhinderung des RNA-Abbaus wurde das Eluat im Tube unmittelbar nach Zentrifugation auf Eis gelagert. Durch Vermessung im UV-Spektrometer (260 nm) wurde die RNA-Konzentration und -Reinheit bestimmt.

Zur Kontrolle der RNA-Integrität wurde eine Gelelektrophorese in einem 1% igem Agarose-Gel durchgeführt.

Es folgte eine konstante Lagerung der RNA-Proben bei -80°C.

3.3.5. Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

In Vorbereitung auf die folgende PCR zur Genexpressionsanalyse wurde die isolierte RNA sowohl aus Miniorgankulturen, als auch aus Epithelzellen, mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben.

Je Ansatz wurden 500 ng RNA des entsprechenden Eluatvolumens in ein 0,2 ml Eppendorfgefäß vorgelegt und auf 10,2 μ l mit RNAse freiem Wasser ergänzt.

Zur Aufschmelzung der Sekundärstruktur der RNA wurden die Tubes im Thermocycler 5 Minuten bei 70°C erhitzt und anschließend 5 Minuten bei 4°C belassen.

Für das sich anschließende Protokoll wurde der Mastermix vorbereitet, von welchem 8,8 μ l nach den vorangegangen Cyclerschritten in jedes Tube pipettiert wurde. Dieser Mastermix setzte sich aus 4,0 μ l 5x Puffer, 1,0 μ l dNTP – Mix, 1,0 μ l Oligo – dT, 2,4 μ l H₂O (RNase frei) sowie 0,4 μ l M-MLV Reverse Transkriptase zusammen.

Die Reverse Transkription verlief anschließend mit dem Thermocyclerprogramm 10 Minuten bei 40°C, 50 Minuten bei 45°C und 15 Minuten bei 70°C.

Durch Herunterkühlen des Cyclers auf 4°C wurde die Reaktion beendet.

Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

Nach dem Umschreiben der mRNA in cDNA erfolgte deren Vervielfältigung durch die Polymerase-Kettenreaktion. Hierfür wurde zunächst ein PCR-Mix aus 12,5 μ l PCR-Mastermix, 1,0 μ l sense Primer (MMP 9, -12, -13; GAPDH), 1,0 μ l antisense Primer (MMP 9, -12, -13; GAPDH) und 9,5 μ l H₂O hergestellt.

In ein 0,2 ml Tube wurden 24 μ l des PCR-Mixes vorgelegt, als Template 1 μ l der zu amplifizierenden cDNA hinzugefügt und die PCR mit folgendem Thermocyclerprogramm gestartet:

- 4 Minuten $94^{\circ}C$
- 30 Sekunden 94°C <---
- 30 Sekunden 60°C | wiederholt 38 Zyklen
- 1 Minute $72^{\circ}C$ --->
- 5 Minuten $72^{\circ}C$

Durch Herunterkühlen des Cyclers auf 4°C wurde die DNA-Vervielfältigung nach 39 Zyklen beendet. Zur Kontrolle wurde ein Tube mit dem PCR-Mix und entsprechenden Primern mitgeführt, jedoch anstelle des cDNA-Templates 1 μ l H₂O eingesetzt.

Die optimale Anzahl an PCR-Zyklen, zur Vermeidung des Erreichens der Plateauphase in der Amplifikation, wurde im Vorhinein durch Zyklentests bestimmt. Dabei erfolgte, analog dem oben beschriebenen Protokoll, die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion mit anschließender gelelektrophoretischer Auftrennung und digitaler Dokumentation.

3.3.6. Gelelektrophorese

Zur Identifizierung der amplifizierten DNA-Fragmente wurde ein 1,5% ige Agarosegel verwendet. 10 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl 6x Probenpuffer versetzt und hiervon 5 µl in die Taschen des Agarosegeles pipettiert. Nach Anlegen einer Spannung von 100 Volt liefen die DNA-Proben 90 Minuten durch das elektrische Feld, bevor sie im UV-Licht betrachtet und digital dokumentiert wurden. Mithilfe der Software "AIDA Image Analyzer" (Version 3.52, Multi Labeling, Firma Raytest) wurde anschließend eine Quantifizierung der Bandenintensität vorgenommen.

3.3.7. Sequenzierung

Zur Isolierung der amplifizierten PCR-Produkte verwendete diese Studie das "MinElute Gel Extraction Kit" der Firma Qiagen.

Nach Auftrennung im Agarosegel ist das zu sequenzierende DNA-Fragment aus dem Gel mittels Skalpell ausgeschnitten und gewogen worden. Daraufhin wurden im Verhältnis 3 : 1 drei Volumeneinheiten QG Puffer zu einer Volumeneinheit Gel hinzugefügt. Die Auflösung des Geles in einen flüssigen Aggregatzustand erfolgte durch 10 minütige Inkubation bei 50°C.

Nach Zugabe des gleichen Volumens Isopropanol wurde die Lösung gut durchmischt und zur Bindung der DNA auf eine Säulenmembran gegeben. Es folgten mehrere Waschschritte mit anschließender Zentrifugation. Zur Elution der DNA wurden 10 μ l EB Puffer auf die Säulenmembran gegeben, 1 Minute inkubiert und zentrifugiert. Ein Aliquot (5 μ l + 1 μ l Ladepuffer) der aufgereinigten DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert.

Die Vorbereitung der zu sequenzierenden DNA-Proben erfolgte entsprechend dem Protokoll des Sequenzier-Kits (Applied Biosystems). Circa 1 μ g DNA-Fragment wurden in 10 μ l H₂O gelöst und mit 1 μ l Primer, 1 μ l DMSO und 8 μ l Ready Mix unter den oben genannten Bedingungen amplifiziert (in Analogie der Matrix-Metalloproteinasen). Nach Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte die Sequenzierung durch Frau Dr. rer. nat. Dorothea Darmer im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung der Medizinischen Fakultät.

3.3.8. DNA - Microarray

Eine vergleichende Genexpressionsanalyse erfolgte durch die DNA-Hybridisierung mittels Microarray. Zur Herstellung der Targets wurde nach dem oben genannten Protokoll kultiviert, geschädigt und die mRNA isoliert.

Die folgenden Schritte wurden freundlicherweise im Forschungslabor der Klinik für Kinderund Jugendmedizin des Universitätsklinikums Halle (Saale), Leiter Dr. rer. nat. Martin Sebastian Staege, durchgeführt.

Nach der RNA-Isolierung erfolgte während der anschließenden DNA-Synthese durch *in vitro*-Transkription die Markierung der DNA durch Zugabe von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden. Anschließend wurde auf den Microarray, ein spezieller Glasträger, auf welchem in Reihen und

Spalten Oligonukleotide als Sonden fixiert sind, diese fluoreszenzmarkierte DNA aufgebracht, sodass komplementäre freie und fixierte DNA-Abschnitte hybridisieren konnten.

3.3.9. Statistische Auswertung der Ergebnisse

Statistische Testverfahren

Ausgangspunkt für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten statistischen Analysen sind die über "AIDA Image Analyzer" ermittelten, quantifizierten Bandenintensitäten der Gelelektrophoresen.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden das Statistikprogramm "IBM SPSS Statistics" (Version 19) und Microsoft Office Excel (2010) verwendet.

Die durchgeführten Untersuchungen haben einen vergleichenden Charakter. Es wurden aus der Nasenmuschelmukosa verschiedener Probanden die Expressionen sowohl der Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13, als auch die Expression des Referenzgenes GAPDH in "Nativpräparaten" und den verschiedenen, oben dargestellten, Versuchskonditionen ermittelt.

Als bekannte Testverfahren kamen in dieser Studie ein Parametertest (Student's t-Test) und zwei parameterfreie Tests (Vorzeichen- und Wilcoxon-Test) zur Anwendung. Bei diesen Tests sind unterschiedliche Voraussetzungen der Stichproben zu erfüllen. Das kann ggf. zu qualitativ abweichenden Entscheidungen führen. So kann z.B. der t-Test einen signifikanten Unterschied zeigen, während der Vorzeichentest diesen nicht aufweist.

Um die Entscheidungen nicht ausschließlich an ein Testverfahren zu binden, wurden alle drei Verfahren gleichzeitig genutzt und die Ergebnisse nebeneinander gestellt.

In allen genannten Verfahren bedeutet die Ablehnung der Nullhypothese, dass sich zwei Stichproben signifikant unterscheiden. Geht man bei den vorliegenden Daten im direkten Vergleich davon aus, dass sich zwei Stichproben in einer bestimmten Richtung unterschieden (die Werte sind in der Gegenüberstellung überwiegend kleiner oder größer, was in der Praxis als Genexpression oder -suppression interpretiert wird), wird dieser Richtungsunterschied in der Hypothese als einseitige Betrachtung berücksichtigt. In den Anlagen wird eine Überexpression mit "Hochregulation", eine Suppression mit "Herabregulation" sowie nicht signifikante Unterschiede durch " \approx " gekennzeichnet.

Hinsichtlich des Signifikanzniveaus α wurden die üblichen Werte von 10%, 5% und 1% gewählt. In der Literatur wird zumeist mit einem Signifikanzniveau von 5% entschieden. Dieser Betrachtung folgt auch die Zusammenfassung. Die Ergebnisse können den beigefügten Tabellen entnommen werden. Testentscheidungen bezüglich der Nullhypothese werden bei Ablehnung mit "AB" und die Nichtablehnung mit "NA" gekennzeichnet.

Lineare Regression einer Vermutung

Die Regressionsanalyse wird in der Medizin für Ursachen- und Wirkungsanalysen genutzt. Die Aufgabe besteht darin, eine mathematische Gleichung herzuleiten, die einen Zusammenhang zwischen zwei messbaren Merkmalen optimal beschreibt. Der Vorteil der Regression besteht darin, von einem unabhängigen Merkmal direkt den abhängigen Wert bestimmen zu können, ohne eine erneute Messung durchführen zu müssen. Dabei ist zu beachten, dass Prognosen nur für Werte zulässig sind, die aus dem Wertebereich der unabhängigen Variablen stammen.

In den vorliegenden Untersuchungen zeigte sich in einer Reihe von Fällen, dass diese Zusammenhänge bereits durch lineare Gleichungen beschrieben werden können (lineare Regression). Für praktische Anwendungen ist es nur dann sinnvoll mit einer Regressionsgeraden zu arbeiten, wenn der tatsächliche Zusammenhang dem einer Geraden weitgehend entspricht. Um dies zu entscheiden, wurde das Bestimmtheitsmaß als Instrument herangezogen.

Das Bestimmtheitsmaß nimmt Werte zwischen 0 und 1 an. Liegen die Werte näher an 1, können sie besser durch Geraden repräsentiert werden. Ein $R^2 = 0.8$ besagt, dass 80% der Varianz durch die Regressionsgerade erklärbar sind und die verbleibenden 20% von anderen Einflüssen stammen. Die Konstruktion der Regressionsgeraden wurde von den verwendeten PC-Programmen übernommen.

26

4. Ergebnisse

4.1. RNA-Isolation

4.1.1. Kits

Zur Etablierung des Versuchsprotokolls wurden zunächst vergleichende Experimente mit RNA-Isolierungs-Kits unterschiedlicher Firmen durchgeführt. Über anschließende spektrophotometrische OD₂₆₀- und OD₂₈₀-Messungen konnte sowohl eine Quantifizierung der RNA vorgenommen, als auch eine Aussage über die Reinheit der isolierten RNA (OD₂₆₀ / OD₂₈₀) getroffen werden. Innerhalb der OD₂₆₀-Messung sollten Werte zwischen 0,1 und 1 angestrebt werden. Dagegen sind Werte zwischen 0,02 und 0,1 als stark fehlerhaft anzusehen [Mülhardt, 2009]. Bezüglich des Reinheitsquotienten OD₂₆₀ / OD₂₈₀ geht man bei Werten zwischen 1,7 und 2,0 von sauberer RNA-Präparation aus [Schrimpf et al., 2002].

Die Ermittlung dieser Werte für die Kits der Firmen Invitek, Macherey-Nagel, Takara, Thermo Fisher und Qiagen stellt die *Tab. 10* dar. Unter Berücksichtigung der oben genannten Intervalle bezüglich guter RNA-Ausbeute und -Reinheit entschied sich diese Studie im weiteren Protokoll für die Verwendung des "RNeasy Plus Mini Kit" der Firma Qiagen.

4.1.2. Qualitätskontrolle der RNA – Isolation

Als Kontrolle der Integrität sowie Präparationsqualität der RNA diente das 1%ige Agarosegel mit Ethidiumbromid-Färbung. Zwei scharfe Banden für 18 S und 28 S im Fluoreszenzintensitäts-Verhältnis 1:2 zeigten dabei qualitativ gute Präparationen an (siehe *Abb*. 2). Signale für genomische DNA konnten nicht verzeichnet werden.



Abb. 2: 1% iges Agarosegel zur Qualitätskontrolle nach RNA-Isolation, am Beispiel von MOC des Patienten 9; Konditionen: (1) nativ, (2) negativ, (3) Magensaft pH 4,5, (4) Magensaft pH 5,5, (5) artifizieller Magensaft pH 4,5, (6) artifizieller Magensaft pH 5,5.

4.2. Reverse Transkriptase - Polymerasekettenreaktion

Zyklentest

Die geeignete Anzahl an PCR-Zyklen im Rahmen dieser Studie wurde zu Beginn durch Zyklentests ermittelt. Zunächst wurden mittels Patientenpool (n=6) 30, 33, 36 und 39 PCR-Zyklen getestet (siehe *Abb. 3*). Die Zyklenabstufungen sind in den Bandenintensitäten erkennbar: Bei 30 Zyklen nur schwach sichtbar, bei 39 Zyklen ein deutliches Bild.



Abb. 3: Zyklentest mittels Patientenpool bei 30, 33, 36 und 39 Zyklen.

Aufgrund dieser Ergebnisse schloss sich ein Zyklentest von 39 Zyklen an, in welchem die sechs Patientenproben des Pools einzeln aufgetragen wurden. In diesem Bereich waren interindividuelle Unterschiede nachweisbar (siehe *Abb. 4*).

Die PCR wurde demnach in allen Experimenten dieser Studie mit 39 Zyklen durchgeführt.



Abb. 4: Zyklentest mittels sechs verschiedener Patientenproben (Nr. 1 bis 6) bei 39 Zyklen.

Ergebnisauswertung

Die folgenden Ergebnisse beziehen sich auf die digitalen Auswertungen der Gelelektrophoresen, nach Transkription und Amplifikation isolierter RNA in der Polymerasekettenreaktion (siehe *Abb. 5*). Zunächst werden die Ergebnisse des Referenzgenes GAPDH, im folgenden Kapitel die der Matrix Metalloproteinasen 9, 12 und 13 betrachtet.



Abb. 5: PCR-Produkte nach Gelelektrophorese.

Die drei verwendeten statistischen Tests Vorzeichen-, Wilcoxon- sowie t-Test erbrachten in der Mehrzahl der Fälle übereinstimmende Ergebnisse. Aufgrund dessen beziehen sich die kommenden Erläuterungen auf den t-Test im Signifikanzniveau $\alpha = 5\%$.

Innerhalb des ersten Kollektives (Patienten 1 bis 10) wurden die Konditionen "nativ", "negativ", "positiv", "Magensaft" der pH-Werte 4,5 und 5,5 sowie "artifizieller Magensaft" der pH-Werte 4,5 und 5,5 unter Verwendung von Magensaft I betrachtet. Im zweiten Kollektiv (Patienten 11 bis 19) dagegen die Konditionen "negativ" und "Magensaft pH 4,5" unter Verwendung des Magensaftes II (siehe *Tab.* 8). Hier wurde auf das Mitführen des artifiziellen Magensaftes verzichtet, da sich bereits im I. Kollektiv keine signifikanten Unterschiede zwischen humanem und artifiziellem Magensaft nachweisen ließen.

4.2.1. GAPDH

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente sowohl in der Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion, als auch im DNA-Microarray als Referenzgen zur internen Kontrolle der Experimente.

Sowohl in den Bandenintensitäten der Reverse Transkriptase- Polymerasekettenreaktion (siehe *Tab. 11* u. *16*), als auch in den Fluoreszenzsignalen des Microarrays (siehe *Tab. 22*) lassen sich bereits interindividuelle Expressionsunterschiede von GAPDH verzeichnen. Aber auch zwischen den einzelnen Versuchskonditionen sind Regulationen in der Expression zu beobachten. Die Boxplots in *Abb. 6.1.* und *Abb. 6.2.* stellen dies dar.




Abb. 6.1.: Boxplotdarstellungen der Signalintensitäten nach Gelelektrophorese; GAPDH, Kollektiv I (n=10).

Abb. 6.2.: Boxplotdarstellungen der Signalintensitäten nach Gelelektrophorese; GAPDH, Kollektiv II (n=9).

Diese Regulationen weisen jedoch spezifische Verhaltensmuster auf und lassen innerhalb der Analyse durch lineare Regression die Konstruktion von Regressionsgeraden zu. Am Beispiel des Kollektiv I folgt die Darstellung der Regressionsgeraden bezüglich der "Nativprobe" als unabhängiges Merkmal (x-Achse) und der Versuchskonditionen "negativ", "positiv", "Magensaft" und "artifizieller Magensaft" der pH-Werte 4,5 und 5,5 als abhängige Merkmale (y-Achse) (siehe *Abb. 7.1.* bis *Abb. 7.6.*).



Abb. 7.3.: GAPDH nativ / MS pH 4,5

Abb. 7.4.: GAPDH nativ / MS pH 5,5



Abb. 7.5.: GAPDH nativ / art. MS pH 4,5

Abb. 7.6.: GAPDH nativ / art. MS pH 5,5

Auch in den Vergleichen der unterschiedlichen Magensaft-Konditionen ließen sich Regressionsgeraden ermitteln (siehe *Abb. 8.1.* bis *Abb. 8.4.*).



Abb. 8.1.: GAPDH MS pH 4,5 / MS pH 5,5



Abb. 8.3.: *GAPDH MS pH 5,5 / art. MS pH 5,5*



Abb. 8.2.: GAPDH MS pH 4,5 / art. MS pH 4,5



Abb. 8.4.: GAPDH art. MS pH 4,5 / art. MS pH 5,5

4.2.2. Matrix-Metalloproteinasen, Kollektiv I

Bezugsgröße "Nativprobe"

Im zweiseitigen Test zeigten sich bezüglich der "Nativprobe" in 14 von 18 Vergleichen signifikante Unterschiede. Darunter zählen alle Konditionen für MMP 9 und MMP 12 sowie die Konditionen "Magensaft pH 4,5" und "Magensaft pH 5,5" für MMP 13 (siehe *Tab. 12*).

Keine Signifikanzen zeigten die Bedingungen "positiv", "negativ" sowie die "artifiziellen Magensäfte" der pH-Werte 4,5 und 5,5 für MMP 13.

Im t-Test zeigte sich im einseitigen Vergleich zur Feststellung einer Überexpression bzw. Suppression von MMP 9, 12 und 13 bezüglich der "Nativproben" in 17 von 18 Fällen eine Überexpression. Ein annäherndes Gleichverhalten stellte sich in der Kondition des "artifiziellen Magensaftes" pH 4,5 für MMP 13 dar. Herabregulationen waren nicht zu verzeichnen.

Bezugsgröße "Negativprobe"

Auf Grundlage der Expressionen der "Negativprobe" zeigten sich im zweiseitigen Test in durchgängig allen Konditionen der Gene MMP 9, 12 und 13 keine signifikanten Unterschiede (siehe *Tab. 13*). Hierbei wurden die Expressionsstärken innerhalb der Konditionen "positiv", "Magensaft pH 4,5", "Magensaft pH 5,5" sowie "artifizieller Magensaft" der pH-Werte 4,5 und 5,5 zur "Negativprobe" in Beziehung gesetzt.

In den einseitigen Tests stellte sich auf Basis der "Negativprobe" in 13 von 15 Fällen ein annäherndes Gleichverhalten dar. Ausnahme hierbei ist die Kondition des "artifiziellen Magensaftes pH 5,5" bei MMP 12 und 13. Hier zeigte sich eine signifikante Überexpression der Metalloproteinasen.

Die Boxplotdarstellungen in *Abb. 9* untermauern die statistischen Ergebnisse der beiden oben genannten Bezugspunkte "Nativ-" und "Negativprobe".



Statistische Vergleiche unterschiedlicher Magensaftcharakteristika

MSpH 5,5 4,5 ant

_م8

Ŧ

art. MS pH 5,5 MS 4,5

30-

20-

10-

0-

positiv

nativ

Ī

negativ

MS pH Kondition

In den angewendeten statistischen Testverfahren wurden die verschiedenen Magensaftkonditionen untereinander verglichen: humaner Magensaft des pH-Wertes 4,5 zu humanem Magensaft pH 5,5 und artifiziellem Magensaft pH 4,5; humaner Magensaft des pH-Wertes 5,5 zu artifiziellem Magensaft pH 5,5 sowie artifizieller Magensaft pH 4,5 zu artifiziellem Magensaft pH 5,5.

Innerhalb des t-Tests bei $\alpha = 5\%$ zeigten die zweiseitigen Vergleiche der Magensaftproben in allen Fällen keine signifikanten Unterschiede – weder zwischen humanem und artifiziellem Magensaft noch zwischen den pH-Werten 4,5 und 5,5 (siehe Tab. 15)

Aus diesem Grund entschied sich diese Studie in den Experimenten des II. Kollektives einzig für die Verwendung des humanen Magensaftes (II) des pH-Wertes 4,5, dessen Eigenschaften Tab. 8 darstellt.



Abb. 10: PCR-Produkte in verschiedenen Konditionen für MMP 9, 12 und 13 am Beispiel von Patient 10, Kollektiv I.

Konditionen: (1) MOC nativ, (2) MOC positiv, (3) MOC negativ, (4) MOC Magensaft pH 4,5, (5) MOC Magensaft pH 5,5, (6) MOC artifizieller Magensaft pH 4,5, (7) MOC artifizieller Magensaft pH 5,5, (8) EpC negativ, (9) EpC artifizieller Magensaft pH 4,5, (10) EpC artifizieller Magensaft pH 5,5.

Abb. 10 illustriert die oben dargestellten statistischen Daten. Deutlich zu sehen sind hierbei die Expressionsunterschiede (MOC-spezifisch) zwischen der "Nativprobe" (1) und den kultivierten sowie konditionierten Proben (2-7). Die letzt genannten Proben unterschieden sich hingegen nicht – weder gelelektrophoretisch noch statistisch signifikant.

Die Expressionsstärken von MMP 9, 12 und 13 innerhalb der Epithelzellen stellten sich nur schwach dar. Auf eine Ergebnisauswertung wurde aufgrund der wenigen Proben sowie einer nur schwach detektierbaren Expression verzichtet. Von einer weiteren Verwendung ausgewachsener Einzelzellen wurde abgesehen.

Des Weiteren zeigt *Abb. 10* für MMP 13 eine Doppelbande. Da innerhalb des RNA-Isolations-Protokolles ein DNAse-Verdau stattfand, wurde hinter dieser Doppelbande ein alternatives Spliceprodukt vermutet. Es erfolgte die Isolierung sowie die Sequenzierung der Einzelfragmente nach dem oben beschriebenen Protokoll. Die ermittelten Sequenzdaten zeigten das Vorhandensein genomischer DNA (siehe *Abb. 11*). Eine Kontroll-PCR auf RNA-Basis lieferte das entsprechende Produkt mit einer Größe von 263 Basenpaaren.

agcatgttta	ccttcaagtg	actgggaagt	ggaaacctat	ccataagtga	102826513
tgactcacca	ttgcaggcct	ataaaagtaa	aggtaatctc	tgcggaaaga	102826463
CAACAGTCCC	CAGGCATCAC	CATTCAAGAT	GCATCCAGGG	GTCCTGGCTG	102826413
CCTTCCTCTT	CTTGAGCTGG	ACTCATTGTC	GGCCCTGCC	CCTTCCCAGT	102826363
GGTGGTGATG	AAGATGATTT	GTCTGAGGAA	GACCTCCAGT	TTGCAGAGgt	102826313
agagtatctt	gccaatcctg	atgatgcggt	tggtacatct	cagaaatgtc	102826263
cttctctttt	aaacgcagtt	cattttggtg	tcttttctag	CGCTACCTGA	102826213
GATCATACTA	CCATCCTACA	AATCTCGCGG	GAATCCTGAA	GGAGAATGCA	102826163
GCAAG <mark>CTCCA</mark>	TGACTGAGAG	GCTCC GAGAA	ATGCAGTCTT	TCTTCGGCTT	102826113
AGAGGTGACT	GGCAAACTTG	ACGATAACAC	CTTAGATGTC	ATGAAAAAGC	102826063
CAAGATGCGG	GGTTCCTGAT	GTGGGTGAAT	ACAATGTTTT	CCCTCGAACT	102826013
CTTAAATGGT	CCAAAATGAA	TTTAACCTAC	AGgtaaatca	taggctatct	102825963
ttctttcata	tttgttagcc	ttttcttgta	gtattaaatg	tctaatatta	102825913

Abb. 11: Auszug der Gensequenz von MMP 13. Markiert Exons (blau), Introns (schwarz) und deren Übergänge (aqua) innerhalb der Sequenz sowie die in der Studie verwendeten Primer. Zwischen dem Reverse- und Forward-Primer für MMP 13 liegen neben Exons auch Anteile an Introns. Genomische DNA ist grau markiert.

In der Regressionsanalyse ließen sich für MMP 9 und 12 zwischen den verschiedenen "Magensaft"-Konditionen lineare Regressionen ermitteln. Diese sind im Folgenden durch Regressionsgeraden in Diagrammen dargestellt. Das Bestimmtheitsmaß R^2 wird in jedem Diagramm angegeben. Für MMP 13 waren innerhalb der Versuchskonditionen keine linearen Zusammenhänge nachzuweisen.



Abb. 12.1.: MMP 9 MS pH 4,5 / MS pH 5,5



Abb. 12.3.: MMP 9 MS pH 5,5 / art. MS pH 5,5 / art. MS





Abb. 12.4.: MMP 9 art. MS pH 4,5 / art. MS pH 5,5



Abb. 13.1.: MMP 12 MS pH 4,5 / MS pH 5,5 Abb. 13.2.: MMP 12 MS pH 4,5 / art. MS pH 4,5



4.2.3. Matrix-Metalloproteinasen, Kollektiv II

Bezugsgröße "Negativprobe"

Zweiseitige Vergleiche der Expressionen von MMP 9, 12 und 13 für die Kondition "negativ" als unabhängige und die Kondition "Magensaft pH 4,5" als abhängige Variable im t-Test zeigten in allen Fällen keine signifikanten Unterschiede.



Abb. 14: Boxplotdarstellungen der Signalintensitäten nach Elektrophorese; Kollektiv II (n=9).



Abb. 15: PCR-Produkte in verschiedenen Konditionen für MMP 9, 12 und 13 am Beispiel der Patienten 14 bis 19, Kollektiv II.

Konditionen: Patient 14 (1) negativ, (2) MS pH 4,5; Patient 15 (3) negativ, (4) MS pH 4,5; Patient 16 (5) negativ, (6) MS pH 4,5; Patient 17 (7) negativ, (8) MS pH 4,5; Patient 18 (9) negativ, (10) MS pH 4,5; Patient 19 (11) negativ, (12) MS pH 4,5.

Abb. 15 illustriert die Ergebnisauswertung des II. Kollektives. Hier sind zwischen den "Negativkontrollen" und den MOCs, welche mit humanem Magensaft des pH-Wertes 4,5 versetzt wurde, keine Unterschiede sichtbar.

Ebenso wurde für MMP 13 eine Doppelbande beobachtet, welche in Analogie des I. Kollektives nach PCR-Amplifikation von RNA als genomische DNA identifiziert wurde.

4.3. DNA-Microarray

Für die Genexpressionsanalyse mittels DNA-Microarray wurden sowohl Miniorgankulturen, als auch Epithelzellen der Patienten 11 und 12 verwendet. Von den 23 humanen Matrix-Metalloproteinasen sind in diesen Geweben die in *Tab. 9* aufgeführten Proteasen nachgewiesen worden.

Die ermittelten Signalintensitäten (siehe *Tab. 18 - 22*) für die Kondition "Magensaft pH 4,5" wurden hierbei analog der vorhergehenden Ergebnisauswertung zu der Kondition "negativ" ins Verhältnis gesetzt. Da bei Patient 12 ebenso eine "Nativprobe" mitgeführt wurde, konnte hier zusätzlich der Quotient zur Kondition "Magensaft pH 4,5", sowie zur Kondition "Negativkontrolle", gebildet werden. Bei Werten > 1 geht man in Bezug zur "Negativkontrolle" von einer Hochregulation, bei Werten < 1 von einer Herabregulation aus. Innerhalb der MOCs konnte in beiden Patientenbeispielen für MMP 1, 2, 3, 7, 12 und 16 eine Hochregulation nachgewiesen werden, für MMP 28 eine Suppression. Innerhalb der Epithelzellen waren MMP 9, 10, 12, 14 und 18 überexprimiert, MMP 28 herabreguliert. In allen anderen Fällen sind für die wenigen Patientenbeispiele sowohl Herab-, als auch Hochregulationen verzeichnet worden, sodass ein Beobachtungstrend nicht auszumachen ist. Im Vergleich zur "Nativprobe" stellten sich bei Patient 12 die "Negativprobe" sowie die Probe der Kondition "Magensaft pH 4,5" bei neun von 12 Matrix-Metalloproteinasen als überexprimiert dar.

Gen	MOC 11		MOC 12		EpC 11	EpC 12
	MS/neg	neg/nativ	MS/nativ	MS/neg	MS/neg	MS/neg
MMP 1	1,027	58,867	72,857	1,238	1,182	0,944
MMP 2	1,063	3,509	4,033	1,149	1,075	0,608
MMP 3	1,059	78,033	97,471	1,249		
MMP 7	1,048	0,433	0,567	1,312		
MMP 9	1,214	2,570	2,460	0,957	1,236	1,499
MMP 10	0,634	3,230	3,745	1,160	1,171	1,131
MMP 11		1,003	1,307	1,303	0,767	
MMP 12	1,219	5,180	5,615	1,084		1,304
MMP 14	0,967	1,833	1,955	1,067	0,928	1,476
MMP 14	0,873	3,941	4,116	1,044	1,198	2,314
MMP 14	0,971	3,255	3,873	1,190	1,014	1,643
MMP 14	0,849	3,065	4,235	1,382	0,909	
MMP 16	1,590	0,397	0,717	1,803		
MMP 16	0,876	0,971	0,820			
MMP 25	1,010	2,601	2,091	0,845	0,764	1,355
MMP 28	0,655	3,278	2,608	0,804	0,969	1,016
MMP 28	0,954	2,253	1,868	0,796	0,914	1,416
MMP 28		3,013	2,813	0,829		0,937
MMP 28		58,867	72,857	0,934		1,270
						1

Tab. 9: Microarray-Fluoreszenzsignale anwesender MMPs für Miniorgankulturen (MOC) und Epithelzellen (EpC) der Patienten 11 und 12 im Verhältnis zur "Negativkontrolle".

4.4. Anamnestische Merkmale

Präoperativ erfolgte innerhalb der Anamnese der Patienten 1 bis 19 die Erfassung von Risikofaktoren. Neben den über das Refluxmodell erfassten experimentellen Ergebnissen soll an dieser Stelle auf individuelle Merkmale hingewiesen werden. Neben Vorerkrankungen und beruflicher Anamnese sollten in dieser Studie vor allem die Merkmale Alkohol- und Tabakkonsum sowie subjektive Refluxbeschwerden Beachtung finden. Innerhalb der Ergebnisauswertung der "Negativproben", welche kultiviert, jedoch nicht konditioniert wurden, stellten sich im t-Test (Signifikanzniveau 5%) zwischen Kollektiv I und II signifikante Unterschiede dar. Dabei war zu beobachten, dass Patienten ohne anamnestische Risikomerkmale im Gesamtkollektiv die niedrigsten Expressionswerte für MMP 9, 12 und 13, Patienten mit Risikomerkmalen (z.B. Tabakkonsum oder Refluxbeschwerden) dagegen deutlich höhere Expressionen aufwiesen. *Abb. 16* stellt beispielhaft Expressionsstärken nach Risikomerkmalen gegenüber.



Abb. 16: Expressionsunterschiede zwischen Patienten verschiedener Risikomerkmale. Patientin 9: ø Tabakkonsum, ø Reflux; Patientin 10: øTabakkonsum, Reflux positiv; Patient 12: 20 Zigaretten/Tag, ø Reflux; Patient 14: 7 Zigaretten/Tag, Reflux positiv.

Weiterhin wurden die Patienten 1 bis 19 für das Merkmal Tabakkonsum in die Gruppen "Raucher" und "Nichtraucher" und für das Merkmal Sodbrennen in die Gruppen "Kein Reflux" und "Reflux" unterteilt (siehe *Tab. 7*). Die Expression der Metalloproteinasen wurde innerhalb von Nicht-Risiko- und Risikogruppe für die Versuchskondition "negativ" nach signifikanten Unterschieden untersucht.

Dabei unterschied sich die Expression der Matrix Metalloproteinase 9 zwischen den Gruppen "Raucher" und "Nichtraucher" (siehe *Abb. 17*), die von MMP 12 zwischen den Gruppen "Reflux" und "Kein Reflux" (siehe *Abb. 18*), signifikant. In anderen Fällen waren keine Signifikanzen nachzuweisen.



Abb. 17: Bandenintensitäten der "Negativproben" nasaler Schleimhautepithelzellen bei Nichtrauchern und Rauchern. Nichtraucher: n=11, Raucher: n=8.



Abb. 18: Bandenintensitäten der "Negativproben" nasaler Schleimhautepithelzellen bei Patienten ohne und mit symptomatischem Reflux. Ohne Reflux: n=12, mit Reflux: n=7.

5. Diskussion

Der Zusammenhang zwischen gastroösophagealem bzw. laryngopharyngealem Reflux und Erkrankungen im Kopf-Hals-Bereich, speziell der Entstehung von Tumoren, wird kontrovers diskutiert. Obwohl in der Literatur vielfach darauf hingewiesen wird, dass Magensäure eine Noxe mit kanzerogenem Potential nicht nur für den Ösophagus, sondern auch für die Kopf-Hals-Region darstellen kann, ist das Prinzip von Ursache und Wirkung keinesfalls geklärt. Einige Publikationen schließen Magensäurereflux als unabhängigen Risikofaktor in der Entwicklung eines Karzinoms sogar aus [Ozlugedik et al., 2006].

Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Expression von Matrix-Metalloproteinasen sowie die Charakterisierung ihrer Rollen im Refluxgeschehen auf der Basis des Modellsystems der Miniorgankulturen. Die diesbezüglich erarbeiteten Ergebnisse sollen im Folgenden erörtert werden.

5.1. Modellsystem

Patientengut

Das gesamte Studienkollektiv schloss 19 Patienten im Alter von 16 bis 52 Jahre ein, mit einem Altersdurchschnitt von 30 Jahren. Bei einer Verteilung von zehn weiblichen und neun männlichen Patienten wurde das Geschlechterverhältnis als ausgewogen betrachtet. Sowohl die anamnestische, als auch die präoperative endoskopische Beurteilung ergaben für keinen der in die Studie einbezogenen Patienten eine relevante HNO-ärztliche Vorerkrankung. Neben dieser makroskopischen erfolgte nach Conchotomie auch eine mikroskopische Beurteilung der humanen Mukosa. In der Gesamtheit kann daher von gesundem, experimentell verwendetem Gewebematerial ausgegangen werden.

Kultivierung

Das *in vitro*-Modell der Miniorgankulturen ist seit der Erstbeschreibung durch Steinsvåg et al. (1991) laut Literatur vielfach verwendet und diskutiert worden [Kleinsasser et al., 2004; Oertel, 2008; Kleinsasser et al., 2009; Weigelt et al., 2010]. Als Alternative zu einer tierexperimentelle Studie war es in diesem Modell möglich, eine *in vivo*-Situation nachzuahmen und Genanalysen durchzuführen sowie einen möglichen genregulatorischen Einfluss von Magensäurereflux an humaner Mukosa zu untersuchen. Trotz der genannten Möglichkeiten sind kritische Punkte innerhalb des Modellsystems anzumerken. So ermöglicht zwar die Erhaltung der Gewebearchitektur trotz einer Kultivierung *in vitro* interzelluläre Kommunikation und einen gewissen organspezifischen Metabolismus, jedoch limitiert beispielsweise die Abwesenheit einer vaskulären Versorgung die Zelldifferenzierung des Explantates [Freshney und Goann, 1990]. Außerdem sind "Variationen der Proben beim Anlegen der Organkultur, [...] geringfügige Unterschiede in der Handhabung während der Präparation, der Geometrie und der zellulären Zusammensetzung der Proben" [Freshney und Goann, 1990] als Einflussfaktoren nicht zu vernachlässigen.

Die Einschätzung von Vitalität und Integrität der Gewebe innerhalb der Zellkultur erfolgte durch die mikroskopische Begutachtung im zweitägigen Intervall. Trotz der Nähe zur *in vivo*-Situation ist in dieser Studie davon auszugehen, dass bereits die Entnahme der Conchae nasales inferiores, deren Präparation mittels Skalpell sowie deren Kultivierung Zellstress hervorgerufen haben. Ein möglicher kausaler Zusammenhang spiegelt sich in den Ergebnissen wider: Die deutlichsten Expressionsunterschiede innerhalb der Matrix-Metalloproteinasen finden sich zwischen den "Nativproben", welche postoperativ, nicht-kultiviert und nichtkonditioniert eingefroren und später analysiert wurden, und allen weiteren Proben, welche kultiviert und konditioniert wurden. Dieser Unterschied war im zweiseitigen Vergleich in 14 von 18 Fällen signifikant, im einseitigen Vergleich in 17 von 18 Fällen bezüglich der "Nativprobe" als Überexpression nachweisbar. Eine solch klare Differenz zeigte sich in keinem weiteren Vergleich von kultiviertem und konditioniertem Gewebe bzw. Zellen.

Die Kultivierungsdauer betrug im Falle der Miniorgankulturen 7 Tage, im Falle der Einzelzellkultur circa 14 Tage. Das bedeutet, dass die aus dem Nasenmuschelsubstrat ausgewachsenen Einzelzellen unter gleichen standardisierten Bedingungen durchschnittlich doppelt so lange kultiviert wurden. Dies war einerseits notwendig, um die aus dem Gewebeverband herausgewachsenen Zellen in vitaler und stabiler Architektur den Konditionen zuzuführen. Andererseits ist unklar, ob eine längere Kultivierungsdauer nicht weiteren Zellstress hervorgerufen und die metabolische Kompetenz der Zellen supprimiert haben könnte. Kleinsasser et al. untersuchten diesbezüglich in Miniorganen der Conchae nasales die Aktivität von Cytochrom P450 2A6, einem Schlüsselenzym im Metabolismus von Xenobiotika, in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer. Es stellte sich eine Enzymstabilität bis zum 11. Kultivierungstag heraus, mit einer bis dahin leicht sinkenden Aktivität von Cytochrom P450 2A6 [Kleinsasser et al., 2009].

In der Gesamtheit gestalteten sich nicht nur die Kultivierung, sondern beginnend mit der RNA-Isolierung auch die weiteren Experimente innerhalb der Primärzellkulturen als problematisch. Als Gründe hierfür werden hauptsächlich das Auswachsen der Zellen aus dem Gewebeverband sowie die geringe Mitoserate bis hin zur induzierten Apoptose durch fehlende Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte angesehen.

Der Ergebnisumfang für die Einzelzellkultur war so gering, dass eine Auswertung der Ergebnisse, speziell die Anwendung statistischer Verfahren, als nicht sinnvoll erschien. Gensignale im Microarray konnten jedoch mit denen der Miniorgankulturen verglichen werden.

Schädigung

Den experimentellen Konditionen dienten humane Magensaftproben der pH-Werte 4,5 und 5,5 sowie die artifiziell hergestellten Magensaftproben der pH-Werte 4,5 und 5,5.

Der humane Magensaft wurde dabei von zwei verschiedenen Spendern aus Ösophago-Gastro-Duodenoskopien gewonnen. Anhand der *Tab. 8* lässt sich bereits erkennen, dass es interindividuelle Unterschiede in Magensaftzusammensetzung und dessen Enzymaktivität gibt. Diesbezüglich erfolgte die Einteilung des Gesamtkollektives in zwei Gruppen. Ideal wäre in diesem Refluxmodell gewesen, die Nasenmuschelmukosa eines Patienten mit dessen individuellem Magensaft zu versetzen. Dies hätte für jeden Patienten jedoch eine zusätzliche Belastung durch eine Ösophago-Gastro-Duodenoskopie bedeutet, welche zudem nicht indiziert gewesen wäre.

Innerhalb der Etablierung des Refluxmodells sollte die Verwendung humanen Magensaftes mit der Verwendung synthetisch hergestellten Magensaftes verglichen werden, um im Falle eines annähernden Gleichverhaltens in weiterführenden Studien u.a. gezielt Einzelkomponenten des Magensaftes auf ihre genregulatorische sowie genotoxikologische Wirkung zu untersuchen. Die Zusammensetzung des artifiziellen Magensaftes entsprach den Referenzwerten des "Deutschen Arzneibuches" [Diverse Autoren, 2010] sowie "Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik." [Thomas, 2005]. In dieser Studie zeigten sich im zweiseitigen Vergleich des t-Testes in allen Fällen keine signifikanten Unterschiede zwischen künstlich hergestelltem und humanem Magensaft. In Hinblick auf genregulatorische Effekte geht diese Studie somit von einem Gleichverhalten beider Säfte aus.

In vorausgegangenen Studien war unter analogen Versuchkonditionen der genotoxikolische Effekt des pH-Wertes von Magensäure mittels Comet-Assay analysiert worden. Die Ergebnisse dieser Studie zeigten eine Zunahme von DNA-Strangbrüchen mit abnehmendem pH-Wert [Oertel, 2008; Weigelt et al., 2010]. Der größte Unterschied wurde dabei beim Übergang von pH 5,5 zu pH 4,5 beobachtet [Oertel, 2008]. Vor diesem Hintergrund wurden in der hier vorliegenden Studie diese pH-Werte ausgewählt.

Im Gegensatz zu den genotoxikologischen Studien zeigten die genregulatorischen Analysen für MMP 9, 12 und 13 zwischen den pH-Werten 4,5 und 5,5 in allen Fällen keine signifikanten Unterschiede. Ein annäherndes Gleichverhalten sowohl zwischen den pH-Werten 4,5 und 5,5, als auch zwischen humanem und artifiziellem Magensaft bestätigen ebenso die Regressionsanalysen.

Das Versetzen der Conchae nasales inferiores mit humanem und artifiziellem Magensaft wurde standardisiert einmalig für eine Stunde durchgeführt. Sowohl die Einmaligkeit des Experiments, als auch der Zeitrahmen der potentiellen Schädigung entsprechen nicht der Refluxkrankheit *in vivo*. Diese zeigt sich klinisch sowie pH-metrisch meist rezidivierend,

teilweise mehrere Episoden pro Tag, über einen prolongierten Zeitraum. Dennoch belegen Studien, dass innerhalb des oberen Aerodigestivtraktes bereits der einmalige Kontakt mit Magensäure Gewebeläsionen hervorrufen kann [Postma et al., 2001].

Positivkontrolle

Neben den Versuchskonditionen des humanen und artifiziellen Magensaftes der pH-Werte 4,5 und 5,5 dienten in dieser Studie eine "Negativ-" sowie eine "Positivprobe" der experimentellen Als "Positivkontrolle" wurde eine Kontrolle. 0,06%ige Wasserstoffperoxidlösung (150 μ M) verwendet. H₂O₂ wird zur Gruppe der Reaktiven Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species, ROS) gezählt. Pathophysiologisch wird es im Organismus bei verschiedenen Formen des oxidativen Stresses, so auch innerhalb von Erkrankungsprozessen (z.B. Entzündungen), gebildet. ROS können dabei entscheidenden Einfluss auf Signaltransduktionen sowie Genregulationen nehmen, wie z.B. auf Matrix-Metalloproteinasen [Lu und Wahl, 2005]. So bestätigen auch Siwik et al. innerhalb einer Studie zur Herzinsuffizienz, in Abhängigkeit der H2O2-Konzentration, eine Minderung der myokardialen Zellzahl sowie die Erhöhung der Aktivität von Matrix-Metalloproteinasen unter dem Einfluss von Wasserstoffperoxid [Siwik et al., 2001].

Innerhalb der statistischen Auswertung dieser Studie konnten jedoch für die Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13 im t-Test (α =5%) zwischen der Vergleichsbasis der "Positivkontrolle" und allen anderen Konditionen keine signifikanten Unterschiede ermittelt werden. Demnach waren unter der Behandlung der Nasenmuscheln mit Wasserstoffperoxid keine Expressionsveränderung für die drei untersuchten Proteinasen zu verzeichnen. Die Ursachen hierfür können vielschichtig sein. Einerseits ist unklar, ob speziell MMP 9, 12 und 13 innerhalb einer H₂O₂-abhängigen Kaskade Aktivitätsänderungen unterworfen sind. Andererseits ist es möglich, dass im experimentellen Ansatz eine H₂O₂-Inkubation von 5 Minuten eine zu kurze Zeitspanne für die toxische Wirkung von ROS mit folglicher Induktion von Signalwegen zur Genregulation darstellt. Weiterhin ist zu beachten, dass innerhalb der Kultivierung eine signifikante Hochregulation der gesamten MMP-Aktivität zu verzeichnen war. Dadurch besteht auch die Möglichkeit, dass im Falle einer Wirkung von ROS die Bildung noch höherer MMP-Expressionslevel außerhalb der metabolischen Zellkompetenz lag.

Aufgrund dieser Ergebnisse innerhalb des I. Kollektives wurde in den folgenden Experimenten auf die Verwendung der "Positivkontrolle" in Form von Wasserstoffperoxid verzichtet.

Negativkontrolle

Betrachtet man für alle Patienten (n=19) die ermittelten Werte der "Negativkontrolle" (siehe *Tab. 11* und *Tab. 16*), so fällt auf, dass die Expressionshöhe von MMP 9, 12 und 13 innerhalb des II. Kollektives (Patienten 11 bis 19) durchgängig höher liegt, als innerhalb des I. Kollektives (Patienten 1 bis 10). Dieser Unterschied lässt im zweiseitigen t-Test bei α = 5% als signifikant bestätigen. Da die "Negativkontrolle" zwar kultiviert, jedoch nicht mit Magensäure versetzt wurde, stellt sich die Frage, warum innerhalb dieser Kondition signifikante Expressionsunterschiede nachzuweisen sind.

Eine mögliche Antwort könnten die anamnestischen Daten der Patienten geben. Ermittelt man im Gesamtkollektiv die drei niedrigsten sowie die drei höchsten Expressionswerte für die Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13, so lässt sich beobachten, dass die drei niedrigsten Expressionswerte bei den Patienten zu finden sind, die anamnestisch weder rauchen, noch subjektive Refluxbeschwerden angeben. Im Gegensatz dazu finden sich die drei höchsten MMP-Expressionen bei Patienten mit Tabakkonsum, Refluxbeschwerden oder simultan beiden Merkmalen. So hat beispielsweise die Patientin 16, welche im Gesamtkollektiv anamnestisch den höchsten Zigarettenkonsum von 24 Stück pro Tag angibt, von 19 Patienten den höchsten Expressionswert für MMP 9 sowie den dritthöchsten Wert für MMP 12. Ein weiteres Beispiel ist Patient 14, welcher sowohl einen Tabakkonsum, als auch Refluxbeschwerden angibt. Er weist die zweithöchsten Expressionswerte für MMP 9, 12 und 13 auf. Ähnliche Beobachtungen sind auch in der Literatur publiziert worden: De et al. verzeichneten beispielsweise im Nasensekret von Kindern, welche dem Passivrauchen ausgesetzt waren, höhere Expressionslevel von MMP 9 [De et al., 2011]. Ebenso bestätigen Lavigne et al. eine MMP 12aktivierende Wirkung des Zigarettenrauches [Lavigne und Eppihimer, 2005].

Neben diesen interindividuellen Expressionsunterschieden lässt sich beobachten, dass sich bei einem sehr hohen bzw. sehr niedrigen Expressionswert einer untersuchten Matrix-Metalloproteinase intraindividuell auch erhöhte bzw. erniedrigte Expressionen der anderen Proteinasen finden. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass Matrix-Metalloproteinasen die Aktivierung ihrer Proenzyme je nach Merkmalen (Bsp. Alter, Geschlecht) oder spezifischen Stimuli (Bsp. Tabakkonsum, entzündliche Erkrankungen) sowohl autoproteolytisch, als auch untereinander über Regulationskaskaden induzieren können [Wagener und Müller, 2010].

5.2. Genregulation im Refluxmodell

GAPDH

Als Enzym der Glykolyse spielt die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase eine wichtige Rolle im Energiestoffwechsel des Menschen. Da humanen Zellen und Gewebe für deren Vitalität auf die Glykolyse angewiesen sind, ist GAPDH ubiquitär nachweisbar. Dies ist u.a. eine Eigenschaft, aufgrund derer GAPDH als eines der häufigen Referenzgene in der Forschung verwendet wird.

In dieser Studie war GAPDH in allen verwendeten Geweben als deutliches Signal nachweisbar (siehe *Tab. 11 u. 16*). Hier zeigten die Absolutwerte der Bandenintensitäten nach PCR und die Fuoreszenzsignale des Array auch, dass GAPDH interindividuell unterschiedlich stark exprimiert wird. Dies konnte sowohl auf der "Nativ"-Ebene, als auch zwischen den einzelnen Versuchskonditionen beobachtet werden.

Diese differierenden Expressionslevel sind in der Literatur nicht nur interindividuell, sondern auch intraindividuell z.B. in Abhängigkeit von embryonaler Entwicklungsphase, Schwangerschaft oder auf molekularer Ebene in Abhängigkeit des Zellzyklus beschrieben worden [Bustin, 2000]. Energiebedarf und -verbrauch spielen dabei eine wichtige Rolle. Desweiteren können die mRNA- und Proteinlevel von GAPDH durch Einfluss bestimmter Stimuli modifiziert werden. So lösen u.a. Hypoxie, oxidativer Stress oder genotoxische Agenzien eine Steigerung der Expression aus [Bustin, 2000; Tristan et al., 2011]. Diese Stimuli könnten auch Einfluss auf die Genregulation von GAPDH in dieser Studie gehabt haben.

Unabhängig von der Ätiologie ist festzustellen, dass GAPDH in diesem Modellsystem als Referenzgen nicht geeignet ist. Die Literatur bestätigt dies [Bustin, 2000]. So beschrieben Wang et al. in ihrer Studie die Expression des "Housekeeping"-Gens als instabil und hoben GUSB sowie TBP als optimale Referenzgene hervor [Wang et al., 2010].

Aber auch wenn GAPDH nicht die Eigenschaft aufwies, intra-, interindividuell sowie interkonditionell einheitlich exprimiert zu sein, zeigte es doch im Gegensatz zu den Matrix-Metalloproteinasen ein stabiles Verhaltensmuster. So konnten ausschließlich für GAPDH sowohl auf der Vergleichsbasis "nativ", als auch innerhalb aller "Magensaft"-Konditionen lineare Regressionen ermittelt werden, durch welche unter Wissen der unabhängigen Variable eine Vorhersage der abhängigen Variable möglich war, ohne weitere Messungen durchzuführen. Dieses Charakteristikum des Gleichverhaltens zeichnet GAPDH hier besonders aus.

Matrix-Metalloproteinasen

In dieser Studie lag der Schwerpunkt auf der Expressionsanalyse der Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13 in humaner Nasenmuschelmukosa. Mittels der semiquantitativen Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion wurden alle drei Enzyme detektiert. Anhand von *Abb. 9* und *14* wird deutlich, dass MMP 13 in beiden Patientengruppen geringer exprimiert wird, als MMP 9 und 12. Innerhalb der Genanalyse mittels Microarray zeigte MMP 13 sogar keine hinreichende Signalintensität. MMP 9 und 12 dagegen waren neben 21 weiteren Matrix-Metalloproteinasen nachweisbar. Eine solch restriktive Expression von MMP 13, welche in nur wenigen humanen Geweben nachweisbar ist, ist auch in der Literatur beschrieben [Klein und Bischoff, 2011].

Zwei Bezugspunkte sollten der Einschätzung von Expressionsveränderungen dienen: Zum Ersten der Vergleich der "Nativproben" zu den konditionierten Proben. Die "Nativprobe" stellte dabei das Gewebe dar, welches der in vivo-Situation am nächsten kommt. Dem gegenüber wurden die mit Magensäure versetzten Nasenmuscheln gestellt. Für MMP 9, 12 und 13 stellten sich dabei in 17 von 18 Vergleichen signifikante Unterschiede, in Form von Überexpressionen, heraus. Wie oben erwähnt, wird in dieser Studie in Hinblick auf derartige Überexpression, bezüglich Präparation und Kultivierung der Miniorgankulturen, von Zellstress ausgegangen. Aus diesen Gründen sollte innerhalb der Zellkultur eine "Negativprobe" mitgeführt werden. Diese wurde kultiviert, anschließend jedoch, alternativ zum Magensaft, mittels PBS konditioniert. Innerhalb der statistischen Auswertung zeigten die Gewebe in 13 von 15 Fällen ein annäherndes Gleichverhalten. Daher ist von Expressionsveränderungen der Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13 alleine durch das Versetzen der Gewebe mit Magensaft in dieser Studie nicht auszugehen. Es stellt sich die Frage, ob hierbei Fehlerquellen im Modellsystem zu suchen sind, beispielsweise in Art und Dauer der Magensaft-Konditionierung, ob die Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13 im Refluxgeschehen eine untergeordnete Rolle spielen bzw. ob andere Matrix-Metallproteinasen entscheidendere Funktionen im Pathomechanismus tragen.

5.3. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erarbeiteten Ergebnisse erfolgte im Statistikprogramm "SPSS" mittels drei verschiedener Test: Den Parametertests Vorzeichen- und Wilcoxontest sowie dem parameterfreien Test, dem t-Test. Dies erfolgte zudem in drei verschiedenen Signifikanzniveaus: 10%, 5% und 1%. In der Gesamtheit erhöhte dies die Validität der Ergebnisauswertung.

Kritisch anzusehen ist die grundlegend geringe Anzahl an Patienten mit n=19. Jedoch erbrachten multiple Auswertungen von PCR und Microarray vergleichbare Ergebnisse.

6. Zusammenfassung

Der Zusammenhang zwischen laryngopharyngealem Reflux und Erkrankungen des oberen Aerodigestivtraktes wird kontrovers diskutiert. Eine refluxassoziierte zelluläre Antwort ist weitgehend unklar. Ziel dieser Studie war die Untersuchung der Expression von Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13 in humaner Nasenmuschelmukosa sowie die Charakterisierung ihrer Rollen im Refluxgeschehen auf der Basis des Modellsystems der Miniorgankulturen.

Hierbei stellten sich interindividuelle Expressionsunterschiede heraus. Es ist möglich, dass ein Zusammenhang zwischen Expressionslevel und patientenbezogener Risikomerkmale besteht. In dieser Studie wurden höhere MMP-Expressionen bei vorhandenen Risikomerkmalen, wie beispielsweise Tabakkonsum, beobachtet.

Nach Konditionierung der Conchae nasales inferiores mittels Magensaft, in Assoziation eines Refluxgeschehens, zeigten sich keine signifikanten Expressionsveränderungen von MMP 9, 12 oder 13. Dabei ist zu beachten, dass diese drei Metalloproteinasen punktuell untersucht wurden. Sowohl die Viezahl an Krankheitsbildern, welche in der Literatur mit Matrix-Metalloproteinasen in Zusammenhang gebracht wurden, als auch das Spektrum an Regulationsmechanismen lassen deutlich werden, dass weiterführende Studien bezüglich des Einflusses humaner Matrix-Metalloproteinasen bei Refluxerkrankung nötig sind.

Im Modellsystem selbst fand sich unter Beibehaltung des organspezifischen Gewebeverbandes in den Miniorgankulturen eine der *in vivo*-Situation gleichende Struktur für Forschungsansätze vor. Auch wenn die Conchotomie, die Präparation der Nasenmuscheln sowie deren Kultivierung bereits Zellstress hervorgerufen haben, ist das Modell der Miniorgankulturen als Alternative zu tierexperimentellen Versuchen eine Möglichkeit, Expositionen mit einer oder mehrerer Noxen durchzuführen, um anschließend genregulatorische Effekte zu analysieren. Die Übertragbarkeit *in vivo* muss dabei in nachfolgenden Studien geklärt werden.

- Ayazi S, Lipham JC, Hagen JA, Tang AL, Zehetner J, Leers JM et al.: A new technique for measurement of pharyngeal pH: normal values and discriminating pH threshold. J. Gastrointest. Surg. 8 (2009) 1422–1429.
- Balbín M, Pendás AM, Uría JA, Jiménez MG, Freije JP, López-Otín C: Expression and regulation of collagenase-3 (MMP-13) in human malignant tumors. APMIS 1 (1999) 45–53.
- Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K et al.: Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat. Cell Biol 10 (2000) 737–744.
- Boenninghaus HG, Lenarz T: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 13. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007, S. 263–280.
- Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE: Matrix metalloproteinases: role in arthritis. Front. Biosci 11 (2006) 529–543.
- Bustin SA: Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. J. Mol. Endocrinol 2 (2000) 169–193.
- Chakrabarti S, Patel KD: Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8stimulated human neutrophils. J. Leukoc. Biol 1 (2005) 279–288.
- Chaudhary AK, Singh M, Bharti AC, Asotra K, Sundaram S, Mehrotra R: Genetic polymorphisms of matrix metalloproteinases and their inhibitors in potentially malignant and malignant lesions of the head and neck. J. Biomed. Sci 17 (2010) 10.
- Cheng P, Jiang FH, Zhao LM, Dai Q, Yang WY, Z LM et al.: Human macrophage metalloelastase correlates with angiogenesis and prognosis of gastric carcinoma. Dig. Dis. Sci 11 (2010) 3138–3146.
- Cornelius LA, Nehring LC, Harding E, Bolanowski M, Welgus HG, Kobayashi DK et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. J. Immunol 12 (1998) 6845–6852.
- Corry DB, Kiss A, Song LZ, Song L, Xu J, Lee SH et al.: Overlapping and independent contributions of MMP2 and MMP9 to lung allergic inflammatory cell egression through decreased CC chemokines. FASEB J 9 (2004) 995–997.
- Crissman JD, Visscher DW, Sakr W: Premalignant lesions of the upper aerodigestive tract: pathologic classification. J. Cell. Biochem. Suppl 17 (1993) 49–56.

- Culhaci N, Metin K, Copcu E, Dikicioglu E: Elevated expression of MMP-13 and TIMP-1 in head and neck squamous cell carcinomas may reflect increased tumor invasiveness. BMC Cancer 4 (2004) 42.
- De S, Leong SC, Fenton JE, Carter SD, Clarke RW, Jones AS: The effect of passive smoking on the levels of matrix metalloproteinase 9 in nasal secretions of children. Am J Rhinol Allergy 4 (2011) 226–230.
- Dent J: Review article: from 1906 to 2006 a century of major evolution of understandin of gastro-oesophageal reflux disease. Aliment. Pharmacol. Ther 9 (2006) 1269–1281.
- Deutsche Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten: Leitlinie Reflux (2005): *www.dgvs.de*. (Aufgerufen am: 30.01.2012).
- Diverse Autoren: Arzneibuch. Deutsches Arzneibuch. Europäisches Arzneibuch. 6. Aufl. Deutscher Apotheker Verlag, Stuttgart, 2010.
- Dong Z, Kumar R, Yang X, Fidler IJ: Macrophage-derived metalloelastase is responsible for the generation of angiostatin in Lewis lung carcinoma. Cell 6 (1997) 801–810.
- Elkington PTG, Friedland JS: Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. Thorax 3 (2006) 259–266.
- Farrokhi F, Vaezi MF: Extra-esophageal manifestations of gastroesophageal reflux. Oral Dis 4 (2007) 349–359.
- Freshney RI, Goann SR: Tierische Zellkulturen. Ein Methoden-Handbuch. De Gruyter, Berlin, 1990, S. 304–305.
- Groen JN, Smout AJ: Supra-oesophageal manifestations of gastro-oesophageal reflux disease. Eur J Gastroenterol Hepatol 12 (2003) 1339–1350.
- Ha PK, Califano JA: The molecular biology of laryngeal cancer. Otolaryngol. Clin. North Am 5 (2002) 993–1012.
- Hatano H, Kudo Y, Ogawa I, Tsunematsu T, Kikuchi A, Abiko Y, Takata T: IFN-induced transmembrane protein 1 promotes invasion at early stage of head and neck cancer progression. Clin. Cancer Res 19 (2008) 6097–6105.
- Helm JF, Dodds WJ, Hogan WJ, Soergel KH, Egide MS, Wood CM: Acid neutralizing capacity of human saliva. Gastroenterology 1 (1982) 69–74.
- Hou P, Troen T, Ovejero MC, Kirkegaard T, Andersen TL, Byrjalsen I et al.: Matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) in osteoclasts: new lesson on the involvement of MMPs in bone resorption. Bone 1 (2004) 37–47.

- Impola U, Jeskanen L, Ravanti L, Syrjänen S, Baldursson B, Kähäri VM, Saarialho-Kere U: Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-7 and MMP-13 and loss of MMP-19 and p16 are associated with malignant progression in chronic wounds. Br. J. Dermatol 4 (2005) 720–726.
- Janssen J, Laatz W: Statistische Datenanalyse mit SPSS f
 ür Windows. Eine anwendungsorientierte Einf
 ührung in das Basissystem und das Modul Exakte Tests. 6. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 2007.
- Jaspersen D, Micklefield GH, Vogelmeier C, Becker HF: Refluxassoziierte Atemwegserkrankungen: Asthma, chronischer Husten, Schlafapnoe. Epidemiologie, Diagnostik und Therapie. Internist (Berl) 1 (2003) 58–62.
- Jonaitis L, Pribuisiene R, Kupcinskas L, Uloza V: Laryngeal examination is superior to endoscopy in the diagnosis of the laryngopharyngeal form of gastroesophageal reflux disease. Scand. J. Gastroenterol 2 (2006) 131–137.
- Karin M, Liu ZG, Zandi E: AP-1 function and regulation. Curr. Opin. Cell Biol 2 (1997) 240–246.
- Kennedy JH: Silent gastroesophageal reflux: an important but little known cause of pulmonary complications. Dis Chest 42 (1962) 42–45.
- Klein T, Bischoff R: Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. Amino Acids 2 (2011) 271–290.
- Kleinsasser NH, Harréus UA, Gamarra F, Driemel O, Hagen R, Buehrlen M: Cytochrome P4502A6 stability in a mini organ culture model of human nasal mucosa for genotoxicology studies as detected by flow cytometry. Eur Arch Otorhinolaryngol 3 (2009) 385–389.
- Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F et al.: The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. Mutat. Res 1 (2004) 63–73.
- Lavigne MC, Eppihimer MJ: Cigarette smoke condensate induces MMP-12 gene expression in airway-like epithelia. Biochem. Biophys. Res. Commun 1 (2005) 194– 203.
- Lipan MJ, Reidenberg JS, Laitman JT: Anatomy of reflux: a growing health problem affecting structures of the head and neck. Anat Rec B New Anat 6 (2006) 261–270.

- Lu Y, Wahl LM: Oxidative stress augments the production of matrix metalloproteinase-1, cyclooxygenase-2, and prostaglandin E2 through enhancement of NF-kappa B activity in lipopolysaccharide-activated human primary monocytes. J. Immunol 8 (2005) 5423–5429.
- Ma LJ, Li W, Zhang X, Huang DH, Zhang H, Xiao JY, Tian YQ: Differential gene expression profiling of laryngeal squamous cell carcinoma by laser capture microdissection and complementary DNA microarrays. Arch. Med. Res 2 (2009) 114–123.
- Maeda H, Okamoto T, Akaike T: Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. Biol. Chem 2 (1998) 193–200.
- Mukhopadhyay S, Munshi HG, Kambhampati S, Sassano A, Platanias LC, Stack MS: Calcium-induced matrix metalloproteinase 9 gene expression is differentially regulated by ERK1/2 and p38 MAPK in oral keratinocytes and oral squamous cell carcinoma. J. Biol. Chem 32 (2004) 33139–33146.
- Mülhardt C: Der Experimentator. Molekularbiologie/Genomics. 6. Aufl., Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 2009.
- Murphy G, Nagase H: Localizing matrix metalloproteinase activities in the pericellular environment. FEBS J 1 (2011) 2–15.
- Nagase H, Visse R, Murphy G: Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. Cardiovasc. Res 3 (2006) 562–573.
- Nagase H, Woessner JF: Matrix metalloproteinases. J. Biol. Chem 31 (1999) 21491-21494.
- Nasr HB, Mestiri S, Chahed K, Bouaouina N, Gabbouj S, Jalbout M, Chouchane L: Matrix metalloproteinase-1 (-1607) 1G/2G and -9 (-1562) C/T promoter polymorphisms: susceptibility and prognostic implications in nasopharyngeal carcinomas. Clin. Chim. Acta 1 (2007) 57–63.
- Nénan S, Boichot E, Lagente V, Bertrand CP: Macrophage elastase (MMP-12): a proinflammatory mediator? Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1 (2005) 167–172.
- Ng KTP, Qi X, Kong KL, Cheung BYY, Lo CM, Poon RTP et al.: Overexpression of matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) correlates with poor prognosis of hepatocellular carcinoma. Eur. J. Cancer 15 (2011) 2299–2305.
- Oertel K: Testung des Einflusses unterschiedlicher pH-Bedingungen auf die DNA-Stabilität anhand von Miniorgankulturen / Etablierung eines Modells. (2008)

- Ozlugedik S, Yorulmaz I, Gokcan K: Is laryngopharyngeal reflux an important risk factor in the development of laryngeal carcinoma? Eur Arch Otorhinolaryngol 4 (2006) 339–343.
- Pearson JP, Parikh S, Orlando RC, Johnston N, Allen J, Tinling SP et al.: Review article: reflux and its consequences the laryngeal, pulmonary and oesophageal manifestations. Conference held in conjunction with the 9th International Symposium on Human Pepsin (ISHP) Kingston-upon-Hull, UK, 21-23 April 2010. Aliment. Pharmacol. Ther 1 (2011) 1–71.
- Postma GN, Tomek MS, Belafsky PC, Koufman JA: Esophageal motor function in laryngopharyngeal reflux is superior to that in classic gastroesophageal reflux disease. Ann. Otol. Rhinol. Laryngol 12 (2001) 1114–1116.
- Probst R, Grevers G, Iro H: Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde. 3. Aufl. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2008, S. 324–338.
- Qadeer MA, Swoger J, Milstein C, Hicks DM, Ponsky J, Richter JE et al.: Correlation between symptoms and laryngeal signs in laryngopharyngeal reflux. Laryngoscope 11 (2005) 1947–1952.
- Reiß M: Facharztwissen HNO-Heilkunde. Differenzierte Diagnostik und Therapie. 1. Aufl. Springer, Berlin, Heidelberg, 2009, S. 585–606.
- Riede UN, Bianchi L: Allgemeine und spezielle Pathologie. 168 Tabellen. 5. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2004.
- Rosenthal EL, McCrory A, Talbert M, Carroll W, Magnuson JS, Peters GE: Expression of proteolytic enzymes in head and neck cancer-associated fibroblasts. Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg 8 (2004) 943–947.
- Sampsonas F, Kaparianos A, Lykouras D, Karkoulias K, Spiropoulos K: DNA sequence variations of metalloproteinases: their role in asthma and COPD. Postgrad Med J 978 (2007) 244–250.
- Schrimpf G, Aigner A, Jansohn M: Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. 3. Aufl. Spektrum Akad. Verl., Heidelberg, 2002.
- Schwarze J: Grundlagen der Statistik. 11. Aufl. Nwb Verlag, Herne, Berlin, 2009.
- Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS: Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. Am. J. Physiol., Cell Physiol 1(2001) 53-60.

- Sternlicht MD, Werb Z: How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. Annu. Rev. Cell Dev. Biol 17 (2001) 463–516.
- Thomas, Lothar: Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden f
 ür die medizinische Diagnostik. 6. Aufl. TH-Books-Verl.-Ges., Frankfurt/Main, 2005, S. 1779–1783.
- Thurnher, Dietmar: HNO-Heilkunde. Ein symptomorientiertes Lehrbuch. 1. Aufl. Springer, Wien, 2010, S. 361–381.
- Tileston W: Peptic ulcer of the oesophagus. In: The American Journal of the Medical Sciences 132 (1906) 240–265.
- Tristan C, Shahani N, Sedlak TW, Sawa A: The diverse functions of GAPDH: views from different subcellular compartments. Cell. Signal 2 (2011) 317–323.
- Tu HF, Wu CH, Kao SY, Liu CJ, Liu TY, Lui MT: Functional -1562 C-to-T polymorphism in matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) promoter is associated with the risk for oral squamous cell carcinoma in younger male areca users. J. Oral Pathol. Med 7 (2007) 409–414.
- Vaezi MF: Extraesophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease. Clin Cornerstone 4 (2003) 39-40.
- Vaezi MF: Therapy Insight: gastroesophageal reflux disease and laryngopharyngeal reflux. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol 12 (2005) 595–603.
- van Wart HE, Birkedal-Hansen H: The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 14 (1990) 5578–5582.
- Wagener C, Müller O: Molekulare Onkologie. Entstehung, Progression, klinische Aspekte ; 95 Tabellen. 3. Aufl. Thieme, Stuttgart, 2010, S. 311–316.
- Wang F, Wang J, Liu D, Su Y: Normalizing genes for real-time polymerase chain reaction in epithelial and nonepithelial cells of mouse small intestine. Anal. Biochem 2 (2010) 211–217.
- Weigelt J, Sandner A, Neumann K, Schön I: Analyse der DNA-Stabilität bei Miniorgankulturen unter dem Einfluss von Refluxatbestandteilen. 81. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Abstractband, Wiesbaden (2010) S. 38.
- Weiß C: Basiswissen Medizinische Statistik. Mit 9 Übersichten. 5. Aufl. Springer, Berlin, 2010.

- Westermarck J, Kähäri VM: Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion. FASEB J 8 (1999) 781–792.
- Young JL, Shaw GY, Searl JP, Miner PB: Laryngeal manifestations of gastroesophageal reflux disease: endoscopic appearance and management. Gastrointest. Endosc 3 (1996) 225–230.
- Zhai Y, Qiu W, Dong XJ, Zhang XM, Xie WM, Zhang HX et al.: Functional polymorphisms in the promoters of MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-12 and MMP-13 are not associated with hepatocellular carcinoma risk. Gut 3 (2007) 445–447.

8. Anlagen

8.1. RNA-Isolations-Kits

Zur Etablierung des Modellsystems wurden RNA-Isolations-Kits der Firmen Invitek, Macherey-Nagel, Takara, Thermo Fisher und Qiagen in Durchführbarkeit, totale RNA-Ausbeute sowie Reinheitsquotienten verglichen.

Tab. 10: RNA-Isolations-Kits.

Nach RNA-Aufarbeitung wurden spektrophotometrische OD_{260} - und OD_{280} -Messungen durchgeführt, der Quotient OD_{260} / OD_{280} gebildet sowie der RNA-Betrag ermittelt. Bei OD_{260} -Werten <0,07 wurden der OD-Quotient sowie der RNA-Betrag nicht angegeben ("keine Angabe" = "k.A.").

Concha nasalis	Kit (Firma)	Kondition	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ OD ₂₈₀	RNA-Betrag [µg]
Ι	Takara	nativ	0,005	0,001	k.A.	k.A.
		nativ	0,002	0,003	k.A.	k.A.
	Thermo Fisher	nativ	0,071	0,037	1,919	15,620
		nativ	0,028	0,02	k.A.	k.A.
	Qiagen	nativ	0,006	0,005	k.A.	k.A.
II	Macherey-Nagel	nativ	0,108	0,063	1,714	23,760
	Thermo Fisher	nativ	0,267	0,13	2,050	58,740
	Qiagen	nativ	0,078	0,037	2,108	17,160
		positiv	0,151	0,089	1,697	33,220
		positiv	0,141	0,083	1,699	31,020
		negativ	0,085	0,05	1,700	18,700
		negativ	0,108	0,062	1,742	23,760
III	Macherey-Nagel	positiv	0,055	0,033	k.A.	k.A.
		negativ	0,053	0,031	k.A.	k.A.
	Qiagen	positiv	0,036	0,018	k.A.	k.A.
		negativ	0,045	0,022	k.A.	k.A.
IV	Invitek	positiv	0,454	0,235	1,932	99,880
		negativ	0,091	0,043	2,116	20,020
	Qiagen	nativ	0,292	0,155	1,884	64,240
		positiv	0,091	0,048	1,896	20,020
		negativ	0,073	0,039	1,872	16,060
		MS pH 4,5	0,204	0,181	1,127	44,880
		MS pH 5,5	0,102	0,055	1,855	22,440

8.2. Kollektiv I

8.2.1. Signalintensitäten nach Gelelektrophorese

Dargestellt sind die Bandenintensitäten [AU] nach Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion und Gelelektrophorese, ermittelt durch "AIDA Image Analyzer". In allen folgenden Tabellen sind Signalintensitäten unter Verwendung des humanen

Magensaftes als "MS pH 4,5 / 5,5" gekennzeichnet, unter Verwendung des synthetisch hergestellten Magensaftes als "art. MS pH 4,5 / 5,5".

Tab. 11: Signalintensitäten [AU] nach Gelelektrophorese, Kollektiv I.

Dargestellt sind die Expressionsstärken der Matrix-Metallproteinasen 9, 12 und 13 und des Referenzgenes GAPDH sowie die entsprechenden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (s).

	Patienten											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	MW	s
<i>MMP 9</i>												
nativ	4,25	7,71	9,29	7,45	0,09	8,15	26,36	7,69	0,45	0,75	7,22	7,21
positiv	18,38	9,76	14,42	12,44	17,66	24,77	41,56	28,11	2,50	43,59	21,32	12,65
negativ	15,88	13,93	17,08	21,84	13,39	16,12	32,38	20,29	9,06	31,06	19,10	7,15
MS pH 4,5	15,74	12,25	13,89	15,11	15,25	13,34	39,33	24,49	0,25	25,44	17,51	9,79
MS pH 5,5	15,65	14,18	14,12	14,11	15,35	26,00	49,43	31,64	9,83	24,42	21,47	11,33
art. MS pH 4,5		14,78	15,16	21,14	18,27	23,80	39,91	16,77	4,10	33,94	20,87	10,09
art. MS pH 5,5		12,15	11,99	16,34	17,99	17,49	51,67	31,97	10,41	25,48	21,72	12,43
MMP 12												
nativ	1,24	4,21	8,04	2,00	2,88	1,02	3,20	4,96	0,23	4,01	3,18	2,17
positiv	14,59	8,65	24,38	17,03	23,19	13,83	5,32	23,77	0,33	30,63	16,17	9,04
negativ	14,86	11,31	21,39	17,74	20,19	7,04	8,64	23,04	1,32	23,68	14,92	7,21
MS pH 4,5	14,48	10,18	19,65	14,27	20,39	11,11	9,11	28,25	1,41	26,73	15,56	7,87
MS pH 5,5	14,51	11,44	20,67	16,71	21,13	7,94	11,67	23,21	0,19	24,77	15,22	7,27
art. MS pH 4,5		11,01	18,24	18,22	16,93	8,73	12,51	28,02	0,29	24,12	15,34	7,85
art. MS pH 5,5		13,37	21,59	15,58	19,17	10,10	11,29	26,44	1,34	27,25	16,24	7,86
MMP 13												
nativ	0,34	0,18	4,75	0,20	0,39	0,31	0,04	0,51	0,18	0,50	0,74	1,34
positiv	1,99	0,38	3,39	0,57	2,54	3,74	0,36	7,19	0,34	1,78	2,23	2,05
negativ	3,22	0,25	2,77	0,26	2,16	1,05	0,30	3,82	0,30	4,08	1,82	1,49
MS pH 4,5	2,09	0,25	4,75	0,26	3,31	9,80	0,33	4,78	0,32	3,87	2,98	2,89
MS pH 5,5	1,41	1,08	5,18	1,09	1,95	1,55	1,03	6,94	0,42	3,11	2,38	2,00
art. MS pH 4,5		0,33	2,45	0,24	3,62	0,78	0,23	6,83	0,22	0,62	1,70	2,13
art. MS pH 5,5		1,17	3,12	0,91	1,92	2,11	0,50	6,67	1,21	10,10	3,08	3,04
GAPDH												
nativ	40,49	36,12	58,63	7,15	49,62	38,05	37,42	76,68	5,01	76,69	42,59	23,22
positiv	44,21	35,28	58,71	45,23	49,04	44,92	46,29	80,43	0,00	72,37	47,65	20,64
negativ	42,92	38,91	66,35	9,83	49,43	40,16	42,81	79,97	16,42	72,53	45,93	21,38
MS pH 4,5	43,43	35,03	65,25	8,59	49,14	44,75	40,06	76,30	8,72	72,00	44,33	22,14
MS pH 5,5	44,96	41,06	74,31	17,22	65,67	68,10	57,94	111,68	30,15	98,25	60,93	27,82
art. MS pH 4,5		37,21	83,57	44,24	45,25	59,51	48,93	92,93	39,87	92,22	60,41	21,58
art. MS pH 5,5		38,36	73,87	39,13	62,04	61,22	36,03	107,93	35,76	120,83	63,91	30,04

8.2.2. Statistik: Vergleichsbasis "Nativprobe"

Dargestellt sind die Ergebnisse der angewendeten statistischen Verfahren. In allen folgenden Tabellen der statistischen Auswertung ist das Verfahren des t-Testes im 5%-Signifikanzniveau mit den entsprechenden p-Werten hervorgehoben, da sich die Kapitel "Ergebnisse" und "Diskussion" hauptsächlich hierauf berufen.

Tab. 12: Statistische Tests auf Basis der "Nativprobe", Kollektiv I.

Vorzeichen- (VOR), Wilcoxon- (WIL) und t-Test (t-T) für die Signifikanzniveaus α von 10%, 5% und 1%. Innerhalb der Gene MMP 9, 12, 13 und GAPDH werden die "Nativproben" der Probanden 1 bis 10 mit den jeweiligen Versuchskonditionen verglichen. Testentscheidungen bezüglich der Nullhypothese werden bei Ablehnung mit "AB" und bei Nichtablehnung mit "NA" gekennzeichnet.

		10%			5%				1%			
	VOR	WIL	t-T	VOR	WIL	t-T	p- Werte t-T	VOR	WIL	t-T		
MMP 9												
nativ - positiv	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0053	AB	AB	AB		
nativ - negativ	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0005	AB	AB	AB		
nativ - MS pH 4.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0017	AB	AB	AB		
nativ - MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0002	AB	AB	AB		
nativ - art. MS pH 4.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0020	AB	AB	AB		
nativ - art. MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0015	AB	AB	AB		
MMP 12												
nativ - positiv	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0009	AB	AB	AB		
nativ - negativ	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0002	AB	AB	AB		
nativ - MS pH 4.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0004	AB	AB	AB		
nativ - MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0002	NA	AB	AB		
nativ - art. MS pH 4.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0010	AB	AB	AB		
nativ - art. MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0005	AB	AB	AB		
MMP 13												
nativ - positiv	AB	AB	AB	AB	AB	NA	0,0656	NA	NA	NA		
nativ - negativ	AB	AB	AB	AB	AB	NA	0,0849	NA	NA	NA		
nativ - MS pH 4.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0432	AB	AB	NA		
nativ - MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0186	AB	AB	NA		
nativ - art. MS pH 4.5	AB	AB	NA	AB	NA	NA	0,2954	NA	NA	NA		
nativ - art. MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	NA	NA	0,0791	NA	NA	NA		
GAPDH												
nativ - positiv	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,2302	NA	NA	NA		
nativ - negativ	NA	AB	AB	NA	AB	AB	0,0334	NA	NA	NA		
nativ - MS pH 4.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,1553	NA	NA	NA		
nativ - MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0003	AB	AB	AB		
nativ - art. MS pH 4.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0052	NA	NA	AB		
nativ - art. MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0030	NA	NA	AB		

8.2.3. Statistik: Vergleichsbasis "Negativprobe"

Tab. 13: Statistische Tests auf Basis der "Negativprobe", Kollektiv I.

Vorzeichen- (VOR), Wilcoxon- (WIL) und t-Test (t-T) für die Signifikanzniveaus α von 10%, 5% und 1%. Innerhalb der Gene MMP 9, 12, 13 und GAPDH werden die "Negativproben" der Probanden 1 bis 10 mit den jeweiligen Versuchskonditionen verglichen. Testentscheidungen bezüglich der Nullhypothese werden bei Ablehnung mit "AB" und bei Nichtablehnung mit "NA" gekennzeichnet.

		10%			5%				1%		
	VOR	WIL	t-T	VOR	WIL	t-T	p- Werte t-T	VOR	WIL	t-T	
<i>MMP 9</i>											
negativ - positiv	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,3755	NA	NA	NA	
negativ - MS pH 4.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,3338	NA	NA	NA	
negativ - MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,3741	NA	NA	NA	
negativ - art. MS pH 4.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,3868	NA	NA	NA	
negativ - art. MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,4481	NA	NA	NA	
MMP 12											
negativ - positiv	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,3008	NA	NA	NA	
negativ - MS pH 4.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,4750	NA	NA	NA	
negativ - MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,4646	NA	NA	NA	
negativ - art. MS pH 4.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,6708	NA	NA	NA	
negativ - art. MS pH 5.5	NA	AB	AB	NA	NA	NA	0,0984	NA	NA	NA	
MMP 13											
negativ - positiv	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,4544	NA	NA	NA	
negativ - MS pH 4.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,2249	NA	NA	NA	
negativ - MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,2567	NA	NA	NA	
negativ - art. MS pH 4.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,9502	NA	NA	NA	
negativ - art. MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	AB	NA	0,0594	NA	NA	NA	
GAPDH											
negativ - positiv	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,6939	NA	NA	NA	
negativ - MS pH 4.5	NA	AB	NA	NA	AB	NA	0,1506	NA	NA	NA	
negativ - MS pH 5.5	NA	NA	AB	NA	NA	AB	0,0015	NA	NA	AB	
negativ - art. MS pH 4.5	NA	NA	AB	NA	NA	AB	0,0088	NA	NA	AB	
negativ - art. MS pH 5.5	NA	NA	AB	NA	NA	AB	0,0135	NA	NA	NA	

8.2.4. Statistik: Genregulation

Tab. 14: t-Test in einseitiger Fragestellung, Kollektiv I.

"Nativ-" und "Negativproben" von MMP 9, 12, 13 und GAPDH wurden den Versuchskonditionen im t-Test (einseitige Fragestellung) bei $\alpha = 5\%$ gegenüber gestellt, um Überexpressionen bzw. Gensuppressionen zu ermitteln. Nicht signifikante Abweichungen sind durch " \approx " gekennzeichnet.

	Basis: "Nativprobe"	Basis: "Negativprobe"
MMP 9		
positiv	Hochregulation	≈
negativ	Hochregulation	
MS pH 4.5	Hochregulation	~
MS pH 5.5	Hochregulation	≈
art. MS pH 4.5	Hochregulation	~
art. MS pH 5.5	Hochregulation	≈
MMP 12	Hochregulation	
positiv	Hochregulation	≈
negativ	Hochregulation	
MS pH 4.5	Hochregulation	≈
MS pH 5.5	Hochregulation	≈
art. MS pH 4.5	Hochregulation	~
art. MS pH 5.5	Hochregulation	Hochregulation
MMP 13	Hochregulation	
positiv	Hochregulation	~
negativ	Hochregulation	
MS pH 4.5	Hochregulation	~
MS pH 5.5	Hochregulation	≈
art. MS pH 4.5	~	~
art. MS pH 5.5	Hochregulation	Hochregulation
GAPDH		
positiv	≈	≈
negativ	Hochregulation	
MS pH 4.5	~	~
MS pH 5.5	Hochregulation	Hochregulation
art. MS pH 4.5	Hochregulation	Hochregulation
art. MS pH 5.5	Hochregulation	Hochregulation

8.2.5. Statistik: Vergleichsbasis "Magensaftproben"

Tab. 15: Statistische Tests auf Basis der "Magensaftproben", Kollektiv I.

Vorzeichen- (VOR), Wilcoxon- (WIL) und t-Test (t-T) für die Signifikanzniveaus α von 10%, 5% und 1%. Dargestellt sind die Signifikanzen zwischen den Konditionen "Magensaft pH 4,5 / 5,5" sowie der "artifiziellen Magensäfte pH 4,5 / 5,5". Testentscheidungen bezüglich der Nullhypothese werden bei Ablehnung mit "AB" und bei Nichtablehnung mit "NA" gekennzeichnet.

		10%		5%				1%		
	VOP	WII	t-T	VOP	WII	t-T	p- Werte	VOP	WII	t-T
MMP 9	VOR	WIL	t- 1	VOR		t-1	t-1	VOR		t-1
MS pH 4.5 - MS pH 5.5	NA	AB	AB	AB	NA	AB	0,0426	NA	NA	NA
MS pH 4.5 - art. MS pH 4.5	AB	AB	NA	NA	AB	NA	0,1071	NA	NA	NA
MS pH 5.5 - art. MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,7415	NA	NA	NA
art. MS pH 4.5 - art. MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,7680	NA	NA	NA
MMP 12										
MS pH 4.5 - MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,6802	NA	NA	NA
MS pH 4.5 - art. MS pH 4.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,7091	NA	NA	NA
MS pH 5.5 - art. MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,1487	NA	NA	NA
art. MS pH 4.5 - art. MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,2545	NA	NA	NA
MMP 13										
MS pH 4.5 - MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,5250	NA	NA	NA
MS pH 4.5 - art. MS pH 4.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,2411	NA	NA	NA
MS pH 5.5 - art. MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,5003	NA	NA	NA
art. MS pH 4.5 - art. MS pH 5.5	NA	NA	NA	AB	NA	NA	0,2283	NA	NA	NA
GAPDH										
MS pH 4.5 - MS pH 5.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0007	AB	AB	AB
MS pH 4.5 - art. MS pH 4.5	AB	AB	AB	AB	AB	AB	0,0053	AB	AB	AB
MS pH 5.5 - art. MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,8039	NA	NA	NA
art. MS pH 4.5 - art. MS pH 5.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0,4694	NA	NA	NA

8.3. Kollektiv II

8.3.1. Signalintensitäten nach Gelelektrophorese

Tab. 16: Signalintensitäten [AU] nach Gelelektrophorese, Kollektiv II.

Dargestellt sind die Expressionsstärken der Matrix-Metallproteinasen 9, 12 und 13 und des Referenzgenes GAPDH sowie die entsprechenden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (s).

]	Patienten						
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	MW	s
<i>MMP 9</i>											
negativ	67,92	60,50	38,99	86,15	79,21	89,16	79,39	61,98	85,03	72,04	15,31
MS pH 4,5	83,90	74,83	34,87	70,91	62,38	74,50	79,14	55,75	85,05	69,04	15,04
MMP 12											
negativ	34,11	37,31	25,33	61,88	67,62	56,46	48,26	45,11	50,91	47,44	12,84
MS pH 4,5	44,10	38,80	19,92	58,83	60,78	49,78	47,70	42,69	37,40	44,44	11,54
MMP 13											
negativ	36,95	2,21	1,94	14,18	6,40	1,88	10,37	2,18	10,77	9,81	10,61
MS pH 4,5	18,37	2,64	0,26	19,11	10,11	2,56	24,84	5,54	12,01	10,60	8,15
GAPDH											
negativ	242,92	156,83	92,10	124,82	104,99	85,53	122,67	120,22	103,41	128,17	45,17
MS pH 4,5			75,71	138,43	110,54	145,15	144,61	131,41	126,49	124,62	22,84

8.3.2. Statistik: Vergleichsbasis "Negativprobe"

Tab. 17: Statistische Tests auf Basis der "Negativprobe", Kollektiv II. Vorzeichen- (VOR), Wilcoxon- (WIL) und t-Test (t-T) für die Signifikanzniveaus α von 10%, 5% und 1%. Verglichen werden die Expressionen der "Negativproben" von MMP 9, 12, 13 und GAPDH gegen die Expressionen innerhalb der Kondition "Magensaft pH 4,5". Testentscheidungen bezüglich der Nullhypothese werden bei Ablehnung mit "AB" und bei Nichtablehnung mit "NA" gekennzeichnet.

		10%		5%				1%		
	VOR	WIL	t-T	VOR	WIL	t-T	p- Werte t-T	VOR	WIL	t-T
<i>MMP 9</i>										
negativ - MS pH 4,5	NA	NA	AB	NA	NA	NA	0,4773	NA	NA	NA
MMP 12										
negativ - MS pH 4,5	NA	NA	AB	NA	NA	NA	0,2048	NA	NA	NA
MMP 13										
negativ - MS pH 4,5	NA	NA	AB	NA	NA	NA	0,7836	NA	NA	NA
GAPDH										
negativ - MS pH 4,5	NA	AB	NA	NA	NA	NA	0,0990	NA	NA	NA

8.4. DNA-Microarray

Tabellarisch dargestellt sind die in den Miniorganen (MOCs) sowie ausgewachsenen Epithelzellen (EpC) der Patienten 11 und 12 über Oligonukleotid-Sonden detektierten Fuoreszenzsignalintensitäten der Matrix-Metalloproteinasen sowie den statistisch ermittelten p-Werten und der daraufhin formulierten Wahrscheinlichkeit der An- (P = present) oder Abwesenheit (A = absent) entsprechender Gene.

	Patient 11										
	n	egativ	MS pH 4,5								
Gen	Signal	P/A	p-Wert	Signal	P/A	p-Wert					
MMP 1	19417,520	Р	0,000	19939,910	Р	0,000					
MMP 2	8916,713	Р	0,000	9477,964	Р	0,000					
MMP 3	16395,660	Р	0,000	17357,910	Р	0,000					
MMP 7	1608,540	Р	0,014	1686,260	Р	0,008					
MMP 9	352,829	Р	0,000	428,221	Р	0,000					
MMP 10	1334,879	Р	0,001	845,798	Р	0,001					
MMP 12	817,007	Р	0,001	995,780	Р	0,001					
MMP 14	2044,619	Р	0,001	1976,666	Р	0,001					
MMP 14	1213,001	Р	0,000	1058,482	Р	0,001					
MMP 14	859,954	Р	0,003	835,144	Р	0,004					
MMP 14	838,239	Р	0,014	711,468	Р	0,024					
MMP 16	75,373	Р	0,038	119,810	Р	0,038					
MMP 16	168,990	Р	0,046	148,080	М	0,056					
MMP 25	271,226	Р	0,014	273,922	Р	0,019					
MMP 28	429,091	Р	0,000	280,933	Р	0,000					
MMP 28	325,078	Р	0,019	310,268	Р	0,019					

Tab. 18: Microarray-Fluoreszenzsignale anwesender MMPs für MOC, Patient 11.

Tab.	19:	Microarra	v-Fluor	reszenzsignale	anwesender	MMPs	für	MOC.	Patient	12
1000	· · ·	1111010001100	, 1 11101	colorizor zirene	chin cocheren	TITLE D	,	$m \circ \circ$,	I concontre .	

	Patient 12								
	nativ			negativ			MS pH 4,5		
Gen	Signal	P/A	p-Wert	Signal	P/A	p-Wert	Signal	P/A	p-Wert
MMP 1	343,343	Р	0,006	20211,410	Р	0,000	25014,980	Р	0,000
MMP 2	2814,652	Р	0,000	9876,988	Р	0,000	11350,880	Р	0,000
MMP 3	211,354	Α	0,171	16492,600	Р	0,000	20600,800	Р	0,000
MMP 7	1126,109	Р	0,038	487,184	Р	0,046	639,035	М	0,056
MMP 9	131,000	Р	0,003	336,731	Р	0,001	322,236	Р	0,000
MMP 10	961,283	Р	0,006	3105,056	Р	0,000	3600,110	Р	0,000
MMP 11	174,993	Μ	0,056	175,573	М	0,056	228,751	Р	0,030
MMP 12	231,384	Α	0,130	1198,519	Р	0,001	1299,139	Р	0,000
MMP 14	1677,801	Р	0,004	3075,457	Р	0,000	3280,495	Р	0,000
MMP 14	405,688	Р	0,030	1598,768	Р	0,000	1669,618	Р	0,001
MMP 14	503,503	Α	0,095	1638,790	Р	0,002	1950,135	Р	0,002
MMP 14	215,496	Α	0,274	660,463	Р	0,014	912,536	Р	0,014
MMP 16	315,123	Р	0,046	125,240	Р	0,046	225,841	Р	0,046
MMP 25	295,997	Р	0,008	287,393	Р	0,024	242,778	Р	0,038
MMP 28	237,660	Α	0,171	618,162	Р	0,046	496,863	Р	0,046
MMP 28	93,388	Α	0,304	306,151	Р	0,038	243,595	Р	0,030
MMP 28	217,613	Р	0,002	490,376	Р	0,001	406,563	Р	0,001
MMP 28	118,264	Α	0,150	356,323	Р	0,019	332,661	Р	0,014

	Patient 11									
	n	egativ		MS pH 4,5						
Gen	Signal	P/A	p-Wert	Signal	P/A	p-Wert				
MMP 1	3189,583	Р	0,000	3771,417	Р	0,000				
MMP 2	528,261	Р	0,000	567,992	Р	0,000				
MMP 9	108,242	Р	0,008	133,807	Р	0,001				
MMP 10	1638,129	Р	0,001	1918,887	Р	0,001				
MMP 11	129,473	Р	0,038	99,298	Р	0,024				
MMP 14	2650,539	Р	0,001	2462,107	Р	0,001				
MMP 14	1183,573	Р	0,001	1417,405	Р	0,000				
MMP 14	937,075	Р	0,004	950,435	Р	0,006				
MMP 14	832,785	Р	0,019	748,723	Р	0,024				
MMP 25	332,623	Р	0,019	254,216	Р	0,030				
MMP 28	717,874	Р	0,000	695,668	Р	0,000				
MMP 28	506,740	Р	0,024	463,255	Р	0,024				

Tab. 20: Microarray-Fluoreszenzsignale anwesender MMP für EpC, Patient 11.

Tab. 21: Microarray-Fluoreszenzsignale anwesender MMP für EpC, Patient 12.

	Patient 12									
	n	egativ		MS pH 4,5						
Gen	Signal	P/A	p-Wert	Signal	P/A	p-Wert				
MMP 1	2177,418	Р	0,000	2056,285	Р	0,000				
MMP 2	568,494	Р	0,000	345,597	Р	0,000				
MMP 9	149,033	Р	0,008	223,418	Р	0,008				
MMP 10	4115,220	Р	0,000	4656,270	Р	0,000				
MMP 12	138,726	Р	0,024	180,969	Р	0,046				
MMP 14	1583,950	Р	0,003	2338,188	Р	0,001				
MMP 14	724,015	Р	0,001	1675,419	Р	0,001				
MMP 14	827,519	Р	0,014	1359,212	Р	0,006				
MMP 25	236,162	Р	0,038	320,001	Р	0,019				
MMP 28	832,672	Р	0,019	845,672	Р	0,046				
MMP 28	382,471	Р	0,014	541,514	Р	0,030				
MMP 28	1609,676	Р	0,000	1507,583	Р	0,000				
MMP 28	934,864	Р	0,024	1187,142	Р	0,019				

Tab. 22: Microarray-Fluoreszenzsignale des Referenzgenes GAPDH, Patient 11 und 12.

	Patient 11, MOC		Patient 11, EpC		Patient 12, MOC			Patient 12, EpC	
Gen	negativ	MS 4,5	negativ	MS 4,5	nativ	negativ	MS 4,5	negativ	MS 4,5
GAPDH	20580,620	23548,880	22738,350	20714,200	22511,920	21633,210	29623,820	29723,190	23206,560
	19647,190	21500,810	21039,710	19677,460	20838,830	18230,420	25515,810	26667,940	21517,150
	20277,620	23020,240	22702,700	19465,500	24226,160	20139,510	28429,740	28798,900	22349,640

9. Thesen

- 1. Reflux von Magensaft kann pathophysiologisch neben dem Ösophagus auch den oberen Aerodigestivtrakt betreffen.
- 2. Laryngopharyngealer Reflux wird als Risikofaktor für Erkrankungen des oberen Aerodigestivtraktes angesehen.
- 3. Die Inkubation von respiratorischem Epithel mit Magensaft verursacht Gewebeläsionen und induziert Genexpressionsveränderungen.
- 4. Matrix-Metalloproteinasen sind an Differenzierungsprozessen humanen Gewebes beteiligt.
- 5. Matrix-Metalloproteinasen werden interindividuell verschiedenartig exprimiert.
- 6. Patientenbezogene Risikomerkmale haben Einfluss auf das Expressionsniveau von Matrix-Metalloproteinasen.
- 7. Miniorgankulturen aus Conchae nasales inferiores repräsentieren *in vitro* adäquat die *in vivo*-Situation respiratorischen Gewebes des oberen Aerodigestivtraktes.
- 8. Das *in vitro*-Modell der Miniorgankulturen eignet sich für die Exposition mit einer oder mehrerer Noxen und anschließender Untersuchung genregulatorischer Effekte.
- 9. Entnahme, Präparation und Kultivierung der Conchae nasales inferiores können die Expression von Matrix-Metalloproteinasen beeinflussen.
- 10. Die Matrix-Metalloproteinasen 9, 12 und 13 unterliegen refluxinduzierten Expressionsveränderungen.
- 11. Referenzgene sind durch experimentelle Konditionen regulativ beeinflussbar.
- 12. Die Optimierung der Kultivierungs- und Inkubationszeiten erhöht die Reproduzierbarkeit der gewonnenen Ergebnisse.
- 13. Statistisch relevante Aussagen in dem gewählten Modellsystem mit primärer Gewebekultur benötigen eine größere Anzahl experimenteller Daten.
Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Franziska Schwarzer
Geburtsdaten:	18.03.1986 in Halle (Saale)
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulausbildung

1992 – 1996	Grundschule Thomas	s Mann, H	alle (Saale))	
1996 - 2005	Landesgymnasium	Latina	August	Hermann	Francke
	(Spezialisierung: Sprachzweig), Halle (Saale)				

■ Studium

2005 - 2011	Studium der Humanmedizin an der Martin Luther Universität
	Halle-Wittenberg
2012	Promotionsstudentin (01.01.2012 bis 31.05.2012)

Praktisches Jahr

- Klinik für Innere Medizin, Städtisches Klinikum Dessau
- Klinik für Chirurgie, Städtisches Klinikum Dessau
- Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Helios Klinik Sangerhausen

Promotion

 2008 - 2013: Doktorandin in der Klinik f
ür Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der Martin Luther Universit
ät Halle-Wittenberg

<u>Publikation</u>

 Schwarzer F, Schön I, Neumann K, Sandner A: In vitro Expression der Matrix-Metalloproteinasen MMP 9, 12 und 13 bei refluxexponierten Miniorgankulturen.
 81. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Abstractband, Wiesbaden (2010) S. 33

Ärztliche Tätigkeit

- seit 01.06.2012: Assistenzärztin, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Carlvon-Basedow-Klinikum Merseburg

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit ausschließlich von mir und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Alle Hilfsmittel und anderen Arbeiten wörtlich oder inhaltlich entnommenen Textstellen sind ausdrücklich als solche gekennzeichnet und als Quellen angegeben.

Außer dieser Arbeit habe ich keine weiteren Promotionsversuche unternommen. Dies ist mein erstes Promotionsverfahren.

Franziska Schwarzer

Halle (Saale), den 21.01.2014

Danksagung

Danken möchte ich Frau PD Dr. med. Kerstin Hoffmann für die Möglichkeit zur Promotion sowie der freundlichen Überlassung des Themas.

An dieser Stelle danke ich ebenso Herrn Prof. Dr. med. habil. Stefan Plontke als Direktor der Universitäts- und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde der MLU Halle-Wittenberg für die Zulassung zur Promotion an seiner Klinik.

Ich danke Frau Dr. med. Annett Sandner, Oberärztin der Universitäts- und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilunde der MLU, für die Betreuung.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Ilona Schön, Leiterin des Forschungslabores der Klinik, deren fachliche Unterstützung, Anregung und Motivation ich sehr zu schätzen weiß.

Frau Sabine Koitzsch, medizinisch-technische Assistentin des Forschungslabores, danke ich sehr für ihre allzeit helfende Hand in der praktischen Durchführung meiner Laborarbeit.

Dem Forschungslabor der Universitäts- und Poliklinik für Herz- und Thoraxchirurgie danke ich für die Möglichkeit zur elektronischen Quantifizierung meiner PCR-Daten.

Ebenso geht auch ein Dank an Herrn Dr. rer. nat. Martin Sebastian Staege, Leiter des Forschungslabores der Universitäts- und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin, für die Vergleichsanalyse mittels Microarray.

Großer Dank gilt meinen Eltern, welche mir stets mit Rat und Tat zur Seite stehen und ohne deren Unterstützung eine Fertigstellung der Promotion vor meinem Berufsbeginn gewiss nicht möglich gewesen wäre. Danke!