

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohren-
krankheiten, plastische und ästhetische Operationen
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

**Modulation Nikotin induzierter DNA-Schäden an humanen Lymphozyten
und nasaler Mukosa**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Roland Koch
aus Schweinfurt

Würzburg, Juni 2010

Referent: Professor Dr. med. Norbert Kleinsasser

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Robert Mlynski

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 26. Oktober 2010

Der Promovend ist Arzt.

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1	Einleitung	1
1.1	Belastung des Menschen durch Xenobiotika	1
1.2	Tabakkonsum als bedeutender Gesundheitsrisikofaktor	2
1.3	Präventionsmaßnahmen gegen den weltweiten Tabakkonsum	4
1.4	Eingesetzte Xenobiotika	5
1.4.1	Nikotin	5
1.4.2	Epibatidin	6
1.4.3	Methylmethansulfonat	7
1.5	Ziele der Arbeit	8
Kapitel 2	Material und Methoden	10
2.1	Materialien und Geräte	10
2.1.1	Testsubstanzen	10
2.1.2	Lösungen, Medien und Zusätze	10
2.1.3	Enzyme	11
2.1.4	Chemikalien und Reagenzien	11
2.1.5	Verbrauchsmaterialien	11
2.1.6	Geräte	12
2.1.7	Lösungen und Puffer	12
2.1.8	Herstellung der beschichteten Objektträger	13
2.2	Probanden und Patienten	14
2.2.1	Spender von Lymphozyten	14
2.2.2	Spender von nasaler Schleimhaut und Lymphozyten	14
2.3	Gewinnung der Einzelzellen	15
2.3.1	Isolierung der Lymphozyten	15
2.3.2	Isolierung und Separation von nasalen Mukosazellen	16
2.4	Zellzählung und Vitalitätsbestimmung	17

2.5	Kryokonservierung und Reaktivierung der Lymphozyten	18
2.6	Genotoxizitätsbestimmung mit dem alkalischen Einzelzell- Mikrogelelektrophorese Assay	19
2.6.1	Grundlagen und Modifikationen	19
2.6.2	Inkubationsschemata	20
2.6.3	Fremdstoffexposition	21
2.6.4	Versuchsablauf	22
2.6.5	Versuchsablauf mit Formamidopyrimidin-Glykosylase	23
2.6.6	Auswertung am Fluoreszenzmikroskop	24
2.7	Schematisches Versuchsprotokoll	25
2.8	Graphische Darstellung und statistische Testverfahren	26

Kapitel 3 Ergebnisse 28

3.1	Teilnehmerauswahl	28
3.2	Auswertung der Fragebögen	28
3.3	Ergebnisse zur Zellvitalität vor und nach Fremdstoffexposition	29
3.4	Genotoxizität der getesteten Xenobiotika	29
3.4.1	Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Formamidopyrimidin- Glykosylase	30
3.4.2	Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Aphidicolin	32
3.4.3	Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Epibatidin	34
3.4.4	Ergebnisse zum Einfluss des Tabakkonsums	38

Kapitel 4 Diskussion 39

4.1	Diskussion der Methodik	39
4.1.1	Einsatz von humanen Lymphozyten und nasalen Mukosazellen	39
4.1.2	Nachweis von DNA-Schäden mit dem alkalischen Einzelzell- Mikrogelelektrophorese Assay	40
4.2	Diskussion der Ergebnisse	42

4.2.1	DNA-Schädigung durch Nikotin	42
4.2.2	Einfluss des Tabakkonsums auf die Ergebnisse des alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assays	51
4.3	Tumorfördernde Mechanismen von Nikotin	52
4.4	Ausblick	55

Kapitel 5	Anhang	57
------------------	---------------	-----------

5.1	Zusammenfassung	57
5.2	Abkürzungsverzeichnis	59
5.3	Fragebogen zur Fremdstoffbelastung	61
5.4	Datenübersicht	64
5.5	Bildnachweis	74
5.6	Literatur	74
5.7	Publikation	83

Danksagung

1.1 Belastung des Menschen durch Xenobiotika

Der Mensch kommt täglich mit Gefahrstoffen aus der Umwelt in Kontakt und nimmt diese durch Inhalation, Ingestion oder über die Haut auf. Diese Stoffe werden als Xenobiotika bezeichnet und können dem menschlichen Organismus entweder direkt oder nach metabolischer Aktivierung Schaden zufügen. Hierbei werden Stoffe mit zytotoxischer Wirkung, welche die Zellfunktion beeinträchtigen, von genotoxischen Substanzen unterschieden, welche das Erbgut eines Organismus verändern können. Die oberen Luft- und Speisewege sind diesen Noxen in erster Linie ausgesetzt.

Neben einer akuten toxischen Wirkung, wie etwa einer lokalen Reizung der Haut oder der Schleimhäute, können einige Xenobiotika bei chronischer Exposition zu einer Krebserkrankung beim Menschen führen. Aus diesem Grund ist es notwendig, das Gefährdungspotential durch diese Stoffe genau zu analysieren. Mit verschiedenen *in vivo*, *ex vivo* oder *in vitro* Methoden lassen sich zyto- und genotoxische Effekte von Xenobiotika nachweisen. Aus den gewonnenen Ergebnissen können relevante Kenn- sowie Grenzwerte für die Belastung am Arbeitsplatz, in der Umwelt sowie in der häuslichen Umgebung bestimmt werden.

Eine genaue Einteilung der Xenobiotika nach dem Schadensausmaß wird durch die Internationale Agentur für Krebsforschung (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), einer Einrichtung der Weltgesundheitsorganisation (WHO), vorgenommen. Diese teilt die untersuchten Xenobiotika in fünf Gruppen ein [IARC, 2010]:

- Gruppe 1: krebserzeugend für den Menschen
- Gruppe 2A: wahrscheinlich krebserzeugend für den Menschen
- Gruppe 2B: möglicherweise krebserzeugend für den Menschen
- Gruppe 3: nicht klassifizierbar bezüglich der Kanzerogenität für den Menschen
- Gruppe 4: wahrscheinlich nicht krebserzeugend für den Menschen

Xenobiotika, die eine tumorfördernde Wirkung aufweisen, werden als Kanzerogene bezeichnet und können an verschiedenen Stellen in den mehrstufigen Prozess der

Tumorentstehung eingreifen und diesen beschleunigen. Im Dreistufenmodell der Tumorigenese bauen die Stufen der Tumorinitiation, -promotion und -progression aufeinander auf: In der Phase der Initiation entstehen Mutationen an der DNA im Zellkern, falls diese nicht durch zelluläre Schutzmaßnahmen erkannt und repariert werden. Kanzerogene, welche die DNA verändern können, werden als genotoxisch bezeichnet und besitzen keinen Schwellenwert, da auch geringste Konzentrationen die Tumorigenese initiieren können.

Während der Tumorpromotion werden Zellwachstum und Zellteilung der initiierten Zelle durch Eingriffe von sogenannten Promotoren stimuliert und es entsteht über einen präneoplastischen Zellklon ein gutartiger benigner Tumor. Dieser Prozess kann Monate bis Jahre dauern.

Die Tumorprogression bezeichnet den Übergang eines benignen Tumors in einen entarteten malignen Tumor mit zunehmender genetischer Instabilität und erhöhtem Metastasierungspotential der Tumorzellen (siehe **Abbildung 1.1**). Für Kanzerogene, welche zur Promotion und Progression beitragen, können Schwellenwerte angegeben werden, ab denen ein toxischer Effekt zu erwarten ist [Dekant et Wiebel, 2007].

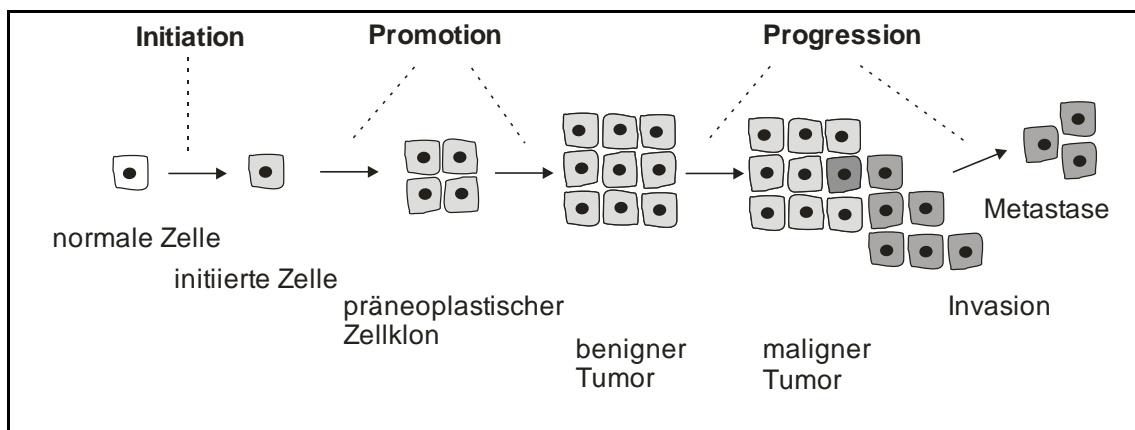


Abbildung 1.1: Mehrstufenprozess der Tumorigenese.

1.2 Tabakkonsum als bedeutender Gesundheitsrisikofaktor

Tabakprodukte werden weltweit auf verschiedene Weise konsumiert. Neben der häufigsten Aufnahmeart, dem Rauchen, wird Tabak auch gekaut, geschnupft oder

gelutscht. Dabei verursacht jede Form des Tabakkonsums Abhängigkeit und schwere gesundheitliche Schäden. Von über 4800 verschiedenen Verbindungen, die vorwiegend erst beim Verbrennen des Tabaks entstehen, gelten mindestens 250 dieser Substanzen als giftig oder kanzerogen [Schenk et al., 2008]. In der Reihe „Fakten zum Rauchen“ listet das Deutsche Krebsforschungszentrum 90 Kanzerogene auf, die im Tabakrauch enthalten sind und die bisher von der IARC oder der MAK-Kommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) als krebserzeugend oder möglicherweise krebserzeugend klassifiziert wurden. Zur Gruppe 1 nach IARC werden folgende Tabak-inhaltsstoffe gezählt: der polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren, die tabakspezifischen Nitrosamine 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon und N-Nitrosornicotin, die aromatischen Amine 2-Toluidin, 2-Naphthylamin und 4-Aminobiphenyl, aus der Gruppe der Aldehyde das Formaldehyd, die flüchtigen Kohlenwasserstoffe 1,3-Butadien und Benzol, organische Verbindungen wie Vinylchlorid und Ethylenoxid, Metalle wie Arsen, Beryllium, Nickel, Chrom und Cadmium sowie der radioaktive Stoff Polonium-210 [Nair et al., 2009].

Sowohl im Hauptstromrauch, der direkt vom Raucher inhaliert wird, als auch im Nebenstromrauch liegen die gleichen chemischen Komponenten vor. Infolge der niedrigeren Verbrennungstemperatur im Nebenstromrauch erreichen hier einige Substanzen 50fach höhere Konzentrationen als im Hauptstromrauch. Der Nebenstromrauch wird allerdings in der Raumluft stark verdünnt [Parzefall et al., 2005].

Bei Rauchern treten zahlreiche Krebserkrankungen, Erkrankungen der Gefäße und des Herzens, entzündliche Erkrankungen der Lunge, Diabetes sowie Parodontitis häufiger auf als bei Nichtrauchern. Tumore, an denen eine Mitbeteiligung des Tabakkonsums nachgewiesen wurde, sind Lungen-, Mundhöhlen-, Kehlkopf-, Speiseröhren-, Magen-, Bauchspeicheldrüsen-, Harnleiter-, Blasen-, Nieren- und Brustkrebs sowie einige Leukämieformen. Rauchen in der Schwangerschaft führt zu einer Zunahme von Schwangerschaftskomplikationen wie Früh-, Fehl- und Totgeburten sowie fetalen Entwicklungsstörungen, die lebenslang persistieren können. Sämtliche durch das Rauchen verursachte Erkrankungen können auch durch Passivrauchen entstehen. Hierbei werden der Nebenstromrauch sowie der vom Raucher wieder ausgeatmete Rauch eingeatmet [Reinberger et al., 2009].

1.3 Präventionsmaßnahmen gegen den weltweiten Tabakkonsum

Der weltweite Tabakkonsum wird von der WHO als eine Pandemie eingeschätzt, die nur durch ein länderübergreifendes Engagement eingedämmt werden kann. Auf Initiative der WHO wurde im Mai 2003 ein Rahmenabkommen zur Tabakkontrolle, der sogenannte *Framework Convention on Tobacco Control* (FCTC) eingeführt, an das sich seitdem immer mehr Länder angeschlossen haben [WHO, 2003]. Seit 2008 berichtet die WHO jährlich über die weltweiten Maßnahmen zur Eindämmung des Tabakkonsums im sogenannten MPOWER-Bericht und unterstützt die teilhabenden Länder an der Umsetzung verschiedener Maßnahmen gegen Tabakkonsum und -handel. Der Titel dieses Berichtes setzt sich aus den angelsächsischen Anfangsbuchstaben der notwendigen Maßnahmen zusammen:

Monitor tobacco use and prevention policies

Protect people from tobacco smoke

Offer help to quit tobacco use

Warn about the dangers of tobacco

Enforce bans on tobacco advertising, promotion and sponsorship

Raise taxes on tobacco

Um die Bevölkerung in Deutschland über das Tabakrauchen als das größte vermeidbare Gesundheitsrisiko unserer Zeit zu informieren, hat das Deutsche Krebsforschungszentrum 2009 ein Buch mit dem Titel „Tabakatlas Deutschland“ herausgegeben, das die aktuellen Daten für Deutschland darstellt [Pötschke-Langer et al., 2009]. Als Vorbild wurde der internationale Tabakatlas verwendet, der 2009 in seiner dritten Auflage erschien und die weltweiten Daten zum Tabakkonsum und -handel aufzeichnet.

1.4 Eingesetzte Xenobiotika

1.4.1 Nikotin

Seit der Isolierung von Nikotin, dem Hauptalkaloid der zu den Nachtschattengewächsen gehörenden Tabakpflanze, durch W. Posselt und L. Reimann im Jahre 1828 konnten bereits viele seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften entschlüsselt werden. Seine Wirkung im menschlichen Körper entfaltet es über den nikotinergeren Acetylcholinrezeptor. Dabei sind viele seiner Effekte auf den menschlichen Organismus dosisabhängig. In niedrigen Konzentrationen, wie sie etwa durch das Rauchen von Tabak aufgenommen werden, hat Nikotin einen stimulierenden Einfluss auf verschiedene Organsysteme, wie etwa dem zentralen Nervensystem, dem Herz-Kreislaufsystem, dem Magendarmtrakt und auf verschiedene endokrine Organe. In hohen Konzentrationen, die der letalen Dosis von 60 mg nahe kommen, schlagen sich diese Wirkungen um zu einem Kreislaufkollaps und es kann über einen Depolarisationsblock der neuromuskulären Übertragung innerhalb weniger Minuten zum Tod durch Atemlähmung kommen.

Nikotin ist die suchterzeugende Substanz im Tabakrauch. Es wird auch zur Entwöhnung des Rauchens in Form von Nikotinplastern, Kaugummis und Sprays eingesetzt. Der Erfolg dieser Substitutionstherapie fällt mit einem tabakfreien Anteil von etwa 10% der Behandelten nach einem Jahr nur mäßig aus [Starke, 2005].

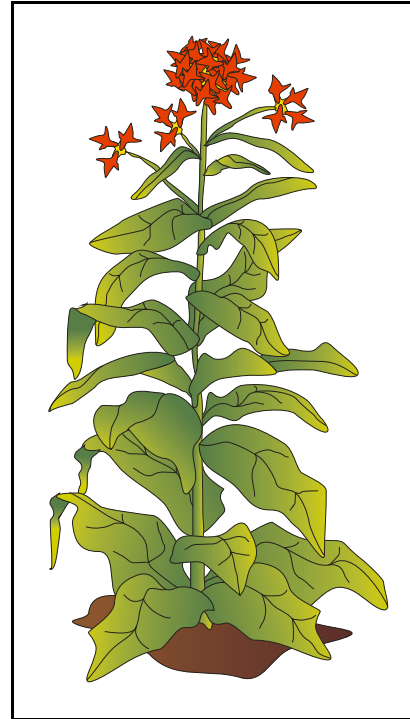


Abbildung 1.2: Rotblühende Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*)

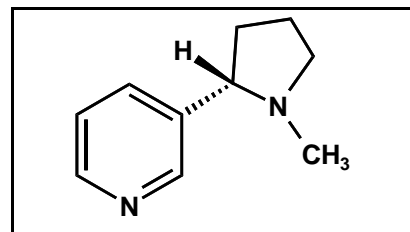


Abbildung 1.3: Strukturformel von Nikotin

1.4.2 Epibatidin

Die Entdeckung des Alkaloids Epibatidin geht auf die amerikanischen Forscher John W. Daly und Charles W. Myers zurück, die im Jahre 1977 bei einer Forschungsreise in Ecuador einige Frösche der Spezies *Epipedobates tricolor* mitnahmen, die der Gattung *Dendrobates* sowie übergeordnet der Familie der Baumsteigerfrösche (*Dendrobatidae*) angehören. Die Eingeborenen Süd- und Mittelamerikas nutzen seit jeher das Hautsekret dieser Frösche, um Giftpfeile herzustellen. Daher sind diese nur wenige Zentimeter großen Frösche auch als sogenannte Pfeilgiftfrösche bekannt. In den Versuchen von Daly und Myers rief ein aus der Haut dieser Frösche gewonnener Alkaloid-Extrakt bei Mäusen das Straub'sche Schwanzphänomen hervor. Dabei legt sich der Schwanz der Maus durch einen Krampf der perianalen Muskulatur S-förmig über den Rücken. Dies ist eine für Opiate typische, aber nicht spezifische Reaktion. Da das Phänomen trotz einer Vorbehandlung mit dem Opioidantagonisten Naloxon auftrat, musste eine nichtopioide Stoffgruppe für diese Reaktion verantwortlich sein. Nach einer Folge von Reinigungsschritten konnte aus einer Alkaloidfraktion von etwa 60 mg, die aus der Haut von 750 Fröschen extrahiert wurde, circa 750 µg der für das Straub'sche Schwanzphänomen verantwortlichen Verbindung gewonnen werden [Mueller, 1996].

Erst nach Verbesserung der Analysemethoden gelang Spande und Kollegen im Jahre 1992 die endgültige Strukturaufklärung mit einer Aufnahme des Protonenkernresonanzspektrums bei 500 MHz. Das neu entschlüsselte Alkaloid nannten sie Epibatidin nach dem Frosch *Epipedobates tricolor*, aus dem es isoliert wurde [Spande et al., 1992]. Um Epibatidin in größeren Mengen nutzen zu können, wurde bereits im gleichen Jahr von verschiedenen Forschungsgruppen mit der Synthese von Epibatidin begonnen. Auf Grund seiner etwa 200fach stärkeren analgetischen Wirkung als Morphin, einer kurzen Anflutzeit (3-5 min) und einer begrenzten Wirkdauer von



Abbildung 1.4: Azurblauer Pfeilgiftfrosch (*Epipedobates tricolor*)

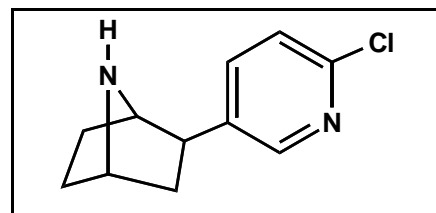


Abbildung 1.5: Strukturformel von Epibatidin

maximal einer Stunde waren die Hoffnungen anfangs groß, ein neues effizientes Analgetikum zur Verfügung zu haben. Im Mausmodell führten aber Konzentrationen von Epibatidin, die nur geringfügig über der für die Antinozizeption notwendigen Konzentration lagen, zu toxischen Auswirkungen mit Atemlähmung, Anfällen und Tod der Mäuse. Epibatidin ist neben Nikotin ein starker Agonist am nikotineren Acetylcholinrezeptor (nAChR). Für diese hohe Toxizität wird die Aktivierung zweier Subtypen des nAChR verantwortlich gemacht: der zentrale neuronale $\alpha 4\beta 2$ Rezeptor und der ganglionerge $\alpha 3\beta 4$ Rezeptor. Auf Grund dieser hohen Toxizität ist eine direkte pharmazeutische Nutzung nicht möglich. Verschiedene Analoga mit geringerer Toxizität sind bereits synthetisiert worden, wie etwa das Tebaniclin (ABT-594). Es wird vermutet, dass Analoga mit einer höheren Selektivität für den $\alpha 4\beta 2$ Rezeptorsubtypen und zugleich einer geringen Selektivität für den $\alpha 3\beta 4$ Rezeptor eine analgetische Wirkung mit geringerer Toxizität besitzen [Yogeeswari et al., 2006].

1.4.3 Methylmethansulfonat

Methylmethansulfonat (MMS) ist eine direkt DNA-alkylierende Verbindung, die als Standardreagenz zur Strangbruchbildung der DNA in der Positivkontrolle von Genotoxizitätstests verwendet wird [Speit et Hartmann, 1999]. Dabei methyliert MMS über einen so genannten S_N2 -Mechanismus, einer Sonderform

der nukleophilen Substitution, mit hoher Affinität das Stickstoffatom in Position 7 der Guaninbase (N^7 -Guanin). Mit einer geringeren Affinität alkyliert MMS auch die folgenden Atome von Basen der DNA: N^1 -Adenin, N^3 -Adenin, N^7 -Adenin, N^3 -Cytosin, N^3 -Guanin, O^6 -Guanin und N^3 -Thymidin [Beranek, 1990].

Nach Alkylierung von N^7 -Guanin kann die Bindung zwischen der DNA-Base und dem Desoxyribosephosphat-Gerüst der DNA durch Hydrolyse leicht zum N^7 -Methylguanin und einem Zuckerhalbacetal gespalten werden (siehe **Abbildungen 1.7** und **1.8**). Diese abasische Stelle kann entweder spontan oder enzymatisch in einen Einzelstrangbruch überführt werden [Eiberger, 2008].

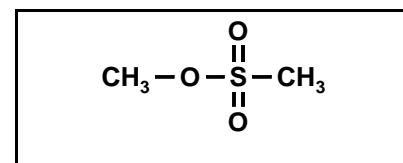


Abbildung 1.6: Strukturformel von MMS

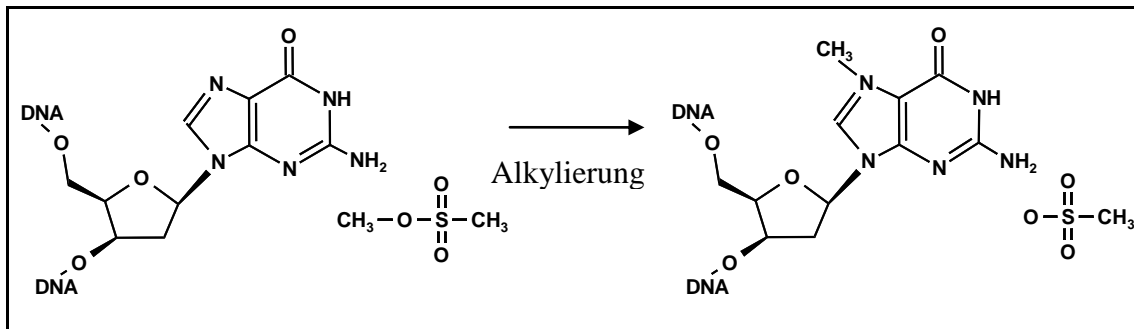


Abbildung 1.7: Reaktion der an der DNA gebundenen Base Guanin mit Methylmethansulfonat durch einen S_N2 -Mechanismus zur alkylierten Base Guanin und Methansulfonat.

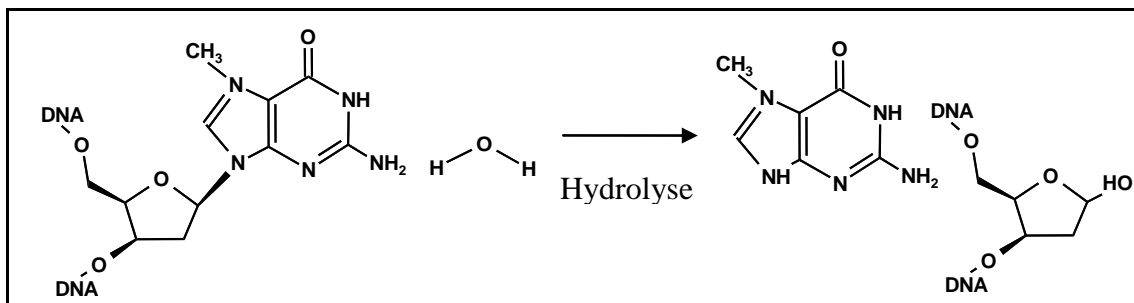


Abbildung 1.8: Hydrolytische Spaltung der an der DNA gebundenen, alkylierten Base Guanin in N^7 -Methylguanin und in das an die DNA gebundene Zuckerhalbacetal.

1.5 Ziele der Arbeit

Grundlage dieser experimentellen Studie ist die Erkenntnis, dass Nikotin in humanen Lymphozyten und nasalen Epithelien dosisabhängige DNA-Schäden induziert [Kleinsasser et al., 2005]. Die Mechanismen, die zu dieser DNA-Schädigung durch Nikotin führen, sind bisher nicht geklärt und sollen in dieser experimentellen Studie an humanen Lymphozyten und nasalen Mukosazellen mit dem alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet) Assay untersucht werden. Es werden sowohl frisch isolierte als auch rekultivierte Lymphozyten eingesetzt. Die DNA schädigenden Effekte sollen an nasalen Epithelien stellvertretend für das gesamte respiratorische Epithel des oberen und unteren Atemtraktes beobachtet werden.

Mit dem Comet Assay sollen folgende Hypothesen untersucht werden:

1. Lassen sich an frisch isolierten Lymphozyten mit Hilfe der Endonuklease Formamidopyrimidin-Glykosylase oxidative DNA-Schäden durch Nikotin nachweisen und kann somit die Sensitivität Nikotin induzierter DNA-Schäden im Comet Assay gesteigert werden?
2. Kann durch Zugabe des Reparaturinhibitors Aphidicolin während der Fremdstoffinkubation mit Nikotin die Reparatur induzierter DNA-Schäden an rekultivierten Lymphozyten gehemmt werden und somit die Fragmentierung der DNA im Comet Assay erhöht werden?
3. Kann durch den Einsatz von Epibatidin, einem im Vergleich zu Nikotin stärkeren Rezeptoragonisten am nAChR, die genotoxische Wirkung von Nikotin moduliert werden? Diese Untersuchungen sollen an nasalen Mukosazellen sowie an frisch isolierten Lymphozyten des gleichen Patienten durchgeführt werden.
4. Hat der Rezeptoragonist Epibatidin eine eigene DNA schädigende Wirkung?
5. Weisen nasale Mukosazellen von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern einen Unterschied in der basalen DNA-Schädigung sowie nach Fremdstoffinkubation mit Nikotin im Comet Assay auf?

Die Untersuchungen zur Zyto- und Genotoxizität der Xenobiotika Nikotin, Epibatidin und Methylmethansulfonat (MMS) erfolgten an frisch isolierten und rekultivierten Lymphozyten sowie an separierten nasalen Mukosazellen. Als etablierte Testmethoden kamen der Trypanblau-Ausschlusstest zur Bestimmung der Zytotoxizität und der alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assay zur Detektion induzierter DNA-Schäden zum Einsatz.

2.1 Materialien und Geräte

Im Folgenden werden die für die Versuche verwendeten Materialien und Geräte mit Angabe der Bezugsquelle aufgeführt.

2.1.1 Testsubstanzen

Als Testsubstanzen dienten:

(±)-Epibatidin	Tocris Bioscience, Ellisville, USA
Methylmethansulfonat	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Nikotin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

2.1.2 Lösungen, Medien und Zusätze

Folgende Artikel wurden verwendet:

nicht essentielle Aminosäuren-Lösung	Biochrom, Berlin, D
Natrium-Pyruvat-Lösung (100 mM)	Biochrom, Berlin, D
10fach konzentrierte Phosphat gepufferte Salzlösung	Roche, Mannheim, D
BEG-Medium	Promo Cell, Heidelberg, D
DME-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
bovines Serumalbumin in Fertiglösung	Linaris, Wertheim, D
Penicillin-Streptomycin-Lösung (1000 Units pro 1000 µg/ml)	Biochrom, Berlin, D
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, D
Separationsmedium (Biocoll D 1.077)	Biochrom, Berlin, D

2.1.3 Enzyme

Folgende Enzyme kamen zum Einsatz:

DNase	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Formamidopyrimidin-Glykosylase	BioLabs, Frankfurt, D
Protease	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

2.1.4 Chemikalien und Reagenzien

Folgende Chemikalien und Reagenzien fanden Anwendung:

Agarose: <i>Normal Melting Point</i> -Agarose	Roth, Karlsruhe, D
<i>Low Melting Point</i> -Agarose	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Aphidicolin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
bovines Serumalbumin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethylendiamintetraessigsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Ethidiumbromid	Merck, Schwalbach, D
Fungizone	Invitrogen, Karlsruhe, D
2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]- Ethansulfonsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Kaliumhydroxid	Merck, Schwalbach, D
Natriumchlorid	Merck, Schwalbach, D
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck, Schwalbach, D
Natronlauge	Merck, Schwalbach, D
N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (30%)	Serva, Heidelberg, D
Salzsäure (10 M)	Merck, Schwalbach, D
Trishydroxymethylaminomethan	Merck, Schwalbach, D
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Trypanblau Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Steinheim, D

2.1.5 Verbrauchsmaterialien

Zur Durchführung der Versuche wurden folgende Verbrauchsmaterialien verwendet:

Deckgläser Stärke 0 (24 x 32 mm)	Paul Marienfeld, Lauda, D
Gewebekulturschalen	Becton Dickinson, Oxnard, USA
Objektträger geschnitten mit doppel- seitigen Mattrand (26 x 76 mm)	Langenbrinck, Emmendingen, D
Kryoröhrchen (2 ml)	Nunc, Roskilde, DK

Pasteurpipetten	Brand, Wertheim, D
Reaktionsgefäße (0,5 ml) (1,5 ml) (1,5 ml; braun)	Hartenstein, Würzburg, D Sarstedt, Nümbrecht, D Brand, Wertheim, D
Zellkulturplatte (24-Loch-Platte)	Becton Dickinson, Oxnard, USA
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen, D

2.1.6 Geräte

Folgende Geräte wurden verwendet:

Elektrophoresekammer	Renner, Dannstadt, D
Elektrophoresenetzgerät EV202	Consort, Turnhout, B
Fluoreszenzlampe ebq 100 ISOLATED	Leica, Heerbrugg, CH
Mikroskope: Fluoreszenzmikroskop, DM4000B Lichtmikroskop, 473028	Leica, Heerbrugg, CH Zeiss, Oberkochen, D
pH-Meter	WTW, Weilheim, D
Zellzählkammer, Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, D
Zentrifugen: UNIVERSAL 16R Centrifuge 5415 R Centrifuge 5810 R	Hettich, Tuttlingen, D Eppendorf, Hamburg, D Eppendorf, Hamburg, D

2.1.7 Lösungen und Puffer

Vor Beginn der Versuche wurden der Lysepuffer und der Elektrophoresepuffer frisch angesetzt und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei 4°C gelagert:

Der Lysepuffer für eine Küvette setzte sich aus 66,75 ml Lysestammlösung, 7,5 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) und 0,75 ml Triton X-100 zusammen. Für die Lysestammlösung wurden 292,8 g Natriumchlorid, 67 ml einer 30-prozentigen Lösung aus N-Lauroylsarcosin-Natriumsalz, 74,4 g Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) und 2,4 g Trishydroxymethylaminomethan (Tris) in 1800 ml Aqua bidestillata (bidest.) gelöst, durch Zugabe von Natriumhydroxid (NaOH)-Plätzchen und 5 molarer Salzsäure (HCl)-Lösung auf pH 10,0 eingestellt und mit Aqua bidest. auf 2 l aufgefüllt.

Der Elektrophoresepuffer für eine Elektrophoresekammer setzte sich aus 120 ml 5 molarer NaOH-Lösung, 10 ml 0,2 molarer EDTA-Stammlösung und 1870 ml Aqua bidest. zusammen. Für eine 5 molare NaOH-Lösung wurden 200 g NaOH-Plätzchen in 900 ml Aqua bidest. suspendiert und die Lösung mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt. Zur Herstellung der 0,2 molaren EDTA-Stammlösung wurde 14,89 g EDTA in 180 ml Aqua bidest. gelöst und durch Zugabe von NaOH-Plätzchen ein pH-Wert von 10,0 eingestellt. Nach Auffüllen mit Aqua bidest. auf 200 ml und Autoklavieren der EDTA-Stammlösung erfolgte die lichtgeschützte Lagerung bei Raumtemperatur (RT).

Für den Trispuffer wurde 97 g Tris in 1900 ml Aqua bidest. gelöst und durch Zugabe von 10 molarer HCl-Lösung der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Nach Auffüllen auf 2 l mit Aqua bidest. wurde der Trispuffer autoklaviert und bei RT gelagert.

Für die Versuche mit der Formamidopyrimidin-Glykosylase (Fpg) erfolgte die Herstellung folgender zusätzlicher Stamm- und Gebrauchslösungen: Der 10fach konzentrierte Enzympuffer setzte sich aus 9,5 g 2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure, 7,5 g Kaliumchlorid und 186 mg EDTA zusammen. Nach Einstellen auf pH 8,0 mit Kaliumhydroxid wurde der 10fach konzentrierte Enzympuffer bei -20°C gelagert.

Für die Lösung aus bovinem Serumalbumin (BSA) wurde 10 mg BSA in 10 ml Aqua bidest. gelöst. Nach Sterilfiltration erfolgte die Lagerung bei -20°C.

Der verwendete Enzym-BSA-Puffer setzte sich aus 4 ml einfach konzentriertem Enzympuffer und 1 ml BSA-Lösung zusammen. Für die Fpg-Lösung wurden 1 µl Fpg-Stammlösung in 3 ml Enzym-BSA-Puffer suspendiert. Diese beiden Gebrauchslösungen mussten vor dem Versuch frisch angesetzt werden und wurden bis zur Verwendung auf Eis gekühlt.

2.1.8 Herstellung der beschichteten Objektträger

Zur elektrophoretischen Auftrennung der DNA in einem Agarosegel mussten längsseitig mattierte Objektträger mit *Normal Melting Point*-Agarose (NMP-Agarose) vorbeschichtet werden. Nach Benetzen der Objektträger in der erhitzten NMP-Agaroselösung (1,5%) wurden die Unterseiten der Objektträger abgewischt und diese über Nacht zum Trocknen der Agarosedeckschicht ausgelegt. Anschließend erfolgte die Lagerung der beschichteten Objektträger unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur.

2.2 Probanden und Patienten

Die Teilnehmer an dieser Studie bestanden zum einen aus freiwilligen Blutspendern und zum anderen aus Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Hagen), die im Zeitraum von Februar bis Dezember 2009 an Nasenmuscheln bzw. Nasennebenhöhlen operiert wurden. Alle Teilnehmer wurden nach den Vorgaben des Ethikkommissionsantrages (Nr. 16/06) des Klinikums der Julius-Maximilians-Universität Würzburg mündlich und schriftlich über die wissenschaftliche Verwendung ihrer Proben aufgeklärt.

Zur Beurteilung der individuellen Fremdstoffbelastung füllten die Teilnehmer einen Fragebogen aus, in dem der Alkohol- und Tabakkonsum, der Kontakt gegenüber passivem Tabakrauch sowie Angaben zur beruflichen oder privaten Exposition mit Fremdstoffen erfasst wurden (siehe 5.3). Der Alkoholkonsum wurde in Gramm Ethanol pro Tag umgerechnet mit Ethanolkonzentrationen von 25 g/l für Bier, 88 g/l für Wein und 400 g/l für Spirituosen. Die Abschätzung des Tabakkonsums erfolgte in *pack years*. Dabei entspricht ein *pack year* dem Konsum von einer Schachtel mit 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr.

2.2.1 Spender von Lymphozyten

Von männlichen Probanden im Alter von 26 bis 54 Jahren, die sich aus Studenten und Mitarbeitern der Klinik rekrutierten, wurde je 20 ml Vollblut in heparinisierte Monovettenröhrchen entnommen und unverzüglich zur Lymphozytenisolierung in das Labor der Klinik gebracht.

2.2.2 Spender von nasaler Schleimhaut und Lymphozyten

Die verwendete Nasenschleimhaut stammte von 15 Patienten (6 Frauen und 9 Männer) im Alter von 19 bis 68 Jahren und wurde im Rahmen von operativen Eingriffen der inneren Nase gewonnen. Von 8 der 15 operierten Patienten konnten venöse Blutproben (10 ml) eingesetzt werden. Aus dem heparinisierten Vollblut der Patienten erfolgte umgehend die Isolierung der Lymphozyten für die weiteren Versuche.

2.3 Gewinnung der Einzelzellen

2.3.1 Isolierung der Lymphozyten

Die Isolierung der Lymphozyten aus dem heparinisiertem Vollblut erfolgte durch Dichtegradientenzentrifugation in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit eingelassener Trennscheibe aus Polyethylen. Diese poröse Trennscheibe mit zentraler Aussparung verhindert ein Vermischen des Separationsmediums mit dem venösen Vollblut vor Beginn der Zentrifugation sowie eine Rekontamination der aufgetrennten Lymphozyten mit den im Pellet abgesetzten Erythrozyten und Granulozyten während der Gewinnung der Interphase aus Lymphozyten und Monozyten (siehe **Abbildung 2.1**).

Zuerst wurde das Zentrifugenröhrchen mit 15 ml Separationsmedium unter sterilen Bedingungen befüllt und 30 sec bei 1000 *rounds per minute* (rpm) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert, so dass sich anschließend das Separationsmedium unterhalb der Trennscheibe befand. Hierauf wurde das Vollblut auf die Trennscheibe geschichtet und 10 min bei 2000 rpm und RT zentrifugiert, wobei ein ungebremster Zentrifugenbetrieb für eine scharfe Phasentrennung erforderlich war. Folgende Schichten ergaben sich nach der Zentrifugation mit der obersten Phase im Zentrifugenröhrchen beginnend:

- Plasmaphase mit Thrombozyten
- Interphase aus Lymphozyten und Monozyten
- Separationsphase mit Trennscheibe
- Pellet aus Erythrozyten und Granulozyten

Vor Gewinnung der Lymphozyten wurde die Plasmaphase verworfen, um eine Kontamination mit Thrombozyten zu verhindern. Anschließend erfolgte mit einer Pasteurpipette die Überführung der milchig trüben Interphase aus Lymphozyten und Monozyten in ein frisches 15 ml Zentrifugenröhrchen. Durch Zugabe von 10 ml einer einfach konzentrierten phosphatgepufferten Salzlösung (1x PBS) und anschließender Zentrifugation bei 1000 rpm und RT für 10 min erfolgte der erste Waschschrift der gewonnenen Lymphozyten. Nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes wurde das Pellet aus Lymphozyten erneut in 10 ml 1x PBS resuspendiert und für 10 min bei 1000 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das

Pellet in 7 ml *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI)-Medium (37°C) aufgenommen. Dem RPMI-Medium wurden 15% der bovinen Serumalbumin-Fertiglösung sowie je 1% der Natrium-Pyruvat-Lösung, der Lösung aus nicht essentiellen Aminosäuren und der Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt.

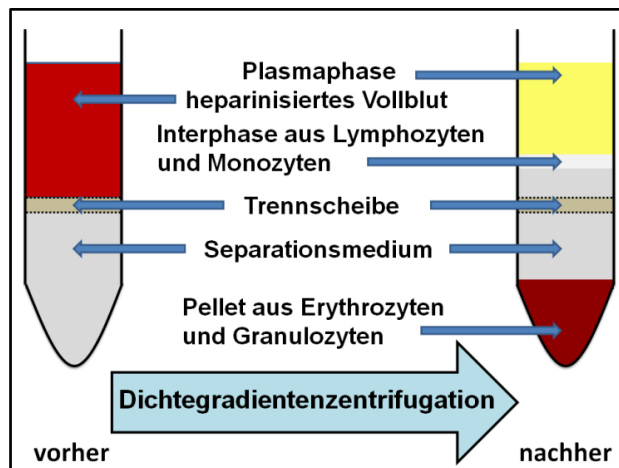


Abbildung 2.1: Auftrennung des heparinisierten Vollblutes durch Dichtegradientenzentrifugation.

2.3.2 Isolierung und Separation von nasalen Mukosazellen

Im Anschluss an die Operation wurden die nasalen Schleimhautpräparate in physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) aus dem Operationssaal in das Labor transportiert und dort zügig unter den aseptischen Bedingungen einer Sterilbank weiterverarbeitet. In einer Gewebekulturschale erfolgte mit einem Skalpell die Trennung der nasalen Schleimhaut von Blutbestandteilen und Knochenresten in *Dulbecco's Modified Eagle's* (DME)-Medium mit 1% Fungizone und 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung. Hierauf wurden die Schleimhautpräparate in 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 9 ml *Bronchial Epithelial Growth* (BEG)-Medium zuzüglich 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung überführt und 100 µl einer aliquotierten Enzymlösung hinzugegeben, die sich aus 100 mg Protease und 1 mg DNase in 10 ml 1x PBS gelöst zusammensetzte.

Unter Lichtausschluss erfolgte für 24 h die Inkubation der Schleimhautpräparate auf einer Schüttelplatte bei 4°C. Hierauf wurden die Schleimhautpräparate samt Medium in eine Gewebekulturschale gegeben und es erfolgte mit einem Skalpell ein mechanisches Ablösen noch anhaftender Mukosazellen durch mehrmaliges Abschaben der Schleimhautoberflächen. Nach Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 2 ml BSA-

Fertiglösung wurde die Zellsuspension durch einen sterilen Zellstoff in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen filtriert.

2.4 Zellzählung und Vitalitätsbestimmung

Zellzahlen und Vitalitäten von Lymphozyten und nasalen Mukosazellen wurden in einer Neubauer-Zählkammer mit dem Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Dabei nehmen vitale Zellen mit intakter Zellmembran den Farbstoff Trypanblau nicht auf und erscheinen unter dem Lichtmikroskop ungefärbt. In tote Zellen dringt der blaue Farbstoff ein und färbt deren Zytoplasma blau an [Phillips, 1973].

Jeweils 10 µl der gewonnenen Zellsuspension wurden mit 10 µl einer Trypanblau-Lösung (0,4%) suspendiert und in die Neubauer-Zählkammer gegeben. Sowohl ungefärbte, vitale Zellen als auch blau gefärbte, avitale Zellen wurden in den vier großen Quadranten der Neubauer-Zählkammer jeweils getrennt ausgezählt.

Während Lymphozyten eine kugelförmige Gestalt aufwiesen, präsentierten sich die etwa dreimal so großen nasalen Mukosazellen von meist länglicher Form mit teils dichtem unilokalem Besatz an Kinozilien (siehe **Abbildung 2.2** und **2.3**). Dabei zeigten vitale Epithelzellen der Nasenschleimhaut einen regen Kinozilienschlag.



Abbildung 2.2: Ungefärbte, vitale nasale Mukosazelle mit unilokalem Besatz an Kinozilien unter dem Lichtmikroskop bei 800facher Vergrößerung nach Trypanblaufärbung.



Abbildung 2.3: Blau gefärbte, avitale nasale Mukosazelle mit unilokalem Besatz an Kinozilien unter dem Lichtmikroskop bei 800facher Vergrößerung nach Trypanblaufärbung.

Die Konzentration vitaler Zellen pro ml Zellsuspension wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{vitale Zellen pro ml} = \frac{\text{Anzahl der ungefärbten Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Quadrate}} \times 2 \times 10^4$$

Die Vitalität der gewonnenen Einzelzellen berechnete sich jeweils aus dem Verhältnis von vitalen Zellen zur Gesamtzellzahl und wurde in Prozent angegeben.

2.5 Kryokonservierung und Rekultivierung der Lymphozyten

Für die Versuche an rekultivierten Lymphozyten mussten frisch isolierte Lymphozyten kryokonserviert werden. Aliquots mit einer Zellkonzentration von etwa 10^6 Zellen auf 1 ml Tieffriermedium, bestehend aus 90% BSA-Fertiglösung und 10% DMSO, wurden in 2 ml Kryoröhrchen gefüllt und in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter bei -80°C im Gefrierschrank gelagert. Dabei bewirkte das Isopropanol eine geregelte Temperaturabnahme der Lymphozytensuspension von 1°C pro Minute.

Für die Rekultivierung der kryokonservierten Lymphozyten wurden die tiefgefrorenen Lymphozyten möglichst schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Um die Zellen aus dem Tieffriermedium zu lösen, wurden die getauten Zellsuspensionen aus zwei Kryoröhrchen zu 10 ml RPMI-Medium (4°C) gegeben und für 5 min bei 1000 rpm und RT zentrifugiert. Nach sorgfältigem Absaugen der Überstandes wurde das Pellet in 4 ml RPMI-Medium (37°C) resuspendiert.

Vor Beginn der Versuche erfolgte die Vitalitäts- und Zellzahlbestimmung der rekultivierten Lymphozyten in der Neubauer-Zählkammer mit dem Trypanblau-Ausschlusstest (siehe 2.4).

2.6 Genotoxizitätsbestimmung mit dem alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assay

2.6.1 Grundlagen und Modifikationen

Mit dem alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet) Assay steht eine etablierte Methode zur Verfügung, um die DNA schädigenden Einflüsse von Xenobiotika im Rahmen von *in vitro* und *in vivo* Genotoxizitätstests zu untersuchen. Der Comet Assay weist Einzel- und Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen, Reparatereinschnitte der DNA sowie DNA-*Crosslinks* nach [Tice et al., 2000]. Dieses Verfahren unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} > 13$) wurde von Singh entwickelt [Singh et al., 1988] und gilt als eine Weiterentwicklung des Assays nach Østling und Johanson, mit dem sich bis dato unter neutralen pH-Bedingungen nur Doppelstrangbrüche der DNA nachweisen ließen [Østling et Johanson, 1984].

Zur Analyse werden die Zellen nach der Fremdstoffinkubation als Einzelzellsuspension in Agaroselösung aufgenommen, auf einen beschichteten Objektträger aufgetragen und unter alkalischen Bedingungen von zellulären Membranen lysiert. Nach der Lyse liegt nur noch die zelluläre DNA auf dem Objektträger vor. Hierauf werden die Zellen einem alkalischen Puffer ausgesetzt, wodurch es zur Entwindung und Auftrennung der DNA-Doppelhelix in seine beiden Einzelstränge, zur Denaturierung der vorhandenen RNA und zur Überführung alkalilabiler Stellen in Strangbrüche kommt. Anschließend folgt die elektrophoretische Auftrennung der DNA. Danach werden die Objektträger neutralisiert und mit Ethidiumbromid gefärbt. Während der Elektrophorese wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente im Agarosegel aus dem ursprünglichen Kern in Richtung Anode und geben den geschädigten Zellen ein kometenförmiges Aussehen. Hierbei nehmen die Länge und Intensität des „Kometenschweif“ mit steigender DNA-Fragmentierung zu (siehe **Abbildung 2.4** und **2.5**).

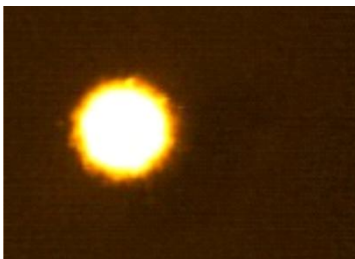


Abbildung 2.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Zellkerns ohne erkennbare DNA-Fragmentierung nach alkalischer Denaturierung, Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung mit Ethidiumbromid bei 1000facher Vergrößerung.

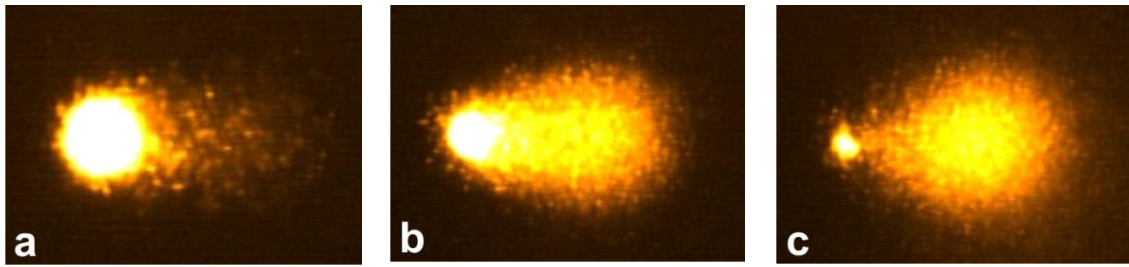


Abbildung 2.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellkernen mit zunehmender DNA-Fragmentierung von (a) nach (c) bei 1000facher Vergrößerung.

Die Sensitivität für den Nachweis induzierte DNA-Schäden im Comet Assay kann durch verschiedene Modifikationen des Standardprotokolls erhöht werden.

Mit Hilfe von Endonukleasen lassen sich mit dem Comet Assay auch Basenmodifikationen nachweisen. In dieser Arbeit wurde die aus dem Bakterium *Escherichia coli* gewonnene Formamidopyrimidin-Glykosylase (Fpg) als Endonuklease eingesetzt. Diese erkennt vor allem oxidativ geschädigte Purine, insbesondere das 8-oxo-Guanin, und schneidet diese aus der DNA heraus. Anschließend entfernt das Enzym den abasischen Zuckerrest und verursacht somit einen Einzelstrangbruch der DNA [Bhagwat et Gerlt, 1996].

Als eine weitere Modifikation können sogenannte Reparaturinhibitoren, wie etwa das Aphidicolin (APC), eingesetzt werden. Diese hemmen während der Fremdstoffinkubation die spontane Reparatur basaler und induzierter DNA-Schäden durch zelluläre Enzyme. Somit kommt es zu einer Akkumulation von Reparaturschnitten und einer gesteigerten Migration der DNA im Comet Assay [Speit et al., 2004b].

2.6.2 Inkubationsschemata

2.6.2.1 Inkubationsschema mit Nikotin und Formamidopyrimidin-Glykosylase

Zur Untersuchung einer konzentrationsabhängigen DNA-Schädigung durch Nikotin erfolgte an frisch isolierten Lymphozyten eine einstündige Inkubation mit Nikotin in aufsteigender Konzentration (10 μM , 100 μM und 1000 μM). Zum Nachweis oxidativer DNA-Schäden durch Nikotin wurden die Lymphozyten nach der einstündigen Fremdstoffinkubation mit Fpg behandelt. Als Negativkontrollen dienten die einstündige Inkubation der Lymphozyten mit RPMI-Medium bzw. die Inkubation mit RPMI-

Medium und Fpg. Für die Positivkontrollen erfolgten eine einstündige Inkubation mit der stark genotoxischen Substanz Methylmethansulfonat (MMS) von 100 μM bzw. eine Inkubation mit MMS (100 μM) und Fpg.

2.6.2.2 Inkubationschema mit Nikotin und Aphidicolin

In diesem Versuchsabschnitt wurde an rekultivierten Lymphozyten eine Dosis-Wirkungskurve für eine einstündige Inkubation mit Nikotin in aufsteigender Konzentration (1 μM , 10 μM , 100 μM und 1000 μM) sowie für eine Koinkubation der Nikotinkonzentrationen mit APC (2,5 $\mu\text{g/ml}$) erstellt. Als Negativkontrollen dienten die einstündige Inkubation der Lymphozyten mit RPMI-Medium bzw. die Inkubation mit RPMI-Medium und APC (2,5 $\mu\text{g/ml}$). Für die Positivkontrollen erfolgte eine einstündige Inkubation mit MMS (100 μM) bzw. eine Inkubation mit MMS (100 μM) und APC (2,5 $\mu\text{g/ml}$).

2.6.2.3 Inkubationschema mit Nikotin und Epibatidin

In diesem Versuchsabschnitt wurden sowohl isolierte nasale Mukosazellen als auch frisch isolierte Lymphozyten des gleichen Patienten mit Epibatidin in aufsteigender Konzentration (1 μM , 10 μM und 100 μM) über eine Stunde inkubiert. An beiden Zellenarten erfolgte eine einstündige Inkubation mit Nikotin (1000 μM) sowie eine Koinkubation der getesteten Epibatidinkonzentrationen jeweils mit Nikotin (1000 μM). Als Negativkontrolle diente für alle Versuche die alleinige Inkubation der Zellen mit dem entsprechenden Nährmedium der Zellen, RPMI-Medium für Lymphozyten und BEG-Medium für Nasenschleimhautzellen. Für die Positivkontrolle erfolgte für beide Zellarten eine einstündige Inkubation mit MMS (100 μM).

2.6.3 Fremdstoffexposition

Für die Fremdstoffexposition der Lymphozyten wurden jeweils 1000 μl Zellsuspension mit etwa 2×10^5 Lymphozyten in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen ausgesät. Nach Zugabe der Xenobiotika in einer Konzentration von je 10 $\mu\text{l/ml}$ Zellsuspension erfolgte die Fremdstoffinkubation für 60 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2 . Anschließend wurden die Zellsuspensionen in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben.

Zur Fremdstoffexposition der nasalen Mukosazellen wurden jeweils 500 μl Zellsuspension mit etwa 1×10^5 Zellen in 2 ml Reaktionsgefäße gegeben. Nach Zugabe der Xenobiotika in einer Konzentration von 10 $\mu\text{l/ml}$ Zellsuspension erfolgte eine 60-minütige Fremdstoffinkubation unter Lichtausschluss im Schüttelwasserbad bei 37°C.

Danach wurden Aliquots von 10 μl aus den exponierten Zellsuspensionen für eine zweite Vitalitätstestung entnommen (siehe 2.4). Nach Zentrifugation der exponierten Zellsuspensionen bei 1200 rpm für 6 min wurden die Überstände in den Reaktionsgefäßen bis auf etwa 70 μl abgesaugt und das Zellpellet jeweils im verbliebenen Medium resuspendiert. Bis zur Durchführung des Comet Assays erfolgte eine Kühlung der Reaktionsgefäße auf gestoßenem Eis unter Lichtausschluss, um eine mögliche Reparatur der induzierten DNA-Schäden sowie ein Fortschreiten der Zellkernschädigung durch den UV-Anteil im natürlichen Licht zu vermeiden.

2.6.4 Versuchsablauf

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten abgedunkelt unter Rotlicht, um eine zusätzliche Schädigung der DNA durch das UV-Licht zu verhindern. Aus den gekühlten Zellsuspensionen wurden je 20 μl in 180 μl der erwärmten *Low Melting Point* (LMP)-Agaroselösung (0,5%) aufgenommen, je 60 μl der Zell-Agarose-Suspension auf zwei beschichtete Objektträger gegeben und mit einem Deckglas (24 \times 32 mm) versehen. Da sich die LMP-Agarose im Vergleich zur NMP-Agarose, die für die Grundbeschichtung der Objektträger verwendet wurde (siehe 2.1.8), bei einer niedrigeren Temperatur verflüssigt, bleiben die in LMP-Agarose aufgenommenen Zellen in der Grundschicht aus NMP-Agarose haften. Nach vorsichtigem Abstreifen der Deckgläser wurden die Zellen tragenden Objektträger in eine mit Lyselösung gefüllte Küvette gestellt. Während der zweistündigen Lyse bei 4°C unter Lichtausschluss kam es zur Auflösung der Zytoplasma- und Zellkernmembranen.

Anschließend wurden die Objektträger mit der Agarosezellschicht nach oben in eine mit gestoßenem Eis gekühlte Elektrophoresekammer gelegt und diese bis zur vollständigen Bedeckung der Objektträger mit etwa 1900 ml des alkalischen Elektrophoresepuffer (4°C) gefüllt. In einer Elektrophoresekammer mit den Außenmaßen von 34 cm \times 21 cm \times 7 cm (Länge \times Breite \times Höhe) können maximal 21 beschichtete Objektträger gleichzeitig behandelt werden (siehe **Abbildung 2.6**). Nach einer 20-

minütigen Inkubation im alkalischen Elektrophoresepuffer erfolgte die Elektrophorese für weitere 20 min bei einer Spannung von 25 V und einer Stromstärke von 300 mA. Die hierzu benötigte Stromstärke wurde über die Menge an Elektrophoresepuffer eingestellt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Elektrophoresekammer entnommen und zur Neutralisierung des pH-Wertes für 5 min in eine mit Trispuffer gefüllte Küvette gestellt.

Nach kurzer Trocknung erfolgten die Färbung der DNA mit 20 µl Ethidiumbromidlösung (20 µg/ml Aqua bidest.) und eine lichtgeschützte Lagerung der Objektträger in einer feuchten Kammer bei 4°C. Die angefärbten Objektträger wurden innerhalb von einer Woche ausgewertet.



Abbildung 2.6: Aufsicht auf eine mit 21 seitlich mattierten Objektträgern bestückte Elektrophoresekammer mit Deckel. Länge, Breite und Höhe der Kammer sind 34 cm × 21 cm × 7 cm.

2.6.5 Versuchsablauf mit Formamidopyrimidin-Glykosylase

Für die Versuche mit Fpg wurden die Zellen pro Fremdstoffkonzentration auf vier Objektträger in Agarose eingebettet und anschließend für zwei Stunden lichtgeschützt bei 4°C in Lysepuffer gestellt. Nach der Lyse erfolgten drei Waschschrte der Objektträger in eiskaltem einfach konzentriertem Enzypuffer für je 5 min. Anschließend wurden jeweils zwei Objektträger pro Fremdstoffkonzentration mit 100 µl Enzym-BSA-Puffer bzw. 100 µl Fpg-Lösung eingedeckt. Nach einer 30-minütigen Inkubation im Brutschrank bei 37°C wurden die Objektträger in Aqua bidest. getaucht und in die Elektrophoresekammer gelegt. Die weiteren Arbeitsschritte erfolgten analog dem oben beschriebenen Versuchsablauf (siehe 2.6.4).

2.6.6 Auswertung am Fluoreszenzmikroskop

Die Auswertung der Objektträger erfolgte computerassistent an einem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung über eine daran angeschlossene CCD-Kamera. Mit Hilfe des Programms Comet 5.5 (Kinetic Imaging, Liverpool, GB) wurden als Maß zur Quantifizierung der DNA-Schädigung das *Olive Tail Moment* (OTM), der DNA-Anteil im Schweif (*DNA in Tail*, DT), der DNA-Anteil im ursprünglichen Kern (*DNA in Head*, DH) und die Schweiflänge (*Tail Length*, TL) bestimmt (siehe **Abbildung 2.7**). Hierbei ist der OTM-Wert ein dimensionsloser Parameter, der sich aus dem Produkt der Schweiflänge mit dem relativen Anteil der DNA im Kometenschweif errechnet [Olive et al., 1990]:

$$\text{Olive Tail Moment} = \text{Tail Length} \times \frac{\text{DNA in Tail}}{\text{DNA in Tail} + \text{DNA in Head}}$$

Für jede eingesetzte Konzentration erfolgte die Auswertung des Migrationsverhaltens von 100 Zellkernen auf zwei identisch behandelten Objektträgern. Anschließend wurden aus den jeweils 100 Werten für das OTM, DT und TL die arithmetischen Mittelwerte berechnet.

Da es am Randbereich des Objektträgers durch das Abziehen des Deckglases zur mechanischen Schädigung der Zellkerne kommen kann, wurden Zellkerne in diesem Bereich nicht in die Auswertung aufgenommen.

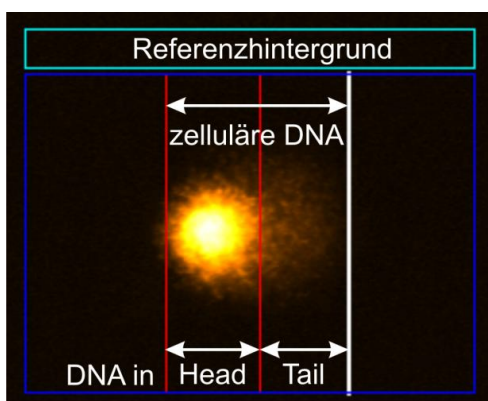
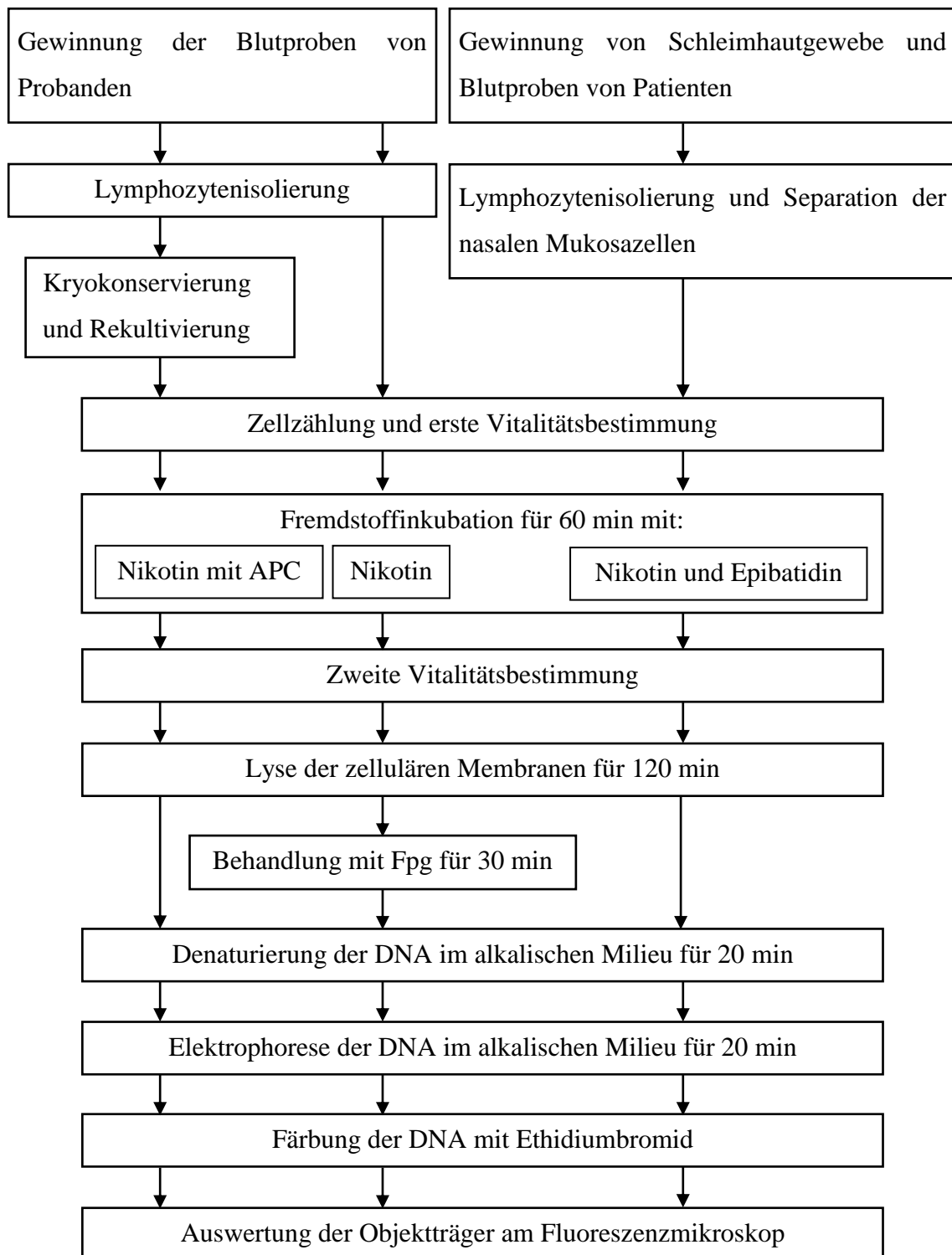


Abbildung 2.7: Quantifizierung der DNA-Schädigung mit dem Programm Comet 5.5 am Beispiel eines Zellkerns mit starker DNA-Fragmentierung. Messung der Bereiche für *DNA in Head* und *DNA in Tail* im Vergleich zum Referenzhintergrund.

2.7 Schematisches Versuchsprotokoll



2.8 Graphische Darstellung und statistische Testverfahren

Die graphische Darstellung der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Genotoxizität erfolgte in sogenannten *Boxplots* aus den OTM-Mittelwerten mit Hilfe der Datenanalyse-Software Statistica 8.0 (StatSoft, Tulsa, USA).

Dabei stellt ein *Boxplot* die Hälfte aller Daten in einem Kasten dar, der nach unten durch das 25. Perzentil und nach oben durch das 75. Perzentil begrenzt wird. In der Box wird der Medianwert durch einen horizontalen Strich dargestellt. Der Maximal- und Minimalwert im Bereich von eineinhalb Seitenlängen wird jeweils durch eine T-förmige Linie ober- und unterhalb des Kastens markiert. Werte, die mehr als eineinhalb Seitenlängen außerhalb des Kastens liegen, werden als Ausreißer definiert und sind mit einem Quadrat gekennzeichnet (siehe **Abbildung 2.9**).

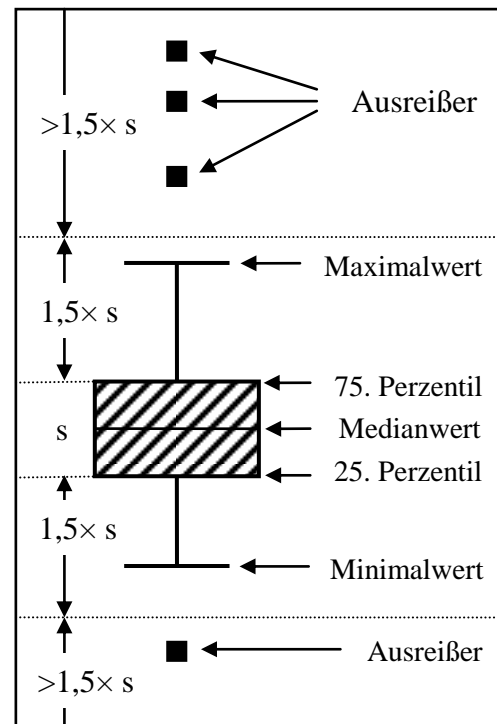


Abbildung 2.9: Boxplot mit Seitenlänge (s) der Box.

Die statistische Analyse erfolgte ebenfalls an den OTM-Mittelwerten mit der Datenanalyse-Software Statistica 8.0 (StatSoft,

Tulsa, USA). Nur Versuche, in denen die Zellvitalität größer als 80% war, wurden in die statistische Auswertung aufgenommen [Tice et al., 2000]. Um verbundene Stichproben zu vergleichen, wurden mit dem Friedman-Test und dem Wilcoxon-Test zwei nichtparametrische Testverfahren angewendet.

Der Friedman-Test vergleicht drei oder mehr verbundene Stichproben, indem den arithmetischen Mittelwerten der einzelnen Fremdstoffkonzentrationen ihrer Größe nach Ränge zugewiesen werden. Nach Aufsummieren der Ränge der einzelnen Datensätze wird der p-Wert aus dem Vergleich der Rangsummen der getesteten Fremdstoffkonzentrationen für die jeweilige Gruppe bestimmt.

Um jeweils zwei verbundene Stichproben auf einen signifikanten Unterschied zu überprüfen, wurde der Wilcoxon-Test durchgeführt.

Das globale α -Niveau wurde mit $\alpha_g = 0,05$ festgelegt. Mit Hilfe der Bonferroni-Holm-Korrektur wurden für die Ergebnisse aus den Wilcoxon-Tests lokale α -Niveaus bestimmt, um eine Kumulierung des Alphafehlers zu vermeiden. Hierbei werden die p-Werte aus k Wilcoxon-Tests aufsteigend der Größe nach ($p_1 \leq p_2 \leq p_3 \leq \dots \leq p_k$) sortiert und k lokale α -Niveaus bestimmt:

$$\begin{aligned}\alpha_1 &= \frac{\alpha_g}{k} \\ \alpha_2 &= \frac{\alpha_g}{k-1} \\ \alpha_3 &= \frac{\alpha_g}{k-2} \\ &\vdots \\ \alpha_k &= \frac{\alpha_g}{k-(k-1)} = \alpha_g\end{aligned}$$

Für Signifikanz muss dann jeweils gelten:

$$\begin{aligned}p_1 &< \alpha_1 \\ p_2 &< \alpha_2 \\ &\vdots \\ p_k &< \alpha_k\end{aligned}$$

Gilt für einen Wilcoxon-Test $p_i \geq \alpha_i$ mit i ($1 \leq i \leq k$), so sind dieser und alle folgenden p-Werte nicht signifikant [Bärlocher, 2008].

3.1 Teilnehmerauswahl

Zur Beurteilung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung von Nikotin induzierten DNA-Schäden an Lymphozyten erfolgte für die Versuche eine Auswahl der teilnehmenden Probanden. Nur männliche Probanden waren für diesen Versuchsteil zugelassen, um das unterschiedliche Geschlecht als eine mögliche Störgröße für diese Versuche auszuschließen [Bajpayee et al., 2002]. Die männlichen Blutspender waren im Alter von 26 bis 54 Jahren mit einem Altersdurchschnitt von 32,9 Jahren.

Die nasale Mukosa stammte von Patienten der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen der Julius-Maximilians-Universität Würzburg, die im Rahmen von Nasen- und Nasennebenhöhlenoperationen gewonnen werden konnte. Das untersuchte Spenderkollektiv von 15 Patienten setzte sich aus 9 Männern und 6 Frauen im Alter von 19 bis 68 Jahren zusammen. Das Durchschnittsalter lag bei 39,0 Jahren. Die epidemiologischen Daten der Teilnehmer mit Angabe des Tabak- und Alkoholkonsums sowie der Exposition gegenüber Passivrauch und Fremdstoffen werden im Anhang aufgeführt (siehe 5.4).

3.2 Auswertung der Fragebögen

Die Auswertung der Fragebögen zur individuellen Vorbelastung der Patienten erbrachte folgende Ergebnisse: 7 von 9 Patienten gaben einen geringen bis mäßigen Alkoholkonsum von 2 bis 25 g Ethanol pro Tag an, während 3 der 6 Patientinnen einen geringen Alkoholkonsum von 1 bis 11 g Ethanol pro Tag äußerten. Somit konnte bei allen Teilnehmern ein chronisch hoher Alkoholkonsum mit über 40 g Ethanol pro Tag ausgeschlossen werden. 7 der 15 Patientinnen und Patienten konsumierten in letzter Zeit Tabakprodukte in Form von Zigaretten. Die Angaben über den zurückliegenden Zigarettenverbrauch reichten von 2 bis 21 *pack years*. Dem Passivrauchen waren 8 der 15 Patientinnen und Patienten ausgesetzt. Bei der beruflichen und privaten Exposition gegenüber Fremdstoffen wurden unter anderem der Kontakt gegenüber Holzstäube, Haarfärbemittel, Lacke, Farben und Asbest angegeben.

3.3 Ergebnisse zur Zellvitalität vor und nach Fremdstoffexposition

In dieser Studie erfolgte die Bestimmung der Vitalität der Versuchszellen jeweils vor und nach der einstündigen Fremdstoffexposition mit dem Trypanblau-Ausschlusstest, um eine mögliche zytotoxische Wirkung der Xenobiotika zu bestimmen.

Die Vitalitätswerte lagen für die frisch isolierten und rekultivierten Lymphozyten sowohl zu Beginn der Versuche als auch nach der einstündigen Fremdstoffinkubation bei >90% sowie für die nasalen Mukosazellen bei >80%. Somit kam es zu keiner Abnahme der Zellvitalität durch eine einstündige Inkubation mit Nikotin, Epibatidin oder Methylmethansulfonat (MMS) in den eingesetzten Konzentrationen. Ein zytotoxischer Effekt durch die verwendeten Xenobiotika konnte für diese Versuche ausgeschlossen werden.

3.4 Genotoxizität der getesteten Xenobiotika

Im Folgenden werden die Ergebnisse zur Genotoxizität von Nikotin und Epibatidin an humanen Lymphozyten und nasalen Mukosazellen dargestellt. Die Schädigung der DNA durch die eingesetzten Fremdstoffe wurde mit dem Comet Assay erfasst und unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand der Parameter *Olive Tail Moment* (OTM), *DNA in Tail* (DT) und *Tail Length* (TL) gemessen. Die graphische Darstellung und statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte an den OTM-Werten.

Eine tabellarische Zusammenfassung der gemessenen Werte für OTM, DT und TL mit Angabe der Mittelwerte, Medianwerte und Standardabweichungen findet sich im Anhang (siehe 5.4).

3.4.1 Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Formamidopyrimidin-Glykosylase

Die einstündige Inkubation mit Nikotin (10 μM , 100 μM und 1000 μM) ergab an frisch isolierten Lymphozyten im Friedman-Test einen signifikanten Anstieg der OTM-Medianwerte mit $p = 0,003$. Auch in der Koinkubation der eingesetzten Nikotinkonzentrationen mit der Formamidopyrimidin-Glykosylase (Fpg) zeigte sich im Friedman-Test eine signifikante Zunahme der OTM-Medianwerte mit $p = 0,003$. Im Wilcoxon-Test konnte ab einer Nikotinkonzentration von 100 μM ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Negativkontrolle mit $p = 0,009$ gezeigt werden. Durch Koinkubation mit Fpg ließ sich bereits ab 10 μM Nikotin ein signifikanter Anstieg des OTM-Medianwertes im Vergleich zur Negativkontrolle mit $p = 0,022$ darstellen.

Die Positivkontrollen, MMS und MMS mit Fpg, zeigten deutliche DNA-Schäden mit einem Anstieg des OTM-Medianwertes von 0,272 (Medium) auf 1,667 bzw. von 0,486 (Medium mit Fpg) auf 5,062. Im Wilcoxon-Test ergab sich jeweils ein signifikanter Unterschied mit $p = 0,005$.

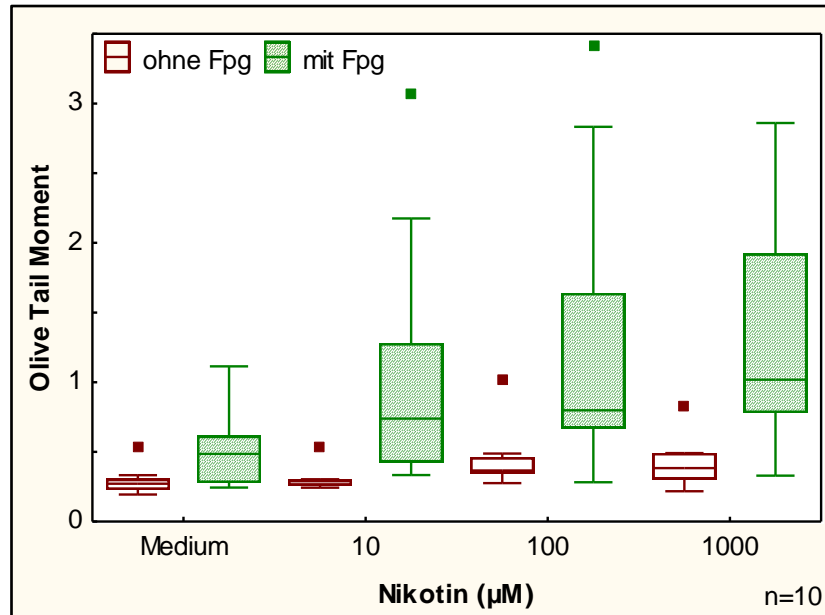


Abbildung 3.1: Konzentrationsabhängige DNA-Fragmentierung durch Nikotin (10 μM , 100 μM und 1000 μM) sowie Nikotin mit Fpg an frischen Lymphozyten in OTM.

n: Anzahl der Versuche. ■: Ausreißer.

Tabelle 3.1: Ergebnisse der Friedman-Tests mit Angabe der p-Werte, des α -Niveaus und der Signifikanz. Test I erfolgte an den OTM-Medianwerten der Negativkontrolle (Medium) und den Nikotinkonzentrationen (10 μ M, 100 μ M und 1000 μ M). Test II erfolgte an den OTM-Medianwerten der Negativkontrolle (Medium mit Fpg) und den Nikotinkonzentrationen (10 μ M, 100 μ M und 1000 μ M) jeweils mit Fpg. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des allgemeinen Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Friedman-Test	p-Wert	α -Niveau	Signifikanz
Test I	0,003	0,05	Ja
Test II	0,003	0,05	Ja

Tabelle 3.2: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentrationen sowie der Positivkontrolle (100 μ M MMS) gegen die Negativkontrolle (Medium) an den OTM-Medianwerten. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
10 μ M Nikotin vs. Medium	0,285	0,05	Nein
100 μ M Nikotin vs. Medium	0,009	0,017	Ja
1000 μ M Nikotin vs. Medium	0,013	0,025	Ja
100 μ M MMS vs. Medium	0,005	0,0125	Ja

Tabelle 3.3: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentrationen (Nik.) mit Fpg und der Positivkontrolle (100 μ M MMS mit Fpg) gegen die Negativkontrolle (Medium mit Fpg) an den OTM-Medianwerten. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
10 μ M Nik. mit Fpg vs. Medium mit Fpg	0,022	0,05	Ja
100 μ M Nik. mit Fpg vs. Medium mit Fpg	0,016	0,017	Ja
1000 μ M Nik. mit Fpg vs. Medium mit Fpg	0,005	0,025	Ja
100 μ M MMS mit Fpg vs. Medium mit Fpg	0,005	0,013	Ja

3.4.2 Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Aphidicolin

An rekultivierten Lymphozyten zeigte die einstündige Inkubation mit Nikotin (1 μM , 10 μM , 100 μM und 1000 μM) im Friedman-Test einen signifikanten Anstieg der OTM-Medianwerte mit $p = 0,01$. Durch Koinkubation mit Aphidicolin (APC) ergab der Friedman-Test ebenfalls eine signifikante Zunahme der OTM-Medianwerte mit $p = 0,003$. In den Wilcoxon-Tests konnte ab 1 μM Nikotin sowohl ohne APC als auch mit APC ein signifikanter DNA-Schaden im Vergleich zur Negativkontrolle nachgewiesen werden.

Die Positivkontrollen, MMS bzw. MMS mit APC, zeigten deutliche DNA-Schäden mit einem Anstieg des OTM-Medianwertes von 0,246 (Negativkontrolle) auf 1,052 bzw. mit APC von 0,298 auf 8,282 und waren im Wilcoxon-Test mit je $p = 0,001$ signifikant.

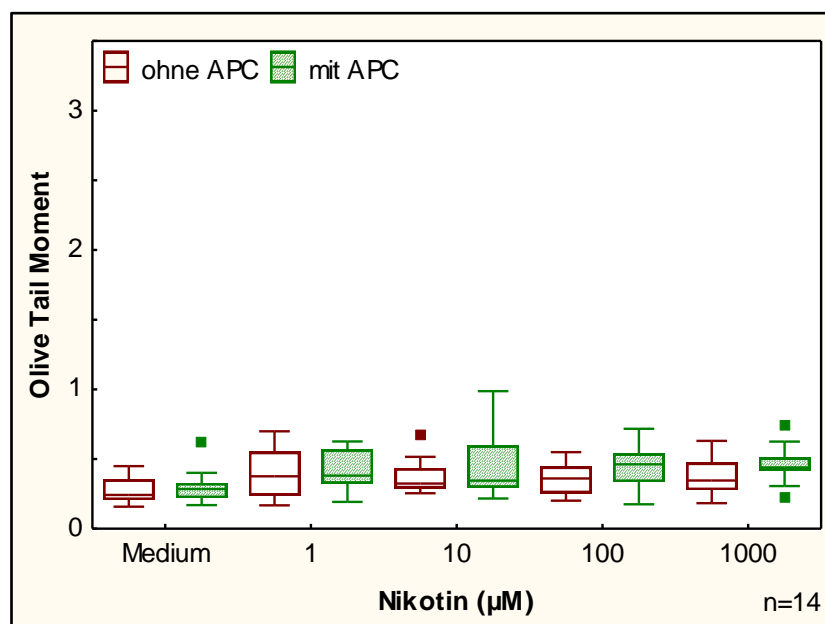


Abbildung 3.2: Konzentrationsabhängige DNA-Fragmentierung von Nikotin (1 μM , 10 μM , 100 μM und 1000 μM) und Nikotin mit APC an rekultivierten Lymphozyten in OTM.

n: Anzahl der Versuche. ■: Ausreißer.

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Friedman-Tests mit Angabe der p-Werte, des α -Niveaus und der Signifikanz. Test I erfolgte an den OTM-Medianwerten der Negativkontrolle (Medium) und der Nikotinkonzentrationen (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M und 1000 μ M). Test II erfolgte an den OTM-Medianwerten der Negativkontrolle (Medium mit APC) und den Nikotinkonzentrationen (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M und 1000 μ M) jeweils mit APC. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des allgemeinen Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Friedman-Test	p-Wert	α -Niveau	Signifikanz
Test I	0,01	0,05	Ja
Test II	0,003	0,05	Ja

Tabelle 3.5: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentrationen und der Positivkontrolle (100 μ M MMS) gegen die Negativkontrolle (Medium) an den OTM-Medianwerten. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
1 μ M Nikotin vs. Medium	0,004	0,017	Ja
10 μ M Nikotin vs. Medium	0,002	0,013	Ja
100 μ M Nikotin vs. Medium	0,012	0,050	Ja
1000 μ M Nikotin vs. Medium	0,011	0,025	Ja
100 μ M MMS vs. Medium	0,001	0,010	Ja

Tabelle 3.6: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentrationen (Nik.) mit APC und der Positivkontrolle (100 μ M MMS mit APC) gegen die Negativkontrolle (Medium mit APC) an den OTM-Medianwerten. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
1 μ M Nik. mit APC vs. Medium mit APC	0,004	0,017	Ja
10 μ M Nik. mit APC vs. Medium mit APC	0,011	0,05	Ja
100 μ M Nik. mit APC vs. Medium mit APC	0,003	0,025	Ja
1000 μ M Nik. mit APC vs. Medium mit APC	0,002	0,013	Ja
100 μ M MMS mit APC vs. Medium mit APC	0,001	0,0125	Ja

3.4.3 Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Epibatidin

3.4.3.1 Versuche an Lymphozyten

An frisch isolierten Lymphozyten ergab die einstündige Inkubation mit 1000 μM Nikotin eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentierung gegenüber der Negativkontrolle mit $p = 0,025$ im Wilcoxon-Test.

Die einstündige Inkubation mit Epibatidin (1 μM , 10 μM und 100 μM) zeigte einen signifikanten Anstieg des OTM-Medianwertes mit $p = 0,029$ im Friedman-Test. Im Wilcoxon-Test ergab sich nur für die beiden niedrigen Epibatidinkonzentrationen (1 μM und 10 μM) ein signifikanter DNA-Schaden im Vergleich zur Negativkontrolle.

Durch Koinkubation der Epibatidinkonzentrationen mit 1000 μM Nikotin konnte nur mit 10 μM Epibatidin der Nikotin induzierte DNA-Schaden signifikant gesenkt werden mit $p = 0,012$ im Wilcoxon-Test.

Die Positivkontrolle mit 100 μM MMS zeigte einen signifikanten Anstieg des OTM-Medianwertes von 0,332 (Negativkontrolle) auf 1,376 mit $p = 0,001$ im Wilcoxon-Test.

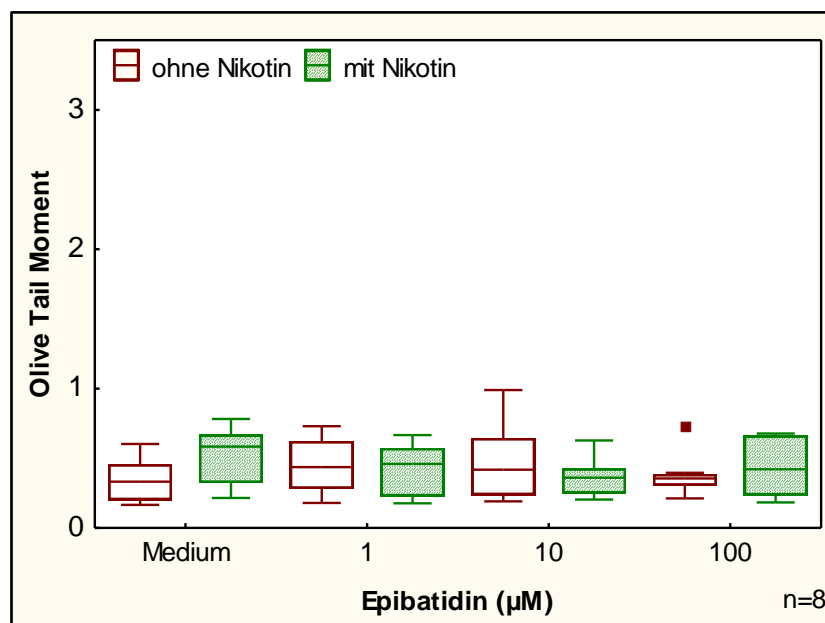


Abbildung 3.3: Konzentrationsabhängige DNA-Fragmentierung durch Epibatidin (1 μM , 10 μM und 100 μM) und Epibatidin mit Nikotin (1000 μM) an frischen Lymphozyten in OTM. n: Anzahl der Versuche. ■: Ausreißer.

Tabelle 3.7: Ergebnis des Friedman-Tests mit Angabe des p-Wertes, des α -Niveaus und der Signifikanz. Der Friedman-Test erfolgte an den OTM-Medianwerten der Negativkontrolle (Medium) und der Epibatidinkonzentrationen (1 μ M, 10 μ M und 100 μ M).

Friedman-Test	p-Wert	α -Niveau	Signifikanz
	0,029	0,05	Ja

Tabelle 3.8: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentration (1000 μ M) und der Positivkontrolle (100 μ M MMS) gegen die Negativkontrolle (Medium) an den OTM-Medianwerten. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
1000 μ M Nikotin vs. Medium	0,025	0,05	Ja
100 μ M MMS vs. Medium	0,001	0,025	Ja

Tabelle 3.9: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der Epibatidinkonzentrationen (1 μ M, 10 μ M und 100 μ M) gegen die Negativkontrolle (Medium) an den OTM-Medianwerten. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
1 μ M Epibatidin vs. Medium	0,017	0,025	Ja
10 μ M Epibatidin vs. Medium	0,012	0,017	Ja
100 μ M Epibatidin vs. Medium	0,401	0,05	Nein

Tabelle 3.10: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der Epibatidinkonzentrationen (1 μ M, 10 μ M und 100 μ M) mit Nikotin (1000 μ M) gegen Nikotin (1000 μ M) an den OTM-Medianwerten. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
1 μ M Epibatidin mit Nikotin vs. Nikotin	0,093	0,025	Nein
10 μ M Epibatidin mit Nikotin vs. Nikotin	0,012	0,017	Ja
100 μ M Epibatidin mit Nikotin vs. Nikotin	0,161	0,05	Nein

3.4.3.2 Versuche an nasalen Mukosazellen

An nasalen Mukosazellen führte die einstündige Inkubation mit 1000 μM Nikotin im Vergleich zur Negativkontrolle zu einem signifikanten Anstieg des DNA-Schadens mit $p = 0,008$ im Wilcoxon-Test.

Die einstündige Inkubation mit Epibatidin (1 μM , 10 μM , 100 μM) ergab eine signifikante Zunahme der OTM-Medianwerte mit $p = 0,001$ im Friedman-Test. Im Wilcoxon-Test konnte ab 1 μM Epibatidin ein signifikanter DNA-Schaden im Vergleich zur Negativkontrolle mit $p = 0,027$ nachgewiesen werden.

Durch Koinkubation der Epibatidinkonzentrationen mit 1000 μM Nikotin kam es zu keiner Abnahme des Nikotin induzierten DNA-Schadens.

Die Positivkontrolle MMS zeigte eine deutliche DNA-Schädigung mit einem Anstieg des OTM-Medianwertes von 0,447 (Negativkontrolle) auf 3,681 und war im Wilcoxon-Test mit $p = 0,001$ signifikant.

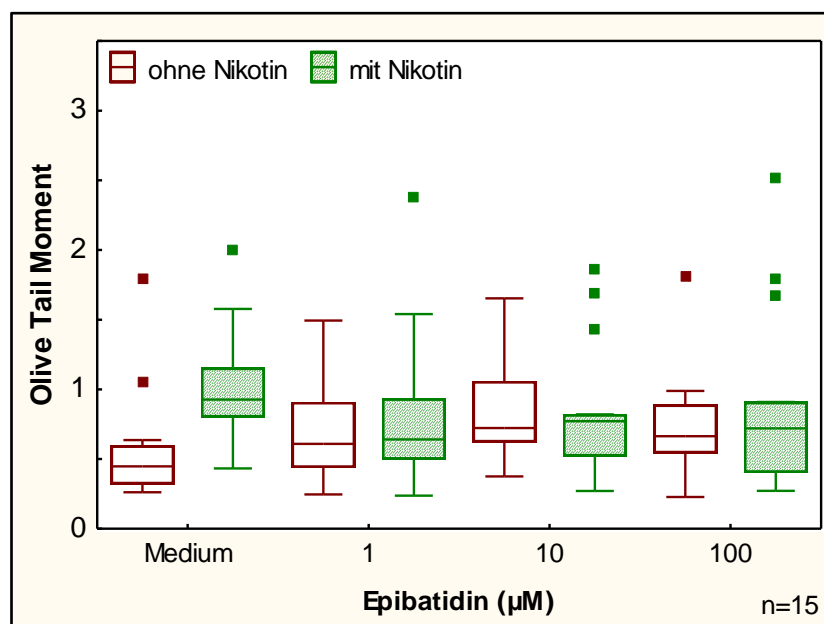


Abbildung 3.4: Konzentrationsabhängige DNA-Fragmentierung durch Epibatidin (1 μM , 10 μM , 100 μM) und Epibatidin mit Nikotin (1000 μM) an nasalen Mukosazellen in OTM.

n: Anzahl der Versuche. ■: Ausreißer.

Tabelle 3.11: Ergebnis des Friedman-Tests mit Angabe des p-Wertes, des α -Niveaus und der Signifikanz. Der Friedman-Test erfolgte an den OTM-Medianwerten von Negativkontrolle (Medium) und Epibatidin (1 μ M, 10 μ M und 100 μ M).

Friedman-Test	p-Wert	α -Niveau	Signifikanz
	0,001	0,05	Ja

Tabelle 3.12: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentration (1000 μ M) und der Positivkontrolle (100 μ M MMS) gegen die Negativkontrolle (Medium) an den OTM-Medianwerten. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveaus von $p \leq 0,05$.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
1000 μ M Nikotin vs. Medium	0,008	0,05	Ja
100 μ M MMS vs. Medium	0,001	0,025	Ja

Tabelle 3.13: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der Epibatidinkonzentrationen (1 μ M, 10 μ M und 100 μ M) gegen die Negativkontrolle (Medium) an den OTM-Medianwerten. Grau hervorgehoben sind die p-Werte unterhalb des nach Bonferroni-Holm korrigierten Signifikanzniveaus.

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
1 μ M Epibatidin vs. Medium	0,027	0,05	Ja
10 μ M Epibatidin vs. Medium	0,005	0,017	Ja
100 μ M Epibatidin vs. Medium	0,015	0,025	Ja

Tabelle 3.14: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche an den OTM-Medianwerten der Epibatidinkonzentrationen (1 μ M, 10 μ M und 100 μ M) mit Nikotin (1000 μ M) gegen Nikotin (1000 μ M).

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
1 μ M Epibatidin mit Nikotin vs. Nikotin	0,140	0,025	Nein
10 μ M Epibatidin mit Nikotin vs. Nikotin	0,112	0,017	Nein
100 μ M Epibatidin mit Nikotin vs. Nikotin	0,211	0,05	Nein

3.4.4 Ergebnisse zum Einfluss des Tabakkonsums

Um einen Einfluss des Tabakkonsums der Patienten auf die Ergebnisse bei nasalen Mukosazellen im Comet Assay zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der DNA-Fragmentierung bei einstündiger Inkubation mit Medium sowie mit Nikotin (1000 μM) nach Rauchern ($n = 7$) und Nichtrauchern ($n = 8$) getrennt ausgewertet und miteinander verglichen. Im Wilcoxon-Test konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen Raucher und Nichtraucher bezüglich der basalen DNA-Fragmentierung ($p = 0,237$) sowie bei der Inkubation mit Nikotin ($p = 0,499$) nachgewiesen werden.

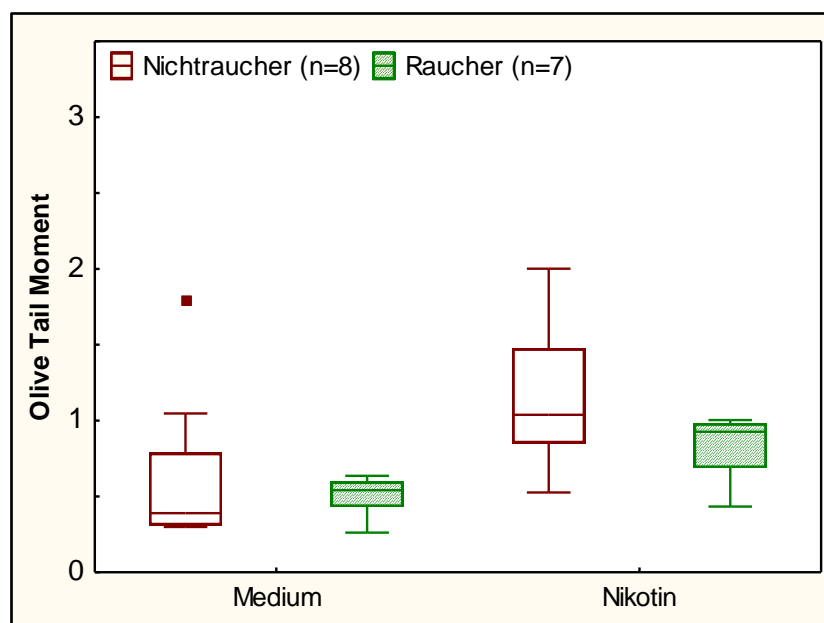


Abbildung 3.5: DNA-Fragmentierung nach Inkubation mit Medium und Nikotin (1000 μM) an nasalen Mukosazellen in OTM von Nichtrauchern ($n = 8$) und Rauchern ($n = 7$).
n: Anzahl der Versuche. ■: Ausreißer.

Tabelle 3.15: Ergebnisse der Wilcoxon-Tests mit Angabe der p-Werte, des lokalen α -Niveaus und der Signifikanz. Es erfolgten Paarvergleiche der OTM-Medianwerte bei Inkubation mit Medium sowie bei Inkubation mit Nikotin (1000 μM) von Nichtrauchern (NR.) gegen Raucher (R.).

Wilcoxon-Test	p-Wert	Lokales α -Niveau	Signifikanz
Medium von NR. vs. Medium von R.	0,237	0,025	Nein
Nikotin von NR. vs. Nikotin von R.	0,499	0,05	Nein

Schwerpunkte dieser Arbeit liegen in der Untersuchung und Modulation der genotoxischen Effekte von Nikotin sowie in der Untersuchung der rezeptorvermittelten Mechanismen von Nikotin induzierten DNA-Schäden an Lymphozyten und nasalen Mukosazellen. Der Einfluss des Tabakkonsums der Probenspender auf die Ergebnisse im Comet Assay an nasaler Mukosa wird ebenfalls diskutiert.

4.1 Diskussion der Methodik

4.1.1 Einsatz von humanen Lymphozyten und nasalen Mukosazellen

Humane Lymphozyten sind anerkannte Testzellen für molekularbiologische und toxikologische Untersuchungen, um das zytotoxische und genotoxische Potential von Xenobiotika an humanem Gewebe zu messen [Spitz et al., 2003]. Sie lassen sich leicht durch Dichtegradientenzentrifugation aus einer venösen Blutprobe gewinnen und zeichnen sich durch eine hohe Vitalität aus. Aufgrund dieser Vorteile wird diese Zellart häufig für *in vitro* Studien zur Untersuchung der Genotoxizität von Xenobiotika eingesetzt [Kleinsasser et al., 2004b].

In dieser Arbeit erfolgte die Untersuchung der DNA-schädigenden Wirkung von Nikotin sowohl an frisch isolierten als auch an rekultivierten Lymphozyten. Um genotoxische Effekte von Nikotin an rekultivierten Zellen beurteilen zu können, wurden frisch isolierte Lymphozyten für maximal 14 Tage bei -80°C in Tieffriermedium kryokonserviert und anschließend zur Fremdstoffinkubation aufgetaut. Nach Schmezer und Kollegen soll eine Kryokonservierung der Lymphozyten von maximal 12 Monaten die Sensitivität der Lymphozyten nicht beeinträchtigen [Schmezer et al., 2001].

Da Lymphozyten erst nach Aufnahme durch andere Gewebe und entsprechender Metabolisierung mit Umweltschadstoffen in Kontakt kommen, dürfen die hier gemessenen Effekte nicht mit denen an primären Kontaktorganen, wie etwa an Epithelien, gleichgesetzt werden. In einer früheren Studie unterschieden sich die genotoxischen Effekte an Lymphozyten im Vergleich zu den Ergebnissen an Mukosazellen des oberen Aerodigestivtraktes von gleichen Spendern [Kleinsasser et al., 2000].

Um die Effekte von Nikotin am primären Kontaktorgan des oberen Aerodigestivtraktes beurteilen zu können, erfolgten in dieser Arbeit die Untersuchungen zur Genotoxizität von Nikotin an humaner nasaler Mukosa. Aufgrund ihrer morphologischen und funktionellen Ähnlichkeit mit dem Flimmerepithel der Bronchien sollen die Ergebnisse an nasaler Mukosa stellvertretend für das respiratorische Epithel des oberen und unteren Atemtraktes stehen. Das für diese Arbeit verwendete Gewebe stammte von der mittleren und unteren Nasenmuschel, die für die Untersuchung toxischer Effekte von inhalierten Stoffen auf Grund des Ablagerungsmusters in der Nasenhöhle als besonders geeignet gilt [Merkle et al., 1998].

Um Einzelzellen aus nasalem Gewebe zu gewinnen, erfolgte eine enzymatische Verdauung über 24 Stunden und anschließend ein mechanisches Ablösen der Mukosazellen vom restlichen Gewebe. Es ist zu beachten, dass das enzymatische Trennen von Epithelzellen aus ihrem physiologischen Gewebeverband zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber schädigenden Substanzen im Comet Assay führen kann und somit das direkte Übertragen der Ergebnisse auf die *in vivo* Situation beeinträchtigt ist [Kleinsasser et al., 2004a]. Auch weisen isolierte Einzelzellen einen teilweise veränderten Fremdstoffmetabolismus auf [Teissier et al., 1998] und sie unterscheiden sich teilweise erheblich in der Funktion von Schlüsselenzymen intrazellulärer Signalwege im Vergleich zu Zellen im physiologischen Gewebeverband [Benimetskaya et al., 2006].

4.1.2 Nachweis von DNA-Schäden mit dem alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assay

1999 gab eine Expertengemeinschaft auf dem *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures* (IWGTP) in Washington Leitlinien zur Durchführung von Genotoxizitätstests heraus und einigte sich darauf, dass genotoxische Effekte durch Xenobiotika mit dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assay am besten mit der von Singh etablierten alkalischen Version, dem sogenannten Comet Assay, dargestellt werden können [Singh et al., 1988].

Der Comet Assay ist ein sensitives und häufig verwendetes Testverfahren zur Detektion von DNA-Schäden an exponierten Einzelzellen und lässt sich an proliferierenden sowie nicht proliferierenden Zellpopulationen durchführen. Unter den alkalischen Be-

dingungen ($\text{pH} > 13$) kommt es zur Entspiralisierung und Auftrennung der DNA-Doppelhelix in die beiden Einzelstränge. Somit lassen sich mit dem Comet Assay Einzelstrangbrüche der DNA, alkalilabile Stellen, *Crosslinks* der DNA mit DNA oder Proteinen sowie Einzel- und Doppelstrangbrüche aufgrund unvollständiger Exzisionsreparatur erfassen. Hierbei soll die Vitalität der Zellen über 80% liegen, um den Einfluss avitaler Zellen mit hoher DNA-Fragmentierung auf die Ergebnisse zu minimieren. Weitere Vorteile des Comet Assays sind seine hohe Flexibilität, geringen Kosten und einfache Anwendung sowie die geringe Anzahl benötigter Zellen, um DNA-Schäden nachzuweisen [Tice et al., 2000].

Aufgrund dieser Vorteile kommt der Comet Assay in Studien zur Ökogenotoxikologie u. a. [Kleinsasser et al., 2006] und im klinischen Biomonitoring zum Einsatz z. B. [Undeger et Basaran, 2002]. Auch in Fragestellungen zur genotoxischen Wirkung verschiedener Chemotherapeutika nimmt der Comet Assay einen zunehmenden Stellenwert ein [McKenna et al., 2008]. Bei Cisplatin, einem häufig eingesetzten Chemotherapeutikum, konnten *Crosslinks* von DNA mit DNA im Comet Assay nachgewiesen werden [Pfuhrer et Wolf, 1996]. Die Besonderheit im Nachweis von *Crosslinks* im Comet Assay beruht auf einer Reduktion der DNA-Migration, da es zu einer Aggregation der DNA kommt [Merk et Speit, 1999]. Die Anthracycline Idarubicin und Mitoxantrone sowie weitere Chemotherapeutika wie Doxetaxel, Paclitaxel und Gemcitabin riefen einen messbaren DNA-Schaden im Comet Assay hervor [Blasiak et al., 2002; Ollikainen et al., 2000].

Die Auswertung der mit Ethidiumbromid angefärbten Zellkerne erfolgt unter einem Fluoreszenzmikroskop. In den Anfängen dieser Methode wurde die DNA-Fragmentierung subjektiv durch einen Vergleich der Länge des „Kometenschweifs“ mit definierten Skalen ausgewertet [Singh et al., 1988]. Heute können die verschiedenen Parameter der einzelnen Zellkerne mit Hilfe von speziellen Computerprogrammen auf einmal gemessen werden. In dieser Arbeit wurden die Werte für die DNA-Fragmentierung mit Hilfe der Software Comet 5.5 bestimmt (siehe **Abbildung 4.1**). Parameter für die DNA-Fragmentierung sind die Schweiflänge (*Tail Length*, TL), der Gehalt an Einzelstrangbrüchen der DNA im Schweif (*DNA in Tail*, DT) sowie im verbliebenen Kern (*DNA in Head*) als auch das sogenannte *Olive Tail Moment* (OTM).

Der OTM-Wert wurde von Olive und Banath im Jahr 1993 eingeführt und setzt sich aus der Schweiflänge und dem DNA-Gehalt im Schweif zusammen [Olive et Banath, 1993]. Bei der Interpretation der Ergebnisse des Comet Assays sind folgende Aspekte zu beachten: Gemessene Werte für die DNA-Schädigung in OTM, DT und TL können nicht ohne weiteres zwischen verschiedenen Studiengruppen verglichen werden, da die Ergebnisse sowohl von den Einstellungen am Fluoreszenzmikroskop als auch von der verwendeten Auswertungssoftware abhängig sind. Nachteilig auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse von verschiedenen Labors wirken sich auch methodische Unterschiede aus, beispielsweise in der Dauer der alkalischen Entwindung der DNA sowie in der Dauer und Spannung der Elektrophorese [Faust et al., 2004].

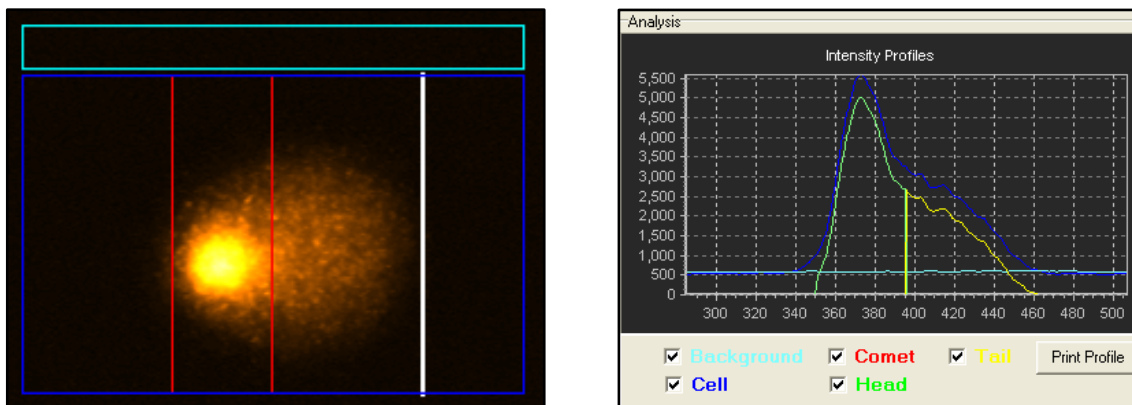


Abbildung 4.1: Messung der DNA-Fragmentierung mit der Software Comet 5.5: Auf der linken Seite wird das Messfeld eines Zellkerns mit starker DNA-Fragmentierung dargestellt. Auf der rechten Seite findet sich das entsprechende Profil der Leuchtintensität, welches der Verteilung der elektrophoretisch aufgetrennten DNA des Zellkerns entspricht.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 DNA-Schädigung durch Nikotin

In dieser Arbeit ergab sich für eine einstündige Inkubation mit Nikotin an frisch isolierten Lymphozyten ab 100 μM Nikotin und an rekultivierten Lymphozyten ab

1 μM eine signifikante Schädigung der DNA. Die Vitalität der Lymphozyten lag vor und nach Nikotininkubation über 90%.

An verschiedenen Zellarten wurde Nikotin in unterschiedlichen Konzentrationen auf eine genotoxische Wirkung untersucht und es konnte in mehreren Studien ein dosisabhängiger DNA-Schaden festgestellt werden: In Untersuchungen an Lymphozyten sowie an Einzelzellen des lymphatischen Gewebes der Tonsilla palatina konnten für beide Zellarten signifikante DNA-Schäden ab 500 μM Nikotin ermittelt werden [Kleinsasser et al., 2005].

An menschlichen Mundschleimhautzellen wurde im Mikronukleustest ebenfalls ab 1 μM Nikotin eine signifikante DNA-Schädigung gemessen [Argentin et Cicchetti, 2004]. Arabi konnte an menschlichen Spermatozoen ab einer Nikotinkonzentration von 750 μM einen signifikanten Anstieg von DNA-Strangbrüchen im Comet Assay nachweisen [Arabi, 2004]. An menschlichen Speicheldrüsenzellen konnte ab 250 μM Nikotin eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentierung im Comet Assay gemessen werden [Ginzkey et al., 2009].

An Miniorgankulturen von nasaler Schleimhaut, einem Zellmodell, welches der physiologischen Situation sehr nahe kommt, wurden ebenfalls Nikotin induzierte DNA-Schäden aufgezeichnet [Sassen et al., 2005a]. An Ovarialzellen des chinesischen Hamsters konnten Trivedi und Mitarbeiter einen vermehrten Austausch von Schwesterchromatiden sowie chromosomale Aberrationen nach Nikotinexposition nachweisen [Trivedi et al., 1990].

Um die Ergebnisse aus *in vitro* Versuchen mit der physiologischen Situation am Menschen vergleichen zu können, ist es wichtig den Nikotingehalt nach Inhalation oder Ingestion von Tabakprodukten zu bestimmen: Die im Blut von starken Rauchern gemessenen Nikotinkonzentrationen lagen tagsüber zwischen 10 und 50 ng/ml [Hukkanen et al., 2005]. Da eine Nikotinkonzentration von 50 ng/ml umgerechnet 0,6 μM entspricht, liegt die maximal gemessene Nikotinkonzentration im Blut starker Raucher nur gering niedriger als die an rekultivierten Lymphozyten gemessene DNA schädigende Konzentration von 1 μM Nikotin nach nur einer einstündigen Fremdstoffinkubation. Die Nikotinkonzentrationen im Speichel von Rauchern liegen um mehr als das Hundertfache höher als im Blut [Teneggi et al., 2002].

Auch nach transdermaler Applikation von Nikotin (Nicorette 15mg) fanden sich im Speichel über 10fach höhere Werte, im Magensaft sogar über 60fach höhere Werte als im Blut der Probanden [Lindell et al., 1996].

Die Reparaturfähigkeit von induzierten Einzelstrangbrüchen sowie das Auftreten von Mutationen in nicht kodierenden Genabschnitten können Gründe dafür sein, dass es bei Rauchern trotz jahrelangem hohen Tabakkonsum nur zu einer relativ mäßig erhöhten Rate an Krebserkrankungen kommt. In dieser Studie wurde die Reparatur induzierter DNA-Schäden durch direktes Abkühlen der Zellsuspension mit gestoßenem Eis nach Fremdstoffinkubation verhindert, um das gesamte Schädigungsausmaß einer ein-stündigen Fremdstoffinkubation zu bestimmen.

4.2.1.1 Nachweis von oxidativem Stress durch die Formamidopyrimidin-Glykosylase

Der zellschädigende Einfluss von chemischen Stoffen, ionisierenden Strahlen aber auch durch Hypoxie oder Ischämie des Gewebes kann über freie Radikale ausgeübt werden. Hierbei handelt es sich um Atome oder Moleküle mit einem ungepaarten Elektron in ihrer äußeren Schale. Aus Wasser oder Sauerstoff entstandene Radikale werden als reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) bezeichnet. Hierzu zählen das Hyperoxid (O_2^-), das Wasserstoffperoxid (H_2O_2) sowie das Hydroxylradikal ($\bullet OH$) [Oberholzer, 2001].

Diese gelten als Mediatoren für den oxidativen Stress und rufen bei fehlender Elimination Zyto- und Genotoxizität hervor, indem sie unter anderem mitochondriale Enzyme hemmen, Apoptose und zelluläre Hypertrophie hervorrufen sowie eine mutagene Wirkung auf die DNA ausüben können. Bei einer Interaktion von ROS mit Membranlipiden, der sogenannten Lipidperoxidation, entstehen organische Sauerstoffverbindungen wie etwa Hydroxylperoxide und Carbonylverbindungen, die ebenfalls zu Modifikationen der zellulären DNA führen [O'Rourke et al., 2003]. ROS werden aber auch vom Immunsystem und durch endogenen Sauerstoffmetabolismus gebildet, um in den Organismus eingedrungene Bakterien zu zerstören und weitere Zellen der Immunabwehr anzulocken [Bogeski et al., 2010].

Durch Reaktion von O_2^- mit dem gefäßdilatierendem Stickoxid (NO) entsteht ein weiterer starker Oxidant und nitrosierendes Agens, das Peroxynitrit (ONOO⁻) [Modlinger et al., 2004].

Oxidative DNA-Schäden umfassen Einzel- und Doppelstrangbrüche, abasische Stellen sowie eine oxidative Schädigung der Basen. Eine der bekanntesten Basenschädigungen ist die oxidierte Form der Base Guanin als sogenanntes 8-oxo-Guanin (siehe **Abbildung 4.2**). Während der Replikation kann das mutagene 8-oxo-Guanin fälschlicher Weise mit Adenin anstatt mit Cytosin in Verbindung treten und somit eine Transversion von G:C zu T:A verursachen [Cheng et al., 1992]. Liegt diese Punktmutation in einem für ein Protein kodierenden Bereich, kann ein Protein mit veränderter oder aufgehobener Funktion synthetisiert werden.

Eine weitere oxidative Basenschädigung ist das vermutlich nicht mutagene 2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin (Fapy), welches eine hemmende Wirkung auf die DNA-Synthese ausübt [Malins et al., 2002].

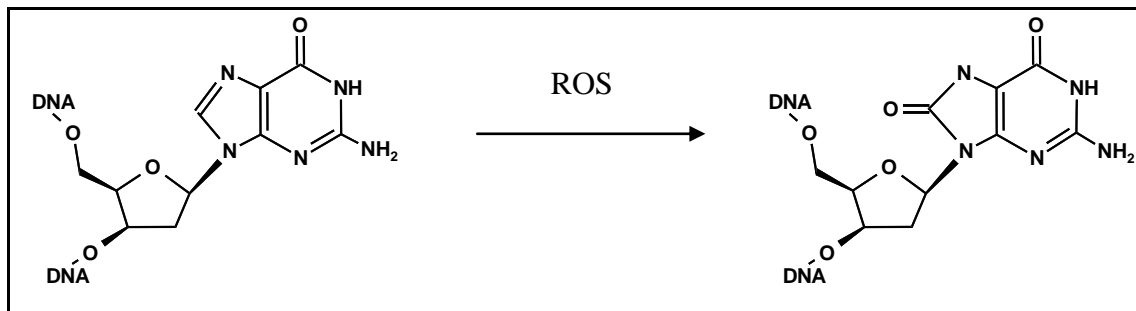


Abbildung 4.2 Modifikation der Base Guanin durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) zu 8-oxo-Guanin.

Geschädigte Basen werden größtenteils durch Enzyme der Basenexzisionsreparatur (BER) entfernt. Dabei entsteht zuerst eine abasische Stelle, indem eine DNA-Glykosylase die glykosidische Bindung zwischen der spezifischen Base und dem Desoxyribosephosphat-Gerüst spaltet. Viele DNA-Glykosylasen besitzen zusätzlich eine sogenannte AP-Lyase-Aktivität, mit der sie die Desoxyribose an der abasischen Stelle aus dem DNA-Strang herausschneiden können. Auch die in dieser Arbeit verwendete Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg) katalysiert beide enzymatische Reaktionen, indem es substratspezifisch die geschädigten Basen 8-oxo-

Guanin und Fapy abspaltet und mit ihrer AP-Lyase-Aktivität einen DNA-Einzelstrangbruch verursacht [Bhagwat et Gerlt, 1996].

Während der BER werden durch weitere Enzyme das ursprüngliche Nukleotid, bestehend aus entsprechender Base und Ribosephosphatrest, nach Vergleich mit dem komplementären Gegenstrang wieder eingesetzt und eine irreversible DNA-Schädigung verhindert [Bjelland et Seeberg, 2003].

In dieser Arbeit konnten mit Fpg oxidativ geschädigte Basen an frisch isolierten Lymphozyten mit Nikotin ab 10 μM in der einstündigen Inkubation nachgewiesen werden. Somit konnte der Nachweis Nikotin induzierter DNA-Schäden durch die Verwendung von Fpg an frisch isolierten Lymphozyten sensitiviert werden, da bei alleiniger Inkubation mit Nikotin erst ab 100 μM eine signifikante DNA-Schädigung nachgewiesen werden konnte (siehe **4.2.1**). Interessanterweise kam es auch in der Positivkontrolle mit dem alkylierenden Agens MMS zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Fragmentation durch Fpg. Die Arbeitsgruppe um Speit stellte ebenfalls fest, dass Fpg neben oxidativ geschädigten Basen auch alkylierende DNA-Schäden detektiert [Speit et al., 2004a].

Eine oxidative DNA-Schädigung durch Nikotin konnte auch an verschiedenen zellulären Systemen nachgewiesen werden: In Versuchen an einer Zelllinie von humanen Krebszellen aus der Mundhöhle wurde in der Durchflusszytometrie ab 10 μM Nikotin ein signifikanter Anstieg von 8-oxo-Guanin festgestellt [Wu et al., 2005]. Wu konnte an dieser Zelllinie durch den Einsatz von Fpg im Comet Assay eine signifikante Zunahme der DNA-Fragmentation ab 10 μM Nikotin messen. Auch an mukosalen Zellen des Colons ließen sich durch Nikotin induzierte oxidative DNA-Schäden nachweisen [Crowley-Weber et al., 2003].

Ein weiterer Beweis für die Generierung von mutagenen Sauerstoffradikalen durch Nikotin liefern Versuche, in denen durch Koinkubation mit dem bekannten Antioxidans N-Acetylcystein (NAC) aber auch mit Substanzen wie etwa Ferulasäure, Ellagsäure, Quercetin, Curcumin oder Eugenol Nikotin induzierte DNA-Schäden vermindert werden konnten [Bandyopadhyaya et al., 2008; Kar Mahapatra et al., 2009; Muthukumar et al., 2008; Sudheer et al., 2008].

Sudheer und Mitarbeiter stellten an kultivierten peripheren Lymphozyten der Ratte bei einer einstündigen Inkubation mit Nikotin ab 1 mM einen dosisabhängigen, oxidativen

DNA-Schaden anhand folgender zwei Parameter fest: Es kam sowohl zu einem Anstieg von Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen als Zeichen einer gesteigerten Lipidperoxidation als auch zu einem Abfall des wichtigen endogenen Radikalfängers Glutathion als Zeichen für eine Eliminierung generierter ROS. Anschließend konnte mit NAC ab 1 mM und Ferulasäure ab 150 μ M der DNA-Schaden im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Nikotin gesenkt werden [Sudheer et al., 2007].

Dass sich auch ein intensiver Kontakt mit nikotinhaltigen Tabakblättern nachteilig auf die körpereigenen Schutzsysteme gegen ROS auswirkt, konnte in einer epidemiologischen Studie an indischen Arbeitern der Tabak verarbeitenden Industrie gezeigt werden: Eine jahrelange Exposition gegenüber feinen Tabakstäuben führte im Blut der Arbeiter zu einem Anstieg von Serum-Lipid-Peroxid und NO als endogene oxidative Marker sowie zu einer Abnahme von Vitamin C und der erythrozytären Superoxidpermutase als endogene Antioxidantien im Vergleich zur nicht exponierten Kontrollgruppe [Swami et al., 2006].

4.2.1.2 Inhibition der DNA-Reparatur mit Aphidicolin

Beschädigte Basen der DNA und Einzelstrangbrüche können erfolgreich durch zelluläre Enzyme der Basenexzisionsreparatur (BER) sowie der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) erkannt und korrigiert werden [Montenarh, 2007].

In dieser Arbeit wurde Aphidicolin (APC) als Reparaturinhibitor verwendet, welches von verschiedenen Pilzarten unter anderem von *Nigrospora sphaerica* synthetisiert wird (siehe **Abbildung 4.3**). APC hemmt reversibel die DNA-Polymerasen α und δ [Park et al., 1991]. Durch Inhibition der DNA-Polymerase α , die am Ende der BER für den Einbau des entsprechenden Nukleotids anhand der Vorlage des unbeschädigten Komplementärstranges verantwortlich

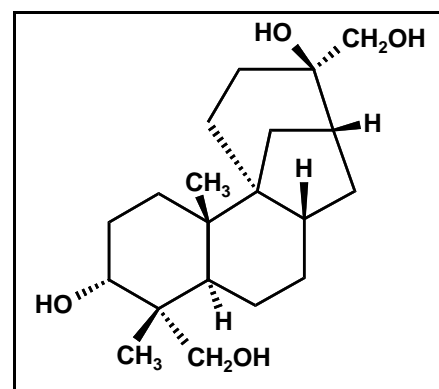


Abbildung 4.3: Strukturformel von APC

ist, bleibt die DNA-Reparatur aus und der Einzelstrangbruch der DNA persistiert. Die DNA-Polymerase δ sorgt für das Korrekturlesen der eingesetzten Nukleotide während der NER. Bei der NER können im Unterschied zur BER die fehlerhafte Base zusammen

mit der Desoxyribose entfernt sowie längere Abschnitte aus der DNA exzidiert werden [Horn, 2002].

In dieser Arbeit ergab eine Koinkubation von Nikotin mit APC an rekultivierten Lymphozyten eine signifikante DNA-Schädigung ab 1 μM Nikotin, der im Vergleich zur alleinigen Nikotininkubation stärker ausfiel. Die Nachweisgrenze für Nikotin induzierte DNA-Schäden konnte durch den Einsatz von APC an rekultivierten Lymphozyten nicht weiter gesenkt werden, da sich bereits bei alleiniger Nikotininkubation ab 1 μM ein signifikanter Anstieg der DNA-Fragmentierung nachweisen ließ.

In verschiedenen Versuchen konnten mit APC genotoxische Effekte durch mutagene Strahlen und Kanzerogene aufgezeigt werden [Speit et al., 2004b; Zheng et al., 2005]. Da DNA-Polymerasen auch an der Replikation der DNA während der Mitose beteiligt sind, kann durch Inhibitoren wie APC der Zellzyklus in der frühen Synthese-Phase gestoppt werden. Diese Technik wird in Zellkulturen genutzt, um alle Zellen in das gleiche Zellzyklusstadium zu bringen [Pedrali-Noy et al., 1980].

Allgemein gibt es zwei Möglichkeiten die Reparaturkapazität von DNA-Schäden mit dem Comet Assay zu messen: Zum einen kann die Reparaturkapazität als eine Abnahme induzierter DNA-Schäden über eine bestimmte Dauer gemessen werden und zum anderen können Inhibitoren der DNA-Reparatur eingesetzt werden [Speit et Hartmann, 1995].

4.2.1.3 Modulation Nikotin induzierter DNA-Schäden mit Epibatidin

Nikotin bindet als starker Agonist am nikotinergen Azetylcholinrezeptor (nAChR), einem pentameren Liganden gekoppelten Ionenkanal, der entweder aus einer heterologen Kombination der beiden Typen von Untereinheiten (alpha und beta) oder aus 5 homologen alpha-Untereinheiten besteht (siehe **Abbildung 4.4**). Beim Menschen sind bereits 9 verschiedene alpha-Untereinheiten ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) und 3 verschiedene beta-Untereinheiten ($\beta 2$ - $\beta 4$) des nAChRs charakterisiert worden [Gotti et Clementi, 2004].

Als Epibatidin-sensitive Rezeptoren werden alle Rezeptoren bezeichnet, welche die Untereinheiten $\alpha 7$, $\beta 2$ oder $\beta 4$ enthalten. Dabei bindet Epibatidin an den heteromeren $\alpha 4\beta 2$ Rezeptor mit einer hohen Affinität und etwa 20fach stärker als Nikotin sowie an den homomeren $\alpha 7$ Rezeptor mit einer niedrigen Affinität aber etwa 150fach stärker als Nikotin [Marks et al., 2010].

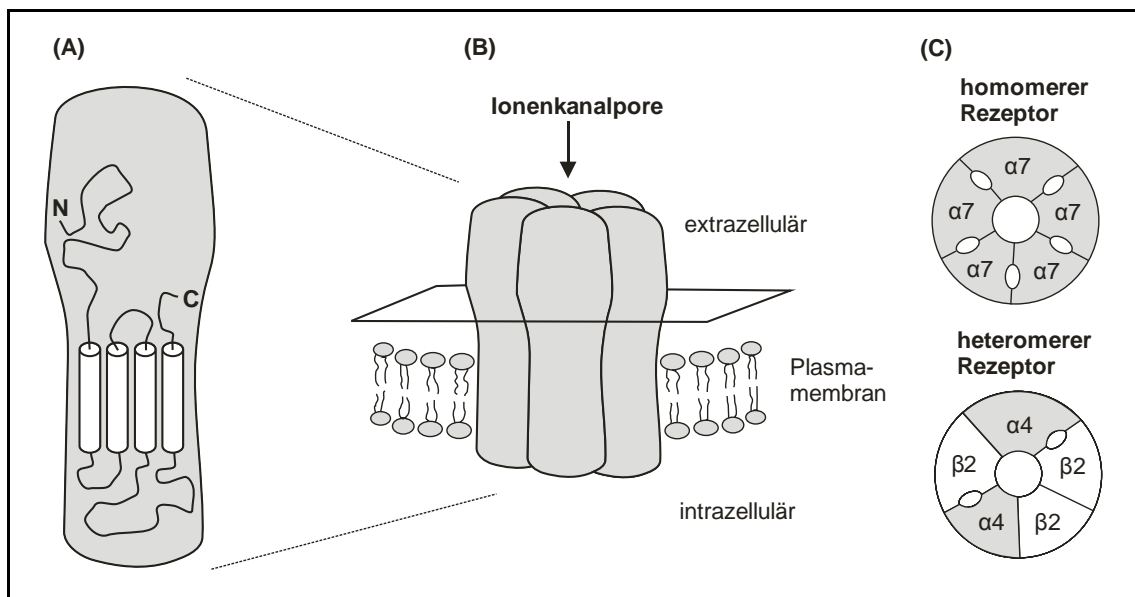


Abbildung 4.4: Aufbau des nAChR (B) aus 5 Untereinheiten, die jeweils viermal die Zellmembran durchspannen (A). Querschnitte (C) eines homomeren $\alpha 7$ nAChR aus 5 $\alpha 7$ -Untereinheiten sowie eines heteromeren $\alpha 4\beta 2$ nAChR bestehend aus 2 $\alpha 4$ -Untereinheiten und 3 $\beta 2$ -Untereinheiten nach [Gotti et Clementi, 2004].

Durch den Neurotransmitter Acetylcholin erfolgt am nAChR die Signalübertragung im zentralen und peripheren Nervensystem sowie an der motorischen Endplatte zur Übertragung der Nervenimpulse auf die Muskulatur. Neben Nerven- und Muskelzellen exprimieren auch andere Zellarten von Vertebraten den nAChR. Innerhalb des Nervensystems werden von Endothelzellen, Astrozyten und Progenitorzellen verschiedene Subtypen des nAChR gebildet. Außerhalb des Nervensystems konnten bereits an Lymphozyten, Makrophagen, bronchialen Epithelzellen, Endothelzellen, Urothelzellen, an verhornter und unverhornter Epidermis sowie an mehreren Tumorzelllinien des kleinzelligen Bronchialkarzinoms und des Mesothelioms die Synthese verschiedener Untereinheiten des nAChR nachgewiesen werden [Egleton et al., 2008].

Durch Verdrängung von radioaktiv markiertem [^3H]-Nikotin mit den Substanzen Nikotin, Epibatidin und α -Bungarotoxin von der Zelloberfläche konnten an humanen Lymphozyten die Expression des nAChR gezeigt werden [Wongsriraksa et al., 2009]. Wongsriraksa und Mitarbeiter stellten eine interindividuell unterschiedliche Expression an mRNA der Untereinheiten $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 1$ und $\beta 2$ fest und wiesen im Immunoblot eine ebenfalls individuell verschiedene Expression der Proteine für $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und $\beta 1$

nach. Die Autoren gehen davon aus, dass humane Lymphozyten die nAChR $\alpha 4\beta 2$, $\alpha 4\beta 2\alpha 5$ und teils auch den homomeren $\alpha 7$ -Rezeptor exprimieren.

In nasaler Mukosa konnte mit der Reversen Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) die mRNA der Untereinheiten $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$ und $\beta 4$ mit einer interindividuell variierenden Expression nachgewiesen werden [Keiger et al., 2003]. Somit sind rezeptorvermittelte Effekte über den nAChR an Lymphozyten sowie an nasalen Mukosazellen möglich.

In dieser Arbeit wurden Lymphozyten und nasale Mukosazellen des gleichen Spenders für eine Stunde mit zwei starken Agonisten am nAChR, Nikotin (1000 μM) und Epibatidin (1 μM , 10 μM und 100 μM) inkubiert, um die Nikotin induzierten DNA-Schäden am nAChR zu untersuchen. Nikotin wurde für diese Versuche in der Konzentration von 1000 μM eingesetzt, da sich in eigenen Versuchen sowie nach Sichtung früherer Publikationen DNA-Schäden durch Nikotin an beiden Zellarten bei deutlich niedrigeren Konzentrationen nach einer einstündigen Inkubation zeigten. In eigenen Versuchen konnte für frisch isolierte Lymphozyten in der einstündigen Inkubation mit Nikotin ab 10 μM ein Anstieg der DNA-Fragmentierung nachgewiesen werden (siehe **3.4.1**). An humaner Nasenschleimhaut ergab sich ein signifikanter DNA-Schaden ab einer Nikotinkonzentration von 250 μM [Kleinsasser et al., 2006].

Durch Koinkubation konnte nur an Lymphozyten mit 10 μM Epibatidin die Nikotin induzierte DNA-Schädigung gesenkt werden. An nasalen Mukosazellen kam es durch die Koinkubation zu keiner Reduktion des DNA-Schadens. Stattdessen führte Epibatidin selbst in den beiden niedrigen Konzentrationen (1 μM und 10 μM) zu einer DNA-Schädigung an Lymphozyten. An nasalen Mukosazellen konnte für alle eingesetzten Konzentrationen von Epibatidin (1 μM , 10 μM und 100 μM) ein signifikanter DNA-Schaden gemessen werden.

Für den rezeptorvermittelten Mechanismus der genschädigenden Wirkung von Nikotin sprechen die Ergebnisse, dass es auch durch Epibatidin, einen ebenfalls starken Agonisten am nAChR, zu einer Zunahme der DNA-Fragmentation im Comet Assay gekommen war.

Da aber auch der Nikotin induzierte DNA-Schaden durch Koinkubation mit Epibatidin zum Teil gesenkt werden konnte, kann an seiner im Vergleich zu Nikotin 150fach höheren Bindungsstärke zum homomeren $\alpha 7$ -Rezeptor liegen. Durch kompetitive

Verdrängung verhindert Epibatidin, dass sich Nikotin an diesen Rezeptor bindet. Somit kann die durch Nikotin ausgelöste intrazelluläre Signalkaskade zum Teil unterbunden werden. Vor allem über den $\alpha 7$ -Rezeptor sollen die proliferativen Effekte von Nikotin in Tumorzellen vermittelt werden [Egleton et al., 2008].

4.2.2 Einfluss des Tabakkonsums auf die Ergebnisse des alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese Assays

Der Einfluss des Tabakkonsums, insbesondere des Zigarettenrauchens, auf die basale DNA-Fragmentierung im Comet Assay an Lymphozyten von Rauchern wurde bereits in mehreren Studien untersucht. Die Ergebnisse sind zum Teil widersprüchlich. Eine Metaanalyse über 38 Studien konnte einen signifikanten Anstieg des basalen DNA-Schadens an Lymphozyten von Rauchern im Vergleich zu Nichtrauchern feststellen. Dieser signifikante Unterschied relativiert sich, wenn die Studien nach der verwendeten Methode zur Messung der DNA-Schädigung getrennt ausgewertet werden: In 23 der 38 Studien konnte bei Verwendung einer Analysesoftware kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. In den restlichen 15 Studien, welche die DNA-Schädigung an Hand subjektiver Skalen einschätzten, ergaben sich signifikant erhöhte Werte für eine DNA-Schädigung an Lymphozyten von Rauchern. [Hoffmann et al., 2005]. Die gleiche Arbeitsgruppe konnte in eigenen Versuchen, selbst bei starken Rauchern mit einem Konsum von mehr als 20 Zigaretten am Tag, keine erhöhte basale DNA-Schädigung der Lymphozyten im Vergleich zu Nichtrauchern feststellen [Hoffmann et Speit, 2005; Speit et al., 2003]. Nach Lu und Morimoto korreliert an Lymphozyten von japanischen Rauchern der basale DNA-Schaden mit der Anzahl an *pack years* sowie mit der täglich aufgenommenen Menge an Nikotin oder Teer [Lu et Morimoto, 2008].

In dieser Arbeit erfolgte an den eingesetzten nasalen Mukosazellen die Untersuchung zum Einfluss des Rauchens auf die Ergebnisse im Comet Assay. In der basalen DNA-Fragmentierung unter Inkubation mit Nährmedium ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Gruppe der Raucher im Vergleich zur Gruppe der Nicht-raucher. Auch der Vergleich der DNA-Schädigung nach einer einstündigen Inkubation mit Nikotin (1000 μ M) erbrachte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Aufgrund der geringen Gruppenstärke von 7 bzw. 8 Teilnehmern ist die Aussagekraft dieser Untersuchung eingeschränkt.

Ebenfalls in Versuchen an nasaler Mukosa konnten Sassen und Mitarbeiter keinen Einfluss des Rauchens auf die Ergebnisse im Comet Assay nachweisen [Sassen et al., 2005b]. Allerdings ist auch in dieser Studie die Anzahl an Proben in Relation zum erwarteten Unterschied für eine weiterreichende Aussage ungenügend.

4.3 Tumorfördernde Mechanismen von Nikotin

Die Erkenntnisse, dass Nikotin den nAChR aktiviert und dass es nach Exposition gegenüber Nikotin intrazellulär zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommt, lassen vermuten, dass es sich hier um eine zusammenhängende Signalkaskade handelt. Die Literaturrecherche erbrachte einige Studien, die für diese Theorie sprechen: Barr und Kollegen wiesen nach, dass bestimmte Formen von ROS, wie sie auch durch Nikotin generiert werden, einen spezifischen Transkriptionsfaktor (NF- κ B) aktivieren können, der die Genexpression für verschiedene biologische Prozesse der Immunantwort, Zellproliferation, Entzündung und Apoptose reguliert [Barr et al., 2007]. Auch nach Aktivierung des $\alpha 7$ nAChR konnte dieser Transkriptionsfaktor induziert werden [Ye et al., 2004].

Am Tiermodell konnte ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Aktivierung des nAChR und der Bildung von ROS aufgezeichnet werden [Bruin et al., 2008]. Nach maternaler Nikotinexposition an Ratten kam es zu einem Anstieg der Apoptoserate in den pankreatischen Beta-Zellen neugeborener Ratten. Dies führten die Autoren auf eine direkte Wechselwirkung von Nikotin mit dem nAChR und anschließender ROS-Produktion zurück.

In einer Studie von Panayiotidis und Mitarbeiter konnte durch den Einsatz eines Ca^{2+} -Chelators die genotoxische Wirkung von H_2O_2 auf die DNA humaner Lymphozyten gesenkt werden [Panayiotidis et al., 1999]. Als Ursache für die DNA-Strangbrüche wurde hierbei eine durch H_2O_2 ausgelöste, Ca^{2+} -vermittelte Aktivierung von Endonukleasen angesehen. Auch die Aktivierung des nAChR führt zu einem Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} und kann ebenfalls zur Aktivierung dieser Endonukleasen beitragen.

Als eine weitere Ursache für die Genotoxizität von Nikotin wird die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO), einem kurzlebigen freien Radikal, durch die Aktivierung der

induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) vermutet. Nikotin soll hierbei stimulierend auf die Genexpression von iNOS wirken [Argentin et Cicchetti, 2006]. Nikotin führte auch an den beiden anderen Isoformen der NOS, der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthase (nNOS) sowie an der endothelialen Isoform (eNOS) zu einer Aktivitätssteigerung [Pogun et al., 2000; Tonnessen et al., 2000]. Nach der Isolierung der iNOS aus Makrophagen der Maus nach Stimulierung mit bakteriellem Lipopolysaccharid durch Stuehr und Mitarbeiter im Jahre 1991 konnten bereits in etlichen weiteren Zellen des Immunsystems die Expression von iNOS nachgewiesen werden [Stuehr et al., 1991]. Interessanterweise kann eine Aktivität von iNOS auch in vielen anderen Zellarten außerhalb des Immunsystems gemessen werden, unter anderem auch in nasalen Mukosazellen [Kawamoto et al., 1998; Taylor et Geller, 2000]. Auch durch eine Aktivierung des $\alpha 7$ nAChR konnte an neuronalem Gewebe eine gesteigerte NO-Synthese gemessen werden [Haberberger et al., 2003; Papadopolou et al., 2004]. Zusätzlich liefert Nikotin durch den direkten Ca^{2+} -Einstrom nach Aktivierung des nAChR das für die Synthese von NO benötigte Ca^{2+} [Zayas et al., 2002].

Während der oxidativen Elimination von Nikotin kann ein reaktiver Metabolit (Iminiumion) entstehen, welches über den sogenannten Elektronentransfer zur Synthese von ROS beiträgt [Kovacic et Cooksy, 2005]. Nach Kovacic kann durch Nitrosierung dieses nikotinergeren Iminiummetaboliten ein reaktives Nitrosamin gebildet werden, welches ebenfalls eine schädigende nitrosierende Wirkung auf Basen der DNA ausüben kann.

In mehreren Studien konnten tumorproliferative Effekte wie etwa ein gesteigertes Zellwachstum, Angioneogenese und Apoptosehemmung durch Nikotin nachgewiesen werden: Heeschen und Mitarbeiter wiesen *in vitro* an humanen Endothelzelllinien eine gesteigerte Zellproliferation, eine verminderte Apoptoserate sowie eine für die Angiogenese typische tubuläre Ausrichtung der Zellen nach, wie sie auch durch Inkubation mit dem vaskulären Endothelzellwachstumsfaktor (VEGF) hervorgerufen werden konnten. *In vivo* kam es durch Gabe von Nikotin nach Ischämie am Mausmodell zu einer gesteigerten Angiogenese und vermehrten Durchblutung des Gewebes [Heeschen et al., 2001]. In weiteren Studien konnte eine Nikotin induzierte Aktivierung des nAChR, insbesondere des $\alpha 7$ Rezeptors, für diese angioproliferative Wirkung

verantwortlich gemacht werden [Cooke et Bitterman, 2004; Egleton et al., 2009; Heeschen et al., 2002].

In einem Review von Zeidler werden verschiedene Studien zusammengefasst, in denen sowohl pro- als auch antiapoptische Effekte durch Nikotin nachgewiesen wurden [Zeidler et al., 2007]. Nach Zeidler kam es bei *in vitro* Versuchen vermehrt zu einer Hemmung der Apoptose und bei *in vivo* Versuchen häufiger zu einer gesteigerten Apoptose durch Nikotin. Diese widersprüchlichen Effekte werden auf die Verwendung unterschiedlicher Zellarten, verschiedener Nikotinkonzentrationen, auf Unterschiede der Expositionsdauer sowie auf eine unterschiedliche Metabolisierung der *in vitro* Zellkultur im Vergleich zur komplexen *in vivo* Situation zurückgeführt.

Für die intrazelluläre Vermittlung des Apoptose inhibierenden Effektes von Nikotin sind verschiedene Signalkaskaden verantwortlich: An einer Zelllinie für humane Lungenkrebszellen führte Nikotin zu einer Aktivierung der intrazellulären Enzyme Proteinkinase C sowie zweier Isoformen der *Extracellular-signal Regulated Kinase* (ERK 1 und ERK 2). Diese gehören zur Gruppe der Mitogen-aktivierten Kinasen (MAP-K) und können das stark antiapoptisch wirkende Protein Bcl 2 (*B-cell lymphoma 2*) aktivieren, welches ebenfalls als ein Tumorpromotor in Lungenkrebszellen gilt [Mai et al., 2003].

An Lungenepithelzellen der Ratte bewirkte Nikotin einen Anstieg des Protoonkogen Ras (*rat sarcoma*), welches als ein zentrales Glied verschiedener Signaltransduktionswege unter anderem einen weiteren Effektor (Raf) aktiviert. Raf (*rat fibrosarcoma*) phosphoryliert als MAP-Kinase die Kinasen ERK 1 und ERK 2 und verhindert somit die Apoptose über die oben genannte Signalkaskade [Guo et al., 2005].

Arredondo und Mitarbeiter wiesen an Mundschleimhautzellen nach Aktivierung des $\alpha 7$ AChR durch Nikotin eine starke Zunahme des Transkriptionsfaktors STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription*) über zwei unterschiedliche intrazelluläre Signalwege nach: die Exposition mit Nikotin führte zum einen über die Signalkaskade (Ras/Raf/ERK) zu einer gesteigerten Genexpression von STAT3 und zum anderen zur Aktivitätssteigerung einer Janus-Kinase, die STAT3 über einer direkte Phosphorylierung aktiviert [Arredondo et al., 2006]. STAT-3 vermittelt als sogenanntes Protoonkogen proliferative und antiapoptische Effekte [Bowman et al., 2000].

In einigen Untersuchungen zeigte Nikotin auch einen hemmenden Einfluss auf den Zellzyklus mit einer Arretierung der Zellen nach der Mitose in der G0/1-Phase, welche auf eine Akkumulation von Nikotin induzierten DNA-Schäden hinweist [Frazer-Abel et al., 2004; Lee et al., 2005].

Genotoxische Effekte durch Nikotin können zu einem manifesten Schaden am menschlichen Genom führen, wenn sie nicht durch zelluläre Reparatur behoben werden oder durch Apoptose der Zelle eliminiert werden. Da Nikotin selbst den physiologischen Schutz der Apoptose zu inhibieren vermag, erhöht sich sein Gefährdungspotential für den menschlichen Organismus. Da Nikotin meist zusammen mit weiteren kanzerogenen Stoffen während des Zigarettenrauchens aufgenommen wird, kann von sogenannten kokanzerogenen Effekten ausgegangen werden, die das schädigende Potential von Nikotin weiter steigern. Auch sorgt die Sucht induzierende Wirkung von Nikotin für einen anhaltenden Konsum dieser kanzerogenen Stoffe über viele Jahre.

Die aus vielen Studien gewonnenen Erkenntnisse zu den tumorfördernden Effekten von Nikotin müssen zu einer neuen Abschätzung von Nutzen und Risiko einer Substitutionstherapie mit Nikotin im Rahmen der Tabakentwöhnung führen.

4.4 Ausblick

Um die Mechanismen der Nikotin induzierten DNA-Schädigung weiter zu untersuchen, bedarf es des Einsatzes zusätzlicher Methoden zur Darstellung genotoxischer Effekte: Durch eine Kombination des alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet) Assays mit der Methode der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) können neben dem gesamten DNA-Schaden auch schadensspezifische Regionen von Nikotin nach Markierung ausgewählter Chromosomen dargestellt werden [Harreus et al., 2004].

Um die Aussagekraft von *in vitro* Genotoxizitätsuntersuchungen zu erhöhen, soll eine möglichst physiologische Situation des zu untersuchenden Zielgewebes angestrebt werden. Für das respiratorische Epithel, insbesondere für die nasale Mukosa, stehen zwei verschiedene *in vitro* Modelle zur Verfügung, die dieser Vorgabe näher kommen: Bei den sogenannten Miniorgankulturen wachsen kleine Gewebestücke aus nasaler Mukosa durch Kultivierung mit spezifischen Nährmedien zu Kulturen mit vollständig

umschlossener Schleimhaut heran, die über eine stabile metabolische Kompetenz verfügen [Kleinsasser et al., 2009]. Eine weitere verbesserte Expositionsmethode bietet das sogenannte *Air Liquid Interface*, in dem die physiologische Polarität der nasalen Mukosazellen mit einer getrennten Luft- und Nährmediumseite abgebildet wird. Hierbei kann die Fremdstoffexposition der nasalen Mukosazellen sowohl über das Nährmedium als auch über die Luft durch Begasung der Zellen erfolgen [Aufderheide et al., 2003].

Für die Untersuchungen zum rezeptorvermittelten DNA-Schaden von Nikotin am nAChR kann die Signaltransduktion sowohl extra- als auch intrazellulär blockiert werden. Als ein selektiver Antagonist am $\alpha 7$ nAChR kann das α -Bungarotoxin eingesetzt werden, um die Signaltransduktion am Rezeptor durch Nikotin zu verhindern. Durch membrangängige Calciumchelatoren (BAPTA) können zudem die intrazellulären Signalwege unterbunden werden, indem das für die Aktivierung verschiedener zellulärer Enzyme benötigte Ca^{2+} gebunden wird. Auch eine Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch die Aktivierung des nAChR lässt sich mit BAPTA erfolgreich verhindern.

Um den Einfluss der intrazellulären Generierung von NO nach Nikotininkubation weiter zu untersuchen, können Inhibitoren der NOS (L-NMMA) sowie selektive Inhibitoren der iNOS (1400W, BYK 191023) eingesetzt werden [Egemnazarov, 2009].

Nur durch ein vertieftes Verständnis der tumorfördernden Mechanismen von Nikotin können in Zukunft Tabak und Nikotin assoziierte Erkrankungen wirksamer verhindert werden.

5.1 Zusammenfassung

Beim Zigarettenrauchen als der häufigsten Form des Tabakkonsums stellt das respiratorische Epithel des oberen und unteren Aerodigestivtraktes das primäre Kontaktorgan der zyto- und genotoxischen Inhaltsstoffe dar. Nikotin, das Hauptalkaloid des Tabaks, ruft nicht nur eine starke Abhängigkeit hervor, sondern kann in Anbetracht früherer Studien auch zum Tabak assoziierten Krebsrisiko beitragen. Neben tumorproliferativen Effekten wie etwa der Angiogenese, der Zellproliferation oder einer Apoptoseinhibition ist die Rolle der tumorinitiierenden Wirkung von Nikotin durch eine direkte Schädigung der DNA noch unzureichend untersucht.

Ziele dieser experimentellen Arbeit waren deshalb, Nikotin induzierte DNA-Schäden an frisch isolierten sowie rekultivierten humanen Lymphozyten mit Hilfe des alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet) Assays darzustellen, den Nachweis dieser Schäden durch Koinkubation mit dem Reparaturenzyminhibitor Aphidicolin (APC) zu sensitivieren sowie oxidativ geschädigte Basen durch die Formamidopyrimidin-Glykosylase (Fpg) aufzuzeigen. Durch Koinkubation mit Epibatidin, einem Subtyp spezifischen und kompetitiven Agonisten am nikotinergen Acetylcholinrezeptor (nAChR), wurde die Rolle der rezeptorvermittelten Mechanismen Nikotin induzierter DNA-Schäden an Lymphozyten und nasalen Mukosazellen untersucht. Auch der Frage, ob Rauchen zu einer erhöhten basalen Schädigung an nasalen Mukosazellen führe, wurde nachgegangen.

Nach der Zellisolierung der humanen nasalen Schleimhautzellen und peripheren Lymphozyten erfolgte zum Ausschluss zytotoxischer Effekte jeweils vor und nach der einstündigen Fremdstoffinkubation mit Nikotin (1 μM bis 1000 μM), APC (2,5 $\mu\text{g/ml}$), Epibatidin (1 μM bis 100 μM) und MMS (100 μM) die Bestimmung der Zellvitalität mit dem Trypanblau-Ausschlusstest. Durch Inkubation mit Fpg nach der Lyse zellulärer Membranen erfolgte die Augmentation oxidativ geschädigter Basen. Potentielle DNA-Schäden in Form von Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Stellen der DNA wurden mit dem Comet Assay erfasst. An frisch isolierten Lymphozyten konnte nach einstündiger Inkubation mit Nikotin ab 100 μM ein signifikanter DNA-Schaden festgestellt

werden. Mit dem Einsatz von Fpg kam es ab 10 μM Nikotin zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Fragmentierung. An rekultivierten Lymphozyten konnte nach Kryokonservierung bei einstündiger Inkubation mit Nikotin bereits ab 1 μM eine signifikante DNA-Schädigung nachgewiesen werden, die sich ebenfalls bei Koinkubation mit APC ab 1 μM darstellte. Durch Koinkubation von Nikotin (1000 μM) mit Epibatidin in aufsteigender Konzentration konnte an frisch isolierten Lymphozyten nur in einer Konzentration (10 μM) die Nikotin induzierte DNA-Fragmentierung gesenkt werden. Hierbei zeigte Epibatidin selbst einen DNA-Schaden in niedriger Konzentration (1 μM und 10 μM). An nasalen Mukosazellen konnte der Nikotin induzierte DNA-Schaden durch die Koinkubation mit Epibatidin nicht gesenkt werden. Auch an nasaler Mukosa rief Epibatidin ab 1 μM einen signifikanten DNA-Schaden hervor. Bezüglich einer Einflussgröße durch das Rauchen auf die Ergebnisse im Comet Assay konnte kein Unterschied der basalen als auch der durch Nikotin induzierten DNA-Fragmentierung zwischen der Gruppe der Raucher und Nichtraucher festgestellt werden, wobei die geringe Gruppenstärke ($n = 8$) keine eindeutige Aussage zulässt.

Nikotin verursachte bereits bei einer einstündigen Expositionsdauer DNA-Schäden an humanen Lymphozyten und nasalen Mukosazellen. Der Nachweis oxidativ geschädigter Basen an Lymphozyten zeigt auf eine Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) durch Nikotin hin. Die Aktivierung des homomeren $\alpha 7$ nAChR durch Nikotin soll hierbei eine wichtige Rolle als Auslöser der intrazellulären Signaltransduktion der Radikalbildung spielen. Epibatidin als ein starker Agonist am $\alpha 7$ Rezeptor führte bereits in geringen Konzentrationen zu einer signifikanten DNA-Fragmentierung. Bei fehlender Reparatur dieser DNA-Schäden und einer ausbleibenden Elimination der geschädigten Zelle können diese Mutationen akkumulieren und zur Tabak assoziierten Krebsentstehung beitragen. Eine Substitutionstherapie mit Nikotin zur Raucherentwöhnung muss bei solchen Ergebnissen äußerst kritisch betrachtet werden.

Vor diesem Hintergrund ist es notwendig die Untersuchungen zur Genotoxizität von Nikotin durch den Einsatz weiterer Methoden, wie etwa der Kombination des Comet Assays mit der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) oder dem Einsatz eines *Air Liquid Interface*, voranzutreiben und die rezeptorvermittelten Mechanismen der DNA-schädigenden Wirkung von Nikotin durch spezifische Antagonisten weiter zu erforschen.

5.2 Abkürzungsverzeichnis

APC	Aphidicolin
Aqua bidest.	Aqua bidestilla
BAPTA	1,2-Bis (o-aminophenoxy) ethan-Tetraessigsäure
Bcl 2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BEG-Medium	<i>Bronchial Epithelial Growth-Medium</i>
BER	Basenexzisionsreparatur
BSA	bovines Serumalbumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DH	<i>DNA in Head</i>
DME-Medium	<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DT	<i>DNA in Tail</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
Fapy	2,6-Diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidin
et al.	und andere
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
Fpg	Formamidopyrimidin-Glykosylase
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
KOH	Kaliumhydroxid
LMP	<i>Low Melting Point</i>
L-NMMA	N-Monomethyl-L-Arginin
MAK	maximale Arbeitsplatzkonzentration
ME	Medianwert
MMS	Methylmethansulfonat
mRNA	<i>mesenger Ribonucleic Acid</i>
MW	Mittelwert
NAC	n-Acetylcystein
nAChR	nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NF-κB	<i>Nuclear Factor-κB</i>
Nik.	Nikotin

NMP	<i>Normal Melting Point</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
NR.	Nichtraucher
O ₂ ⁻	Hyperoxid
OH	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
OTM	<i>Olive Tail Moment</i>
8-oxo-Guanin	8-Oxo-7,8-dihydro-2-desoxyguanin
p. y.	<i>pack years</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
R.	Raucher
Raf	<i>rat fibrosarcoma</i>
Ras	<i>rat sarcoma</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RPMI-Medium	<i>Roswell Park Memorial Institute-Medium</i>
RT	Raumtemperatur
SD	<i>standard deviation</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TL	<i>Tail Length</i>
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vs.	versus
WHO	<i>World Health Organisation</i>

5.3 Fragebogen zur Fremdstoffbelastung

Universitätsklinikum Würzburg

Klinikum der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität

Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankhe

Direktor: Univ. Prof. Dr. R. Hagen



Angaben zum Patienten

Name

Geburtsdatum

Sehr geehrte Patientin, sehr geehrter Patient,

bitte beantworten Sie nachfolgende Fragen über Fremdstoffbelastungen. Sie helfen dadurch, Einflüsse auf die Gesundheit durch die Umwelt und die Arbeitswelt genauer zu beurteilen. Alle Angaben unterliegen dem Datenschutz und werden anonym und vertraulich behandelt.

Waren Sie bzw. sind Sie **passiv Tabakrauch** ausgesetzt? Wenn ja, machen Sie bitte genauere Angaben!

1.	von	bis
<hr/>		
2.	von	bis
<hr/>		
3.	von	bis
<hr/>		
4.	von	bis
<hr/>		

Trinken Sie bzw. haben Sie **alkoholische Getränke** getrunken? Wenn ja, geben Sie bitte Art und Menge an!

	<u>Menge</u>	<u>von</u>	<u>bis</u>
Bier:	<hr/>		
Wein:	<hr/>		
Andere:	<hr/>		

Möchten Sie **zusätzliche Angaben** machen?

Vielen Dank für Ihre Mithilfe!

5.4 Datenübersicht

Tabelle 5.1: Epidemiologische Daten der 10 männlichen Blutspender für die Versuche an frisch isolierten Lymphozyten mit Angabe von Alter in Jahren (a), Beruf, Alkoholkonsum in Gramm Ethanol pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in *pack years* (p. y.) sowie Kontakt gegenüber Passivrauch und Fremdstoffen.

Nr.	Alter(a)	Beruf	Alkohol- konsum (g/d)	Nikotin- konsum (p. y.)	Passivrauch	Fremdstoffe
1	28	Arzt	0	0	Nein	Nein
2	32	Arzt	20	0	Nein	Nein
3	45	Arzt	18	0	Nein	Nein
4	29	Arzt	8	0	Nein	Nein
5	33	Arzt	0	0	Nein	Nein
6	32	Arzt	3	0	Nein	Nein
7	31	Arzt	8	0	Nein	Nein
8	28	Arzt	0	0	Nein	Nein
9	38	Biol. techn. Assistent	8	0	Nein	Nein
10	54	Video-Medientechniker	13	0	Nein	Nein

Tabelle 5.2: Epidemiologische Daten der 14 männlichen Blutspender für die Versuche an rekultivierten Lymphozyten mit Angabe von Alter in Jahren (a), Beruf, Alkoholkonsum in Gramm Ethanol pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in *pack years* (p. y.) sowie Kontakt gegenüber Passivrauch und Fremdstoffen.

Nr.	Alter(a)	Beruf	Alkohol- konsum (g/d)	Nikotin- konsum (p. y.)	Passivrauch	Fremdstoffe
1	28	Arzt	0	0	Nein	Nein
2	32	Arzt	20	0	Nein	Nein
3	45	Arzt	18	0	Nein	Nein
4	29	Arzt	8	0	Nein	Nein
5	33	Arzt	0	0	Nein	Nein
6	32	Arzt	3	0	Nein	Nein
7	31	Arzt	8	0	Nein	Nein
8	28	Arzt	0	0	Nein	Nein
9	38	Biol. techn. Assistent	8	0	Nein	Nein
10	54	Video-Medientechniker	13	0	Nein	Nein
11	28	Student	6	0	Nein	Nein
12	23	Ingenieur	22	0	Nein	Nein
13	26	Student	12	5	Ja	Holzstaub
14	33	Arzt	0	0	Nein	Nein

Tabelle 5.3: Epidemiologische Daten der 15 Patienten mit Angabe von Geschlecht (m = männlich, w = weiblich), Alter in Jahren (a), Verwendung einer Blutprobe, Beruf, Alkoholkonsum in Gramm Ethanol pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in *pack years* (p. y.), Kontakt gegenüber Passivrauch und Fremdstoffen. i. R.: im Ruhestand.

Nr.	Sex	Alter (a)	Blutprobe	Beruf	Alkoholkonsum (g/d)	Nikotinkonsum (p. y.)	Passivrauch	Fremdstoffe
1	m	20	Nein	Stapelfahrer	0	2	Ja	Holzstaub
2	w	27	Ja	Arzthelferin	1	8	Ja	Nein
3	m	30	Ja	Versicherungsvertreter	2	7	Ja	Holzstaub
4	w	55	Ja	Verkäuferin	11	0	Ja	Nein
5	w	19	Nein	Industriekauffrau	0	0	Nein	Holzstaub
6	m	44	Nein	Lackierer	15	0	Nein	Lacke, Farben
7	w	27	Nein	Friseurin	0	9	Ja	Haarfärbemittel
8	m	33	Nein	Weinbauer	25	0	Nein	Nein
9	m	60	Ja	Malermeister	7	0	Nein	Lacke, Farben
10	m	27	Ja	Holzarbeiter	13	21	Ja	Holzstaub
11	m	68	Ja	Schreiner i. R.	8	0	Nein	Holzstaub, Farben
12	w	23	Nein	Studentin	0	0	Nein	Nein
13	m	58	Ja	Elektroinstallateur	13	0	Nein	Asbest, Chemikalien
14	w	67	Nein	Kellnerin i. R.	2	6	Ja	Nein
15	m	28	Ja	Informatiker	14	2	Ja	Nein

Tabelle 5.4: Wertetabelle zum Versuchsabschnitt **3.4.1 Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Formamidopyrimidin-Glykosylase**. Messwerte für die Negativkontrolle (Medium), Nikotin (10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M) und die Positivkontrolle mit Methylmethansulfonat (100 μ M MMS) mit Angabe der Mittelwerte (MW), Medianwerte (ME) und der Standardabweichungen (SD).

Nr.	Medium			Nikotin									MMS		
	OTM	DT	TL	10 μ M			100 μ M			1000 μ M			100 μ M		
				OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	0,31	1,31	32,66	0,29	1,21	33,20	0,46	1,69	33,01	0,38	1,58	37,11	2,67	8,49	60,83
2	0,22	1,05	27,5	0,25	1,09	28,07	0,49	1,80	34,50	0,37	1,50	33,72	1,30	4,90	43,75
3	0,23	1,07	27,55	0,30	1,30	29,18	0,45	1,92	31,21	0,44	1,85	32,67	1,00	4,05	40,65
4	0,27	1,12	33,35	0,28	1,17	33,94	0,31	1,24	34,94	0,49	1,96	37,28	1,25	4,35	47,83
5	0,19	0,9	27,05	0,30	1,35	30,62	0,37	1,74	31,25	0,30	1,43	29,12	2,32	7,76	59,66
6	0,28	1,2	28,93	0,30	1,28	29,71	0,37	1,68	30,78	0,39	1,70	31,61	1,57	5,55	50,43
7	0,27	1,06	29,62	0,29	1,26	31,54	0,35	1,37	35,53	0,22	1,00	29,30	0,83	3,20	42,59
8	0,28	1,33	29,68	0,26	1,12	30,27	0,35	1,46	31,14	0,22	0,97	28,73	2,14	7,19	53,93
9	0,54	2,11	34,9	0,54	2,19	34,75	1,02	3,68	40,96	0,84	2,77	39,95	1,76	7,61	47,57
10	0,33	1,37	30,38	0,24	1,07	29,77	0,28	1,25	29,95	0,49	2,10	32,85	2,10	8,42	55,79
MW	0,29	1,25	30,16	0,31	1,30	31,11	0,45	1,78	33,33	0,41	1,69	33,23	1,69	6,15	50,30
ME	0,28	1,16	29,65	0,29	1,24	30,45	0,37	1,69	32,13	0,39	1,64	32,76	1,67	6,37	49,13
SD	0,10	0,34	2,68	0,09	0,33	2,20	0,21	0,71	3,31	0,18	0,53	3,84	0,61	1,96	7,08

OTM: Olive Tail Moment, DT: DNA in Tail, TL: Tail Length

Tabelle 5.5: Wertetabelle zum Versuchsabschnitt **3.4.1 Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Formamidopyrimidin-Glykosylase**. Messwerte für die Negativkontrolle (Medium mit Fpg), Nikotin mit Fpg (10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M) sowie die Positivkontrolle (100 μ M MMS mit Fpg).

Nr.	Medium mit Fpg			Nikotin mit Fpg						MMS mit Fpg					
	OTM	DT	TL	10 μ M			100 μ M			1000 μ M					
				OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL			
1	0,28	1,18	34,38	0,33	1,40	34,53	0,48	1,91	38,17	0,78	2,86	40,46	3,77	11,24	71,06
2	0,54	1,91	32,63	1,04	3,79	40,18	3,57	8,08	44,42	1,92	6,18	53,95	3,53	10,81	67,07
3	0,54	2,12	33,01	0,76	2,94	37,06	1,21	3,99	38,28	1,27	4,19	45,53	9,22	21,92	79,06
4	0,62	2,5	35,52	0,37	1,59	33,75	1,64	4,87	43,19	2,86	8,67	54,00	2,31	7,60	56,35
5	0,44	1,9	32,81	0,62	2,86	34,78	0,83	2,87	39,22	0,59	2,28	38,29	5,67	15,99	67,39
6	0,4	1,79	31,09	1,28	3,88	34,11	0,67	2,21	32,85	0,92	3,71	39,37	16,94	39,26	94,43
7	0,26	1,2	29,58	0,42	1,71	35,61	0,31	1,26	31,17	0,86	2,95	33,88	3,40	9,88	59,51
8	0,24	1,07	30,04	0,71	2,75	34,27	0,28	1,34	28,22	0,33	1,42	32,44	10,02	24,05	83,56
9	0,76	2,77	39,18	3,28	9,03	56,95	2,83	8,39	59,03	2,48	6,84	48,89	4,45	14,61	63,40
10	1,11	4,73	39,85	2,18	5,99	56,06	0,77	3,18	39,49	1,12	4,56	38,11	6,13	13,59	86,93
MW	0,52	2,12	33,81	1,10	3,59	39,73	1,26	3,81	39,40	1,31	4,37	42,49	6,54	16,90	72,88
ME	0,49	1,91	32,91	0,74	2,90	35,20	0,80	3,03	38,75	1,02	3,95	39,92	5,06	14,10	69,23
SD	0,27	1,08	3,51	0,95	2,34	9,04	1,12	2,59	8,59	0,84	2,25	7,74	4,44	9,42	12,57

OTM: Olive Tail Moment, DT: DNA in Tail, TL: Tail Length

Tabelle 5.6: Wertetabelle zum Versuchsabschnitt **3.4.2 Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Aphidicolin**. Messwerte für die Negativkontrolle (Medium), Nikotin (1 μM , 10 μM , 100 μM , 1000 μM) sowie die Positivkontrolle (100 μM MMS).

Nr.	Medium			Nikotin												MMS		
	OTM	DT	TL	1 μM			10 μM			100 μM			1000 μM			100 μM		
				OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	0,23	1,01	32,37	0,70	2,38	36,71	0,43	1,79	35,64	0,55	1,84	37,05	0,47	1,63	37,23	1,46	4,59	51,09
2	0,37	1,38	31,46	0,65	2,15	32,35	0,43	1,49	32,47	0,20	0,86	29,74	0,28	1,23	31,79	0,65	2,32	36,84
3	0,38	1,48	30,03	0,49	1,74	34,01	0,30	1,18	34,67	0,38	1,34	32,72	0,58	1,87	34,25	0,96	3,07	37,33
4	0,45	1,73	32,73	0,55	2,04	36,58	0,67	2,21	35,56	0,45	1,74	34,21	0,51	1,95	33,69	1,82	5,92	59,20
5	0,24	1,02	32,72	0,34	1,34	33,59	0,29	1,29	32,47	0,34	1,22	31,99	0,28	1,10	31,71	1,05	3,60	46,82
6	0,23	1,00	28,19	0,20	0,92	26,55	0,25	1,05	26,94	0,22	1,02	27,34	0,28	1,08	26,43	0,99	3,65	42,84
7	0,3	1,29	26,98	0,24	1,08	27,41	0,33	1,33	27,96	0,47	0,82	24,10	0,22	1,05	26,31	1,51	4,92	40,87
8	0,28	1,37	28,82	0,46	1,98	32,08	0,37	1,55	31,45	0,41	1,78	32,05	0,33	1,42	30,73	0,67	2,98	38,00
9	0,21	0,99	28,01	0,29	1,28	29,10	0,31	1,32	29,26	0,28	1,28	29,96	0,25	1,18	29,20	0,83	3,07	42,94
10	0,25	1,09	31,67	0,41	1,72	32,97	0,52	2,09	39,33	0,41	1,68	33,28	0,45	1,77	31,38	0,88	3,51	48,83
11	0,35	1,52	38,26	0,57	2,23	45,01	0,47	1,89	41,35	0,52	2,06	41,62	0,63	2,34	42,73	2,80	9,30	65,33
12	0,18	0,83	27,72	0,17	0,76	27,56	0,29	1,22	29,27	0,21	0,90	26,89	0,18	0,75	27,11	1,27	4,06	50,60
13	0,16	0,69	31,02	0,35	1,17	31,36	0,27	1,07	33,30	0,26	1,03	32,74	0,36	1,35	34,23	1,63	4,88	63,76
14	0,18	0,74	31,85	0,23	0,95	32,49	0,60	1,57	34,79	0,31	1,10	32,80	0,46	1,55	37,03	1,36	4,13	62,46
MW	0,27	1,15	30,85	0,40	1,55	32,70	0,40	1,50	33,18	0,36	1,41	32,61	0,38	1,45	32,42	1,28	4,29	49,07
ME	0,25	1,06	31,24	0,38	1,53	32,42	0,35	1,41	32,89	0,36	1,31	32,73	0,35	1,39	31,75	1,16	3,86	47,83
SD	0,09	0,31	2,92	0,17	0,55	4,75	0,13	0,37	4,13	0,12	0,40	3,75	0,14	0,43	4,60	0,57	1,73	10,10

OTM: Olive Tail Moment, DT: DNA in Tail, TL: Tail Length

Tabelle 5.7: Wertetabelle zum Versuchsabschnitt **3.4.2 Ergebnisse der Inkubation mit Nikotin und Aphidicolin**. Messwerte für die Negativkontrolle (Medium mit APC), Nikotin mit APC (1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M) sowie die Positivkontrolle (100 μ M MMS mit APC).

Nr.	Medium mit APC			Nikotin mit APC												MMS mit APC		
	OTM	DT	TL	1 μ M			10 μ M			100 μ M			1000 μ M			OTM	DT	TL
				OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL			
1	0,31	1,28	34,5	0,48	1,64	35,74	0,30	1,25	34,80	0,54	1,84	31,91	0,31	1,26	31,16	6,91	18,15	74,56
2	0,23	1,05	31,18	0,44	1,59	37,37	0,30	1,14	30,90	0,42	1,44	31,93	0,51	1,71	36,87	6,55	16,94	78,80
3	0,4	1,45	30,41	0,58	1,84	31,85	0,72	2,41	34,44	0,49	1,81	32,41	0,74	2,37	32,48	4,62	13,12	63,81
4	0,62	2,07	34,83	0,63	2,19	35,85	0,84	2,67	35,07	0,72	2,36	36,11	0,59	2,14	38,43	10,14	23,24	90,10
5	0,26	1,14	29,72	0,33	1,26	28,92	0,24	1,10	29,63	0,31	1,31	31,58	0,22	0,98	30,35	6,45	16,33	77,89
6	0,32	1,33	29,88	0,22	0,97	25,02	0,27	1,17	28,75	0,18	0,85	26,21	0,43	1,44	27,23	11,62	26,23	92,48
7	0,18	0,86	25,63	0,19	0,93	25,69	0,99	3,13	33,43	0,57	2,28	31,81	0,63	1,98	28,70	7,41	18,79	79,16
8	0,32	1,47	30,8	0,37	1,64	32,83	0,29	1,39	28,69	0,37	1,65	29,81	0,42	1,77	30,88	8,55	20,78	85,44
9	0,22	1,05	28,3	0,32	1,46	28,06	0,22	1,08	27,86	0,34	1,37	28,27	0,35	1,42	29,77	8,46	20,08	87,61
10	0,33	1,42	31,52	0,57	1,93	34,35	0,43	1,75	33,15	0,45	1,85	33,55	0,46	1,68	34,07	5,34	13,67	82,12
11	0,39	1,66	41,92	0,58	2,24	41,59	0,59	2,21	44,18	0,68	2,50	46,11	0,43	1,73	36,33	8,28	19,46	89,37
12	0,23	1,07	28,42	0,40	1,38	30,78	0,31	1,24	27,88	0,48	1,59	33,28	0,44	1,46	28,64	13,05	28,29	97,29
13	0,17	0,72	29,59	0,34	1,27	34,37	0,38	1,37	33,94	0,47	1,52	40,76	0,42	1,52	36,44	6,72	15,30	82,37
14	0,19	0,8	31,4	0,25	0,99	31,82	0,28	1,07	33,80	0,25	1,06	30,99	0,45	1,43	35,18	9,46	20,49	96,95
MW	0,30	1,24	31,29	0,41	1,52	32,45	0,44	1,64	32,61	0,45	1,67	33,20	0,46	1,64	32,61	8,11	19,41	84,14
ME	0,29	1,21	30,61	0,39	1,53	32,34	0,31	1,31	33,29	0,46	1,62	31,92	0,44	1,60	31,82	7,85	19,46	83,91
SD	0,12	0,36	3,86	0,14	0,43	4,59	0,25	0,68	4,29	0,15	0,48	5,04	0,13	0,36	3,59	2,27	2,35	9,15

OTM: Olive Tail Moment, DT: DNA in Tail, TL: Tail Length

Tabelle 5.8: Wertetabelle zum Versuchsabschnitt **3.4.3.1 Versuche an Lymphozyten**. Messwerte für die Negativkontrolle (Medium), Nikotin (1000 μM) sowie für Epibatidin (1 μM , 10 μM , 100 μM).

Nr.	Medium			Nikotin 1000 μM			1 μM			10 μM			100 μM		
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	0,21	0,98	29,93	0,29	1,32	31,58	0,40	1,58	33,82	0,24	1,11	30,34	0,32	1,38	34,21
2	0,41	1,83	31,12	0,36	1,71	28,47	0,47	2,07	31,46	0,49	2,04	31,04	0,36	1,68	28,33
3	0,19	0,92	26,94	0,21	0,98	29,64	0,18	0,85	27,37	0,24	1,10	29,30	0,21	1,01	28,32
4	0,60	2,32	44,08	0,78	2,61	39,38	0,73	2,59	44,42	0,99	3,10	45,69	0,38	1,60	39,02
5	0,42	1,80	36,47	0,7	2,72	39,68	0,52	2,14	32,65	0,52	2,10	35,17	0,40	1,71	34,96
6	0,25	0,95	36,45	0,56	2,02	38,55	0,37	1,29	35,95	0,35	1,31	36,35	0,35	1,27	36,71
7	0,17	0,76	29,32	0,6	1,98	36,45	0,19	0,80	32,30	0,19	0,85	31,83	0,29	1,19	34,50
8	0,49	1,88	48,8	0,64	2,16	56,6	0,72	2,47	57,74	0,77	2,53	60,39	0,73	2,38	60,50
MW	0,34	1,43	35,39	0,52	1,94	37,54	0,45	1,72	36,96	0,47	1,77	37,51	0,38	1,53	37,07
ME	0,33	1,39	33,79	0,58	2,00	37,50	0,44	1,83	33,24	0,42	1,68	33,50	0,36	1,49	34,73
SD	0,16	0,59	7,69	0,21	0,59	8,89	0,21	0,70	9,72	0,28	0,80	10,62	0,15	0,42	10,18

OTM: Olive Tail Moment, DT: DNA in Tail, TL: Tail Length

Tabelle 5.9: Wertetabelle zum Versuchsabschnitt **3.4.3.1 Versuche an Lymphozyten**. Messwerte für Epibatidin (1 μM , 10 μM , 100 μM) mit Nikotin (1000 μM) sowie für die Positivkontrolle (100 μM MMS).

Nr.	Epibatidin mit Nikotin												MMS		
	1 μM			10 μM			100 μM			100 μM			OTM	DT	TL
1	0,25	1,18	29,70	0,28	1,29	32,41	0,27	1,28	29,71	1,02	3,73	48,77			
2	0,46	1,93	32,32	0,30	1,45	27,12	0,40	1,90	29,36	0,63	2,76	36,31			
3	0,21	0,96	30,15	0,20	0,94	29,43	0,20	0,95	27,87	0,45	1,93	39,47			
4	0,63	2,35	40,86	0,42	1,82	39,02	0,68	2,51	43,50	1,56	5,13	58,10			
5	0,52	1,99	37,29	0,42	1,71	36,32	0,67	2,53	34,25	2,44	7,63	56,69			
6	0,46	1,58	36,96	0,43	1,43	38,09	0,44	1,40	36,13	1,26	3,92	57,84			
7	0,18	0,78	31,28	0,21	0,94	32,23	0,18	0,82	30,56	1,49	4,75	56,43			
8	0,67	2,37	53,73	0,63	2,15	56,52	0,65	2,29	57,32	1,58	5,26	62,93			
MW	0,42	1,64	36,54	0,36	1,47	36,39	0,44	1,71	36,09	1,30	4,39	52,07			
ME	0,46	1,76	34,64	0,36	1,44	34,37	0,42	1,65	32,41	1,38	4,34	56,56			
SD	0,19	0,62	8,00	0,14	0,42	9,12	0,21	0,69	9,95	0,62	1,74	9,61			

OTM: Olive Tail Moment, DT: DNA in Tail, TL: Tail Length

Tabelle 5.10: Wertetabelle zum Versuchsabschnitt **3.4.3.2 Versuche an nasalen Mukosazellen**. Messwerte für die Negativkontrolle (Medium), Nikotin (1000 μM) sowie für Epibatidin (1 μM , 10 μM , 100 μM).

Nr.	Medium			Nikotin			Epibatidin								
	1000 μM			1 μM			10 μM			100 μM					
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	0,44	1,91	36,82	0,43	1,99	32,36	0,50	1,93	40,86	0,38	1,60	38,50	0,52	2,17	39,10
2	0,6	2,24	38,1	0,93	3,1	37,75	0,53	3,22	39,08	0,98	3,87	38,56	0,86	3,19	38,23
3	0,43	1,61	38,04	1	3,57	44,74	1,18	4,16	48,79	0,76	2,47	42,17	0,89	3,13	45,16
4	0,45	1,61	33,3	0,53	1,82	33,21	0,68	2,21	34,73	0,62	2,15	34,81	0,72	2,31	37,03
5	0,33	1,2	34,95	0,9	2,64	39,46	0,50	1,17	34,61	0,75	2,15	37,41	0,62	1,90	37,37
6	1,8	5,38	47,67	1,16	3,86	40,36	1,54	4,03	40,52	1,40	4,33	43,33	0,91	3,15	38,83
7	0,64	2,66	38	0,94	3,7	38,78	0,74	3,33	40,97	1,06	3,88	46,26	0,99	3,50	44,55
8	0,53	2,24	41,15	1,58	4,51	47,81	0,54	2,88	42,76	0,72	2,81	40,86	0,57	2,35	38,95
9	1,05	4,07	48,96	2	6,21	54,34	2,37	5,15	50,68	1,65	5,22	51,04	1,81	5,88	51,93
10	0,57	2,3	40,72	0,98	3,51	46,37	0,93	2,57	40,66	0,67	2,85	41,01	0,66	2,77	40,44
11	0,3	1,19	33,64	1,37	3,63	43,99	0,47	1,78	39,70	0,72	2,46	38,79	0,68	2,08	40,09
12	0,32	1,21	35,01	0,92	2,63	40,25	0,89	1,79	38,05	0,47	1,75	38,21	0,61	2,05	43,85
13	0,3	1,22	33,23	0,8	2,54	40,09	0,48	1,49	32,94	1,19	3,32	41,66	0,53	1,83	37,08
14	0,26	1,02	30,44	0,89	2,75	39,68	0,24	1,05	30,04	0,38	1,43	32,95	0,23	0,96	29,86
15	0,54	2,22	41,26	0,69	2,52	41,51	0,64	1,83	37,29	0,70	2,78	42,68	0,54	2,15	40,94
MW	0,57	2,14	38,09	1,01	3,27	41,38	0,82	2,57	39,45	0,83	2,87	40,55	0,74	2,63	40,23
ME	0,45	1,91	38,00	0,93	3,10	40,25	0,64	2,21	39,70	0,72	2,78	40,86	0,66	2,31	39,10
SD	0,39	1,19	5,22	0,40	1,10	5,55	0,54	1,20	5,44	0,36	1,08	4,44	0,35	1,11	4,92

OTM: Olive Tail Moment, DT: DNA in Tail, TL: Tail Length

Tabelle 5.11: Wertetabelle zum Versuchsabschnitt **3.4.3.2 Versuche an nasalen Mukosazellen**. Messwerte für Epibatidin (1 μM , 10 μM , 100 μM) mit Nikotin (1000 μM) sowie für die Positivkontrolle (100 μM MMS).

Nr.	Epibatidin mit Nikotin												MMS		
	1 μM			10 μM			100 μM			100 μM			OTM	DT	TL
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL			
1	0,5	2,09	42,83	0,52	2,17	41,25	0,40	1,72	39,05	5,75	15,82	60,07			
2	0,53	2,09	34,14	0,77	2,83	42,88	0,90	3,23	40,52	4,11	11,23	64,16			
3	1,18	3,73	50,00	1,43	4,33	52,52	0,76	2,57	45,18	3,68	9,90	65,24			
4	0,68	2,29	35,86	0,81	2,58	37,02	0,36	1,38	31,80	4,86	12,08	69,05			
5	0,5	1,55	36,05	0,34	1,21	34,88	0,36	1,31	35,90	3,44	9,10	65,90			
6	1,54	4,52	43,84	1,69	5,06	44,89	1,80	5,47	47,82	3,07	9,10	58,17			
7	0,74	3,00	36,70	0,78	3,26	38,22	1,68	6,56	44,97	4,15	12,31	64,81			
8	0,54	2,15	40,96	0,68	2,69	41,09	0,72	2,64	42,44	3,50	9,60	69,41			
9	2,37	6,74	55,58	1,86	5,68	51,38	2,51	7,15	56,53	6,81	16,82	76,67			
10	0,93	3,27	45,17	0,81	3,07	43,90	0,91	3,30	45,36	4,09	11,15	68,08			
11	0,47	1,77	38,71	0,52	1,89	40,44	0,41	1,59	37,36	3,33	8,61	66,49			
12	0,89	2,64	38,86	0,61	1,98	35,90	0,45	1,55	38,68	2,63	7,39	60,59			
13	0,48	1,65	35,66	0,82	2,69	45,21	0,59	2,21	42,52	6,89	16,02	85,28			
14	0,24	1,04	30,49	0,27	1,11	30,81	0,27	1,12	31,49	3,18	8,91	61,55			
15	0,64	2,44	41,39	0,58	2,25	43,19	0,78	2,85	44,62	2,64	7,89	56,03			
MW	0,82	2,73	40,42	0,83	2,85	41,57	0,86	2,98	41,62	4,14	11,06	66,10			
ME	0,64	2,29	38,86	0,77	2,69	41,25	0,72	2,57	42,44	3,68	9,90	65,24			
SD	0,54	1,42	6,45	0,47	1,30	5,83	0,64	1,92	6,41	1,37	3,03	7,37			

OTM: Olive Tail Moment, DT: DNA in Tail, TL: Tail Length

5.5 Bildnachweis

Abbildung 1.4: Azurblauer Pfeilgiftfrosch. In: <http://www.naturhistorisches-museum.de/bilder/pfeilgiftfrosch.jpg> (letzter Zugriff: 31.05.2010).

Abbildung 4.4: Aufbau des nAChR. In: Gotti, C., Clementi, F., 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74, 363-396.

Eigene Abbildungen: Abbildung 1.1 bis 1.3, Abbildung 1.5 bis 4.3.

5.6 Literatur

Arabi, M., 2004. Nicotinic infertility: assessing DNA and plasma membrane integrity of human spermatozoa. *Andrologia* 36, 305-310.

Argentin, G., Cicchetti, R., 2004. Genotoxic and antiapoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Toxicol Sci* 79, 75-81.

Argentin, G., Cicchetti, R., 2006. Evidence for the role of nitric oxide in antiapoptotic and genotoxic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Apoptosis* 11, 1887-1897.

Arredondo, J., Chernyavsky, A.I., Jolkovsky, D.L., Pinkerton, K.E., Grando, S.A., 2006. Receptor-mediated tobacco toxicity: cooperation of the Ras/Raf-1/MEK1/ERK and JAK-2/STAT-3 pathways downstream of alpha7 nicotinic receptor in oral keratinocytes. *FASEB J* 20, 2093-2101.

Aufderheide, M., Knebel, J.W., Ritter, D., 2003. An improved in vitro model for testing the pulmonary toxicity of complex mixtures such as cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* 55, 51-57.

Bajpayee, M., Dhawan, A., Parmar, D., Pandey, A.K., Mathur, N., Seth, P.K., 2002. Gender-related differences in basal DNA damage in lymphocytes of a healthy Indian population using the alkaline Comet assay. *Mutat Res* 520, 83-91.

Bandyopadhyaya, G., Sinha, S., Chattopadhyay, B.D., Chakraborty, A., 2008. Protective role of curcumin against nicotine-induced genotoxicity on rat liver under restricted dietary protein. *Eur J Pharmacol* 588, 151-157.

Bärlocher, F., 2008. *Biostatistik*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, pp. 91-92.

Barr, J., Sharma, C.S., Sarkar, S., Wise, K., Dong, L., Periyakaruppan, A., Ramesh, G.T., 2007. Nicotine induces oxidative stress and activates nuclear transcription factor kappa B in rat mesencephalic cells. *Mol Cell Biochem* 297, 93-99.

- Benimetskaya, L., Ayyanar, K., Kornblum, N., Castanotto, D., Rossi, J., Wu, S., Lai, J., Brown, B.D., Popova, N., Miller, P., McMicken, H., Chen, Y., Stein, C.A., 2006. Bcl-2 protein in 518A2 melanoma cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res* 12, 4940-4948.
- Beranek, D.T., 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat Res* 231, 11-30.
- Bhagwat, M., Gerlt, J.A., 1996. 3'- and 5'-strand cleavage reactions catalyzed by the Fpg protein from *Escherichia coli* occur via successive beta- and delta-elimination mechanisms, respectively. *Biochemistry* 35, 659-665.
- Bjelland, S., Seeberg, E., 2003. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutat Res* 531, 37-80.
- Blasiak, J., Gloc, E., Warszawski, M., 2002. A comparison of the in vitro genotoxicity of anticancer drugs idarubicin and mitoxantrone. *Acta Biochim Pol* 49, 145-155.
- Bogeski, I., Kummerow, C., Al-Ansary, D., Schwarz, E.C., Koehler, R., Kozai, D., Takahashi, N., Peinelt, C., Griesemer, D., Bozem, M., Mori, Y., Hoth, M., Niemeyer, B.A., 2010. Differential redox regulation of ORAI ion channels: a mechanism to tune cellular calcium signaling. *Sci Signal* 3, ra24.
- Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J., Jove, R., 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene* 19, 2474-2488.
- Bruin, J.E., Petre, M.A., Lehman, M.A., Raha, S., Gerstein, H.C., Morrison, K.M., Holloway, A.C., 2008. Maternal nicotine exposure increases oxidative stress in the offspring. *Free Radic Biol Med* 44, 1919-1925.
- Cheng, K.C., Cahill, D.S., Kasai, H., Nishimura, S., Loeb, L.A., 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G----T and A----C substitutions. *J Biol Chem* 267, 166-172.
- Cooke, J.P., Bitterman, H., 2004. Nicotine and angiogenesis: a new paradigm for tobacco-related diseases. *Ann Med* 36, 33-40.
- Crowley-Weber, C.L., Dvorakova, K., Crowley, C., Bernstein, H., Bernstein, C., Garewal, H., Payne, C.M., 2003. Nicotine increases oxidative stress, activates NF-kappaB and GRP78, induces apoptosis and sensitizes cells to genotoxic/xenobiotic stresses by a multiple stress inducer, deoxycholate: relevance to colon carcinogenesis. *Chem Biol Interact* 145, 53-66.
- Dekant, W., Wiebel, F., 2007. Toxikologie. In: Estler, C., Schmidt, E. (Eds.) *Pharmakologie und Toxikologie-Für Studium und Praxis*. Schattauer, Stuttgart, New York, pp. 973-1048.

- Egemnazarov, B., 2009. Role of NO-cGMP signalling pathway in mediation of ischemia-reperfusion lung injury <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/2009/7215/>, (letzter Zugriff: 31.05.2010).
- Egleton, R.D., Brown, K.C., Dasgupta, P., 2008. Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* 29, 151-158.
- Egleton, R.D., Brown, K.C., Dasgupta, P., 2009. Angiogenic activity of nicotinic acetylcholine receptors: implications in tobacco-related vascular diseases. *Pharmacol Ther* 121, 205-223.
- Eiberger, W., 2008. Einfluss von oxidativem Stress auf die DNAREparatur in Säugerzellen. <http://ubm.opus.hbz-nrw.de/volltexte/2008/1619/pdf/diss.pdf>, (letzter Zugriff: 31.05.2010).
- Faust, F., Kassie, F., Knasmüller, S., Boedecker, R.H., Mann, M., Mersch-Sundermann, V., 2004. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* 566, 209-229.
- Frazer-Abel, A.A., Baksh, S., Fosmire, S.P., Willis, D., Pierce, A.M., Meylemans, H., Linthicum, D.S., Burakoff, S.J., Coons, T., Bellgrau, D., Modiano, J.F., 2004. Nicotine activates nuclear factor of activated T cells c2 (NFATc2) and prevents cell cycle entry in T cells. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 758-769.
- Ginzkey, C., Kampfinger, K., Friehs, G., Kohler, C., Hagen, R., Richter, E., Kleinsasser, N.H., 2009. Nicotine induces DNA damage in human salivary glands. *Toxicol Lett* 184, 1-4.
- Gotti, C., Clementi, F., 2004. Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology. *Prog Neurobiol* 74, 363-396.
- Guo, J., Chu, M., Abbeyquaye, T., Chen, C.Y., 2005. Persistent nicotine treatment potentiates amplification of the dihydrofolate reductase gene in rat lung epithelial cells as a consequence of Ras activation. *J Biol Chem* 280, 30422-30431.
- Haberberger, R.V., Henrich, M., Lips, K.S., Kummer, W., 2003. Nicotinic receptor alpha 7-subunits are coupled to the stimulation of nitric oxide synthase in rat dorsal root ganglion neurons. *Histochem Cell Biol* 120, 173-181.
- Harreus, U.A., Kleinsasser, N.H., Zieger, S., Wallner, B., Reiter, M., Schuller, P., Berghaus, A., 2004. Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 563, 131-138.

- Heeschen, C., Jang, J.J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R.S., Tsao, P.S., Johnson, F.L., Cooke, J.P., 2001. Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* 7, 833-839.
- Heeschen, C., Weis, M., Aicher, A., Dimmeler, S., Cooke, J.P., 2002. A novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest* 110, 527-536.
- Hoffmann, H., Hogel, J., Speit, G., 2005. The effect of smoking on DNA effects in the comet assay: a meta-analysis. *Mutagenesis* 20, 455-466.
- Hoffmann, H., Speit, G., 2005. Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res* 581, 105-114.
- Horn, F.L., G.; Moc, I.; Grillhösl, C.; Berghold, S.; Schneider, N.; Münster, B., 2002. Angriffe auf unser Erbgut. *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, pp. 306-329.
- Hukkanen, J., Jacob, P., 3rd, Benowitz, N.L., 2005. Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* 57, 79-115.
- IARC, 2010. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1–100. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/index.php>, (letzter Zugriff: 31.05.2010).
- Kar Mahapatra, S., Chakraborty, S.P., Majumdar, S., Bag, B.G., Roy, S., 2009. Eugenol protects nicotine-induced superoxide mediated oxidative damage in murine peritoneal macrophages in vitro. *Eur J Pharmacol* 623, 132-140.
- Kawamoto, H., Takumida, M., Takeno, S., Watanabe, H., Fukushima, N., Yajin, K., 1998. Localization of nitric oxide synthase in human nasal mucosa with nasal allergy. *Acta Otolaryngol Suppl* 539, 65-70.
- Keiger, C.J., Case, L.D., Kendal-Reed, M., Jones, K.R., Drake, A.F., Walker, J.C., 2003. Nicotinic cholinergic receptor expression in the human nasal mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112, 77-84.
- Kleinsasser, N.H., Harreus, U.A., Gamarra, F., Driemel, O., Hagen, R., Buehrlen, M., 2009. Cytochrome P4502A6 stability in a mini organ culture model of human nasal mucosa for genotoxicology studies as detected by flow cytometry. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 266, 385-389.
- Kleinsasser, N.H., Juchhoff, J., Wallner, B.C., Bergner, A., Harreus, U.A., Gamarra, F., Buehrlen, M., Huber, R.M., Rettenmeier, A.W., 2004a. The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res* 561, 63-73.

- Kleinsasser, N.H., Sassen, A.W., Semmler, M.P., Harreus, U.A., Licht, A.K., Richter, E., 2005. The tobacco alkaloid nicotine demonstrates genotoxicity in human tonsillar tissue and lymphocytes. *Toxicol Sci* 86, 309-317.
- Kleinsasser, N.H., Sassen, A.W., Semmler, M.P., Staudenmaier, R., Harreus, U.A., Richter, E., 2006. [Does nicotine add to the carcinogenic strain of tobacco smoke?]. *HNO* 54, 369-372, 374-365.
- Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Harreus, U.A., Kleinjung, T., Folwaczny, M., Hickel, R., Kehe, K., Reichl, F.X., 2004b. Genotoxicity and cytotoxicity of dental materials in human lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (comet) assay. *J Dent* 32, 229-234.
- Kleinsasser, N.H., Wallner, B.C., Kastenbauer, E.R., Muenzenrieder, R.K., Harreus, U.A., 2000. Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutat Res* 467, 21-30.
- Kovacic, P., Cooksy, A., 2005. Iminium metabolite mechanism for nicotine toxicity and addiction: Oxidative stress and electron transfer. *Med Hypotheses* 64, 104-111.
- Lee, H.J., Guo, H.Y., Lee, S.K., Jeon, B.H., Jun, C.D., Park, M.H., Kim, E.C., 2005. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med* 34, 436-443.
- Lindell, G., Lunell, E., Graffner, H., 1996. Transdermally administered nicotine accumulates in gastric juice. *Eur J Clin Pharmacol* 51, 315-318.
- Lu, Y., Morimoto, K., 2008. Exposure level to cigarette tar or nicotine is associated with leukocyte DNA damage in male Japanese smokers. *Mutagenesis* 23, 451-455.
- Mai, H., May, W.S., Gao, F., Jin, Z., Deng, X., 2003. A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* 278, 1886-1891.
- Malins, D.C., Hellstrom, K.E., Anderson, K.M., Johnson, P.M., Vinson, M.A., 2002. Antioxidant-induced changes in oxidized DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 5937-5941.
- Marks, M.J., Lavery, D.S., Whiteaker, P., Salminen, O., Grady, S.R., McIntosh, J.M., Collins, A.C., 2010. John Daly's compound, epibatidine, facilitates identification of nicotinic receptor subtypes. *J Mol Neurosci* 40, 96-104.
- McKenna, D.J., McKeown, S.R., McKelvey-Martin, V.J., 2008. Potential use of the comet assay in the clinical management of cancer. *Mutagenesis* 23, 183-190.

- Merk, O., Speit, G., 1999. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity. *Environ Mol Mutagen* 33, 167-172.
- Merkle, H.P., Ditzinger, G., Lang, S.R., Peter, H., Schmidt, M.C., 1998. In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 29, 51-79.
- Modlinger, P.S., Wilcox, C.S., Aslam, S., 2004. Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Semin Nephrol* 24, 354-365.
- Montenarh, M., 2007. Veränderungen der DNA-Sequenz. In: Löffler, G., Petrides, P., Heinrich, P. (Eds.) *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, Heidelberg, pp. 236-241.
- Mueller, C., 1996. Epibatidin-ein nicotinartiges, analgetisch wirksames Alkaloid aus Pfeilgiftfröschen. *Pharmazie in Unserer Zeit* 25, 85-92.
- Muthukumaran, S., Sudheer, A.R., Nalini, N., Menon, V.P., 2008. Effect of quercetin on nicotine-induced biochemical changes and DNA damage in rat peripheral blood lymphocytes. *Redox Rep* 13, 217-224.
- Nair, U., Thielmann, H.W., Pötschke-Langer, M., 2009. *Krebserzeugende Substanzen im Tabakrauch*. Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, http://www.tabakkontrolle.de/pdf/FzR_Kanzerogene_im_Tabakrauch.pdf, (letzter Zugriff: 31.05.2010).
- O'Rourke, E.J., Chevalier, C., Pinto, A.V., Thiberge, J.M., Ielpi, L., Labigne, A., Radicella, J.P., 2003. Pathogen DNA as target for host-generated oxidative stress: role for repair of bacterial DNA damage in *Helicobacter pylori* colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2789-2794.
- Oberholzer, M.J., 2001. Zellschädigung. *Pathologie verstehen: molekulare Grundlagen der allgemeinen Pathologie*. Thieme, Stuttgart; New York, pp. 1-16.
- Olive, P.L., Banath, J.P., 1993. Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res* 294, 275-283.
- Ollikainen, T., Knuutila, A., Suhonen, S., Taavitsainen, M., Jekunen, A., Mattson, K., Linnainmaa, K., 2000. In vitro sensitivity of normal human mesothelial and malignant mesothelioma cell lines to four new chemotherapeutic agents. *Anticancer Drugs* 11, 93-99.
- Østling, O., Johanson, K.J., 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123, 291-298.

- Panayiotidis, M., Tsolas, O., Galaris, D., 1999. Glucose oxidase-produced H₂O₂ induces Ca²⁺-dependent DNA damage in human peripheral blood lymphocytes. *Free Radic Biol Med* 26, 548-556.
- Papadopoulou, S., Hartmann, P., Lips, K.S., Kummer, W., Haberberger, R.V., 2004. Nicotinic receptor mediated stimulation of NO-generation in neurons of rat thoracic dorsal root ganglia. *Neurosci Lett* 361, 32-35.
- Park, I.S., Park, J.K., Koh, H.Y., Park, S.D., 1991. DNA single stranded gaps formed during DNA repair synthesis induced by methyl methanesulfonate are filled by sequential action of aphidicolin- and dideoxythymidine sensitive DNA polymerases in HeLa cells. *Cell Biol Toxicol* 7, 49-58.
- Parzefall, W., Neuberger, M., Schulte-Hermann, R., 2005. Die Karzinogene des Tabakrauchs. <http://www.aerzteinitiative.at/Karzinogene05.pdf>, (letzter Zugriff: 31.05.2010).
- Pedrali-Noy, G., Spadari, S., Miller-Faures, A., Miller, A.O., Kruppa, J., Koch, G., 1980. Synchronization of HeLa cell cultures by inhibition of DNA polymerase alpha with aphidicolin. *Nucleic Acids Res* 8, 377-387.
- Pfuhler, S., Wolf, H.U., 1996. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay. *Environ Mol Mutagen* 27, 196-201.
- Phillips, H., 1973. Dye exclusion test for cell viability. In: Kruse, P. (Ed.) *Tissue Culture Methodes and Applications*. Academic Press, New York, pp. 406-408.
- Pogun, S., Demirgoren, S., Taskiran, D., Kanit, L., Yilmaz, O., Koylu, E.O., Balkan, B., London, E.D., 2000. Nicotine modulates nitric oxide in rat brain. *Eur Neuropsychopharmacol* 10, 463-472.
- Pötschke-Langer, M., Mons, U., Schaller, K., Stein, S., Kahnert, S., Schneider, N., Nair, U., Schunk, S., Mersmann, H., 2009. *Tabakatlas Deutschland 2009*. Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, http://www.tabakkontrolle.de/pdf/Tabakatlas_2009.pdf, (letzter Zugriff: 31.05.2010).
- Reinberger, S., Kahnert, S., Schaller, K., Mons, U., Gleich, F., Nair, U., Kienle, U., Pötschke-Langer, M., 2009. *Umweltrisiko Tabak - von der Pflanze zur Kippe*. Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, http://www.tabakkontrolle.de/pdf/Umweltrisiko_Tabak_Band11.pdf, (letzter Zugriff: 31.05.2010).
- Sassen, A.W., Richter, E., Semmler, M.P., Harreus, U.A., Gamarra, F., Kleinsasser, N.H., 2005a. Genotoxicity of nicotine in mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia. *Toxicol Sci* 88, 134-141.

- Sassen, A.W., Richter, E., Semmler, M.P., Harreus, U.A., Gamarra, F., Kleinsasser, N.H., 2005b. Genotoxicity of nicotine in mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia. *Toxicol Sci* 88, 134-141.
- Schenk, M., Schaller, K., Pötschke-Langer, M., 2008. Tabakrauch - ein Giftgemisch. Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg, http://www.tabakkontrolle.de/pdf/FzR_Giftgemisch.pdf, (letzter Zugriff: 31.05.2010).
- Schmezer, P., Rajae-Behbahani, N., Risch, A., Thiel, S., Rittgen, W., Drings, P., Dienemann, H., Kayser, K.W., Schulz, V., Bartsch, H., 2001. Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis* 16, 25-30.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175, 184-191.
- Spande, T.F., Garraffo, H.M., Edwards, M.W., Yeh, H.J., Pannell, L., Daly, J.W., 1992. Epibatidine: A Novel (Chloropyridyl)azabicycloheptane with Potent Analgesic Activity from an Ecuadoran Poison Frog. *J Am Chem Soc* 114, 3475-3478.
- Speit, G., Hartmann, A., 1995. The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10, 555-559.
- Speit, G., Hartmann, A., 1999. The comet assay (single-cell gel test). A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. *Methods Mol Biol* 113, 203-212.
- Speit, G., Schutz, P., Bonzheim, I., Trenz, K., Hoffmann, H., 2004a. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay. *Toxicol Lett* 146, 151-158.
- Speit, G., Schutz, P., Hoffmann, H., 2004b. Enhancement of genotoxic effects in the comet assay with human blood samples by aphidicolin. *Toxicol Lett* 153, 303-310.
- Speit, G., Witton-Davies, T., Heepchantree, W., Trenz, K., Hoffmann, H., 2003. Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat Res* 542, 33-42.
- Spitz, M.R., Wei, Q., Dong, Q., Amos, C.I., Wu, X., 2003. Genetic susceptibility to lung cancer: the role of DNA damage and repair. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 689-698.
- Starke, K., 2005. Pharmakologie cholinergischer Systeme. In: Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. (Eds.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, München, pp. 147-171.

- Stuehr, D.J., Cho, H.J., Kwon, N.S., Weise, M.F., Nathan, C.F., 1991. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 7773-7777.
- Sudheer, A.R., Muthukumar, S., Devipriya, N., Devaraj, H., Menon, V.P., 2008. Influence of ferulic acid on nicotine-induced lipid peroxidation, DNA damage and inflammation in experimental rats as compared to N-acetylcysteine. *Toxicology* 243, 317-329.
- Sudheer, A.R., Muthukumar, S., Kalpana, C., Srinivasan, M., Menon, V.P., 2007. Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: a comparison with N-acetylcysteine. *Toxicol In Vitro* 21, 576-585.
- Swami, S., Suryakar, A.N., Katkam, R.V., Kumbar, K.M., 2006. Absorption of nicotine induces oxidative stress among bidi workers. *Indian J Public Health* 50, 231-235.
- Taylor, B.S., Geller, D.A., 2000. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock* 13, 413-424.
- Teissier, E., Fennrich, S., Strazielle, N., Daval, J.L., Ray, D., Schlosshauer, B., Ghersi-Egea, J.F., 1998. Drug metabolism in in vitro organotypic and cellular models of mammalian central nervous system: activities of membrane-bound epoxide hydrolase and NADPH-cytochrome P-450 (c) reductase. *Neurotoxicology* 19, 347-355.
- Teneggi, V., Squassante, L., Iavarone, L., Milleri, S., Bye, A., Gomeni, R., 2002. Correlation and predictive performances of saliva and plasma nicotine concentration on tobacco withdrawal-induced craving. *Br J Clin Pharmacol* 54, 407-414.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35, 206-221.
- Tonnessen, B.H., Severson, S.R., Hurt, R.D., Miller, V.M., 2000. Modulation of nitric oxide synthase by nicotine. *J Pharmacol Exp Ther* 295, 601-606.
- Trivedi, A.H., Dave, B.J., Adhvaryu, S.G., 1990. Assessment of genotoxicity of nicotine employing in vitro mammalian test system. *Cancer Lett* 54, 89-94.
- Undeger, U., Basaran, N., 2002. Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Arch Toxicol* 76, 430-436.

- WHO, 2003. WHO Framework Convention on Tobacco Control. Genf, http://www.tabakkontrolle.de/pdf/FCTC_englische_Version.pdf, (letzter Zugriff: 31.05.2010).
- Wongsriraksa, A., Parsons, M.E., Whelan, C.J., 2009. Characterisation of nicotine receptors on human peripheral blood mononuclear cells (PBMC). *Inflamm Res* 58, 38-44.
- Wu, H.J., Chi, C.W., Liu, T.Y., 2005. Effects of pH on nicotine-induced DNA damage and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A* 68, 1511-1523.
- Ye, Y.N., Liu, E.S., Shin, V.Y., Wu, W.K., Cho, C.H., 2004. The modulating role of nuclear factor-kappaB in the action of alpha7-nicotinic acetylcholine receptor and cross-talk between 5-lipoxygenase and cyclooxygenase-2 in colon cancer growth induced by 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *J Pharmacol Exp Ther* 311, 123-130.
- Yogeeswari, P., Sriram, D., Ratan Bal, T., Thirumurugan, R., 2006. Epibatidine and its analogues as nicotinic acetylcholine receptor agonist: an update. *Nat Prod Res* 20, 497-505.
- Zayas, R.M., Qazi, S., Morton, D.B., Trimmer, B.A., 2002. Nicotinic-acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons. *J Neurochem* 83, 421-431.
- Zeidler, R., Albermann, K., Lang, S., 2007. Nicotine and apoptosis. *Apoptosis* 12, 1927-1943.
- Zheng, W., He, J.L., Jin, L.F., Lou, J.L., Wang, B.H., 2005. Assessment of human DNA repair (NER) capacity with DNA repair rate (DRR) by comet assay. *Biomed Environ Sci* 18, 117-123.

5.7 Publikation

Kongressbeitrag:

- Koch, R., Ginzkey, C., Friehs, G., Kleinsasser, N.H.: Modulation Nikotin induzierter DNA-Schäden an humanen Lymphozyten und nasaler Mukosa; 81. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Wiesbaden (2010).

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen danke ich für die Möglichkeit, eine experimentelle Arbeit im Fachgebiet der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde durchführen zu können.

Herrn Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser danke ich für die Überlassung des Promotionsthemas sowie für die kontinuierliche Unterstützung und Förderung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit und für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft bei der Auswertung und Niederschrift meiner Ergebnisse.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Robert Mlynski danke ich für die Übernahme des Koferates.

Herrn Dr. med. Christian Ginzkey danke ich für die intensive Betreuung meiner Promotionsarbeit von der Durchführung der experimentellen Versuche bis zur Fertigstellung dieser Arbeit.

Frau Dipl. Biol. Gudrun Friehs danke ich für die vielen hilfreichen Ratschläge zu den experimentellen Methoden und ihre stets freundliche Unterstützung bei der Auswertung meiner Ergebnisse.

Für die freundlichen Hilfestellungen zu den verschiedenen Labortechniken bedanke ich mich bei allen Mitarbeiterinnen und -mitarbeitern des Labors, im Besonderen bei Frau Petra Joa, Herrn Michael Kessler, Frau Ursula Kepp sowie Frau Marga Appelman.

Meinen Promotionskolleginnen und -kollegen danke ich für die gute Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe und für die vielen anregenden Gespräche.

Mein herzlichstes Dankeschön gilt meinen lieben Eltern für ihre andauernde moralische und finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Promotion. Ohne sie wäre die vorliegende Arbeit in dieser Form sicherlich nicht möglich gewesen.