

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

**Differenzierung Nikotin induzierter Zellschäden in Epithelien des  
oberen und unteren Aerodigestivtraktes**

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

vorgelegt von  
Thomas Stüber  
aus Marburg

**Würzburg, Dezember 2010**

**Referent:** Prof. Dr. N. Kleinsasser

**Koreferent:** PD. Dr. R. Mlynski

**Dekan:** Prof. Dr. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung :**

22.02.2011

**Der Promovend ist Arzt**

<b>1. Einleitung</b>		
<b>1.1</b>	<b>Tabak und Krebs</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Anatomie und Histologie der oberen und unteren Atemwege	2
1.1.3	Tumoren der oberen und unteren Atemwege	3
<b>1.2</b>	<b>Nikotin</b>	<b>6</b>
1.2.1	Chemische und pharmakologische Eigenschaften	6
1.2.2	Biologische Wirkung	7
<b>1.3</b>	<b>Zellbiologische Grundlagen</b>	<b>8</b>
1.3.1.	Zellzyklus	8
1.3.2	DNA-Schäden und ihre Entstehung	9
1.3.3	Apoptose	10
<b>1.4</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>12</b>
<b>2. Material und Methoden</b>		
<b>2.1</b>	<b>Verwendete Zellsysteme</b>	<b>13</b>
2.1.1	Humane bronchiale Epithelzelllinie	13
2.1.2	Bronchiale Schleimhaut	13
2.1.3	Nasenschleimhaut	13
<b>2.2</b>	<b>Verwendete Substanzen</b>	<b>14</b>
2.2.1	Nikotin	14
2.2.2	Mecamylamin	14
2.2.3	N-Acetylcystein	14
2.2.4	Methylmethansulfonat	15
2.2.5	Mitomycin C	15
<b>2.3</b>	<b>Einzelzellgewinnung und Zellkultivierung</b>	<b>16</b>
2.3.1	Kultivierung Zelllinie Beas 2b	16
2.3.2	Einzelzellgewinnung aus humaner bronchialer Schleimhaut	16
2.3.3	Einzelzellgewinnung aus Nasenschleimhaut	17
<b>2.4</b>	<b>Zellzählung und Vitalitätstest</b>	<b>18</b>
<b>2.5</b>	<b>Comet Assay</b>	<b>18</b>
2.5.1	Grundlagen des Assays	18
2.5.2	Fremdstoffexposition	19
2.5.3	Getestete Stoffkonzentrationen	19
2.5.4	Technik der Comet Assay Versuche	20

<b>2.6</b>	<b>Durchflusszytometrie</b>	23
2.6.1	Grundlagen der Messtechnik	23
2.6.2	Fremdstoffexposition	23
2.6.3	Getestete Stoffkonzentrationen	24
2.6.4	Zellzyklusmessung	24
2.6.5	Annexin-V-Apoptosemessung	24
2.6.6	Apoptosemessung mit dem TUNEL-Assay	26
<b>2.7</b>	<b>Verwendete Geräte und Reagenzien</b>	27
<b>2.8</b>	<b>Ergebnisauswertung und graphische Darstellung</b>	29
2.8.1	Ergebnisanalyse für den Comet Assay	29
2.8.2	Ergebnisdarstellung für den Comet Assay	29
2.8.3	Ergebnisanalyse der Durchflusszytometrie	30
2.8.4	Ergebnisdarstellung der Durchflusszytometrie	30
2.8.5	Statistische Verfahren	30
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	
<b>3.1</b>	<b>Ergebnisse aus den Versuchen mit dem Comet Assay</b>	32
3.1.1	Zelllinienversuche	32
3.1.2	Ergebnisse der Versuche mit humaner Bronchialschleimhaut	35
3.1.3	Ergebnisse der Versuche mit humaner Nasenschleimhaut	36
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse aus den Versuchen mit dem Durchflusszytometer</b>	41
3.3.1	Apoptosemessung mit Annexin V	41
3.3.2	Apoptose im Tunel-Assay	42
3.3.3	Zellzyklus	43
3.3.3	Zusammenfassung der Daten	48
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methodik</b>	49
4.1.1	Verwendete Gewebe und Präparationsmethoden	49
4.1.2	Comet Assay	51
<b>4.2</b>	<b>Diskussion der Ergebnisse</b>	51
4.2.1	Genotoxizität von Nikotin	51
4.2.2	Mechanismen der DNA-Schädigung	53
4.2.3	Einfluss von Nikotin auf Apoptose und Zellzyklus	55
<b>4.3</b>	<b>Ausblick</b>	57

<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	
5.1	Zusammenfassung	58
<b>6.</b>	<b>Abbildungs- und Literaturverzeichnis</b>	
6.1	Abbildungen	59
6.2	Literatur	59
<b>7.</b>	<b>Anhang</b>	
7.1	Kongressbeiträge	
7.2	Danksagung	
7.3	Lebenslauf	

---

## Verwendete Abkürzungen und chemische Formeln

AP-Läsion	apurinische/apyrimidinische Läsion
APC	Allophycocyanin
BEG-Medium	Bronchial Epithelial Growth Medium
BSA	Bovines Serum Albumin
CYP2A6	Cytochrom P450 2A6
DME-Medium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinacid
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetal Calf Serum
FSC	Front Scatter
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
1n/2n	haploider/diploider Chromosomensatz
Mec	Mecamylamin
MMC	Mitomycin C
MMS	Methylmethansulfonat
NAC	n-Acetylcystein
nAChR	nikotinerger Acetylcholinrezeptor
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Nik	Nikotin
OH-Radikal	Hydroxyl-Radikal
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PI	Propidiumjodid
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Medium
SH-Gruppe	Thiol-Gruppe
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
SSC	Side Scatter

# Einleitung

Tabakrauchen stellt in den Industriestaaten heute das bedeutendste, gleichzeitig vermeidbare Gesundheitsrisiko dar. Neben Erkrankungen des kardiovaskulären Systems wird Tabakkonsum für ein Drittel aller malignen neoplastischen Erkrankungen verantwortlich gemacht [John und Hanke, 2002]. Tabakrauch enthält über 4000 charakterisierte Inhaltsstoffe. Einige dieser Substanzen, wie etwa polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder tabakspezifische Nitrosamine, sind hinsichtlich ihrer Bedeutung in der Kanzerogenese wissenschaftlich gut untersucht. Für das Hauptalkaloid des Zigarettenrauches Nikotin hingegen ist das kanzerogene Potential bisher unzureichend erfasst.

In zellulären Modellen, wie etwa in humanem Tonsillengewebe oder in Miniorgankulturen des oberen Atemtraktes, konnten DNA-Schäden durch Inkubation mit Nikotin induziert werden [Sassen et al., 2005]. Darüber hinaus führte die Inkubation von Nikotin in einigen Versuchen zu antiapoptotischen Effekten, die einen wichtigen Aspekt der nikotininduzierten Kanzerogenese darstellten könnten [Zhang et al., 2006].

## 1.1 Tabak und Krebs

### 1.1.1 Epidemiologie

In der Bundesrepublik Deutschland rauchen 37% der volljährigen Männer und 27% der volljährigen Frauen [Lampert und Schulze, 2006]. Es wird geschätzt, dass weltweit ungefähr 1,3 Milliarden Menschen Tabakprodukte in Form von Zigarettenrauch konsumieren [Guindon und Boisclair, 2003]. Jährlich versterben etwa 5,4 Millionen Menschen an den Folgen des Tabakkonsums [Ezzati und Lopez, 2003]. Aktuellen Hochrechnungen folgend, wird diese Zahl bis 2030 auf 8,3 Millionen ansteigen, wobei dies zu 80% Einwohner von Entwicklungs- und Schwellenländern betreffen wird [Mathers und Loncar, 2006].

Neben kardiovaskulären Erkrankungen stehen dabei Krebserkrankungen an der Spitze der Tabak assoziierten Todesursachenstatistik. Das Risiko für die Entstehung von Tumoren in unterschiedlichen Organsystemen wie Ösophagus, Harnblase, Pankreas und Niere ist durch Tabakrauchen erhöht. Im Vordergrund stehen aber vor allem Malignome

der oberen und unteren Atemwege [Sasco et al., 2004], unter denen das Bronchialkarzinom auf Grund seiner Kombination von hoher Inzidenz und schlechter Prognose eine herausragende Stellung einnimmt.

### **1.1.2 Anatomie und Histologie der oberen und unteren Atemwege**

Die Aufgabe der Atemwege umfasst die Erwärmung, Leitung, Befeuchtung sowie die Reinigung der eingeatmeten Luft. Da in den Atemwegen kein Gasaustausch stattfindet, bezeichnet man den von ihnen umschlossenen Raum atmungsphysiologisch als anatomischen Totraum.

Generell unterscheidet man die oberen von den unteren Atemwegen: zu den oberen werden die Nase mit ihren Nebenhöhlen, Rachen und Kehlkopf gezählt, während die distal des Kehlkopfes gelegenen Anteile des luftleitenden Systems als die unteren Atemwege bezeichnet werden.

Die Nase und die Nasennebenhöhlen werden als sinunasaler Raum zusammengefasst. Die Oberflächen der Nasennebenhöhlen sind ausschließlich von respiratorischem Epithel bedeckt. Hingegen lassen sich in der eigentlichen Nasenhöhle eine Regio respiratoria und eine Regio olfactoria histologisch voneinander abgrenzen. Bei der Regio olfactoria handelt es sich um einen vornehmlich auf der oberen Nasenmuschel lokalisierten Bereich, der einen Teil des menschlichen Geruchsorgans darstellt. Die Regio respiratoria ist wie andere Regionen der Atemwege mit respiratorischem Epithel bedeckt. Bei respiratorischem Epithel handelt es sich um ein mehrreihiges, hochprismatisches, Kinozilienbesetztes Epithel, das von Becherzellen durchsetzt ist. Die schleimproduzierenden Becherzellen und das Flimmerepithel bilden den sogenannten mukoziliären Apparat und dienen der Reinigung der Atemwege. Die Dichte der Becher- und Flimmerepithelzellen variiert je nach anatomischer Lokalisation im Atemtrakt.

Die unteren Luftwege umfassen die Trachea und den sich ihr anschließenden Bronchialbaum. Der Bronchialbaum ist ein System sich teilender und verengender Röhren, beginnend mit dem linken beziehungsweise rechten Stammbronchus. Im Anschluss folgen die Lappenbronchien, die sich weiter in Segmentbronchien, kleinere Bronchioli lobulares und schließlich in Bronchioli respiratorii verästeln, denen sich der für den Gasaustausch wichtige Alveolarraum anschließt.

Der Wandaufbau der unteren Atemwege ist grundsätzlich ähnlich und gliedert sich in die Tunica mucosa, Tunica fibromusculocartilaginea und Tunica adventitia, wobei die Bezeichnung der bronchialen Wandschichten in der Literatur uneinheitlich gehandhabt wird. Die Trachea sowie die größeren Bronchien werden, wie auch Nase und Nasennebenhöhlen, von respiratorischem Epithel ausgekleidet.

In den distaleren Abschnitten des Bronchialbaums ändert sich die epitheliale Auskleidung. Die Bronchioli lobulares sind von einem einschichtigen Flimmerepithel bedeckt, das Epithel der Bronchioli respiratorii ist einschichtig prismatisch oder kubisch und es finden sich nur noch einzelne Flimmerzellen [Welsch, 2003].

### **1.1.3 Tumoren der oberen und unteren Atemwege**

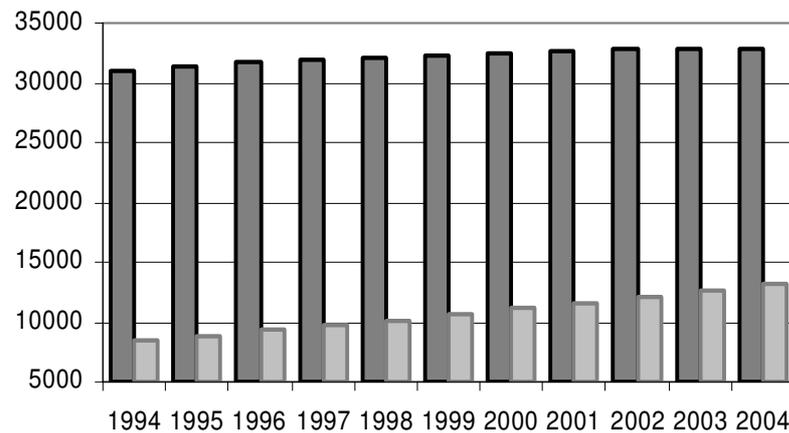
Im Gegensatz zu den Tumoren des Bronchialepithels sind Malignome der Nase- und Nasennebenhöhlen sehr selten. Sie machen lediglich 3-4 Prozent aller Kopf- und Halstumoren aus und sind für weniger als 1 Prozent aller Krebstoten in den westlichen Industriestaaten verantwortlich. In Japan ist die Inzidenz mit 4 Fällen auf 100000 Einwohnern beträchtlich höher als in den Vereinigten Staaten und Europa, wo laut Statistik 0,8 Erkrankungen pro 100000 Einwohner auftreten [Götte und Hörmann, 2004]. Ätiologisch stehen in den westlichen Industriestaaten inhalative Substanzen als Risikofaktoren im Vordergrund. Zu den epidemiologisch gesicherten Substanzen zählen Holzstäube sowie Nickel und Chromverbindungen. Zigarettenkonsum geht mit einer Steigerung des relativen Erkrankungsrisikos um das 1,5 bis 2,5-fache einher [Sasco et al., 2004].

50-70 Prozent der Tumoren treten primär im Sinus maxillaris, 15-30 Prozent in der Nasenhaupthöhle und 10-15 Prozent im Sinus ethmoidalis auf. Histopathologisch sind die Tumoren der Nase und ihrer Nebenhöhlen uneinheitlich. Neben Plattenepithel- und Adenokarzinomen sind Adenoidzystische- und Zylinderzellkarzinome häufig. Mit Zigarettenkonsum sind vor allem Plattenepithelkarzinome assoziiert [Sasco et al., 2004].

Therapeutisch werden meist Kombinationen aus operativer Therapie und anschließender Radiotherapie in kurativer Absicht eingesetzt. Eine Chemotherapie kommt allenfalls adjuvant oder in palliativen Erkrankungsfällen zur Anwendung. Die 5-

Jahresüberlebensrate liegt für alle Tumoren im Mittel bei etwa 50%. Unterschiedliche histopathologische Tumortypen weichen davon aber zum Teil stark ab.

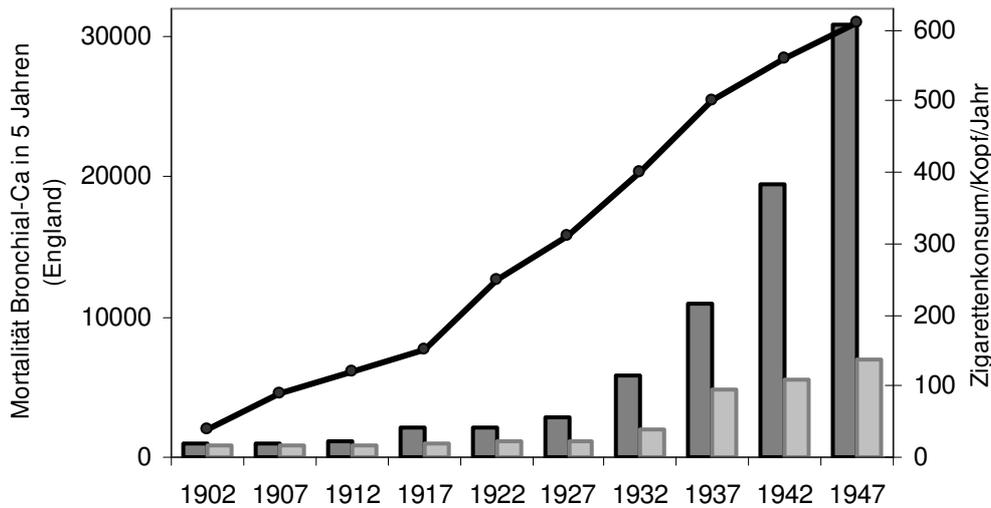
Maligne Neoplasien der Lunge sind für 25 Prozent aller Karzinome des Menschen verantwortlich. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen der 5. und 6. Dekade.



**Abb. 1-1** Lungenkrebsinzidenz in Deutschland von 1994 bis 2004 nach epidemiologischer Erhebung des Robert Koch Institutes (Frauen hell, Männer dunkel) [Robert-Koch-Institut, 2009]. Die Inzidenz bei Männern ist stagnierend. Bei Frauen ist ein leichter Anstieg zu verzeichnen, der vermutlich mit einer Zunahme der weiblichen Zigarettenkonsumenten zu erklären ist.

Die Lungenkrebsinzidenz beträgt 60 Fälle pro 100000 Einwohner und stellt die häufigste Krebstodesursache bei Männern und die dritthäufigste Krebstodesursache bei Frauen dar.

90% der Bronchialkarzinome werden durch Tabakkonsum verursacht, wobei Dauer und Ausmaß des Zigarettenkonsums gemessen in Packungsjahren (pack years, py) das Erkrankungsrisiko bestimmen. Epidemiologische Studien zum Zusammenhang zwischen Zigarettenkonsum und Lungenkrebsinzidenz wiesen bereits in den 50er Jahren auf die gesundheitlichen Gefahren des Tabakkonsums hin [Doll, 1957; Kennaway, 1957]. Neben dem Zigarettenkonsum werden berufliche Karzinogene für schätzungsweise 5% der Malignome verantwortlich gemacht. Asbest spielt dabei neben Nickel und Chromverbindungen die mit Abstand wichtigste Rolle.



**Abb. 1-2** Korrelation von Zigarettenkonsum (Liniendiagramm) und Häufigkeit von Lungentumoren (Säulendiagramm Männer dunkel, Frauen hell) in England und Wales nach Kennaway 1957.

Histopathologisch werden die Tumoren der Lunge in kleinzellige Bronchialkarzinome, die ein Viertel aller Lungenmalignome ausmachen, und die verbleibenden nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome unterteilt. Die nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinome können je nach Ursprungsgewebe weiter in Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome unterteilt werden. Die peripher lokalisierten Adenokarzinome stellen die häufigste Lungenkrebsform des Nichtraucherers dar.

Weil Frühsymptome meist fehlen, sind zum Zeitpunkt der Diagnosestellung 2/3 der Patienten bereits inoperabel. Dies erklärt auch die insgesamt schlechte 5-Jahresüberlebensrate aller Patienten von nur 5% [Piper, 2007].

## 1.2 Nikotin

### 1.2.1 Chemische und pharmakologische Eigenschaften

Nikotin ist ein in Tabakpflanzen und anderen Nachtschattengewächsen natürlich vorkommendes Alkaloid. Es wirkt dort als

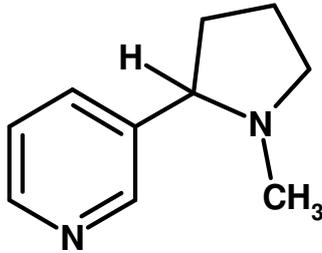


Abb. 1-3 Strukturformel von Nikotin

biologisches Insektizid. Der Mensch nimmt es vornehmlich durch Rauch-, Schnupf- und Kautabakkonsum, Nikotinkaugummis oder Pflaster zur Zigarettenentwöhnung auf. Chemisch betrachtet handelt es sich um ein Amin, welches ein aromatisches Pyridingrundgerüst sowie ein tertiäres Amin in der Seitengruppe enthält. Nikotin besitzt ein

Stereozentrum und kommt in der Natur als (S)-Nikotin vor. Die IUPAC Bezeichnung ist (S)-(-)-3-(1-Methyl-pyrrolidin-2-yl)-pyridin. Nikotin ist schwach basisch mit einem pKa-Wert von 7,84. Die Höhe der oralen, nasalen und alveolären Resorptionsrate des Nikotins ist pH-Wert abhängig. Der pH-Wert des Zigarettenrauches beträgt markenabhängig um 5,5. Das bei diesem pH-Wert hauptsächlich protonierte Nikotin wird oral und nasal nur schlecht resorbiert. Bedingt durch den pH-Wert der Alveolarflüssigkeit von 7,5 sind inhalierte Nikotinmoleküle in der Lunge zu 30% ungeladen und werden schnell über die Alveolarmembranen ins Blut aufgenommen. Auf Grund der großen Alveolarfläche wird das inhalierte Nikotin nahezu vollständig resorbiert.

Bei Rauchern werden abhängig von individueller Inhalationstiefe und markenabhängigem Nikotingehalt Plasmanikotinspiegel von bis zu 30 ng/ml gemessen. Bei der Anwendung von Nikotinplastern finden sich im pharmakologischen Gleichgewichtszustand (Steady State) durchschnittliche Nikotinplasmakonzentrationen zwischen 10 und 20 ng/ml, bei der Anwendung von Nikotinkaugummis liegen die gemessenen Konzentrationen im Bereich von 5 bis 15 ng/ml [Hukkanen et al., 2005].

Die Plasmahalbwertszeit von Nikotin ist mit 2 Stunden kurz, die Proteinbindung mit weniger als 5% gering. Der Abbau erfolgt hauptsächlich Cytochrom-P450-2A6 (CYP2A6) vermittelt zu Kotinin und Pyridinmethylaminobuttersäure [Yamazaki et al., 1999]. Die Cytochrome sind eine Familie mischfunktioneller Monooxygenasen und

spielen eine zentrale Rolle im oxidativen Metabolismus einer Vielzahl von Substanzen. Sie sind am endoplasmatischen Retikulum der Zellen lokalisiert und katalysieren unterschiedliche Reaktionen unter Verwendung von molekularem Sauerstoff und NADPH. Weniger als 10 % des aufgenommenen Nikotins werden unverändert ausgeschieden [Aktories et al., 2005b].

### **1.2.2 Biologische Wirkung**

Nikotin besitzt einen suchterzeugenden Effekt, der über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren (nAChR) vermittelt ist [Mansvelder und McGehee, 2002]. Neben diesem seit langem bekannten Effekt besitzt Nikotin zahlreiche weitere Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System und den Zellstoffwechsel, die ebenfalls zum Teil rezeptorvermittelt sind. Die große alveoläre Resorptionsfläche und das damit einhergehende schnelle Anfluten von Nikotin im Blut trägt nicht nur zur Suchterzeugung bei, sondern führt auch zu einem unmittelbaren Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck.

Nikotinerge Acetylcholinrezeptoren sind membranständige ligandengesteuerte Ionenkanäle. Sowohl Nikotin als auch Acetylcholin sind Agonisten an dieser Rezeptorklasse. Die Rezeptoren sind aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten zusammengesetzt. Sie kommen im Nervensystem vor, konnten aber in vielen anderen Geweben wie zum Beispiel Nasenschleimhaut [Keiger et al., 2003] oder bronchialem Zelllinienepithel [Egleton et al., 2008] ebenfalls nachgewiesen werden. Man unterscheidet verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, die gewebespezifisch vorkommen und zum Teil unterschiedliche biologische Effekte auslösen.

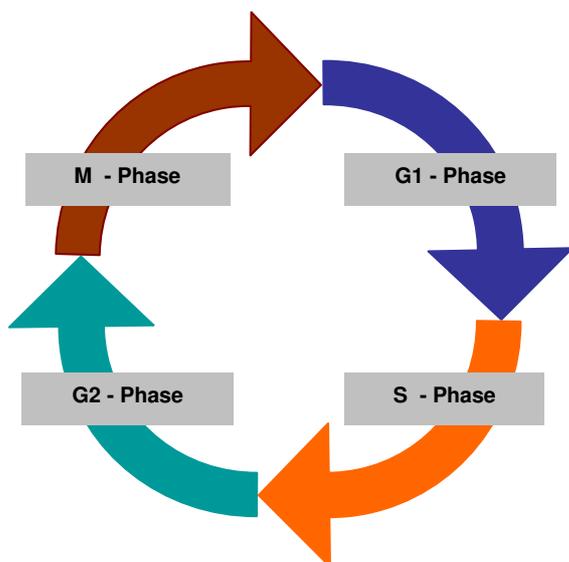
Mehrere Studien legen eine Beteiligung von Nikotin an der Tumorpromotion durch Alterationen im Zellzyklus und Apoptoseinhibition nahe. So konnte gezeigt werden, dass durch Nikotin aktivierte nAChR-abhängige Signalkaskaden unter Beteiligung von NF-kappaB, einem wichtigen intrazellulären Transkriptionsfaktor, und Bcl2 [Mai et al., 2003] zur Apoptoseinhibition in Lungenkrebszellen A549 führen [Zhang et al., 2006]. Eine Beeinflussung der Zellzykluskontrolle zeigte sich unter anderem in Keratinozyten [Lee et al., 2005]. Über verschiedene Wachstumsfaktoren wirkt Nikotin pro-angiogenetisch [Costa und Soares, 2009].

Darüber hinaus konnten auch direkte genotoxische Schäden durch Inkubation mit Nikotin in den Zielzellen der Tabak assoziierten Krebsentstehung im oberen Aerodigestivtrakt [Kleinsasser et al., 2006] sowie in Tonsillengewebe [Kleinsasser et al., 2005] und menschlichem Speicheldrüsengewebe [Ginzkey et al., 2008; Ginzkey et al. 2010] ausgelöst werden.

## **1.3 Zellbiologische Grundlagen**

### **1.3.1. Zellzyklus**

Der Lebenszyklus vitaler Zellen ist ein streng kontrollierter und regulierter Prozess, der sich in vier Phasen unterteilen lässt.



**Abb. 1-4** Schematische Darstellung der Phasenreihenfolge.

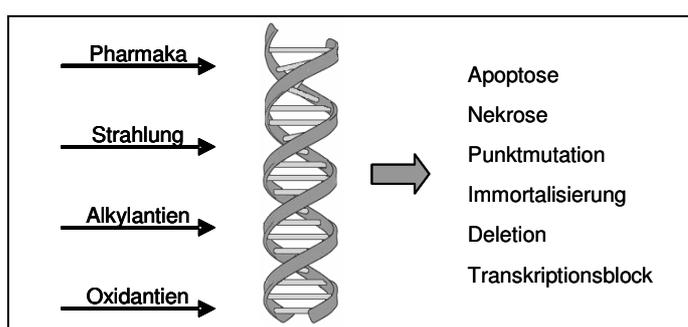
Nach der Mitose in der M-Phase erfolgen in der G1-Phase Zellwachstum und Proteinsynthese. In Phase S wird die DNA repliziert. G2 dient der Vorbereitung auf die nächste Zellteilung. An Kontrollpunkten in G1- und G2- Phase wird mit Hilfe von Proteinen wie P53 die Zellintegrität sichergestellt.

In der so genannten M-Phase erfolgt die Zellteilung durch Mitose. In der sich anschließenden G1-Phase nimmt die Zelle an Größe zu und synthetisiert benötigte Proteine für die folgende DNA-Replikation in der S-Phase. Am Ende der Replikationsphase ist die Zelle tetraploid, das heißt jedes Chromosom besitzt zwei Chromatiden. Der je nach Zellzyklusphase variierende DNA-Gehalt der Zelle stellt die Grundlage der durchflusszytometrischen Messung des Zellzyklus dar. Die Schrittmacher dieses regulierten Prozesses sind Cycline und Cyclin-abhängige Proteinkinasen. Die intrazelluläre Konzentration der Cyclin-Unterklassen ist abhängig

von der Phase des Zellzyklus und wird durch exogene Signalkaskaden beeinflusst. Die Cycline regulieren über Phosphorylierung Cyclin-abhängige Proteinkinasen, die wiederum verschiedene für Differenzierung und Teilung wichtige Substrate wie Laminine, Tubuline und Wachstumsfaktoren steuern [Loeffler und Petrides, 2003b]. Das Zusammenspiel verschiedener Proteine verhindert an Kontrollpunkten zwischen den Phasen G1/S und G2/M, dass fehlerhafte oder beschädigte Zellen in die nächste Phase des Zellzyklus eintreten und DNA-Schäden durch Replikation vermehrt werden. Bei Versagen dieser Mechanismen entstehen Alterationen im Zellzyklus die an Tumorinitiation und Progression beteiligt sein können. Daher sollen mögliche nikotin-induzierte Zellzyklusalterationen in dieser Arbeit untersucht werden.

### 1.3.2 DNA-Schäden und ihre Entstehung

Die Kanzerogenese ist ein mehrstufiger Prozess, in dessen Beginn der Entstehung von DNA-Schäden eine wichtige Rolle zukommt. Unterschiedliche exogene und endogene Einflüsse verursachen diese DNA-Schädigungen. Beispiele hierfür sind spontane, natürliche Basenhydrolyse und Methylierungsreaktionen oder exogene Einflüsse wie Ionisierung und verschiedene kanzerogene Agentien wie in Abbildung 1-5 dargestellt [Aktories et al., 2005a]. Die Einflüsse führen über unterschiedliche Mechanismen zu Basenmodifikationen, DNA-Strangbrüchen und kovalenten Verbindungen zwischen DNA und reaktivem Karzinogen.



**Abb. 1-5** DNA-schädigende Einflüsse wie Strahlung, Oxidantien, Alkylantien oder Pharmaka können eine Reihe unterschiedlicher Folgen nach sich ziehen. Durch Immortalisierung und Mutationen kann es zur malignen Transformation der Zelle kommen.

Häufige Modifikationen der DNA durch Alkylierung beziehungsweise Methylierung erfolgen an N7- oder O6- Position von Guanin. Die entstehenden Methylguanine sind im Gegensatz zu anderen DNA-Modifikationen, wie zum Beispiel Radikal-induzierten 8-Oxo-Guaninen, instabil. Durch spontane Hydrolyse können diese DNA-Basen

verloren gehen und so genannte apurinische/apyrimidinische Stellen (AP-Läsionen) hinterlassen. Durch spontane Hydrolyse der DNA oder durch Reparaturenzyme kann der DNA-Strang an solchen AP-Stellen brechen.

Andere DNA-Veränderungen entstehen, wenn Moleküle mit mehreren reaktiven Gruppen zwei DNA-Basen vernetzen. Diese Schäden der DNA werden Crosslinks genannt und gelten als hochmutagen [Aktories et al., 2005a].

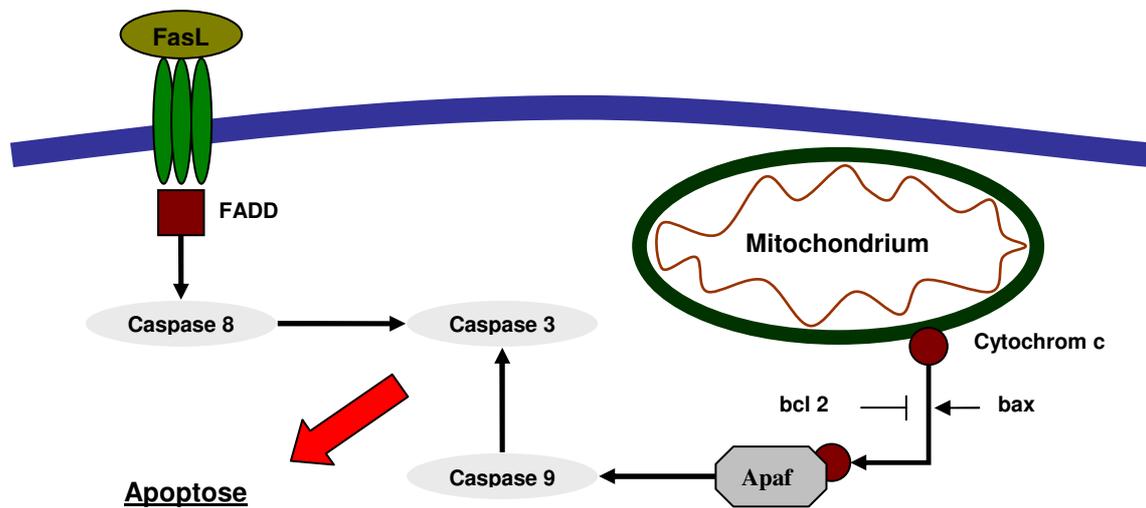
Die genannten DNA-Veränderungen bleiben aber häufig ohne Folgen, da sie durch Reparaturenzyme zum Teil wieder behoben werden können oder betroffene Zellen durch Apoptose absterben. Prinzipiell stellen sie aber im Falle einer Persistenz einen möglichen ersten Schritt in der Tumorentstehung dar. Eine Möglichkeit zur Erfassung und Quantifizierung der genannten chemischen Modifikationen der DNA bietet der Comet Assay.

### 1.3.3 Apoptose

Die Apoptose als eine Form des programmierten Zelltodes stellt einen wichtigen physiologischen Zellprozess in der Entwicklung, Differenzierung und Aufrechterhaltung von Geweben dar. Beispiele hierfür finden sich sowohl in der Embryogenese, bei der Selektion und Entfernung autoreaktiver T-Lymphozyten als auch bei der normalen Zellerneuerung im Erwachsenenalter. Darüber hinaus kommt der Apoptose eine wichtige Rolle in der Zerstörung genotoxisch geschädigter und veränderter Zellen zu. Somit stellt das Versagen apoptotischer Mechanismen einen entscheidenden Schritt in der Krebsentstehung dar [Loeffler und Petrides, 2003a]. Daher soll die Beeinflussung der Apoptose durch Nikotin im Sinne einer Inhibition oder Induktion in dieser Arbeit erfasst werden.

Die Apoptose beginnt morphologisch mit der Schrumpfung des Zellkerns, der so genannten Kernpyknose. Es kommt zur Vesikelbildung und zur anschließenden Lyse der Zelle. Im Mittelpunkt dieses energieabhängigen Prozesses stehen die Caspasen. Caspasen sind eine Familie intrazellulärer Proteasen, die als Vorstufen gebildet werden und über verschiedene Signalkaskaden proteolytisch aktiviert werden [Hotchkiss *et al.*, 2009].

Es können intrinsische/mitochondriale und extrinsische über unterschiedliche membranständige Rezeptoren vermittelte Aktivierungswege unterschieden werden [Ashe und Berry, 2003].



**Abb. 1-6** Schematische Darstellung der Apoptoseeinleitung. Dargestellt sind intrinsischer und extrinsischer Signalweg. Intrinsisch: Nach Stimulus kommt es unter dem Einfluss von Proteinen der bcl und der bax-Subfamilien zur Freisetzung von Cytochrom c. Die Bindung von Cytochrom c an das zytosolische Protein Apaf 1 aktiviert die Caspasenkaskade. Extrinsisch: Nach Bindung eines Liganden an den Fas – Rezeptor erfolgt vermittelt durch ein Adaptermolekül FADD die Caspasenaktivierung. Beide Wege führen über Aktivierung der Caspase 3 schließlich zur Apoptose der Zelle.

## **1.4 Ziele der Arbeit**

Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung und Quantifizierung des genotoxischen Potentials von Nikotin in Zellen des oberen und unteren Aerodigestivtraktes. Dazu sollen mit Hilfe des Comet Assays potentielle Nikotin induzierte DNA-Schäden an Einzelzellen aus oberen und unteren Aerodigestivtrakt nachgewiesen werden. Dabei dienen die humane Bronchialzelllinie Beas 2b und humane Frischzellen aus dem Bronchialsystem als Modell des unteren Atemtraktes. Als Modell des oberen Aerodigestivtraktes finden humane Nasenschleimhautzellen Verwendung. In einem zweiten Schritt sollen die ausgelösten Effekte durch den Einsatz des Antioxidans N-Acetylcystein und des nicht-kompetitiven nAch-Rezeptorblockers Mecamylamin genauer untersucht werden, um Rückschlüsse auf intrazelluläre Signalwege der genotoxischen Schädigungsmechanismen ziehen zu können.

Das Versagen apoptotischer Mechanismen und Störungen der Zellzykluskontrolle stellen entscheidende Schritte bei der Entstehung von malignen Neoplasien aus DNA-Läsionen dar. Um zu überprüfen ob Nikotin neben einer Induktion von DNA-Schäden auch diese zellulären Kontrollmechanismen beeinflusst, soll daher mit Hilfe der Durchflusszytometrie an Zellen der Bronchialzelllinie die Wirkung von Nikotin auf Apoptose und Zellzyklus untersucht werden. Durch den Einsatz eines Zytostatikums werden dazu Apoptosen induziert und durch Koinkubation mit Nikotin potentielle antiapoptotische Effekte erfasst. Mit diesem Ansatz soll zum Verständnis einer möglichen Beteiligung von Nikotin an der Krebsentstehung im humanen Respirationstrakt beigetragen werden.

## 2.1 Verwendete Zellsysteme

Vor Verwendung humaner Gewebe erfolgte eine präoperative ärztliche Aufklärung der Patienten mit schriftlicher Einwilligung zur Studienteilnahme. Die Untersuchungen fanden nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg statt.

### 2.1.1 Humane bronchiale Epithelzelllinie

Für die Zelllinienuntersuchung wurde die Zelllinie Beas 2b verwendet. Es handelt sich dabei um eine humane bronchiale Epithelzelllinie, die ursprünglich aus der Autopsie eines tumorfreien Spenders stammt. Die Zellen wurden mit Adenovirus 12/SV40 Hybrid Viren immortalisiert und wachsen adhärent als Monolayer. Die Zelllinie gilt als Referenzgewebe für Untersuchungen an normaler humaner Bronchialschleimhaut [Wang et al., 2009]. Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie stammt von der European Collection of Cell Cultures, Port Down/UK (ECACC Nr.: 95102433) und wurde dort käuflich erworben.

### 2.1.2 Bronchiale Schleimhaut

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben humaner bronchialer Schleimhaut stammen aus anatomischen Resektionen der Klinik und Poliklinik für Thorax-, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor Univ.-Prof. Dr. R. Leyh).

### 2.1.3 Nasenschleimhaut

Die verwendeten Nasenschleimhautproben stammen aus Nasen und Nasennebenhöhlenoperationen der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. R. Hagen). Nach Entnahme wurden die Proben in isotoner Kochsalzlösung in das Labor der Klinik überführt und dort weiterverarbeitet.

## 2.2 Verwendete Substanzen

### 2.2.1 Nikotin

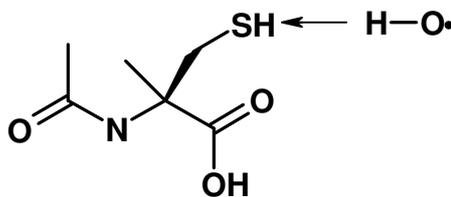
Das Hauptalkaloid des Tabakrauches wurde in verschiedenen Konzentrationen auf seine genotoxische Potenz hin untersucht. Die chemischen und pharmakologischen Eigenschaften von Nikotin sind in Abschnitt 1.2 dargestellt.

### 2.2.2 Mecamylamin

In den 50er Jahren wurde Mecamylamin als erstes oral verfügbares Anihypertensivum eingesetzt. Es handelt sich um einen nicht-kompetitiven Antagonisten am nikotinergen Acetylcholinrezeptor, der heute auf Grund seines Nebenwirkungsprofils in der ursprünglichen Indikation nur noch selten eingesetzt wird. Durch Blockade zerebraler Nikotinrezeptoren, die an der Suchtentstehung beteiligt sind, kann Mecamylamin zur Suchtentwöhnung eingesetzt werden [Shytle et al., 2002].

### 2.2.3 N - Acetylcystein

N-Acetylcystein (NAC) ist ein Derivat der natürlich vorkommenden Aminosäure L-Cystein. Auf Grund seiner freien Sulfhydrylgruppe (SH-Gruppe) wirkt es antioxidativ. Die SH-Gruppe kann mit reaktiven Molekülen wie Wasserstoffperoxid oder Hydroxylradikalen direkt reagieren. Dabei werden zwei SH-Gruppen unter Bildung einer Disulfidbindung oxidiert. Darüber hinaus ist N-Acetylcystein an der Synthese des körpereigenen intrazellulären Antioxidans Glutathion beteiligt. Medizinisch wird Acetylcystein zur Mucolyse oder als Antidot bei Paracetamolintoxikation eingesetzt.



**Abb. 2-1** Antioxidativer Effekt von N-Acetylcystein. Das rechts dargestellte Hydroxylradikal greift die S-H Gruppe des Acetylcysteins an. Das OH-Radikal reagiert mit H\* zu Wasser. Dabei entstehen unter Ausbildung einer Disulfidbrücke (S-S) NAC-Dimere.

### 2.2.4 Methylmethansulfonat

Das in dieser Arbeit als Positivkontrolle verwendete Methylmethansulfonat (MMS) ist

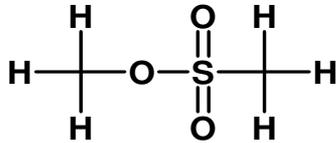


Abb. 2-2 MMS-Strukturformel

eine bekannt genotoxische Substanz. In Vorversuchen wurde eine Dosierung von 100µM für die einstündige Inkubation festgelegt. MMS alkyliert bevorzugt die Nukleinbase Guanin an Position N7 [Speit und Hartmann, 1999] über einen so genannten S<sub>n</sub>2-

Mechnismus wie in Grafik 2-3 dargestellt. Die chemische Bindung zwischen DNA-Base und zugehöriger phosphorylierter Desoxyribose wird daraufhin hydrolytisch zu 7-Methylguanin und Halbacetal gespalten. Diese DNA-Strukturveränderung führt zu einer spontanen oder enzymatisch verursachten Einzelstrangbruchbildung.

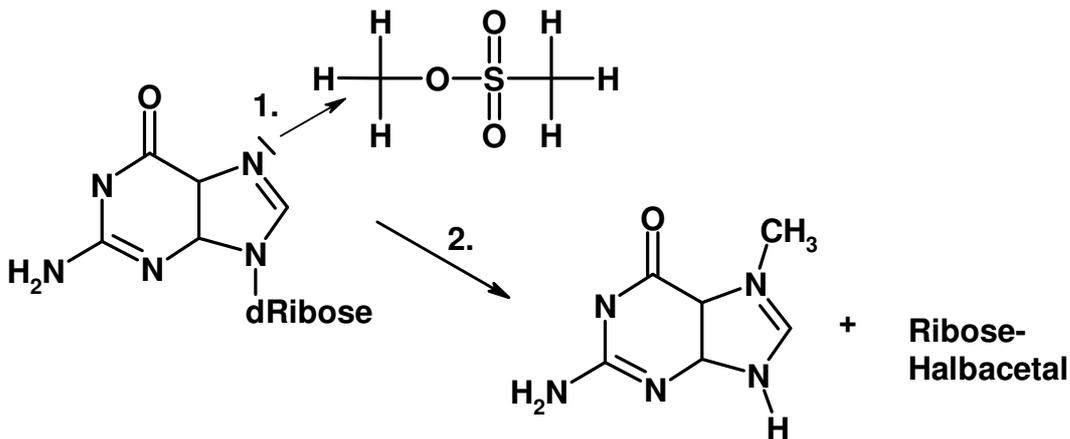


Abb. 2-3 Alkylierung von Guanosin durch Methylmethansulfonat.

(1.) MMS und Guanosin reagieren über einen S<sub>n</sub>2-Mechnismus miteinander. Das freie Elektronenpaar reagiert dabei mit MMS. (2.) Es entstehen N7-Methylguanidin, das hydrolytisch weiter zu N7-Methylguanin und Zuckerhalbacetal zerfällt, und das nicht dargestellte negativ geladene Methansulfonat.

### 2.2.5 Mitomycin C

Mitomycin C (MMC) wurde in dieser Arbeit für die durchflusszytometrische Apoptosemessung als Positivkontrolle verwendet. Es handelt sich dabei um ein bekanntes Apoptose induzierendes Zytostatikum [Pirnia et al., 2002].

## **2.3 Einzelzellgewinnung und Zellkultivierung**

### **2.3.1 Kultivierung Zelllinie Beas 2b**

Die Kultivierung der humanen epithelialen Zelllinie Beas 2b erfolgte in beschichteten Zellkulturflaschen mit einer Kulturfläche von 25cm<sup>2</sup> in 10ml Bronchial-Epithelial-Growth-Medium (BEGM). Die Beschichtung bestand aus 0,01mg/ml Fibronektin, 0,03mg/ml Kollagen und 0,001mg/ml bovinem Serumalbumin (BSA), die in BEG-Medium gelöst wurden. Zur Beschichtung wurden von dieser BEGM-Lösung je 6ml in 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen pipettiert und diese für 2 bis 24h bei 37 Grad Celsius im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das BEG-Beschichtungsmedium abgenommen und die Zellkulturflaschen nach kurzer Trocknung im Kühlschrank aufbewahrt. Das Beschichtungsmedium konnte bis zu 3 mal wieder verwendet werden.

Am 1. Tag wurden zwischen 3000 und 6000 Zellen pro cm<sup>2</sup> in die Zellkulturflaschen ausgesät. Sobald der Zellmonolayer eine Dichte von 70-80% erreichte, was in der Regel zwischen dem 3. und 4. Tag der Fall war, folgte die Passagierung der Zellen. Dazu wurde das Zellkulturmedium abpipettiert und die Zellen mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurden 2ml 0,25% Trypsin auf die Zellkultur gegeben. Nach 3 bis 5 minütiger Inkubation bei 37 Grad Celsius im Brutschrank erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle der Ablösung. Bei ausreichender Ablösung der Zellen wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 4 ml RPMI-Medium, das fetales Kälberserum (FCS) enthält, abgestoppt und die Zellsuspension in 15 ml Falcon Tubes überführt. Nach 6 minütiger Zentrifugation bei 1000rpm schloss sich ein Waschschrift mit PBS an. Anschließend wurden die Zellen erneut in den 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen ausgesät oder für die Fremdstoffexposition weiterverwendet.

### **2.3.2 Einzelzellgewinnung aus humaner bronchialer Schleimhaut**

Die Proben humaner Bronchialschleimhaut wurden nach anatomischer Resektion von humanem Lungengewebe abpräpariert. Die anatomische Resektion wird im Gegensatz zur nicht-anatomischen Keilresektion unter Präparation der anatomischen Lungen-, Lappen- oder Segmentgrenzen durchgeführt, so dass bei dieser Resektionstechnik bronchiales Epithel am hiliären Schnitttrand des Resektats gewonnen werden kann

[Berchtold et al., 2006]. Dazu wurde unmittelbar nach Resektion der Operationspräparate mit Hilfe eines Skalpells ein möglichst großes Stück Stamm- oder Segmentbronchus abpräpariert. Bei zentral im Lungenlappen gelegenen Tumoren erfolgte dies erst nach Schnittrandkontrolle im Schnellschnittpräparat durch den Pathologen. Das gewonnene circa 2cm lange, zirkuläre Bronchialstück wurde anschließend sofort in DME-Medium überführt, unter Lichtabschluss in das Labor transportiert und dort mit Hilfe eines Skalpells in kleinere Gewebestücke zerteilt. Anschließend folgten mehrere Waschschriffe mit PBS zur Entfernung von Blut und Geweberesten. Nach Ablösen der Mucosa vom Knorpel und Überführung der Epithelstückchen in 15ml Falcon Tubes mit 9ml DME-Medium schloss sich die Isolierung der Einzelzellen aus dem epithelialen Zellverband mit Hilfe von 100µl einer aliquotierten Enzymlösung (0,1g Protease + 1mg DNase in 10ml PBS gelöst) an. Nach 24h Inkubation bei 4 Grad Celsius auf einer Schüttelplatte erfolgte das Abstoppen der Enzymreaktion mit 2ml FCS und ein Waschschriff mit PBS. Anschließend wurden Zellzahl, Vitalität und Zilientätigkeit nach Trypanblaufärbung in der Neubauerzählkammer bestimmt.

### **2.3.3 Einzelzellgewinnung aus Nasenschleimhaut**

Die Nasenschleimhautpräparate wurden nach ihrer Gewinnung im OP unverzüglich in DME-Medium aufgenommen, im Labor in einer Petrischale präpariert und von Blut und kleineren Knochenresten befreit. Anschließend wurden die Gewebestücke in 15ml Falcontubes mit 9ml DMEM überführt und 100µl aliquotierte Enzymlösung (0,1g Protease + 1mg DNase in 10ml PBS gelöst) hinzugegeben. Nach 24 stündiger Inkubation bei 4 Grad Celsius unter Lichtabschluss auf einer Schüttelplatte wurden die 9ml Medium und die Gewebestücke in eine Petrischale gegeben und die Schleimhautseite mit einem Skalpell abgeschabt, um noch nicht gelöste Nasenschleimhautzellen von den Gewebestücke abzulösen. Nach Beendigung der Enzymreaktion durch Zugabe von 2ml FCS folgte die Aufnahme der Zellsuspension mit einer Pipette und die Überführung über eine sterile Gaze in 15ml Falcontubes. Daran schloss sich ein Waschschriff mit PBS und die abschließende Zellzählung und Vitalitätstestung in der Neubauerkammer an.

### **2.4 Zellzählung und Vitalitätstest**

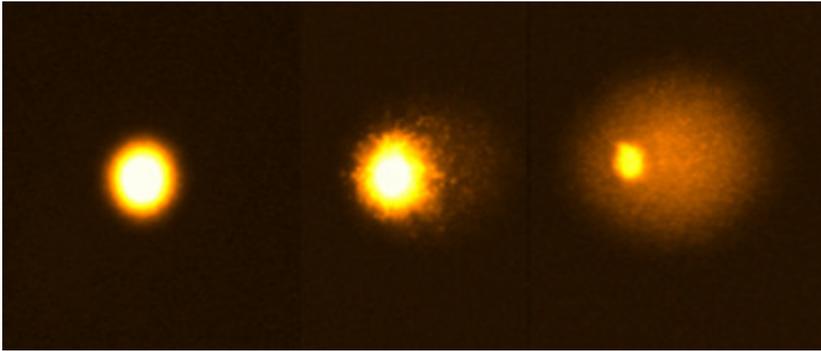
Die Zellzahlen und Vitalitäten von Frischzellen humaner Gewebe wurden in dieser Arbeit mit dem Trypanblau-Vitalitätstest bestimmt. Dieser Test ermöglicht die Bestimmung der Zellzahl und des Anteils vitaler Zellen in einer Zellsuspension. Zur Identifizierung der avitalen Zellen wird der anionische Farbstoff Trypanblau eingesetzt. Dieser negativ geladene Farbstoff kann nur bei defekter äußerer Zellmembran in die Zelle eindringen, da dann das negative Zellpotential zusammengebrochen ist. Durch Zellzählung in der Neubauerkammer unter dem Mikroskop kann die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl Trypanblau-gefärbter Zellen bestimmt und damit die Vitalität der getesteten Zellsuspension in Prozent angegeben werden.

Zellzahlen und Vitalitäten der Zelllinie konnten maschinell mit Hilfe des Zellzählgeräts (Casy Counter) bestimmt werden.

### **2.5 Comet Assay**

#### **2.5.1 Grundlagen des Assays**

Der Comet Assay ist ein sensitiver Test zur Detektion und Quantifizierung verschiedener DNA-Schäden. In der ursprünglich etablierten gelelektrophoretischen Technik unter neutralen pH-Bedingungen [Ostling und Johanson, 1984] konnten dabei nur DNA-Strangbrüche detektiert werden. Das heute üblicherweise verwendete und durch Singh etablierte Protokoll unter alkalischen Bedingungen bei pH 13 zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität gegenüber einem breiteren Spektrum bekannter DNA-Veränderungen aus, da es durch den hohen pH-Wert zu einer vollständigen Denaturierung und Auflösung der molekularen Tertiärstruktur kommt. Neben DNA-Einzelstrangbrüchen werden so auch alkalilabile DNA-Addukte sowie durch Oxidantien entstandene Strangbrüche erfasst.



**Abb. 2-4**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme. Zellkerne mit zunehmender Schädigung von links nach rechts im Comet Assay

Das Funktionsprinzip beruht auf der Wanderung negativ geladener DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Die Zellen werden dazu auf Objektträgern fixiert. Nach Entfernung der zellulären Membranbestandteile durch eine Lyselösung wird die DNA in alkalischer Lösung entspiralisiert und die so genannte Einzelzellgelelektrophorese im elektrischen Feld durchgeführt. Die negativ geladene DNA wandert dabei zur Anode. Je größer die Rate der DNA-Fragmentierung ist, desto mehr kleine DNA-Stücke entstehen, welche weiter und schneller im elektrischen Feld wandern und so das charakteristische Bild eines Kometenschweifens erzeugen.

### 2.5.2 Fremdstoffexposition

Für die Fremdstoffexposition wurden je 500µl Zellsuspension mit je  $1 \times 10^5$  Zellen in Eppendorfgefäße pipettiert.

Die Fremdstoffzugabe erfolgte mit 10µl/ml Zellsuspension. Anschließend wurden die Proben für eine Stunde bei 37 Grad Celsius unter Lichtabschluss im Wasserschüttelbad inkubiert. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden unter Rotlicht durchgeführt, um zusätzliche DNA-Schäden durch Lichteinfluss zu reduzieren. Nach Abschluss der Inkubation schlossen sich die Durchführung des Comet Assays und eine Vitalitätstestung mit Hilfe des Trypanblauausschlusstests an.

### 2.5.3 Getestete Stoffkonzentrationen

#### 2.5.3.1 Nikotin

In der ersten Versuchsserie wurden Dosiswirkungskurven von Nikotin an Beas2b Zellen, humanem Bronchialepithel und Nasenschleimhaut erstellt. Für Nasenschleimhautgewebe und Zelllinie wurden die Nikotinkonzentrationen 1µM, 10µM, 100µM, 1mM, 2mM und 4mM verwendet. Aufgrund niedriger Gewebemengen

und Zellzahlen wurden an Bronchialepithelien nur die Nikotinkonzentrationen 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M und 1mM getestet. Als Negativkontrolle wurde PBS, als Positivkontrolle MMS in einer Konzentration von 100 $\mu$ M eingesetzt.

### **2.5.3.2 Mecamylamin und N-Acetylcystein**

Für Mecamylamin wurde in Koinkubation mit 1mM Nikotin eine Wirkungskurve an Beas2b Zellen mit aufsteigender Mecamylaminkonzentration erstellt (1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 100 $\mu$ M). An Nasenschleimhautepithel wurden die Mecamylaminkonzentrationen 1 $\mu$ M, 10 $\mu$ M und 100 $\mu$ M verwendet. Für N-Acetylcysteininkubationen wurde nach Literaturangabe [Sudheer et al., 2008] eine Konzentration von 1mM verwendet.

### **2.5.4 Technik der Comet Assay Versuche**

Zur Fixierung der Zellen auf den Objektträgern mussten diese mit Agarose beschichtet werden. Hierzu wurde 1,5% normal-melting Agaroselösung I durch Aufkochen in der Mirkowelle gelöst und die Objektträger darin eingetaucht. Nach Abwischen der Unterseite wurden die nun einseitig beschichteten Objektträger zum Trocknen ausgelegt und anschließend bis zu ihrer Verwendung bei Raumtemperatur gelagert.

Vor dem Auftragen der Zellen nach einstündiger Fremdstoffinkubation auf die Objektträger erfolgte die Vitalitätstestung mit Trypanblau. Aus den jeweiligen Zellsuspensionen wurden anschließend 20 $\mu$ l entnommen und zusammen mit 180 $\mu$ l low-melting Agarose II in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Im Gegensatz zur normal-melting Agarose I, die bei der Beschichtung der Objektträger eingesetzt wurde, liegt die low-melting Agarose II bei niedrigeren Temperaturen flüssig vor. So wird verhindert, dass sich die Beschichtung der Objektträger bei der nun folgenden Auftragung von 60 $\mu$ l der Agarose-Zellsuspension wieder verflüssigt. Es wurden von jeder Zellsuspension 2 Objektträger hergestellt und mit einem Deckglas (24x32mm) abgedeckt, das nach 2-3 Minuten wieder vorsichtig abgenommen wurde. Die Objektträger wurden zur Verblindung mit Zahlen codiert, so dass bei der späteren Auswertung nicht ohne Decodierung auf die jeweils getestete Fremdstoffkonzentration geschlossen werden konnte.

Um eine Wanderung der DNA während der später folgenden Elektrophorese im elektrischen Feld zu ermöglichen, müssen alle zellulären Membranen entfernt und die DNA entspiralisiert werden. Dazu wurden die Objektträger in Küvetten gestellt und mit Lysepuffer überschichtet. Es folgten eine zweistündige Inkubation unter Lichtabschluss bei 4 Grad Celsius und im Anschluss an den Lyseprozess die Überführung der Objektträger in die Elektrophoresekammer, die dort mit der Agaroseschicht nach oben platziert und mit kaltem, alkalischem Elektrophoresepuffer überschichtet wurden. Leere Plätze in der Elektrophoresekammer wurden mit unbeschichteten Objektträgern aufgefüllt. Um zusätzliche Temperatur induzierte DNA-Schäden zu vermeiden, erfolgte eine Eiskühlung der Elektrophoresekammer. Die Objektträger wurden nun für 20 Minuten dem alkalischen Elektrophoresepuffer ausgesetzt. In dieser Zeit erfolgt die Entspiralisierung der DNA. Im Anschluss an diesen Prozess folgte die Elektrophorese für 20 Minuten bei einer Spannung von 25V und einer Stromstärke von 300mA bei einem Elektrodenabstand von 32cm. Die Stromstärke wurde über die Puffermenge reguliert.

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Kammer zur Neutralisierung für 5 Minuten in Trispuffer überführt. Nach kurzer Trocknung folgte die DNA-Färbung mit 20µl Ethidiumbromid (Konzentration 20µg/ml) und das Aufbringen eines Deckglases (24x32).

**2.5.5 Puffer und Lösungen**

<b>EDTA Stammlösung 0,2 mM</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 14,89g EDTA</li> <li>- mit A. bidest auf 180ml auffüllen</li> <li>- pH10 mit NaOH einstellen</li> <li>- mit A. bidest. auf 200ml auffüllen</li> <li>- autoklavieren</li> <li>- lichtgeschützt bei Raumtemperatur lagern</li> </ul>
<b>Tris-Neutralisationspuffer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 97g TRIS</li> <li>- mit A. bidest auf 1950ml auffüllen</li> <li>- pH 7,5 mit 10M HCL einstellen</li> <li>- mit A. bidest. auf 2l auffüllen</li> <li>- autoklavieren</li> <li>- bei Raumtemperatur lagern</li> </ul>
<b>Lysepuffer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 67ml N-Lauroylsarcosin Na-Salz</li> <li>- 292,8g NaCl</li> <li>- 2,4g TRIS</li> <li>- NaOH-Plätzchen zugeben</li> <li>- pH 10 mit 5M NaOH einstellen</li> <li>- mit A. bidest. auf 2l auffüllen</li> </ul>
<b>Lyselösung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 0,75ml Triton</li> <li>- 7,5ml DMSO</li> <li>- 66,75ml Lysepuffer</li> </ul>
<b>Elektrophoresepuffer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 120ml 5M NaOH</li> <li>- 10ml EDTA-0,2M-Stammlösung</li> <li>- mit A. bidest. auf 2l auffüllen</li> </ul>
<b>Ethidiumbromid-Färbelösung</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 20µg/ml in A. bidest.</li> <li>- lichtgeschützt bei 4C° lagern</li> </ul>
<b>Agaroselösung I</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1,5g NMP-Agarose</li> <li>- 100ml 1x PBS</li> </ul>
<b>Agaroselösung II</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 50mg LMP-Agarose</li> <li>- 10ml 1x PBS</li> </ul>

## **2.6 Durchflusszytometrie**

### **2.6.1 Grundlagen der Messtechnik**

Die Durchflusszytometrie erlaubt die Messung von Parametern wie Zellgröße, Zellgranulierung und Fluoreszenzintensität. Dazu werden Streulicht- und Fluoreszenzsignale analysiert, die entstehen, wenn Einzelzellen in einem Flüssigkeitsstrom an einer Lichtquelle vorbeigeleitet werden.

Um zu gewährleisten, dass jeweils nur einzelne Zellen die Lichtquelle passieren, arbeitet das Zytometer mit zwei Flüssigkeitssystemen. Mit dem Zuleitungssystem wird ein schnell fließender laminarer Transportstrom in der Messkammer erzeugt. Durch eine zweite Kapillare wird die angesaugte Probenflüssigkeit mit den Zellen in das Zentrum dieses Transportstroms eingebracht. Diese hydrodynamische Fokussierung der Zellen sorgt dafür, dass die einzelnen Zellen im Zentrum des Transportstrahls einander folgend durch den Lichtmessstrahl geleitet werden. Als Lichtquelle dient in den meisten Messsystemen ein Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488nm. Der Lichtstrahl dieses Lasers kreuzt die Messkammer rechtwinklig. Die Streuung des Lichtstrahls bei Auftreffen auf die Zelle bzw. die Intensität der Fluoreszenz, die durch den Lichtstrahl erzeugt wird, kann durch ein nachgeschaltetes Detektorsystem aus Bildverstärkerröhren erfasst werden. Durch rechtwinklige Anordnung der nachgeschalteten optischen Systeme können Vorwärts- und Seitwärtsstreuung getrennt detektiert werden. Die Seitwärtsstreuung (Side Scatter SSC) ist ein Maß für Granulierung und Membranfaltung der Zellen, die Vorwärtsstreuung (Front Scatter FSC) dient als Maß für die Zellgröße.

### **2.6.2 Fremdstoffexposition**

Für die Fremdstoffinkubation wurden die Beas 2b-Zellen aus den 25cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit Trypsin abgelöst und je 100.000 in 12,5cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit 5ml BEG-Medium neu ausgesät. Nach 24 stündiger Inkubation im Brutschrank folgte die Fremdstoffzugabe mit 10µl/ml Zellkulturmedium und die erneute Inkubation für 24 Stunden.

Nach abgeschlossener Fremdstoffexposition wurde das BEG-Medium aus den Zellkulturflaschen abgenommen und in 15ml Falcontubes überführt, die adhären Zellen mit Hilfe von Trypsin abgelöst und nach Vitalitätsbestimmung ebenfalls in die Falcontubes pipettiert. Nach 2 Waschschritten erfolgte je nach verwendetem Zellzyklus/Apoptoseprotokoll entweder die Zugabe von 1ml 70% kalten Ethanol für den TUNEL-Assay und Überführung in FACS-Röhrchen oder die Zellen wurden in PBS gelöst in die FACS-Röhrchen für die Annexin Messung überführt.

### **2.6.3 Getestete Stoffkonzentrationen**

Nikotin wurde in einer Konzentration von 1mM für 24 Stunden mit Zelllinienepithel inkubiert. Mitomycin wurde als Positivkontrolle verwendet und mit 50µg/ml eingesetzt

### **2.6.4 Zellzyklusmessung**

Das Funktionsprinzip der durchflusszytometrischen Zellzyklusmessung basiert auf dem unterschiedlich hohen DNA-Gehalt der Zelle in den verschiedenen Zyklusphasen. Durch Anfärben der DNA mit einem DNA-bindenden Antikörper wie Propidiumjodid und Bestimmung der Fluoreszenzintensität mittels der Durchflusszytometrie ist so die Darstellung des Zellzyklus möglich. Die Zellzyklusmessung kann zusammen mit dem TUNEL-Assay durchgeführt werden.

### **2.6.5 Annexin-V-Apoptosemessung**

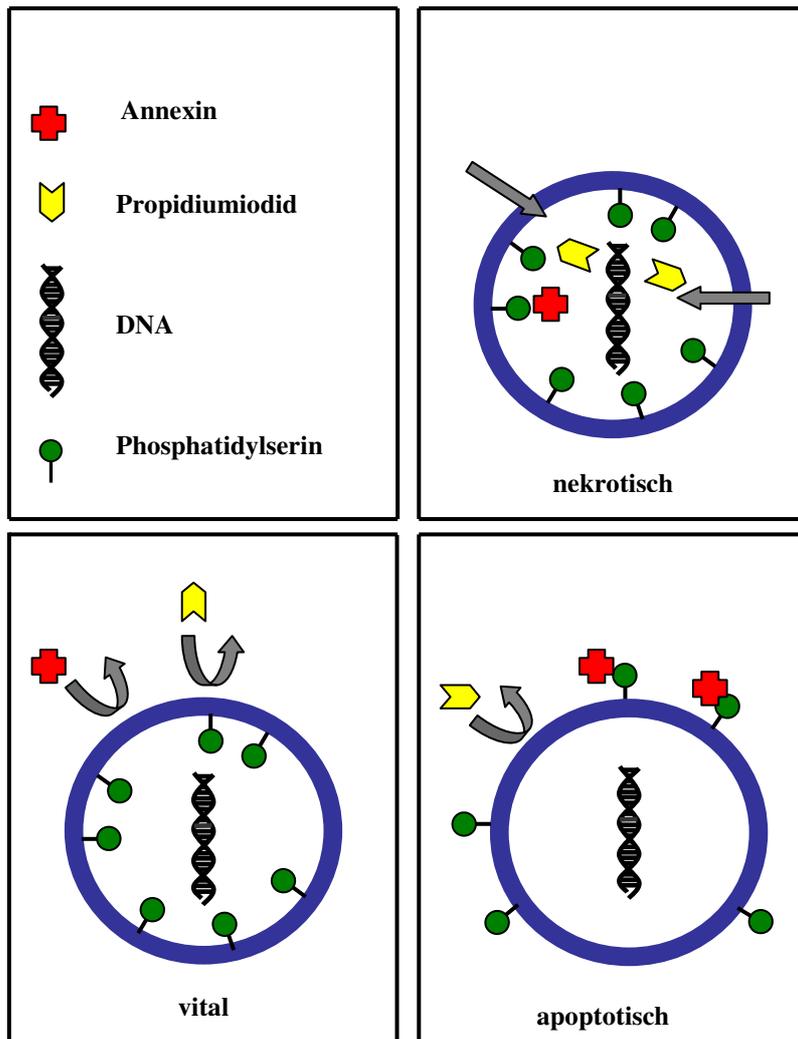
Die durchflusszytometrische Untersuchung und Detektion apoptotischer Zellen mit Hilfe des Antikörpers Annexin V beruht auf morphologischen Veränderungen der Zellmembran, die durch die Apoptose ausgelöst werden. Vitale Zellen sind durch eine asymmetrische Verteilung unterschiedlicher Phospholipide in der zellulären Außenmembran charakterisiert, die Energie verbrauchend durch Membranproteine aufrechterhalten wird. Phosphatidylserin ist eines dieser Lipide und wird in der nicht-apoptotischen Zelle ausschließlich an der Innenseite der Zellmembran präsentiert. Die Apoptose führt zu einer aktiven Translokation von Phosphatidylserin an die Außenseite

der Zellmembran und markiert die Zelle so für Makrophagen und andere Zellen als apoptotisch.

Mit Hilfe des Phosphatidylserin bindenden Antikörpers Annexin V und eines daran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes wie Allophycocyanin (APC) können diese membranständigen Phosphatidylserinmoleküle an der Zelloberfläche detektiert werden.

In der Spätphase der Apoptose oder bei nekrotischen Zellen ist die Integrität der Zellmembran aufgehoben, so dass Annexin V durch die Zellmembran ins Innere der Zelle gelangen kann und Phosphatidylserinmoleküle auf der Innenseite der Zelle anfärbt. Um früh-apoptotische von spät-apoptotisch und nekrotischen Zellen unterscheiden zu können wird daher eine gleichzeitige Färbung mit dem DNA-färbenden Propidiumjodid durchgeführt. Bei spät-apoptotischen und nekrotischen Zellen treten sowohl Annexin V als auch Propidiumjodid durch die nicht mehr intakte Plasmamembran in die Zelle ein und färben Phosphatidylserinmoleküle und DNA in der Zelle an [BD-Biosciences, 2006].

Zur Messung wurden die in PBS gelösten Zellen zentrifugiert (500g/6min.) und nach Abnahme des Überstandes in 100µl Annexin V Binding Buffer (1x) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 5µl Annexin-V-APC und 5µl Propidiumjodid. Nach vorsichtigem Durchmischen schlossen sich eine 15 minütige Inkubation im Dunkeln sowie die Zugabe von 400µl Annexin V Binding Buffer (1x) in jedes FACS-Röhrchen an. Die Zellen konnten anschließend innerhalb einer Stunde am Durchflusszytometer gemessen und ausgewertet werden.



**Abb. 2-5** Prinzip des Annexin-V-Assays

**vitale Zelle:**

Phosphatidylserin ist ausschließlich an der Membraninnenseite lokalisiert. Weder DNA noch Serin ist gefärbt.

**Apoptotische Zelle:**

Phosphatidylserin ist externalisiert und wird durch Annexin gebunden. Die Zelle ist Annexin positiv. Die DNA ist nicht angefärbt.

**Nekrotische Zelle:**

Die Plasmamembran ist nicht intakt. Annexin + Propidiumiodid strömen in die Zelle ein und färben DNA + Phosphatidylserin an der Innenmembran

**2.6.6 Apoptosemessung mit dem TUNEL-Assay**

Die TUNEL-Methode (TdT-mediated dUTP nick end labeling) beruht auf dem Umstand, dass während der Apoptose die DNA-Doppelhelix durch Endonukleasenaktivierung fragmentiert wird, wobei kleinere DNA-Stücke entstehen. Durch die Zugabe terminaler Desoxynucleotidtransferase (TdT) wird die Bindung von ebenfalls zugegebenen Brom-markierten Desoxyuridintriphosphatmolekülen (Br-dUTP) an die freiliegenden 3'-Hydroxygruppen dieser DNA-Fragmente katalysiert. Die endständigen BrdU-Moleküle können dann mit FITC-gebundenen monoklonalen BrdU-Antikörpern markiert und durchflusszytometrisch erfasst werden. Um eine gleichzeitige Auswertung des Zellzyklus zu ermöglichen, kann zusätzlich die DNA (nach dem in „2.7.2 Zellzyklusmessung“ beschriebenen Prinzip) mit Propidiumjodid/RNase Staining Buffer markiert und anschließend der Zellzyklus gemessen werden [BD-Biosciences, 2008].

Für die Durchführung des Versuches wurden die Zellen in 70% Ethanol für mindestens 30 Minuten inkubiert. Nach Zentrifugation (500g, 6min.) wurde das Ethanol wieder abpipettiert und die Zellen zwei mal mit „Wash Buffer“ gewaschen. Es schlossen sich die Aufnahme des Zellpellets in 50µl DNA „Labeling Solution“ („Reaction Buffer“ 10µl+“TdT Enzyme“ 0,75µl+“Br-dUTP“ 8µl+ A.bidest 32,25µl) und eine einstündige Inkubation im Wasserbad bei 37 Grad Celsius an. Im Weiteren erfolgten zwei Waschschrte mit je 1ml „Rinse Buffer“ und Resuspendierung der Zellpellets in 100µl Staining Solution (5µl „FITC-labeled Anti-BrdU“ +95µl „Rinsing Buffer“). Nach dieser Färbung wurden die Zellen für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert, 500µl „PI/RNase Staining Buffer“ zugegeben und erneut für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse konnte dann innerhalb von 3 Stunden erfolgen.

## 2.7 Verwendete Geräte und Reagenzien

<b>Chemikalien</b>	
Agarose (MEEO)	Roth, Karlsruhe, D
Agarose Type VII (LMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Aminosäuren (nicht essentiell) 100x	Biochrom, Berlin, D
Annexin-V-APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
Annexin-V-Binding-Buffer, 10x	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD APO-BRDU-Kit	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD FACS Clean	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD Propidiumjodid Staining Solution (50µg/ml)	BD Biosciences, Heidelberg, D
BD Shutdown Solution	BD Biosciences, Heidelberg, D
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
CASY-Ton	Innovatis AG, Reutlingen, D
Collagen	BD Biosciences, Heidelberg, D
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim, D
Ethidiumbromid	Merck Biosciences, Schwalbach, D
FCS (Fetal Calf Serum)	Linaris, Wertheim, D.
Fibronektin	BD Biosciences, Heidelberg, D
Konservierer für Wasserbäder	Roth, Karlsruhe, D
Mecamylamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Mitomycin C	Medac GmbH, Hamburg, D
MMS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
Natriumchlorid	Merck Biosciences, Schwalbach, D
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck Biosciences, Schwalbach, D
Natrium-Pyruvat 100mM	Biochrom, Berlin, D
Natronlauge	Merck Biosciences, Schwalbach, D
Nikotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D

N-Lauroylsarcosine 30% Penicillin-Streptomycin (1000U/1000µg/ml) PI/RNase Stainig Buffer PBS, 10x RPMI 1640 mit stab. Glutamin; 2,0g/l NaHCO <sub>3</sub> Salzsäure 1M Salzsäure 5M Tris(-Hydroxymethyl)Aminomethan Triton X-100 Trypan Blue Solution 0,4%	Serva, Heidelberg, D Biochrom, Berlin, D BD Biosciences, Heidelberg, D Roche Diagnostics, Mannheim, D Biochrom, Berlin, D Merck Biosciences, Schwalbach, D Merck Biosciences, Schwalbach, D Merck Biosciences, Schwalbach, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D
<b>Enzyme</b>	
Protease DNase Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D Roche Diagnostics, Mannheim, D Biochrom, Berlin, D
<b>Medien</b>	
BEG-Medium mit Supplement Packung RPMI-Medium DME-Medium	Promo Cell, Heidelberg, D Biochrom, Berlin, D Invitrogen (Gibco), Karlsruhe, D
<b>Geräte und Zubehör</b>	
Brutschränke CO <sub>2</sub> Inkubator NU5500E CO <sub>2</sub> Inkubator mit Heißluftsterilisation CB210 Counter Durchflusszytometer, FACS Canto Elektrophoresekammern (220VOLT-50HERZ) Elektrophoresenetzgerät, EV202 Fluoreszenzlampen, ebq 100 ISOLATED Fluoreszenzmikroskop (Comet 5.5), DM4000B Heizplatte, M6 Kammern Küvetten Membran-Vakuumpumpe  Mikroskop, 473028 Mikrowelle pH-Meter  Pipetten Shaker, ELMI S3 Sterile Werkbank, HERAsafe  Vortex Waagen Wasserbäder  Zählkammer, Neubauer Zellzählgerät CASY INNOVATIS Zentrifugen Hettich UNIVERSAL 16R Centrifuge 5415R MiniSpin Eppendorf	NuAire Inc., Plymouth, USA Binder GmbH, Tuttlingen, D Karl Hecht KG, Sondheim, D BD Biosciences, Heidelberg, D Renner, Dannstadt, D Consort, Turnhout, Bel Leica, Heerbrugg, CH Leica, Heerbrugg, CH CAT / M. Zipperer GmbH, Staufen, D Nalge Nunc International, Napville, USA Brand GmbH, Wertheim, D ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz, D ZEISS, Oberkochen, D Sharp Electronics (Europe), Hamburg, D Wissenschaftliche-Technische Werkstätte, Weilheim i. OB, D Eppendorf AG, Hamburg, D Rose Scientific Ltd., Edmonton, Can Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, D Genie 2 Bender & Hobein AG, Zürich, CH August Sauter KG, Ebingen, D Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, D Marienfeld, Lauda-Königshofen, D Innovatis AG, Reutlingen, D  Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, D Eppendorf AG, Hamburg, D Eppendorf AG, Hamburg, D
<b>Verbrauchsmaterialien</b>	
CASY-Cups (Cellcountergefäße) Deckgläser (24x32mm)  FACS-Röhrchen Objektträger (ca. 76x26mm)	Innovatis AG, Reutlingen, D Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, D BD Biosciences, Discovery Labware, USA R. Langenbrinck, Emmendingen, D

Pasteurpipetten (Glas) Pipetten aus Polystyrol (1ml, 5ml, 10ml) Pipettenspitzen (200 $\mu$ l, 1000 $\mu$ l) (0,5- 10 $\mu$ l) Reaktionsgefäße (0,5ml) (1,5ml) (1,5ml; braun) Zellkulturflasche (25cm <sup>2</sup> , 75cm <sup>2</sup> ) Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Brand GmbH, Wertheim, D Corning Incorporated, NY, USA Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D A. Hartenstein, Würzburg, D A. Hartenstein, Würzburg, D Sarstedt AG & Co, Nümbrecht, D Brand GmbH, Wertheim, D Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
--	---

## 2.8 Ergebnisauswertung und graphische Darstellung

### 2.8.1 Ergebnisanalyse für den Comet Assay

Zur Erfassung der genotoxischen Schädigung der verschiedenen Zellen wurde die DNA-Migration der Zellen mit Hilfe des Comet Assays erfasst. Dabei korrelieren die Länge des DNA-Schweifes und der Fluoreszenzintensität mit der genotoxischen Schädigung. Die Auswertung der Objektträger erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop am Computer mit Hilfe des Programms Comet 5.5 (Kinetic Imaging, Liverpool, GB). Als quantitatives Maß wurde das dimensionslos-angegebene Olive Tail Moment (OTM) verwendet. Es setzt sich aus der Länge des DNA-Schweifes (TL) und seines DNA-Gehalts (DT) zusammen. Je höher der gemessene Wert, umso größer ist die DNA-Schädigung. Für jede getestete Konzentration wurden 100 Zellen verteilt zu je 50 Zellen auf 2 Objektträgern ausgewertet. In die statistische Auswertung wurden nur Versuche eingeschlossen bei denen die Zellvitalität größer als 80% war.

### 2.8.2 Ergebnisdarstellung für den Comet Assay

Die graphische Bearbeitung der Ergebnisse und ihre Darstellung in Box oder Linienplots erfolgte mit dem Statistikprogramm Statistica 8.0. Zur ihrer Berechnung gingen n arithmetische OTM-Mittelwerte der gemessenen 100 Zellen je Versuchsansatz ein. Die untere Begrenzung der Box wird durch die 25. Perzentile, die obere Begrenzung durch die 75. Perzentile gebildet. Der waagrechte Strich in den Boxplots stellt den Median, errechnet aus n-OTM-Mittelwerten, dar. Ausreißer sind durch einen Kreis markiert, Extremwerte durch einen Stern. Dabei sind Ausreißer mehr als 1,5 Boxlängen und Extremwerte mehr als 3 Boxlängen von der unteren beziehungsweise

der oberen Boxbegrenzung entfernt. Die T-förmigen Linien der Whiskers markieren den Maximal- und Minimalwert im Bereich ohne Ausreißer. Im Text sind hinter den getesteten Konzentrationen die jeweiligen OTM-Mediane +/-Standardabweichung, errechnet aus n OTM-Mittelwerten, angegeben.

### **2.8.3 Ergebnisanalyse der Durchflusszytometrie**

Die Apoptose- und Zellzyklusmessungen wurden mit dem BD FACS Canto Durchflusszytometer durchgeführt und mit der Software FACS DIVA ausgewertet. Die Zellzyklusanalyse erfolgte mit dem Programm ModFIT LT 3.2 (Verity Software House, Topsham US).

### **2.8.4 Ergebnisdarstellung der Durchflusszytometrie**

Die Ergebnisse des TUNEL-Assays wurden mit Hilfe von Statistica 8.0 als Einzelwerte dargestellt. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse sind mit Hilfe von Microsoft Excel 2003 als Balkendiagramme dargestellt.

### **2.8.5 Statistische Verfahren**

Zur statistischen Auswertung wurde ebenfalls das Programm Statistica 8.0 verwendet. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Als statistische Testverfahren wurden der Friedman-Test sowie der Wilcoxon-Test verwendet.

Der Friedman-Test ist ein nicht-parametrisches Verfahren zum statistischen Vergleich von 3 oder mehr gepaarten Stichproben. Dazu werden den OTM-Mittelwerten der verschieden getesteten Konzentrationen jedes einzelnen Patienten nach ihrer Größe Ränge zugewiesen. Anschließend werden die Ränge der einzelnen Patienten aufsummiert. Die Rangsummen der unterschiedlichen Konzentrationen können dann miteinander verglichen werden.

Der Wilcoxon-Test ist ebenfalls ein nicht-parametrisches statistischen Verfahren. Im Gegensatz zum Friedman-Test vergleicht er allerdings nur zwei gepaarte Stichproben, sodass mit seiner Hilfe untersucht werden kann, ob sich die getesteten Konzentrationen signifikant unterscheiden.

Die Nullhypothese ist die Annahme, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den getesteten Variablen besteht, die Alternativhypothese geht von einem signifikanten Unterschied zwischen den getesteten Variablen aus.

Durch multiples Testen, also die Durchführung mehrerer Signifikanztests am gleichen Stichprobenumfang nimmt die  $\alpha$ -Fehlerwahrscheinlichkeit zu. Das Signifikanzniveau ( $p=0,05$ ) kann durch das Bonferroni-Verfahren korrigiert werden. Dabei wird das Signifikanzniveau  $p$  durch die Anzahl ( $m$ ) der durchgeführten Wilcoxon-Tests pro Stichprobenumfang geteilt und so ein korrigiertes Signifikanzniveau  $p/m$  festgelegt. Dieses sehr konservative Korrekturverfahren eignet sich nicht für Zelllinienexperimente, bei denen nur 5 Testwiederholungen durchgeführt wurden.

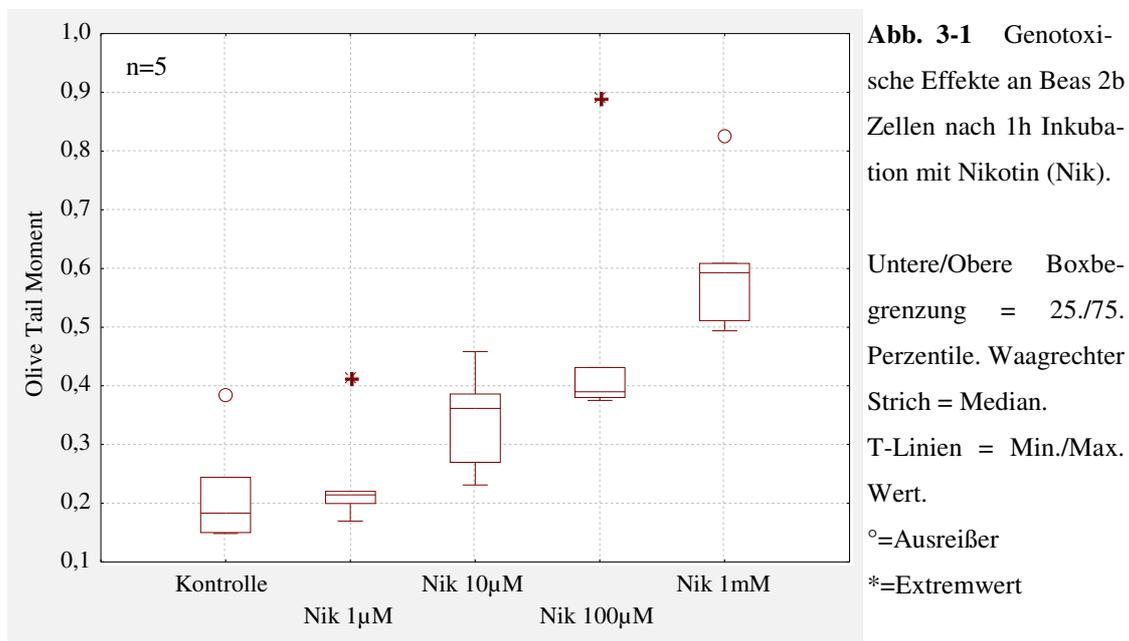
# Ergebnisse

## 3.1 Ergebnisse aus den Versuchen mit dem Comet Assay

Nachfolgend sind die Ergebnisse für die Comet Assay Versuche getrennt nach den unterschiedlichen verwendeten Geweben dargestellt. Im sich anschließenden Abschnitt folgen die Ergebnisse aus Apoptose und Zellzyklus Versuchen.

### 3.1.1 Zelllinienversuche

Nikotin wurde mit aufsteigenden Konzentrationen von 1µl bis 1mM für 1 Stunde mit Zellen der Zelllinie Beas 2b inkubiert. Der Zelllinienversuch wurde fünfmal wiederholt.



Mit steigender Nikotinkonzentration ist ein Anstieg der OTM-Werte festzustellen. Der Friedmantest zeigt mit  $p=0,002$  einen signifikanten Unterschied zwischen den 5 getesteten Konzentrationen. Die Negativkontrolle ( $0,18 \pm 0,1$ ) und Nikotin  $1\mu\text{M}$  ( $0,214 \pm 0,09$ ) beziehungsweise  $10\mu\text{M}$  ( $0,316 \pm 0,09$ ) unterscheiden sich im Wilcoxon-Test nicht signifikant. Negativkontrolle ( $0,185 \pm 0,1$ ) und Nikotin  $100\mu\text{M}$  ( $0,39 \pm 0,22$ ) unterscheiden sich im Wilcoxon-Test mit  $p=0,043$  signifikant. Die Positivkontrolle mit MMS  $100\mu\text{M}$  liegt bei  $2,09 \pm 2,06$ .

Tab. 3-1 Ergebnisse des Friedmantests für Beas 2b (n=5).

	Mittl. Rang	Rangsumme	Mittelw.	Stdabw.
<b>Kontrolle</b>	1,4	7	0,22	0,1
<b>Nik 1<math>\mu</math>M</b>	1,8	9	0,24	0,1
<b>Nik 10<math>\mu</math>M</b>	2,8	14	0,34	0,1
<b>Nik 100<math>\mu</math>M</b>	4,2	21	0,49	0,22
<b>Nik 1mM</b>	4,8	24	0,61	0,13

Dargestellt sind die Mittleren Ränge, Rangsummen, Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen errechnet aus den OTM-Mittelwerten für die einstündige Inkubation von Beas2b Zellen und Nikotinkonzentrationen von 1 $\mu$ M bis 1mM.

Es wurde 1mM Nikotin in einstündiger Koinkubation mit aufsteigenden Mecamylaminkonzentration an Zelllinienepithel Beas 2b getestet. Als Negativkontrolle wurde PBS verwendet, als Positivkontrolle MMS. Zusätzlich wurde 1mM Nikotin ohne Mecamylamin getestet. Der Zelllinienversuch wurde fünfmal wiederholt.

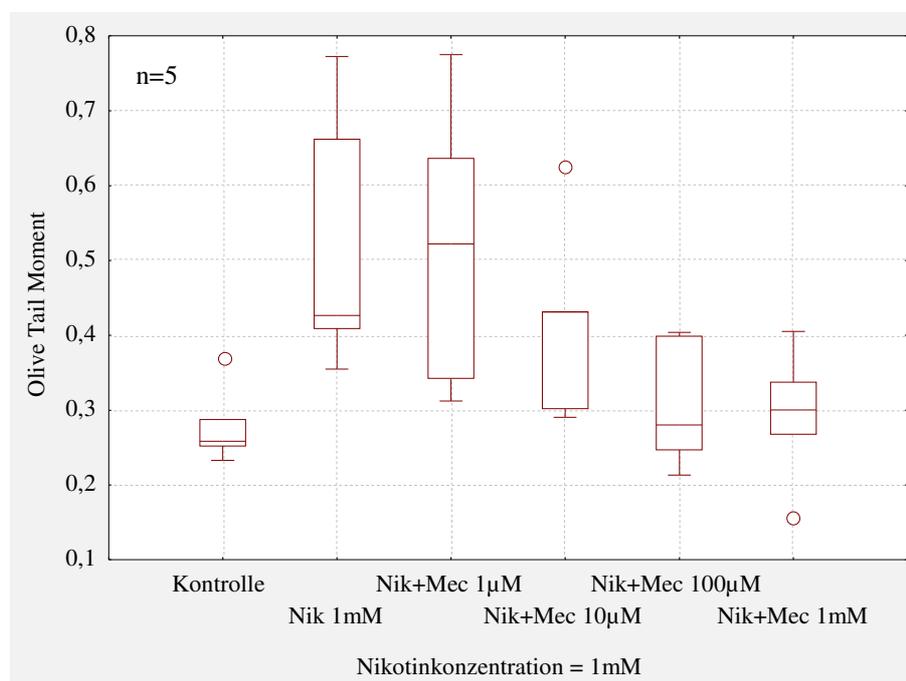


Abb. 3-2 Koinkubation von Nikotin (Nik) und Mecamylamin (Mec) an Beas 2b Zellen. Inkubation 1h.

Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile. Waagrechter Strich = Median. T-Linien = Min./Max. Wert. °=Ausreißer

Der Friedmantest für die Koinkubationen von Nikotin und aufsteigende Mecamylaminkonzentrationen von 0 $\mu$ M bis 1mM ist mit  $p=0,003$  signifikant.

Es ist ein Anstieg des OTM-Medians der Nikotinkonzentration 1mM (0,43 +/-0,18) gegenüber der Kontrolle (0,26 +/-0,05) zu erkennen, im Wilcoxon-test besteht mit  $p=0,04$  ein signifikanter Unterschied. Bei Koinkubation von Nikotin 1mM und Mecamylamin ist eine Abnahme der OTM-Werte mit steigender Mecamylaminkonzentration feststellbar, wobei der Unterschied von Nikotin 1mM (0,43 +/-0,18) und Nikotin+Mecamylamin 100 $\mu$ M (0,28 +/-0,09) mit  $p=0,04$  signifikant ist.

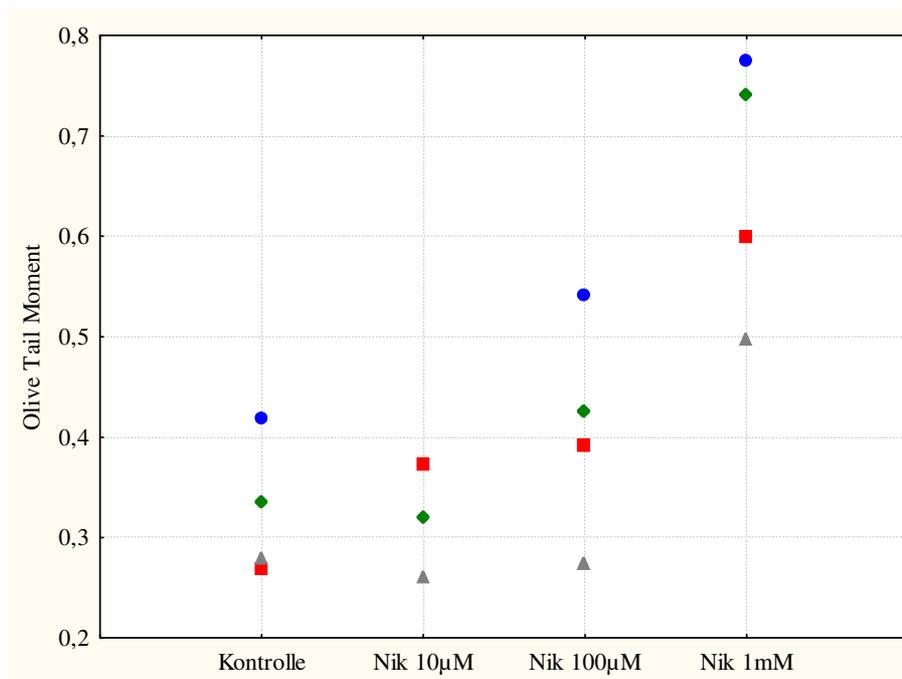
**Tab. 3-2** Ergebnisse des Friedmantests für Beas 2b (n=5).

	<b>Mittl. Rang</b>	<b>Rangsumme</b>	<b>Mittelw.</b>	<b>Stdabw.</b>
<b>Nik</b>	4,4	22	0,53	0,18
<b>Nik+Mec 1<math>\mu</math>M</b>	4,2	21	0,52	0,2
<b>Nik+Mec 10<math>\mu</math>M</b>	3,4	17	0,42	0,14
<b>Nik+Mec100<math>\mu</math>M</b>	1,4	7	0,31	0,09
<b>Nik+Mec1mM</b>	1,6	8	0,29	0,09

Dargestellt sind die Mittleren Ränge, Rangsummen, Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen errechnet aus den OTM-Mittelwerten für die einstündige Koinkubation von Beas2b Zellen mit Nikotinkonzentrationen von 1mM (Nik) und Mecamylamin (Mec) in Konzentrationen von 0 $\mu$ M bis 1mM.

### 3.1.2 Ergebnisse der Versuche mit humaner Bronchialschleimhaut

Es wurden Einzelzellen aus den Bronchialgewebeproben von 4 Patienten isoliert. Nach einstündiger Inkubation mit Nikotin erfolgte die Durchführung des Comet Assay. Als Negativkontrolle kam PBS, als Positivkontrolle MMS in Konzentration von  $100\mu\text{M}$  zum Einsatz.



**Abb. 3-3**

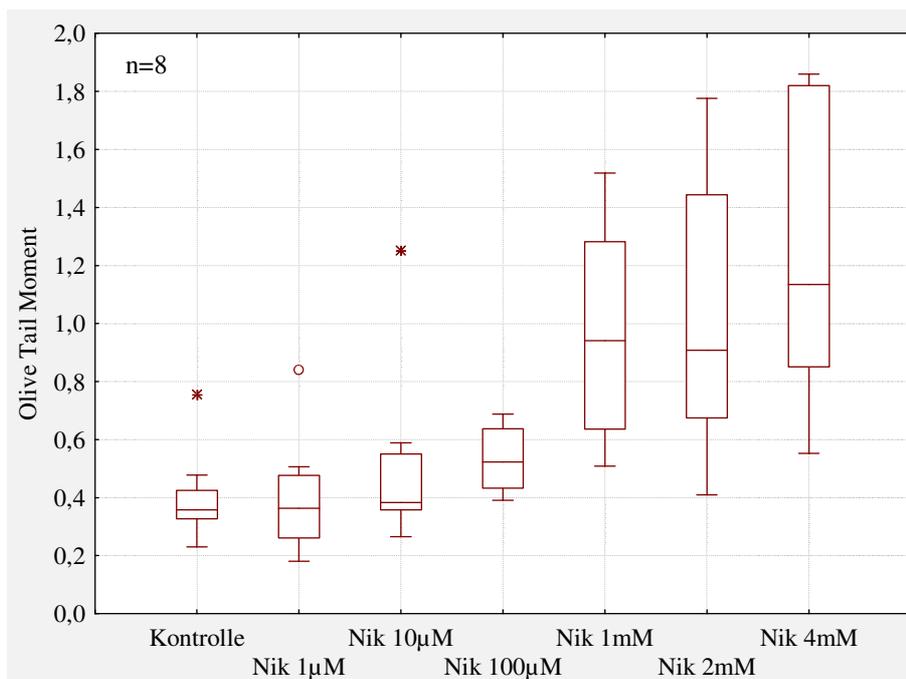
Genotoxische Effekte von Nikotin an humaner Bronchialschleimhaut.

Dargestellt sind die OTM-Mittelwerte von 4 Patientin nach 1h Inkubation mit Nikotinkonzentrationen (Nik) von  $10\mu\text{M}$  bis  $1\text{mM}$ .

Es ist ein Anstieg der OTM-Mediane von Nikotin  $100\mu\text{M}$  ( $0,40 \pm 0,11$ ) und  $1\text{mM}$  ( $0,67 \pm 0,13$ ) gegenüber der Kontrolle ( $0,31 \pm 0,07$ ) zu erkennen. Die OTM-Mediane von Nikotin  $10\mu\text{M}$  liegen bei ( $0,32 \pm 0,05$ ), MMS  $100\mu\text{M}$  ( $3,23 \pm 2,93$ ). Bei der Nikotinkonzentration  $10\mu\text{M}$  konnten nur 3 Proben ausgewertet werden, da sich bei der 4. Probe zu wenige Zellen auf den Objektträgern befanden. Aufgrund des sehr kleinen Stichprobenumfangs von nur 4 Patienten ist eine statistische Analyse nicht sinnvoll.

### 3.1.3 Ergebnisse der Versuche mit humaner Nasenschleimhaut

Es wurde eine Dosiswirkungskurve an Nasenschleimhautzellen von 8 Patienten mit steigenden Nikotinkonzentrationen von 1µM bis 4mM bei einer Inkubationszeit von einer Stunde erstellt. Als Negativkontrolle wurde PBS, als Positivkontrolle MMS 100µM eingesetzt.



**Abb. 3-4** Genotoxische Effekte an humaner Nasenschleimhaut nach 1h Inkubation mit Nikotin (Nik).  
Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile. Waagrechter Strich = Median.  
T-Linien = Min./Max. Wert.  
°=Ausreißer  
\*=Extremwert

Der Friedmantest ist für die einstündige Inkubation von humanen Nasenschleimhautproben mit aufsteigenden Nikotinkonzentrationen von 1µM bis 4mM mit  $p=0,00001$  signifikant.

**Tab. 3-3** Ergebnisse des Friedmantests für humane Nasenschleimhaut (n=8).

	Mittl. Rang	Rangsumme	Mittelw.	Stdabw.
<b>Kontrolle</b>	2,25	18	0,4	0,16
<b>Nik 1µM</b>	1,75	14	0,41	0,21
<b>Nik 10µM</b>	2,88	23	0,51	0,31
<b>Nik 100µM</b>	3,75	30	0,53	0,12
<b>Nik 1mM</b>	5,38	43	0,97	0,37
<b>Nik 2mM</b>	5,5	44	1,03	0,51
<b>Nik 4mM</b>	6,5	52	1,25	0,53

Dargestellt sind die Mittleren Ränge, Rangsummen, Mittelwerte und zugehörigen Standardabweichungen errechnet aus den OTM-Mittelwerten für die einstündige Inkubation von Nasenschleimhaut und Nikotin in Konzentrationen von 1µM bis 1mM.

Die OTM-Werte der Nikotinkonzentrationen 1µM (0,36 +/-0,2) und 10µM (0,38 +/-0,3) liegen auf Kontrollniveau. Die Nikotinkonzentration von 100µM (0,52 +/- 0,12) liegt in der gewählten Darstellungsform erkennbar über den beiden niedrigeren Konzentrationen bzw. der Kontrolle, unterscheidet sich von der Kontrolle aber nicht signifikant (p=0,07). Im Wilcoxon-Test unterscheiden sich die Kontrolle (0,36 +/-0,16) und Nikotin 1mM (0,94 +/- 0,37) mit p=0,01 signifikant. Die OTM-Werte der 2mM und 4mM Nikotinlösungen liegen bei 0,9 +/-0,5 und 1,13 +/-0,51.

**Tab. 3-4** Übersicht Wilcoxon-Testergebnisse für humane Nasenschleimhaut (n=8). Das Signifikanzniveau p liegt Bonferroni-korrigiert bei 0,03. Der Wert unterhalb dieses Niveaus ist grau hinterlegt.

	<b>Kontrolle vs. Nik 100µM</b>	<b>Kontrolle vs. Nik 1mM</b>
<b>p-Wert</b>	0,07	0,01

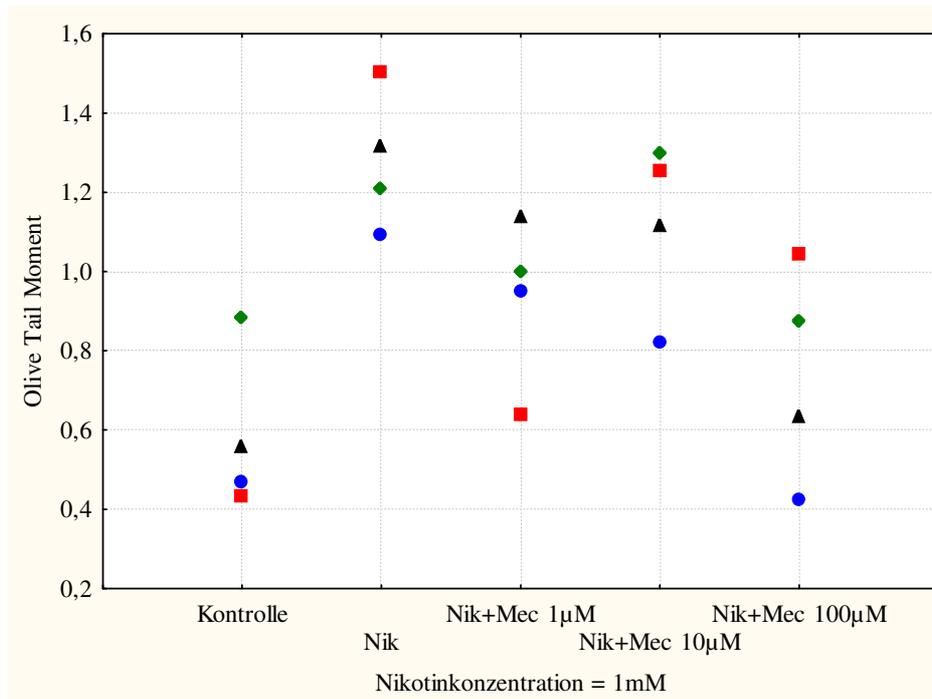
<b>Patient</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter</b>	<b>Beruf</b>	<b>Alkohol (g/Tag)</b>	<b>Nikotin (py)</b>
1	m	22	Schlosser	30	15
2	m	35	Apotheker	10	-
3	m	60	Rentner	20	-
4	m	61	Angestellter	-	-
5	f	58	Hausfrau	-	-
6	m	54	Maschinist	-	5
7	m	35	Angestellter	-	18
8	m	19	Student	-	2

**Tab. 3-5** Daten der 8 Studienpatienten.

m=männlich, f=weiblich

Die Alkoholmenge ist in Gramm (g) pro Tag angegeben, der Nikotinkonsum in pack years (py). 1py entspricht 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr. (-) unregelmäßiger Alkoholkonsum in geringen Mengen <10g Tag beziehungsweise kein Nikotinkonsum.

Nach den OTM-Werten der Dosiswirkungskurve wurde für den folgenden Versuchsansatz eine Nikotinkonzentration von 1mM ausgewählt, um einen statistisch signifikanten DNA-Schaden zu erzeugen. Als Vorversuch wurde an 4 Patienten dann Nikotin mit Mecamylaminkonzentrationen inkubiert, die sich im Koinkubationsversuch mit Beas 2b-Zellen als effektiv erwiesen hatten.



**Abb. 3-5**

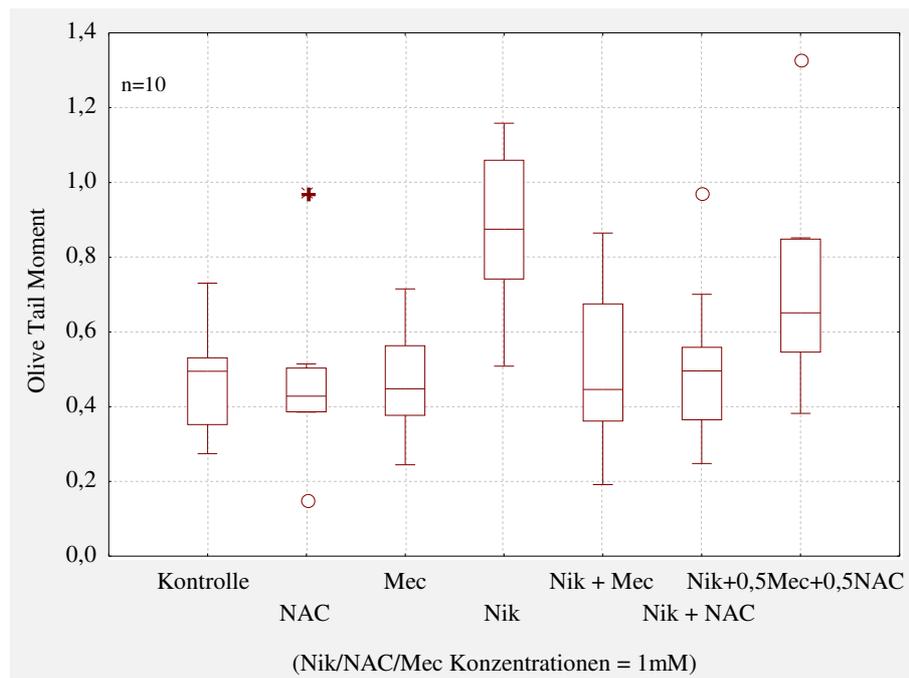
Genotoxische Effekte von Nikotin bei Koinkubation von 1mM Nikotin und unterschiedlichen Mecamylamin an humaner Nasenschleimhaut.

Einzelwertdarstellung der 4 Patienten für die einstündige Koinkubation von Nikotin (Nik) und Mecamylamin (Mec).

Die OTM-Werte aller 4 Versuche für Nikotin in einer Konzentration von 1mM liegen über den zugehörigen

Kontrollwerten. Bei 3 der 4 Patienten sinken die OTM-Werte bei Koinkubation von Nikotin 1mM und Mecamylamin mit steigender Mecamylaminkonzentration und erreichen bei 100µM Mecamylamin das OTM-Niveau der jeweiligen Kontrollen.

Nach den Vorversuchen mit 4 Patienten wurden an Nasenschleimhautproben von 10 Patienten einstündige Koinkubationen von Nikotin 1mM mit einer Mecamylaminkonzentration von 1mM oder mit 1mM N-Acetylcystein (nach Literaturangaben, zum Beispiel Sudheer et al., 2008) durchgeführt. Zusätzlich wurden Mecamylamin, Acetylcystein und Nikotin in einer 1mM Konzentration als Einzelsubstanzen getestet.



**Abb. 3-6** DNA-Schäden bei Koinkubation von Nikotin (Nik), Mecamylamin (Mec) und N-Acetylcystein (NAC) an Beas 2b Zellen. Inkubation 1h. Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile. Waagrechter Strich = Median. T-Linien = Min./Max. Wert. °=Ausreißer \* =Extremwert

Die OTM-Mediane der Kontrolle (0,49 +/-0,15), N-Acetylcystein 1mM (0,43 +/-0,2) und Mecamylamin 1mM (0,45 +/-0,15) liegen auf dem gleichen Niveau. Im Wilcoxon-Test unterscheiden sie sich nicht signifikant ( $p=0,6$  für Kontrolle und NAC;  $p=0,8$  für Kontrolle und Mecamylamin 1mM).

Der Unterschied zwischen Kontrolle (0,49 +/-0,15) und Nikotin 1mM (0,87 +/-0,22) ist mit  $p=0,005$  signifikant. Ebenfalls signifikant mit  $p=0,005$  sind die Unterschiede zwischen Nikotin 1mM (0,87 +/-0,22) und Nikotin+Mecamylamin 1mM (0,45 +/-0,20) sowie Nikotin+N-Acetylcystein 1mM (0,5 +/-0,21). Der OTM-Median der Positivkontrolle liegt bei 4,86 +/-3,41.

**Tab. 3-6** Übersicht Wilcoxon Testergebnisse (n=10). Das Signifikanzniveau nach Bonferronikorrektur bei 0,03. Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

	Kontrolle vs. NAC	Kontrolle vs. MEC	Kontrolle vs. Nik	Nik vs. Nik+Mec	Nik vs Nik+NAC
<b>p-Wert</b>	0,6	0,8	0,005	0,005	0,005

**Tab. 3-7** Daten der 10 Studienpatienten.

Patient	Geschlecht	Alter	Beruf	Alkohol (g/Tag)	Nikotin (py)
1	f	63	Rentnerin	40	50
2	m	54	Maschinist	-	5
3	m	38	Monteur	20	-
4	f	27	Hausfrau	10	11
5	m	38	Angestellter	-	-
6	m	31	Informatiker	-	-
7	f	31	Lehrerin	-	-
8	f	64	Rentnerin	-	10
9	m	19	Student	-	-
10	f	69	Rentnerin	-	-

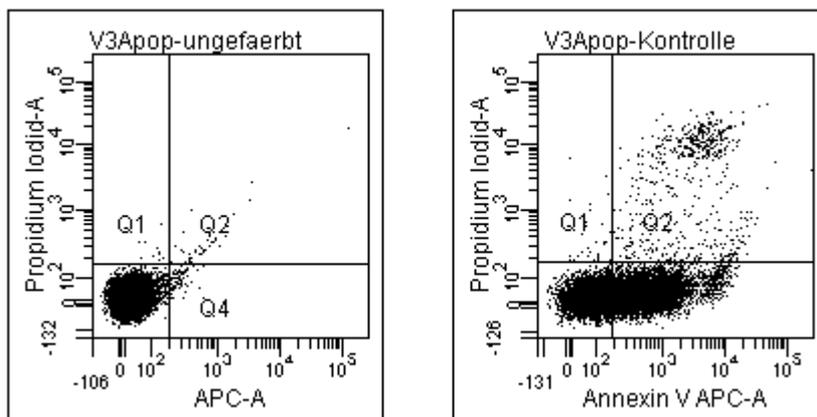
m=männlich, f=weiblich

Die Alkoholmenge ist in Gramm (g) pro Tag angegeben, der Nikotinkonsum in pack years (py). 1py entspricht 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr. (-) unregelmäßiger Alkoholkonsum in geringen Mengen <10g Tag beziehungsweise kein Nikotinkonsum.

## 3.2 Ergebnisse aus den Versuchen mit dem Durchflusszytometer

### 3.3.1 Apoptosemessung mit Annexin V

Beas 2b Zellen wurden für 24 Stunden mit 1mM Nikotin in Zellkulturflaschen inkubiert. Als Negativkontrolle wurde PBS als Positivkontrolle MMS in einer Konzentration von 100 $\mu$ M verwendet.



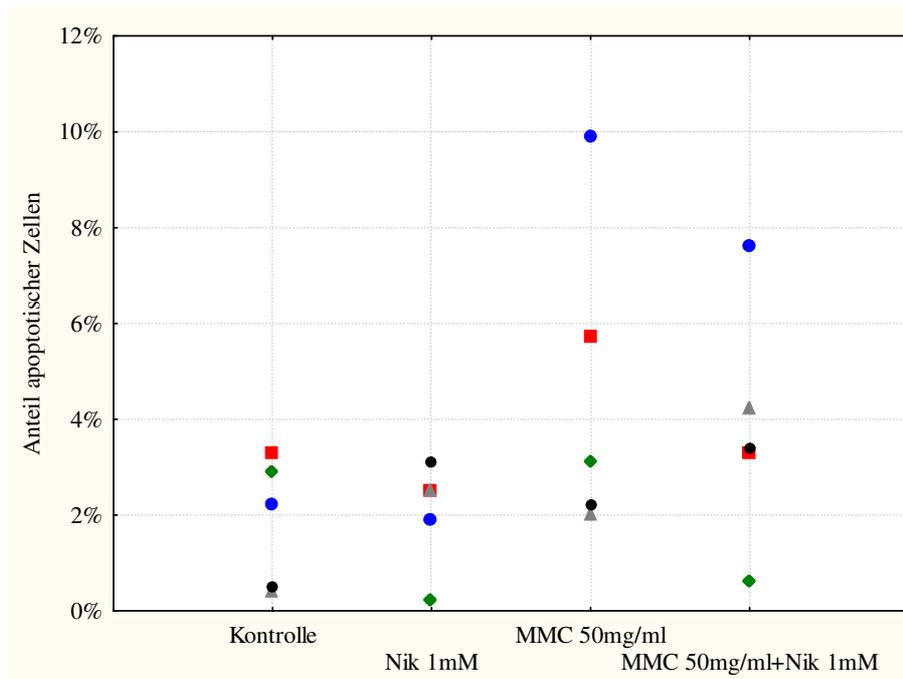
**Abb. 3-7**

Darstellung der durchflusszytometrischen Messung einer Negativkontrolle. Im linken Diagramm sind die Zellen Propidiumjodid beziehungsweise APC gefärbt, im rechten Diagramm Propidiumjodid und Annexin-V-APC

Im Vergleich von ungefärbter Kontrolle und Annexin/APC gefärbter Kontrolle zeigt sich eine Zunahme apoptotischer und nekrotischer Zellen erkennbar an den zunehmenden Anfärbesignalen in den Diagrammfeldern Q4 beziehungsweise Q3.

### 3.3.2 Apoptose im TUNEL-Assay

Zellen der Zelllinie Beas2b wurden für 24 Stunden in Zellkulturflaschen mit Fremdstoff inkubiert. Als Negativ- beziehungsweise Positivkontrolle wurde PBS und MMC 50mg/ml verwendet. Nikotin wurde in einer Dosierung von 1mM sowie in Koinkubation mit MMC 50mg/ml eingesetzt. Die Versuche wurden vier mal wiederholt (n=5).



**Abb. 3-8**

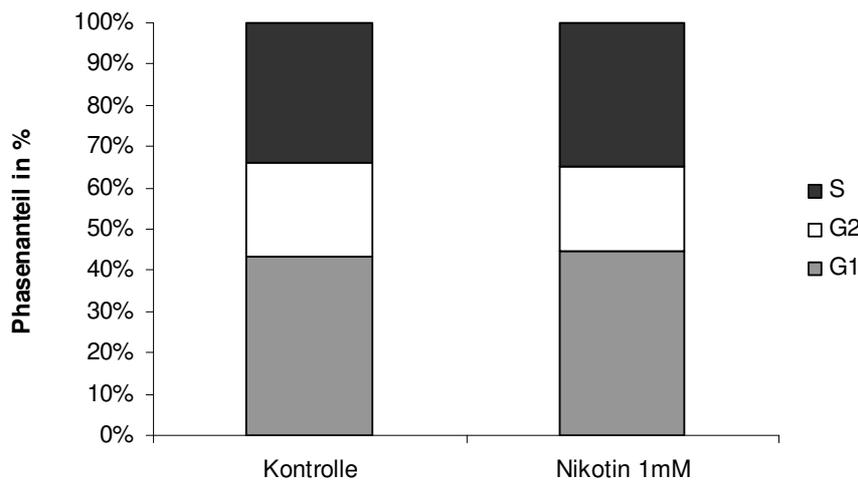
Darstellung des Anteils apoptotischer Zellen im TUNEL-Assay mit APO-BRDU.

Als Kontrolle kam PBS, als Positivkontrolle MMC zum Einsatz. Die Inkubationszeit betrug 24h. n=5

Hinsichtlich des Anteils apoptotischer Zellen an der Testpopulation konnte kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Erkennbar ist allerdings, dass die Streuung der Werte bei Inkubation mit MMC zunimmt. Bei Koinkubation von MMC und Nikotin scheint der Anteil apoptotischer Zellen wieder abzunehmen.

### 3.3.3 Zellzyklus

Die Zelllinie Beas 2b wurden in Zellkulturflaschen für 24 Stunden fremdstoffexponiert. Anschließend erfolgte die Durchführung der Zellzyklusmessung nach dem in Abschnitt 2.8 beschriebenen Protokoll. Die Versuche wurden fünfmal wiederholt.



**Abb. 3- 8**

Dargestellt sind die Mediane der G1-, G2- und S-Phasenanteile in %.

Zelllinienepithel wurde für 24h mit Nikotin 1mM sowie mit PBS als Kontrolle inkubiert.

Der Median der G1-Phase betrug in der Kontrolle  $0,43 \pm 0,08$  und lag für Nikotin 1mM bei  $0,44 \pm 0,04$ . Der G2-Phasenanteil betrug für die Kontrolle im Median  $0,23 \pm 0,05$  sowie  $0,2 \pm 0,04$  für Nikotin. Der Median der S-Phase lag bei  $0,33 \pm 0,04$  beziehungsweise  $0,34 \pm 0,03$ .

Es konnte kein statistisch signifikanter Unterschied der G1, G2 oder S-Phasenanteile von Kontrolle beziehungsweise Nikotin 1mM nachgewiesen werden.

## Datenübersicht: Nikotin-Dosiswirkungskurve an Beas 2b

Versuch	Kontrolle			Nikotin								
	1µM			10µM			100µM					
	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT			
1	31,47	0,15	0,62	36,15	0,21	0,84	35,73	0,27	1,04	43,19	0,38	1,35
2	32,22	0,18	0,79	35,82	0,22	0,90	46,75	0,36	1,19	50,39	0,38	1,20
3	44,51	0,39	1,25	42,46	0,42	1,35	46,38	0,46	1,51	61,75	0,89	2,43
4	36,05	0,15	0,60	32,91	0,20	0,86	37,43	0,39	1,57	39,77	0,43	1,71
5	33,65	0,24	1,07	31,02	0,17	0,78	31,66	0,23	1,01	36,30	0,39	1,51
<b>Median</b>	33,65	0,18	0,79	35,82	0,21	0,86	37,43	0,36	1,19	43,19	0,39	1,51
<b>Stdabw.</b>	5,29	0,10	0,29	4,35	0,10	0,23	6,70	0,09	0,26	10,10	0,22	0,48
Versuch	Nikotin			MMS								
	1mM			100µM								
	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT						
1	43,00	0,49	1,88	59,51	1,03	3,38						
2	60,67	0,51	1,36	42,48	1,23	5,32						
3	65,32	0,83	2,28	74,94	2,09	5,82						
4	38,88	0,59	2,43	72,25	5,94	14,36						
5	43,77	0,61	2,35	63,59	3,85	10,26						
<b>Median</b>	43,77	0,59	2,28	63,59	2,09	5,82						
<b>Stdabw.</b>	11,83	0,13	0,44	12,85	2,07	4,43						

## Datenübersicht: Nikotin und Mecamylamin an Beas 2b

Versuch	Kontrolle		Nikotin		Nikotin + Mecamylamin							
			1mM		Nik 1mM+Mec 1µM		Nik 1mM+Mec 10µM					
1	49,06	0,37	1,22	58,90	0,77	2,24	51,61	0,78	2,23	59,97	0,63	1,70
2	44,33	0,26	0,95	49,95	0,66	2,15	51,50	0,64	2,06	48,00	0,43	1,30
3	44,88	0,23	0,77	53,92	0,43	1,22	55,09	0,52	1,54	45,00	0,29	0,98
4	42,82	0,25	0,91	37,11	0,36	1,25	41,26	0,31	1,13	40,25	0,30	1,15
5	46,26	0,29	0,98	49,81	0,41	1,32	46,88	0,34	1,18	54,01	0,43	1,28
<b>Median</b>	44,88	0,26	0,95	49,95	0,43	1,32	51,50	0,52	1,54	48,00	0,43	1,28
<b>Stdabw.</b>	2,36	0,05	0,16	8,07	0,18	0,51	5,34	0,20	0,50	7,71	0,14	0,27
Versuch	Nikotin + Mecamylamin		MMS		Nikotin + Mecamylamin							
	Nik 1mM+Mec 100µM	Nik 1mM+Mec 1mM	100µM		Nik 1mM+Mec 100µM	Nik 1mM+Mec 1mM	100µM					
1	45,54	0,40	1,35	47,09	0,41	1,36	67,89	2,69	7,20	73,64	4,33	10,96
2	41,12	0,40	1,39	46,90	0,34	1,17	73,64	4,33	10,96	76,39	2,36	6,45
3	46,22	0,25	0,81	47,13	0,27	0,92	76,39	2,36	6,45	75,26	2,78	7,18
4	36,44	0,21	0,84	36,58	0,16	0,62	75,26	2,78	7,18	66,25	2,01	5,44
5	45,18	0,28	0,99	48,94	0,30	1,05	66,25	2,01	5,44	73,64	2,69	7,18
<b>Median</b>	45,18	0,28	0,99	47,09	0,30	1,05	73,64	2,69	7,18	4,54	0,89	2,09
<b>Stdabw.</b>	4,13	0,09	0,28	4,96	0,09	0,28	4,54	0,89	2,09			

## Datenübersicht: Dosiswirkungskurve Nikotin an humaner Nasenschleimhaut

Patient	Kontrolle				Nikotin											
	TL	OTM	DT		TL	OTM	DT									
	1µM				10µM				100µM							
1	46,46	0,37	1,25	46,35	0,45	1,47	50,32	0,51	1,65	50,65	0,69	2,21				
2	49,83	0,76	2,13	38,18	0,51	1,74	48,91	1,25	3,50	42,67	0,66	2,20				
3	40,49	0,37	1,46	35,70	0,26	1,04	39,11	0,36	1,39	45,25	0,58	1,95				
4	47,13	0,48	1,47	45,80	0,32	1,10	47,62	0,37	1,22	52,05	0,39	1,31				
5	40,68	0,34	1,32	49,12	0,84	2,39	52,42	0,59	1,93	49,05	0,61	2,09				
6	30,27	0,35	1,76	25,75	0,26	1,39	29,53	0,36	1,70	30,24	0,42	2,01				
7	26,12	0,23	1,17	24,15	0,18	0,98	25,21	0,27	1,08	33,10	0,45	1,84				
8	29,77	0,32	1,51	31,84	0,41	1,94	30,09	0,40	1,92	31,65	0,47	2,13				
<b>Median</b>	40,59	0,36	1,47	36,94	0,36	1,43	43,37	0,38	1,68	43,96	0,52	2,05				
<b>Stdabw.</b>	9,03	0,16	0,31	9,51	0,21	0,50	10,85	0,31	0,75	8,95	0,12	0,29				
					Nikotin				MMS							
	1mM				2mM				4mM				100µM			
Patient	TL	OTM	DT		TL	OTM	DT		TL	OTM	DT		TL	OTM	DT	
1	58,91	1,52	4,42	66,59	1,78	5,00	64,87	1,86	5,07	87,58	6,33	15,82				
2	40,03	0,60	1,89	46,94	1,14	3,32	55,39	1,79	4,79	95,83	9,95	22,21				
3	49,02	0,95	2,67	42,24	0,58	1,83	50,60	0,80	2,68	72,63	3,71	8,81				
4	53,64	1,26	3,56	49,37	0,80	2,50	59,83	0,94	2,40	100,72	6,81	15,98				
5	69,26	1,31	3,52	80,07	1,75	4,25	70,30	1,86	4,48	84,55	7,55	18,41				
6	35,62	0,67	2,72	38,26	0,77	3,08	49,30	1,33	4,33	60,14	3,71	11,09				
7	27,09	0,51	1,94	28,99	0,41	1,56	30,99	0,55	2,11	51,74	3,52	10,93				
8	43,82	0,93	3,64	46,81	1,01	3,61	41,86	0,91	3,45	97,71	5,84	30,10				
<b>Median</b>	46,42	0,94	3,12	46,88	0,91	3,20	53,00	1,14	3,89	86,07	6,08	15,90				
<b>Stdabw.</b>	13,47	0,37	0,89	16,21	0,51	1,17	12,65	0,53	1,16	18,14	2,25	6,98				

## Datenübersicht: Nikotin und Mecamylamin/N-Acetylcystein an Nasenschleimhaut

Patient	Kontrolle			NAC			Mecamylamin 1mM			Nikotin		
	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT
1	39,82	0,73	2,80	45,37	0,97	3,47	41,30	0,65	2,63	42,85	1,06	3,71
2	23,47	0,27	1,16	23,76	0,15	0,80	24,83	0,24	1,13	32,23	0,51	1,94
3	42,72	0,66	2,31	38,19	0,45	1,64	41,22	0,71	2,38	43,95	0,74	2,63
4	44,65	0,53	1,94	37,68	0,51	1,97	37,38	0,53	2,12	52,23	0,90	3,12
5	37,34	0,27	1,07	34,71	0,40	1,60	41,42	0,43	1,48	37,76	0,58	2,32
6	40,23	0,51	2,02	38,34	0,50	2,11	42,05	0,56	2,12	53,77	1,03	3,35
7	41,80	0,46	1,73	40,50	0,43	1,62	36,65	0,31	1,29	53,83	0,85	2,68
8	43,25	0,50	1,80	39,44	0,42	1,69	42,67	0,47	1,81	50,75	0,80	2,79
9	41,73	0,35	1,32	42,95	0,39	1,44	43,45	0,39	1,48	55,66	1,13	3,65
10	40,25	0,49	1,78	39,55	0,39	1,53	37,36	0,38	1,53	64,73	1,16	3,21
<b>Median</b>	40,99	0,49	1,79	38,89	0,43	1,63	41,26	0,45	1,67	51,49	0,87	2,96
<b>Stdabw.</b>	6,00	0,15	0,53	5,81	0,20	0,68	5,48	0,15	0,50	9,56	0,22	0,57
	<b>Nikotin + Mecamylamin</b>			<b>Nikotin + NAC</b>			<b>Nikotin + MEC + NAC</b>			<b>MMS</b>		
	<b>Nik/Mec/NAC je 1mM</b>			<b>Nik/Mec/NAC je 0,5mM</b>			<b>Nik 1mM Mec/NAC je 0,5mM</b>			<b>100µM</b>		
Patient	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT
1	43,07	0,86	3,49	43,79	0,97	3,62	48,13	1,33	4,72	75,24	6,28	16,07
2	23,46	0,19	1,00	23,59	0,26	1,02	27,21	0,38	1,75	59,33	4,43	13,15
3	34,31	0,31	1,35	33,05	0,25	1,04	35,28	0,44	1,93	67,36	3,20	9,08
4	37,69	0,45	1,87	39,45	0,45	1,78	41,70	0,75	2,89	67,04	3,61	9,61
5	36,64	0,36	1,48	53,97	0,52	1,63	50,25	0,64	2,20	67,34	4,14	11,84
6	40,65	0,68	2,36	41,78	0,53	2,11	46,71	0,85	2,95	123,64	14,91	30,65
7	37,89	0,39	1,49	40,61	0,37	1,43	44,58	0,55	1,92	88,17	5,29	12,85
8	41,42	0,45	1,80	42,14	0,47	1,88	46,79	0,64	2,35	78,67	5,70	13,49
9	49,29	0,58	2,09	46,26	0,56	2,06	60,94	0,85	2,66	82,52	3,68	9,46
10	47,39	0,68	2,07	53,88	0,70	2,18	44,37	0,66	2,22	99,31	6,61	15,04
<b>Median</b>	39,27	0,45	1,83	41,96	0,50	1,83	45,65	0,65	2,29	76,95	4,86	13,00
<b>Stdabw.</b>	7,25	0,20	0,69	9,03	0,21	0,74	8,93	0,27	0,86	19,10	3,41	6,27

### 3.3.4 Zusammenfassung der Daten

Die Daten der Dosiswirkungskurven für die einstündige Inkubation mit Nikotin und Beas 2b Zellen (n=5) beziehungsweise nasaler Schleimhaut (n=8) zeigen eine zunehmende genotoxische Schädigung mit steigender Nikotinkonzentration. Als Maß der genotoxischen Schädigung wurde der Fragmentationsgrad der zellulären DNA gemessen als Schweiflänge (TL), DNA im Schweif (DT) und der Kombination aus beiden Parametern (OTM) verwendet. Als Kontrollwerte für Beas 2b Zellen ergaben sich 33,65 +/-5,29 (TL), 0,18 +/-0,1 (OTM) und 0,79 +/-0,29 (DT). Eine signifikante Erhöhung der OTM-Werte gegenüber dieser Kontrolle zeigt sich ab einer Nikotinkonzentration von 100µM. Die Werte betragen für diese Konzentration 43,19 +/-10,1 (TL), 0,39 +/-0,22 (OTM) und 1,51 +/-0,48 (DT). Bei der Inkubation mit humaner Nasenschleimhaut wird das OTM-Signifikanzniveau bei einer Nikotinkonzentration von 1mM erreicht. Die Werte betragen bei dieser Konzentration 46,42 +/-13,47 (TL), 0,94 +/-0,37 (OTM) und 3,12 +/-0,89 (DT) gegenüber den Kontrollwerten 40,59 +/-9,03 (TL) 0,36 +/-0,16 (OTM) und 1,47 +/-0,31 (DT). Vergleicht man die Kontrollwerte von Beas 2b und Nasenschleimhaut liegen alle 3 Werte der humanen Nasenschleimhaut über denen der Zelllinie. Dies trifft auch für die verschiedenen getesteten Nikotinkonzentrationen zu. Durch die Koinkubation von Nikotin (1mM) und Mecamylamin wird der DNA-Schaden gegenüber der alleinigen Inkubation mit Nikotin (1mM) reduziert. In Beas 2b Zellen (n=5) war dieser Effekt, gemessen an den OTM-Werten, ab einer Mecamylaminkonzentration von 100µM signifikant. Die Werte für diese Koinkubation betragen 45,18 +/-4,13 (TL), 0,28 +/- 0,09 (OTM) und 0,99 +/-0,28 (DT) gegenüber der alleinigen Nikotininkubation mit Werten von 49,95 +/-8,07 (TL), 0,43 +/-0,18 (OTM) und 1,32 +/-0,51 (DT). Auch in nasaler Schleimhaut (n=10) reduziert sich der Schaden sowohl bei der Koinkubation von Nikotin 1mM mit Mecamylamin 1mM als auch mit N-Acetylcystein 1mM für 1h signifikant. Die Werte für die Koinkubation mit 1mM Mecamylamin betragen 39,21 +/-7,25 (TL), 0,45 +/-0,2 (OTM), 1,83 +/-0,69 (DT), für die mit 1mM N-Acetylcystein 41,96 +/-9,03 (TL), 0,5 +/-0,21 (OTM) und 1,83 +/- 0,74 (DT) gegenüber den Werten bei alleinigen Inkubation mit Nikotin 1mM von 51,49 +/- 9,56 (TL), 0,87 +/-0,22 (OTM) und 2,96 +/-0,57 (DT).

Obwohl die kanzerogenen Eigenschaften des Tabakkonsums lange bekannt sind und einige dafür verantwortliche Substanzen im Zigarettenrauch identifiziert werden konnten, ist die Rolle des Nikotins in der Malignomentstehung nach wie vor nicht hinreichend geklärt. Vor dem Hintergrund der immensen gesundheitlichen Schäden und der dadurch entstehenden Gesundheitskosten durch Tabakkonsum, aber auch auf Grund der zunehmenden Verwendung von Nikotinkaugummis und Pflaster zur Rauchentwöhnung ist das genaue Verständnis der genotoxischen Effekte von Nikotin und deren Mechanismen wünschenswert.

### **4.1 Diskussion der Methodik**

#### **4.1.1 Verwendete Gewebe und Präparationsmethoden**

In ersten Versuchsschritten sollten geeignete zelluläre Testsysteme zur Untersuchung der genotoxischen Schädigungspotenz von Nikotin und deren Mechanismen ausgewählt und Isolationstechniken zur Gewinnung der Zellen geprüft werden. Auf Grund pathophysiologischer und epidemiologischer Überlegungen erscheint die Verwendung von Gewebe aus dem Aerodigestivtrakt naheliegend. Zum einen ist die Konzentration des Zigarettenrauches entlang dieses Inhalationsweges besonders hoch, zum anderen weist die Korrelation zwischen Tabakkonsum und Malignomen des alveolobronchialen Systems auf die besondere Vulnerabilität dieser Region gegenüber Zigaretteninhaltsstoffen hin. Obwohl die Häufigkeit sinunasaler Tumoren niedrig ist, erscheint auch die Verwendung nasaler Schleimhaut als Testsystem sinnvoll, da es sich histologisch ebenso wie im Bronchialsystem um Flimmerepithel handelt. Die Verwendung humanen Frischgewebes bietet im Gegensatz zu Zelllinienepithelien den Vorteil genetisch und morphologisch weitgehend unveränderter Zellen. Es besteht allerdings der Nachteil, dass Messergebnisse auf Grund interindividueller Unterschiede und früherer Schadstoffexposition der Probanden beeinflusst werden könnten. In der Literatur werden unter anderem das Geschlecht der Probanden [Bajpayee et al., 2002; Lam et al., 2002] sowie das Alter der untersuchten Patienten [Maluf und Erdtmann, 2000] als Einflussfaktoren diskutiert, die vor allem bei kleinen genotoxischen Effekten der untersuchten Substanzen einen relevanten Störfaktor darstellen könnten.

Daher wurden für die Versuche neben Einzelzellen aus humanen Operationspräparaten auch die Zelllinie Beas2b als Modell humanen Bronchialgewebes verwendet, bei denen oben genannte konfundierende Faktoren nicht zu erwarten sind.

Zur Einzelzellgewinnung aus nasalen sowie bronchialen Geweben bewährte sich die enzymatische Zellvereinzelnung über 24 Stunden. Diese Methode zeigte die besten Ergebnisse hinsichtlich der Zellisolierung bei gleichzeitig geringer Zellschädigung. Einschränkend muss angemerkt werden, dass sich die Zellzählung humaner Nasenschleimhaut direkt nach der Isolierung sehr schwierig gestaltete, da die Zellen zur Verklumpung neigten. Dieses Problem konnte auch durch Versuche mit höheren Enzymkonzentrationen oder längeren Behandlungszeiten über 24 Stunden hinaus nicht gelöst werden. Da dadurch eine zu starke Schädigung der Zellen im Comet Assay induziert wurde. Bei den Proben humaner Bronchialschleimhaut konnten insgesamt nur geringe Zellzahlen isoliert werden, was zu einer Reduzierung der getesteten Konzentrationen zwang. Diese Schwierigkeit trat auch bei einer Untersuchungen von [Edelmann *et al.*, 2005] auf und wurde dort durch den Einsatz eines Zellshavers gelöst. Diese Möglichkeit kam aber nicht in Betracht, da die mechanische Belastung der Zellen ihre Verwendung im Comet Assay vermutlich stark beeinträchtigt hätte.

Das beschriebene enzymatische Herauslösen der Einzelzellen aus ihrem physiologischen, dreidimensionalen Gewebeverband kann zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber schädigenden Substanzen führen [Kleinsasser *et al.*, 2004]. Dieser Effekt könnte am ehesten die Übertragbarkeit der erstellten Dosiswirkungskurven auf *in vivo* Zellverbände beeinflussen, während die Untersuchung intrazellulärer Schädigungswege dadurch nicht beeinträchtigt werden sollte. Weiterhin ist zu bedenken, dass der Fremdstoffmetabolismus von Einzelzellen teilweise verändert ist [Teissier *et al.*, 1998], was zu einer veränderten Entgiftung oder Giftung von eingesetzten Testsubstanzen führen kann. Auch die Funktionen von Schlüsselenzymen intrazellulärer Signalkaskaden unterscheiden sich *in vivo* und *in vitro* zum Teil erheblich [Benimetskaya *et al.*, 2006].

### **4.1.2 Comet Assay**

Der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay (Comet Assay) stellt einen schnellen und sensitiven Test zur Detektion und Quantifizierung von verschiedenen DNA-Schäden auf dem Einzelzellniveau dar. Er ist an nahezu jeder Zellpopulation durchführbar, erfordert nur geringe Zellmengen, weist selbst geringe DNA-Schäden nach und kann sowohl an proliferierenden sowie nicht proliferierenden Zellpopulationen durchgeführt werden [Hartmann et al., 2003]. Auf Grund der genannten Vorteile kommt der Comet Assay nicht nur in Genotoxizitätsstudien zur Anwendung [Kleinsasser et al., 2006], sondern findet auch im klinischen Biomonitoring [Undeger und Basaran, 2002] Verwendung. Verschiede Aspekte sind jedoch bei Interpretation der gewonnenen Ergebnisse beziehungsweise bei ihrer Übertragung vom Zellmodell auf in vivo Zellsysteme zu bedenken: Die Größen der gemessenen Werte, wie OTM, DT und LT sind von den Einstellungen am Mikroskop und der Auswertungssoftware abhängig, so dass die Absolutwerte der erhaltenen Messwerte nicht von Labor zu Labor zu vergleichen sind. Auch ein unmittelbarer Rückschluss von der Höhe der gemessenen Schädigungswerte auf ihren klinischen Schweregrad im Menschen ist daher nicht möglich.

Wichtiger ist jedoch, dass die nachgewiesene DNA-Schäden gar nicht zwangsläufig zu schädlichen Auswirkungen im menschlichen Organismus führen müssen, da Teile der detektierten Schäden durch zelluläre Enzyme im späteren Verlauf wieder repariert oder die Zellen durch Apoptose aus dem Organismus entfernt werden können. Diese Effekte werden durch den Comet Assay aber nicht erfasst. Um die Beeinflussung solcher Schutzmechanismen der Zelle durch Nikotin zu erfassen, wurden daher Versuche zur Zellzyklusalteration und Apoptoseinhibition durchgeführt.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **4.2.1 Genotoxizität von Nikotin**

Im Comet Assay konnte eine statistisch signifikante Erhöhung nikotininduzierter Schäden im einstündigen Inkubationsversuch mit der Zelllinie Beas 2b ab 100µM Nikotin nachgewiesen werden. Für frisch isoliertes humanes Bronchialepithel gelang eine vergleichende Dosisfestlegung signifikant veränderter OTM-Werte auf Grund des

kleinen Stichprobenumfanges nicht. Dennoch ist für Nikotinkonzentrationen von  $100\mu\text{M}$  und  $1\text{mM}$  eine deutliche OTM-Erhöpfung gegenüber der Kontrolle erkennbar. Für humanes Nasenepithel lag die signifikante Dosis bei  $1\text{mM}$  Nikotin. Auch bei höheren Nikotinkonzentrationen im Bereich von  $2\text{-}4\text{mM}$  wurde keine erhöhte Zytotoxizität nachgewiesen (Vitalität  $> 80\%$ ).

Vergleicht man die Verläufe der Dosiswirkungskurven der 3 untersuchten Zellmodelle, ist ein prinzipiell vergleichbarer Verlauf feststellbar. Die Zelllinie Beas 2b erscheint mit einem steileren Kurvenanstieg vulnerabler auf die getesteten Nikotinkonzentrationen zu reagieren. Unklar bleibt, ob dieser Effekt nur auf dem kleineren Stichprobenumfang ( $n=5$ ) gegenüber humaner Nasenschleimhaut beruht ( $n=8$ ). Gleichzeitig liegen die Negativkontrollwerte der Zelllinie Beas 2b deutlich unterhalb der Kontrollwerte humaner Nasenschleimhautproben.

Wie eingangs bereits erwähnt, müssen bei der Verwendung humaner Gewebematerialien nicht nur interindividuelle Unterschiede hinsichtlich der Zellvulnerabilität beachtet werden, sondern auch eine genotoxische Vorbelastung der Zellen, etwa durch Rauchen und Alkoholkonsum, in Betracht gezogen werden. Hoffmann und Speit [2005] konnten in Lymphozyten allerdings keinen Unterschied hinsichtlich der genotoxischen Schädigung von Rauchern und Nichtrauchern nachweisen. Das selbe Ergebnis zeigte sich bei einer Untersuchung von Miniorgankulturen aus humaner Nasenschleimhaut [Sassen et al., 2005]. Darüber hinaus muss in Betracht gezogen werden, dass sowohl die operative Gewinnung humaner Gewebe, deren Aufarbeitung sowie die enzymatische Zellvereinzelnung zu einer Schädigung der Zellen führen. In wie weit dies eine veränderte Empfindlichkeit gegenüber genotoxischen Substanzen bedingt ist unklar. Vergleicht man die Ergebnisse der Versuche mit Beas 2b Zellen mit humanem Bronchialgewebe ist zumindest in dieser Arbeit keine grundsätzlich unterschiedliche Empfindlichkeit der Zellen festzustellen.

Dennoch ist besonders die Verwendung humaner Bronchialschleimhaut kritisch zu betrachten, da es sich bei den Probanden ausschließlich um Tumorpatienten handelte. Obwohl durch Schnittrandkontrollen vor Probenverwendung eine direkte Tumorzellbelastung der Proben weitestgehend ausgeschlossen werden konnte, ist dennoch von einer erheblichen genotoxischen Vorbelastung auszugehen.

Physiologisch vorkommende Nikotinkonzentrationen im Blut liegen im Bereich von maximal 100ng/ml (= 0,6 $\mu$ M) [Teneggi et al., 2002; Hukkanen et al., 2005] und damit 100 beziehungsweise 1000-fach unter den statistisch signifikant getesteten Nikotinkonzentrationen im einstündigen Inkubationsversuch.

Bei der Einschätzung des genotoxischen Potentials von Nikotin ist zu bedenken, dass Raucher im Allgemeinen länger und meist über viele Jahre Nikotin exponiert sind. Darüber hinaus werden in dieser Arbeit keine Wechselwirkungen von Nikotin und anderen toxischen und genotoxischen Tabakinhaltsstoffen erfasst, so dass daher insgesamt von einer höheren genotoxischen Belastung des respiratorischen Systems bei Nikotinkonsum in Zigaretten oder Zigarrenform ausgegangen werden kann. Allerdings ist zu bedenken, dass der als Testmethode verwendete Comet Assay zwar eine hohe Sensitivität für ein breites Spektrum unterschiedlicher DNA-Veränderungen besitzt, diese Veränderungen und Schäden aber nicht zwangsläufig zur malignen Transformation der untersuchten Zellen führen müssen.

Auch durch Einsatz anderer Testmethoden wie des Mikronukleus-Testes [Argentin und Cicchetti, 2004] oder des Schwesterchromatidaustausch-Testes [Trivedi et al., 1990] konnten genotoxische Effekte von Nikotin in verschiedenen Geweben nachgewiesen werden. Darüber hinaus beeinflusst Nikotin, wie in Kapitel 4.2.3 dargestellt, intrazelluläre Signalkaskaden und Steuermechanismen, was zumindest zum Teil zu einer Manifestation genotoxischer Zellschäden im Sinne der Tumorprogression beitragen könnte.

### **4.2.2 Mechanismen der DNA-Schädigung**

Durch Koinkubation von 1mM N-Acetylcystein und 1mM Nikotin an menschlichem Nasenschleimhautepithel konnte in dieser Arbeit eine signifikante ( $p < 0,005$ ) Reduzierung der Nikotin induzierten DNA-Schädigung erzielt werden. Auch durch Koinkubation von Nikotin und Mecamylamin 1mM gelang eine statistisch signifikante Reduktion des DNA-Schadens im einstündigen Inkubationsversuch.

Sowohl an Zelllinienepithel als auch an humaner Nasenschleimhaut konnte dargestellt werden, dass dieser Mecamylamineffekt dosisabhängig ist.

Wie zahlreiche Studien zeigen, ist an der Nikotin induzierten DNA-Schädigung eine Steigerung des oxidativen Stresses beteiligt [Crowley-Weber et al., 2003; Swami et al.,

2006; Muthukumar et al., 2008; Das et al., 2009b]. Untersuchungen mit verschiedenen antioxidativen Substanzen wie N-Acetylcystein oder Ferulasäure konnten im Tiermodell [Sudheer et al., 2008] eine Verminderung der DNA-Fragmentierung bei Koinkubation von Nikotin und einem Antioxidans gegenüber alleiniger Nikotinexposition feststellen. Als Mediatoren des oxidativen Stresses werden so genannte reaktive Sauerstoffspezies (ROS) angesehen. ROS sind hochreaktive kurzlebige Moleküle, die sich vom Sauerstoff ableiten. Dazu gehören unter anderem Hyperoxidanionen,  $H_2O_2$  und Hydroxylradikale. Als Quelle dieser reaktiven Sauerstoffradikale können eine CYP2A6-Induktion [Yamazaki et al., 1999], die Auswirkungen einer gesteigerten Leukozytenaktivität [Gillespie et al., 1987] sowie die Unterbrechung der mitochondrialen Atmungskette durch Nikotineinfluss [Gvozdjakova et al., 1992; Das et al., 2009a] in Betracht gezogen werden. Reaktive Sauerstoffspezies reagieren direkt mit der zellulären DNA und modifizieren diese auf unterschiedlichen Wegen. Auf diese Weise entstehen unter anderem Basenmodifikationen, Cross-links, sowie DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche. Durch Reaktion von ROS mit Lipiden kommt es zur so genannten Lipidperoxidation. Die dabei entstehenden organischen Sauerstoffverbindungen wie Hydroxylperoxide und Carbonylverbindungen können die DNA ebenfalls angreifen und modifizieren.

Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit aber ebenfalls eine Beeinflussung der DNA-Schädigung durch Nikotin bei Einsatz des nicht-kompetitiven Rezeptorblockers Mecamylamin, die eine Beteiligung nikotinerger Acetylcholinrezeptoren an der direkten DNA-Schädigung durch Nikotin nahe legen. Dabei scheinen unterschiedliche intrazelluläre Signalkaskaden möglich. So finden sich in einer Studie von Bruin et al. [Bruin et al., 2008] Hinweise auf eine Beteiligung von nAch-Rezeptoren bei der Entstehung von oxidativem Stress durch ROS. Dabei untersuchten die Autoren die Wirkung maternaler Nikotinexposition an Ratten auf die Pankreas-Beta-Zellen der neugeborenen Ratten. Sie fanden dabei eine Apoptosesteigerung, die sie auf eine direkte Wechselwirkung von Nikotin mit dem nAch-Rezeptor und anschließender ROS-Produktion zurückführten. Ebenfalls interessant erscheint eine Untersuchung von Panayiotidis et al. [1999] in der die genotoxische Wirkung von  $H_2O_2$  auf humane Lymphozyten-DNA untersucht wurde. Dabei konnten durch Einsatz eines Calcium Chelators die DNA-Schäden reduziert werden. Die Autoren schlossen auf eine durch

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ausgelöste Calcium vermittelte Endonucleasenaktivierung, die zu DNA-Strangbrüchen führte. Da die intrazelluläre Calciumfreisetzung eine bekannte Reaktion auf eine nAChR-Stimulation ist, könnte hier eine Verbindung der intrazellulären DNA-Schadigungswege von ROS und nACh-Rezeptorsignalwegen bestehen.

Neben der nikotin-abhängigen ROS-Induktion wird auch eine Beteiligung von Stickoxiden (NO) durch Induktion der induzierbaren Stickoxidsynthetase (iNOS) am genotoxischen Effekt von Nikotin diskutiert [Argentin und Cicchetti, 2006]. Die iNOS-Synthetase konnte in unterschiedlichen humanen Zellen, darunter auch humanem Nasenschleimhautepithelien, nachgewiesen werden [Kawamoto et al., 1998]. Vor allem in neuronalen Geweben wurde auch der Zusammenhang zwischen nAChR-Aktivierung, Ca<sup>2+</sup>-Influx und iNOS-Induktion untersucht und nachgewiesen [Zayas et al., 2002; Haberberger et al., 2003; Garcia-Rates et al., 2010]. Ob dies auch für Epithelien des Aerodigestivtraktes zutrifft, muss weiter untersucht werden.

#### **4.2.3 Einfluss von Nikotin auf Apoptose und Zellzyklus**

Nikotininduzierte DNA-Schädigungen lassen sich am ehesten der Tumorinitiation zuordnen. Es konnte aber in der Vergangenheit auch ein apoptoseinhibierender Effekt von Nikotin in verschiedenen Zellen wie humanen Lungenkrebszellen A549 [Zhang et al., 2006] oder humanen Mundschleimhautzellen [Xu et al., 2007] nachgewiesen werden, der ebenso der Tumorphiliferation zuzuordnen ist. Verschiedene intrazelluläre Moleküle wie bcl2, NF-kappaB und verschiedene Phosphatkinasen scheinen diesen Effekt zu vermitteln [Mai et al., 2003]. Eine Beteiligung nikotinerger Acetylcholinrezeptoren wird ebenfalls diskutiert, wobei die  $\alpha 7$ -Untereinheit dieser Rezeptorgruppe eine besonders wichtige Rolle zu spielen scheint [Egleton et al., 2008]. Nikotinexposition führte in verschiedenen Studien darüber hinaus zu Zellzyklusalterationen. Dabei konnte eine Arretierung der Zellen in der G0/1-Phase nachgewiesen werden [Frazer-Abel et al., 2004; Lee et al., 2005].

In den Zelllinienversuchen dieser Arbeit konnte keine statistisch signifikante Apoptoseinduktion oder Inhibition durch Nikotin nachgewiesen werden. Bei der Verwendung des Annexin-V-Assays wurde in der Negativkontrolle ein hoher Anteil apoptotischer Zellen nachgewiesen. Vermutlich hängt dies mit einer teilweisen Zerstörung der zellulären Außenmembranen bei der Trypsinierung der Zellen zur Ablösung aus den

Zellkulturflaschen zusammen, die eine fehlerfreie Anfärbung und Messung unmöglich macht. Dieses Ergebnis trat auch bei mehrmaliger Wiederholung und auch an kultivierten Nasenschleimhautepithelien auf. Die Testmethode wurde daher verworfen und die TUNEL-Methode mit Apo-BRDU etabliert. Auch hierbei konnte allerdings für einen Stichprobenumfang von  $n=5$  keine statistisch signifikante Apoptoseinduktion oder Inhibition nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der Ergebnisse ist die auffällig breite Streuung der Werte zwischen 2 und 10 Prozent bei Verwendung von Mitomycin zu beachten. Bei einem Teil der Versuche scheint die Positivkontrolle eine Induktion von Apoptosen verursacht zu haben, die zum Teil durch Nikotin verhindert werden konnte. Faktisch fehlt aber bei 3 der 5 Versuche eine Apoptose-induzierende Positivkontrolle, so dass auch ein systematischer, methodischer Fehler bei Aufbau oder Durchführung der Apo-BRDU-Messung nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann.

Zellzyklusalterationen konnten durch eine 24-stündige Inkubation mit 1mM Nikotin nicht ausgelöst werden. In Folgeversuchen sollte daher eine Messung des Zellzyklus nach 6, 12 sowie 48 Stunden erfolgen, da möglicherweise die Messung nach 24 Stunden auf Grund der Generationszeit der Zelllinie die Ursache für das Ausbleiben von Zellzyklusalterationen war.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass auch die kurzzeitige Exposition respiratorischer Epithelien gegenüber Nikotin zu einer Schädigung der zellulären DNA führt. Dabei können sowohl Acetylcholinrezeptor abhängige wie auch Rezeptor unabhängige Schädigungswege in Betracht gezogen werden.

Obwohl die Bedeutung des Nikotin vermittelten genotoxischen Effektes *in vivo* nicht genau zu quantifizieren ist, sollte vor diesem Hintergrund die Nikotinersatztherapie nicht unkritisch betrachtet werden. Die Reduktion der Nikotin vermittelten DNA-Schädigung durch Mecamylamin könnte ein weiteres Argument für die Kombination von Mecamylamin und einer Nikotinersatztherapie zur Suchtentwöhnung liefern, wie durch Lancaster beschrieben [Lancaster und Stead, 2000].

### **4.3 Ausblick**

Zum Verständnis der intrazellulären Schädigungswege von Nikotin, insbesondere im Hinblick auf eine direkte DNA-Schädigung, sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei sollte durch den Einsatz von spezifischen nAChR-Agonisten wie Epibatidine versucht werden, die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse der Mecamylamineversuche im Comet Assay zu überprüfen. Darüber hinaus erscheint auch der Einsatz weiterer spezifischer Substanzen zur Unterbrechung intrazellulärer Signalwege, wie eines membrangängigen Calciumchelatoren, zum Beispiel 1,2-Bis(2-Aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraacetylsäure (BAPTA), iNOS-Inhibitoren wie N-monomethyl-L-Arginin (NMA) oder selektiven Radikalfängern wie Tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) sinnvoll. Neben dem Einzelzellgelelektrophorese-Assay sollten dabei Methoden zur Detektion oxidativen Stresses beziehungsweise reaktiver Sauerstoffspezies angewendet werden.

## Zusammenfassung

Rauchen stellt in den Industrienationen das bedeutendste vermeidbare Gesundheitsrisiko dar. Die Rolle des suchtauslösenden Alkaloids Nikotin in der Tabak assoziierten Kanzerogenese wird kontrovers diskutiert. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung genotoxischer Effekte von Nikotin in Zellen des oberen und unteren Aerodigestivtrakt sowie deren intrazellulärer Mechanismen.

Dazu wurden Zellen aus humaner Nasenschleimhaut und humaner Bronchialschleimhaut enzymatisch isoliert sowie bronchiales Zelllinienepithel kultiviert und mit Nikotin unterschiedlicher Dosierungen für eine Stunde inkubiert. Zur Untersuchung beteiligter Signalkaskaden wurden Koinkubationen von Nikotin und dem nicht-kompetitiven nikotinergen Acetylcholinrezeptorblocker Mecamylamin und dem Antioxidans N-Acetylcystein durchgeführt. Die Erfassung Nikotin induzierter DNA-Schäden erfolgte mit Hilfe des Comet Assays. Zur Untersuchungen von Zellzyklusalterationen sowie Apoptoseinhibition durch Nikotin kam die Durchflusszytometrie zum Einsatz.

Die Ergebnisse der Einzelzellgelelektrophorese zeigten eine dosisabhängige DNA-Schädigung im einstündigen Inkubationsversuch durch Nikotin. Diese Schäden waren gewebeabhängig ab einer Konzentration von 100 $\mu$ M in Zelllinienepithel (n=5) und 1mM in Nasenschleimhautzellen (n=8) signifikant. In humanem Bronchialzellepithel konnte bei dem Stichprobenumfang von n=4 keine signifikante DNA-Schädigung durch die getesteten Nikotindosierungen nachgewiesen werden. Durch eine Koinkubation mit dem Antioxidans N-Acetylcystein sowie dem nicht kompetitiven nACh Rezeptorblocker Mecamylamin konnte eine im Comet Assay nachweisbare Nikotin induzierte DNA-Schädigung verhindert werden. Durchflusszytometrische Untersuchungen zur Klärung einer möglichen Modulation der Apoptose durch Nikotin an bronchialem Zelllinienepithel zeigten keine signifikante Induktion oder Inhibition. Eine Beeinflussung des Zellzyklus durch Nikotin konnte in der Durchflusszytometrie nicht erfasst werden.

Zusammenfassend induziert Nikotin DNA-Schäden in Epithelien des Atemtraktes. An diesem Effekt sind oxidative sowie nACh-Rezeptor abhängige Stoffwechselschritte beteiligt. Vor dem Hintergrund einer potentiellen Beteiligung von Nikotin an der Tumorinitiation und -progression muss eine Nikotinersatztherapie besonders kritisch abgewogen werden.

## 6.1 Abbildungen

- 1-1 Eigene Abbildung nach: Robert-Koch-Institut (2009).  
Krebsinzidenzschätzungen für Deutschland bis 2004.
- 1-2 Eigene Abbildung nach: Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F.,  
Starke, K. (2005a). Chemische Kanzerogenese. In *Allgemeine und  
Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 9. Auflage*, pp. 976-1000.  
Urban und Fischer München-Jena.
- 1-3 bis 3-8 Eigene Abbildungen

## 6.2 Literatur

- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., und Starke, K. (2005a). Chemische Kanzerogenese. In *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 9. Auflage*, pp. 976-1000. Urban und Fischer München-Jena.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., und Starke, K. (2005b). Tabak. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 9. Auflage*, pp. 1050-1056. Urban und Fischer München-Jena.
- Argentin, G., und Cicchetti, R. (2004). Genotoxic and antiapoptotic effect of nicotine on human gingival fibroblasts. *Toxicol Sci* **79**, 75-81.
- Argentin, G., und 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.
- Ashe, P. C., und Berry, M. D. (2003). Apoptotic signaling cascades. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **27**, 199-214.
- Bajpayee, M., Dhawan, A., Parmar, D., Pandey, A. K., Mathur, N., und 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.
- BD-Biosciences (2006). Technical Data Sheet APC Annexin V. In: *Online Catalog/TechnicalPDFs*. Im Internet verfügbar unter:  
[http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/pm/doc/tds/cell\\_bio/live/web\\_enabled/65879H\\_550475.pdf](http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/65879H_550475.pdf) (Stand: 2006).

- BD-Biosciences (2008). Technical Data Sheet APO-BRDU Kit. In: *Online Catalog/Technical PDFs*. Im Internet verfügbar unter: [http://www.bdbiosciences.com/external\\_files/pm/doc/tds/cell\\_bio/live/web\\_enabled/6576KK\\_556405.pd](http://www.bdbiosciences.com/external_files/pm/doc/tds/cell_bio/live/web_enabled/6576KK_556405.pd) (Stand: 2008).
- 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., und Stein, C. A. (2006). Bcl-2 protein in 518A2 melanoma cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res* **12**, 4940-4948.
- Berchtold, R., Bruch, H.-P., und Trentz, O. (2006). Lungenresektionen. In *Chirurgie 5 Auflage*, pp. 598-599. Urban & Fischer München-Jena.
- Bruin, J. E., Petre, M. A., Lehman, M. A., Raha, S., Gerstein, H. C., Morrison, K. M., und Holloway, A. C. (2008). Maternal nicotine exposure increases oxidative stress in the offspring. *Free Radic Biol Med* **44**, 1919-1925.
- Costa, F., und Soares, R. (2009). Nicotine: a pro-angiogenic factor. *Life Sci* **84**, 785-790.
- Crowley-Weber, C. L., Dvorakova, K., Crowley, C., Bernstein, H., Bernstein, C., Garewal, H., und 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.
- Das, S., Gautam, N., Dey, S. K., Maiti, T., und Roy, S. (2009a). Oxidative stress in the brain of nicotine-induced toxicity: protective role of *Andrographis paniculata* Nees and vitamin E. *Appl Physiol Nutr Metab* **34**, 124-135.
- Das, S., Neogy, S., Gautam, N., und Roy, S. (2009b). In vitro nicotine induced superoxide mediated DNA fragmentation in lymphocytes: protective role of *Andrographis paniculata* Nees. *Toxicol In Vitro* **23**, 90-98.
- Doll, R. (1957). Lung cancer and smoking. *R Soc Health J* **77**, 247-250; discussion, 250-244.
- Edelmann, M., Gamarra, F., da Silva, A. K., Hornung, V., Castro, M., Passlick, B., Huber, R. M., und Bergner, A. (2005). Cell cycle effects of radiation on human bronchial epithelium and lung carcinoma cells in monolayer cultures and a three-dimensional co-culture system. *Radiat Res* **164**, 391-399.
- Egleton, R. D., Brown, K. C., und Dasgupta, P. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 151-158.
- Ezzati, M., und Lopez, A. D. (2003). Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet* **362**, 847-852.

- 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., and 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.
- Garcia-Rates, S., Camarasa, J., Sanchez-Garcia, A. I., Gandia, L., Escubedo, E., and Pubill, D. (2010). The effects of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) on nicotinic receptors: intracellular calcium increase, calpain/caspase 3 activation, and functional upregulation. *Toxicol Appl Pharmacol* **244**, 344-353.
- Gillespie, M. N., Owasoyo, J. O., Kojima, S., and Jay, M. (1987). Enhanced chemotaxis and superoxide anion production by polymorphonuclear leukocytes from nicotine-treated and smoke-exposed rats. *Toxicology* **45**, 45-52.
- Ginzkey, C., Kampfinger, K., Friehs, G., Kohler, C., Hagen, R., Richter, E., and Kleinsasser, N. H. (2008). Nicotine induces DNA damage in human salivary glands. *Toxicol Lett* **184**, 1-4.
- Ginzkey, C., Friehs, G., Koehler, C., Hackenberg, S., Voelker, H. U., Richter, E., and Kleinsasser, N. H. (2010) Nicotine and methyl methane sulfonate in mini organ cultures of human parotid gland tissue. *Toxicol Lett* **197**, 69-74.
- Götte, K., und Hörmann, K. (2004). Sinonasal malignancy: what's new? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **66**, 85-97.
- Guindon, E., und Boisclair, D. (2003). Past, current and future trends in tobacco use. *Health nutrition and Population Discussion Paper* **6**, 2-16.
- Haberberger, R. V., Henrich, M., Lips, K. S., und 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.
- Hartmann, A., Agurell, E., Beevers, C., Brendler-Schwaab, S., Burlinson, B., Clay, P., Collins, A., Smith, A., Speit, G., Thybaud, V., und Tice, R. R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. *Mutagenesis* **18**, 45-51.
- Hotchkiss, R. S., Strasser, A., McDunn, J. E., und Swanson, P. E. (2009). Cell death. *N Engl J Med* **361**, 1570-1583.
- Hukkanen, J., Jacob, P., 3rd, und Benowitz, N. L. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* **57**, 79-115.
- John, U., und Hanke, M. (2002). Tobacco smoking- and alcohol drinking-attributable cancer mortality in Germany. *Eur J Cancer Prev* **11**, 11-17.

- Kawamoto, H., Takumida, M., Takeno, S., Watanabe, H., Fukushima, N., und 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., und Walker, J. C. (2003). Nicotinic cholinergic receptor expression in the human nasal mucosa. *Ann Otol Rhinol Laryngol* **112**, 77-84.
- Kennaway, E. (1957). Some questions on cancer of the lung, larynx, and urinary tract. *Br Med J* **1**, 299-306.
- Kleinsasser, N. H., Juchhoff, J., Wallner, B. C., Bergner, A., Harréus, U. A., Gamarra, F., Bührlen, M., Huber, R. M., und Rettenmeier, A. W. (2004). The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* **Volume 561**, Pages 63-73.
- Kleinsasser, N. H., Sassen, A. W., Semmler, M. P., Harreus, U. A., Licht, A. K., und 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., und Richter, E. (2006). Trägt Nikotin zur Krebsentstehung im oberen Aerodigestivtrakt bei? *HNO* **54**, 369-372, 374-365.
- Lam, T. H., Zhu, C. Q., und Jiang, C. Q. (2002). Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutat Res* **515**, 147-157.
- Lampert, T., und Schulze, A. (2006). Bundes-Gesundheitssurvey: Soziale Unterschiede im Rauchverhalten und in der Passivrauchbelastung in Deutschland, pp. 23-27. Robert Koch Institut, Berlin.
- Lancaster, T., und Stead, L. F. (2000). Mecamylamine (a nicotine antagonist) for smoking cessation. *Cochrane Database Syst Rev*, CD001009.
- Lee, H. J., Guo, H. Y., Lee, S. K., Jeon, B. H., Jun, C. D., Park, M. H., und 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.
- Loeffler, G., und Petrides, P. (2003a). Apoptose oder der programmierte Zelltod. In *Biochemie und Pathobiochemie 7. Auflage*, pp. 213-215. Springer, Berlin-Heidelberg.
- Loeffler, G., und Petrides, P. (2003b). Der Zellzyklus. In *Biochemie & Pathobiochemie 7. Auflage*, pp. 210-215. Springer, Berlin - Heidelberg.

- Mai, H., May, W. S., Gao, F., Jin, Z., und Deng, X. (2003). A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 1886-1891.
- Maluf, S. W., und Erdtmann, B. (2000). Follow-up study of the genetic damage in lymphocytes of pharmacists and nurses handling antineoplastic drugs evaluated by cytokinesis-block micronuclei analysis and single cell gel electrophoresis assay. *Mutat Res* **471**, 21-27.
- Mansvelder, H. D., und McGehee, D. S. (2002). Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol* **53**, 606-617.
- Mathers, C. D., und Loncar, D. (2006). Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* **3**, e442.
- Muthukumar, S., Sudheer, A. R., Nalini, N., und 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.
- Ostling, O., und Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**, 291-298.
- Pirnia, F., Schneider, E., Betticher, D. C., und Borner, M. M. (2002). Mitomycin C induces apoptosis and caspase-8 and -9 processing through a caspase-3 and Fas-independent pathway. *Cell Death Differ* **9**, 905-914.
- Robert-Koch-Institut (2009). Krebsinzidenzschätzungen für Deutschland bis 2004.
- Sasco, A. J., Secretan, M. B., und Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer* **45 Suppl 2**, 3-9.
- Sassen, A. W., Richter, E., Semmler, M. P., Harreus, U. A., Gamarra, F., und Kleinsasser, N. H. (2005). Genotoxicity of nicotine in mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia. *Toxicol Sci* **88**, 134-141.
- Shytle, R. D., Penny, E., Silver, A. A., Goldman, J., und Sanberg, P. R. (2002). Mecamylamine (Inversine): an old antihypertensive with new research directions. *J Hum Hypertens* **16**, 453-457.
- Speit, G., und 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.
- Sudheer, A. R., Muthukumar, S., Devipriya, N., Devaraj, H., und 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.

- Swami, S., Suryakar, A. N., Katkam, R. V., und Kumbar, K. M. (2006). Absorption of nicotine induces oxidative stress among bidi workers. *Indian J Public Health* **50**, 231-235.
- Teissier, E., Fennrich, S., Strazielle, N., Daval, J. L., Ray, D., Schlosshauer, B., und Gherzi-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., und 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.
- Trivedi, A. H., Dave, B. J., und Adhvaryu, S. G. (1990). Assessment of genotoxicity of nicotine employing in vitro mammalian test system. *Cancer Lett* **54**, 89-94.
- Undeger, U., und Basaran, N. (2002). Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Arch Toxicology* **76**, 430-436.
- Wang, W., Rayburn, E. R., Hang, J., Zhao, Y., Wang, H., und Zhang, R. (2009). Anti-lung cancer effects of novel ginsenoside 25-OCH(3)-PPD. *Lung Cancer* **65**, 306-311.
- Welsch, U. (2003). Atmungsorgane. In *Lehrbuch Histologie 1. Auflage*, pp. 271-297. Urban & Fischer München-Jena.
- Xu, J., Huang, H., Pan, C., Zhang, B., Liu, X., und Zhang, L. (2007). Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* **36**, 739-744.
- Yamazaki, H., Inoue, K., Hashimoto, M., und Shimada, T. (1999). Roles of CYP2A6 and CYP2B6 in nicotine C-oxidation by human liver microsomes. *Arch Toxicol* **73**, 65-70.
- Zayas, R. M., Qazi, S., Morton, D. B., und Trimmer, B. A. (2002). Nicotinic-acetylcholine receptors are functionally coupled to the nitric oxide/cGMP-pathway in insect neurons. *J Neurochem* **83**, 421-431.
- Zhang, T., Lu, H., Shang, X., Tian, Y., Zheng, C., Wang, S., Cheng, H., und Zhou, R. (2006). Nicotine prevents the apoptosis induced by menadione in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 928-934.

### 7.1 Kongressbeiträge

Ginzkey, C., Stüber, T., Friehs, G., Kleinsasser, N. (2009). Differenzierung Nikotin induzierter DNA-Schäden an humaner Nasenschleimhaut. Vortrag auf der 80. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V., Rostock.

Stüber, T., Ginzkey, C., Friehs, G., Neukam, K., Kleinsasser, N. (2009). Vergleichende genotoxikologische Untersuchung an humaner, nasaler und bronchialer Schleimhaut. Posterausstellung auf der 9. Jahrestagung der norddeutschen Gesellschaft für Otorhinolaryngologie und zervikofaciale Chirurgie, Hannover.

## **7.2 Danksagung**

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Bei Prof. Dr. Dr. h.c. Rudolf Hagen, Direktor der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen, für die Ermöglichung dieser Arbeit.

Bei Prof. Dr. Norbert Kleinsasser für die Annahme als Doktoranden und die persönliche Unterstützung während der gesamten Zeit der Dissertation.

Bei Dr. Christian Ginzkey für seine hervorragende Betreuung und Beratung.

Bei Prof. Dr. Rainer G. Leyh und Dr. Konrad Neukam aus der Klinik für Thorax, Herz- und Thorakale Gefäßchirurgie der Uniklinik Würzburg, sowie bei den Operateuren der HNO-Klinik, für die Kooperation bei der Gewinnung der Schleimhautproben.

Bei Dipl. –Biol. Gudrun Friehs für die Einarbeitung in die Arbeitsmethoden und die freundschaftliche Unterstützung bei der Arbeit im Labor.

Bei Michael Kessler für die Hilfe bei der Entgegennahme der Schleimhautproben.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe, einschließlich der benachbarten, für die angenehme Arbeitsatmosphäre.