

# GENOTOXIZITÄT VON NIKOTIN IN HUMANEM SPEICHELDRÜSENGEWEBE



Dissertation zur Erlangung  
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades  
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von  
Dipl.- Biol. Gudrun Friehs  
aus Lohr am Main

Würzburg, 2010

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Th. Dandekar, Dekan der Fakultät für Biologie

Gutachter: Prof. Dr. N. Kleinsasser

Gutachter: PD. Dr. R. Hock

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Der Mensch muss bei dem Glauben verharren,  
dass das Unbegreifliche begreiflich sei:  
Er würde sonst nicht forschen.

Johann Wolfgang von Goethe

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Krebserkrankungen</b>	<b>7</b>
<b>1.2</b>	<b>Karzinogenese</b>	<b>9</b>
1.2.1	Individuelle Suszeptibilität und ihr Einfluss auf die Karzinogenese	10
<b>1.3</b>	<b>Nikotin</b>	<b>11</b>
1.3.1	Chemische Eigenschaften von Nikotin	12
1.3.2	Biologische Eigenschaften von Nikotin	13
<b>1.4</b>	<b>Toxikologische Testverfahren</b>	<b>14</b>
1.4.1	Untersuchungen zur Zytotoxizität	14
1.4.2	Untersuchungen zur Genotoxizität	14
<b>1.5</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>18</b>
2.1.1	Laborgeräte	18
2.1.2	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3	Reagenzien	19
2.1.4	Eingesetztes Gewebe	21
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>25</b>
2.2.1	Gewinnung von Einzelzellen	25
2.2.2	Gewinnung von Miniorgankulturen	25
2.2.3	Gewinnung von primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea	27
2.2.4	Zellzählung und Vitalitätstest	28
2.2.5	Fremdstoffexposition	29
2.2.6	Einzelzellgelelektrophorese	31
2.2.7	Mikrokerntest	34
2.2.8	Chromosomenaberrationstest	36
2.2.9	Sandwich-ELISA-Test zum Apoptosenachweis	38
2.2.10	Histologische Untersuchungen zur Analyse der Vitalität der Miniorgankulturen der Glandula parotidea	40

2.2.11	Immunfluoreszenzdarstellung von $\alpha$ -Amylase zur Charakterisierung der primären adhärenen Zellen	41
2.2.12	Graphische Darstellung der Ergebnisse	42
2.2.13	Statistische Verfahren	42

### **3 ERGEBNISSE 43**

<b>3.1</b>	<b>Genotoxikologische Untersuchungen in humanen Zellsystemen</b>	<b>43</b>
3.1.1	Genotoxische Effekte bei isolierten Einzelzellen der Glandula parotidea, nachgewiesen in der Einzelzellgelelektrophorese	43
3.1.2	Genotoxische Effekte bei Miniorgankulturen der Glandula parotidea, nachgewiesen in der Einzelzellgelelektrophorese	45
3.1.3	Genotoxische Effekte bei primären adhärenen Zellen der Glandula parotidea, nachgewiesen in der Einzelzellgelelektrophorese	47
3.1.4	Genotoxische Effekte bei primären adhärenen Zellen der Glandula parotidea, nachgewiesen im Mikrokerntest	48
<b>3.2</b>	<b>Ergebnisse der Analysen mit dem Chromosomenaberrationstest</b>	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>Apoptosenachweis mit dem Sandwich-ELISA-Test</b>	<b>50</b>
<b>3.4</b>	<b>Histologische Untersuchungen</b>	<b>51</b>
<b>3.5</b>	<b>Untersuchungen zur Amylaseproduktion mittels Immunfluoreszenzfärbung</b>	<b>54</b>
<b>3.6</b>	<b>Zusammenfassung der Ergebnisse</b>	<b>56</b>

### **4 DISKUSSION 57**

<b>4.1</b>	<b>Genotoxikologische Testverfahren <i>in vitro</i></b>	<b>57</b>
4.1.1	Comet Assay	57
4.1.2	Mikrokerntest	58
4.1.3	Chromosomenaberrationstest	59
<b>4.2</b>	<b>Humane Zellsysteme in einer genotoxikologischen Testbatterie</b>	<b>60</b>
4.2.1	Isolierte Einzelzellen	60
4.2.2	Miniorgankulturen	61
4.2.3	Etablierung primärer adhärenen Zellen	62
<b>4.3</b>	<b>Genotoxisches Potential von Nikotin in Speicheldrüsengewebe</b>	<b>62</b>
4.3.1	Isolierte Einzelzellen	62
4.3.2	Primäre adhärenen Zellen	63
4.3.3	Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch Nikotin	64

<b>4.4</b>	<b>Miniorgankulturen als ein <i>in vivo</i> nahes Testsystem</b>	<b>65</b>
4.4.1	Vitalität der Miniorgankulturen der Glandula parotidea	65
4.4.2	Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden bei Miniorgankulturen der Glandula parotidea	66
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>70</b>
<b>7</b>	<b>ANHANG</b>	<b>72</b>
7.1	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>72</b>
7.2	<b>Tabellen</b>	<b>73</b>
7.3	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>76</b>
7.4	<b>Kongressbeiträge und Publikationen aus der vorliegenden Arbeit</b>	<b>86</b>
7.5	<b>Curriculum vitae</b>	<b>87</b>
7.6	<b>Danksagung</b>	<b>88</b>
7.7	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>89</b>

# 1 EINLEITUNG

Die Einwirkungen von Fremd- und Umweltfaktoren auf die Krebsentstehung im oberen Aerodigestivtrakt wurden bisher vorwiegend durch epidemiologische und tierexperimentelle Analysen belegt. Zur Identifizierung von Gefahrstoffen für den Menschen sind Testsysteme anzustreben, die an humanen Zielzellen DNA-Schädigungen darstellen, welche zu einer Tumorinitiation führen können. Um möglichst lebensnahe Bedingungen zu schaffen, sollen diese Zielzellen im epithelialen Verbund den Fremdstoffen ausgesetzt werden. Ein Modell dieser Art ermöglicht die Identifizierung von Schadstoffen mit erhöhtem Risiko für eine Krebsentstehung und kann somit einen Beitrag zur Tumorprävention leisten.

## 1.1 Krebserkrankungen

Krebserkrankungen stellen neben den Herz-Kreislauferkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland dar. 2008 waren etwa 28 % aller Todesfälle auf Krebs zurückzuführen (s. Abbildung 1).

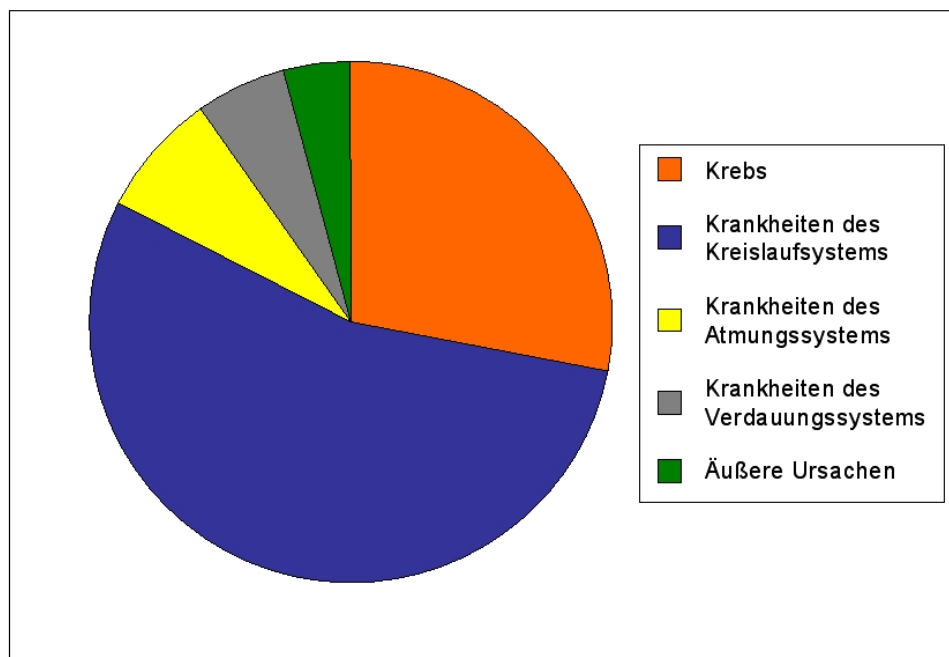


Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland 2008; Quelle: Statistisches Bundesamt ([www.destatis.de](http://www.destatis.de)).

Der Prozess der Tumorentstehung kann durch endogene oder exogene Faktoren initiiert werden. Als endogene Faktoren zur Definition der individuellen Suszeptibilität sind die Mutagensensitivität und die Reparaturkapazität der DNA zu nennen (Jahnke et al., 1999).

Exogenen Faktoren ist der Mensch in seinem natürlichen Umfeld, am Arbeitsplatz oder durch Aufnahme von Nahrungsmitteln ausgesetzt.

Es werden zwei Typen von Wechselwirkungen exogener Krebsfaktoren unterschieden. Entscheidend ist ihr Verhalten gegenüber der DNA: Direkt wirkende genotoxische Kanzerogene interagieren aufgrund ihrer Struktur direkt mit der DNA. In diese Gruppe gehören halogenierte Substanzen, Nitrosamide und Nitrosoharnstoff. Diese sind chemisch reaktiv, elektrophil und reagieren spontan mit der DNA, wobei sie DNA-Addukte bilden. Sie kommen in der Natur nicht vor, sondern finden Verwendung bei Krebs-Chemotherapeutika, bei Desinfektionsmitteln oder bei Insektiziden.

Indirekt wirkende genotoxische Kanzerogene sind erst nach der metabolischen Aktivierung reaktiv gegenüber der DNA. Dabei spielen Phase-I-Enzyme, wie Monooxygenasen der Cytochrom P450-System, Glutathion-S-Transferasen oder die Alkohol-Dehydrogenase 3 eine Rolle. Zu dieser Substanzklasse gehören synthetische und natürliche Stoffe: polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, aromatische Amine, beispielsweise Nikotin, N-Nitrosoverbindungen, Nitroalkylverbindungen, halogenierte Kohlenwasserstoffe und Mykotoxine (Aktories, 2009 b).

Säugetierzellen besitzen *in vivo* verschiedene Schutzmechanismen, die der Entstehung und der Manifestation von Mutationen entgegenwirken können. Dazu zählt die chemische Entgiftung von Kanzerogenen durch deren Interaktion mit anderen nukleophilen Zellbestandteilen, wie beispielsweise Glutathion oder Proteine. Ferner sind Säugetierzellen in der Lage, veränderte Nukleotidbasen durch DNA-Reparaturmechanismen aus der DNA zu entfernen. Daraus ergibt sich ein Schwellenwert, unterhalb dessen experimentell kein signifikanter Anstieg der Mutationsrate detektierbar sein sollte (Baum et al., 2005; Jenkins et al., 2005). Für nicht-genotoxische Kanzerogene konnte die Existenz solcher Schwellenwerte gezeigt werden. Im Gegensatz dazu wird für genotoxische Kanzerogene angenommen, dass aufgrund der direkten Interaktion mit der DNA und dem damit verbundenen Risiko zur Bildung von Mutationen kein Schwellenwert existiert. Da das Risiko einer Krebsneuerkrankung mit abnehmender Dosis einer kanzerogenen Substanz geringer, aber theoretisch niemals gleich Null sein wird, kann für genotoxische Kanzerogene kein Schwellenwert angegeben werden (Kirsch-Volders et al., 2000; Barlow et al., 2006).



## 1.2 Karzinogenese

Die Karzinogenese ist ein komplexer Prozess, der noch unvollständig aufgeklärt ist. Dabei transformiert eine Zelle eines Organismus in eine maligne Tumorzelle. Man geht hierbei von einem Dreistufenmodell der Karzinogenese aus. Es handelt sich dabei um Initiation, Promotion und Progression (s. Abbildung 2).

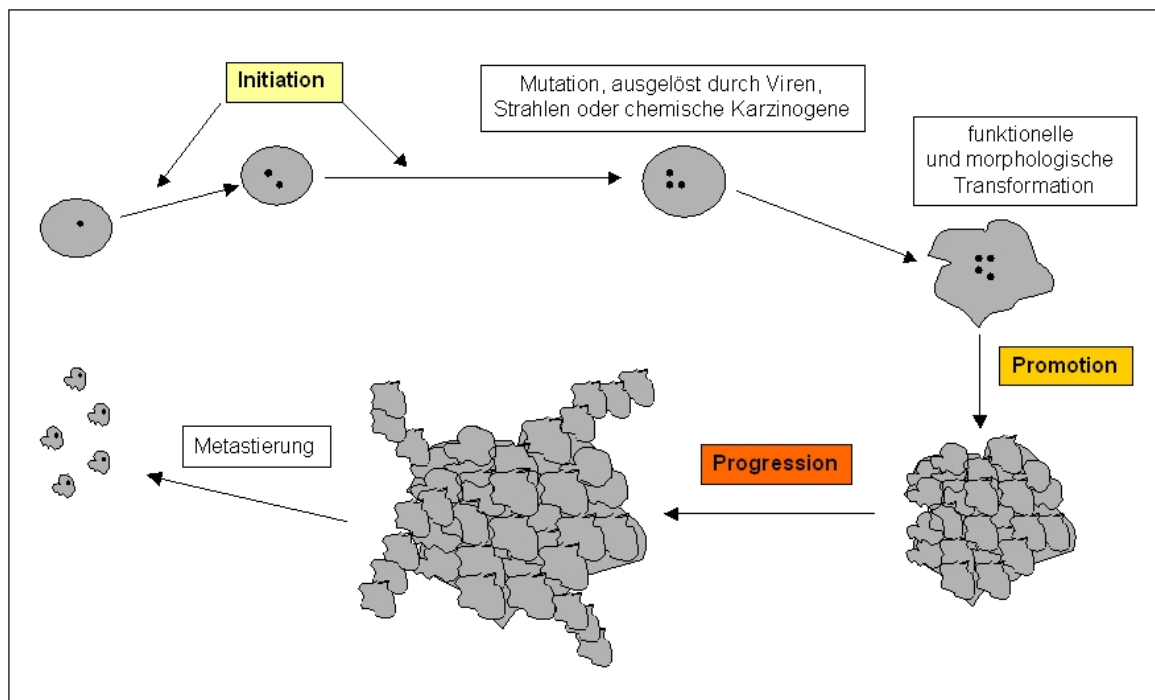


Abbildung 2: Dreistufenmodell der Karzinogenese, welches aus Initiation, Promotion und Progression besteht.

Die Initiation stellt den ersten Schritt dar, bei dem eine normale Zelle eine beispielsweise durch Strahlen, Viren oder chemische Karzinogene ausgelöste Mutation erfährt. Tumorinitiatoren sind entweder selbst chemisch reaktiv oder werden durch den Stoffwechsel in reaktive Zwischenstufen umgewandelt. Dieser Vorgang wird durch unterschiedliche Enzyme katalysiert, wie z. B. durch die Enzyme des Cytochroms P450 Systems, die Glutathion-S-Transferasen und die Alkoholdehydrogenase 3.

Art und Umfang des DNA-Schadens sind zunächst vom zugrundeliegenden Mutagen und dessen Schädigungsmechanismus abhängig. Die initiale Schädigung kann teilweise durch zelleigene Mechanismen wieder behoben werden. Diese sind unter anderem an die Expression des Tumorsuppressorgens p53 auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 gebunden. In Fällen, in denen die Mutation nicht durch DNA-Reparatur oder die Zelle durch Apoptose beseitigt wird, persistiert die Mutation und ist irreversibel.

Den nächsten Schritt in der Karzinogenese stellt die Promotion dar. Dabei wird das Zellwachstum stimuliert, beispielsweise durch Eingriffe in Signalketten. Der Promotor selber bewirkt keine bleibende Veränderung der Zelle. Seine Wirkung ist meist reversibel und muss über Wochen oder Monate anhalten, damit aus einer initiierten Zelle präneoplastische Zellpopulationen werden. Initiation und Promotion sind nicht unabhängig voneinander zu betrachten, da die initiierte Zelle sich in Gegenwart eines Promotors stärker vermehren kann als eine normale Zelle.

Der nächste Abschnitt, die Progression, bezeichnet den Übergang in einen malignen Tumor. Die Wachstumsautonomie und das Metastasierungspotenzial des Tumors nehmen dabei zu. Die zunehmende genetische Instabilität der Tumorzellen ist charakteristisch für diese Phase. Dadurch entsteht eine höhere Wahrscheinlichkeit der Ausprägung von Tumorpheterogenitäten und der Tumorprogression unter Ausbildung metastasierender Subklone (Bosch und Cardis, 1991).

### **1.2.1 Individuelle Suszeptibilität und ihr Einfluss auf die Karzinogenese**

Interindividuelle Unterschiede bei der Entstehung von Tumoren im oberen Aerodigestivtrakt werden oft beschrieben und auf verschiedene Ursachen überprüft. Sowohl exogene Vorbelastung als auch endogene Faktoren spielen hierbei eine Rolle.

Exogenen Ursachen, insbesondere chemischen Agenzien, kommen bei der Initiation von Krebs besondere Bedeutung zu. Hierbei sind vor allem die Art und Dauer der Einwirkung bis zur Tumorentstehung wichtig. Allerdings werden von ca. 1100 tierexperimentell nachgewiesenen chemischen Kanzerogenen nur etwa 50 Stoffe bzw. Stoffgemische als krebs-erzeugend anerkannt (Tomatis et al., 1989). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass zahlreiche Stoffe in physiologischer Konzentration allein keinen karzinogenen Effekt besitzen, sich allerdings bei zusätzlicher chronischer oder akuter Belastung durch andere Chemikalien zu potenten Karzinogenen umwandeln können.

Einige Fremdstoffe und bestimmte Vorgänge im Körper können, ohne selber kanzerogen zu sein, die Empfindlichkeit gegenüber initiiierenden Substanzen erhöhen (Co-Kanzerogene) oder abschwächen (Anti-Kanzerogene).

Bei der Syn-Kanzerogenese wird die Wirkung eines Kanzerogens durch ein weiteres verstärkt, wobei die Reihenfolge der Einwirkung beliebig ist.

### 1.3 Nikotin

Ursprünglich diente das Tabakrauchen den Ureinwohnern Amerikas zu kultischen Zwecken. 1496 brachte Peter Romanus Pane, ein Gefährte des Columbus, die ersten Tabakpflanzen nach Spanien mit, wo diese hauptsächlich als Genussmittel gebraucht wurden. Auch in der Medizin fand Tabak später breite Verwendung.

Jean Nicot (1530-1600), der Gesandte Katharinas von Medici am portugiesischen Hof, förderte den Anbau und damit die Ausbreitung der Tabakpflanze. 1828 isolierten die Heidelberger Chemiker Reimann und Posselt erstmals das in der Tabakpflanze wirksame Alkaloid Nikotin.

Das Rauchen von Tabak stellt ein Risiko im Bezug auf die Sterbewahrscheinlichkeit aus mehreren medizinischen Gründen dar und hängt dabei von mehreren Faktoren ab. Dabei spielen das Alter, in dem man zu rauchen beginnt, der Teer- und Nikotingehalt und die Zahl der gerauchten Zigaretten pro Tag sowie das Inhalationsverhalten eine wichtige Rolle (Ezzati und Lopez, 2003).

So wird Tabakrauchen für 25-30 % und Alkoholkonsum für 3 % der neoplasiebedingten Sterbefälle verantwortlich gemacht (John und Hanke, 2002). Diese Substanzen spielen im oberen Aerodigestivtrakt eine markante Rolle, da sich hier ihre Wirkungen gegenseitig verstärken. Der Anteil durch Tabak- und Alkoholkonsum bedingte Tumore im Kopf- und Halsbereich wird mit 75 % angegeben (Boyle et al., 1995). Tabakrauch enthält über 4000 charakterisierte Inhaltsstoffe, was es meist unmöglich macht, bestimmte Effekte oder Konsequenzen einem bestimmten Bestandteil zuzuschreiben. Außerdem können sich die biologischen Effekte der Bestandteile durch die Zugabe von zusätzlichen Substanzen, wie Alkohol und Umweltgiften, verändern. Des Weiteren hängt dies von der individuellen Gegebenheit bei der metabolischen Aktivierung und der Entgiftung der Karzinogene ab (Zeidler et al., 2007). Einige dieser 4000 Substanzen, wie etwa polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder tabakspezifische Nitrosamine, sind hinsichtlich ihrer Bedeutung in der Kanzerogenese wissenschaftlich gut untersucht. Für das Hauptalkaloid Nikotin des Zigarettenrauches hingegen ist das kanzerogene Potential noch nicht genau erfasst.

Neue Erkenntnisse weisen auf eine aktive Rolle von Nikotin bei der Krebsentstehung durch Tabak hin. Nikotin beeinflusst die Apoptose (Zeidler et al., 2007) und besitzt ein starkes pro-mitogenetisches (Waggoner und Wang, 1994; Dasgupta et al., 2006) und ein angiogenetisches Potential (Heeschen et al., 2001; Cooke und Bitterman, 2004; Costa und Soares, 2009).

### 1.3.1 Chemische Eigenschaften von Nikotin

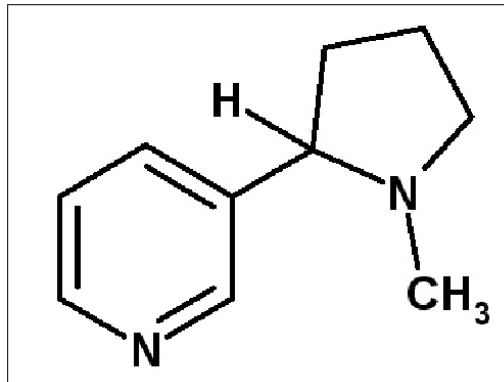


Abbildung 3: Chemische Strukturformel von Nikotin.

Nikotin ist das Hauptalkaloid der Tabakpflanze und kommt auch in anderen Nachtschattengewächsen vor. Es wirkt dort als biologisches Insektizid (Tomizawa und Casida, 2003). Nikotin wird hauptsächlich durch Rauch-, Schnupf- und Kautabakkonsum aufgenommen. Es ist eines der wenigen Alkaloide, das bei Raumtemperatur eine flüssig-ölige Konsistenz besitzt und über einen pH-Wert von 7,84 verfügt. Unter Luftinfluss verfärbt es sich bräunlich und nimmt den tabakähnlichen Geruch an. Chemisch betrachtet handelt es sich bei Nikotin um ein Amin, welches ein aromatisches Pyridingrundgerüst sowie ein tertiäres Amin in der Seitengruppe enthält. Nikotin besitzt ein Stereozentrum und kommt hauptsächlich als (S)-Nikotin vor. Die International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)-Bezeichnung ist (S)-(-)-3-(1-Methyl-pyrrolidin-2-yl)-pyridin. Es wird in der Leber durch oxidative Prozesse abgebaut, wobei es mit einer Halbwertszeit von 2 h eliminiert wird. Nur etwa 10 % des aufgenommenen Nikotins verlassen den Organismus unverändert. Das Abbauprodukt Cotinin ist pharmakologisch unwirksam und kumuliert im Organismus. Es wird mit einer Halbwertszeit von 16-22 h sehr viel langsamer eliminiert, sodass es zu Nachweiszwecken bei Rauchern und Passivrauchern genutzt werden kann (Benowitz und Jacob, 1984).

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. Wenn Tabakrauch durch die Alveolen der Lunge strömt, wird Nikotin aufgrund der großen Alveolarfläche und durch den pH-Wert der Alveolarflüssigkeit von 7,5 schnell absorbiert.

Bei Rauchern werden Plasmanikotinspiegel von bis zu 30 ng/ml gemessen. Diese sind abhängig von individueller Inhalationstiefe und dem markenabhängigen Nikotingehalt. Bei der Anwendung von Nikotinplastern finden sich 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).

### 1.3.2 Biologische Eigenschaften von Nikotin

Nikotin besitzt eine starke suchterzeugende Wirkung, welche über nikotinerge Acetylcholinrezeptoren vermittelt werden (Itier und Bertrand, 2001). Dieser Rezeptortyp ist vor allem in parasympathischen Ganglien, sympathischen Ganglien, im Nebennierenmark, im Zentralnervensystem und an den motorischen Endplatten lokalisiert. Nikotin bindet mit großer Affinität an Rezeptoren, wobei die Rezeptorbindung bei Rauchern im Gegensatz zu Nichtrauchern erhöht ist (Perry et al., 1999). Der Anstieg wird durch die größere Anzahl von nikotinerge Acetylcholinrezeptoren im Gehirn von Rauchern erklärt. Der große pH-Gradient der Magenschleimhaut in Kombination mit den basischen Eigenschaften von Nikotin besagen, dass sich Nikotin im Magensaft anreichert, ebenso im Speichel (Lindell et al., 1993; Lindell et al., 1996). Die Anreicherung von Nikotin wird durch die sogenannte Ionenfalle verursacht. Nikotin kann sich auch in der Muttermilch anreichern (Dahlstrom et al., 1990).

Ebenso beeinflusst Nikotin über den nikotinerge Acetylcholinrezeptor die Herzfrequenz, den Blutdruck, die Motilität des Magen-Darm-Trakts, die Atmung und das Brechzentrum. Das psychische Suchtpotential von Nikotin entspricht dem von Heroin oder Kokain. Entzugserscheinungen, wie Verlangen nach Zigaretten, depressive Verstimmung, Angst und Konzentrationsschwierigkeiten, treten nach 24-48 Stunden auf und nehmen bei Nikotin-entwöhnung über 14 Tage allmählich ab; eine physische Abhängigkeit hält jedoch über mehrere Wochen an (Benowitz, 1988).

Reines Nikotin wurde früher als Pflanzenschutzmittel gegen saugende oder beißende Insekten, unter anderem Blattläuse, eingesetzt. Für die Pflanzen ist der Stoff verträglich und zudem biologisch gut abbaubar. Aufgrund der hohen Toxizität besteht für Nikotin jedoch seit den 1970er Jahren ein Anwendungsverbot.

## 1.4 Toxikologische Testverfahren

Bei der toxikologischen Bewertung von umwelt- und arbeitsplatzrelevanten Noxen sowie im Rahmen von Anmelde- und Zulassungsverfahren von Chemikalien und Arzneimitteln nimmt die Bestimmung des genotoxischen Potentials eine zentrale Stellung ein.

Die Toxikologie kann heute auf eine Vielzahl von Testsystemen zurückgreifen. Dabei wird versucht, die Zahl der Tierversuche soweit wie möglich zu vermeiden, indem Tests an Bakterien oder Zellkulturen durchgeführt werden. Zur Verwendung kommen hauptsächlich Primärzellen, die direkt aus dem Gewebe entnommen wurden, oder permanente Zelllinien. Dabei besteht allerdings die Gefahr, dass die Zellen ihre Differenzierung während der Kulturdauer verlieren. Deswegen ist es sehr wichtig, diese häufig zu überprüfen. Zelllinien stellen eine gute Alternative aufgrund ihrer unbegrenzten Teilungsfähigkeit, Robustheit und Homogenität dar. Allerdings können auch sie im Laufe der Passagen ihre Eigenschaften verändern.

Da einzelne Tests keine umfassende und verlässliche Beurteilung der Wirkung eines Stoffes zulassen, müssen Testbatterien mit unterschiedlichen Zielparametern eingesetzt werden. Getestet wird u.a. auf Genmutationen, verschiedene zytogenetische Endpunkte, DNA-Reparatur sowie DNA-Strangbrüche.

### 1.4.1 Untersuchungen zur Zytotoxizität

Die Untersuchung einer Substanz mit dem Ziel, sie bei Testsystemen einsetzen zu können, beginnt mit der Testung der Zytotoxizität. Dazu werden in einer Vielzahl von Studien der Trypanblauausschluss- und der Neutralrottest verwendet, um die Vitalität der Zellen zu überprüfen. Mit Hilfe einer Dosiswirkungskurve wird die Dosis analysiert, bei der die verwendeten Xenobiotika keine apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen hervorrufen. Die Dosen sollten im physiologischen Bereich liegen und für die verwendeten Zellen nicht zytotoxisch sein, um falsche Testergebnisse zu vermeiden.

### 1.4.2 Untersuchungen zur Genotoxizität

Als Genotoxizität werden Effekte von Xenobiotika bezeichnet, die zu verschiedenen Arten von DNA-Schäden führen können. Dabei unterscheidet man zwischen Aberrationen des Chromosomentyps und des Chromatidtyps (s. Abbildung 4). Bei den Chromosomenaberrationen, die das ganze Chromosom betreffen, unterscheidet man zwischen Translokation, Deletion, Inversion und Insertion. Die Folgen, die diese Mutationen für den Or-

ganismus haben können, hängen davon ab, ob die Körper- oder Keimbahnzellen betroffen sind. Bei Mutationen der Körperzellen übertragen sich diese durch Mitose auf die Tochterzellen und können beispielsweise zu Tumoren führen; die Nachkommen sind dagegen davon nicht betroffen. Mutationen in Keimbahnzellen können dagegen zu Schäden bei den Nachkommen führen. Zu den Chromatidaberrationen gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, die beispielsweise durch alkylierende Substanzen hervorgerufen werden können. Ebenfalls können Gen- oder Punktmutationen oder ein Austausch zwischen Schwesterchromatiden die Folgen sein.

Entscheidend für die Folgen einer DNA-Schädigung ist der Zeitpunkt, zu dem sie auftritt. Die Zelle hat bis zur nächsten DNA-Replikation Zeit, den entstandenen Schaden zu reparieren, bevor dieser durch Weitergabe an die Tochterzellen fixiert wird. Außerdem führen viele Mutationen zum Tod der betroffenen Zelle, so dass die Anzahl persistenter Mutationen gering bleibt (Aktories, 2009 b).

Für den Nachweis genotoxischer Effekte stehen eine Reihe von Testsystemen zur Verfügung:

Bei Chromosomenaberrationen sind Umlagerungen von Chromatinabschnitten beteiligt, die zu sichtbaren Veränderungen der Chromosomenstruktur führen. Sie beruhen auf fehlerhaften Reunionsprozessen bei der Reparatur von DNA-Schäden, die nach Einwirkung von Xenobiotika entstehen.

Beim Schwesterchromatidaustauschtest werden die beiden genetisch identischen Schwesterchromatiden unterschiedlich mit Bromdesoxyuridin angefärbt. Die Metaphasechromosomen in der zweiten Mitose können nach der Färbung dann auf Austausche zwischen den Chromatiden untersucht werden.

Mit Hilfe des Comet Assay können DNA-Strangbrüche, hervorgerufen durch Xenobiotika, nachgewiesen werden.

Der Mikrokerntest weist Chromosomenmutationen nach. Hierbei können chromosomenbrechende Ereignisse und die Induktion von Fehlverteilungen nachgewiesen werden.

Der Ames-Test (Ames et al., 1975) in *Salmonella typhimurium* sowie der HPRT-Test (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) mit V79- bzw. CHO-Zellen weisen Genmutationen nach.

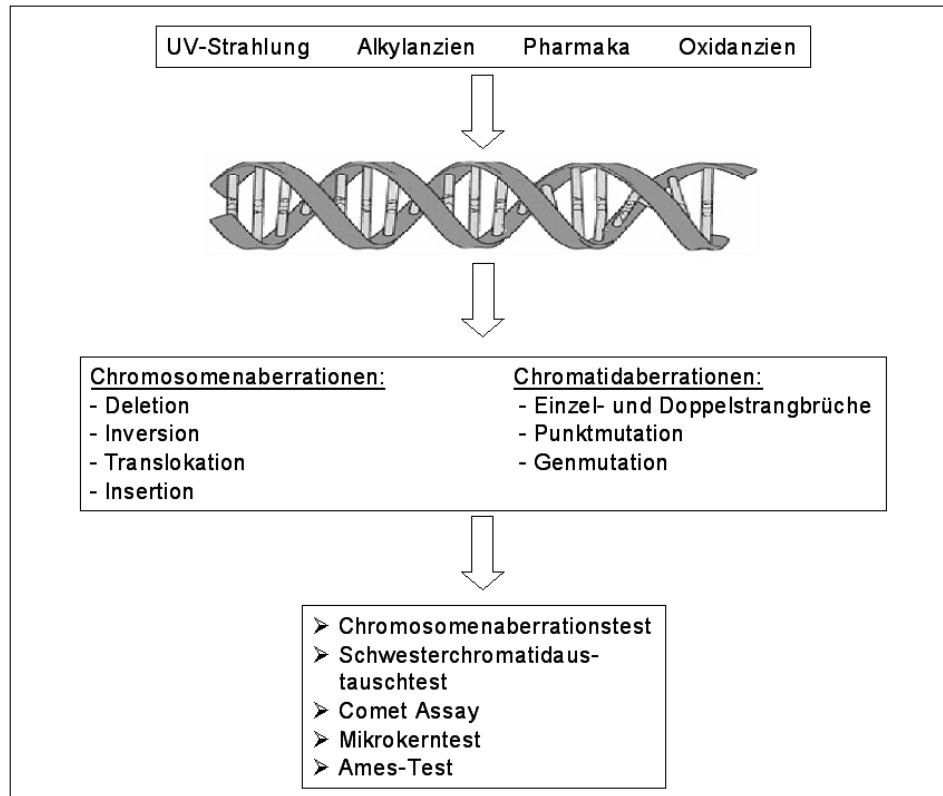


Abbildung 4: Übersicht über verschiedene DNA-Schäden, ihre Folgen und Nachweismethoden für einzelne der oben aufgeführten DNA-Schäden.

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die Tumorentstehung in humanen Speicheldrüsen ist weitestgehend ungeklärt. Lediglich für den Warthintumor, das Zystadenolymphom, gibt es eine positive Korrelation mit dem Tabakkonsum des Individuums (Klussmann et al., 2006). Da sich Nikotin im Speichel von Rauchern anreichert, wird das genotoxische Potential von Nikotin in humanem Gewebe der Ohrspeicheldrüse charakterisiert, um einen möglichen Einflussfaktor auf die Tumorentstehung in Speicheldrüsen abzuklären.

Die Untersuchungen erfolgen zunächst an isolierten Einzelzellen von Frischbiopsaten. Um möglichst lebensnahe Bedingungen zu schaffen, erfolgt die Inkubation auch an strukturell intakten Ohrspeicheldrüsenzellen im Zellverband. Dieses Testsystem der Miniorgankulturen ermöglicht eine wiederholte Exposition der Zellen und die anschließende Reparatur.

Zusätzlich zu den Analysen auf DNA-Ebene werden auch Untersuchungen zur Genotoxizität von Nikotin auf chromosomaler Ebene mit primären adhärennten Zellen durchgeführt.



Das Versagen apoptotischer Mechanismen stellt einen entscheidenden Schritt bei der Entstehung von Tumoren dar. Mit Hilfe des Sandwich-ELISA-Tests wird daher an primären adhären Zellen der Glandula parotidea die Beeinflussung von Apoptose durch Nikotin untersucht.

Mit diesen Testverfahren werden Mechanismen einer möglichen Tumorinitiation und -progression durch Nikotin erforscht. Das Verständnis dieser Funktion soll zukünftig zur Prävention von Speicheldrüsentumoren beitragen.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Geräte	Firma, Ort
Autoklav	SHP Steriltechnik AG
CO <sub>2</sub> Inkubator NU5500E	NuAire Inc., Plymouth, USA
CO <sub>2</sub> Inkubator mit Heißluftsterilisation CB210	Binder GmbH, Tuttlingen
Counter	Karl Hecht KG, Sondheim
Elektrophoresekammern	Renner, Dannstadt
Elektrophoresenetzgerät, EV202	Consort, Turnhout, Belgien
Fluoreszenzlampen, ebq 100 ISOLATED	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Heizplatte, M6	CAT / M. Zipperer GmbH, Staufen
Kammern	Nalge Nunc International, Napville, USA
Küvetten	Brand GmbH, Wertheim
Membran-Vakuumpumpe	ABM Greiffenberger Antriebstechnik GmbH, Marktredwitz
Mikroskop, 473028	ZEISS, Oberkirchen
Mikrowelle	Sharp Electronics, Hamburg
Multistepper	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetierhilfe	Brand GmbH, Wertheim
Shaker, ELMi S3.	Rose Scientific Ltd, Edmonton, Kanada
Sterile Werkbank, HERAsafe	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zählkammer, Neubauer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zellzählgerät CASY INNOVATIS	Innovatis AG, Reutlingen
Zentrifuge Hettich UNIVERSAL 16R	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
MiniSpin Zentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Firma, Ort
CASY-Cups (Cellcountergefäße)	Innovatis AG, Reutlingen
Combitips plus 5ml	Eppendorf AG, Hamburg
Deckgläser (24x32mm)	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Einmalpipetten: 5 ml, 10 ml und 25 ml	Corning Incorporated, NY, USA
Falcon-Röhrchen, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Kryoröhrchen 2ml	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Pasteurpipetten (Glas)	Brand GmbH, Wertheim
200µl, 1000µl Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
0,5- 10µl Pipettenspitzen	A. Hartenstein, Würzburg
Objektträger (ca. 76x26mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen
0,5ml Reaktionsgefäße	A. Hartenstein, Würzburg
1,5ml Reaktionsgefäße	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
1,5ml; braune Reaktionsgefäße	Brand GmbH, Wertheim
Steril-Filter 45µm	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zentrifugenröhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

### 2.1.3 Reagenzien

Chemikalien	Firma, Ort
Aceton	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Agarose (MEEO)	Roth, Karlsruhe
Agarose Type VII (LMP)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Aminosäuren (nicht essentiell) 100 x	Biochrom AG, Berlin
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
BSA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
CASY-Ton	Innovatis AG, Reutlingen
Colchizin	Biochrom AG, Berlin
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Eisessig	J.T. Baker, Griesheim
Ethanol	J.T. Baker, Griesheim
Ethidiumbromid	Merck Biosciences, Schwalbach
Eukit	Merck Biosciences, Schwalbach
FCS (Fetales Kälberserum)	Linaris, Wertheim

Fungizone	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe
Giemsa	Merck Biosciences, Schwalbach
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
MMS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck Biosciences, Schwalbach
Natriumhydroxid-Plätzchen	Merck Biosciences, Schwalbach
Natrium-Pyruvat 100mM	Biochrom AG, Berlin
Natronlauge	Merck Biosciences, Schwalbach
Nikotin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
N-Lauroylsarcosine 30%	Serva, Heidelberg
Penicillin-Streptomycin (1000U/1000µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
PBS, 10x	Roche Diagnostics, Mannheim
Phytohemagglutinin (PHA-L)	Biochrom AG, Berlin
Salzsäure 1M	Merck Biosciences, Schwalbach
Salzsäure 5M	Merck Biosciences, Schwalbach
TRIS	Merck Biosciences, Schwalbach
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trypan 0,4% Blue Solution	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Nährmedien	Firma, Ort
BEG-Medium mit Supplement Packung	Promo Cell, Heidelberg
RPMI-Medium	Biochrom AG, Berlin
DME-Medium	Invitrogen (Gibco), Karlsruhe

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

Antikörper	Firma, Ort
Rabbit Anti Alpha Amylase	Biomeda

## 2.1.4 Eingesetztes Gewebe

Die gewonnenen Gewebematerialien mussten stets aus operationstechnischen Gründen entfernt werden, sodass für die Patienten zu keiner Zeit ein zusätzliches Risiko bestand. Vor der Operation erfolgte eine ärztliche Aufklärung der Patienten. Diese willigten schriftlich in die Entnahme und die nachfolgenden Laboruntersuchungen ein. Die Untersuchungen fanden nach Genehmigung durch die Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg statt (Nr. 16/06).

### 2.1.4.1 Ohrspeicheldrüsengewebe

Das Ohrspeicheldrüsengewebe wurde aus dem tumorfernen, makroskopisch gesunden Gewebe nach lateraler oder totaler Parotidektomie entnommen. Die Operationen fanden in der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg (Direktor Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Hagen) statt. Nach Entnahme wurden die Proben in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DME-Medium) in das Labor der Klinik überführt und dort weiterverarbeitet.

### 2.1.4.2 Anamnesen der Probenspender

Tabelle 1: Anamnesen der Probenspender für die Untersuchungen an Frischzellen der Glandula parotidea

Patient	Geschlecht	Alter	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
1	♀	71	0 g/d	0 pj	Schneiderin
2	♂	41	120 g/d	25 pj	Tankwart
3	♂	63	100 g/d	35 pj	Mechaniker
4	♂	65	0 g/d	0 pj	Krautfahrer
5	♂	44	0 g/d	50 pj	Chauffeur
6	♀	49	0 g/d	0 pj	Schneider
7	♂	71	30 g/d	6 pj	Schweißer
8	♂	69	0 g/d	3 pj	Steuerberater
9	♂	83	0 g/d	0 pj	Rentner
10	♂	55	0 g/d	30 pj	Mechaniker

♂ männlich, ♀ weiblich; Alkoholkonsum ist dargestellt in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Packungsjahren (1 Pj: 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr).

Tabelle 2: Anamnesen der Probenspender für die Untersuchungen an Miniorgan-  
kulturen der Glandula parotidea

Patient	Geschlecht	Alter	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
11	♂	51	0 g/d	0 pj	Architekt
12	♂	48	6 g/d	0 pj	Kraftfahrer
13	♂	78	0 g/d	0 pj	Rentner
14	♂	36	0 g/d	0 pj	Lehrer
15	♀	83	0 g/d	0 pj	Rentner
16	♂	27	0 g/d	0 pj	Mechaniker
17	♂	38	15 g/d	25 pj	Kontrolleur
18	♂	40	20 g/d	0 pj	Mechaniker
19	♂	59	35 g/d	0 pj	Rentner
20	♂	83	0 g/d	0 pj	Rentnerin
21	♀	55	25 g/d	30 pj	Künstlerin
22	♀	63	40 g/d	0 pj	Taxifahrerin

♂ männlich, ♀ weiblich; Alkoholkonsum ist dargestellt in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Packungsjahren (1 Pj: 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr).

Tabelle 3: Anamnesen der Probenspender der Glandula parotidea für die Unter-  
suchungen mit dem Comet Assay an primären adhärenen Zellen

Patient	Geschlecht	Alter	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
29	♂	71	50 g/d	25 pj	Rentner
30	♀	55	0 g/d	23 pj	Hausfrau
31	♂	71	0 g/d	0 pj	Rentner
32	♂	79	0 g/d	0 pj	Rentner
33	♀	45	g/d	25 pj	Hausfrau
34	♀	39	0 g/d	0 pj	Angestellte
35	♂	73	0 g/d	0 pj	Rentner
36	♂	83	0 g/d	15 pj	Rentner
37	♀	53	0 g/d	28 pj	Kaufm. Angestellte
38	♂	63	0 g/d	15 pj	Kraftfahrer

♂ männlich, ♀ weiblich; Alkoholkonsum ist dargestellt in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Packungsjahren (1Pj: 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr).

Tabelle 4: Anamnesen der Probenspender der Glandula parotidea für die Untersuchungen mit dem Mikrokerntest an primären adhärennten Zellen

Patient	Geschlecht	Alter	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
39	♀	31	0 g/d	0 pj	Kaufm. Angestellte
40	♀	55	0 g/d	23 pj	Hausfrau
41	♂	71	50 g/d	25 pj	Rentner
42	♂	79	0 g/d	0 pj	Rentner
43	♂	59	50 g/d	28 pj	Postbeamter
44	♀	39	0 g/d	0 pj	Angestellte
45	♂	70	25 g/d	38 pj	Rentner
46	♂	83	0 g/d	15 pj	Rentner
47	♂	64	50 g/d	17 pj	Rentner
48	♀	63	40 g/d	0 pj	Taxifahrerin

♂ männlich, ♀ weiblich; Alkoholkonsum ist dargestellt in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Packungsjahren (1Pj: 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr).

Tabelle 5: Anamnesen der Probenspender der Glandula parotidea für die Untersuchungen zu den Chromosomenaberrationen an primären adhärennten Zellen

Patient	Geschlecht	Alter	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
59	♂	72	50 g/d	0 pj	Bauschlosser
60	♀	26	0 g/d	0 pj	Hausfrau
61	♂	59	50 g/d	28 pj	Postbeamte
62	♂	65	50 g/d	10 pj	Rentner
63	♂	43	0 g/d	0 pj	Steinmetz
64	♀	54	0 g/d	0 pj	Altenpflegerin
65	♀	63	40 g/d	0 pj	Taxifahrerin
66	♀	48	0 g/d	0 pj	Fachverkäuferin
67	♂	64	50 g/d	17 pj	Rentner
68	♀	55	0 g/d	23 pj	Hausfrau

♂ männlich, ♀ weiblich; Alkoholkonsum ist dargestellt in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Packungsjahren (1Pj: 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr).

Tabelle 6: Anamnesen der Probenspender der Glandula parotidea für die Untersuchungen zur Apoptoserate von primären adhärennten Zellen

Patient	Geschlecht	Alter	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
49	♂	71	0 g/d	0 pj	Rentner
50	♀	47	0 g/d	10 pj	Hausfrau
51	♂	64	50 g/d	17 pj	Rentner
52	♂	43	0 g/d	0 pj	Steinmetz
53	♀	48	0 g/d	0 pj	Fachverkäuferin
54	♂	72	50 g/d	0 pj	Bauschlosser
55	♂	59	50 g/d	28 pj	Postbeamte
56	♀	63	40 g/d	0 pj	Taxifahrerin
57	♀	54	0 g/d	0 pj	Altenpflegerin
58	♀	55	0 g/d	23 pj	Hausfrau

♂ männlich, ♀ weiblich; Alkoholkonsum ist dargestellt in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Packungsjahren (1Pj: 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr).



## 2.2 Methoden

Für die genotoxikologischen Untersuchungen zu Nikotin im oberen Aerodigestivtrakt wurden Frischzellen, Miniorgankulturen und primäre adhärenzte Zellen der Glandula parotidea verwendet. Dabei dienten der Comet Assay, der Mikrokerntest, der Chromosomenaberrationstest und der Sandwich-ELISA als Testsysteme für die einzelnen Analysen. Im Folgenden sind nun die einzelnen Schritte beschrieben.

### 2.2.1 Gewinnung von Einzelzellen

Das Ohrspeicheldrüsengewebe wurde im Operationssaal in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit Dulbecco's Modified Eagle Medium (DME-Medium) mit 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % Fungizone gefüllt und in das Labor gebracht. Danach wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert und enzymatisch zur Einzelzellgewinnung mit 62,5 mg Protease, 12,5 mg Collagenase P und 12,5 mg Hyaluronidase in DME-Medium für 1 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von fetalem Kälberserum abgestoppt, die Zellsuspension über eine sterile Gaze in ein 15 ml Falcon-Röhrchen filtriert und die gewonnenen Einzelzellen für 8 min bei 1100 rpm sedimentiert. Darauf erfolgte ein Waschschrift mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS). Die Regeneration der Einzelzellen erfolgte in 10 ml Bronchial Epithelial Growth Medium (BEG-Medium) mit 1 % Penicillin/Streptomycin in einer Gewebekulturflasche bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator für 24 h. Die anschließende Zellzählung und Vitalitätstestung schlossen sich in der Neubauerkammer an.

### 2.2.2 Gewinnung von Miniorgankulturen

Das Ohrspeicheldrüsengewebe wurde mit einem Skalpell in einer Petrischale mit DME-Medium in 1 mm<sup>3</sup> große Gewebewürfel, die sogenannten Miniorgane, zerkleinert. Um mögliche bakterielle oder virale Kontaminationen auszuschließen, wurde das Gewebe durch mehrmaliges Wechseln des Mediums gewaschen.

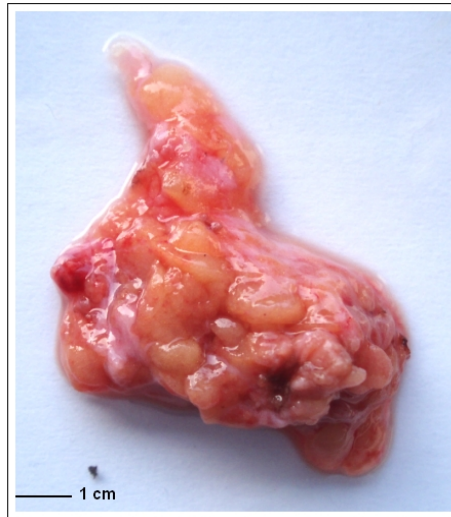


Abbildung 5: Ohrspeicheldrüsengewebe vor der Zerkleinerung.

Die einzelnen Gewebewürfel wurden jeweils in eine Kulturplatte mit je 24 Vertiefungen gegeben. Diese waren zuvor mit 250  $\mu$ l einer 0,5 %iger Agaroselösung beschichtet worden, um ein mögliches Anhaften der Gewebewürfel zu vermeiden. Nach Zugabe von 250  $\mu$ l des Nährmediums BEG in jede Vertiefung wurden die Kulturplatten in einem Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Jeden zweiten Tag wurden die einzelnen Gewebewürfel auf neue, beschichtete Zellkulturplatten mit frischem Medium überführt (s. Abbildung 6).

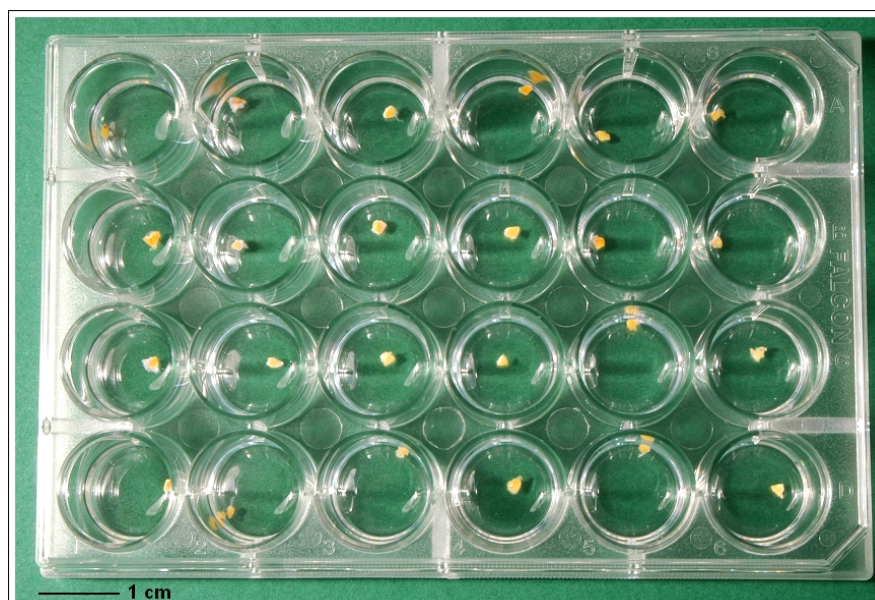


Abbildung 6: Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen. In jeder Vertiefung befindet sich ein Gewebewürfel in 250  $\mu$ l BEG-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin.

### 2.2.3 Gewinnung von primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea

Die Präparation und die Kultivierung der Gewebewürfel wurde wie in 2.2.2 beschrieben durchgeführt. Die einzelnen Vertiefungen wurden nicht mit einer Agaroselösung beschichtet, damit sich die auswachsenden, primären Zellen gut an die Zellkulturplatte anhaften konnten. Während der Kultivierung wurde das Nährmedium alle zwei Tage erneuert. Nach 10-14 Tagen Kultivierung ließen sich primäre, adhärennte Zellen rund um die Miniorgankulturen als einschichtiger Zellrasen erkennen (s. Abbildung 7).

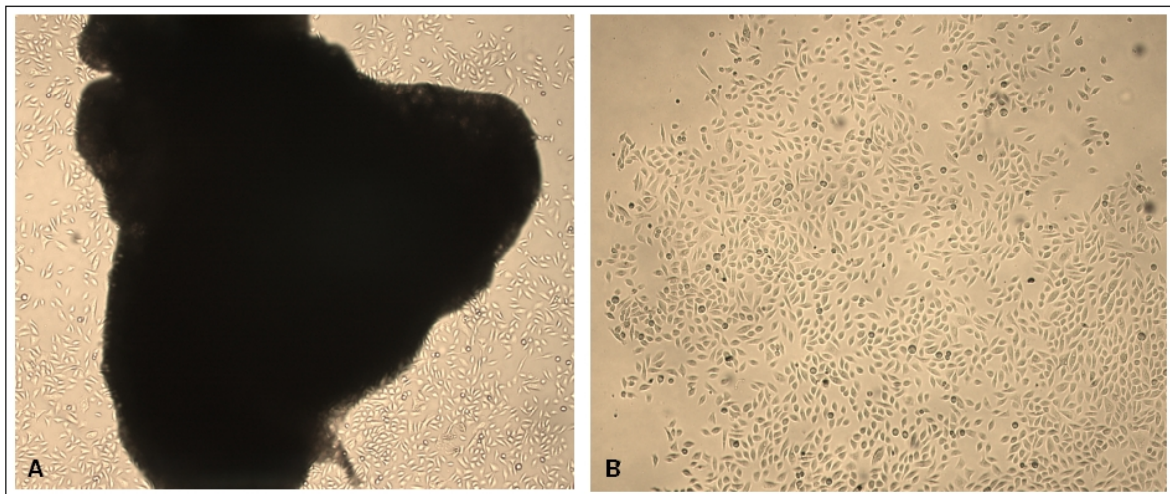


Abbildung 7: Bild A zeigt ein Miniorgan mit den auswachsenden, primären adhärennten Ohrspeicheldrüsenzellen. In Bild B wird der einschichtige Zellrasen der primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea gezeigt.

#### 2.2.3.1 Kultivierung der primären adhärennten Zellen

Zur Passagierung der Zellen erfolgte die Überführung der Miniorgankulturen in neue Zellkulturplatten. Das Nährmedium wurde abgenommen und die primären adhärennten Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden je 250  $\mu$ l 2,5 % Trypsin zu der Zellkultur gegeben. Nach drei- bis fünfminütiger Inkubation bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> erfolgte die lichtmikroskopische Kontrolle der Ablösung. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von Roswell Park Memorial Institution (RPMI)-Medium, welches fetales Kälberserum (FCS) enthält, abgestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Nach einer 8 minütigen Zentrifugation bei 1 100 rpm wurden die Zellen mit PBS gewaschen und abermals zentrifugiert. Das Sediment wurde in BEG-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin resuspendiert. Die Zellzahl und die Vitalitätsbestimmung wurden mit dem Trypanblauausschlusstest in der Neubauerkammer bestimmt. 10 000-15 000 Zellen/cm<sup>2</sup> wurden in 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit je 3 ml BEG-Medium mit 1 % Penicil-

lin/Streptomycin ausgesät und das Nährmedium wurde alle 2 Tage erneuert. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die adhärennten Zellen 1:3 verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt.

### **2.2.3.2 Kryokonservierung von Zellen**

Die primären Zellen wurden in FCS unter Zusatz von 10 % DMSO eingefroren. Dazu wurden sie bis zur Konfluenz gezüchtet und von dem Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach der Zentrifugation bei 1 100 rpm für 6 min wurde das Sediment in 2 ml FCS-DMSO Lösung resuspendiert. Zuerst wurden die Röhrchen in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter bei -80°C gelagert. Dieser ermöglichte ein kontrolliertes Einfrieren, da die Temperatur in diesem konstant um 1°C pro Minute sinkt. Diese Methode verringert die Bildung von Eiskristallen. Nach einem Tag bei -80°C erfolgte die Überführung der Zellen in einen Tank mit flüssigem Stickstoff.

### **2.2.3.3 Auftauen eingefrorener Zellen**

Das zügige Auftauen der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen erfolgte in einem Wasserbad bei 37°C. Die Suspension wurde in ein 15 ml Röhrchen mit vorgelegtem 7 ml Kultivierungsmedium überführt, um die Konzentration des zum Einfrieren verwendeten DMSO zu verdünnen. Nach Sedimentierung der Zellsuspension durch eine sechsminütige Zentrifugation bei 1 000 rpm wurde das Sediment in Nährmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen verteilt. Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> Atmosphäre.

### **2.2.4 Zellzählung und Vitalitätstest**

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde mit Hilfe der Neubauerkammer, die in vier Großquadrate mit je 16 Kleinquadraten unterteilt ist, bestimmt und entsprechend verdünnt eingesetzt. Unter Berücksichtigung des Kammervolumens konnte dann die Zellanzahl pro ml berechnet werden. Die ausgezählte Zellanzahl pro Großquadrat wurde mit dem Faktor  $1 \times 10^4$  multipliziert. Das Ergebnis entsprach den vorhandenen Zellen in einem Milliliter Medium. Das Auszählen der Zellen erfolgte wie in Abbildung 8 dargestellt. Die in der Zeichnung schwarz markierten Zellen wurden gezählt, die weiß gekennzeichneten nicht.

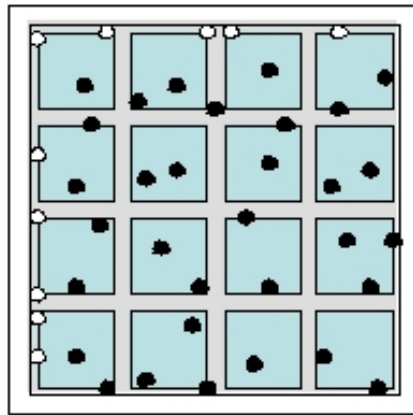


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Neubauerkammer. Die in der Zeichnung schwarz markierten Zellen wurden gezählt, die weiß gekennzeichneten Zellen nicht.

Die Vitalitäten von humanem Gewebe wurden mit dem Trypanblau-Vitalitätstest analysiert. Dieser ermöglichte die Bestimmung der Zellzahl und des Anteils vitaler Zellen in einer Zellsuspension. Die meisten Vitalitätstests stützen sich auf die veränderte Membrandurchlässigkeit. Nekrotische Zellen können Farbstoffe wegen der durchlässigen Zellmembran aufnehmen. Vitale Zellen nehmen derartige Farbstoffe, wie etwa Trypanblau, nicht auf. Durch Zellzählung in der Neubauerkammer können unter dem Mikroskop die Gesamtzellzahl sowie die Anzahl trypanblau gefärbter Zellen bestimmt und damit die Vitalität der getesteten Zellsuspension in Prozent angegeben werden.

## 2.2.5 Fremdstoffexposition

### 2.2.5.1 Inkubationsschema für frisch isolierte Einzelzellen der Glandula parotidea

Nach einer einstündigen enzymatischen Reaktion (s. 2.2.1) wurden die gewonnenen Einzelzellen nach der Zellzählung und der Vitalitätstestung für eine Stunde mit verschiedenen Nikotinkonzentrationen exponiert. Dazu setzte man je Nikotinkonzentration  $1 \times 10^5$  Zellen/ml ein und inkubierte die Proben für 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  und 5 %  $\text{CO}_2$  in Zellkulturplatten mit 24 Vertiefungen. Nach der einstündigen Exposition der Zellen mit 0,125 mM - 4 mM Nikotin, dem Nährmedium als Negativkontrolle und der stark alkylierenden Substanz Methylmethansulfonat (100  $\mu\text{M}$ ) als Positivkontrolle erfolgte eine Vitalitätsbestimmung mit dem Trypanblautests. Darauf wurde die Einzelzellgelelektrophorese (s. 2.2.6) durchgeführt.

### 2.2.5.2 Inkubationsschema für die Miniorgankulturen der Glandula parotidea

Nach der Präparation des Gewebes in Gewebewürfel erfolgte die repetitive Exposition dieser mit 2 mM Nikotin, Nährmedium als Negativkontrolle und 100  $\mu$ M Methylmethansulfonat (MMS) als Positivkontrolle. Der ganze Versuchsaufbau beinhaltete 48 Miniorgankulturen. Für jede Konzentration wurden je 4 Miniorgankulturen mit Nikotin oder MMS oder Nährmedium 1 h im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der enzymatischen Einzelzellseparation (s. 2.2.1) schloss sich die Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) an. Die restlichen 36 Miniorgankulturen in den Zellkulturplatten wurden mit 250  $\mu$ l frischem BEG-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt und wieder durch Zugabe von 2 mM Nikotin bzw. Nährmedium und MMS für 1 h behandelt. Danach erfolgten die erneute enzymatische Vereinzelnung, die Einzelzellgelelektrophorese und die Behandlung der restlichen Miniorgankulturen für eine weitere Stunde. Die verbliebenen 12 Miniorgankulturen wurden nach dreimaligem Exponieren mit Nikotin mit frischem Nährmedium versetzt und danach erfolgte eine 24 stündige Regeneration der Miniorgankulturen. Am darauffolgenden Tag wurden diese wieder vereinzelt und die Einzelzellgelelektrophorese durchgeführt. Zur Verdeutlichung des Versuchsaufbaus siehe Abbildung 9.

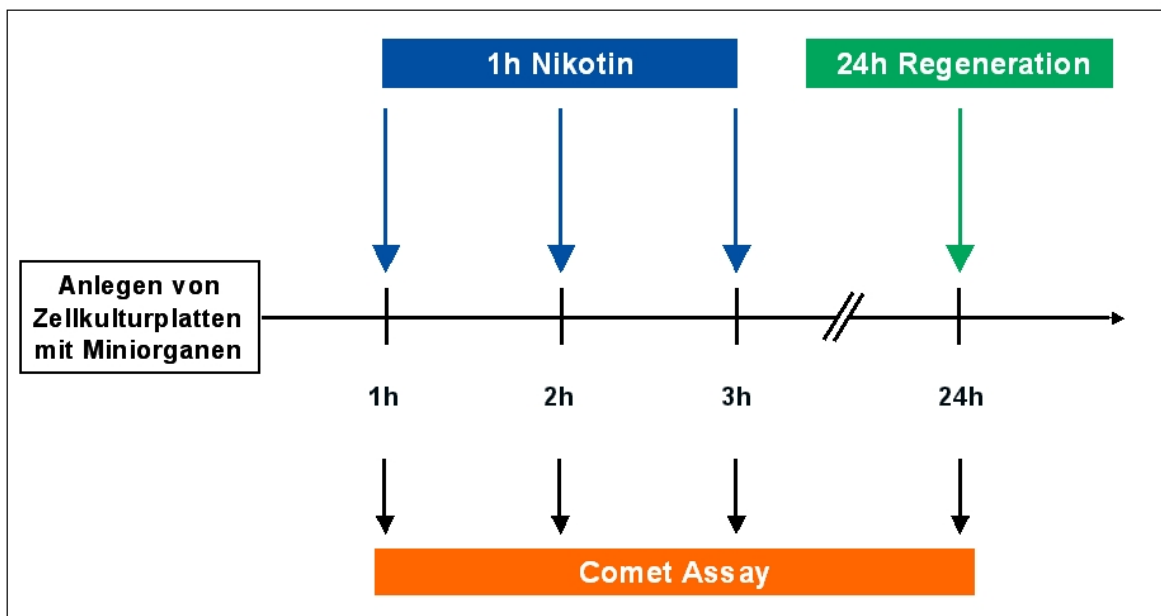


Abbildung 9: Inkubationsschema zur repetitiven Nikotinexposition von Glandula parotidea Miniorgankulturen.

### 2.2.5.3 Inkubationsschema für primäre Glandula parotidea Zellen

Die primären adhärenenten Ohrspeicheldrüsenzellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen bis zu einer 80 % igen Konfluenz kultiviert und dann mit je 3 ml 2,5 % Trypsin abgelöst. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 7 ml RPMI-Medium, welches FCS enthält, abgestoppt. Die Sedimentierung der Zellsuspension erfolgte in einem 15 ml Falcon-Röhrchen für 8 min bei 1 100 rpm und die Resuspendierung des Zellsediments in 5 ml BEG-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin. Nach der Zellzählung mit der Neubauer-kammer und der Vitalitätstestung mit Trypanblau wurden pro Konzentration 75 000 Zellen/ml in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät. Nach einer drei- bis vierstündigen Anheftung der primären Zellen an den Boden der Zellkulturplatten wurden diese mit Nikotin, MMS und Nährmedium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach einer einstündigen Exposition mit 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM und 1 mM Nikotin und 100 µM MMS erfolgte die Ablösung der Zellen mit je 500 µl 2,5 % Trypsin. Die Enzymreaktion wurde durch die Zugabe von 1,5 ml RPMI-Medium gestoppt, die Zellsuspensionen in 1,5 ml Eppendorfgefäßen für 8 min bei 1 100 rpm sedimentiert und die Zellsedimente in 100 µl Nährmedium resuspendiert. Danach schloss sich, wie in 2.2.6.2 beschrieben, die Einzelzellgelelektrophorese an.

Für den Mikrokerntest wurden die primären Zellen 24 h zur Anheftung am Boden der Zellkulturplatten im Inkubator kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte, wie oben beschrieben, die Exposition der Zellen mit Nikotin für 1 h. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit frischem Nährmedium und 2,5 µg/ml Cytochalasin B für 48 h inkubiert. Darauf folgten die Ablösung der Zellen mit je 500 µl 2,5 % Trypsin, das Abstoppen der Enzymreaktion durch Zugabe von 1,5 ml RPMI-Medium und die Sedimentierung der Zellsuspensionen in 1,5 ml Eppendorfgefäßen für 8 min bei 1 100 rpm. Dem schloss sich, wie in 2.2.7.1 beschrieben, der Mikrokerntest an.

### 2.2.6 Einzelzellgelelektrophorese

Die Einzelzellgelelektrophorese (Comet Assay) ist ein schneller und empfindlicher Test zur Darstellung und Quantifizierung von DNA-Schäden. Die ursprüngliche Technik geht auf (Østling und Johanson, 1984) zurück. Durch die Weiterentwicklung von Singh konnte eine erhöhte Sensitivität der Methode durch Verwendung alkalischer Bedingungen während der Elektrophorese erreicht werden (Singh et al., 1988). In dem stark alkalischen Milieu mit einem pH-Wert > 13 ist die DNA vollständig denaturiert und entspiralisiert. Dadurch können neben Doppelstrangbrüchen weitere DNA-Schäden erfasst werden (Tice et

al., 2000). Dazu zählen Einzelstrangbrüche durch Radikale, interkalierende Substanzen oder alkalilabile DNA-Addukte. Vor allem aber werden DNA-Strangbrüche erfasst, die als Resultat einer metabolischen Beteiligung der Zellen auftreten, beispielsweise der Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur oder der enzymatischen Aktivität von Endonukleasen, Topoisomerasen und DNA-Hydrolasen (Slamenova et al., 1997).

Die zuvor mit einem Fremdstoff inkubierten Zellen (ca.  $3 \times 10^4$ ) werden in Agarose auf einem Objektträger eingebettet und deren Membranbestandteile lysiert, sodass nur noch die DNA verbleibt (Cook et al., 1976). Zur Separation der DNA-Stränge werden die Zellen vor der eigentlichen Elektrophorese einem alkalischen Puffer (pH >13) ausgesetzt. Im Anschluss erfolgt eine horizontale Elektrophorese. Brüche in der DNA, welche entweder direkt durch das Xenobiotikum induziert oder durch die Umwandlung von alkalilabilen Stellen entstanden sind, führen zu einer Lockerung der DNA-Struktur im Kern und zu kurzen DNA-Fragmenten. Wegen der größeren Beweglichkeit kommt es zu einer erhöhten DNA-Migration in Richtung der Anode (Klaude et al., 1996). Nach Anfärbung der DNA mit dem DNA-Farbstoff Ethidiumbromid bietet sich im Fluoreszenzmikroskop bei geschädigten Zellen das Bild eines „Kometen“.

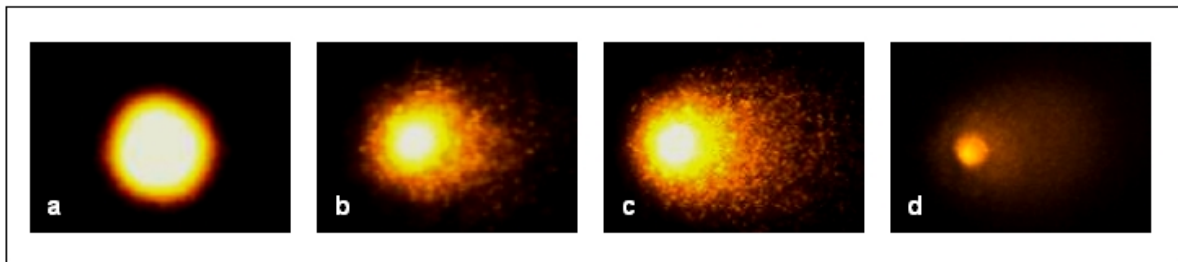


Abbildung 10: Die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von a bis d zeigen einen Zellkern mit steigender DNA-Schädigung dargestellt im Comet Assay.

### 2.2.6.1 Herstellung der beschichteten Objektträger

Die verwendeten Objektträger sind seitlich mattiert, da sie eine bessere Haftung der Agarose gewähren und somit den Verlust der Agaroseschichten vom Glas während der Elektrophorese vermeiden. 1,5 g normal-melting Agarose wurde zur Beschichtung der Zellen mit 100 ml PBS in der Mikrowelle aufgekocht. Danach wurden die Objektträger in die Agaroselösung hineingetaucht, die Rückseite der Objektträger abgewischt und diese zur Trocknung über Nacht ausgebreitet. In dieser Form sind sie bei Raumtemperatur mehrere Wochen haltbar.



### 2.2.6.2 Durchführung der Einzelzellgelelektrophorese

Die Objektträger wurden zwecks Verblindung mit Zahlen codiert, um bei der späteren Auswertung nicht auf die jeweilige Fremdstoffkonzentration schließen zu können. Nach der Exposition der Zellen mit dem Xenobiotikum wurden diese auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  /ml eingestellt und 20  $\mu$ l dieser Zellsuspension mit 180  $\mu$ l einer 0,5 % low-melting Agaroselösung (37°C) in einem Eppendorfgefäß vermischt. Pro Konzentration wurden dann auf zwei beschichtete Objektträger je 60  $\mu$ l Zell-Agarosesuspension aufgetragen und mit einem Deckglas (24 x 32mm) abgedeckt. Nach vorsichtigem Entfernen des Deckglases nach 3-5 min erfolgte die Lyse der Zellen für mindestens 1,5 h bei 4°C lichtgeschützt in der Lyselösung, um mögliche Reparaturvorgänge und zusätzliche DNA-Schäden durch UV-Licht zu vermeiden. Diese bestand aus 0,75 ml Triton, 7,5 ml DMSO und 66,75 ml Lysepuffer (67 ml N-Lauroylsarcosin Na-Salz, 292,8 g NaCl und 2,4 g TRIS, pH 10). Währenddessen wurde die Elektrophoresekammer mit Eis umgeben und mit Elektrophoresepuffer befüllt. Der Elektrophoresepuffer wurde jeden Tag frisch aus 120 ml 5 M NaOH und 10 ml einer 0,2 M EDTA-Lösung angesetzt und vor Verwendung auf 4°C gekühlt. Die Objektträger wurden nach der Lyse horizontal in die Kammer gelegt. Dabei war auf die vollständige Bedeckung der Präparate mit Elektrophoresepuffer zu achten. Leere Plätze wurden mit unbeschichteten Objektträgern aufgefüllt. Zur Entwindung und Trennung der doppelsträngigen DNA beließ man die Objektträger 20 min lichtgeschützt in der Elektrophoresekammer im Elektrophoresepuffer. Im Anschluss daran erfolgte die zwanzigminütige Elektrophorese bei einer Spannung von 25 V und einer Stromstärke von 300 mA, wobei die Stromstärke über die Puffermenge eingestellt wurde. Nach der Elektrophorese wurden die Präparate in TRIS-Neutralisationspuffer mit einem pH-Wert von 7,5 für 5 min neutralisiert und nach Abtropfen der Objektträger mit 20  $\mu$ l einer 20  $\mu$ g/ml konzentrierten Ethidiumbromidlösung zur DNA-Färbung inkubiert und eingedeckt. Die Aufbewahrung der Präparate erfolgte in einer feuchten Kammer bei 4°C maximal eine Woche bis zur Auswertung.

Die Präparate wurden an einem Leica-Fluoreszenzmikroskop bei 200-facher Vergrößerung mit der Komet 5.5 Software (Kinetic Imaging) ausgewertet. Je größer die DNA-Schädigung war, desto weiter und schneller wanderten die DNA-Fragmente im elektrischen Feld zur Anode. Dabei zeigte sich im Fluoreszenzmikroskop ein kometenähnliches Bild mit der intakten DNA im Kopf und der geschädigten DNA im Schweif. Der Prozentsatz der DNA im Schweif (% DNA in tail) ist ein Maß für deren Schädigung. Die DNA-Schädigung wird als Olive-Tail-Moment (OTM) dargestellt (Olive et al., 1993). Es setzt sich aus der Länge des DNA-Schweifes (TL) und seines DNA-Gehalts (DT) zusammen. Je stärker die DNA fragmentiert wurde, desto länger war die Laufstrecke der DNA-Stücke,

die sich als Kometenschweif darstellen ließ. Das OTM wird ohne Einheit angegeben. Es wurden pro Substanz zwei Objektträger mit insgesamt 100 Zellen ausgewertet. Die Speicherung der Daten erfolgte im Microsoft Excel Format.

### 2.2.7 Mikrokerntest

Der Mikrokerntest dient als zytogenetischer Test zur Erkennung von DNA-Schäden auf chromosomaler Ebene in sich teilender Zellen. Mit ihm können Zellen identifiziert werden, die aufgrund von Chromosomenbrüchen und -verlusten nicht mehr in der Lage sind, das Erbmaterial zu gleichen Teilen auf die beiden Tochterkerne zu verteilen.

Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen, die sich während der Mitose nicht an die Spindelfasern angeheftet haben, kondensieren zu einem oder mehreren sogenannten Mikrokerneln. Wie der Zellkern besitzen diese eine Kernmembran, sind jedoch wesentlich kleiner (s. Abbildung 11).

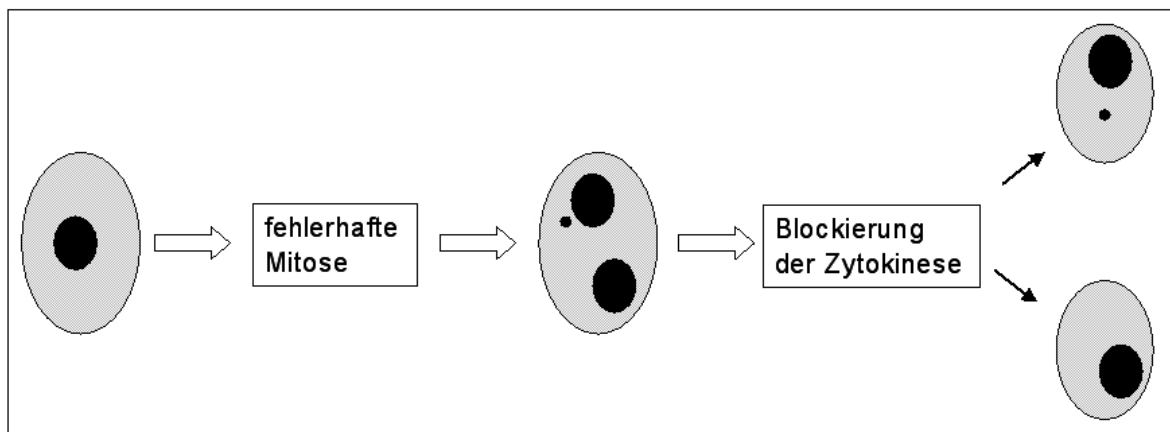


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Mikrokerntests.

Nach Anfärbung der DNA mit einem Farbstoff können die Mikrokerne von den Hauptkernen aufgrund ihrer Größe leicht unterschieden werden. Der Farbstoff Acridin-orange bindet interkalativ an einzel- und doppelsträngige Nukleinsäuren, wobei er bei Blaulichtanregung fluoresziert. Die Bindung von Acridinorange an doppelsträngige DNA im Kern führt zu einer Grünfluoreszenz, während einzelsträngige RNA im Zytoplasma rot fluoresziert. Mikrokerne können nur während der Mitose entstehen, das heißt nur in proliferierenden Zellen. Die Häufigkeit der Mikrokerne gilt dabei als Maß für die schädigenden Einflüsse eines Fremdstoffes auf die Zelle.

### 2.2.7.1 Durchführung des Mikrokerntests mit primären Ohrspeicheldrüsenzellen

Der Mikrokerntest konnte mit primären adhärennten Glandula parotidea Zellen durchgeführt werden, da diese in der Lage sind zu proliferieren. Dabei wurden die Zellen nach der einstündigen Exposition mit verschiedenen Nikotinkonzentrationen für weitere 48 h mit dem Zytokineseinhibitor (Cytochalasin B) der Konz. 2,5 µg/ml inkubiert. Durch Zugabe von Cytochalasin B kann eine Zellteilung nach abgeschlossener Kernteilung verhindert werden. Es entstehen doppelkernige oder mehrkernige Zellen, je nachdem wie oft sich der Kern der Zelle geteilt hat. Nach der Inkubation mit Cytochalasin B wurden die Zellen mit je 500 µl 2,5 % Trypsin abgelöst, die Enzymreaktion durch die Zugabe von 1,5 ml RPMI-Medium gestoppt und die Zellsuspensionen in 1,5 ml Eppendorfgefäßen für 8 min bei 1 100 rpm sedimentiert. Das Sediment wurde in PBS aufgenommen und die Zellzahl mit Hilfe der Neubauerkammer eingestellt. Je  $2 \times 10^4$  -  $3 \times 10^4$  Zellen wurden nach der Behandlung mittels Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht und in eiskaltem Methanol für mindestens 2 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Anschließend wurden die Objektträger 3 - 5 min in einer 0,006 %-igen Acridinorange-Färbelösung gefärbt und zweimal für jeweils 5 min in Soerensen-Puffer entfärbt. Für den Soerensen-Puffer wurden 2,92 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$  und 2,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  in 1 l A. bidest. gelöst und die Lösung danach autoklaviert. Die Präparate wurden mit Soerensen-Puffer eingedeckt und in einer feuchten Kammer bei  $4^{\circ}\text{C}$  für höchstens eine Woche gelagert. Die Auswertung erfolgte an einem Leica-Fluoreszenzmikroskop DM4000B bei 400-facher Vergrößerung. Die Präparate wurden nach den bei Fenech (Fenech, 2000) beschriebenen Kriterien ausgewertet. In einem ersten Zählthroughgang wurden die ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen als Maß für die Proliferation der Zellen ermittelt, während in einem zweiten Zählthroughgang nur doppelkernige Zellen gezählt und die Zahl der Mikrokerne pro 1000 doppelkerniger Zellen bestimmt wurden. Apoptosen wurden parallel zu den ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen gezählt.

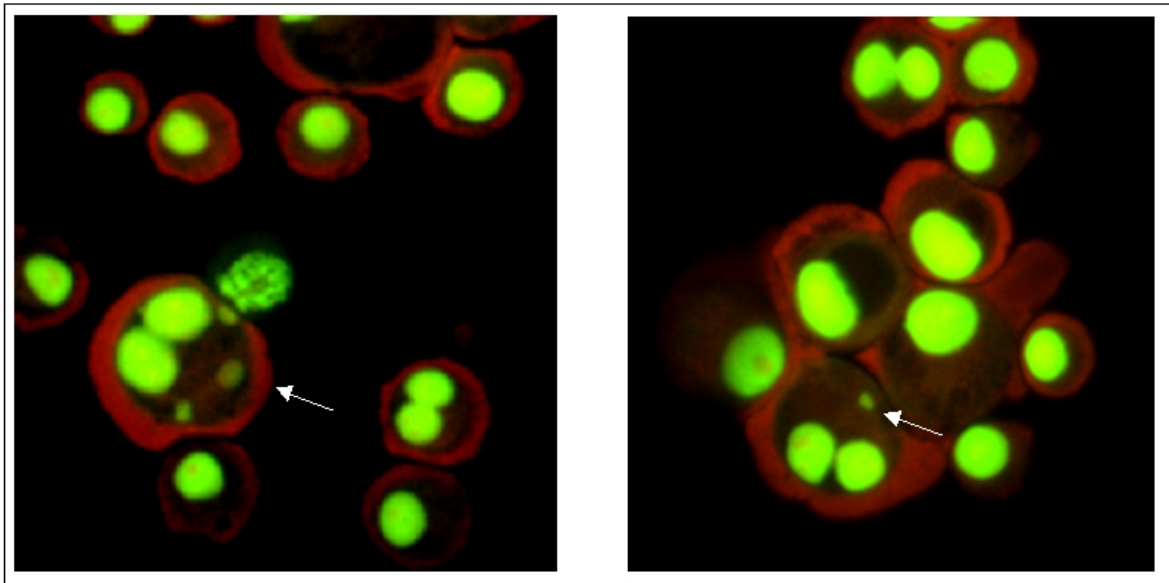


Abbildung 12: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea, angefärbt mit Acridinorange. Die Abbildungen zeigen mehrere einkernige Zellen und doppelkernige Zellen mit Mikrokernen (siehe →).

### 2.2.8 Chromosomenaberrationstest

Chromosomenaberration ist der Oberbegriff für Veränderungen in der Struktur oder der Anzahl der Chromosomen eines Organismus. Bei der strukturellen Aberration ist der Chromosomenaufbau verändert, dagegen bei der numerischen Aberration die Chromosomenanzahl. Chromosomenaberrationen können zum einen durch eine Störung in der Meiose, aber auch durch Mutagene, wie zum Beispiel Röntgenstrahlung oder chemische Stoffe, entstehen. Dabei ist es möglich, dass sie Auswirkung auf die körperliche Funktion, das Erscheinungsbild und die kognitive Leistungsfähigkeit eines Organismus haben.

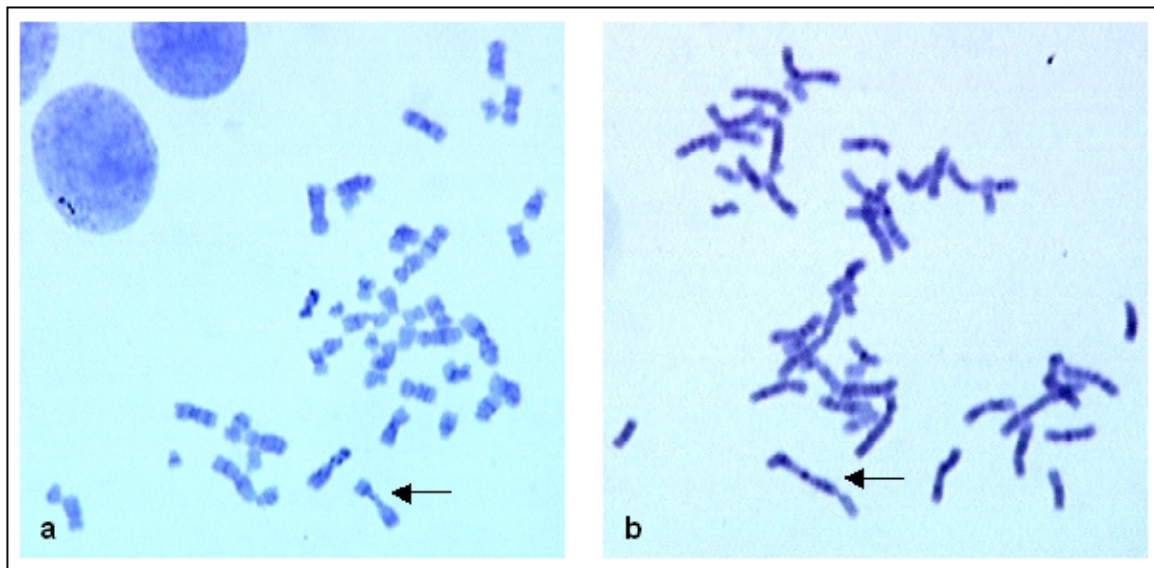


Abbildung 13: Chromosomendarstellung der adhärenenten Ohrspeicheldrüsen Zellen. In Bild a wird die Translokation von Chromosom 13 und 14 q- gezeigt (s. →). Ein Bruch im Chromosom 1 wird in Bild b dargestellt (siehe →).

### 2.2.8.1 Chromosomenpräparation

Zur Präparation der Chromosomen wurden die Zellen der primären adhärenenten Zellen der Ohrspeicheldrüse mit Trypsin abgelöst (s. 2.2.3.1), auf sterilen Objektträgern in Zellkulturschalen für Objektträger ausgesät und für eine Stunde mit verschiedenen Nikotinkonzentrationen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit frischem BEG-Medium versorgt und es erfolgte die Arretierung der Zellen in der Metaphase durch Zugabe von 15  $\mu$ l Colcemid je Objektträger für 1,5 h bei 37°C. Danach wurden das Nährmedium abgegossen und die Chromosomen mit 5 ml einer hypotonen 0,075 M KCl Lösung für 25 min bei 37°C inkubiert. Zu der Lösung wurde dann 1 ml gekühlte Fixierlösung (Methanol-Eisessig im Verhältnis 1:3) gegeben und die Objektträger wurden für weitere 10 min bei 37°C belassen. Nach dem Abgießen der Lösung wurden die Chromosomen mit 5 ml der Fixierlösung für 10 min bei -20°C inkubiert. Danach erfolgte ein weiterer Fixierschritt für 20 min bei -20°C. Nach der Fixierung der Chromosomen wurden die Objektträger mit einer Pinzette aus den Schalen genommen, mit Fixierlösung abgespült und an der Luft getrocknet. Danach wurden die Objektträger für 30 min auf eine 90°C heiße Heizplatte gelegt, bevor sie über Nacht bei 60°C im Wärmeschrank lagerten.

### 2.2.8.2 Chromosomenfärbung

Zur Chromosomenfärbung wurden die Präparate mit einer Trypsinlösung für zwei Minuten in einer Küvette inkubiert. Dabei wurden vor allem die an den Guanin-Cytosin reichen Regionen der DNA gebundenen Proteine herausgelöst, so dass sich während des Eintauchens der Präparate in die 5 %ige Giemsa-Lösung für zwei Minuten die an den Adenin-Thymin reichen Regionen gebundenen Proteine anfärbten. Anschließend wurden die Objektträger zweimal in Aqua bidest. gespült, an der Luft getrocknet und mit Eukitt eingedeckt.

### 2.2.8.3 Auswertung der Chromosomenaberrationen

Die Auswertung der Chromosomenaberrationen erfolgte an einem Durchlichtmikroskop. Dabei wurden strukturelle und numerische Aberrationen ausgewertet. Bei den strukturellen Aberrationen wurde zwischen Chromatidtypaberrationen und Chromosomenaberrationen unterschieden. Beim Chromatidtyp ist einer der beiden Schwesterchromatiden und beim Chromosomentyp sind beide Chromatiden an homologen Stellen betroffen. Bei diesen beiden Typen wurden Chromatidbrüche, bei denen im Idealfall das dislozierte Fragment parallel zu seinem homologen Bereich auf der Schwesterchromatide liegt, ausgewertet. Außerdem wurden auch Chromosomenbrüche, bei denen im Idealfall die Bruchenden offen sind, analysiert.

### 2.2.9 Sandwich-ELISA-Test zum Apoptosenachweis

Mit dem ELISA-Test ist es möglich, Proteine und Viren, aber auch niedermolekulare Verbindungen, wie Hormone, Toxine und Pestizide, in einer Probe nachzuweisen.

Der Sandwich-ELISA verwendet zwei Antikörper, die beide spezifisch das nachzuweisende Antigen binden. Der erste Antikörper, der sogenannte Beschichtungs-Antikörper, wird an einer speziellen Mikrotiterplatte gebunden. Danach wird die zu analysierende Probe mit dem Antikörper inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wird die Platte gewaschen, ungebundene Teile der Probe dadurch entfernt, und nur das an den Beschichtungs-Antikörper gebundene Antigen bleibt zurück. Im nächsten Schritt wird der Detektions-Antikörper, an dessen Ende das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, zugegeben. Dadurch entsteht der Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Durch erneutes Waschen der Platte werden überschüssige Antikörper ausgewaschen und ein passendes chromogenes Substrat zugegeben. Dieses wird von dem Enzym Meerrettichperoxidase zu einem

Reaktionsprodukt umgesetzt, dessen Nachweis durch Farbumschlag, Fluoreszenz oder Chemolumineszenz erfolgen kann. Für quantitative Nachweise wird eine Serie mit bekannten Antigenkonzentrationen durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal zu erhalten.

Eine schematische Darstellung des Sandwich-ELISAs ist in Abbildung 14 gezeigt.

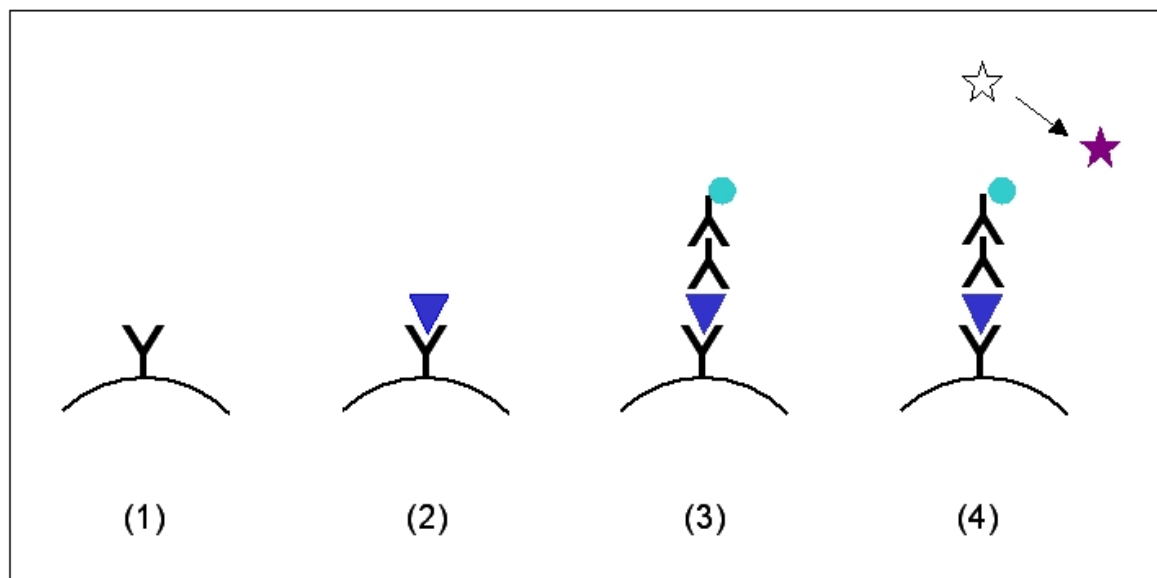


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISAs. (1) Mikrotiterplatte wird mit Beschichtungs-Antikörper inkubiert, (2) Inkubation der Probe, (3) Zugabe des Detektions-Antikörpers, an den das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelt ist, (4) Zugabe des Substrats, welches zum nachweisbaren Reaktionsprodukt (siehe ★) umgesetzt wird.

### 2.2.9.1 Durchführung des Sandwich-ELISA-Tests

Für den Apoptosenachweis wurden 100 000 Zellen/ml der primären adhärennten Zellen der Ohrspeicheldrüse in Zellkulturplatten mit 6 Vertiefungen ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> zur Anheftung der Zellen inkubiert. Danach erfolgte die einstündige Exposition der Zellen mit den verschiedenen Nikotinkonzentrationen. Für die Positivkontrolle wurden die Zellen 24 h mit 800 µM MMS inkubiert und der Überstand für den ELISA-Test eingefroren. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS wurden diese mit frischem BEG-Medium mit 1 % Penicillin/Streptomycin für 4 h im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Darauf wurde der Überstand der Zellsuspension abgenommen und für den Apoptosenachweis bei -80°C eingefroren. Die Zellen wurden mit 2,5 % Trypsin abgelöst, zentrifugiert und das Zellsediment in Lysepuffer aufgenommen und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach der Zentrifugation wurde das Lysat ebenfalls für den ELISA-Test bei -80°C eingefroren.

Der ELISA-Test wurde nach einem Protokoll von Becton Dickinson für Caspase 3 durchgeführt. Die Messung erfolgte an einem ELISA-Reader.

## **2.2.10 Histologische Untersuchungen zur Analyse der Vitalität der Miniorgankulturen der Glandula parotidea**

### **2.2.10.1 Herstellung der Präparate**

Die Miniorgane der Glandula parotidea wurden nach einer Woche Kulturdauer vorsichtig zur Fixierung in 3,7 % Formaldehydlösung überführt und dort für 5 Tage fixiert. Die fixierten Präparate wurden in kleinen gekennzeichneten Plastikkassetten nach Tagen geordnet und 1 h unter fließendem Leitungswasser gewaschen, um das Fixierungsmittel zu entfernen. Danach erfolgte die Entwässerung der Präparate im Autotechnikon mit einer aufsteigenden Alkoholreihe über mehrere Stunden. Zur Eliminierung des Alkohols wurden die Präparate für weitere 2 h mit Xylol behandelt, bevor sie in Paraplast aufbewahrt werden konnten. Schließlich wurden sie in Gießschälchen mit heißem Paraffin überschichtet und zu einem Block verarbeitet. Nach dem Erkalten entfernte man den Paraffinblock aus der Gießform.

Zum Schneiden der Präparate wurden die Paraffinblöcke in ein Rotationsmikrotom eingespannt und 2-5  $\mu\text{m}$  Schnitte angefertigt. Die einzelnen Schnitte konnten dann vorsichtig mit einem Pinsel auf saubere, fettfreie Superfrost-Objektträger aufgezogen werden. Zur Streckung der Schnitte wurde zuvor ein Wassertropfen auf die Objektträger gegeben. Danach trockneten die Schnitte auf einer Wärmeplatte bei 37°C und wurden dann in Kästen sortiert und dort bis zum Färben aufbewahrt.

### **2.2.10.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte zuerst zweimal für 10 min in Xylol gestellt und dann in eine absteigende Alkoholreihe für mehrere Minuten überführt, bevor sie in A. bidest. verblieben. Nach der Inkubation der Schnitte mit Hämalaun für 1-2 min wurden sie zuerst mit A. bidest., dann unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Danach erfolgte die Färbung für 2-3 min mit einer 1 %igen Eosinlösung. Nach einem kurzen Waschschriff mit A. bidest. begann die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe für mehrere Minuten. Anschließend wurden sie für zweimal 5 min in Xylol überführt und danach mit Eukitt eingedeckt.



### 2.2.10.3 Immunhistologische Färbung gegen $\alpha$ -Amylase

Nach der Entparaffinierung der Präparate wurden diese zur Blockierung der unspezifischen Bindungen für 15 min mit 1 % Kälberserum in PBS inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit einem polyklonalen Antikörper aus dem Kaninchen gegen humane  $\alpha$ -Amylase (1:100) für 1 h bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Präparate mit dem biotinylierten Sekundärantikörper gegen Kaninchen inkubiert und gewaschen, gefolgt von einer Inkubation mit Streptavidin-Peroxidase für 30 min. Als Substrat wurde dann zur Visualisierung der Färbung zu den Präparaten für weitere 30 min 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) gegeben; als Kernfärbung diente Hämatoxylin. Nach einem Waschschrift mit A. bidest. begann die Dehydrierung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe für mehrere Minuten. Anschließend wurden sie mit Eukitt eingedeckt. Die Präparate wurden mittels eines Durchlichtmikroskops begutachtet.

### 2.2.11 Immunfluoreszenzdarstellung von $\alpha$ -Amylase zur Charakterisierung der primären adhärennten Zellen

Die primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea wurden auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^5$ /ml eingestellt, mit Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht und in eiskaltem Methanol für mindestens 4 h bei  $-20^\circ\text{C}$  fixiert. Nach der Fixierung der Zellen auf den Objektträgern und deren Trocknung wurden unspezifische Bindungen für 30 min mit einer PBS-FCS Lösung (10 %) blockiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem polyklonalen  $\alpha$ -Amylase Antikörper (1:100) für 1 h. Parallel dazu wurden die Zellen mit einer 0,1 %igen Triton-Lösung inkubiert, um das zytoplasmatische Amylaseantigen für den Antikörper erreichbar zu machen. Danach erfolgte das erneute Waschen der Zellen mit PBS und die anschließende Inkubation für 1 h mit dem Sekundärantikörper anti-Kaninchen (1:1000). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 3-5 min mit 4',6'-Diamidino-2phenylindol (DAPI) zur Zellkernfärbung behandelt und danach gründlich mit A. bidest. gewaschen. Die Präparate wurden mit Eukit eingedeckt und in einer feuchten Kammer bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert. Die Auswertung erfolgte an einem Leica-Fluoreszenzmikroskop.

### 2.2.12 Graphische Darstellung der Ergebnisse

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden sogenannte Boxplots verwendet, die mit dem Datenanalyseprogramm Statistica 8.0 erstellt wurden. Die untere Begrenzung der Box wird durch die 25. Perzentile dargestellt, die Linie in der Box zeigt den Median aus n-OTM-Mittelwerten, und die obere Begrenzung der Box entspricht der 75. Perzentile. Werte, die zwischen 1,5 und 3 Seitenlängen außerhalb der Box liegen, werden als Ausreißer bezeichnet und sind durch einen Kreis markiert. Werte, die mehr als 3 Seitenlängen außerhalb der Box liegen, werden als Extremwerte definiert und sind durch einen Stern bezeichnet. Der Maximal- und Minimalwert im Bereich von 1,5 Seitenlängen wird jeweils durch eine T-förmige Linie ober- und unterhalb der Box markiert.

### 2.2.13 Statistische Verfahren

Zur statistischen Auswertung kam das Programm Statistica 8.0 zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde mit  $p \leq 0,05$  festgelegt. Als statistische Testverfahren dienten der Friedman- sowie der Wilcoxon-test.

Der Friedmantest ist ein nicht-parametrisches Verfahren zum Vergleich von drei- oder mehr gepaarten Stichproben. Dazu werden den OTM-Mittelwerten der verschiedenen getesteten Konzentrationen jedes einzelnen Patienten nach ihrer Größe Ränge zugewiesen. Anschließend werden die Ränge der einzelnen Patienten aufsummiert. Es ist dann möglich, die Rangsummen der unterschiedlichen Konzentrationen miteinander zu vergleichen.

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

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

## 3 ERGEBNISSE

In den nachfolgenden Punkten werden die Ergebnisse der genotoxikologischen, zytogenetischen, histologischen und immunhistochemischen Analysen zu den Effekten von Nikotin in humanem Gewebe des oberen Aerodigestivtraktes dargestellt.

Die Zellzahlen und die Vitalität der Einzelzellen, der Miniorgankulturen und der primären adhärennten Zellen wurden mit Hilfe der Neubauerkammer bestimmt (s. 2.2.4). Dabei wurde die Qualität der Versuche durch den hohen Anteil vitaler Zellen gewährleistet. Bei den hier verwendeten Zellen betragen die Vitalitäten über 80 %.

### 3.1 Genotoxikologische Untersuchungen in humanen Zellsystemen

Die OTM-Werte, Mikrokerne, Chromosomenaberrationen und Apoptoseraten bzw. die jeweiligen Mittelwerte, Mediane und Standardabweichungen zu den Ergebnissen der DNA-Migration, Mikrokernbildung, Chromosomenaberration und Apoptoseinduktion sind unter 7.2 genau angegeben.

#### 3.1.1 Genotoxische Effekte bei isolierten Einzelzellen der Glandula parotidea, nachgewiesen in der Einzelzellgelelektrophorese

Zur Untersuchung von DNA-Schäden in humanem Ohrspeicheldrüsengewebe durch Nikotin wurden Einzelzellen von 15 Probanden mit den Nikotinkonzentrationen zwischen 0,125 mM bis 4 mM für eine Stunde exponiert (s. 2.2.5.1). Die Auswertung der DNA-Schäden erfolgte mit dem Comet Assay. Die Olive Tail Moment Werte dienten als Maß der DNA-Schädigung und wurden in Boxplots dargestellt. Dabei zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt im Friedmantest  $p=0,006$ , Abbildung 15.

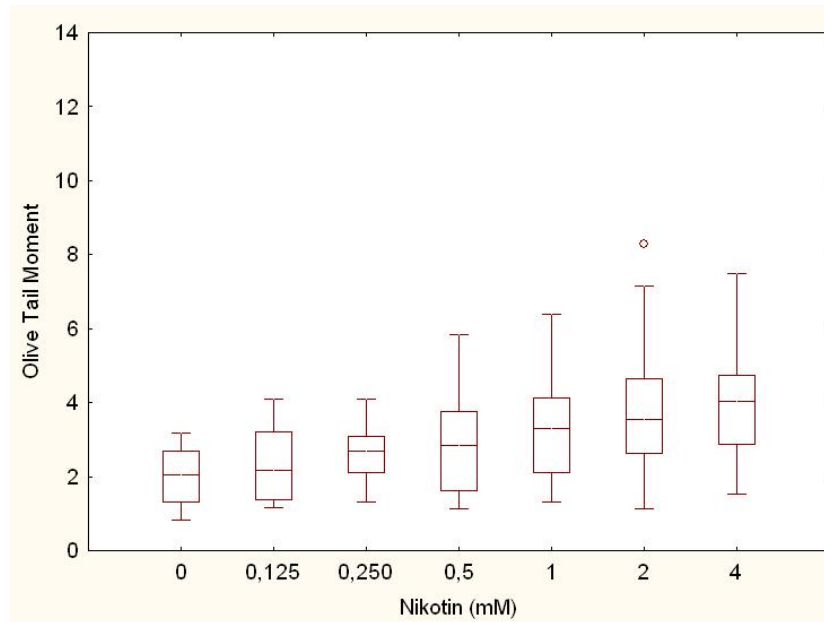


Abbildung 15: DNA-Migration von Einzelzellen der Glandula parotidea nach einstündiger Inkubation mit Nikotin, nachgewiesen im Comet Assay. Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile, waagrechter Strich = Median, T-Linien = Min./Max.-Wert, ° = Ausreißer.

Mit dem Wilcoxonstest konnte nach der Bonferroni Korrektur ein signifikanter Anstieg der Olive Tail Moment (OTM) Werte 0,250 mM, 1 mM, 2 mM und 4 mM Nikotin gegenüber der Negativkontrolle nachgewiesen werden (siehe Tabelle 7). Bei den Nikotinkonzentrationen 0,125 mM Nikotin und 0,5 mM Nikotin zeigte sich kein signifikanter Anstieg der OTM-Werte.

Tabelle 7: Übersicht der Ergebnisse des Wilcoxonstests für isolierte Einzelzellen der Glandula parotidea

Wilcoxonstest	p-Wert	Signifikanz
0,125 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,3	Nein
0,250 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,006	Ja
0,5 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,01	Nein
1 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,002	Ja
2 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,002	Ja
4 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,001	Ja

Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentrationen gegen die Negativkontrolle an den OTM-Medianwerten. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt nach Bonferroni korrigiert bei 0,008.  $n=15$ .

### 3.1.2 Genotoxische Effekte bei Miniorgankulturen der Glandula parotidea, nachgewiesen in der Einzelzellgelelektrophorese

Nach der dreimaligen Exposition der Miniorgankulturen von 10 Probanden mit 2 mM Nikotin und die daran anschließende 24-stündige Regenerationszeit wurden Einzelzellen isoliert und der Comet Assay durchgeführt.

Dabei zeigte sich bei wiederholter Nikotinexposition für je eine Stunde ein signifikanter Anstieg der DNA-Migration bei den Nikotinkonzentrationen 2 mM 1 h und 2 mM 3 h verglichen mit den jeweiligen Negativkontrollen von 1 h und 3 h im Wilcoxonstest. Die Nikotinkonzentrationen der anderen Zeitpunkte unterschieden sich verglichen mit den jeweiligen Negativkontrollen nicht signifikant (s. Tabelle 8). Der DNA-Schaden nach der 24-stündigen Regenerationsphase scheint in der graphischen Darstellung reduziert zu sein. Allerdings zeigte sich im Wilcoxonstest keine Signifikanz.

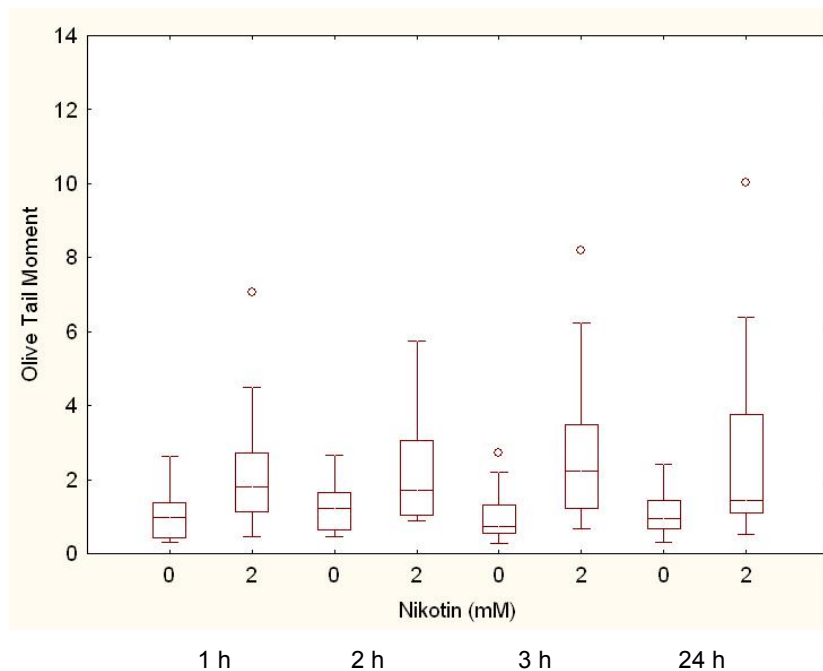


Abbildung 16: Genotoxische Effekte an Miniorgankulturen der Glandula parotidea nach mehrmaliger Inkubation mit Nikotin, nachgewiesen im Comet Assay. Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile, waagrechter Strich = Median, T-Linien = Min./Max.-Wert, ° = Ausreißer.

Tabelle 8: Übersicht der Ergebnisse des Wilcoxontests für Miniorgankulturen der Glandula parotidea

Wilcoxontest	p-Wert	Signifikanz
2 mM Nikotin 1 h vs. Negativkontrolle 1 h	0,02	Ja
2 mM Nikotin 2 h vs. Negativkontrolle 2 h	0,18	Nein
2 mM Nikotin 3 h vs. Negativkontrolle 3 h	0,02	Ja
2 mM Nikotin 24 h vs. Negativkontrolle 24 h	0,11	Nein

Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentrationen gegen die Negativkontrolle an den OTM-Medianwerten. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05.  $n=10$ .

Die Miniorgankulturen wurden ebenfalls mit der stark alkylierenden Substanz Methylmethansulfonat (MMS) als Positivkontrolle repetitiv behandelt, Einzelzellen isoliert und der Comet Assay wurde durchgeführt. Dabei zeigte sich im Friedmantest bei dreimaliger Exposition mit MMS ein Anstieg der OTM-Werte mit einem  $p$ -Wert von 0,002.

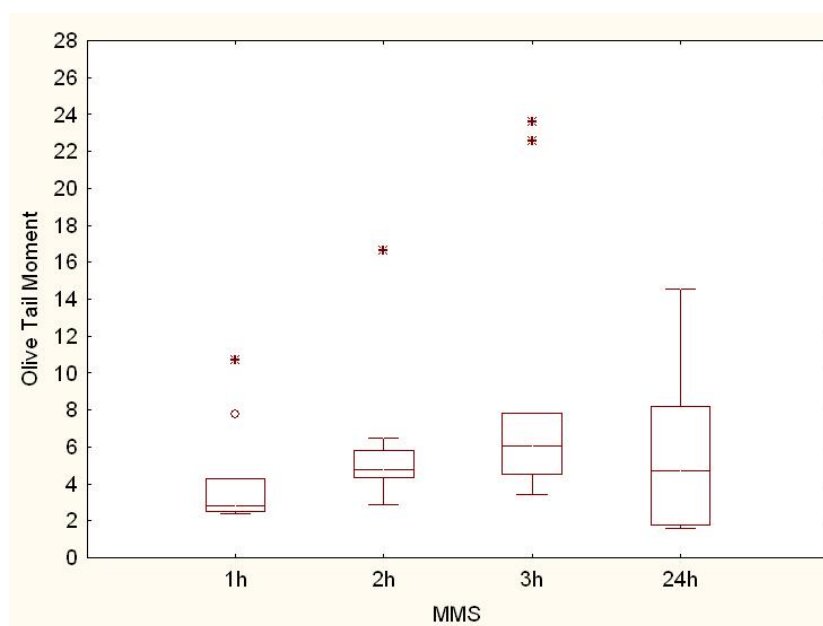


Abbildung 17: Genotoxische Effekte an Miniorgankulturen der Glandula parotidea nach mehrmaliger Inkubation mit MMS, nachgewiesen im Comet Assay. Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile, waagrechter Strich = Median, T-Linien = Min./Max.-Wert, ° = Ausreißer, \* = Extremwert.

Auch konnte im Wilcoxontest zu den verschiedenen Zeiten eine Signifikanz zwischen MMS und den einzelnen Negativkontrollen gezeigt werden, ebenso wie die Reparatur der DNA-Schäden nach einer 24-stündigen Regenerationsphase.

Tabelle 9: Übersicht der Ergebnisse des Wilcoxontests für die Exposition der Miniorgankulturen der Glandula parotidea mit MMS

Wilcoxontest	p-Wert	Signifikanz
Negativkontrolle vs. MMS, 1 h	0,007	Ja
Negativkontrolle vs. MMS, 2 h	0,008	Ja
Negativkontrolle vs. MMS, 3 h	0,005	Ja
Negativkontrolle vs. MMS, 24 h	0,006	Ja

Es erfolgten Paarvergleiche der Methylmethansulfonatkonzentrationen gegen die Negativkontrolle an den OTM-Medianwerten. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt bei 0,05.  $n=10$ .

### 3.1.3 Genotoxische Effekte bei primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea, nachgewiesen in der Einzelzellgelelektrophorese

Die primären adhärennten Zellen von 10 Probanden wurden mit den Nikotinkonzentrationen 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM und 1 mM für eine Stunde exponiert und die DNA-Schäden mit dem Comet Assay nachgewiesen. Dabei zeigte sich bei steigender Nikotinkonzentration ein signifikanter Anstieg der OTM-Werte im Friedmantest  $p=0,006$  (s. Abbildung 18).

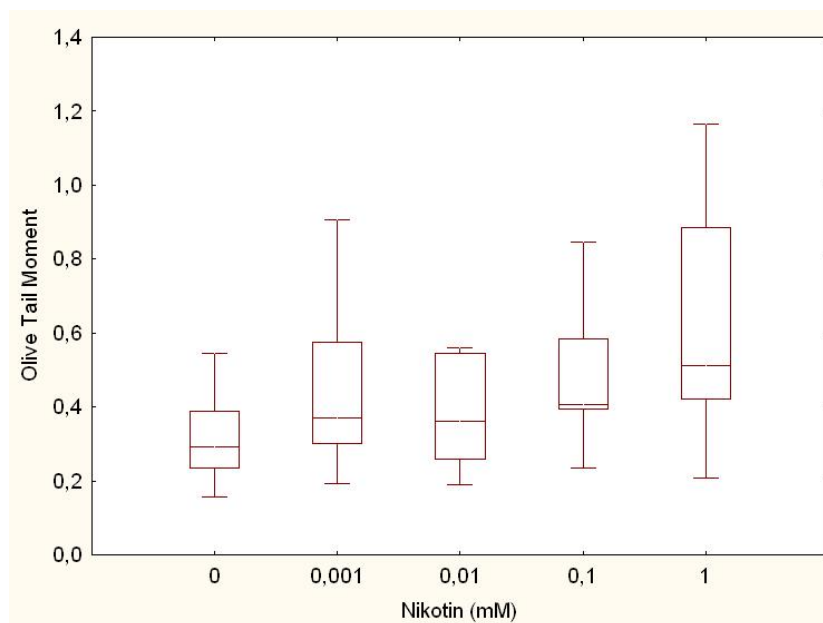


Abbildung 18: DNA-Migration an primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea nach ein-stündiger Inkubation mit Nikotin, nachgewiesen im Comet Assay. Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile, waagrechter Strich = Median, T-Linien = Min./Max.-Wert.

Im Wilcoxon-Test (s. Tabelle 10) unterschieden sich die Negativkontrolle und die Nikotinkonzentrationen 0,1 mM und 1 mM nach der Bonferroni-Korrektur im Gegensatz zu den Nikotinkonzentrationen 0,001 mM und 0,01 mM signifikant.

Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse des Wilcoxon-Tests für primäre adhärenente Zellen der Glandula parotidea im Comet Assay

Wilcoxon-Test	p-Wert	Signifikanz
0,001 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,02	Nein
0,01 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,13	Nein
0,1 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,01	Ja
1 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,005	Ja

Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentrationen gegen die Negativkontrolle an den OTM-Medianwerten. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt nach Bonferroni korrigiert bei 0,0125.  $n=10$ .

### 3.1.4 Genotoxische Effekte bei primären adhärenenten Zellen der Glandula parotidea, nachgewiesen im Mikrokerntest

Im Mikrokerntest zeigte sich bei den primären adhärenenten Zellen der Glandula parotidea von 10 Probanden ein dosisabhängiger Anstieg der Mikrokerne, der im Friedman-Test mit  $p=0,036$  signifikant war (s. Abbildung 19).

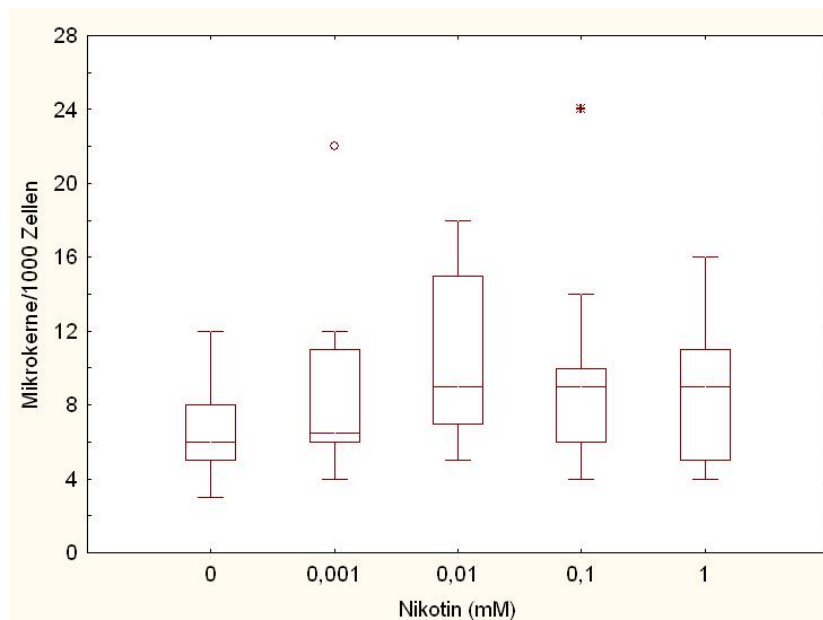


Abbildung 19: Mikrokernebildung an primären adhärenenten Zellen der Glandula parotidea nach ein-stündiger Inkubation mit Nikotin. Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile, waagrechter Strich = Median, T-Linien = Min./Max.-Wert, ° = Ausreißer, \*=Extremwert.



Im Wilcoxon-Test unterschieden sich die Negativkontrolle und die Nikotinkonzentrationen 0,001 mM und 0,01 mM nicht signifikant. Die Nikotinkonzentrationen 0,1 mM und 1 mM zeigten sich im Vergleich mit der Negativkontrolle signifikant.

Tabelle 11: Übersicht der Wilcoxon-Testergebnisse für primäre adhärenente Zellen der Glandula parotidea im Mikrokerneltest

Wilcoxon-Test	p-Wert	Signifikanz
0,001 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,06	Nein
0,01 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,03	Nein
0,1 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,01	Ja
1 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,008	Ja

Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentrationen gegen die Negativkontrolle an den Mikrokern-Medianwerten. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt nach Bonferroni korrigiert bei 0,0125.  $n=10$ .

### 3.2 Ergebnisse der Analysen mit dem Chromosomenaberrationstest

Nach der einstündigen Exposition der primären Ohrspeicheldrüsenzellen von 10 Probanden mit verschiedenen Nikotinkonzentrationen wurden die Chromosomen präpariert. Dabei zeigte sich im Friedmantest ein signifikanter Anstieg der Chromosomenaberrationen mit  $p=0,0001$  (Abbildung 20).

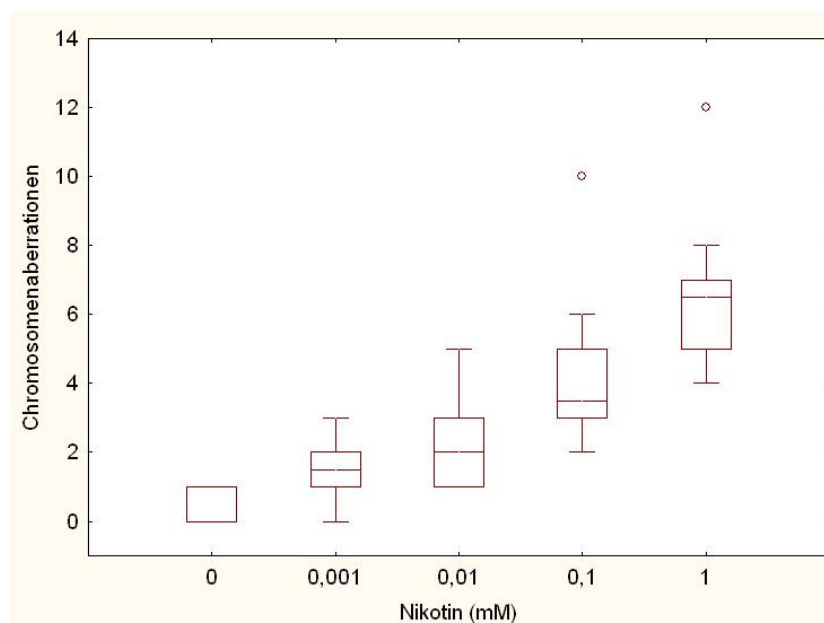


Abbildung 20: Genotoxische Effekte an primären adhärenenten Zellen der Glandula parotidea nach einstündiger Inkubation mit Nikotin, nachgewiesen im Chromosomenaberrationstest. Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile, waagrechter Strich = Median, T-Linien = Min./Max.-Wert, ° = Ausreißer.

Im Wilcoxon-Test unterschieden sich die Nikotinkonzentrationen 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM und 1 mM im Vergleich mit der Negativkontrolle signifikant.

Tabelle 12: Übersicht der Ergebnisse des Wilcoxon-Tests für primäre adhärenente Zellen der Glandula parotidea im Chromosomenaberrationstest

Wilcoxon-Test	p-Wert	Signifikanz
0,001 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,011	Ja
0,01 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,005	Ja
0,1 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,005	Ja
1 mM Nikotin vs. Negativkontrolle	0,005	Ja

Es erfolgten Paarvergleiche der Nikotinkonzentrationen gegen die Negativkontrolle an den Chromosomenaberrations-Medianwerten. Das Signifikanzniveau  $p$  liegt nach Bonferroni korrigiert bei 0,0125.  $n=10$ .

### 3.3 Apoptosenachweis mit dem Sandwich-ELISA-Test

Bei den primären adhärenente Zellen der Ohrspeicheldrüse von 10 Probanden zeigte sich im Friedman-Test kein signifikanter Anstieg der Apoptoserate nach einstündiger Inkubation mit Nikotin. Die Apoptoserate sank mit steigender Nikotinkonzentration (s. Abbildung 21). Im Wilcoxon-Test unterschieden sich die Nikotinkonzentrationen 0,001 mM, 0,01 mM, 0,1 mM und 1 mM nicht signifikant von der Negativkontrolle.

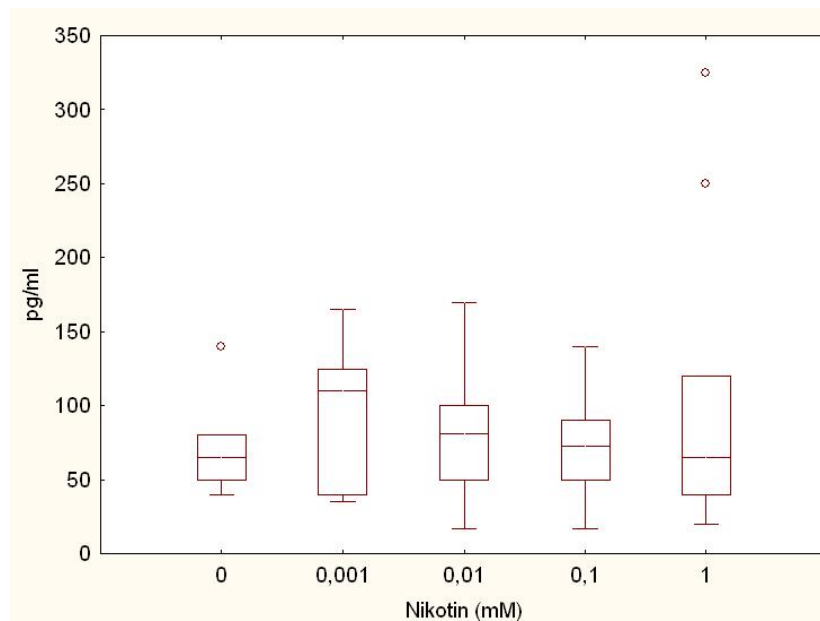


Abbildung 21: Apoptotische Effekte an primären adhärenente Zellen der Glandula parotidea nach einstündiger Inkubation mit Nikotin, nachgewiesen im ELISA-Test. Untere/Obere Boxbegrenzung = 25./75. Perzentile, waagrechter Strich = Median, T-Linien = Min./Max.-Wert, ° = Ausreißer.

### 3.4 Histologische Untersuchungen

Die Kultivierung dreidimensionaler Organkulturen von Speicheldrüsengewebe wurde in dieser Arbeit erstmals durchgeführt. Dazu waren im Vorfeld intensive Vorbereitungen zur Findung eines geeigneten Kultivierungsmediums notwendig. Die Anforderung bestand darin, dass die Miniorgankulturen für die verschiedenen Analysen zur Genotoxizität von Nikotin über einen längeren Zeitraum vital und funktional sein mussten.

Die Vitalität während der Kultivierung der Miniorgankulturen der Ohrspeicheldrüse wurde mit Hilfe von histologischen Schnitten überprüft. Dabei wurden die einzelnen Zellkerne mit Hämatoxylin und das Zytoplasma mit Eosin angefärbt.

Es zeigte sich ein typisches histologisches Bild (s. Abbildung 22) einer serösen Speicheldrüse mit Ausführungsgängen (→ 1), Drüsenzazini (→ 2) und zwischengelagerten Adipozyten (→ 3). Es gab über den ganzen Kultivierungszeitraum keine Anzeichen von Apoptose oder Nekrose.

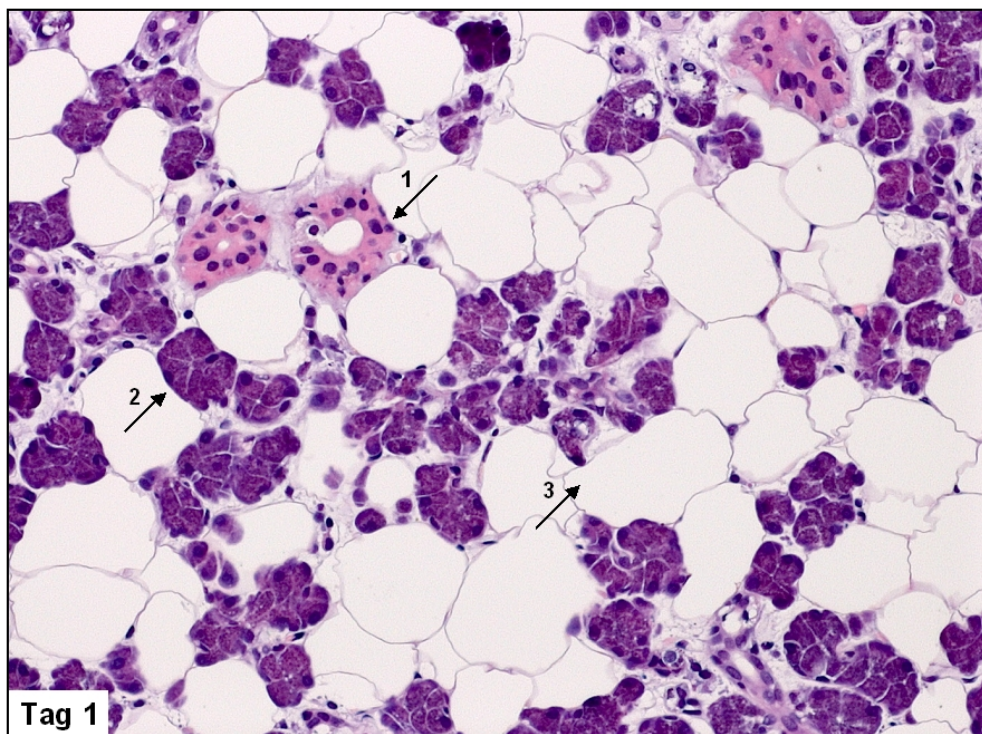


Abbildung 22: Histologischer Schnitt eines Miniorgans der Glandula parotidea am ersten Tag der Kultivierung mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Dargestellt sind Ausführungsgänge (→ 1), Drüsenzazini (→ 2) und zwischengelagerte Adipozyten (→ 3).

Ab dem dritten Tag der Kultivierung der Miniorgankulturen zeigte sich im histologischen Schnitt granuläres Zytoplasma in den Drüsenzazini (s. →).

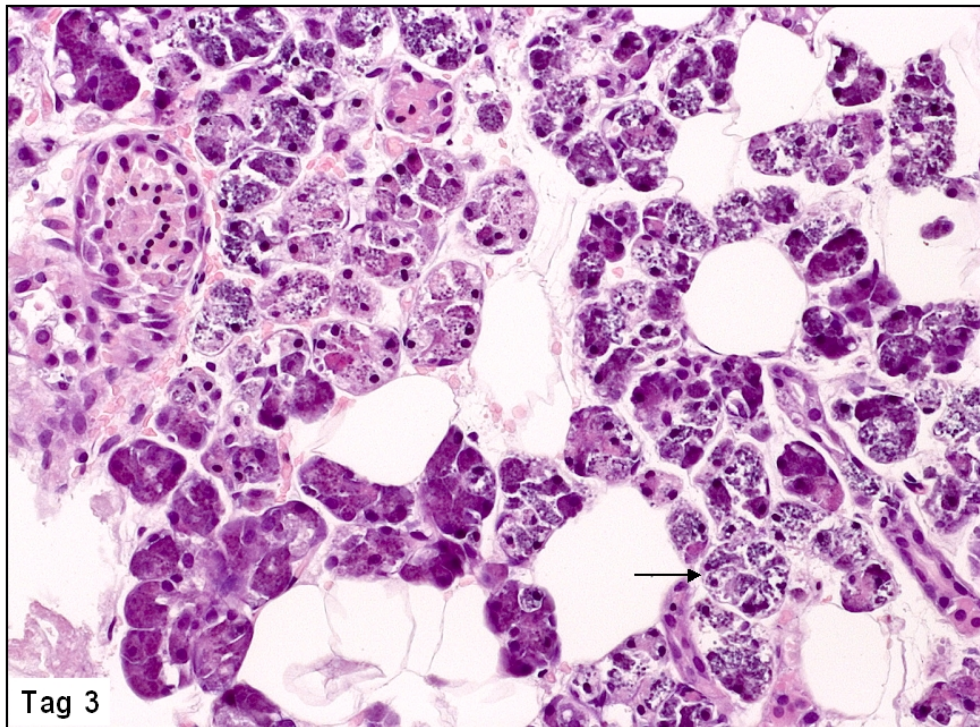


Abbildung 23: Histologischer Schnitt eines Miniorgans der Glandula parotidea am dritten Tag der Kultivierung mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Die Drüsenzazini wiesen ein granuläres Zytoplasma auf (→).

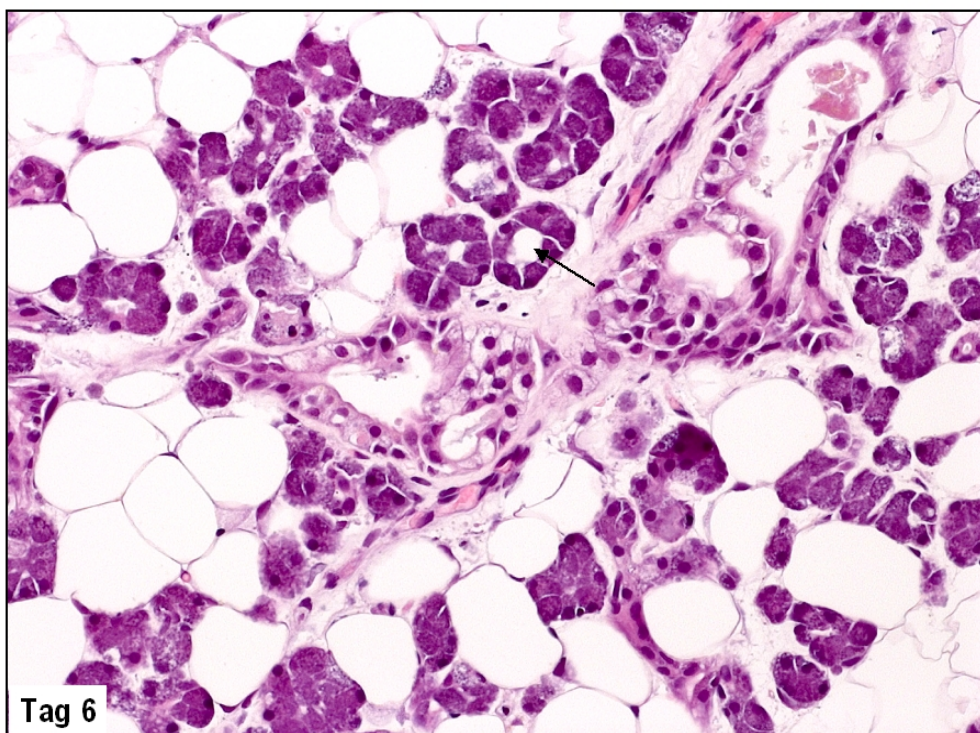


Abbildung 24: Histologischer Schnitt eines Miniorgans der Glandula parotidea am sechsten Tag der Kultivierung mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Es bilden sich Vakuolen in den Drüsenzazini (→).

Am achten Tag der Kultivierung wies das Gängepithel pyknotische Zellkerne und mehr eosinophiles Zytoplasma auf. Im Inneren des Miniorgans ließ sich eine leichte Degeneration (→) des Gewebes beobachten, während der äußere Bereich des Miniorgans noch gut erhalten war (s. Abbildung 25). Die Miniorgane aus dem Ohrspeicheldrüsengewebe blieben während der gesamten Kultivierung morphologisch intakt.

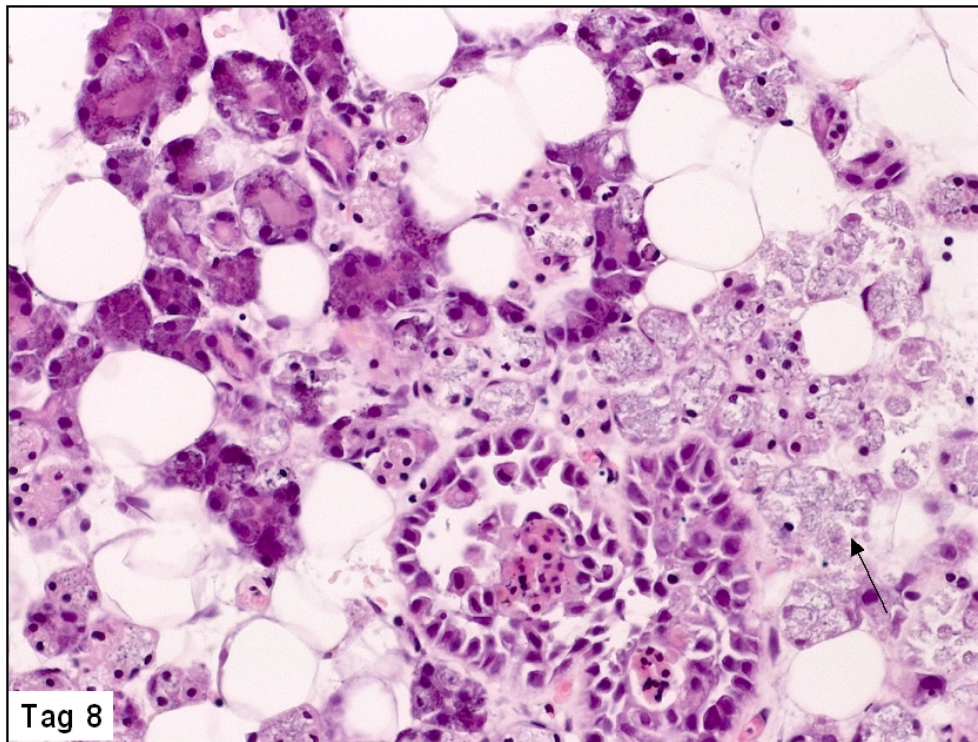


Abbildung 25: Histologischer Schnitt eines Miniorgans der Glandula parotidea am achten Tag der Kultivierung mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Degeneration des Gewebes (→).

Die histologischen Schnitte der Miniorgankulturen wurden zusätzlich zu Hämatoxylin noch mit  $\alpha$ -Amylase gegengefärbt, um die Funktionalität anhand des Vorhandenseins der Amylase zu überprüfen. Dabei zeigte sich, dass über den gesamten Kultivierungszeitraum die für Speicheldrüsen typische  $\alpha$ -Amylase vorhanden war (s. Abbildung 26).

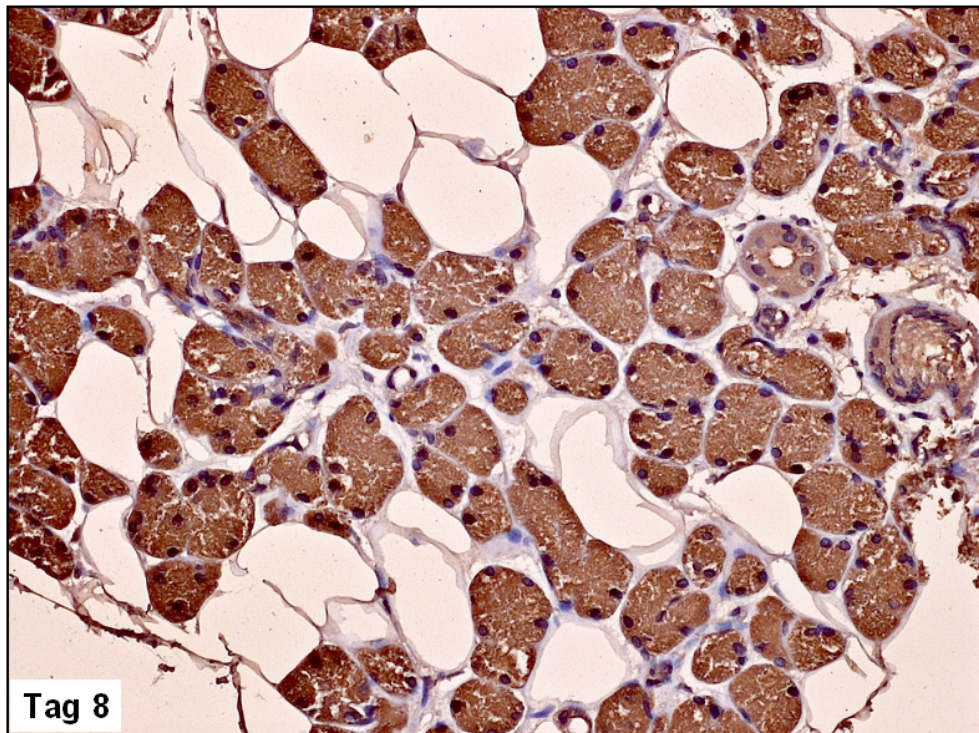


Abbildung 26: Histologischer Schnitt eines Miniorgans der Glandula parotidea am achten Tag der Kultivierung. Die im Zytoplasma produzierte Amylase wurde durch anti- $\alpha$ -Amylase immunhistochemisch angefärbt.

### 3.5 Untersuchungen zur Amylaseproduktion mittels Immunfluoreszenzfärbung

Zur Überprüfung des Amylasegehalts im Zytoplasma der Zellen wurden die Präparate mit  $\alpha$ -Amylase und mittels eines Fluoreszenzmikroskops untersucht. Als Negativkontrolle wurden Zellen der humanen bronchialen Epithelzelllinie (Beas 2b) und als Positivkontrolle Frischzellen der Glandula parotidea verwendet.

Die Färbungen der humanen bronchialen Epithelzelllinie mit DAPI (Bild A) und  $\alpha$ -Amylase (Bild B) wurden am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Danach wurden die beiden Fluoreszenzaufnahmen überlagert (Bild C). Dabei wurde bei den Zellen keine Amylase im Zytoplasma in der immunhistochemischen Färbung nachgewiesen, da es sich bei diesen um eine humane bronchiale Epithelzelllinie handelt, die als Referenzgewebe für Untersuchungen an normaler humaner Bronchialschleimhaut dient.

Die isolierten Frischzellen aus dem Ohrspeicheldrüsengewebe dienten in diesem Versuchsaufbau als Positivkontrolle, da hier davon ausgegangen wurde, dass sie auf jeden Fall noch Amylase produzieren. Die Zellen wurden ebenfalls mit DAPI (Bild D) und  $\alpha$ -

Amylase (Bild E) gefärbt, am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und die einzelnen Fluoreszenzaufnahmen überlagert (Bild F). Dabei zeigte sich eine deutliche Amylaseproduktion im Zytoplasma der Frischzellen der Glandula parotidea.

Bei den zu überprüfenden primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea wurde bei den immunhistochemischen Analysen der typische Amylasegehalt der Speicheldrüsenzellen im Zytoplasma nachgewiesen.

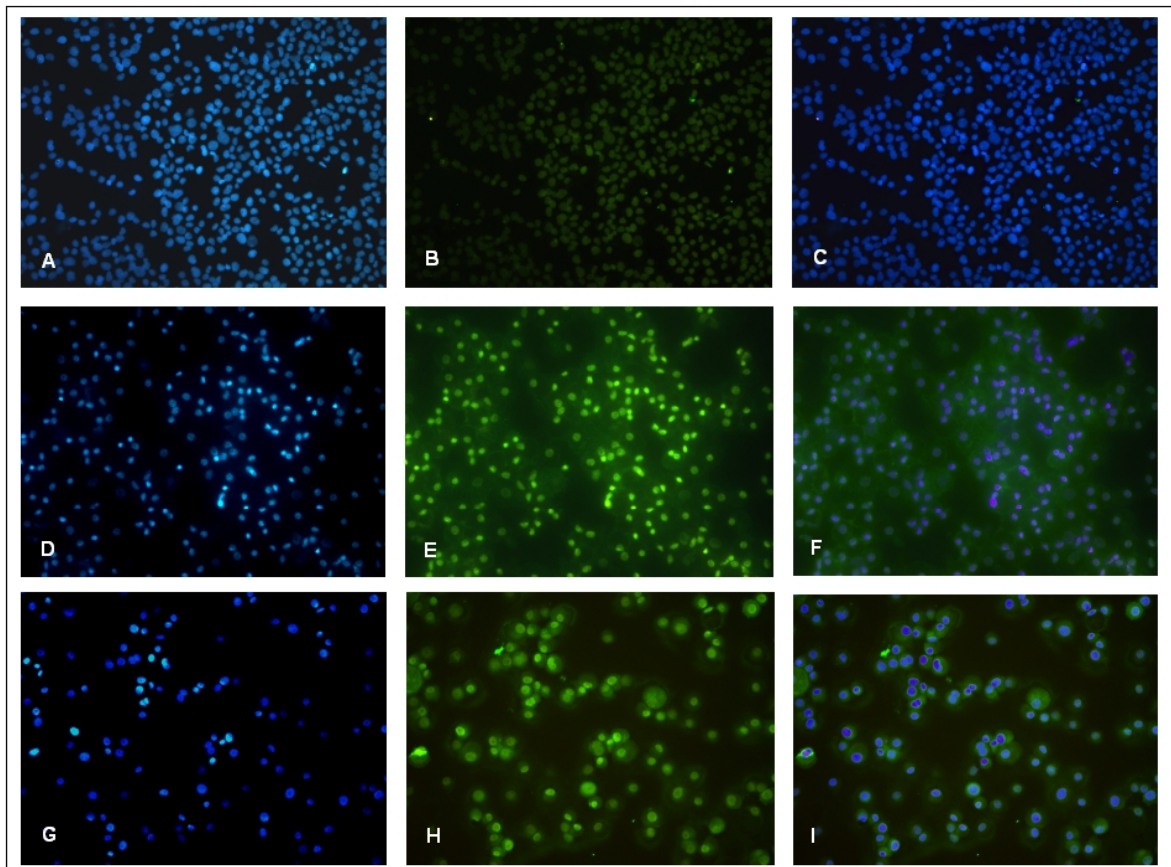


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung der humanen bronchialen Epithelzelllinie (A-C), isolierte Frischzellen(D-F) und primäre adhärennte Zellen der Glandula parotidea (G-I). Bild A, D und G zeigen die Anfärbung der Zellkerne mit DAPI. Die Färbung gegen  $\alpha$ -Amylase ist in Bild B, E und H dargestellt. Diese jeweiligen Fluoreszenzaufnahmen wurden in Bild C, F und I überlagert. Dabei kann man in Bild F und I typische  $\alpha$ -Amylase erkennen.

### 3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Sowohl bei den frisch isolierten Zellen wie auch bei den primären adhären Zellen der Glandula parotidea konnte im Comet Assay ein dosisabhängiger signifikanter DNA-Schaden nachgewiesen werden. Dieser wurde durch die Analysen mit dem Mikrokerntest und dem Chromosomenaberrationstest bei den primären adhären Zellen bestätigt. Die Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden, hervorgerufen durch Nikotin bei Miniorgankulturen der Glandula parotidea, konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich bei der Positivkontrolle MMS eine Reparaturfähigkeit der Miniorgankulturen. Die histologische Analyse der Miniorgankulturen der Glandula parotidea zeigte einen deutlichen  $\alpha$ -Amylase-Gehalt und keine abfallende Vitalität während des Kultivierungszeitraumes.

Nikotin konnte die Apoptoserate bei primären adhären Zellen nicht steigern. Bei der Immunfluoreszenz der primären adhären Zellen konnte mit Hilfe der  $\alpha$ -Amylase nachgewiesen werden, dass es sich bei den generierten Zellen um Speicheldrüsenzellen handelt.



## 4 DISKUSSION

Obwohl die kanzerogenen Eigenschaften des Tabakkonsums lange bekannt sind und einige dafür verantwortliche Substanzen im Zigarettenrauch identifiziert werden konnten, ist die Rolle des Nikotins bei der Malignomentstehung nach wie vor nicht genau geklärt. Aufgrund der gesundheitlichen Risiken des Tabakrauchens, der dadurch entstehenden Kosten und des ansteigenden Konsums von Zigaretten, aber auch auf Grund der zunehmenden Verwendung von Nikotinkaugummis und Pflastern zur Rauchentwöhnung ist das genaue Verständnis der genotoxischen Effekte von Nikotin und deren Mechanismen wünschenswert.

### 4.1 Genotoxikologische Testverfahren *in vitro*

#### 4.1.1 Comet Assay

Im Vergleich zu anderen Genotoxizitätstests bietet der Comet Assay neben hoher Sensitivität und schneller Durchführbarkeit verschiedene Vorteile. So kann der Test theoretisch mit allen eukaryotischen Zellen (Tice et al., 1991) durchgeführt werden und dies mit einer geringen Anzahl benötigter Zellen. Zusätzlich besteht nur ein geringer Verbrauch an Testsubstanzen. Bei der alkalischen Version der Mikrogelelektrophorese können neben Doppelstrangbrüchen weitere DNA-Schäden erfasst werden. Dazu zählen Einzelstrangbrüche durch Radikale, interkalierende Substanzen oder alkalilabile DNA-Addukte (Tice et al., 2000). Vor allem aber werden DNA-Strangbrüche erfasst, die als Resultat einer metabolischen Beteiligung der Zellen auftreten, beispielsweise der Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur oder der enzymatischen Aktivität von Endonukleasen, Topoisomerasen und DNA-Hydrolasen (Slamenova et al., 1997). Es ist ein etabliertes Verfahren zur Detektion von Einzelstrangbrüchen der DNA, alkalilabilen Stellen, DNA-Crosslinks sowie zur Messung von DNA-Reparatur. Diese Methode wird auch im klinischen Biomonitoring eingesetzt (Kassie et al., 2000; Moller et al., 2000; Faust et al., 2004). Allerdings müssen bei der Interpretation der gewonnenen Ergebnisse verschiedene Dinge bedacht werden: Die Qualität der mit dem Comet Assay erhaltenen Daten hängt ganz entscheidend von der Qualität der Testdurchführungen ab. Zum Beispiel sind die gemessenen Werte, wie Olive Tail Moment (OTM), DNA in Tail (DT) und Tail Length (TL), von den Einstellungen am Mikroskop und der Auswertungssoftware abhängig. Man kann die Werte der einzelnen Labore also nicht unbedingt miteinander vergleichen. Als Maßnahmen zur Qualitätssiche-

rung sollten die Präparate durch mehrere Personen ausgewertet werden. Ebenso wird das Mitführen einer Referenzprobe empfohlen (Albertini et al., 2000).

Die nachgewiesenen DNA-Schäden müssen zudem gar nicht zwangsläufig zu schädlichen Auswirkungen im menschlichen Organismus führen, da Teile der Schäden durch zelluläre Enzyme wieder repariert oder die Zellen durch Apoptose aus dem Organismus entfernt werden können.

#### **4.1.2 Mikrokerntest**

Das Verfahren des Mikrokerntests dient als zytogenetischer Test zur Erkennung von DNA-Schäden auf chromosomaler Ebene in sich teilender Zellen. Mit ihm können Zellen identifiziert werden, die aufgrund von Chromosomenbrüchen und -verlusten nicht mehr in der Lage sind, das Erbmateriale zu gleichen Teilen auf die beiden Tochterkerne zu verteilen (Fenech, 1993; Fenech, 2000; Fenech, 2005).

Der Mikrokerntest ermöglicht weitere Aussagen zur Genotoxizität eines Stoffes, da die gewonnenen Daten nicht durch veränderte Zellteilungsabläufe oder suboptimale Zellkulturbedingungen gestört werden. Simple morphologische Kriterien zur Analyse von Gen- und Zytotoxizität können dabei untersucht werden, wie zum Beispiel Chromosomenbrüche, Chromosomenverluste, Chromosomenneuanordnungen, Zellteilungsinhibition, Nekrosen und Apoptosen (Fenech, 2000). Ein Mikrokernel besteht aus Chromatin und ist wesentlich kleiner als der Hauptzellkern. Die Häufigkeit der Mikrokerne wird als quantitatives Maß für den schädigenden Einfluss von Substanzen auf die Zelle gesehen.

Ein Problem des Mikrokerntests stellt die Zeitphase zwischen Inkubation und Fixierung der Schädigung dar, die von 12 bis 48 Stunden bei den in dieser Arbeit verwendeten humanen Zellen betragen kann. Da zuerst die Zellteilung stattfinden muss, bevor die Schädigung in Erscheinung treten kann, ist eine in der Latenzzeit möglicherweise bereits erfolgte DNA-Reparatur zu berücksichtigen. Durch die Entwicklung der Zytokinese-Block-Mikrokernel- (CBMN) Technik, welche Cytochalasin B verwendet, konnten die Zellen nach erfolgter Kernteilung an der Zytokinese gehindert werden (Fenech und Morley, 1986). Es entsteht ein Zellbild von ein-, doppel- und mehrkernigen Zellen. In seiner gegenwärtigen Form kann der Mikrokerntest (CBMN) Genotoxizität und Zytotoxizität erfassen.

### 4.1.3 Chromosomenaberrationstest

Der *in vitro* Chromosomenaberrationstest ist ein zytogenetischer Nachweis von Mutagenität und DNA-Schäden in Säugertierzellen. Chromosomenaberrationen sind mikroskopische Veränderungen in der Chromosomenstruktur, die einen Bruch oder einen Austausch von chromosomalem Material beinhalten. Die meisten Chromosomenaberrationen, die in Zellen beobachtet werden, sind letal. Aber es gibt auch einige Abberationen, die zu genetischen Effekten führen können, entweder somatische oder Keimbahnmutationen. Chromosomenaberrationen können in der ersten Zellteilung detektiert werden (Swierenga et al., 1991). Bei dem Chromosomenaberrationstest können etablierte Zelllinien oder humane Lymphozyten zum Einsatz kommen. Zelllinien, wie beispielsweise chinesische Hamsterovarien- (CHO) oder Lungenzellen (V79), werden auf Grund ihrer Stabilität, kurzen Generationszeit, guten Charakterisierung, kleinen Anzahl der Chromosomen und des stabilen Karyotyp gerne für den Chromosomenaberrationstest verwendet (Bradley et al., 1981; Hsie et al., 1981; Preston et al., 1981). Allerdings lassen sich die Ergebnisse mit diesen Zelllinien nicht direkt auf den Menschen übertragen, da es sich um transformierte Zellen handelt (Preston et al., 1987). Humane Lymphozyten dagegen besitzen eine kurze Generationszeit, einen stabilen Karyotyp, eine einheitliche Zellzykluszeit und die Relevanz für den Menschen (Preston et al., 1981; Preston et al., 1987).

In dieser Arbeit wurden erstmals nach intensiven Vorbereitungen humane Ohrspeicheldrüsenzellen für den Chromosomenaberrationstest verwendet. Dabei ist es besonders wichtig, die Proliferationsrate der Zellen zu kennen, um während der Mitose das Spindelgift Colcemid zu den Zellen zu geben, um dann die Metaphasechromosomen zu erhalten und auszuwerten. Nach einer langen Exposition der Zellen mit einem Xenobiotikum ist es wichtig, eine Regenerationsphase durchzuführen, damit die Mitose wieder fortgesetzt wird (Galloway, 1994).

Die Häufigkeit der Aberrationen wird als quantitatives Maß für den schädigenden Einfluss von Substanzen auf die DNA gesehen. Viele chemische Verbindungen, bei denen der Test positiv ausfällt, haben eine kanzerogene Wirkung auf Säugetiere, doch besteht keine absolute Korrelation zwischen dem Test und der Kanzerogenität.

## 4.2 Humane Zellsysteme in einer genotoxikologischen Testbatterie

In dieser Arbeit wurden Untersuchungen zur Genotoxizität von Nikotin mit isolierten Einzelzellen und Miniorgankulturen, sowie einer eigens etablierten humanen Zelllinie aus Speicheldrüsengewebe durchgeführt. Dabei kam vor allem der Comet Assay zur Anwendung, da dieser mit fast allen eukaryotischen Zellen durchgeführt werden kann. Um genauere Aussagen zur Genotoxizität machen zu können, reicht ein Testsystem nicht aus. Allerdings kann mit den Frischzellen und den Miniorgankulturen kein anderer Test durchgeführt werden, da diese nicht proliferieren. Durch die Etablierung einer primären adhärenenten Ohrspeicheldrüsenzelllinie konnten mit dem Mikrokerntest, dem Chromosomenaberrationstest und dem Sandwich-ELISA-Test weitere Analysen durchgeführt werden.

### 4.2.1 Isolierte Einzelzellen

Die Verwendung von humanem Frischgewebe bietet im Gegensatz zu Zelllinien den Vorteil genetisch und morphologisch weitgehend unveränderter Zellen. Bei den frisch isolierten Zellen 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 geringen genotoxischen Effekten der untersuchten Substanzen einen relevanten Störfaktor darstellen könnten.

Des Weiteren kann das beschriebene enzymatische Herauslösen der Einzelzellen aus ihrem physiologischen, dreidimensionalen Gewebeverband zu einer erhöhten Sensitivität der Zellen gegenüber schädigenden Substanzen führen (Kleinsasser et al., 2004). 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).

Bei Zelllinien handelt es sich entweder um transformierte Zellen oder um Zellen aus Tumoren, die sich durch eine relativ lange Lebensdauer und eine hohe Proliferationsaktivität auszeichnen. Zudem besitzen diese nicht mehr die Gewebestruktur, Zellzusammensetzung und -differenzierung wie ihr Ursprungsorgan (Merkle et al., 1998).

### 4.2.2 Miniorgankulturen

Der Einsatz von Miniorgankulturen erlaubt im Vergleich zu isolierten Einzelzellen und primären Zellkulturen den Erhalt von ursprünglicher Gewebearchitektur, Fremdstoffmetabolismus und der interzellulären Kommunikation (Bates et al., 2000). Ebenfalls bleibt eine Differenzierung in verschiedene Zelltypen über einen längeren Zeitraum erhalten (Bals et al., 1998). Steinsvag et al. berichteten über Miniorgankulturen von humanem adenoidem Gewebe (Steinsvag et al., 1991). Eine modifizierte Methode zur Kultivierung dreidimensionaler Organkulturen nasaler Mukosa wurde von Kleinsasser et al. entwickelt (Kleinsasser et al., 2001). In den letzten Jahren sind Miniorgankulturen zur Untersuchung zahlreicher Organe, wie zum Beispiel des Lungen- und Nervengewebes und der Darm- und Wangenschleimhaut (Hoet et al., 1997; Colon et al., 2001; Stacey und Viviani, 2001), und zur *in vitro* Analyse von verschiedenen Xenobiotika (Ginzkey und Friehs et al., 2010; Kleinsasser et al., 2004) verwendet worden.

Für Thymus-Kulturen wurde von einer anderen Methode für die *in vitro* Betrachtung von Zellinteraktionen in einer physiologischen Mikroumwelt berichtet. Dazu wurden aus Thymusstromazellen und lymphatischen Zellen dreidimensionale Lappen gebildet (Anderson und Jenkinson, 2007). Diese Anordnung zeigt den Haupthistokompatibilitätskomplex, der Eigenschaften besitzt, welche in anderen *in vitro* Systemen, wie zum Beispiel bei Einzelzellen, nicht gesehen werden konnte.

Für *in vitro* Analysen der Leber als parenchymales Organ wurden Leberkulturen beschrieben (Smith et al., 1987). Diese Organkultur wurde zur Untersuchung für eine antivirale Therapie gegen chronische Hepatitis verwendet, da hier die Möglichkeit für eine physiologische Mikroumwelt von Hepatozyten besteht (Chang et al., 2009).

Die Bestrahlung von Krebs im Kopfbereich resultiert meist in Atrophie, Fibrose und Degeneration des Speicheldrüsengewebes (Joraku et al., 2005). Deswegen wurde in mehreren Arbeitsgruppen mit Hilfe von Tissue Engineering versucht, menschliches Speicheldrüsengewebe auf Biomaterial zu generieren. Cheng et al. generierten dreidimensionale Spheroide aus Rattenspeicheldrüsenzellen (Chen et al., 2009); Sun et al. berichteten von intakten polarisierten Minischweineohrspeicheldrüsenzellen, welche interzelluläre Verbindungen besitzen, wie zum Beispiel Desmosome, Gap oder tight junctions (Sun et al., 2006); Joraku et al. gelang die Kultivierung von menschlichen Speicheldrüsenzellen in einem dreidimensionalen Kultursystem aus Kollagen und Matrigel (Joraku et al., 2007).

### 4.2.3 Etablierung primärer adhärenter Zellen

Die Speicheldrüsen synthetisieren und speichern eine Vielzahl von Proteinen, inklusive der  $\alpha$ -Amylase. Sie sind spezialisierte Organe, die Speichel produzieren und sekretieren. Es ist schwierig, eine Speicheldrüsenzellkultur aufgrund der eingeschränkten Zellteilung, der abfallenden Vitalität über einen längeren Kultivierungszeitraum oder der Überwucherung durch Fibroblasten zu generieren (Hiraki et al., 2002). Einige Studien berichten, dass sie Speicheldrüsenzellkulturen in serumfreien Kollagengelen wachsen lassen, um das dreidimensionale Wachstum und die Morphogenese zu untersuchen (Furue et al., 1999).

In dieser Arbeit ist es nach intensiven Vorarbeiten gelungen, eine primäre adhärente Zelllinie zu etablieren. Sie bietet gegenüber den Frischzellen und den Miniorgankulturen den Vorteil der Proliferation über einen längeren Zeitraum. Wir konnten in dieser Arbeit keine abfallende Vitalität der Zellen beobachten und auch keine Überwucherung durch Fibroblasten, wie es in der Literatur beschrieben ist. Ebenfalls besteht die Möglichkeit, die Zellen einzufrieren und zu einem späteren Zeitpunkt wieder weiterzukultivieren, wodurch sie für verschiedene Testsysteme einzusetzen sind.

## 4.3 Genotoxisches Potential von Nikotin in Speicheldrüsenewebe

### 4.3.1 Isolierte Einzelzellen

Im Comet Assay konnte eine statistisch signifikante Erhöhung nikotininduzierter Schäden im einstündigen Inkubationsversuch mit isolierten Einzelzellen der Glandula parotidea nachgewiesen werden. Die OTM-Werte der Nikotinkonzentrationen 0,250 mM, 1 mM, 2 mM und 4 mM zeigten sich signifikant erhöht gegenüber der Negativkontrolle. Diese Ergebnisse der Einzelzellen der Glandula parotidea bestätigten ebenfalls den genotoxischen Effekt von Nikotin an frisch isolierten Tonsillenzellen und Lymphozyten im Comet Assay (Kleinsasser et al., 2005; Ginzkey et al., 2009). Genotoxische *in vitro* Effekte von Nikotin im Comet Assay wurden ebenfalls bei Miniorgankulturen der Nasenschleimhaut (Sassen et al., 2005), menschlichen Spermien (Arabi, 2004), menschlichen Mundschleimhautkrebszellen (Wu et al., 2005), Lymphozyten der Ratte (Sudheer et al., 2007a; Sudheer et al., 2007b) und Hamsterbackentaschenzellen (Barley et al., 2004) berichtet.

Maximale Nikotinkonzentrationen, die im Speichel von starken Rauchern gefunden wurden, 4000 ng/ml (=0,025 mM) (Teneggi et al., 2002), sind nur zehnfach niedriger als die niedrigste Nikotinkonzentration, die zu einer signifikanten DNA-Schädigung *in vitro* nach

einer Stunde Inkubation bei frisch isolierten Einzelzellen der Glandula parotidea geführt haben. Speicheldrüsenzellen sind wahrscheinlich über einen langen Zeitraum hohen Nikotinkonzentrationen ausgesetzt. Ebenso könnten Mundschleimhautzellen, die kleine Speicheldrüsen in der Schleimhaut der Lippen und des Gaumens benachbart sind, lokal durch passive pH-abhängige Diffusion über die Schleimhaut der Mundhöhle Nikotinkonzentrationen ausgesetzt sein (Adrian et al., 2006). Basischer Speichel, welcher bei Menschen, die Betelnüsse in Verbindung mit Kautabak kauen, entsteht, erhöht die Aufnahme von Nikotin und das bewirkt wahrscheinlich auch die hohe Inzidenz von Mundhöhlenkrebs in Asien (Warnakulasuriya und Ralhan, 2007). Dies steht im Gegensatz zu dem geringeren Risiko in zahlreichen epidemiologischen Studien aus den USA und aus Schweden, die keine Korrelation bei dem Genuss von Kautabak und Mundhöhlenkrebs sehen (Henley et al., 2005; Rosenquist et al., 2005).

In einer epidemiologischen Studie aus Finnland wurde ein deutlicher altersbedingter Anstieg von Krebs in Speicheldrüsen bekannt (Tarvainen et al., 2004). In großen und kleinen Speicheldrüsen können sowohl gutartige wie auch bösartige Tumore entstehen. Speicheldrüsenkrebs ist eine seltene Krankheit mit unbekanntem Ursprung. Laut Muscat und Wynder, 1998, erhöhen weder Zigarettenrauch noch Kau- und Schnupftabak das Risiko von Speicheldrüsenkrebs. Im Gegensatz dazu berichten Horn-Ross et al. von einem ansteigenden Risiko bei rauchenden Männern (Horn-Ross et al., 1997). Rauchen stellt einen Risikofaktor bei der Krankheitsursache des Warthins Tumors, eines gutartigen Ohrspeicheldrüsentumors, dar (Pinkston und Cole, 1996; Klusmann et al., 2006). Die Auswirkung genotoxischer Effekte von Nikotin in Speicheldrüsenengewebe ist in der Literatur umstritten.

### 4.3.2 Primäre adhärenente Zellen

Für einige Analysen zur Genotoxizität von Nikotin war es essentiell, eine Zellkultur zu generieren, die proliferiert und über einen längeren Zeitraum zu kultivieren ist. Um zu überprüfen, ob es sich bei den gewonnenen Zellen um Speicheldrüsenzellen und nicht um andere Zellen oder Fibroblasten handelt, wurden immunhistochemische Analysen durchgeführt. Dabei wurden die Zellen auf die Produktion von  $\alpha$ -Amylase hin untersucht. Als Negativkontrolle dienten die humane bronchiale Zelllinie Beas 2b und als Positivkontrolle frisch isolierte Zellen der Glandula parotidea. Bei ersterer wurde wie erwartet keine Amylase im Zytoplasma festgestellt, bei den frisch isolierten Zellen der Glandula parotidea jedoch schon. Die primären adhärenente Speicheldrüsenzellen wiesen in ihrem Zytoplasma auch deutlich  $\alpha$ -Amylase auf. Aufgrund dieser Tatsache kann davon ausgegangen

werden, dass es sich bei den gewonnenen Zellen, die von den Miniorgankulturen der Glandula parotidea auswachsen, um Speicheldrüsenzellen handelt. Diese sind auch noch nach mehreren Wochen der Kultivierung in der Lage,  $\alpha$ -Amylase zu produzieren.

Die Ergebnisse der Analysen der primären adhärennten Ohrspeicheldrüsenzellen zeigen einen statistisch signifikanten Anstieg der DNA-Schäden im Comet Assay. Die OTM-Werte der Nikotinkonzentrationen 0,1 mM und 1 mM waren gegenüber der Negativkontrolle signifikant erhöht.

Im Mikrokerntest bestätigten sich diese Ergebnisse. Hier zeigte sich ebenfalls mit steigender Nikotinkonzentration ein statistisch signifikanter Anstieg der Mikrokerne. Die Zahl der Mikrokerne der Nikotinkonzentrationen von 0,1 mM und 1 mM erhöhten sich im Vergleich zur Negativkontrolle signifikant. Argentin und Cicchetti konnten dagegen schon einen statistisch signifikanten Anstieg der Mikrokerne bei humanen Fibroblasten des Zahnfleisches ab einer Nikotinkonzentration von 1  $\mu$ M nachweisen (Argentin und Cicchetti, 2004).

Die Analysen mit dem Chromosomenaberrationstest zeigten einen statistisch signifikanten Anstieg der Aberrationen mit steigender Nikotinkonzentration. Ein genotoxisches Potential von Nikotin konnte ebenfalls bei der Induktion von Schwesterchromatidaustauschen und Chromosomenaberrationen in chinesischen Hamstero-varienzellen gezeigt werden (Trivedi et al., 1990). Wenngleich andere Autoren wie Doolittle et al. keinen genotoxischen Effekt des Tabakalkaloids und seiner Metaboliten, z. B. Cotinin, im Ames Test und im Schwesterchromatidaustauschtest in chinesischen Hamstero-varienzellen beobachteten (Doolittle et al., 1995), weisen die oben genannten Daten ein DNA-schädigendes Potential von Nikotin auf.

Es konnte somit für Nikotin ein genotoxisches Potential bei primären adhärennten Ohrspeicheldrüsenzellen im Comet Assay, Mikrokerntest und im Chromosomenaberrationstest nachgewiesen werden.

### 4.3.3 Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch Nikotin

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes. Dabei handelt es sich um einen biologischen Prozess, der wichtig für den Organismus ist (Zeidler et al., 2007). Der Prozess der Apoptose kann von außen angeregt oder von zellinternen Prozessen ausgelöst werden. Die Apoptose wird von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt und unterliegt einer strengen Kontrolle. Dadurch wird gewährleistet, dass die betreffende Zelle ohne Schädigung der anderen Zellen zugrunde geht. Die Apoptose ist ein wichtiger Verteidigungsmechanismus, der vor Krebs schützt und ihn eliminiert (Kerr et al., 1994). Sie spielt



eine wichtige Rolle in der Zerstörung genotoxisch geschädigter und veränderter Zellen. Deswegen stellt das Versagen apoptotischer Mechanismen einen entscheidenden Schritt in der Krebsentstehung dar. Aus diesem Grund sollte das Ausmaß der Apoptoseinduktion in dieser Arbeit erfasst werden.

Bei den Analysen zur Apoptoseinduktion durch Nikotin bei der primären Ohrspeicheldrüsenzelllinie konnte keine signifikante Apoptoseinduktion durch Nikotin nachgewiesen werden. Mehrere Autoren konnten allerdings in anderen Geweben, wie beispielsweise im embryonalen Rattenhirn (Roy et al., 1998), in undifferenzierten Rattenzellen (Berger et al., 1998), in Mausembryonen (Zhao und Reece, 2005) und in einer menschlichen embryonalen Fibroblastenzelllinie (Wu et al., 2002), einen pro-apoptotischen Effekt von Nikotin nachweisen.

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 Tumorpheriferation 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).

## 4.4 Miniorgankulturen als ein *in vivo* nahes Testsystem

### 4.4.1 Vitalität der Miniorgankulturen der Glandula parotidea

Durch den mehrwöchigen Kultivierungszeitraum bietet das Miniorganmodell die Möglichkeit der wiederholten Exposition mit Xenobiotika zur Erfassung von Reparaturvorgängen und kumulativen toxischen Effekten. Kleinsasser et al. konnten in früheren Studien nachweisen, dass Miniorgankulturen von Nasenschleimhaut über einen Kultivierungszeitraum von 3 Wochen intakt und vital blieben (Kleinsasser et al., 2001).

Mit Hilfe dieser Arbeit sollte nun auch überprüft werden, ob Gewebestücke der Glandula parotidea als Miniorgan verwendet werden können und über einen längeren Kultivierungszeitraum vital bleiben. Dazu wurden histologische Schnitte der Miniorgankulturen an verschiedenen Tagen des Kultivierungszeitraumes angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Dabei zeigten sich während der Kultivierungszeit azinäre Zellen in einem intakten Bindegewebe, und es gab über den ganzen Kultivierungszeitraum keine Anzei-

chen von Apoptosen oder Nekrosen. Die Morphologie der Miniorgankulturen blieb über den gesamten Kultivierungszeitraum intakt. Die Zellen in der Mitte der Miniorgane wiesen ab dem dritten Tag ein granuläres Zytoplasma auf, was sich bis zum achten Tag der Kultivierung nicht deutlich veränderte. Eine mögliche Erklärung könnte die Mangelversorgung im Inneren der Miniorgane mit Nährmedium sein. Dennoch zeigten intakte Kernstrukturen und Zellmembranen an diesen Zellen keine Anzeichen von Nekrose oder Apoptose. Das Gangepithel wies am achten Tag pyknotische Zellkerne und mehr eosinophiles Zytoplasma auf. Der äußere Bereich des Miniorgans war hingegen noch gut erhalten, wobei sich im Inneren schon eine leichte Degeneration des Gewebes beobachten lässt. Das erklärt sich eventuell dadurch, dass das Gangepithelgewebe sensibler gegenüber der Mangelversorgung mit Nährmedium reagieren könnte als die azinären Zellen.

Die histologischen Schnitte der Miniorgankulturen wurden noch mit anti  $\alpha$ -Amylase gefärbt, um die Sekretion dieser während der Kultivierung zu analysieren. Dabei zeigte sich über den gesamten Kultivierungszeitraum eine starke Expression der  $\alpha$ -Amylase in den Miniorgankulturen. Allerdings könnte das derzeitige Amylaseprotein vor der Operation *in vivo* gebildet worden sein und würde somit nichts über die Sekretionsfunktion bei den Zellen der Miniorgankulturen besagen. Um eine mögliche Sekretionsfunktion der Glandula parotidea Miniorgankulturen *in vitro* zu analysieren, müssten ELISA Messungen der  $\alpha$ -Amylase im Nährmedium gemacht werden. Dies wäre dann ein weiterer Marker für die Vitalität der Miniorgankulturen.

#### **4.4.2 Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden bei Miniorgankulturen der Glandula parotidea**

Bei den Untersuchungen zur Genotoxizität von Nikotin in dieser Arbeit wurden dreidimensionale Miniorgankulturen der Ohrspeicheldrüse angelegt, um eine maximale Perfusion des Mediums und des Xenobiotikums zu gewährleisten. Mit Hilfe der Miniorgankulturen sollten eine repetitive Exposition von Nikotin und die Reparaturfähigkeit der Miniorgankulturen untersucht werden. Dabei konnte im Comet Assay nach einer Stunde Exposition mit 2 mM Nikotin verglichen mit der Negativkontrolle eine Verdopplung der DNA-Schädigung, die nach der Bonferroni Korrektur signifikant war, nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis der Verdopplung der DNA Migration bei einer Nikotinkonzentration von 2 mM im Comet Assay konnte schon für frisch isolierte Einzelzellen der Glandula parotidea gezeigt werden (Ginzkey et al., 2009).

Ein statistisch signifikanter Anstieg der DNA-Schäden im Comet Assay nach repetitiver Exposition mit 2 mM Nikotin konnte nicht gezeigt werden. Dieses Ergebnis wurde eben-

falls in einem ähnlichen Versuchsaufbau mit Miniorgankulturen der Nasenschleimhaut gezeigt. Hierbei wurde ein nikotininduzierter DNA-Schaden nach einer einzigen Exposition hervorgerufen, allerdings wurde kein Anstieg nach weiteren Expositionen gemessen (Sassen et al., 2005). Für die stark alkylierende Substanz Methylmethansulfonat konnte ein statistisch signifikanter Anstieg der DNA-Schäden nach repetitiver Exposition nachgewiesen werden.

Viele der DNA-Schäden, die mit dem Comet Assay gemessen werden, sind reversibel. Verschiedene Mechanismen der DNA-Reparatur sind schon bekannt, zum Beispiel die homologe Rekombination, Nukleotid- oder Basenexzisionsreparatur und die Mismatchreparatur (Bernstein et al., 2002). Deswegen sollte in dieser Arbeit auch die Reparaturfähigkeit der Miniorgankulturen überprüft werden. Dazu wurden sie nach dreimaliger ein-stündiger Exposition mit 2 mM Nikotin für weitere 24 h nur mit Nährmedium kultiviert. Dabei zeigte sich keine statistisch signifikante Abnahme der DNA-Schäden bei 2 mM Nikotin im Comet Assay. Allerdings konnte eine signifikante Abnahme der DNA-Schäden bei MMS beobachtet werden. Die Reparaturfähigkeit von DNA-Schäden durch N-methyl-N'-nitro-N-Nitroguanidin (MNNG) wurde in einer anderen Untersuchung bei Miniorgankulturen von Nasenschleimhautzellen gezeigt (Sassen et al., 2005).

Ein bestehender DNA-Schaden nach einer Regenerationszeit von 24 h zeigt wahrscheinlich einen manifesten DNA-Schaden an. Andererseits 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.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Tumore entstehen in einem mehrstufigen Prozess, der die Tumorinitiation, Promotion und Progression beinhaltet. Dabei spielen exogene Faktoren, wie Fremdstoffe, Umwelteinflüsse, Lebensgewohnheiten, Ernährungsverhalten oder Tabakkonsum eine wichtige Rolle. Für viele Fremdstoffe aus unserer Umwelt, die als Aerosole eingeatmet werden, stellen die Zellen des oberen und unteren Aerodigestivtrakts das primäre Kontaktorgan dar. Der Aerodigestivtrakt ist somit eine der wichtigsten Lokalisationen für Tabak assoziierten Karzinome. Dabei ist Nikotin nicht nur suchterzeugend, sondern spielt eine direkte Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren. Um einen Beitrag zur Tumorprävention zu leisten, sollten *in vitro* Testsysteme etabliert werden, welche die Charakterisierung von Nikotin in seiner tumorinitiierenden und promovierenden Potenz ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden genotoxische Effekte von Nikotin an frisch isolierten Zellen, primären adhären Zellen und Miniorgankulturen der Glandula parotidea untersucht. Die Vitalität und Morphologie der Miniorgankulturen wurden mit histologischen Schnitten überprüft. Zur Charakterisierung der primären adhären Zellen wurden immunhistochemische Färbungen mit anti- $\alpha$ -Amylase durchgeführt. Die Erfassung nikotininduzierter DNA-Schäden erfolgte mit Hilfe des Comet Assays, des Mikrokerntests und des Chromosomenaberrationstests. Zur Untersuchung der Apoptoseinduktion durch Nikotin kam der Sandwich-ELISA-Test zum Einsatz. Methylmethansulfonat wurde dabei als Positivkontrolle verwendet.

Während des ganzen Kultivierungszeitraums der Miniorgankulturen der Glandula parotidea konnten keine Anzeichen von Apoptosen oder Nekrosen festgestellt werden. Die Morphologie der Miniorgankulturen blieb während der Kultivierung intakt. Bei der Färbung der histologischen Schnitte gegen  $\alpha$ -Amylase zeigte sich während der Kultivierung der Miniorgankulturen die typische  $\alpha$ -Amylase im Zytoplasma der Zellen. Die immunhistochemische Färbung der primären adhären Zelllinie der Glandula parotidea zeigte die typische  $\alpha$ -Amylase im Zytoplasma der Zellen. Im Comet Assay zeigte sich bei den frisch isolierten und den primären adhären Zellen der Glandula parotidea eine dosisabhängige DNA-Schädigung im einständigen Inkubationsversuch durch Nikotin. Diese Schädigung war ab einer Konzentration von 0,25 mM Nikotin bei den frisch isolierten und ab 0,1 mM Nikotin bei den primären adhären Zellen signifikant. Im Mikrokerntest und im Chromosomenaberrationstest zeigten sich ein dosisabhängiger Anstieg der Mikrokerne, der sich ab 0,1 mM Nikotin als signifikant erwies, bzw. ein signifikanter Anstieg der Chromosomenaberrationen ab 0,001 mM Nikotin. Eine abfallende Apoptoserate war bei stei-

gender Nikotinkonzentration im Sandwich-ELISA-Test zu beobachten. Ein signifikanter DNA-Schaden konnte nach ein- und dreistündiger Exposition mit Nikotin bei den Miniorgankulturen der Glandula parotidea nachgewiesen werden. Es zeigte sich weder ein signifikanter DNA-Schaden über die dreimalige Exposition mit Nikotin bei den Miniorgankulturen, noch konnte eine Reparatur der nikotininduzierten DNA-Schäden nachgewiesen werden. Bei der repetitiven Exposition mit der Positivkontrolle Methylmethansulfonat bei den Miniorgankulturen zeigte sich ein signifikanter Anstieg der OTM-Werte. Diese erhöhte Migration konnte nach einer 24-stündigen Regenerationsphase nicht nachgewiesen werden.

Das Modell der Miniorgankulturen der Glandula parotidea erweist sich für genotoxikologische Untersuchungen als gut geeignet. Durch die Möglichkeit der mehrfachen Exposition mit anschließenden Regenerationsphasen ist eine Annäherung an reale Lebensbedingungen möglich. Ebenfalls konnten mit der Etablierung der primären adhären Zellen weitere Testsysteme, wie beispielsweise der Mikrokerntest, der Chromosomenaberrationstest und der Sandwich-ELISA-Test, zur Analyse der Genotoxizität von Nikotin angewendet werden. In der Zusammenschau dieser Testsysteme konnte ein Überblick der Genotoxizität von Nikotin gewonnen werden. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass Nikotin eine entscheidende Rolle bei der Initiation von tabakassoziierten Tumoren im Aerodigestivtrakt spielen kann. Zum Verständnis der intrazellulären Schädigungswege von Nikotin, insbesondere im Hinblick auf eine direkte DNA-Schädigung, sind weitere Untersuchungen notwendig. Dabei werden spezifische nikotinerge Acetylcholinrezeptor Agonisten wie Epibatidin oder Mecamylamin verwendet.

## 6 SUMMARY

Tumor development is a multilevel process including initiation, promotion, and progression. It may be influenced by a multitude of exogenous factors, such as contact with foreign materials, various environmental conditions, lifestyle, diet, and the consumption of alcohol and tobacco. Cells of the upper aerodigestive tract represent the primary contact region for inhaled aerosols or harmful particles from the environment and are thus highly susceptible to the development of tobacco-induced malignancies. In this context, nicotine, which is known to be an addictive component in tobacco smoke, seems to play a crucial role in the initiation and progression of tumors. As an initial step towards effective tumor prevention, appropriate *in vitro* test systems must be established to allow for a detailed characterization of the cyto- and genotoxic properties of nicotine.

In this study, we examined toxic effects of nicotine in freshly isolated cells in a primary developed salivary gland cell line as well as in mini organ cultures of human parotid gland tissue. Histological evaluations of mini organ cultures were performed to analyze the vitality and morphology of mini organ cultures during cultivation. Immunohistological staining using monoclonal antibodies against  $\alpha$ -amylase were performed in order to functionally characterize the cultivated cells. DNA damage was assessed by the alkaline single cell microgel electrophoresis (comet) assay, the micronucleus test and the chromosomal aberration test. The sandwich ELISA test was also performed in order to analyze the expression of caspase 3 as a marker for apoptosis. Methylmethanesulphonate, a well-known genotoxic agent, served as an appropriate positive control.

No apoptosis or necrosis was seen by histological examination of the mini organ cultures during the entire cell culture phase. In addition, immunohistological staining with anti- $\alpha$ -amylase showed the typical  $\alpha$ -amylase in the cytoplasm of the mini organ cultures throughout the cultivation period. Moreover,  $\alpha$ -amylase was detected immunohistologically in the primary parotid gland cell line. A dose-dependent increase in nicotine-induced DNA migration was demonstrated by the comet assay in freshly isolated parotid gland cells as well as in primary adherent cells of the parotid gland in a one-hour exposure experiment. A significant enhancement of DNA migration was observed at a nicotine concentration of 0.25 mM in freshly isolated cells, whereas significant effects were also seen at a concentration of 0.1 mM in primary adherent cells in comparison to the control. A dose-dependent increase in micronuclei was induced at a concentration of 0.1 mM and chromosomal aberrations were observed at 0.001 mM nicotine. Regarding the induction of apoptosis, a decrease in caspase 3 activity was shown for increasing nicotine concentrations.

Significant DNA migration could be seen after one- and three-hour exposures to nicotine. Neither significant DNA migration over time nor repair of the nicotine-induced DNA damage as expressed by a reduction of the DNA migration could be seen. In contrast, repetitive exposure to methylmethanesulphonate was shown to induce an enhanced DNA migration in mini organ cultures compared to a single exposure. This DNA migration was reduced after a 24-hour period of regeneration signalling DNA repair.

The model of using miniorgans of the glandula parotidea seems to be suitable for genotoxicological analyses. The option of administering repetitive exposure and allowing for subsequent phases of DNA repair and regeneration provides a realistic comparison to the real life condition. Furthermore, the establishment of primary adherent cell lines allows for additional analyses to be performed with a variety of different test systems such as the micronucleus test, chromosomal aberration test and the sandwich ELISA test in order to better characterize the genotoxic potential of nicotine. The combined results of these various tests provide a comprehensive overview as to the genotoxicity of nicotine. Our data indicate that nicotine appears to play an essential role in the induction of tobacco-associated malignancies of the upper aerodigestive tract. However, to more clearly understand the processes involved in the intracellular damaging pathways, particularly with respect to direct DNA damage, further investigations are necessary. Future studies should clearly include the analysis of specific nicotinic acetylcholine receptor agonists such as epibatidine and mecamylamine.

# 7 ANHANG

## 7.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>bzw.</b>	beziehungsweise
<b>BEG-Medium</b>	Bronchial Epithelial Growth Medium
<b>BSA</b>	Bovines Serum Albumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>d.h.</b>	das heißt
<b>DME-Medium</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DNA</b>	Desoxyribonucleinacid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum
<b>g</b>	Gramm
<b>h</b>	Stunde
<b>Konz.</b>	Konzentration
<b>l</b>	Liter
<b>Lsg.</b>	Lösung
<b>M</b>	molar(mol/l)
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	millimolar
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>MMC</b>	Mitomycin C
<b>MMS</b>	Methylmethansulfonat
<b>Nik</b>	Nikotin
<b>OTM</b>	Olive Tail Moment
<b>PBS</b>	Phosphat gepufferte Salzlösung
<b>rpm</b>	Runden pro Minute
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institution
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TRIS</b>	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
<b>U</b>	Unit (Enzymeinheit)
<b>u.a.</b>	unter anderem
<b>V</b>	Volt (Einheit der Spannung)
<b>vgl.</b>	Vergleiche



## 7.2 Tabellen

Tabelle 13: Datenübersicht der frisch isolierten Zellen der Glandula parotidea im Comet Assay

Patient	Kontrolle			Nikotin									Nikotin								
	0mM			0,125mM			0,25mM			0,5mM			1mM			2mM			4mM		
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	1,98	3,16	105	2,18	3,55	99,3	2,6	4,12	104	2,28	3,84	105	2,47	4,18	102	3,96	5,81	104	4,18	6,22	115
2	0,82	1,44	71,5	1,5	1,87	90,5	2,68	3,48	93,4	2,36	3,1	95,2	3,53	4,35	99,1	4,28	5,19	102	4,75	6,31	113
3	2,44	3,4	97,9	3,66	4	113	3,08	4,04	108	5,83	6,15	122	6,02	6,33	143	8,29	8,19	142	7,31	8,45	133
4	3,18	4,62	130	4,1	5,57	123	3,56	5,11	102	4,6	6,47	131	6,4	8,8	145	7,15	10,3	138	7,48	11	123
5	3,6	4,57	130	4,8	5,87	138	7,2	7,73	151	6,17	7,46	153	6,75	7,81	151	9,46	9,78	156	12,7	12,9	170
6	3,59	4,98	122	3,21	4,65	122	3,3	4,86	110	3,01	4,56	108	4,13	6,18	113	4,66	6,71	123	5,88	7,96	119
7	2,04	2,92	91,9	1,38	2,35	85,2	2,45	4,33	83,4	2,63	4,56	88,5	2,51	4,46	89	2,89	4,46	91,1	4,02	6,76	107
8	1,09	1,8	82,6	1,33	2,24	80,6	2,1	3,07	82,6	1,62	2,44	81,6	3,31	4,51	103	2,77	4,16	97	2,87	4,7	91,9
9	2,79	3,76	111	3,22	4,41	110	4,1	5,86	108	3,92	5,35	100	5,16	6,87	110	5,73	7,92	112	4,67	6,58	108
10	2,68	3,76	114	2,25	3,35	109	2,98	4,34	108	2,84	4,19	104	3,98	5,74	110	3,54	5,18	108	3,06	4,69	102
Mean	2,42	3,44	106	2,76	3,79	107	3,41	4,69	105	3,52	4,81	109	4,43	5,92	117	5,27	6,77	117	5,69	7,56	118
Median	2,56	3,58	108	2,73	3,77	109	3,03	4,33	106	2,92	4,56	105	4,06	5,96	110	4,47	6,26	110	4,71	6,67	114
SD	0,95	1,17	19,6	1,22	1,38	18,2	1,45	1,33	19	1,55	1,56	21,3	1,57	1,59	21,6	2,32	2,18	21,5	2,92	2,65	21,5

Tabelle 14: Datenübersicht der Miniorgankulturen der Glandula parotidea im Comet Assay

Patient	Kontrolle			Nikotin			Kontrolle			Nikotin			Kontrolle			Nikotin			Kontrolle			Nikotin		
	0mM			2mM			0mM			2mM			0mM			2mM			0mM			2mM		
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	1,4	2	64	0,7	1,3	58	1,2	2,2	64	0,9	1,7	64	0,7	1,2	64	0,7	1,2	57	0,7	1,4	66	1,42	2,48	63,4
2	0,9	1,6	57	1,1	1,9	62	1,4	3	64	1,1	2	58	0,9	1,9	60	0,9	1,8	57	1,4	2,1	78	1,46	2,5	76,4
3	2,2	3,2	100	1,6	2,5	95	2,3	3,6	91	1,8	2,7	96	1,3	2,1	82	1,7	2,6	89	1,3	2,1	79	2,18	3,22	87,4
4	2,6	3,2	114	2,7	3,2	107	2,7	3,2	128	3,1	3,5	111	2,2	2,8	104	1,6	1,9	109	2,4	3,2	110	1,96	2,59	98,4
5	2,2	3,3	76	7,1	8,9	94	5,8	7,5	90	5,7	7,2	89	4,8	6,3	88	6,2	7,9	103	2,3	2,9	75	6,4	8,29	94,1
6	1	1,8	72	2,6	4	83				1,6	2,7	75	2,7	3,7	82	3,5	4,6	80	1,1	1,9	71	3,75	5,08	83,9
7	3,6	4,9	80	7,6	9,8	90	4	4,8	86	12	13	135	4,6	6,5	91	21	26	146	4,1	6,2	75	6,01	8,81	85
8	0,4	1,4	44	0,5	1,6	44	0,6	1,8	50	0,9	2,6	48	0,6	1,7	51	2,8	6,8	64	1,9	4,8	47	1,09	2,92	45,8
9	1,2	3,8	46	4,5	11	70	1,6	4,7	49	4,7	13	68	0,3	1	37	8,2	20	73	0,7	2,4	35	10	20,9	85,6
10	0,4	1,7	40	1,7	4,8	50	0,5	1,8	41	1,8	5	49	0,5	1,9	39	2,1	6,3	50	0,3	1,1	37	0,95	3,19	41,8
11	0,3	1,4	33	1,4	4,1	41	0,6	2,5	40	2,2	6,2	52	0,5	2,2	40	1,2	4,1	43	0,5	2	39	1,23	3,48	47,1
12	0,4	1,7	37	2	5,5	51	0,7	2,7	46	1,5	4,4	45	0,8	3	48	2,4	6,7	55	0,8	3	44	0,51	2,23	37,4
Mean	1,4	2,5	63	2,8	4,9	70	1,9	3,4	68	3,1	5,3	74	1,7	2,9	66	4,4	7,5	77	1,5	2,8	63	3,08	5,47	70,5
Median	1,1	1,9	61	1,8	4,1	66	1,4	3	64	1,8	3,9	66	0,9	2,1	62	2,2	5,5	69	1,2	2,3	68	1,71	3,2	80,2
SD	1,1	1,2	26	2,4	3,3	23	1,7	1,7	28	3,2	3,9	28	1,6	1,8	23	5,7	7,7	30	1,1	1,4	23	2,93	5,35	22,2

Tabelle 15: Datenübersicht der primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea im Comet Assay

Patient	Kontrolle			Nikotin											
	0 $\mu$ M			1 $\mu$ M			10 $\mu$ M			100 $\mu$ M			1mM		
	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL	OTM	DT	TL
1	0,27	1,05	30,6	0,19	0,89	28,24	0,56	2,09	35,32	0,58	1,96	36,80	0,42	1,47	32,91
2	0,24	1,11	30,19	0,30	1,34	31,94	0,28	1,16	33,91	0,23	0,98	29,54	0,43	1,76	32,39
3	0,31	1,18	35,07	0,39	1,41	40,84	0,29	1,14	39,26	0,40	1,54	43,04	0,89	2,59	48,32
4	0,39	1,64	39,5	0,91	2,86	44,31	0,54	2,23	41,02	0,58	2,16	43,53	0,57	2,23	44,93
5	0,18	3,48	39,37	0,22	4,30	41,47	0,24	6,35	43,62	0,29	6,49	41,44	1,17	3,49	35,02
6	0,16	0,82	24,07	0,30	1,20	26,92	0,19	0,79	25,49	0,39	1,58	26,92	0,21	0,98	24,49
7	0,23	1,22	24,42	0,35	1,55	25,23	0,48	2,21	27,00	0,85	3,30	31,83	0,37	1,75	28,96
8	0,55	2,07	40,92	0,57	2,11	43,52	0,55	2,00	43,55	0,60	2,14	43,67	0,61	2,08	39,73
9	0,44	1,61	37,63	0,43	1,71	37,30	0,43	1,69	40,17	0,41	1,58	37,52	0,45	1,68	36,13
10	0,36	1,40	40,9	0,66	1,85	37,61	0,26	0,98	40,47	0,41	1,34	39,63	1,13	2,94	47,89
Mean	0,31	1,56	34,27	0,43	1,92	35,74	0,38	2,06	36,98	0,47	2,31	37,39	0,62	2,10	37,08
Median	0,29	1,31	36,4	0,37	1,63	37,5	0,36	1,85	39,7	0,41	1,77	38,6	0,51	1,92	35,6
SD	0,12	0,76	6,54	0,22	1,00	7,13	0,14	1,60	6,46	0,18	1,60	6,08	0,33	0,74	8,04

Tabelle 16: Datenübersicht der primären adhärennten Zellen der Glandula parotidea im Mikrokerntest

Patient	Kontrolle	Nikotin				
	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1mM	
1	8	7	6	9	11	
2	11	11	14	10	15	
3	8	12	16	24	10	
4	6	6	15	8	8	
5	6	6	8	10	8	
6	3	4	10	6	5	
7	6	8	7	9	11	
8	3	6	5	6	4	
9	5	5	8	4	4	
10	12	22	18	14	16	
Mean	6,80	8,70	10,70	10,00	9,20	
Median	6,00	6,50	9,00	9,00	9,00	
SD	3,01	5,31	4,64	5,64	4,24	

Tabelle 17: Datenübersicht der primären adhärenen Zellen der Glandula parotidea im Chromosomenaberrationstest

Patient	Kontrolle	Nikotin			
	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1mM
1	0	3	5	10	12
2	0	1	1	3	5
3	1	2	2	6	7
4	1	1	3	3	4
5	0	1	2	3	6
6	0	2	4	5	8
7	0	1	1	2	7
8	0	2	3	3	7
9	1	2	2	4	6
10	0	0	1	4	5
Mean	0,30	1,50	2,40	4,30	6,70
Median	0,00	1,50	2,00	3,50	6,50
SD	0,48	0,85	1,35	2,31	2,21

Tabelle 18: Datenübersicht der primären adhärenen Zellen der Glandula parotidea im Sandwich-ELISA-Test

Patient	Kontrolle	Nikotin			
	0 $\mu$ M	1 $\mu$ M	10 $\mu$ M	100 $\mu$ M	1mM
1	50	165	17	17	20
2	60	100	90	80	120
3	40	125	100	100	40
4	40	40	55	65	250
5	140	125	140	90	80
6	80	150	170	140	120
7	80	120	90	65	40
8	70	38	72	90	325
9	72	35	50	50	50
10	60	50	17	17	49
Mean	69,20	94,80	80,10	71,40	109,40
Median	65,00	110,00	81,00	72,50	65,00
SD	28,86	49,75	49,25	37,64	101,18

### 7.3 Literaturverzeichnis

Adrian, C. L., Olin, H. B., Dalhoff, K., Jacobsen, J. (2006). In vivo human buccal permeability of nicotine. *Int J Pharm* **311**, 196-202.

Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F., Starke, K. (Ed.) (2009 b). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 10. Auflage*. Urban und Fischer, München-Jena.

Albertini, R. J., Anderson, D., Douglas, G. R., Hagmar, L., Hemminki, K., Merlo, F., Natarajan, A. T., Norppa, H., Shuker, D. E., Tice, R., Waters, M. D., Aitio, A. (2000). IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. *Mutat Res* **463**, 111-172.

Ames, B. N., McCann, J., Yamasaki, E. (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* **31**, 347-364.

Anderson, G., Jenkinson, E. J. (2007). Investigating central tolerance with reaggregate thymus organ cultures. *Methods Mol Biol* **380**, 185-196.

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

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

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

Bals, R., Gamarra, F., Kaps, A., Grundler, S., Huber, R. M., Welsch, U. (1998). Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. *Cell Tissue Res* **293**, 573-577.

Barley, R. D., Pollock, S., Shallow, M. C., Peters, E., Lam, E. W. (2004). Tobacco-related-compound-induced nitrosative stress injury in the hamster cheek pouch. *J Dent Res* **83**, 903-908.

Barlow, S., Renwick, A. G., Kleiner, J., Bridges, J. W., Busk, L., Dybing, E., Edler, L., Eisenbrand, G., Fink-Gremmels, J., Knaap, A., Kroes, R., Liem, D., Muller, D. J., Page, S., Rolland, V., Schlatter, J., Tritscher, A., Tueting, W., Wurtzen, G. (2006). Risk assessment of substances that are both genotoxic and carcinogenic report of an International Conference organized by EFSA and WHO with support of ILSI Europe. *Food Chem Toxicol* **44**, 1636-1650.

Bates, R. C., Edwards, N. S., Yates, J. D. (2000). Spheroids and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* **36**, 61-74.

Baum, M., Fauth, E., Fritzen, S., Herrmann, A., Mertes, P., Rudolphi, M., Spormann, T., Zankl, H., Eisenbrand, G., Bertow, D. (2005). Acrylamide and glycidamide: approach towards risk assessment based on biomarker guided dosimetry of genotoxic/mutagenic effects in human blood. *Adv Exp Med Biol* **561**, 77-88.

Benimetskaya, L., Ayyanar, K., Kornblum, N., Castanotto, D., Rossi, J., Wu, S., Lai, J., Brown, B. D., Popova, N., Miller, P., McMicken, H., Chen, Y., Stein, C. A. (2006). Bcl-2 protein in 518A2 melanoma cells in vivo and in vitro. *Clin Cancer Res* **12**, 4940-4948.

Benowitz, N. L. (1988). Drug therapy. Pharmacologic aspects of cigarette smoking and nicotine addiction. *N Engl J Med* **319**, 1318-1330.

Benowitz, N. L., Jacob, P., 3rd (1984). Daily intake of nicotine during cigarette smoking. *Clin Pharmacol Ther* **35**, 499-504.

Berger, F., Gage, F. H., Vijayaraghavan, S. (1998). Nicotinic receptor-induced apoptotic cell death of hippocampal progenitor cells. *J Neurosci* **18**, 6871-6881.

Bernstein, C., Bernstein, H., Payne, C. M., Garewal, H. (2002). DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutat Res* **511**, 145-178.

Bosch, F. X., Cardis, E. (1991). Black tobacco and cancer: introducing an epidemiological review. *Eur J Cancer* **27**, 1345-1348.

Boyle, P., Macfarlane, G. J., Blot, W. J., Chiesa, F., Lefebvre, J. L., Azul, A. M., de Vries, N., Scully, C. (1995). European School of Oncology Advisory report to the European Commission for the Europe Against Cancer Programme: oral carcinogenesis in Europe. *Eur J Cancer B Oral Oncol* **31B**, 75-85.

Bradley, M. O., Bhuyan, B., Francis, M. C., Langenbach, R., Peterson, A., Huberman, E. (1981). Mutagenesis by chemical agents in V79 chinese hamster cells: a review and analysis of the literature. A report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res* **87**, 81-142.

Chang, M. L., Sung, K. F., Sheen, I. S., Lin, S. M., Yeh, C. T. (2009). A liver slice culture-based ex vivo assay to predict the outcome of antiviral therapy for chronic hepatitis C. *J Viral Hepat* **16**, 359-366.

Chen, M. H., Chen, Y. J., Liao, C. C., Chan, Y. H., Lin, C. Y., Chen, R. S., Young, T. H. (2009). Formation of salivary acinar cell spheroids in vitro above a polyvinyl alcohol-coated surface. *J Biomed Mater Res A* **90**, 1066-1072.

Colon, J. E., Bhol, K. C., Razzaque, M. S., Ahmed, A. R. (2001). In vitro organ culture model for mucous membrane pemphigoid. *Clin Immunol* **98**, 229-234.

Cook, P. R., Brazell, I. A., Jost, E. (1976). Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. *J Cell Sci* **22**, 303-324.

Cooke, J. P., Bitterman, H. (2004). Nicotine and angiogenesis: a new paradigm for tobacco-related diseases. *Ann Med* **36**, 33-40.

Costa, F., Soares, R. (2009). Nicotine: a pro-angiogenic factor. *Life Sci* **84**, 785-790.

Dahlstrom, A., Lundell, B., Curvall, M., Thapper, L. (1990). Nicotine and cotinine concentrations in the nursing mother and her infant. *Acta Paediatr Scand* **79**, 142-147.

Dasgupta, P., Rastogi, S., Pillai, S., Ordonez-Ercan, D., Morris, M., Haura, E., Chellappan, S. (2006). Nicotine induces cell proliferation by beta-arrestin-mediated activation of Src and Rb-Raf-1 pathways. *J Clin Invest* **116**, 2208-2217.

Doolittle, D. J., Winegar, R., Lee, C. K., Caldwell, W. S., Hayes, A. W., de Bethizy, J. D. (1995). The genotoxic potential of nicotine and its major metabolites. *Mutat Res* **344**, 95-102.

Egleton, R. D., Brown, K. C., Dasgupta, P. (2008). Nicotinic acetylcholine receptors in cancer: multiple roles in proliferation and inhibition of apoptosis. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 151-158.

Ezzati, M., Lopez, A. D. (2003). Estimates of global mortality attributable to smoking in 2000. *Lancet* **362**, 847-852.

Faust, F., Kassie, F., Knasmuller, S., Boedecker, R. H., Mann, M., Mersch-Sundermann, V. (2004). The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res* **566**, 209-229.

Fenech, M. (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* **285**, 35-44.

Fenech, M. (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* **455**, 81-95.

Fenech, M. (2005). In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med* **111**, 3-32.

Fenech, M., Morley, A. A. (1986). Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat Res* **161**, 193-198.

Furue, M., Okamoto, T., Hayashi, H., Sato, J. D., Asashima, M., Saito, S. (1999). Effects of hepatocyte growth factor (HGF) and activin A on the morphogenesis of rat submandibular gland-derived epithelial cells in serum-free collagen gel culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* **35**, 131-135.

Galloway, S. M. (1994). Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression, and intriguing questions. *Environ Mol Mutagen* **23 Suppl 24**, 44-53.

Ginzkey, C., Friehs, G., Koehler, C., Hackenberg, S., Voelker, H. U., Richter, E., Kleinsasser, N. H. Nicotine and methyl methane sulfonate in mini organ cultures of human parotid gland tissue. *Toxicol Lett*. Epub ahead of print.

Ginzkey, C., Kampfinger, K., Friehs, G., Kohler, C., Hagen, R., Richter, E., Kleinsasser, N. H. (2009). Nicotine induces DNA damage in human salivary glands. *Toxicol Lett* **184**, 1-4.

Heeschen, C., Jang, J. J., Weis, M., Pathak, A., Kaji, S., Hu, R. S., Tsao, P. S., Johnson, F. L., Cooke, J. P. (2001). Nicotine stimulates angiogenesis and promotes tumor growth and atherosclerosis. *Nat Med* **7**, 833-839.

Henley, S. J., Thun, M. J., Connell, C., Calle, E. E. (2005). Two large prospective studies of mortality among men who use snuff or chewing tobacco (United States). *Cancer Causes Control* **16**, 347-358.

Hiraki, A., Shirasuna, K., Ikari, T., Shinohara, M., Garrod, D. R. (2002). Calcium induces differentiation of primary human salivary acinar cells. *J Cell Physiol* **193**, 55-63.

Hoet, P. H., Demedts, M., Nemery, B. (1997). In vitro modulation of the P450 activities of hamster and human lung slices. *Cell Biol Toxicol* **13**, 185-192.

Hoffmann, H., Speit, G. (2005). Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and the micronucleus test. *Mutat Res* **581**, 105-114.

Horn-Ross, P. L., Ljung, B. M., Morrow, M. (1997). Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. *Epidemiology* **8**, 414-419.

Hsie, A. W., Casciano, D. A., Couch, D. B., Krahn, D. F., O'Neill, J. P., Whitfield, B. L. (1981). The use of Chinese hamster ovary cells to quantify specific locus mutation and to determine mutagenicity of chemicals. A report of the gene-tox program. *Mutat Res* **86**, 193-214.

Hukkanen, J., Jacob, P., 3rd, Benowitz, N. L. (2005). Metabolism and disposition kinetics of nicotine. *Pharmacol Rev* **57**, 79-115.

Itier, V., Bertrand, D. (2001). Neuronal nicotinic receptors: from protein structure to function. *FEBS Lett* **504**, 118-125.

Jahnke, V., Matthias, C., Bockmuhl, U., Strange, R. C. (1999). [Genetic predisposition for the development of head and neck carcinomas]. *Laryngorhinootologie* **78**, 24-27.

Jenkins, G. J., Doak, S. H., Johnson, G. E., Quick, E., Waters, E. M., Parry, J. M. (2005). Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? *Mutagenesis* **20**, 389-398.

John, U., Hanke, M. (2002). Tobacco smoking- and alcohol drinking-attributable cancer mortality in Germany. *Eur J Cancer Prev* **11**, 11-17.

Joraku, A., Sullivan, C. A., Yoo, J., Atala, A. (2007). In-vitro reconstitution of three-dimensional human salivary gland tissue structures. *Differentiation* **75**, 318-324.

Joraku, A., Sullivan, C. A., Yoo, J. J., Atala, A. (2005). Tissue engineering of functional salivary gland tissue. *Laryngoscope* **115**, 244-248.



Kassie, F., Parzefall, W., Knasmuller, S. (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* **463**, 13-31.

Kerr, J. F., Winterford, C. M., Harmon, B. V. (1994). Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* **73**, 2013-2026.

Kirsch-Volders, M., Aardema, M., Elhajouji, A. (2000). Concepts of threshold in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* **464**, 3-11.

Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J., Ahnstrom, G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* **363**, 89-96.

Kleinsasser, N. H., Gamarra, F., Bergner, A., Wallner, B. C., Harreus, U. A., Juchhoff, J., Kastenbauer, E. R., Huber, R. M. (2001). Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* **63**, 141-147.

Kleinsasser, N. H., Juchhoff, J., Wallner, B. C., Bergner, A., Harreus, U. A., Gamarra, F., Buhrlen, M., Huber, R. M., Rettenmeier, A. W. (2004). The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res* **561**, 63-73.

Kleinsasser, N. H., Sassen, A. W., Semmler, M. P., Harreus, U. A., Licht, A. K., Richter, E. (2005). The tobacco alkaloid nicotine demonstrates genotoxicity in human tonsillar tissue and lymphocytes. *Toxicol Sci* **86**, 309-317.

Klussmann, P. J., Wittekindt, C., Florian Preuss, S., Al Attab, A., Schroeder, U., Guntinas-Lichius, O. (2006). High risk for bilateral Warthin tumor in heavy smokers--review of 185 cases. *Acta Otolaryngol* **126**, 1213-1217.

Lam, T. H., Zhu, C. Q., Jiang, C. Q. (2002). Lymphocyte DNA damage in elevator manufacturing workers in Guangzhou, China. *Mutat Res* **515**, 147-157.

Lindell, G., Farnebo, L. O., Chen, D., Nexø, E., Rask Madsen, J., Bukhave, K., Graffner, H. (1993). Acute effects of smoking during modified sham feeding in duodenal ulcer patients. An analysis of nicotine, acid secretion, gastrin, catecholamines, epidermal growth factor, prostaglandin E2, and bile acids. *Scand J Gastroenterol* **28**, 487-494.

Lindell, G., Lunell, E., Graffner, H. (1996). Transdermally administered nicotine accumulates in gastric juice. *Eur J Clin Pharmacol* **51**, 315-318.

Mai, H., May, W. S., Gao, F., Jin, Z., Deng, X. (2003). A functional role for nicotine in Bcl2 phosphorylation and suppression of apoptosis. *J Biol Chem* **278**, 1886-1891.

Maluf, S. W., 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., McGehee, D. S. (2002). Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *J Neurobiol* **53**, 606-617.

Merkle, H. P., Ditzinger, G., Lang, S. R., Peter, H., Schmidt, M. C. (1998). In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* **29**, 51-79.

Moller, P., Knudsen, L. E., Loft, S., Wallin, H. (2000). The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **9**, 1005-1015.

Muscat, J. E., Wynder, E. L. (1998). A case/control study of risk factors for major salivary gland cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* **118**, 195-198.

Olive, P. L., Durand, R. E., Le Riche, J., Olivotto, I. A., Jackson, S. M. (1993). Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancers. *Cancer Res* **53**, 733-736.

Østling, O., Johanson, K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* **123**, 291-298.

Perry, D. C., Davila-Garcia, M. I., Stockmeier, C. A., Kellar, K. J. (1999). Increased nicotinic receptors in brains from smokers: membrane binding and autoradiography studies. *J Pharmacol Exp Ther* **289**, 1545-1552.

Pinkston, J. A., Cole, P. (1996). Cigarette smoking and Warthin's tumor. *Am J Epidemiol* **144**, 183-187.

Preston, R. J., Au, W., Bender, M. A., Brewen, J. G., Carrano, A. V., Heddle, J. A., McFee, A. F., Wolff, S., Wassom, J. S. (1981). Mammalian in vivo and in vitro cytogenetic assays: a report of the U.S. EPA's gene-tox program. *Mutat Res* **87**, 143-188.

Preston, R. J., San Sebastian, J. R., McFee, A. F. (1987). The in vitro human lymphocyte assay for assessing the clastogenicity of chemical agents. *Mutat Res* **189**, 175-183.

Rosenquist, K., Wennerberg, J., Schildt, E. B., Bladstrom, A., Hansson, B. G., Andersson, G. (2005). Use of Swedish moist snuff, smoking and alcohol consumption in the aetiology of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta Otolaryngol* **125**, 991-998.

Roy, T. S., Andrews, J. E., Seidler, F. J., Slotkin, T. A. (1998). Nicotine evokes cell death in embryonic rat brain during neurulation. *J Pharmacol Exp Ther* **287**, 1136-1144.

Sassen, A. W., Richter, E., Semmler, M. P., Harreus, U. A., Gamarra, F., Kleinsasser, N. H. (2005). Genotoxicity of nicotine in mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia. *Toxicol Sci* **88**, 134-141.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L. (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* **175**, 184-191.

Slamenova, D., Gabelova, A., Ruzekova, L., Chalupa, I., Horvathova, E., Farkasova, T., Bozsakyova, E., Stetina, R. (1997). Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. *Mutat Res* **383**, 243-252.

Smith, P. F., Fisher, R., Shubat, P. J., Gandolfi, A. J., Krumdieck, C. L., Brendel, K. (1987). In vitro cytotoxicity of allyl alcohol and bromobenzene in a novel organ culture system. *Toxicol Appl Pharmacol* **87**, 509-522.

Stacey, G., Viviani, B. (2001). Cell culture models for neurotoxicology. *Cell Biol Toxicol* **17**, 319-334.

Steinsvag, S. K., Strand, M., Berg, O., Miaguchi, M., Olofsson, J. (1991). Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* **101**, 1323-1331.

Sudheer, A. R., Muthukumaran, S., Devipriya, N., Menon, V. P. (2007a). Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology* **230**, 11-21.

Sudheer, A. R., Muthukumaran, S., Kalpana, C., Srinivasan, M., Menon, V. P. (2007b). Protective effect of ferulic acid on nicotine-induced DNA damage and cellular changes in cultured rat peripheral blood lymphocytes: a comparison with N-acetylcysteine. *Toxicol In Vitro* **21**, 576-585.

Sun, T., Zhu, J., Yang, X., Wang, S. (2006). Growth of miniature pig parotid cells on biomaterials in vitro. *Arch Oral Biol* **51**, 351-358.

Swierenga, S. H., Heddle, J. A., Sigal, E. A., Gilman, J. P., Brillinger, R. L., Douglas, G. R., Nestmann, E. R. (1991). Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutat Res* **246**, 301-322.

Tarvainen, L., Suuronen, R., Lindqvist, C., Malila, N. (2004). Is the incidence of oral and pharyngeal cancer increasing in Finland? An epidemiological study of 17,383 cases in 1953-1999. *Oral Dis* **10**, 167-172.

Teissier, E., Fennrich, S., Strazielle, N., Daval, J. L., Ray, D., Schlosshauer, B., Ghersi-Egea, J. F. (1998). Drug metabolism in in vitro organotypic and cellular models of mammalian central nervous system: activities of membrane-bound epoxide hydrolase and NADPH-cytochrome P-450 (c) reductase. *Neurotoxicology* **19**, 347-355.

Teneggi, V., Squassante, L., Iavarone, L., Milleri, S., Bye, A., Gomeni, R. (2002). Correlation and predictive performances of saliva and plasma nicotine concentration on tobacco withdrawal-induced craving. *Br J Clin Pharmacol* **54**, 407-414.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* **35**, 206-221.

Tice, R. R., Andrews, P. W., Hirai, O., Singh, N. P. (1991). The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. *Adv Exp Med Biol* **283**, 157-164.

Tomatis, L., Aitio, A., Wilbourn, J., Shuker, L. (1989). Human carcinogens so far identified. *Jpn J Cancer Res* **80**, 795-807.

- Tomizawa, M., Casida, J. E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu Rev Entomol* **48**, 339-364.
- Trivedi, A. H., Dave, B. J., Adhvaryu, S. G. (1990). Assessment of genotoxicity of nicotine employing in vitro mammalian test system. *Cancer Lett* **54**, 89-94.
- Waggoner, S. E., Wang, X. (1994). Effect of nicotine on proliferation of normal, malignant, and human papillomavirus-transformed human cervical cells. *Gynecol Oncol* **55**, 91-95.
- Warnakulasuriya, K. A., Ralhan, R. (2007). Clinical, pathological, cellular and molecular lesions caused by oral smokeless tobacco--a review. *J Oral Pathol Med* **36**, 63-77.
- Wu, H. J., Chi, C. W., Liu, T. Y. (2005). Effects of pH on nicotine-induced DNA damage and oxidative stress. *J Toxicol Environ Health A* **68**, 1511-1523.
- Wu, Y. P., Kita, K., Suzuki, N. (2002). Involvement of human heat shock protein 90 alpha in nicotine-induced apoptosis. *Int J Cancer* **100**, 37-42.
- Xu, J., Huang, H., Pan, C., Zhang, B., Liu, X., Zhang, L. (2007). Nicotine inhibits apoptosis induced by cisplatin in human oral cancer cells. *Int J Oral Maxillofac Surg* **36**, 739-744.
- Zeidler, R., Albermann, K., Lang, S. (2007). Nicotine and apoptosis. *Apoptosis* **12**, 1927-1943.
- Zhang, T., Lu, H., Shang, X., Tian, Y., Zheng, C., Wang, S., Cheng, H., Zhou, R. (2006). Nicotine prevents the apoptosis induced by menadione in human lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* **342**, 928-934.
- Zhao, Z., Reece, E. A. (2005). Nicotine-induced embryonic malformations mediated by apoptosis from increasing intracellular calcium and oxidative stress. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* **74**, 383-391.

## 7.4 Kongressbeiträge und Publikationen aus der vorliegenden Arbeit

### Kongressbeiträge:

Norddeutscher HNO Kongress 2007, Kiel. Humane Miniorgankulturen der Glandula parotidea für die Ökogenotoxikologie. (Katja Kampfinger, C. Ginzkey, Gudrun Friehs, C. Köhler, Katrin Frölich, R. Hagen, N. Kleinsasser)

Norddeutscher HNO Kongress 2007, Kiel. Genotoxische Effekte von Nikotin in humanem Speicheldrüsengewebe. (C. Ginzkey, Katja Kampfinger, Gudrun Friehs, C. Köhler, Katrin Frölich, R. Hagen, N. Kleinsasser)

Deutscher HNO Kongress 2008, München. Nikotin induzierte Genotoxizität in humanem Speicheldrüsengewebe. (C. Ginzkey, G. Friehs, K. Kampfinger, N. H. Kleinsasser)

Deutscher HNO Kongress 2009, Rostock. Primäre Speicheldrüsenzellkulturen zur Evaluation Tumor initiiender Effekte. (Friehs, G., Ginzkey, C., Hagen, R., Kleinsasser, N.)

Deutscher HNO Kongress 2009, Rostock. Differenzierung Nikotin induzierter DNA-Schäden an humaner Nasenschleimhaut. (Ginzkey, C., Stüber, T., Friehs, G., Kleinsasser, N.)

Deutscher HNO Kongress 2010, Wiesbaden. Verwendung primärer Speicheldrüsenzellkulturen zur Untersuchung der Genotoxizität von Xenobiotika auf Chromatidebene. (Friehs, G., Ginzkey, C., Hagen, R., Kleinsasser, N.)

### Publikationen:

Nicotine induces DNA damage in human salivary glands. Ginzkey C, Kampfinger K, Friehs G, Köhler C, Hagen R, Richter E, Kleinsasser NH. Toxicol Lett. 2009 Jan 10;184(1):1-4.

Nicotine and methyl methane sulfonate in mini organ cultures of human parotid gland tissue. Ginzkey C, Friehs G, Köhler C, Hackenberg S, Voelker HU, Richter E, Kleinsasser NH. Toxicol Lett. Epub ahead of print.

## 7.5 Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name	Gudrun Maria Gertrud Friehs
Geburtsdatum	13.05.1979
Geburtsort	Lohr am Main
Familienstand	ledig
Nationalität	deutsch

### Schulbildung:

1985-1990	Volksschule Münnerstadt
1990-1999	Johann-Philipp-von-Schönborn-Gymnasium in Münnerstadt (Hum. Gym.)

### Studium:

Oktober 1999	Beginn des Chemiestudiums an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Oktober 2000	Beginn des Biologiestudiums an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
März 2003	Ablegung der Vordiplomprüfungen in den Fächern Physik, Chemie und Allgemeine Biologie
März 2005	Ablegung der Diplomprüfungen in den Fächern Biochemie (Hauptfach), Organische Chemie und Humangenetik
Mai 2005	Beginn der Diplomarbeit, zum Thema „Funktionelle Analyse von Virulenzfaktoren bei Streptococcus mutans“ in der Nachwuchsgruppe Streptococcus pneumoniae am Zentrum für Infektionsforschung der Universität Würzburg
November 2006	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen in Würzburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. N. Kleinsasser

## 7.6 Danksagung

Während meiner Arbeit an diesem Projekt standen mir viele Menschen mit Rat und Tat zur Seite. An dieser Stelle möchte ich mich daher bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zu ihrem Gelingen 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 interessante Themenstellung und die kompetente, wissenschaftliche Gesamtbetreuung. Seine Anregungen, Ratschläge und ein „immer offenes Ohr“ waren für mich sehr hilfreich. Diese Unterstützung leistete einen wesentlichen Beitrag bei der Umsetzung meiner Dissertation.

Bei Herrn PD. Dr. Robert Hock für die spontane Bereitschaft, das Gutachten zu übernehmen.

Bei Dr. Christian Ginzkey für seine kameradschaftliche Betreuung, kompetente Beratung und die vielen hilfreichen Hinweise.

Bei den Operateuren der HNO-Abteilung und ihren Teams. Ohne ihre Kooperation bei der Gewinnung von Gewebeproben hätte kein einziger Versuch stattfinden können.

Ein besonders herzliches Dankeschön gebührt der Arbeitsgruppe mit Ursula Kepp, Michael Kessler, Silke Hummel, Margarete Appelman, Renate Port, Dr. Antje Technau, Dr. Katja Kampfinger, Jeanette Roller, Christine Polednik, Petra Grünsfelder, Dr. Marianne Schmidt, Petra Joa und Karin Jung. Besonders das angenehme Arbeitsklima gab mir Freude und Motivation, diese Arbeit anzufertigen und durchzustehen.

Weiter möchte ich mich bei meinem Freund Carsten bedanken, der einige anstrengende Arbeitsphasen geduldig mit mir durchgestanden und mir durch seine aufmunternde Unterstützung über so manche Durststrecke hinweggeholfen hat.

Abschließend gilt mein Dank meinen Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich auf vielerlei Weise immer wieder unterstützt haben.



## 7.7 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Doktorarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Ferner bestätige ich, dass ich weder an der Universität Würzburg noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder eine Doktorprüfung abzulegen.

Würzburg, den 23.06.2010

Gudrun Friehs