

Aus dem Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. P. Eyer

Zur Bedeutung von Myosmin für das Adenokarzinom des Ösophagus: Genotoxizität in OE33-Zellen

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sarah Vogt
aus
Göttingen
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. E. Richter

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Storr
Prof. Dr. M. Götz

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2006

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGEN	III
1 EINLEITUNG	1
1.1 Krebserkrankungen in Deutschland	1
1.1.1 Lungenkrebs	3
1.1.2 Ösophaguskrebs	4
1.2 Entstehung von Krebserkrankungen	6
1.3 Myosmin	7
1.3.1 Chemische Eigenschaften von Myosmin	9
1.3.1.1 Toxikologische Bewertung von Myosmin	10
1.4 Nitrosamine	10
1.4.1 Vorkommen und Bildung von Nitrosaminen	13
1.4.2 Nitrosierung von Myosmin	15
1.4.3 Pyridyloxobutyl-Addukte	16
1.5 Freie Radikale und andere reaktive Spezies	17
1.5.1 Reaktive Sauerstoffspezies	17
1.5.2 Reaktive Stickstoffspezies	18
1.5.2.1 Stickstoffmonoxid	18
1.5.2.2 Peroxynitrit	19
1.6 Toxikologische Testmethoden	20
1.6.1 Test auf Cytotoxizität	20
1.6.2 Untersuchung der Genotoxizität	21
1.6.2.1 Comet-Assay	23
1.7 Zielsetzung der Arbeit	24
2 MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Material	26
2.1.1 Software	26
2.1.2 Geräte	26
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	27
2.1.4 Chemikalien	27
2.1.5 Lösungen und Reagenzien	28
2.1.6 Zelllinien	30
2.1.6.1 OE19	30
2.1.6.2 OE33	30
2.2 Methoden	31
2.2.1 Kultivieren von OE33-Zellen	31
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl	31
2.2.3 Einfrieren von OE33-Zellen	32

2.2.4	Auftauen von OE33-Zellen	32
2.2.5	MTT-Test	33
2.2.6	Comet-Assay	33
2.2.6.1	Behandlung mit FPG-Protein	34
2.2.7	Statistik	35
3	ERGEBNISSE	36
3.1	MTT-Test	36
3.1.1	Myosmin	36
3.1.2	Wasserstoffperoxid	37
3.1.3	3-Morpholinosydnonimin	38
3.2	Comet-Assay	39
3.2.1	Myosmin	40
3.2.2	Myosmin bei sauren pH-Werten	41
3.2.3	Myosmin und reaktive Spezies	42
3.2.3.1	Wasserstoffperoxid	42
3.2.3.2	3-Morpholinosydnonimin	44
3.2.4	FPG-Behandlung	46
3.2.4.1	Wasserstoffperoxid und FPG	46
3.2.4.2	3-Morpholinosydnonimin und FPG	47
3.2.5	COX-2 Hemmung	49
3.2.6	Hemmung der Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT)	51
4	DISKUSSION	53
4.1	Verwendete Testmethoden	54
4.1.1	Cytotoxizität	54
4.1.2	Comet-Assay	55
4.2	Genotoxische Wirkung von Myosmin	56
4.3	Myosmin und reaktive Spezies	59
4.3.1	Wasserstoffperoxid	59
4.3.2	Stickoxid und Peroxynitrit	60
4.4	COX-2 Hemmung	62
4.5	Hemmung der AGT	64
4.6	Ausblick	65
5	ZUSAMMENFASSUNG	67
6	LITERATURVERZEICHNIS	69

Abkürzungen

AGT	O ⁶ -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body mass index
COX	Cyclooxygenase
CYP	Cytochrom P450 Enzyme
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
ECACC	European Collection of Cell Cultures
ETS	Environmental tobacco smoke
FPG	Formamidopyrimidinglykosylase
GERD	Gastroösophageale Refluxkrankheit
HLA	Histokompatibilitäts-Antigen
HPRT-Test	Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-Test
ICAM	Interzelluläres Zelladhäsions-Molekül
iNOS	induzierbare NO-Synthase
LD ₅₀ -Wert	mittlere letale Dosis
mA	Milliampere
min	Minute(n)
mL	Milliliter
HPB	4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon
IARC	International Agency for Research on Cancer
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3,(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
M.W.	Mittelwert
MW	Molekulargewicht
N	Normalität (mol H ⁺ pro Liter)
NNAL	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	N'-Nitrosonoronicotin
NO [•]	Stickstoffmonoxidradikal
NSAID	Nonsteroidal antiinflammatory drugs
O ₂ ⁻	Superoxidanionradikal
ONOO ⁻	Peroxynitritanion
OTM	Olive Tail Moment

PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RNA	Ribonukleinsäure
RNOS	reaktive Stickoxide
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
S.D.	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIN-1	3-Morpholinosydnonimin
TSNA	Tobacco-specific nitrosamine
UV-Licht	Ultra-Violettes Licht (100-400 nm)

1 Einleitung

1.1 Krebserkrankungen in Deutschland

Krebs stellt heutzutage in Deutschland neben Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. 1999 wurde für jeden vierten von insgesamt ca. 850 000 Todesfällen eine bösartige Krebserkrankung verantwortlich gemacht (Abbildung 1). Trotz intensiver Forschung und stets verbesserter Therapiemöglichkeiten verstarben 1990 europaweit etwa 26% der Männer und 21% der Frauen an Krebs [1].

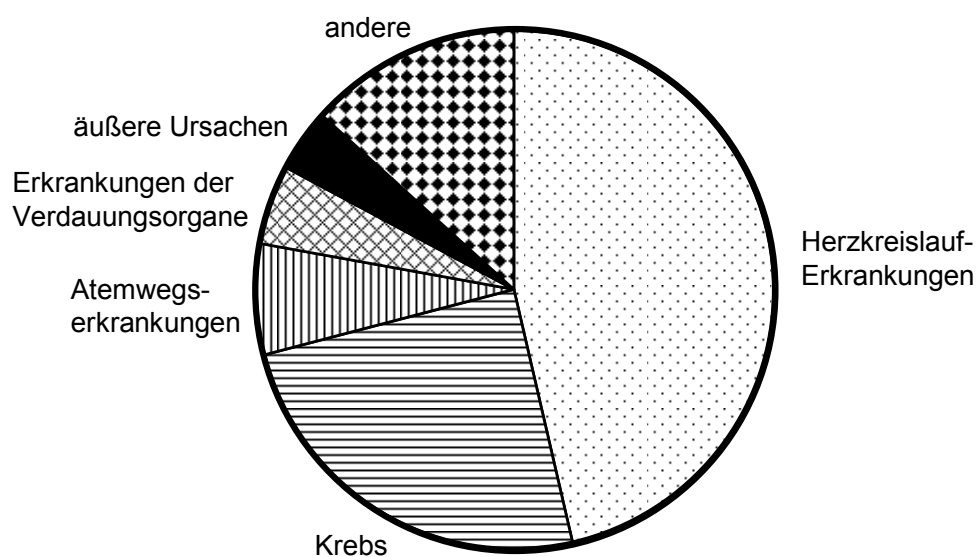


Abbildung 1: Todesursachen in Deutschland 2003; Quelle: Statistisches Bundesamt (www.destatis.de).

In Tabelle 1 ist der Anteil der häufigsten Krebsformen an den jährlich auftretenden Neuerkrankungen in Deutschland wiedergegeben. Das Robert-Koch-Institut in Berlin schätzt die Zahl der Neuerkrankungen für das Jahr 2000 auf ca. 200 000 Fälle bei Männern und auf ca. 194 700 bei Frauen. Dabei liegt das mittlere Erkrankungsalter bei 66 bzw. 67 Jahren.

Tabelle 1: Prozentualer Anteil der Krebsarten an den Krebsneuerkrankungen in Deutschland 2000; Quelle: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004.

Männer		Frauen	
Organ	Häufigkeit (%)	Organ	Häufigkeit (%)
Prostata	20,3	Brustdrüse	24,4
Darm	16,3	Darm	17,6
Lunge	15,9	Lunge	5,4
Harnblase	8,9	Gebärmutter	5,1
Magen	5,3	Magen	5,1
Niere	4,4	Eierstöcke	5,0
Mund- und Rachenraum	3,8	Pankreas	4,0
Non-Hodgkin-Lymphom	3,0	Harnblase	3,6
Pankreas	2,9	Gebärmutterhals	3,4
Leukämie	8,8	Non-Hodgkin-Lymphom	3,4
Malignes Melanom der Haut	2,7	Niere	3,2

Bei der Erhebung von Daten über Krebserkrankungen ist neben der Unterscheidung des Geschlechts auch die Erfassung von Neuerkrankungen gegenüber den Sterbefällen für die Interpretation der Ergebnisse wichtig. So ist beim Mann mit 20,3% die Prostata zwar das am häufigsten von bösartigen Tumoren befallene Organ, steht jedoch als Todesursache unter den Krebsformen mit 10,2% „nur“ an dritter Stelle. Der Lungenkrebs ging 2000 mit 15,9% in die Statistik der Neuerkrankungen ein, war jedoch unter den Männern mit 26,8% die Krebsform mit der höchsten Sterberate [2].

Bei der Beurteilung von Krebsrisikofaktoren unterscheidet man grundsätzlich zwischen individuell vermeidbaren Risiken, wie einer ungesunden Lebensweise und nicht beeinflussbaren Größen. Dazu zählen unter anderem genetisch bedingte Krebsrisikofaktoren. Studien über Risikofaktoren für Krebserkrankungen ergaben, dass falsche Ernährungsgewohnheiten und

Adipositas sowie der Konsum von Tabak mit jeweils einem Drittel die Hauptursachen für die Entstehung von Krebserkrankungen sind [3].

Tabelle 2: Prozentualer Anteil der Krebsarten an den Krebssterbefällen in Deutschland 2000; Quelle: Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2004.

Männer		Frauen	
Organ	Häufigkeit (%)	Organ	Häufigkeit (%)
Lunge	26,8	Brustdrüse	17,8
Darm	12,5	Darm	15,3
Prostata	10,2	Lunge	9,8
Magen	6,3	Pankreas	6,3
Pankreas	5,3	Magen	6,2
Niere	3,6	Eierstöcke	6,1
Harnblase	3,5	Leukämie	3,3
Mundhöhle und Rachen	3,3	Non-Hodgkin-Lymphom	2,7
Leukämie	3,2	Gebärmutter	2,7
Speiseröhre	2,9	Niere	2,6

1.1.1 Lungenkrebs

In Deutschland erkranken jährlich etwa 31 800 Männer und 10 400 Frauen an Lungenkrebs. Dies entspricht einem Anteil von 15,9 bzw. 5,4% an den bösartigen Neuerkrankungen. Lungenkrebs zählt zu den malignen Tumoren, für die der Hauptrisikofaktor schon seit langer Zeit bewiesen ist. Bei 90% der männlichen und 60% der weiblichen Lungenkrebspatienten ist die Erkrankung auf das Rauchen zurückzuführen. Das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken, steigt mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten, der Dauer des Rauchens, der Inhalationstiefe sowie der Nikotin- und Teerkonzentration. Wird das Rauchen aufgegeben, so verringert sich das Krebsrisiko mit der Zeit. Durch die Latenzzeit von etwa 20 Jahren bleibt das Erkrankungsrisiko jedoch lange erhöht. Außer dem Rauchen gelten auch Belastungen mit kanzerogenen Stoffen am Arbeitsplatz und Radon belastete Wohnhäuser als Risikofaktoren.

Während die Inzidenz bei Männern in Deutschland seit Mitte der 1980er Jahre rückläufig ist, steigt diese bei den Frauen kontinuierlich an. Das ist durch das veränderte Rauchverhalten, das sich dem der Männer angleicht, zu erklären. Trotz verbesserter Therapiemöglichkeiten zählt der Lungenkrebs zu den prognostisch ungünstig verlaufenden Krebserkrankungen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate ist mit etwa 13% bei Männern ähnlich jener der Frauen (14%) [2].

1.1.2 Ösophaguskrebs

Der Ösophagus (Speiseröhre) ist etwa 30 cm lang. Er verläuft zwischen Rachen und Magen und dient dem Transport der Nahrung. Der Ösophagus weist drei anatomisch bedingte Engstellen auf. Den Ösophagusmund am oberen Eingang, die Aortenenge, an der der Ösophagus durch den Aortenbogen und die Trachea begrenzt wird sowie die Zwerchfellenge. Die Innenseite ist von einer Schleimhaut aus unverhorntem Plattenepithel mit eingestreuten Drüsen bedeckt. Darunter liegen eine submuköse Bindegewebsschicht sowie eine Muskelschicht. Die Muskelschicht besteht im oberen Teil der Speiseröhre aus quergestreifter Muskulatur, die sich beim Schlucken willkürlich zusammenzieht. Im unteren Teil besteht sie dagegen, wie auch im übrigen Verdauungstrakt, aus glatter Muskulatur. Ihre Kontraktionen geschehen unwillkürlich. Die glatte Muskulatur sorgt für den Transport der Nahrung in den Magen.

In Deutschland erkranken jährlich etwa 3370 Männer und 880 Frauen an Speiseröhrenkrebs, was einem Anteil von unter 2% an allen bösartigen Neubildungen bei den Männern und 0,5% bei den Frauen entspricht. Der Anteil an den Krebstodesfällen liegt mit 2,9% bzw. 0,9% etwas höher. Dies liegt an der sehr ungünstigen Prognose dieser Krebsart, die sich in den letzten Jahren kaum verbessert hat. Auf die Mukosa und Submukosa beschränkte Tumoren sind selten und werden meist nur zufällig entdeckt. Wenn das typische Symptom der Schluckbeschwerden (Dysphagie) auftritt, haben Ösophaguskarzinome die Wandschichten häufig schon weit infiltriert bzw. Metastasen in Lymphknoten oder benachbarten Organen gebildet. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt bei Männern etwa 11% und bei Frauen 8% [2].

Bis Mitte der 1970er Jahre waren weniger als 5% der Ösophaguskrebsereignisse auf Adenokarzinome zurückzuführen. Seit dem steigt ihr Anteil in großen Teilen Europas und in den USA. Heute haben Adenokarzinome etwa die gleiche Inzidenz wie Plattenepithelkarzinome, wobei ihr Anteil weiter steigt. Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Plattenepithelkarzinomen sind Rauchen und Alkoholkonsum [4]. Als wichtigster Risikofaktor für die Entstehung von Adenokarzinomen im Ösophagus gilt dagegen der Barrett-Ösophagus. Er entsteht durch chronischen Reflux von Säuren und Duodenalinhalten aus dem Magen.

Dadurch kommt es zu einer Umwandlung des Plattenepithels der Speiseröhre in ein Zylinderepithel (Metaplasie). Schließlich folgt eine Dysplasie, d.h. der Verlust der Differenzierung der Zellen des Gewebes. Das Risiko für einen Patienten mit bekanntem Barrett-Ösophagus ein Adenokarzinom zu entwickeln, ist etwa 100-fach höher als für die Normalbevölkerung [5]. Die wichtigsten zellulären Mechanismen, die zur Bildung eines Adenokarzinoms führen sind in Abbildung 2 zusammengefasst.

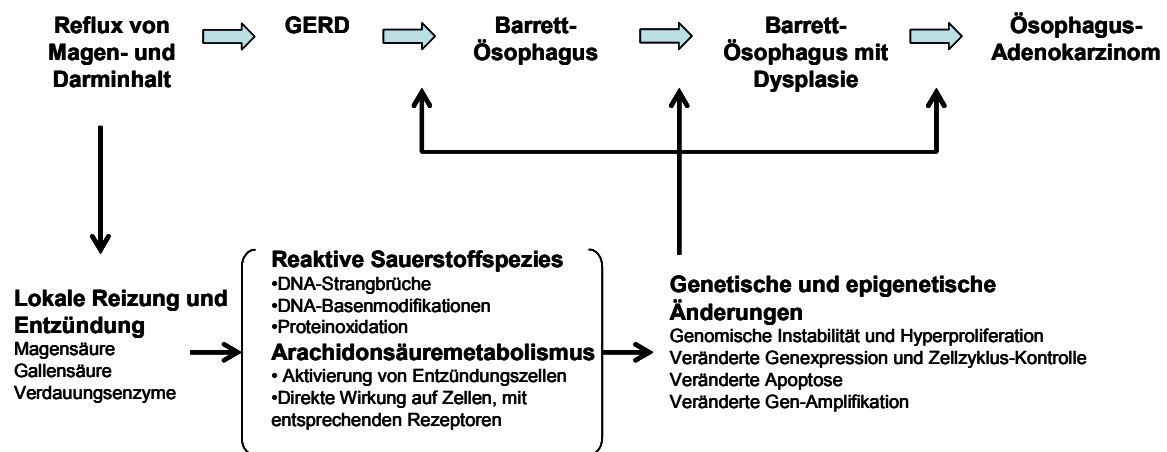


Abbildung 2: Mechanismen, die zur Adenokarzinom-Entstehung im Ösophagus führen; GERD: gastroösophageale Refluxkrankheit; nach Chen et al. [6].

Salzsäure und Pepsin im Magensaft, sowie konjugierte und nicht konjugierte Gallensäuren, Trypsin und Lysolecithin im Darmsaft sind an der Schädigung der Ösophaguswand und der Entwicklung von Adenokarzinomen beteiligt. Es wird allgemein anerkannt, dass die Ösophagusschleimhaut weitgehend resistent gegen Salzsäure allein ist, solange sie nicht in sehr hohen Konzentrationen (etwa pH 1) auftritt. Starke Säuren insbesondere in Kombination mit Gallensäuren oder Pankreasenzymen können dazu führen, dass die Schleimhaut durchlässig wird und Wasserstoffionen passieren können. Gleichzeitig können evtl. auch potente Kanzerogene die Schleimhaut passieren und auf die Stammzellen in der Mukosa einwirken. Salzsäure in Kombination mit schon geringen Pepsinkonzentrationen schädigt die Schleimhaut über zwei Mechanismen. Zum einen können Zellinhaltsstoffe verdaut werden, zum anderen kann der Abbau von Oberflächenstrukturen dazu führen, dass sich die Zelle vom Epithelium ablöst. Bis heute wird die Rolle der Magensäure bei der Entstehung von Adenokarzinomen des Ösophagus kontrovers diskutiert. Viele klinische Studien haben gezeigt, dass eine Säurebildung unterdrückende Therapie die Symptome der Refluxkrankheit mindern kann und Komplikationen vorbeugt. Selbst der Barrett-Ösophagus regeneriert sich teilweise und es entstehen Inseln mit normalem Plattenepithel. Andererseits bewirkt die Unterdrückung des Reflux keinen kompletten Rückgang des Barrett-Ösophagus und eliminiert auch nicht die

Gefahr der Adenokarzinomentstehung. Gallensäuren selbst sind nicht kanzerogen. Allerdings können sekundäre Gallensäuren, die beim Abbau primärer Gallensäuren durch Bakterien entstehen als Co-Kanzerogene wirken. Ihre Wirkung scheint vom Konjugationsstatus und dem pH-Wert der Umgebung abzuhängen. Bei sauren pH-Werten besonders zwischen 3 und 5 können nicht ionisierte und lipophile Gallensäuren in die Schleimhautzellen eindringen. Dort werden sie ionisiert und können zu Zellschäden führen. Unkonjugierte Gallensäuren können bei neutralen pH-Werten als Krebs-Promotoren wirken [6].

Neben dem Reflux gibt es weitere Risikofaktoren wie Fettleibigkeit, Alkohol- und Zigarettenkonsum, eine hohe Aufnahme von rotem Fleisch, gesättigten Fettsäuren und Eisen. Auch die Einnahme von Medikamenten, die zu einer Entspannung des unteren Ösophagussphinkters führen, erhöht das Risiko. Männer sind weitaus häufiger betroffen als Frauen, wobei Sexualhormone scheinbar keine Rolle spielen. Das Erkrankungsrisiko steigt mit zunehmendem Alter, die meisten Patienten erkranken zwischen dem 70. und 80. Lebensjahr. Auf der anderen Seite kann eine Infektion mit bestimmten *Helicobacter pylori*-Stämmen schützend wirken. Auch eine an Obst, Gemüse, Fisch und Rohfasern reiche Ernährung sowie die Aufnahme von Antioxidanzien senken das Risiko [4].

1.2 Entstehung von Krebserkrankungen

Die Entstehung von gutartigen (benignen) und bösartigen (malignen) Tumoren durch die Einwirkung von Chemikalien wird als chemische Kanzerogenese bezeichnet. Dabei unterscheidet man genotoxische und epigenetische Kanzerogene. Die genotoxische Kanzerogenese beruht auf der Reaktion von Substanzen mit Biomolekülen, v.a. der DNA wodurch es zu Mutationen kommen kann. Diese Reaktionen können entweder mit der Substanz direkt oder nach vorhergehender Metabolisierung ablaufen. Zu den genotoxischen Kanzerogenen gehören unter anderem aromatische Amine, polyzyklische Kohlenwasserstoffe und Nitrosamine. Epigenetische Kanzerogene reagieren dagegen nicht mit der DNA. Sie wirken krebsauslösend indem sie beispielsweise über Entzündungsvorgänge oder cytotoxische Wirkungen zu einer gesteigerten Proliferation führen. Andere Substanzen haben hormonähnliche Wirkung oder wirken tumorpromovierend.

Die Tumorentstehung wird in die drei Stufen Initiation, Promotion und Progression unterteilt. (Abbildung 3). Die Initiation einer Zelle beruht meistens auf einer Veränderung der Erbinformation durch genotoxische Kanzerogene. Epigenetisch wirksame Substanzen können aber ebenfalls zur Initiation führen, indem beispielsweise das Methylierungsmuster der DNA

verändert wird. Die Initiation ist ein schneller Vorgang, der schon durch kurzen Kontakt mit dem Kanzerogen ausgelöst werden kann. Sie findet nur in sich teilendem Gewebe statt. Die Tumorpromotion bezeichnet die Entstehung eines gutartigen Tumors aus initiierten Zellen. Sie läuft im Gegensatz zur Initiation sehr langsam ab und dauert oft Jahre oder Jahrzehnte. Unter der Einwirkung von Tumorpromotoren zeigen initiierte Zellen einen Wachstumsvorteil gegenüber normalen Körperzellen. Die Tumore bleiben in diesem Stadium aber auf das Ausgangsgewebe beschränkt. Tumorpromotoren sind selbst nicht kanzerogen, erhöhen aber die Tumorzinzidenz initiierten Zellen. Sie wirken oft organspezifisch. Zu den promovierenden Substanzen gehören z.B. polychlorierte Kohlenwasserstoffe. Der letzte Schritt der Kanzerogenese ist die Progression. Dabei kommt es durch weitere Mutationen zur Bildung bösartiger Tumorzellen, die auch in Nachbargewebe eindringen können. Die Mutationen führen zu einem uneingeschränkten Teilungsvermögen der Tumorzellen und können auch den Stoffwechsel der Zellen verändern.

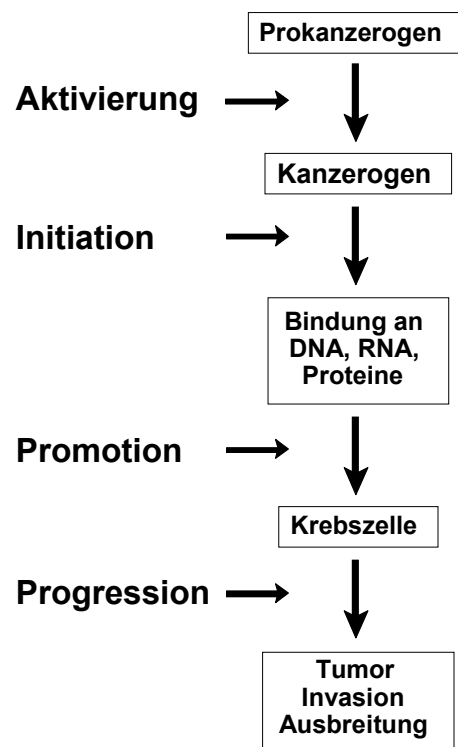


Abbildung 3: Mehrstufenkonzept der Kanzerogenese.

1.3 Myosmin

Myosmin gehört neben Nicotin zu den ersten strukturell aufgeklärten Tabakalkaloiden. Bereits 1933 wurde es aus Zigarrenrauch isoliert und nur wenige Jahre später gelang die Strukturaufklärung [7]. Durch Dehydrogenierung von Nicotin bei 570 °C konnte dann 1944

Myosmin gewonnen werden. In der heranwachsenden Pflanze ist Nicotin ebenfalls das Ausgangsprodukt für Myosmin. Zunächst wird es zu Nornicotin demethyliert. Durch Dehydrogenierung von Nornicotin wird Myosmin gebildet, das in weiteren Folgereaktionen zu Nicotinsäure abgebaut wird (Abbildung 4) [8,9].

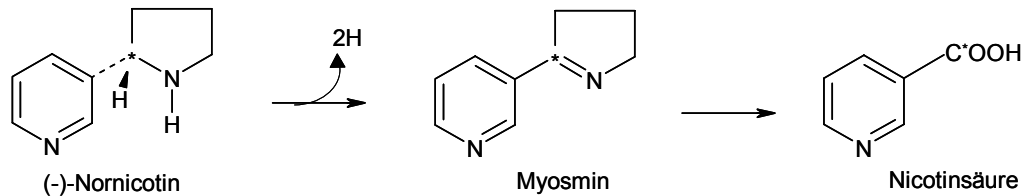


Abbildung 4: Bildung von Myosmin durch Dehydrogenierung von Nornicotin.

In Rohtabak liegt der Myosmingehalt bei 0,9 bis 2 mg/g [10]. Die Untersuchung des Tabakrauches verschiedener Zigarettenarten ergab Myosmingehalte von 13-33 µg/Zigarette im Hauptstromrauch und 73-224 µg/Zigarette im Nebenstromrauch [11]. Die Luft eines Raumes in dem geraucht wird, enthält etwa 0,04 bis 0,185 µg/m³ Myosmin [12]. Bei einem Atemaus-tauschvolumen von 20 m³/Tag und unter Annahme einer zu Nicotin vergleichbaren 70%-igen Inhalation des Alkaloids aus dem ETS [13] nimmt ein Erwachsener über die Passivrauch-belastung 0,06-2,6 µg/Tag Myosmin zu sich. Das Vorkommen von Myosmin ist jedoch nicht nur auf den Tabak begrenzt. In Blättern und Wurzeln des australischen Nachtschattengewäch-ses *Duboisia hopwoodii*, dessen Blätter wegen ihrer narkotisierenden Wirkung von den Aborigines gekaut werden, konnte Myosmin nachgewiesen werden [14]. In der Papaya (*Carica Papaya*) ist Myosmin ebenfalls enthalten [15]. In diesem Zusammenhang wird die für Nicotin und dessen strukturverwandte Alkaloide bekannte insektizide Wirkung auch für Myosmin diskutiert [15]. Beide Pflanzen können jedoch als Quellen für die tabakunabhängige Myosminbelastung der Weltbevölkerung vernachlässigt werden. Erste Ergebnisse für eine wesentlich weitere Verbreitung von Myosmin lieferten die Ergebnisse von Zwickenpflug et al. [16] aus der Arbeitsgruppe von Prof. Richter. In verschiedenen Proben von Erd- und Haselnüssen konnte Myosmin in Konzentrationen zwischen 0,2 und 2 ng/g nachgewiesen werden. Mit dem Verzehr von 100 g Nüssen nimmt der Mensch zwischen 0,02 und 0,20 µg zu sich. Diese Belastung liegt in der gleichen Größenordnung wie jene durch ETS. In den daraufhin untersuchten Grundnahrungsmitteln wie Reis, Weizen, Mais und Kartoffel wurde Myosmin in ähnlichen Mengen gefunden [17]. Maier [18] konnte darüber hinaus Myosmin in Muttermilch und Speichel nachweisen. Die gefundenen Konzentrationen liegen abhängig vom

Rauchstatus der Mutter für die Muttermilch zwischen 0,17 und 1,34 ng/mL und für den Speichel zwischen 1,58 ng/mL (10,81 nM) und 1,87 ng/mL (12,79 nM).

Tabelle 3: Vorkommen von Myosmin in Nahrungsmitteln und Milchprodukten [16,17].

Myosmin nachgewiesen			Myosmin nicht nachgewiesen	
Pflanzenfamilie	Quelle	Konzentration ng/g	Pflanzenfamilie	Quelle
Haselgewächse (Corylaceae)	Haselnuss	0,7	Korbblütler (Compositae lig.)	Blattsalat
Schmetterlingsblütler (Papilionaceae)	Erdnuss	0,2 – 2,0	Gänsefußgewächse (Chenopodiaceae)	Spinat
Nachtschattengewächse (Solanaceae)	Kartoffel Tomate	2,41 – 4,47 0,53 – 0,66	Kürbisgewächse (Scrophulariaceae)	Gurke
Doldenblütler (Umbelliferae)	Karotte	0,01 – 0,03	Lauchgewächse (Liliaceae)	Zwiebel
Sterkuliengewächse (Sterculiaceae)	Kakao	0,68 – 0,85	Weinrebenengewächse (Vitaceae)	Weintraube
Rosengewächse (Rosaceae)	Apfel	1,12 – 1,25	Bananengewächse (Musaceae)	Banane
Ananasgewächse (Bromeliaceae)	Ananas	0,66 – 0,72	Rautengewächse (Rutaceae)	Mandarine Zitrone
Strahlengriffelgewächse (Actinidiaceae)	Kiwi	1,15 – 1,61		
Sauergräser	Hirse	0,41 – 0,43		
Süßgräser (Gramineae)	Weizen Reis Mais	0,37 – 0,51 0,19 – 1,15 0,48 – 1,60		
Milchprodukte	Milch	1,16 – 1,35		
	Sahne	5,93 – 6,26		

1.3.1 Chemische Eigenschaften von Myosmin

Myosmin, $C_9H_{10}N_2$, hat ein Molekulargewicht von 146,19 g/mol und einen pK_a Wert, der bei $7,81 \pm 0,2$ liegt [<http://www.cas.org/SCIFINDER/SCHOLAR>]. Myosmin ist unter alkalischen Bedingungen wasserdampfflüchtig, sein Schmelzpunkt liegt zwischen 39 und 42 °C. Das Absorptionsmaximum im Infrarotbereich liegt bei $\nu_{C=N} = 1618 \text{ cm}^{-1}$ [19-21], das Maximum der Absorption ultravioletter Strahlung befindet sich in 95% Ethanol bei $\lambda_{\text{max}} = 234 \text{ nm}$ [22].

In einer wässrigen Hydroxylamin-Lösung reagiert Myosmin als Carbonyl-Komponente. Dieses lässt auf ein reversibles Hydrolysegleichgewicht in wässriger Lösung schließen (Abbildung 5) [23]. Anhand von ^1H - und ^{13}C -NMR-Spektren ließ sich das pH-abhängige Gleichgewicht belegen. Im sauren pH-Bereich liegt fast ausschließlich die offenkettige Aminoketonform vor, wohingegen im neutralen und alkalischen Milieu die geschlossene Ringform überwiegt. In Pufferlösungen mit physiologischem pH-Wert von 7,4 befindet sich nur 1% des Myosmins in offenkettiger Form [24].

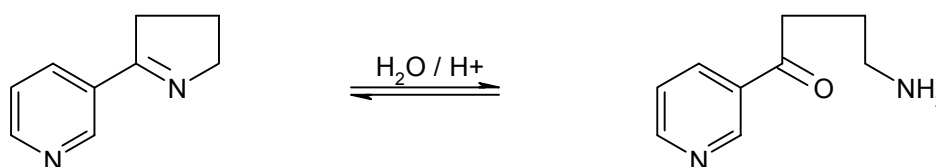


Abbildung 5: Reversibles Hydrolysegleichgewicht von Myosmin.

1.3.1.1 Toxikologische Bewertung von Myosmin

Verglichen mit Nicotin, dessen tödliche Dosis für den Menschen auf 40-60 mg geschätzt wird, ist Myosmin weit weniger toxisch. Der LD_{50} -Wert beträgt für Ratten zwischen 190 mg/kg (i.p.) und 1875 mg/kg (oral) [25,26]. Für L-Nicotin liegt die LD_{50} für Ratten bei 50 mg/kg (oral) und bei 14,5 mg/kg (i.p.) [<http://www.sigmaaldrich.com>]. Die akute Toxizität von Myosmin ist damit für Ratten 10-fach geringer verglichen mit der von Nicotin. In einem Versuch wurde Mäusen über einen Zeitraum von 50 Wochen täglich 0,5 mg Myosmin verabreicht. Diese Dosis überlebten 76% der Versuchsgruppe gegenüber 98% der Kontrollgruppe [27]. Im Ames-Test zeigte Myosmin keine mutagenen Eigenschaften, jedoch konnte die Induktion von DNA-Schäden im Testsystem *Escherichia coli* $\text{polA}^+/\text{polA}^-$ beobachtet werden [28]. In humanen Lymphozyten und Mukosazellen der Nasenschleimhaut erzeugt Myosmin eindeutig DNA Schäden, die mit dem Comet Assay nachgewiesen wurden [29].

1.4 Nitrosamine

N-Nitrosoverbindungen werden durch eine an ein Stickstoffatom gebundene Nitrosogruppe ($-\text{N}=\text{O}$) charakterisiert. Zu ihnen gehören die Nitrosamine und Nitrosamide. Nitrosamine entstehen bevorzugt im sauren Milieu aus sekundären Aminen und salpetriger Säure (Abbildung 6). Unter Einwirkung von Stickoxiden nitrosieren primäre und sekundäre Amine wiederum unabhängig von der Basizität des Amins [30]. Die eigentliche Reaktion erfolgt

dabei über das Nitrosylkation oder Nitrosylhalogenide. Durch das pH-Milieu des Reaktionsmediums lässt sich die Ausbeute über den Anteil des aktiven Nitrosierungsagens steuern. Das Optimum der Ausbeute liegt häufig bei pH-Werten von 3,0 bis 3,5. Ein niedrigerer pH-Wert kann zu einer Protonierung des Stickstoffs des sekundärenamins zum Iminiumion führen und dadurch die Reaktion mit nitrosierenden Substanzen behindern. Bei pH-Werten größer als 5 wird hingegen die säurekatalysierte Nitrosierung zunehmend unterbunden.

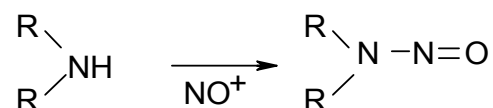


Abbildung 6: Vereinfachtes Schema der N-Nitrosierung.

Die akute Toxizität von *N*-Nitrosoverbindungen variiert stark. Die LD₅₀ des akut giftigsten Nitrosamins *N*-Nitrosomethylbenzylamin liegt bei 18 mg/kg Körpergewicht bei Ratten. Andere kanzerogene wirksame *N*-Nitrosamine zeigen dagegen keine akute Toxizität. Die Gabe letaler Dosen führt beim Mensch meist über massive Lebernekrosen zum Tod. *N*-Nitrosamine gehören zu den wirksamsten chemischen Kanzerogenen. Sie induzieren Tumoren in allen Spezies, die hierauf getestet wurden. Die kanzerogene Wirkung wurde ausführlich in Tierversuchen untersucht. Bis heute wurden mehr als 300 Verbindungen, darunter über 200 *N*-Nitrosodialkylamine getestet, wovon etwa 90% kanzerogen wirken [31]. Die Wirkung ist organspezifisch, in Nagern werden Tumore abhängig von der Art der Administration vor allem in Leber, Ösophagus, Nasen- und Mundschleimhaut, Lunge, Harnblase, Niere, Pankreas und Schilddrüse induziert. Allgemein betrachtet führen symmetrische *N*-Nitrosamine vor allem zur Bildung von Lebertumoren. Unsymmetrisch substituierte *N*-Nitrosamine erzeugen dagegen – zumindest bei der Ratte - vor allem Ösophagustumoren. Zyklische *N*-Nitrosamine zeigen keine einheitliche Organspezifität und erzeugen Tumoren in verschiedenen Geweben. Nitrosamine wirken als Präkanzerogene, die metabolisch aktiviert werden, wobei reaktive Metaboliten entstehen, die mit der DNA reagieren können (Abbildung 7). Die Aktivierung beginnt mit einer α -Hydroxylierung durch Cytochrom P450 Enzyme (CYP). Einfache *N*-Nitrosodialkylamine wie etwa *N*-Nitrosodimethylamin werden von CYP2E1 aktiviert. An der Umsetzung komplexerer Nitrosamine sind diverse andere CYP-Isoenzyme beteiligt. Alternativ zur Aktivierung kann es über eine Denitrosierung auch zu einer Entgiftung kommen, wobei hierbei das primäre Amin, das entsprechende Aldehyd, sowie NO[•] oder Nitrit gebildet werden. Die metabolische Aktivierung findet hauptsächlich in der Leber statt. Je nach Gewebslokalisation der Isoenzyme kann sie aber auch in extrahepatischen Geweben wie Dünndarm,

Lunge oder Ösophagus stattfinden. α -Hydroxynitrosamine zerfallen spontan, es entstehen Diazoniumionen, die das ultimale Kanzerogen darstellen. Der Großteil dieser Ionen reagiert mit Wasser und bildet dabei den entsprechenden Alkohol. Ein kleiner Teil aber reagiert mit Biomolekülen, wie DNA, RNA oder Proteinen und bildet Addukte. Mit DNA werden hauptsächlich N^7 -Alkylguanine gebildet, die jedoch nicht zu Mutationen führen. Darüber hinaus entstehen O^6 -Alkylguanine, die statt an Cytosin eher an Thymin binden und so zu G:C \rightarrow A:T Mutationen führen, die an der Krebsinitiation beteiligt sind [32]. Außerdem entstehen noch O^4 - und O^2 -Alkylthymidine, die ebenfalls kanzerogene Wirkung haben. Nach heutigem Kenntnisstand ist die Schädigung der DNA die Hauptursache für die kanzerogene Wirkung von N -Nitrosoverbindungen.

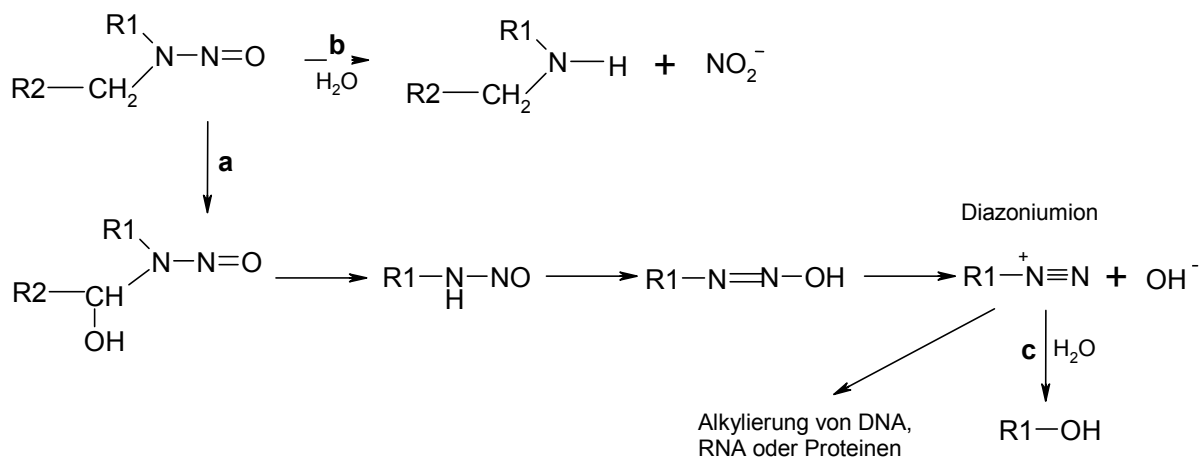


Abbildung 7: Reaktionsschema der N -Nitrosamine; a: Aktivierung durch α -Hydroxylierung; b: Entgiftung durch Denitrosierung; c: Hydrolyse zum entsprechenden Alkohol.

Für die ausgeprägte Organspezifität der Kanzerogenese durch N -Alkylnitrosamine sind neben der Applikationsart lokal unterschiedliche Aktivierungs- und Entgiftungsraten verantwortlich. Ein Beispiel hierfür ist N -Nitrosomethylbenzylamin, das Ösophaguskarzinome hervorruft. Im Ösophagus findet die Metabolisierung zu über 80% durch Angriff an der Methylengruppe der Benzylseitenkette statt, wobei Benzaldehyd und Methyl Diazohydroxid gebildet werden, in der Leber nur zu 50%. Entsprechend wird im Ösophagus 9-fach mehr O^6 -Methylguanin gebildet als in der Leber. Außerdem scheint im Ösophagus die Reparaturkapazität der O^6 -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase geringer zu sein, so dass es zu einer Anreicherung des promutagenen Schadens kommt. Auch die Entgiftungsreaktion des α -Hydroxynitrosamins zum entsprechenden Glucuronid findet scheinbar nicht statt [31].

1.4.1 Vorkommen und Bildung von Nitrosaminen

Die Nitrosaminbelastung des Menschen setzt sich aus diversen Faktoren zusammen. Auf der einen Seite werden vom menschlichen Körper in allen Bereichen des täglichen Lebens Nitrosamine zusammen mit anderen Giftstoffen aufgenommen, zum anderen besteht im Organismus selbst die Möglichkeit der **endogenen Nitrosierung** von Substanzen.

Es ist prinzipiell davon auszugehen, dass Amine im menschlichen Organismus durch endogene Nitrosierung die gleichen Nitrosamine bilden, die sich auch *in vitro* durch klassische Nitrosierungsmechanismen darstellen lassen. Eine chemische Nitrosierung findet beispielsweise im sauren pH-Milieu des Magens statt, wenn Amine als nitrosierbare Vorstufen und Nitrit oder Stickoxide vorhanden sind. Der Nitritgehalt im Magen lässt sich hauptsächlich auf Nitrat zurückführen, das mit der Nahrung aufgenommen wird. Dieses wird vom Gastrointestinaltrakt resorbiert und mit Hilfe eines Anionen-Transportsystems zu 25% in den Speichel abgesondert [33-35]. Eine bakterienvermittelte Nitrosierung findet u.a. über die Bakterien der Mundhöhle statt, die mehr als 20% des Speichelnitrats, also 5% der aufgenommenen Menge, zu Nitrit reduzieren. Dieses wird nahezu komplett mit dem Speichel geschluckt und stellt so die Hauptquelle (80%) für Nitrit im Magen dar [35,36]. Eine nicht unerhebliche exogene Nitritquelle besteht in der Aufnahme von gepökeltem Fleisch oder Fisch. Die durchschnittliche Nitritkonzentration eines nüchternen Menschen liegt im Magensaft bei pH-Werten kleiner als 5 im Bereich von 0,1 bis 2,6 M und erreicht bei pH-Werten größer 5 Konzentrationen von 26 bis 54 M [37]. Dieses Nitrit wird allerdings beim Gesunden durch aktive Sekretion von Ascorbinsäure über Redoxreaktionen ständig abgebaut [38,39]. Ein hoher pH-Wert des Magensaftes deutet auf einen achlorhydrischen Magen hin, der optimale Bedingungen für das Wachstum von Darmbakterien wie *Escherichia coli* und *Proteus spp.* bietet. Diese Bakterien sind in der Lage, größere Mengen Nitrat zu Nitrit zu reduzieren. Sie katalysieren unter Mitwirkung eines molybdänhaltigen Enzyms die Synthese von Nitrosaminen auch bei höheren pH-Werten [40-42].

Ein Entzündungsgeschehen kann ebenfalls für die endogene Bildung von Nitrosaminen verantwortlich sein. Entzündungszellen in Organen mit chronischer Infektion oder Entzündung können Stickoxide bilden. Im Rahmen der Immunstimulation werden diese durch Makrophagen und Neutrophile induziert. Unter Beteiligung des Enzyms NO-Synthase wird in einer Sauerstoff- und NADPH-abhängigen Reaktion der endständige Guanidino-Stickstoff des L-Arginins oxidiert, wobei Citrullin gebildet und NO[•] freigesetzt wird. NO[•] dient als Vasodilatator in den Arteriolen und als Neurotransmitter. Da es jedoch in großem Überschuss

produziert wird, reagiert der überwiegende Teil mit dem im Blut gelösten Sauerstoff zu den potenten Nitrosierungsagenzien N_2O_3 und N_2O_4 [32,43,44].

Eine Blasen- oder Harnwegsinfektion durch bestimmte Bakterien, die ihrerseits Nitrosierungspotenzial besitzen, kann eine zusätzliche Nitrosaminexposition bewirken [45].

Die bedeutendsten Quellen für die **exogene Nitrosaminbelastung** stellen neben dem Rauchen, Tabakschnupfen und -kauen [46] Nahrungsmittel, Kosmetika und die berufsbedingte Exposition dar [47]. In Nahrungsmitteln stellt das starke Kanzerogen *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA) mit etwa 1 µg Aufnahme pro Tag den größten Anteil, außerdem sind *N*-Nitrosopiperidin und *N*-Nitrosopyrrolidin von Bedeutung. Neben diesen flüchtigen Nitrosaminen finden sich ferner auch wenig bis nicht kanzerogene, nichtflüchtige Nitrosamine, beispielsweise *N*-Nitrososarcosin, *N*-Nitrosoprolin und *N*-Nitrosothiazolidincarbonsäure in Lebensmitteln. Die Aufnahme von Nitrosaminen kann bei flüchtigen Verbindungen über die Lunge und die Haut stattfinden. Am häufigsten werden sie über den Verdauungstrakt aufgenommen und meist sehr effizient bei der Leberpassage metabolisiert. Die meisten kurzkettigen *N*-Alkylnitrosamine werden zu etwa 60% als CO_2 abgeatmet. Der Rest wird mit dem Urin, ein sehr geringer Anteil auch über die Fäzes ausgeschieden. Gut wasserlösliche Hydroxyalkylnitrosamine werden dagegen hauptsächlich über den Urin ausgeschieden.

Ein Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Nitrosaminen und der Krebsentstehung beim Menschen lässt sich an verschiedenen Beispielen zeigen. *N*-Nitrosoverbindungen verursachen im Tierversuch Magentumoren. Besonders viele Magentumoren beim Menschen treten in Regionen auf, in denen viel Nitrit mit der Nahrung aufgenommen oder viel Fisch gegessen wird, dessen Amine besonders gut nitrosierbar sind. Ein weiteres Beispiel ist die geringere Häufigkeit von Magentumoren in Gebieten in denen viel Vitamin C mit der Nahrung aufgenommen wird, da Vitamin C die Nitrosierungsreaktion hemmt.

Zu den Nitrosaminen, die Tumoren im Ösophagus erzeugen gehören *N*-Nitrosodipropylamin, das u.a. als Verunreinigung in Pflanzenschutzmitteln und alkoholischen Getränken vorkommt, *N*-Nitrosodibutylamin, das in Gummiwaren aber auch in Fleisch und Fisch enthalten sein kann und *N*-Nitrosomethylphenylamin, das in der Gummiindustrie auftritt (Abbildung 8) [31]. *N*-Nitrosomethylbenzylamin wird in China als Verunreinigung in der Nahrung mit der dort erhöhten Inzidenz von Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus in Verbindung gebracht. Das im Tabak vorkommende *N*-Nitrosornicotin ist zusammen mit Alkohol wahrscheinlich für den Ösophaguskrebs der Raucher verantwortlich. Im Modell der Refluxösophagitis an der

Ratte bestätigt sich die hohe Kanzerogenität der beiden zuletzt genannten Nitrosamine und auch des *N*-Nitrosomethylpentylamins [48-51].

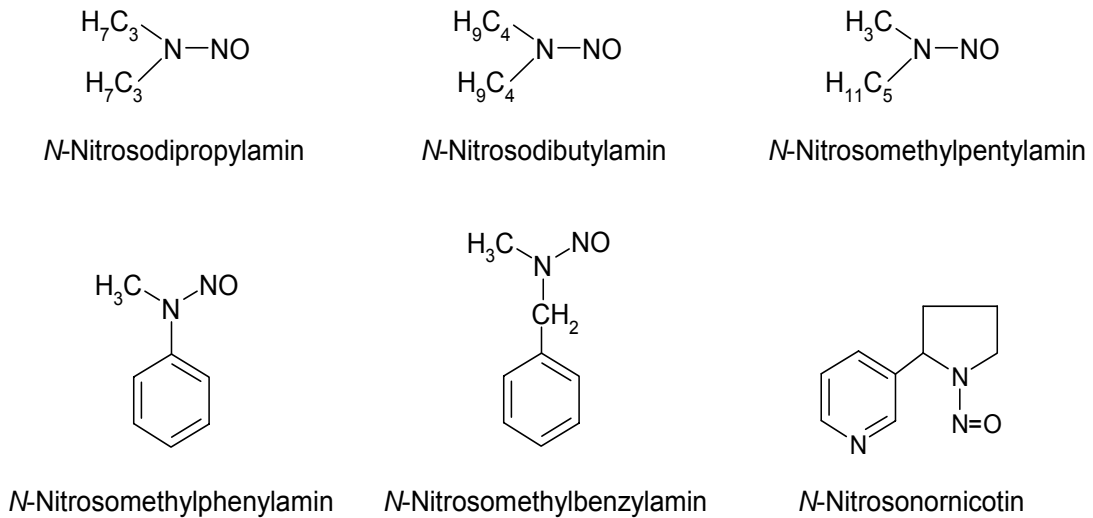


Abbildung 8: Kanzerogene *N*-Nitrosamine, die Ösophagustumoren verursachen.

1.4.2 Nitrosierung von Myosmin

Die Nitrosierung von Myosmin wurde erstmalig in einer Veröffentlichung von Zwickenpflug [52] detailliert beschrieben. Er untersuchte die direkte Nitrosierung von Myosmin mit N_2O_3 in Pufferlösungen mit pH-Werten von 5,5 bis 9. Es resultierte ein Reaktionsgemisch, das in Abhängigkeit vom pH-Milieu zu unterschiedlichen Anteilen aus *N'*-Nitrosornicotin (NNN) und dem Ketoalkohol 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) bestand. Diese Nitrosierungsprodukte konnten von Zwickenpflug außerdem in humanem Magensaft nach Zusatz von $NaNO_2$ nachgewiesen werden. Eine Erklärung liefert das zuvor beschriebene reversible Hydrolysegleichgewicht des Myosmins. Unter sauren Bedingungen hydrolysiert Myosmin zur offenkettigen Aminoketonform, und die Nitrosierung des primären Amins führt zu einem instabilen Diazohydroxid, das *in situ* wahrscheinlich zum Ketoalkohol zerfällt. Höhere pH-Werte begünstigen dagegen die Bildung von NNN aus der geschlossenen Iminform des Myosmins. Weitere ausführliche Untersuchungen zur pH-Abhängigkeit der Myosminnitrosierung mit radioaktiv markiertem Myosmin zeigten jedoch überraschenderweise auch eine Zunahme der NNN-Bildung bei pH-Werten unter 2. Hier wurde sogar mehr NNN als HPB gebildet [53]. Für die Bildung reaktiver Zwischenprodukte erscheint der direkte Weg zum Ketoalkohol von besonderer Bedeutung zu sein. Während das NNN zur Bildung reaktiver Produkte eine metabolische Aktivierung benötigt, entsteht das HPB bei der Nitrosierung von

Myosmin direkt über eine instabile Zwischenstufe (Abbildung 9). Das hierbei wahrscheinlich auftretende reaktive Diazohydroxid, ist als starkes Elektrophil in der Lage, nicht nur mit Wasser zum HPB zu reagieren, sondern auch mit zellulären Makromolekülen kovalente Bindungen einzugehen. Dies wurde mit radioaktiv markiertem Myosmin in Nitrosierungsansätzen an Kalbsthymus-DNA nachgewiesen [53].

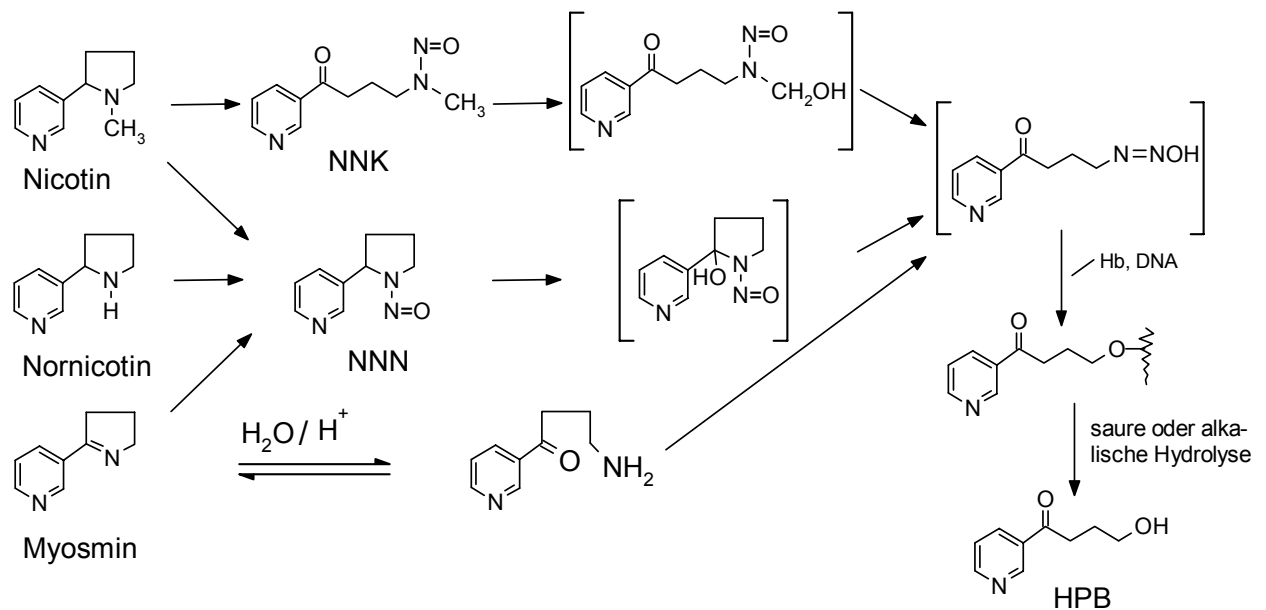


Abbildung 9: Beitrag von Myosmin zur Entstehung von HPB freisetzenden Addukten (reaktive Zwischenstufen sind durch eckige Klammern gekennzeichnet).

1.4.3 Pyridyloxobutyl-Addukte

Als einzige Quelle für HPB freisetzende Addukte galten bisher 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und NNN. HPB wird daher auch als Biomarker für die Belastung mit tabakspezifischen Nitrosaminen eingesetzt. NNK und NNN sind die stärksten kanzerogenen Nitrosamine im Tabakrauch und wurden von der IARC als kanzerogen für den Menschen eingestuft (<http://www.iarc.fr>). In Versuchen an Ratten konnte gezeigt werden, dass für NNK eine konzentrationsabhängige Beziehung zwischen der Bildung von HPB-Addukten und der Zahl gebildeter Lungentumoren besteht [54]. NNN führt bei Ratten vor allem zur Bildung von Tumoren im Ösophagus und der Nasehöhle. Zielorgane sind bei der Maus die Lunge, beim Hamster Nasehöhle und Lunge. Beim Nerz, der einzigen untersuchten Spezies, die nicht zu den Nagetieren gehört, erzeugt NNN ebenfalls Tumoren, vor allem in der Nasehöhle. Beim Menschen wird ein Zusammenhang mit der Entstehung von Ösophaguskrebs vermutet.

Anders als Myosmin muss NNN durch α -Hydroxylierung metabolisch aktiviert werden. Für die HPB-Bildung ist die Hydroxylierung in der 2'-Position der entscheidende erste Schritt. Diese Reaktion wird von verschiedenen Cytochrom P450-Isoenzymen (CYP) katalysiert, wobei den Isoenzymen aus der 2A-Klasse wohl die größte Bedeutung zukommt. Das Isoenzym CYP2A13 katalysiert beispielsweise die 2'-Hydroxylierung von (R)-NNN, das bis zu 25% des NNN im Tabak ausmacht [55]. Das bei dieser Reaktion entstehende instabile Diazohydroxid kann entweder direkt zu HPB hydrolysiert werden oder Biomoleküle wie DNA, RNA oder auch Hämoglobin alkylieren. Mit DNA werden unterschiedlich stabile Addukte gebildet [56]. Außerdem hemmt eines der identifizierten Pyridyloxobutyl-Addukte, das O^6 -[1-oxo-1-(3-pyridyl)but-4-yl]-d-Guanosin, die Aktivität der O^6 -Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT). Dieses Enzym katalysiert die Reparatur von alkylierter DNA, insbesondere von O^6 -Methylguanin. O^6 -Methylguanin kommt in Geweben, in denen sich Tumoren bilden häufig vor und scheint eine Rolle in der Tumorentstehung zu spielen. Da das Enzym bei der Reaktion inaktiviert wird, schwächen die Pyridyloxobutyl-Addukte die Reparaturkapazität der Zelle [57,58].

1.5 Freie Radikale und andere reaktive Spezies

Freie Radikale sind Atome oder Moleküle mit einem oder mehreren ungepaarten Elektronen. Sie sind sehr reaktiv und können daher mit Biomolekülen wie DNA, RNA, Proteinen und Lipiden reagieren. Freie Radikale oder Folgeprodukte der Lipidperoxidation können zu Mutationen in krebsassoziierten Genen und posttranslationalen Modifikationen von Proteinen beispielsweise durch Phosphorylierung oder Nitrosylierung führen. Außerdem können freie Radikale über die Signaltransduktionskaskade in Zellwachstum und Tumorförderung eingreifen, wobei es u.a. zur Induktion von Protoonkogenen kommen kann. Der Körper schützt sich auf verschiedenen Wegen vor freien Radikalen. Zum einen reagieren verschiedene Enzyme wie Peroxidasen oder Katalase mit freien Radikalen. Außerdem fangen Antioxidanzien wie die Vitamine E und C oder das Glutathion die Radikale ab, so dass ein Schaden vermieden wird. Darüber hinaus können bereits entstandene Schäden besonders der DNA auch wieder repariert und irreparabel geschädigte Moleküle abgebaut werden.

1.5.1 Reaktive Sauerstoffspezies

Für die ATP-Gewinnung in den Mitochondrien wird Sauerstoff zu Wasser reduziert. Läuft diese Reaktion unvollständig ab, so entstehen reaktive Sauerstoffspezies. Dazu gehört der Singulett-Sauerstoff, der zur Lipidperoxidation oder zu Schäden an Proteinen führen kann.

Das Superoxidanion (O_2^-) ist selbst nicht sehr reaktiv, ist aber ein Vorläufer anderer reaktiver Sauerstoffspezies. Es wird von der Superoxid-Dismutase zu Wasserstoffperoxid und Sauerstoff disproportioniert. Zusätzlich zu seiner Entstehung bei der Zellatmung wird es auch von phagozytierenden Leukozyten gebildet und ist deshalb in der Wundheilung und der Abwehr von bakteriellen Infektionen von essentieller Bedeutung.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist ein schwaches Oxidationsmittel, das einige Enzyme deaktivieren kann. Es kann durch Membranen diffundieren und in Verbindung mit zweiwertigem Eisen zur Bildung des Hydroxylradikals führen. Es wird im Körper v.a. durch Katalase und Glutathionperoxidase inaktiviert.

Hydroxylradikale (OH^\bullet) sind sehr reaktiv. Sie können radikalische Kettenreaktionen wie etwa bei der Lipidperoxidation auslösen. Außerdem können sie mit der DNA reagieren und zu Basenmodifikationen oder Strangbrüchen führen.

1.5.2 Reaktive Stickstoffspezies

Nitrosierende Moleküle, die unter bestimmten Bedingungen wie chronischen Entzündungen entstehen, können die Zelle schädigen. Auf der anderen Seite können nitrosierende Verbindungen aber auch eine Rolle im Zellschutz spielen, indem sie die entsprechenden Signalwege regulieren.

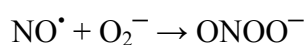
1.5.2.1 Stickstoffmonoxid

Ende der 1980er Jahre wurde entdeckt, dass Stickstoffmonoxid (NO^\bullet) *in vivo* wichtige Funktionen hat. Es wirkt regulierend auf das Nerven-, Immun- und Kardiovaskularsystem und spielt eine wichtige Rolle für das Überleben der Zelle. Während es in niedrigen Konzentrationen antiapoptotisch wirkt, induzieren erhöhte Konzentrationen den programmierten Zelltod [59]. NO^\bullet ist ein gasförmiges freies Radikal, das durch Membranen diffundieren kann. Im Körper wird seine Bildung von NO-Synthasen (NOS) katalysiert. Das Stickstoffatom des Guanidinrestes von L-Arginin wird unter Bildung von L-Citrullin zu NO^\bullet oxidiert. Es gibt zwei Hauptgruppen von NOS. Die konstitutiven NOS werden in bestimmten Zelltypen ständig exprimiert. Bei steigenden intrazellulären Calcium-Konzentrationen führen sie zur Bildung nanomolarer NO^\bullet -Konzentrationen, die als Signalmoleküle dienen. Sie kontrollieren u.a. den Blutdruck, regulieren eisenbindende Enzyme und wirken als Neurotransmitter. Die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) wird durch Cytokine und/oder bakterielle Produkte induziert. Sie führt zur Bildung höherer, mikromolarer NO^\bullet -Konzentrationen, die cytotoxisch wirken und beispielsweise der Bakterienabwehr dienen.

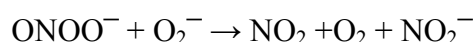
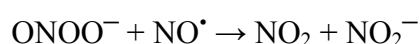
NO^\bullet reagiert selbst nur langsam mit Biomolekülen. Aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit sind nur Reaktionen mit anderen Radikalen oder mit Metallzentren von biologischer Bedeutung. Höhere NO^\bullet -Konzentrationen führen über Reaktionen mit O_2 oder Superoxid (O_2^-) zur Bildung von reaktiven Stickoxiden (RNOS), die reaktiver sind und mehr Biomoleküle modifizieren können als NO^\bullet selber. Je nach gebildeter RNOS-Spezies kann es in der Zelle zu nitrosierendem und oxidativem Stress kommen.

1.5.2.2 Peroxynitrit

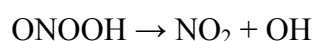
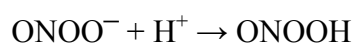
Das Peroxynitritanion (ONOO^-) wird *in vivo* durch die Reaktion des Stickstoffmonoxidradikals mit dem Superoxidanion gebildet.



Es steht im Gleichgewicht mit seiner protonierten Form, der peroxysalpetrigen Säure (ONOOH). Die Halbwertszeit von $\text{ONOO}^-/\text{ONOOH}$ beträgt bei physiologischem pH-Wert etwa 0,7 s [60]. Im Körper wird es in signifikanten Mengen im Verlauf von Entzündungsreaktionen gebildet, wenn u.a. aktivierte Makrophagen oder Neutrophile NO^\bullet freisetzen. Peroxynitrit wirkt stark oxidierend oder nitrierend auf verschiedene organische Moleküle wie Proteine, Lipide, Thiole und Nukleinsäuren, mit denen es direkt oder radikalvermittelt reagiert. Bei der Reaktion mit DNA kommt es zu Mutationen, vor allem Einzel-Basenpaar-substitutionen. Außerdem können Enzymaktivitäten und Signalketten beeinflusst werden [61,62]. Liegen die Moleküle aus denen es gebildet wird nicht in gleichen Konzentrationen vor, so reagiert es mit der im Überschuss vorhandenen Spezies zu NO_2 , das oxidierend wirkt.



Liegen weder NO^\bullet noch O_2^- im Überschuss vor, wird über eine homolytische Spaltung trotzdem NO_2 gebildet [63].



Der Körper schützt sich vor Peroxynitrit zum einen durch Abfangen des Moleküls durch Antioxidanzien und zum anderen durch Bekämpfung der Radikale aus denen es gebildet wird. Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von Peroxynitrit wird für *in vitro* Versuche oft 3-Morpholinonydnonimin (SIN-1) eingesetzt. SIN-1 ist ein Metabolit des Nitrovasodilatators Molsidomin. Bei physiologischen pH-Werten zerfällt es und setzt dabei NO^\bullet und O_2^- frei, aus denen

Peroxynitrit gebildet wird. 1 mM SIN-1 führt im sauerstoffgesättigten Zellkulturmedium für einen Zeitraum von mindestens zwei Stunden zu einer linearen Peroxynitritfreisetzung von etwa 12 $\mu\text{M}/\text{min}$. Stehen nicht genügend Sauerstoff oder endogene Oxidationsmittel zur Verfügung, so wird mehr NO^{\bullet} als O_2^{\ominus} freigesetzt [64].

1.6 Toxikologische Testmethoden

Der Toxikologie steht heute eine ganze Batterie von Testsystemen zur Verfügung. Früher wurde die Wirkung von Substanzen hauptsächlich am lebenden Tier untersucht. Für bestimmte Fragestellungen, wie etwa die Zulassung von Arzneimitteln sind diese Tests nach wie vor unumgänglich. Um die Zahl von Tierversuchen jedoch so weit wie möglich zu verringern, sowie um Zeit und Kosten zu sparen, werden inzwischen immer mehr Tests an Bakterien- oder Zellkulturen durchgeführt. Insbesondere Ergebnisse von Versuchen an Säugetierzellen können aufgrund ihrer anatomischen, physiologischen und biochemischen Ähnlichkeiten zumindest qualitativ auf den Menschen übertragen werden. Verwendung finden zum einen Primärzellen, die direkt aus dem Gewebe entnommen werden, zum anderen permanente Zelllinien. Primärzellen können für einige Tage bis Wochen kultiviert werden. Zumindest zu Beginn der Kultur zeigen sie noch die gleichen Eigenschaften wie Zellen *in vivo*. Während der Kultur besteht allerdings die Gefahr, dass die Zellen ihre Differenzierung verlieren. Außerdem muss mit erheblichen interindividuellen Unterschieden gerechnet werden. Deshalb stellen Zelllinien, die durch eine genetische Veränderung unbegrenzte Teilungsfähigkeit erlangt haben, eine wichtige Alternative dar. Häufig sind diese Zelllinien aus einem Tumor gezüchtet oder mit einem krebserzeugenden Agens behandelt worden. Gegenüber Primärzellen haben sie außer ihrer Teilungsfähigkeit den Vorteil, dass sie robuster und homogener sind. Auch sie können jedoch im Laufe der Passagen ihre Eigenschaften verändern. Außerdem unterscheidet sich ihr Metabolismus häufig deutlich von dem nicht transformierter Zellen *in vivo*.

1.6.1 Test auf Cytotoxizität

Werden Zellkulturen als Testsystem eingesetzt, so beginnt man die Untersuchung einer Substanz mit Tests auf ihre Cytotoxizität. Einfache Methoden hierfür sind der **Neutralrot-** und der **Trypanblau-Ausschluss**. Neutralrot ist ein kationischer Farbstoff, der per Diffusion in die Zellen aufgenommen wird. Der Farbstoff akkumuliert in den Zellen, indem er an die lysosomale Matrix bindet. Geschädigte Zellen sind nicht in der Lage, den Farbstoff zurückzuhalten, so dass zwischen lebenden und geschädigten Zellen unterschieden werden kann.

Trypanblau kann ebenfalls nur in geschädigte Zellen eindringen. Sein Anion bindet an Zellproteine und färbt die Zelle so tiefblau an.

Sensitiver ist der **MTT-Test**. Mit diesem Vitalitätstest wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt. Die Methode beruht auf der enzymatischen Reduktion des löslichen, gelben Tetrazoliumsalzes MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) zu einem blauen, unlöslichen Formazan (Abbildung 10), die nur in lebenden Zellen abläuft.

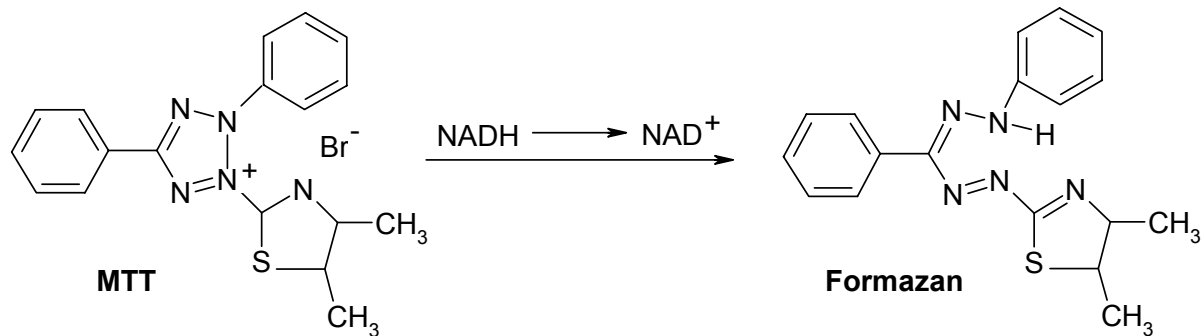


Abbildung 10: Umsetzung des gelben Tetrazoliumsalzes MTT zu blauem Formazan.

1.6.2 Untersuchung der Genotoxizität

Als genotoxisch werden Effekte von Xenobiotika bezeichnet, die zu Veränderungen der DNA führen. Die Auswirkungen können vielfältig sein. Man unterscheidet dabei zwischen Veränderungen (Aberrationen) des Chromatidtyps und des Chromosomentyps. Zu den Chromatidaberrationen gehören Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA, die beispielsweise durch alkylierende Substanzen hervorgerufen werden können. Außerdem zählen zu dieser Gruppe die Mikroläsionen, die durch elektrophile Agenzien hervorgerufen werden. Sie führen zu Gen- oder Punktmutationen sowie zu Austausch zwischen Schwesterchromatiden. Chromosomenaberrationen, die das Chromosom als Ganzes betreffen, führen dagegen zu Ringbildungen und azentrischen Fragmenten. Die Folgen für den Menschen hängen stark davon ab, ob die Mutationen in Körper- oder Keimzellen auftreten. Mutationen in Körperzellen werden über mitotische Teilungen auf die Tochterzellen übertragen und können u.a. zur Tumorentstehung, zu Atherosklerose oder anderen Altersvorgängen führen. Die Nachkommen werden von diesen genetischen Veränderungen jedoch nicht betroffen. In Keimzellen können Schäden im genetischen Material dagegen zu Erbkrankheiten und Fertilitätseinschränkungen führen. Der Großteil der menschlichen Erbkrankheiten wird durch rezessive Gene verursacht, d.h. die Krankheit tritt nur dann auf, wenn sowohl das von der Mutter wie auch das vom Vater

vererbte Gen die Mutation aufweisen. Entscheidend für die Folgen einer DNA-Schädigung ist der Zeitpunkt, an dem sie auftritt. Die Zelle hat bis zur nächsten DNA-Replikation Zeit, den entstandenen Schaden zu reparieren, bevor er durch Weitergabe an die Tochterzellen fixiert wird. Außerdem führen viele Mutationen schnell zum Tod der betroffenen Zelle, so dass die Anzahl dauerhafter (persistenter) Mutationen gering bleibt [31].

Für den Nachweis genotoxischer Effekte stehen eine Reihe von Testmethoden zur Verfügung. Am bekanntesten ist der bereits in den frühen 1970er Jahren von Bruce Ames entwickelte **Ames-Test**. Hierfür werden *Salmonella typhimurium*-Mutanten eingesetzt, welche die Aminosäure Histidin nicht selbst synthetisieren können. Werden diese Bakterien auf histidin-freien Nährböden gezüchtet, können nur Bakterien überleben, bei denen eine Rückmutation dazu geführt hat, dass Histidin wieder synthetisiert wird. Diese Rückmutation kann entweder spontan auftreten oder durch mutagene Substanzen induziert werden. Nachdem den Bakterien viele fremdstoffmetabolisierende Enzyme von Säugerzellen fehlen, wird im Ames-Test durch Zugabe von aktivierenden Systemen wie Rattenleberhomogenat häufig der Metabolismus von Säugetieren simuliert. Dadurch können auch Substanzen erfasst werden, die eine metabolische Aktivierung benötigen, um mutagene Wirkung zu zeigen.

Der **Mikrokerntest** weist Chromosomenmutationen nach. Es können chromosomenbrechende (klastogene) Ereignisse und die Induktion von Fehlverteilungen (Aneuploidie) nachgewiesen werden. Mikronuklei entstehen, wenn bei der Zellteilung Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen nicht auf die Tochterkerne verteilt werden, sondern sich mit einer Kernmembran umgeben.

Beim **Schwesterchromatid-Austauschtest** werden die beiden genetisch identischen Schwesterchromatiden unterschiedlich (meist mit Bromdesoxyuridin) angefärbt. Die Metaphasechromosomen in der zweiten Mitose nach der Färbung können dann auf Austausch zwischen den Chromatiden untersucht werden.

Mit der **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)** ist es möglich, ein ganzes Chromosom, das Zentromer eines bestimmten Chromosoms oder auch simultan alle Chromosomen eines Chromosomensatzes, Chromosomenenden oder einzelne Abschnitte (Gene) auf einem Chromosom zu lokalisieren. Die zu untersuchende DNA-Sequenz wird mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden angefärbt. Dadurch kann bei der Diagnose von fötalen Zellen oder Tumorzellen eine Translokation (Verlagerung eines Chromosomenabschnittes auf ein anderes Chromosom) einfach erkannt werden.

1.6.2.1 Comet-Assay

Die Genotoxizität von Myosmin wird in dieser Arbeit mit Hilfe des alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assays untersucht. Aufgrund des Aussehens der elektrophoretisch aufgetrennten DNA wird dieser Test als Comet-Assay bezeichnet (Abbildung 11). Die Methode wurde bereits 1988 von Singh entwickelt [65]. Mit ihm lassen sich durch biologische, chemische oder physikalische Noxen hervorgerufene DNA-Schädigungen nachweisen. Untersuchungen können an praktisch allen zu Einzelzellen separierbaren Gewebetypen durchgeführt werden, wodurch sich der Test auch für *in vivo* Versuche eignet. Genauso gut können aber auch Zellkulturlinien als Testsystem eingesetzt werden [66].

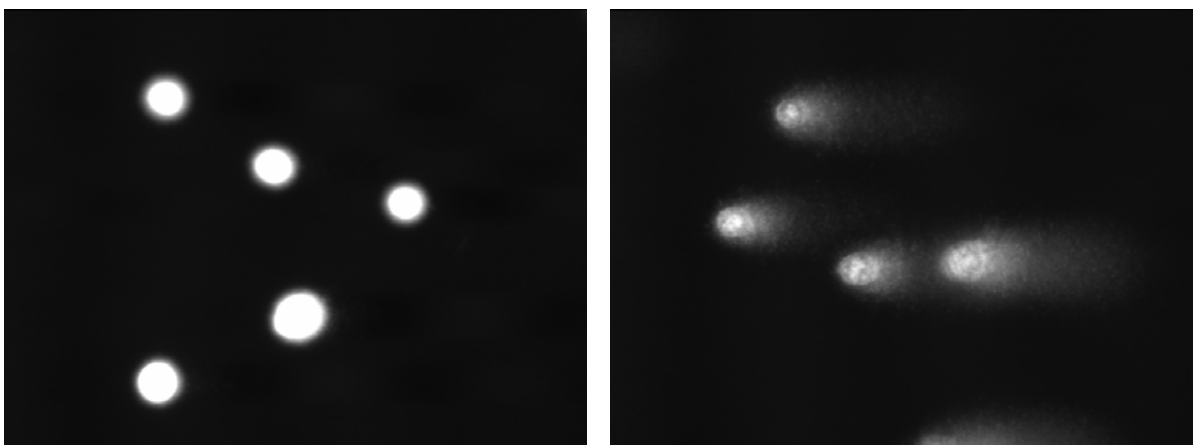


Abbildung 11: links: ungeschädigte OE33-Zellen; rechts: Zellen nach 1-stündiger Behandlung mit 5 µM MNNG.

In seiner alkalischen Form weist der Comet-Assay Einzel- und Doppelstrangbrüche nach. Einzelstrangbrüche werden schnell repariert, so dass sie kaum zu letalen oder mutagenen Schäden führen. Bei der Excisionsreparatur entstehende kleine DNA-Fragmente bilden ebenfalls einen Teil des Schweifes. Außerdem können Apyrimidin- und Apurin-Stellen nachgewiesen werden, die entstehen wenn veränderte DNA-Basen durch Reparaturenzyme entfernt werden. Diese Stellen sind alkalilabil, so dass im stark basischen Elektrophoresepuffer Strangbrüche entstehen. Die Entfernung zwischen den DNA-Strangbrüchen liegt im Bereich von etwa 10^9 Da, das entspricht einer Länge von 1 mm. Die Länge des Cometenschweifs beträgt jedoch nur einige Hundertstel dieser Strecke. Der Schweif wird wahrscheinlich aus so genannten Loops gebildet, die entstehen, wenn sich die „supercoiled“ DNA nach einem Strangbruch relaxiert. Je mehr Strangbrüche entstehen, umso höher ist die Anzahl der entstehenden Loops und umso mehr DNA findet sich im Schweif. Als Maß für die Schädigung der DNA dient das Olive Tail Moment (OTM). Es berechnet sich aus dem Anteil der DNA im

Schweif multipliziert mit dem Abstand zwischen den Zentren von Kopf und Schweif als Maß für die mittlere Wegstrecke der DNA. Zusätzliche Informationen lassen sich durch den Einsatz von Reparaturenzymen gewinnen. Die DNA wird nach der Lyse auf dem Gel mit läsionsspezifischen Reparaturenucleasen behandelt, die am Ort der Schädigung Strangbrüche einführen. Durch die Behandlung mit Endonuclease III können beispielsweise oxidierte Pyrimidine nachgewiesen werden. Die Behandlung mit Formamidopyrimidinglykosylase (FPG) dient dem Nachweis von 8-Hydroxyguanin, das durch oxidativen Stress entsteht [67]. Die Oxidation der Basen kann zu falschen Basenpaarungen und damit zu einer Veränderung der genetischen Information bzw. Mutationen führen.

Kleinsasser et al. [29] konnten mit Hilfe des Comet-Assays bereits eine sowohl konzentrations- als auch zeitabhängige DNA-Schädigung durch Myosmin nachweisen. Der Effekt wurde an Zellen aus Nasenschleimhautbiopsien und an Lymphozyten gezeigt.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Das tabakspezifische Nitrosamin *N*'-Nitrosornicotin (NNN) ist eines der wenigen Kanzerogene, das im Tierversuch Ösophagustumoren auslöst und vom Mensch bekanntermaßen aufgenommen wird. NNN muss metabolisch aktiviert werden, um Addukte zu bilden, die bei alkalischer oder saurer Hydrolyse HPB freisetzen. Die gleichen Addukte werden auch durch das tabakspezifische Nitrosamin 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) gebildet. Die Häufigkeit HPB-freisetzender DNA-Addukte in der Ösophagusschleimhaut unterscheidet sich bei Rauchern und Nichtrauchern kaum [68]. Daher muss es tabakunabhängige Quellen für HPB-freisetzende Addukte geben. Myosmin kann entweder direkt oder über NNN zu HPB-Addukten führen. Es konnte in unserem Arbeitskreis in einer Reihe von Grundnahrungs- und Genussmitteln, sowie in Muttermilch und im Speichel nachgewiesen werden [16-18]. Seitdem ist Myosmin nicht mehr als ausschließlich in Tabak vorkommend einzustufen. Damit stellt sich die Frage welche Rolle Myosmin bei der Krebsentstehung im Menschen spielt. Von besonderem Interesse ist dabei das Adenokarzinom des Ösophagus. Im Gegensatz zu dem früher hauptsächlich auftretenden Plattenepithelkarzinom gelten hier nicht Rauchen und Alkoholkonsum, sondern besonders ein aus der Refluxkrankheit resultierender Barrett-Ösophagus und Adipositas als Risikofaktoren [4,69].

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, welche Rolle Myosmin bei der Entstehung von HPB-Addukten bzw. Tumoren im Ösophagus spielt. Dazu soll der genotoxische Effekt von Myosmin mit Hilfe des Comet-Assays an humanen Ösophaguskarzinomzellen getestet wer-

den. Gearbeitet wird dabei nicht nur mit Myosmin allein, sondern die Bedingungen die im Ösophagus an der Karzinomentstehung beteiligt sein könnten sollen nach Möglichkeit abgebildet werden. Zum einen soll der Einfluss eines im Ösophagus durch Säurereflux entstehenden niedrigen pH-Wertes auf die Myosmintoxizität untersucht werden. Der Reflux führt außerdem zu chronischen Entzündungsreaktionen, in deren Verlauf reaktive Spezies wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Stickstoffmonoxid (NO^\bullet) und Peroxynitrit (ONOO^-) vom Ösophagusgewebe freigesetzt werden. Der Einfluss dieser reaktiven Verbindungen auf die Genotoxizität von Myosmin soll ebenfalls untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 *Material*

2.1.1 Software

- Microsoft Word 2002 (Microsoft Corporation)
- Microsoft Excel 2002 (Microsoft Corporation)
- Comet Assay II Version 2.11 (Perceptive Instruments Ltd)
- Prism 4 for Windows (GraphPad Software, Inc.)
- Reference Manager Professional Edition Version 10 (ISI Research Soft.)

2.1.2 Geräte

- 180 °C Wärmeschrank (Heraeus-Kendro, Langensebold)
- -80 °C Gefrierschrank Ultra Low Temperature Freezer (New Brunswick Scientific, Nürtingen)
- 8-Kanal-Pipette 30-300 µL (Eppendorf, Hamburg)
- Analysenwaage (Mettler, Giessen)
- Autoklav Varioklav (H + P Labortechnik, Oberschleißheim)
- Einfrierbehälter Cryo 1 C Freezing Container (Nalgene, Wiesbaden)
- Elektrophorese Consort Power Supply E 835 (Roth, Karlsruhe)
- Elektrophoresekammer Modell HU 13 W (Labtech International, Burkhardtsdorf)
- Fluoreszenzmikroskop BX 60 (Olympus, Hamburg)
- Inkubator Heracell 240 (Heraeus-Kendro)
- inoLab pH-Meter (Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim)
- Kühlpumpe C 25 P (Thermo Haake, Karlsruhe)
- Lichtmikroskop Axiovert 135M (Carl Zeiss, Göttingen)
- Magnetrührer, MAG-H (Bachofer, Reutlingen)
- Mikroskop Power Supply U-RFL-T (Olympus)
- Minifuge GL (Heraeus-Kendro)
- Multilabel Counter 1420 Victor² (PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim)
- Multipette plus (Eppendorf)
- Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim)
- Pipetten Eppendorf Research 0,5-10 µL; 10-100 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL (Eppendorf)

- Pipettierhilfe Pipetboy acu (Integra biosciences, Chur)
- Präzisionswaage A-150-SX (Cobos, Hamburg)
- Rotlichtlampen dukalux SL (Kindermann, Ochsenfurt)
- Sterilbank Hera safe (Heraeus-Kendro)
- Tischzentrifuge Hettich Mikro 22 R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen)
- Vortex-Rüttler VF2 (Jahnke + Kunkel IKA-Labortechnik, Staufen)
- Waage Mettler PC 440 (Mettler)
- Wasserbad Lauda-Thermostat (Messgeräte-Werk Lauda, Chur)

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

- 12-well Platten, steril (BD-Falcon, Heidelberg)
- 6-well Platten, steril (Nunc, Wiesbaden)
- 96-well Platten, steril (Nunc, Wiesbaden)
- Deckgläser, 24×60 mm (R. Langenbrinck, Emmendingen)
- Einmalspritzen 5 mL, 10 mL, 50 mL steril (B. Braun, Melsungen)
- Gewebekulturflaschen Cellstar 25 und 75 cm², steril (Greiner, Frickenhausen)
- Kanülen Sterican 0,90×40 mm (B. Braun)
- Kryoröhrchen 1,8 mL (Nalgene)
- Kryoröhrchen Halter; CryoSleeve (Nalgene)
- Multipettenspitzen Combitips Plus 5 mL, 10 mL (Eppendorf)
- Objektträger mit 5 mm Mattrand an den Längsseiten, 26×76 mm (R. Langenbrinck)
- Pasteurpipetten 230 mm (Fisher Scientific, Schwerte)
- Pipettenspitzen epT.I.P.S 0,5-20 µL, 2-200 µL, 20-300 µL, 50-1000 µL (Eppendorf)
- Reaktionsgefäße 1,5 mL, 2 mL (Eppendorf)
- Reaktionsgefäße 15 mL, 50 mL, steril (BD-Falcon)
- Serologische Pipetten 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL, einzeln steril verpackt (BD-Falcon)
- Sterilfilter Rotilabo-Spritzenfilter steril 0,22 µm, PVDF (Roth)
- Untersuchungshandschuhe Peha-soft (Hartmann, Heidenheim)

2.1.4 Chemikalien

- 1-Propanol (Merck, Darmstadt)
- DMSO; Dimethylsulfoxid (Roth)
- EDTA; Ethylendinitrilotetraessigsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)

- Ethanol 70% (Roth)
- Ethanol per analysis (Merck)
- Ethidiumbromid-Tabletten (Sigma-Aldrich)
- Glycerin (Roth)
- H₂O₂; Wasserstoffperoxid (Merck)
- HCl; Salzsäure 37% (Merck)
- HEPES (Roth)
- KCl; Kaliumchlorid (Sigma-Aldrich)
- KH₂PO₄; Kaliumdihydrogenphosphat (Sigma-Aldrich)
- KOH; Kaliumhydroxid (Sigma-Aldrich)
- LE-Agarose Sea Kem (Biozym, Hessisch Oldendorf)
- Low Melting Point Agarose Sea Plaque GTG (Biozym)
- MNNG; N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (Sigma-Aldrich)
- MTT; 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (Roth)
- Myosmin (im Arbeitskreis synthetisiert)
- Na₂HPO₄ × 2 H₂O; Dinatriumphosphat (Sigma-Aldrich)
- NaCl; Natriumchlorid (Merck)
- NaF; Natriumfluorid (Sigma-Aldrich)
- Na-Lauroylsarcosinat (Sigma-Aldrich)
- NaOH; Natriumhydroxid (Merck)
- NS-398; N-[2-(Cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]methansulfonamid (Sigma-Aldrich)
- Reinstwasser (Membrapur, Bodenheim)
- SIN-1; 3-Morpholinopyridonimin (Sigma-Aldrich)
- Tris; (Tris(hydroxymethyl)-)aminomethan (Merck)
- Triton X 100 (Roth)

2.1.5 Lösungen und Reagenzien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Hoher Glukosegehalt (4,5 g/L); mit Natriumpyruvat; mit Phenolrot; ohne L-Glutamin (Invitrogen-Gibco, Karlsruhe)

Zum Herstellen von Komplettmedium mit 10% Fötalem Kälberserum, 2 mM Glutamin sowie 100 IU/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin versetzen.

Elektrophoresepuffer

300 mM NaOH
1 mM EDTA

Puffer vor jeder Elektrophorese frisch ansetzen und auf 4 °C kühlen.

Enzympuffer für FPG-Protein

100 mM KCl
2 mM EDTA
50 mM HEPES
5% Glycerin

In Reinstwasser lösen, pH-Wert mit KOH auf 7,6 einstellen.

Ethidiumbromid-Lösung

20 µg/mL Ethidiumbromid in H₂O dest.

Fötale Kälberserum

FCS; (Invitrogen-Gibco)

FPG-Protein

0,2 mg/mL (Sigma-Aldrich)

L-Glutamin

200 mM (100×) (Invitrogen-Gibco)

Lyselösung

2,5 M NaCl
100 mM EDTA
10 mM Tris
1% Na-Lauroylsarcosinat

In H₂O dest. lösen. Der pH-Wert wird mit NaOH-Plätzchen auf 10,0 gebracht.

Vor Gebrauch werden 89 mL dieser Stammlösung mit 10 mL DMSO und 1 mL Triton X 100 gemischt.

MTT-Lösung 5×

5 mg/mL MTT in PBS 1× lösen und steril filtrieren; vor Gebrauch 1:5 mit Komplettmedium verdünnen.

Neutralisierungslösung

400 mM Tris

Den pH-Wert mit HCl auf 7,5 einstellen.

Penicillin/Streptomycin

10 000 U/mL Penicillin G-Natrium und 10 000 µg/mL Streptomycinsulfat in 0,85% NaCl (Invitrogen-Gibco)

PBS 1× (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) pH 7,4

137 mM NaCl
2,7 mM KCl
14 mM Na₂HPO₄
1,4 mM KH₂PO₄

Mit H₂O dest. auf 1 L auffüllen; pH-Wert einstellen.

Trypanblau

0,4% in 0,85% NaCl (Invitrogen-Gibco)

Vor Gebrauch mit PBS auf 0,18% verdünnen.

Trypsin-EDTA

1× in HBSS (Invitrogen-Gibco)

2.1.6 Zelllinien

Die hier verwendeten Adenokarzinomzelllinien OE19, OE33 sowie eine Plattenepithelkarzinomzelllinie wurden freundlicherweise von Dr. Burkhard von Rahden vom Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München zur Verfügung gestellt.

2.1.6.1 OE19

Die Zelllinie OE19 (ECACC-Nummer 96071721), auch JROECL19 genannt, stammt aus dem Adenokarzinom des Übergangs vom Ösophagus zum Magen eines 72 jährigen Patienten. Der Tumor wurde nach den Richtlinien der International Union Against Cancer in das pathologische Stadium III eingeteilt und zeigte mäßige Differenzierung. OE19 exprimiert die Antigene HLA-A, -B und -C konstitutiv. Die Expression von ICAM-1 (CD 54) kann durch Behandlung mit Interferon Gamma induziert werden. Die Zellen exprimieren epitheliale Cytokeratine und sind kanzerogen in Mäusen.

2.1.6.2 OE33

Die Zelllinie OE33 (ECACC-Nummer 96070808), auch JROECL33 genannt, stammt aus dem Adenokarzinom des unteren Ösophagus (Barrett Metaplasie) einer 73 jährigen Patientin. Der Tumor wurde nach den Richtlinien der International Union Against Cancer in das pathologische Stadium IIA eingeteilt und zeigte geringe Differenzierung. OE33 exprimiert die Antigene HLA-A, -B und -C und ICAM-1 konstitutiv. Die Expression von HLA-DR kann durch Behandlung mit Interferon Gamma induziert werden. Die Zellen exprimieren epitheliale Cytokeratine und sind kanzerogen in Mäusen.

2.2 Methoden

Alle Arbeiten mit Zellen werden in einer Sterilbank durchgeführt. Diese wird vor Beginn der Arbeit jeweils mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Nicht sterile Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen oder Reaktionsgefäße werden vor Gebrauch 20 min bei 120 °C autoklaviert. Die Pasteurpipetten werden durch 3 stündiges Erhitzen auf 180 °C sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen werden steril filtriert.

2.2.1 Kultivieren von OE33-Zellen

OE33-Zellen werden bei 37 °C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit in 25 cm²- oder 75 cm² Gewebekulturflaschen in DMEM-Kulturmedium mit erhöhtem Glukosegehalt (4,5 g/L) kultiviert. Das DMEM-Kulturmedium wird mit 2 mM L-Glutamin, 10% Fötalem Kälberserum, 100 U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin supplementiert ("Komplettmedium"). Sind etwa 90% des Flaschenbodens bewachsen, so werden die Zellen passagiert, d.h. auf neue Flaschen aufgeteilt. Das ist etwa alle 3 Tage notwendig. Dazu werden die Zellen zunächst je nach Flaschengröße mit 6 bzw. 10 mL PBS gewaschen. Anschließend werden sie durch Zugabe von 0,5 bzw. 1 mL Trypsin und etwa 5 minütige Inkubation bei 37 °C abgelöst. Die Zellen werden dann in 6 bzw. 10 mL Komplettmedium aufgenommen. Man gibt jeweils die Hälfte der Zellsuspension in eine neue Kulturflasche und füllt mit Komplettmedium auf 6 bzw. 15 mL auf.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen werden wie oben beschrieben abgelöst. Dann werden sie 1:10 mit einer 0,18%igen Trypanblau-Lösung gemischt und in einer Neubauer-Zählkammer (Abbildung 12) ausgezählt. Der Farbstoff kann nur in geschädigte Zellen eindringen, so dass weiße Zellen als lebend, blaue als abgestorben gewertet werden. Es werden 4 Quadrate mit je 16 Feldern ausgezählt. Jedes Feld entspricht einem Volumen von 0,00625 mm³ oder µL, jedes Quadrat hat dementsprechend ein Volumen von 0,1 µL. Die mittlere Zellzahl pro Quadrat wird wie folgt berechnet:

$$N = \frac{(N1 + N2 + N3 + N4)}{4}$$

Die Zellzahl entspricht $N \times 10^5$ Zellen pro mL.

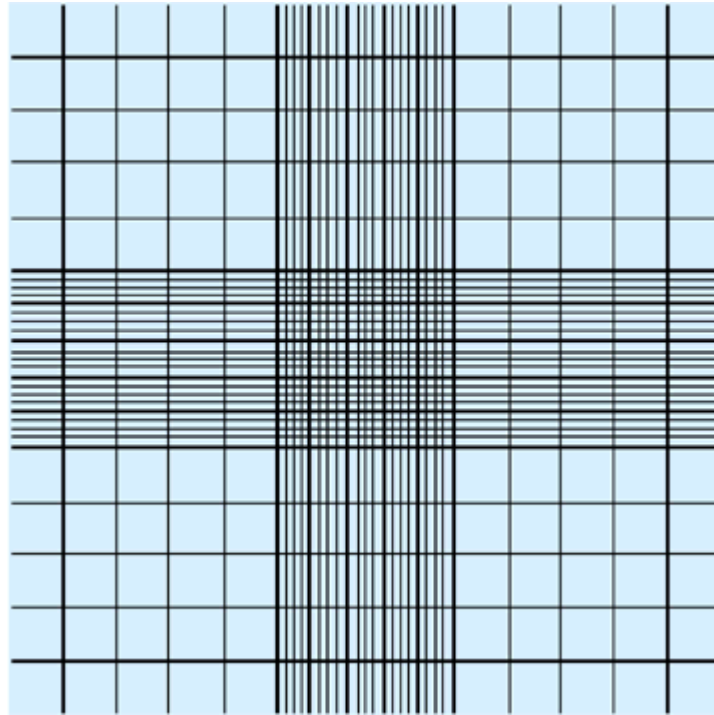


Abbildung 12: Neubauer-Zählkammer.

2.2.3 Einfrieren von OE33-Zellen

Die trypsinierten Zellen werden durch 10 min Zentrifugation bei 800 rpm und 4 °C in einer Minifuge pelletiert. Gleichzeitig wird die Zelldichte der Suspension bestimmt. Anschließend wird das Pellet so in Kompletmedium mit 10% DMSO resuspendiert, dass die Zelldichte 2×10^6 Zellen/mL beträgt. Man gibt je 1,8 mL der Suspension in ein Kryoröhrchen. Die Röhrchen werden 24 h bei - 80 °C in einem Freezing Container gelagert. Dadurch werden die Zellen mit 1 °C pro Minute heruntergekühlt. Die Zellen werden bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.4 Auftauen von OE33-Zellen

Kryokulturen werden im Wasserbad bei 37 °C möglichst schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wird in 10 mL Kompletmedium aufgenommen und 10 min bei 800 rpm in der Minifuge zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet in 6 mL Kompletmedium resuspendiert und in eine 25 cm²-Kulturflasche gegeben. Nach 4-5 Tagen ist die Flasche zu etwa 90% bewachsen und die Zellen können passagiert werden.

2.2.5 MTT-Test

Zur Messung der Cytotoxizität werden jeweils 1×10^4 Zellen pro Kavität einer 96-well-Mikrotiterplatte in 100 μL Komplettmedium ausgesät und 24 h bebrütet. Nach dem Absaugen des Mediums wird die Prüfsubstanz in 100 μL Medium zugegeben. Für Inkubationszeiten ab 24 h wird Medium mit Serum verwendet, darunter Medium ohne Serum. Jede Konzentration wird in 8 wells getestet, das entspricht einer Spalte der Mikrotiterplatte. Als Positivkontrolle dient NaF, das in einer finalen Konzentration von 5 mg/mL eingesetzt wird. Als Negativkontrolle werden die Zellen mit der höchsten eingesetzten Lösungsmittelkonzentration inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wird das Medium wiederum abgesaugt. Es werden je 100 μL MTT-Lösung ($1\times$) in jede Einzelkavität pipettiert. Nach circa 1-stündiger Inkubationsdauer bei 37 °C und 5% CO_2 wird die MTT-Lösung abgesaugt und pro Kavität 100 μL DMSO auf die Zellen gegeben. Dadurch wird das durch metabolische Umsetzung gebildete Formazan gelöst. Schließlich erfolgt die spektralphotometrische Vermessung der Formazanlösung bei 570 und 690 nm mittels des Multilabel Counters Victor². Bei der ersten Wellenlänge wird die Formazankonzentration bestimmt. Die Messung bei 690 nm dient dem Ausschließen von Lösungsmittelleffekten.

Die Auswertung erfolgt in Excel. Die Absorption bei 690 nm wird jeweils von der Absorption bei 570 nm subtrahiert. Anschließend wird der Mittelwert der Negativkontrollen gleich 100% gesetzt und der prozentuale Anteil der übrigen Werte hieran bestimmt.

2.2.6 Comet-Assay

Mindestens eine Woche vor Testbeginn werden Objektträger mit Agarose beschichtet. Dazu werden 85 μL 0,5%iger Agarose in PBS auf die Objektträger pipettiert und ein Deckglas aufgelegt. Anschließend lässt man die Agarose bei Raumtemperatur trocknen und bewahrt die Objektträger staubfrei im Dunkeln auf.

Ansatz in 6-well Platten:

5×10^5 Zellen/well werden in je 3 mL Komplettmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgt die Behandlung mit der Testsubstanz. Danach werden die Zellen mit Hilfe von 200 μL Trypsin abgelöst und in 1 mL Komplettmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wird in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 200 μL PBS aufgenommen, 25 μL der Zellsuspension werden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Ansatz in 12-well Platten:

2×10^5 Zellen/well werden in je 1 mL Kompletmedium ausgesät. Nach 24 h erfolgt die Behandlung mit der Testsubstanz. Danach werden die Zellen mit Hilfe von 100 μ L Trypsin abgelöst und in 300 μ L Kompletmedium aufgenommen. Die Zellsuspension wird in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und 10 min bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 25 μ L PBS aufgenommen.

Von jetzt an wird im Rotlicht gearbeitet, um eine Schädigung der DNA durch UV-Licht zu verhindern. 0,7%ige Low melting point (LMP)-Agarose in PBS wird in der Mikrowelle aufgekocht und im Wasserbad auf 40 °C abgekühlt. 75 μ L der Agarose werden zu 25 μ L Zellsuspension gegeben, gemischt und auf einen beschichteten Objektträger pipettiert. Sofort wird ein Deckglas aufgelegt und man lässt die Agarose etwa 5 min im Kühlschrank fest werden. Das Deckglas wird entfernt und eine dritte Schicht Agarose (85 μ L) aufgegeben. Das Deckglas wird wieder aufgelegt und der Objektträger nochmals für einige Minuten in den Kühlschrank gelegt.

Danach werden die Objektträger (ohne Deckglas) in frische Lyselösung überführt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert.

Am nächsten Tag werden die Objektträger in die Elektrophoresekammer gelegt, freie Plätze werden mit leeren Objektträgern aufgefüllt. Die Kammer wird mit frischem Elektrophorese-puffer gefüllt. Während der Elektrophorese wird ständig auf 4 °C gekühlter Puffer durch die Kammer gepumpt. Zuerst lässt man die Objektträger 30 min in dem alkalischen Puffer liegen, so dass sich die DNA entwinden kann und alkalilabile Stellen in Strangbrüche umgewandelt werden. Dann lässt man die Elektrophorese 30 min bei 25 V und maximal 300 mA laufen.

Anschließend werden die Objektträger 3×5 min mit einigen Tropfen Neutralisierungslösung inkubiert. Danach lässt man sie einige Minuten bei Raumtemperatur trocknen und färbt die DNA mit etwa 50 μ L Ethidiumbromidlösung (1×) an.

Die Auswertung erfolgt an einem Fluoreszenzmikroskop mit CCD-Kamera bei 40× Vergrößerung. Mit Hilfe des Programms Comet II werden verschiedene Parameter wie Länge und Intensität von Kopf und Schweif sowie das Olive Tail Moment bestimmt.

2.2.6.1 Behandlung mit FPG-Protein

Wenn die DNA mit FPG-Protein behandelt werden soll, lässt man die dritte Agaroseschicht weg. Nach der hier nur einstündigen Lyse werden die Objektträger 3×5 min mit Enzympuffer gewaschen. Je Objektträger werden 50 μ L Puffer mit 1 μ g/mL FPG aufpipettiert und ein

Deckglas aufgelegt. Negativkontrollen werden mit Puffer ohne Protein behandelt. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wird wie oben beschrieben die Elektrophorese durchgeführt. Alle Arbeitsschritte finden im Rotlicht statt.

2.2.7 Statistik

Zur Berechnung der Ergebnisse wurde das Programm Prism 4 for Windows (GraphPad Software, Inc.) verwendet.

Soweit nicht anders angegeben wird in den Graphen jeweils der Mittelwert (M.W.) sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus den Einzelversuchen dargestellt. In den Tabellen wird die Zahl der Versuche (N), der Mittelwert, die Standardabweichung (S.D.) sowie die Wahrscheinlichkeit (p) von Unterschieden zwischen den Ansätzen angegeben. Um auf Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen zu testen, wird der Wilcoxon Signed Rank Test verwendet, da die Stichproben klein sind und keine Normalverteilung vorliegt. Die Unterschiede gelten als signifikant falls $p < 0,05$ ist.

3 Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeit wurden sowohl die MTT-Tests als auch die Comet-Assays mit drei verschiedenen Zelllinien durchgeführt. Das waren zum einen die beiden aus humanen Adenokarzinomen des Ösophagus gewonnenen Zelllinien OE19 und OE33 und zum anderen eine aus einem humanen Plattenepithelkarzinom des Ösophagus gewonnene Zelllinie. Da sich erste Ergebnisse zur Cyto- und Genotoxizität kaum zwischen den Zelllinien unterschieden, wurden weitere Versuche nur noch mit OE33-Zellen durchgeführt. Die hier dargestellten Ergebnisse beziehen sich ausschließlich auf diese Zelllinie.

3.1 MTT-Test

Der MTT-Test dient in erster Linie dazu, die maximalen Konzentrationen zu bestimmen, die später im Comet-Assay eingesetzt werden können. In jedem Versuch werden je untersuchter Konzentration acht Wiederholungen angesetzt. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bzw. die Vitalität der Zellen wird im Vergleich zu den lösungsmittelbehandelten Negativkontrollen bestimmt. Dazu wird der Mittelwert der Absorptionen der Negativkontrollen gleich 100% gesetzt und der prozentuale Anteil der übrigen Werte hieran bestimmt. Aus den acht Wiederholungen je Konzentration wird der Mittelwert gebildet. In den Abbildungen wird jeweils der Mittelwert (M.W.) aus sechs Einzelversuchen, sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt. Sofern nicht anders angegeben, werden alle Versuche bei neutralem pH-Wert durchgeführt.

3.1.1 Myosmin

Die cytotoxische Wirkung von Myosmin auf OE33-Zellen wird für Inkubationszeiten von einer, 4 und 24 Stunden bestimmt (Abbildung 13). Dies entspricht den Inkubationszeiten, die auch für die Untersuchung der Genotoxizität eingesetzt werden sollen. Für die Versuche wird eine 1 M Myosmin-Stammlösung (MW = 146,2 g/mol) in Reinstwasser jeweils am Versuchstag frisch hergestellt. Getestet werden Konzentrationen von 1 μ M bis 31,62 mM in Medium ohne Serum mit je acht Wiederholungen pro Konzentration. Bei der Negativkontrolle wird dem Medium die höchste im Test verwendete Reinstwassermenge zugesetzt.

Nach ein- oder 4-stündiger Inkubation fällt die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen und damit die Vitalität der Zellen erst bei einer Konzentration von 31,62 mM Myosmin auf einen Wert unter 70% ab. Bei einer Inkubation über 24 Stunden reicht hierfür schon eine Konzentration von 10 mM aus.

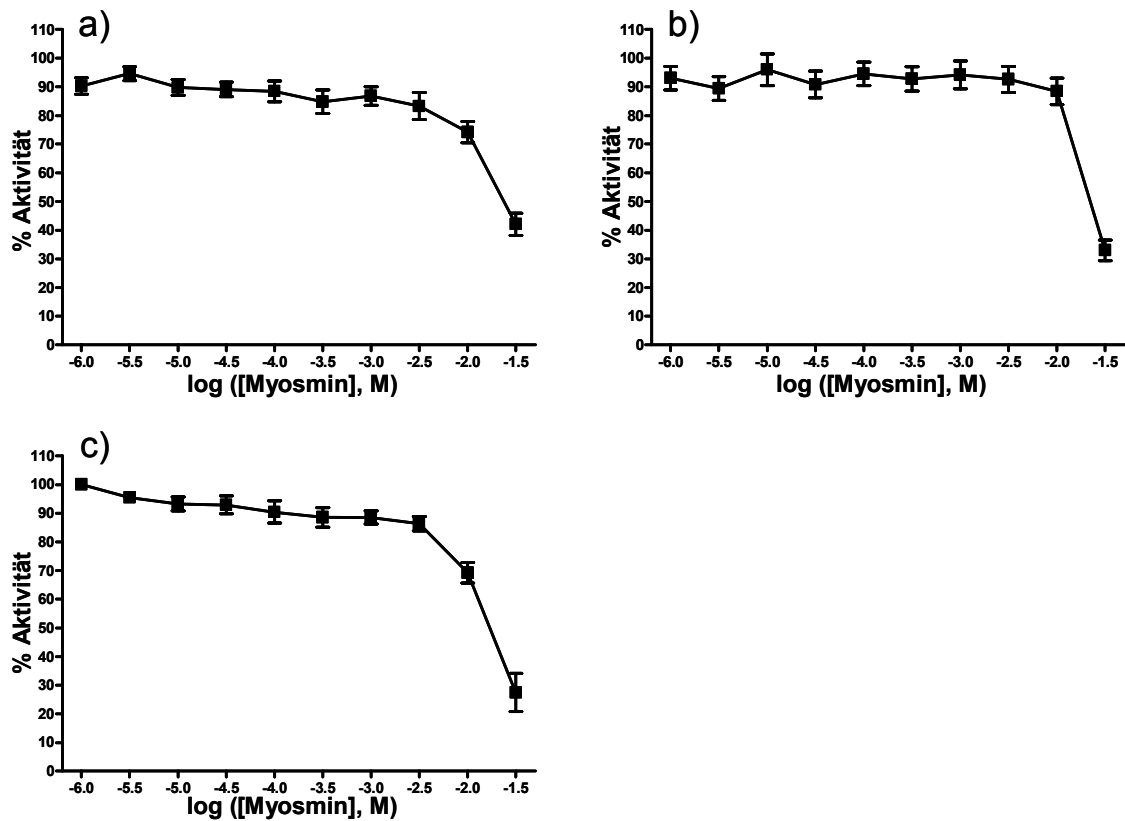


Abbildung 13: MTT-Test an OE33-Zellen nach 1 h (a), 4 h (b) und 24 h (c) Inkubation mit Myosmin; M.W. \pm SEM, N=6.

3.1.2 Wasserstoffperoxid

Die OE33-Zellen werden mit Wasserstoffperoxid behandelt, um sie einem oxidativen Stress auszusetzen und die Wirkung von Myosmin evtl. zu verstärken. Die Cytotoxizität von H_2O_2 wird nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bestimmt (Abbildung 14). Dies entspricht der Inkubationszeit, die auch für die Untersuchung der Genotoxizität eingesetzt werden soll. Für die Versuche wird eine 1 M H_2O_2 -Stammlösung in Reinstwasser hergestellt und bei 4 °C gelagert. Getestet werden Konzentrationen von 1 μ M bis 31,62 mM in Medium ohne Serum mit je acht Wiederholungen pro Konzentration. Bei der Negativkontrolle wird dem Medium die höchste im Test verwendete Reinstwassermenge zugesetzt.

Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen nimmt mit zunehmender Wasserstoffperoxidkonzentration kontinuierlich ab. Ab einer Konzentration von 3,16 mM fällt die Aktivität deutlich ab und erreicht bei 31,62 mM eine Aktivität von nur noch 13% gegenüber der mit Reinstwasser behandelten Negativkontrolle.

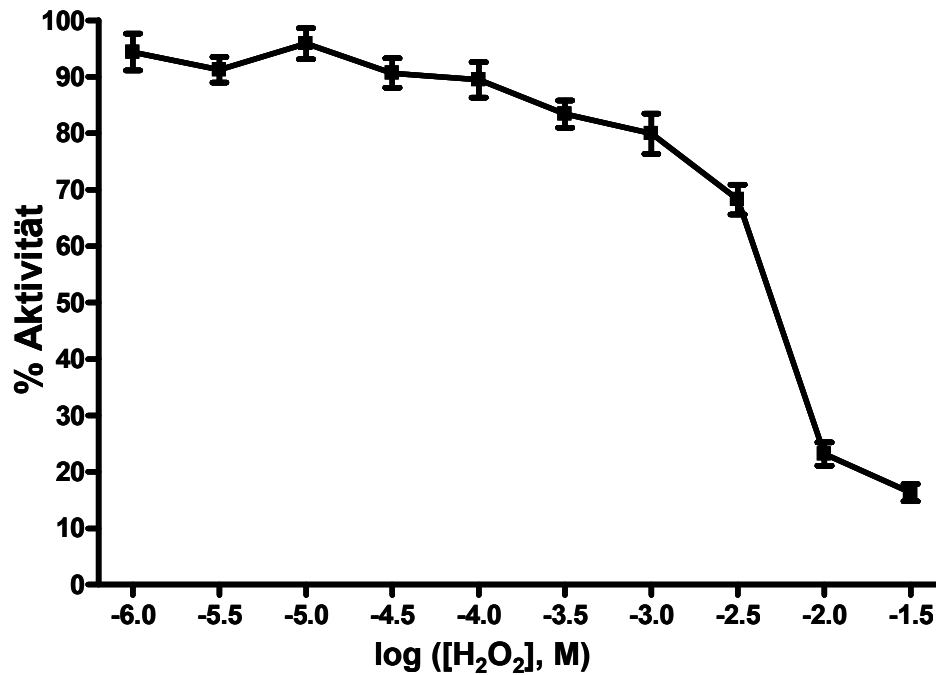


Abbildung 14: MTT-Test an OE33-Zellen nach 1 h Inkubation mit Wasserstoffperoxid; M.W. \pm SEM, N=6.

3.1.3 3-Morpholinosydnonimin

Bei physiologischen pH-Werten zerfällt 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) und setzt dabei NO[•] und O₂⁻ frei, aus denen Peroxynitrit gebildet wird. Ziel ist es, zu überprüfen, ob das so gebildete Peroxynitrit in der Lage ist Myosmin zu aktivieren. Um die Cytotoxizität von SIN-1 auf OE33-Zellen zu untersuchen, werden sie 4 Stunden mit 0,1 μ M bis 1 mM SIN-1 in Komplettmedium inkubiert (Abbildung 15). Damit sich das SIN-1 nicht schon vor Versuchsbeginn zersetzt wird es in PBS mit einem pH-Wert von 5,5 gelöst. Die 100 mM Stammlösung (MW = 206,6 g/mol) wird jeweils erst kurz vor Versuchsbeginn hergestellt.

SIN-1 zeigt in dem geprüften Konzentrationsbereich nur eine geringe Cytotoxizität. Die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen beträgt bei einer SIN-1 Konzentration von 0,1 μ M 81% der mit PBS pH 5,5 behandelten Negativkontrolle und fällt bis 1 mM nur auf 74% ab.

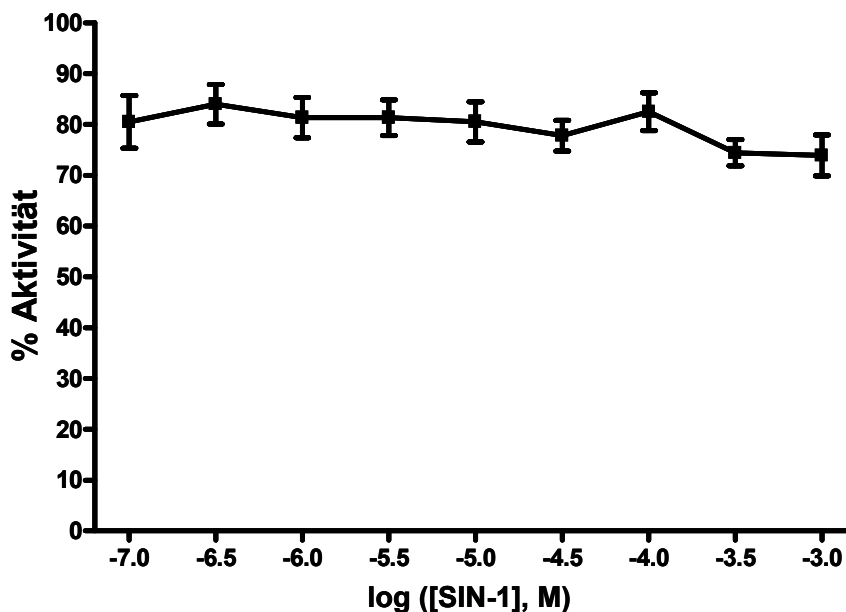


Abbildung 15: MTT-Test an OE33-Zellen nach 4 h Inkubation mit SIN-1; M.W. \pm SEM N=6.

3.2 Comet-Assay

Die Auswertung der mit Ethidiumbromid angefärbten Objektträger erfolgt mit dem Programm Comet Assay II (Perceptive Instruments) bei 40-facher Vergrößerung. Pro Objektträger werden 50 Zellen ausgewertet. Es wird jeweils das Olive Tail Moment (OTM) bestimmt, das sich aus dem Anteil der DNA im Schweif multipliziert mit dem Abstand zwischen den Zentren von Kopf und Schweif als Maß für die mittlere Wegstrecke der DNA berechnet. Dargestellt sind in den Graphen jeweils der Mittelwert (M.W.) sowie der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus den Einzelversuchen. In den Tabellen wird die Zahl der Versuche (N), der Mittelwert, die Standardabweichung (S.D.) sowie die Wahrscheinlichkeit (p) von Unterschieden zwischen den Ansätzen angegeben. Um auf Unterschiede zwischen den Versuchsansätzen zu testen, wird der Wilcoxon Signed Rank Test verwendet.

Soweit es nicht anders angegeben ist werden alle Versuche bei neutralen pH-Werten von etwa 7,4 – dem pH-Wert des DMEM-Mediums durchgeführt. Bei jedem Versuch wird nach der Inkubation mit der Prüfsubstanz die Vitalität der Zellen mittels Trypanblau-Ausschluss überprüft. Nur wenn diese über 70% liegt, werden die Zellen für den Comet-Assay verwendet. Damit soll sichergestellt werden, dass mit diesem Test nachgewiesene DNA-Strangbrüche wirklich auf genotoxischen Schäden und nicht auf cytotoxischen Effekten beruhen. Außerdem werden jeweils eine Negativkontrolle mit der höchsten eingesetzten Lösungsmittelkonzentration sowie eine Positivkontrolle mitgeführt. Als Testsubstanz für die Positivkontrollen wird MNNG verwendet.

3.2.1 Myosmin

Als erstes wurde die genotoxische Wirkung von Myosmin alleine bestimmt. Kleinsasser et al. [29] haben die DNA-schädigende Wirkung von Myosmin bereits in Primärkulturen von Nasenschleimhautzellen und Lymphozyten mit Hilfe des Comet-Assays untersucht. Bei 1 bis 24 h Inkubation konnten sie für Myosminkonzentrationen zwischen 5 und 100 mM einen zeit- und konzentrationsabhängigen Anstieg der Schäden zeigen [29].

Um den Effekt von Myosmin in OE33-Zellen zu untersuchen, wurden sie 1, 4 und 24 h mit dem Alkaloid inkubiert (Abbildung 16, Tabelle 4). Dazu wurde eine 1 M Myosmin-Stamm-lösung (MW = 146,19 g/mol) in Reinstwasser am Versuchstag jeweils frisch hergestellt. Für Inkubationszeiten bis 4 Stunden werden Myosminkonzentrationen bis 50 mM getestet. Bei einer Inkubationszeit von 24 Stunden wirkt diese Konzentration cytotoxisch. Deshalb werden hier maximal 25 mM Myosmin eingesetzt.

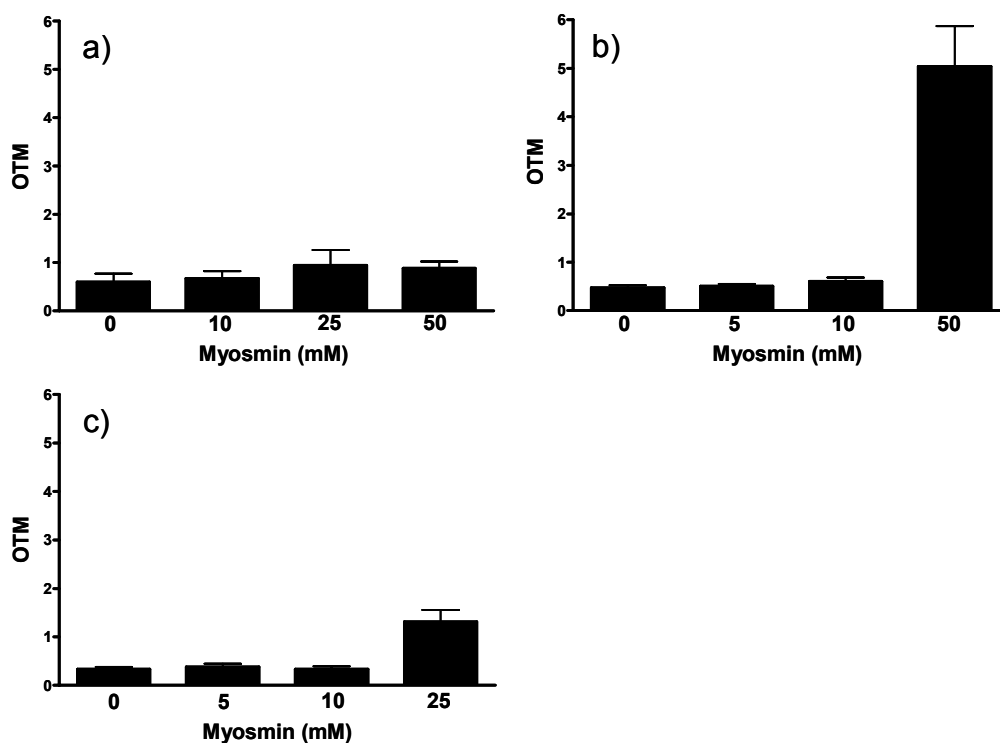


Abbildung 16: Comet-Assay an OE33-Zellen nach 1 h (a, N=6-13), 4 h (b, N=6-25) und 24 h (c, N=6) Inkubation mit Myosmin; M.W. \pm SEM.

Bei einstündiger Inkubation zeigt sich bei steigenden Myosminkonzentrationen bis 50 mM kaum ein Anstieg der DNA-Schädigung. Bei 4-stündiger Inkubation führt eine Konzentration von 50 mM Myosmin dagegen zu einem deutlichen Effekt. Der Mittelwert des OTM steigt bei 50 mM Myosmin auf das zehnfache der Werte der Negativkontrollen an. Bei Behandlung mit 10 und 50 mM Myosmin unterscheiden sich die entstandenen DNA-Schäden signifikant

von dem nur mit Lösungsmittel behandelten Ansatz ($p < 0,05$). Bei einer Inkubation über 24 Stunden führt nur die höchste getestete Myosminkonzentration zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Schädigung auf das Vierfache der Werte der Negativkontrollen ($p < 0,05$).

Tabelle 4: Genotoxizität in OE33-Zellen nach 1 bis 24 h Inkubation mit 0 – 50 mM Myosmin. Die DNA-Schäden werden im Comet-Assay als OTM bestimmt.

	0 mM	5 mM	10 mM	25 mM	50 mM
1 Stunde Inkubation					
N	13		6	11	6
Mittelwert	0,59		0,67	0,94	0,88
S.D.	0,62		0,37	1,06	0,34
p (gegen 0 mM)			0,1094	0,2324	0,0156
4 Stunden Inkubation					
N	25	11	19		6
Mittelwert	0,47	0,50	0,61		5,04
S.D.	0,26	0,17	0,32		2,05
p (gegen 0 mM)		0,0615	0,0102		0,0156
24 Stunden Inkubation					
N	6	6	6	6	
Mittelwert	0,33	0,38	0,33	1,31	
S.D.	0,12	0,16	0,15	0,60	
p (gegen 0 mM)		0,4219	0,5000	0,0156	

3.2.2 Myosmin bei sauren pH-Werten

In vitro Versuche haben gezeigt, dass Myosmin bei sauren pH-Werten zwischen 2 und 5 am effektivsten nitrosiert wird. Die OE33-Zellen können nur kurzfristig einem pH-Wert von 5 ausgesetzt werden, weil dieser pH-Wert bereits cytotoxisch wirkt. Da ein Teil der Versuchsansätze aufgrund zu geringer Vitalität der Zellen verworfen werden musste und es außerdem zu sehr hohen Schwankungen zwischen den Ergebnissen der einzelnen Versuche kam, werden diese Ergebnisse hier nicht dargestellt. Die Inkubation bei pH 6 (Abbildung 17) verursacht dagegen keinen problematischen Abfall der Vitalität, allerdings liegt hier auch nur ein sehr geringer Teil des Myosmins in einer ringoffenen Form vor und die Nitrosierung läuft nur sehr langsam ab. Die Inkubationszeiten betragen 4 und 24 h. Da auch hier nur geringe Effekte auftreten wurde keine kürzere Inkubationszeit getestet. Es wird wieder eine frische 1 M Myosmin-Stammlösung verwendet. Das Medium der einzelnen Versuchsansätze wird nach Myosminzugabe jeweils mit 4 N Salzsäure auf pH 6 eingestellt.

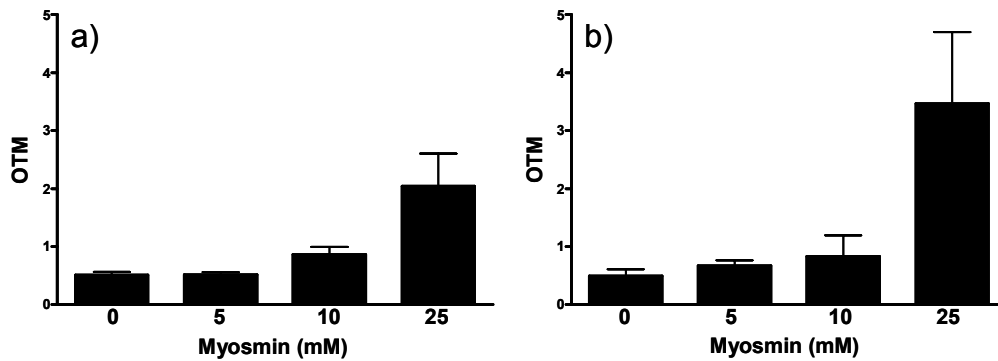


Abbildung 17: Comet-Assay an OE33-Zellen nach 4 h (a) und 24 h (b) Inkubation mit Myosmin bei pH 6; M.W. \pm SEM; N=6.

Tabelle 5: Genotoxizität in OE33-Zellen nach 4 und 24 h Inkubation mit 0 – 25 mM Myosmin bei pH 6. Die DNA-Schäden werden im Comet-Assay als OTM bestimmt.

	0 mM	5 mM	10 mM	25 mM
	4 Stunden Inkubation			
N	6	6	6	6
Mittelwert	0,51	0,51	0,87	2,04
S.D.	0,14	0,11	0,32	1,37
p (gegen 0 mM)		0,4219	0,0313	0,0156
	24 Stunden Inkubation			
N	6	6	6	6
Mittelwert	0,50	0,67	0,83	3,46
S.D.	0,28	0,23	0,88	3,02
p (gegen 0 mM)		0,0313	0,2188	0,0156

Bei 4-stündiger Inkubation (Tabelle 5) steigt der Mittelwert des OTM bei Inkubation mit 25 mM Myosmin auf den vierfachen Wert der Negativkontrolle an. Die Schäden der Ansätze mit 10 und 25 mM Myosmin unterscheiden sich signifikant von der Negativkontrolle ($p < 0,05$). Im Vergleich zu den 4 Stunden Werten bleibt der Schaden in der Negativkontrolle bei Inkubation für 24 Stunden etwa gleich. Bei den mit Myosmin inkubierten Ansätzen steigt der DNA-Schaden dagegen stärker an. Das OTM der mit 25 mM Myosmin behandelten Ansätze steigt auf den siebenfachen Wert der unbehandelten Zellen. Allerdings unterscheiden sich nur die mit 5 und 25 mM Myosmin behandelten Ansätze signifikant von der Negativkontrolle ($p < 0,05$).

3.2.3 Myosmin und reaktive Spezies

3.2.3.1 Wasserstoffperoxid

Um zu überprüfen, ob Wasserstoffperoxid in der Lage ist, Myosmin zu aktivieren und damit die Schädigung der DNA zu erhöhen, werden die Zellen mit 25 mM Myosmin, 1 mM H_2O_2 oder einer Kombination beider Substanzen inkubiert (Abbildung 18). Die Inkubation von

25 mM Myosmin mit einer geringeren H_2O_2 -Konzentration führt nicht mehr zu einer deutlichen Erhöhung des OTM gegenüber der Inkubation mit Myosmin alleine (Daten nicht dargestellt). Für beide Substanzen werden 1 M Stammlösungen in Reinstwasser angesetzt. Die Inkubationszeit beträgt eine Stunde.

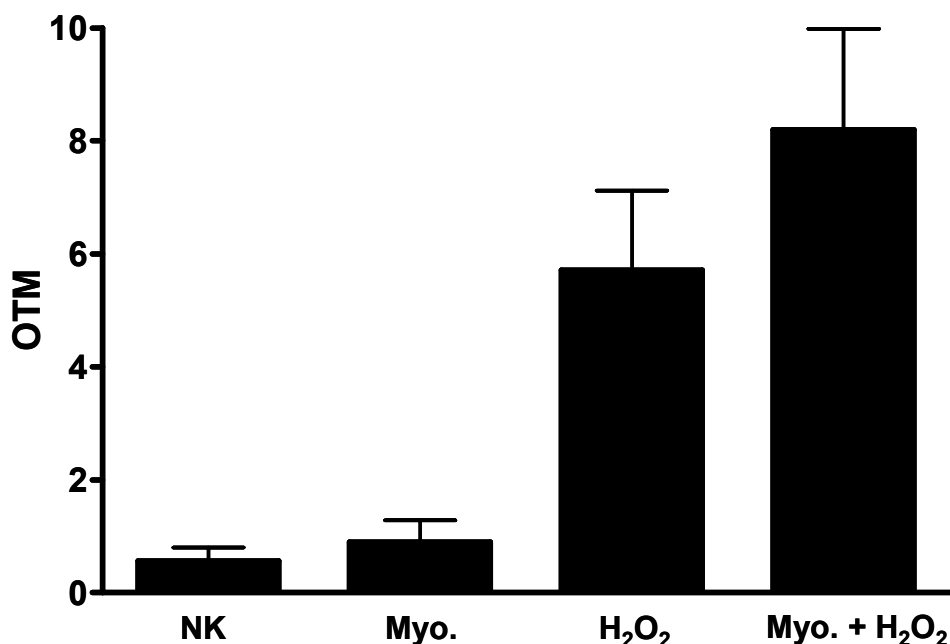


Abbildung 18: Comet-Assay an OE33-Zellen nach 1 h Inkubation mit 25 mM Myosmin, 1 mM H_2O_2 bzw. Myosmin und H_2O_2 zusammen; M.W. ± SEM, N=7.

Tabelle 6: Genotoxizität in OE33-Zellen nach 1 h Inkubation mit 25 mM Myosmin und 1 mM H_2O_2 . Die DNA-Schäden werden im Comet-Assay als OTM bestimmt.

	NK	Myosmin	H_2O_2	Myosmin + H_2O_2
N	7	7	7	7
Mittelwert	0,57	0,90	5,71	8,20
S.D.	0,62	1,01	3,73	4,73
p (gegen NK)		0,2344	0,0078	0,0078
p (gegen Myo.)			0,0078	0,0078
p (gegen H_2O_2)				0,1094

Der Mittelwert des OTM verdoppelt sich nach der Myosminbehandlung knapp gegenüber der mit Lösungsmittel behandelten Negativkontrolle (Tabelle 6). Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid führt zu einer wesentlich stärkeren DNA-Schädigung. Die Kombination beider Substanzen verursacht sogar einen Anstieg des OTM auf das 14-fache der Werte der Negativkontrollen. Damit unterscheiden sich sowohl die mit H_2O_2 allein als auch die mit Myosmin und H_2O_2 in Kombination behandelten Zellen signifikant von der Negativkontrolle (jeweils $p < 0,01$). Die zusätzliche Inkubation mit Myosmin erhöht die H_2O_2 bedingten DNA-Schäden

stärker als die Summe der Einzelinkubationen. Dieser additive Effekt erreicht jedoch kein Signifikanzniveau.

3.2.3.2 3-Morpholinosydnonimin

Bei physiologischen pH-Werten zerfällt 3-Morpholinosydnonimin (SIN-1) und setzt dabei NO^\bullet und O_2^- frei, aus denen Peroxynitrit gebildet wird. Im Körper wird Peroxynitrit bei Entzündungsreaktionen in größeren Mengen gebildet. Mit diesem Versuch sollen die Bedingungen im entzündeten Gewebe simuliert werden, um zu überprüfen, ob es dabei zu einer Aktivierung von Myosmin kommt. Die OE33-Zellen werden hierfür je 4 Stunden mit 0 bis 10 mM Myosmin mit und ohne 1 mM SIN-1 bei neutralen pH-Werten inkubiert (Abbildung 19). Aus 1 mM SIN-1 werden im hier verwendeten DMEM-Medium laut Doulias et al. [70] etwa 12 μM Peroxynitrit pro Minute freigesetzt. Martin-Romero et al. [71] konnten für Phenolrot haltiges DMEM Medium bei einem pH-Wert von 7,4 eine maximale Peroxynitritfreisetzung von 3,2 $\mu\text{M}/\text{min}$ aus 100 μM SIN-1 zeigen. Die Halbwertszeit beträgt dabei etwa 15 Minuten. Beide Quellen kommen zu dem Ergebnis, dass nur über einen Zeitraum von zwei Stunden Peroxynitrit gebildet wird. Deshalb wird in den hier durchgeführten Versuchen nach 2 h Inkubationszeit erneut 1 mM SIN-1 zu den Versuchsansätzen gegeben. Zuvor durchgeführte Versuche mit einstündiger Inkubation oder vier Stunden Inkubation, ohne dass SIN-1 nachgegeben wurde, führten wenn überhaupt nur zu einer sehr geringen Erhöhung des DNA-Schadens (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wurden Versuche mit der halben SIN-1 Konzentration und 10 mM Myosmin durchgeführt. Diese führen zwar zu einer Erhöhung der DNA-Schädigung durch Myosmin, der Effekt ist allerdings geringer als bei den hier gezeigten Versuchen mit 1 mM SIN-1. Da nur 3 Versuche mit 0,5 mM SIN-1 durchgeführt wurden, werden die Ergebnisse hier nicht dargestellt. Um ein Zerfallen des Peroxynitritdonors vor Versuchsbeginn zu vermeiden, wird kurz vor Inkubationsbeginn eine frische 10^{-1} M SIN-1 Stammlösung (MW = 206,6 g/mol) in PBS pH 5,5 hergestellt. Eine 1 M Myosmin-Stammlösung wird ebenfalls am Versuchstag in Reinstwasser hergestellt.

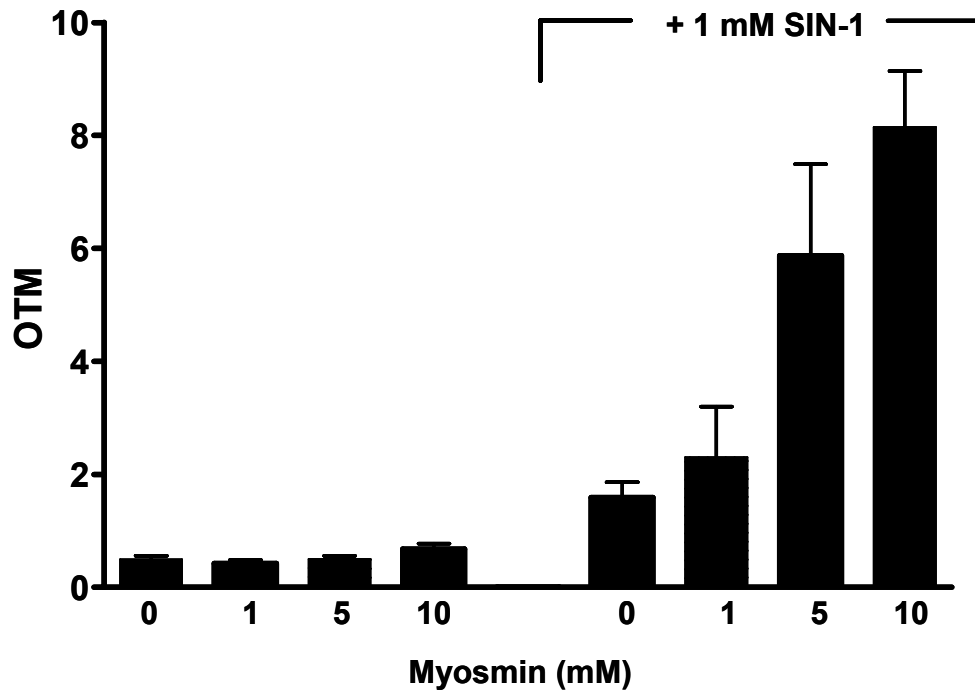


Abbildung 19: Comet-Assay an OE33-Zellen nach 4 h Inkubation mit 0 bis 10 mM Myosmin, mit und ohne 1 mM SIN-1; M.W. \pm SEM, N=8-19.

Tabelle 7: Genotoxizität in OE33-Zellen nach 4 h Inkubation mit 1 - 10 mM Myosmin und 1 mM SIN-1. Die DNA-Schäden werden im Comet-Assay als OTM bestimmt.

	NK	1 mM SIN-1	1 mM Myo.	1 mM Myo. + SIN-1	5 mM Myo.	5 mM Myo. + SIN-1	10 mM Myo.	10 mM Myo. + SIN-1
N	19	11	8	8	9	9	13	13
Mittelwert	0,50	1,59	0,42	2,31	0,50	5,90	0,68	8,15
S.D.	0,28	0,90	0,17	2,52	0,17	4,86	0,36	3,59
p (gegen NK)		0,0005	0,4219	0,0039	0,0645	0,0020	0,0133	0,0001
p (gegen SIN-1)				0,2305		0,0039		0,0001
p (gegen jeweiliges Myo.)				0,0039		0,0020		0,0001

Bei den nur mit Myosmin behandelten Zellen erhöht sich der Mittelwert des OTM mit steigender Konzentration wiederum nur geringfügig (Tabelle 7). Der Schaden erreicht nur bei 10 mM Myosmin Signifikanz ($p < 0,05$), ist aber deutlich geringer als der durch 1 mM SIN-1 ($p < 0,001$) allein erzeugte Schaden. In den zusätzlich mit SIN-1 behandelten Proben zeigt sich dagegen ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg der DNA-Schäden durch Myosmin. Die Mittelwerte der mit 5 bzw. 10 mM Myosmin und SIN-1 behandelten Versuchsansätze unterscheiden sich außerdem signifikant von dem mit dem Peroxynitritdonor allein behandelten Ansatz um das Drei- ($p < 0,01$) bzw. Fünffache ($p < 0,0001$).

3.2.4 FPG-Behandlung

Die Behandlung mit Formamidopyrimidinglykosylase (FPG) dient dem Nachweis von 8-Hydroxyguanin, das durch oxidativen Stress entsteht. Collins et al. [67] haben Comet-Assays mit und ohne FPG-Protein an HeLa (transformierte humane Epithel-) Zellen durchgeführt. Oxidative Schäden wurden dabei durch Inkubation der Zellen mit H_2O_2 induziert. Am wirkungsvollsten ist es nach diesen Ergebnissen, die lysierten Zellen in den Gelen 30 Minuten mit FPG zu behandeln. Sowohl kürzere als auch längere Inkubationszeiten führten zu weniger Strangbrüchen. Um zu überprüfen, ob Myosmin zu oxidativen DNA-Schäden führt, werden Comet-Assays mit FPG-Protein entsprechend den Angaben im Kapitel Methoden (2.2.6.1) durchgeführt.

3.2.4.1 Wasserstoffperoxid und FPG

Als „Positivkontrolle“ dient auch hier H_2O_2 . Die Versuchsbedingungen entsprechen denen der bereits beschriebenen Versuche mit Myosmin und H_2O_2 in Kombination (3.2.3.1). Dem entsprechend werden die OE33-Zellen eine Stunde mit 25 mM Myosmin, 1 mM H_2O_2 bzw. beiden Stoffen zusammen inkubiert (Abbildung 20). Nach der Lyse werden die Gele 30 min bei 37 °C mit FPG-Protein behandelt. Pro Objektträger werden dazu 50 μ L FPG in Enzym-puffer [1 μ M/mL] bzw. 50 μ L Enzym-puffer alleine verwendet. In den Versuchen von Collins et al. führt eine 2-stündige Regenerationszeit nach der H_2O_2 -Behandlung zu noch deutlicheren Ergebnissen, da in dieser Zeit Einzelstrangbrüche, die den Effekt der Reparatur-Endonuclease überlagern könnten repariert werden. In OE33-Zellen führt eine Regenerationszeit dagegen zu geringeren Schäden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Sowohl bei den Negativkontrollen als auch bei den mit 25 mM Myosmin behandelten Zellen unterscheiden sich die mit FPG-Protein behandelten Ansätze nur sehr geringfügig von den mit Enzym-puffer allein behandelten Ansätzen (Tabelle 8). Für die mit 1 mM H_2O_2 behandelten Zellen zeigt sich dagegen ein deutlicher Anstieg des OTM auf den dreifachen Wert. Für die mit Myosmin und H_2O_2 zusammen behandelten Zellen ist der Anstieg wieder geringer. Sowohl die mit Myosmin als auch die mit H_2O_2 behandelten Ansätze, die zusätzlich mit FPG inkubiert wurden unterscheiden sich signifikant von den jeweiligen Ansätzen ohne FPG (jeweils $p < 0,05$). Bei den mit Myosmin und H_2O_2 in Kombination behandelten Zellen besteht dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen den Ansätzen mit und ohne FPG-Protein.

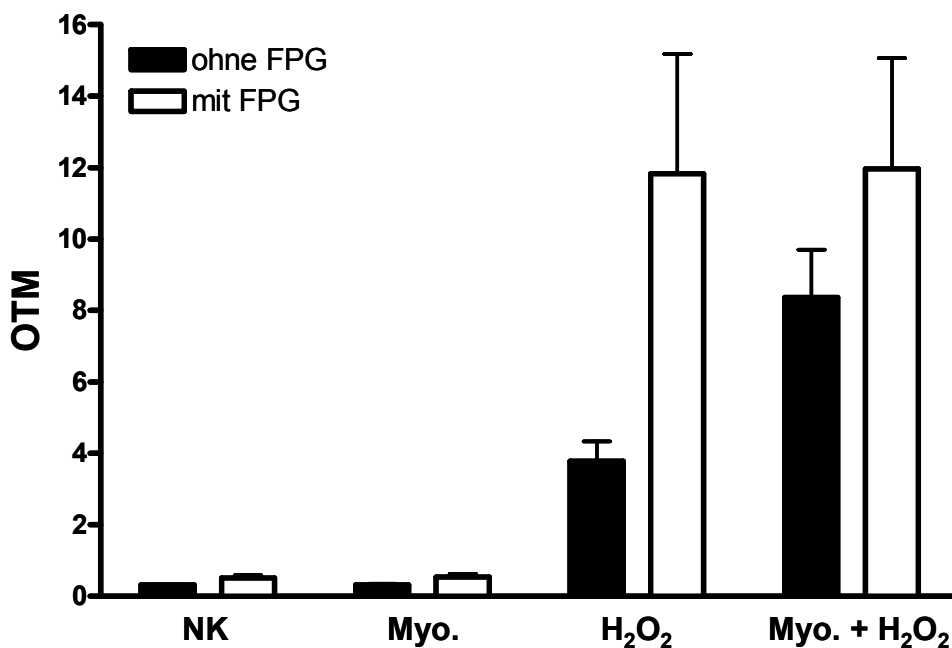


Abbildung 20: Comet-Assay an OE33-Zellen nach 1 h Inkubation mit 25 mM Myosmin, 1 mM H₂O₂ oder beiden Stoffen in Kombination; schwarze Säulen ohne FPG-Behandlung; weiße Säulen mit FPG-Behandlung; M.W. ± SEM, N=6.

Tabelle 8: Genotoxizität in OE33-Zellen nach 1 h Inkubation mit 25 mM Myosmin und 1 mM H₂O₂ mit und ohne Behandlung mit FPG. Die DNA-Schäden werden im Comet-Assay als OTM bestimmt.

	NK	NK + FPG	Myosmin	Myosmin + FPG	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂ + FPG	Myosmin + H ₂ O ₂	Myosmin + H ₂ O ₂ + FPG
N	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	0,31	0,52	0,31	0,54	3,77	11,83	8,36	11,96
S.D.	0,04	0,19	0,09	0,23	1,37	8,20	3,29	6,95
p (gegen NK)		0,0156	0,0156	0,0156	0,5000	0,0156	0,0156	0,0625
p (gegen H₂O₂ ohne FPG)							0,0156	
p (gegen H₂O₂ mit FPG)								0,1250
p (gegen Ansatz ohne FPG)		0,0156		0,0156		0,0156		0,1250

3.2.4.2 3-Morpholinosydnomin und FPG

Der deutlichste Anstieg der genotoxischen Wirkung von Myosmin konnte bisher durch gleichzeitige Inkubation mit SIN-1 erreicht werden. Deshalb soll auch hier der Anteil des oxidativen Schadens untersucht werden (Abbildung 21). Dazu werden die 4 Stunden mit Lösungsmittel, 10 mM Myosmin, 1 mM SIN-1 oder beiden Substanzen in Kombination behandelten Zellen nach der Lyse wiederum 30 Minuten mit FPG-Protein behandelt.

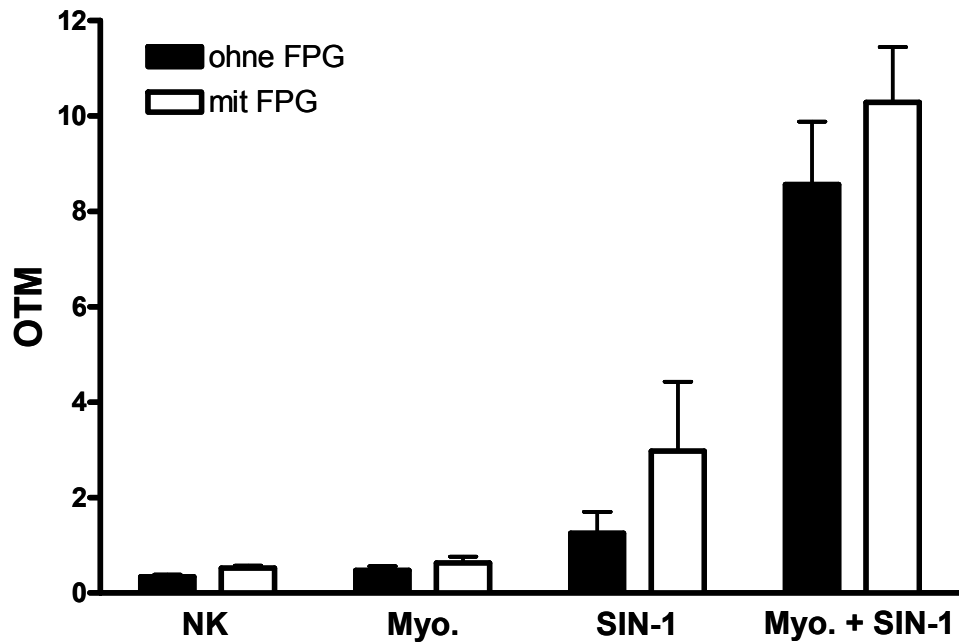


Abbildung 21: Comet-Assay an OE33-Zellen nach 4 h Inkubation mit 10 mM Myosmin, 1 mM SIN-1 oder beiden Stoffen in Kombination; schwarze Säulen ohne FPG-Behandlung; weiße Säulen mit FPG-Behandlung; M.W. \pm SEM, N=6.

Tabelle 9: Genotoxizität in OE33-Zellen nach 4 h Inkubation mit 10 mM Myosmin und 1 mM SIN-1 mit und ohne Behandlung mit FPG. Die DNA-Schäden werden im Comet-Assay als OTM bestimmt.

	NK	NK + FPG	Myosmin	Myosmin + FPG	SIN-1	SIN-1 + FPG	Myosmin + SIN-1	Myosmin + SIN-1 + FPG
N	6	6	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	0,33	0,52	0,47	0,63	1,25	2,97	8,56	10,29
S.D.	0,13	0,14	0,22	0,33	1,10	3,58	3,24	2,85
p (gegen NK)		0,0156	0,0781	0,0156	0,0313	0,0156	0,0156	0,0156
p (gegen SIN-1 ohne FPG)							0,0156	
p (gegen SIN-1 mit FPG)								0,0156
p (gegen Ansatz ohne FPG)		0,0156		0,1563		0,1563		0,0781

Gegenüber der Negativkontrolle ist in allen Ansätzen, außer dem mit 10 mM Myosmin behandelten, ein signifikanter Anstieg der DNA-Schäden zu beobachten (Tabelle 9). Auch in diesem Versuch wird bestätigt, dass die Behandlung mit einer Kombination aus Myosmin und SIN-1 zu einem starken Anstieg der Schäden gegenüber der Behandlung mit SIN-1 alleine führt. Im Vergleich zu der Behandlung mit SIN-1 führt die Inkubation mit der Kombination zu einem siebenfachen Anstieg der induzierten Schäden ($p < 0,05$). Werden die Objektträger nach der Lyse mit FPG inkubiert, so steigt das OTM in allen Ansätzen an. Dieser Anstieg ist jedoch nur im Fall der Negativkontrolle signifikant ($p < 0,05$). Der Mittelwert des OTM steigt

in den mit SIN-1 alleine bzw. mit Myosmin und SIN-1 in Kombination behandelten Ansätzen etwa um den gleichen Betrag an.

3.2.5 COX-2 Hemmung

Die Cyclooxygenase-2 (COX-2) wird bei Entzündungsvorgängen und durch mitogene Stimuli induziert. Sie hemmt die Apoptose und die Immunantwort und führt zu einer verstärkten Krebszellproliferation, Tumorangiogenese und Invasivität von Tumorzellen. Ein Ansatz zur Chemoprävention von Ösophaguskrebs ist die Gabe nichtsteroidaler antiinflammatorischer Arzneimittel (NSAIDs), welche die Cyclooxygenasen hemmen [72]. Laut Cheong et al. [73] führt eine 24 stündige Inkubation von OE33-Zellen mit 50 μM des selektiven COX-2 Hemmstoffes NS-398 zu einer signifikanten Reduktion der COX-2 Expression auf etwa 50% gegenüber der Kontrolle. Gleichzeitig wird auch die Proliferation der Zellen gehemmt. Um die Wirkung des hier verwendeten NS-398 zu überprüfen, wurden die Zellen 24, 48 und 72 Stunden mit 0, 10 und 50 μM NS-398 in 96-well Platten inkubiert (Abbildung 22). Die Proliferation wurde anschließend durch Anfärben der Zellen mit MTT (die Durchführung entspricht dem MTT-Test) überprüft. Je höher die Absorption ist, umso mehr MTT wurde zu blauem Formazan umgesetzt und entsprechend größer ist die Zelldichte in dem jeweiligen Ansatz. Jede Konzentration und Inkubationszeit wurde 6-mal an je 8 wells getestet. Dargestellt ist die Absorption in % der unbehandelten Negativkontrolle.

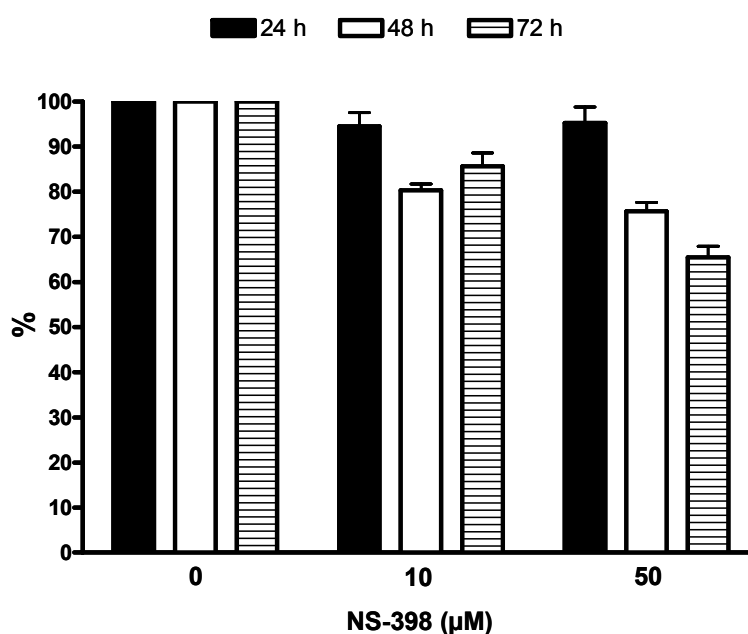


Abbildung 22: Proliferation von OE33-Zellen nach 24, 48 und 72 h Inkubation mit 0, 10 und 50 μM NS-398; M.W. \pm SEM, N=6.

Die Behandlung der Zellen mit NS-398 für 24 Stunden führt noch nicht zu einer signifikant geringeren Zellzahl. Sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden Inkubation mit 10 oder 50 μM NS-398 ist die Zellzahl aber signifikant geringer als in der unbehandelten Kontrolle (jeweils $p < 0,05$).

Um den Einfluss von COX-2 auf die Genotoxizität von Myosmin zu untersuchen, werden die OE33-Zellen ebenfalls 24 Stunden mit 50 μM NS-398 vorinkubiert (Abbildung 23). Dazu wird eine 20 mM Stammlösung in DMSO hergestellt, die bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wird. Nach der Vorinkubation werden die Zellen wie oben beschrieben 4 Stunden in Medien mit der höchsten verwendeten Lösungsmittelkonzentration (NK), 10 mM Myosmin bzw. Myosmin und 1 mM SIN-1 inkubiert, wobei nach 2 Stunden SIN-1 nachgegeben wird.

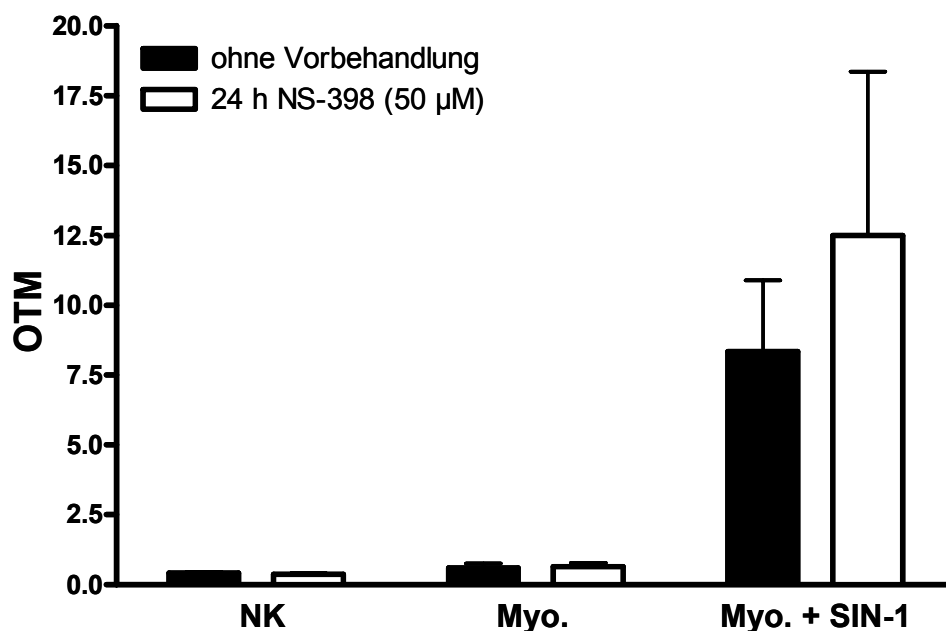


Abbildung 23: Comet-Assay an OE33-Zellen nach 4 h Inkubation mit 10 mM Myosmin, sowie Myosmin und 1 mM SIN-1; schwarze Säulen ohne Vorbehandlung, weiße Säulen 24 h Vorbehandlung mit 50 μM NS-398; M.W. \pm SEM, N=6.

Tabelle 10: Genotoxizität in OE33-Zellen nach 4 h Inkubation mit 10 mM Myosmin und 1 mM SIN-1 mit und ohne 24 h Vorbehandlung mit NS-398. Die DNA-Schäden werden im Comet-Assay als OTM bestimmt.

	NK	NS-398 NK	Myosmin	NS-398 Myosmin	Myo. + SIN-1	NS-398 Myo. + SIN-1
N	6	6	6	6	6	6
Mittelwert	0,42	0,37	0,60	0,64	8,34	12,48
S.D.	0,11	0,10	0,39	0,32	6,26	14,38
p (gegen NK)		0,0469	0,3438	0,2188	0,0156	0,0156
p (gegen Ansatz ohne NS-398)		0,0469		0,2188		0,5000

Die Mittelwerte des OTM unterscheiden sich bei den Negativkontrollen und den mit Myosmin behandelten Zellen kaum zwischen den nicht vorbehandelten und den 24 h mit 50 μ M NS-398 vorbehandelten Ansätzen (Tabelle 10). Die gleichzeitige Behandlung mit Myosmin und SIN-1 führt zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Schäden, der sich sowohl für die Ansätze mit als auch ohne Vorbehandlung signifikant von den entsprechenden Ansätzen mit Myosmin alleine unterscheiden (jeweils $p < 0,05$). Zwischen den Ansätzen mit und ohne Vorbehandlung, ist nur bei der Negativkontrolle eine geringe aber signifikante Abnahme ($p < 0,05$) zu verzeichnen. Nach kombinierter Gabe von Myosmin und SIN-1 steigt der DNA-Schaden nach COX-2-Hemmung sogar um etwa 50% an (n.s.).

3.2.6 Hemmung der Alkylguanin-DNA Alkyltransferase (AGT)

Die AGT katalysiert die Reparatur von alkylierter DNA, insbesondere des promutagenen O^6 -Methylguanins. Dieses Addukt wird häufig in Tumorgewebe gefunden und scheint eine Rolle in der Tumorentstehung zu spielen. Die AGT erkennt auch das von TSNA und Myosmin gebildete O^6 -[1-Oxo-1-(3-pyridyl)but-4-yl]-d-Guanosin als Substrat. Da das Enzym bei der Reaktion inaktiviert wird, könnte dieses Addukt die Reparaturkapazität der Zelle schwächen. Mit Hilfe des Comet-Assays soll überprüft werden, ob Myosmin die Reparatur methylierter DNA in OE33-Zellen hemmt (Abbildung 24). Dazu werden die Zellen zuerst eine Stunde mit 1 μ M des direkt methylierenden N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) inkubiert. Die Zellen eines Versuchsansatzes werden danach sofort in Agarose aufgenommen und auf einen Objektträger aufgebracht, um den durch MNNG verursachten DNA-Schaden zu erfassen. Den übrigen Ansätzen lässt man 23 Stunden Zeit, die entstandenen Schäden in MNNG freiem Medium zu reparieren. Während dieser Zeit inkubiert man die Zellen entweder mit Medium mit der höchsten verwendeten Lösungsmittelkonzentration, mit 10 mM Myosmin, mit 1 mM SIN-1 oder mit beiden Stoffen in Kombination. Die Negativkontrolle wird 24 Stunden mit Medium mit Lösungsmittel inkubiert. Es wird eine 1 mM MNNG-Stammlösung (MW = 147,09 g/mol) in DMSO verwendet, die bei -20 °C gelagert wird.

Tabelle 11: Schema der Behandlung im Comet-Assay zur Untersuchung der Hemmung der AGT.

	1 h	23 h
NK	Medium	Medium
	1 μ M MNNG	Zellen sofort in Agarose aufnehmen
0	1 μ M MNNG	Medium
Myo.	1 μ M MNNG	10 mM Myosmin
SIN	1 μ M MNNG	1 mM SIN-1
Myo. + SIN	1 μ M MNNG	10 mM Myosmin + 1 mM SIN-1

Inkubiert man die OE33-Zellen eine Stunde mit 1 μM MNNG so entsteht ein Schaden mit einem OTM von $10,57 \pm 1,46$. Werden sie anschließend 23 h mit frischem Medium weiter inkubiert, so wird der Schaden fast vollständig repariert (Tabelle 12). Setzt man dem Medium während der Regenerationszeit 10 mM Myosmin zu, so verdoppelt sich der zurück bleibende Schaden. Bei Behandlung mit 1 mM SIN-1 bzw. Myosmin und SIN-1 in Kombination erhöht sich der Mittelwert des OTM noch deutlicher auf etwa den vierfachen Wert. Jede Behandlung unterscheidet sich signifikant von der in der Regenerationszeit mit Medium inkubierten Kontrolle (jeweils $p < 0,05$). Die Behandlung mit Myosmin und SIN-1 zusammen unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Behandlung mit SIN-1 alleine.

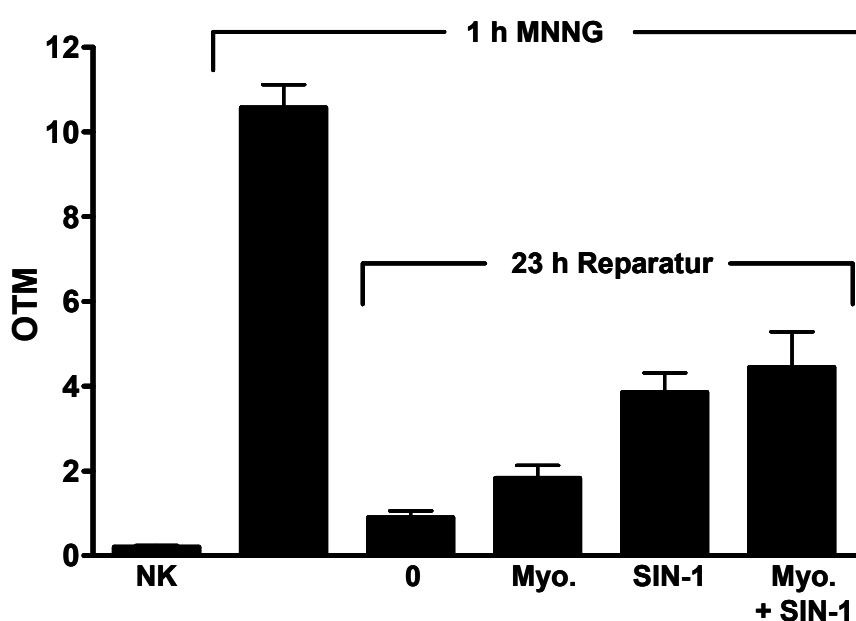


Abbildung 24: Comet-Assay an OE33-Zellen; NK: 24 h Medium; 1 h Inkubation mit 1 μM MNNG, dann 23 h Inkubation mit Medium, 10 mM Myosmin, 1 mM SIN-1 oder Myosmin und SIN-1 zusammen; M.W. \pm SEM, N=6.

Tabelle 12: Genotoxizität in OE33-Zellen nach 1 h Inkubation mit 1 μM MNNG und 23 h Reparatur mit 10 mM Myosmin und 1 mM SIN-1. Die DNA-Schäden werden im Comet-Assay als OTM bestimmt.

	NK (24 h)	MNNG (1 h)	MNNG 0 (23 h)	MNNG Myo (23 h)	MNNG SIN-1 (23 h)	MNNG Myo+SIN-1 (23 h)
N	6	7	6	6	6	6
Mittelwert	0,20	10,57	0,90	1,83	3,85	4,44
S.D.	0,11	1,46	0,40	0,76	1,12	2,08
p (gegen NK)		0,0078	0,0156	0,0156	0,0156	0,0156
p (gegen MNNG 1 h)			0,0156	0,0156	0,0156	0,0156
p (gegen 0)				0,0156	0,0156	0,0156
p (gegen Myo)					0,0156	0,0156
p (gegen SIN-1)						0,4219

4 Diskussion

Ösophaguskrebs kommt in zwei Formen vor. Ösophagus-Plattenepithelkarzinome haben in vielen Entwicklungsländern besonders aus dem asiatischen Raum eine hohe Inzidenz. Adenokarzinome sind dagegen in den westlichen Ländern häufiger, wobei ihre Inzidenz insgesamt stark zunimmt [74,75]. Das Adenokarzinom entwickelt sich meist aus einem Barrett-Ösophagus, bei dem das normale Plattenepithel durch ein Zylinderepithel (Metaplasie) ersetzt wird. In diesem Gewebe kann es zu weiteren genetischen Veränderungen kommen, so dass sich über eine Dysplasie ein Adenokarzinom entwickelt. Als stärkster Risikofaktor für diese Krebsart gilt der gastroösophageale Reflux, von dem etwa 20% der Bevölkerung betroffen sind [76,77]. Dazu kommen Übergewicht, Rauchen, Zwerchfelldurchbruch und verschiedene Pharmakotherapien. Außerdem spielt die Ernährung eine wichtige Rolle. Eine kalorien-, fett- und cholesterinreiche Ernährung sowie wenig Antioxidanzien und Ballaststoffe erhöhen das Risiko [78-85]. Etwa 10% der Refluxpatienten entwickeln einen Barrett-Ösophagus, wobei Männer wesentlich stärker gefährdet sind als Frauen. Das liegt wahrscheinlich daran, dass bei Frauen mit Refluxsymptomen weniger Säure in die Speiseröhre aufsteigt [86]. Die molekularen Vorgänge, die von der Refluxkrankheit zum Adenokarzinom führen sind bis heute nicht eindeutig geklärt. Refluxbestandteile wie Säure und Galle können die Schleimhaut der Speiseröhre schädigen und direkt oder über Entzündungsvorgänge zu DNA-Veränderungen führen [87]. Dadurch können Genmutationen oder Veränderungen der Genexpression in vielen verschiedenen Genen auftreten. Eine Beteiligung an der Entstehung maligner Zellen wurde für Gene beschrieben, die an der Steuerung der Apoptose beteiligt sind, für Gene, die den Zellzyklus regeln, für Tumorsuppressor- und Onkogene sowie für Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen [88-93]. Das am besten untersuchte Gen in Adenokarzinomen des Ösophagus ist das Tumorsuppressorgen *p53*. Es verhindert in der normalen Zelle, dass DNA-Schäden bei der Teilung an die Tochterzellen weitergegeben werden. Außerdem aktiviert es beim Auftreten von DNA-Schäden die Reparatur und stoppt so lange die Zellteilung. Bei zu stark geschädigten Zellen induziert es die Apoptose. In etwa der Hälfte der Adenokarzinome des Ösophagus sind Mutationen im *p53*-Gen vorhanden [6]. Der Reflux von Säure allein scheint die Bildung eines Barrett-Ösophagus nicht auszulösen. Zumindest führt eine Säure unterdrückende Therapie nicht zu einer Rückwandlung des Barrett-Epithels in ein normales Plattenepithel. Gallensäuren können als Tumorpromotoren wirken, indem sie über eine Aktivierung der Proteinkinase C die Zellproliferation erhöhen [94]. Außerdem wird das Aktivator-Protein-1 (AP-1) induziert. Die Dihydroxy-Gallensäuren Chenodeoxycholat und Deoxycholat führen laut Zhang et al. [95] in der humanen Ösophagus-Adenokarzinomzelllinie

SK-GT-4 zu einer Aktivierung der Cyclooxygenase 2 (COX-2) und zu einem etwa 10-fachen Anstieg der Prostaglandin E₂ (PGE₂) Produktion. Die COX-2 spielt demnach eine wichtige Rolle in der Tumorentwicklung, wahrscheinlich in Verbindung mit der NO-Synthase [96].

4.1 Verwendete Testmethoden

4.1.1 Cytotoxizität

Hier wurde zum einen der MTT-Test und außerdem der Trypanblau-Ausschluss verwendet. Bei dem sensitiveren MTT-Test wird die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen bestimmt, die nur in lebenden Zellen gelbes MTT in blaues Formazan umsetzen. Die Konzentration des gebildeten Formazans kann photometrisch bestimmt werden und steigt mit der Anzahl der vitalen Zellen. Dieser Test wurde verwendet, um die Substanzkonzentrationen für die Comet-Assays zu bestimmen.

Vor der Durchführung des Comet-Assays wurde dagegen der schnellere Trypanblau-Ausschluss durchgeführt, um cytotoxische Effekte der Behandlung auszuschließen. Der Farbstoff kann nur in abgestorbene Zellen eindringen. Bei diesem Test muss ein Problem bedacht werden, das sich aus dem adhären, also am Boden des Kulturgefäßes anhaftenden Wachstum der OE33-Zellen ergibt. Wenn nach der Inkubationszeit mit der Testsubstanz das Medium abgesaugt wird, werden auch abgestorbene Zellen mit abgesaugt. Damit werden nur noch Zellen angefärbt, die zwar so stark geschädigt sind, dass der Farbstoff die Zellmembran durchdringen kann, die sich aber noch nicht vom Boden des Kulturgefäßes abgelöst haben. Dadurch kann es vorkommen, dass die Vitalität der behandelten Zellen höher erscheint, als sie tatsächlich ist. In den durchgeführten Versuchen konnte häufig beobachtet werden, dass die Zellzahl in den mit höheren Konzentrationen der Testsubstanz behandelten Versuchsansätzen abnahm, während die Vitalität hoch war und keine DNA-Schäden nachgewiesen werden konnten. Dies kann entweder an dem eben beschriebenen Phänomen liegen, dass sehr stark geschädigte Zellen abgesaugt wurden oder die Testsubstanz hat die Zellproliferation gehemmt, ohne im Comet-Assay nachweisbare Schäden zu verursachen. Um diese Frage zu klären, müsste die Zahl apoptotischer und nekrotischer Zellen im Medium der Versuchsansätze bestimmt werden.

Die MTT-Tests mit Myosmin zeigen, dass es bis zu Inkubationszeiten von 4 Stunden in Konzentrationen bis etwa 30 mM eingesetzt werden kann, ohne dass die Vitalität unter 70% abfällt. Bei 24-stündiger Inkubation sollte die Konzentration nicht über 10 mM liegen. Für die Comet-Assays wurden zum Teil auch höhere Konzentrationen eingesetzt, da bei niedrigeren

Konzentrationen keine Cometen zu beobachten waren. In den parallel durchgeführten Trypanblau-Ausschlüssen lag die Vitalität der eingesetzten Zellen aber immer über 70%, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die nachgewiesenen Schäden nicht auf cytotoxischen Effekten beruhen. Allerdings kommt es selbst bei diesen hohen Myosminkonzentrationen nicht zu einem signifikanten Anstieg der DNA-Schäden. Die MTT-Tests mit SIN-1 zeigen, dass die Vitalität im getesteten Konzentrationsbereich durchgehend bei 80% der mit Lösungsmittel behandelten Negativkontrollen liegt. Die Ursache für diesen konzentrationsunabhängigen Effekt, der bereits bei sehr niedrigen Konzentrationen von SIN-1 maximal ausgeprägt zu sein scheint, ist nicht bekannt.

4.1.2 Comet-Assay

Der Comet-Assay dient dem Nachweis von DNA-Schäden an Einzelzellen. Er weist Einzel- und Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und Reparaturfragmente nach. Nach der Behandlung mit der Testsubstanz werden die Zellen in ein Agarosegel eingebettet. Die Zell- und Kernmembran werden anschließend durch alkalische Lyse entfernt. Strangbrüche führen zur Bildung von DNA-Fragmenten. Während der Elektrophorese wandern diese Fragmente schneller in Richtung Anode als die intakte DNA. Durch Anfärben mit Ethidiumbromid lässt sich diese Migration im Fluoreszenzmikroskop sichtbar machen. Unfragmentierte DNA befindet sich im Kopf des Kometen, kürzere DNA-Fragmente bilden den Schweif. Je mehr DNA sich im Kometenschweif befindet und je länger dieser ist, umso stärker ist die Schädigung der Zelle. Als Maß für diese Schädigung dient das Olive Tail Moment. Zytotoxische Effekte führen ebenfalls zur Fragmentierung der DNA. Um Cytotoxizität als Ursprung der Cometenbildung auszuschließen, wird bei jedem Comet-Assay vor dem Einbetten der Zellen in die Agarose ein Trypanblau-Ausschluss durchgeführt. Da nur Zellen verwendet werden, bei denen die Vitalität über 70% liegt, sollten zytotoxische Effekte als Ursache für die Cometenbildung ausgeschlossen sein. Der Comet-Assay stellt eine zeit- und kostensparende Alternative zu Chromosomenanalysen wie Mikrokerntest oder Schwesterchromatidenaustauschtest dar. Je nach benötigter Inkubationszeit lassen sich innerhalb eines Tages Aussagen über die Genotoxizität von biologischen, chemischen oder physikalischen Noxen treffen. Bei der Interpretation der Ergebnisse muss allerdings bedacht werden, dass dieser Test keinen toxikologischen Endpunkt darstellt. Weder die detektierten DNA-Strangbrüche noch DNA-Addukte sind gleichbedeutend mit einer kanzerogenen Wirkung, da die Schäden später wieder repariert werden können oder zum Zelltod führen. Außerdem gilt der Test als relativ unempfindlich. Zur Induktion nachweisbarer Schäden müssen häufig sehr viel höhere Konzentrationen eingesetzt werden, als *in vivo* vorkommen. Auf der anderen Seite ist der Mensch geno-

toxischen Substanzen aber häufig über einen sehr viel längeren Zeitraum ausgesetzt als die Zellen im Comet-Assay. Dadurch kann es zur Anreicherung promutagener DNA-Schäden kommen.

Aufgrund der beschriebenen Vorteile wird der Comet-Assay heute sehr häufig für die Untersuchung der Genotoxizität verschiedenster Substanzen eingesetzt. So wurden in verschiedenen Arbeiten die Auswirkungen des Rauchens auf die DNA untersucht [97-99]. Außerdem diente der Test dem Nachweis der Genotoxizität von Einzelsubstanzen wie etwa polyzyklischen Kohlenwasserstoffen [100,101]. Darüber hinaus wurde die im Vergleich zu normalen Zellen zum Teil veränderte Sensitivität von Krebszellen gegenüber verschiedenen Noxen untersucht [102,103].

4.2 Genotoxische Wirkung von Myosmin

Als ein Risikofaktor für die Entstehung von Adenokarzinomen gilt das Rauchen. Tabakrauch ist eine Hauptquelle für die Belastung des Menschen mit Nitrosaminen [104]. Von den sieben tabakspezifischen Nitrosaminen (TSNA) besitzen *N*-Nitrosornicotin (NNN), 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol (NNAL) das eindeutig höchste kanzerogene Potential. Ihre wichtigsten Zielorgane umfassen Lunge, Ösophagus und Pankreas [57]. Während NNK ausschließlich bei der Nitrosierung von Nicotin entsteht, wird NNN zusätzlich durch Nitrosierung von Nicotin und Myosmin gebildet [52,105,106]. Die durch eine Cytochrom P450 Monooxygenase vermittelte Aktivierung der beiden TSNA NNN und NNK führt zu einer reaktiven Zwischenstufe, die an DNA und Proteine wie z.B. Hämoglobin binden kann (Abbildung 9). Bei der Hydrolyse dieser Addukte wird 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) freigesetzt. Hämoglobinaddukte, die HPB freisetzen, wurden als spezifische Biomarker für eine Belastung mit TSNA aus Tabak und Tabakrauch vorgeschlagen. Mehrere unabhängige Studien zeigen jedoch, dass sich die HPB-Addukte beim Raucher und Nichtraucher nur um das Zwei- bis Dreifache unterscheiden [107-110]. Da sich andere Biomarker für die Tabakrauchbelastung wie Cotinin und NNAL, die Hauptmetaboliten von Nicotin bzw. NNK, beim Raucher und Nichtraucher um mindestens den Faktor 100 unterscheiden [13,111,112], sollte eine Differenz in der gleichen Größenordnung auch für die HPB-Addukte zu erwarten sein. Aus diesem Grund wurden weitere tabakunabhängige Quellen für die HPB-Addukte postuliert [113]. Eine hohe Hintergrundbelastung, die aus anderen Quellen stammt, könnte den geringen Unterschied zwischen Rauchern und Nichtrauchern erklären. Bisher war das Tabakalkaloid Myosmin von geringerem Interesse, weil es verglichen mit Nicotin und Nicotin nur in geringen Mengen in Tabak

und Tabakrauch gefunden wird [11,114-116]. In unserem Arbeitskreis wurde jedoch gezeigt, dass sich das Vorkommen von Myosmin nicht auf den Tabak beschränkt. Das Alkaloid ist in Nüssen [16], in einer Reihe von Grundnahrungsmitteln, sowie in Obst, Gemüse und Milch [17] in ppb-Mengen enthalten. Die Aufnahme von Myosmin über die Nahrung wurde als mindestens gleichwertig zu einer starken Passivrauchbelastung geschätzt [17]. Außerdem konnte es im Speichel in einer Konzentration von durchschnittlich 1,8 ng/mL (12,31 nM) nachgewiesen werden. Die mittleren Konzentrationen von Myosmin im Speichel unterscheiden sich mit 1,87 bzw. 1,58 ng/mL bei Rauchern und Nichtrauchern nur geringfügig voneinander und korrelieren nicht mit den Cotininkonzentrationen [18]. Im Plasma werden vergleichbar hohe Myosminmengen gefunden, aus denen sich unter Annahme einer ähnlichen Toxikokinetik wie für Nikotin eine tägliche Aufnahme von Myosmin im mg-Bereich berechnen lässt [117,118]. Diese Myosminmengen können mit den bisher gefundenen Rückständen in Lebensmitteln nicht erklärt werden. Es muss demnach weitere Quellen für Myosmin geben, die zu einer Belastung des Menschen führen, die weit über die Myosminaufnahme durch das Rauchen hinausgeht.

Myosmin wird unter Bedingungen, wie sie im Magensaft vorliegen, innerhalb weniger Stunden nahezu vollständig nitrosiert [52,53]. Die Nitrosierung ist abhängig vom pH-Wert und läuft besonders effektiv im Bereich zwischen pH 2 und 5 ab. Unter diesen Bedingungen ist HPB das Hauptprodukt (60-75%), während bei pH 1 dreimal mehr NNN (16%), verglichen mit HPB (5%), gebildet wird. Die Bildung von HPB erfolgt über ein instabiles hochreaktives Intermediat, welches nicht nur mit Wasser abreagiert, sondern auch Proteine und DNA angreift.

Untersuchungen an humanem Ösophagusgewebe haben gezeigt, dass Krebspatienten höhere DNA-Adduktlevel haben, als Kontrollpersonen ohne Tumorerkrankung. Ein Zusammenhang mit dem Rauchen konnte nicht nachgewiesen werden. Olliver et al. [87] haben Gewebeproben von Patienten mit Barrett-Ösophagus und Adenokarzinomen im Ösophagus mit Hilfe des Comet-Assays auf DNA-Schäden untersucht. Dabei konnten sie zeigen, dass die Schäden in beiden Patientengruppen im Barrettgewebe gegenüber normalem Plattenepithel und Gewebe des Magens erhöht sind. Da die DNA-Addukte des Ösophagus deutlich mit dem BMI ansteigen [68], liegt es nahe Nahrungsfaktoren wie unter Umständen Myosmin, für diese Addukte verantwortlich zu machen. Die DNA-Bindung von radioaktivem Myosmin wurde *in vitro* unter Nitrosierungsbedingungen nachgewiesen [53]. Kleinsasser et al. [29] haben die genotoxische Wirkung von Myosmin im Comet-Assay gezeigt. Sowohl in humanen Lymphocyten als auch in Nasenschleimhautzellen konnten zeit- und konzentrationsabhängige Schäden

nachgewiesen werden. Bei Myosmin-behandelten Ratten wurde ein HPB-bspaltendes Addukt am Hämoglobin und an der Ösophagus-DNA gefunden [119].

Die hier durchgeführten Inkubationen von OE33-Zellen mit Myosmin führen im neutralen pH-Bereich konzentrationsabhängig nur zu einem sehr geringen Anstieg der im Comet-Assay nachweisbaren DNA-Schäden. Dieser Anstieg ist nach 1-stündiger Inkubation für 50 mM, nach 4-stündiger Inkubation für 10 und 50 mM und nach 24-stündiger Inkubation für 25 mM Myosmin signifikant. Obwohl die Vitalität der verwendeten Zellen in den durchgeführten Trypanblau-Ausschlusstests hoch ist, könnten bei der Inkubation mit 25 und 50 mM Myosmin bereits zytotoxische Effekte auftreten. Die Versuche mit unterschiedlichen Inkubationszeiten zeigen keine deutliche Zunahme der Schädigung nach längerer Inkubation. Diese Ergebnisse stehen damit im Widerspruch zu den an Lymphocyten und Nasenschleimhautzellen durchgeführten Versuchen [29]. Sie könnten ein weiterer Hinweis darauf sein, dass aus Krebszellen gewonnene Zellkulturen evtl. nicht den gleichen Metabolismus besitzen wie Primärzellen. Außerdem liegt unter neutralen Bedingungen fast das gesamte Myosmin in der geschlossenen Iminform vor. Eine Nitrosierung würde hier zu NNN führen, das weiter aktiviert werden muss, um DNA-Addukte zu bilden. *In vitro* Versuche haben allerdings gezeigt, dass Myosmin bei neutralen pH-Werten nur sehr langsam nitrosiert wird. Am effektivsten läuft diese Reaktion bei pH-Werten zwischen 2 und 5 ab. Bereits bei pH 5 liegt Myosmin zu über 90% in einer ringoffenen Form vor, deren Nitrosierung direkt zu einem reaktiven Metaboliten führt, der mit DNA HPB-freisetzende Addukte bildet. Dementsprechend sollten die Comet-Assays ebenfalls bei möglichst niedrigen pH-Werten durchgeführt werden. So ließe sich auch das Aufsteigen von Magensäure in den Ösophagus abbilden. Die für die Versuche eingesetzten OE33-Zellen reagieren allerdings empfindlich auf niedrige pH-Werte. Schon bei pH 5 ist die während der jeweiligen Versuche durch Trypanblau-Ausschluss überprüfte Vitalität der Zellen so gering, dass sie kaum noch für die Comet-Assays eingesetzt werden können. Um dieses Problem zu vermeiden werden die OE33-Zellen bei pH 6 mit Myosmin behandelt. Bei diesem pH-Wert liegt zwar nur ein geringer Teil des Myosmins in einer offenkettigen Form vor und auch die Nitrosierung läuft zumindest *in vitro* nur sehr langsam ab, dafür führt die Behandlung aber nicht zu einer Verringerung der Vitalität oder Zellzahl im Versuchsansatz. Die Behandlung mit 0 bis 25 mM Myosmin führt konzentrationsabhängig zu einem kontinuierlichen Anstieg der nachgewiesenen DNA-Schäden, die deutlich über den im Neutralen ermittelten Schäden liegen. Nach 4 Stunden Inkubation unterscheiden sich die induzierten DNA-Schäden ab einer Konzentration von 10 mM Myosmin signifikant von der Negativkontrolle. Nach 24-stündiger Inkubation ist dies bereits bei 5 mM zu beobachten. Werden die

Zellen mit 25 mM Myosmin behandelt, steigt das OTM nach 4 Stunden auf den 4-fachen bzw. nach 24 Stunden auf den 7-fachen Wert der Negativkontrolle.

Aus den Literaturangaben und den hier erzielten Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass Myosmin zumindest unter sauren Bedingungen ein genotoxisches Potential besitzt und somit besonders in Kombination mit aufsteigender Magensäure eine Rolle bei der Adduktbildung im Ösophagus spielen könnte.

4.3 Myosmin und reaktive Spezies

Chronische Entzündungen sind an der Krebsentstehung in verschiedenen Organen beteiligt. Entzündungsvorgänge führen zu oxidativen Schäden, die eine Rolle bei der Entwicklung der gastroösophagealen Refluxkrankheit (GERD) und wahrscheinlich auch des Barrett-Ösophagus spielen. Die Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die an der DNA zu Strangbrüchen und Basenmodifikationen führen steigt mit zunehmender Ösophagitis an und ist in den Zellen des Barrett-Ösophagus am höchsten. Besonders wenn proliferierende Stammzellen in der Basalzellschicht des Ösophagus oxidativem Stress ausgesetzt sind steigt die Gefahr, dass sich ein Adenokarzinom bildet [120].

4.3.1 Wasserstoffperoxid

Oxidativer Stress spielt wie gesagt eine wichtige Rolle für die Entstehung und Entwicklung der Refluxkrankheit, sowie für die Entstehung von Adenokarzinomen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass in der Ösophagismukosa von Patienten mit Refluxkrankheit vermehrt Sauerstoffradikale freigesetzt werden [121]. Epidemiologische Studien zeigen außerdem eindeutig, dass eine höhere Aufnahme von Antioxidanzien das Risiko ein Adenokarzinom im Ösophagus zu entwickeln senkt [6,81,83,85]. Wasserstoffperoxid ist eine stabile Verbindung, die in der lebenden Zelle als Endprodukt vieler Oxidationsreaktionen gebildet wird. Es kann sowohl oxidierend als auch reduzierend wirken. Außerdem führt es zur Bildung des sehr reaktiven Hydroxylradikals. Unter normalen Bedingungen beträgt die H_2O_2 -Konzentration in der Zelle 10^{-7} bis 10^{-9} M. Im Verlauf von Entzündungsprozessen kann die Konzentration aber steigen. Wasserstoffperoxid verursacht im Comet-Assay nachweisbare oxidative DNA-Schäden durch die Induktion von Einzelstrangbrüchen und die Oxidation von Basen [67]. Die hier durchgeführten Versuche an OE33-Zellen bestätigen diesen Effekt. Eine 1-stündige Inkubation mit 1 mM H_2O_2 verzehnfacht den DNA-Schaden gegenüber der Negativkontrolle. Die Inkubation mit Myosmin alleine führt auch hier kaum zu einem Schaden. Werden die Zellen mit H_2O_2 und Myosmin zusammen inkubiert, so erhöht sich das OTM zwar auf mehr als die

Summe der Einzelschädigungen, unterscheidet sich jedoch nicht signifikant von der Behandlung mit H_2O_2 allein. Demnach wird Myosmin zumindest unter den getesteten Versuchsbedingungen nicht oder nur geringfügig durch H_2O_2 aktiviert. Um den Anteil des oxidativen Schadens an den verursachten Strangbrüchen zu untersuchen, wurden zusätzlich Comet-Assays mit der Reparaturenuclease Formamidopyrimidinglykosylase (FPG) durchgeführt. Diese erkennt 8-OH-Guanin, einen häufig genutzten Biomarker für oxidative DNA-Schäden, und andere geschädigte Purine und führt an der entsprechenden Stelle zum Strangbruch. Wie in der Literatur beschrieben [67], verursacht die Inkubation von OE33-Zellen mit H_2O_2 in hohem Maße oxidative Schäden, die von der FPG erkannt werden. Bei mit Myosmin behandelten OE33-Zellen führt die Behandlung mit FPG dagegen nicht zu einer Steigerung des OTM. Dies bedeutet, dass die Genotoxizität von Myosmin nicht auf der Induktion oxidativer Schäden beruht, was jedoch auch nicht zu erwarten war.

4.3.2 Stickoxid und Peroxynitrit

Stickoxid (NO^\bullet) hat neben seinen erwünschten physiologischen Effekten z.B. in der Neurotransmission, Immunabwehr und Herz-Kreislauf-Kontrolle auch eine wichtige Rolle in verschiedenen pathologischen Prozessen einschließlich Entzündungen und Kanzerogenese [122]. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird beispielsweise in colorectalen Adenomen induziert. In der Barrett-Schleimhaut und in Adenokarzinomen des Ösophagus ist sowohl die Expression der iNOS mRNA als auch des Proteins selber gegenüber normalem Gewebe des Magens erhöht [96]. Als Reaktion auf Kontakt mit Säure wird von den Zellen der distalen Ösophagusschleimhaut NO^\bullet freigesetzt. Das lässt sich sowohl in gesunden, als auch in weitaus höherem Maße in GERD Patienten beobachten. Woher das freigesetzte NO^\bullet stammt ist noch nicht genau geklärt, evtl. kommt Nitrat als Quelle in Frage. Die Expression der iNOS wird durch die Säureexposition nicht beeinflusst [123]. Zusätzlich entsteht nitrosierender Stress, wenn im Speichel vorhandenes Nitrit mit Magensäure in Kontakt kommt und dadurch zu salpetriger Säure und verschiedenen nitrosierenden Verbindungen umgewandelt wird. Damit diese nicht zur Bildung kanzerogener N-Nitrosoverbindungen führen, wird aktiv Ascorbinsäure in den Magensaft abgegeben. Die Ascorbinsäure reagiert sehr schnell mit den nitrosierenden Spezies, wobei diese zu NO^\bullet reduziert werden. Im Ösophagus von Patienten mit Refluxkrankheit können so NO^\bullet -Konzentrationen bis zu $50 \mu\text{M}$ gebildet werden [124]. Während NO^\bullet selber nur langsam mit Biomolekülen reagiert, werden mit Sauerstoff oder Superoxid (O_2^-) wesentlich reaktivere Spezies gebildet. Beispielsweise reagiert NO^\bullet mit Superoxid schnell zu Peroxynitrit. Dieses oxidiert und nitrosiert effektiv alle Klassen von Biomolekülen wie Proteine, Lipide, Thiole und Nukleinsäuren. SIN-1, der reaktive Metabolit

des Vasodilatators Molsidomin wird häufig eingesetzt, um NO^{\bullet} , O_2^{\ominus} , Peroxynitrit und Hydroxylradikale freizusetzen. Damit soll die Freisetzung dieser Stoffe durch Makrophagen, Neutrophile und Endothelzellen imitiert werden. In sauerstoffgesättigter Lösung zerfällt SIN-1 und setzt über einen Zeitraum von zwei Stunden NO^{\bullet} und O_2^{\ominus} in konstanten Raten frei [125]. Kim et al. [62] haben an *supF* Shuttle Vector DNA beobachtet, dass SIN-1 weniger mutagen wirkt als die direkte Gabe von Peroxynitrit. Es hat einen anderen Wirkmechanismus und führt v.a. über die Oxidation der Desoxyribose zu Einzelstrangbrüchen. Stehen während der Versuche zu wenig Sauerstoff oder alternative Elektronenakzeptoren zur Verfügung, wie dies *in vivo* oft der Fall ist, wird aus SIN-1 NO^{\bullet} aber kein O_2^{\ominus} freigesetzt und damit auch kein Peroxynitrit gebildet (Abbildung 25) [64].

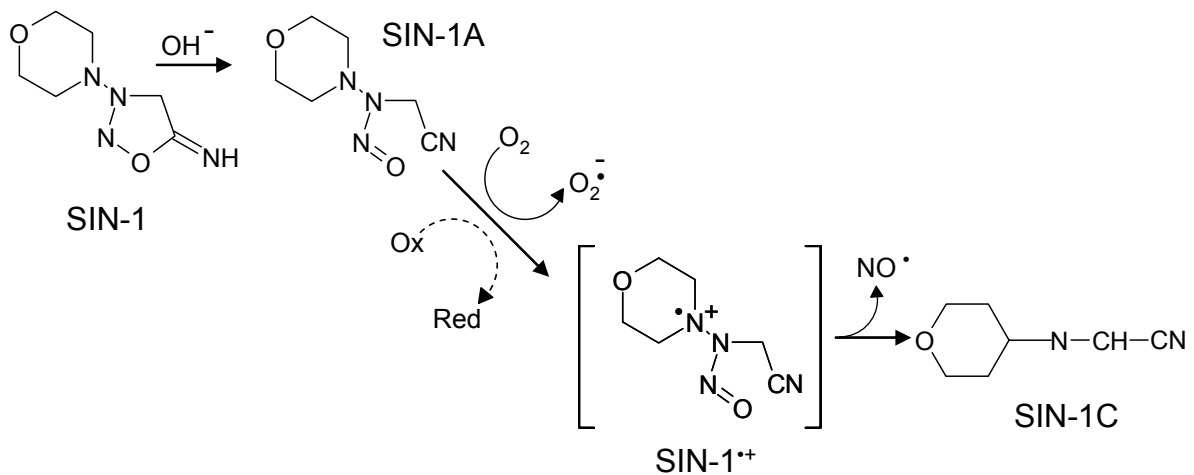


Abbildung 25: Oxidation von SIN-1 zu SIN-1C; Der gestrichelte Pfeil zeigt, dass bei einem anderen Oxidationsmittel als Sauerstoff kein Superoxid freigesetzt wird (nach Singh et al. [64]).

Doulias et al. [70] kommen zu dem Ergebnis, dass bei Versuchen mit Zellkulturen nach etwa einer halben Stunde der Sauerstoff über dem Zellkulturmedium verbraucht ist. In den hier durchgeführten Versuchen wurden die Versuchsansätze während der Inkubationszeit nicht durch Schütteln oder Sauerstoffeinleitung belüftet. Es ist also sehr wahrscheinlich, dass nach einer gewissen Zeit nicht mehr genügend Sauerstoff für die Reaktion mit SIN-1 zur Verfügung stand. Außerdem sind in den OE33-Zellen und evtl. auch im Zellkulturmedium sicher biologische Oxidanzien vorhanden. Da die genauen Reaktionsmechanismen von SIN-1 unter diesen Bedingungen nicht bekannt sind, ist es schwierig zu sagen in welchem Verhältnis NO^{\bullet} und Peroxynitrit freigesetzt worden sind. SIN-1 beeinflusst die Reaktivität von Myosmin aber ganz offensichtlich. Die Inkubation von 5 oder 10 mM Myosmin, die alleine nicht zu Strangbrüchen führt, verursacht zusammen mit SIN-1 einen signifikanten Anstieg der induzierten

DNA-Schäden gegenüber der Inkubation mit SIN-1 alleine. Da eine kurze Inkubationszeit, in der noch genügend Sauerstoff vorhanden ist um vor allem Peroxynitrit freizusetzen, nicht zu einem deutlichen Anstieg der Strangbrüche führt, ist es wahrscheinlich, dass dieser auf einer Interaktion zwischen NO[•] und Myosmin beruht. Es ist davon auszugehen, dass das Myosmin durch NO[•] nitrosiert wird. Die Myosminkonzentration die nötig ist, um im Comet-Assay bei 4-stündiger Inkubation auch mit SIN-1 zusammen einen genotoxischen Effekt zu zeigen (1 mM), liegt 100.000-fach über den in unserem Arbeitskreis für den Speichel bestimmten Konzentrationen (etwa 10 nM). In der Speiseröhre sind vermutlich ähnlich niedrige Konzentrationen zu erwarten. Daraus kann jedoch nicht geschlossen werden, dass Myosmin keine kanzerogenen Wirkungen hat. Nachdem der Comet-Assay relativ unempfindlich ist, müssen bei diesem Test allgemein höhere Substanzkonzentrationen eingesetzt werden. Außerdem ist der Körper dem in Nahrung und Tabakrauch enthaltenen Myosmin über Jahrzehnte ausgesetzt, so dass mit der Zeit kumulative Schäden entstehen können.

Auch hier wurden Versuche mit FPG durchgeführt, um festzustellen welchen Anteil oxidative Schäden haben. Wiederum führt die FPG-Behandlung nach Inkubation mit Myosmin allein kaum zu einem Anstieg des OTM. Die durch SIN-1 verursachten Strangbrüche steigen etwa um den Faktor 2,3. Es werden also eindeutig oxidative Schäden eingeführt, der Effekt ist jedoch nicht signifikant. Der Anteil der oxidativen Schäden bei der Behandlung mit Myosmin und SIN-1 in Kombination ist wieder geringer, was darauf hindeutet, dass tatsächlich Myosmin an der Induktion dieser Schäden beteiligt ist. Ein weiterer Aspekt, der bei Inkubationen in Kombination mit SIN-1 beachtet werden muss ist, dass NO[•] und Peroxynitrit die Nukleotid-Excisionsreparatur (NER) hemmen [126]. Die NER repariert außer UV-Schäden und DNA Cross-links auch sperrige Addukte und damit möglicherweise auch HPB-Addukte. Es könnte deshalb nach längerer Inkubation mit Myosmin allein ein Teil der induzierten Schäden schon wieder repariert werden und diese Reparatur könnte durch SIN-1 gehemmt werden. Dadurch könnten die im Comet-Assay gemessenen Schäden im Vergleich höher ausfallen.

4.4 COX-2 Hemmung

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die Einnahme nichtsteroidaler antiinflammatorischer Substanzen (NSAIDs) wie etwa Aspirin die Gefahr ein Ösophaguskarzinom zu entwickeln um bis zu 90% verringern kann [127]. Die NSAIDs hemmen in einem Teil der daraufhin untersuchten Zelltypen die Aktivität der Cyclooxygenasen (COX), die die Bildung von Prostaglandinen aus Arachidonsäure katalysieren. Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation von Proliferation und Apoptose von Tumorzellen, sie wirken als

Wachstumsfaktoren, Immunsuppressoren und fördern die Angiogenese. Die Expression der COX-2 wird durch proinflammatorische und mitogene Stimuli wie Cytokine, Endotoxine, Interleukine und Phorbolster induziert [128]. Zhang et al. [129] konnten in Ösophagus-Plattenepithelzelllinien zeigen, dass sowohl konjugierte als auch unkonjugierte Gallensäuren die COX-2 Expression erhöhen. Unkonjugierte Gallensäuren sind dabei etwa 5-fach effektiver als konjugierte, weil sie lipophiler sind und deshalb besser in die Zellen gelangen können. Dafür kommen konjugierte Gallensäuren im oberen Gastrointestinaltrakt aber viel häufiger vor, wodurch sich die Wahrscheinlichkeit erhöht, dass sie eine Rolle bei der Entwicklung eines Barrett-Ösophagus spielen. Über die Expression von COX-2 in Ösophagusgeweben liegen sehr unterschiedliche Studien vor. Zimmermann et al. [128] fanden COX-2 Aktivität in Adenokarzinomzellen, aber nicht im angrenzenden Metaplasie-Gewebe. Shirvani et al. [130] beschreiben einen deutlichen Anstieg der Expression von Metaplasie über Dysplasie zum Adenokarzinom. Laut Cheong et al. [127] wird die COX-2 im normalen Plattenepithel des Ösophagus in geringen Mengen exprimiert. Die Expression steigt danach im Metaplasie-Gewebe des Barrett-Ösophagus und noch stärker in Dysplasie-Gewebe an, ist in den Zellen des Adenokarzinoms aber wieder geringer. Im Gegensatz zu den meisten anderen Studien stammen hier die Gewebeproben der einzelnen Entwicklungsstadien jeweils von den gleichen Patienten. Dadurch werden interindividuelle Unterschiede der COX-2 Expression ausgeglichen. NSAIDs, die im Ösophagus als COX-2 Hemmstoffe wirken, können der Chemoprävention oder Chemotherapie von Adenokarzinomen in diesem Organ dienen. In anderen Organen, in denen NSAIDs ebenfalls antiproliferativ und proapoptotisch wirken, scheinen dagegen andere Mechanismen beteiligt zu sein. So führt die Gabe des selektiven COX-2 Hemmstoffes NS-398 in der humanen Leberkrebs-Zelllinie HepG2 beispielsweise nicht zu einer verringerten COX-2 Expression [131].

Die Wirkung von NS-398 auf OE33-Zellen wurde bereits untersucht [73]. Mit Hilfe von Western Blots konnte gezeigt werden, dass eine 24-stündige Inkubation von OE33-Zellen mit 50 μ M NS-398 zu einer signifikanten Hemmung der COX-2 mRNA-Expression auf etwa die Hälfte des Kontrollwertes führt. Gleichzeitig wird die Synthese von Prostaglandin E₂ (PGE₂) gehemmt und die Zellproliferation durch vermehrte Apoptose verlangsamt. Auch in den hier durchgeführten Versuchen wird die Proliferation der OE33-Zellen durch Inkubation mit NS-398 gehemmt. Eine 24-stündige Vorbehandlung mit dieser Substanz führt im Comet-Assay zu geringfügig erhöhten DNA-Schäden durch Myosmin. Da die Hemmung der COX-2 eigentlich chemopräventiv wirkt, wäre das Gegenteil zu erwarten gewesen. Der Anstieg ist jedoch sehr gering und man kann nicht ausschließen, dass es sich im Rahmen der Streuung

der Werte um einen Zufallsbefund handelt. NS-398 hat jedenfalls keinen Schutzeffekt auf die Genotoxizität von Myosmin. Bei der Inkubation mit Myosmin und SIN-1 zusammen steigt der DNA-Schaden durch Vorinkubation mit NS-398 um etwa ein Drittel an, aber auch dieser Effekt ist nicht signifikant. Möglicherweise hemmt NS-398 die DNA-Reparatur und führt so zu größeren DNA-Schäden. Raju et al. [132] haben in einer humanen Krebszelllinie gezeigt, dass die Behandlung mit dem COX-2 Hemmstoff Celecoxib zu einer Downregulation des Ku70 Proteins und einer Hemmung der DNA-abhängigen Proteinkinase führt. Beide sind an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt. Falls NS-398 den gleichen Effekt hat, ließe sich dadurch die Tendenz zu höheren DNA-Schäden durch Myosmin und SIN-1 im Comet-Assay erklären.

4.5 Hemmung der AGT

Das DNA-Reparaturenzym *O*⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT) entfernt Methyl- oder andere Alkyladdukte von der *O*⁶-Position des Guanins und überträgt sie auf eine Sulfhydrylgruppe am aktiven Zentrum des Enzyms. Dadurch werden mögliche G:C → A:T Austausche verhindert. Das Enzym wurde bereits in vielen verschiedenen Spezies der Archaeen, Bakterien und Eukaryoten einschließlich des Menschen nachgewiesen. In vielen Tumorgeweben ist die Transkription der AGT durch eine Hypermethylierung des Promotors ausgeschaltet. 60% der Adenokarzinome des Ösophagus weisen eine anormale Methylierung der Transferase auf. Die Inaktivierung der AGT soll ebenfalls am Auftreten von G:C → A:T Mutationen in den *p53*-Genen von colorectalen Tumoren, Gehirntumoren (Astrozytom) und Lungenkrebs beteiligt sein. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Überexpression des Enzyms die Krebsentstehung verhindern kann. In transgenen Mäusen schützt es zum Beispiel vor G → A Mutationen in *K-ras* Onkogenen von Lungentumoren [133]. Die AGT scheint damit der wichtigste Schutzmechanismus gegen methylierende Kanzerogene zu sein. Neben Methyladdukten erkennt die Transferase wie bereits erwähnt auch andere Alkyladdukte als Substrat. Dazu gehört auch eines der Pyridyloxobutyladdukte (HPB-Addukte), das *O*⁶-[1-Oxo-1-(3-pyridyl)but-4-yl]-d-Guanosin, das außer von NNK und NNN [134,135] wahrscheinlich auch von Myosmin gebildet wird. Dieses und andere HPB-Addukte könnten allerdings auch durch Nucleotidexcisionsreparatur (NER) entfernt werden, bei der ein Stück des geschädigten DNA-Stranges herausgeschnitten wird und anhand der Information des Gegenstrangs neu synthetisiert wird. Da die AGT bei der Entfernung von Addukten inaktiviert wird, können zusätzliche Addukte wie das HPB-Addukt, selbst wenn sie nicht direkt an der Krebsentstehung beteiligt sind, die Reparaturkapazität der Zelle schwächen [58]. Andererseits macht man

sich in der Chemotherapie die Hemmung der AGT, z.B. durch O^6 -Benzylguanin, bei Tumoren zunutze, die durch eine hohe Expression der AGT behandlungsresistent werden [134].

Um den Einfluss von Myosmin auf die Reparaturkapazität zu untersuchen, wurden die OE33-Zellen zuerst eine Stunde dem direkt methylierenden Nitrosamid MNNG ausgesetzt. Dadurch entstehen Methyl-Addukte, die von der AGT repariert werden können. Wenn man die Zellen nach der Inkubation mit MNNG 23 Stunden mit frischem Medium weiterwachsen lässt, wird der entstandene DNA-Schaden fast vollständig repariert. Setzt man dem Medium in dieser Regenerationszeit 10 mM Myosmin zu, so verdoppelt sich der zurückbleibende Schaden, gleichbedeutend mit einer signifikanten Hemmung der Reparatur. Eine noch deutlichere Hemmung wird bei Inkubation mit SIN-1 gesehen. SIN-1 führt zur Bildung von NO^* und O_2^- bzw. Peroxynitrit. Laval und Wink [136] haben gezeigt, dass exogen zugeführtes NO^* die AGT hemmt. Dies wird durch die Ergebnisse mit SIN-1 bestätigt, wobei unklar bleibt, ob Peroxynitrit ebenfalls an der Hemmung beteiligt ist. Bei Inkubation der Zellen mit Myosmin und SIN-1 zusammen bleibt ein Schaden zurück, der zwar größer ist als der durch SIN-1 alleine ausgelöste Schaden, sich von letzterem aber nicht signifikant unterscheidet. Ein synergistischer Effekt lässt sich deshalb aus diesen Ergebnissen nicht ableiten.

4.6 Ausblick

Die hier dargestellten Versuche wurden alle an einer Krebszelllinie durchgeführt. Zelllinien, insbesondere wenn sie aus Krebszellen gewonnen werden, besitzen jedoch kaum den gleichen Fremdstoffmetabolismus wie Zellen *in vivo*. Daher wäre es interessant die Versuche an Miniorgankulturen zu wiederholen, die anschließend ebenfalls mit Hilfe des Comet-Assays untersucht werden könnten. Da Miniorgankulturen nur über einen kurzen Zeitraum kultiviert werden, ändert sich ihr Metabolismus kaum. Durch die Erhaltung des Organverbandes sind die Zellen unempfindlicher als Einzellzellen. Das kann als Hinweis auf eine vermehrte metabolische Aktivität der Zellen und einen höheren Schutz im Zellverband gewertet werden. Besonders interessant wäre in diesem Zusammenhang die Behandlung mit Myosmin bei sauren pH-Werten. Erst so ließe sich die Genotoxizität von Myosmin unter Refluxbedingungen beurteilen. Um einen möglichen Beitrag von Myosmin an der Krebsentstehung im Ösophagus weiter zu bestätigen, müssen zusätzliche Testmethoden angewendet werden. Der Comet-Assay stellt nur eine Momentaufnahme, jedoch keinen toxikologischen Endpunkt dar. Ob die beispielsweise durch Myosmin und SIN-1 verursachten DNA-Schäden tatsächlich zu Mutationen führen oder evtl. wieder repariert werden bzw. zum Absterben der Zelle führen kann mit diesem Test nicht unterschieden werden. Um die Reparatur der durch Myosmin und SIN-1

verursachten Schäden zu überprüfen, wurden bereits Comet-Assays durchgeführt. Dabei wurden die Zellen nach der Behandlung 24 Stunden mit frischem Medium weiter kultiviert, um den Zellen Zeit zur Reparatur zu geben. Diese Versuche führten jedoch zu sehr uneinheitlichen Ergebnissen auf deren Darstellung hier verzichtet wird. Mit dem ebenfalls durchgeführten HPRT-Test zum Nachweis von Vorwärtsmutationen, konnte keine mutagene Wirkung von Myosmin nachgewiesen werden. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Palitti aus Viterbo (Italien) werden zur Zeit auch Schwesterchromatid-Austauschtests und Chromosomenaberrationstests mit Myosmin in verschiedenen z.T. reparaturdefizienten Zelllinien durchgeführt. Diese Versuchen haben bisher widersprüchliche Ergebnisse gezeigt.

Eine weitere interessante Substanzgruppe sind die Gallensäuren, die eine wichtige Rolle bei der Adenokarzinom-Entstehung im Ösophagus spielen [137,138]. Erste Versuche zu möglichen Wechselwirkungen zwischen der Gallensäure Deoxycholinsäure und Myosmin haben keine gesteigerte Genotoxizität gezeigt. Das kann allerdings wiederum daran liegen, dass aufgrund der mangelnden Toleranz der verwendeten Zelllinie OE33 gegenüber niedrigen pH-Werten die Versuche im neutralen Milieu durchgeführt wurden.

Ob Myosmin tatsächlich DNA-Addukte in OE33-Zellen verursacht, könnte beispielsweise mit Hilfe von ^{32}P -Postlabeling oder HPLC genauer untersucht werden. Über die Inkubation mit radioaktiv markiertem Myosmin ließe sich der Anteil von Radioaktivität, der kovalent an die DNA gebunden wird, bestimmen. Außerdem könnte der Metabolismus von radioaktiv markiertem Myosmin in den Zellen untersucht werden. Hierfür steht eine HPLC-Methode mit allen möglichen Metaboliten als Referenzsubstanzen zur Verfügung [139].

5 Zusammenfassung

Krebserkrankungen sind nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Der Ösophagus- oder Speiseröhrenkrebs ist an diesen Todesfällen mit 2,9% bei Männern und 0,9% bei Frauen beteiligt. Auch wenn es sich damit um eine seltene Krebsform handelt, beschäftigen sich zur Zeit viele Arbeitsgruppen auf der ganzen Welt mit diesem Thema. Zum einen ist die Prognose der Krebsart sehr schlecht. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt nur 11% bei Männern und 8% bei Frauen. Das liegt auch daran, dass die Erkrankung häufig erst erkannt wird, wenn die Tumoren schon Metastasen bilden. Während früher vor allem Plattenepithelkarzinome zu beobachten waren, treten heute immer mehr Adenokarzinome auf. Inzwischen sind in der westlichen Welt mehr als die Hälfte der Tumoren in der Speiseröhre Adenokarzinome und ihr Anteil steigt weiter. Hauptrisikofaktor für diese Karzinome ist der Barrett-Ösophagus, der sich durch chronischen gastroösophagealen Reflux entwickelt. Das Risiko ein Adenokarzinom zu entwickeln, ist bei Barrett-Patienten etwa 100-fach höher als in der Normalbevölkerung, andererseits kommt es aber auch unter den Barrett-Patienten nur bei 10% zur Krebsentstehung. Die genauen molekularen Mechanismen der Kanzerogenese im Ösophagus sind bis heute nicht geklärt. Eine Mischung aus Gallensäuren aus dem Magensaft und Verdauungsenzymen aus dem Duodenalinhalt scheint in Kombination mit der Magensäure für die Krebsentstehung verantwortlich zu sein. Steigen diese Substanzen beim Reflux in die Speiseröhre auf, so führen sie direkt oder über Entzündungsprozesse zu DNA-Schäden. Die aufsteigende Magensäure reagiert mit im Speichel vorhandenem Nitrit außerdem zu verschiedenen nitrosierenden Spezies. Dadurch kann es zur Bildung kanzerogener *N*-Nitrosoverbindungen kommen. Bei sauren pH-Werten wird Myosmin, das außer im Tabak in vielen Nahrungsmitteln vorhanden ist, effektiv nitrosiert. Dabei entstehen das potente Kanzerogen *N*-Nitrosonornicotin und ein reaktiver Metabolit, der 4-Hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanon (HPB) freisetzende DNA-Addukte bildet. Für eine Beteiligung von Myosmin an der Entstehung von Ösophagustumoren spricht, dass bei Ratten die mit Myosmin behandelt wurden, HPB freisetzende DNA-Addukte im Ösophagus nachgewiesen werden konnten.

In dieser Arbeit wurde die Genotoxizität von Myosmin mit Hilfe des Comet-Assays in der humanen Ösophagus-Adenokarzinomzelllinie OE33 untersucht. Dieser Test weist Einzel- und Doppelstrangbrüche der DNA sowie alkalilabile Stellen und Reparaturfragmente nach. Inkubationen mit Myosmin führen im Neutralen nur zu einem sehr geringen Anstieg der im Comet-Assay nachweisbaren DNA-Schäden. Bei pH 6, bei dem das Myosmin leichter nitrosiert werden kann kommt es dagegen zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Schä-

den. Nach 4- bzw. 24-stündiger Inkubation mit 25 mM Myosmin ist ein deutlicher Anstieg zu beobachten. Die Induktion von oxidativem Stress durch Zusatz von Wasserstoffperoxid führt nicht zur Steigerung der Genotoxizität von Myosmin. Durch Zugabe von 3-Morpholino-sydnonimin (SIN-1), das NO^{\bullet} und O_2^- freisetzt, wird Myosmin dagegen aktiviert. Wahrscheinlich beruht dieser Effekt auf der Reaktion mit NO^{\bullet} . Da es durch aufsteigende Magensäure auch in der Speiseröhre zu nitrosierenden Bedingungen kommt, können auch dort DNA-Schäden durch Myosmin bzw. seine Metaboliten induziert werden. Ein weiteres interessantes Ergebnis ist, dass die Reparatur methylierter DNA durch Myosmin gehemmt wird. Das zeigt, dass Myosmin zur Bildung von DNA-Addukten führt, die von der O^6 -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase als Substrat erkannt werden und so die Reparaturkapazität der Zelle schwächen.

6 Literaturverzeichnis

1. Geddes M Balzi D Tomatis L (1994) Progress in the fight against cancer in EC countries: changes in mortality rates, 1970-90. *Eur J Cancer Prev* 3:31-44
2. Bertz, J., Hentschel, S., Hundsdörfer, G. et al. Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken. 2004;
3. Doll R (1996) Nature and nurture: possibilities for cancer control. *Carcinogenesis* 17:177-184
4. Lagergren J (2005) Adenocarcinoma of oesophagus: what exactly is the size of the problem and who is at risk? *Gut* 54 Suppl 1:i1-i5
5. Stein HJ von Rahden BHA Höfler H Siewert JR (2003) Karzinom des Ösophagogastralen Übergangs und Barrett-Ösophagus. *Chirurg* 74:703-708
6. Chen XX Yang CS (2001) Esophageal adenocarcinoma: a review and perspectives on the mechanism of carcinogenesis and chemoprevention. *Carcinogenesis* 22:1119-1129
7. Johnstone RAW Plimmer JR (1959) The chemical constituents of tobacco and tobacco smoke. *Chem Rev* 59:885-936
8. Kisaki T Tamaki E (1966) Phytochemical studies of the tobacco alkaloids. X. Degradation of the tobacco alkaloids and their optical rotary changes in tobacco plants. *Phytochemistry* 5:293-300
9. Leete E Chedekel MR (1972) Aberrant syntheses in higher plants. II. Aberrant formation of (-)-*N*-methylanabasine from *N*-methyl- Δ^1 -piperdeinium chloride in *Nicotiana tabacum* and *N. glauca*. *Phytochemistry* 11:2751-2756
10. Sisler EC (1969) Determination of myosmine with *o*-aminobenzaldehyde. *Anal Biochem* 31:183-188
11. Sakuma H Kusama M Yamaguchi K Matsuki T Sugawara S (1984) The distribution of cigarette smoke components between mainstream and sidestream smoke. II. Bases. *Beitr Tabakforsch Int* 12:199-209
12. Jenkins RA Palausky MA Counts RW Guerin MR Dindal AB Bayne CK (1996) Determination of personal exposure of non-smokers to environmental tobacco smoke in the United States. *Lung Cancer* 14:S195-S213
13. Benowitz NL (1996) Cotinine as a biomarker of environmental tobacco smoke exposure. *Epidemiol Rev* 18:188-204
14. Luanratana O Griffin WJ (1982) Alkaloids of *Duboisia hopwoodii*. *Phytochemistry* 21:449-451
15. Lydon J Duke SO (2004) The Potential of Pesticides from Plants. Herbes, Spices, and Medical Plants; Ch. Vol. 4 pp 1-41;
16. Zwickenpflug W Meger M Richter E (1998) Occurrence of the tobacco alkaloid myosmine in nuts and nut products of *Arachis hypogaea* and *Corylus avellana*. *J Agric Food Chem* 46:2703-2706
17. Tyroller S Zwickenpflug W Richter E (2002) New sources of dietary myosmine uptake from cereals, fruits, vegetables and milk. *J Agric Food Chem* 50:4909-4915
18. Maier M (2004) Biomonitoring der Myosminbelastung des Menschen in Muttermilch, Speichel und Plasma. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der LMU
19. Brandänge S Lindblom L (1976) *N*-Vinyl as *N*-H protection group. A convenient synthesis of myosmine. *Acta Chem Scand* 30:39
20. Witkop B (1954) Infrared diagnosis of the hydrochlorides of organic bases. II. The structure of myosmine. *Am Chem Soc* 76:5597-5599
21. Korte F Schulze-Steinen H-J (1962) Umlagerung von α -Aroyl-pyrrolidonen in konz. Salzsäure zu Pyrrolinderivaten. *Chem Ber* 95:2444-2452

22. Swain ML Eisner A Woodward CF Brice BA (1949) Ultraviolet absorption spectra of nicotine, normicotine and some of their derivatives. *J Am Chem Soc* 71:1341-1345
23. Brandänge S Rodriguez B (1983) Ring chain tautomerism of myosmine. *Acta Chem Scand Ser B* 37:643-644
24. Zoltewicz JA Bloom LB Kem WR (1989) Quantitative determination of the ring-chain hydrolysis equilibrium constant for anabaseine and related tobacco alkaloids. *J Org Chem* 54:4462-4468
25. Ambrose AM DeEds F (1946) Some comparative observations on (-)-nicotine and myosmine. *Proc Soc Exp Biol Med* 63:423-424
26. Anon (1995) *Römpp Chemie Lexikon*, CD 1.0. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag
27. French FA Freedlander BL Furst A (1957) *Proc Am Assoc Cancer Res* 2:205
28. Riebe M Westphal K Fortnagel P (1982) Mutagenicity testing, in bacterial test systems, of some constituents of tobacco. *Mutat Res* 101:39-43
29. Kleinsasser NH Wallner BC Harréus UA Zwicklenpflug W Richter E (2003) Genotoxic effects of myosmine in human lymphocytes and upper aerodigestive tract epithelial cells. *Toxicology* 192:171-177
30. Machholz R Lewerenz HJ (1989) *Lebensmitteltoxikologie*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag
31. Marquardt H Schäfer SG (2004) *Lehrbuch der Toxikologie. 2*; Stuttgart, Germany: Wissenschaftliche Verlagsges.mbh
32. Vermeer ITM (2000) Nitrate exposure and endogenous formation of carcinogenic nitrosamines in humans. Ph D Thesis at the Department of Health Risk and Analytical Toxicology, Maastricht University, Netherlands
33. Spiegelhalder B Eisenbrand G Preussmann R (1976) Influence of dietary nitrate on nitrite content of human saliva: possible relevance to in vivo formation of N-nitroso compounds. *Food Chem Toxicol* 14:545-548
34. Tannenbaum SR Weisman M Fett D (1976) The effect of nitrate intake on nitrite formation in human saliva. *Food Cosmet Toxicol* 14:549-552
35. Anon (1981) *The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds*. Washington DC: National Academy of Sciences National Press
36. Eisenbrand G (1981) *N-Nitrosoverbindungen in Nahrung und Umwelt. Eigenschaften, Bildungswege, Nachweisverfahren und Vorkommen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
37. Xu GP Reed PI (1993) N-nitroso compounds in fresh gastric juice and their relation to intragastric pH and nitrite employing an improved analytical method. *Carcinogenesis* 14:2547-2551
38. Iijima K Henry E Moriya A Wirz A Kelman AW McColl KEL (2002) Dietary nitrate generates potentially mutagenic concentrations of nitric oxide at the gastroesophageal junction. *Gastroenterology* 122:1248-1257
39. Moriya A Grant J Mowat C Williams C Carswell A Preston T Anderson S Iijima K McColl KEL (2002) In vitro studies indicate that acid catalysed generation of N-nitrosocompounds from dietary nitrate will be maximal at the gastro-oesophageal junction and cardia. *Scand J Gastroenterol* 37:253-261
40. Walters CL Hill MJ Rudell WSJ (1978) Gastric juice nitrite. Its source and relationship to hydrogen ion concentration. *Environmental aspects of N-nitroso compounds*. IARC Sci Publ 19:279-288
41. Koehl W Eisenbrand G (1999) *N-nitroso compounds*. Toxicology; eds: Marquardt H Schäfer S Mc Clellan R Welsch F, San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokio, Toronto, Academic Press

42. Jarosz M Dzieniszewski J Dabrowska-Ufniarz E Wartanowicz M Ziemiński S (2000) Tobacco smoking and vitamin C concentration in gastric juice in healthy subjects and patients with *Helicobacter pylori* infection. *Eur J Cancer Prev* 9:423-428
43. Mirvish SS (1995) Role of *N*-nitroso compounds (NOC) and *N*-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Lett* 93:17-48
44. Vermeer ITM Moonen EJC Dallinga JW Kleinjans JCS van Maanen JMS (1999) Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosopiperidine in humans. *Mutat Res* 428:353-361
45. Tricker AR (1996) Excretion of *N*-nitrosamines in patients with bacterial bladder infections or diversions of urinary tract. *Eur J Cancer Prev* 5 (Suppl):95-99
46. Richter E Scherer G (2004) Aktives und passives Rauchen. Lehrbuch der Toxikologie; Ch. 35 pp 897-918; eds: Marquardt H Schäfer SG, Stuttgart, Germany, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH
47. Eisenbrand G Fuchs A Koehl W (1996) *N*-Nitroso compounds in cosmetics, household commodities and cutting fluids. *Eur J Cancer Prev* 5 (Suppl 1):41-46
48. Stoner GD Gupta A (2001) Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis* 22:1737-1746
49. Singer GM Chuan J Roman J Min-Hsin L Lijinsky W (1986) Nitrosamines and nitrosamine precursors in foods from Linxian, China, a high incidence area for esophageal cancer. *Carcinogenesis* 7:733-736
50. Schneider P Hinrichs S Zulim R Towery R Morris C Mirvish SS (1996) Carcinogenesis by methylbenzyl nitrosamine near the squamocolumnar junction and methylamyl nitrosamine metabolism in the mouse forestomach. *Cancer Lett* 102:125-131
51. Theisen J Peters JH Fein M Hughes M Hagen JA DeMeester SR DeMeester TR Laird PW (2005) The mutagenic potential of duodenoesophageal reflux. *Ann Surg* 241:63-68
52. Zwickenpflug W (2000) *N*-nitrosation of myosmine yields HPB (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone) and NNN (*N*-nitrosornicotine). *J Agric Food Chem* 48:392-394
53. Wilp J Zwickenpflug W Richter E (2002) Nitrosation of dietary myosmine as risk factor of human cancer. *Food Chem Toxicol* 40:1223-1228
54. Staretz ME Foiles PG Miglietta LM Hecht SS (1997) Evidence for an important role of DNA pyridyloxobutylation in rat lung carcinogenesis by 4-(methyl nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone: effects of dose and phenethyl isothiocyanate. *Cancer Res* 57:259-266
55. Wong HL Murphy SE Hecht SS (2005) Cytochrome P450 2A-catalyzed metabolic activation of structurally similar carcinogenic nitrosamines: *N*'-nitrosornicotine enantiomers, *N*-nitrosopiperidine, and *N*-nitrosopyrrolidine. *Chem Res Toxicol* 18:61-69
56. Ziegel R Shallop A Jones R Tretyakova N (2003) *K-ras* gene sequence effects on the formation of 4-(methyl nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK)-DNA adducts. *Chem Res Toxicol* 16:541-550
57. Hecht SS (1998) Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific *N*-nitrosamines. *Chem Res Toxicol* 11:559-603
58. Pegg AE (2000) Repair of O(6)-alkylguanine by alkyltransferases. *Mutat Res* 462:83-100
59. Blaise GA Gauvin D Gangal M Authier S (2005) Nitric oxide, cell signaling and cell death. *Toxicology* 208:177-192

60. Wydra, V. Einfluss reaktiver Spezies auf Membranbestandteile und auf den Photozyklus von Bacteriorhodopsin Fachbereich Chemie der Technischen Universität Darmstadt; 2001;
61. Denicola A Radi R (2005) Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology* 208:273-288
62. Kim MY Dong M Dedon PC Wogan GN (2005) Effects of peroxynitrite dose and dose rate on DNA damage and mutation in the *supF* shuttle vector. *Chem Res Toxicol* 18:76-86
63. Ridnour LA Thomas DD Mancardi D Espey MG Miranda KM Paolocci N Feelisch M Fukuto J Wink DA (2004) The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 385:1-10
64. Singh RJ Hogg N Joseph J Konorev E Kalyanaraman B (1999) The peroxynitrite generator, SIN-1, becomes a nitric oxide donor in the presence of electron acceptors. *Arch Biochem Biophys* 361:331-339
65. Tice RR Agurell E Anderson D Burlinson B Hartmann A Kobayashi H Miyamae Y Rojas E Ryu JC Sasaki YF (2000) Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35:206-221
66. Kleinsasser NH (2004) Toxikologische Bewertung von Inhalationsnoxen: Testmethoden, Einschätzung der toxischen Wirksamkeit und des Gefahrenpotenzials, Grenzwerte. *Laryngo-Rhino-Otol* 83:36-53
67. Collins AR Dobson VL Dusinská M Kennedy G Stetina R (1997) The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 375:183-193
68. Hölzle D (2003) Bestimmung von DNA-Addukten tabakspezifischer Nitrosamine in Abhängigkeit von Rauchstatus und Ernährung. Dissertation an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
69. Cheng KK Sharp L McKinney PA Logan RFA Chilvers CED Cook-Mozaffari P Ahmed A Day NE (2000) A case-control study of oesophageal adenocarcinoma in women: a preventable disease. *Br J Cancer* 83:127-132
70. Doulias PT Barbouti A Galaris D Ischiropoulos H (2001) SIN-1-induced DNA damage in isolated human peripheral blood lymphocytes as assessed by single cell gel electrophoresis (comet assay). *Free Radic Biol Med* 30:679-685
71. Martin-Romero FJ Gutierrez-Martin Y Henao F Gutierrez-Merino C (2004) Fluorescence measurements of steady state peroxynitrite production upon SIN-1 decomposition: NADH versus dihydrodichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123. *J Fluoresc* 14:17-23
72. Buskens CJ Ristimäki A Offerhaus GJA Richel DJ van Lanschot JJB (2003) Role of cyclooxygenase-2 in the development and treatment of oesophageal adenocarcinoma. *Scand J Gastroenterol* 38 (Suppl 239):87-93
73. Cheong E Ivory K Doleman J Parker ML Rhodes M Johnson IT (2004) Synthetic and naturally occurring COX-2 inhibitors suppress proliferation in a human oesophageal adenocarcinoma cell line (OE33) by inducing apoptosis and cell cycle arrest. *Carcinogenesis* 25:1945-1952
74. Devesa SS Blot WJ Fraumeni JF (1998) Changing patterns in the incidence of esophageal and gastric carcinoma in the United States. *Cancer* 83:2049-2053
75. Bollschweiler E Wolfgarten E Gutschow C Hölscher AH (2001) Demographic variations in the rising incidence of esophageal adenocarcinoma in white males. *Cancer* 92:549-555
76. Terry P Lagergren J Wolk A Nyrén O (2000) Reflux-inducing dietary factors and risk of adenocarcinoma of the esophagus and gastric cardia. *Nutr Cancer* 38:186-191

77. Kulig M Nocon M Vieth A Leodolter A Jaspersen D Labenz J Meyer-Sabellek W Stolte M Lind T Malfertheiner P Willich SN (2004) Risk factors of gastroesophageal reflux disease: methodology and first epidemiological results of the ProGERD study. *J Clin Epidemiol* 57:580-589
78. Chen H Tucker KL Graubard BI Heineman EF Markin RS Potischman NA Russell RM Weisenburger DD Ward MH (2002) Nutrient intakes and adenocarcinoma of the esophagus and distal stomach. *Nutr Cancer* 42:33-40
79. Gammon MD Terry MB Arber N Chow W-H Risch HA Vaughan TL Schoenberg JB Mayne ST Stanford JL Dubrow R Rotterdam H West AB Fraumeni JF Weinstein IB Hibshoosh H (2004) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use associated with reduced incidence of adenocarcinomas of the esophagus and gastric cardia that overexpress cyclin D1: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:34-39
80. Kubo A Corley DA (2004) Marked multi-ethnic variation of esophageal and gastric cardia carcinomas within the United States. *Am J Gastroenterol* 99:582-588
81. Mayne ST Risch HA Dubrow R Chow W-H Gammon MD Vaughan TL Farrow DC Schoenberg JB Stanford JL Ahsan H West AB Rotterdam H Blot WJ Fraumeni JF (2001) Nutrient intake and risk of subtypes of esophageal and gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:1055-1062
82. Lagergren J Bergström R Adami H-O Nyrén O (2000) Association between medications that relax the lower esophageal sphincter and risk for esophageal adenocarcinoma. *Ann Intern Med* 133:165-175
83. Terry P Lagergren J Hansen H Wolk A Nyrén O (2001) Fruit and vegetable consumption in the prevention of oesophageal and cardia cancers. *Eur J Cancer Prev* 10:365-369
84. Terry P Lagergren J Ye W Wolk A Nyrén O (2001) Inverse association between intake of cereal fiber and risk of gastric cardia cancer. *Gastroenterology* 120:387-391
85. Wolfgarten E Rosendahl U Nowroth T Leers J Metzger R Hölscher AH Bollschweiler E (2001) Coincidence of nutritional habits and esophageal cancer in Germany. *Onkologie* 24:546-551
86. Banki F DeMeester SR Mason RJ Campos G Hagen JA Peters JH Bremner CG DeMeester TR (2005) Barrett's esophagus in females: A comparative analysis of risk factors in females and males. *Am J Gastroenterol* 100:560-567
87. Olliver JR Hardie LJ Gong Y Dexter S Chalmers D Harris KM Wild CP (2005) Risk factors, DNA damage, and disease progression in Barrett's esophagus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 14:620-625
88. Lord RV O'Grady R Sheehan C Field AF Ward RL (2000) *K-ras* codon 12 mutations in Barrett's oesophagus and adenocarcinomas of the oesophagus and oesophagogastric junction. *J Gastroenterol Hepatol* 15:730-736
89. Doak SH Jenkins GJS Parry EM Griffiths AP Shah V Baxter JN Parry JM (2003) Characterisation of p53 status at the gene, chromosomal and protein levels in oesophageal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 89:1729-1735
90. Vieth M Schneider-Stock R Röhrich K May A Ell C Markwarth A Roessner A Stolte M Tannapfel A (2004) INK4a-ARF alterations in Barrett's epithelium, intraepithelial neoplasia and Barrett's adenocarcinoma. *Virchows Arch* 445:135-141
91. Feith M Stein HJ Mueller J Siewert JR (2004) Malignant degeneration of Barrett's esophagus: the role of the Ki-67 proliferation fraction, expression of E-cadherin and p53. *Dis Esophagus* 17:322-327
92. Hardie JJ Darnton SJ Wallis YL Chauhan A Hainaut P Wild CP Casson AG (2005) *p16* expression in Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: association with genetic and epigenetic alterations. *Cancer Lett* 217:221-230

93. Darnton SJ Hardie LJ Muc RS Wild CP Casson AG (2005) Tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (*TIMP-3*) gene is methylated in the development of esophageal adenocarcinoma: loss of expression correlates with poor prognosis. *Int J Cancer* 115:351-358
94. Kaur BS Ouatu-Lascar R Omary MB Triadafilopoulos G (2000) Bile salts induce or blunt cell proliferation in Barrett's esophagus in an acid-dependent fashion. *Am J Physiol* 278:G1000-G1009
95. Zhang F Subbaramaiah K Altorki N Dannenberg AJ (1998) Dihydroxy bile acids activate the transcription of cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 273:2424-2428
96. Wilson KT Fu S Ramanujam KS Meltzer SJ (1998) Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in Barrett's esophagus and associated adenocarcinomas. *Cancer Res* 58:2929-2934
97. Speit G Witton-Davies T Heepchantree W Trenz K Hoffmann H (2003) Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat Res* 542:33-42
98. Ellahuene MF Pérez-Alzola LP Farfán-Urzuá M González-Hormazabal P Garay M Olmedo MI Last JA (2004) Preliminary evaluation of DNA damage related with the smoking habit measured by the comet assay in whole blood cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1223-1229
99. Wolz L Krause G Scherer G Aufderheide M Mohr U (2002) In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line. *Food Chem Toxicol* 40:845-850
100. Annas A Brittebo E Hellman B (2000) Evaluation of benzo(a)pyrene-induced DNA damage in human endothelial cells using alkaline single cell gel electrophoresis. *Mutat Res* 471:145-155
101. Gábelová A Binková B Valovicová Z Srám RJ (2004) DNA adduct formation by 7*H*-dibenzo[*c,g*]carbazole and its tissue- and organ-specific derivatives in Chinese hamster V79 cell lines stably expressing cytochrome P450 enzymes. *Environ Mol Mutagen* 44:448-458
102. Harréus UA Kleinsasser NH Zieger S Wallner B Reiter M Schuller P Berghaus A (2004) Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of Comet assay and fluorescence in situ hybridization. *Mutat Res* 563:131-138
103. Rajaei-Behbahani N Schmezer P Risch A Rittgen W Kayser KW Dienemann H Schulz V Drings P Thiel S Bartsch H (2001) Altered DNA repair capacity and bleomycin sensitivity as risk markers for non-small cell lung cancer. *Int J Cancer* 95:86-91
104. Hoffmann D Brunnemann KD Prokopczyk B Djordjevic MV (1994) Tobacco-specific *N*-nitrosamines and *Areca*-derived *N*-nitrosamines: chemistry, biochemistry, carcinogenicity, and relevance to humans. *J Toxicol Environ Health* 41:1-52
105. Klus H Kuhn H (1982) Verteilung verschiedener Tabakrauchbestandteile auf Haupt- und Nebenstromrauch (Eine Übersicht). *Beitr Tabakforsch Int* 11:229-265
106. Carmella SG Borukhova A Desai D Hecht SS (1997) Evidence for endogenous formation of tobacco-specific nitrosamines in rats treated with tobacco alkaloids and sodium nitrite. *Carcinogenesis* 18:587-592
107. Atawodi SE Lea S Nyberg F Mukeria A Constantinescu V Ahrens W Brueske-Hohlfeld I Fortes C Boffetta P Friesen MD (1998) 4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone-hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to tobacco smoke: validation of a method to be used in multicenter studies. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:817-821

108. Branner B Kutzer C Zwickenpflug W Scherer G Heller WD Richter E (1998) Haemoglobin adducts from aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines in pregnant smoking and nonsmoking women. *Biomarkers* 3:35-47
109. Carmella SG Kagan SS Kagan M Foiles PG Palladino G Quart AM Quart E Hecht SS (1990) Mass spectrometric analysis of tobacco-specific nitrosamine hemoglobin adducts in snuff-dippers, smokers, and non-smokers. *Cancer Res* 50:5438-5445
110. Falter B Kutzer C Richter E (1994) Biomonitoring of hemoglobin adducts: aromatic amines and tobacco-specific nitrosamines. *Clin Invest* 72:364-371
111. Carmella SG Akerkar S Hecht SS (1993) Metabolites of the tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in smokers' urine. *Cancer Res* 53:721-724
112. Meger M Meger-Kossien I Riedel K Scherer G (2000) Biomonitoring of environmental tobacco smoke (ETS)-related exposure to 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK). *Biomarkers* 5:33-45
113. Richter E (1996) Haemoglobin adducts of N-nitroso compounds. *Eur J Cancer Prev* 5:115-119
114. Burton HR Dye NK Bush LP (1992) Distribution of tobacco constituents in tobacco leaf tissue .1. Tobacco-specific nitrosamines, nitrate, nitrite, and alkaloids. *J Agric Food Chem* 40:1050-1055
115. Brunnemann KD Qi J Hoffmann D (2002) Chemical profile of two types of oral snuff tobacco. *Food Chem Toxicol* 40:1699-1703
116. Jenkins RA Palausky A Counts RW Bayne CK Dindal AB Guerin MR (1996) Exposure to environmental tobacco smoke in sixteen cities in the United States as determined by personal breathing zone air sampling. *J Expos Anal Environ Epidemiol* 6:473-502
117. Dempsey D Tutka P Jacob P Allen F Schoedel K Tyndale RF Benowitz NL (2004) Nicotine metabolite ratio as an index of cytochrome P450 2A6 metabolic activity. *Clin Pharmacol Ther* 76:64-72
118. Glas S (2003) Autoradiographische Untersuchungen zur Toxikokinetik von Myosmin in Ratten. Dissertation an der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
119. Richter E Schlöbe D Hölzle D Wilp J (2002) Comparative DNA and hemoglobin adduct formation by dietary myosmine and N'-nitrosornicotine in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 365 (Suppl.1):R140
120. Chen X Ding YW Yang G-Y Bondoc F Lee M-J Yang CS (2000) Oxidative damage in an esophageal adenocarcinoma model with rats. *Carcinogenesis* 21:257-263
121. Sihvo EIT Salminen JT Rantanen TK Rämö OJ Ahotupa M Färkkilä M Auvinen MI Salo JA (2002) Oxidative stress has a role in malignant transformation in Barrett's oesophagus. *Int J Cancer* 102:551-555
122. Bentz BG Simmons RL Haines GK Radosevich JA (2000) The yin and yang of nitric oxide: reflections on the physiology and pathophysiology of NO. *Head & Neck* 22:71-83
123. Bove M Vieth M Casselbrant A Ny L Lundell L Ruth M (2005) Acid challenge to the esophageal mucosa: effects on local nitric oxide formation and its relation to epithelial functions. *Dig Dis Sci* 50:640-648
124. Iijima K Grant J McElroy K Fyfe V Preston T McColl KEL (2003) Novel mechanism of nitrosative stress from dietary nitrate with relevance to gastro-oesophageal junction cancers. *Carcinogenesis* 24:1951-1960
125. Li CQ Trudel LJ Wogan GN (2002) Genotoxicity, mitochondrial damage, and apoptosis in human lymphoblastoid cells exposed to peroxynitrite generated from SIN-1. *Chem Res Toxicol* 15:527-535

126. Chien YH Bau DT Jan KY (2004) Nitric oxide inhibits DNA-adduct excision in nucleotide excision repair. *Free Radic Biol Med* 36:1011-1017
127. Cheong E Igali L Harvey I Mole M Lund E Johnson IT Rhodes M (2003) Cyclooxygenase-2 expression in Barrett's oesophageal carcinogenesis: an immunohistochemical study. *Aliment Pharmacol Ther* 17:379-386
128. Zimmermann KC Sarbia M Weber A-A Borchard F Gabbert HE Schrör K (1999) Cyclooxygenase-2 expression in human esophageal carcinoma. *Cancer Res* 59:198-204
129. Zhang F Altorki NK Wu Y-C Soslow RA Subbaramaiah K Dannenberg AJ (2001) Duodenal reflux induces cyclooxygenase-2 in the esophageal mucosa of rats: evidence for involvement of bile acids. *Gastroenterology* 121:1391-1399
130. Shirvani VN Ouatu-Lascar R Kaur BS Omary MB Triadafilopoulos G (2000) Cyclooxygenase 2 expression in Barrett's esophagus and adenocarcinoma: ex vivo induction by bile salts and acid exposure. *Gastroenterology* 118:487-496
131. Huang DS Shen KZ Wei JF Liang TB Zheng SS Xie HY (2005) Specific COX-2 inhibitor NS398 induces apoptosis in human liver cancer cell line HepG2 through BCL-2. *World J Gastroenterol* 11:204-207
132. Raju U Ariga H Dittmann K Nakata E Ang KK Milas L (2005) Inhibition of DNA repair as a mechanism of enhanced radioresponse of head and neck carcinoma cells by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 63:520-528
133. Liu LL Qin X Gerson SL (1999) Reduced lung tumorigenesis in human methylguanine DNA-methyltransferase transgenic mice achieved by expression of transgene within the target cell. *Carcinogenesis* 20:279-284
134. Wang M Cheng G Sturla SJ Shi Y McIntee EJ Villalta PW Upadhyaya P Hecht SS (2003) Identification of adducts formed by pyridyloxobutylation of deoxyguanosine and DNA by 4-(acetoxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a chemically activated form of tobacco specific carcinogens. *Chem Res Toxicol* 16:616-626
135. Mijal RS Thomson NM Fleischer NL Pauly GT Moschel RC Kanugula S Fang Q Pegg AE Peterson LA (2004) The repair of the tobacco specific nitrosamine derived adduct *O*⁶-[4-oxo-4-(3-pyridyl)butyl]guanine by *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase variants. *Chem Res Toxicol* 17:424-434
136. Laval F Wink DA (1994) Inhibition by nitric oxide of the repair protein, *O*⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Carcinogenesis* 15:443-447
137. Jolly AJ Wild CP Hardie LJ (2004) Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines. *Mutagenesis* 19:319-324
138. Nehra D Howell P Williams CP Pye JK Beynon J (1999) Toxic bile acids in gastro-oesophageal reflux disease: influence of gastric acidity. *Gut* 44:598-602
139. Zwickenpflug W Tyroller S Richter E (2005) Metabolism of myosmine in Wistar rats. *Drug Metab Dispos* 33:1648-1656

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Elmar Richter für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen und die jederzeit vorhandene Unterstützung und Hilfsbereitschaft bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dem kommissarischen Vorstand des Institutes, Herrn Professor Dr. Peter Eyer, gilt mein Dank für die Überlassung des Arbeitsplatzes.

Herrn Dr. Burkhard von Rahden vom Institut für Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München danke ich für die Überlassung der hier verwendeten Zelllinien.

Herzlicher Dank gilt allen meinen Kollegen im Arbeitskreis, die mit ihrer Freundlichkeit, Hilfsbereitschaft, ihrem Humor und ihren Kochkünsten stets für ein angenehmes Arbeitsklima sorgten.

Insbesondere bei meiner Kollegin Katharina Fuchs möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und die seelische Unterstützung besonders zu Beginn unserer Zeit am Walther Straub-Institut bedanken.

Bei Frau Christiana Oehlmann möchte ich mich für die vielen guten Tipps im Laboralltag und die vielen, manchmal nicht rein wissenschaftlichen Gespräche bedanken.

An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Der größte Dank gilt meiner Familie, die diese Arbeit erst ermöglicht hat.

Lebenslauf

Name		Vogt
Vorname		Sarah
Geboren am	15.06.1977	in Göttingen
<u>Schule:</u>	08.83 – 07.87	Grundschule Kleinenbremen
	07.87 – 06.89	Orientierungsstufe Bückeberg
	08.89 – 07.96	Gymnasium Adolfinum Bückeberg
<u>Studium:</u>	10.96 – 07.97	Wirtschaftsingenieurwesen Universität Karlsruhe (TH)
	10.97 – 04.03	Biologie Universität Karlsruhe (TH) Abschluss: Diplom Biologin
		Diplomarbeit: Molekulare Charakterisierung genetischer Elemente aus der Pilzabwehr der Weinrebe; Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Institut für Rebenzüchtung, Siebeldingen
<u>Promotion:</u>	seit 05.03	Anfertigen einer experimentellen Doktorarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. E. Richter am Walther Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München