

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und

Ohrenheilkunde der

Universität München

Vorstand: Prof. Dr. med. A. Berghaus

**DNA-Fragmentierung in humanen Speicheldrüsenzellen und
Lymphozyten nach Exposition gegenüber Metallsalzen und
Ethanol**

Dissertation

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

vorgelegt von

Philipp Baumeister

aus

München

2005

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. C. Matthias

Mitberichterstatter:

Priv.-Doz. Dr. med. G. Längst

Priv.-Doz. Dr. med. H. Mückter

Priv.-Doz. Dr. med. L. von Meyer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr. med. U. Harréus

Dekan:

Professor Dr. med. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung:

21.04.2005

Meinen lieben Eltern,
die das alles
möglich gemacht haben

Danksagung

Ich bedanke mich bei der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München und ihrem ärztlichen Direktor, **Herrn Professor Dr. med. A. Berghaus**, für die Bereitstellung der in der Arbeit verwendeten Proben und die stets freundliche Unterstützung.

Bei **Herrn Priv.-Doz. Dr. med. C. Matthias** möchte ich mich herzlich für die Durchsicht des Textes und die Übernahme des Referats bedanken.

Mein Dank gilt **Herrn Dr. med. U. Harréus**, der mich die ganze Zeit fachlich wie menschlich hervorragend betreute. Ich danke ihm für alle Anregungen und die Durchsicht des Textes. Ganz herzlich möchte ich mich für die Bereitstellung der Labormaterialien und das Vertrauen in mich und meine Arbeit bedanken.

Ich möchte mich bei **Herrn Priv.-Doz. Dr. med. N. Kleinsasser** bedanken, der bei der Planung und Strukturierung der Arbeit maßgeblichen Anteil hatte und sie mit Herrn Dr.med. Harréus ins Leben rief.

Bei **Frau S. Zieger** möchte ich für ihren unermüdlichen Einsatz bei der Probenbeschaffung und für ihre Unterstützung bei den letzten Versuchen ganz herzlich bedanken.

Besonders danke ich **Frau Dr. biol. hum. B. Wallner** für die Einweisung in die Methodik und Literaturrecherche sowie für immerwährende Hilfsbereitschaft und Freundschaft.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	9
1 Einleitung.....	11
1.1 Tumoren der Kopfspeicheldrüsen	11
1.2 DNA-Fragmentierung und Kanzerogenese.....	11
1.2.1 DNA-Fragmentierung und Krebsentstehung am Beispiel von <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin.....	12
1.2.2 Mehrstufenhypothese der Kanzerogenese.....	13
1.3 Metallsalze	14
1.3.1 Vorkommen in der Umwelt.....	14
1.3.1.1 Zink (II).....	14
1.3.1.2 Nickel (II).....	14
1.3.1.3 Cadmium (II).....	15
1.3.1.4 Chrom (VI).....	15
1.3.2 DNA-Fragmentierung	16
1.3.2.1 Zink (II).....	16
1.3.2.2 Nickel (II).....	16
1.3.2.3 Cadmium (II).....	18
1.3.2.4 Chrom (VI).....	20
1.4 Ethanol	20
1.4.1 Verbrauch von Ethanol und dessen Folgen.....	20
1.4.2 Kanzerogene Wirkung und DNA-Fragmentierung durch Ethanol	21
1.5 Die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese	22
1.6 Aufgabenstellung	23
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Material	24
2.1.1 Spendergruppe.....	24
2.1.2 Speicheldrüsengewebe	24
2.1.3 Lymphozyten.....	24
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Einzelzellgewinnung	24
2.2.1.1 Isolierung der Speicheldrüsenzellen aus den Operationsresektaten.....	24
2.2.1.2 Isolierung der Lymphozyten aus heparinisiertem Vollblut.....	25
2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	25
2.2.3 Inkubation mit den Testsubstanzen	26
2.2.3.1 Testsubstanzen	26

2.2.3.2	Inkubation der Speicheldrüsenzellen	26
2.2.3.3	Inkubation der Lymphozyten	27
2.2.3.4	Reparaturversuche	27
2.2.4	Präparation der Objektträger	27
2.2.5	Auftragen der Zellen	28
2.2.6	Lyse der Zell- und Kernmembranen	28
2.2.7	Alkalische Elektrophorese.....	28
2.2.8	Fluoreszenzfärbung	28
2.2.9	Auswertung und Datenerfassung	29
2.2.10	Statistik.....	29
2.3	Labormaterialien und Geräte.....	31
2.3.1	Chemikalien und Reagenzien.....	31
2.3.2	Medien und Zusätze	31
2.3.3	Enzyme.....	31
2.3.4	Testsubstanzen	31
2.3.5	Lösungen	32
2.3.5.1	MEM-Joklik	32
2.3.5.2	Enzymlösung zur Zellisolierung	32
2.3.5.3	Agarose.....	32
2.3.5.4	Lysestammlösung.....	32
2.3.5.5	Lysepuffer	32
2.3.5.6	Elektrophoresepuffer	33
2.3.5.7	Neutralisationspuffer	33
2.3.5.8	Färbelösung (Stammlösung)	33
2.3.5.9	Tieffriermedium	33
2.3.6	Verbrauchsmaterial	33
2.3.7	Technische Geräte	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Zellvitalitäten	35
3.2	Mikrogelelektrophorese	35
3.2.1	DNA-Schädigung in Speicheldrüsenzellen.....	37
3.2.1.1	DNA-fragmentierende Effekte von Ethanol, Zinkchlorid, Nickelsulfat und Cadmiumsulfat in Speicheldrüsenzellen	37
3.2.1.2	DNA-fragmentierende Effekte von Natriumdichromat und Natriumdichromat in Kombination mit Ethanol bzw. Metallverbindungen in Speicheldrüsenzellen	39
3.2.1.3	DNA-Fragmentierung durch <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin in Speichel- drüsenzellen.....	41

3.2.1.4	Vergleich der DNA-Schädigung der Testsubstanzen hinsichtlich der Herkunft des Gewebes und Dignität der Grunderkrankung.....	42
3.2.2	DNA-Schädigung in Lymphozyten.....	43
3.2.2.1	DNA-Schädigung durch Ethanol, Zinkchlorid, Nickelsulfat und Cadmiumsulfat in Lymphozyten.....	43
3.2.2.2	DNA-Schädigung durch Natriumdichromat und Natriumdichromat in Kombination mit Ethanol bzw. Metallverbindungen in Lymphozyten.....	44
3.2.2.3	DNA-Fragmentierung durch <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin in Lymphozyten.....	47
3.2.3	Vergleich der DNA-Schädigung der Testsubstanzen hinsichtlich der Herkunft und der Dignität der Grunderkrankung.....	48
3.2.4	Vergleich der OTM-Werte von Speicheldrüsen- und Lymphozytenversuchen.....	49
3.2.4.1	Durchschnittswerte und Mediane.....	49
3.2.5	Reparaturversuche.....	50
4	Diskussion und Zusammenfassung	53
4.1	Diskussion der Testsubstanzen.....	53
4.1.1	Zink (II).....	53
4.1.1.1	Physiologische Bedeutung und Metabolismus.....	53
4.1.1.2	Kanzerogenese	53
4.1.1.3	Eigene Ergebnisse und Schlußfolgerung.....	54
4.1.2	Nickel (II).....	54
4.1.2.1	Physiologische Bedeutung und Metabolismus.....	54
4.1.2.2	Kanzerogenese	54
4.1.2.3	Eigene Ergebnisse und Schlußfolgerung.....	55
4.1.3	Cadmium (II).....	56
4.1.3.1	Physiologische Bedeutung und Metabolismus.....	56
4.1.3.2	Kanzerogenese	56
4.1.3.3	Eigene Ergebnisse und Schlussfolgerung	57
4.1.4	Chrom (VI).....	58
4.1.4.1	Physiologische Bedeutung und Metabolismus.....	58
4.1.4.2	Kanzerogenese	59
4.1.4.3	Eigene Ergebnisse und Schlussfolgerung	60
4.1.5	Ethanol	61
4.1.5.1	Physiologische Bedeutung und Metabolismus.....	61
4.1.5.2	Kanzerogenese	61
4.1.5.3	Eigene Ergebnisse und Schlussfolgerung	62
4.2	Diskussion der statistischen Analyse	63
4.3	Zusammenfassung.....	64

5	Literatur	66
6	Publikationen aus der Arbeit.....	77
7	Curriculum vitae.....	78

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
Cd	Cadmium
CdSO/ CdSO ₄	Cadmiumsulfat
CYP2E1	Cytochrom-P450-Isoenzym E1
°C	Grad Celcius
ca.	circa
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH / C ₂ H ₅ OH	Ethanol
EtBr	Ethidiumbromid
evtl.	eventuell
Fe	Eisen
Fpg	Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase
IARC	International Agency for Research on Cancer
mA	Milliampere
MEOS	Mikrosomales ethanoxidierendes System
MNNG	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
Na ₂ Cr ₂ O ₇ / Cr	Natriumdichromat
Ni	Nickel
NiSO/ NiSO ₄	Nickelsulfat
NK	Negativkontrolle
nm	Nanometer
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phosphate Buffered Saline
s.	siehe
STH	somatotropes Hormon
s.u. / s.o.	siehe unten / siehe oben
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vol %	Volumenprozent
V	Volt

z.B.	zum Beispiel
Zn	Zink
ZnCl/ ZnCl ₂	Zinkchlorid
µm	Mikrometer
XPA	Xeroderma pigmentosum A

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit beschreibt das DNA-schädigende Potential von verschiedenen Metallsalzen und Ethanol an Zellen humaner Kopfspeicheldrüsen und peripheren Lymphozyten. Es soll gezeigt werden, ob von diesen Substanzen ein erhöhtes Risiko für das Gewebe im Sinne einer quantifizierbaren DNA-Schädigung ausgeht.

1.1 Tumoren der Kopfspeicheldrüsen

Etwa 30 % der Tumoren der Kopfspeicheldrüsen sind bösartiger Natur. Insgesamt ist die Glandula parotis mit etwa 80 % der Malignome am häufigsten betroffen, gefolgt von der Glandula submandibularis mit rund 12 %. Bei einer Inzidenz von 1,2 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr muss man im Vergleich zu anderen Tumorerkrankungen von einem relativ seltenen Geschehen ausgehen. Insgesamt sind Männer häufiger betroffen als Frauen, wobei sich die Inzidenz bei den männlichen Patienten in den letzten 20 Jahren leicht erhöht hat, während sie bei den Frauen weitgehend konstant blieb [Horn-Ross et al., 1997].

Über die Ätiologie des Speicheldrüsenkrebses ist wenig bekannt. Als einzige etablierte Risikofaktoren gelten die Exposition gegenüber ionisierender Strahlung und eine vorangegangene Krebserkrankung einer Speicheldrüse. Daneben wird die Rolle von Umweltfaktoren und eine mögliche virale Genese diskutiert. In epidemiologischen Studien konnte ein erhöhtes Risiko für Arbeiter in der nickel- und gummiverarbeitenden Industrie nachgewiesen werden [Horn-Ross et al., 1997]. Die Rolle des Epstein-Barr-Virus, des Humanen Papillomavirus, des Humanen Herpesvirus 8 und des Cytomegalievirus bei der Genese gut- und bösartiger Speicheldrüsentumoren ist weiterhin nicht eindeutig geklärt [Atula et al., 1998]. Es wird vermutet, dass diese als onkogen geltenden Viren zu einer Dysregulation von Onkogenen der Wirtszellen führen und durch Einschleusung viraler Onkogene die Tumorentwicklung begünstigen.

1.2 DNA-Fragmentierung und Kanzerogenese

Die Transformation einer gesunden Körperzelle in eine maligne Tumorzelle basiert auf einem multifaktoriellen Geschehen. Eine wichtige Rolle spielt die Exposition gegenüber Kanzerogenen. Zu beachten sind aber auch individuelle Unterschiede bezüglich der Vulnerabilität der Erbsubstanz, z.B. durch unterschiedliche Mutagensensitivitäten, das heisst die Empfindlichkeit einzelner Personen gegenüber Fremdstoffen, oder auch der Fähigkeit derartige Schäden zu reparieren.

1.2.1 DNA-Fragmentierung und Krebsentstehung am Beispiel von *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin

Der genaue Mechanismus der DNA-schädigenden Wirkung zahlreicher Substanzen ist nicht eindeutig geklärt. Neben direkten Schäden, die Fremdstoffe an der DNA verursachen, kommen auch Schädigungen des Mitoseapparats für ihre krebsinduzierenden Eigenschaften in Betracht.

Der Wirkungsmechanismus direkt alkylierender Substanzen ist weitgehend bekannt. Ein Vertreter dieser Stoffklasse ist das *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG). MNNG reagiert mit Stickstoff- und Sauerstoffatomen der DNA-Basen und geht mit ihnen kovalente Bindungen ein. Konsequenz dieser Reaktionen ist die fehlerhafte Replikation der DNA. Kommt es zu einer Häufung von DNA-Replikationsfehlern, wird das enzymatische Reparatursystem überlastet. Können nicht alle Replikationsfehler behoben werden, vererben sich diese bei Zellteilungen auf die Tochterzellen [Böcker et al., 1996].

Betrifft diese chemisch induzierte somatische Mutation des Genoms labile DNA-Abschnitte, wie z. B. Protoonkogene, sind ernste Folgen zu erwarten. Protoonkogene sind physiologischer Bestandteil jeder zellulären DNA und codieren u.a. für Proteine, die an Wachstums- und Differenzierungsprozessen der Zelle beteiligt sind, wie z. B. zytosolische Glukokortikoid- oder plasmamembranständige STH-Rezeptoren. Mutierte Protoonkogene werden als Onkogene bezeichnet. Ihre Expressionsprodukte können zu einer exzessiven Zellproliferation führen [Weinberg, 1996].

Daneben spielen bei der Entstehung maligner Tumoren die Tumorsuppressorgene eine äußerst wichtige Rolle. Das bekannteste Beispiel ist das p53-Gen, das für ein Protein codiert, welches in der späten G₁-Phase des Zellzyklus (postmitotische Wachstumsphase) das Fortschreiten in die nächste Phase des Zellzyklus verhindert. Welche Konsequenz eine Mutation dieses Gens hat, wird durch die Tatsache deutlich, dass in rund der Hälfte aller menschlichen Tumoren ein vollständig funktionierendes p53-Protein fehlt [Weinberg, 1996].

Die kanzerogene Wirkung von MNNG konnte im Tierexperiment nachgewiesen werden [Aoyagi et al., 2000]. Eine Rolle könnten dabei durch MNNG induzierte DNA-Strangbrüche gespielt haben, die Slamenova et al. [1997] in humanen Leberzellen detektierten. Auch an einer Vielzahl von Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes, namentlich Zellen von Tonsillen, Mundhöhle, Nase, Nasennebenhöhlen, Pharynx und Larynx, wurden DNA-schädigende Wirkungen von MNNG nachgewiesen [Harréus et al., 1999].

1.2.2 Mehrstufenhypothese der Kanzerogenese

Nach der sogenannten Mehrstufenhypothese ist die Mutation mehrerer Protoonkogene und Tumorsuppressorgene Voraussetzung für die Transformation von Körperzellen in maligne Tumorzellen. Diese Transformation verläuft in drei Phasen:

- **Initiation:** Darunter versteht man die Auslösung der notwendigen Mutationen, d.h. eine irreversible Veränderung der DNA, die bei der Zellteilung auf die entstehenden Zellen übertragen werden kann. Als Initiatoren kommen chemische und physikalische Noxen, sowie onkogene Viren in Betracht.
- **Latenzperiode:** Etwa 15 bis 20 Jahre dauernde Phase, in der es zur Proliferation der initiierten Zellen und weiteren Mutationen kommt. Bei anhaltender Präsenz der Noxe, kann es zudem zu einer Selektion und klonalen Proliferation der initiierten Zellen kommen.
- **Klinische Manifestation:** frühzeitig als Carcinoma in situ oder auch primär benigne Neoplasie. Später durch infiltrierendes Wachstum und Metastasierung.

Die chemische Kanzerogenese kann beschleunigt werden durch sogenannte Promotoren und Kokarzinogene. Als Promotoren bezeichnet man Substanzen, die nach vorangegangener Gabe eines Initiators in subkarzinogener Dosis einen Tumor hervorrufen. Wird zunächst wiederholt ein Promotor appliziert und erst danach der Initiator, bleibt die Tumorentstehung aus. Kokarzinogene sind Stoffe, die bei gleichzeitiger Gabe eines Initiators eine signifikant höhere Tumorraten verursachen. Im Zusammenhang mit der Mehrstufenhypothese ist schließlich noch das komplette Karzinogen als Noxe definiert, das sowohl initiiert, als auch promovierende Eigenschaften besitzt und in ausreichend hoher Dosis appliziert alleine den gesamten Prozess der Tumorentstehung auslöst.

Je größer das Ausmaß der messbaren Veränderungen und Schädigungen, die eine Substanz an der DNA verursacht, desto größer sollte nach dieser Hypothese die Gefahr sein, dass durch das Einwirken der Substanz die Zellen maligne entarten. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Quantifizierung der DNA-schädigenden Wirkung mehrerer Metalle und von Ethanol an Speicheldrüsenzellen und Lymphozyten.

1.3 Metallsalze

Der Mensch ist Metallen aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens in vieler Hinsicht ausgesetzt. Sie werden mit der Nahrung und dem Trinkwasser aufgenommen und als Stäube inhaliert. Das Ausmaß der Aufnahme von Metallen ist regional unterschiedlich. Hierbei spielen Faktoren wie die Nähe zu Industrie- und Müllverbrennungsanlagen, die Herkunft der Nahrung, insbesondere von Obst und Gemüse, oder das regionale Verkehrsaufkommen eine Rolle.

In den letzten zwanzig Jahren wurde ein großer Aufwand zur Erforschung der metall-induzierten Karzinogenese betrieben. Es scheint, als würden Metalle, wie Chrom, Nickel, Cadmium, Arsen und Vanadium, in vielen Phasen der Tumorentstehung begünstigend wirken. Sie beeinflussen das Zellwachstum und können die Apoptose, den genetisch programmierten Zelltod, induzieren. Dies geschieht durch Beeinflussung der Regulation von nukleären Transkriptionsfaktoren und von Signal-Transduktions-Wegen. Es wurden Veränderungen bei der Genexpression und die vermehrte Entstehung von Sauerstoffradikalen nachgewiesen. Schließlich wirken Metalle mutagen und karzinogen im Sinne der mutationsbedingten Aktivierung von Onkogenen und/oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und der Amplifikation von Onkogenen durch Veränderung der Transkription [Wang et al., 2001].

1.3.1 Vorkommen in der Umwelt

Die in dieser Arbeit getesteten Metallverbindungen waren Salze von Zink, Nickel, Cadmium und Chrom. Zum Einsatz kamen sie als Zinkchlorid (ZnCl_2), Nickelsulfat (NiSO_4), Cadmiumsulfat (CdSO_4) und Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).

1.3.1.1 Zink (II)

Zink wird heute zum größten Teil bei der Galvanisierung von Eisen und bei der Herstellung von Messing verwendet. Die durchschnittliche Konzentration in Böden liegt bei 50 mg/kg Erdboden, sie variiert dabei von 10 – 300 mg/kg Erdboden weltweit. In den menschlichen Organismus gelangt Zink über die Aufnahme von Fleisch, Fisch, Milchprodukten, Gemüse, Nüsse und jeder Art Getreide [Barceloux, 1999 (A)].

1.3.1.2 Nickel (II)

Nickel findet Anwendung in der Galvanisierungsindustrie und bei der Herstellung von Batterien. Das Schwermetall gelangt über Müllverbrennungsanlagen, Metallhütten, durch Verbrennung fossiler Energieträger und durch Abwässer der Galvanikindustrie in das Oberflächengewässer [Dally, 1997]. Das gilt besonders für das wasserlösliche Salz

Nickelsulfat. In die Nahrungskette gelangt die Substanz z.B. über Trinkwasser und Gemüse. Die durchschnittliche Aufnahme der amerikanischen Bevölkerung lag 1999 bei 300 µg/Tag [Barceloux, 1999 (B)].

1.3.1.3 Cadmium (II)

2001 veröffentlichte das Umweltbundesamt eine Aufsehen erregende Studie, nach der durch wiederaufladbare Nickel-Cadmium-Akkumulatoren in Deutschland rund 400 Tonnen des Schwermetalls Cadmium in die Umwelt gelangten [Rentz O et al., 2001]. Etwa die Hälfte dieser Menge wird mit dem Hausmüll entsorgt und verbrannt. Daneben gelangt Cadmium durch phosphathaltige Düngemittel in die Umwelt. Geschätzte 80 Tonnen Cadmium kommen so pro Jahr in landwirtschaftlich genutzte Böden. Das Umweltbundesamt¹ stellt 1998 eine tägliche Cadmiumaufnahme Erwachsener über Nahrung und Trinkwasser von 0,1 – 0,2 µg/kg Körpergewicht fest. Es gibt Hinweise darauf, dass Cadmium im Körper vor allem in Lunge, Leber und renalem Kortex akkumuliert [Satarug et al., 2002].

1.3.1.4 Chrom (VI)

In Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) liegt Chrom hexavalent Chrom im Chromat vor. Chrom (VI) wird bei der Stahlproduktion und bei der Verbrennung fossiler Brennstoffe freigesetzt [Barceloux, 1999 (C)]. Als Bestandteil von Holzschutzmitteln wird es in der Holzverarbeitenden Industrie in großen Mengen eingesetzt. Es kommt in Zement vor und dient als Pigment bei der Herstellung von Farben. Da der Nachweis des hexavalenten Chroms äußerst schwierig ist, liegen keine genauen Daten über die Umweltbelastung durch das Metall vor. Chrom (VI) wird von der Bevölkerung vorwiegend über die Nahrung aufgenommen. Inhaliert wird nur ein geringer Teil der 246-343 µg/d, die von einem Erwachsenen in etwa aufgenommen werden [Rowbotham et al., 2000]. Das Ausmaß der Belastung durch Chrom (VI) dafür die Arbeiter der stahl- und holzverarbeitenden Industrie ist durch verschiedene Arbeitsprozesse und somit divergierende Partikelgrößen der entstehenden Stäube unterschiedlich. Dies könnte erklären, warum immer wieder Kritik an standardisierten Schutzmaßnahmen laut wird [Decker et al., 2002].

¹ Erschienen in: Bundesgesundheitsblatt, Bd. 41 (5), 1998, 218-226

1.3.2 DNA-Fragmentierung

1.3.2.1 Zink (II)

Zink ist Kofaktor für mehr als 70 Enzyme des menschlichen Organismus. Darüber hinaus stabilisiert es die DNA durch Bindung an die Phosphatgruppen der Basen und spielt eine Rolle bei der Regulation der DNA-Synthese und der Zellteilung in Säugerzellen [Thompson et al., 1989]. Über Zink als DNA-schädigendes Agens ist wenig bekannt. Banu et al. zeigten 2001, dass Zinksulfat zu DNA-Einzelstrangbrüchen in peripheren Leukozyten von Mäusen, führt. Eine weitere Studie bewies, dass Zinkchlorid in menschlichen Leukozyten klastogene Effekte, d.h. Chromosomenbrüche hervorruft [Santra et al., 2000]. Untersuchungen an humanen Speicheldrüsenzellen liegen für Zinkchlorid bislang noch nicht vor.

1.3.2.2 Nickel (II)

Die International Agency for Research on Cancer (IARC) hat Nickelsalze als krebserzeugend klassifiziert (Gruppe 1). Metallisches Nickel gilt dagegen als mögliches, das heisst Karzinogen der Gruppe 2b für Menschen. Epidemiologisch konnte die krebserzeugende Wirkung von Nickelverbindungen beschrieben werden. Die genaue Pathogenese ist jedoch weiterhin unklar. Es wurde gezeigt, dass Nickelsulfat sowohl klastogen als auch aneugen ist, d.h., bei der Zellteilung entsteht eine abnormale Chromosomenzahl in den Tochterzellen [Seoane et al., 2001]. Chakrabarti et al. (2001) wiesen DNA-Protein-Crosslinks, induziert durch Nickelverbindungen nach. In menschlichen embryonalen Lungen-Fibroblasten verursachte Nickelsubdisulfid (α -Ni₃S₂) DNA-Strangbrüche [Zhuang et al., 1996]. Bei der Induktion dieser DNA-Schäden spielen reaktive Sauerstoffspezies eine große Rolle. So entstanden durch Nickel (II) verschiedene Sauerstoffradikale bei Anwesenheit von Wasserstoffperoxid, wahrscheinlich über Reaktionen vom Fenton-Typ. Die Fenton-Reaktion ist eine der stärksten oxidierenden Reaktionen. In ihrem Ablauf entstehen aus Wasserstoffperoxid und Fe²⁺ ein freies Hydroxyl-Radikal. Daneben entstehen Fe³⁺ und ein Hydroxid-Anion. Außerdem bindet Nickel (II) an Glutathion und Metallothionein, und verringert somit das Abwehrvermögen der Zellen gegen Oxidantien [Kawanishi et al., 1994]. Nickel kann zudem in hohem Maße die DNA-Reparaturmechanismen von Säugetierzellen beeinflussen. Asmuss et al. konnten 2000 (A) zeigen, dass das XPA-Protein, welches eine entscheidende Rolle bei der Nukleotid-Exzisions-Reparatur der DNA spielt, durch Nickel (II) inaktiviert wurde. Das XPA-Protein ist eines von 7 Proteinen (XPA – XPG), die in die Reparatur v.a. von UV-Licht-induzierten DNA-Schäden involviert sind und bei Patienten mit Xeroderma pigmentosum defekt sind (schematische Darstellung in Abbildung 1.1). Das Protein, das DNA-Schäden im Sinne von Oligonukleotiden (v.a. Thymin-Dimere) detektiert und an diese bindet, hat ein Zink-Finger-Motiv innerhalb seiner DNA-bindenden Domäne (siehe Abbildung 1.2). Vermutlich drängt Nickel (II) innerhalb dieser Gruppe an die Stelle

von Zink, wodurch die DNA-Reparatur bei einem entscheidenden Schritt gestört wird [Hartwig, 1998].

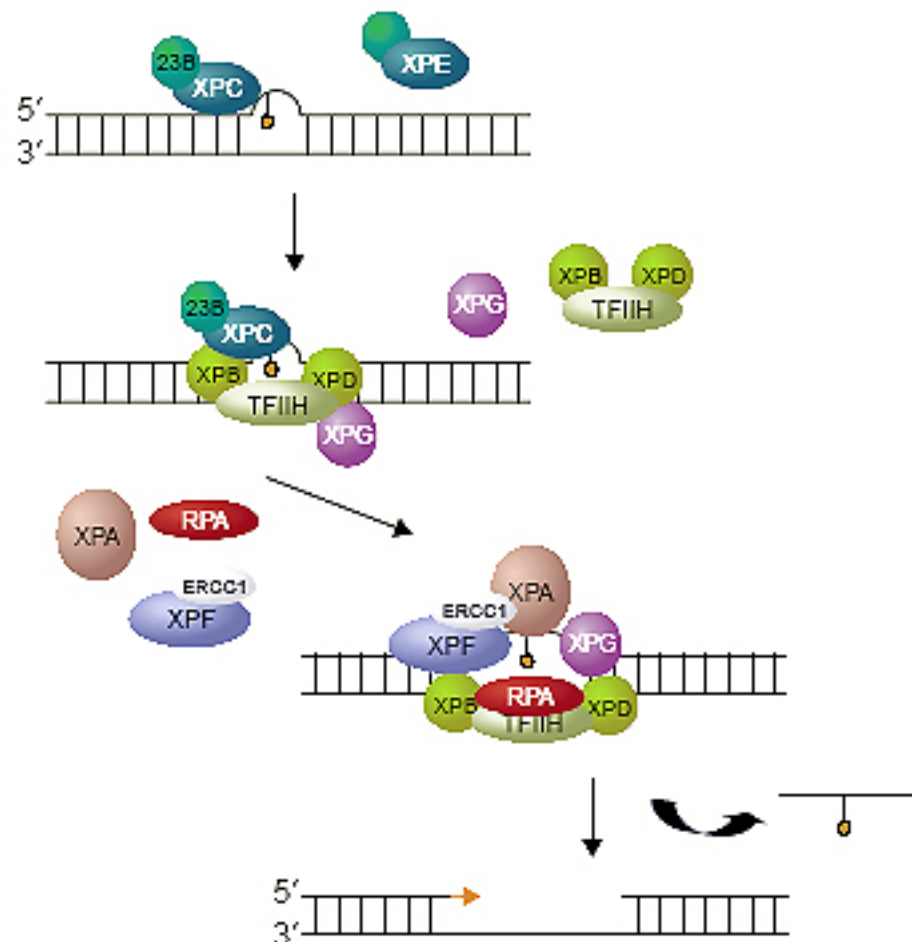


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (Quelle: Mitchell JR, Hoeijmakers JHJ und Niedernhofer LJ: Divide and conquer: nucleotide excision repair battles cancer and ageing, *Current Opinion in Cell Biology*, 2003; 15: 232-240). Beteiligte Enzyme:

RPA	Stabilisiert die DNA
TFIIH	Katalysiert die Entwicklung der DNA
XPA	Bindet an die Läsion
XPB	3' → 5' - Helicase
XPC-23B	Erkennt DNA-Läsion
XPD	5' → 3' - Helicase
XPE	Assistiert XPC-23B bei der Erkennung des Schadens
XPF und ERCC-1	5' - Inzisions-Einheit
XPG	3' - Inzisions-Einheit

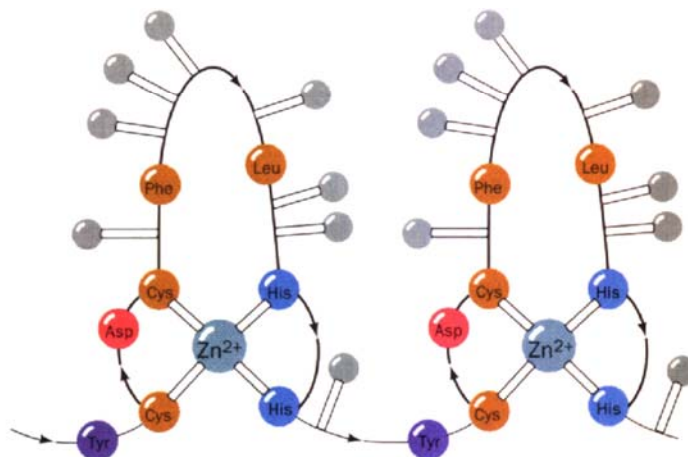


Abbildung 1.2: Zink-Finger-Domäne. Dargestellt sind die das Zink ligierenden Aminosäuren. Die grauen Kugel repräsentieren die wahrscheinlichsten DNA-bindenden Seitenketten [nach Klug A. und Rhodes D., *Trends Biochem. Sci.*, 12, 465 (1988)]

1.3.2.3 Cadmium (II)

Cadmium (II) zählt laut IARC zu den Karzinogenen der Gruppe 1, d.h. seine krebserregende Wirkung konnte epidemiologisch und experimentell erwiesen werden. In einem Review erwähnen Rossman et al. 1992 mehrere mögliche Pathomechanismen, die die karzinogenen Effekte des Metalls erklären. Da die *in vitro*-Behandlung von DNA mit Cadmium (II) nicht zu Strangbrüchen oder alkali-labilen Stellen führte, vermuteten die Autoren indirekt schädigende Wirkungen. Zum einen führt Cadmium (II) wie Nickel (II) zu einem oxidativen Milieu indem es zum Verbrauch zellulären Glutathions führt. Zum anderen kann es im Komplex mit Metallothionein DNA-Strangbrüche verursachen. Metallothioneine sind kleine cysteinreiche Proteine, die mit hoher Affinität zahlreiche Metalle binden. Über ihre genaue Funktion ist wenig bekannt, generell wird davon ausgegangen, dass sie Metalle detoxifizieren sollen. Da die Komplexe aus Protein und Metall aber erwiesenermaßen zu DNA-Strangbrüchen führen [Müller et al., 1991], neutralisiert dieser Proteintyp möglicherweise die zytotoxische Wirkung von Cadmium (II) auf Kosten der Stabilität der DNA. Als dritter Pathomechanismus ist die Inhibierung der DNA-Reparatur zu nennen. Cadmium (II) inhibiert wie Nickel das XPA-Protein und damit den ersten Schritt der DNA-Reparatur nach UV-Schäden. Daneben hemmt Cadmium (II) auch die bakterielle Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg-Protein). Dieses Enzym, das wie das XPA-Protein zu den Zink-Finger-Proteinen zählt, katalysiert die Entfernung von oxidierten Basen aus der DNA mittels Basen-Exzisions-Reparatur [Asmuss et al., 2000 (A)]. Abbildung 1.3 zeigt den allgemeinen Ablauf der Basen-Exzisions-Reparatur.

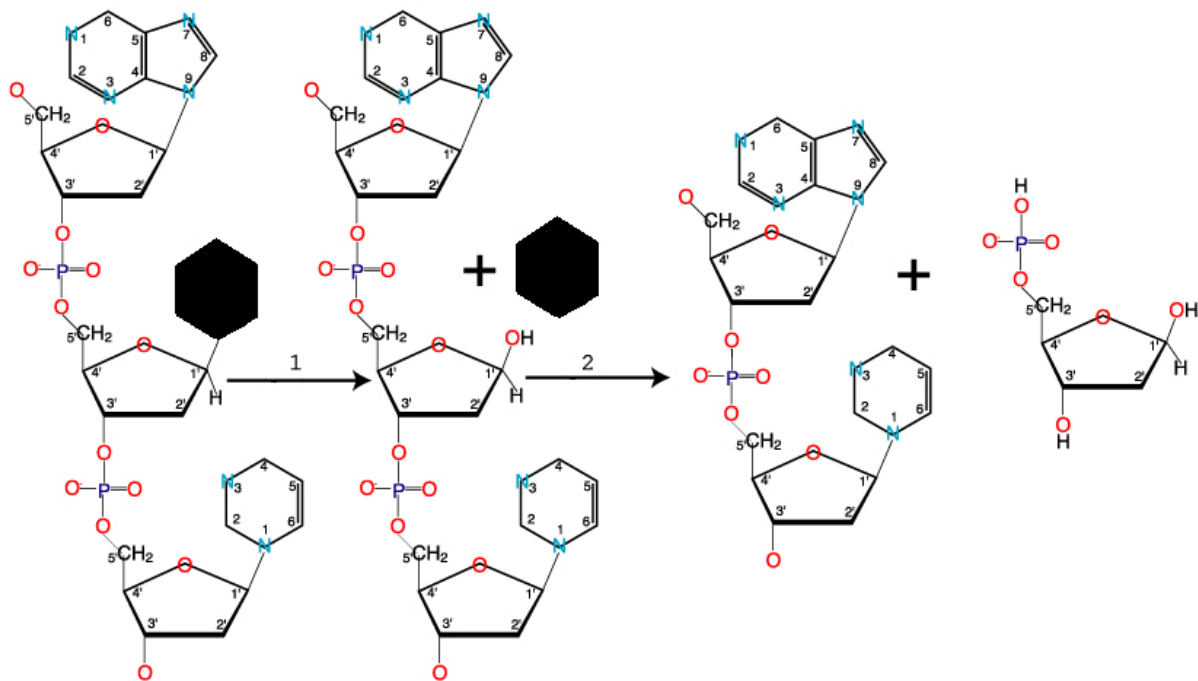


Abbildung 1.3: Schema der Basen-Exzisions-Reparatur:

- 1: Eine spezifische DNA-Glykosylase (z.B. die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase) lysiert die beschädigte Base (schwarz) und die Desoxyribose.**
- 2: Eine Endonuklease exzidiert die Desoxyribose an ihren Phosphatgruppen.**

Die wiederholte Kultivierung von alveolären Epithelzellen in cadmiumchloridhaltigem Medium führte dazu, dass die intrazellulären Konzentrationen von Glutathion und Metallothionein anstiegen [Potts et al., 2001]. Durch die Kultivierung konnten sich die somit an Cadmium adaptierten Zellen besser vor DNA-Schäden schützen, die durch Wasserstoffperoxid hervorgerufen wurden. Gleichzeitig konnten die Autoren zeigen, dass in cadmiumadaptierten Zellen hinzugefügtes Fpg-Protein und Endonuklease III in größerem Ausmaß inhibiert wurden als in den Vergleichszellen. Das Substrat der Endonuklease III sind oxidativ geschädigte Pyrimidine.

Die DNA-Fragmentierung von Cadmium (II) entfaltet sich also auf zwei Wegen: Zum einen führt es zum vermehrten Auftreten oxidativer DNA-Schäden indem es zum Verbrauch zellulärer Antioxidantien wie Glutathion und Metallothionein führt. Zum anderen verhindert es die Reparatur eben dieser Schäden durch die Inhibition des Fpg-Proteins und der Endonuklease III. Zusätzlich fanden sich in Studien Hinweise, dass Cadmium (II) die Expression von Protoonkogenen und des p53-Tumorsuppressorgens fördert. Daneben induziert es auch die Expression des zytoprotektiven Metallomethioneins und Glutathions.

In unterschiedlichen Zelllinien konnte daneben gezeigt werden, dass Cadmium (II) in nicht zytotoxischer Konzentration (1 μM) die DNA-Synthese und die Zellproliferation stimuliert [Beyersmann et al., 1997].

1.3.2.4 Chrom (VI)

Die karzinogene Wirkung von Chrom (VI) im Chromat konnte sowohl im Tierversuch, als auch epidemiologisch nachgewiesen werden (IARC, 1990). Es liegt eine Vielzahl von Studien vor, die sich mit dem Mechanismus der Chrom(VI)-induzierten Karzinogenese beschäftigten. In Tests sowohl mit Bakterien, als auch mit Säugerzellen konnte die direkte DNA-Schädigung nachgewiesen werden. Die DNA-Schäden beruhen wahrscheinlich auf der Einwirkung reaktiver Zwischenprodukte, die bei der zellulären Reduktion von Chrom (VI) zu Chrom (III) auftreten, oder auf Chrom (III) selber [Hartwig, 1998]. Reynolds et al. konnten 2004 den Schädigungsmechanismus von Chrom (III) näher aufklären indem sie nachgewiesen haben, dass Chrom (III) nach intrazellulärer Reduktion von Chrom (VI) mit der DNA Addukte bildet. Mit der alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von Vitamin C die Chrom (VI)- bedingte DNA-Fragmentierung reduziert werden kann. Denselben Effekt hatte in dieser Studie die Zugabe von Katalase, einem Enzym, das die Umwandlung von Wasserstoffperoxid in Wasser und molekularen Sauerstoff katalysiert. Weder Vitamin C, noch Katalase hatten jedoch Einfluss auf die Wirkung von Chrom (III) [Blasiak et al., 2000 (A)]. Der oxidative Stress, verursacht durch die *in vivo*-Reduktion von Chrom (VI) ruft in Zellen eine Vielzahl von Reaktionen hervor. Neben der direkten Genom-Schädigung ist insbesondere die Modulation von Genen zu nennen. So konnte gezeigt werden, dass der oxidative DNA-Schaden, hervorgerufen durch orale Applikation von Chrom (VI), in p53-defizienten Mäusen signifikant höher war als in einer Vergleichspopulation. Das lässt vermuten, dass das p53-Tumorsuppressorgen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung oxidativer DNA-Schäden spielt [Bagchi et al., 2001].

1.4 Ethanol

1.4.1 Verbrauch von Ethanol und dessen Folgen

Seit der Mitte der 50er bis zum Ende der 70er Jahre kam es in Deutschland zu einem steilen Anstieg des pro Kopf Verbrauchs von Alkohol. Nach einer Steigerung um das drei- bis vierfache lag der pro Kopf Verbrauch am Anfang der 80er Jahre bei über 12 Litern reinen Ethanols pro Kopf und Jahr und stellte Deutschland damit an die Spitze im weltweiten Vergleich [Dekant et al., 2001]. Der Verbrauch ging in den 80er und 90er Jahren zurück und lag im Jahre 2000 bei 10,5 Litern reinen Alkohols².

Die Folgen eines exzessiven Alkoholkonsums sind bis heute vielfach untersucht worden. Chronischer Alkoholabusus schädigt in erster Linie die Leber, das Nervensystem und das kardiovaskuläre System. Fettleber und Leberzirrhose, chronischer Tremor und Wernicke-

² Quelle: Deutsche Hauptstelle gegen Suchtgefahren (DHS) e.V.

Encephalopathie, sowie alkoholische Kardiomyopathie stehen im direkten Zusammenhang mit dem chronischen Alkoholmissbrauch.

1.4.2 Kanzerogene Wirkung und DNA-Fragmentierung durch Ethanol

Viele epidemiologische Studien stellten einen direkten Zusammenhang zwischen chronischem Alkoholkonsum und dem Auftreten von Tumoren in Mundhöhle, Pharynx und Larynx, Ösophagus und Leber fest. Man geht davon aus, dass 3 bis 4 % aller Tumoren in Industrieländern nicht auftreten würden, wenn es gelänge, den chronischen Alkoholabusus zu eliminieren [Dekant et al., 2001].

Der genaue Pathomechanismus der Tumorentstehung durch Ethanol ist bisher ungeklärt. Barry et al. blickten 2001 auf die Ergebnisse zahlreicher Studien zur Erbgutschädigung von Ethanol zurück. Viele verschiedene Methoden wurden zur Testung des DNA-fragmentierenden Potentials des Ethanols eingesetzt, unter anderem zur Untersuchung von Mutationen in Bakterien und Säugetierzellen oder zum Nachweis von Chromosomenaberrationen an menschlichen Lymphozyten. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass mit größter Wahrscheinlichkeit nicht Ethanol die tumorinduzierende Substanz ist, sondern Acetaldehyd als erster Metabolit des Ethylalkohols. Diese Folgerung ziehen sie aus der Tatsache, dass Ethanol in der überwiegenden Zahl der *in vitro*-Tests zu keinen DNA-Veränderungen führte, jedoch im Rahmen von *in vivo*-Untersuchungen detektierbare DNA-fragmentierende Effekte hatte, wenn es in ausreichend hohen Dosen getestet wurde. Man muss davon ausgehen, dass Ethanol *in vivo* größtenteils in Acetaldehyd übergeführt wird, während dies *in vitro* nur zu einem geringen Teil geschieht, abhängig von der metabolischen Aktivität des getesteten Gewebes. Die International Agency for Research on Cancer klassifiziert Acetaldehyd als Karzinogen der Gruppe 2b, also als möglicherweise karzinogen [IARC, 1999].

Ethanol agiert weiterhin als Enzym-Induktor. In Langzeitstudien konnte nachgewiesen werden, dass durch chronischen Ethanolkonsum die Aktivität des mikrosomalen Ethanol-Oxidations-Systems (microsomal ethanol-oxidizing system, MEOS) ansteigt. Dabei induziert Ethanol speziell die Expression des Cytochrom-P450-Isoenzym CYP2E1 [Lieber, 1999], was die zunehmende Alkohol-Toleranz bei chronischem Abusus erklärt. Das Cytochrom CYP2E1 ist aber auch für die Umwandlung einer Vielzahl von Xenobiotika in toxische bzw. karzinogene Substanzen verantwortlich. Darunter befinden sich Medikamente wie Paracetamol, Anästhetika wie Enfluran und Halothan, industriell genutzte Lösungsmittel (Benzene und seine Derivate), sowie auch Nitrosamine, welche in Nahrungsmitteln und Tabakrauch vorhanden sind [Meskar et al. 2001]. Bei all diesen Reaktionen entstehen Sauerstoffradikale, die die Zellen unter einen hohen oxidativen Stress setzen [Nieto et al., 2003].

1.5 Die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese

Østling und Johanson entwickelten 1984 die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) zum Nachweis strahleninduzierter DNA-Schäden. Die zunächst im neutralen Milieu durchgeführte Untersuchung diente der Detektierung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Zur Durchführung wurden etwa 1×10^5 Zellen auf präparierten Objektträgern in Agarose eingebettet, anschließend lysiert und unter pH-neutralen Bedingungen der Elektrophorese ausgesetzt. Abhängig vom Ausmaß der strahlungsbedingten DNA-Fragmentierung zeigte die DNA eine Wanderung zur Anode. Je höher die DNA-Schädigung bzw. -Fragmentierung durch eine Noxe, desto weiter war die Wanderungstrecke in der Elektrophorese. Singh et al. modifizierten die Methode 1988. Sie arbeiteten während der Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen. Durch die Alkalisierung des Elektrophoresepuffers wurden zwei Dinge erreicht: Zum einen kamen nun auch Einzelstrangbrüche zur Darstellung, da die DNA im alkalischen Milieu denaturiert, d.h. entspiralisiert und in Einzelsträngen vorliegt. Zum anderen wurden durch den hohen pH-Wert Strangbrüche dort hervorgerufen, wo durch Veränderungen an der DNA oder durch defizitäre Exzisionsreparatur alkalilabile Stellen entstanden. Die Methode wurde hierdurch empfindlicher für DNA-Fragmentierungen. Unter neutralen Bedingungen konnten bei der Untersuchung strahlenexponierter Zellen bei Strahlungswerten von bis zu 100 rad keine DNA-Schäden nachgewiesen werden. Im alkalischen Milieu zeigte die DNA humaner Lymphozyten dagegen nach Bestrahlung von 25 bis 100 rad eine gleichmäßige dosisabhängige Wanderung im elektrischen Feld. Dies ist durch die ausbleibende Denaturierung der DNA bei neutralem pH und hierdurch vorwiegend entstehender Doppelstrangbrüche erklärbar. Ein weiterer Vorteil der Alkalisierung ist der Abbau zellulärer RNA und somit die Vermeidung störender Einflüsse bei der Auswertung [Singh et al. 1988, Kuchenmeister 1991]. Es muss erwähnt werden, dass es auch in Kontrollgruppen ohne Zusatz einer Noxe zu messbarer DNA-Migration kommt. Diese wird durch geringfügige DNA-Schäden hervorgerufen, denen die mechanische Belastung der Zellen (z.B. Zentrifugation) oder der Einfluss der eingesetzten Enzyme (z.B. Protease) zugrunde liegen. Durch die Wanderung der DNA im elektrischen Feld entsteht nach Anfärbung ein kometenähnliches Bild. Der Kopf des Kometen repräsentiert den Zellkern mit der weitgehend ungeschädigten DNA. Der Schweif des Kometen zeigt die im unterschiedlichen Ausmaß fragmentierte DNA. [Tice et al., 2000]. Zur Quantifizierung der durch eine Noxe entstandenen DNA-Schädigung dient das *Olive Tail Moment*. Es berechnet sich als Produkt aus DNA-Wanderungstrecke und der relativen Fluoreszenzdichte im Schweif des Kometen [Olive et al., 1993]. Bei der Selektion der ausgewerteten Zellen, wurde darauf geachtet, dass sie dem Durchschnitt der vielen hundert Zellen auf dem Objektträger entsprachen. Dabei wurden sogenannte „Hegdehogs“, das heisst Zellen deren Kometenkopf nicht mehr klar zu differenzieren war, ausdrücklich nicht gewertet, da diese neben Zellen mit sehr hohem Schädigungsniveau auch Zellen darstellen können, die sich im apoptotischen

Prozess befinden [nach einer Stellungnahme von Raymond Tice vom NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM)].

1.6 Aufgabenstellung

Die vorliegende Arbeit zeigt, in welchem Ausmaß ausgewählte Metallsalze von Zink, Nickel, Cadmium und Chrom sowie Ethanol fähig sind, die DNA in Speicheldrüsenzellen im Sinne von Einzelstrangbrüchen, alkalilabiler Stellen und inkompletter Exzisionsreparatur zu schädigen. Zum Nachweis der DNA-fragmentierende Wirkung der Substanzen wurde die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese gewählt. Da alle getesteten Stoffe durch Ingestion oder Inhalation in den menschlichen Organismus gelangen, haben sie eine besondere Bedeutung für die bislang weitgehend ungeklärte Kanzerogenese in Speicheldrüsen. Dies ermöglicht nach der heute gültigen Hypothese zur Krebsentstehung Rückschlüsse auf das mögliche kanzerogene Potenzial dieser Substanzen. Neben den Speicheldrüsenzellen wurden auch Lymphozyten verwendet. Diese wurden bereits in einer Vielzahl von Studien eingesetzt, die sich mit der DNA-schädigenden Wirkung von Umweltstoffen beschäftigten. Die DNA von Lymphozyten ist aufgrund ihrer guten Verfügbarkeit ein gängiges Material für zu testende Substanzen. Alle in der Arbeit eingesetzten Verbindungen wurden sowohl an den Speicheldrüsenzellen, als auch an Lymphozyten getestet, um an zwei unterschiedlichen humanen Zelltypen das DNA-schädigende Potential der Substanzen zu testen. Weiterhin wurde geprüft, ob durch Ethanol, Zinkchlorid, Nickelsulfat und Cadmiumsulfat die DNA-fragmentierende Wirkung von Chrom (VI) beeinflusst werden konnte. Im Rahmen der Untersuchung konnte durch Zugabe von Cadmiumsulfat zu Natriumdichromat die durch Chrom (VI) hervorgerufene DNA-Schädigung nahezu verdoppelt werden. Dies gab Anlass dazu, die Wirkungen von Cadmium näher zu untersuchen, wobei besonderer Wert auf die Beeinflussung der DNA-Reparatur durch Cadmium gelegt wurde.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Spendergruppe

Die insgesamt 46 Patienten, von denen das Speicheldrüsengewebe stammte, waren im Alter von 18 bis 86, im Mittel $53 \pm 0,5$ Jahre. Der Median liegt bei 57 Jahren. 26 Patienten waren männlichen Geschlechts, 20 Gewebeproben stammten von Frauen.

Die verwendeten Lymphozyten kamen von 20 der 46 Gewebespendern. In dieser Gruppe befanden sich die Spender im Alter von 22 bis 74 Jahren. Der Mittelwert beträgt $53 \pm 0,2$ Jahre, der Median 57 Jahre.

Die Gewebeproben wurden aus Operationsresektaten gewonnen. Die Resektionen waren aufgrund unterschiedlicher Erkrankungen klinisch indiziert und wurden an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenranke der Ludwig-Maximilians-Universität München vorgenommen. Die Probenentnahme war ohne Einfluß auf den operativen Verlauf und die anschließende pathologische Diagnostik.

2.1.2 Speicheldrüsengewebe

Bei der Untersuchung wurde Gewebe der Glandula parotis und der Glandula submandibularis verwendet. Es handelte sich um makroskopisch gesunde Anteile der Operationsresektate. Für die jeweilige Probenentnahme wurde die Einwilligung der Patienten eingeholt.

2.1.3 Lymphozyten

Zur Isolierung der Lymphozyten standen jeweils 18 ml heparinisiertes Vollblut zur Verfügung. Das Blut wurde während der Operation entnommen.

2.2 Methoden

2.2.1 Einzelzellgewinnung

2.2.1.1 Isolierung der Speicheldrüsenzellen aus den Operationsresektaten

Von den Speicheldrüsenresektaten wurde ein makroskopisch gesunder Anteil abgetrennt und in einem Biopsiegefäß mit NaCl-Lösung aufbewahrt. Daraufhin erfolgte der Transport in das Labor unter Lichtabschluss. Bei Zerkleinerung des Gewebes unter einem Lichtmikroskop mittels Skalpell wurden Blutgefäße und Bindegewebe so weit wie möglich entfernt. Es schloss sich die Inkubation des Gewebes in einer Enzymlösung bei 37 °C für 60 Minuten im

Schüttelwasserbad an (Schüttelfrequenz: 140 U/min), um die Zellen aus ihrem Gewebeverband zu lösen. Die Enzymlyösung bestand aus 62,5 mg Protease (*Streptomyces griseus*) [Sigma, Steinheim], 12,5 mg Hyaluronidase (Schafshoden) [Boehringer, Mannheim] und 12,5 mg Kollagenase P (*Clostridium histolyticum*) [Boehringer]. Die Enzyme wurden in 10 ml Joklik-Medium gelöst und anschließend steril filtriert. Nicht gelöste, größere Gewebestücke konnten durch Filtration über eine zweilagige Gazeschicht in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen aus der Zellsuspension entfernt werden. Nach Zentrifugation bei 400 U/min für 10 Minuten und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in 1 ml Joklik resuspendiert, worauf sich eine Zellzählung und Vitalitätsbestimmung anschloss.

2.2.1.2 Isolierung der Lymphozyten aus heparinisierem Vollblut

Das heparinisierte Vollblut kam unter Lichtabschluss in das Labor. 18 ml des Blutes wurden mit 9 ml PBS (Phosphate buffered saline, ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonat) [Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein] vermischt und vorsichtig auf 15 ml Biocoll-Separationsmedium [Biochrom KG, Berlin] geschichtet. Durch Zentrifugation bei 2000 U/min für 20 Minuten ohne Bremse bildete sich zwischen der Blutserum- und Biocollschicht eine Bande, in der sich die Lymphozyten befanden. Diese wurde mittels einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen und mit 15 ml PBS in ein weiteres Zentrifugenröhrchen überführt. Bei einer zweiten Zentrifugation bei 2000 U/min für 10 Minuten mit Bremse bildete sich ein Lymphozyten-Pellet am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet in 1 ml FCS (Fetal Calf Serum) [Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein] resuspendiert. Es folgte ein Trypanblau-Ausschlusstest zur Bestimmung der Zellvitalitäten und Zellzahl. Zellaliquots von je 10^5 Lymphozyten in 1 ml Tieffriermedium (90 % FCS, 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) [Merck, Darmstadt]) wurden in ein Kryoröhrchen [Nalgene, Rochester, NY, USA] gegeben. In einem durch Isopropanol isoliertem Behälter (Cryo 1 °C Freezing Container) [Nalgene, Rochester, NY, USA] erfolgte die Abkühlung der Kryoröhrchen um 1 °C pro Stunde auf eine Temperatur von -80 °C zur Aufbewahrung.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zellzahl und Vitalität der Zellsuspension wurden mit dem Trypanblau-Ausschlusstest (*Phillips 1973*) bestimmt. 50 µl der Suspension wurden 1:1 mit einer Trypanblaulösung (Trypan Blue Stain 0,4 %, Trypanblau) [Gibco BRL Lifetechnologies] vermischt und ein Tropfen des Gemisches in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Unter einem Phasenkontrastmikroskop wurden jeweils die Anzahl der vitalen (ungefärbten) und der avitalen (blaugefärbten) Zellen bestimmt und der prozentuale Anteil der vitalen Zellen errechnet. Mit diesem Test können die Zellen durch Blaufärbung identifiziert werden, die avital im Sinne

eines fehlenden Sauerstoff- und Glucosestoffwechsels sind und in einer Trypsinlösung schnell verdaut werden. Die nichtgefärbten Zellen können somit als grundsätzlich lebens- und stoffwechselfähig betrachtet werden [Phillips, 1973].

2.2.3 Inkubation mit den Testsubstanzen

2.2.3.1 Testsubstanzen

Folgende Testsubstanzen wurden untersucht [Konzentration nachstehend]:

- Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) [1 $\mu\text{mol/ml}$]
- Zinkchlorid (ZnCl_2) [2 $\mu\text{mol/ml}$]
- Nickelsulfat (NiSO_4) [2 $\mu\text{mol/ml}$]
- Cadmiumsulfat (CdSO_4) [2 $\mu\text{mol/ml}$]
- Ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) [60 $\mu\text{mol/ml}$]

Die eingesetzten Konzentrationen der Testsubstanzen beruhen auf Dosis-Wirkungskurven, die im Rahmen von Vorversuchen und vorausgegangenen Untersuchungen im *Deutschen Krebsforschungszentrum* in Heidelberg und im Labor *Klinisch experimentelle Onkologie* der HNO-Klinik der LMU München erstellt wurden.

Als Lösungsmittel der Testsubstanzen und Negativkontrolle kam Aqua bidest. zum Einsatz. Die Positivkontrolle wurde mit *N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin* (MNNG) [Aldrich Chem. Co, Milwaukee, Wisconsin, USA] in der Konzentration von 0,07 $\mu\text{mol/ml}$ durchgeführt.

Nachstehende Stoffkombinationen wurden eingesetzt:

- Natriumdichromat [1 $\mu\text{mol/ml}$] & Ethanol [30 $\mu\text{mol/ml}$]
- Natriumdichromat [1 $\mu\text{mol/ml}$] & Zinkchlorid [1 $\mu\text{mol/ml}$]
- Natriumdichromat [1 $\mu\text{mol/ml}$] & Nickelsulfat [1 $\mu\text{mol/ml}$]
- Natriumdichromat [1 $\mu\text{mol/ml}$] & Cadmiumsulfat [1 $\mu\text{mol/ml}$]

2.2.3.2 Inkubation der Speicheldrüsenzellen

Pro Testsubstanz wurden in drei Parallelansätzen 100 μl der Zellsuspension (je 5×10^4 Zellen) und 10 μl der Substanzlösung in eine 96-Lochplatte pipettiert. Je zwei der Ansätze waren zur weiteren Verarbeitung in der Mikrogelelektrophorese vorgesehen, ein Ansatz wurde zu einer weiteren Vitalitätstestung nach der Fremdstoffinkubation verwendet, um zytotoxische Effekte der Testsubstanz zu bestimmen. Die Zellen wurden bei 37 °C im Schüttelwasserbad eine Stunde lang inkubiert. Darauf wurden die 110 μl Testansatz in ein Zentrifugenröhrchen

überführt. Es folgte eine Zentrifugation für fünf Minuten bei 400 U/min. Die Zellpellets wurden in 75 µl 0,7 %iger Low Melting Agarose aufgenommen und auf Objektträger aufgetragen.

2.2.3.3 Inkubation der Lymphozyten

Das Auftauen der Kryoröhrchen erfolgte bei Zimmertemperatur. 1 ml der Zellsuspension wurde nun zu 8 ml PBS (4 °C) in einem Zentrifugationröhrchen gegeben und bei 2000 U/min und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes konnte das Zellpellet in 1 ml RPMI-Medium resuspendiert werden. 50 µl der Zellsuspension dienten zur Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Ausschlusstest. Anschließend wurden je 100 µl der Zellsuspension (5×10^4 Zellen) zu 900 µl Roswell Park Memorial Institute-Medium (RPMI, 1640 W/25 MM HEPES mit L-Glutamin) [Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein] gegeben und diese Menge mit je 100 µl Testsubstanzlösung versetzt. Pro Testsubstanz wurden drei Ansätze verwendet, zwei zur weiteren Verarbeitung in der Mikroelektrophorese, eine zur Vitalitätsbestimmung. Nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C und einer Schüttelfrequenz von 140/min im Schüttelwasserbad schloss sich eine Zentrifugation der Röhrchen bei 2000 U/min bei 4 °C für fünf Minuten an. Die Zellpellets wurden in 75 µl 0,7 %iger Low Melting Agarose aufgenommen und auf Objektträger aufgetragen.

2.2.3.4 Reparaturversuche

Die Reparaturversuche folgten dem Protokoll der Speicheldrüsenversuche. Anstatt einer 96-Lochplatte kamen jedoch Zentrifugenröhrchen zum Einsatz, in denen die Zellen im Schüttelwasserbad inkubiert wurden. Nach der darauffolgenden Zentrifugation bei 400 U/min für fünf Minuten wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet in 200 µl Joklik-Medium aufgenommen. Um in den Ansätzen, die nun weitere 60 Minuten inkubiert wurden, die initial hinzugegebene Testsubstanzlösung so weit wie möglich zu eliminieren, erfolgte eine weitere Zentrifugation (400 U/min, 5 Minuten). Das Zellpellet wurde daraufhin in 200 µl frischem Joklik-Medium resuspendiert. Nach der zweiten Inkubationsperiode erfolgte die abschließende Zentrifugation (400 U/min, 5 Minuten). Die Zellpellets wurden in 75 µl 0,7 %iger Low Melting Agarose aufgenommen und auf Objektträger aufgetragen.

2.2.4 Präparation der Objektträger

Die Objektträger (24 x 70 mm) hatten eine Mattierung von je 5 mm an den Längsseiten, um einerseits eine gute Haftung der Agaroseschicht und andererseits im nicht mattierten Bereich die digitale Auswertung der DNA ohne Artefakte zu ermöglichen. Die basale Agaroseschicht

bestand aus 85 µl 0,5 %iger Normal Melting Agarose (NMA, Seakem[®]LE agarose) [FMC-Bio Products, Rockland, Maine USA] in PBS im Verhältnis 1:2 gelöst. Innerhalb eines Tages trocknete die Lösung auf dem Objektträger vollständig aus und diente den folgenden Schichten zur besseren Haftung.

2.2.5 Auftragen der Zellen

Nach Inkubation und abschließender Zentrifugation wurde das verbleibende Zellpellet in 75 µl 0,7 %iger Low Melting Agarose (LMA, Sea-Plaque[®] GTG[®] Agarose 0,7 %) [FMC-Bio Products, Rockland, Maine USA] suspendiert. Nach Auftragen der Suspension auf die vorbereiteten Objektträger wurden diese auf eine gekühlte Metallplatte gelegt, damit die Schicht rasch und gleichmäßig zur Haftung kam. Eine weitere Schicht mit 85 µl 0,7 %iger Low Melting Agarose bedeckte schließlich die zelltragende Agaroseschicht.

2.2.6 Lyse der Zell- und Kernmembranen

Die Lyse der Membranstrukturen der Zellen erfolgte mit einer alkalischen Lyselösung aus 1 ml Triton X-100 (t-Octylphenoxyethoxyethanol) [Sigma, Steinheim], 10 ml DMSO und 89 ml Lysestammlösung [146,4 g NaCl, 1,2 g Trizma-Base (C₄H₁₁NO₃), 37,2 g Na₂EDTA und 10 g N-Lauroylsarcosin Natrium Salz (C₂₁H₂₀N₃Br) ad 1 Liter Aqua bidest., pH 10]. Die Lyse erfolgte für mindestens 60 Minuten bei 4 °C unter Lichtabschluss und ermöglichte der DNA die anschließende Wanderung im elektrischen Feld.

2.2.7 Alkalische Elektrophorese

Die Objektträger wurden in einer horizontalen Elektrophoresekammer beginnend an der Anode positioniert und mit Elektrophoresepuffer (24 g NaOH und 0,744 Na₂EDTA ad 2 l Aqua bidest.) bedeckt; es folgte eine 20 minütige Denaturierungsphase, in der sich die DNA im alkalischen Milieu entspiralisierte und in Einzelstränge teilte. Im Anschluß wurde die Elektrophorese bei 25 V und 300 mA für 20 Minuten durchgeführt. Die Objektträger wurden schließlich mit einer Lösung aus 48,5 g Trizma-Base ad 1 Liter Aqua bidest (pH = 7,5) neutralisiert.

2.2.8 Fluoreszenzfärbung

Die Anfärbung der DNA erfolgte mit 75 µl einer Lösung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, die auf den Objektträgern verteilt wurden.

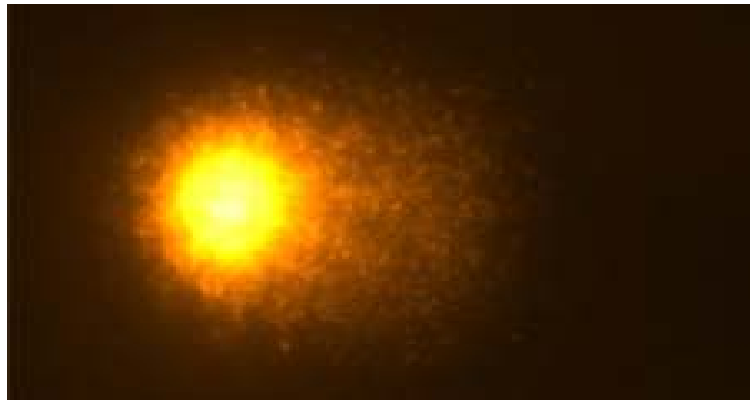
Ethidiumbromid-Stammlösung: 2 mg Ethidiumbromid [*Sigma*, München] pro ml Aqua bidest.

Die Stammlösung wurde bis kurz vor dem Anfärben bei 4 °C unter Lichtabschluss aufbewahrt und zur Anfärbung 1:10 mit Aqua bidest. verdünnt.

2.2.9 Auswertung und Datenerfassung

Die Auswertung der Zellen erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop [Leica, Heerbrugg/CH] und der Software Komet 3.1 [Kinetic Imaging, Liverpool].

Die gemessenen DNA-Schäden setzten sich aus Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und defizitärer Exzisionsreparatur zusammen. Je größer das Ausmaß der Schädigung, d.h. je kleiner die DNA-Fragmente, desto weiter ist die Wanderung der Fragmente im elektrischen Feld. Entsprechend dem Schädigungsniveau entsteht so das Bild eines Kometen :



Der Kopf des Kometen enthält weitgehend ungeschädigte DNA, der Schweif den fragmentierten Anteil der DNA. Das Ausmaß der Schädigung wird mit dem sog. *Olive Tail Moment* (OTM) [Olive et al., 1993] quantifiziert, der Produkt aus DNA-Wanderungsstrecke und der relativen Fluoreszenzdichte im Schweif des Kometen darstellt. Pro Substanz bzw. Negativ- und Positivkontrolle wurden 2 Objektträger ausgewertet. Auf jedem der zwei Objektträger wurden jeweils 40 Zellen evaluiert.

2.2.10 Statistik

Zur statistischen Analyse wurden die OTM-Werte der Negativkontrollen mit denen der Testsubstanzen mittels Wilcoxontest für zwei verbundene Stichproben verglichen. Derselbe Test wurde für den Vergleich zwischen den OTM-Werten von Natriumdichromat und den Stoffkombinationen angewendet. Aufgrund der multiplen Testung wurde auch das Signifikanz-Niveau nach der Bonferroni-Methode erhöht.

Die Versuche mit Speicheldrüsenzellen wurden nach Lokalisation des Spendergewebes (Glandula parotis bzw. Glandula submandibularis) und nach Dignität der Erkrankung des Spenders gruppiert. Auch die Versuche mit Lymphozyten wurden anhand der Dignität der

Grunderkrankung eingeteilt. Der Mann-Whitney-U-Test für zwei unabhängige Stichproben diente dem Vergleich der jeweiligen Gruppen. Da bei diesen Tests keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren, wurde auf die Erhöhung des Signifikanz-Niveaus nach Bonferroni verzichtet.

Zur graphischen Darstellung der OTM-Werte wurden Boxplots gewählt. Die horizontale Linie innerhalb der Box markiert den Median, d.h. den Wert, über und unter dem jeweils die Hälfte aller Fälle liegt, das 50. Perzentil. Bei einer geraden Anzahl von Fällen ist der Median der Mittelwert der zwei mittleren Fälle, wenn diese auf- oder absteigend sortiert sind. Der Kasten wird nach unten durch eine Linie begrenzt, die sog. 1. Quartile, d.h. 25 % aller Werte sind kleiner. Die obere Kastenbegrenzung ist die 3. Quartile, also der Wert, der von 75 % aller Werte unter- und von 25 % aller Werte überschritten wird. Werte, die mehr als drei Boxlängen über bzw. unter den begrenzenden Quartilen liegen, werden als Extremwerte bezeichnet und mit einem Stern markiert. Werte, welche die 1. bzw. 3. Quartile um mehr als eineinhalb Kastenlängen über- bzw. unterschreiten, nennt man Ausreisser und werden mit einem Kreis gekennzeichnet. Die T-Linien markieren den kleinsten bzw. höchsten Wert, wobei weder Extremwerte, noch Ausreisser berücksichtigt werden.

Die jeweiligen Berechnungen wurden mit dem Programm SPSSTM 10.0.7 durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt und nach dem Bonferroni-Verfahren für jeden Test korrigiert.

2.3 Labormaterialien und Geräte

2.3.1 Chemikalien und Reagenzien

Folgende Substanzen fanden Anwendung [Bezugsquelle nachstehend]:

Dimethylsulfoxid (DMSO) [Merck, Darmstadt], Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na_2EDTA) [Serva, Heidelberg], Low-Melting-Agarose und Normal-Melting-Agarose [FMC-Bio Products, Rockland, Maine, USA]; Biocoll-Separationsmedium [Biochrom KG, Berlin]; Natriumchlorid (NaCl) [Sigma, Steinheim], Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) [Merck, Darmstadt] und Natriumhydroxid (NaOH , wasserfrei) [Merck, Darmstadt].

N-Lauroylsarcosin Natrium Salz ($\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{Br}$) [Sigma, Steinheim], Trishydroxymethylaminomethan (Trisma-Base) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$) [Merck, Darmstadt]; Triton X-100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol) [Sigma, Steinheim] und Trypan Blue Stain 0,4 %, Trypanblau [Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein].

2.3.2 Medien und Zusätze

Zum Einsatz kamen:

Fetal Bovine Serum (FCS) [Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein], MEM-Joklik (ohne L-Glutamin und NaHCO_3) [Linaris, Bettingen am Main], Penicillin-Streptomycin-Lösung [Sigma, Steinheim]. Phosphate buffered saline (PBS, ohne Calcium, Magnesium und Natriumbikarbonat) [Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein] und Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI: 1640 w/25 MM mit L-Glutamin) [Gibco BRL Lifetechnologies, Eggenstein].

2.3.3 Enzyme

Zur Zellisolierung wurden verwendet:

Hyaluronidase aus Schafshoden [Roche Duagnostics, Mannheim], Kollagenase P aus *Clostridium histolyticum* (Lyophilisat, nicht steril) [Roche Diagnostics, Mannheim] und Protease aus *Streptomyces griseus* [Sigma, Steinheim].

2.3.4 Testsubstanzen

Zur Inkubation standen zur Verfügung:

Ethanol absolut ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), Zinkchlorid (ZnCl_2), Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat ($\text{NiSO}_4 \times 6 \text{H}_2\text{O}$) und Cadmiumsulfat-Hydrat ($\text{CdSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$) [Merck, Darmstadt]. Natriumdichromat-

Dihydrat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$) [Sigma, Steinheim] und *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) [Aldrich Chem. Co, Milwaukee, Wisconsin, USA].

2.3.5 Lösungen

2.3.5.1 MEM-Joklik

10,98 g Pulvermedium Joklik-MEM ohne L-Glutamine, ohne NaHCO_3 , 2g NaHCO_3 , 10 ml Penicillin-Streptomycin zu 1 l Aqua bidest., pH-Wert 7,20-7,25, sterilfiltrieren und portionsweise bei 4 °C aufbewahren.

2.3.5.2 Enzymlösung zur Zellisolierung

62,5 mg Protease 12,5 mg Hyaluronidase und 12,5 mg Kollagenase P in 10 ml Joklik ansetzen, sterilfiltrieren und bis zur Verwendung im Wasserbad bei 37 °C aufbewahren.

2.3.5.3 Agarose

1 %ige Normal-Melting Agarose

0,5 %ige Normal-Melting Agarose

0,7 %ige Normal-Melting Agarose

unter kurzem Erhitzen in der Mikrowelle mit PBS lösen und bis zur weiteren Verwendung im Wasserbad (37 °C) aufbewahren.

2.3.5.4 Lysestammlösung

146,4 g NaCl (2,5 M)

1,2 g Trizma-Base (10 mM)

37,2 g Na_2EDTA (100 mM)

10 g (1 %) *N*-Lauroylsarcosin Natrium Salz ad 1 l Aqua bidest., pH-Wert auf 10 einstellen

2.3.5.5 Lysepuffer

1 ml Triton X-100

10 ml DMSO

89 ml Lysestammlösung

2.3.5.6 Elektrophoresepuffer

24 g NaOH-Plättchen
 0,744 g Na₂EDTA
 ad 2 l Aqua bidest.

2.3.5.7 Neutralisationspuffer

48,5 g Trizma-Base (400 mM) mit 990 ml Aqua bidest. mischen und auf einen pH-Wert von 7,5 einstellen, dann auf 1 l auffüllen. Bei Raumtemperatur aufbewahren.

2.3.5.8 Färbelösung (Stammlösung)

50 ml Aqua bidest., 10 mg Ethidiumbromid: diese Lösung bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahren, kurz vor dem Versuch eine 1:10 Verdünnung mit Aqua bidest. herstellen und sterilfiltrieren.

2.3.5.9 Tieffriermedium

10 % DMSO
 90 % FCS

2.3.6 Verbrauchsmaterial

Objektträger zum Mikroskopieren (24 x 70 mm), je 5 mm speziell seitlich mattiert	[Langenbrinck, Emmendingen]
Deckgläser zum Mikroskopieren (76 x 26 mm), Glasdicke 0,08 - 0,12 mm	[Langenbrinck, Emmendingen]
Röhrchen mit Schraubverschluß (15 ml, 13 ml)	[Sarstedt, Nümbrecht]
Röhrchen mit Schraubverschluß (50 ml)	[Greiner, Frickenhausen]
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	[Becton Dickinson, Heidelberg]
Einwegfiltereinheiten steril, 0,22 µm Filter Unit, Millex ^R -GV, Millex ^R -GS	[Millipore, Eschborn]
Gaze	[Lochmann & Ralscher, Rengsdorf]
Einwegskalpell	[Feather, Japan]
Microtiterplatte Cellstar ^R mit Abdeckplatte und 96 Vertiefungen, steril	
Kryoröhrchen 2 ml, steril	[Greiner, Frickenhausen]
Pipette aus Polystyrol mit Stöpsel (10 ml),	[Nalgene, Rochester, NY,USA]

steril	[Greiner, Frickenhausen]
Pipettenspitzen, steril	[Eppendorf, Hamburg]
Stericup (150 ml), steril	[Millipore, Eschborn]

2.3.7 Technische Geräte

Analysenwaage Voyager	[Ohaus, Gießen]
Elektrophoresenetzgerät E865	[Renner, Dannstadt]
Gefrierschrank (-80 °C)	[New Brunswick Scientific, Nürtingen]
horizontale Elektrophoresekammer (237 x 180 mm)	[Renner, Dannstadt]
Kühlschrank (+4 °C) und Gefrierschrank	[Bosch, Stuttgart]
Magnetrührer Combimag RCT	[IKA, Staufen]
Mikroskop:	
Standardmikroskop	[Zeiss, Oberkochen]
Fluoreszenzmikroskop DMLB	[Leica, Heerbrugg/CH]
Filtersystem N2.1, Grünanregung BP 516 – 560, RKP 580 LP 580, Objektive 40x/0,5, 10x/0,22, 4x/0,1	
Mikrowelle MWS 2819	[Bauknecht, Schorndorf]
pH- Meter 766 Calimatic	[Knick, Berlin]
Schüttelwasserbad 1083	[GFL, Burgwedel]
Schüttler Vortex Genie 2	[Scientific Industries, Bohemia, NY, USA]
Sterilbank Herasafe	[Heraeus, Hanau]
Waage 1419	[Sartorius, Gießen]
Zentrifuge Varifuge 3,0RS und 3,0R	[Heraeus, Hanau]
Zellzählkammer nach Neubauer	[Marienfeld]
Cryo 1 °C Freezing Container	[Nalgene, Rochester, NY, USA]
Auswertung/ Datenspeicherung:	
Programm Komet 3.1	[Kinetic Imaging, Liverpool]
Datenspeicherung	[Microsoft Excel]

3 Ergebnisse

3.1 Zellvitalitäten

Ein Vitalitätstest wurde vor und nach der Inkubation mit den schädigenden Substanzen durchgeführt. Bei den Speichdrüsenzellen lagen die Werte vor der Inkubation konstant bei über 95 %; Bei den Lymphozyten betrug die Vitalität vor der Inkubation größtenteils über 80 %. Lediglich bei vier der insgesamt 20 Versuche wurde dieser Wert unterschritten, wobei aber immer noch Werte von über 70 % erreicht wurden.

Um eventuelle zytotoxische Effekte der Testsubstanzen auszuschließen, wurde nach der Inkubation mit den Fremdstoffen jeweils eine weitere Vitalitätsbestimmung durchgeführt. Hier lagen die Werte bei den Versuchen mit Speicheldrüsenzellen über 93 %, bei den Lymphozyten bei über 80 %.

3.2 Mikrogelelektrophorese

Bei einer nicht DNA-fragmentierende Substanz wie z.B. Aqua bidest., das als Negativkontrolle und Lösungsmittel verwendet wurde, erwartet man nahezu unfragmentierte DNA nach der Inkubation. Nach der Elektrophorese und Anfärbung der DNA mittels Ethidiumbromid ergibt sich exemplarisch folgende elektrophoretische Auftrennung:



Abbildung 3.1: Geringe DNA-Fragmentierung

Die Inkubation mit Aqua bidest. führte zu keiner nennenswerten Fragmentierung der DNA. Da die relativ großen Moleküle im elektrischen Feld nur sehr träge wandern und es zu praktisch keiner der Größe folgenden Auftrennung der Moleküle kommt, zeigt sich ein eng begrenztes Areal, in dem sich die gesamte DNA befindet.

Ein Beispiel für eine mäßig DNA-schädigende Substanz ist Natriumdichromat. Die Inkubation der Zellen mit dieser Substanz führt zur Fragmentierung der DNA, d.h. es entstehen Bruchstücke mit unterschiedlichen Molekulargewichten und unterschiedlicher Größe. Die

DNA-Teilstücke sind Polyanionen und wandern im elektrischen Feld abhängig von ihrer Größe unterschiedlich weit in Richtung Anode. In der Mikrogelelektrophorese zeigt der Kometenschweif Richtung Anode. Kleinste Fragmente bilden den äußersten Anteil des Schweifs, während die ungeschädigte DNA aufgrund ihrer Größe im Kometenkopf verbleibt. Nach Inkubation mit einer mittelgradig schädigenden Substanz wie Natriumdichromat sieht man daher folgendes Bild:

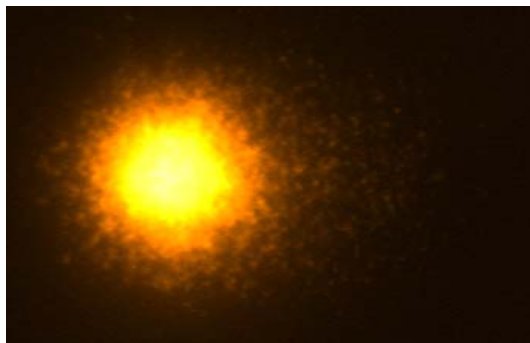


Abbildung 3.2: Mittelgradige DNA-Fragmentierung

Um Fehler im Versuchsablauf auszuschließen, wurde bei jedem Versuch eine Positivkontrolle durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit MNNG (*N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin), einer direkt alkylierenden Substanz, inkubiert. Das folgende Bild stellt eine durch MNNG induzierte DNA-Schädigung dar:

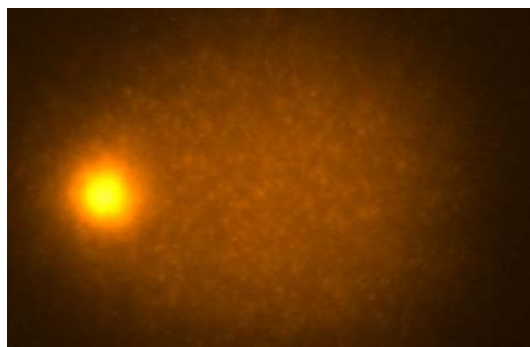


Abbildung 3.3: Starke DNA-Schädigung

Die relativ lange Wanderungsstrecke der fragmentierten DNA weist auf kleine DNA-Teilstücke hin. Darüber hinaus verbleibt im Kometenkopf nur noch wenig DNA, so dass hohe OTM-Werte – der Median lag bei 35,1 – zustande kommen.

3.2.1 DNA-Schädigung in Speicheldrüsenzellen

3.2.1.1 DNA-fragmentierende Effekte von Ethanol, Zinkchlorid, Nickelsulfat und Cadmiumsulfat in Speicheldrüsenzellen

Der Umfang der getesteten Metallverbindungen wurde im Laufe der Arbeit kontinuierlich erweitert. Aus diesem Grund liegen die meisten Werte für die Positiv- bzw. Negativkontrolle vor. Da alle Substanzen in Aqua bidest. gelöst wurden, wurde dieses auch als Negativkontrolle verwendet. Hierzu stehen insgesamt 40 Werte zur Verfügung. Für die Positivkontrolle mit *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin wurden 40 Werte erhoben. Die erbgutschädigenden Effekte von Ethanol, Zinkchlorid, Nickelsulfat und Cadmiumsulfat sind im Vergleich zur Negativkontrolle in der nachfolgenden Grafik dargestellt. Die Boxplots wurde mit dem Statistikprogramm SPSSTM 10.0.7 erstellt, die Fallzahlen sind in der Legende angegeben.

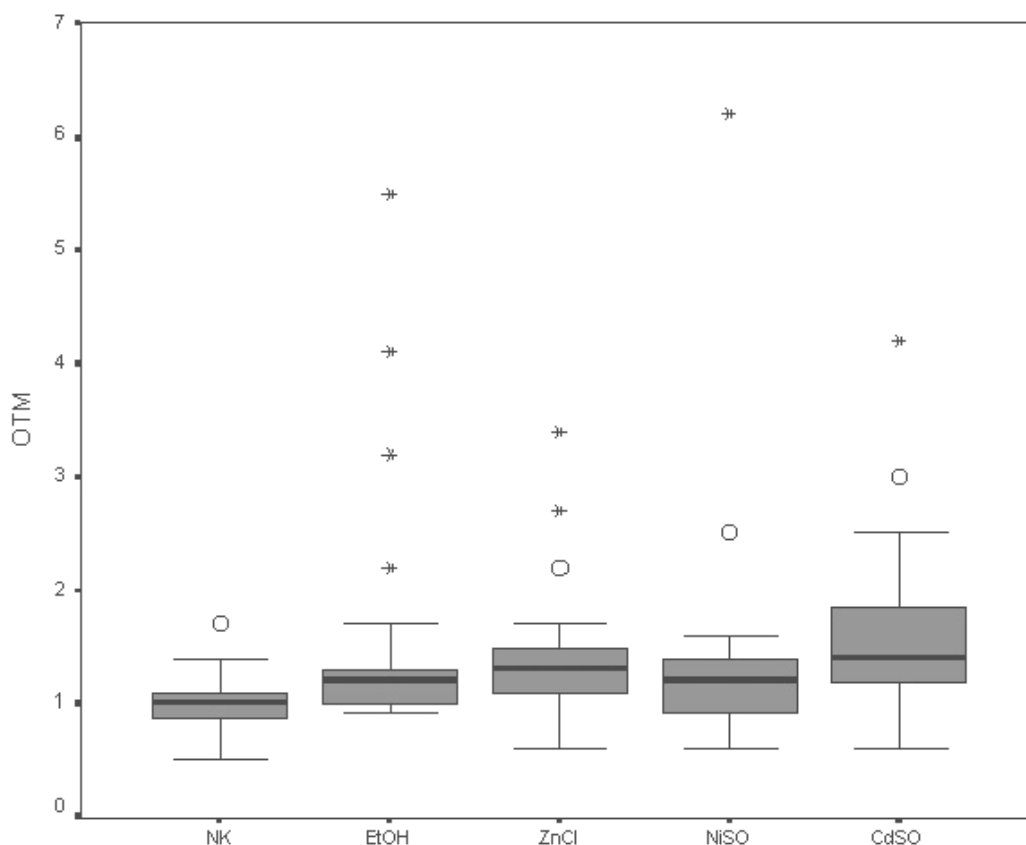


Abbildung 3.4: DNA-Schädigung von Ethanol, Zinkchlorid, Nickelsulfat und Cadmiumsulfat in Speicheldrüsenzellen

x-Achse: Darstellung der Testsubstanzen mittels Boxplots. NK: Aqua bidest. (n = 40) als Negativkontrolle, EtOH: Ethanol (n = 27), ZnCl: Zinkchlorid (n = 36), NiSO: Nickelsulfat (n = 37), CdSO: Cadmiumsulfat (n = 27), o: Ausreißerwert, *: Extremwert

y-Achse: OTM: Olive Tail Moment als quantitatives Maß der DNA-Schädigung

Alle getesteten Substanzen zeigen keine relevante DNA-Schädigung. Der Median der OTM-Werte bei Aqua bidest. liegt bei 1,0, der von Ethanol bei 1,2. Zinkchlorid hat einen Median von 1,3, Nickelsulfat von 1,3 und Cadmiumsulfat von 1,4. Alle Testsubstanzen ausgenommen Nickelsulfat weisen im Vergleich zur Negativkontrolle eine signifikante Schädigung auf. Tabelle 3.1 zeigt die p-Werte.

Tabelle 3.1: p-Werte des Vergleichs DNA-fragmentierender Effekte der Testsubstanzen mit der Negativkontrolle

Testsubstanz	p-Werte
Ethanol	0,005
Zinkchlorid	$\leq 0,001$
Nickelsulfat	0,021
Cadmiumsulfat	$\leq 0,001$

Signifikanz-Niveau nach Bonferroni-Korrektur: 0,01

Trotz der signifikant höheren Schädigung der Prüfsubstanzen gegenüber der Negativkontrolle kann nicht von einer nennenswerten Schädigung gesprochen werden, da im Zusammenhang mit der Mikrogelelektrophorese erst ab OTM-Werten größer 2,0 von einer relevanten DNA-Schädigung ausgegangen wird.

3.2.1.2 DNA-fragmentierende Effekte von Natriumdichromat und Natriumdichromat in Kombination mit Ethanol bzw. Metallverbindungen in Speicheldrüsenzellen

Die erbgutschädigende Wirkung von Natriumdichromat wird in Abbildung 3.5 im Vergleich zur Negativkontrolle gezeigt. Zusätzlich stellt die Grafik die DNA-Schädigung von Natriumdichromat in Kombination mit jeweils auch einzeln getesteten Metallverbindungen und Ethanol dar. Die Fallzahlen sind in der Legende angegeben.

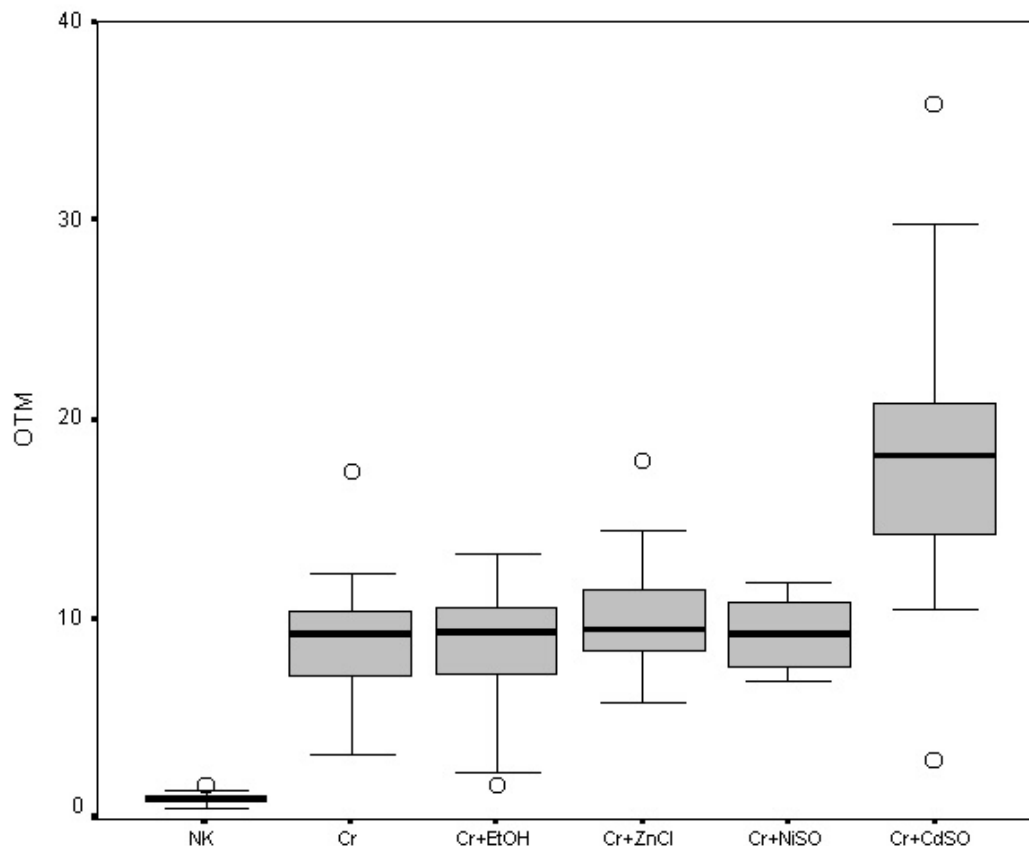


Abbildung 3.5: DNA-Schädigung von Natriumdichromat und Stoffkombinationen in Speicheldrüsenzellen

x-Achse: Darstellung der Testsubstanzen mittels Boxplot. NK: Aqua bidest. als Negativkontrolle (n = 40), Cr: Natriumdichromat (n = 41), Cr+EtOH: Natriumdichromat mit Ethanol (n = 23), Cr+ZnCl: Natriumdichromat mit Zinkchlorid (n = 20), Cr+NiSO: Natriumdichromat mit Nickelsulfat (n = 12), Cr+CdSO: Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat (n = 21), ○: Ausreißerwert

y-Achse: OTM: Olive Tail Moment als quantitatives Maß der DNA- Schädigung

Die Prüfsubstanzen verursachen alle eine relevante DNA-Schädigung. Der Median von Natriumdichromat liegt bei 9,2; in Kombination mit Ethanol liegt der Median bei 9,3, mit Zinkchlorid bei 9,5, mit Nickelsulfat bei 9,2. Den höchsten DNA-fragmentierenden Effekt erzielt Natriumdichromat in Kombination mit Cadmiumsulfat mit einem Median von 18,2.

Die Tabelle 3.2 zeigt die p-Werte gegenüber der Negativkontrolle. In Tabelle 3.3 werde die p-Werte der Stoffkombination gegenüber Natriumdichromat dargestellt.

Tabelle 3.2: p-Werte des Vergleichs DNA-fragmentierender Effekte der Testsubstanzen mit der Negativkontrolle

Testsubstanz	p-Werte
Natriumdichromat	$\leq 0,001$
Natriumdichromat mit Ethanol	$\leq 0,001$
Natriumdichromat mit Zinkchlorid	$\leq 0,001$
Natriumdichromat mit Nickelsulfat	0,002
Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat	$\leq 0,001$

Signifikanz-Niveau nach Bonferroni-Korrektur: 0,01

Tabelle 3.3: p-Werte des Vergleichs DNA-fragmentierender Effekte der Stoffkombinationen mit Natriumdichromat

Testsubstanz	Signifikanzniveau p
Natriumdichromat mit Ethanol	0,689
Natriumdichromat mit Zinkchlorid	0,955
Natriumdichromat mit Nickelsulfat	0,083
Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat	$\leq 0,001$

Signifikanz-Niveau nach Bonferroni-Korrektur: 0,01

Abgesehen von der Kombination Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat, führen die Stoffkombinationen zu keiner signifikant höheren DNA-Schädigung als Natriumdichromat alleine.

3.2.1.3 DNA-Fragmentierung durch *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin in Speicheldrüsenzellen

Die höchsten OTM-Werte erreichte MNNG, das als direkt alkylierende Substanz als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Der Median der von MNNG erreichten OTM-Werte liegt bei 35,1, der p-Wert der DNA-Schädigung gegenüber der Negativkontrolle bei $p < 0,001$. Abbildung 3.6 zeigt die mit MNNG erzielten OTM-Werte im Vergleich zu der Negativkontrolle als Boxplot (Fallzahlen sind in der Legende angegeben).

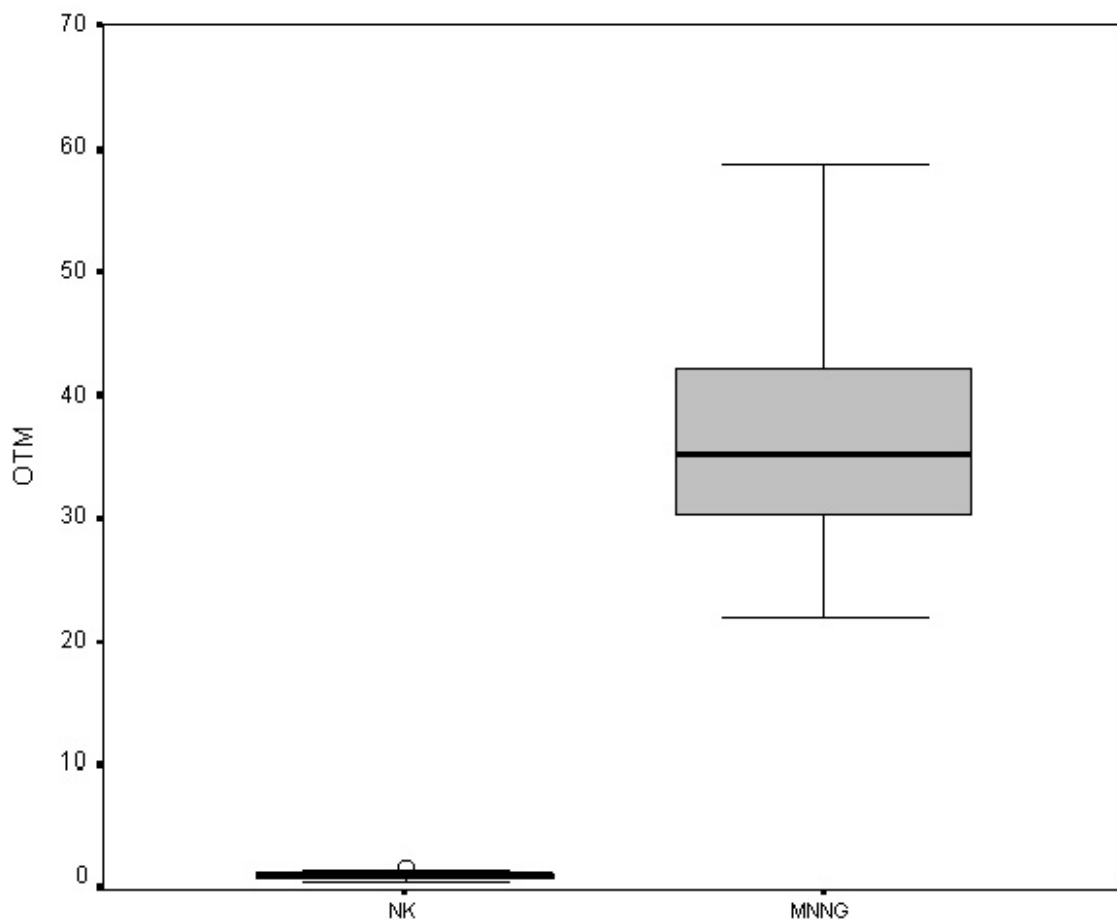


Abbildung 3.6: DNA-Schädigung durch MNNG in Speicheldrüsenzellen

x-Achse: Darstellung der Testsubstanzen mittels Boxplot. NK: Aqua bidest. als Negativkontrolle (n = 40), MNNG: *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (n = 38), ○: Ausreißerwert

y-Achse: OTM: *Olive Tail Moment* als quantitatives Maß der DNA-Schädigung

3.2.1.4 Vergleich der DNA-Schädigung der Testsubstanzen hinsichtlich der Herkunft des Gewebes und Dignität der Grunderkrankung

Die Ergebnisse der Versuche mit Speicheldrüsengewebe konnten hinsichtlich der Herkunft des Gewebes (Glandula parotis bzw. Glandula submandibularis) und der Dignität der Grunderkrankung der Gewebespende gruppiert werden. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde geprüft, ob es signifikante Unterschiede der OTM-Werte gab, abhängig davon, ob das Gewebe von der Glandula parotis oder Glandula submandibularis stammte bzw. ob die Grunderkrankung des Spenders benigne oder maligne war. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse des Tests.

Tabelle 3.4: Ergebnisse der Vergleichs innerhalb der Gruppen

Testsub-stanz	Lokalisation	Anzahl	p-Wert ³	Dignität	Anzahl	p-Wert ³
NK	Gl. parotis	22	0,391	benigne	14	0,733
	Gl. submandibularis	18		maligne	16	
EtOH	Gl. parotis	14	0,883	benigne	8	0,490
	Gl. submandibularis	13		maligne	14	
ZnCl	Gl. parotis	19	0,315	benigne	11	0,585
	Gl. submandibularis	17		maligne	16	
NiSO	Gl. parotis	19	0,313	benigne	13	0,694
	Gl. submandibularis	18		maligne	15	
CdSO	Gl. parotis	15	0,433	benigne	9	0,775
	Gl. submandibularis	12		maligne	12	
Cr	Gl. parotis	23	0,371	benigne	15	0,154
	Gl. submandibularis	18		maligne	16	
Cr+EtOH	Gl. parotis	11	0,056	benigne	7	0,190
	Gl. submandibularis	12		maligne	12	
Cr+ZnCl	Gl. parotis	9	0,849	benigne	4	0,589
	Gl. submandibularis	11		maligne	9	
Cr+NiSO	Gl. parotis	5	0,167	benigne	3	0,480
	Gl. submandibularis	7		maligne	4	
Cr+CdSO	Gl. parotis	11	0,078	benigne	7	0,329
	Gl. submandibularis	10		maligne	10	
MNNG	Gl. parotis	21	0,060	benigne	12	0,296
	Gl. submandibularis	17		maligne	16	

NK: Aqua bidest. als Negativkontrolle, EtOH: Ethanol, ZnCl: Zinkchlorid, NiSO: Nickelsulfat, CdSO: Cadmiumsulfat, Cr: Natriumdichromat, Cr+EtOH: Natriumdichromat mit Ethanol, Cr+ZnCl: Natriumdichromat mit Zinkchlorid, Cr+NiSO: Natriumdichromat mit Nickelsulfat, Cr+CdSO: Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat

Bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ war keiner der Vergleiche statistisch signifikant.

³ Asymptotische Signifikanz (zweiseitig)

3.2.2 DNA-Schädigung in Lymphozyten

Zur Inkubation der Lymphozyten fanden dieselben Testsubstanzen wie bei den Versuchen mit Speicheldrüsengewebe Anwendung.

3.2.2.1 DNA-Schädigung durch Ethanol, Zinkchlorid, Nickelsulfat und Cadmiumsulfat in Lymphozyten

Die folgende Grafik stellt die OTM-Werte dar, die durch die Inkubation der Lymphozyten mit Ethanol, Zinkchlorid, Nickelsulfat und Cadmiumsulfat erreicht wurden. Die Fallzahlen sind in der Legende angegeben.

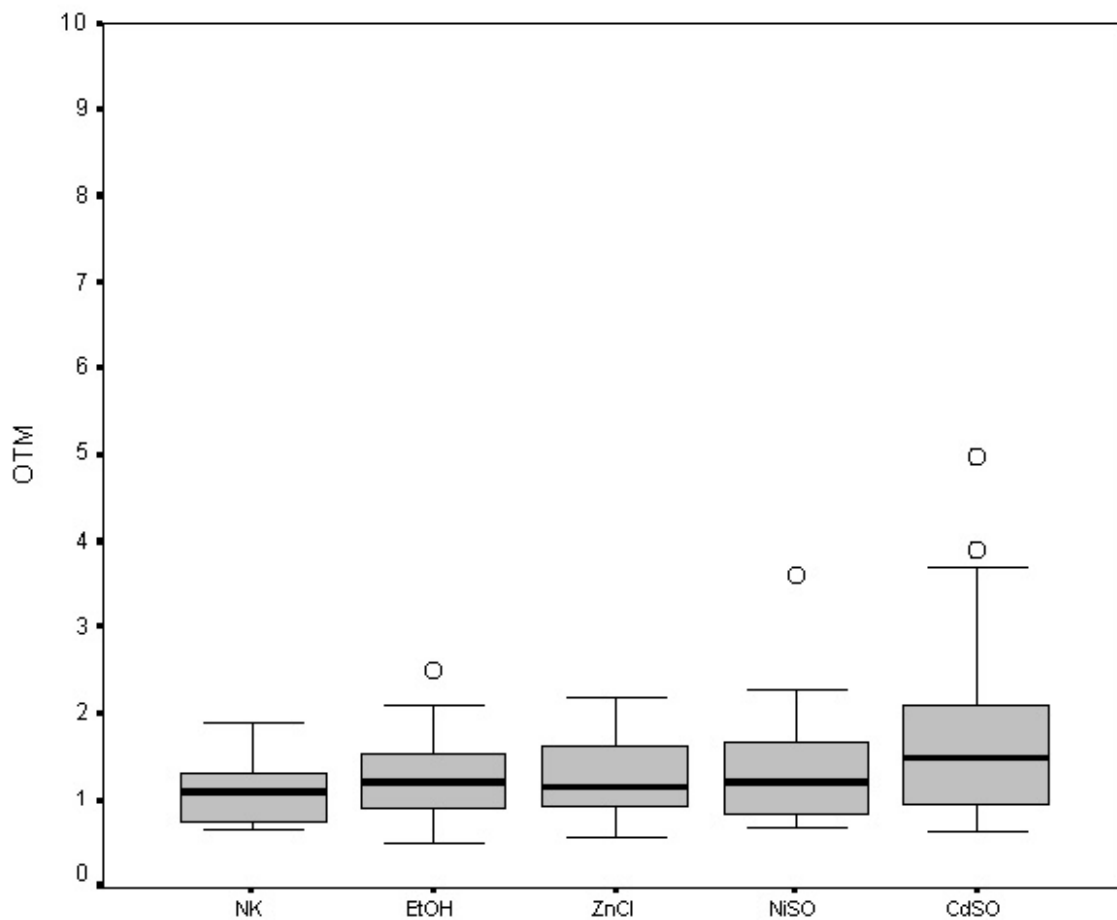


Abbildung 3.7: DNA-Schädigung von Ethanol, Zinkchlorid, Nickelsulfat und Cadmiumsulfat in Lymphozyten

x-Achse: Darstellung der Testsubstanzen mittels Boxplot. NK: Aqua bidest. (n = 20) als Negativkontrolle, EtOH: Ethanol (n = 20), ZnCl: Zinkchlorid (n = 20), NiSO: Nickelsulfat (n = 20), CdSO: Cadmiumsulfat (n = 20), ○: Ausreisserwert

y-Achse: OTM: *Olive Tail Moment* als quantitatives Maß der DNA-Schädigung

Alle Substanzen erreichen trotz zum Teil signifikanter Unterschiede zur Negativkontrolle keine OTM-Werte, bei denen man von einer relevanten DNA-Schädigung sprechen könnte. Der Median der OTM-Werte lag bei Aqua bidest. als Negativkontrolle bei 1,1, der von Ethanol bei 1,3. Der Median von Zinkchlorid betrug 1,3, der von Nickelsulfat 1,4, derjeniger von Cadmiumsulfat 1,8. Bei der Mikrogelelektrophorese geht man erst ab einem OTM von 2,0 von einer gesicherten DNA-Schädigung aus. Tabelle 3.5 zeigt die p-Werte des Vergleichs der OTM-Werte der Testsubstanzen mit denen der Negativkontrolle.

Tabelle 3.5: p-Werte des Vergleichs DNA-fragmentierender Effekte der Testsubstanzen mit der Negativkontrolle

Testsubstanz	p-Werte
Ethanol	0,009
Zinkchlorid	0,001
Nickelsulfat	0,027
Cadmiumsulfat	0,001

Signifikanz-Niveau nach Bonferroni-Korrektur: 0,0125

3.2.2.2 DNA-Schädigung durch Natriumdichromat und Natriumdichromat in Kombination mit Ethanol bzw. Metallverbindungen in Lymphozyten

Alle getesteten Stoffe führen zu einer relevanten DNA-Schädigung. Die Mediane der OTM-Werte betragen:

- Aqua bidest.: 1,1
- Natriumdichromat: 10,0
- Natriumdichromat + Ethanol: 10,3
- Natriumdichromat + Zinkchlorid: 10,9
- Natriumdichromat + Nickelsulfat: 10,7
- Natriumdichromat + Cadmiumsulfat: 19,2

Abbildung 3.8 zeigt die Verteilung der OTM-Werte, die nach der Inkubation der Lymphozyten mit Natriumdichromat und den Stoffkombinationen bestimmt werden konnte.

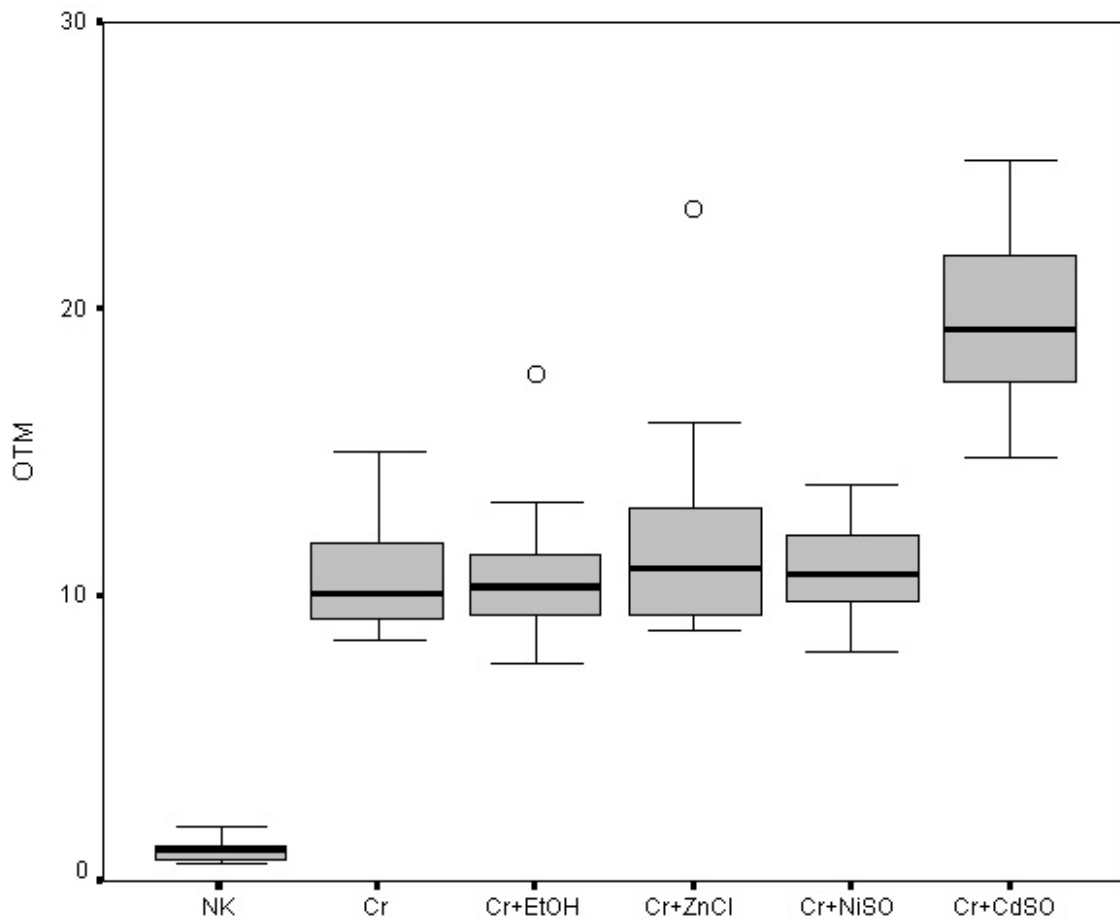


Abbildung 3.8: DNA-Schädigung von Natriumdichromat und Stoffkombinationen in Lymphozyten

x-Achse: Darstellung der Testsubstanzen mittels Boxplot. NK: Aqua bidest. als Negativkontrolle (n = 20), Cr: Natriumdichromat (n = 20), Cr+EtOH: Natriumdichromat mit Ethanol (n = 20), Cr+ZnCl: Natriumdichromat mit Zinkchlorid (n = 20), Cr+NiSO: Natriumdichromat mit Nickelsulfat (n = 17), Cr+CdSO: Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat (n = 20), ○: Ausreisserwert

y-Achse: OTM: *Olive Tail Moment* als quantitatives Maß der DNA- Schädigung

Tabelle 3.6 stellt die p-Werte des Vergleichs der OTM-Werte der Testsubstanzen mit denen der Negativkontrolle dar.

Tabelle 3.6: p-Werte des Vergleichs DNA-fragmentierender Effekte der Testsubstanzen mit der Negativkontrolle

Testsubstanz	p-Werte
Natriumdichromat	< 0,001
Natriumdichromat mit Ethanol	< 0,001
Natriumdichromat mit Zinkchlorid	< 0,001
Natriumdichromat mit Nickelsulfat	< 0,001
Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat	< 0,001

Signifikanz-Niveau nach Bonferroni-Korrektur: 0,01

Tabelle 3.7 zeigt die p-Werte des Vergleichs zwischen Natriumdichromat und den Stoffkombinationen.

Tabelle 3.7: p-Werte des Vergleichs DNA-fragmentierender Effekte der Stoffkombinationen mit Natriumdichromat

Testsubstanz	p-Werte
Natriumdichromat mit Ethanol	0,723
Natriumdichromat mit Zinkchlorid	0,011
Natriumdichromat mit Nickelsulfat	0,006
Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat	< 0,001

Signifikanz-Niveau nach Bonferroni-Korrektur: 0,01

Die Kombination von Natriumdichromat mit Ethanol bzw. Zinkchlorid führte zu keiner signifikant höheren DNA-Schädigung. Die anderen Stoffkombinationen ergaben eine signifikant höhere DNA-Fragmentierung als Natriumdichromat alleine.

3.2.2.3 DNA-Fragmentierung durch *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin in Lymphozyten

Wie bei den Versuchen mit Speicheldrüsengewebe führte auch bei der Inkubation mit Lymphozyten MNNG zu den höchsten OTM-Werten. Der Median lag bei 46,1. Der p-Wert des Vergleichs zwischen Aqua bidest. und MNNG betrug weniger als 0,001. Abbildung 3.9 zeigt die entsprechenden Boxplots.

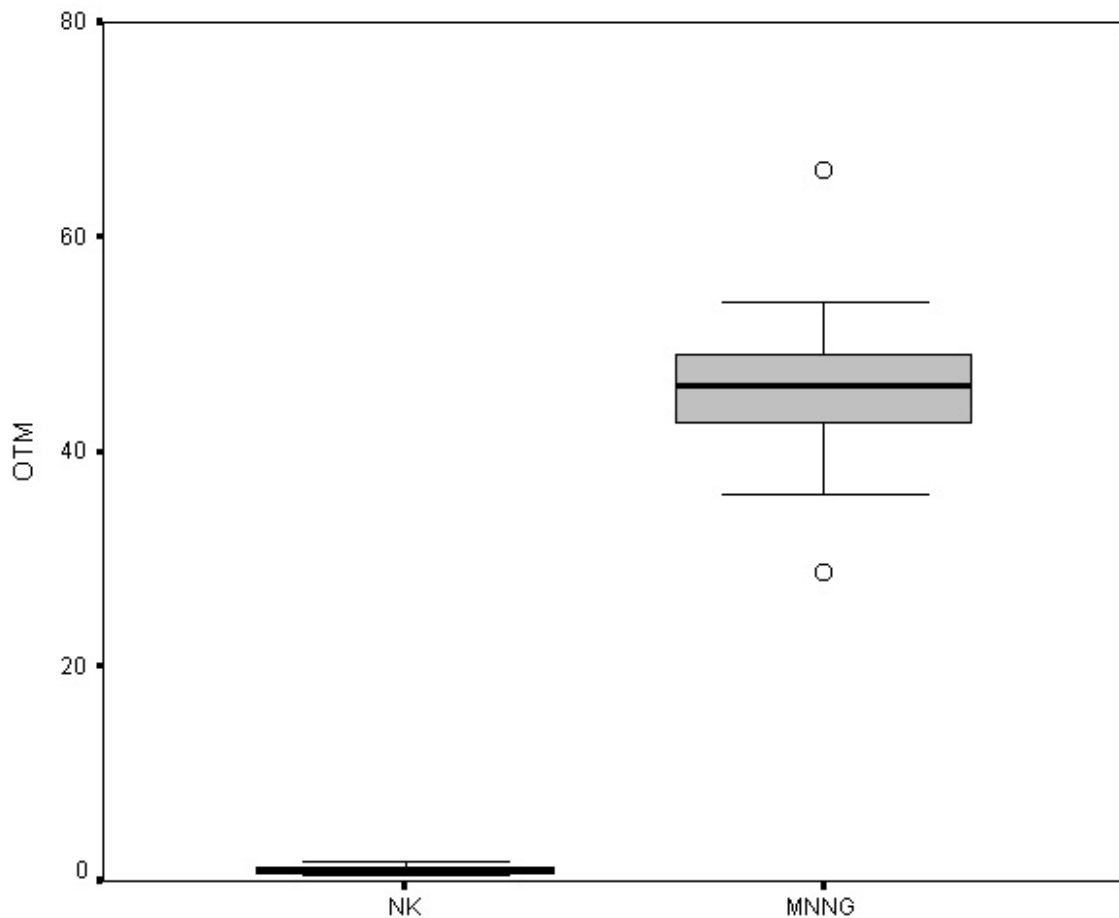


Abbildung 3.9: DNA-Schädigung durch MNNG in Lymphozyten

x-Achse: Darstellung der Testsubstanzen mittels Boxplot. NK: Aqua bidest. als Negativkontrolle (n = 20), MNNG: *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (n = 17), ○: Ausreisserwert

y-Achse: OTM: *Olive Tail Moment* als quantitatives Maß der DNA- Schädigung

3.2.3 Vergleich der DNA-Schädigung der Testsubstanzen hinsichtlich der Herkunft und der Dignität der Grunderkrankung

Die Ergebnisse der Versuche mit Lymphozyten konnten nach der Dignität der Grunderkrankung des Zellspenders gruppiert werden. Mit dem Mann-Whitney-U-Test wurde nachgewiesen, dass sich die OTM-Werte jener Versuche, bei denen die Zellen von Patienten mit maligner Grunderkrankung stammten, nicht signifikant von den OTM-Werten bei Patienten mit benigner Erkrankung unterschieden. Tabelle 3.8 zeigt die Ergebnisse des Tests.

Tabelle 3.8: Ergebnisse des Vergleichs benigne vs. maligne Grunderkrankung

Testsubstanz	Dignität	Anzahl	p-Wert
NK	benigne	7	0,222
	maligne	10	
EtOH	benigne	7	0,97
	maligne	10	
ZnCl	benigne	7	0,97
	maligne	10	
NiSO	benigne	7	0,19
	maligne	10	
CdSO	benigne	7	0,51
	maligne	10	
Cr	benigne	7	0,733
	maligne	10	
Cr+EtOH	benigne	7	0,143
	maligne	10	
Cr+ZnCl	benigne	7	0,329
	maligne	10	
Cr+NiSO	benigne	5	1,000
	maligne	10	

Testsubstanz	Dignität	Anzahl	p-Wert
Cr+CdSO	benigne	7	0,495
	maligne	10	
MNNG	benigne	7	0,749
	maligne	10	

NK: Aqua bidest. als Negativkontrolle, EtOH: Ethanol, ZnCl: Zinkchlorid, NiSO: Nickelsulfat, CdSO: Cadmiumsulfat, Cr: Natriumdichromat, Cr+EtOH: Natriumdichromat mit Ethanol, Cr+ZnCl: Natriumdichromat mit Zinkchlorid, Cr+NiSO: Natriumdichromat mit Nickelsulfat, Cr+CdSO: Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat

3.2.4 Vergleich der OTM-Werte von Speicheldrüsen- und Lymphozytenversuchen

3.2.4.1 Durchschnittswerte und Mediane

Tabelle 3.9 vergleicht die Mediane mit den Durchschnittswerten der Speicheldrüsen- und Lymphozytenversuche.

Tabelle 3.9: Durchschnittswerte und Mediane

Testsubstanz	Speicheldrüsenzellen		Lymphozyten	
	OTM		OTM	
	Median	Mittelwert	Median	Mittelwert
Aqua bidest.	1,0	1,0	1,1	1,1
Ethanol	1,2	1,5	1,2	1,3
Zinkchlorid	1,3	1,4	1,1	1,3
Nickelsulfat	1,2	1,3	1,2	1,4
Cadmiumsulfat	1,4	1,6	1,5	1,8
Natriumdichromat	9,2	8,9	10,0	10,6
Natriumdichromat & Ethanol	9,3	8,6	10,3	10,6
Natriumdichromat & Zinkchlorid	9,5	10,1	10,9	11,8
Natriumdichromat & Nickelsulfat	9,2	9,3	10,7	10,9
Natriumdichromat & Cadmiumsulfat	18,2	18,5	19,2	19,5
MNNG	35,1	36,8	46,1	46,2

Die Substanzen schädigen die DNA der Speicheldrüsenzellen und der Lymphozyten in vergleichbarem Ausmaß. Hervorzuheben sind die signifikant unterschiedlichen DNA-Schädigungen von Lymphozyten durch Natriumdichromat in Kombination mit Nickelsulfat

im Vergleich zu Natriumdichromat alleine. Dies konnte bei den Speicheldrüsenzellen nicht gezeigt werden.

3.2.5 Reparaturversuche

Nachdem sich gezeigt hat, dass der Zusatz von Cadmiumsulfat zu Natriumdichromat nahezu zu einer Verdoppelung des *Olive Tail Moments* führte, stellte sich die Frage, auf welche Weise die beiden Substanzen interagierten. Die verfügbare Literatur wies auf eine Inhibition der zelluläre DNA-Reparatur durch Cadmium (II) hin. Insgesamt sechs Versuchsansätze sollten zeigen, wann, wie und in welchem Ausmaß Cadmium (II) die Natriumdichromat-induzierte DNA-Fragmentierung beeinflusste:

Zwei Ansätze dienten zur Bestimmung der DNA-Schädigung von Natriumdichromat ohne bzw. in Kombination mit Cadmiumsulfat in Speicheldrüsenzellen. Die Zellen wurden mit den Testsubstanzen für 60 Minuten inkubiert. In zwei weiteren Ansätzen wurde die Reparaturfähigkeit der Zellen getestet. Dazu wurden die Zellen nach initialer Inkubation mit Natriumdichromat bzw. Natriumdichromat und Cadmiumsulfat weitere 60 Minuten im Joklikmedium inkubiert. Um den Einfluss von Cadmiumsulfat auf die Reparatur der Zellen bewerten zu können, wurden zu einem Ansatz nach einstündiger Inkubation mit Natriumdichromat, für die sich anschließende 60 minütige Reparaturphase Cadmiumsulfat, zugegeben. In einem letzten Ansatz wurden die Zellen eine Stunde mit Natriumdichromat in Kombination mit Cadmiumsulfat inkubiert und eine weitere Stunde mit nachträglichem Zusatz von Cadmiumsulfat. Abbildung 3.11 zeigt die Ergebnisse der Versuche mittels Boxplots. Die Mediane und Durchschnittswerte der einzelnen Ansätze gibt Tabelle 3.10 wieder.

Tabelle 3.10: Median und Durchschnittswerte der Reparaturversuche an Speicheldrüsenzellen

Testsubstanz	OTM		Anzahl
	Median	Mittelwert	
NK	0,8	0,9	5
Cr	10,3	9,9	5
Cr+CdSO	17,8	17,9	5
Cr (1h Rep.)	7,1	6,8	5
Cr+CdSO4 (1h Rep.)	20,1	19,3	5
Cr (1h Rep.+CdSO)	20,5	19,1	5
Cr+CdSO (1h Rep.+CdSO)	27,6	31,7	5

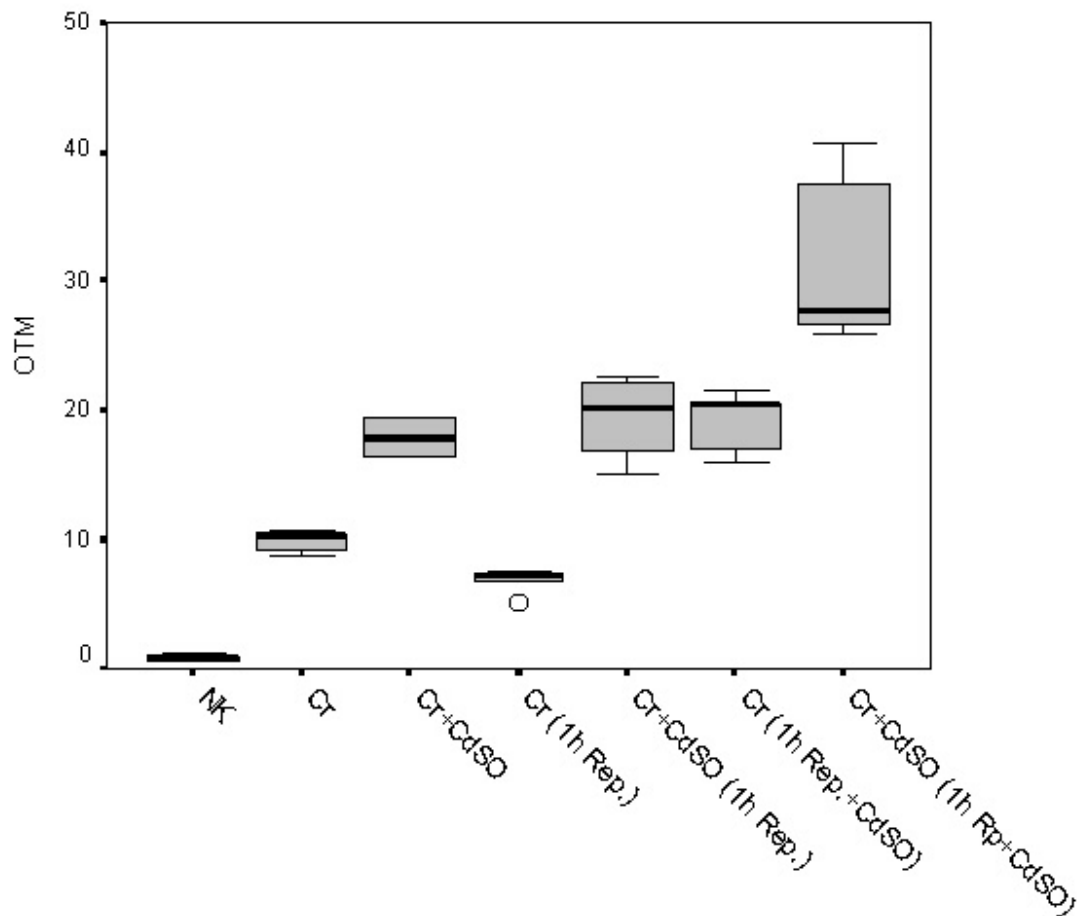


Abbildung 3.11: DNA-Schädigung von Natriumdichromat in Kombination von Cadmiumsulfat in Speicheldrüsenzellen

x-Achse: Darstellung der Testsubstanzen mittels Boxplot. NK: Aqua bidest. als Negativkontrolle (n = 5), Cr: Natriumdichromat (einstündige Inkubation, n = 5), Cr+CdSO: Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat (einstündige Inkubation, n = 5), Cr (1h Rep.): Natriumdichromat (einstündige Inkubation mit anschließender einstündiger Reparaturphase, n = 5), Cr+CdSO (1h Rep.): Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat (einstündige Inkubation mit anschließender einstündiger Reparaturphase, n = 5), Cr (+CdSO): Natriumdichromat (einstündige Inkubation mit anschließender einstündiger Reparaturphase mit Zusatz von Cadmiumsulfat; n = 5), Cr+CdSO (+CdSO): Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat (einstündige Inkubation mit anschließender einstündiger Reparaturphase mit Zusatz von Cadmiumsulfat; n = 5)

y-Achse: OTM: Olive Tail Moment als quantitatives Maß der DNA-Schädigung

Die Schädigung von Natriumdichromat, sowie aller Stoffkombinationen ist im Vergleich zur Negativkontrolle mit $p < 0,043$ signifikant. Tabelle 3.11 zeigt die Ergebnisse weiterer Signifikanztests.

Tabelle 3.11: Ergebnisse der Signifikanztests

Testpaarung	p-Werte
(1) Cr+CdSO vs. Cr	0,043
(2) Cr (1h Rep.) vs. Cr	0,043
(3) Cr+CdSO (1h Rep.) vs. Cr+CdSO	0,225
(4) Cr (1h Rep.+CdSO) vs. Cr	0,043
(5) Cr+CdSO (1h Rep.+CdSO) vs. Cr+CdSO	0,043
(6) Cr+CdSO (1h Rep.+CdSO) vs. Cr+CdSO (1h Rep.)	0,080

Signifikanz-Niveau nach Bonferroni-Korrektur: 0,0083

Nach Bonferroni-Korrektur wurde das Signifikanz-Niveau auf $p \leq 0,0083$ erniedrigt. Aufgrund dieser Korrektur kann für keine der Testpaarungen eine signifikante Aussage getroffen werden. Dennoch können die Resultate wie folgt beschrieben werden.

- (1) Die Kombination von Natriumdichromat mit Cadmiumsulfat führt zu einer sehr viel höheren Schädigung als Natriumdichromat alleine.
- (2) Die Schädigung der Zellen nimmt durch eine einstündige Reparaturphase nach Inkubation mit Natriumdichromat gegenüber der initialen Schädigung durch Inkubation mit Natriumdichromat deutlich ab.
- (3) Die Schädigung der Zellen nach Inkubation mit der Metallkombination nimmt nach einstündiger Reparaturphase gegenüber der Initialschädigung nicht ab, sondern steigt weiter an.
- (4) Wird dem Ansatz nach einstündiger Inkubation mit Natriumdichromat für eine weitere 60-minütige Inkubation Cadmiumsulfat hinzugefügt, nimmt die Schädigung gegenüber der Initialschädigung deutlich zu.
- (5) Wird dem Ansatz nach einstündiger Inkubation mit der Metallkombination noch einmal Cadmiumsulfat zugefügt, so führt das zu einer weiteren Zunahme der Schädigung gegenüber der Ausgangsschädigung durch die Stoffkombination.
- (6) Die negativen Auswirkungen auf die Schädigung der Zellen durch Cadmiumsulfat während der 60 Minuten Reparaturphase (3) läßt sich durch den wiederholten Zusatz von Cadmiumsulfat während der Reparatur nochmals deutlich steigern.

4 Diskussion und Zusammenfassung

4.1 Diskussion der Testsubstanzen

4.1.1 Zink (II)

4.1.1.1 Physiologische Bedeutung und Metabolismus

Der Körper eines erwachsenen Menschen enthält in etwa 1,5-2,5 g Zink. Es ist gleichmäßig im Körper verteilt und hat keinen spezifischen Speicher im Organismus. Zink wird über die Nahrung aufgenommen und erfüllt als Spurenelement eine Reihe physiologischer Funktionen. So benötigen mehr als 300 Enzyme des menschlichen Organismus Zink um ihre Funktion optimal zu erfüllen. Daneben ist es zur Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion biologischer Membranen unerlässlich. Es wird benötigt, um die Struktur von DNA, RNA und Ribosomen zu stabilisieren, und spielt als Bestandteil zinkhaltiger Transkriptionsfaktoren eine Rolle bei der Expression von Genen [Wolfram, 2001].

4.1.1.2 Kanzerogenese

Das DNA-fragmentierende Potential von Zink (II) untersuchten Thompson et al. 1989. Die Gruppe entdeckte, dass es bei der Behandlung von Salmonellenstämmen mit Zink-2,4-pentanedion zu Mutationen infolge der Verschiebung des Leserasters kam. Dies ist die Folge einer Baseninsertion und/oder -deletion in der ursprünglichen Basensequenz. Das ließe sich dadurch erklären, dass Zinkchlorid ein starker Inhibitor der DNA-Ligase I ist, die bei der DNA-Replikation während der Zellteilung benötigt wird [Yang et al., 1996]. Der erbgutschädigende Effekt von Zinksulfat wurde an Mäusen getestet: Ihnen wurde die Substanz in verschiedenen Konzentrationen mit dem Trinkwasser zugeführt. Nach unterschiedlich langen Zeiträumen wurden dann periphere Leukozyten isoliert. Nach der alkalischen Mikrogelelektrophorese stellte sich heraus, dass Zink (II) signifikante DNA-Schäden im Sinne von Einzelstrangbrüchen setzte [Banu et al., 2001]. Die *in vitro* Behandlung von humanen peripheren Leukozyten mit Zinkchlorid führte zur Abnahme der Zellteilungsfrequenz, zu Chromosomenbrüchen und anderen Zellschäden [Santra et al., 2000]. Neben den DNA-schädigenden Effekten verschiedener Zinksalze wurden auch genprotektive Wirkungen von Zink (II) untersucht. Es scheint eine große Rolle beim Schutz der Zellen gegenüber oxidativem Stress zu spielen: Die zinkarme Diät von Mäusen führte zu verstärkter Lipidoxidation und DNA-Fragmentation, zu einem erhöhten Glutathionverbrauch und vermehrter Bildung von Sauerstoffradikalen in den Zellen von Leber und Hirn [Bagchi et al., 1998]. Der Schutz vor oxidativen Zellschäden durch Zink (II) scheint aber von der intrazellulären Konzentration abzuhängen. Zum einen führten hohe Zinkkonzentration in den Zellen zu einer Verstärkung der oxidativen DNA-Schäden und zum nachfolgenden Zelltod.

Zum anderen legen Versuche nahe, dass Zink (II) die Expression von Metallothioneinen induziert und auf diesem Weg vor oxidativen Schäden schützt [Chimienti et al., 2001]. Dieser Auffassung widersprechen allerdings Müller et al. 1991. Ihre Untersuchungen ergaben, dass Zink (II) oder Cadmium (II), komplexiert durch Metallothioneine, zu DNA-Strangbrüchen führen. Diese zufälligen Strangbrüche, die nicht an bestimmten Basensequenzen stattfinden, können aufgrund der Bindung zwischen den Schwermetallen und dem Protein, oder durch verbleibende SH-Gruppen des Proteins entstanden sein. Dieselbe Forschergruppe präziserte ihre Ergebnisse 1994, als sie durch Untersuchungen mit Radikalfängern und Elektron-Spin-Resonanz-Spektroskopie auf freie Radikale als Mediatoren des DNA-Schadens stießen. Sie erwähnen aber auch, dass, je nach Einfluss verschiedener Parameter im intra- und extrazellulären Milieu, die protektive oder schädliche Aktivität der Zink-Metallothionein-Komplexe variierte.

4.1.1.3 Eigene Ergebnisse und Schlußfolgerung

Zink (II) führte in unseren Versuchen zu keiner nennenswerten DNA-Schädigung, weder bei Speicheldrüsenzellen, noch bei Lymphozyten. Es induzierte weder direkte DNA-Strangbrüche, noch kam es durch Zink (II) zu indirekten DNA-Schäden im Sinne einer Reparaturinhibition oder der Induktion alkalilabiler Stellen. Das Metall hatte daneben bei beiden Zellarten keinen darstellbaren Einfluss auf die Chrom-induzierte Schädigung. Chrom (VI) führt unter anderem zu oxidativen DNA-Schäden, die im Experiment durch Antioxidantien verringert werden konnten [Blasiak et al., 2000 (A)]. Zink (II), das über eine gesteigerte Metallothionein-Synthese in anderen Versuchen eine protektive Wirkung entfaltete, schützte die Zellen in unseren Versuchen nicht vor oxidativen Schäden.

4.1.2 Nickel (II)

4.1.2.1 Physiologische Bedeutung und Metabolismus

Nickel gehört zu den möglicherweise essentiellen Spurenelementen und ist in allen Geweben des menschlichen Körpers nachweisbar [Wolfram, 2001]. Ein Erwachsener nimmt in etwa 0,5 mg Nickel pro Tag auf [Dekant, 2001], den Hauptteil mit der Nahrung und etwa 22 % mit dem Trinkwasser. Im Magen-Darm-Trakt werden weniger als 15 % des Nickels resorbiert [WHO, 1991], der größte Teil wird also ausgeschieden.

4.1.2.2 Kanzerogenese

Die krebserzeugende Wirkung von Nickel (II) gilt als bewiesen. Es ist als Karzinogen der Gruppe I von der International Agency on Research on Cancer klassifiziert [IARC, 1990 (A)]. Erste Vermutungen ergaben sich aufgrund auffällig häufiger Krebserkrankungen unter

Nickel-Arbeitern in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts. 1980 wurde in Deutschland eine Studie gestartet, die 1213 Bogenschweißer umfasste, welche berufsbedingt Nickel- und Chromdämpfe inhalierten. Bei der letzten Follow-Up-Studie, die den Zeitraum von 1989 bis 1995 umfasste, bestätigte sich, dass die Arbeiter eine signifikant erhöhte Krebsmortalität gegenüber der Normalbevölkerung und Kontrollgruppe haben. Es traten gehäuft Krebserkrankungen des Respirationstraktes und der Lunge auf. Jedoch konnte als Ursache für die Fälle von Lungenkrebs eine Asbestbelastung nicht ausgeschlossen werden [Becker, 1999]. Experimentell konnte gezeigt werden, dass Nickel (II) in Form von Nickelsubdisulfid ($\alpha\text{-Ni}_3\text{S}_2$) in menschlichen Lungenfibroblasten DNA-Strangbrüche hervorruft [Zhuang et al., 1996]. Dieselbe Zellart inkubierten Seoane et al. 2000 mit Nickel (II) in Form von Nickelchlorid (NiCl_2) und Nickelsulfat (NiSO_4). Beide Substanzen produzierten Chromosomenbrüche. Als wahrscheinlichster Mechanismus, der diese direkten DNA-Schäden verursacht, wurde in einem Rückblick auf mehrere Studien die Formation freier Sauerstoffradikale diskutiert [Sunderman, 1993]. An Ratten-Lymphozyten getestet, verursachten Nickelsubdisulfid und Nickelsulfat Kreuzverbindungen zwischen Proteinen und DNA und führten so zu einer „fixen“ Veränderung des DNA-Moleküls [Chakrabarti et al., 2001]. Neben diesen direkten DNA-fragmentierenden Wirkungen von Nickel (II), gibt es viele Hinweise auf die Hemmung der DNA-Exzisionsreparatur durch Nickel (II). Es inaktivierte das XPA-Protein, ein Enzym, das bei der Reparatur UV-Licht-induzierter DNA-Schäden eine Rolle spielt [Asmuss et al., 2000 (A)].

4.1.2.3 Eigene Ergebnisse und Schlußfolgerung

Weder Speicheldrüsenzellen noch Lymphozyten wurden in unseren Versuchen durch Nickelsulfat relevant geschädigt. In früheren Untersuchungen führte Nickel (II) direkt zu DNA-Strangbrüchen und Chromosomenbrüchen. Dies konnte hier nicht bestätigt werden. Auch indirekte Erbgutschäden infolge der Verstärkung der Chrom(VI)- induzierten DNA-Schädigung durch Nickel (II) konnten nicht gezeigt werden. Es gab keine Hinweise darauf, dass Nickel (II) einen nennenswerten Einfluss auf die enzymatische DNA-Reparatur hat. Mögliche Erklärung dafür, dass Nickel (II) keine DNA-schädigende Wirkungen entfaltetete, könnte eine zu kurze Inkubationzeit sein. Nickel (II) führte in der Studie von Seoane et al. (2001) erst nach 24-26 Stunden zu Chromosomenbrüchen. Während der Versuche von Zhuang et al. (1996) wurden die Zellen vier Stunden inkubiert. Nickel (II) hatte in unseren Versuchen keinen Einfluss auf die Chrom-induzierte DNA-Fragmentierung. Dies erscheint zunächst erstaunlich, da sich Nickel (II) sich als potenter Inhibitor der enzymatischen DNA-Reparatur herausgestellt hat [Hartwig, 1998]. Das Metall inhibiert das Schlüsselenzym der Nukleotid-Exzisions-Reparatur [Asmuss et al., 2000 (B)]. Wie jedoch Reynolds et al. 2004 zeigten, werden die Addukte, die Chrom (III) mit DNA-Phosphatgruppen bildet, mittels Nukleotid-Exzision repariert. Eine mögliche Erklärung dafür, dass Nickel (II) zu keiner

Erhöhung des gemessenen DNA-Schadens bei gemeinsamer Inkubation mit Natriumdichromat führte, wäre, dass die Chrom (III)-induzierten DNA-Addukte mit der alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese nicht zu detektieren sind. So wird vermutet, dass beispielsweise CrCl_3 eine nicht-verdrehende Läsion in Verbindung mit dem DNA-Rückgrat verursacht [Blankert et al., 2003]. Hinsichtlich der Reparatur oxidativer DNA-Läsionen mittels Basen-Exzision konnte gezeigt werden, dass Nickel (II) das Schlüsselenzym, die Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase, nicht inhibiert [Hartwig et al., 2002].

4.1.3 Cadmium (II)

4.1.3.1 Physiologische Bedeutung und Metabolismus

Cadmium zählt zu den möglicherweise essentiellen Spurenelementen. Cadmium liegt im Organismus überwiegend an Metallothioneine gebunden vor. Der Gesamtbestand an Cadmium im Organismus beträgt in etwa 30 mg [Petrides, 1990]. In den Nieren akkumuliert Cadmium bis zum 50. Lebensjahr, danach geht der Cadmiumgehalt der Nierenrinde wieder zurück [Dekant et al., 2001].

4.1.3.2 Kanzerogenese

Nichtraucher nehmen täglich zwischen 7 und 12 μg Cadmium mit Nahrung und Trinkwasser auf. Bei Rauchern kommen 0,1-0,2 μg Cadmium pro Zigarette zusätzlich hinzu. Cadmium wird über die Lunge weitaus besser resorbiert als über den Gastrointestinaltrakt, in dem es wahrscheinlich über Eisen- oder Kalziumcarrier in die Schleimhautzellen gelangt.

Cadmium wurde von der IARC als Karzinogen der Gruppe 1 klassifiziert [IARC, 1993]. Epidemiologische und experimentelle Studien stellen einen klaren Zusammenhang zwischen Cadmium-Exposition und Lungenkrebs her. Weniger eindeutig ist die Assoziation mit Prostatakrebs. Im Tierversuch führte die Inhalation von Cadmium zu Adenokarzinomen der Lunge, Ingestion und Injektion des Metalls rief Prostata Tumoren und andere Neoplasien hervor [Waalkes, 2000]. In humanen Prostataepithelzellen kam es nach Behandlung mit Cadmium zu maligner Transformation [Achanzar et al., 2001]. Bei der Erforschung des kanzerogenen Potentials von Cadmium (II) stieß man auf direkte und indirekte Wege der Tumorinduktion. Cadmium (II) greift die DNA direkt an: Durch Inkubation von humanen Leberzellen mit Cadmiumchlorid (CdCl_2) kam es zu einer dosis- und zeitabhängigen Zunahme des DNA-Schadens. Der Schaden nahm in den ersten 12 Stunden der Inkubation zu, worauf er in den folgenden 12 Stunden wieder abnahm. Dies ist dadurch zu erklären, dass es zur vermehrten Expression von Metallothioneinen kam, die nicht nur eine hohe Affinität zu Cadmium (II) aufweisen, sondern auch effektive Radikalfänger darstellen [Fatur et al., 2002]. Dass bei den Cadmium (II)-induzierten DNA-Schäden Sauerstoffradikale involviert sind, stellten mehrere Studien fest. Über die Bildung von Superoxidionen, Hydroxyl-Radikalen und

Wasserstoffperoxid rief Cadmium (II) erhöhte Lipidoxidation, DNA- und Membran-Schäden und Apoptose hervor [Stohs et al., 2001].

Indirekte Wege, auf denen Cadmium (II) die Krebsentstehung begünstigen könnte, stellen DNA-Reparatur-Inhibition, Beeinflussung von Enzymaktivitäten, Veränderungen der Gen-Regulation und Stimulation des Zellwachstums dar. Es konnte gezeigt werden, dass Cadmium(II)chlorid sowohl das XPA-, als auch das Fgp-Protein inhibiert. Beide sind DNA-Reparatur-Enzyme [Asmuss et al., 2000 (A)]. Cadmium (II) stimulierte in einer anderen Studie die Aktivität der Kalzium-abhängigen Endonuklease, die DNA-Strangbrüchen induziert [Lohmann et al., 1993]. Beyersmann et al. veröffentlichten 1997 in einer Studie eine Liste von Genen, deren Expression das Metall in unterschiedlichen Zelllinien zu verstärken vermochte. Darunter ist auch das p53-Tumorsuppressorgen. Anhand von Rattenchondrozyten konnte gezeigt werden, dass Cadmium (II) die DNA-Synthese und das Zellwachstum stimuliert [Zglinicki et al., 1992].

4.1.3.3 Eigene Ergebnisse und Schlussfolgerung

Cadmiumsulfat führte nach Inkubation mit Speicheldrüsenzellen und Lymphozyten zu keinem nennenswerten DNA-Schaden. Die Inkubation der Zellen mit der Stoffkombination aus Natriumdichromat und Cadmiumsulfat führte fast zu einer Verdoppelung der OTM-Werte gegenüber denen, die durch Natriumdichromat alleine hervorgerufen wurde. Diesen Resultaten wurde durch weitere Versuche an Speicheldrüsenzellen nachgegangen. Es stellte sich heraus, dass die Zellen in der Lage waren, die durch Natriumdichromat hervorgerufenen Schäden innerhalb einer einstündigen Reparaturphase deutlich zu vermindern. Die DNA-Fragmentierung, die durch die Kombination der beiden Metallverbindungen während einer einstündigen Inkubation entstanden, konnten die Zellen in nachfolgenden Reparaturphase von einer Stunde hingegen nicht vermindern. Dies könnte daraufhinweisen, dass Cadmiumsulfat zu einer lang anhaltenden Inhibierung der enzymatischen DNA-Reparatur schon während der einstündigen Inkubation in der Lage ist, da vor der folgenden Reparaturphase die Metalle aus dem Medium herausgewaschen wurden. Darüber hinaus konnte der verstärkende Effekt auch dann hervorgerufen werden, wenn erst nach der Inkubation der Zellen mit Natriumdichromat dem Medium das Cadmiumsulfat während der folgenden einstündigen Reparatur zugesetzt wurde. Schließlich konnte das Ausmaß der DNA-Schädigung zusätzlich gesteigert werden, wenn nach initialer Inkubation der Zellen mit der Metallkombination während der folgenden einstündigen Reparatur ein weiteres Mal Cadmiumsulfat zugesetzt wurde.

Aus diesen Ergebnissen könnten sich zwei Schlüsse ergeben. Zum einen scheint Cadmium (II) einen inhibierenden Einfluss auf die DNA-Reparatur zu haben. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, dass Cadmium (II) in der Lage ist, die DNA-Reparaturvorgänge, die infolge der Natriumdichromat-induzierten DNA-Fragmentierung einsetzen, nachhaltig zu inhibieren. Dies könnte in erster Linie die DNA-Ligase III und die

Poly(ADP-Ribose)-Polymerase betreffen. Die beiden Zinkfingerproteine katalysieren in Säugetierzellen entscheidenden Schritte bei der Basenexzisionsreparatur bzw. bei der Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen [Tomkinson et al., 2001]. Cadmium (II) interagiert mit Zinkfingerproteinen indem es an die Stelle von Zink in diesen Domänen tritt. Auf diese Weise inhibiert es auch die Formamidopyrimidin-DNA-Glycosylase (Fpg-Protein), ein weiteres Protein der Basenexzisionsreparatur. Es konnte gezeigt werden, dass bei gleichzeitiger Inkubation mit Cadmium (II) und Zink (II) das Fpg-Protein in weit kleinerem Ausmaß gehemmt wurde als bei Inkubation mit Cadmium (II) alleine. Wurde das Enzyme zuerst mit Cadmium (II) inkubiert und in einer anschließenden Phase mit Zink (II), konnte die Fpg-Inaktivierung durch Cadmium (II) nicht rückgängig gemacht werden [Asmuss et al., 2000 (A)/(B)].

Zum anderen muss Cadmium (II) einen direkt verstärkenden Einfluss auf die durch Natriumdichromat hervorgerufenen DNA-Schäden haben. Es erscheint unwahrscheinlich, dass es allein durch Inhibierung der DNA-Reparaturmechanismen beinahe zu einer Verdopplung der OTM-Werte kommt, da die Zellen binnen einer Stunde unbeeinflusster Reparatur lediglich in der Lage waren, die OTM-Werte etwa 30 % zu reduzieren. Durch seine Affinität zu Glutathion und Metallothioneinen kommt es durch Cadmium (II) zu einer Herabsetzung des Schutzpotentials der Zellen vor Oxidantien [Rossman et al., 1992; Potts et al., 2001]. Bei der *in vivo*-Reduktion von Chrom (VI) zu Chrom (III) entstehen Oxidantien [Blasiak et al., 2000 (A)]. Es ist naheliegend, dass die oxidativen DNA-Schäden durch hexavalentes Chromat in Anwesenheit von Cadmium (II) zunehmen. In der Untersuchung von Wätjen et al. (2002) zeigte Cadmium (II) u.a. in C6 Gliomzellen von Ratten eine Vielzahl DNA-schädigender Wirkungen, die zur Apoptose von 50 % der Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit 0,7 µM Cadmiumchlorid führte. Dies konnte für drei der insgesamt acht untersuchten Zelllinien nachgewiesen werden. Cadmium (II) gilt als Modulator multipler zellulärer Signaltransduktionswege. Es beeinflusst sowohl Proteinkinasen und Phosphatasen, als auch den Metabolismus von second messengern wie cGMP [Beyersmann et al., 1997].

4.1.4 Chrom (VI)

4.1.4.1 Physiologische Bedeutung und Metabolismus

Chrom ist als essentieller Nahrungsbestandteil für den Zucker- und Fettmetabolismus umstritten [Anderson, 1997; Stearns, 2000]. Die Deutsche Gesellschaft für Ernährung e.V. empfiehlt dennoch eine tägliche Aufnahme für Erwachsene von 30 bis 100 µg über chromhaltige Nahrungsmittel wie Linsen oder Vollkornbrot⁴. Hexavalentes Chrom wird nach oraler Aufnahme zu über 99,7 % im Gastrointestinalum zu Chrom (III) reduziert, bevor es in

⁴ Quelle: "Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr"; Hrgs: DGE; 1. Auflage 2000, Umschau/ Braus Verlag

den Blutstrom gelangt. Dort liegt es als organischer Komplex vor, der über den Urin ausgeschieden wird [Kerger et al., 1997].

4.1.4.2 Kanzerogenese

Die International Agency for Research on Cancer klassifizierte Chrom (VI) als Karzinogen der Gruppe 1. Es fanden sich ausreichende epidemiologische Beweise für die krebserzeugende Wirkung von Chrom (VI)-Verbindungen, wie sie in der Industrie beispielsweise als Farbpigmente verwendet werden. Die Organisation beurteilte dagegen die Daten, die Chrom (III) und metallisches Chrom betrafen, als unzureichend, um die Substanzen als krebserregend zu klassifizieren. Sie gelten als Karzinogene der Gruppe 3, also als möglicherweise aber nicht eindeutig kanzerogen [IARC, 1990 (B)]. Ausschlaggebend für die kanzerogene Wirkung des hexavalenten Chroms scheint unter anderem die Art der Aufnahme zu sein. In einer rückblickenden Studie wurde festgestellt, dass der Zusammenhang zwischen arbeitsplatzbedingter Inhalation von Chrom (VI) und einer erhöhten Rate von Lungentumoren statistisch erwiesen ist. Eine Verbindung zwischen erhöhten Inzidenzen von Tumoren des Verdauungstraktes und oral aufgenommenem Chrom (VI) konnte jedoch nicht bewiesen werden [Proctor et al., 2002]. Ursache hierfür könnte sein, dass die Zellen des Magen-Darm-Traktes nur schlechter in der Lage sind, das hexavalente zu trivalentem Chrom zu reduzieren.

Die DNA-fragmentierenden Wirkungen von Chrom (VI) kommen über mindestens zwei Interaktionen mit der DNA zustande: Zunächst entstehen bei der *in vivo*-Reduktion von Chrom (VI) reaktive Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid, was zu oxidativen DNA-Schäden führt. Das Ausmaß dieser Schäden konnte durch Zusatz von Vitamin C und Katalase in verschiedenen Ansätzen reduziert werden. Vitamin C, ein Antioxidans, verhinderte teilweise DNA-Strangbrüche und die Entstehung alkalilabiler Stellen bzw. die Formation von DNA-Kreuzverbindungen. Katalase, das Enzym, das Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff abbaut, konnte die DNA-Schädigung ebenfalls verringern. Zu einer Zunahme der DNA-Schäden kam es durch Zugabe von Endonuklease III [Blasiak et al., 2000 (A)]. Das Enzym der Nukleotid-Exzisions-Reparatur erkennt oxidierte Pyrimidine und induziert an diesen Stellen Einzelstrangbrüche [Voet et al., 1995]. Liu et al. fanden 2001 (A) heraus, dass bei der *in vivo*-Reduktion von Chrom (VI) zunächst Chrom (V) entsteht. Dieses intermediär entstehende Produkt führte in ihren Versuchen zur Bildung freier Radikale. Dieselbe Forschergruppe konnte weiterhin zeigen, dass Chrom (VI) in humanen Epithelzellen der Lunge die Aktivierung der nukleären Transkriptionsfaktoren NF- κ B und p53, die Entstehung von DNA-Schäden, die Induktion der Zell-Apoptose sowie eine Inhibierung der Zell-Proliferation hervorrief [Liu et al., 2001 (B)].

Neben den oxidativen Schäden wird das Genom weiter durch die Einwirkung von Chrom (III) geschädigt. Die Diskriminierung der Chrom (VI)- von den Chrom (III)-induzierten Schäden

ist schwierig, da trivalentes Chrom im Gegensatz zu hexavalentem Chrom nur schwer in die Zelle gelangt. Deshalb fällt die Unterscheidung schwer, welche Schäden durch Chrom (III) alleine gesetzt wurden und welche zusätzlich im Verlauf der zellulären Reduktion von Chrom (VI) entstanden sind. Es konnte gezeigt werden, dass Chrom (VI) bei physiologischen pH nicht mit DNA reagiert, während durch die Reduktion zu Chrom (III) DNA-Schäden entstehen. Die eingehende Untersuchung der entstandenen DNA-Addukte wiesen darauf hin, dass nicht-oxidative Chrom(III)-abhängige Reaktionen sowohl für die mutagenen, als auch für die Replikation-blockierenden DNA-Läsionen durch Chrom(VI) in menschlichen Fibroblasten verantwortlich waren [Zhitkovich et al., 2002]. Qi et al. (2000) kommen zu einem anderen Ergebnis. Deren Untersuchung zufolge setzte Chrom (III) einer Fenton-Reaktion ähnlich oxidative Schäden, die durch verschiedene Radikalfänger wie Ascorbinsäure oder Vitamin E fast gänzlich verhindert werden konnten. Die beiden zuletzt zitierten Studien wurden an isolierter DNA durchgeführt.

4.1.4.3 Eigene Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die Inkubation der Speicheldrüsenzellen mit Natriumdichromat führte zu einem durchschnittlichen OTM-Wert von 8,9 (Median = 9,2). Dieser Wert lag bei den Lymphozyten bei 10,6 (Median = 10,0). In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Fähigkeit der Speicheldrüsenzellen getestet, die durch einstündige Inkubation mit Natriumdichromat entstandene DNA-Fragmentierung, in einer weiteren Stunde Inkubation im gereinigten Medium zu reparieren. Dabei verringerte sich der durchschnittliche OTM von initial 9,9 (Median = 10,3) auf 6,8 (Median = 7,1).

Man muss nach diesen Ergebnissen davon ausgehen, dass die intrazelluläre Reduktion von Chrom (VI) und das resultierende Chrom (III) in beiden Geweben zu einer beträchtlichen DNA-Schädigung führt. Die nach der Inkubation vitalen Zellen sind zum einen in der Lage, entstandene Schäden zu einem gewissen Grad zu reparieren. Zum anderen muss man schließen, dass die weiterhin teilungsfähigen Zellen maligne entarten können. Der epidemiologische Zusammenhang zwischen Chromexposition und Malignomen des Respirationstraktes konnte in zahlreichen Studien erwiesen werden [IARC, 1990 (B); Becker, 1991; Proctor et al., 2002]. Humane Magenschleimhautzellen, die mit Chrom (VI) inkubiert wurden, zeigten eine um ein Vielfaches höhere DNA-Schädigung als diejenigen in der Kontrollgruppe [Pool-Zobel et al., 1994; Blasiak et al., 1999]. Obwohl in epidemiologischen Studien kein statistisch gesicherter Zusammenhang zwischen Ingestion von Chrom (VI)-Verbindungen und Tumoren des Gastrointestinaltraktes hergestellt werden konnte [Proctor et al., 2002], muss man aufgrund unserer Ergebnisse den Verdacht äussern, dass von Natriumdichromat ein erhöhtes Risiko maligner Entartung für Speicheldrüsenewebe ausgeht. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Natriumdichromat bei kombinierter Inkubation mit Cadmiumsulfat zu deutlich höherer DNA-Schädigung führt als durch Natriumdichromat

alleine. Die durchschnittlichen OTM-Werte wurden mehr als verdoppelt. Dies könnte als weitere Hinweis auf den oxidativen Schädigungsmechanismus des Chrom (VI) im Natriumdichromat bei intrazellulärer Reduktion zu Chrom (III) gewertet werden.

4.1.5 Ethanol

4.1.5.1 Physiologische Bedeutung und Metabolismus

Ethanol gehört chemisch zu der Gruppe der Alkohole. Ethanol ist bei Raumtemperatur flüssig und aufgrund seiner hydrophilen Hydroxy-Gruppe vollständig in Wasser löslich.

Die Resorption von Ethanol nach oraler Aufnahme unterliegt starken Schwankungen. Die Menge des resorbierten Ethanols ist individuell stark unterschiedlich. Zudem zeigen sich deutliche Tagesschwankungen in der Resorption von Ethanol. Nach oraler Aufnahme des Alkohols beginnt sein Abbau schon in der Mundschleimhaut durch die Alkoholdehydrogenase (ADH). Das Enzym katalysiert die Oxidation von Ethanol zu Acetaldehyd (Ethanal) und konnte in Zellen des gesamten Gastrointestinaltrakts, der Lunge und Nieren nachgewiesen werden. Der größte Teil des aufgenommenen Ethanols wird in der Leber metabolisiert. In Hepatozyten steht neben der zytosolischen Alkoholdehydrogenase ein weiteres abbauendes Enzym, eine mikrosomale mischfunktionelle Oxygenase zur Verfügung. Acetaldehyd ist auch Endprodukt der durch dieses Enzym katalysierten Reaktion [Dekant et al., 2001].

4.1.5.2 Kanzerogenese

Die International Agency for Research on Cancer (IARC) hat alkoholische Getränke als Karzinogene der Gruppe 1 klassifiziert. Es fanden sich ausreichend Beweise für die Karzinogenität von alkoholischen Getränken in Menschen und eine Verbindung zwischen malignen Tumoren der Mundhöhle, des Pharynx und Larynx, der Speiseröhre und der Leber mit dem Konsum alkoholischer Getränke [IARC, 1988]. Der molekulare Mechanismus der Karzinogenese ist unklar. Die hierzu durchgeführten Studien kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. In den meisten *in vitro* durchgeführten Experimenten konnten keine direkten erbgutschädigenden Wirkungen für Ethanol gezeigt werden. Dagegen führte Ethanol *in vivo* in aller Regel zu DNA-Schäden. Dies lässt sich damit erklären, dass Ethanol *in vivo* zu Acetaldehyd abgebaut wird. Acetaldehyd ist laut IARC ein Karzinogen der Gruppe 2b, d.h. es gilt als möglicherweise krebserregend [IARC, 1999]. Es erwies sich in diversen Studien als mutagen und erbgutschädigend [Barry et al., 2001]. Interessanterweise finden sich zunehmend Hinweise auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem gehäuftem Auftreten von Karzinomen im oberen Verdauungstrakt bei der asiatischen Bevölkerung und der Tatsache, dass bei etwa der Hälfte dieser Population „untypische“ ADH-Isoenzyme vorkommen, die Alkohol sehr schnell zu Acetaldehyd metabolisieren [Dekant et al., 2001 und

Vakevainen et al., 2000]. Zur Entstehung des Acetaldehyds im oberen Aerodigestivtrakt, Gastrointestinaltrakt und in der Leber trägt dabei nicht nur der Metabolismus der Zellen dieser Organsysteme bei. Es fanden sich Hinweise, dass besonders in der Mundhöhle ein großer Teil des im Speichel enthaltenen Acetaldehyds aus dem Metabolismus von Hefen der Mundflora, vornehmlich von *Candida albicans* stammte [Tillonen et al., 1999]. Daneben gibt es Anzeichen, dass Acetaldehyd durch einen oxidativen enzymatischen Weg direkt in der Gl. parotis entstehen könnte [Vakevainen et al., 2000]. Denn neben dem Abbau durch ADH wird Ethanol zu einem geringen Anteil und besonders bei hohen Konzentrationen (ab etwa 3000 mg/l) durch das Cytochrom-P450-Isoenzym 2E1 (CYP2E1) in Mikrosomen zu Acetaldehyd metabolisiert. Dieser Stoffwechselweg ist im Gegensatz zum ADH-katalysierten Abbau auslösbar. Ein langjähriger hoher Alkoholkonsum führt zu einer bis zu 10-fachen CYP2E1-Induktion in der Leber [Dekant et al., 2001] und in anderen Zelltypen, beispielsweise in den bronchialen Epithelzellen [Runge et al., 2001] und den Zellen der Mundschleimhaut. Nieto et al. zeigten 2002, dass bei den CYP2E1-katalysierten Reaktionen reaktive Sauerstoffradikale entstehen, die in ihren Versuchen hepatische Sternzellen aktivierten und somit zur Entstehung einer Leberfibrose beitragen könnten [Nieto et al., 2002]. Die Sauerstoffradikale können daneben auch oxidative DNA-Schäden verursachen. So zeigte sich, dass Leberzellen, die CYP2E1 überexprimieren (HepG2 E47-Zellen) und durch Zugabe von CYP2E1-Substrat einem hohen oxidativen Stress ausgesetzt wurden, durch Prä-Inkubation mit Zink, das wie beschrieben antioxidative Effekte hat, geschützt werden konnten [Perez et al., 2003]. Auf der anderen Seite ist CYP2E1 bei der Metabolisierung von Chrom (VI) beteiligt. Zytotoxische Effekte von Chrom (VI) konnten experimentell durch CYP2E1-Inhibitoren vermindert werden [Pourahmad et al., 2001]. Neben Chrom (VI) werden eine Reihe anderer Xenobiotika durch das Cytochrom-P450-Isoenzym biologisch aktiviert [Meskar et al., 2001]. Dazu zählen unter anderem Tabakinhaltsstoffe wie Nitrosamine und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe. Für Nitrosamine konnte ein hohes DNA-schädigendes Potential nachgewiesen werden [Kleinsasser et al., 2000 und 2001].

4.1.5.3 Eigene Ergebnisse und Schlussfolgerung

Die Inkubation der Speicheldrüsenzellen mit Ethanol führte in unseren Versuchen nicht zu DNA-Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen oder inkompletter Exzisionsreparatur. Möglicherweise konnte durch die geringe Inkubationszeit bzw. einen Mangel an metabolischer Aktivität der ansonsten vitalen Zellen Ethanol nicht ausreichend in Acetaldehyd umgewandelt werden. Auch die Inkubation der Lymphozyten mit Ethanol zeigte keine DNA-fragmentierende Wirkung. Darüber hinaus beeinflusste der Zusatz von Ethanol während der Inkubation mit Natriumdichromat weder bei Speicheldrüsenzellen, noch bei Lymphozyten das Ausmaß der DNA-Schäden, die durch Natriumdichromat alleine hervorgerufen wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beim Ausmaß der

Schäden hinsichtlich des Alkoholkonsums der Gewebespende und der damit zu erwartenden Konzentration von CYP2E1 in den Zellen.

Für Ethanol konnten durch unsere Versuche mit der alkalischen Mikrogelelektrophorese keine erbgutschädigende Effekte nachgewiesen werden. Der genaue Mechanismus der durch epidemiologische Studien erwiesenen Kanzerogenität des Ethylalkohols konnte nicht weiter aufgeklärt werden.

4.2 Diskussion der statistischen Analyse

Die Wahl des statistischen Testverfahrens wurde mit Frau Dr. Schubert-Fritschle vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE) der Ludwig-Maximilians-Universität München abgestimmt. Zwei Testverfahren kamen in Frage: Zum einen der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben bzw. der Mann-Whitney-U-Test für zwei unverbundene Stichproben und die Varianzanalyse. Die Voraussetzung der Varianzanalyse - dem genaueren statistischen Test - ist die Normalverteilung der erhobenen OTM-Werte. Der einfachste Test auf Normalverteilung ist die Bildung des Quotienten von Mittelwert und Median, der zwischen 0,9 und 1,1 liegen muss. Diese Bedingung war für Cadmiumsulfat bei den Speicheldrüsenzellen und für Zinkchlorid, Nickel- und Cadmiumsulfat bei den Lymphozyten nicht gegeben. Um einheitliche Testverfahren anwenden zu können, wurde der Wilcoxon-Test bzw. der Mann-Whitney-U-Test gewählt. Aufgrund der multiplen Testung innerhalb der Gruppen, wurden zur Absicherung die Signifikanzniveaus der einzelnen Test nach dem Bonferroni-Verfahren korrigiert. D.h., das ursprüngliche Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ wurde durch die Anzahl der Tests innerhalb der Gruppen dividiert. Hinsichtlich der Schlußfolgerungen, die aus den Ergebnissen gezogen wurden, wären auch nach Testung mittels Varianzanalyse keine genaueren Aussagen möglich gewesen.

4.3 Zusammenfassung

Die Ätiologie von Speicheldrüsenmalignomen ist noch weitestgehend ungeklärt. Eine mögliche Rolle von Umweltschadstoffen wird diskutiert. In der vorliegenden Arbeit wird das DNA-fragmentierende Potential von verschiedenen Metallen und Ethanol analysiert. Als Testgewebe wurden Zellen von Kopfspeicheldrüsen gewählt, da sie durch Inhalation und Ingestion mit den ubiquitär vorkommenden Substanzen ständig in Kontakt kommen. Zur Quantifizierung der durch die Stoffe induzierten DNA-Schäden wurde die alkalische Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) gewählt. Der Comet Assay ist eine etablierte Methode zum Nachweis von Erbgutschäden im Sinne von DNA-Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen.

Die Empfindlichkeit von Speicheldrüsenzellen gegenüber den eingesetzten Substanzen wurde mit der von Lymphozyten verglichen. Lymphozyten wurden bereits in einer Vielzahl von Studien eingesetzt, die sich mit dem DNA-schädigenden Potential von Umweltstoffen beschäftigt haben.

Zinkchlorid, Nickelsulfat, Cadmiumsulfat, Natriumdichromat und Ethanol wurden jeweils isoliert getestet, um ihre DNA-schädigende Wirkung an Speicheldrüsenzellen darzustellen. Zusätzlich wurden die Substanzen in Kombination mit Natriumdichromat inkubiert, um hemmende oder promovierende Effekte zu detektieren. Es stellte sich heraus, dass Cadmiumsulfat durch Natriumdichromat verursachte DNA-Schäden zu potenzieren vermag. Um die Wirkungsweise von Cadmiumsulfat während der Inkubation der Zellen mit Natriumdichromat näher zu analysieren, wurden Cadmiumsulfat und Natriumdichromat gemeinsam inkubiert und anschließend Reparaturversuche mit und ohne Cadmiumzusatz durchgeführt. Deren Besonderheit lag darin, dass die Zellen die Möglichkeit hatten, die induzierten Schäden zu reparieren. Die Analyse der cadmiumspezifischen Auswirkungen weisen auf eine Hemmung der Reparatur der durch Natriumdichromat hervorgerufenen DNA-Schäden hin.

Wenngleich die Salze von Nickel und Cadmium von der International Agency for Research on Cancer (IARC) als Karzinogene der Gruppe 1, d.h. als sicher krebserregend klassifiziert wurden, ging in unserem Modell keine DNA-fragmentierende Wirkung von Nickelsulfat bzw. Cadmiumsulfat in Speicheldrüsenzellen aus. Dasselbe gilt für Zink im Zinkchlorid, das jedoch auch von der IARC als nicht karzinogen angesehen wird.

Auch Chrom (VI) im Chromat wird von der IARC als Kanzerogen der Gruppe 1 klassifiziert. Die durch Natriumdichromat induzierten DNA-Schäden sowohl in Speicheldrüsenzellen als auch in Lymphozyten bestätigen dies und machen deutlich, dass von einem erhöhten Krebsrisiko für die Speicheldrüsen bei Exposition gegenüber Chrom (VI) im Chromat ausgegangen werden muss.

Daneben konnte gezeigt werden, dass Cadmium (II) die Reparatur von DNA-Schäden hervorgerufen durch Natriumdichromat hemmt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit tritt Cadmium (II) in der DNA-bindenden Domäne der Formamido-DNA-Glycosylase (Fgp) an die Stelle von Zink (II) und inhibiert so das Schlüsselenzym der Basen-Exzisions-Reparatur. Es konnte gezeigt werden, dass Cadmiumsulfat die von Natriumdichromat gesetzten DNA-Schäden nahezu verdoppelt. Verfügten die Zellen nach Inkubation mit Natriumdichromat über eine Reparaturkapazität, die die Schädigung etwa um ein Drittel reduzierte, wurde diese möglicherweise durch den Zusatz von Cadmium ausgeschaltet. Dabei spielte es keine Rolle, ob Cadmiumsulfat gleichzeitig mit Natriumdichromat oder nachträglich in der Reparaturphase hinzugefügt wurde.

Hinsichtlich des Alkohols kommt die IARC zu der Einschätzung, dass Ethanol als Reinsubstanz nicht als eindeutig kanzerogen angesehen werden kann, während alkoholische Getränke Gruppe 1-Karzinogene darstellen. Die Versuche zur DNA-fragmentierenden Wirkung von Ethanol in Speicheldrüsenzellen und Lymphozyten zeigen, dass Ethanol als Reinsubstanz in unserem Modell keine erbgutschädigenden Effekte aufweist.

Aus diesen Ergebnissen, die sich bei Speicheldrüsenzellen und Lymphozyten gleichermaßen ergaben, leitet sich ein deutlich erhöhtes Krebsrisiko für gegenüber Chrom (VI) und Cadmium (II) exponierte Personengruppen ab. Aufgrund des Vorkommens dieser Metalle in Arbeitsstoffen und Genussmitteln betrifft dies im besonderen Maße Arbeiter im Baugewerbe und in der Holzverarbeitenden Industrie sowie Raucher. Neben der Reduktion der getesteten Noxen sollten künftig weitere Arbeits- und Umweltschadstoffen an den Zielzellen der humanen Kanzerogenese getestet werden um ihr krebserregendes und erbgutschädigendes Potential für den Menschen und die zugrundeliegenden Pathomechanismen zu evaluieren. Darüber hinaus wird deutlich, dass eine abschließende Risikoabschätzung von Umweltstoffen eine Vielzahl an unterschiedlichen Testverfahren und den Einsatz verschiedener Gewebe erfordert.

5 Literatur

Achanzar WE, Diwan BA, Liu J, Quader ST, Webber MM und Waalkes MP: Cadmium-induced malignant transformation of human prostate epithelial cells. **Cancer Research, 2001; 61(2): 455-458.**

Anderson RA: Chromium as an Essential Nutrient for Humans [Record Supplied By Publisher]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP, 1997; 26(1): 35-41.**

Aoyagi K, Kohfuji K, Yano S, Murakami N, Hori H, Terasaki Y, Takeda J, Tanaka M und Shirouzu K: Morphological change in the MNNG-treated rat gastric mucosa. **Kurume Medical Journal, 2000; 47(1): 31-36.**

Asmuss M, Mullenders LHF, Eker A und Hartwig A: Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. **Carcinogenesis, 2000 (A); 21(11): 2097-2104.**

Asmuss M, Mullenders LHF, Hartwig A: Interference by toxic metal compounds with isolated zinc finger DNA repair proteins. **Toxicology Letters, 2000 (B); 112-113: 227-231.**

Atula T, Grenman R, Klemi P: Human papillomavirus, Epstein-Barr virus, human herpesvirus 8 and human cytomegalovirus involvement in salivary gland tumours. **Oral Oncology, 1998; 34(5): 391-395.**

Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ: Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. **Molecular and Cellular Biochemistry, 2001; 222: 149-158.**

Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Tran MX, Krohn RL, Ray SD und Stohs SJ: Protective effects of zinc salts on TPA-induced hepatic and brain lipid peroxidation, glutathion depletion, DNA damage and peritoneal macrophage activation in mice. **General Pharmacology, 1998; 30(1): 43-50.**

-
- Banu BS, Devi KD, Mahboob M und Jamil K:** In vivo genotoxic effect of zinc sulfate in mouse peripheral blood leukocytes using Comet assay. **Drug and Chemical Toxicology**, 2001; 24(1): 63-73.
- Barceloux DG:** Zinc. **Journal of Clinical Toxicology**, 1999 (A); 37(2): 279-292.
- Barceloux DG:** Nickel. **Journal of Clinical Toxicology**, 1999 (B); 37(2): 239-258.
- Barceloux DG:** Chromium. **Journal of Clinical Toxicology**, 1999 (C); 37(2): 173-194.
- Barry JP, Jenkinson P:** Is ethanol genotoxic? A review of the published data. **Mutagenesis**, 2001; 16(2): 91-101.
- Becker N:** Cancer mortality among arc welders exposed to fumes containing chromium and nickel. Results of a third follow-up: 1989-1995. **Journal of Occupational and Environmental Medicine / American College of Occupational and Environmental Medicine**, 1991; 41(4): 294-303.
- Beyersmann D, Hechtenberg S:** Cadmium, Gene Regulation, and Cellular Signalling in Mammalian Cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 1997; 144: 247-261.
- Blankert SA, Coryell VH, Picard BT, Wolf KK, Lomas RE und Stearns DM:** Characterization of nonmutagenic Cr(III)-DNA interactions. **Chemical Research in Toxicology**, 2003; 16(7):847-854.
- Blasiak J, Kowalik J:** A comparison of the in vitro genotoxicity of tri- and hexavalent chromium. **Mutation Research**, 2000 (A); 469: 135-145.
- Blasiak J, Trzeciak A, Malecka-Panas E, Drzewoski J und Wojewodzka M:** In vitro genotoxicity of ethanol and acetaldehyde in human lymphocytes and the gastrointestinal tract mucosa cells. **Toxicology in Vitro: An international journal published in association with BIBRA** , 2000 (B); 14(4): 287-295.
- Blasiak J, Trzeciak A, Malecka-Panas E, Drzewoski J, Iwanienko T, Szumiel I und Wojewodzka M:** DNA damage and repair in human lymphocytes and gastric mucosa cells exposed to chromium and curcumin. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, 1999; 19: 19-31.

-
- Böcker W, Höfler H, Denk H und Heitz PU:** Allgemeine Tumorpathologie, in: **Pathologie, 1. Auflage (Seite 161-199), Böcker/Denk/Heitz, Urban & Schwarzenberg, München/Wien/Baltimore, 1997.**
- Bunsekmeyer B, Bergmann KCh:** Nickelgehalt deutscher Nahrungsmitteln. **Allergo Journal: Interdisziplinäre Zeitschrift für Allergologie und Umweltmedizin: Organ der Deutschen Gesellschaft für Allergie- und Immunitätsforschung, 1998; 7: 419-424.**
- Chakrabarti SK, Chengjiang B, Kunnath SS:** DNA-Protein Crosslinks induced by Nickel compounds in isolated rat lymphocytes: Role of reactive oxygen species and specific amino acids. **Toxicology and Applied Pharmacology, 2001; 170: 153-165.**
- Chimienti F, Jourdan E, Favier A und Seve M:** Zinc resistance impairs sensitivity to oxidative stress in HeLa cells: Protection through metallothioneins expression. **Free Radical Biology and Medicine, 2001; 31(10): 1179-1190.**
- Dally H:** Einfluss von Nickel (II) und Cadmium (II) auf Induktion und Reparatur oxidativer DNA-Schäden in Säugerzellen. **Dissertation, vorgelegt der Fakultät für Biologie und Chemie der Universität Bremen, 1997.**
- Decker P, Cohen B, Butala JH und Gordon T:** Exposure to wood dust and heavy metals in workers using CCA pressure-treated wood. **AIHA journal : a journal for the science of occupational and environmental health and safety, 2002; 63(2):166-171.**
- Dekant W, Vamvakas S, Henschler D:** Wichtige Gifte und Vergiftungen, in: **Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage (Seite 1076-1087), Forth/Henschler/Rummel, Urban & Fischer, München/Jena, 2001.**
- El Azzouzi B, Tsangaris GT, Pellegrini O, Manuel Y, Benveniste J und Thomas Y:** Cadmium induces apoptosis in a human T cell line. **Toxicology, 1994; 88: 127-139.**
- Fang JL, Vaca CE:** Detection of DNA adducts of acetaldehyde in peripheral white blood cells of alcohol abusers. **Carcinogenesis, 1997; 18(4):627-632.**

Fatur T, Tusek M, Falnoga I, Scancar J, Lah TT und Filipic M: DNA damage and metallothionein synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposed to cadmium. **Food and chemical Toxicology, 2002; 40(8): 1069-1076.**

Fatur T, Lah TT, Filipic M: Cadmium inhibits repair of UV-, methyl methanesulfonate- and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells. **Mutation Research, 2003; 529(1-2): 109-116.**

Hartwig M: Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. **Toxicology Letters, 1998; 102-103: 234-239.**

Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, Herzer U, Kostelac D, Pelzer A, Schwerdtle T und Burkle A: Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. **Environmental Health Perspectives, 2002; 110 (5): 797-799.**

Harréus U, Schmezer P, Kuchenmeister F und Maier H: Genotoxische Wirkung auf menschliche Schleimhautbiopsien des oberen Aerodigestivtraktes. **Laryngorhinootologie, 1999; 78(4): 176-181.**

Horn-Ross PL, Ljung BM, Morrow M: Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. **Epidemiology, 1997; 8(4): 414-419.**

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Nickel and Nickel Compounds. **IARC, 1990 (A); 49: 257.**

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Cadmium and Cadmium Compounds. **IARC, 1993; 58: 119.**

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Chromium and Chromium Compounds. **IARC, 1990 (B); 49: 40.**

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Acetaldehyde. **IARC, 1999; 71: 319.**

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Alcohol Drinking. **IARC, 1988; 44: 35.**

-
- Kawanishi S, Inoue S, Yamamoto K:** Active oxygen species in DNA damage induced by carcinogenic metal compounds. **Environmental Health Perspectives, 1994; 102 (3): 17-20.**
- Kerger BD, Finley BL, Corbett GE, Dodge DG und Paustenbach DJ:** Ingestion of chromium(VI) in drinking water by human volunteers: absorption, distribution, and excretion of single and repeated doses. **Journal of Toxicology and Environmental Health, 1997; 50(1): 67-95.**
- Kleinsasser NH, Weissacher H, Kastenbauer ER, Dirschedl P, Wallner BC und Harréus UA:** Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology: Official journal of European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS): Affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology – Head and Neck Surgery, 2000; 257: 337-342 .**
- Kleinsasser NH, Wagner C, Wallner BC, Harréus UA und Kastenbauer ER:** Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients. **Mutation Research, 2001; 491: 151-161.**
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK und Harréus UA:** Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the comet assay. **Mutation Research, 2001; 467: 21-30.**
- Kuchenmeister F:** Die MGE: eine schnelle und sensitive Methode zum Nachweis von DNA-Schäden in Einzelzellen. **Diplomarbeit, vorgelegt der Fakultät für Biologie der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, 1991.**
- Lieber CS:** Microsomal ethanol-oxidizing system (MEOS): the first 30 years (1968-1998)- a review. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research, 1999; 23(6): 991-1007.**
- Liu KJ, Shi X:** *In vivo* reduction of chromium (VI) and its related free radical generation. **Molecular and Cellular Biochemistry, 2001 (A); 222: 41-47.**

-
- Liu KJ, Husler J, Jianping Y, Stephen SL, Cutler D, Chen F, Wang S, Zhang Z, Ding M, Wang L und Shi X:** On the mechanism of Cr (VI)-induced carcinogenesis: Dose dependence of uptake and cellular responses. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 2001 (B); 222: 221-229.
- Lohmann RD, Beyersmann D:** Cadmium and zinc mediated changes of the Ca-dependent endonuclease in apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 1993; 190: 1097-1103.
- Lopez-Ortal P, Souza V, Bucio L, Gonzalez E und Gutierrez-Ruiz C:** DNA damage produced by cadmium in human fetal hepatic cell line. **Mutation Research**, 1999; 439: 301-306.
- Lynn S, Yew FH, Chen KS, Jan KY:** Reactive Oxygen Species are involved in nickel inhibition of DNA repair. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 1997; 29: 208-216.
- Meskar A, Plee-Gautier E, Amet Y, Berthou F und Lucas D:** Alcohol-xenobiotic interactions. Role of cytochrome P450 2E1. **Pathologie-Biologie**, 2001; 49(9): 696-702.
- Mourón SA, Golijow CD, Fernando ND:** DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay. **Mutation Research**, 2001; 498: 47-55.
- Müller T, Schuckelt R, Jaenicke L:** Cadmium/zinc-metallothionein induces DNA strand breaks in vitro. **Archives of Toxicology**, 1991; 65: 20-26.
- Müller T, Schuckelt R, Jaenicke L:** Evidence for radical species as intermediates in cadmium/zinc-metallothionein-dependent DNA damage in vitro. **Environmental Health Perspectives**, 1994; 3: 27-29.
- Nieto N, Friedman SL, Cederbaum AI:** Stimulation and proliferation of primary rat hepatic stellate cells by cytochrome P450 2E1-derived reactive oxygen species. **Hepatology** , 2002; 35(1): 62-73.

-
- Olive PL, Banath JP:** Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. **Mutation Research, 1993; 294(3): 275-283.**
- Østling O, Johanson KJ:** Microgelelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications, 1984; 123(1): 291-298.**
- Perez MJ, Cederbaum AI:** Metallothionein 2A induction by zinc protects HEPG2 cells against CYP2E1-dependent toxicity. **Free Radical Biology & Medicine, 2003; 34(4): 443-455.**
- Petrides PE:** Spurenelemente, in: **Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage (Seite 623-645), Löffler/Petrides, Springer, Berlin/Heidelberg/New York, 1990 .**
- Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U, Schröder HG und Schmezer P:** Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. **Environmental and Molecular Mutagenesis, 1994; 24(1): 23-45.**
- Potts RJ, Bernalov IA, Wallace SS, Melamede RJ und Hart BA:** Inhibition of oxidative DNA repair in cadmium-adapted alveolar epithelial cells and the potential involvement of metallomethionein. **Toxicology, 2001; 161: 25-38.**
- Pourahmad J, O'Brien PJ:** Biological reactive intermediates that mediate chromium (VI) toxicity. **Advances in Experimental Medicine and Biology, 2001; 500: 203-207.**
- Proctor DM, Otani JM, Finley BL, Paustenbach DJ, Bland JA, Speizer N und Sargent EV:** Is hexavalent chromium carcinogenic via ingestion? A weight-of-evidence review. **Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A, 2002; 65(10): 701-746.**
- Qi W, Reiter RJ, Tan DX, Garcia JJ, Manchester LC, Karbownik M und Calvo JR:** Chromium(III)-induced 8-hydroxydeoxyguanosine in DNA and its reduction by antioxidants: comparative effects of melatonin, ascorbate, and vitamin E. **Environmental Health Perspectives, 2000; 108(5):399-402.**

-
- Rentz O, Engels B, Schultann F:** Untersuchung von Batterieverwertungsverfahren und -anlagen hinsichtlich ökologischer und ökonomischer Relevanz, unter besonderer Berücksichtigung des Cadmiumproblems, Umweltforschungsplan des Bundesministers für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit; **Forschungsprojekt 299 35 330; Deutsch-Französisches Institut für Umweltforschung, Karlsruhe, 2001.**
- Reynolds M, Peterson E, Quievryn G, Zhitkovich A:** Human nucleotide excision repair efficiently removes chromium-DNA phosphate adducts and protects cells against chromate toxicity. **The Journal of biological chemistry, 2004; 279(29): 30419-30424.**
- Rossman TG, Roy NK, Lin W:** Is cadmium genotoxic? **IARC Scientific Publications, 1992; 118: 367-375.**
- Rowbotham AL, Levy LS, Shuker LK:** Chromium in the environment: an evaluation of exposure of the UK general population and possible adverse health effects. **Journal of Toxicology and Environmental Health Part B, Critical Review, 2000; 3(3): 145-178.**
- Runge DM, Stock TW, Lehmann T, Taege C, Bernauer U, Stolz DB, Hofmann S und Foth H:** Expression of cytochrome P450 2E1 in normal human bronchial epithelial cells and activation by ethanol in culture. **Archives of Toxicology, 2001; 75(6): 335-345.**
- Santra M, Talukder G, Sharma A:** Clastogenic effects of zinc chloride on human peripheral blood leukocytes in vitro. **Cytobios, 2000; 102(399): 55-62.**
- Satarug S, Baker JR, Reilly PE, Moore MR und Williams DJ:** Cadmium levels in the lung, liver, kidney cortex, and urine samples from Australians without occupational exposure to metals. **Archives of Environmental Health, 2002; 57(1): 69-77.**
- Seoane AI, Dulout FN:** Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied bei kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. **Mutation Research, 2001; 490: 99-106.**

Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, 1988; 175(1): 184-191.

Slamenova D, Gabelova A, Ruzekova L, Chalupa I, Horvathova E, Farkasova T, Bozsakyova E und Stetina R: Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells, validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. **Mutation Research**, 1997; 383(3): 243-252.

Stearn DM: Is Chromium an trace essential metal? **Biofactors**, 2000;11(3): 149-162.

Stohs SJ, Bagchi D, Hassoun E und Bagchi M: Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium Ions. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, 2001; 20(2): 77-88.

Sunderman FW: Search for molecular mechanisms in the genotoxicity of nickel. **Scandinavian Journal of Work, Environment and Health**, 1993; 19(1): 75-80.

Thompson ED, Mc Dermott JA, Zerkle TB, Skare JA, Evans BLB und Cody DB: Genotoxicity of zinc in 4 short-term mutagenicity assays. **Mutation Research**, 1989; 223: 267-272.

Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H., Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC und Sasaki YF: Single Cell Gel/ Comet Assay: Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**; 2000; 35: 206-221.

Tillonen J, Homann N, Rautio M und Jousimies-Somer H: Role of yeasts in the salivary acetaldehyde production from ethanol among risk groups for ethanol-associated oral cavity cancer. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research**, 1999; 23(8): 1409-1415.

Tomkinson AE, Chen L, Dong Z, Leppard JB, Levin DS, Mackey ZB und Motycka TA: Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases. **Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology**, 2001; 68: 151-164.

-
- Trzeciak A, Kowalik J, Malecka-Panas E; Drzewoski J, Wojewódzka M, Iwanenko T und Blasiak J:** Genotoxicity of chromium in human gastric mucosa cells and peripheral blood lymphocytes evaluated by the single cell gel electrophoresis (comet assay). **Medical Science Monitor: International medical journal of experimental and clinical research, 2000; 6(1): 24-29.**
- Vakevainen S, Tillonen J, Agarwal DP, Srivastava N und Salaspuro M:** High salivary acetaldehyde after a moderate dose of alcohol in ALDH2-deficient subjects: strong evidence for the local carcinogenic action of acetaldehyde. **Alcoholism, Clinical and Experimental Research, 2000; 24(6): 873-877.**
- Vijayalakshmi R, Kanthimathi M, Subramanian V, Nair BU:** DNA cleavage by a Chromium(III) complex. **Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000; 271(3): 731-734.**
- Voet D, Voet JG:** DNA replications, repair and recombination, in: **Biochemistry, Second Edition (page 1020-1073), John Wiley & Sons, Inc., New York/Cichester/Brisbane/Toronto/Singapore, 1995.**
- Waalkes MP:** Cadmium carcinogenesis in review. **Journal of Inorganic Biochemistry, 2000; 79(1-4): 241-244.**
- Wätjen W, Haase H, Biagioli M, Beyersmann D:** Induction of Apoptosis in Mammalian Cells by Cadmium and Zinc. **Environmental Health Perspectives, 2002; 110(5): 885-887.**
- Weinberg RA:** How cancer arises. **Scientific American, 1996; 275(3): 62-70.**
- Wang S, Shi X:** Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry, 2001; 222: 3-9.**
- Wolfram S:** Spurenelemente, in: **Pharmakologie und Toxikologie, 8. Auflage (Seite 775-782), Forth/Henschler/Rummel, Urban & Fischer, München/ Jena, 2001.**
- World Health Organisation – International Program on Chemical Safety (WHO-IPCS):** Nickel. **Environmental Health Criteria, 1991; 108.**

Yang SW, Becker FF, Chan JY: Inhibition of human DNA ligase I activity by zinc and cadmium and the fidelity of ligation. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, 1996; **28(1): 19-25.**

Yuan C, Kadiiska M, Achanzar WE, Mason RP und Waalkes MP: Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockade of apoptosis. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2000; **164: 321-329.**

Zglinicki T, von Edwall C, Östlund E, Lind B, Nordberg M, Ringertz NR und Wroblewski J: Very low cadmium concentrations stimulate DNA synthesis and cell growth. **Journal of Cell Science**, 1992; **103: 1073-1081.**

Zhitkovich A, Quievryn G, Messner J, Motylevich Z: Reductive activation with cysteine represents a chromium(III)-dependent pathway in the induction of genotoxicity by carcinogenic chromium(VI). **Environmental Health Perspectives**, 2003; **110(5): 729-731.**

Zhuang ZX, Shen Y, Shen HM, Ng V und Ong CN: DNA strand breaks and poly (ADP-ribose) polymerase activation induced by crystalline nickel subsulfide in MRC-5 lung fibroblast cells. **Human and Experimental Toxicology**, 1996; **15: 891-897.**

6 Publikationen aus der Arbeit

- *Karzinogene und kokarzinogene Wirkung von Metallen und Ethylalkohol in humanen Speicheldrüsenzellen*
U.Harréus, P. Baumeister, B. Wallner, A. Berghaus, N. Kleinsasser
HNO, im Druck
- *Karzinogene und kokarzinogene Effekte von Metallen und Alkohol in humanen Speicheldrüsenzellen*
B. Wallner, P. Baumeister, N. Kleinsasser, C. Matthias, U, Harréus
HNO Informationen 2 (2004)
- *Genotoxic effects of metal on human salivary gland tissue and lymphocytes as detected by the Comet assay*
U. Harréus, P. Baumeister, H. Hagedorn, C. Matthias, N. Kliensasser, A. Berghaus
International Journal of Oncology, angenommen

7 Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name: Philipp Baumeister
Geburtsdatum: 16.02.1975
Geburtsort: München
Eltern: Dr. Hermann Leo Baumeister
Almut Baumeister, geb. Reissig
Familienstand: Ledig
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Akademische Ausbildung

1981 - 1985 *Grundschule*
Grundschule an der Türkenstrasse, München

1985 - 1995 *Gymnasium*
Willi-Graf-Gymnasium, München

1996 – 2004 *Medizinstudium*
Ludwig-Maximilians-Universität, München
April 1999 Ärztliche Vorprüfung / Physikum
Sept. 2000 1. Staatsexamen
April 2003 2. Staatsexamen
April 2004 3. Staatsexamen
2000 -2004 Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Hals-,
Nasen- und Ohrenkranke, LMU München

Juni bis September 1999 *Advanced English Program mit Science Workshops an der University of California, Los Angeles*

1995-1996 **Zivildienst**
Johanniter-Unfall-Hilfe e.V., Kreisverband München

