

**Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Ernst Kastenbauer**

**Ökogenotoxikologische Testverfahren
an Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa und
Lymphozyten des peripheren Blutes**

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

vorgelegt von
Barbara Wallner
aus Traunstein

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. N. Kleinsasser

Mitberichterstatter: Prof. Dr. E. Richter
Priv. Doz. Dr. med. V. Heinemann

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. U. Harréus

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 05. Februar 2003

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	4
1.1	DNA-Schädigung und Reparatur	4
1.2	Zellapoptose	7
1.3	Freisetzung von Zellbotenstoffen	9
1.4	Mukosakulturen zur Evaluierung potenzieller Mutagene	10
1.5	Fragestellung	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Kultivierung humaner Mukosa als Miniorgane	13
2.1.1	Gewinnung der nasalen Mukosa	14
2.1.2	Präparation der Mukosastücke	14
2.1.3	Kulturbedingungen	14
2.2	Histologische Untersuchungen	15
2.2.1	Herstellung der Präparate	15
2.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	16
2.2.3	Beurteilung der Ergebnisse	16
2.3	Fremdstoffexposition, Zellseparation und Vitalitätsmessung	16
2.3.1	Fremdstoffexposition	16
2.3.2	Isolierung der Zellen aus dem Epithelverbund	18
2.3.3	Bestimmung der Vitalität	19
2.4	Untersuchung der DNA-Schädigung	19
2.4.1	Grundlagen der Methode	19
2.4.2	Fixierung der Zellen auf Objektträgern	19
2.4.3	Lysierung von Zell- und Kernmembran	20
2.4.4	Elektrophoretische Auftrennung der DNA	20
2.4.5	Digitale Analyse der DNA-Migration	20
2.5	Untersuchungen zur Apoptose	21
2.5.1	Grundlagen der Methode	21
2.5.2	Präparation und Färbung der Zellen	22
2.5.3	Auswertung	22
2.6	Untersuchungen zur Zytokinproduktion	22
2.6.1	Grundlagen der Methode	22
2.6.2	Vorbereitung der Reagenzien und Proben	23
2.6.3	Durchführung des Tests	25
2.6.4	Messung und Auswertung	25
2.7	Untersuchungen zur DNA-Reparatur	26
2.7.1	Grundlagen der Methode	26
2.7.2	DNA-Reparatur von Lymphozyten <i>in vitro</i>	26
2.7.3	Reparaturfähigkeit des Lymphozyten-Proteinextraktes	29

2.8	Vergleich der DNA-Schädigung in Mikrokerntest und Mikrogelelektrophorese	32
2.8.1	Grundlagen des Mikrokerntests	32
2.8.2	Durchführung des Mikrokerntests	32
2.8.3	Ansetzen der Kulturen	32
2.8.4	Auswertung	34
2.8.5	Durchführung der Mikrogelelektrophorese	35
2.8.6	Auswertung des Vergleichs von Mikrokerntest und Mikrogelelektrophorese	35
2.9	Statistische Analyse	36
2.9.1	Darstellung der Ergebnisse	36
2.9.2	Ergebnisanalyse der Untersuchungen zur Genotoxizität	36
2.9.3	Ergebnisanalyse der Untersuchungen zur Apoptose	36
2.9.4	Ergebnisanalyse zur Bestimmung der Zytokinproduktion	37
2.9.5	Ergebnisanalyse zur DNA-Reparatur	37
2.9.6	Ergebnisanalyse zum Vergleich Mikrokerntest – Mikrogelelektrophorese	38
2.10	Methodenspezifische Labormaterialien	39
2.10.1	Enzyme, Zellkulturmedien und Chemikalien	39
2.10.2	Agar, Medien und Lösungen	41
2.10.3	Testkits und Sonstiges	44
2.10.4	Verbrauchsmaterial	45
2.10.5	Geräte und Zubehör	46
3	ERGEBNISSE	47
3.1	Kultivierung humaner Mukosa als Miniorgane	47
3.2	Histologische Untersuchungen	48
3.3	Bestimmung der Vitalität	50
3.3.1	Zilienschlag	50
3.3.2	Trypanblau-Ausschlusstest	50
3.4	DNA-Schädigung an Miniorganen nach Fremdstoffexposition	50
3.4.1	Mehrfache Kontrollexposition und Reparatur	52
3.4.2	Mehrfache <i>N</i> -Nitrosodiethylamin-Exposition und Reparatur	53
3.4.3	Mehrfache Benzo[a]pyren-diol-epoxid-Exposition und Reparatur	54
3.4.4	Mehrfache Natriumdichromat-Exposition und Reparatur	55
3.4.5	Mehrfache <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin-Exposition und Reparatur	56
3.5	Untersuchungen zur Apoptose	57
3.5.1	Apoptose in nicht exponierten Miniorgankulturen	58
3.5.2	Apoptose nach <i>N</i> -Nitrosodiethylamin-Exposition	59
3.5.3	Apoptose nach Benzo[a]pyren-diol-epoxid-Exposition	60
3.5.4	Apoptose nach Natriumdichromat-Exposition	61
3.5.5	Apoptose nach <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin-Exposition	62
3.6	Bestimmung der Zytokinproduktion	63
3.6.1	Zytokinfreisetzung während der Kultivierung	64
3.6.2	Zytokinfreisetzung durch <i>N</i> -Nitrosodiethylamin-Exposition	65
3.6.3	Zytokinfreisetzung durch Benzo[a]pyren-diol-epoxid-Exposition	66
3.6.4	Zytokinfreisetzung durch Natriumdichromat-Exposition	67

3.7	DNA-Reparatur	69
3.7.1	DNA-Reparatur von Lymphozyten	69
3.7.2	Individuelle Reparaturfähigkeit von Lymphozyten	70
3.7.3	Individuelle Reparaturfähigkeit von Proteinextrakten	71
3.7.4	Gegenüberstellung der individuellen Reparaturfähigkeiten	72
3.8	Vergleich Mikrokerntest – Mikrogelelektrophorese	73
4	DISKUSSION	75
4.1	Kultivierung und histologische Untersuchung der Miniorgane	75
4.2	DNA-Schädigung an Miniorganen	77
4.2.1	DNA-Fragmentierung durch <i>N</i> -Nitrosodiethylamin	77
4.2.2	DNA-Fragmentierung durch Benzo[<i>a</i>]pyren-diol-epoxid	80
4.2.3	DNA-Fragmentierung durch Natriumdichromat	81
4.2.4	DNA-Fragmentierung durch <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin	83
4.3	Apoptose	84
4.3.1	Bedeutung der Apoptose	84
4.3.2	Apoptose durch <i>N</i> -Nitrosodiethylamin	85
4.3.3	Apoptose durch Benzo[<i>a</i>]pyren-diol-epoxid	85
4.3.4	Apoptose durch Natriumdichromat	86
4.3.5	Apoptose durch <i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin	87
4.4	Zytokinproduktion von Miniorgankulturen	88
4.4.1	Bedeutung der Zytokine	88
4.4.2	IL-8 Freisetzung humaner nasaler Miniorgankulturen	90
4.4.3	GM-CSF Freisetzung humaner nasaler Miniorgankulturen	92
4.5	DNA-Reparatur	93
4.5.1	DNA-Reparatur von Lymphozyten	94
4.5.2	Individuelle DNA-Reparaturfähigkeit	95
4.6	Vergleich Mikrokerntest – Mikrogelelektrophorese	98
5	ZUSAMMENFASSUNG	101
6	LITERATUR	103
7	ANHANG	118
7.1	Verwendete Abkürzungen	118
7.2	Anamnesen der Probenspender	119
7.3	Lebenslauf	121
7.4	Publikationen	122
7.5	Danksagung	124

1 EINLEITUNG

Die Einwirkung bestimmter Fremd- und Umweltstoffe auf die Krebsentstehung im oberen Aerodigestivtrakt wurde bisher durch vorwiegend epidemiologische und tierexperimentelle Untersuchungen belegt. Für die Identifizierung von Gefahrenstoffen für den Menschen ist ein Testsystem anzustreben, das an humanen Zielzellen DNA-Schädigungen darstellt, welche über Mutation zu einer Tumorentstehung führen können. Um möglichst lebensnahe Bedingungen zu schaffen, sollen diese Zellen im epithelialen Verbund Mehrfachexpositionen mit potenziell mutagenen Substanzen sowie Reparaturintervallen ausgesetzt werden. Ein Modell dieser Art ermöglicht die Identifizierung von Personengruppen mit erhöhtem Risiko für Krebsentstehung und leistet somit einen Beitrag zur Tumorentstehung.

1.1 DNA-Schädigung und Reparatur

Das Überleben eines Organismus ist abhängig von der korrekten Überlieferung genetischer Informationen einer Zellgeneration an die nächste. Diese Übermittlung verlangt höchste Präzision in der DNA-Replikation und Chromosomenverteilung. Ebenso wichtig ist die Fähigkeit, induzierte DNA-Schäden zu überleben und zugleich vererbte Mutationen möglichst gering zu halten [Zhou und Elledge, 2000].

Schädigung an der Erbsubstanz der Zellen kann sowohl endogen als auch exogen verursacht werden. Spontan induzierter DNA-Schaden entsteht oft durch zelluläre Metaboliten. So ist die Produktion freier Radikale als Nebenprodukt des aktiven Stoffwechsels häufig mit oxidativer DNA-Schädigung verbunden. Exogene Ursachen für Veränderungen an der DNA der Zellen dagegen stammen aus dem Umfeld des Menschen. Künstlich erzeugte Produkte, aber auch natürlich vorkommende Stoffe sind in der Lage, die DNA zu schädigen. Exogene DNA-Schädigung wird mit dem Begriff Genotoxizität beschrieben.

Es gibt verschiedene Arten von DNA-Schäden. Abhängig von der Art der Noxe werden Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüche, Deletionen, Aberrationen, Inter- und Intrastrang-Crosslinks sowie Basenmodifikationen induziert.

Ein deutliches Beispiel für Auswirkungen genotoxischer Agenzien ist die starke Korrelation zwischen UV-Exposition, Alkohol- oder Nikotinkonsum und der Entwicklung von Krebserkrankungen der Haut, der Lunge oder des oberen Aerodigestivtraktes [Kripke, 1993]. Auch Fremdstoffe, denen Menschen in ihrer Umwelt und Arbeitsumgebung ausgesetzt sind, sogenannte Xenobiotika, stellen exogene Quellen von DNA-Schädigung dar. Viele davon stehen bei Ingestion oder Inhalation in unmittelbarem Kontakt mit der Schleimhaut des

oberen Aerodigestivtraktes. Da diese Stoffe potenziell mutagenen Charakter besitzen, sind sie als zusätzliche Risikofaktoren zu werten. Auf ihrem Weg in den Körper passieren feste, flüssige oder flüchtige Stoffe zuerst die Mukosa dieser Region, werden dann an ihr abgelagert, zum Teil über sie aufgenommen und umgesetzt.

Ubiquitäre Vertreter solcher Fremdstoffe sind Nitrosamine, welche in Nahrungsmitteln [Boeing et al., 1993], in Tabakrauch [Hecht und Hoffmann, 1998; Abdel-Rahman und El-Zein, 2000], in Medikamenten [Brown, 1999] und in Kosmetika [Sommer und Eisenbrand, 1988] enthalten sind. Sie kommen aber auch in der Metall, Gummi und Leder verarbeitenden Industrie vor und werden als leicht flüchtige Stoffe vor allem über die Atemwege aufgenommen [Tricker et al., 1989]. Eine vermehrte Exposition gegenüber Nitrosaminen steht mit einer erhöhten Sterberate infolge von Tumoren der Speiseröhre, der Mundhöhle und des Schlundes in Zusammenhang [Straif et al., 2000].

Auch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe werden den Xenobiotika zugeordnet. Sie entstehen bei unvollständiger Verbrennung organischen Materials. Durch ihr Vorkommen in Lebensmitteln [Knize et al., 1999], im Tabakrauch [Smith et al., 2000] und in der Eisen und Stahl verarbeitenden Industrie [Haguenoer et al., 1990] treten sie ebenfalls primär mit den Zellen des oberen Aerodigestivtraktes in Kontakt.

Nach dauerhafter Exposition gegenüber Nickel, Chromat, Teer oder Mineralöl können Tumoren der Nase oder der Nasennebenhöhlen auftreten. Diese werden auch als Berufskrankheit anerkannt [Berufskrankheitenverordnung, 1997]. Außerdem besteht eine Assoziation zwischen Zementstaub, Lacken, Teerprodukten, Kühlschmierstoffen, fossilen Brennstoffen und Tumoren des Pharynx [Übersicht in: Maier und Sennewald, 1994].

Auf zellulärer Ebene können durch Verletzung der DNA-Integrität Prozesse wie Transkription und Replikation gehemmt werden, was ein Anhalten des Zellzyklus zur Folge hat. Auch programmierter Zelltod und genomische Instabilität werden dadurch hervorgerufen. Veränderte genetische Informationen führen im weiteren Verlauf der Karzinogenese über Mutation und nachfolgender Transformation zu einer Tumorinitiation, Promotion und Progression [Barrett, 1992].

Art und Umfang der DNA-Schädigung sind zunächst abhängig von den zugrundeliegenden Mutagenen und deren Schädigungsmechanismen. Eine Verletzung der DNA-Integrität wird auf direktem oder indirektem Weg durch die Schadstoffe selbst oder deren Metaboliten induziert. In der Biotransformation stellt die Phase-I-Reaktion eine Funktionalisierungsreaktion dar. Diese metabolische Veränderung kann sowohl zu einer „Entgiftung“ wie auch zu

einer „Giftung“ des Fremdstoffes führen [van Iersel et al., 1999]. Eine große Rolle spielen dabei unter anderem die Enzyme des Cytochrom P450 Systems [Hong und Yang, 1997], die Glutathion-S-Transferasen [Kihara et al., 1997] und die Alkoholdehydrogenase 3 [Coutelle et al., 1997]. Neben zahlreichen anderen Einflüssen auf den Zellstoffwechsel können diese Enzymsysteme aus Prokanzerogenen über Zwischenstufen ultimative Kanzerogene herstellen.

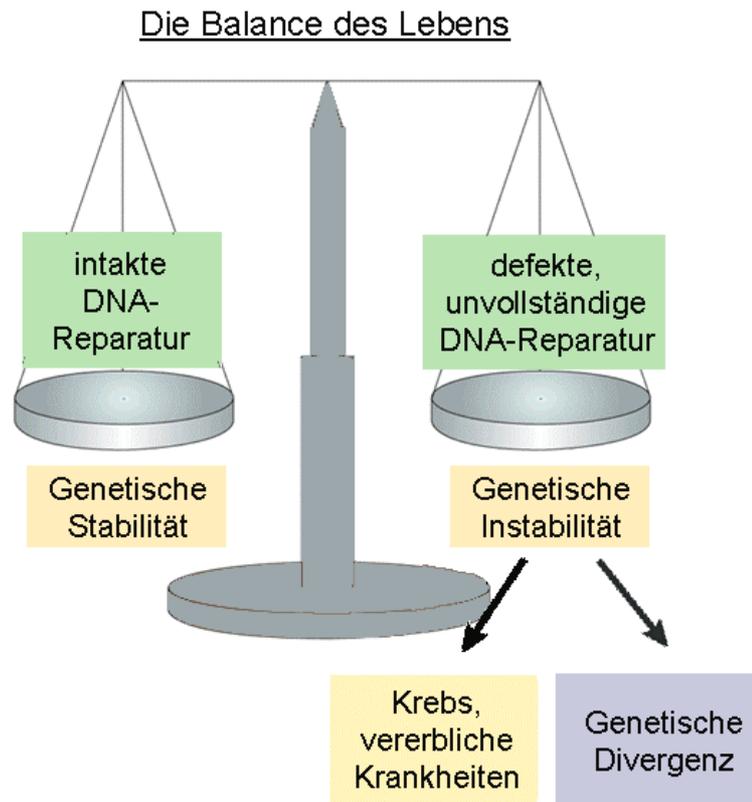


Abbildung 1: Die Balance des Lebens. Überleben erfordert ein genauestens ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen der Vermeidung von Mutationen durch DNA-Reparatur und anderen zellulären Reaktionen auf DNA-Schädigung, welche die genetische Stabilität, die Bildung und Persistenz von Mutationen beeinflussen können (Graphik nach Friedberg, 2001).

Neben der umweltbedingten Exposition gegenüber Karzinogenen spielt auch die individuelle DNA-Empfindlichkeit gegenüber Schadstoffen, die Mutagensensitivität, in der Risikoabschätzung für Krebserkrankung eine bedeutende Rolle [Markham et al., 1994]. Einen der wichtigsten Faktoren stellt dabei die individuelle DNA-Reparaturaktivität dar. Dies ist ein ubiquitärer Schutz, der für das Überleben einer Zelle und für die Erhaltung des normalen Zellzyklus essentiell ist [Bohr et al., 1989; Hartwell und Weinert, 1989]. Um den Folgen einer DNA-Schädigung vorzubeugen, ist die Zelle mit komplexen Mechanismen der DNA-Reparatur ausgestattet. Dabei werden kleinere Basenmodifikationen durch

Basenexzisionsreparatur, sperrige und somit helixverzerrende Addukte aber vorwiegend durch Nukleotid-Exzisionsreparatur entfernt. Die Mismatch-Reparatur dagegen eliminiert falsch gepaarte Nukleotide [de Boer und Hoeijmakers, 2000]. Effektive DNA-Reparatur schützt vor Auswirkungen genotoxischer Stoffe, während eine Störung des Reparatursystems Mutationsraten und genomische Instabilität ansteigen lässt (Abb.1) [Berwick und Vineis, 2000]. Sowohl die Mutagensensitivität als auch die Reparaturfähigkeit induzierter DNA-Schäden, abhängig von der Funktion komplexer Reparatursysteme, gehen auf endogene Faktoren zurück und sind individuellen Unterschieden unterworfen [Cloos et al., 1996; Cheng et al., 1998].

Die meisten dieser Erkenntnisse basieren auf epidemiologischen Untersuchungen. Zur experimentellen Evaluierung genotoxischer Stoffe werden häufig Tiermodelle oder Einzelzellkulturen eingesetzt. Letztere weisen aber sehr oft einen gänzlich veränderten oder aufgehobenen Fremdstoffmetabolismus auf. Zudem basieren viele Resultate auf lediglich einmaligen Expositionsphasen. Geeignete Methoden zur Simulierung annähernd realer Lebensbedingungen fehlen jedoch bislang. Anzustreben ist ein Modell, das auch Mehrfach- oder Dauerexpositionen erlaubt und ergänzend die Beobachtung des individuellen DNA-Reparaturverhaltens ermöglicht.

1.2 Zellapoptose

Ein gesunder Organismus besteht vorwiegend aus differenzierten Zellen. Ein Teil davon ist unersetzlich, ein anderer Teil wird jeweils nach Erfüllung der zellspezifischen Aufgaben eliminiert. Wenn Zellen ihre Aufgabe nicht optimal ausführen, kann dies katastrophale Konsequenzen für den Organismus haben [Steller, 1995]. Der genetisch programmierte Zelltod, die Apoptose, versucht dies zu verhindern. Hier erfolgt innerhalb weniger Stunden der kontrollierte Abbau einer Zelle. Sie findet unter normalen physiologischen Bedingungen wie bei Organinvolution, Fetal- und Embryonalentwicklung oder bei Differenzierung des Immunsystems statt [Wyllie et al., 1980]. Auch in Tumorzellen finden sich apoptotische Stadien, diese wachsen jedoch bei entsprechend gesteigerter Proliferation weiter. Zellen mit nicht reparierten DNA-Schäden sowie virusinfizierte Zellen können durch Apoptose eliminiert werden, wobei verschiedene membranständige Rezeptoren die immunologisch vermittelten Signale weitergeben [Nagata, 1997].

Morphologisch werden zu Beginn der Apoptose eine Verringerung des Zellvolumens sowie Ausstülpungen der Zytoplasmamembran beobachtet. Weitere Merkmale stellen die

Chromatinverdichtung und die Schrumpfung des Zellkerns dar. Membransumgeschlossene Vesikel beginnen, sich von der Zelle abzuschneiden. Ferner wird Apoptose durch eine Abfolge biochemischer Vorgänge charakterisiert [Allen et al., 1997]. Durch Aktivierung von Caspasen werden zellabbauende Substrate ausgeschüttet. Die eintretende mitochondriale Membranpermeabilität führt zu einem Verlust des transmembranalen Potentials. Das Phospholipid Phosphatidylserin verlagert sich von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran [van Engeland et al., 1998]. Phagozytierende Zellen erkennen diese Veränderung und können die apoptotische Zelle oder die membranumgrenzten apoptotischen Körper zellgesteuert abbauen [Fadok et al., 1992]. Schließlich erfolgt nach einer irreversiblen Aktivierung von calciumabhängigen Endonukleasen die Fragmentierung der DNA, was ebenfalls als typisches Merkmal einer apoptotischen Zelle gilt [Darzynkiewicz et al., 1992].

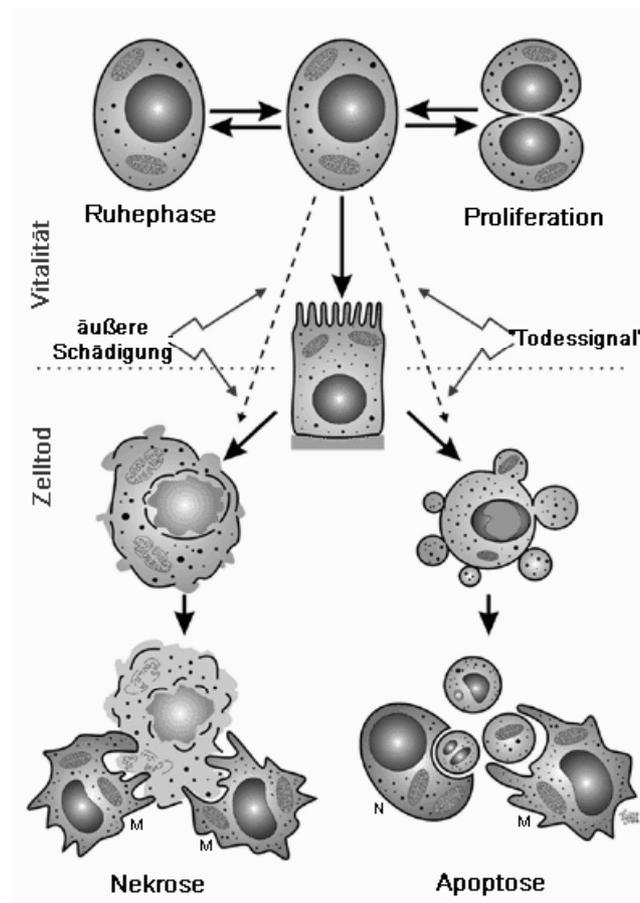


Abbildung 2: Zelltod durch Nekrose (äußere Einflüsse) und Apoptose (genetisch gesteuert). Nekrose ist mit einer Schädigung der Zellmembran, der Freisetzung von Entzündungsmediatoren und dem Zellabbau durch Makrophagen (M) verbunden. Bei Apoptose dagegen bleibt die Zellmembran intakt, apoptotische Körperchen schnüren sich von der Zelle ab und werden von Makrophagen (M) oder Neutrophilen (N) eliminiert. Quelle: Boehringer Mannheim [1996].

Benachbarte Zellen sind normalerweise nicht nachteilig betroffen. Unkontrollierte Apoptose ist jedoch mit schwerwiegenden Folgen verbunden und bedeutet in nicht regenerierbaren Zellen einen irreversiblen Funktionsverlust für den Organismus. Auch Zellen, die nach Erfüllung ihrer Funktion keiner Apoptose unterliegen, können sich für den Organismus nachteilig auswirken. Eine exakte Regulation der Apoptose ist deshalb lebenswichtig für den Menschen [Thompson, 1995].

Apoptose und Nekrose sind zwei wichtige Prozesse, die zum Tod einer Zelle führen (Abb. 2). Nekrose beschreibt das Zugrundegehen von Zellen durch äußere Einflüsse, z.B. durch Strahlung, Verbrennung, Vergiftung oder mechanische Verletzung. Charakteristische Merkmale von Nekrose sind Kondensation der Kernsubstanz, Anschwellen der Zellorganellen und ein Platzen der Zelle. Durch Freisetzung von Stoffen aus dem Zytoplasma werden Phagozyten angelockt, Zytokine produziert und eine Entzündungsreaktion hervorgerufen. Während der Apoptose dagegen läuft ein genetisch gesteuertes Programm ab, von dem nur einzelne Zellen betroffen sind. Diese reagieren auf Signale, auch wenn sich der Auslöser außerhalb der Zelle befindet. Die Zellmembran bleibt unbeschädigt und es tritt keine Entzündungsreaktion ein. Infolge des sinkenden Volumens verliert die Zelle ihren Kontakt zu den Nachbarzellen. Apoptose ist also der geordnete Abbau einer Zelle aus dem Inneren heraus [Thornberry und Lazebnik, 1998].

Der apoptotische Zelltod ohne Entzündungsreaktion bietet daher eine gute Möglichkeit, Apoptose von Nekrose zu unterscheiden. Andere häufig verwendete Methoden sind die Detektion von Phosphatidylserin an der Zelloberfläche über Annexin V-Bindung, der Nachweis von DNA-Leitern und die Färbung von DNA-Fragmenten mit charakteristischen Enden. DNA-Fragmentierung kann sowohl durch Apoptose als auch durch Fremdstoffe hervorgerufen werden. Deshalb ist es bei genotoxikologischen Untersuchungen wichtig, den aktuellen physiologischen Zustand der Zellen zu kennen.

1.3 Freisetzung von Zellbotenstoffen

Viele Zelltypen bilden und sezernieren Zellbotenstoffe zur Regulierung von wichtigen biologischen Vorgänge wie Wachstum, Aktivierung, Entzündung, Immunität, Gewebereparatur und Morphogenese. Diese sogenannten Zytokine sind beteiligt am Weiterleben, an der Proliferation und der Aktivierung reifer Entzündungszellen wie Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten. Ebenso wie Makrophagen und Lymphozyten, die Primärquellen von Zytokinen darstellen, sind auch Fibroblasten,

Epithelzellen und Endothelzellen zur *in vitro* Produktion solcher Mediatoren fähig [Smith et al., 1990; Ohtoshi et al., 1991].

Die Epithelzellen der Atemwege stehen häufig in Kontakt mit toxischen Agenzien, wie z.B. Luftverunreinigung, Tabakrauch und bakteriellen Partikeln. Nasale und bronchiale Epithelzellen sind zur Produktion und Freisetzung verschiedenster Zytokine fähig. Oft spielen diese auch in Verbindung mit Atemwegsentzündungen eine Rolle, wie z.B. Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8), Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) und Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) [Cox et al., 1992; Devalia et al., 1993; Becker et al., 1993]. Da das Epithel des Respirationstraktes als erstes Passageorgan bei Inhalation oder Ingestion von Schadstoffen ein unmittelbares Zielorgan darstellt, tritt es möglicherweise als initialer Vermittler von allergischen Entzündungsreaktionen auf. In Untersuchungen von Boland et al. [1999] und Ohtoshi et al. [1998] zeigte sich nach Inkubation mit Abgaspartikeln oder dem aromatischen Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren eine Erhöhung der GM-CSF Freisetzung von humanen Nasenepithelzellen. Zudem wurde *in vivo* ein Anstieg der IL-6 und IL-8 Produktion nach hoher Sauerstoffexposition festgestellt [Capellier et al., 1997]. Eine Vermehrung der Zytokinsekretion kann auf die Freisetzung bereits existierender Zytokinspeicher oder auch auf die Proteinneubildung zurückzuführen sein, welche meist mit gesteigerten Transkriptionsraten der Zytokingene verbunden ist [Boland et al., 2000]. Obwohl die Nase ein primäres Kontaktorgan für Schadstoffe darstellt, wurden bisher nur selten Untersuchungen an humaner nasaler Mukosa durchgeführt [Schierhorn et al., 1997]. Ein Zusammenhang zwischen Exposition von Umweltschadstoffen und Atemwegserkrankungen konnte bereits gezeigt werden [Devalia et al., 1993].

1.4 Mukosakulturen zur Evaluierung potenzieller Mutagene

In Untersuchungen der Karzinogenese des oberen Aerodigestivtraktes ist die Mukosa dieser Region von besonderem Interesse, da sich ein Großteil aller Tumoren aus diesen epithelialen Zellen entwickelt. Auch gewinnt das Biomonitoring von umwelt- und arbeitsbedingter Belastung sowie von Personen mit erhöhtem Risiko für eine Krebsentwicklung immer mehr an Bedeutung. Da jedoch der Ausschluss von zusätzlichen Faktoren, wie der Genuss von Tabak oder Alkohol unter Berücksichtigung weiterer Xenobiotika-Expositionen, sehr schwierig zu realisieren ist, ermöglichen *in vivo* Untersuchungen die Darstellung von Art und Menge des zu untersuchenden Fremdstoffs oft nur teilweise. Bei *in vitro* Modellen dagegen ist die Möglichkeit der Standardisierung gegeben und daher die Abschätzung des *in vivo* Potenzials von genotoxischen Stoffen in humanen Zellkultursystemen sinnvoll. Bisher

wurden dafür Einzelinkubationen separierter Mukosazellen oder Lymphozyten in verschiedenen *in vitro* Modellen eingesetzt [Pool-Zobel et al., 1994; Harréus et al., 1999; Kleinsasser et al., 2000a].

Kulturen enzymatisch aufgetrennter Epithelzellen des Aerodigestivtraktes entwickeln repräsentative Eigenschaften für natives Gewebe. Sie zeigen aber nur zum Teil die mukosalen Zellpopulationen, die *in vivo* zu sehen sind, denn die Basalmembran und das darunter liegende Stroma fehlen oft. Anteile dieser Basalmembran sind aber sowohl für das Wachstum als auch für die Differenzierung von respiratorischem Epithel *in vitro* essentiell [van Scott et al., 1991; Chevillard et al., 1991]. Die *in vitro* Kultivierung in Monolayerkulturen ist oft mit dem Verlust der Zilienfunktion bzw. einer Dedifferenzierung der Epithelzellen verbunden [Ziegelaar et al., 2002]. Außerdem kann auf diesem Weg auch nur ein partielles oder sogar irreführendes Bild verschiedener Stoffwechselfvorgänge, wie z.B. der Entzündungsantwort in der Mukosa, vermittelt werden [Schierhorn et al., 1999]. Einzelzellkulturen weisen im Vergleich zu Zellen im Gewebeverbund einen veränderten Fremdstoffmetabolismus mit unterschiedlichen DNA-Sensitivitäten und Reparaturmechanismen auf [DeLeve et al., 1997; Teissier et al., 1998]. Die Höhe des DNA-Schadens nach einmaliger Exposition von Einzelzellen kann nicht die komplexe *in vivo* Situation aus ständiger DNA-Schädigung und Reparatur darstellen. Ein *in vitro* Modell soll die Möglichkeit geben, wiederholte Inkubationen von potenziell genotoxischen Stoffen an humanen Zielzellen in ihrer epithelialen Form und Umgebung durchzuführen, so dass Xenobiotika in einer repetitiven Art einwirken können. Ein Modell dieser Art stellen Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa dar [Kleinsasser et al., 2001], modifiziert nach einer auf Steinsvag et al. [1991] basierenden Methode an adenoidem Gewebe.

In vivo nahe Bedingungen sind bei dreidimensionalen Organkulturen in besonderer Weise verwirklicht. Im Gegensatz zu anderen Primärkulturen können sie histologisch differenzierte Zellen erhalten, denn sie ähneln der Architektur von *in vivo* Organen. Durch die Integrität der Zellen in ihrem organspezifischen Verbund gelingt es, eine natürliche und dem lebenden Organismus ähnliche Situation herzustellen [Fjellbirkeland et al., 1996]. Dieses System bietet die Möglichkeit, detaillierte Experimente an verschiedenen Mechanismen in Verbindung mit epitheliale Zellwachstum, mit Differenzierung und Reparatur durchzuführen.

1.5 Fragestellung

Mögliche schädigende Einflüsse durch Arbeits- und Umweltstoffe auf das Erbgut der Zellen sind im Zusammenhang mit einer Karzinomentstehung von besonderem Interesse. Bei Ingestion und Inhalation von Fremdstoffen fungiert der obere Aerodigestivtrakt als erstes Kontaktorgan und stellt somit die Zielzellen einer möglichen DNA-Schädigung. Viele etablierte Untersuchungen zur Toxizität und Genotoxizität finden an Tiermodellen sowie an humanen Einzelzell- oder Monolayerkulturen statt. Hierbei ergeben sich jedoch Probleme durch die ungesicherte Übertragbarkeit auf den Menschen, durch den Verlust der strukturellen Integrität des nativen Epithels oder durch einen veränderten Fremdstoffmetabolismus. Daher werden in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen behandelt:

- Bietet ein dreidimensionales Miniorgankulturmodell humaner nasaler Mukosazellen die Möglichkeit der Charakterisierung potenzieller Gefahrenstoffe in einer *in vivo* nahen Situation?
- Bleiben die Miniorgankulturen während einer zweiwöchigen Kultivierung auch strukturell intakt oder zeigen sich Hinweise für eine Nekrose?
- Welchen Effekt haben mehrfache Fremdstoffexpositionen oder Reparaturphasen auf die DNA-Integrität der als Organ kultivierten Mukosazellen?
- Beeinflusst wiederholte Fremdstoffexposition die Vitalität und die Apoptoseinduktion in den Zellen kultivierter Miniorgane?
- Wird durch die Kultivierung oder durch die Fremdstoffexposition an humanen Miniorganen eine Entzündungsreaktion hervorgerufen?
- Ist es möglich, anhand unterschiedlicher Untersuchungsmethoden die individuelle Reparaturkapazität an humanen Lymphozyten darzustellen und Personen mit erhöhter Mutagensensitivität zu identifizieren?
- Ist die Aussagekraft von Einzelzell-Mikrogelelektrophorese und Mikrokerntest vergleichbar?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Kultivierung humaner Mukosa als Miniorgane

Miniorgane humaner nasaler Mukosa werden elf Tage lang kultiviert und bis zu dreimal fremdstoffexponiert. Vitalitäts- und histologische Untersuchungen sollen über die gesamte Kulturdauer die Aktivität und die strukturelle Integrität der Miniorgane überprüfen. Zytokinbestimmungen erfolgen während der Kultivierung und der Fremdstoffexposition. Die Untersuchung genotoxischer Effekte der eingesetzten Fremdstoffe, einer dadurch induzierten Apoptose oder eines Vitalitätsverlusts erfolgen nach Auftrennung der Miniorgane in Einzelzellen (Abb. 3).

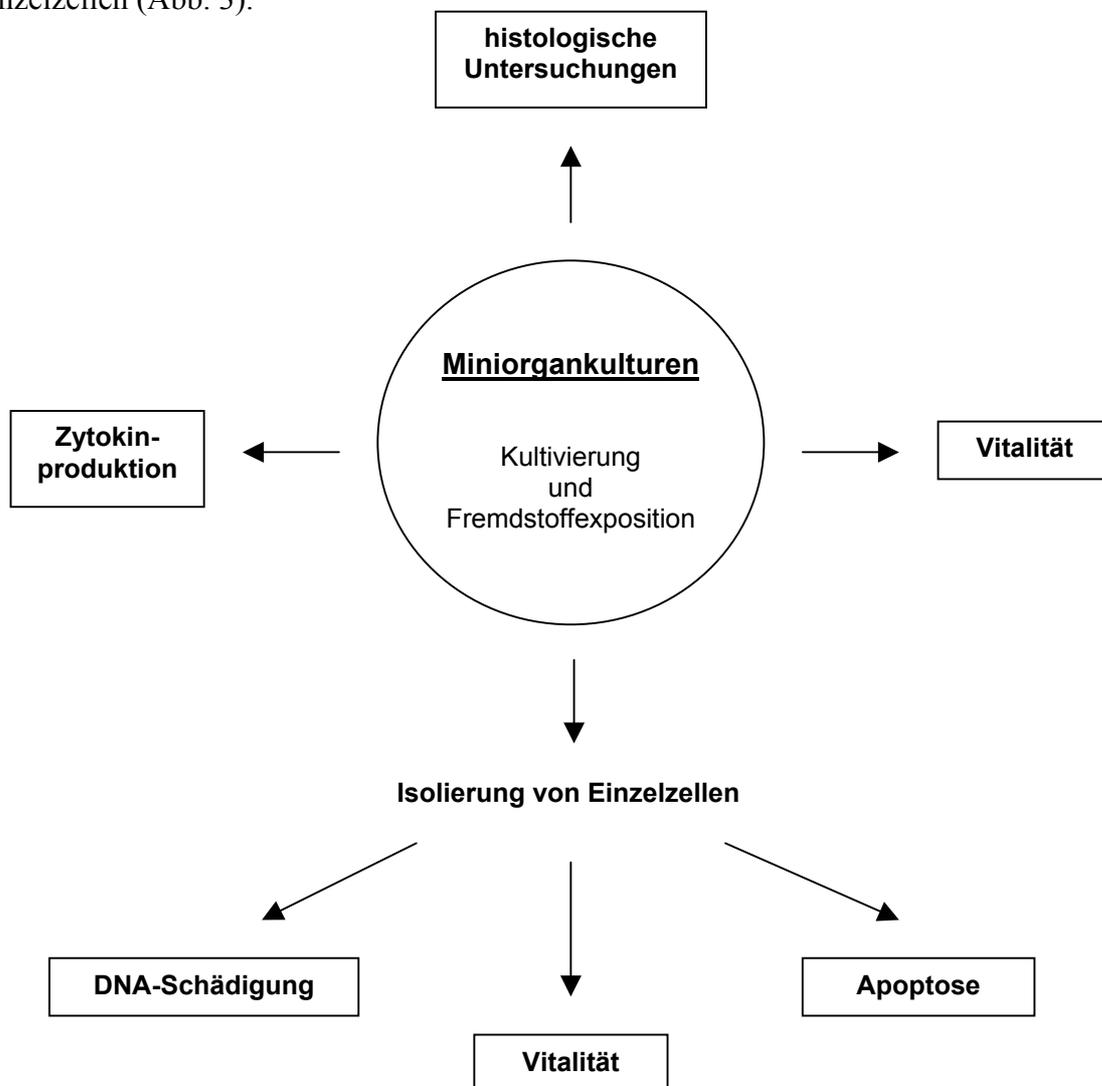


Abbildung 3: Übersicht der Untersuchungen an Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa. Während der Kultivierung der Miniorgane werden Untersuchungen zu Histologie, zur Zytokinproduktion und zur Vitalität angestellt. Nach Fremdstoffexposition werden die separierten Zellen der Miniorgankulturen hinsichtlich DNA-Schädigung, Vitalität und Apoptose untersucht.

2.1.1 Gewinnung der nasalen Mukosa

Die verwendete Schleimhaut stammt von Teilresektionen der unteren Nasenmuscheln (Conchotomie) aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Ludwig-Maximilians-Universität München. Indikation für eine Conchotomie war in der Regel eine Behinderung der Nasenatmung. Um überschießenden Schwellungszuständen vorzubeugen, wurde der untere freie Schleimhautrand der Concha nasalis inferior reduziert. Die 23 Spender (Anamnesen siehe Anhang, Tab. 19) wurden entsprechend einem Ethikkommissionsantrag (Nr. 104/98 und 073/00) über die wissenschaftliche Verwendung der Proben präoperativ aufgeklärt. Die Präparate wurden in physiologischer Kochsalzlösung ins Labor transportiert. Die Zeitdifferenz zwischen Operation und Versuchsbeginn betrug ein bis zwei Stunden.

2.1.2 Präparation der Mukosastücke

Die Schleimhautresektate der Nasenmuscheln wurden mit einem Skalpell von anhängendem Gewebe abpräpariert und in Stückchen von ca. 1 mm Kantenlänge geschnitten. Nach dreimaligem Waschen in Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM; Promocell, Heidelberg), das mit Bovine Pituitary Extract, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Triiodthyronin, Transferrin und Retinoic Acid (Promocell) versetzt war, wurden sie auf zuvor agarbeschichtete 24-Well-Platten gebracht (Falcon, Heidelberg).

2.1.3 Kulturbedingungen

Die Multiwellplatten waren mit sterilem 0,75 % Agar Noble (DIFCO-Laboratories, Detroit, USA) beschichtet. Der Agar war in Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-Lifetechnologies, Eggenstein) gelöst und mit nicht essentiellen Aminosäuren (1,1 µl/ml), Streptomycin (1,8 µl/ml) und Amphotericin B (3,6 µl/ml; Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) supplementiert. Pro Ansatz wurde ein Mukosastück in 250 µl BEGM herangezogen. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank (Heraeus, Hanau) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Das BEGM wurde nach zwei Tagen, die agarbeschichtete Multiwellplatte nach jeder Fremdstoffexposition gewechselt. Die Dauer der Kultivierung betrug 11 Tage. Bei Mediumwechsel in 48-stündigem Intervall wurde an den Kulturtagen 2, 7, 9 und 11 der Überstand aller Parallelansätze gesammelt, eingefroren und bis zur Zytokinbestimmung bei -80 °C aufbewahrt. Die Vitalität der Miniorgane wurde fortwährend über die Beobachtung des Zilienschlages durch ein inverses Mikroskop (DMIRB, Leica, Heerbrugg) kontrolliert.

2.2 Histologische Untersuchungen

2.2.1 Herstellung der Präparate

Zur Fixierung wurden die Miniorgane nach 3, 7, 9 und 11 Tagen Kulturdauer vorsichtig, ohne das Gewebe zu verletzen, in 5 ml 4 % Formaldehydlösung (Fischar, Saarbrücken) überführt. Die Präparate verblieben zwischen 4 und 40 Tagen in der Lösung.

Die fixierten Miniorgane wurden in gekennzeichnete Plastikkassetten mit Einbettungsschwämmen (Merck, Darmstadt) geordnet und drei Stunden lang unter fließendem Leitungswasser gewaschen, um das Fixierungsmittel zu entfernen. Es folgte die Entwässerung der Präparate in aufsteigender Alkoholreihe. Dazu wurden die Kassetten jeweils für drei Stunden in 50 %, 70 %, 96 % und zweimal in 100 % Ethanol gegeben. Zur Eliminierung des Alkohols wurden die Proben für je zwei Stunden in zwei Portionen Methylbenzoat (Merck, Darmstadt) als Intermedium, dann für zwei Stunden in Benzol (Merck, Darmstadt) aufbewahrt. Schließlich durchtränkten die Präparate erst eine Stunde lang in einer bei 30 °C gesättigten Lösung von Paraffin (Serva, Heidelberg) in Benzol, bevor man sie für zwei Stunden in ein Paraffinbad (Daglef Patz, Wankendorf) mit 56-58 °C übertrug. In einem Gießschälchen wurden sie mit heißem Paraffin überschichtet und zu einem Block verarbeitet. Nach dem Erkalten entfernte man den Paraffinblock aus der Gießform [Romeis, 1989].

Die ausgegossenen Präparate wurden nach dem Erstarren in die Halterung eines Schlittenmikrotoms (Reichert-Jung, Kiel) gespannt. Mit einem C-Messer wurden die eingebetteten Proben in einer Dicke von 5-10 µm geschnitten und in ein Streckbad (Reichert-Jung, Kiel) mit 37 °C übertragen. Hierdurch streckte sich der Schnitt und befreite sich von Falten. Danach wurden die Präparate mit einer Nadel auf saubere und fettfreie Objektträger aufgezogen, in Küvetten sortiert und im Brutschrank (37 °C) bis zum Färben aufbewahrt.

Zum Herauslösen des Paraffins tränkte man die Schnitte nach dem völligen Trocknen für fünf Minuten in Neoclear (Merck, Darmstadt) und überführte sie anschließend über eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100 %, 2 x 96 %, 2 x 70 % Ethanol) in Aqua bidest.. In jeder dieser Flüssigkeiten sollten sie drei bis fünf Minuten verbleiben, bevor sie gefärbt und eingedeckt wurden.

2.2.2.12.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die entparaffinierten Schnitte wurden zweimal je drei Minuten in Aqua bidest. gewaschen und danach für fünf Minuten in Hämatoxylin-Lösung (0,1 %; Merck, Darmstadt) inkubiert. Anschließend erfolgte ein Spülen erst unter fließendem Leitungswasser, dann in Aqua bidest.. Mit Eosin (Merck, Darmstadt) wurden sie eine Minute lang gegengefärbt. Nachdem sie wiederum zweimal mit Aqua bidest. gewaschen worden waren, begann die Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (je drei Minuten in 70 %, 96 %, 2 x 100 %). Anschließend wurden sie für drei Minuten in Neoclear (Merck) überführt und mit Eukitt (Klinikapotheke, LMU München) eingedeckt.

Bei dieser Färbung nimmt das Zytoplasma verschiedene Rottöne an, Zellkerne erscheinen blauschwarz, Erythrozyten orangerot und Fibrin pinkfarben.

2.2.3 Beurteilung der Ergebnisse

Die Präparate wurden unter dem Lichtmikroskop (Leica, Heerbrugg, Schweiz) betrachtet und hinsichtlich ihrer Epithelialisierung und Struktur bewertet. Zur Dokumentation wurden die Schnitte der Miniorgankulturen an den einzelnen Untersuchungstagen mit einer Spiegelreflexkamera (Minolta, Osaka, Japan) fotografiert.

2.3 Fremdstoffexposition, Zellseparation und Vitalitätsmessung

2.3.1 Fremdstoffexposition

Nach 7 Tagen Kulturdauer wurden die Miniorgane erstmals mit den zu untersuchenden Substanzen *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA; Sigma, Steinheim; 50 mM), Benzo[*a*]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE; Midwest Research Institute, Kansas, USA; 9 µM) oder Natriumdichromat (Na₂Cr₂O₇; Sigma; 1 mM) inkubiert. Als Negativkontrolle diente Medium (BEGM), als Positivkontrolle *N*-Methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG; Aldrich, Milwaukee, USA; 0,0035 mM). Pro Substanz und Testzeitpunkt wurden drei Mukosafragmente kultiviert. Die Dauer der Fremdstoffexposition betrug eine Stunde und fand bei 37 °C im Schüttelwasserbad statt. Zu 250 µl Kulturmedium wurden 25 µl der Substanz in entsprechender Konzentration gegeben.

Fremdstoffexposition von Miniorgankulturen

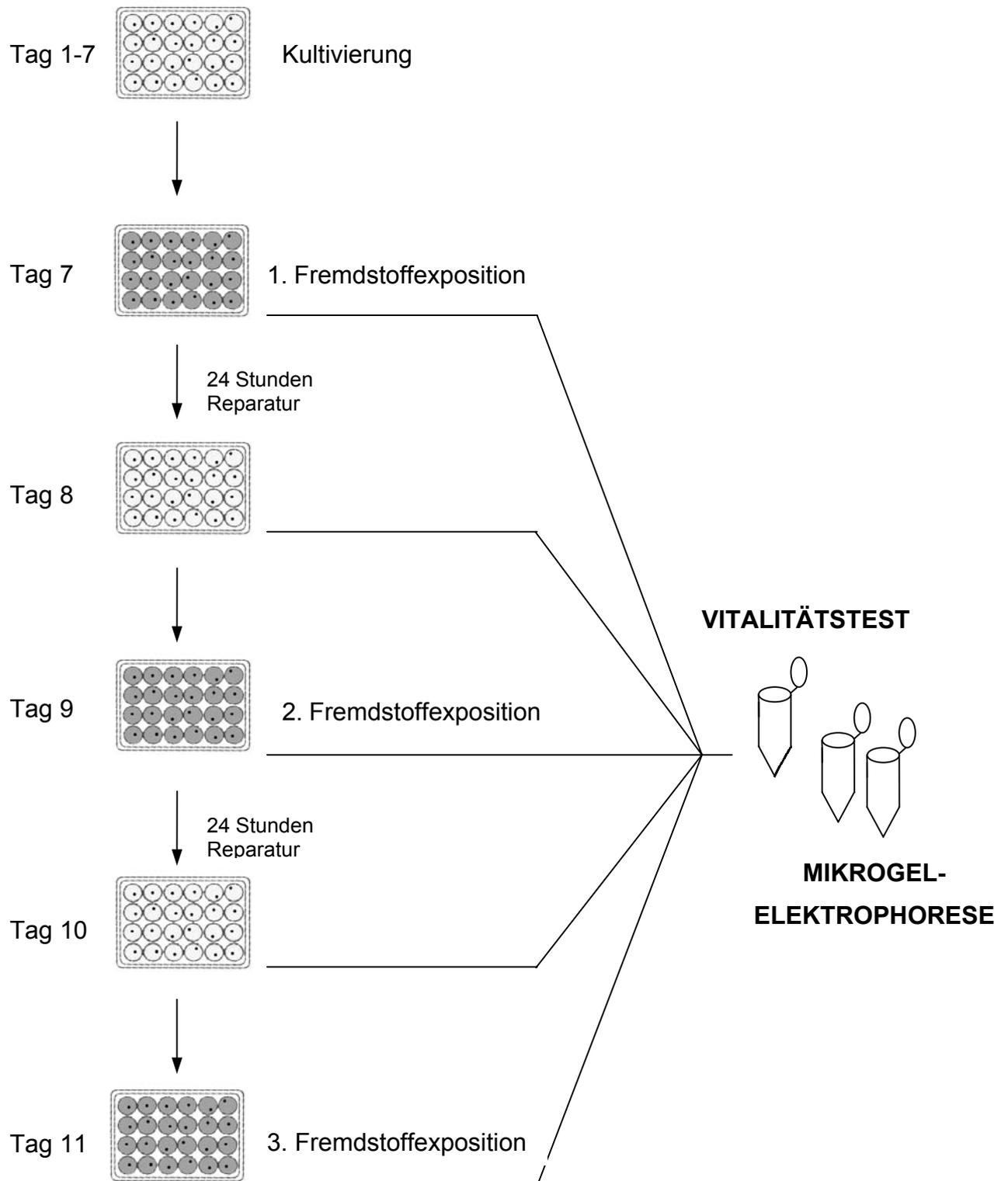


Abbildung 4: Schema für Fremdstoffexposition von Miniorgankulturen. Die Miniorgane werden an den Kulturtagen 7, 9 und 11 für eine Stunde fremdstoffexponiert. Unmittelbar nach der Exposition wird ein Teil davon dem Vitalitätstest und der Mikrogelelektrophorese zugeführt. Ein anderer Teil wird weiterkultiviert und nach 24 Stunden Reparatur ebenfalls o.g. Untersuchungen zugeführt.

Nach der Inkubation wurden die Überstände abgesaugt und die Miniorgane zweimal mit 250 µl BEGM gewaschen, bevor sie entweder auf eine neue Platte gesetzt oder in Einzelzellen separiert wurden. Jeweils drei Miniorgane pro Substanz wurden sofort der Zellseparation und anschließend der Genotoxizitätsuntersuchung (Mikrogelelektrophorese) sowie dem Vitalitätstest zugeführt. Die übrigen wurden auf neue, agarbeschichtete Platten mit 250 µl Medium pro Well gebracht und weiterhin in Kultur gehalten. Nach 24 Stunden wurden weitere drei Kulturen pro Substanz in Einzelzellen überführt, um die DNA-Schädigung nach 24-stündiger Reparatur bzw. Regeneration zu messen. Am 9. Tag erfolgte die 2. Inkubation mit den Testsubstanzen, zu gleichen Bedingungen wie am 7. Tag. Drei Organkulturen wurden nach der Inkubation wieder in Einzelzellen separiert, die restlichen auf frische Kulturplatten gesetzt. Wie bereits für Tag 8 beschrieben, wurde auch an Tag 10 die Reparatur der gesetzten DNA-Schäden untersucht. Am 11. Tag wurden die verbleibenden Miniorgankulturen ein drittes Mal inkubiert und in Einzelzellen separiert, um der Mikrogelelektrophorese zugeführt werden zu können (Abb. 4).

2.3.2 Isolierung der Zellen aus dem Epithelverbund

Die Isolierung der Zellen erfolgte durch 45-minütige Inkubation in einem Enzymmix nach Pool-Zobel et al. [1994], bestehend aus 5 mg/ml Protease (Sigma, Steinheim), 1 mg/ml Hyaluronidase (Boehringer, Mannheim) und 1 mg/ml Kollagenase P (Boehringer) in BEGM gelöst. Jeweils zwei Miniorgane wurden in einem Reaktionsgefäß in 600 µl Enzymmix 45 Minuten lang im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Durch kurzes Rütteln mit einem Minishaker (MS1, IKA, Wilmington, USA) wurden die gelösten Zellen vom bindegewebehaltigen Kern getrennt. Mit einer sterilen Kanüle konnte dieser Kern aus dem Gefäß entfernt werden. Die Zugabe von 600 µl FCS (fötale Kälberserum, Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) neutralisierte die Enzyme und verhinderte eine Verklumpung der Zellen. Die Zellsuspension wurde bei 800 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes wurden 1000 µl kaltes PBS (Phosphate Buffered Saline, Gibco Lifetechnologies) zugegeben, der Gefäßinhalt durchmischt und erneut bei 800 U/min zentrifugiert. Dieser Waschvorgang wurde wiederholt. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet für die Mikrogelelektrophorese oder zur Vitalitätsbestimmung weiter verwendet.

2.3.3 Bestimmung der Vitalität

Die Messung der Vitalität erfolgte über den Trypanblau-Ausschlusstest [Phillips, 1973]. Unmittelbar vor der Messung vermischte man ein Aliquot der Zellsuspension mit Trypanblau-Lösung. Ein Tropfen dieser Suspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Vitale Zellen färben sich aufgrund der intakten Zellmembran nicht. Avitale Zellen erscheinen dagegen blau, da der Farbstoff durch die bereits geschädigte Membran eindringen kann. Ermittelt wurde der Prozentsatz vitaler Zellen aus 16 Kleinquadraten.

2.4 Untersuchung der DNA-Schädigung

2.4.1 Grundlagen der Methode

Die alkalische Version der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) ist ein Verfahren zum Nachweis von DNA-Schäden an Einzelzellen. Hierbei werden überwiegend Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und inkomplette Exzisionsreparaturvorgänge dargestellt. Nach Lysierung der Membranen und somit Freilegung der DNA innerhalb einer Agaroseschicht folgt eine Alkali-Behandlung, die eine Entwindung der DNA-Helixstruktur ermöglicht. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Anfärbung der gewanderten, induzierten DNA-Fragmente ist es möglich, anhand der Migrationsstrecke und der Fluoreszenzintensität im Schweif des Kometen das Ausmaß eines DNA-Schadens zu quantifizieren.

2.4.2 Fixierung der Zellen auf Objektträgern

Um eine bessere Haftung der Zellen auf den Objektträgern zu gewährleisten, wurden diese vorpräpariert. Nach Markierung der an den Längsseiten mattierten Objektträger (Langenbrinck, Emmendingen; 24 x 70 mm) wurde eine erste Agaroseschicht aufgetragen, die aus 85 µl einer 0,5 % Normal Melting Agarose (FMC Bio Products, Rockland, USA) bestand. Durch Abdecken mit einem Glas der Stärke 0 (Langenbrinck) verteilte sich die Agarose homogen. Nach dem Antrocknen der Agarose wurden die Objektträger weiter verwendet.

Das Zellpellet wurde in 75 µl 0,7 % Low Melting Agarose (FMC Bio Products) aufgenommen und als zweite Schicht auf die vorbereiteten Objektträger aufgetragen, mit einem Deckglas versehen und auf eine gekühlte Metallplatte gelegt. Eine dritte Agaroseschicht (85 µl, 0,7 %) diente zur vollständigen Einbettung der Zellen. Nachdem sich die beiden letzten Schichten verfestigt hatten, wurde das Glas vorsichtig abgezogen.

2.4.3 Lysierung von Zell- und Kernmembran

Zur Freilegung der DNA für die anschließende Elektrophorese wurden Zell- und Kernmembranen der eingebetteten Zellen mindestens eine Stunde lang bei 4 °C lysiert. Dazu stellte man die Objektträger vertikal in eine Färbekammer, die mit 100 ml einer frisch angesetzten Lyselösung gefüllt war (2,5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 1 % N-Lauroylsarcosinsalz, 10 mM Trisma-Base, 1 % Triton-X und 10 % DMSO, pH 10).

2.4.4 Elektrophoretische Auftrennung der DNA

Nach Auflösung der Membranen wurden die Objektträger aus der Lyselösung herausgenommen, die Restlösung vorsichtig abgewischt und horizontal anodenwärts in eine wassergekühlte Elektrophoresekammer (Renner, Dannstadt) gelegt. Bis zu ihrer vollständigen Bedeckung wurde ein auf 4 °C temperierter Elektrophoresepuffer (300 mM NaOH, 1 mM Na₂EDTA, pH 12) nachgefüllt. Nach 20 Minuten alkalischer Denaturierung und Entspiralisierung der DNA wurde die Elektrophorese gestartet (25 V, 300 mA). Substanzinduzierte DNA-Fragmente konnten nun im elektrischen Feld in Richtung Anode wandern. Nach 20 Minuten wurden die Objektträger aus der Kammer genommen und auf einer Färbebrücke dreimal im Abstand von fünf Minuten mit 400 mM Trisma-Base neutralisiert. Abschließend wurden alle mit 75 µl des DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffs Ethidiumbromid (Sigma, Steinheim; 50 µM) angefärbt und in angefeuchteten, lichtgeschützten Objektträgerkästen bis zur Auswertung aufbewahrt.

2.4.5 Digitale Analyse der DNA-Migration

Die Auswertung der angefärbten DNA auf den Objektträgern erfolgte mit einem DMLB Fluoreszenzmikroskop (Leica, Heerbrugg, Schweiz) und einer daran gekoppelten CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (Komet 3.1, Kinetic ImagingTM, Liverpool, GB).

Abhängig vom Ausmaß der induzierten Strangbrüche zeigen die DNA-Fragmente im elektrischen Feld verschiedene Migrationsmuster. Je stärker die Schädigung, desto schneller und somit weiter wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Daraus resultiert ein kometenähnliches Bild, mit weitgehend ungeschädigter DNA im Kopf und geschädigter DNA im Schweif des Kometen (Abb. 5). Um das Ausmaß der DNA-Schädigung zu beschreiben, wurde der Olive Tail Moment (OTM) eingesetzt. Dieser gibt das Produkt aus der mittleren DNA-Wanderungstrecke und dem Anteil der DNA im Kometenschweif in Relation zur

Gesamt-DNA einer Zelle an [Olive und Banath, 1993]. So kann eine quantitative Aussage über die DNA-Fragmentierung getroffen werden. Üblicherweise wird der OTM ohne Einheit angegeben.

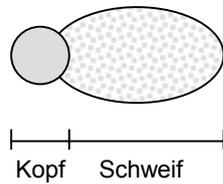


Abbildung 5: Schematische Darstellung eines Kometen. Im Kopf des Kometen befindet sich weitgehend intakte DNA, im Schweif die im elektrischen Feld gewanderte, fragmentierte DNA.

2.5 Untersuchungen zur Apoptose

2.5.1 Grundlagen der Methode

Mit dem Annexin V-Test kann man frühe Apoptose von später Apoptose und von Nekrose unterscheiden. Die Verlagerung von Phosphatidylserin, einem Phospholipid auf der Innenseite der Plasmamembran, auf die Außenseite ist ein frühes Ereignis im Ablauf der Apoptose. Das Zelladhäsionsprotein Annexin V kann an das Phosphatidylserin binden, falls sich dieses bereits auf der Membranaußenseite befindet (Abb. 6). Das verwendete Annexin V ist mit einem Fluoreszenzmarker gekoppelt. Innerhalb kurzer Zeit kann man frühe Apoptose mikroskopisch oder zytometrisch quantifizieren. Eine zusätzliche Gegenfärbung der DNA mit Propidiumiodid ist wichtig, um früh-apoptotische Zellen mit intakter Membran von spät-apoptotischen oder nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Diese färben sich aufgrund der beschädigten Membran mit Propidiumiodid an. Ist die Plasmamembran zerstört, bindet Annexin V auch im Zellinnern und liefert falsch positive Signale [van Engeland et al., 1998].

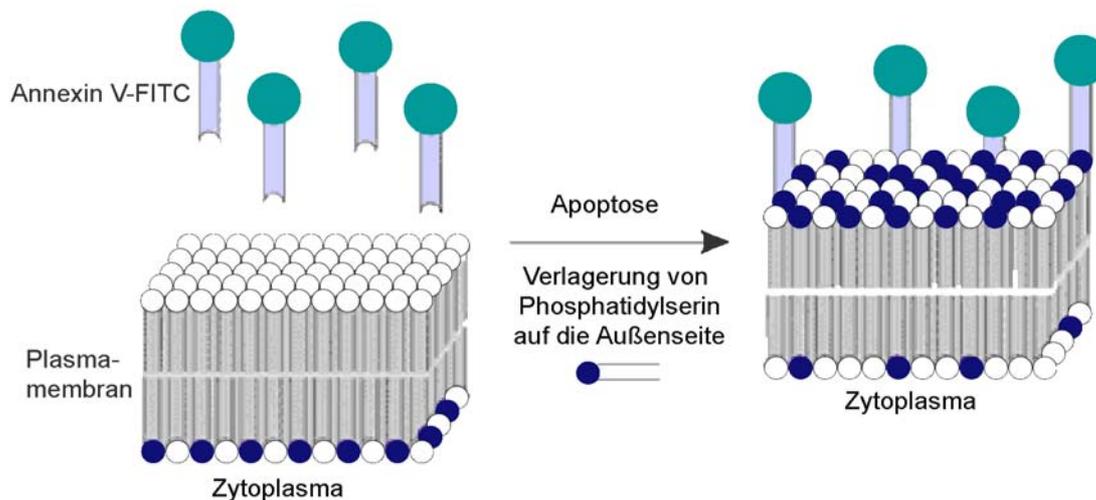


Abbildung 6: Verlagerung von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Plasmamembran während der Apoptoseinduktion. Quelle: Clontech [1996].

2.5.2 Präparation und Färbung der Zellen

Das durch die Separation der Miniorgane erhaltene Zellpellet wurde in 200 µl Waschpuffer (Clontech, Palo Alto, USA) resuspendiert und bei 800 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurden die Zellen erneut in 200 µl Waschpuffer aufgenommen und 5 µl FITC- (Fluoreszeinisothiocyanat) markiertes Annexin V (Clontech) sowie 10 µl Propidiumiodid (Clontech) zugesetzt. Nach kurzem Durchmischen folgte unter Lichtausschluss eine 10minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 50 µl der Zellsuspension auf einen beschrifteten Objektträger aufgebracht, mit einem Deckglas versehen und unter dem Licht- bzw. Fluoreszenzmikroskop (DMLB, Leica) ausgewertet.

2.5.3 Auswertung

Zur Auswertung wurden 100 Zellen herangezogen. Der erste Schritt bestand aus der Bestimmung der Zellzahl eines Bildausschnittes im Durchlicht. Als nächstes wurde im gleichen Bildausschnitt unter blauem Fluoreszenzlicht (Filter: I3; 450-490 nm) die Anzahl grün- oder rotfluoreszierender Zellen analysiert. Nach Auswertung von 100 Zellen wurde der Anteil früh-apoptotischer Zellen (grün, Phosphatidylserin an Membranaußenseite) und spät-apoptotischer oder nekrotischer Zellen (rot, Membranschädigung) erfasst.

2.6 Untersuchungen zur Zytokinproduktion

2.6.1 Grundlagen der Methode

Die Zytokinkonzentrationen wurden aus dem Überstand der Miniorgankulturen mittels ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) festgestellt (Abb. 7).

Die Wells einer Mikrotiterplatte sind mit dem für das Zytokin spezifischen monoklonalen Antikörper beschichtet. Proben, Standards und Kontrollen werden in die Wells pipettiert und anschließend der biotinylierte, monoklonale sekundäre Antikörper zugegeben. Während der ersten Inkubation bindet das spezifische Antigen gleichzeitig an den immobilisierten Antikörper auf der Platte und an den biotinylierten in der Lösung. Nach Entfernen des überschüssigen zweiten Antikörpers wurde das Enzym Streptavidin-Peroxidase zugegeben. Dieses heftet sich an den biotinylierten Antikörper. Nach der zweiten Inkubation und dem Entfernen des überschüssigen Enzyms wurde eine Substratlösung beigegefügt, welche über das gebundene Enzym farbig reagiert. Die Farbintensität dieses Produkts ist direkt proportional zur Konzentration des Zytokins, das in der Probe vorhanden ist.

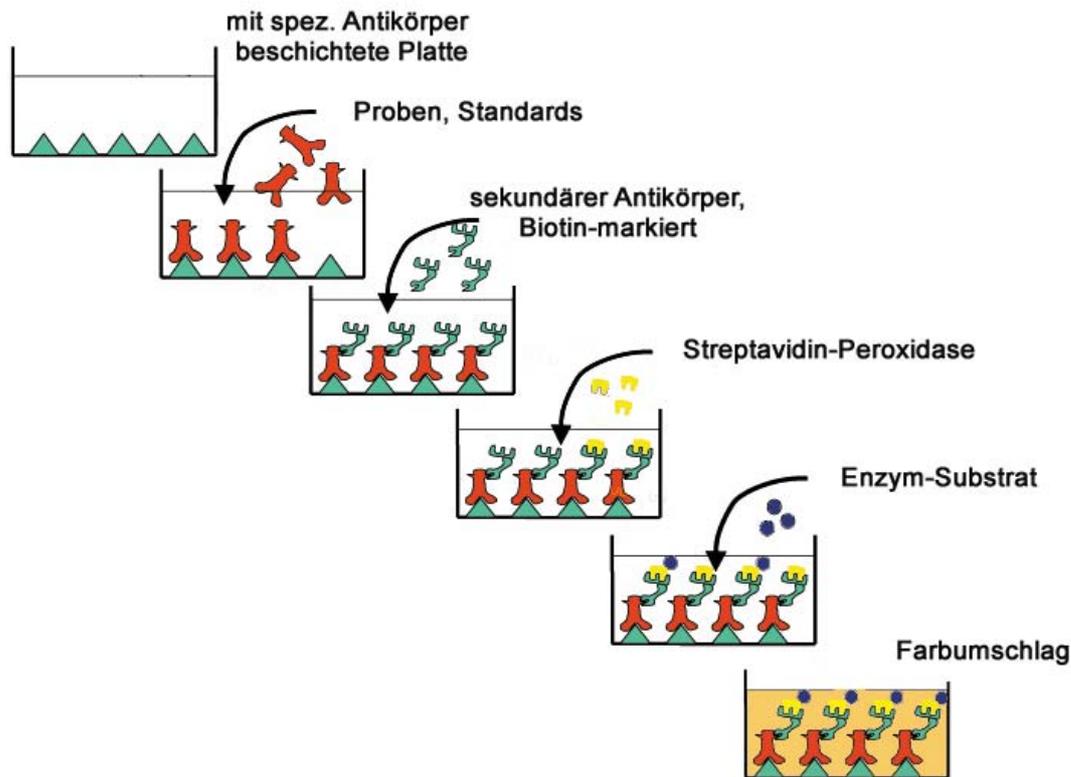


Abbildung 7: ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) zur Bestimmung der Zytokinkonzentration. Die Platte ist mit dem spezifischen Antikörper beschichtet. Nach Zugabe der dargestellten Reagenzien werden die nichtgebundenen Moleküle gewaschen. Die Intensität des Farbumschlags ist ausschlaggebend für die in der Probe enthaltene Zytokinmenge.

2.6.2 Vorbereitung der Reagenzien und Proben

Alle Reagenzien (Biosource, Nivelles, Belgien) mussten erst Raumtemperatur erlangen, bevor sie verwendet werden konnten. Zuerst wurden 50 ml des 25-fach konzentrierten Waschpuffers (Biosource) in 1250 ml Aqua bidest. gelöst. Das 100-fache Streptavidin-Peroxidase-Konzentrat (Biosource) wurde ebenso in entsprechendem Puffer verdünnt (120 μ l in 12 ml). Zur Herstellung des Standardkonzentrats wurde der lyophilisierte humane Interleukin-8 (hIL-8) Standard (Biosource) in 1040 μ l bzw. der humane Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (hGM-CSF) Standard (Biosource) in 930 μ l Standardpuffer (Biosource) gegeben und vermischt. Nun wurden die Konzentrate für eine Standardkurve verdünnt (Tabelle 1 und 2). Standardpuffer und entsprechende Standards wurden in ein beschriftetes Reaktionsgefäß pipettiert und gut gemixt, bevor diese Lösung für die nächste Konzentration verwendet wurde.

Tabelle 1: Pipettierschema für das Ansetzen der Standardkurve für IL-8.

Standard	Konzentration	Vorlage	Standardpuffer
8	1000 pg/ml	100 µl Konzentrat	900 µl
7	500 pg/ml	300 µl Standard 8	300 µl
6	250 pg/ml	300 µl Standard 7	300 µl
5	125 pg/ml	300 µl Standard 6	300 µl
4	62,5 pg/ml	300 µl Standard 5	300 µl
3	31,2 pg/ml	300 µl Standard 4	300 µl
2	15,6 pg/ml	300 µl Standard 3	300 µl
1	0 pg/ml		300 µl

Tabelle 2: Pipettierschema für das Ansetzen der Standardkurve für GM-CSF.

Standard	Konzentration	Vorlage	Standardpuffer
8	250 pg/ml	25 µl Konzentrat	575 µl
7	125 pg/ml	300 µl Standard 8	300 µl
6	62,5 pg/ml	300 µl Standard 7	300 µl
5	31,2 pg/ml	300 µl Standard 6	300 µl
4	15,6 pg/ml	300 µl Standard 5	300 µl
3	7,8 pg/ml	300 µl Standard 4	300 µl
2	3,9 pg/ml	300 µl Standard 3	300 µl
1	0 pg/ml		300 µl

Nachdem die eingefrorenen Proben aus den Miniorgankultur-Überständen Raumtemperatur erreicht hatten, wurden sie gut vermengt. Für die IL-8 Bestimmung wurden sie auf einer separaten, nicht proteinbindenden 96-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden) mit Standardpuffer (Biosource) im Verhältnis 1:50 verdünnt, gemischt und mit Klebestreifen bis zur weiteren Verwendung verschlossen. Die Proben für die Bestimmung des GM-CSF wurden unverdünnt eingesetzt.

2.6.3 Durchführung des Tests

Auf jeder Platte wurden zwei Wells als Leerwerte freigelassen. Sowohl für die Standards als auch für die verdünnten Proben wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Dadurch konnten pro Platte neben den acht Standardkonzentrationen weitere 39 Proben bestimmt werden.

50 µl der Standards bzw. der Proben wurden auf die vorgesehenen Wells der ELISA-Platte pipettiert, Probennummer und Plattenposition notiert. Nach Zugabe von 50 µl biotinyliertem anti-hIL-8 Konjugat (Biosource) bzw. anti-hGM-CSF Konjugat (Biosource), jedoch nicht in die Leerwertansätze, erfolgte eine 90-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Dekantieren der Platte wurden alle Wells mit 300 µl Waschpuffer (Biosource) gefüllt. Dieser Waschvorgang war insgesamt viermal durchzuführen. In jedes Well - die Leerwertansätze ausgenommen - wurden nun 100 µl Streptavidin-Peroxidase (Biosource) pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach vier weiteren Waschschrritten erfolgte die Zugabe von je 100 µl Chromogensubstrat (Biosource) und eine Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln, welche mit einer Blaufärbung verbunden war. Um die Substratreaktion zu stoppen, wurden in jedes Well 100 µl Stopp-Lösung (Biosource) pipettiert, was einen Farbumschlag der Lösung ins Gelbe bewirkte. Innerhalb zwei Stunden konnte von jedem Well der Platte bei 450 nm mit einem ELISA-Reader (Medgenix, Düsseldorf) die Absorption gemessen werden.

2.6.4 Messung und Auswertung

Der ELISA-Reader wurde gegen die Leerwerte, in denen sich nun lediglich Chromogensubstrat und Stopp-Lösung befanden, tariert. Mit Hilfe der Software Mikrowin 3.0 (Mikrotek, Overath, Deutschland) konnte die Absorption eines jeden einzelnen Wells bestimmt und über eine Standardkurve die Konzentration von IL-8 bzw. GM-CSF in den Proben berechnet werden. Dazu war die Eingabe bestimmter Parameter, wie IL-8 bzw. GM-CSF-Konzentration der Standards, Verdünnungsfaktor der Proben (1:50 für IL-8) und Auswahl der Kurvenanpassung zur Berechnung der Dosis-Wirkungskurve, erforderlich.

2.7 Untersuchungen zur DNA-Reparatur

2.7.1 Grundlagen der Methode

DNA-Reparatur ist über den Rückgang einer induzierten DNA-Fragmentierung messbar. Im Anschluss an eine DNA-Schädigung von Lymphozyten wird ein Reparaturintervall gewährt und das Ausmaß der noch verbliebenen, nicht reparierten DNA-Schädigung mittels Mikrogelelektrophorese festgestellt. Eine andere Möglichkeit zur Untersuchung der DNA-Reparatur bietet die Bestimmung der individuellen Aktivität von Enzymen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Der Proteinextrakt von Lymphozyten enthält Reparaturenzyme einer individuellen, unbestimmten Aktivität. Über Inkubation dieses Extraktes mit vorgeschädigter Substrat-DNA können unterschiedliche Reparaturaktivitäten verglichen werden.

2.7.2 DNA-Reparatur von Lymphozyten *in vitro*

2.7.2.1 Isolierung der Lymphozyten

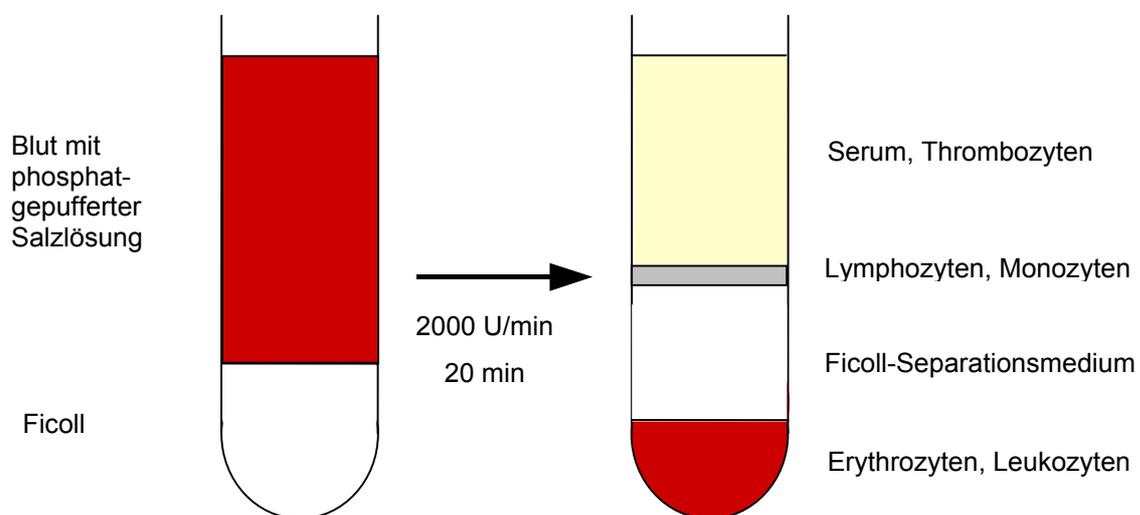


Abbildung 8: Isolierung von Lymphozyten über das Ficoll-Separationsmedium.

Von zehn ausgewählten Spendern (Anamnesen siehe Anhang, Tab. 20) wurden 18 ml heparinisiertes Vollblut mit 9 ml PBS vermischt und anschließend vorsichtig auf 15 ml Ficoll-Separationsmedium (Biochrom, Heidelberg) geschichtet, das in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt wurde. Darauf erfolgte für 20 Minuten die Zentrifugation bei 2000 U/min mit freiem Auslauf. Dabei bildeten sich verschiedene Schichten (Abb. 8).

Lymphozyten und Monozyten waren in einer milchigen Bande zu finden. Die Schicht darüber bestand aus Serum mit Thrombozyten, darunter sammelte sich das restliche Ficoll-Separationsmedium. Im Pellet waren Erythrozyten, restliche Leukozyten und Mediumreste enthalten. Die Lympho- und Monozytenbande wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und zu 15 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS; Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) gegeben. Wieder wurde 10 Minuten lang bei 2000 U/min mit Bremse zentrifugiert und das entstandene Zellpellet danach in 1 ml fötalem Kälberserum (FCS) resuspendiert. Zur Bestimmung von Vitalität und Zellzahl wurde ein Aliquot der Lymphozytensuspension mit der gleichen Menge Trypanblau vermischt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgewertet. Die Lymphozyten wurden portioniert und in 90 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt) eingefroren. Für den Mikrokerntest wurden 5×10^6 Zellen/ml, für die Reparatur-Untersuchungen an Lymphozyten 2 bis $2,5 \times 10^6$ Zellen/ml in Kryogefäße (Nalgene, Rochester, USA) gefüllt und in einem mit Isopropanol gefüllten Behälter (Nalgene), der eine Temperaturabnahme von 1°C pro Stunde zulässt, im -80°C Gefrierschrank aufbewahrt. Nach 24 Stunden konnten die tiefgefrorenen Lymphozyten bei -80°C gelagert werden, ohne Genotoxizitätsuntersuchungen zu beeinträchtigen [Schmezer et al., 2001].

2.7.2.2 Versuchsansätze

Pro Spender wurden drei Parallelversuche mit jeweils verschiedenen Medienzusätzen durchgeführt. Im ersten Ansatz wurden Lymphozyten in 85 % RPMI 1640 (Rosewell Park Memorial Institut; Biochrom, Heidelberg) und 15 % FCS (Lymphozytenmedium) ohne weitere Zusätze inkubiert.

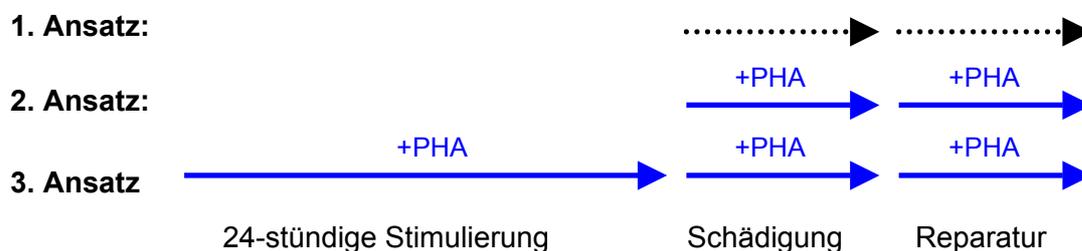


Abbildung 9: Übersicht der verschiedenen Versuchsansätze der Lymphozytenreparatur ohne und mit PHA-Zusatz während der Schädigungs- und Reparaturphase sowie mit 24-stündiger PHA-Stimulierung. PHA: Phytohämagglutinin.

In einem Parallelansatz war das Lymphozytenmedium mit 4,8 µg/ml Phytohämagglutinin (PHA; Biochrom, Heidelberg) supplementiert. Ein dritter Ansatz erforderte eine 24-stündige Stimulierungsphase der Lymphozyten mit PHA. Aliquots von 5×10^6 Lymphozyten wurden in 4,9 ml mit PHA versetztem Lymphozytenmedium in sterilen Zellkulturfläschchen (25 ml; Sarstedt, Nümbrecht) 24 Stunden lang im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.7.2.3 Auftauen der Proben

In einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurden 10 ml 4 °C kaltes PBS vorgelegt. Die eingefrorenen Kryogefäße mit den Lymphozytenaliquots wurden so weit aufgetaut, bis nur noch ein letzter Eisrest zu erkennen war. Dann wurde die Suspension aus Lymphozyten in Tieffriermedium in das vorbereitete PBS überführt und 10 Minuten lang bei 4 °C und 2000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet in 1 ml Lymphozytenmedium resuspendiert.

Vitalitätsbestimmung und Zellzählung erfolgten über den oben beschriebenen Trypanblau-Ausschlusstest (siehe Kapitel 2.3.3). Die Lymphozytensuspension wurde mit entsprechendem Medium auf 5 bis 10×10^5 Zellen/ml verdünnt.

2.7.2.4 Fremdstoffinkubation

In 13 ml Zentrifugenröhrchen mit rundem Boden (Sarstedt, Nümbrecht) wurden 1 ml Ansätze mit 5 bis 10×10^4 Lymphozyten in entsprechenden Medien (ohne PHA, mit PHA, 24-stündige Vorinkubation) hergestellt. Pro Untersuchungszeitpunkt (0-, 15-, 30- und 60-minütige Reparatur) wurden drei Ansätze angelegt, wovon zwei für die Doppelbestimmung mit der Mikrogelelektrophorese und einer für die Vitalitätstestung nach der Fremdstoffinkubation vorgesehen waren. Nach Zugabe von 10 µl H₂O₂ (Merck, Darmstadt; 2,5 µM) oder PBS (Kontrolle) wurden die Lymphozyten für eine Stunde im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert.

2.7.2.5 Reparatur und Mikrogelelektrophorese

Nach der Inkubation erfolgten zwei Zentrifugationen bei 4 °C und 2000 U/min für fünf Minuten. Der Überstand wurde jeweils dekantiert, das Zellpellet in 5 ml kaltem PBS aufgenommen und erneut zentrifugiert, um das Wasserstoffperoxid aus den Zellen zu waschen. Sowohl bei den Kontrollansätzen als auch beim Ansatz mit Wasserstoffperoxidschädigung wurde der Überstand abpipettiert, das Zellpellet in 75 µl 0,7 % Low Melting Agarose aufgenommen und auf vorbereitete Objektträger gebracht. Die Ansätze

der drei Reparaturzeitpunkte hingegen wurden mit jeweils 1 ml Lymphozytenmedium (ohne PHA, mit PHA, mit 24-stündiger PHA-Stimulierung; siehe Abb. 9) resuspendiert und für 15, 30 oder 60 Minuten erneut im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Reparaturzeit wurden die Zellsuspensionen zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Zellen gleich den Kontrollansätzen auf Objektträgern fixiert. Vitalitäten wurden im dritten Ansatz mittels Trypanblau-Ausschlusstest evaluiert. Nach Auftragen und Verfestigung der zweiten Agarose-schicht wurden die fixierten Lymphozyten in 4 °C temperierter Lyselösung zur Eliminierung von Zell- und Kernmembranen verwahrt. Elektrophoretische Auftrennung der DNA sowie die digitale Analyse der DNA-Migration fand wie in Kapitel 2.4.4, 2.4.5 beschrieben statt.

2.7.2.6 Auswertung und Ergebnisanalyse

Die Auswertung der Objektträger erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop (DMLB, Leica) und einer daran gekoppelten CCD-Kamera mit digitaler Bildverarbeitung (Komet 3.1, Kinetic Imaging™, Liverpool, GB). Um das Ausmaß der DNA-Schädigung zu beschreiben, wurde der Olive Tail Moment eingesetzt.

Pro Proband und Untersuchungszeitpunkt wurden zwei Objektträger mit je 40 Zellen ausgewertet. Der Mittelwert daraus bildet die Grundlage für die weiteren Berechnungen. Aus dem prozentualen Anteil der nach 15 Minuten persistierenden Schädigung kann nun nach folgender Formel der individuell erzielte, prozentuale Rückgang der DNA-Fragmentierung berechnet werden:

$$\text{Rückgang der DNA -Fragmentierung in \%} = 100 - \frac{\text{OTM (15 Minuten Reparatur)} * 100}{\text{OTM (H}_2\text{O}_2\text{-Schädigung)}}$$

2.7.3 Reparaturfähigkeit des Lymphozyten-Proteinextraktes

2.7.3.1 Herstellung des Proteinextraktes

Lymphozyten von zehn Spendern (Anamnesen siehe Anhang, Tab. 20) wurden aus heparinisiertem Vollblut isoliert. Die erhaltene Lymphozytenbande wurde zweimal in Extraktionspuffer gewaschen, bestehend aus 45 mM HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure; Gibco Lifetechnologies, Eggenstein), 0,4 M KCl (Sigma, Steinheim), 1 mM Na₂EDTA (Serva, Heidelberg), 0,1 mM Dithiothreitol (Sigma), 10 % Glycerol

(Sigma), mit einem pH-Wert von 7,8. Nach Möglichkeit wurde der gesamte Zellüberstand entfernt. Das Lymphozytenpellet wurde in Extraktionspuffer resuspendiert, in Aliquots von $0,5 \times 10^7$ Zellen pro 50 μl in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

Kurz vor dem Versuch wurde ein Aliquot aufgetaut und 12 μl 1 % Triton X-100 (Sigma) in Extraktionspuffer dazugegeben. Darauf folgte eine fünfminütige Zentrifugation bei 12 000 g, um Kerne und Zellreste zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen und mit dem vierfachen Volumen Reaktionspuffer aus 45 mM HEPES (Gibco Lifetechnologies), 0,25 mM Na_2EDTA (Merck), 2 % Glycerol (Sigma), 0,3 mg/ml Bovine Serum Albumin (Sigma) und einem pH-Wert von 7,8 vermischt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.7.3.2 Gewinnung und Schädigung der Substrat-DNA

Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurde eine zerkleinerte Nasenmuschel 60 Minuten lang in einem Enzymmix aus 5 mg/ml Protease (Sigma), 1 mg/ml Kollagenase (Boehringer, Mannheim), 1 mg/ml Hyaluronidase (Boehringer) inkubiert, der in Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM, PromoCell, Heidelberg) gelöst war. Zur Vermeidung von Zellklumpen wurde diese Suspension durch eine zweilagige Gaze in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gefiltert. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 400 U/min) erfolgten Resuspendierung des Pellets mit BEGM sowie Zellzählung und Vitalitätstest mittels Trypanblau-Ausschlusstest. Je 10^5 Zellen pro Ansatz wurden auf einer 96-Well-Mikrotiterplatte für eine Stunde mit $2,5\text{ }\mu\text{M}$ H_2O_2 (Merck, Darmstadt) bzw. PBS als Kontrollsubstanz und Lösungsmittel bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ im Schüttelwasserbad inkubiert, um DNA-Schäden zu induzieren. Die Zellsuspensionen wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 400 U/min fünf Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellpellet in 75 μl Agarose (0,7 %, Low Melting Agarose) aufgenommen und auf vorbereitete Objektträger (siehe Kapitel 2.4.2) aufgetragen, mit einem Deckglas versehen und auf einer gekühlten Metallplatte bis zur Verfestigung gelagert. Nach Auftragen und Verfestigung einer zweiten Schicht aus Agarose wurden sie in einer Küvette mit Lyselösung mindestens eine Stunde lang bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

2.7.3.3 DNA-Reparatur über Proteinextrakte *in vitro*

Die Objektträger wurden dreimal je fünf Minuten in mit Reaktionspuffer gefüllten Färbekammern gewaschen. 45 μl des vorbereiteten Zellextraktes eines Spenders wurden mit den vorgeschädigten, auf Objektträgern fixierten Zellen, inkubiert. PBS-behandelte DNA diente als Kontrollansatz für möglicherweise unerwünschte Endonukleaseaktivitäten im Protein-

extrakt. Da die Extrakte in Reaktionspuffer gelöst waren, fungierte dieser als Negativkontrolle. Nach Auflegen eines Deckglases wurden die Objektträger in einer feuchten Kammer eine Stunde bei 37 °C inkubiert und im Anschluss daran der Elektrophorese zugeführt.

2.7.3.4 Auswertung

Als allgemeine Basisansätze galten die Kontrollen oder H₂O₂-behandelten nasalen Zellen, welche mit Extrakt-puffer (EP) inkubiert wurden. Als individuelle Kontrollen wurden PBS-inkubierte Ansätze mit dem jeweiligen Proteinextrakt behandelt (Kontrolle + P_i). Die eigentlichen Testansätze stellten H₂O₂-exponierte Zellen mit anschließender individueller Proteinextrakt-Reparatur dar (H₂O₂ + P_i). Zur Auswertung herangezogen wurden letztlich die relativen OTM-Werte, die aus der Differenz der OTM-Werte von individuellen Testansätzen und individuellen Kontrollen berechnet wurden ($OTM_{H_2O_2+P_i} - OTM_{Kontrolle+P_i}$).

Tabelle 3: Übersicht zur Auswertung der Reparaturfähigkeit von Lymphozytenextrakten.

	Versuchsansatz	Auswertung (rel. OTM)
Basisansätze	Kontrolle + Extrakt-puffer EP	$OTM_{H_2O_2+EP} - OTM_{Kontrolle+EP}$
	H ₂ O ₂ + Extrakt-puffer EP	
indiv. Kontrollansatz	Kontrolle + indiv. Proteinextrakt P _i	$OTM_{H_2O_2+P_i} - OTM_{Kontrolle+P_i}$
indiv. Testansatz	H ₂ O ₂ + Proteinextrakt P _i	

EP: Extrakt-puffer; P_i: individuelle Proteinextrakte der Probanden 1 bis 10; Kontrolle: Kontrollansätze mit PBS; H₂O₂: wasserstoffperoxidgeschädigte Ansätze; rel. OTM: relativer Olive Tail Moment ($OTM_{H_2O_2} - OTM_{Kontrolle}$).

2.7.3.5 Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde ein Aliquot des Lymphozytenextraktes (50 µl) aufgetaut und über 12 Stunden mit 950 µl 0,1 M NaOH (Merck, Darmstadt) inkubiert. Von jeder Probe wurden 100 µl mit 900 µl einer Arbeitslösung (Pierce, Rockford, USA) vermischt. Nach Vorbereitung einer Protein-Standardkurve (BSA; Bovine Serum Albumin) wurden in jeweils zwei Parallelansätzen die Standardproben oder die zu untersuchenden Proben in eine nicht proteinbindende 96-Well-Platte (Nunc, Wiesbaden) pipettiert. Nach Zugabe von 200 µl Arbeitslösung wurde sie mit einer Folie verschlossen, kurz geschüttelt und 30 Minuten bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Platte sollte erst wieder Raumtemperatur erlangen, bevor die Absorption der einzelnen Ansätze in einem Mikrotiterplatten-Reader (MRX, Dynatech, Denkendorf) bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen wurde. Über die Standardkurve wurden die BSA-Konzentrationen der eingesetzten Proteinextrakte berechnet.

2.8 Vergleich der DNA-Schädigung in Mikrokerntest und Mikrogelelektrophorese

2.8.1 Grundlagen des Mikrokerntests

Mikrokerne entstehen durch azentrische Chromosomenfragmente oder durch vollständige Chromosomen, die während der Anaphase in der Zellteilung zurückgeblieben sind. Dies kann als Folge von Chromosomenbrüchen oder als Funktionsstörung des Spindelapparats auftreten [Fenech und Morley, 1985]. Die Zellteilung ist notwendig für die Bildung des Mikrokerns. Um quantitative Aussagen treffen zu können, ist es wichtig, den Prozentsatz von Zellen – mit und ohne Mikrokerne – zu kennen, die nach der Fremdstoffexposition eine Teilung durchgeführt haben. Das ist möglich durch Blockierung der Zytogenese mit Cytochalasin B, was zu binukleären Zellen führt [Natarajan et al., 1996].

2.8.2 Durchführung des Mikrokerntests

2.8.3 Ansetzen der Kulturen

Von 20 Spendern (Anamnesen siehe Anhang, Tab. 21) wurden Lymphozyten, die in Tieffriermedium aus 90 % FCS (Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) und 10 % DMSO (Merck) bei -80 °C gelagert waren, unter sterilen Bedingungen aufgetaut und in 10 ml PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml RPMI 1640 (Biochrom, Heidelberg) mit 15 % FCS resuspendiert und damit die Zellzahl und die Vitalität über den Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Pro Kultur wurden 5×10^6 Lymphozyten in 4,9 ml RPMI 1640 mit 15 % FCS aufgenommen und in ein steriles 25 cm² Kulturfläschchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Die Zugabe von 100 µl Phytohämagglutinin (PHA; Biochrom; 240 µg/ml) diente zur Stimulierung der Lymphozyten. Pro Spender wurden jeweils zwei Kulturen angesetzt und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert.

2.8.3.1 Inkubation mit genotoxischen Substanzen

Nach 43 Stunden wurde einer Kultur unter sterilen Bedingungen 50 mM *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA, Sigma, Steinheim) zugegeben, welches in Medium gelöst war. Als Kontrollansatz diente reine Mediumzugabe (85 % RPMI mit 15 % FCS). Nach einstündiger Inkubation wurden beide Ansätze in Zentrifugenröhrchen überführt, die Kulturflaschen mit 5 ml Hank's-Lösung (Biochrom) gewaschen und mit dem ersten Ansatz vermischt. Nach achtminütiger Zentrifugation bei 1200 U/min wurden die Überstände abgesaugt, die

Zellpellets in 5 ml Hank's-Lösung resuspendiert und erneut zentrifugiert. Anschließend wurden die Lymphozyten in 5,2 ml Lymphozytenmedium (85 % RPMI mit 15 % FCS) aufgenommen, in sterile Kulturflaschen gefüllt und weiter kultiviert.

2.8.3.2 Zugabe von Cytochalasin B

Nach 44 Stunden Kulturdauer wurde allen Ansätzen 15 µl Cytochalasin B (Sigma; 2 µg/µl in DMSO) zugegeben. In der anschließenden Kultivierung von 26 bis 28 Stunden wurde dadurch eine Teilung des Zytoplasmas verhindert, eine Kernteilung jedoch zugelassen.

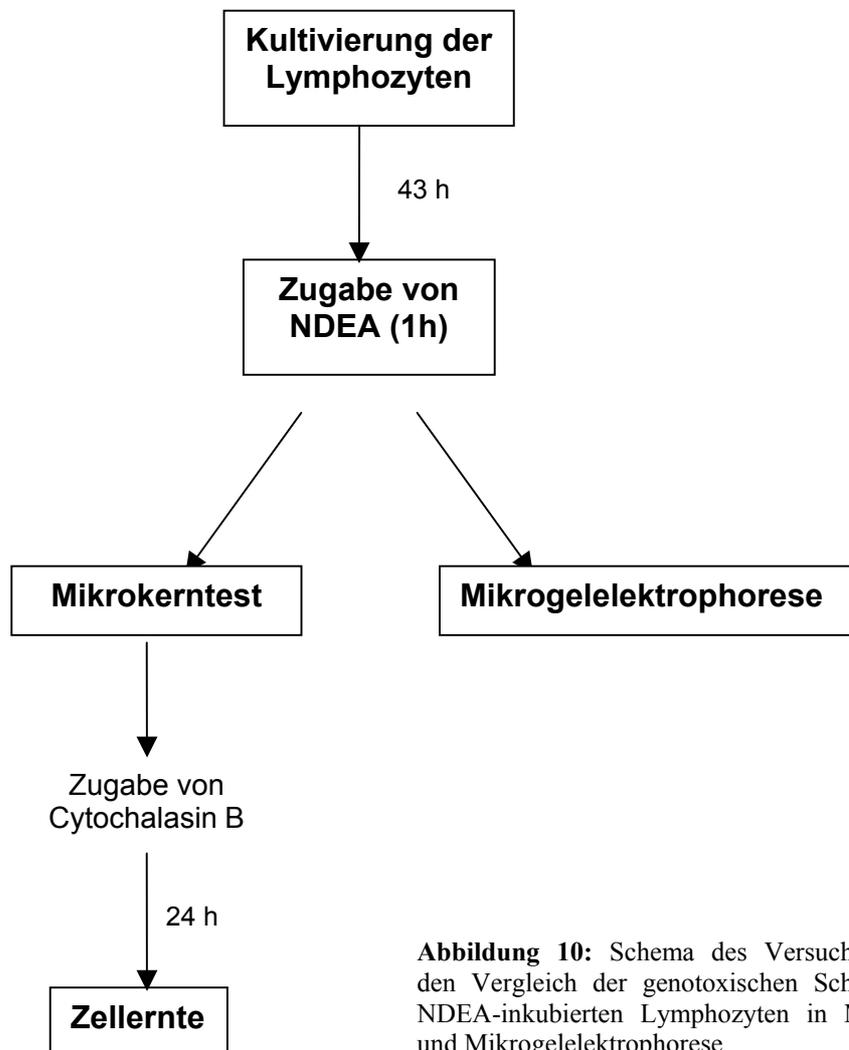


Abbildung 10: Schema des Versuchsaufbaus für den Vergleich der genotoxischen Schädigung von NDEA-inkubierten Lymphozyten in Mikrokerntest und Mikrogelelektrophorese

2.8.3.3 Zellernte

Eine Kulturdauer von 70-72 Stunden wurde gewählt, um die maximale Frequenz an Mikrokernen bestimmen zu können [Fenech und Morley, 1985]. Zur Zellernte wurde der Inhalt der Kulturflaschen mit Pasteurpipetten in 15 ml Röhrchen überführt. Mit 3 ml Hanks Lösung wurden die Flaschen nachgespült. Nun folgte eine Zentrifugation bei 1000 U/min für acht Minuten. Die Überstände wurden abpipettiert und die Pellets sofort mit 3 ml 0,075 M KCl-Lösung (Sigma) resuspendiert. Die anschließende Zentrifugation von drei Minuten erfolgte bei 800 U/min. Wieder wurden die Überstände entnommen, dem Pellet 5 ml eiskaltes Fixativ (Methanol: Eisessig 3:1; Merck, Darmstadt) zugegeben und sofort resuspendiert. Diese Ansätze blieben 10 Minuten auf Eis und wurden danach erneut bei 1000 U/min acht Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden abpipettiert und die Pellets mit 5 ml PBS und erneuter Zentrifugation gewaschen. Abermals wurde der Überstand entfernt und mit 5 ml eiskaltem Fixativ, wie oben beschrieben, behandelt. Nach 10-minütiger Fixierung auf Eis und wiederholter Zentrifugation wurden die Überstände bis auf ein Restvolumen von 50 bis 100 µl entfernt und die Niederschläge mit einer Pasteurpipette vorsichtig resuspendiert.

2.8.3.4 Objektträgerpräparation und Färbung

Je 10 µl Zellsuspension wurde mäanderförmig auf gesäuberte, entfettete und markierte Objektträger aufgetragen und luftgetrocknet. Pro Kultur wurden drei Objektträger angefertigt. Eine Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Acridin-Orange (Serva, Heidelberg) diente zur Differenzierung von Zytoplasma und Zellkernen. Dazu wurden 50 µl einer 0,01 mg/ml Acridin-Orange-Lösung auf die Objektträger gebracht und mit einem Deckglas verteilt. Nach einer etwa 10-minütigen Einwirkzeit konnten die binukleären Zellen und Mikrokerne unter dem Fluoreszenzmikroskop mit dem Filter I3 (BP 450-490) ausgezählt werden. Das Zytoplasma einer Zelle färbte sich rot, das Kernmaterial gelb. Die Objektträger wurden unmittelbar nach der Färbung ausgewertet.

2.8.4 Auswertung

Die Anzahl von Mikrokernen aus 1000 binukleären Zellen wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop (DMLB, Leica) bestimmt. Das Auftreten von mehreren Mikrokernen in einer doppelkernigen Zelle wurde als ein Ereignis gewertet.

Folgende Punkte waren bei der Auswertung von Mikrokernen zu beachten [Lasne et al., 1984]:

- Das Zytoplasma der gezählten Zellen muss vollständig erhalten sein.
- Sind beide Kerne einer Zelle von unterschiedlicher Größe, muss der kleinere wenigstens halb so groß sein wie der größere.
- Mikrokerne dürfen nicht größer sein als 1/5 des kleineren Zellkerns.
- Mikrokerne müssen deutlich im Zytoplasma liegen.
- Mikrokerne sollen klar von den Zellkernen getrennt vorliegen und die gleiche Fluoreszenzintensität wie die Zellkerne aufweisen.

Das Ergebnis wurde in Mikrokernen/1000 doppelkernigen Zellen angegeben.

2.8.5 Durchführung der Mikrogelelektrophorese

Nachdem die Kulturansätze für den Mikrokerntest mit 50 mM *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA, Sigma, Steinheim) inkubiert und gewaschen worden waren, wurden die Lymphozyten in neues Medium aufgenommen (Kap. 2.8.3.1). Von jedem Ansatz wurden 3 x 100 µl für die Bestimmung der DNA-Fragmentierung mittels Mikrogelelektrophorese in separate Zentrifugenröhrchen gegeben. Diese wurden erneut bei 1200 U/min acht Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 0,7 % Low Melting Agarose (FMC, Bio Products, Rockland, USA) aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde auf markierte Objektträger gegeben und durch das Auflegen eines Deckglases (Langenbrinck, Emmendingen) gleichmäßig verteilt. Nach Lysierung der Zell- und Kernmembranen folgte die elektrophoretische Auftrennung der DNA.

2.8.6 Auswertung des Vergleichs von Mikrokerntest und Mikrogelelektrophorese

Die im Mikrokerntest ermittelten Frequenzen von Mikrokernen pro 1000 binukleärer Zellen in Kontroll- und in NDEA-inkubierten Ansätzen wurden den in der Mikrogelelektrophorese gemessenen DNA-Schäden gegenübergestellt.

2.9 Statistische Analyse

2.9.1 Darstellung der Ergebnisse

Die graphische Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Boxplots, die mit dem Datenanalyseprogramm SPSS 10.0 angefertigt wurden. Der Boxplot besteht aus einer Box, die vom 25. Perzentil (25 % aller Werte sind kleiner) und vom 75. Perzentil (25 % aller Werte sind größer) begrenzt wird. Die innere Linie repräsentiert den Median. Ferner werden der kleinste und der größte Wert durch die umgekehrte bzw. obere T-Linie markiert. Extremwerte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen, werden mit einem Stern markiert, Ausreißerwerte, die um mehr als eineinhalb Kastenlängen außerhalb liegen, mit einem Kreis.

Da die Fragestellungen in dieser Arbeit explorativer Art sind und keine Hypothesen getestet, sondern Gruppenunterschiede evaluiert werden, wird ein lokales α -Niveau von $p \leq 0,05$ festgelegt. Falls die ermittelten p-Werte innerhalb des α -Niveaus liegen, werden diese in der Graphik dargestellt.

2.9.2 Ergebnisanalyse der Untersuchungen zur Genotoxizität

Die statistische Analyse basiert auf dem mittleren OTM-Wert von 80 Zellen (zwei Objektträger je Ansatz, 40 Zellen je Objektträger), die pro getesteter Substanz und pro Spender ausgewertet wurden. Der genotoxische Effekt der Fremdstoffbehandlung sowie die anschließenden Reparaturintervalle auf die DNA-Migration der 20 Testansätze wurden mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Daten (SPSSTM 10.0) analysiert. Die an verschiedenen Tagen getesteten Miniorgankulturen stammen von denselben Spendern. Das Ausmaß der DNA-Schädigung nach einmaliger Inkubation wurde mit der nach zwei- und der dreimaliger Inkubation verglichen (Tag 7 vs. Tag 9, Tag 9 vs. Tag 11). Ebenso wurde der Effekt der 24-stündigen Reparatur (Tag 8 und 10) mit den vorhergehenden Schädigungen (Tag 7 und 9) in Beziehung gesetzt. Das lokale α -Niveau wurde mit $p \leq 0,05$ definiert.

2.9.3 Ergebnisanalyse der Untersuchungen zur Apoptose

Bei den Apoptoseuntersuchungen liegen der statistischen Analyse die prozentualen Anteile an früh- oder spät-apoptotischen Zellen von 100 ausgewerteten Zellen pro Ansatz zugrunde. Der Einfluss einer Fremdstoffexposition sowie der Effekt einer mehrmaligen Exposition humaner Minorgankulturen nasaler Mukosa auf die Induktion apoptotischer Vorgänge werden mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Daten (SPSSTM 10.0) analysiert. Die an den Tagen 7, 9 und 11

untersuchten Miniorgankulturen stammen von denselben Spendern. Der prozentuale Anteil früh- und spät-apoptotischer Zellen fremdstoffexponierter Miniorgane wurde mit unbehandelten Kulturen verglichen. Außerdem wurden Unterschiede im Apoptoseverhalten durch einmalige bzw. wiederholte Fremdstoffbelastungen analysiert (Tag 7 vs. Tag 9, Tag 9 vs. Tag 11). Das lokale α -Niveau wurde mit $p \leq 0,05$ definiert.

2.9.4 Ergebnisanalyse zur Bestimmung der Zytokinproduktion

Für die Bestimmung der Zytokinproduktion während der normalen Kultivierung der Miniorgane sowie für den Vergleich fremdstoffinduzierter Konzentrationsveränderungen wurde der Wilcoxon-Test für abhängige Daten (SPSSTM 10.0) angewendet. Die Ergebnisse basieren auf Doppelbestimmungen von je 20 Ansätzen zur Beobachtung der Kultivierung und je 12 Parallelansätzen für die Untersuchung fremdstoffinduzierter Konzentrationsveränderungen. Die an den verschiedenen Tagen getestete Zytokinproduktion ist auf Organkulturen derselben Spender zurückzuführen. Verglichen wurde die freigesetzte Menge an IL-8 oder GM-CSF an den Kulturtagen 2, 7, 9 und 11. Außerdem wurde eine durch Xenobiotika verursachte Veränderung durch Gegenüberstellung der Zytokinproduktion exponierter und nicht exponierter Miniorgankulturen untersucht. Das lokale α -Niveau wurde mit $p \leq 0,05$ definiert.

2.9.5 Ergebnisanalyse zur DNA-Reparatur

Für die Untersuchung der DNA-Reparatur an H₂O₂-geschädigten Lymphozyten wurden ebenfalls 80 Zellen pro Spender und untersuchtem Zeitpunkt ausgewertet. Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse nach den verschiedenen Reparaturintervallen wurde an jedem Untersuchungszeitpunkt (0, 15, 30 und 60 Minuten) der Medianwert der 10 Untersuchungen sowie der Standardfehler berechnet. Zur Veranschaulichung der individuellen Reparaturkapazität wurden jeweils die Ergebnisse der Einzelversuche angegeben. Darüber hinaus wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson zwischen den mit zwei verschiedenen Methoden ermittelten Ergebnissen berechnet. Dieser misst die Stärke eines linearen Zusammenhangs zwischen zwei Merkmalen und nimmt dafür Werte zwischen -1 und +1 an. Je stärker der Wert von Null gegen Eins geht, desto stärker ist die Korrelation.

2.9.6 Ergebnisanalyse zum Vergleich Mikrokerntest – Mikrogelelektrophorese

Die Auswertung der Mikrokernelfrequenz erfolgte auf jeweils drei parallel angefertigten Objektträgern eines Ansatzes. Kontroll- und NDEA-exponierte Kulturen stammten von je einem Spender. Auch beim Vergleich des Mikrokerntests mit der Mikrogelelektrophorese wurde mit derselben Lymphozytenkultur gearbeitet. Statistische Analysen wurden deshalb mit dem Wilcoxon-Test für abhängige Daten (SPSSTM 10.0) durchgeführt. Vorausgehend wurde in beiden Methoden die durch das Nitrosamin induzierte DNA-Schädigung gegenüber den Kontrollansätzen analysiert. Anschließend wurde das Ausmaß der Genotoxizität von NDEA im Mikrokerntest und in der Mikrogelelektrophorese verglichen. Das lokale α -Niveau wurde mit $p \leq 0,05$ definiert. Außerdem wurde der Korrelationskoeffizient r nach Pearson zwischen den im Mikrokerntest und den in der Mikrogelelektrophorese erzielten Ergebnissen berechnet.

2.10 Methodenspezifische Labormaterialien

2.10.1 Enzyme, Zellkulturmedien und Chemikalien

Enzyme, Zellkulturmedien und Zusätze	Firma
Aminosäuren, nicht essentiell	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Amphotericin B	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM)	Promocell, Heidelberg
Supplement Pack für BEBM	Promocell, Heidelberg
DMEM- Medium	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Hank's Lösung	Biochrom, Heidelberg
HEPES (N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Hyaluronidase aus Schafshoden	Roche, Mannheim
Kollagenase P aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Roche, Mannheim
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim
Phosphate Buffered Saline (PBS, ohne Calcium, Magnesium und Natriumbicarbonate)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Phytohämagglutinin (PHA)	Biochrom, Heidelberg
Protease aus <i>Streptomyces griseus</i>	Sigma, Steinheim
Rosewell Park Memorial Institut 1640 (RPMI): w/NaHCO ₃ , N-Acetyl-L-alanyl-L-glutamin	Biochrom, Heidelberg

Chemikalien	Firma
Acridin-Orange	Serva, Heidelberg
Agar Noble	DIFCO, Detroit, USA
Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid (BPDE)	Midwest Research Institute, Kansas, USA
Benzol	Sigma, Steinheim
Bovine Serum Albumin	Sigma, Steinheim
Cytochalasin B	Sigma, Steinheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dithiothreitol	Sigma, Steinheim
Eisessig	Merck, Darmstadt
Eosinlösung	Merck, Darmstadt
Ethanol 100 %, 80 %, 75 %	Klinikapotheke der LMU München
Ethidiumbromid	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz	Serva, Heidelberg
Eukitt	Klinikapotheke der LMU München
Ficoll-Separationsmedium	Biochrom, Heidelberg
Formalinlösung 4 %	Klinikapotheke der LMU München
Glycerol	Sigma, Steinheim
Hämatoxylinlösung	Merck, Darmstadt
Histoplast	Serva, Heidelberg
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma, Steinheim
Low-Melting-Agarose: Sea-Plaque GTG	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Methanol	Merck, Darmstadt
Methylbenzoat	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Natriumdichromat (Na ₂ Cr ₂ O ₇)	Sigma, Steinheim
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid Plätzchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
<i>N</i> -Lauroylsarcosin Natrium Salz (C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, Steinheim
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin (MNNG)	Aldrich, Milwaukee, USA
<i>N</i> -Nitrosodiethylamin (NDEA)	Sigma, Steinheim
Normal-Melting-Agarose: Seakem LE	FMC-Bio Products, Rockland, USA
Trishydroxymethylaminomethan (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trypanblau 0,4 %,	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Wasserstoffperoxid 30 %	Merck, Darmstadt
Xylol	Merck, Darmstadt

2.10.2 Agar, Medien und Lösungen

Miniorgankulturen	Anleitung
<p>Agarherstellung für Miniorgankultur</p> <p>2,25 g Agarpulver (Agar Noble) 150 ml Aqua bidest.</p>	<p>Agarpulver und Aqua bidest. vermischen, in Mikrowelle erhitzen, in 30 ml Portionen abfüllen und sterilisieren.</p>
<p>DMEM-Medium Herstellung</p> <p>500 ml Aqua bidest. 9,99 g DMEM Pulver 1,96 g HEPES Pulver</p>	<p>DMEM und HEPES in Aqua bidest. lösen, pH-Einstellung auf 7,2, Sterilfiltration, Abfüllen in 250 ml Portionen.</p>
<p>Gießen von DMEM-Agarplatten</p> <p>30 ml Agar Noble 30 ml DMEM 6 ml FCS 120 µl nicht essentielle Aminosäuren 120 µl Amphotericin B 240 µl Penicillin-Streptomycin-Lösung</p>	<p>DMEM, FCS, nicht essentielle Aminosäuren, Amphotericin B und Penicillin-Streptomycin in einem sterilen Gefäß vermischen, Agar Noble in der Mikrowelle erhitzen, mit supplementiertem Medium versetzen und 24-Well-Platten mit Multipipette in 200 µl Portionen beschichten.</p>
<p>Bronchial Epithelial Growth Medium (BEGM)</p> <p>500 ml Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM) Supplement Pack: BPE, Epidermal Growth Factor, Insulin, Hydrocortison, Epinephrin, Triiodothyronin, Transferrin, Retinoic Acid</p>	<p>unter sterilen Bedingungen zugeben, gut mischen, bei 4 °C lagern.</p>
<p>Enzymlösung zur Zellisolierung</p> <p>50 mg Protease 10 mg Hyaluronidase 10 mg Kollagenase P</p>	<p>in 10 ml BEGM lösen, sterilfiltrieren.</p>

Mikrogelelektrophorese	Anleitung
<p>Agarose</p> <p>0,5 %ige Low-Melting-Agarose 0,7 %ige Normal-Melting-Agarose PBS</p>	<p>unter kurzem Erhitzen in der Mikrowelle mit PBS lösen und bis zur weiteren Verwendung im Wasserbad (37 °C) aufbewahren.</p>
<p>Lysestammlösung</p> <p>146,4 g NaCl (2,5 M) 1,2 g Trishydroxymethylaminomethan (10 mM) 37,2 g Na₂EDTA (100 mM) 10 g N-Lauroylsarcosinnatriumsalz (1%) Aqua bidest.</p>	<p>NaCl, Trishydroxymethylaminomethan in 500 ml Aqua bidest. lösen, Na₂EDTA in 160 ml Aqua bidest. mit Zugabe von NaOH-Plätzchen lösen, N-Lauroylsarcosinnatriumsalz in 160 ml Aqua bidest. lösen, nach Vermischen aller Komponenten pH-Wert auf 10 einstellen und mit Aqua bidest. auf 1 l auffüllen.</p>
<p>Lysepuffer</p> <p>1 ml Triton X-100 10 ml DMSO 89 ml Lysestammlösung</p>	<p>Triton X-100 und DMSO in 100 ml Messzylinder geben, mit Lysestammlösung auf 100 ml auffüllen.</p>
<p>Elektrophoresepuffer</p> <p>24 g NaOH-Plätzchen (300 mM) 0,744 g Na₂EDTA (1 mM) Aqua bidest.</p>	<p>NaOH-Plätzchen und Na₂EDTA in 2 l Aqua bidest. lösen, bei 4 °C lagern.</p>
<p>Neutralisationspuffer (400 mM)</p> <p>48,5 g Trishydroxymethylaminomethan Aqua bidest.</p>	<p>Trishydroxymethylaminomethan in 1 l Aqua bidest. lösen, pH-Wert auf 7,5 einstellen, bei Raumtemperatur aufbewahren.</p>
<p>Ethidiumbromid-Färbelösung</p> <p>0,2 mg/ml Ethidiumbromid in Aqua bidest. (Stammlösung)</p>	<p>1:10 Verdünnung der Stammlösung mit Aqua bidest. (Färbelösung) sterilfiltrieren, bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahren.</p>

Reparatur/Mikrokerntest	Anleitung
<p>Tieffriermedium</p> <p>10 % DMSO 90 % FCS</p>	<p>muss bei Gebrauch immer kühl sein</p>
<p>RPMI</p> <p>500 ml RPMI 1640 5 ml Penicillin-Streptomycin-Lösung</p>	<p>Penicillin-Streptomycin-Lösung zu RPMI 1640 hinzufügen und vermischen.</p>
<p>Phytohämagglutinin (240 µg/ml)</p> <p>1,2 mg Phytohämagglutinin 5 ml PBS</p>	<p>Phytohämagglutinin in PBS auflösen, zu je 1 ml portionieren und bei -20 °C lagern.</p>
<p>Cytochalasin B (2 µg/ml)</p> <p>5 mg Cytochalasin B 2,5 ml DMSO</p>	<p>Cytochalasin B in DMSO auflösen und portioniert (0,5 ml) einfrieren.</p>
<p>KCl-Lösung (0,075 M)</p> <p>5,59 g KCl 1 l Aqua bidest.</p>	<p>KCl in Aqua bidest. auflösen, bei Raumtemperatur lagern.</p>
<p>Methanol-Eisessig</p> <p>750 ml Methanol 250 ml Eisessig</p>	<p>Methanol und Eisessig unter Abzug mischen, bei -20 °C aufbewahren.</p>
<p>Acridin-Orange-Färbelösung</p> <p>1 mg/ml Acridin-Orange in PBS lösen (Stammlösung)</p>	<p>1:100 Verdünnung mit PBS herstellen (Färbelösung)</p>

2.10.3 Testkits und Sonstiges

<p>Apoptose</p> <p>Annexin V Propidiumiodid Waschpuffer</p>	<p>Clontech, Palo Alto, USA</p>
<p>Zytokine: ELISA: IL-8, GM-CSF</p> <p>hIL-8 Standard hGM-CSF Standard hIL-8 Antibody-coated Wells, 96 hGM-CSF Antibody-coated Wells, 96 hIL-8 Biotin-Konjugat hGM-CSF Biotin-Konjugat Standardpuffer Streptavidin-Peroxidase (HRP), 100x Konzentrat Streptavidin-Peroxidase Verdünnungspuffer Waschpufferkonzentrat, 25x Chromogensubstrat (Tetramethylbenzidin, TMB) Stopp-Lösung</p>	<p>Biosource, Nivelles, Belgien</p>
<p>Proteinbestimmung: BCA Protein Assay Kit</p> <p>Reagenz A Reagenz B BSA-Standard Verdünnungspuffer</p>	<p>Pierce, Rockford, USA</p>

2.10.4 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien	Firma
24-Well-Platte	Falcon, Heidelberg
Combitips	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser zum Mikroskopieren (76 x 26 mm), Glasdicke 0,08 - 0,12 mm	Langenbrinck, Emmendingen
Einbettungsgitter	Merck, Darmstadt
Einbettungsschwämme	Merck, Darmstadt
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten steril, 0,22 µm Filter Unit, Millex-GV, Millex-GS	Millipore, Eschborn
Farbfilme ISO 100	Agfa, Leverkusen
Kryoröhrchen 2 ml, steril	Nalgene, Rochester, USA
Mikrotiterplatte Cellstar 96-Well, steril	Greiner, Frickenhausen
nicht-proteinbindende 96-Well-Platten	Nunc, Wiesbaden
Objektträgerkasten für 50 Objektträger	GLW, Würzburg
Objektträger 24 x 70 mm, je 5 mm seitlich mattiert	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträger normal	Merck, Darmstadt
Pasteurpipetten steril, 7 ml	Merck, Darmstadt
Pipette aus Polystyrol (2, 5, 10, 25 ml), steril	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen (200 µl, 1000 µl), steril	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml, 13 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Schreibdiamant	Renner, Dannstadt
Stericup (150 ml), steril	Millipore, Eschborn
Zellkulturfläschchen, 25 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht

2.10.5 Geräte und Zubehör

Verbrauchsmaterialien	Firma
Analysenwaage Voyager (0,1 mg – 62 g)	Ohaus, Gießen
Auswertung/ Datenspeicherung:	
Programm Komet 3.1	Kinetic Imaging, Liverpool
Datenspeicherung	Microsoft Excel
Elektrophoresenetzgerät E865	Renner, Dannstadt
ELISA-Reader	Medgenix, Düsseldorf
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
Mikroskope:	
Standardmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Inversmikroskop DMIRB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop DMLB	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem N2.1, BP 516 – 560	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Filtersystem I3, BP 450 – 490	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Objektive 100x/1,25 Öl;	Leica, Heerbrugg, Schweiz
40x/0,5; 10x/0,22; 4x/0,1	Leica, Heerbrugg, Schweiz
Mikrotiterplatten-Reader	Dynatech, Denkendorf, Deutschland
MikroWin 3.0	Mikrotek, Overath, Deutschland
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht, Schorndorf
Minishaker MS 1	IKA-WORKS, Wilmington, USA
Kryo -1 °C-Freezing-Container	Nalgene, Rochester, USA
Paraffinbad	Daglef Patz, Wankendorf
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schlittenmikrotom	Reichert-Jung, Kiel
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Spiegelreflexkamera	Minolta, Osaka, Japan
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Streckbad	Reichert-Jung, Kiel
Waage 1419 (1 mg - 600 g)	Sartorius, Gießen
Zellzählkammer nach Neubauer	Merck, Darmstadt
Zentrifuge Varifuge 3.0RS und 3.0R	Heraeus, Hanau

3 ERGEBNISSE

Der folgende Teil der Arbeit stellt die Ergebnisse der Untersuchungen genotoxischer Effekte, der Vitalität, der Apoptose und Zytokinproduktion an Miniorganen humaner nasaler Schleimhaut sowie der histologischen Aufarbeitungen dar. Des Weiteren erfolgt ein Vergleich der individuellen Reparaturkapazitäten von Lymphozyten unterschiedlicher Spender, welche mit zwei verschiedenen Methoden untersucht wurden. Abschließend werden die Resultate einer Nitrosaminexposition von Lymphozyten aus zwei verschiedenen genotoxikologischen Testverfahren, dem Mikrokerntest und dem Comet Assay, gegenübergestellt.

3.1 Kultivierung humaner Mukosa als Miniorgane

Aus Nasenmuschelresektaten von 23 Patienten wurden Miniorgankulturen angelegt, an welchen die Untersuchungen zur DNA-Schädigung, zur Apoptose und zur Zytokinproduktion durchgeführt wurden. Das Alter der Probanden lag zwischen 20 und 64 Jahren, der Mittelwert bei 41 Jahren. Das Spenderkollektiv bestand aus 8 Frauen und 15 Männern (Anamnesen der Spender siehe Anhang, Tabelle 19).

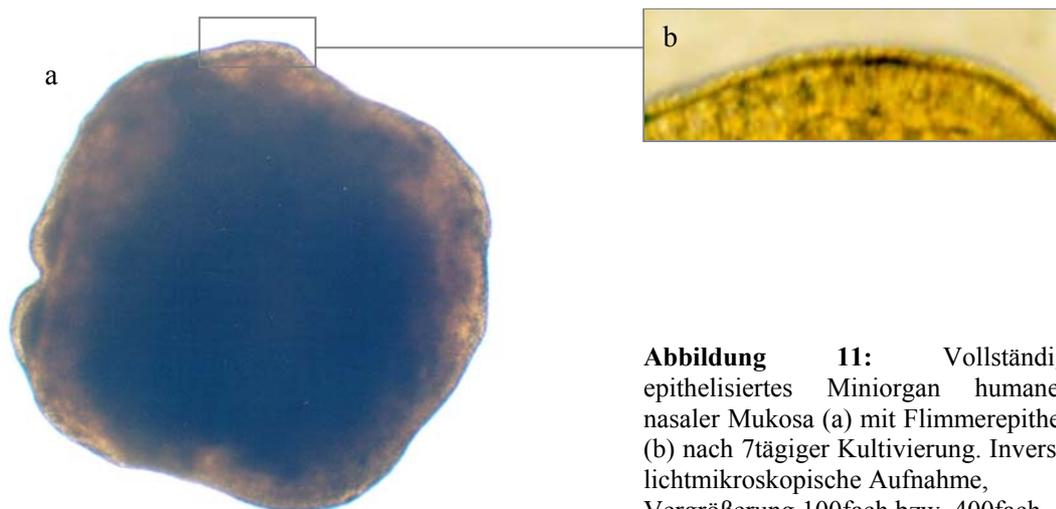


Abbildung 11: Vollständig epithelisiertes Miniorgan humaner nasaler Mukosa (a) mit Flimmerepithel (b) nach 7-tägiger Kultivierung. Inverse lichtmikroskopische Aufnahme, Vergrößerung 100fach bzw. 400fach.

Zu Beginn der Kultivierung war nur eine Seite der Gewebefragmente mit respiratorischem Epithel ausgestattet. Bereits nach 24 Stunden beginnt sich neues Epithel zu bilden. In den ersten Tagen besitzen die Miniorgane sehr individuelle, unregelmäßige Formen und vereinzelt ist ein Ablösen von Randzellen zu beobachten. Nach etwa fünf Tagen weisen die Kulturen bereits deutlich regelmäßigeren Umrissen auf, runden sich teilweise ab und sind wieder vollständig epithelisiert. Vor allem die Originalepithelien sind häufig mit Zilien ausgestattet, welche einen kräftigen, koordinierten Bewegungsschlag aufweisen. Der neu gebildete Zellrand besteht aus wenigen Reihen und erscheint sehr flach. Dieser besitzt meist kein Flimmerepithel. Nach sieben Tagen erscheinen die Miniorgane von allen Seiten her sehr kompakt und bewegen sich frei schwimmend im Medium.

3.2 Histologische Untersuchungen

Am ersten Tag der Kultivierung sind die Miniorgane nur teilweise epithelisiert. Die Dicke des Flimmerepithels variiert zwischen zwei und sechs Zellreihen, wird von einer breiten Basalmembran begrenzt und ist mit einzelnen Becherzellen durchsetzt. Darunter befindet sich faserreiches, lockeres Bindegewebe und teilweise vaskuläres Gewebe (Abb. 12). Nach drei Tagen nehmen die Epithelzellen nahe der präparationsbedingten Schnittstelle eine abgeflachte Form an und bilden eine sehr dünne Epithelschicht (Abb. 13). Innerhalb von sieben Tagen sind die verletzten Stellen wieder geschlossen (Abb. 14). Das neu gebildete Epithel besteht aus zwei bis drei Zellreihen. Nach 10 bis 15 Tagen in Kultur erscheint es dicht und über das gesamte Gewebefragment ausgebreitet. Es bleibt auch während der weiteren Kultivierung morphologisch intakt.

Zu Beginn der Kultur findet man verschiedene Zelltypen im Stroma der Miniorgane. Es besteht vorwiegend aus Fibroblasten, Lymphozyten, Granulozyten und Mastzellen. Nach einer Woche ist das Stroma relativ zellarm, die lymphoiden Zellen werden durch Kollagenfasern und Fibroblasten ersetzt.

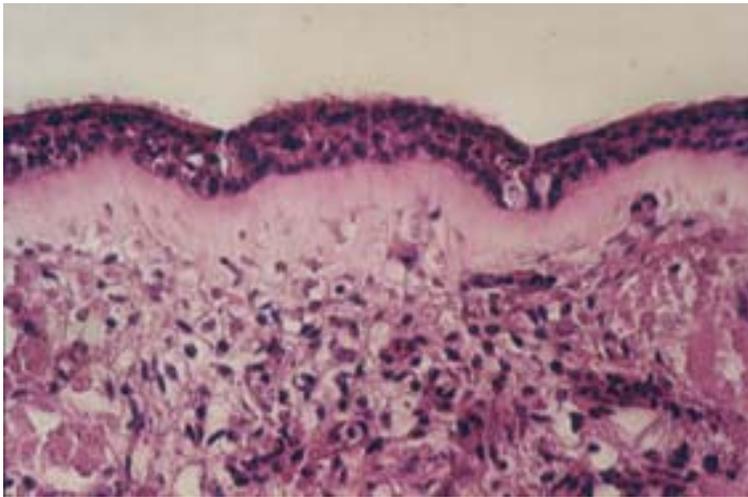


Abbildung 12: Ausschnitt einer humanen unteren Nasenmuschel. Deutlich zu erkennen ist das zilientragende respiratorische Epithel, die Basalmembran und das darunterliegende Bindegewebe. Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung 100fach.

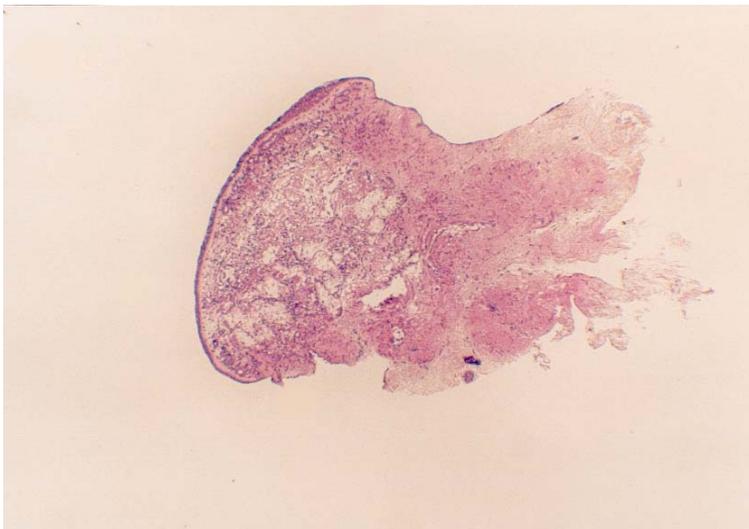


Abbildung 13: Miniorgan humaner nasaler Mukosa nach dreitägiger Kultivierung im Querschnitt. Das Mukosafragment ist nur teilweise mit Epithel bedeckt. Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung 40fach.

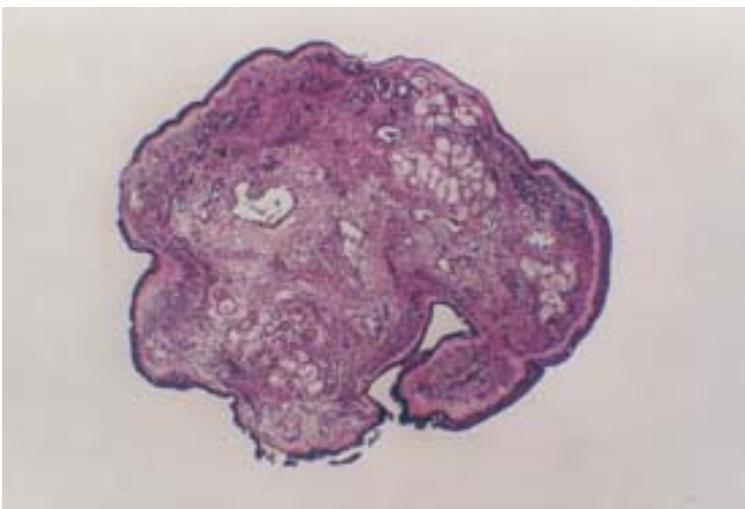


Abbildung 14: Miniorgan humaner nasaler Mukosa nach siebtägiger Kultivierung. Das gesamte Gewebefragment ist von z.T. zilientragendem respiratorischem Epithel umgeben. Färbung: Hämatoxylin-Eosin, Vergrößerung 40fach.

3.3 Bestimmung der Vitalität

Um die Vitalität der Miniorgankulturen während der gesamten Kultur- und Versuchsdauer zu gewährleisten, wurde diese anhand des Zilienschlags und mit dem Trypanblau-Ausschlusstest an separierten Miniorganzellen untersucht.

3.3.1 Zilienschlag

Ein wichtiges Indiz für die Vitalität der Miniorgane ist der Zilienschlag. Während der gesamten Kulturdauer wurde jeweils nach dem Mediumwechsel der Zilienschlag der Mukosafragmente beobachtet. In einem inversen Lichtmikroskop konnte an den mit Zilien ausgestatteten Epithelien der Miniorgankulturen durchweg ein kräftiger Flimmerschlag festgestellt werden, der auch durch die Fremdstoffexpositionen nicht beeinträchtigt wurde.

3.3.2 Trypanblau-Ausschlusstest

Die Bestimmung der Zellvitalität mit dem Trypanblau-Ausschlusstest wurde parallel zu den Genotoxizitätsuntersuchungen durchgeführt, um für die Qualität des Versuchs einen hohen Anteil vitaler Zellen zu gewährleisten. Bei einer Vitalität $< 75\%$ wurde der Ansatz verworfen. Zu jedem Untersuchungszeitpunkt (Tag 7 bis Tag 11) und unabhängig von der Fremdstoffexposition lagen die Vitalitäten der bereits separierten Zellen der Mukosafragmente über 95 %.

3.4 DNA-Schädigung an Miniorganen nach Fremdstoffexposition

Vorangestellt werden hier exemplarische DNA-Schädigungen, wie sie von unterschiedlichen Xenobiotika hervorgerufen werden können. Die von den Testsubstanzen induzierten Strangbrüche bilden im alkalischen Milieu einzelne DNA-Fragmente, welche im elektrophoretischen Feld, abhängig vom Molekulargewicht, unterschiedliche Strecken in Richtung Anode zurücklegen. Durch dieses Migrationsverhalten entsteht ein kometenförmiges DNA-Konglomerat. Im Kopf dieses Kometen befindet sich die weitgehend intakte DNA der Zelle, der Kometenschweif besteht aus fragmentierter DNA. Eine Vielzahl von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und DNA-Abschnitten inkompletter Exzisionsreparatur verursachen diese Migrationsmuster.

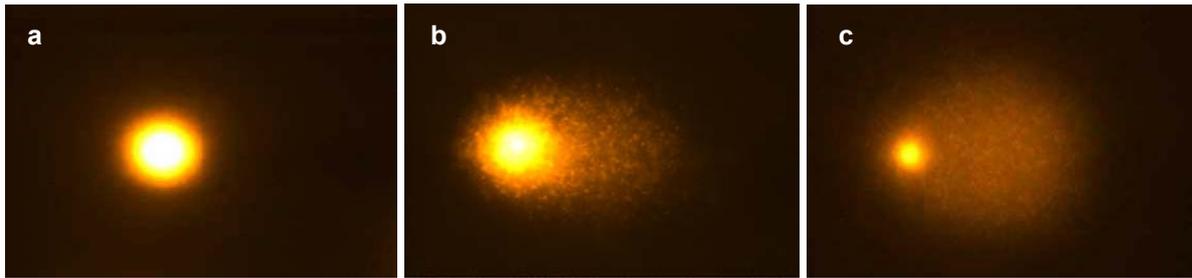


Abbildung 15: DNA einer Zelle ohne erkennbare DNA-Fragmentierung (a), mit mittelgradiger (b) und mit starker Schädigung (c) nach alkalischer Denaturierung, Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung mit Ethidiumbromid; Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 400fach.

Die unfragmentierte, vorwiegend intakte DNA einer Zelle nach Elektrophorese und Färbung mit Ethidiumbromid weist eine fast runde Form auf (Abb. 15a). Nach Behandlung mit einem polyzyklischen Kohlenwasserstoff ist die fragmentierte DNA im elektrischen Feld anodenwärts gewandert. Der Kopf des Kometen fluoresziert stark, der Kometenschweif weist gegen sein Ende hin abnehmende Intensität auf (Abb. 15b). Die DNA-Fragmentierung einer Chromat- oder MNNG exponierten Zelle ist sehr hoch und befindet sich überwiegend im Schweif des Kometen (Abb. 15c).

Zur Untersuchung der DNA-Schädigung wurden humane Miniorgankulturen von 23 Spendern (Anamnesen im Anhang, Tab. 19) an den Kulturtagen 7, 9 und 11 mit den Fremdstoffen NDEA, BPDE und Natriumdichromat inkubiert. Anschließend wurde die dadurch hervorgerufene DNA-Fragmentierung mittels Mikrogelelektrophorese quantifiziert. Außerdem wurde die Reduzierung der DNA-Migration nach jeweils 24-stündigem Reparaturintervall im Anschluss an die erste und an die zweite Exposition untersucht (siehe Tab. 4 und Abb. 3, S. 18). Die konstante Anzahl von 23 Ergebnissen konnte bei einzelnen Substanzen und Untersuchungstagen nicht aufrecht erhalten werden, da nicht für alle Tests genügend Zellmaterial zur Verfügung stand.

Tabelle 4: Übersicht der Untersuchungszeitpunkte humaner nasaler Miniorgankulturen nach Fremdstoffexpositionen und Reparaturintervallen.

Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11
1. Exposition	-	2. Exposition	-	3. Exposition
-	Reparatur	-	Reparatur	-
Mikrogelelektrophorese	Mikrogelelektrophorese	Mikrogelelektrophorese	Mikrogelelektrophorese	Mikrogelelektrophorese

3.4.1 Mehrfache Kontrollexposition und Reparatur

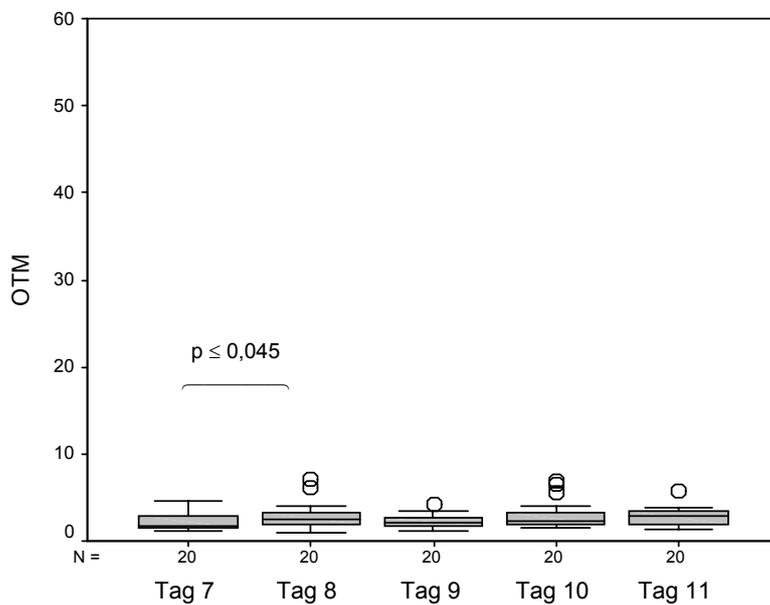


Abbildung 16: DNA-Fragmentierung in Zellen humaner nasaler Miniorgankulturen an den Untersuchungstagen 7, 8, 9, 10 und 11. OTM: Olive Tail Moment, N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer.

Als Negativkontrolle wurde den Miniorganen Medium zugesetzt, das auch als Lösungsmittel für die Testsubstanzen verwendet wurde. An allen untersuchten Tagen (Tag 7, 8, 9, 10, 11) sind keine Unterschiede in der DNA-Schädigung gegenüber den vorhergehenden Tagen zu finden. Die Mediane der mittleren OTM-Werte in 20 Ansätzen liegen an allen fünf Tagen zwischen 2,15 und 2,98.

Tabelle 5: p-Werte im Wilcoxon-Test für das Ausmaß der DNA-Fragmentierung in Zellen nicht exponierter Miniorgane im Vergleich zum Vortag

p ≤	Tag 8 vs. Tag 7	Tag 9 vs. Tag 8	Tag 10 vs. Tag 9	Tag 11 vs. Tag 10
K	0,045	0,306	0,131	0,926

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition.

3.4.2 Mehrfache *N*-Nitrosodiethylamin-Exposition und Reparatur

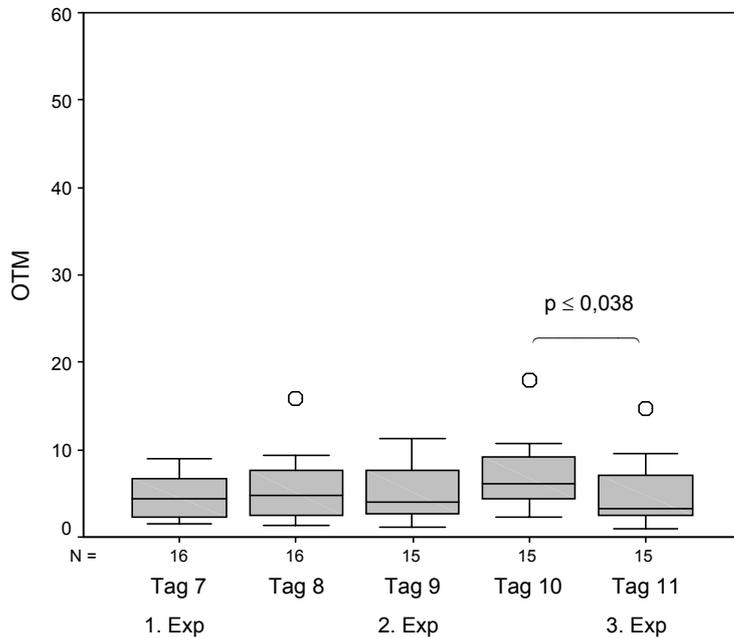


Abbildung 17: *N*-Nitrosodiethylamin-(NDEA) induzierte DNA-Fragmentierung in Zellen humaner Miniorgankulturen an Tag 7 (1. Exposition), Tag 8 (24-stündige Reparatur), Tag 9 (2. Exposition), Tag 10 (24-stündige Reparatur) und Tag 11 (3. Exposition). OTM: Olive Tail Moment, N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer.

Untersuchungen mit *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) zeigen, dass dieses Nitrosamin eine genotoxische Wirkung für Miniorgane gegenüber den Kontrollansätzen besitzt. Nach einer zwei- (OTM 3,98) oder dreifachen Exposition (OTM 3,33) kann keine Veränderung der DNA-Fragmentierung gegenüber der ersten Fremdstoffbelastung (OTM 4,30) beobachtet werden. Eine DNA-Reparatur nach 24 Stunden (OTM Tag 8: 4,70 und Tag 10: 6,18) ist nicht zu erkennen.

Tabelle 6: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der DNA-Fragmentierung in Zellen *N*-Nitrosodiethylamin-(NDEA) und nicht exponierter Miniorgankulturen an den verschiedenen Untersuchungstagen.

p ≤	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11
K	0,001	0,001	0,004	0,001	0,011
Tag 8	0,642		0,272	-	-
Tag 9	0,256			0,272	0,397
Tag 10	-	-			0,038

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; - : nicht getestet.

3.4.3 Mehrfache Benzo[a]pyren-diol-epoxid-Exposition und Reparatur

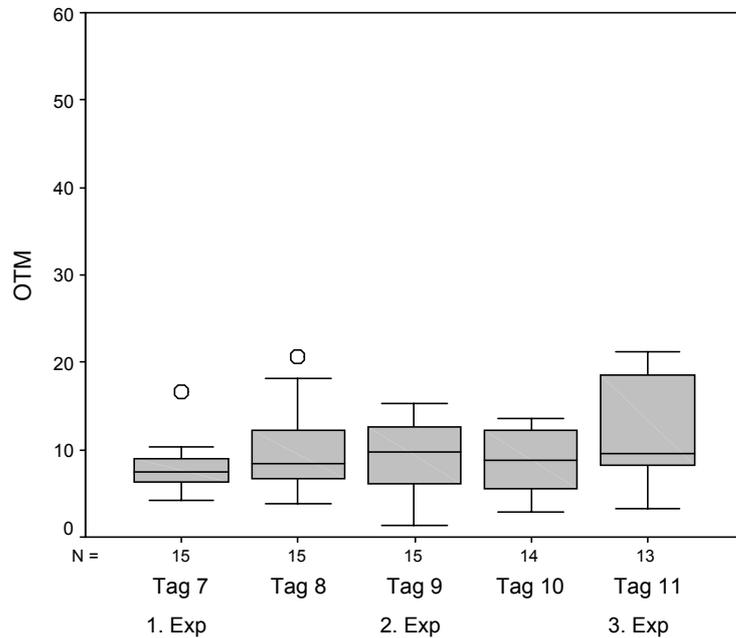


Abbildung 18: Benzo[a]pyren-diol-epoxid-(BPDE) induzierte DNA-Fragmentierung in Zellen humaner Miniorgankulturen an Tag 7 (1. Exposition), Tag 8 (24-stündige Reparatur), Tag 9 (2. Exposition), Tag 10 (24-stündige Reparatur) und Tag 11 (3. Exposition). OTM: Olive Tail Moment, N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer.

Das Epoxid des polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffs Benzo[a]pyren (BPDE) weist an allen untersuchten Tagen ein genotoxisches Potenzial für Organkulturen auf. Das Ausmaß der DNA-Fragmentierung nach ein- (OTM 7,49), zwei- (OTM 9,69) oder dreimaliger Exposition (OTM 9,59) bleibt in den Medianwerten fast unverändert.

24-stündige Reparaturphasen nach erster und zweiter Expositionsphase bewirken keinen wesentlichen Rückgang der DNA-Migration (OTM 8,34 und 8,80).

Tabelle 7: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der DNA-Fragmentierung in Zellen Benzo[a]pyren-diol-epoxid-(BPDE) und nicht exponierter Miniorgankulturen an den verschiedenen Untersuchungstagen.

p ≤	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11
K	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002
Tag 8	0,211	-	0,551	-	-
Tag 9	0,268	-	-	0,925	0,249
Tag 10	-	-	-	-	0,209

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; - : nicht getestet.

3.4.4 Mehrfache Natriumdichromat-Exposition und Reparatur

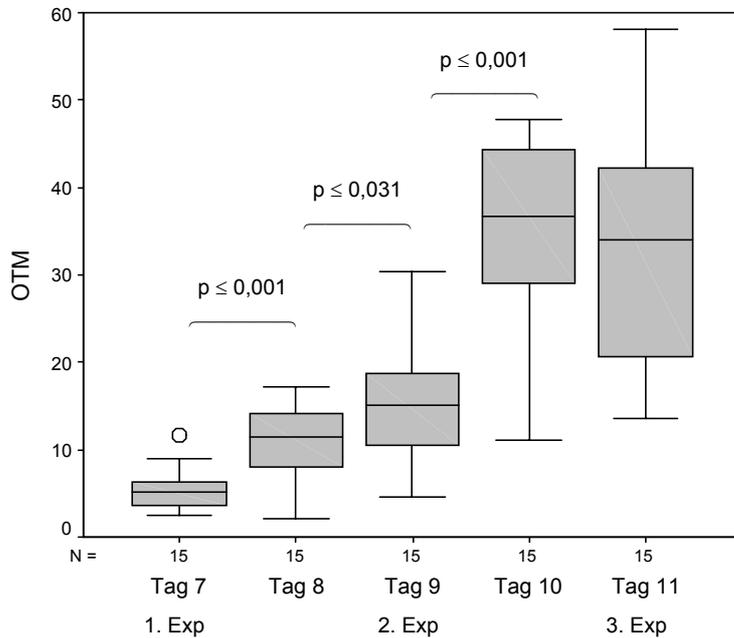


Abbildung 19: Natriumdichromat- ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) induzierte DNA-Fragmentierung in Zellen humaner Miniorgankulturen an Tag 7 (1. Exposition), Tag 8 (24-stündige Reparatur), Tag 9 (2. Exposition), Tag 10 (24-stündige Reparatur) und Tag 11 (3. Exposition). OTM: Olive Tail Moment, N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer.

Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) verursacht bereits nach einmaliger Inkubation deutliche Schäden an der DNA von Miniorganzellen (OTM 5,20), nach zweiter und dritter Fremdstoffexposition steigt das Schädigungsniveau jedoch noch weiter an (OTM 15,04 und 34,06). Die genotoxische Wirkung von Natriumdichromat erhöht sich zwischen den Expositionstagen auf mehrfache Ausgangswerte.

Nach Reparaturintervallen von 24 Stunden zeigt sich kein Rückgang der DNA-Migration, sondern sogar ein Anstieg der DNA-Fragmentierung bis zum Schädigungsniveau der dreifachen Exposition (OTM Tag 8: 11,48 und Tag 10: 36,31).

Tabelle 8: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der DNA-Fragmentierung in Zellen Natriumdichromat- ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) und nicht exponierter Miniorgankulturen an den verschiedenen Untersuchungstagen.

p ≤	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11
K	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Tag 8	0,001		0,031	-	-
Tag 9	0,001			0,001	0,001
Tag 10	-	-			0,776

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; - : nicht getestet.

3.4.5 Mehrfache *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin-Exposition und Reparatur

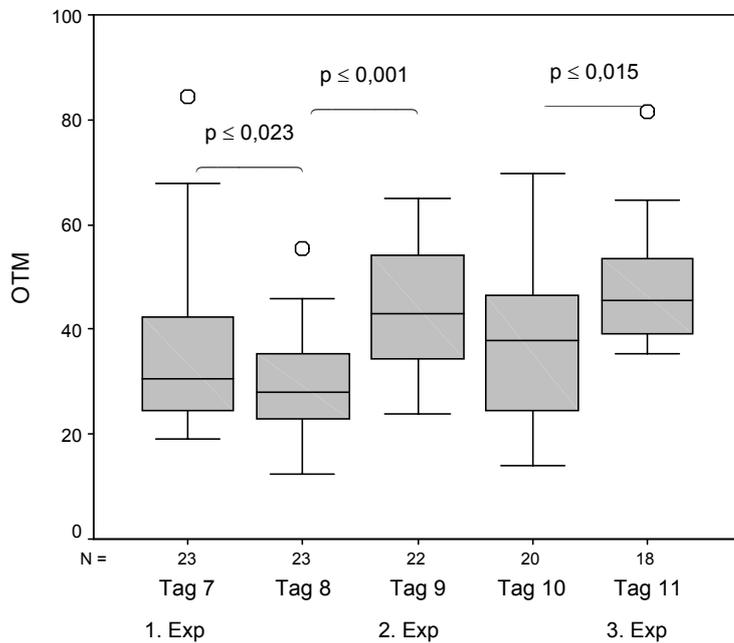


Abbildung 20: *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin-(MNNG) induzierte DNA-Fragmentierung in Zellen humaner Miniorgankulturen an Tag 7 (1. Exposition), Tag 8 (24-stündige Reparatur), Tag 9 (2. Exposition), Tag 10 (24-stündige Reparatur) und Tag 11 (3. Exposition). OTM: Olive Tail Moment, N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer.

Das als Positivkontrolle verwendete Nitrosamid schädigt die DNA von Zellen nasaler Miniorgane sehr stark. An allen untersuchten Tagen ist eine hohe DNA-Fragmentierung zu finden, die nach der zweiten und dritten Exposition (OTM 42,99 und 45,54) noch deutlich gegenüber der einmaligen Exposition (OTM 30,56) zugenommen hat. Nach mehrmaliger Fremdstoffexposition nimmt das Ausmaß der DNA-Schädigung weiter zu.

Die gewährten Reparaturphasen bewirken einen leichten Rückgang der DNA-Schädigung, der jedoch lediglich nach der ersten Exposition Signifikanzniveau erreicht (OTM Tag 8: 28,01 und Tag 10: 38,03).

Tabelle 9: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der DNA-Fragmentierung in Zellen *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin-(MNNG) und nicht exponierter Miniorgankulturen an verschiedenen Untersuchungstagen.

p ≤	Tag 7	Tag 8	Tag 9	Tag 10	Tag 11
K	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Tag 8	0,023		0,001	-	-
Tag 9	0,095	0,001		0,156	0,231
Tag 10	-	-	0,156		0,015

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; - : nicht getestet.

3.5 Untersuchungen zur Apoptose

In der frühen Phase des Apoptosevorgangs einer Zelle ist deren Plasmamembran noch intakt. Es findet lediglich eine Verlagerung eines Phospholipids (Phosphatidylserin) von der Membraninnenseite auf die Außenseite statt. Eine späte Apoptosephase dagegen ist mit Beschädigung der Membran, mit Chromatinkondensation und chromosomaler Fragmentierung verbunden. Mit Annexin V kann das an der Außenseite der Plasmamembran lokalisierte Phosphatidylserin als Zeichen eines frühen Apoptoseereignisses nachgewiesen werden. Um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden (Annexin V Bindung an der Membraninnenseite), müssen nun durch Gegenfärbung mit Propidiumiodid Zellen mit beschädigter Plasmamembran (nekrotisch oder spät-apoptotisch) ausgeschlossen werden.

Früh-apoptotische Zellen, die Annexin V binden, erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün, nekrotische Zellen rot.

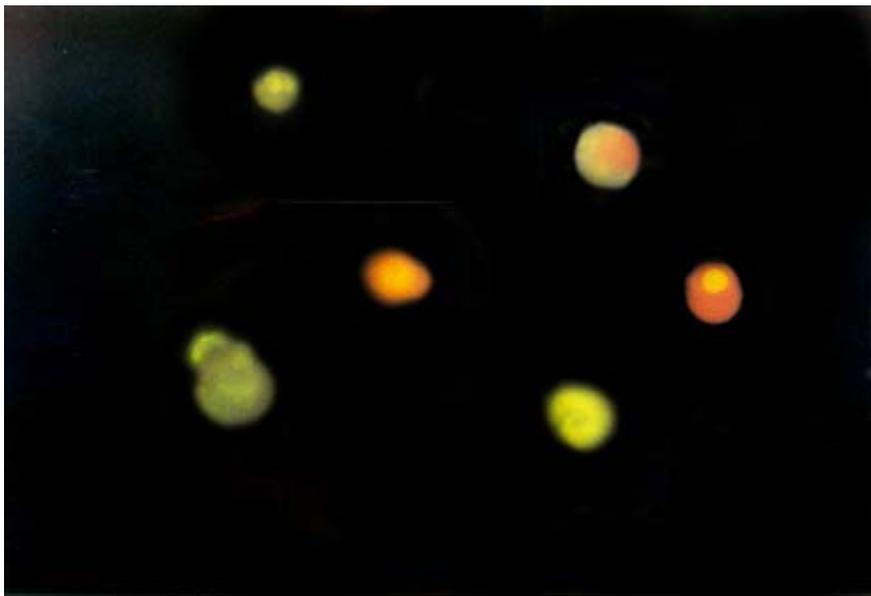


Abbildung 21: Darstellung von Annexin V gefärbten früh-apoptotischen (grün) und spät-apoptotischen (rot) Zellen humaner nasaler Mukosa. Zellen im normalen Zellzyklus zeigen keine Fluoreszenz. Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 400fach.

Die Untersuchungen zur Apoptose wurden unmittelbar nach Fremdstoffexposition und Separation der Miniorgane, also zeitgleich zur Mikrogelelektrophorese, durchgeführt. Damit können genauere Aussagen zur Ursache der DNA-Fragmentierung, ob direkt durch den Fremdstoff oder durch Fremdstoff-induzierte Apoptose, getroffen werden.

3.5.1 Apoptose in nicht exponierten Miniorgankulturen

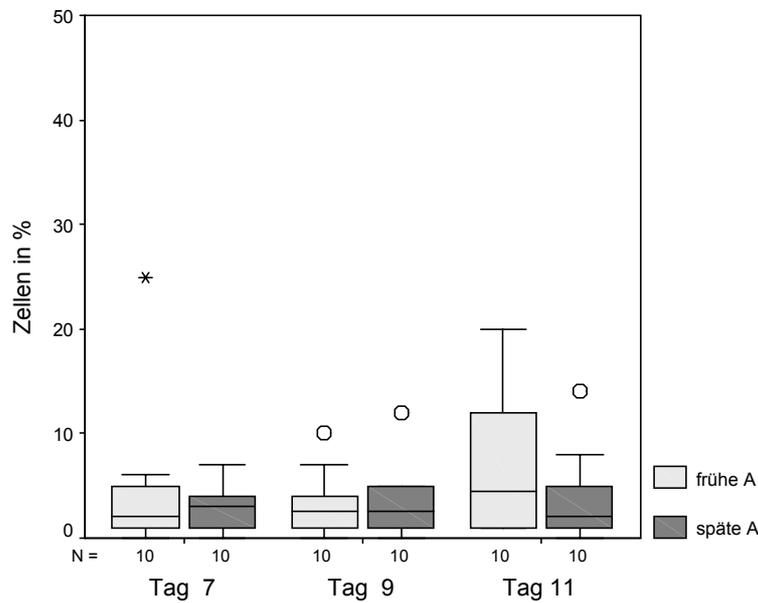


Abbildung 22: Apoptose-induktion. Prozentualer Anteil der früh- und spät-apoptotischen Zellen an den Tagen 7, 9 und 11 ohne Fremdstoffexposition; N: Anzahl der Versuche; o: Ausreißer; *: Extremwert; A: Apoptose.

Nach sieben Tagen Kulturdauer weisen die Zellen separierter Miniorgane 2 % früh-apoptotische und 3 % spät-apoptotische Zellen auf. Nach zwei weiteren Tagen liegen die Werte bei 2,5 %. Nach insgesamt elftägiger Kultivierung steigt der Anteil früh-apoptotischer Zellen auf 4,5 %. Späte Apoptose findet nur mehr in 2 % der Miniorganzellen statt.

Tabelle 10: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich des Anteils apoptotischer Zellen in nicht exponierten Miniorgankulturen an den Untersuchungstagen 7, 9 und 11.

keine Exposition	Tag 7		Tag 9		Tag 11	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät
p ≤						
Tag 7			0,878	0,288	0,103	0,905
Tag 9					0,153	0,442

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert.

3.5.2 Apoptose nach *N*-Nitrosodiethylamin-Exposition

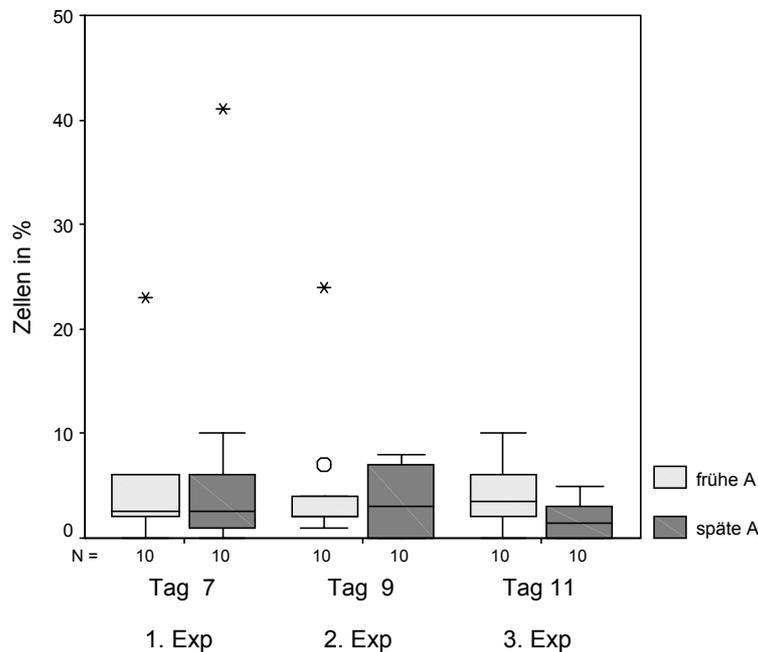


Abbildung 23: Apoptose-induktion durch *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA). Prozentualer Anteil der früh- und spät-apoptotischen Zellen an den Tagen 7 (1. Exposition), 9 (2. Exposition) und 11 (3. Exposition); N: Anzahl der Versuche; o: Ausreißer; *: Extremwert; A: Apoptose.

Nach einmaliger Nitrosaminexposition weisen 2,5 % der Zellen der Miniorgane früh- und 2,5 % spät-apoptotische Vorgänge auf. Nach 9 Tagen Kulturdauer und zweifacher Fremdstoffbelastung befinden sich 2 % in früher und 3 % in später Apoptose. Eine dreimalige Inkubation mit NDEA ist mit einem Rückgang des Anteils spät-apoptotischer Zellen verbunden (3,5 % frühe, 1,5 % späte Apoptose). Im Vergleich zur Kontrolle verändert sich somit die Apoptose nach NDEA-Behandlung nicht.

Tabelle 11: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich des Anteils apoptotischer Zellen in *N*-Nitrosodiethylamin- (NDEA) und nicht exponierten Miniorgankulturen an den Untersuchungstagen 7, 9 und 11.

NDEA	Tag 7		Tag 9		Tag 11	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät
p ≤						
K	0,215	0,753	0,397	0,964	0,132	0,766
Tag 7			0,573	0,593		-
Tag 9					0,813	0,120

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; - : nicht getestet.

3.5.3 Apoptose nach Benzo[a]pyren-diol-epoxid-Exposition

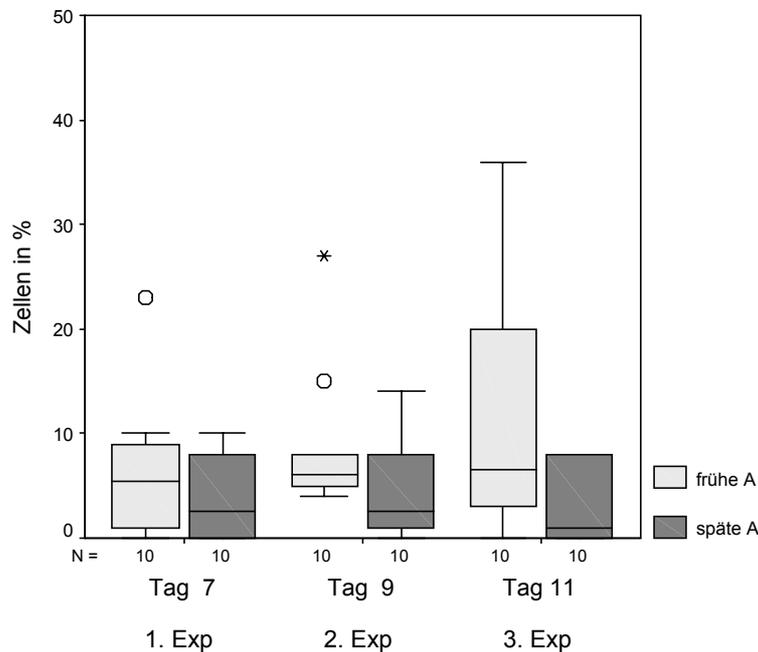


Abbildung 24: Apoptose-induktion durch Benzo[a]pyren-diol-epoxid (BPDE). Prozentualer Anteil der früh- und spät-apoptotischen Zellen an den Tagen 7 (1. Exposition), 9 (2. Exposition) und 11 (3. Exposition); N: Anzahl der Versuche; ○: Ausreißer; *: Extremwert; A: Apoptose.

Eine einmalige Benzo[a]pyren-diol-epoxid-Exposition verursacht in Miniorgankulturen 5,5 % früh- und 2,5 % spät-apoptotische Zellen. Durch die zweifache Fremdstoffbelastung wird ein deutlich erhöhter Anteil früh-apoptotischer Zellen gegenüber dem Kontrollansatz hervorgerufen. Am 11. Tag, nach der dritten BPDE-Exposition, befinden sich ebenfalls mehr Zellen in frühen Apoptosestadien als an den vorhergehenden Untersuchungstagen. Die Rate spät-apoptotischer Zellen, welche bereits einen Membranschaden aufweisen, bleibt von der BPDE-Exposition unbeeinflusst (2,5 %, 2,5 % und 1,1 %). BPDE erhöht den Anteil früh apoptotischer Zellen nach einfacher (5,5 %) zweifacher (6 %) und dreifacher Exposition (6,5 %), wobei der Unterschied zu den Kontrollen nur am 9. Tag Signifikanzniveau erreicht.

Tabelle 12: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich des Anteils apoptotischer Zellen in Benzo[a]pyren-diol-epoxid- (BPDE) und nicht exponierten Miniorgankulturen an den Untersuchungstagen 7, 9 und 11.

BPDE	Tag 7		Tag 9		Tag 11	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät
K	0,345	0,812	0,021	0,262	0,213	0,260
Tag 7			0,241	0,753		-
Tag 9					0,919	0,246

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; - : nicht getestet.

3.5.4 Apoptose nach Natriumdichromat-Exposition

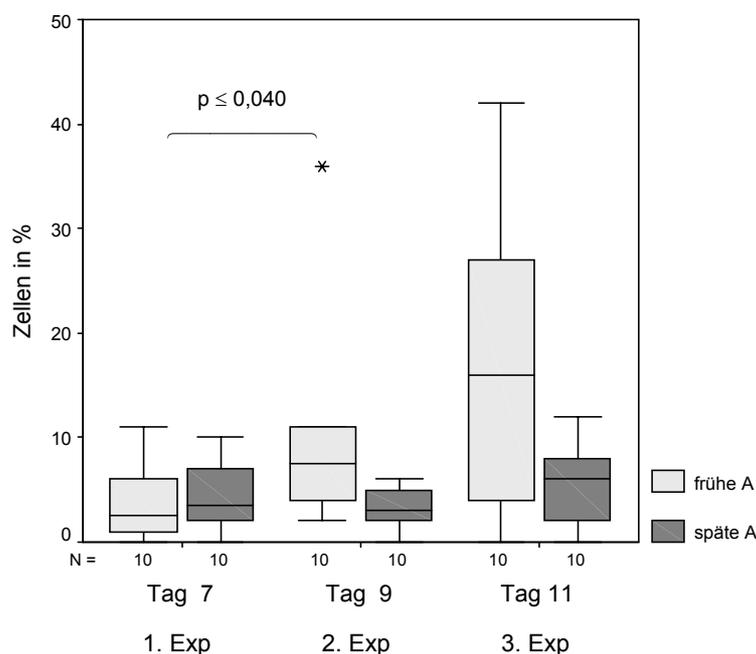


Abbildung 25: Apoptose-induktion durch Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Prozentualer Anteil der früh- und spät-apoptotischen Zellen an den Tagen 7 (1. Exposition), 9 (2. Exposition) und 11 (3. Exposition); N: Anzahl der Versuche; *: Extremwert; A: Apoptose.

Natriumdichromat verursacht nach einmaliger Exposition in 2,5 % der Zellen nasaler Miniorgane frühe, in 3,5 % späte Apoptose. Nach weiteren Belastungsphasen zeigt sich ein erhöhter Anteil früh-apoptotischer Zellen im Vergleich zum Kontrollansatz. Der Zahl der Zellen mit früh-apoptotischen Merkmalen steigt mit jeder zusätzlichen Exposition deutlich an (Tag 9: 7,5 % und Tag 11: 16 %). Eine mehrfache Natriumdichromatexposition zeigt keinen signifikanten Einfluß auf späte Apoptosestadien. 4 % und 3 % der Zellen weisen bereits an den Tagen 7 und 9, 6 % an Tag 11 Membranschädigungen auf.

Tabelle 13: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich des Anteils apoptotischer Zellen in Natriumdichromat- ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) und nicht exponierten Miniorgankulturen an den Untersuchungstagen 7, 9 und 11.

$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	Tag 7		Tag 9		Tag 11	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät
p ≤						
K	0,263	0,204	0,028	0,929	0,050	0,153
Tag 7			0,040	0,554	-	
Tag 9					0,373	0,146

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; - : nicht getestet.

3.5.5 Apoptose nach *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin-Exposition

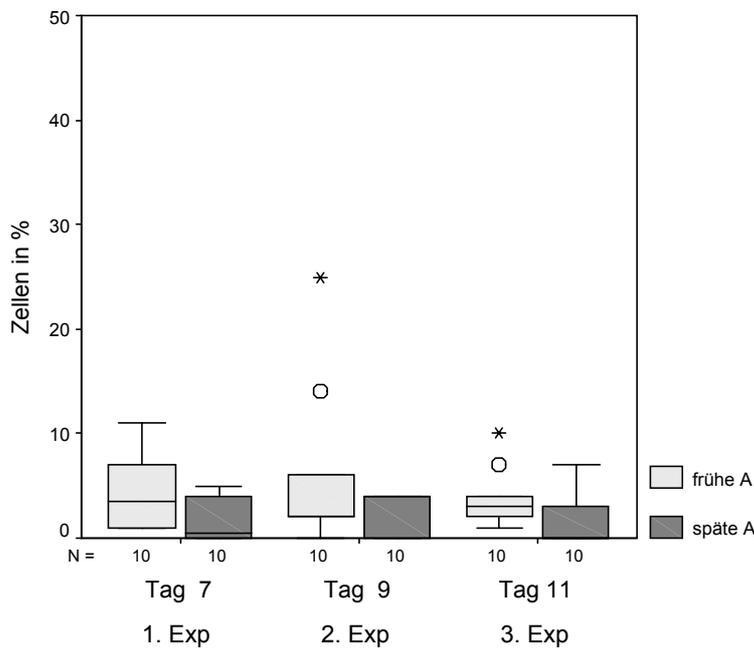


Abbildung 26: Apoptose-induktion durch *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitroso-guanidin (MNNG). Prozentualer Anteil der früh- und spät-apoptotischen Zellen an den Tagen 7 (1. Exposition), 9 (2. Exposition) und 11 (3. Exposition); N: Anzahl der Versuche; ○: Ausreißer; *: Extremwert; A: Apoptose.

N-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) verursacht nur sehr geringe Apoptoseraten, die sich zu keinem Zeitpunkt signifikant von der Kontrolle unterscheiden. In der Tendenz ist die Anzahl der spät-apoptotischen Zellen sogar eher erniedrigt (0,5 %, 4,1 %, 0,9 % nach 7, 9 und 11 Tagen). Einmalige Inkubation führt in 3,5 % der Zellen zu frühen Apoptosevorgängen. 0,5 % der Miniorganzellen befinden sich in späteren Stadien mit Membranschädigungen. Nach der zweiten Exposition werden 2 % früh- und 4 % spät-apoptotische Zellen beobachtet. Diese Werte verändern sich auch durch die dritte Exposition am 11. Tag nicht wesentlich.

Tabelle 14: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich des Anteils apoptotischer Zellen in *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin-(MNNG) exponierten und nicht exponierten Miniorgankulturen (Kontrolle) an den Untersuchungstagen 7, 9 und 11.

MNNG	Tag 7		Tag 9		Tag 11	
	früh	spät	früh	spät	früh	spät
p ≤						
K	0,306	0,592	0,471	0,230	0,539	0,109
Tag 7			0,959	0,088		-
Tag 9					1,000	0,105

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; - : nicht getestet.

3.6 Bestimmung der Zytokinproduktion

Die von den Miniorganen freigesetzte Zytokine wurde an den Tagen 2, 7, 9 und 11 aus dem Kulturüberstand bestimmt. Untersucht wurde jeweils die in den vorhergehenden 48 Stunden produzierte Menge. Bei Mediumwechsel bzw. vor der Fremdstoffexposition wurde der Überstand aller gleichbehandelten Ansätze gesammelt und portioniert eingefroren. Die an Tag 9 bestimmte Zytokinmenge kann somit als Reaktion auf die erste, bereits erfolgte Exposition gewertet werden. Eine Untersuchung am 11. Tag stellt die Zytokinproduktion nach der zweiten Exposition dar.

Interleukin 8 (IL-8) gilt als chemotaktischer Faktor für Neutrophile, Eosinophile und T-Lymphozyten. Es wird u.a. sowohl von Fibroblasten, von Endothel- als auch von Epithelzellen produziert. IL-8 stellt das dominierende exprimierte Zytokin des humanen nasalen Epithels dar. Aufgrund bestimmter infektiöser und toxischer Substanzen kann eine Aktivierung der immunkompetenten Zellen erfolgen und eine Entzündungsantwort vermittelt werden.

Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) spielt eine wichtige Rolle in der Reifung von Granulozyten, Makrophagen und Eosinophilen sowie in der Hämatopoese. Dieses Zytokin wird unter anderem von Makrophagen, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen gebildet. Die Freisetzung von GM-CSF kann durch mechanische oder chemische Einwirkungen beeinflusst werden.

3.6.1 Zytokinfreisetzung während der Kultivierung

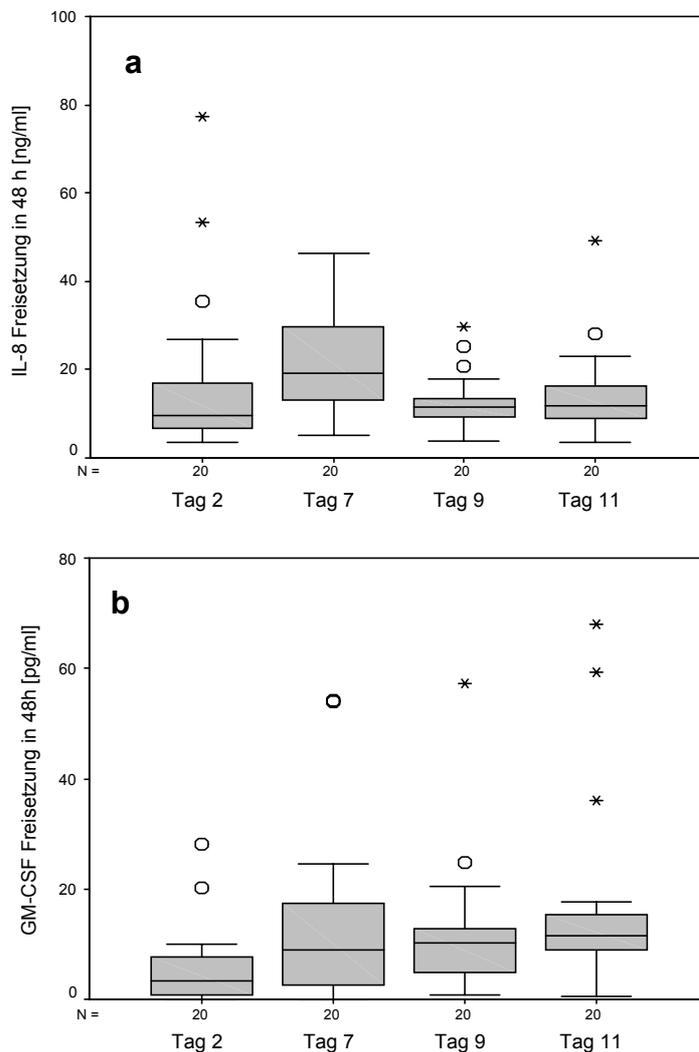


Abbildung 27: Freisetzung von IL-8 (a) bzw. GM-CSF (b) durch humane nasale Miniorgankulturen. IL-8/GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand an den Kulturtagen 2, 7, 9 und 11 nach 48-stündiger Kultivierung. N: Anzahl der Versuche; ○: Ausreißer; *: Extremwert.

Die Freisetzung von IL-8 nach zweitägiger Kultivierung der Miniorgane liegt durchschnittlich bei etwa 10 ng/ml. Nach sieben Tagen Kulturdauer steigt die gebildete Menge dieses Zytokins deutlich auf 18,4 ng/ml an. Im weiteren Kulturverlauf, an den Tagen 9 und 11, nimmt die IL-8 Produktion deutlich ab (11,0 und 11,5 ng/ml).

In den ersten 48 Stunden produzieren die Miniorgankulturen ca. 5 pg/ml GM-CSF. Im weiteren Verlauf (Tag 7) steigt die Zytokinfreisetzung deutlich auf 10 pg/ml in 48 Stunden an. In den folgenden Untersuchungen nach 48 (Tag 9) bzw. 96 Stunden (Tag 11) können keine weiteren Steigerungen der Produktion festgestellt werden.

3.6.3 Zytokinfreisetzung durch Benzo[a]pyren-diol-epoxid-Exposition

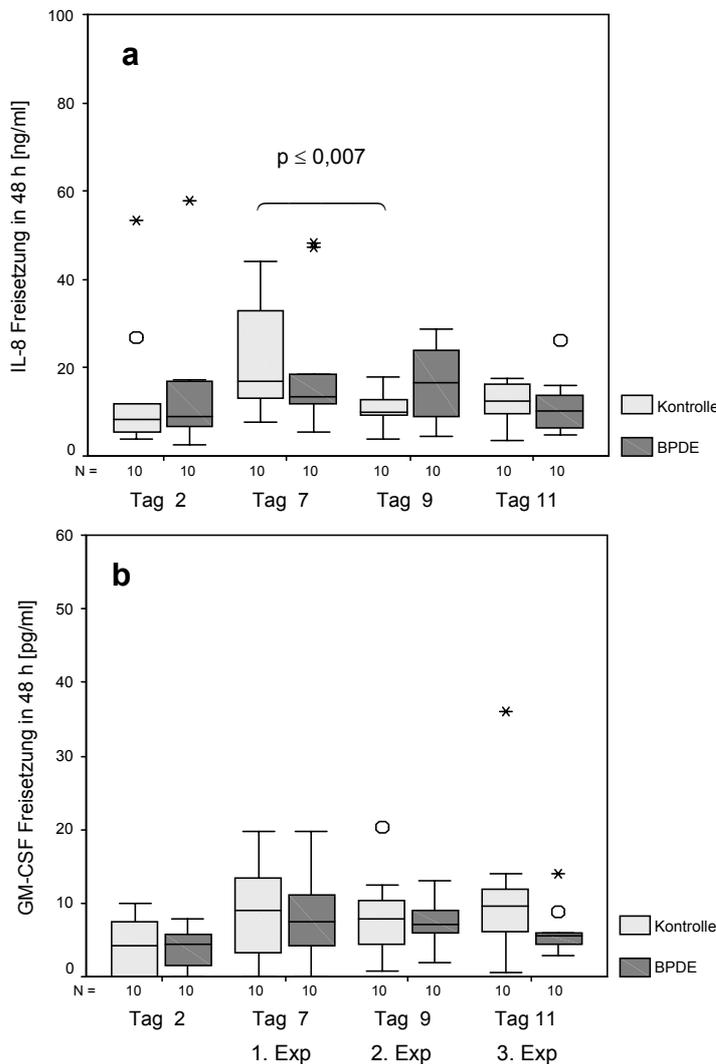


Abbildung 29: Freisetzung von IL-8 (a) bzw. GM-CSF (b) durch nicht (Kontrolle) und Benzo[a]pyren-diol-epoxid- (BPDE) exponierte Miniorgankulturen. IL-8/GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand an den Tagen 2, 7 (1. Exposition), 9 (2. Exposition) und 11 (3. Exposition) jeweils nach 48-stündiger Kultivierung. N: Anzahl der Versuche; o: Ausreißer; *: Extremwert.

Nach 48-stündiger Kultivierung weisen Kontrollen und BPDE-Ansätze ähnliche IL-8 Konzentrationen auf (8,8 und 9,8 ng/ml). Am 7. Tag steigt die IL-8 Freisetzung der Miniorgane leicht an, der Wert des Kontrollansatzes liegt etwas höher. Eine erste BPDE-Belastung (Tag 9: 16,5 ng/ml) ist mit einer leicht erhöhten Produktion von IL-8 verbunden. Eine weitere Exposition induziert einen Konzentrationsrückgang (11,2 ng/ml).

Die GM-CSF Produktion der nasalen Miniorgane zeigt sich nach einer siebentägigen Kultivierung gegenüber dem 2. Tag deutlich erhöht (Tag 2 und Tag 7: 4,6 und 9,0 pg/ml). Die erste Fremdstoffexposition verursacht keine Veränderungen der GM-CSF Freisetzung. Zweimalige BPDE-Belastung induziert einen Rückgang der GM-CSF Produktion (5,6 pg/ml) gegenüber den nicht exponierten Organkulturen (11,3 pg/ml).

3.6.4 Zytokinfreisetzung durch Natriumdichromat-Exposition

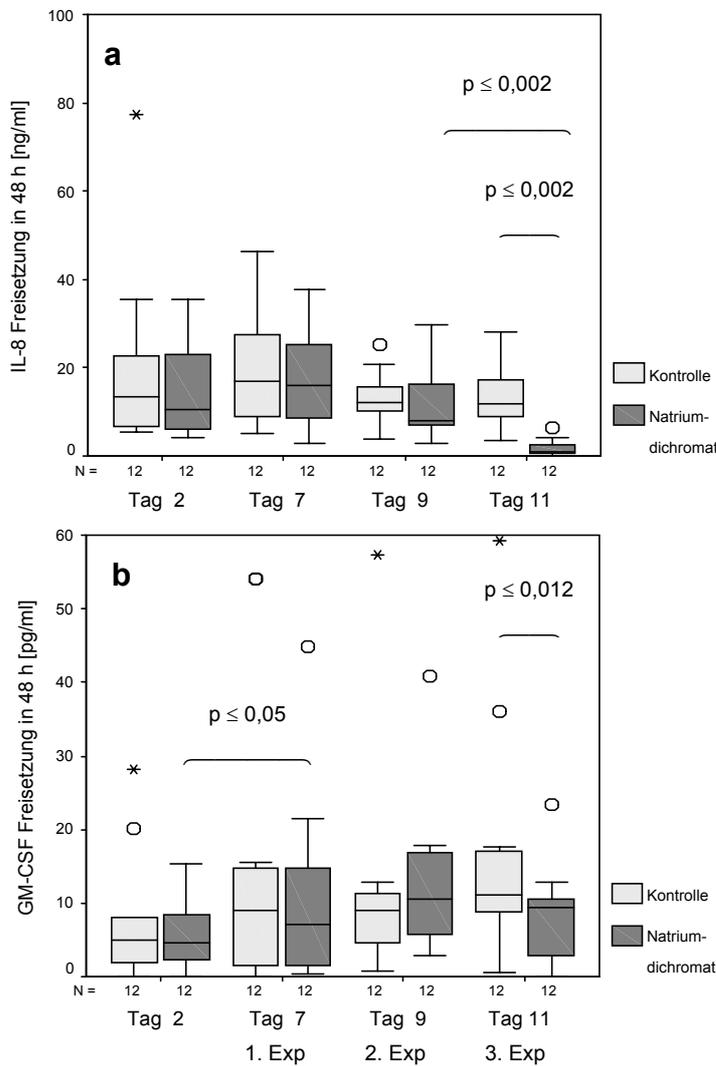


Abbildung 30: IL-8 (a) bzw. GM-CSF (b) Freisetzung von nicht (Kontrolle) und Natriumdichromat- ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) exponierten Miniorgankulturen. IL-8/GM-CSF Konzentration im Kulturüberstand an den Tagen 2, 7 (1. Exposition), 9 (2. Exposition) und 11 (3. Exposition). jeweils nach 48-stündiger Kultivierung. N: Anzahl der Versuche; ○: Ausreißer; *: Extremwert.

Miniorgane für Natriumdichromatuntersuchungen zeigen an den Kulturtagen 2 und 7 unveränderte IL-8 Freisetzung (10,5 und 16,1 ng/ml). Die erste Chromatexposition hat eine leichte Konzentrationsabnahme an Tag 9 zur Folge. Die zweite Fremdstoffbehandlung verursacht jedoch einen deutlichen IL-8 Rückgang (0,9 ng/ml) im Vergleich zum Kontrollansatz (11,5 ng/ml) und zur ersten Chromatbehandlung (7,9 ng/ml).

Die GM-CSF Produktion der Miniorgankulturen steigt im Laufe der Kulturdauer leicht an. Durch die erste Natriumdichromat-Exposition wird eine höhere Menge an GM-CSF gegenüber den Kontrollansätzen freigesetzt (12,9 und 11,5 pg/ml). Eine zweifache Fremdstoffbelastung induziert eine am Tag 11 deutlich niedrigere GM-CSF Konzentration (9,3 pg/ml) im Vergleich zu den nicht exponierten Kulturen (11,3 pg/ml).

Tabelle 15: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der IL-8 Produktion fremdstoffexponierter und nicht exponierter Miniorgankulturen bzw. der Freisetzung an den verschiedenen Untersuchungstagen.

IL-8	K	NDEA	BPDE	Na ₂ Cr ₂ O ₇
p ≤				
Tag 2 vs. K	-	0,045	0,878	0,308
Tag 7 vs. K	-	0,099	0,333	0,136
Tag 9 vs. K	-	0,034	0,114	0,158
Tag 11 vs. K	-	0,937	0,799	0,002
Tag 7 vs. Tag 2	0,073	0,272	0,139	0,272
Tag 9 vs. Tag 7	0,007	0,272	0,799	0,158
Tag 11 vs. Tag 9	0,526	0,433	0,093	0,002

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; NDEA: *N*-Nitrosodiethylamin; BPDE: Benzo[a]pyren-diol-epoxid; Na₂Cr₂O₇: Natriumdichromat; - : nicht getestet.

Tabelle 16: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der GM-CSF Produktion fremdstoffexponierter und nicht exponierter Miniorgankulturen bzw. der Freisetzung an den verschiedenen Untersuchungstagen.

GM-CSF	K	NDEA	BPDE	Na ₂ Cr ₂ O ₇
p ≤				
Tag 2 vs. K	-	0,583	0,678	0,959
Tag 7 vs. K	-	0,071	0,263	0,170
Tag 9 vs. K	-	0,724	0,385	0,209
Tag 11 vs. K	-	0,023	0,059	0,012
Tag 7 vs. Tag 2	0,020	0,023	0,008	0,050
Tag 9 vs. Tag 7	0,588	0,272	0,646	0,136
Tag 11 vs. Tag 9	0,070	0,583	0,241	0,060

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert. K: keine Exposition; NDEA: *N*-Nitrosodiethylamin; BPDE: Benzo[a]pyren-diol-epoxid; Na₂Cr₂O₇: Natriumdichromat; - : nicht getestet.

3.7 DNA-Reparatur

Für die Untersuchung der DNA-Reparatur bzw. der individuellen Reparaturfähigkeiten wurden von 10 ausgewählten Personen Lymphozyten aus peripherem Blut isoliert. Das Alter der ausschließlich männlichen Spender lag zwischen 24 und 36 Jahren, der Mittelwert bei 30,9 Jahren (Anamnesen der Spender siehe Anhang, Tabelle 20).

3.7.1 DNA-Reparatur von Lymphozyten

Von Lymphozyten derselben Spender wurden jeweils drei Ansätze für die Untersuchung der DNA-Reparatur durchgeführt, um Unterschiede im Reparaturverhalten von nicht stimulierten, während der Inkubation einstündig stimulierten und 24-stündig mit PHA stimulierten Lymphozyten darzustellen. Dazu wurde die DNA der Lymphozyten durch eine einstündige H_2O_2 -Inkubation geschädigt. Im Anschluss daran wurden Reparaturphasen von 0, 15, 30 und 60 Minuten gewährt und die persistierenden Schäden mit Hilfe der Mikrogelelektrophorese quantifiziert.

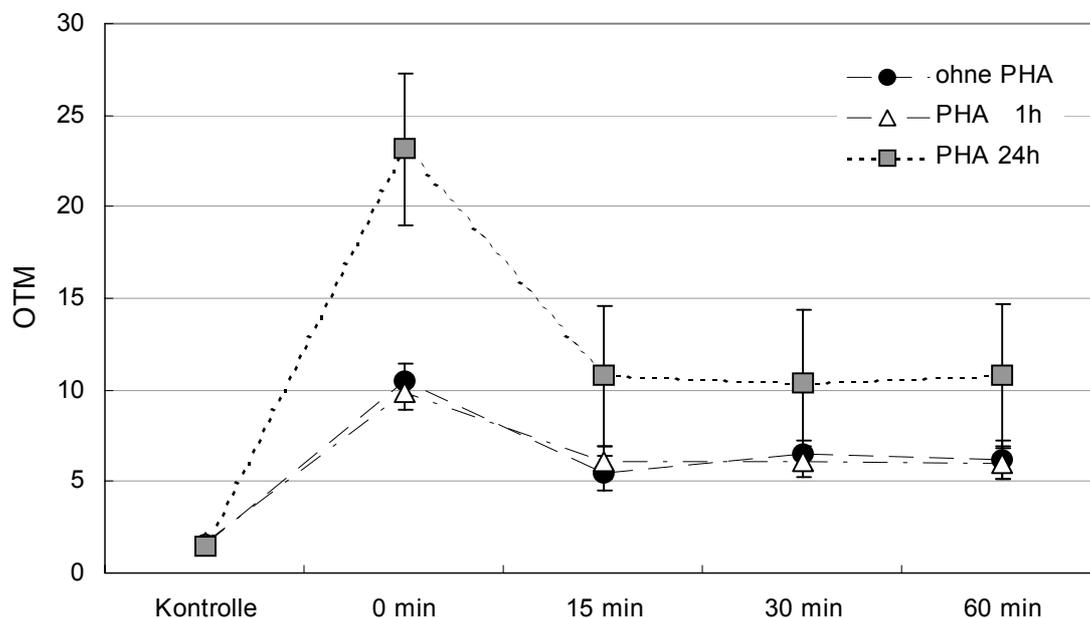


Abbildung 31: DNA-Reparatur H_2O_2 -geschädigter Lymphozyten, die ohne (●), mit einstündiger (Δ) oder 24-stündiger (■) PHA-Stimulierung inkubiert wurden. Dargestellt werden die Ansätze der Kontrolle und der H_2O_2 -Schädigung nach 0, 15, 30 und 60 Minuten Reparaturintervall. OTM: Olive Tail Moment als quantitatives Maß genotoxischer Schädigung. Mittelwerte aus 10 Versuchen. Die Fehlerbalken bezeichnen den Standardfehler der Mittelwerte.

Der Großteil der DNA-Reparatur von geschädigten Lymphozyten in Medium, dem kein oder nur einstündig während der Fremdstoffinkubation PHA zugesetzt wurde, findet in den ersten 15 Minuten statt. Eine längere Reparaturphase von 30 bzw. 60 Minuten ergibt nahezu gleichbleibende OTM-Werte. Eine 24-stündige PHA-Stimulierung dagegen äußert sich in einer höheren DNA-Schädigung durch H_2O_2 . Auch hier ist die Reparaturkinetik in den ersten 15 Minuten am höchsten.

3.7.2 Individuelle Reparaturfähigkeit von Lymphozyten

Zur Bestimmung der individuellen Reparaturkapazität wurde die Reduktion der DNA-Fragmentierung von 24 Stunden PHA-stimulierten Lymphozyten in den ersten 15 Minuten nach der Exposition herangezogen. Pro Spender wurden Doppelversuche durchgeführt.

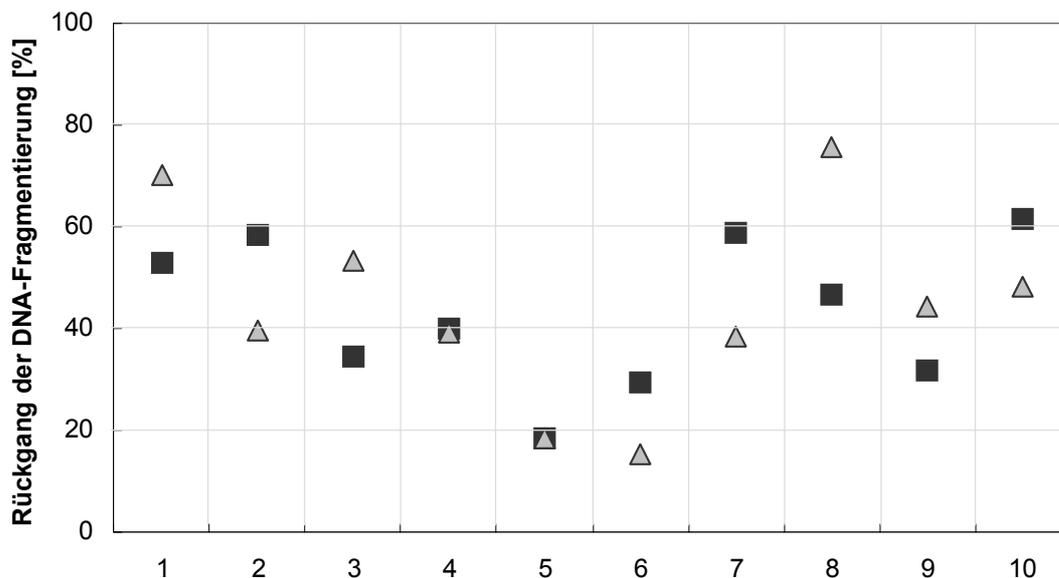


Abbildung 32: Individuelle DNA-Reparaturkapazität. Darstellung des prozentualen Rückgangs der durch H_2O_2 verursachten DNA-Fragmentierung in einer 15-minütigen Reparaturphase an 10 Probanden (1-10). Es wurden jeweils zwei unabhängige Versuche (▲; ■) durchgeführt.

Bei den 10 untersuchten Probanden liegen nach einer 15-minütigen Reparaturphase die individuellen Rückgänge der DNA-Fragmentierung zwischen 15 % und 75 %. Die Lymphozyten der einzelnen Spender weisen in den beiden Versuchsdurchgängen unterschiedliche Reparaturkapazitäten auf. Diese Unterschiede sind aber geringer als die Unterschiede zwischen den verschiedenen Spendern (Abb. 32).

3.7.3 Individuelle Reparaturfähigkeit von Proteinextrakten

Zusätzlich wurde die individuelle Reparaturkapazität der 10 Probanden über die Aktivität eines Proteinextraktes bestimmt, welcher aus Lymphozyten gewonnen wurde.

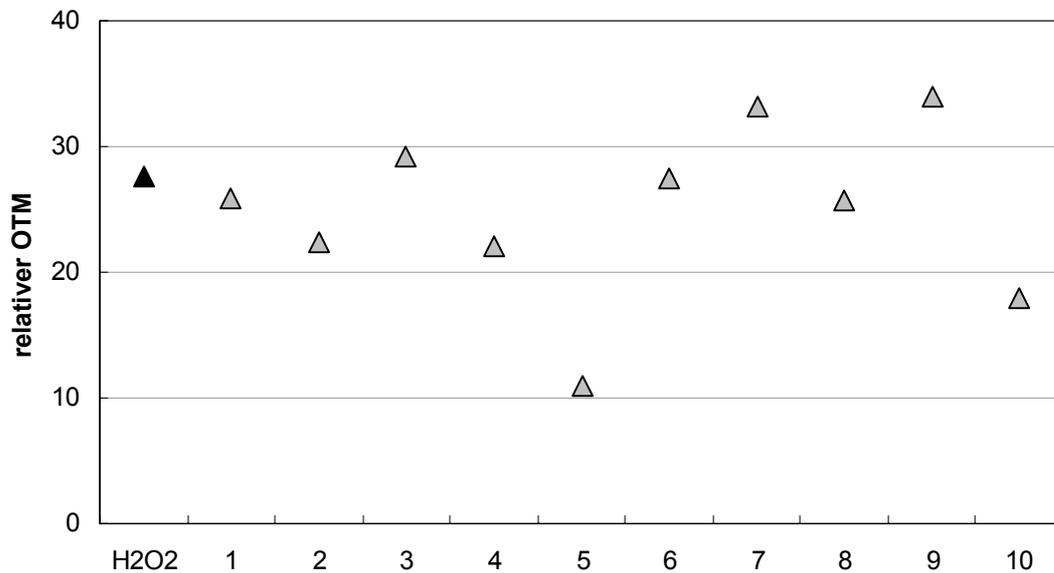


Abbildung 33: Individuelle DNA-Reparaturkapazität über die Aktivität von Lymphozyten-Proteinextrakten. Darstellung der DNA-Fragmentierung, die durch initiale Schädigung (H_2O_2 ; ▲) sowie durch zusätzliche Inkubation mit Reparaturenzymen aus den individuellen Proteinextrakten der 10 Probanden (1-10; ▲), induziert wurde. Zur Quantifizierung der DNA-Fragmentierung wurde der relative Olive Tail Moment verwendet ($OTM_{Schädigung} - OTM_{Kontrolle}$).

Durch Inkubation der individuellen Proteinextrakte mit bereits H_2O_2 -geschädigter Substrat-DNA kann die Aktivität darin enthaltener Reparaturenzyme untersucht werden. Da diese Proteinextrakte vorwiegend aus Endonukleasen bestehen, ist eine Zunahme der DNA-Fragmentierung gegenüber den extraktlosen Ansätzen zu beobachten. Als Kontrolle dient H_2O_2 -geschädigte Substrat-DNA, die nur mit Extrakt-puffer inkubiert wurde. Auch in diesem Versuchsansatz zeigen sich individuell sehr unterschiedliche Reaktionen. Nur bei den Probanden 3, 7 und 9 verursacht der Proteinextrakt im Vergleich zur Kontrolle einen Anstieg der DNA-Fragmentierung. Bei den Probanden 2, 4, 5, und 10 jedoch nimmt die DNA-Migration ab (Abb. 33).

Gesamtproteingehalt der Extrakte

Der Proteingehalt der Lymphozytenextrakte liegt zwischen 10,4 und 14,9 mg/ml. Lediglich bei Proband 3 konnten nur 5,2 mg/ml Gesamtprotein nachgewiesen werden.

Tabelle 17: Gesamtproteinkonzentration in Lymphozyten-Proteinextrakten der 10 untersuchten Probanden.

Proband	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
mg/ml	14,6	10,4	5,2	13,7	14,4	14,8	13,5	11,5	12,8	14,9

3.7.4 Gegenüberstellung der individuellen Reparaturfähigkeiten

Eine Gegenüberstellung der in den beiden Untersuchungen festgestellten individuellen Reparaturfähigkeiten zeigt erhebliche Abweichungen. Im Versuch der Lymphozyten-Reparatur weisen die Probanden 1, 2, 7, 8 und 10 relativ hohe Reparaturkapazitäten bzw. Rückgänge der DNA-Fragmentierung auf. Die Reparatur über die individuellen Proteinextrakte hingegen stellt keine oder nur eine sehr geringe Aktivität dar.

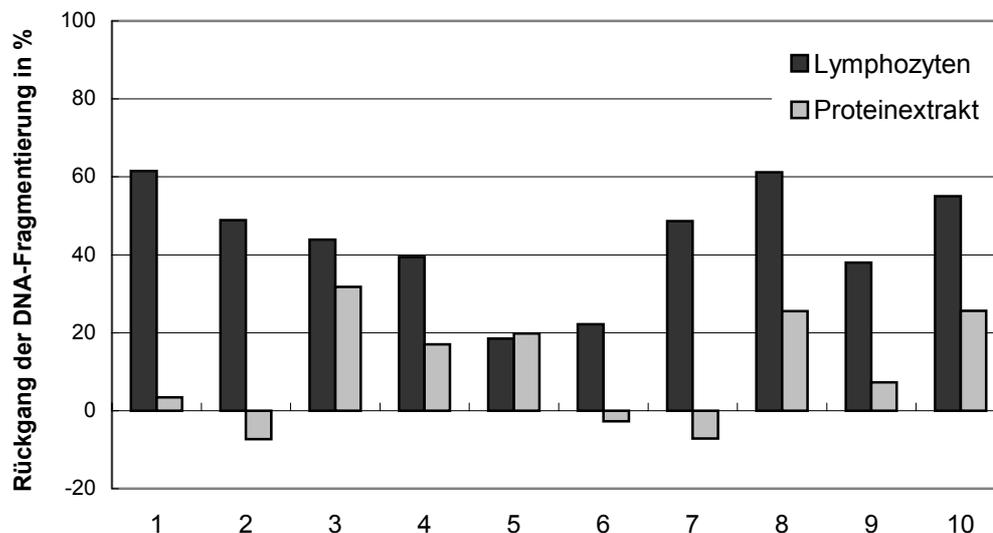


Abbildung 34: Individuelle Reparaturkapazitäten von 10 Probanden (1-10) in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen. Vergleichende Darstellung des individuellen prozentualen Rückgangs einer durch H₂O₂ induzierten DNA-Fragmentierung in Lymphozyten (■) bzw. durch den Lymphozyten-Proteinextrakt (▒).

Um die Ergebnisse der beiden Methoden zur Untersuchung der individuellen Reparaturfähigkeit zu vergleichen, wurde der Korrelationskoeffizient „r“ nach Pearson berechnet. Dabei zeigten die ermittelten Rückgänge der DNA-Fragmentierung in Lymphozyten und in Proteinextrakten nur eine sehr geringe Korrelationen ($r = 0,088$). Hier muss jedoch die für eine Korrelationsanalyse geringe Fallzahl berücksichtigt werden.

3.8 Vergleich Mikrokerntest – Mikrogelelektrophorese

Um die Aussagekraft der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) gegenüber einem anderen etablierten Genotoxizitätstest darzustellen, wird ein Vergleich beider Testsysteme angestellt. Aus peripherem Blut von 20 Spendern wurden Lymphozyten isoliert, die in Parallelansätzen kultiviert und gegenüber NDEA exponiert wurden. Die induzierte DNA-Schädigung wurde sowohl im Mikrokerntest als auch im Comet Assay evaluiert. Das Spenderkollektiv bestand aus 7 Frauen und 13 Männern im Alter von 19 bis 70 Jahren, der Altersdurchschnitt lag bei 36 Jahren (Anamnesen der Spender im Anhang, Tabelle 21).

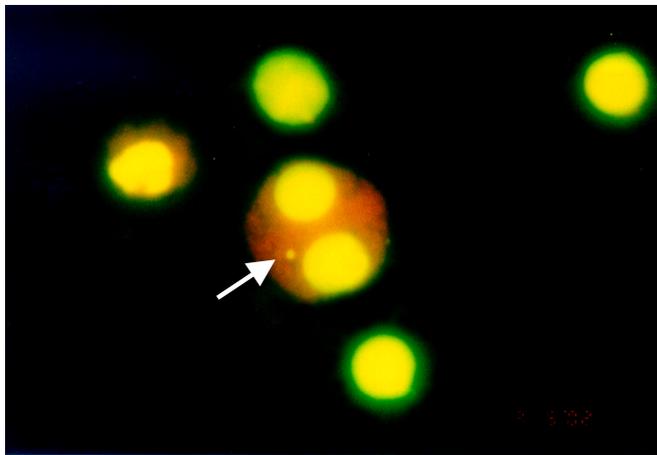


Abbildung 35: Darstellung einer binukleären Lymphozytenzelle mit Mikrokern (Pfeil). Kernmaterial ist gelb gefärbt, Zytoplasma rot; Färbung Acridin-Orange, Fluoreszenzmikroskopie, Vergrößerung 1000fach.

Im Mikrokerntest weisen Lymphozyten aus der nicht exponierten 72-stündigen Kultur eine Mikrokernrate von 8 pro 1000 binukleären Zellen auf. Nach erfolgter Nitrosaminbehandlung verdoppelt sich die Rate der gebildeten Mikrokerne. Damit induziert NDEA im Mikrokerntest eine erhöhte Mikrokernbildung ($p \leq 0,001$).

Die DNA der im gleichen Ansatz über 44 Stunden kultivierten Lymphozyten zeigt in der Mikrogelelektrophorese nach Inkubation mit reinem Medium einen OTM-Wert von 2. Eine einstündige Inkubation mit dem Nitrosamin NDEA ruft eine DNA-Fragmentierung mit dem OTM-Wert von 4,4 hervor. Dieser Wert ist gegenüber dem Kontrollansatz, entsprechend dem Ergebnis aus dem Mikrokerntest, ebenfalls signifikant erhöht ($p \leq 0,001$).

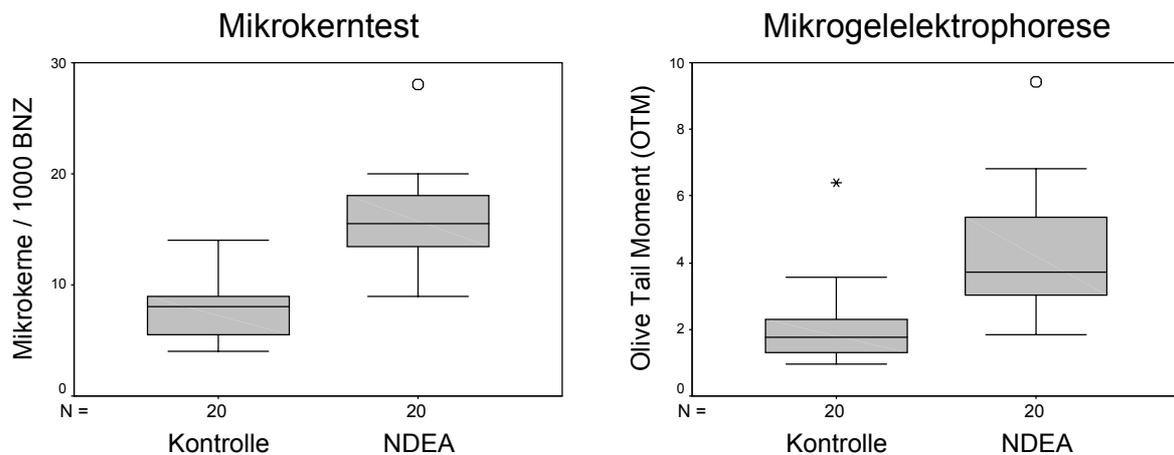


Abbildung 36: Genotoxischer Effekt von *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) an Lymphozyten derselben Spender im Mikrokerntest und in der Mikrogelelektrophorese. Anzahl der Mikrokerne pro 1000 binukleärer Zellen (BNZ) bzw. Olive Tail Moment (OTM) als quantitatives Maß genotoxischer Schädigung in den Kontroll- und NDEA-exponierten Ansätzen. N: Anzahl der Versuche; o: Ausreißer; *: Extremwert.

Um die Aussagekraft der beiden Genotoxizitätstests gegenüberzustellen, wurde der Korrelationskoeffizient „*r*“ nach Pearson zwischen den Ergebnissen von Mikrokerntest und Mikrogelelektrophorese berechnet. Dabei ergaben sich sowohl für die Kontrollen- als auch für die NDEA-exponierten Ansätze nur sehr geringe Korrelationen (Kontrolle: $r = 0,128$; NDEA: $r = 0,037$). Auch hier muss jedoch die für eine Korrelationsanalyse geringe Fallzahl berücksichtigt werden.

Tabelle 18: p-Werte im Wilcoxon-Test für den Vergleich der DNA-Schädigung im Mikrokerntest und in der Mikrogelelektrophorese.

p ≤	Mikrokerntest	Mikrogelelektrophorese
Kontrolle	0,001	0,001
NDEA	0,001	0,001

Das lokale α -Niveau wurde bei $p \leq 0,05$ definiert.

4 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wird ein dreidimensionales Miniorgankulturmodell aus humanem nasalen Epithel vorgestellt. Zum einen wurden genotoxische Effekte von Xenobiotika unterschiedlicher Stoffklassen mit Mehrfachexpositionen und nachfolgenden Reparaturintervallen untersucht und damit bessere Einschätzungen des gesundheitsgefährdenden Potenzials dieser Stoffe ermöglicht. Zum anderen wurden zur weiteren Etablierung von Miniorgankulturen Beobachtungen zu Vitalität und Apoptose durchgeführt. Durch Kultivierung oder Fremdstoffexposition hervorgerufene mögliche Entzündungsreaktionen sollten über die Freisetzung von Zytokinen detektiert werden und zur weiteren Validierung des Modells beitragen.

Zur Darstellung der individuellen Reparaturkapazität wurden zwei unterschiedliche Versuchsansätze humaner Lymphozyten verglichen.

Außerdem wurde die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese dem Mikrokerntest hinsichtlich der Aussagekraft von DNA-Schädigung gegenübergestellt.

4.1 Kultivierung und histologische Untersuchung der Miniorgane

Dreidimensionale Organkulturen sind eine alternative Form der Kultivierung respiratorischen Epithels. Steinsvag et al. berichten über nichtadhäsive stationäre Organkulturen aus humanem adenoiden Gewebe [1991]. Auch zu Kulturen menschlicher Bronchialbiopsien liegen genauere Ausführungen vor [Fjellbirkeland et al., 1996]. Eine modifizierte Methode zur Kultivierung dreidimensionaler Organkulturen nasaler Mukosa wurde von Kleinsasser et al. [2001] entwickelt und erstmals deren Verwendbarkeit für *in vitro* Langzeitinkubationen mit Xenobiotika gezeigt.

Miniorgankulturen wurden unter anderem eingesetzt an Schilddrüsengewebe zur Untersuchung von Hormonproduktionen [Hayakawa et al., 1993], an humanen Leberfeinschnitten zur Beobachtung von DNA-Veränderungen [Beamand et al., 1998] oder an Haut zur Analyse der Aktivierung von Benzo[a]pyren [Watson et al., 1988]. Durch die Integrität der Zellen in ihrem organspezifischen Verbund sollen möglichst natürliche, der Situation im lebenden Organismus entsprechende Verhältnisse dargestellt werden. Besonders wichtig erscheint dies bei Versuchsansätzen, die den Kontakt von Fremdstoffen mit Zielorganen untersuchen. Von Monolayer- oder Suspensionskulturen, wie sie meist für

entsprechende Untersuchungen eingesetzt werden, ist bekannt, dass sie sehr oft einen völlig veränderten oder aufgehobenen Fremdstoffmetabolismus aufweisen [DeLeve et al., 1997; Teissier et al., 1998].

Mit Hilfe histologischer und lichtmikroskopischer Methoden wurde überprüft, ob es möglich ist, humane nasale Mukosa im Zellverbund ohne Verlust des strukturellen Aufbaus zu kultivieren. Paraffinschnitte von Miniorganen humaner nasaler Mukosa ergaben, dass zu Beginn der Kultivierung nur ein kleiner Anteil der Gewebefragmente von respiratorischer Mukosa bedeckt war. Bei einigen Kulturansätzen war sowohl mehrreihiges wie auch mehrschichtiges Flimmerepithel zu beobachten, was mit häufigen Gewebereaktionen humaner Nasenschleimhaut auf Einwirkungen exogener Faktoren zu erklären ist. Neben Epithelschädigungen durch Infektion, Gebrauch von Nasentropfen und allgemeinen Umwelteinflüssen können physiologisch bedingte Umwandlungen der humanen nasalen Mukosa auftreten. Das Epithel im vorderen Teil der unteren Nasenmuschel entspricht beim Menschen häufig nicht dem feinstrukturellen Bild respiratorischer Mukosa mit typischem Flimmerepithel. Als Reaktion auf Luftströmung kann eine funktionelle Umwandlung dieses Epithels, teilweise mit Zilienverlust, über ein Zylinderepithel bis hin zum Plattenepithel erfolgen [Jahnke, 1992].

Nach sechs bis sieben Kulturtagen waren die hier untersuchten Miniorgane fast vollständig von respiratorischem Epithel umgeben. Ein Wandern von Epithelzellen zu den verletzten Gewebestellen ist von Untersuchungen zur Wundheilung *in vivo* und *in vitro* dokumentiert [Al-Batran et al., 1999]. Durch Migration von Epithelzellen werden die präparationsbedingten Schnittstellen an der Oberfläche des Fragments geschlossen. Während dieses Vorgangs nehmen die Epithelzellen eine flache und längliche Form an. Das neue Epithel besteht aus zwei bis drei Zellreihen. Die Miniorgane nehmen bei einem Durchmesser von ein bis zwei Millimetern eine rundliche bis ovale Form an. Nach 14 Tagen bieten sie das morphologische Bild eines zellarmen, bindegewebigen Körpers, dem ein mehrreihiges respiratorisches Epithel aufsitzt. Neben einer Basalmembran sind Basalzellen, z.T. zilientragende Epithelzellen sowie sezernierende Becherzellen vorhanden. Die Basalmembran ist sehr wichtig für das Wachstum und auch für die Differenzierung von respiratorischem Epithel *in vitro* [van Scott et al., 1991; Chevillard et al., 1991]. Morphologische und immunhistochemische Untersuchungen belegen *in vitro* epitheliales Zellwachstum, Differenzierung der Zellen sowie proliferierende Fähigkeit dieses Epithels [Fjellbirkeland et al., 1996]. Einige der Epithelzellen sind zilientragend. Sowohl das Auftreten von ziliären Vorläufern wie Basalkörper im Zytoplasma von Epithelzellen als auch das Vorkommen kürzerer Zilien spricht für eine anhaltende

Ziliennachbildung *in vitro* [Jorissen et al., 1990; Curtis et al., 1987]. Ein koordinierter Zilienschlag ist bei ca. 80 % der hier untersuchten Kulturen nachweisbar, wie auch an Organkulturen bronchialer Epithelzellen des Menschen beobachtet wurde [Bals et al., 1998].

Im Vergleich zu Monolayerkulturen bieten Organkulturen wichtige Vorteile. Eine Differenzierung in verschiedene Zelltypen bleibt mindestens vier Wochen lang erhalten [Bals et al., 1998], in Monolayerkulturen dagegen dedifferenzieren die Epithelzellen teilweise schon innerhalb einer Woche [Jorissen et al., 1990]. Das Epithel der Miniorgane besitzt im Gegensatz zu dem aus Monolayerkulturen einen Aufbau gemäß der *in vivo* Situation. Die Zellen wachsen auf ihrer Matrix und bilden ihre eigene Basalmembran. Außerdem ist bei Organkulturen eine Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen möglich.

Mit dreidimensionalen Organkulturen respiratorischen Epithels steht eine alternative, zeitlich stabile und *in vivo* nahe Kulturform zur Verfügung, mit der detaillierte Experimente an Zellmechanismen in Verbindung mit epithelialem Zellwachstum, mit Differenzierung und Reparatur durchgeführt werden können.

Kleinsasser et al. [2001] gelang es zu zeigen, dass sich dieses Miniorgankulturmodell aus humaner nasaler Mukosa für wiederholte Fremdstoffinkubationen von Schleimhautzellen im Zellverbund gut eignet. Hiermit kann eine *in vivo* ähnliche Situation der Mukosa des oberen Aerodigestivtraktes dargestellt werden. Außerdem ermöglicht die Realisierung von mehrfachen Inkubationen mit nachfolgenden Reparaturphasen die Simulation einer bestimmten beruflichen Exposition.

4.2 DNA-Schädigung an Miniorganen

Nach siebentägiger Kultivierung wurden die Miniorgane ein-, zwei- und dreifach gegenüber ausgewählten Fremdstoffen exponiert. Im Anschluss daran wurden sie in Einzelzellen separiert um mittels Mikrogelelektrophorese die induzierte DNA-Fragmentierung zu quantifizieren. Zusätzlich wurde der nach einer 24-stündigen Reparaturphase persistierende DNA-Schaden evaluiert.

4.2.1 DNA-Fragmentierung durch *N*-Nitrosodiethylamin

Nitrosamine, wie *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA), sind als Kanzerogene der Gruppe 2 eingestuft [IARC, 2001]. Diese Kategorie ist definiert als "wahrscheinlich karzinogen bei Menschen". Nitrosamine werden als leicht flüchtige Stoffe vorwiegend über die Atemwege aufgenommen, aber da sie auch in Nahrungsmitteln vorkommen [Boeing et al., 1993], stellt

die Ingestion einen weiteren Aufnahmeweg dar. Neben Tabakrauch, Medikamenten und Kosmetika sind verschiedene Baustoffe ebenfalls Quellen volatiler Nitrosamine [Abdel-Rahman et al., 2000; Brown, 1999; Sommer und Eisenbrand, 1988]. Eine zusätzliche Belastung kann durch berufsbedingte Umstände (z.B. in der Sprengstoff-, Leder-, Gummi- und Metallindustrie) hervorgerufen werden [Monarca et al., 2001; Sullivan et al., 1998].

Nitrosamine stellen sogenannte Präkarzinogene dar, d.h. sie müssen zunächst metabolisch aktiviert werden. Der klassische Weg der Aktivierung von Dialkylnitrosaminen erfolgt durch eine α -C-Hydroxilierung über Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen. Über verschiedene reaktive Zwischenprodukte wird ein Diazohydroxid gebildet, welches als Elektrophil mit nukleophilen Zentren der DNA zu stabilen Addukten reagieren kann, so dass genotoxische Effekte ausgelöst werden. Als ultimatives Karzinogen diskutiert wird auch der spontane Zerfall des gebildeten Diazohydroxids zu einem Carbeniumion, das die nukleophilen Zentren von DNA, RNA und Proteinen zu alkylieren vermag [Eisenbrand und Metzler, 1994].

Epidemiologische Untersuchungen an Arbeitern in der Gummiindustrie zeigten, dass hohe Nitrosaminkonzentrationen mit einer erhöhten Sterblichkeit aufgrund von Tumoren in Ösophagus, Mundhöhle und Pharynx verbunden sind [Straif et al., 2000]. Ein großer Verzehr von gepökeltem Fisch und eine damit verbundene hohe Aufnahme von Nitrosaminen wird als Grund für Nasopharynxkarzinome in Südchina gesehen [Zou et al., 1994].

Durch die längerfristige Inhalation des Nitrosamins Nitrosomethylpiperazin konnte in einem Langzeitversuch an Ratten die Entstehung von Tumoren der Nasenhöhle nachgewiesen werden [Klein et al., 1999]. Nach oraler Aufnahme des tabakspezifischen Nitrosamins NNK (4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon) wurde an Nagern eine DNA-Schädigung in den Epithelien der Nasenhöhle festgestellt [Pool-Zobel et al., 1992]. NDEA-versetztes Trinkwasser verursachte eine erhöhte Anzahl von Einzelstrangbrüchen in der Rattenleber [Pasupathy und Bhattacharya, 2000]. Bezüglich der Genotoxizität von Nitrosaminen an humanem Gewebe liegen nur sehr wenige Informationen vor. Untersuchungen an Zellkulturen humaner fötaler Nierenepithelzellen ergaben ein kanzerogenes Potenzial von Nitrosaminen [Huang et al., 1986]. An humanen, metabolisch kompetenten Epithelzelllinien von Lunge, Leber und Darm wurden genotoxische Effekte von verschiedenen Prokanzerogenen, u.a. von Nitrosaminen, dargestellt [Mace et al., 1998]. An humanen bukkalen Mukosazellen wurde als Epithelzellkultur oder als Explantat das tabakspezifische Karzinogen NNK untersucht [Liu et al., 1993]. Die genotoxische Wirkung von NDEA konnte bereits an verschiedenen humanen Epithelien des oberen Aerodigestivtraktes, wie an oropharyngealer, laryngealer und nasaler

Mukosa, gezeigt werden [Harréus et al., 1999; Kleinsasser et al., 2000a] Außerdem wurde der genotoxische Effekt von NDEA an Einzelzellen und an Organkulturen nasaler Mukosa nach ein- und mehrfacher Fremdstoffinkubation verglichen [Kleinsasser et al., 2001], wobei an Einzelzellen deutlich höhere Schädigungsraten auftraten. Eine dreimalige NDEA-Exposition hatte in Miniorgankulturen keinen additiven Effekt auf die DNA-Fragmentierung.

In den hier untersuchten Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa verursachte NDEA eine geringe, aber signifikante DNA-Schädigung. Auch durch mehrfache Exposition fand jedoch keine Steigerung des Schädigungsgrades statt. Eine 24-stündige Reparaturphase hatte keinen Rückgang der DNA-Fragmentierung zur Folge. Im Vergleich zu Untersuchungen an Einzelzellen ist das Schädigungsniveau in Organkulturen etwas niedriger [Kleinsasser et al., 2001]. Dies könnte mit der Exposition der Zellen im Gewebeverbund zu erklären sein, da der Fremdstoff während einer einstündigen Belastung vorwiegend mit den äußeren Zellen des Organs in Verbindung tritt, die inneren dagegen erst nach seiner Diffusion betroffen sind. Auch eine aufrechterhaltene metabolische Kompetenz könnte für eine „Entgiftung“ der Fremdstoffe verantwortlich sein, denn dies würde sich ebenfalls als verminderte DNA-Migration in Miniorganzellen äußern. Ähnliche Beobachtungen wurden an Monolayerzellkulturen und Sphäroiden nach Etoposidexposition gemacht [Huang et al., 1998]. Der genotoxische Effekt in Sphäroiden lag unter dem Schädigungsniveau der Monolayerkultur. Ein Teil der Zellen zeigt im Comet Assay keine DNA-Fragmentierung, vermutlich sind dies nicht-proliferierende Zellen aus dem Inneren des Sphäroids [Olive und Banath, 1992]. Außerdem wurde beobachtet, dass Sphäroide oft stärker resistente Zellen gegenüber verschiedenen chemotherapeutischen Substanzen enthalten als Monolayerkulturen [Kobayashi et al., 1993]. Der Informationsaustausch zwischen Zellen könnte einen weiteren Grund für die geringere DNA-Schädigung in dem hier vorgestellten Modell darstellen. Wahrscheinlich besitzt er erheblichen Anteil an der metabolischen Kompetenz der Miniorgane und ist möglicherweise für die effektivere Eliminierung des Schadstoffes sowie für die gesteigerte DNA-Reparaturleistung verantwortlich. Auch Olive und Durand [1994] vermuten einen Kontakteffekt als Ursache für die Resistenz der von ihnen untersuchten Sphäroidzellen. Sowohl die interzelluläre Kommunikation, welche die Regeneration der DNA-geschädigten Sphäroidzellen erhöht, als auch die Veränderung der Zellform, der Genexpression und der nukleären Form könnten zu einer effizienteren DNA-Reparatur bzw. zu erhöhter Resistenz führen.

4.2.2 DNA-Fragmentierung durch Benzo[a]pyren-diol-epoxid

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) sind Umweltschadstoffe und als Risikofaktoren für die Krebsentstehung beim Menschen anerkannt. Sie werden bei unvollständiger Verbrennung von organischem Material freigesetzt und sind unter anderem in Tabakrauch [Smith et al., 2000], Autoabgasen sowie in Nahrungsmitteln [Kazerouni et al., 2001] enthalten. Benzo[a]pyren (B[a]P) gilt als Leitsubstanz der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe und wird von der IARC (International Agency for Research on Cancer) als humanes Kanzerogen der Klasse 2A eingestuft [IARC, 2001]. B[a]P selbst zeigt erst Toxizität, wenn es in der Zelle mittels Cytochrom P450 abhängiger Monooxygenasen und Peroxidasen metabolisch aktiviert wird [Phillips und Grover, 1994]. Unter Entstehung von Radikalen wird es von der Arylhydrocarbonhydroxylase in hochreaktive Dihydrodiol-Epoxiderivate umgewandelt. Epoxide sind elektrophil und greifen die DNA an, indem sie über kovalente Bindung sperrige Addukte bilden [Peltonen und Dipple, 1995]. Strukturelle Veränderungen in der DNA führen zu Störungen normaler Zellfunktionen wie Transkription oder Replikation [Friedberg et al., 1995]. Neben DNA-Addukten können auch alkalilabile Stellen oder DNA-Strangbrüche durch B[a]P und Metaboliten hervorgerufen werden [Sage und Haseltine, 1984]. Derartige Schäden können durch Nukleotid- oder durch Basenexzisionsreparatur entfernt werden [Tang et al., 1992; Braithwaite et al., 1998].

In epidemiologischen Untersuchungen wurde eine Korrelation zwischen großem Verzehr von geräuchertem, PAH-haltigem Essen, und einer Erkrankung an Tumoren des Magen-Darm-Traktes festgestellt [Fritz und Soos, 1980]. Auch bei chinesischen Frauen, die beim Kochen starken Öldämpfen ausgesetzt waren, wurde eine erhöhte Morbidität an Adenokarzinomen der Lunge gefunden [Li et al., 1994]. Beschäftigte in der Eisen-, Steinkohle-, Stahl- und Teerindustrie sind ebenfalls einer vermehrten PAH-Belastung und somit einem genotoxischen Potenzial ausgesetzt [Maier und Sennewald, 1994; Haguenoer et al., 1990].

Genotoxische und mutagene Effekte von B[a]P und dessen Metaboliten BPDE sind an Säugern und an humanen Zellsystemen untersucht [Conney et al., 1994]. Ein erhöhtes Risiko für Krebsentstehung durch orale Exposition wiesen Culp et al. [1998] an Mäusen nach, deren Nahrung mit reinem B[a]P oder einem Kohle-Teer-Gemisch versetzt war. Durch B[a]P verursachte Tumoren wurden überwiegend im Vormagen gefunden, durch das Kohle-Teer-Gemisch sogar an mehreren Lokalisationen, vor allem aber in Lunge und Darm.

Wei et al. [1996] demonstrierten an humanen Lymphozyten eine Assoziation von BPDE mit erhöhtem Lungenkrebsrisiko. An humanen Fibroblasten konnte gezeigt werden, dass PAHs

nach Kurzzeitbehandlung DNA-Addukte und Strangbrüche hervorrufen. BPDE führte zu einem konzentrationsabhängigen Ansteigen der DNA-Migration im Comet Assay [Hanelt et al., 1997].

In den hier vorgestellten Untersuchungen induzierte BPDE an Miniorganen humaner nasaler Mukosa unter den spezifischen Versuchsbedingungen eine mittelgradige DNA-Fragmentierung. Nach zwei- und dreifacher Exposition konnte kein weiteres Ansteigen der DNA-Schädigung beobachtet werden. Möglicherweise wurden die durch BPDE induzierten DNA-Läsionen zwischen den einzelnen Expositionsphasen zum größten Teil repariert. Die Untersuchungen nach 24-stündigen Reparaturintervallen zeigten jedoch keinen Rückgang des Schädigungsgrades. Dies könnte bedeuten, dass effektive Reparatur erst 24 bis 48 Stunden nach einer BPDE-Exposition stattfindet. Venkatachalam et al. [1995] fanden an humanen, reparaturfähigen Fibroblasten ebenfalls eine Persistenz von durch BPDE induzierten Schäden. Nach einer 24-stündigen Reparaturphase waren ebenfalls lediglich 19 % der ursprünglichen Schäden repariert.

4.2.3 DNA-Fragmentierung durch Natriumdichromat

Hexavalente Chromverbindungen, wie Natriumdichromat, gelten als karzinogen für den Menschen und werden von der IARC [1990] der Kategorie 2 zugeordnet. Chrom spielt eine wichtige Rolle an industriellen Arbeitsplätzen. Es findet häufig Verwendung in der Chrom-, Stahl- und Lederindustrie, in der Schweißtechnik und Holzbehandlung [Klein et al., 2001] sowie als Zusatz in Farben und Lacken [Bagchi et al., 1997]. Außerdem ist es Bestandteil des Zements. Das Krebsrisiko ist in diesem Berufsfeld deutlich erhöht [Davies et al., 1991].

Chrom (VI) wirkt als Präkanzerogen, das erst in der Zelle zum ultimativen Kanzerogen Chrom (III) reduziert wird. Mit Hilfe eines aktiven Transportsystems kann Chrom (VI) durch die Zellmembranen in die Zielzelle gelangen, wo es über Zwischenprodukte und der Freisetzung von Radikalen zu Chrom (III) reduziert wird, welches stabile Komplexe mit DNA, RNA, Proteinen oder Lipiden bildet. Auch die erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen führt zu DNA-Schäden, wie Strangbrüche und alkalilabile Stellen, zu veränderter Genexpression sowie zu Zelltod durch Apoptose [De Flora et al., 1989]. Einige Studien konnten zeigen, dass ein chromatinduzierter Schaden von der Bildung fünfwertiger Chromzwischenprodukte abhängt [Jones et al., 1991; Shi und Dalal, 1992].

Epidemiologische Studien haben eine hohe Inzidenz von Tumoren im Respirationstrakt bei Arbeitern gefunden, die aufgrund ihrer Beschäftigung hohen Chrom (VI)-Konzentrationen

ausgesetzt waren [Alcedo und Wetterhahn, 1990]. Neben Lungenkarzinomen [Gibb et al., 2000] kann hexavalentes Chrom auch Tumoren in Nase und Nasennebenhöhlen verursachen [Davies et al., 1991; Satoh et al., 1994]. In einer Studie von Chen und Seaton [1998] wird eine Assoziation zwischen dem Maler- und Lackiererberuf und erhöhtem Krebsrisiko bezüglich Blase, Magen, Leber und Ösophagus festgestellt.

In Zellkulturen ruft Chromat neoplastische Transformationen hervor [Elias et al., 1989]. Pool-Zobel et al. [1994] untersuchten den genotoxischen Effekt von Chromat an nasalen Zellen von Menschen und von Ratten, wobei in beiden Organismen vergleichbare Zyto- wie auch Genotoxizität hervorgerufen wurde. Auch Harrès et al. [1999] konnte Cr (VI)-induzierte DNA-Schäden an humanem Epithel aus Nase, Pharynx und Larynx nachweisen.

In der vorliegenden Untersuchung weisen die Miniorgankulturen nach zwei- und dreifacher Natriumdichromatexposition deutlich zunehmende DNA-Fragmentierung auf. Auch nach den 24-stündigen Reparaturintervallen konnte kein Rückgang, sondern sogar ein weiterer Anstieg der DNA-Fragmentierung beobachtet werden. Deshalb ist von einer sehr starken Schädigung auszugehen, die sich in Abwesenheit des Schadstoffes noch weiter ausdehnt. Vermutlich sind die gebildeten Sauerstoffradikale für das Auslösen einer Kettenreaktion verantwortlich, die zur Bildung ständig neuer Radikale führt. Dadurch könnte fortwährend weiterer DNA-Schaden induziert werden, was in den Miniorgankulturen auch beobachtet wurde. Es ist davon auszugehen, dass sich das Chromat in allen Zellen sehr gut verteilt, da ein ziemlich homogenes DNA-Schädigungsmuster vorherrscht. Vermutlich kann es durch Ionenkanäle in die äußeren Zellen eindringen. Von dort aus greifen die durch Chrom (VI) gebildeten Radikale auf die Nachbarzellen über und verursachen auch in den inneren Zellen DNA-Schäden. Chromat wird konzentrationsabhängig in die Zelle aufgenommen. Dort werden bis zu 30-fache Konzentrationen gegenüber dem Extrazellulärraum erreicht [Sehlmeyer et al., 1990]. Nach dreifacher Chromatexposition von Miniorgankulturen wurde ebenfalls erhöhte DNA-Fragmentierung gegenüber einfacher Belastung festgestellt [Kleinsasser et al., 2001]. Eine weitere Erklärung für vermehrte Entstehung von Strangbrüchen ist in einer inhibierten DNA-Reparatur zu sehen. Der während der ersten Inkubation induzierte Schaden scheint nicht mehr repariert zu werden. Jede weitere Fremdstoffbelastung lässt das Schädigungsausmaß weiter ansteigen. An chromatgeschädigten Nagerzellen wurde demonstriert, dass Einzelstrangbrüche innerhalb acht Stunden erfolgreich, DNA-Addukte dagegen nur sehr ineffizient repariert wurden [Manning et al., 1994]. Durch eine Kombination von inhibierter

Reparatur und anhaltender Schädigung durch Radikale kann auch das stete Ansteigen der DNA-Fragmentierung in den Zellen der Miniorgane erklärt werden.

4.2.4 DNA-Fragmentierung durch *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin

N-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) wird als beim Menschen wahrscheinlich karzinogen der Gruppe 2A zugeteilt [IARC, 2001]. MNNG wird nicht kommerziell, sondern als experimentelles Mutagen, Teratogen und Karzinogen verwendet [Lewis, 2000]. Früher wurde es für die Herstellung von Diazomethan, einem Methylierungsmittel, benutzt. Mögliche Expositionen bei Beschäftigten beschränken sich auf Forschungslabore [IARC, 1974].

MNNG ist eine alkylierende Substanz und verursacht DNA-Strangbrüche, chromosomale Aberrationen, Mikrokerne sowie Schwesterchromatidaustausch in Human- und Nagerzellen [Hsie et al., 1987]. Es wird unter physiologischen Bedingungen bei Elimination eines Isocyanats zum Diazohydroxid umgewandelt. Dieses wiederum bildet durch spontane Abspaltung von N_2 und OH^- das elektrophile Alkylkation. Alkylierende Verbindungen tragen reaktionsfähige Gruppen, die mit DNA-Basen eine kovalente Bindung eingehen können. So rufen sie fehlerhafte DNA-Strukturen hervor, ohne dabei selbst metabolisiert zu werden.

Eine karzinogene Wirkung von MNNG wurde in tierexperimentellen Studien an Nagern [Aoyagi et al., 2000] nachgewiesen. Slamenova et al. [1997] konnten DNA-Strangbrüche an humanen Leberzellen nach Inkubation mit MNNG feststellen. Eine stark genotoxische Wirkung wurde auch an humanen Darm- und Magenzellen beschrieben [Pool-Zobel et al., 1994]. Humane Zellen des oberen Aerodigestivtraktes zeigten in der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese starke MNNG-induzierte DNA-Fragmentierung [Kleinsasser et al., 2000a; Harréus et al., 1999].

Nach ein-, zwei- bzw. dreifacher MNNG-Exposition der Organkulturen steigt das Ausmaß der DNA-Fragmentierung immer weiter an. Nach 24-stündigen Reparaturintervallen können die induzierten Strangbrüche etwas reduziert werden, der persistierende Schaden ist jedoch immer noch sehr groß. Durch jede zusätzliche Exposition wird somit das Niveau der Schädigung erhöht. Vermutlich tragen die starken kovalenten Bindungen zwischen reaktionsfähigen Gruppen und DNA-Basen zu den zunehmenden Schädigungsraten bei. In Miniorgankulturen hatte eine Mehrfachexposition ebenfalls einen Anstieg der DNA-Migration gegenüber einer einmaligen Belastung zur Folge [Kleinsasser et al., 2001]. Das Nitrosamid MNNG diente in diesen Ansätzen als Positivkontrolle für die Induktion von DNA-Strangbrüchen.

4.3 Apoptose

Nach der ersten, zweiten und dritten Fremdstoffexposition der Miniorgankulturen wurde an bereits separierten Zellen mittels Annexin V-Test der Anteil der Zellen in frühen oder späten Apoptosestadien festgestellt. Mögliche zelltodinduzierende Nebeneffekte, die während der Kultivierung oder nach den Expositionen mit genotoxischen Substanzen auftreten, können bestimmt werden. Dies erlaubt eine bessere Einordnung der Genotoxizitätsmessungen.

4.3.1 Bedeutung der Apoptose

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltodes, der unter normalen physiologischen Bedingungen wie Organogenese, Homöostase und Entwicklung des Immunsystems stattfindet. Sie ist ein lebenswichtiger Mechanismus für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Apparates. Nur wenn Neubildung und Eliminierung der Zellen im Gleichgewicht stehen, bleibt der Organismus gesund. Sie stellt also einen wichtigen Faktor in der Entwicklung und Pathophysiologie mancher Krankheiten dar.

Die zeitliche Abfolge der Apoptose ist charakterisiert durch biochemische Vorgänge, wie die Aktivierung von Caspasen und die mitochondriale Permeabilität, die zur Zerstörung des transmembranalen Potenzials führt. Die Verlagerung von Phosphatidylserin an die Außenseite der Zellmembran und die DNA-Fragmentierung sind typische Merkmale einer apoptotischen Zelle. Der Kern erscheint kondensiert und fragmentiert. Die Verlagerung von Phosphatidylserin vermittelt die Phagozytose apoptotischer und benachbarter Zellen durch Makrophagen. Diese Reaktionen gehen der DNA-Fragmentierung voraus, die kurz nach der irreversiblen Aktivierung von calciumabhängigen Endonukleasen beginnt. Der initialen Aufspaltung der DNA in 50 bis 300 kb lange Stücke folgt die oligonukleosomale Fragmentierung, die auf Doppelstrangbrüchen der DNA beruht [Allen et al., 1997].

In den hier durchgeführten Versuchen wurde Apoptose über Annexin V nachgewiesen. Dieses reagiert in Gegenwart von Calcium spezifisch mit Phosphatidylserin, einem Phospholipid, das ursprünglich im Zellinneren lokalisiert ist. Bei induzierter Apoptose verlagert es sich auf die Außenseite der Zytoplasmamembran und ist über Bindung an Annexin V zu erkennen [van Engeland et al., 1998]. Hierbei handelt es sich um ein frühes Ereignis des apoptotischen Prozesses.

4.3.2 Apoptose durch *N*-Nitrosodiethylamin

Die einfache, zweifache oder dreifache Exposition von Miniorgankulturen gegenüber Nitrosamin *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) hatte zu keinem Untersuchungszeitpunkt Einfluss auf den Anteil früh- oder spät-apoptotischer Zellen.

Eine Studie an neutrophilen Blutzellen beobachtete einen signifikanten Anstieg der apoptotischen Zellen nach einstündiger Inkubation mit *N*-Nitrosodimethylamin. Nach drei Stunden dagegen überwogen meist nekrotische Effekte [Jablonski et al., 1999]. In *N*-Nitrosodimethylamin-behandelten Monolayerkulturen konnten ebenfalls apoptotische Vorgänge wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und DNA-Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden [Lin et al., 1999]. In Endothelzellen verursachte das tabakspezifische Nitrosamin NNK Apoptose, die auch über Annexin V dargestellt wurde [Tithof et al., 2001]. Hier wurden reaktive Metaboliten von Nitrosaminen für die Initiierung der apoptotischen Vorgänge verantwortlich gemacht [Sarafian und Bredesen, 1994].

Möglicherweise waren die Miniorgankulturen nicht in der Lage, das hier verwendete NDEA zu metabolisieren, obwohl Cytochrom P450 in Miniorganen nasaler Mukosa auch nach siebentägiger Kulturdauer noch nachweisbar ist [unveröffentlichte Ergebnisse]. Dies zeigt, dass NDEA in den hier eingesetzten Konzentrationen in Zellen humaner Miniorgankulturen keine Apoptose auslöst.

4.3.3 Apoptose durch Benzo[a]pyren-diol-epoxid

In Miniorgankulturen, die dem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff Benzo[a]pyren-diol-epoxid (BPDE) ausgesetzt waren, konnten erst nach der dritten Exposition vermehrt früh-apoptotische Zellen nachgewiesen werden.

Normalerweise findet die frühe Apoptose bereits drei bis vier Stunden nach einer Exposition statt [Bacsó et al., 2000]. Allerdings induzieren polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe auch in anderen Versuchsansätzen Apoptose erst nach vielen Stunden. In einer Untersuchung von humanen B-Zellen beobachteten Salas und Burchiel [1998] 18 Stunden nach einer B[a]P-Exposition einen Anstieg der apoptotischen Zellen um 75 %, nach einer BPDE-Exposition sogar um 215 % im Vergleich zum Kontrollansatz. Allerdings wurde hier der TUNEL-Assay angewandt, der auf freien DNA-Endstücken basiert. Dieses Verfahren detektiert ein späteres Ereignis der Apoptose. Auch Jyonouchi et al. [1999] fanden an humanen Epithelzellen der Atemwege 48 Stunden nach einstündiger BPDE-Belastung einen Apoptoseanteil von 20 %. B[a]P verursachte in Leberzellen der Maus nach 24 Stunden eine

DNA-Fragmentierung aufgrund von Apoptose [Lei et al., 1998]. Der hier durchgeführte Annexin V-Test beruht auf einer frühen Reaktion im Apoptoseverlauf, die der nukleären Kondensation sowie der Fragmentierung vorausgeht [Chan et al., 1998; van Engeland et al., 1998].

Eventuell handelt es sich bei den hier detektierten früh-apoptotischen Zellen um bereits zwei oder vier Tage vorher induzierte Apoptosevorgänge. Apoptose muss erst initiiert werden, bevor eine Signalkaskade einsetzt und erste Ereignisse sichtbar werden. Möglicherweise wird durch die Kultivierung der nasalen Mukosazellen im Zellverbund eine Induktion apoptotischer Vorgänge verzögert.

4.3.4 Apoptose durch Natriumdichromat

In den hier untersuchten Miniorgankulturen zeigte Natriumdichromat nach der zweiten und dritten Expositionsphase einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen gegenüber den Kontrollansätzen.

Hexavalentes Chrom löst an Zellen typisch apoptotische Merkmale wie Zellschrumpfung, Bildung von Membranblasen, Kern- und DNA-Fragmentierung aus [Blankenship et al., 1994]. Initiale Apoptosevorgänge, durch Chrom induziert, sind in einer laryngealen Zelllinie schon nach ein bis zwei Stunden zu beobachten [Singh et al., 1998a]. Die DNA-Kondensation ist die erste irreversible Veränderung im Zellkern [Bosman, 1999]. Die Zellen stellen ihre Proliferation ein und sechs Stunden später werden erste apoptotische Merkmale sichtbar. Nach acht bis zwölf Stunden nimmt die metabolische Aktivität ab, die Membran wird geschädigt und die DNA-Integrität aufgehoben [Rudolph et al., 2000]. An Nagerzellen verursachte Chromat nach zwei Tagen apoptotische Zellen mit fragmentierter DNA. Morphologische Merkmale wie Zellschrumpfung bei intakter Membran- und Organellenstruktur waren bereits nach 24 Stunden zu sehen [Blankenship et al., 1994; Shimada et al., 1998].

Die hier gemessene Zunahme apoptotischer Zellen nach zwei- und dreimaliger Exposition könnte mit Sauerstoffradikalen oder Chromintermediaten, die bei der Reduktion von Chrom (VI) entstehen, zusammenhängen [Chen et al., 2001]. Chrom (III) und Chrom (V) bilden kovalente Bindungen mit der DNA und anderen Makromolekülen, die schließlich zu Induktion des p53 Tumorsuppressorgens und zu Zellapoptose führen [Singh et al., 1998b]. Die Aktivierung dieses Gens wird für einen kritischen Schritt in der Apoptoseinduktion durch Chrom VI gehalten [Carlisle et al., 2000]. Als Transkriptionsfaktor kann p53 die Expression

von Genen aktivieren, die an der Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen oder an der Kontrolle und Regulation des Apoptoseprozesses beteiligt sind [Polyak et al., 1997; Gu et al., 2000]. Die Kometenformen, die nach zwei- bis dreimaliger Chromatexposition entstanden, sehen sehr den apoptotischen Figuren ähnlich, die in Fairbairn et al. [1996] bei der Unterscheidung von Apoptose und Nekrose dargestellt werden. Während NDEA und BPDE in Miniorgankulturen Kometen mit DNA-Fragmentierung mittleren Grades verursachten, war bei mehrfacher Natriumdichromat- und MNNG-Behandlung eine sehr starke Schädigung, mit Kometenformen wie oben beschrieben, zu beobachten.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Natriumdichromat in nasalen Miniorganen nach mehrfacher Exposition apoptotische Zellvorgänge induziert.

4.3.5 Apoptose durch *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin

Eine ein-, zwei- oder dreifache Exposition von Miniorgankulturen gegenüber dem Nitrosamid *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) verursachte keine Apoptoseinduktion im Vergleich zu den Kontrollansätzen. MNNG rief jedoch in der Mikrogelelektrophorese eine sehr starke DNA-Fragmentierung hervor.

Da einige Methoden zur Apoptoseuntersuchung auf der Detektion stark fragmentierter DNA basieren, liegt die Vermutung nahe, dass MNNG ebenfalls programmierten Zelltod auslöst. Allerdings konnte hier zu keinem Zeitpunkt weder signifikante Phosphatidylserinverlagerung noch Membranschädigung festgestellt werden. Apoptose muss aber nicht unbedingt mit den beobachteten DNA-Fragmentierungen übereinstimmen, wie bei genotoxischen Substanzen in der Mikrogelelektrophorese gesehen werden. Auch Roser et al. [2001] fanden keine Korrelation zwischen der starken, MNNG-induzierten DNA-Fragmentierung und dem Apoptoseverhalten der untersuchten Zellen. Diese Beobachtungen sind jedoch zell- und stoffspezifisch.

Nachdem in den hier durchgeführten Untersuchungen Apoptose nicht nachweisbar war, wird die starke, MNNG induzierte DNA-Fragmentierung ausschließlich als fremdstoffinduzierte DNA-Schädigung interpretiert. Dies wiederum zeigt, dass MNNG sehr gut als Positivkontrolle für DNA-Schädigung eingesetzt werden kann.

In den Versuchen an Zellen humaner Miniorgankulturen induzierte keiner der getesteten Stoffe nach der ersten Fremdstoffexposition Apoptose. Obwohl Nitrosamine, polyzyklische

aromatische Kohlenwasserstoffe und Natriumdichromat in anderen Ansätzen durchaus Apoptose in Zellen hervorgerufen hatten [Jyonouchi et al., 1999; Shimada et al., 1998; Lin et al., 1999] war in der vorliegenden Untersuchung kein Effekt nachweisbar. Dies kann damit zusammenhängen, dass die Evaluierung apoptotischer Zellen sofort nach der einstündigen Fremdstoffexposition stattgefunden hatt. Möglicherweise war dieser Untersuchungszeitpunkt noch zu früh, um Apoptose detektieren zu können.

4.4 Zytokinproduktion von Miniorgankulturen

Miniorgankulturen bestehen unter anderem aus immunkompetenten Zellen wie Epithel- und Endothelzellen oder Fibroblasten. Während der 11-tägigen Kultivierung können diese Zellen Zytokine, sogenannte Zellbotenstoffe, ins Kulturmedium abgeben. Die Konzentration der Zytokine IL-8 und GM-CSF im Kulturüberstand wurde an den Kulturtagen 2, 7, 9 und 11 bestimmt und stellt jeweils die Produktion der vorhergehenden 48 Stunden dar. So ist es möglich, eine Veränderung der Zytokinkonzentration sowohl im Rahmen der Kultivierung als auch im Zusammenhang mit einer Fremdstoffexposition zu bestimmen.

4.4.1 Bedeutung der Zytokine

Epithelzellen des Respirationstraktes treten primär mit toxischen Umweltschubstanzen wie Tabakrauch, Luftschadstoffen und bakteriellen Partikeln in Kontakt. Sie stellen nicht nur eine mechanische Barriere zur Außenwelt dar, sondern sind auch wirksame Vermittler von Immun- und Entzündungsreaktionen im Abwehrmechanismus der Atemwege. Sie exprimieren eine Vielzahl von Zytokinen, die in allergischen Atemwegsentzündungen eine wichtige Rolle spielen, wie Interleukin 6 (IL-6), Interleukin 8 (IL-8) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF) [Ohtoshi et al., 1998]. Humane nasale Epithelzellen vermitteln auch aufgrund bestimmter toxischer Substanzen eine inflammatorische Antwort. Eine Exposition humaner nasaler und bronchialer Epithelzellen gegenüber Dieselabgaspartikeln, Stickstoffdioxid (NO₂) oder Ozon war mit einer Zunahme der Produktion von IL-8, TNF- α und GM-CSF verbunden [Devalia et al., 1993, 1994; Boland et al., 1999]. Es existiert ein klarer Zusammenhang zwischen Schadstoffexpositionen und Atemwegs-erkrankungen [Department of Health Advisory Group on the Medical Aspects of Air Pollution Episodes 1992, 1993]. So ruft eine vermehrte NO₂-Exposition häufig Symptome von Rhinitis, chronischem Husten und schlimmen Asthmaanfällen hervor und erhöhte Ozonwerte wirken sich nachteilig auf die Lungenfunktion aus [Devlin et al., 1991; Mudway und Kelly, 2000].

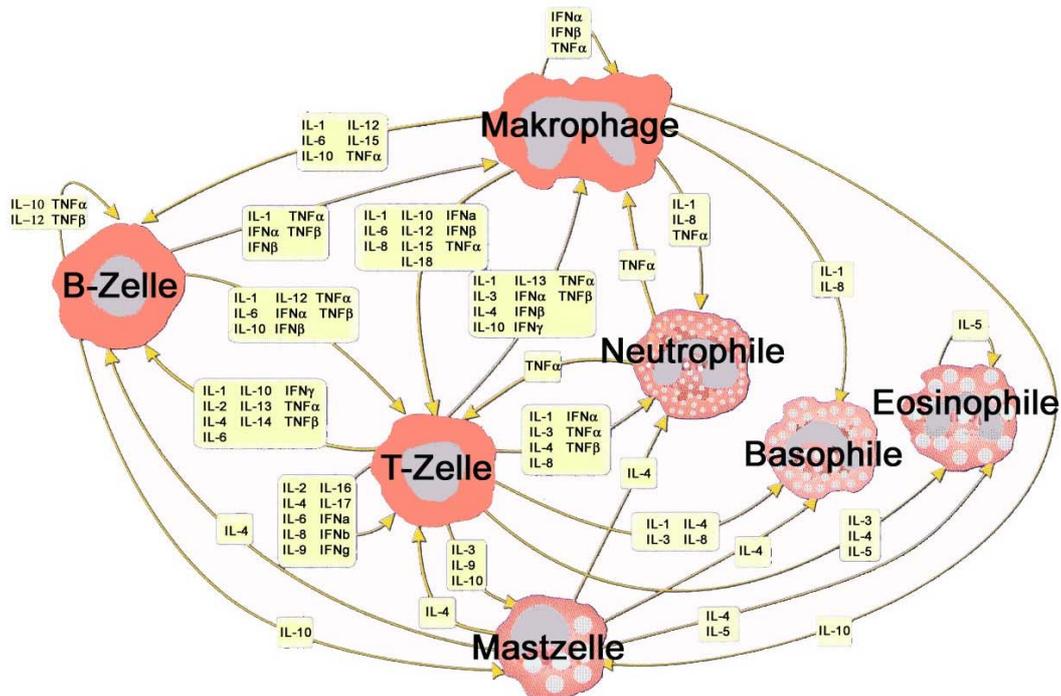


Abbildung 37: Das Zytokin-Netzwerk zur Kommunikation der Zellen. Zytokine werden unter anderem von Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen, Granulozyten und Mastzellen produziert. Zytokine wirken in sehr komplexer Weise aufeinander und repräsentieren ein hoch entwickeltes und vielseitiges Kommunikationsnetzwerk, das sehr wichtig für das Immunsystem und dessen verschiedenartige Abwehrmechanismen ist. Quelle: Bender MedSystems [2002]

Interleukine sind an Entzündungsreaktionen, Zelldifferenzierungen und -migrationen beteiligt und stimulieren B- und T-Zellen. Interleukin 8 (IL-8) gilt als wirksamer chemotaktischer Faktor für neutrophile und eosinophile Granulozyten, da es deren Transmigration durch das Endothel und das Epithel stimuliert. Damit nimmt es eine zentrale Rolle in der Akkumulation von Neutrophilen an entzündeten Stellen *in vivo* ein [Sehmi et al., 1993]. IL-8 steigert den Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies und die Bildung von Adhäsionsmolekülen [Ibelgauf, 1999]. Es wird unter anderem von Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten Endothel- und Epithelzellen produziert und stellt das dominierende Zytokin des humanen nasalen Epithels dar. Seine Expression ist auch in unstimulierten Zellkulturen erhöht [Becker et al., 1993]. Daher ist von einer IL-8 Produktion der kultivierten nasalen Miniorgane auszugehen. Nach einer Exposition gegenüber Schadstoffen wie Ozon oder NO_2 ist *in vitro* häufig ein Anstieg der IL-8 Freisetzung humaner Epithelzellen des Respirationstraktes zu beobachten [Devlin et al., 1994; Devalia et al., 1994].

Der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) ist auch ein wichtiges Zytokin für die Reifung von eosinophilen Granulozyten und Makrophagen. Es

spielt eine Schlüsselrolle in verschiedenen Funktionen des Immunsystems sowie in der Hämatopoese. GM-CSF wird unter anderem von Makrophagen, Lymphozyten, Neutrophilen, Eosinophilen, Fibroblasten, Mastzellen, Endothel- und Epithelzellen gebildet. Normalerweise ist die GM-CSF Freisetzung dieser Zellen gering, kann aber durch mechanische Verletzung, UV-Strahlung oder mikrobiologische Produkte gesteigert werden [Tarr, 1996]. Da Miniorgankulturen ebenfalls Epithel- und Endothelzellen enthalten, ist auch im Rahmen der vorliegenden Untersuchung die Produktion von GM-CSF zu erwarten. Das wäre ein Anhaltspunkt für die beständige metabolische Aktivität dieser über einen längeren Zeitraum kultivierten Mukosafragmente. Häufig verlieren in Kultur gehaltene Zellen schon nach wenigen Tagen die Fähigkeit, ihren Stoffwechsel und eine Bioaktivierung aufrecht zu erhalten. Dies ist meist mit einem Rückgang der Aktivität fremdstoffmetabolisierender Enzyme verbunden, wie dem Cytochrom P450 oder der Glutathion-S-Transferase [Cummings et al., 2000; Hashemi et al., 2000]. GM-CSF wird von vielen Zellen vermehrt nach zusätzlicher Schadstoffexposition produziert. An humanen Bronchialepithelzellen wurde nach NO₂- und nach Ozonexposition gesteigerte Freisetzung festgestellt [Devalia et al., 1993; Rusznak et al., 1996]. Auch Dieselabgaspartikel induzierten an humanen Nasenepithelzellen einen Konzentrationsanstieg [Ohtoshi et al., 1998].

4.4.2 IL-8 Freisetzung humaner nasaler Miniorgankulturen

Die IL-8 Produktion humaner nasaler Miniorgane wurde über die im Kulturüberstand enthaltene Konzentration mittels ELISA bestimmt. Nach den ersten 48 Stunden der Kultivierung lag sie bei 10 ng/ml. Der kurzfristige IL-8 Anstieg nach sieben Tagen weist auf eine vorübergehend eingetretene Aktivierung von immunkompetenten Zellen hin. Nach weiteren zwei bis vier Tagen geht die IL-8 Konzentration wieder auf das Ausgangsniveau vom zweiten Tag zurück. Die Miniorgane weisen in den ersten Tagen der Kultivierung Gewebeverletzungen auf, die von der Präparation der Nasenmuschel stammen. An diesen Stellen findet Wundheilung bzw. Reparatur oder Neubildung einer Epithelschicht statt. Dadurch werden vermutlich Entzündungsmediatoren exprimiert. Bei *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen konnte beim Schließen einer Wunde eine Migration von Epithelzellen beobachtet werden [Al-Batran et al., 1999], die möglicherweise mit einem Anstieg von IL-8 verbunden ist. Ein Konzentrationsanstieg von proinflammatorischen Zytokinen kann aber auch mit Supplementierung des Kulturmediums mit Wachstumsfaktoren erklärt werden. In diesem Fall wäre die zunehmende IL-8 Freisetzung auf den epidermalen Wachstumsfaktor zurückzuführen, der im verwendeten Medium enthalten ist. Wahrscheinlich ist der hier

beobachtete Konzentrationsanstieg als eine Reaktion auf die veränderten Wachstumsbedingungen gegenüber der *in vivo* Situation zu sehen.

Das Nitrosamin NDEA verursachte nach einmaliger Inkubation einen Anstieg der IL-8 Freisetzung. Bisher liegen jedoch keine Untersuchungen über seine Auswirkung auf die Zytokinproduktion vor. Viele Studien belegen neben anderen proinflammatorischen Zytokinen einen signifikanten Anstieg von IL-8 durch eine Schadstoffexposition verschiedener nasaler Epithelzellkulturen. Dieser wird durchgehend als Entzündung der Luftwege interpretiert. Lediglich in einer Studie konnte durch einen Nitrosaminmetaboliten, dem Stickstoffoxid (NO), eine konzentrationsabhängige Steigerung der IL-8 Produktion von Blutzellen beobachtet werden [Villarete und Remick, 1997]. An NO₂-exponierten Organkulturen humaner nasaler Mukosa wurde ebenfalls eine signifikante Erhöhung der Interleukine IL-1 β , IL-6 und IL-8 festgestellt [Schierhorn et al., 1999]. Möglicherweise induziert das hier untersuchte NDEA nach einmaliger Exposition eine leichte Entzündungsreaktion in den Miniorgankulturen.

Der hier eingesetzte polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoff BPDE verursachte keine Veränderungen der Zytokinkonzentration. An Bronchialzellen wurde demonstriert, dass Dieselabgaspartikel und das darin enthaltene Benz[a]pyren einen Anstieg der IL-8 Produktion bewirken können. Allerdings wurden dort eine bronchiale Zelllinie und B[a]P-Expositionszeiten von 24 bis 48 Stunden eingesetzt [Ohtoshi et al., 1998; Boland et al., 1999]. Zur Expression PAH-induzierter IL-8 Produktion liegen derzeit keine weiteren Untersuchungen vor. Lediglich mit einem Extrakt aus Zigarettenrauch, in dem ebenfalls B[a]P enthalten war, konnte an humanen bronchialen Epithelzellen eine Erhöhung der IL-8 Freisetzung gezeigt werden [Wyatt et al., 1999].

Dreimalige Chromatexposition war in den Miniorganen nasaler Mukosa mit einer deutlichen Abnahme der IL-8 Konzentration im Kulturüberstand verbunden. In allen bisher aufgeführten Untersuchungen folgte auf eine Schadstoffexposition stets ein Ansteigen der untersuchten Zytokinkonzentrationen. Lediglich nach Zusatz des Kortikosteroids Dexamethason wurde ein signifikanter Rückgang der Entzündungsmediatoren IL-8, GM-CSF und TNF- α in nasaler Mukosa beobachtet [Mullol et al., 1995]. Es gibt nur wenige, zum Teil kontroverse Ergebnisse über die Auswirkung einer Chromatexposition. Eine Belastung humaner Bronchialzellen mit verschiedenen Metallen resultierte in einer geringeren Zytokinexpression durch Chrom und Kupfer im Vergleich zu Zink, Arsen und Vanadium [Samet et al., 1998]. Ein leichter, chrominduzierter Anstieg der IL-6 Produktion konnte in unstimulierten,

peripheren mononukleären Blutzellen festgestellt werden, während eine Phytohämagglutinin-(PHA) Stimulation mit einem IL-6 Rückgang verbunden war [Granchi et al., 1998]. Im Blut von Bewohnern eines chromkontaminierten Gebiets in New Jersey fand man dagegen signifikant niedrigere IL-6 Konzentrationen als in einer Vergleichsgruppe [Snyder et al., 1996]. Allerdings handelt es sich hier um grundsätzlich verschiedene Untersuchungsmodelle, die nur sehr schwer miteinander in Verbindung zu bringen sind. Um Ergebnisse in einem *in vitro* Versuch vergleichen zu können, sind die Art der Aufnahme bzw. die Dauer der Exposition, der Oxidationszustand der Chromatverbindung und die Nebenreaktionen ausschlaggebend.

4.4.3 GM-CSF Freisetzung humaner nasaler Miniorgankulturen

Die im Kulturüberstand der Miniorgankulturen produzierte Menge an GM-CSF ist sehr gering. Auch Tarr [1996] konnte an mehreren kultivierten Zellarten, unter anderem an Epithel- und Endothelzellen, Fibroblasten und Granulozyten, ohne Stimulation nur eine minimale Sekretion feststellen. Nach siebentägiger Kulturdauer stieg die GM-CSF Produktion der hier untersuchten Miniorgane ebenfalls an und veränderte sich im Gegensatz zu IL-8 für den Rest der Kultivierung nicht mehr. Eventuell handelt es sich auch hier um Entzündungsreaktionen, die mit Wundheilung der im Rahmen der Präparation verletzten Gewebeabschnitte und der Neubildung der Epithelschicht in Verbindung stehen. Dem verwendeten Medium fehlten zytokinsteigernde Wachstumsfaktoren. Möglicherweise ist die Umstellung auf neue Kultur- und Wachstumsbedingungen Grund für die in den ersten zwei Tagen geringere GM-CSF Freisetzung gegenüber späteren Untersuchungszeitpunkten. Auch Steinsvag et al. [1991] beschrieben den Transfer der Gewebefragmente in die Kultur als eine Situation, in der die Miniorgane durch die komplett veränderten Lebensbedingungen einem großen Trauma ausgesetzt werden.

NDEA verursachte nach dreimaliger Inkubation einen Rückgang der GM-CSF Produktion. Bisher liegen keine Untersuchungen zur GM-CSF Freisetzung vor, die speziell durch NDEA beeinflusst wurde. An humanen Makrophagen wurde nach einer Behandlung mit dem tabakspezifischen Nitrosamin 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) eine Abschwächung der GM-CSF Bildung beobachtet [Rioux und Castonguay, 2001]. Sie zeigten erstmals, dass NNK über alkylierende Intermediate das Gleichgewicht der Zytokinsynthese humaner Zellen stört und unter Umständen die Entwicklung eines Lungentumors begünstigen kann. An einer humanen Bronchialzelllinie wurde entdeckt, dass ein Abbauprodukt der

Nitrosamine, das Stickoxidradikal, die Freisetzung von GM-CSF in einer zeit- und dosisabhängigen Weise inhibiert [Sanders et al., 2001].

Der hier untersuchte Metabolit der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, BPDE, verursachte keine wesentliche Veränderung der GM-CSF Produktion der Miniorgankulturen, bei leichtem Rückgang nach dreimaliger Exposition. Obwohl in Kulturen humanen respiratorischen Epithels nach Belastung mit Dieselabgaspartikeln ein Anstieg der GM-CSF Freisetzung beobachtet wurde [Boland et al., 2000 ; Bayram et al., 1998], konnte dieser Effekt hier nicht bestätigt werden. Allerdings wurde mit anderen Modellen gearbeitet, vorwiegend bronchialen Zelllinien in Monolayerkulturen. Zudem waren diese Zellen 24- bis 48-stündigen, unsere Miniorgankulturen dagegen nur einstündigen Belastungsphasen ausgesetzt. Ein B[a]P induzierter Anstieg der GM-CSF Produktion konnte an einer bronchialen Zelllinie demonstriert werden [Ohtoshi et al., 1998]. In einer Studie mit Zigarettenrauchextrakt, in dem B[a]P enthalten ist, wurde eine Steigerung der GM-CSF Freisetzung an humanen Lungenfibroblasten beobachtet [Sato et al., 1999].

Dreifache Exposition von Natriumdichromat verursacht einen Rückgang der GM-CSF Produktion humaner Miniorgankulturen. Auch dazu existieren bisher keine vergleichbaren Untersuchungen an humanen Zellkulturen. Die GM-CSF Bildung peripherer mononukleärer Blutzellen zeigte nach Einwirkung eines chromhaltigen Extraktes keine Veränderung [Granchi et al., 1998]. Eine Exposition von humanen epidermalen Keratinozyten gegenüber Chemikalien und Kontaktirritantien hatte ebenfalls keinen Einfluss auf durch Chromat verursachte GM-CSF Freisetzung [Wilmer et al., 1994].

4.5 DNA-Reparatur

Die DNA-Reparatur ist ein ubiquitärer Schutz- und Verteidigungsmechanismus, der für das Überleben der Zelle und die Kontrolle des Zellzyklus essentiell ist [Hartwell und Weinert, 1989]. Effektive DNA-Reparatur schützt vor Auswirkungen genotoxischer Karzinogene. Ein Rückgang der Reparaturkapazität zieht eine zunehmende Empfindlichkeit gegenüber Mutationen und eine erhöhte genetische Instabilität nach sich. Folglich sind die individuellen Reparaturraten entscheidende Faktoren für die Möglichkeit einer Krebsentstehung [Berwick und Vineis, 2000]. Die DNA-Reparaturkapazität kann auf verschiedene Arten gemessen werden: als Rate der Schadensentfernung, als Aufnahme von Substraten für die unkontrollierte DNA-Synthese oder als Aktivität einzelner Schritte in der DNA-Reparatur [Schmezer et al., 2001].

Im Folgenden soll daher auf die Reparaturfähigkeit von oxidativ geschädigten Lymphozyten und auf die individuelle Reparaturfähigkeit einzelner Personen eingegangen werden. Letztere wurde sowohl über die Reduzierung der DNA-Schädigung in Lymphozyten als auch über die Aktivität von Reparaturenzymen in einem Lymphozyten-Proteinextrakt bestimmt.

4.5.1 DNA-Reparatur von Lymphozyten

Zur Evaluierung und Darstellung intraindividuelle Unterschiede im Zeitverlauf der DNA-Reparatur [Collins et al., 1996, 1997] dient sehr häufig Wasserstoffperoxid, das oxidativen Schaden an der DNA verursacht. In der mitochondrialen Elektronentransportkette oder während der Oxidation zahlreicher Moleküle im endoplasmatischen Retikulum entsteht ein Superoxidradikal. Bei dessen Umwandlung über das Enzym Superoxiddismutase wird Wasserstoffperoxid gebildet [Bunker, 1992]. Es durchdringt die Zellmembran sehr leicht und wird über einen nichtenzymatischen Prozess in Hydroxidradikale umgewandelt. Diese wiederum verursachen Einzel- und Doppelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und oxidierte Purine und Pyrimidine [Joenje, 1989; Sankaranarayanan, 1991]. Oxidativ induzierte DNA-Schäden werden über zelluläre Reparaturprozesse eliminiert. Dazu gehören die Wiederherstellung von intakten DNA-Strängen und die Basenexzisionsreparatur, die unter normalen Bedingungen innerhalb weniger Stunden erfolgt [Collins et al., 1995].

Lymphozyten zeigen sich verhältnismäßig resistent gegenüber durch Wasserstoffperoxid hervorgerufenen DNA-Strangbrüchen [Collins et al., 1995]. Dies äußert sich auf zweifache Weise. Zum einen zeigt ein Teil der Zellen auch bei hohen Konzentrationen keinen DNA-Schaden, zum anderen wird in Lymphozyten, die auf Wasserstoffperoxid reagieren, im Vergleich zu anderen Zellen ein geringerer Schädigungsgrad hervorgerufen. Auch in den hier durchgeführten Untersuchungen konnten sowohl in nicht als auch in einstündig mit PHA stimulierten Lymphozyten Zellpopulationen mit niedrigerer DNA-Schädigung beobachtet werden. Nach 24-stündiger Stimulation war hingegen ein wesentlich höherer Zellanteil von der DNA-Schädigung betroffen. Möglicherweise variiert in den einzelnen Zellen die Konzentration von antioxidativen Enzymen wie Katalase, Glutathionperoxidase oder anderen Radikalfängern.

Zur Kinetik der DNA-Reparatur humaner peripherer Lymphozyten gibt es kontroverse Berichte. Nach einer vierstündigen Reparaturphase wurde keine Regeneration von DNA-Strangbrüchen gefunden [Schraufstätter et al., 1988]. In mit PHA stimulierten Lymphozyten dagegen wurden innerhalb einer Stunde bis zu 80 % der Strangbrüche repariert, während ohne

Stimulierung weniger als 50 % der DNA-Fragmentierung zurückgingen [Kaminskas und Li, 1992]. In allen hier durchgeführten Ansätzen konnte gezeigt werden, dass in den ersten 15 Minuten ein Großteil der DNA-Schäden repariert wurde, mit einem Rückgang des DNA-Schadens um 40 % sowohl bei stimulierten als auch bei unstimulierten Lymphozyten. Allerdings fand in den folgenden 45 Minuten kaum noch zusätzliche Reparatur der bestehenden DNA-Schäden statt. Andere Untersuchungen an frisch isolierten, mit Wasserstoffperoxid geschädigten Lymphozyten wiesen eine effektive Reparatur zwei Stunden nach Inkubation nach [Floyd und Cassoni, 1994; Collins et al., 1995]. Es gibt jedoch auch Beobachtungen, nach denen zuvor kryokonservierte Lymphozyten zwei Stunden nach einer Fremdstoffbelastung mit Wasserstoffperoxid nicht reparierten [Visvardis et al., 1997]. Barret et al. [1995] fanden in unstimulierten Lymphozyten ein Defizit an Nukleotidexzisionsreparatur. Sie führten dies auf eine Blockade des Zellzyklus in der G₀/G₁-Phase zurück, da viele DNA-Reparaturenzyme zellzyklusabhängig sind. Häufig werden Lymphozyten 20 Stunden lang mit PHA behandelt, um sie in G₁-Phase zu bringen, in der sie eine größere Reparaturkapazität besitzen [Schmezer et al., 2001]. In unstimulierten Lymphozyten wird das Fehlen von Enzymen, die an Reparaturvorgängen beteiligt sind, z.B. Polymerasen, für die langsamere Regeneration verantwortlich gemacht [Kaminskas und Li, 1992; Collins et al., 1993]

In den 24 Stunden aktivierten Lymphozyten wurden in der vorliegenden Untersuchung stets höhere DNA-Schädigungen festgestellt. Dies könnte mit einer gesteigerten Enzymaktivität stimulierter und somit proliferierender Zellen im Vergleich zu ruhenden Zellen in Zusammenhang stehen. Ebenso wäre eine Überlagerung von aktuell geschädigter und bereits reparierter DNA denkbar [Sirover et al., 1990].

4.5.2 Individuelle DNA-Reparaturfähigkeit

Einer der wichtigsten Faktoren in der Risikoabschätzung für eine Krebserkrankung ist die DNA-Reparaturaktivität. Zur Evaluierung individueller Unterschiede wurden an Lymphozyten von 10 Personen jeweils zwei Versuchsansätze zur DNA-Reparatur durchgeführt.

Zum einen wurde die Reparatur über den Rückgang der DNA-Fragmentierung von geschädigten Lymphozyten in einem 15-minütigen Reparaturintervall bestimmt. Zum anderen erfolgte die Evaluierung der individuellen Reparaturkapazität über einen Proteinextrakt aus Lymphozyten, der mit wasserstoffperoxidgeschädigter Substrat-DNA inkubiert wurde.

Hierbei wird die Aktivität der im Extrakt enthaltenen Reparaturenzyme, vorwiegend von Endonukleasen, gemessen.

Bei Bestimmung der Reparaturkapazität von stimulierten Lymphozyten nach einem 15-minütigen Reparaturintervall zeigten sich bei den 10 untersuchten Spendern deutliche Unterschiede. Auch die über den Proteinextrakt bestimmte Aktivität der Reparaturenzyme lieferte individuell abweichende Ergebnisse. Allerdings korrelieren die Reparaturaktivitäten beider Methoden nicht miteinander. Während ein 15-minütiges Reparaturintervall bei den Spendern 5 und 6 zu einer niedrigen Reparaturaktivität führt, liegt diese bei Bestimmung über den Proteinextrakt wesentlich höher und umgekehrt.

Eine alternative Methode zur Bestimmung der *in vitro* DNA-Reparaturaktivität, nämlich über die Inkubation eines Zellextraktes mit spezifisch geschädigter Substrat-DNA, wird hier eingehender diskutiert. Das Kernmaterial wasserstoffperoxidgeschädigter Zellen stellt das Substrat für Enzymreaktionen dar. Die geschädigte DNA wird mit dem Lymphozyten-Proteinextrakt unbekannter Aktivität, anstelle reiner Reparaturenzyme, inkubiert. Im Anschluss daran wird das Ausmaß der DNA-Fragmentierung untersucht. Mit dieser Methode waren bereits interindividuelle Unterschiede in der Reparaturaktivität nachweisbar [Collins et al., 2001]. Mit dem Proteinextrakt-Assay wird Reparatur über die Aktivität der Exzision von wasserstoffperoxidgeschädigten Basen gemessen.

Die meisten oxidierten Basen in der DNA werden durch Basenexzision repariert (BER). Zuerst werden sie durch eine spezifische DNA-Glykosylase entfernt, es entsteht eine apurinische/apyrimidinische Stelle. Eine Endonuklease schneidet nun die Desoxyribosephosphatgruppe von der apurinischen Stelle und bildet eine einzelne Nukleotidlücke, die von der DNA-Polymerase aufgefüllt wird. Schließlich versiegelt eine Ligase den Strangbruch und vollendet den Reparaturprozess [Elliott et al., 2000]. Über die individuelle Variabilität der BER-Enzymaktivitäten und deren Regulation sowie eine mögliche Beziehung zu erhöhtem Krebsrisiko ist bisher sehr wenig bekannt [Barret et al., 1996].

Die Art der Extraktion und die Reaktionsbedingungen des hier durchgeführten Tests basieren auf einem von Redaelli et al. [1998] beschriebenen Assay. Dort wird die Endonukleaseaktivität von Lymphozytenextrakten über die Anhäufung von Plasmidfragmenten mit der Gelelektrophorese bestimmt. Anstelle der Messung von Plasmidfragmenten wurden hier DNA-Strangbrüche mit Hilfe der Mikrogelelektrophorese quantifiziert. Dabei konnten Kontrollansätze mit ungeschädigter Substrat-DNA bestätigen,

dass in den eingesetzten Extrakten keine unspezifische Endonukleaseaktivität herrschte. Experimentell induzierter DNA-Schaden ist Voraussetzung für die Akkumulation von DNA-Brüchen, induziert durch Endonukleasen im Extrakt. Somit können Inzisionsschritte der DNA-Reparatur dargestellt werden.

Der Proteinextrakt-Assay ist in der Lage, zwischen individuellen Lymphozytenproben zu unterscheiden. Die zehn getesteten Individuen wiesen Abweichungen in der initialen Reparatur auf, denn nach 60 Minuten Proteininkubation wurde ein unterschiedliches Ausmaß an DNA-Brüchen induziert. Einzelne Probanden zeigten allerdings ein sehr auffälliges Aktivitätsmuster. Während die meisten der untersuchten Personen mit einem Ansteigen der DNA-Fragmentierung reagierten, kam es vereinzelt sogar zu einem Rückgang im Vergleich zur Kontrolle. Möglicherweise kann damit die Fähigkeit des Extraktes dargestellt werden, der Inzision folgende Reparaturschritte auszuführen, wie z.B. die DNA-Reparatursynthese mit nachfolgender Ligation. Schwankungen der AP-Endonuklease-Aktivität wurden bei [Redaelli et al., 1998] auf experimentelle Umstände zurückgeführt. Collins et al. [2001] konnten für jeden Probanden an zwei verschiedenen Untersuchungszeitpunkten sehr ähnliche Kurven der *in vitro* Reparatur darstellen. Dies bedeutet, dass die interindividuellen Unterschiede über einen gewissen Zeitraum erhalten bleiben. Eventuell enthält die Substrat-DNA aus Mukosazellen nur unzureichend oxidierte Basen, wie auch Collins et al. [2001] an Adenokarzinomzellen beobachteten. Die Proteinkonzentration der in dieser Arbeit eingesetzten Extrakte hatten keinen ersichtlichen Einfluss auf das Ausmaß der Reparaturaktivität. Ein Lymphozytenextrakt, der bereits bei der Isolierung aus peripherem Blut mit Thrombozytenprotein verunreinigt wurde, hätte jedoch möglicherweise eine künstlich niedrige Reparaturaktivität zur Folge. Da Thrombozyten keinen Zellkern besitzen, weisen sie vermutlich keine Reparaturenzymaktivität auf, tragen aber zur Proteinkonzentration bei [Elliott et al., 2000].

Da die hier erzielten Ergebnisse intraindividuelle Abweichungen der DNA-Reparaturfähigkeit zeigen, ist es notwendig, die eingesetzten Methoden zu optimieren, um konkrete Aussagen zur Mutagensensitivität einzelner Personen treffen zu können.

4.6 Vergleich Mikrokerntest – Mikrogelelektrophorese

Der Mikrokerntest wird in zytogenetischen Studien eingesetzt, um chromosomale Veränderungen wie azentrische Chromosomen- und Chromatidenfragmente oder das Fehlen von Chromosomen in der Anaphase festzustellen. Mikrokerne entstehen, wenn ganze Chromosomen oder Fragmente während einer Mitose nicht in die neuen Zellkerne aufgenommen werden, sondern als Chromatinpartikel in der folgenden Interphase im Zytoplasma erscheinen. Sie sind einerseits Ausdruck einer genomischen Instabilität und andererseits Folge eines fremdstoffinduzierten Schadens [Streffer, 1997]. Lymphozyten einzelner Individuen antworten sehr unterschiedlich auf eine Stimulierung mit Phytohämagglutinin (PHA), so dass sich die Zahl der sich teilenden Zellen in Kultur oft unterscheidet. Deshalb wird häufig eine Methode verwendet, bei der Mikrokerne nur in den Zellen gezählt werden, die aufgrund einer blockierten Zellteilung groß und binukleär erscheinen. Cytochalasin B, das zur Unterdrückung der Zellteilung zugesetzt wird, verursacht selbst weder Mikrokerne noch chromosomalen Schaden. Diese Methode kann daher sowohl für ein Biomonitoring, das die Mikrokerne der *in vivo* Situation aufzeigt [Hessel et al., 2001], als auch für eine Darstellung des mutageninduzierten Chromosomenschadens eingesetzt werden [Fenech und Morley, 1985].

In der Mikrogelelektrophorese können Störungen der DNA-Integrität wie Strangbrüche, alkalilabile Stellen oder offene Exzisionsreparaturstellen dargestellt werden. Zellen mit erhöhtem DNA-Schaden zeigen vermehrt Wanderung des genetischen Materials in Richtung Anode. Die Länge des Kometenschweifs besitzt positive Korrelation mit der Größe des DNA-Schadens in der Zelle [Singh et al., 1988]. Die Sensitivität dieser Methode liegt bei 0,2-2 Strangbrüche pro 10^9 Daltons (15 kb) [Collins et al., 1996]. Die alkalische Version der Mikrogelelektrophorese weist viele Vorteile gegenüber anderen Genotoxizitätsmessungen auf. Dazu zählen die geringe Anzahl benötigter Zellen, die kurze Testdauer und die Eignung fast jeden Gewebes, da keine mitotische Aktivität erforderlich ist. Sie stellt damit eine optimale Methode für *in vivo* Untersuchungen sowie für *in situ* Monitoring von Umweltschadstoffen dar. Dies setzt jedoch die gleiche Empfindlichkeit wie bei anderen Methoden voraus. Beim Comet Assay wurde eine höhere Sensitivität gegenüber DNA-Schäden durch direkt wirkende als durch indirekt wirkende Substanzen festgestellt [Vrzoc und Petras, 1997]. Eventuell liegt der Grund dafür in der Art der Schädigung. Direkt wirkende Mutagene, wie alkylierende Stoffe, bilden beispielsweise durch Transfer von alkylierenden Gruppen DNA-Addukte, die in einer DNA-Fragmentierung resultieren [Heflich, 1991]. Durch

indirekt wirkende Stoffe werden neben Monoaddukten DNA-Crosslinks erzeugt, die vermutlich die Migration von DNA-Fragmenten beeinträchtigen [Tice et al., 1992; Hartmann und Speit, 1994].

Die Ergebnisse von Mikrokerntest und Mikrogelelektrophorese nach Inkubation mit NDEA zeigten signifikant erhöhte Werte gegenüber den Negativkontrollen. Die Korrelation der Ergebnisse beider Methoden war jedoch als sehr gering einzustufen. NDEA wurde in früheren Untersuchungen meist in Experimenten mit Nagern, denen das Nitrosamin mehrfach oral appliziert wurde, eingesetzt. Dabei kam es aber zu kontroversen Ergebnissen. Eine deutlich erhöhte Mikrokernrate konnte nach einmaliger Gabe des Nitrosamins detektiert werden [Robbiano et al., 1997]. Ein Effekt an Milzzellen von Mäusen hingegen konnte erst nach 15-tägiger NDEA-Behandlung dargestellt werden [Benning et al., 1992]. Aber auch von fehlender Mikrokernbildung an Mausmodellen, selbst nach starker NDEA-Belastung, wurde berichtet [Morita et al., 1997]. *N*-Nitrosodiethanolamin zeigte erst in sehr hohen Konzentrationen gesteigerte Mikrokernraten in humanen Lymphozyten [Dittberner et al., 1988].

Ein Problem beim Mikrokerntest stellt die Zeitphase zwischen Inkubation und Fixierung der Schädigung dar, die von 30 bis 72 Stunden betragen kann. Da zuerst eine Zellteilung stattfinden muss, bevor eine Schädigung in Erscheinung treten kann, ist eine in der Latenzzeit möglicherweise bereits erfolgte DNA-Reparatur zu berücksichtigen. Deshalb ist es von großer Bedeutung, zu welchem Zeitpunkt, *in vivo* oder während des Mikrokerntests, wie lange und in welchen Konzentrationen die Exposition stattfindet. Eine zusätzliche Rolle spielt das Cytochrom P450, welches zur Aktivierung des Prokanzerogens NDEA notwendig ist [Benning et al., 1992]. Weil nach längerer Kultivierung von Lymphozyten oder anderen Zelllinien die Aktivität des Cytochrom P450 oft sehr rasch abnimmt, darf dieser Faktor in der Ergebnisbeurteilung nicht vernachlässigt werden. Immunzytologische Untersuchungen an Zellen humaner nasaler Miniorgankulturen konnten Cytochrom P450 auch nach 11-tägiger Kulturdauer noch nachweisen [unveröffentlichte Ergebnisse]. Die meisten der hier angeführten Beobachtungen fanden an Tiermodellen statt. Vielleicht liegt hier die Ursache für die divergierenden Ergebnisse im Versuchsansatz mit humanen Lymphozyten, in dem eindeutig erhöhte Mikrokernraten nachgewiesen wurden.

Die Fähigkeit von Nitrosaminen zur Induktion von DNA-Strangbrüchen wurde mit der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese bereits vielfach bestätigt. NDEA ruft genotoxische Effekte an Lymphozyten und an Mukosazellen des oberen Aerodigestivtraktes hervor [Harréus et al.,

1999; Kleinsasser et al., 2000b]. Humane Leberzellen zeigten im Comet Assay durch *N*-Nitrosodimethylamin-Exposition eine konzentrationsabhängige, signifikante DNA-Schädigung [Barcelo et al., 1998].

Ein Vergleich der Mikrogelelektrophorese mit dem Mikrokerntest nach Basisschädigung von Lymphozyten ergab eine sehr hohe Korrelation beider Methoden [Diem und Rüdiger, 1999]. Im Comet Assay verursachten Wasserstoffperoxid und Methylmethansulfonat starke DNA-Schäden, jedoch wurde keine erhöhte Mikrokernrate induziert [Andreoli et al., 1999]. Ebenso erzeugt das Insektizid Deltamethrin trotz metabolischer Aktivierung in humanen Lymphozyten keine Mikrokerne, obwohl in der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese DNA-Strangbrüche nachgewiesen wurden [Villarini et al., 1998]. Eine fehlende Sensitivität des Mikrokerntests bei den Substanzen Dichlorbutan, Chlorohexan, Dichlorethan führten Tafazoli et al. [1998] auf die substanzspezifische Schädigungsform zurück. Eine hohe Reparaturkapazität oder auch eine selektive Eliminierung stark geschädigter Zellen, die nicht mehr in die Mikrokernzählung einfließen, könnten zu einer herabgesenkten Mikrokernrate zum Zeitpunkt der Auswertung führen. Für die Evaluierung des genotoxischen Potenzials von Styren bzw. Kobalt und Tungsten waren hingegen beide Methoden einsetzbar [Laffon et al., 2001; van Goethem et al., 1997]. Am Beispiel des Nitrosamins NDEA konnte dies mit der hier durchgeführten Untersuchung bestätigt werden. Unter Berücksichtigung der direkten oder indirekten Wirkungsweise der Testsubstanz und dem Zeitpunkt der Inkubation stimmen Mikrogelelektrophorese und Mikrokerntest in ihren Aussagen hinsichtlich der Genotoxizität überein. Wünschenswert wäre eine Kombination der beiden Methoden, um den unterschiedlichen Wirkungsmechanismen der Xenobiotika gerecht zu werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bei der Aufnahme zahlreicher inhalativer und ingestiver Umwelt- und Arbeitsstoffe fungiert das Epithel des oberen Aerodigestivtraktes als primäres Kontaktorgan. In diesen Zielzellen für mögliche Xenobiotika-induzierte DNA-Schädigungen können Schleimhautkarzinome entstehen. Für das Risiko einer Krebsentstehung spielen sowohl die umweltbedingte Exposition gegenüber Karzinogenen als auch die individuelle Mutagensensitivität eine bedeutende Rolle. Um einen Beitrag zur Tumorprävention zu leisten, sollten *in vitro* Testsysteme etabliert werden, welche die Charakterisierung von Gefahrenstoffen sowie die Darstellung von Faktoren der individuellen Suszeptibilität in lebensnahen Bedingungen ermöglichen.

Humane Mukosafragmente der unteren Nasenmuschel wurden als Miniorgane kultiviert und nach Mehrfachexposition gegenüber potenziell mutagenen Substanzen mit anschließenden Reparaturphasen untersucht. Zur Quantifizierung fremdstoffinduzierter DNA-Schädigung wurde die alkalische Form der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (MGE) eingesetzt. Die Vitalität der Miniorgankulturen wurde über den Trypanblau-Ausschlusstest, die Apoptose-induktion über die Verlagerung von Phosphatidylserin mit Annexin V bestimmt. Mögliche Entzündungsreaktionen wurden mittels ELISA aus den Konzentrationen der Zytokine Interleukin-8 (IL-8) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF) in den Kulturüberständen detektiert. Zur Evaluierung der individuellen DNA-Reparaturkapazität von Lymphozyten wurden Modifikationen der MGE etabliert: Quantifiziert wurde zum einen die individuelle Fähigkeit von Lymphozyten, einen fremdstoff-induzierten DNA-Schaden zu reparieren, zum anderen wurde die Aktivität isolierter Reparaturenzyme aus einem Lymphozyten-Proteinextrakt bestimmt. DNA-Schädigung von Lymphozyten durch ein Nitrosamin wurde sowohl mit der MGE als auch mit dem Mikrokerntest gemessen und vergleichend dargestellt.

Das dreidimensionale Miniorgankulturmodell humaner nasaler Mukosazellen konnte zur Charakterisierung der Gefahrenstoffe *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA), Benzo[*a*]pyren-diol-epoxid (BPDE), Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) und *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) in einer *in vivo* nahen Situation etabliert werden.

Während einer zweiwöchigen Kultivierung blieben die Miniorgankulturen strukturell intakt. Mehrfache Expositionen der Miniorgane gegenüber NDEA und BPDE waren mit deutlicher DNA-Schädigung verbunden. $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ und MNNG verursachten mit jeder weiteren Exposition höhere DNA-Fragmentierungen. Eine Reduzierung der DNA-Schäden im Sinne

einer Reparatur war lediglich nach Exposition mit $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ und MNNG zu beobachten. Die Vitalität der Zellen nasaler Miniorgane wurde durch keinen der untersuchten Stoffe beeinträchtigt. Weder NDEA- noch MNNG-Exposition hatten programmierten Zelltod zur Folge. BPDE und $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ dagegen induzierten nach der dritten Belastung Apoptose.

Entzündungsreaktionen über Veränderungen der Zytokinfreisetzung von Miniorgankulturen wurden nach NDEA-Belastung nicht nachgewiesen. Mehrfache BPDE- und $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ -Expositionen verursachten aber einen Rückgang der GM-CSF Produktion, $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ zusätzlich eine Reduzierung der IL-8-Freisetzung von Miniorganen.

Die Effizienz der DNA-Reparatur in Lymphozyten, gemessen mit der MGE, war in den ersten 15 Minuten des Reparaturintervalls am größten. Allerdings zeigte sich die Bestimmung der individuellen Reparaturfähigkeit durch exogene Faktoren beeinflussbar. Eine Identifizierung von Personen mit erhöhter Mutagensensitivität wurde nicht erreicht.

Bei der Untersuchung einer NDEA-induzierten DNA-Schädigung an Lymphozyten bestätigte der Mikrokerntest die Ergebnisse der MGE.

Das Modell der Miniorgankulturen erweist sich sowohl für genotoxikologische als auch für zytologische und immunologische Untersuchungen als gut geeignet. Durch die Möglichkeit der mehrfachen Exposition mit anschließenden Reparaturphasen ist eine Annäherung an reale Lebensbedingungen möglich. Die metabolische Kompetenz dieser Organkulturen konnte für die Produktion von Entzündungsparametern gezeigt werden. Weitere Versuchsansätze zur quantitativen und qualitativen Darstellung der DNA-Reparatur erscheinen besonders im Modell von Miniorgankulturen humaner Epithelien erfolgversprechend.

Die Etablierung der hier vorgestellten Methoden und deren erste Ergebnisse können in Zukunft zur Prävention maligner Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes beitragen.

6 LITERATUR

- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA: The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco specific nitrosamine NNK; *Cancer Lett* 159:63-71 (2000)
- Al-Batran SE, Astner ST, Supthut M, Gamarra F, Brueckner K, Welsch U, Knuechel R, Huber RM: Three-dimensional in vitro cocultivation of lung carcinoma cells with human bronchial organ culture as a model for bronchial carcinoma; *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:200-208 (1999)
- Alcedo JA, Wetterhahn KE: Chromium toxicity and carcinogenesis; *Int Rev Exp Pathol* 31:85-108 (1990)
- Allen RT, Hunter WJ, Agrawal DK: Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis; *J Pharmacol Toxicol Methods* 37:215-228 (1997)
- Andreoli C, Leopardi P, Rossi S, Crebelli R: Processing of DNA damage induced by hydrogen peroxide and methyl methanesulfonate in human lymphocytes: analysis by alkaline single cell gel electrophoresis and cytogenetic methods; *Mutagenesis* 14:497-503 (1999)
- Aoyagi K, Kohfuji K, Yano S, Murakami N, Hori H, Terasaki Y, Takeda J, Tanaka M, Shirouzu K: Morphological change in the MNNG-treated rat gastric mucosa; *Kurume Med J* 47:31-36 (2000)
- Bacsó Z, Everson RB, Eliason JF: The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented; *Cancer Res* 60:4623-4628 (2000)
- Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun EA, Tran MX, Tang L, Stohs SJ: Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate [chromium VI] and cadmium chloride [cadmium II] to rats; *Free Radic Biol Med* 22:471-478 (1997)
- Bals R, Gamarra F, Kaps A, Grundler S, Huber RM, Welsch U: Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system; *Cell Tissue Res* 293:573-577 (1998)
- Barcelo S, Mace K, Pfeifer AM, Chipman JK: Production of DNA strand breaks by N-nitrosodimethylamine and 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in THLE cells expressing human CYP isoenzymes and inhibition by sulforaphane; *Mutat Res* 402:111-120 (1998)
- Barrett JC: Mechanism of action of known carcinogens. In: Mechanisms of carcinogenesis in risk identification; Vaino H, Magee PN, McGregor DB, McMichael AJ (Hrsg.); Lyon, IARC Sci Pub 116:115-134 (1992)
- Barret JM, Calsou P, Salles B: Deficient nucleotide excision repair activity in protein extracts from normal human lymphocytes; *Carcinogenesis* 16:1611-1616 (1995)

- Barret JM, Calsou P, Laurent G: DNA repair activity in protein extracts of fresh human malignant lymphoid cells; *Mol Pharmacol* 49:766-771 (1996)
- Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, Ohtoshi T, Miyabara Y, Sagai M, Davies RJ: The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro; *Am J Respir Cell Mol Biol* 18:441-448 (1998)
- Beamand JA, Barzon PT, Price RJ, Lake BG: Lack of effect of coumarin on unscheduled DNA synthesis in precision-cut human liver slices; *Food Chem Toxicol* 36:647-653 (1998)
- Becker S, Koren HS, Henke DC: Interleukin-8 expression in normal nasal epithelium and its modulation by infection with respiratory syncytial virus and cytokines tumor necrosis factor, interleukin-1, and interleukin-6; *Am J Respir Cell Mol Biol* 8:20-27 (1993)
- Bender MedSystems: <http://www.bendermedsystems.com> (2002)
- Benning V, Depasse F, Melcion C, Cordier A: Detection of micronuclei after exposure to mitomycin C, cyclophosphamide and diethylnitrosamine by the in vivo micronucleus test in mouse splenocytes; *Mutat Res* 280:137-142 (1992)
- Berwick M, Vineis P: Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans; an epidemiological review; *J Natl Cancer Inst* 92:874-897 (2000)
- Berufskrankheitenverordnung (BKV): <http://www.pafs.de/recht/verord/bkv.html> (1997)
- Blankenship LJ, Manning FC, Orenstein JM, Patierno SR: Apoptosis is the mode of cell death caused by carcinogenic chromium; *Toxicol Appl Pharmacol* 126:75-83 (1994)
- Boehringer Mannheim: <http://www.ukammann.de> (1996)
- Boeing H, Schlehofer B, Blettner M, Wahrendorf J: Dietary carcinogens and the risk for glioma and meningioma in Germany; *Int J Cancer* 53:561-565 (1993)
- Bohr VA, Evans MK, Fornace AJ: DNA repair and its pathogenetic implications; *Lab Invest* 61:143-161 (1989)
- Boland S, Baeza-Squiban A, Fournier T, Houcine O, Gendron M, Chévrier M, Jouvenot G, Coste A, Aubier M, Marano F: Diesel exhaust particles are taken up by airway epithelial cells in vitro and alter cytokine production; *Am J Physiol* 276:604-613 (1999)
- Boland S, Bonvallot V, Fournier T, Baeza-Squiban A, Aubier M, Marano F: Mechanisms of GM-CSF increase by diesel exhaust particles in human airway epithelial cells; *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278:25-32 (2000)
- Bosman FT: The nuclear matrix in pathology; *Virchows Arch* 435:391-399 (1999)

- Braithwaite E, Wu X, Wang Z: Repair of DNA lesions induced by polycyclic aromatic hydrocarbons in human cell-free extracts: involvement of two excision repair mechanisms; *Carcinogenesis* 19:1239-1246 (1998)
- Brown JL: N-Nitrosamines; *Occup Med* 14:839-848 (1999)
- Bunker VW: Free radicals, antioxidants and ageing; *Med Lab Sci* 49:299-312 (1992)
- Capellier G, Zhang Z, Maheu MF, Pointet H, Racadot E, Kantelip B, Regnard J, Barale F: Nasal mucosa inflammation induced by oxygen administration in humans; *Acta Anaesthesiol Scand* 41:1011-1016 (1997)
- Carlisle DL, Pritchard DE, Sing J, Patierno SR: Chromium (VI) induces p53-dependent apoptosis in diploid human lung and mouse dermal fibroblasts; *Mol Carcinog* 28: 111-118 (2000)
- Chan A, Reiter R, Wiese S, Fertig G, Gold R: Plasma membrane phospholipid asymmetry precedes DNA fragmentation in different apoptotic cell models; *Histochem Cell Biol* 110:553-558 (1998)
- Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X: Cell apoptosis induced by carcinogenic metals; *Mol Cell Biochem* 222:183-188 (2001)
- Chen R, Seaton A: A meta-analysis of painting exposure and cancer mortality; *Cancer Detect Prev* 22:533-539 (1998)
- Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, Wei Q: Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients; *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:465-468 (1998)
- Chevillard M, Hinrasky J, Zahm JM, Plotkowski L, Puchelle E: Proliferation, differentiation and ciliary beating on human respiratory ciliated cells in primary culture; *Cell Tissue Res* 264:49-55 (1991)
- Clontech: ApoAlert™ Annexin V Apoptosis Kit; Clontechniques Archives; <http://clontech.com/archive/JUL96UPD/ApoAlert.html> (1996)
- Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, Hsu TC, Zhang F, Tobi H, Braakhuis BJ, Snow GB: Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma; *J Natl Cancer Inst* 88:530-535 (1996)
- Collins AR, Duthie SJ, Dobson VL: Direct enzymic detection of endogenous oxidative base damage in human lymphocyte DNA; *Carcinogenesis* 14:1733-1735 (1993)
- Collins AR, Ma AG, Duthie SJ: The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells; *Mutat Res* 336:69-77 (1995)
- Collins A, Dusinska M, Gedik C: Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ Health Perspect* 104:465-469 (1996)

- Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S, Filion L, Panayiotidis M, Raslova K, Vaughan N: Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications; *Environ Mol Mutagen* 30:139-146 (1997)
- Collins A, Dusinska M, Horváthová E, Munro E, Savio M, Stetina R: Inter-individual differences in repair of DNA base oxidation, measured in vitro with the comet assay; *Mutagenesis* 16:297-301 (2001)
- Conney AH, Chang RC, Jerina DM, Wei SJC: Studies on the metabolism of benzo[a]pyrene and dose-dependent differences in the mutagenic profile of its ultimate carcinogenic metabolite; *Drug Metab Rev* 26:125-163 (1994)
- Coutelle C, Ward PJ, Fleury B, Quattrocchi P, Chambrin H, Iron A, Couzigou P, Cassaigne A: Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms; *Hum Genet* 99:319-325 (1997)
- Cox G, Gauldie J, Jordana M: Bronchial epithelial cell-derived cytokines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils in-vitro; *Am J Respir Cell Mol Biol* 7:507-513 (1992)
- Culp SJ, Gaylor DW, Sheldon WG, Goldstein LS, Beland FA: A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay; *Carcinogenesis* 19:117-124 (1998)
- Cummings BS, Lasker JM, Lash LH: Expression of glutathione-dependent enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal tubular cells from human kidney; *J Pharmacol Exp Ther* 293:677-685 (2000)
- Curtis LN, Carson JE, Collins AM: Features of developing ferret tracheal epithelium: ultrastructural observations of in vivo and in vitro differentiation of ciliated cells; *Exp Lung Res* 13:223-240 (1987)
- Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry; *Cytometry* 13:795-808 (1992)
- Davies JM, Easton DF, Bidstrup PL: Mortality from respiratory cancer and other causes in United Kingdom chromate production workers; *Br J Ind Med* 48:299-313 (1991)
- de Boer J, Hoeijmakers JHJ: Nucleotide excision repair and human syndromes; *Carcinogenesis* 21:453-460 (2000)
- De Flora S, Serra D, Basso C, Zancchi P: Mechanistic aspects of chromium carcinogenicity; *Arch Toxicol Suppl* 13:28-39 (1989)
- DeLeve LD, Wang X, Kaplowitz N, Shulman HM, Bart JA, van der Hoek A: Sinusoidal endothelial cells as a target for acetaminophen toxicity. Direct activation versus requirement for hepatocyte activation in different mouse strains; *Biochem Pharmacol* 53:1339-1345 (1997)

- Department of Health Advisory Group on the Medical Aspects of Air Pollution Episodes: Second Report – Sulphur dioxide, acid aerosols and particulates; London, HMSO (1992)
- Department of Health Advisory Group on the Medical Aspects of Air Pollution Episodes: Third Report – Oxides of nitrogen; London, HMSO (1993)
- Devalia JL, Campbell AM, Sapsford RJ, Rusznak C, Quint D, Godard P, Bousquet J, Davies RJ: Effect of nitrogen dioxide on synthesis of inflammatory cytokines expressed by human bronchial epithelial cells in vitro; *Am J Respir Cell Mol Biol* 9:271-278 (1993)
- Devalia JL, Rusznak C, Herdman MJ, Trigg CJ, Tarraf H, Davies RJ: Effect of nitrogen dioxide and sulphur dioxide on airway response of mild asthmatic patients to allergen inhalation; *Lancet* 344:1668-1671 (1994)
- Devlin RB, McDonnell WF, Mann R, Becker S, House DE, Schreinemachers D, Koren HS: Exposure of humans to ambient levels of ozone for 6.6 hours causes cellular and biochemical changes in the lung; *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:72-81 (1991)
- Devlin RB, McKinnon KP, Noah T, Becker S, Koren HS: Ozone-induced release of cytokines and fibronectin by alveolar macrophages and airway epithelial cells; *Am J Physiol* 266:612-619 (1994)
- Diem E, Rüdiger HW: Mikrokerntest und Comet Assay: Ein Ergebnisvergleich bei Normalprobanden; *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 34:437-441 (1999)
- Dittberner U, Eisenbrand G, Zankl H: Cytogenetic effects of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) and NDELA-monoacetate in human lymphocytes; *J Cancer Res Clin Oncol* 114:575-578 (1988)
- Elias Z, Poirot O, Pezerat H, Suquet H, Schneider O, Danière MC, Terzetti F, Baruthio F, Fournier M, Cavalier C: Cytotoxic and neoplastic transforming effects of industrial hexavalent chromium pigments in Syrian hamster embryo cells; *Carcinogenesis* 10:2043-2052 (1989)
- Elliott RM, Astley AB, Southon S, Archer DB: Measurement of cellular repair activities for oxidative DNA damage; *Free Radic Biol Med* 28:1438-1446 (2000)
- Eisenbrand G, Metzler M: *Toxikologie für Chemiker: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. Mit einer Einführung in das Chemikalien- und Gefahrstoffrecht von Hennecke F*; Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1994)
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages; *J Immunol* 148:2207-2216 (1992)
- Fairbairn DW, Walburger DK, Fairbairn JJ, O'Neill KL: Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis; *Scanning* 18: 407-416 (1996)
- Fenech M, Morley A: Measurement of micronuclei in lymphocytes; *Mutat Res* 147:29-36 (1985)

- Floyd DN, Cassoni AM: Intrinsic radiosensitivity of adult and cord blood lymphocytes as determined by the micronucleus assay; *Eur J Cancer* 30:615-620 (1994)
- Fjellbirkeland L, Bjerkvig R, Steinsvag SK, Laerum OD: Nonadhesive stationary organ culture on human bronchial mucosa; *Am J Respir Cell Mol Biol* 15:197-206 (1996)
- Friedberg EC, Walker GC, Siede W: DNA Repair and Mutagenesis; American Society for Microbiology Press, Washington DC (1995)
- Friedberg EC: How nucleotide excision repair protects against cancer; *Nat Rev Cancer* 1:22-33 (2001)
- Fritz W, Soos K: Smoked food and cancer; *Bibl Nutr Dieta* 29:57-64 (1980)
- Gibb HJ, Lees PS, Pinsky PF, Rooney BC: Lung cancer among workers in chromium chemical production; *Am J Ind Med* 38:115-126 (2000)
- Granchi D, Verri E, Ciapetti G, Savarino L, Cenni E, Gori A, Pizzoferrato A: Effects of chromium extract on cytokine release by mononuclear cells; *Biomaterials* 19:283-291 (1998)
- Gu Z, Flemington C, Chittenden T, Zambetti GP: ei24, a p53 response gene involved in growth suppression and apoptosis; *Mol Cell Biol* 20:233-241 (2000)
- Haguenoer JM, Cordier S, Morel C, Lefebvre JL, Hemon D: Occupational risk factors for upper respiratory tract and upper digestive tract cancer; *Br J Ind Med* 47:380-383 (1990)
- Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G: A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells; *Mutat Res* 390:179-188 (1997)
- Harréus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H: Genotoxische Wirkung auf menschliche Schleimhautbiopsien des oberen Aerodigestivtraktes; *Laryngorhinootologie* 78:176-181 (1999)
- Hartmann A, Speit G: Comparative investigation of the genotoxic effects of metals in the single cell gel (SCG) test; *Environ Mol Mutagen* 23:299-305 (1994)
- Hartwell LH, Weinert TA: Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events; *Science* 246:629-634 (1989)
- Hashemi E, Till C, Ioannides C: Stability of cytochrome P450 proteins in cultured precision-cut rat liver slices; *Toxicology* 149:51-61 (2000)
- Hayakawa N, Hirakawa S, Nakai H, Suzuki S, Ota Z: The effects of thyroid microsomal antibody on thyroid peroxidase activity in human follicular cells: a mini organ culture study; *Endocr J* 40:149-161 (1993)
- Hecht SS, Hoffmann D: N-nitroso compounds and man: sources of exposure, endogenous formation and occurrence in body fluids; *Eur J Cancer Prev* 7:165-166 (1998)

- Heflich RH: Chemical mutagens. In: Genetic Toxicology; Li AP, Heflich RH (Hrsg.); CRC Press, Florida:143-202 (1991)
- Hessel H, Radon K, Pethran A, Maisch B, Grobmair S, Sautter I, Fruhmann G: The genotoxic risk of hospital, pharmacy and medical personnel occupationally exposed to cytostatic drugs - evaluation by the micronucleus assay; *Mutat Res* 497:101-109 (2001)
- Hong JY, Yang CS: Genetic polymorphism of cytochrome P450 as a biomarker of susceptibility to environmental toxicity; *Environ Health Perspect* 105:759-762 (1997)
- Hsie AW, San Sebastian JR, Perdue SW, Schenley RL, Waters MD: Multiple-endpoint mutagenesis with Chinese hamster ovary (CHO) cells: evaluation with eight carcinogenic and non-carcinogenic compounds; *Mol Toxicol* 1:217-234 (1987)
- Huang M, Wang XQ, Wang ZH, Zhou CN, Wu M: The studies of malignant transformation of human epithelial cells induced by diethylnitrosamine (NDEA) in vitro; *Sci Sin* 29:1186-1191 (1986)
- Huang P, Olive PL, Durand RE: Use of the Comet Assay for assessment of drug resistance and its modulation in vivo; *Br J Cancer* 77:412-416 (1998)
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some aromatic amines, hydrazine and related substances, N-nitroso compounds and miscellaneous alkylating agents; IARC, Lyon, Vol 4:183-195 (1974)
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Chromium, nickel and welding; IARC, Lyon, Vol 49: 49-411 (1990)
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Programmed on the Evaluation of Carcinogenic; <http://monographs.iarc.fr>. (2001)
- Ibelgaufts: <http://www.copewithcytokines.de/>(1999)
- Jablonski J, Jablonska E, Moniuszko-Jakoniuk J, Holownia A: Evaluation of the influence of N-nitrosodimethyloamine (NDMA) on the apoptosis of neutrophils of peripheral blood (PMN) and the expression of the IL-6R membrane receptor-in vitro research; *Immunol Invest* 28:177-184 (1999)
- Jahnke V: Der feingewebliche Aufbau der Nase und der Nasennebenhöhlen; In: Nase, Nasennebenhöhlen, Gesicht, Mundhöhle und Pharynx, Kopfspeicheldrüsen; Kastenbauer E (Hrsg.); Thieme Verlag, Stuttgart:34-41 (1992)
- Joenje H: Genetic toxicology of oxygen; *Mutat Res* 219:193-208 (1989)
- Jones P, Kortenkamp A, O'Brien P, Wang G, Yang G: Evidence for the generation of hydroxyl radicals from a chromium (V) intermediate isolated from the reaction of chromate and glutathione; *Arch Biochem Biophys* 286:652-655 (1991)

- Jorissen M, van der Scheuren B, van der Berghe H: Ciliogenesis in cultured human nasal epithelium; *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 52:368-374 (1990)
- Jyonouchi H, Sun S, Iijima K, Wang M, Hecht S: Effects of anti-7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene on human small airway epithelial cells and the protective effects of myo-inositol; *Carcinogenesis* 20:139-145 (1999)
- Kaminskas E, Li JC: Repair of DNA damage induced by oxygen radicals in human non-proliferating and proliferating lymphocytes; *Mutat Res* 274:103-110 (1992)
- Kazerouni N, Sinha R, Hsu CH, Greenberg A, Rothman N: Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study; *Food Chem Toxicol* 39:423-436 (2001)
- Kihara M, Kihara M, Kubota A, Furukawa M, Kimura H: GSTM1 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to head and neck cancers among Japanese smokers; *Cancer Lett* 112:257-62 (1997)
- Klein RG, Schmezer P, Hermann R, Waas P, Spiegelhalter B, Bartsch H: Strong nasal carcinogenicity and genotoxicity of 1-nitroso-4-methylpiperazine after low dose inhalation in rats; *Carcinogenesis* 20:1629-31 (1999)
- Klein RG, Schmezer P, Amelung F, Schroeder HG, Woeste W, Wolf J: Carcinogenicity assays of wood dust and wood additives in rats exposed by long-term inhalation; *Int Arch Occup Environ Health* 74:109-118 (2001)
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Münzenrieder RK, Harréus UA: Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the comet assay; *Mutat Res* 467:21-30 (2000a)
- Kleinsasser NH, Weissacher H, Kastenbauer ER, Dirschedl P, Wallner BC, Harréus UA: Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants; *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257:337-342 (2000b)
- Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harréus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER, Huber RM: Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay; *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 63:141-147 (2001)
- Knize MG, Salmon CP, Pais P, Felton JS: Food heating and the formation of heterocyclic aromatic amine and polycyclic aromatic hydrocarbon mutagens/carcinogens; *Adv Exp Med Biol* 459:179-193 (1999)
- Kobayashi H, Man S, Graham CH, Kapitain SJ, Teicher BA, Kerbel RS: Acquired multicellular-mediated resistance to alkylating agents in cancer; *Proc Natl Acad Sci USA* 90:3294-3298 (1993)

- Kripke ML: Carcinogenesis: ultraviolet radiation. In: *Dermatology in General Medicine*; Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Austen KF, Wolff K, Freedberg IM (Hrsg.); McGraw-Hill, New York, 4. Ausgabe:797 (1993)
- Laffon B, Pasaro E, Mendez J: Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: comet assay in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei; *Mutat Res* 491:163-172 (2001)
- Lasne C, Gu ZW, Venegas W, Chouroulinkov I: The in vitro micronucleus assay for detection of cytogenetic effects induced by mutagen-carcinogens: comparison with the in vitro sister-chromatid exchange assay; *Mutat Res* 130:273-282 (1984)
- Lei W, Yu R, Mandlekar S, Kong AN: Induction of apoptosis and activation of interleukin 1beta-converting enzyme/Ced-3 protease (caspase-3) and c-Jun NH2-terminal kinase 1 by benzo[a]pyrene; *Cancer Res* 58:2102-2106 (1998)
- Lewis RJ: *Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials*; John Wiley Verlag, New York, 10. Ausgabe (2000)
- Li S, Pan D, Wang G: Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes; *Arch Environ Health* 49:119-122 (1994)
- Lin H, Parsels LA, Maybaum J, Hollenberg PF: N-Nitrosodimethylamine-mediated cytotoxicity in a cell line expressing P450 2E1: evidence for apoptotic cell death; *Toxicol Appl Pharmacol* 157:117-124 (1999)
- Liu Y, Sundqvist K, Belinsky SA, Castonguay A, Tjalve H, Grafstrom RC: Metabolism and macromolecular interaction of the tobacco-specific carcinogen 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in cultured explants and epithelial cells of human buccal mucosa; *Carcinogenesis* 14:2383-2388 (1993)
- Mace K, Offord EA, Harris C, Pfeifer AM: Development of in vitro models for cellular and molecular studies in toxicology and chemoprevention; *Arch Toxicol Suppl* 20:227-236 (1998)
- Maier H, Sennewald E: *Risikofaktoren für Plattenepithelkarzinome im Kopf-Halsbereich*; Hauptverband der gewerblichen Berufsgenossenschaften, Sankt Augustin (1994)
- Manning FCR, Blankenship LJ, Wise JP, Xu J, Bridgewater LC, Patierno SR: Induction of internucleosomal DNA fragmentation by carcinogenic chromate: relationship to DNA damage, genotoxicity, and inhibition of macromolecular synthesis; *Environ Health Perspect* 102:159-167 (1994)
- Markham AF, Coletta PL, Robinson PA, Clissond P, Taylor GR, Carr IM: Screening for cancer predisposition; *Europ J Cancer* 30:2015-2029 (1994)
- Monarca S, Feretti D, Zanardi A, Moretti M, Villarini M, Spiegelhalder B, Zerbini I, Gelatti U, Lebbolo E: Monitoring airborne genotoxicants in the rubber industry using genotoxicity tests and chemical analyses; *Mutat Res* 490:159-169 (2001)

- Morita T, Asano N, Awogi T, Sasaki YF, Sato S, Shimada H, Sutou S, Suzuki T, Wakata A, Sofuni T, Hayashi M: Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative Study of the Micronucleus Group Test. Mammalian Mutagenicity Study Group; *Mutat Res* 389:3-122 (1997)
- Mudway IS, Kelly FJ: Ozone and the lung: a sensitive issue; *Mol Aspects Med* 21:1-48 (2000)
- Mullol J, Xaubet A, Gaya A, Roca-Ferrer J, Lopez E, Fernandez JC, Fernandez MD, Picado C: Cytokine gene expression and release from epithelial cells. A comparison study between healthy nasal mucosa and nasal polyps; *Clin Exp Allergy* 25:607-615 (1995)
- Nagata S: Apoptosis by death factor; *Cell* 88:355-365 (1997)
- Natarajan AT, Boei JWA, Darroudi F, van Diemen PCM, Dulout F, Hande MP, Ramalho AT: Current cytogenetic methods for detecting exposure and effects of mutagens and carcinogens; *Environ Health Persp* 104:445-448 (1996)
- Ohtoshi T, Vancheri C, Cox G: Monocyte-macrophage differentiation induced by human upper airway epithelial cells; *Am J Respir Cell Mol Biol* 4:255-263 (1991)
- Ohtoshi T, Takizawa H, Okazaki H, Kawasaki S, Takeuchi N, Ohta K, Ito K: Diesel exhaust particles stimulate human airway epithelial cells to produce cytokines relevant to airway inflammation in vitro; *J Allergy Clin Immunol* 101:778-785 (1998)
- Olive PL, Banath JP: Growth fraction measured using the comet assay; *Cell Prolif* 25:447-457 (1992)
- 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; *Mutat Res* 294:275-283 (1993)
- Olive PL, Durand RE: Drug and radiation in spheroids: cell contact and kinetics; *Cancer Metastasis Rev* 13:121-138 (1994)
- Pasupathy K, Bhattacharya RK: Damage to DNA and activity of nuclear DNA repair and replicative enzymes following N-nitrosodiethylamine treatment to rats; *J Biochem Mol Toxicol* 14: 277-282 (2000)
- Peltonen K, Dipple A: Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation; *J Occup Environ Med* 37:52-58 (1995)
- Phillips DH, Grover PL: Polycyclic hydrocarbon activation: bay regions and beyond; *Drug Metab Rev* 26:443-467 (1994)
- Phillips HJ: Dye exclusion test for cell viability. In: *Tissue culture*; Kruse PF (Hrsg.); Academic Press, New York:407-408 (1973)
- Polyak K, Xia Y, Zweier JL, Kinzler KW, Vogelstein B: A model for p53-induced apoptosis; *Nature* 389:300-305 (1997)

- Pool-Zobel BL, Klein RG, Lieggibel UM, Kuchenmeister F, Weber S, Schmezer P: Systemic genotoxic effects of tobacco-related nitrosamines following oral and inhalational administration to Sprague-Dawley rats; *Clin Invest* 79:299-306 (1992)
- Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U, Schroder HG, Schmezer P: Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples; *Environ Mol Mutagen* 24:23-45 (1994)
- Redaelli A, Magrassi R, Bonassi S, Abbondandolo A, Frosina G: AP endonuclease activity in humans: development of a simple assay and analysis of ten normal individuals; *Teratog Carcinog Mutagen* 18:17-26 (1998)
- Rioux N, Castonguay A: 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone modulation of cytokine release in U937 human macrophages; *Cancer Immunol Immunother* 49:663-670 (2001)
- Robbiano L, Mereto E, Migliazi MA, Pastore P, Brambilla G: An in vivo micronucleus assay for detecting the clastogenic effect in rat kidney cells; *Mutat Res* 390:51-57 (1997)
- Romeis B: *Mikroskopische Technik*; Urban und Schwarzenberg, München/Wien, 17. Auflage (1989)
- Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G: Contribution of apoptosis to responses in the comet assay; *Mutat Res* 497:169-175 (2001)
- Rudolph E, Peychl J, Cervinka M: The dynamics of the hexavalent chromium induced apoptotic patterns in vitro; *Acta Medica* 43:83-89 (2000)
- Rusznak C, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ: Ozone-induced mediator release from human bronchial epithelial cells in vitro and the influence of nedocromil sodium; *Eur Respir J* 9:2298-2305 (1996)
- Sage E, Haseltine WA: High ratio of alkali-sensitive lesions to total DNA modification induced by benzo[a]pyrene diol epoxide; *J Biol Chem* 259:11098-11102 (1984)
- Salas VM, Burchiel SW: Apoptosis in Daudi human B cells in response to benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol; *Toxicol Appl Pharmacol* 151:367-376 (1998)
- Samet JM, Graves LM, Quay J, Dailey LA, Devlin RB, Ghio AJ, Wu W, Bromberg PA, Reed W: Activation of MAPKs in human bronchial epithelial cells exposed to metals; *Am J Physiol* 275:551-558 (1998)
- Sanders SP, Kim J, Connolly KR, Porter JD, Siekierski ES, Proud D: Nitric oxide inhibits rhinovirus-induced granulocyte macrophage colony-stimulating factor production in bronchial epithelial cells; *Am J Respir Cell Mol Biol* 24:317-325 (2001)
- Sankaranarayanan K: Ionizing radiation and genetic risks. III: Nature of spontaneous and radiation-induced mutations in mammalian in vitro systems and mechanisms of induction of mutations by radiation; *Mutat Res* 258:75-97 (1991)

- Sarafian TA, Bredesen DE: Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? *Free Radic Res* 21:1-8 (1994)
- Satoh N, Fukuda S, Takizawa M, Furuta Y, Kashiwamura M, Inuyama Y: Chromium-induced carcinoma in the nasal region. A report of four cases; *Rhinology* 32:47-50 (1994)
- Sato E, Koyama S, Takamizawa A, Masubuchi T, Kubo K, Robbins RA, Nagai S, Izumi T: Smoke extract stimulates lung fibroblasts to release neutrophil and monocyte chemotactic activities; *Am J Physiol* 277:1149-1157 (1999)
- Schierhorn K, Zhang M, Kacy M, Kunkel G: Ozone-induced augmentation of eicosanoid metabolism in human nasal mucosa in vitro; *Int Arch Allergy Immunol* 113:312-315 (1997)
- Schierhorn K, Zhang M, Matthias C, Kunkel G: Influence of ozone and nitrogen dioxide on histamine and interleukin formation in a human nasal mucosa culture system; *Am J Respir Cell Mol Biol* 20:1013-1019 (1999)
- Schmezer P, Rajae-Bebahani N, Risch A, Thiel S, Rittgen W, Drings P, Dienemann H, Kayser KW, Schulz V, Bartsch H: Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes; *Mutagenesis* 168:25-30 (2001)
- Schraufstätter I, Hyslop P, Jackson JH, Cochrane CG: Oxidant-induced DNA damage of target cells; *J Clin Invest* 82:1040-1050 (1988)
- Sehlmeyer U, Hechtenberg S, Klyszcz H, Beyersmann D: Accumulation of chromium in Chinese hamster V79-cells and nuclei; *Arch Toxicol* 64:506-508 (1990)
- Sehmi R, Cromwell O, Wardlaw AJ, Moqbel R, Kay AB: Interleukin-8 is a chemo-attractant for eosinophils purified from subjects with a blood eosinophilia but not from normal healthy subjects; *Clin Exp Allergy* 23:1027-1036 (1993)
- Shi X, Dalal NS: The role of superoxide radical in chromium (VI)-generated hydroxyl radical: The Cr (VI) Haber-Weiss-Cycle; *Arch Biochem Biophys* 292:323-327 (1992)
- Shimada H, Shiao YH, Shibata M, Waalkes MP: Cadmium suppresses apoptosis induced by chromium; *J Toxicol Environ Health A* 54:159-168 (1998)
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells; *Exp Cell Res* 175:184-191 (1988)
- Singh J, McLean JA, Pritchard DE, Montaser A, Patierno SR: Sensitive quantitation of chromium-DNA adducts by inductively coupled plasma mass spectrometry with a direct injection high efficiency nebulizer; *Toxicol Sci* 46:260-265 (1998a)
- Singh J, Carlisle DL, Pritchard DE, Patierno SR: Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review); *Oncol Rep* 5:1307-1318 (1998b)

- Sirover MA, Vollberg TM, Seal G: DNA repair and the molecular mechanisms of Bloom's syndrome; *Crit Rev Oncog* 2:19-33 (1990)
- Slamenova D, Gabelova A, Ruzekova L, Chalupa I, Horvathova E, Farkasova T, Bozsakyova E, 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; *Mutat Res* 383:243-252 (1997)
- Smith CJ, Perfetti TA, Rumble MA, Rodgman A, Doolittle DJ: "IARC Group 2A carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke; *Food Chem Toxicol* 39:183-205 (2000)
- Smith SM, Lee DK, Lacy J, Coleman DL: Rat tracheal epithelial cells produce granulocyte/macrophage colony stimulating factor; *Am Respir Cell Mol Biol* 2:59-68 (1990)
- Snyder CA, Udasin I, Waterman SJ, Taioli E, Gochfeld M: Reduced IL-6 levels among individuals in Hudson County, New Jersey, an area contaminated with chromium; *Arch Environ Health* 51:26-28 (1996)
- Sommer H, Eisenbrand G: A method for the determination of N-nitrosoalkanolamines in cosmetics; *Z Lebensm Unters Forsch* 186:235-238 (1988)
- Steinsvag SK, Strand M, Berg O, Miaguchi M, Olofsson J: Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system; *Laryngoscope* 101:1323-1331 (1991)
- Steller H: Mechanisms and genes of cellular suicide; *Science* 267:1445-1449 (1995)
- Straif K, Weiland SK, Bungers M, Holthenrich D, Taeger D, Yi S, Keil U: Exposure to high concentrations of nitrosamines and cancer mortality among a cohort of rubber workers; *Occup Environ Med* 57:180-187 (2000)
- Streffer C: Genetische Prädisposition and Strahlenempfindlichkeit bei normalen Geweben; *Strahlenther Onkol* 173:462-468 (1997)
- Sullivan PA, Eisen EA, Woskie SR, Kriebel D, Wegman DH, Hallock MF, Hammond SK, Tolbert PE, Smith TJ, Monson RR: Mortality studies of metalworking fluid exposure in the automobile industry: VI. A case-control study of esophageal cancer; *Am J Ind Med* 34:36-48 (1998)
- Tafazoli M, Baeten A, Geerlings P, Kirsch-Volders M: In vitro mutagenicity and genotoxicity study of a number of short-chain chlorinated hydrocarbons using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (Comet assay) in human lymphocytes: a structure-activity relationship (QSAR) analysis of the genotoxic and cytotoxic potential; *Mutagenesis* 13:115-126 (1998)
- Tang MS, Pierce JR, Doisy RP, Nazimiec ME, MacLeod MC: Differences and similarities in the repair of two benzo[a]pyrene diol epoxide isomers induced DNA adducts by uvrA, uvrB, and uvrC gene products; *Biochemistry* 31:8429-8436 (1992)

- Tarr PE: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and the immune system; *Med Oncol* 13:133-140 (1996)
- Teissier E, Fennrich S, Strazielle N, Daval JL, Ray D, Schlosshauer B, Ghersi-Egea JF: Drug metabolism in in vitro organotypic and cellular models of mammalian central nervous system: activities of membrane-bound epoxide hydrolase and NADPH-cytochrome P450 (C) reductase; *Neurotoxicology* 19:347-355 (1998)
- Thompson CB: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease; *Science* 267:1456-1462 (1995)
- Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within; *Science* 281:1312-1316 (1998)
- Tice RR, Strauss GHS, Peters WP: High dose alkylating agents with autologous bone marrow support in patients with breast cancer: preliminary assessment of DNA damage in individual peripheral blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis technique assay; *Mutat Res* 271:101-113 (1992)
- Tithof PK, Elgayyar M, Schuller HM, Barnhill M, Andrews R: 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, a nicotine derivative, induces apoptosis of endothelial cells; *Am J Physiol* 281:1946-1954 (2001)
- Tricker AR, Spiegelhalder B, Preussmann R: Environmental exposure to preformed nitroso compounds; *Cancer Surv* 8:251-72 (1989)
- van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM: Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure; *Cytometry* 31:1-9 (1998)
- van Goethem F, Lison D, Kirsch-Volders M: Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide; *Mutat Res* 392:31-43 (1997)
- van Iersel M, Verhagen H, van Bladeren PJ: The role of biotransformation in dietary (anti)-carcinogenesis; *Mutat Res* 443:259-270 (1999)
- van Scott MR, Cheng PW, Henke DC, Yankaskas JR: Cell culture of airway epithelia. In: *The Airway Epithelium*; Farmer SG, Hay DWP (Hrsg.); Marcel Dekker, New York:135-167 (1991)
- Venkatachalam S, Denissenko M, Wani AA: DNA repair in human cells: quantitative assessment of bulky anti-BPDE-DNA adducts by non-competitive immunoassays; *Carcinogenesis* 16:2029-2036 (1995)
- Villarete LH, Remick DG: Nitric oxide regulation of interleukin-8 gene expression; *Shock* 7:29-35 (1997)

- Villarini M, Moretti M, Pasquini R, Scassellati-Sforzolini G, Fatigoni C, Marcarelli M, Monarca S, Rodrigues AV: In vitro genotoxic effects of the insecticide deltamethrin in human peripheral blood leukocytes: DNA damage ('comet' assay) in relation to the induction of sister-chromatid exchanges and micronuclei; *Toxicology* 130:129-139 (1998)
- Visvardis EE, Tassiou AM, Piperakis SM: Study of DNA damage induction and repair capacity of fresh and cryopreserved lymphocytes exposed to H₂O₂ and γ -irradiation with the alkaline comet assay; *Mutat Res* 383:71-80 (1997)
- Vrzoc M, Petras ML: Comparison of alkaline single cell gel (Comet) and peripheral blood micronucleus assay in detecting DNA damage caused by direct and indirect acting mutagens; *Mutat Res* 381:31-40 (1997)
- Watson WP, Smith RJ, Huckle KR, Wright AS: Human organ culture techniques for the detection and evaluation of genotoxic agents; *IARC Sci Publ* 89:384-388 (1988)
- Wei Q, Gu J, Cheng L, Bondy ML, Jiang H, Hong WK, Spitz MR: Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer; *Cancer Res* 56:3975-3979 (1996)
- Wilmer JL, Burleson FG, Kayama F, Kanno J, Luster MI: Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin; *J Invest Dermatol* 102:915-922 (1994)
- Wyatt TA, Heires AJ, Sanderson SD, Floreani AA: Protein kinase C activation is required for cigarette smoke-enhanced C5a-mediated release of interleukin-8 in human bronchial epithelial cells; *Am J Respir Cell Mol Biol* 21:283-288 (1999)
- Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis; *Int Rev Cytol* 68:251-306 (1980)
- Ziegelaar BW, Aigner J, Staudenmaier R, Lempart K, Mack B, Happ T, Sittinger M, Endres M, Naumann A, Kastenbauer E, Rotter N: The characterization of human respiratory epithelial cells cultured on resorbable scaffolds: first step towards a tissue engineered replacement; *Biomaterials* 23:1425-1438 (2002)
- Zhou BB, Elledge SJ: The DNA damage response: putting checkpoints in perspective; *Nature* 408:433-439 (2000)
- Zou XN, Lu SH, Liu B: Volatile N-nitrosamines and their precursors in Chinese salted fish – a possible etiological factor for NPC in China; *Int J Cancer* 59:155-158 (1994)

7 ANHANG

7.1 Verwendete Abkürzungen

B[a]P	—	Benzo[a]pyren
BEGM	—	Bronchial Epithelial Growth Medium
BER	—	Basenexzisionsreparatur
BNZ	—	Binukleäre Zellen
BP	—	Bandpassfilter
BPDE	—	Benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid
BSA	—	Bovine Serum Albumin
DMEM	—	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	—	Dimethylsulfoxid
DNA	—	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	—	Ethylendiaminetetraessigsäure
ELISA	—	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
EP	—	Extraktpuffer
FCS	—	fötales Kälberserum
FITC	—	Fluoreszeinisothiocyanat
g	—	Fallbeschleunigung
GM-CSF	—	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
H ₂ O ₂	—	Wasserstoffperoxid
HE	—	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	—	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IARC	—	International Agency for Research on Cancer
i	—	individuell
IL	—	Interleukin
m	—	männlich
MGE	—	Mikrogelelektrophorese
MNNG	—	N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin
N	—	Anzahl
NDEA	—	N-Nitrosodiethylamin
NNK	—	4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
OTM	—	Olive Tail Moment
PAH	—	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
P	—	Proteinextrakt
PHA	—	Phytohämagglutinin
PBS	—	Phosphate Buffered Saline
r	—	Korrelationskoeffizient nach Pearson
RNA	—	Ribonukleinsäure
RPMI	—	Rosewell Park Memorial Institute 1640
SCE	—	Schwesterchromatidaustausch
TNF- α	—	Tumornekrosefaktor α
TUNEL	—	Terminale Desoxyribosyl-Transferase mediated dUTP Nick End Labeling
w	—	weiblich

7.2 Anamnesen der Probenspender

Tabelle 19: Anamnesen der Spender nasaler Schleimhaut für die Untersuchungen an Miniorgankulturen.

Nr.	Alter	Geschlecht	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
1	51	♂	0 g/d	15 py	arbeitslos
2	21	♀	0 g/d	0 py	o.A.
3	34	♂	0 g/d	11 py	Lagerist
4	61	♀	5 g/d	0 py	Hausfrau
5	48	♀	0 g/d	0 py	o.A.
6	44	♂	0 g/d	0 py	o.A.
7	20	♂	0 g/d	0 py	o.A.
8	33	♂	25 g/d	10 py	Zimmerer
9	58	♀	0 g/d	0 py	o.A.
10	50	♂	200 g/d	25 py	Lackierer
11	28	♂	25 g/d	8 py	o.A.
12	51	♂	0 g/d	0 py	Bauarbeiter
13	59	♀	0 g/d	0 py	Hausfrau
14	54	♀	0 g/d	0 py	Hausfrau
15	35	♂	25 g/d	10 py	Maschineneinsteller
16	34	♂	25 g/d	1 py	Kaufmann
17	29	♂	5 g/d	5 py	Küchenhilfe
18	24	♀	5 g/d	0 py	Hausfrau
19	64	♂	50 g/d	0 py	Marketingleiter
20	31	♀	0 g/d	0 py	o.A.
21	43	♂	25 g/d	25 py	Reitlehrer
22	43	♂	0 g/d	0 py	o.A.
23	21	♂	5 g/d	3 py	Bürokaufmann

♂ männlich, ♀ weiblich; Alkoholkonsum in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Packungsjahren (1 py: 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr), o.A. ohne Angabe

Tabelle 20: Anamnesen der Spender peripheren Blutes für die Untersuchungen der Lymphozyten-Reparatur.

Nr.	Alter	Geschlecht	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
1	26	♂	25 g/d	12 py	Student
2	24	♂	25 g/d	0 py	Student
3	26	♂	25 g/d	3 py	Student
4	32	♂	25 g/d	0 py	Arzt
5	31	♂	10 g/d	0 py	Arzt
6	36	♂	0 g/d	3 py	Flugbegleiter
7	33	♂	25 g/d	3 py	Physiker
8	35	♂	25 g/d	10 py	Arzt
9	36	♂	10 g/d	0 py	Arzt
10	30	♂	0 g/d	0 py	Arzt

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

Tabelle 21: Anamnesen der Spender peripheren Blutes bei dem Vergleich Mikrokerntest – Mikrogelelektrophorese.

Nr.	Alter	Geschlecht	Alkoholkonsum	Nikotinkonsum	Beruf
1	25	♀	0 g/d	0 py	wiss. Angestellte
2	44	♂	25 g/d	2 py	Taxifahrer
3	70	♀	5 g/d	0 py	Hausfrau
4	32	♂	25 g/d	0 py	Bäcker
5	19	♂	25 g/d	2 py	Maler
6	30	♀	0 g/d	0 py	Hausfrau
7	33	♂	25 g/d.	10 py	Zimmerer
8	28	♂	25 g/d	8 py	o.A.
9	44	♂	50 g/d	0 py	Verlagsdirektor
10	37	♂	25 g/d	10 py	Formenbauer
11	35	♂	25 g/d	15 py	Maschineneinsteller.
12	35	♂	0 g/d	0 py	o.A.
13	31	♀	5 g/d	0 py	Büroangestellte
14	27	♂	25 g/d	12 py	IT-Techniker
15	42	♂	0 g/d	0 py	o.A.
16	59	♂	25 g/d	17 py	Kaufmann
17	29	♀	25 g/d	0 py	wiss. Angestellte
18	28	♀	0 g/d	0 py	wiss. Angestellte
19	29	♀	0 g/d	0 py	Krankenschwester
20	34	♂	25 g/d	1 py	Kaufmann

♂ männlich, ♀ weiblich; Alkoholkonsum in Gramm pro Tag (g/d), Nikotinkonsum in Packungsjahren (1 py: 20 Zigaretten pro Tag über ein Jahr), o.A. ohne Angabe.

7.3 Lebenslauf

Barbara Christina Wallner

Geburtsdatum: 07. August 1972

Geburtsort: Traunstein

Schulbildung:

1978 - 1982 Grundschule Teisendorf

1982 - 1991 Rottmayr-Gymnasium Laufen, Abitur

Universitätsausbildung:

1992 - 1998 Biologiestudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München

1997 Diplomarbeit am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, Neuherberg

November 1998 Studienabschluss: Diplom-Biologin

Praktika:

Oktober 1996 Praktikum am Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

1997 - 1998 Studentische Hilfskraft der AG Expositionskammern am GSF-Forschungszentrum

Berufliche Tätigkeit:

seit Januar 1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Labor *Klinisch experimentelle Onkologie* der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Ludwig-Maximilians-Universität München

7.4 Publikationen

Originalpublikationen

- Kleinsasser NH, Harréus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER: Mutagensensitivität von Patienten mit Larynx- bzw. Oropharynxkarzinomen; *Laryngorhinootologie* 78:679-684 (1999)
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK, Harréus UA: Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay; *Mutat Res* 467:21-30 (2000)
- Kleinsasser NH, Weissacher H, Kastenbauer ER, Dirschedl P, Wallner BC, Harréus UA: Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants; *Eur Arch Otorhinolaryngol* 257:337-342 (2000)
- Kleinsasser NH, Kastenbauer ER, Wallner BC, Weissacher H, Harréus UA: Genotoxizität von Phthalaten. Zur Diskussion über Weichmacher in Kinderspielzeug; *HNO* 49:378-381 (2001)
- Kleinsasser NH, Weissacher H, Wallner BC, Kastenbauer ER, Harréus UA: Zytotoxizität und Genotoxizität von Fluoriden in humaner Mukosa und Lymphozyten; *Laryngorhinootologie* 80:187-190 (2001)
- Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harréus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER, Huber RM: Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay; *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 63:141-147 (2001)
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Weissacher H, Harréus UA: Genotoxicity of di-butyl-phthalate and di-iso-butyl-phthalate in human lymphocytes and mucosal cells; *Teratog Carcinog Mutagen* 21:189-196 (2001)
- Kleinsasser NH, Wagner C, Wallner BC, Harréus UA, Kastenbauer ER: Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients; *Mutat Res* 491:151-161 (2001)
- Harréus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER, Kleinsasser NH: Untersuchungen zur DNA-Reparatur von Schleimhautzellen und Lymphozyten mit dem Comet Assay; *Laryngorhinootologie* 80:23-26 (2001)
- Harréus UA, Kastenbauer ER, Wallner BC, Kleinsasser NH: Stellenwert der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese in der Ökogenotoxikologie; *Laryngorhinootologie* 81:528-533 (2002)
- Harréus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER, Kleinsasser NH: Genotoxicity and cytotoxicity of 4-nonylphenol ethoxylates on lymphocytes using the Comet Assay; *Int J Environ Anal Chem* 82:395-401 (2002)
- Kleinsasser NH, Kastenbauer ER, Zieger S, Baluschko T, Wallner BC, Harréus UA: Lagerung humaner nasaler Mukosa für die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese; *HNO*, im Druck.

Kongressbeiträge

- Wallner BC, Harréus UA, Münzenrieder RK, Kastenbauer ER, Kleinsasser NH: Genotoxische Empfindlichkeit humaner Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes und peripherer Lymphozyten im Vergleich; Research Festival, MMW München 201 (1999)
- Wallner BC, Weissacher H, Harréus UA, Kleinsasser NH: Zytotoxizität und Genotoxizität von Fluoriden; 71. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Berlin (2000)
- Wallner BC, Kleinsasser NH, Bergner A, Harréus UA: Genotoxicity of di- and diiso-butylphthalates in human mucosal cells and lymphocytes; EUFOS Berlin (2000)
- Wallner B, Richter E, Zwickelpflug W, Harréus U, Kleinsasser N: Untersuchungen zur Genotoxizität von Nitrosaminen an humanen Epithelien und Lymphozyten; 72. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Hamburg (2001)
- Wallner BC, Harréus UA, Kastenbauer ER, Kleinsasser NK: Genotoxikologische Untersuchungen mehrfach-exponierter Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa; 73. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie, Baden-Baden (2002)

7.5 Danke !

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

PD Dr. med. Norbert Kleinsasser, der mir die Möglichkeit gab, im Labor *Klinisch experimentelle Onkologie* zu promovieren. Er war stets am Fortgang meiner Arbeit interessiert und wurde der zahlreichen Diskussionen gerade in den letzten Wochen nicht müde.

Prof. Dr. med. Ernst Kastenbauer, der durch die Bereitstellung von technischen und finanziellen Mitteln diese Arbeit erst ermöglichte.

Dr. med. Ulrich Harréus, der meine Arbeit betreute, mich in die Grundlagen der Thematik einführte, stets Interesse zeigte und immer ein offenes Ohr für Probleme und Fragen jeglicher Art hatte.

PD Dr. Weitkunat, IBE, der mich sehr geduldig und freundlich bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse beraten hat.

Tatjana Baluschko, der unermüdlichen Helferin, die mir im Labor stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Ihr unbeschreibliches Improvisationstalent half mir in vielen aussichtslosen Momenten.

Sabina Zieger, die mich im Laboralltag unterstützte und mit ihrem Humor versorgte. Viele freundschaftliche Gespräche sowie gemeinsame Anläufe ließen manche Hürde kleiner erscheinen.

Leslie Pfrogner, die mich in die Welt des ELISA einführte und auch bei noch so vollem Terminkalender immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Brigitte Mack, die mich freundlicher Weise bei der Anfertigung der histologischen Schnitte unterstützte.

Den *OP-Teams* aus den Kliniken Innenstadt und Großhadern, ohne deren Hilfsbereitschaft und Kooperation die Proben nie den Weg ins Labor gefunden hätten.

Allen *Doktoranden* des Labors, für die abwechslungsreiche und lustige Zeit, die fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen außerhalb des Rotlicht-Labors, die Versorgung mit Keksen, Gummibären und Kaffee, der mich auch bei nächtlichen Versuchen nicht müde werden ließ.

Dr. med. dent. Ruth Münzenrieder, die mir durch ihre aufmunternde Art sowie durch ihre Tipps beim Erstellen dieser Arbeit sehr geholfen hat.

Doris Wögerbauer, die mir geduldig zu jeder Zeit mit Rat und Tat in fotografischen und gestalterischen Engpässen zur Seite stand.

Meinen Eltern, die all die Jahre hinter meinem Tun standen, und mich unterstützten, wo auch immer sie nur konnten und durften.

Ein besonderes Dankeschön aber geht an meinen Freund *Hardy*, der mich immer wieder zu motivieren wußte und mich zur rechten Zeit auf den Sonnenschein aufmerksam machte.