

Programm Lebensgrundlage Umwelt  
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Zwischenbericht anlässlich des  
Statusseminars des BWPLUS am 28.2. und 1.3.2001 im  
Forschungszentrum Karlsruhe

**Kombinationswirkungen umweltrelevanter Metallverbindungen in  
Lungenzellen**

T. Schwerdtle<sup>1</sup>, A. Pelzer<sup>1</sup>, A. Seidel<sup>2</sup>, A. Hartwig<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe*

<sup>2</sup> *Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. G. Grimmer-Stiftung, Großhansdorf*

Förderkennzeichen: BWB 99007

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des  
Landes Baden-Württemberg gefördert.

## **Kombinationswirkungen umweltrelevanter Metallverbindungen in Lungenzellen**

T. Schwerdtle<sup>1</sup>, A. Pelzer<sup>1</sup>, A. Seidel<sup>2</sup>, A. Hartwig<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe

<sup>2</sup> Biochemisches Institut für Umweltcarcinogene, Prof. Dr. G. Grimmer-Stiftung, Großhansdorf

### **Summary**

This project aims to investigate the genotoxicity of environmentally relevant particulate nickel and cadmium compounds in human lung cells as primary targets of metal-induced carcinogenicity. Special focus will be given to the question whether direct DNA damage or inhibition of DNA repair processes causing enhancing effects with other DNA damaging agents are predominant. In a first step, a sensitive procedure to quantify DNA adducts of benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P) was established. This method is based on HPLC with fluorescence detection and allows the specific and reproducible quantification of 1 DNA-adduct of benzo[*a*]pyrene diol epoxide (BPDE) per 10<sup>8</sup> base pairs in cultured cells. By this approach, we demonstrated the dose-dependent generation of DNA lesions and their repair in HeLa and A549 lung cells. The removal of DNA adducts of BPDE was inhibited by both NiCl<sub>2</sub> and NiO in the non-cytotoxic concentration range. The results obtained so far indicate that the repair inhibition by Ni(II) observed previously also applies for lung cells and for both soluble and insoluble nickel compounds.

### **Zusammenfassung**

Gesamtziel des Vorhabens ist die Abklärung der Genotoxizität von partikulären, umweltrelevanten Nickel- und Cadmiumverbindungen in menschlichen Lungenzellen als Zielzellen der metallinduzierten Kanzerogenese. Insbesondere soll abgeklärt werden, ob primäre genotoxische Effekte oder DNA-Reparaturinhibitionen im Vordergrund stehen, die in der Folge zu Wirkungsverstärkungen in Kombination mit anderen DNA-schädigenden Agentien führen. Hierfür wurde zunächst ein auf HPLC mit Fluoreszenzdetektion basierendes Testsystem zum empfindlichen Nachweis von DNA-Schäden des Benzo[*a*]pyrens (B[*a*]P) etabliert, welches nunmehr den spezifischen und reproduzierbaren Nachweis von 1 DNA-Addukt des Benzo[*a*]pyren 7,8-diol 9,10-epoxids (BPDE) pro 10<sup>8</sup> Basenpaare in Kulturzellen ermöglicht. Mit Hilfe dieses Testsystems wurde die dosisabhängige Induktion der DNA-Schäden und ihre Reparatur in HeLa- und A549-Zellen gezeigt. Die Entfernung der DNA-Läsionen wurde sowohl durch NiCl<sub>2</sub> als auch durch NiO in nicht-cytotoxischen Konzentrationen gehemmt. Die bislang erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß die in Vorarbeiten gezeigten Reparaturinhibitionen durch NiCl<sub>2</sub> auch in Lungenzellen zu beobachten sind und daß sowohl wasserlösliche als auch weitgehend wasserunlösliche Nickelverbindungen inhibitorisch auf die Nucleotid-Exzisionsreparatur wirken.

## 1 Einleitung

Aufgrund ihrer weiten Verbreitung hat die Gruppe der krebserzeugenden Metallverbindungen sowohl in der Umwelt als auch am Arbeitsplatz eine große praktische Bedeutung. Dennoch sind die zugrunde liegenden Mechanismen noch unklar, da mit Ausnahme von Chromaten die Mutagenität nur schwach und/oder erst bei hohen Konzentrationen nachweisbar ist. Demgegenüber zeigten eigene Untersuchungen, daß wasserlösliches Nickel(II) und Cadmium(II) zwar erst in vergleichsweise hohen Konzentrationen DNA-Schäden induzieren, aber in sehr geringen Konzentrationen die Reparatur endogener oxidativer und durch Umweltmutagene induzierter DNA-Schäden hemmen und so deren genotoxische Wirkung verstärken (zusammengefaßt in Hartwig, 2000). Diese Untersuchungen wurden bislang in den permanenten, für Laboruntersuchungen häufig eingesetzten Zelllinien (HeLa, V79) in Kombination mit UVC-Strahlung durchgeführt. Im Rahmen dieses Vorhabens sollen im wesentlichen zwei Aspekte abgeklärt werden. Zum einen soll untersucht werden, ob die schwachen direkten genotoxischen Wirkungen und die ausgeprägten Reparaturinhibitionen auch in Lungenzellen als Zielzellen der Metall-induzierten Kanzerogenese zu beobachten sind. Diese Fragestellung gewinnt auch durch Befunde an Bedeutung, nach denen Nickel sowohl in der Allgemeinbevölkerung als auch nach beruflicher Exposition in der Lunge im Laufe des Lebens angereichert wird und somit von einer kontinuierlichen Belastung auszugehen ist (Kollmeier et al., 1985). Im Fall von Cadmium tritt eine inhalative Belastung hauptsächlich bei beruflicher Exposition, aber auch nicht unwesentlich durch Tabakrauch auf. Darüber hinaus soll die Frage beantwortet werden, ob die für wasserlösliche Nickel- und Cadmiumverbindungen beobachteten Effekte auch für weitgehend wasserunlösliche Metallverbindungen zutreffen. Grundlage für diese Fragestellung sind Befunde, nach denen sich unterschiedliche Verbindungen eines Metalls erheblich in der Kanzerogenität unterscheiden. So zählt beispielsweise  $\text{Ni}_3\text{S}_2$  zu den stärksten Kanzerogenen beim Menschen und im Tierversuch, wohingegen wasserlösliches Nickel(II) nur schwach wirksam ist. Als Ursache für diese Diskrepanz werden Unterschiede in der Bioverfügbarkeit vermutet. So wird wasserlösliches Nickelchlorid vergleichsweise langsam in Zellen aufgenommen und vorwiegend im Cytoplasma an Proteine gebunden. Demgegenüber werden Partikel des weitgehend wasserunlöslichen Nickelsubdisulfids phagozytiert und in Lysosomen in Kernnähe transportiert. Aufgrund des dort vorherrschenden sauren pH-Wertes lösen sie sich langsam auf und bewirken somit hohe Konzentrationen an Nickelionen im Zellkern (Costa et al., 1981; Fletcher et al., 1994). Da die meisten Metalle in der Umwelt in partikulärer Form vorkommen (z.B. als Oxide) ist die Abklärung dieser Fragen von zentraler Bedeutung für die Beurteilung von Umweltrisiken durch Metallverbindungen. Ausgehend von der Tatsache, daß Metallverbindungen sowohl in der allgemeinen Umwelt als auch am Arbeitsplatz nie allein auftreten, sondern praktisch immer zusammen mit anderen toxischen Substanzen wie beispielsweise polyaromatischen Kohlenwasserstoffen, liefern die geplanten Versuche zum Einfluß der Metallverbindungen auf DNA-Reparaturprozesse darüber hinaus eine wichtige Grundlage zur Abschätzung von Kombinationswirkungen mit anderen DNA-schädigenden Agentien.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Zellkultur

Die menschlichen Zelllinien HeLa und A549 wurden in MEM-Medium bzw. DMEM-Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100 % Luftfeuchtigkeit in Gewebekulturschalen kultiviert.

### 2.2 Chemikalien

#### *Benzo[a]pyren 7,8-diol 9,10-epoxid*

1 mg (±)- bzw. (+)-*anti*-BPDE wurden in 1 ml THF / 5% Triethylamin gelöst und die Stammlösung in 10 ml Aliquots in Glasschraubfläschchen bei -80 °C aufbewahrt. Alle weiteren BPDE-Lösungen wurden durch Verdünnen der Stammlösung mit THF / 1% Triethylamin hergestellt.

#### *Benzo[a]pyren*

B[a]P (HPLC-Grade, ca. 98 %) war ein Produkt der Firma Fluka. Die Inkubationslösungen wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn in DMSO angesetzt.

#### *Nickeloxid*

NiO (schwarz) wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. Adriana Oller, Fa. NIPERA (Nickel Producers Environmental Research Association), Durham, North Carolina, USA, zur Verfügung gestellt. Die Partikel sind gut bezüglich der Oberflächeneigenschaften charakterisiert; der Durchmesser beträgt  $3,8 \pm 1,0 \mu\text{M}$ . Direkt vor Versuchsbeginn wurden die Partikel im Trockenschrank 30 min bei 110°C sterilisiert und eine Stammsuspension (jeweils 2-3 mg/ml autoklaviertem, bidestilliertem Wasser) 20 min in einem Ultraschallbad behandelt.

### 2.3 Bestimmung der Koloniebildungsfähigkeit

Logarithmisch wachsende Zellen wurden entsprechend den jeweiligen Versuchsbedingungen inkubiert, abtrypsiniert und jeweils 300 Zellen wurden zur Koloniebildung ausgesät. Nach 7 Tagen wurde das Medium abgesaugt, mit PBS gewaschen, mit Ethanol fixiert, mit Giemsa-Farbstoff gefärbt und die Kolonien wurden ausgezählt.

### 2.4 Quantifizierung von DNA-Addukten des Benzo[a]pyrens in zellulärer DNA

#### *DNA-Isolierung*

Die Isolierung der DNA nach Abschluß der Inkubation mit B[a]P oder seinen Metaboliten basiert auf einer modifizierten Methode nach Sambrook et al.(1989). Die abtrypsinierten Zellen ( $3 - 6 \times 10^6$ ) wurden

in eiskalter TBS-Lösung (0,0027 M KCl, 0,137 M NaCl, 0,025 M Tris-Base, pH 7,4) aufgenommen, gezählt und 4 min bei 1300 rpm (4°C) zentrifugiert. Nach einem erneuten Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet vorsichtig in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8) aufgenommen und die Zellsuspension nach Zugabe von 900 µl Extraktionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 8, 0,1 M EDTA, 20 µg/ml RNase (DNase-frei), 0,5 % SDS) 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von Proteinase K (Endkonzentration 100 µg/ml) und 3 h Inkubation im Wasserbad bei 50°C wurde die Lösung zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Abtrennung der DNA von den Proteinen wurde die Lösung mit 1 Vol einer Mischung aus Tris-gepuffertem Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol (25:24:1) versetzt, geschüttelt und danach zur Phasentrennung mit 10000g bei RT 10 min zentrifugiert. Mit der oberen wäßrigen Phase wurde die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion ein- bis zweimal wiederholt, bis keine Interphase mehr beobachtet wurde. Zur vollständigen Entfernung des Phenols aus der wässrigen Phase schloß sich eine Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) analog der Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion an. Nachfolgend wurde die DNA durch Zugabe von 0,2 Vol 10 M Ammoniumacetatlösung zur wässrigen DNA-Lösung und 2 Vol Ethanol (absolut) ausgefällt und 12 h bei -18°C aufbewahrt. Nach 10 min Zentrifugation bei 10000g (4°C) wurde das DNA-Pellet vorsichtig in 70%igem Ethanol aufgenommen und anschließend erneut bei 6000g (4°C) 10 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde viermal wiederholt. Zuletzt wurde das gereinigte DNA-Pellet in einem definierten Volumen bidest. Wasser aufgenommen und die Konzentration wurde photometrisch anhand der Absorption bei 260 nm bestimmt. Der Quotient  $A_{260}/A_{280}$  gibt Aufschluß über die Reinheit der DNA.

#### *HPLC-Analyse*

Durch die saure Hydrolyse der isolierten DNA mit Salzsäure wird die Bindung zwischen dem C-10 des B[a]P-Metaboliten und der N<sup>2</sup>-Position des Guanins gespalten und es entstehen zwei isomere Tetrole, die sich lediglich in der Stellung der Hydroxygruppe am C-10 unterscheiden. Die mit Natronlauge rückneutralisierte Lösung der beiden Tetrole wird anschließend zur HPLC-Analyse eingesetzt. In Vorversuchen zeigte sich, daß durch die Rückneutralisation Tetrol I-2 nahezu vollständig in Tetrol I-1 übergeht, so daß im Folgenden nur die Quantifizierung von Tetrol I-1 vorgenommen wurde. Die Analyse von Standardlösungen und Inkubationslösungen mittels HPLC wurde an RP-18 Säulen isokratisch mit 55% Methanol in Wasser durchgeführt. Bei den Säulen handelt es sich um eine Vorsäule (Lichrosorb RP 18, 10 µM, 4,0 x 60 mm) und eine Trennsäule (Lichrosorb RP 18, 5 µM, 4,0 x 250 mm), die durch ein Motorsäulenschaltventil gesteuert werden. Dabei wurde nach 10-minütigem Konditionieren der Vorsäule mit Fließmittel A (Wasser), Injektion der Probe (1000 µl) mit dem Autosampler und anschließendem Waschen der Vorsäule mit Fließmittel B (20% Methanol in Wasser), das Motorsäulenschaltventil von der Ladestellung auf die Injektionsstellung umgeschaltet, wodurch das auf der Vorsäule aufkonzentrierte Material mit dem Fließmittel C (55% Methanol in Wasser) auf die Hauptsäule übertragen wird. Die

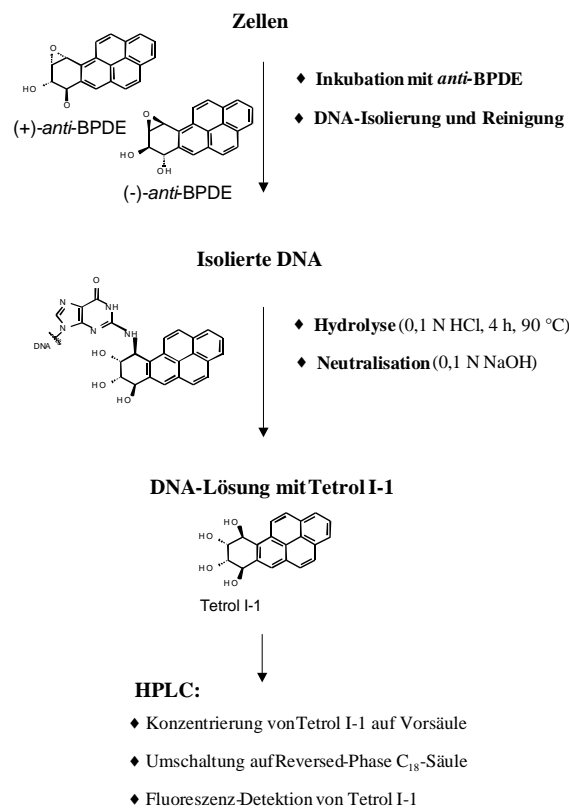
Quantifizierung erfolgte durch einen Fluoreszenzdetektor bei einer Anregungswellenlänge von 344 nm und einer Emissionswellenlänge von 398 nm.

### 3 Ergebnisse

In dieser ersten Projektphase wurde zunächst untersucht, ob die für NiCl<sub>2</sub> in Kombination mit UVC-Strahlung beobachteten Reparaturhemmungen auch für partikuläre Nickelverbindungen zutreffen. Als Nickelverbindung wurde dabei NiO eingesetzt, da dieses zum einen ein starkes Kanzerogen ist und zum anderen die verfügbaren, sehr gut charakterisierten Partikel zur Phagozytose geeignete Durchmesser und Oberflächencharakteristika aufwies (A. Oller, persönliche Mitteilungen). Als umweltrelevantes DNA-schädigendes Agens wurde B[a]P ausgewählt. Um das Testsystem methodisch zu etablieren und um Wechselwirkungen mit der Metabolisierung zu vermeiden, wurden zunächst die aktiven Metaboliten (±)- bzw. (+)-*anti*-BPDE eingesetzt, die zu langlebigen DNA-Addukten an der N<sup>2</sup>-Position von Guanin führen und aus heutiger Sicht maßgeblich zur kanzerogenen Wirkung von B[a]P beitragen.

#### 3.1 Quantifizierung von DNA-Addukten des Benzo[*a*]pyrens

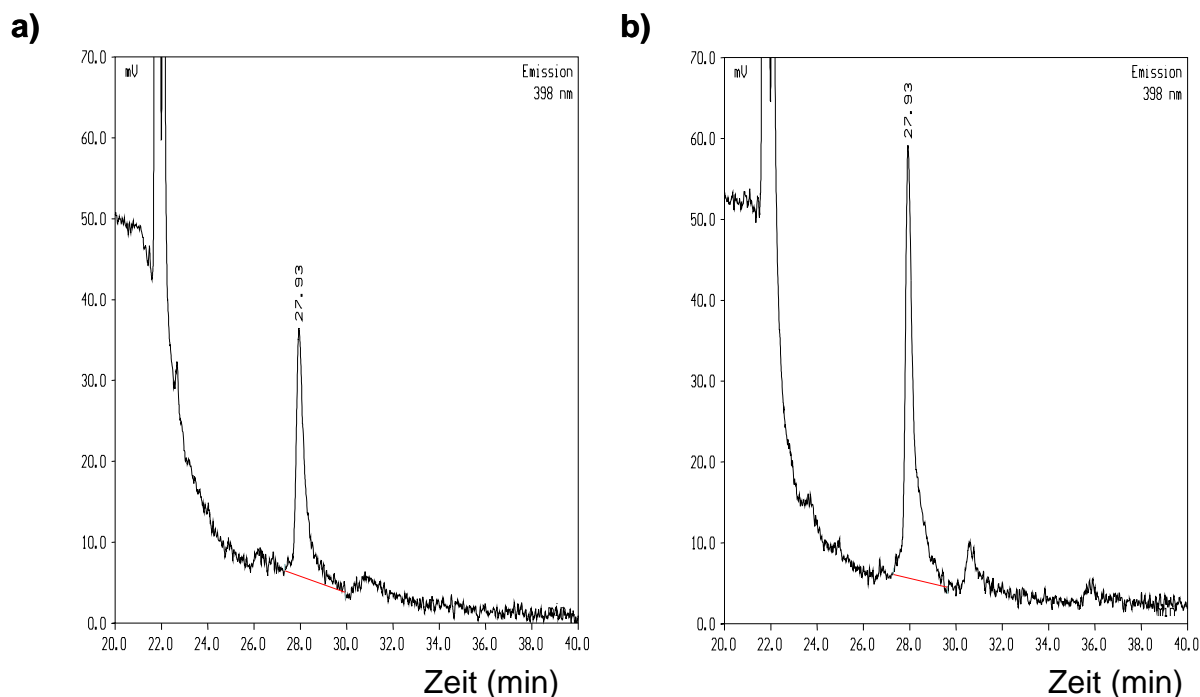
Zunächst wurde eine in der Literatur beschriebene Methode zum empfindlichen Nachweis von DNA-Addukten des B[a]P in unserem Labor etabliert und optimiert. Das Prinzip des Nachweises ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abbildung 1:** Prinzip des Nachweises von DNA-Addukten des BPDE

Es basiert auf der Inkubation von Kulturzellen mit B[a]P oder seinen genotoxischen Metaboliten ( $\pm$ )- bzw. (+)-*anti*-BPDE, der anschließenden Isolierung und Reinigung der DNA und einer nachfolgenden sauren Hydrolyse der DNA zur Abspaltung der entsprechenden Tetrole. Diese werden dann mit Hilfe der HPLC mit Fluoreszenzdetektion nachgewiesen und quantifiziert.

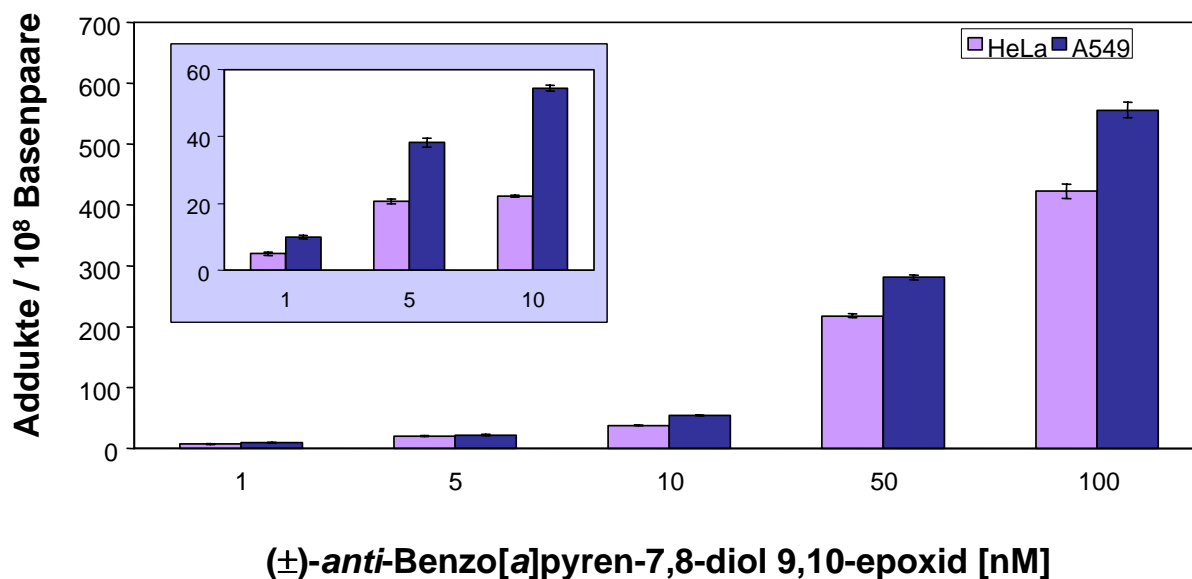
Die chromatographische Trennung ist in Abbildung 2 dargestellt. Das optimierte Testsystem hat eine Nachweisgrenze von 1 pg Tetrol I-1, was einem Addukt pro  $10^8$  Basenpaare entspricht. Je nach Adduktzahl werden 10 – 200  $\mu$ g DNA benötigt.



**Abbildung 2:** Chromatographischer Nachweis von DNA-Addukten des B[a]P durch HPLC mit Fluoreszenzdetektion. a: Nachweis von 30 pg/ml Tetrol I-1 in Kalbsthymus-DNA; b: Nachweis von BPDE-DNA-Addukten nach 2 h Inkubation von HeLa-Zellen mit 50 nM ( $\pm$ )-*anti*-BPDE; analysiert wurden 50  $\mu$ g DNA

### 3.2 DNA-Adduktbildung durch BPDE

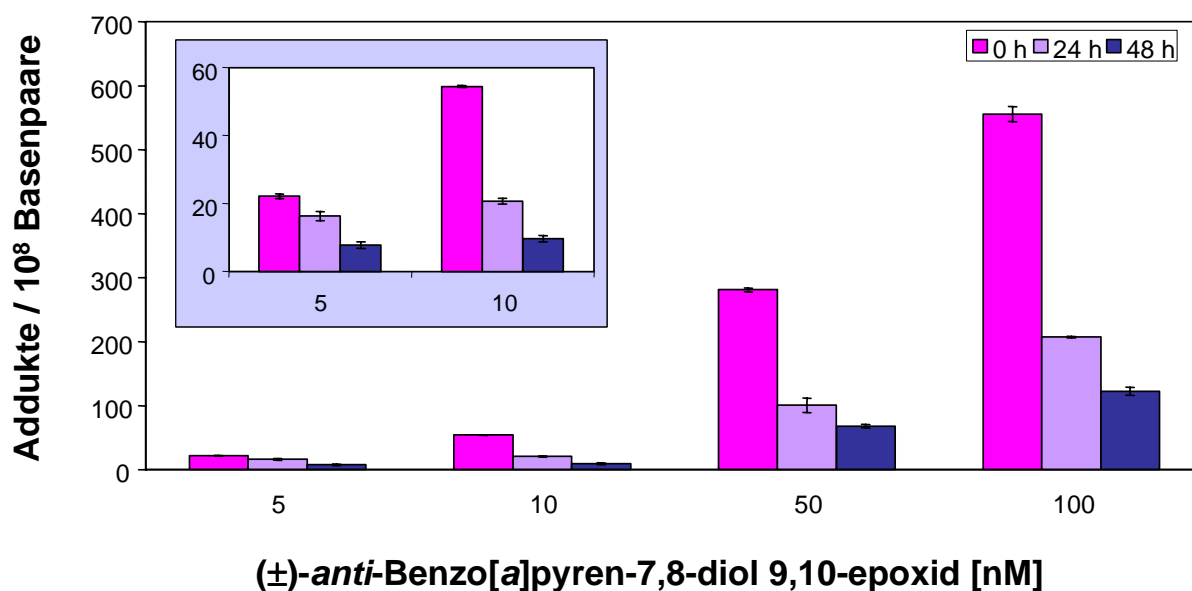
Vor der Durchführung von Kombinationsversuchen war es zunächst erforderlich, die Adduktbildung reproduzierbar zu quantifizieren. Hierfür wurden sowohl HeLa-Zellen als auch A549-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des aktiven Metabolitengemisches ( $\pm$ )-*anti*-BPDE 2 h inkubiert. Die in Abbildung 3 dargestellten Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige Induktion von DNA-Addukten, die durchgängig etwas höher in A549-Zellen im Vergleich zu HeLa-Zellen liegen. Es wird auch deutlich, daß die Empfindlichkeit der Methode ausreichend ist, um auch im nicht-cytotoxischen Konzentrationsbereich bis 50 nM (HeLa-Zellen) und 100 nM (A549-Zellen) die Addukte zu quantifizieren. Die sehr kleinen Fehlerbalken weisen darüber hinaus auf die sehr gute Reproduzierbarkeit der Versuche hin, insbesondere, da es sich um Mittelwerte unabhängiger Studien handelt.



**Abbildung 3:** Induktion BPDE-induzierter DNA-Addukte in HeLa- und A549-Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  SD.

### 3.3 Reparatur von DNA-Addukten des BPDE

Die Reparatur von DNA-Addukten des BPDE wurde nach 24 und 48 h bestimmt. Wie in Abbildung 4 dargestellt, findet eine effiziente Reparatur der DNA-Läsionen bereits nach 24 h statt. Allerdings läßt sich ein Teil der Addukte auch nach 48 h noch nachweisen, was auf eine unvollständige Reparatur hindeutet.



**Abbildung 4:** Reparatur von DNA-Addukten des BPDE. Logarithmisch wachsende A549-Zellen wurden 2 h mit BPDE behandelt und 24 h bzw. 48 h nachinkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  SD.



### 3.4 Cytotoxizität von NiCl<sub>2</sub> und NiO in A549-Zellen

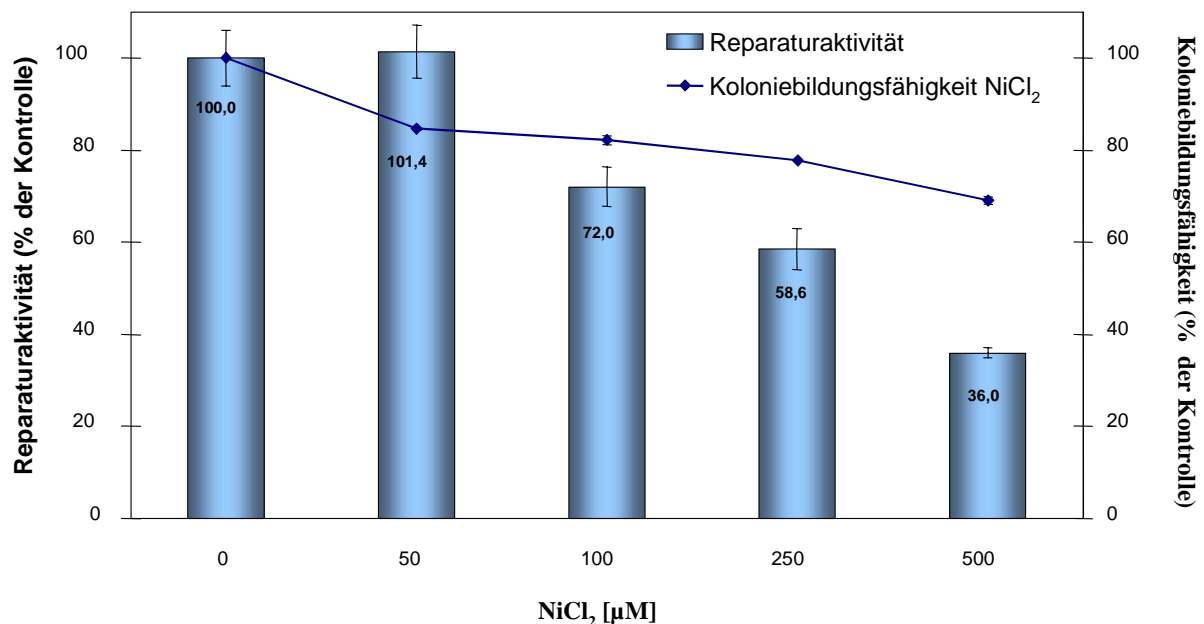
Konzentrationen bis zu 500  $\mu\text{M}$  NiCl<sub>2</sub> haben nach 24 h Inkubation nur einen geringfügigen Einfluß auf die Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen. NiO ist bis zu 1  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  nicht cytotoxisch; bei 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ist die Koloniebildungsfähigkeit auf ca. 50 % reduziert.

### 3.5 Einfluß von NiCl<sub>2</sub> und NiO auf die Adduktbildung durch BPDE

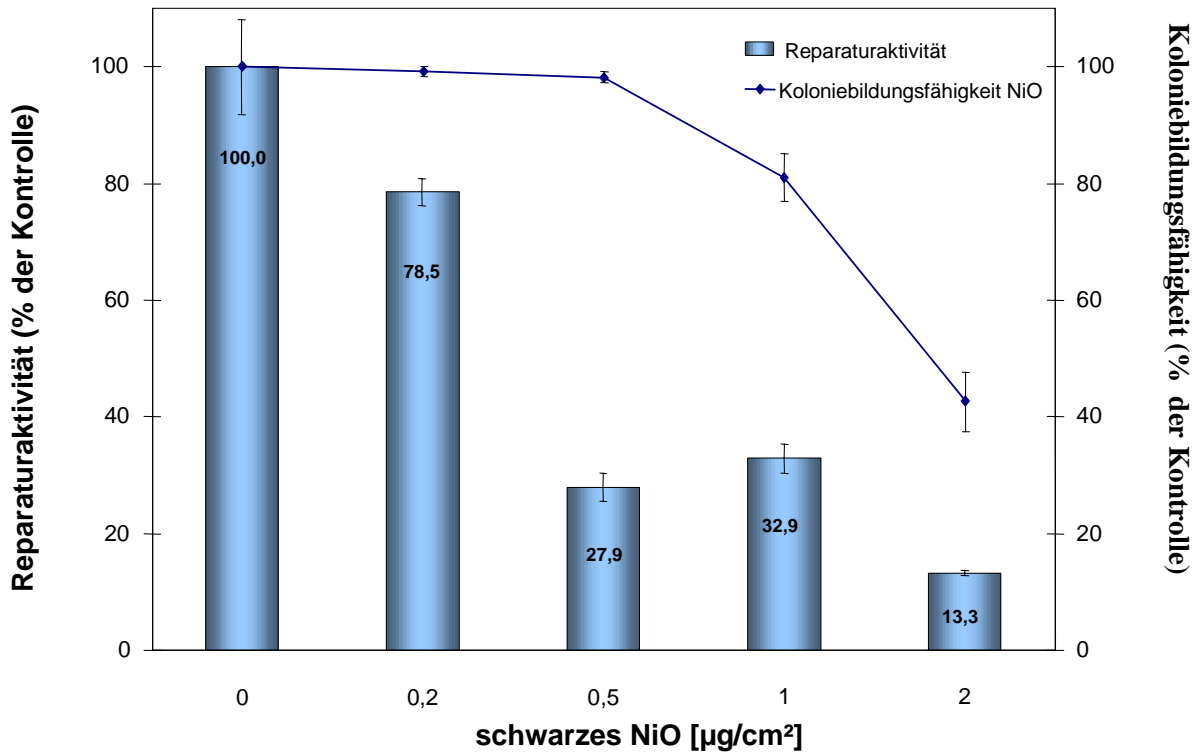
In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob lösliches und/oder partikuläres Nickel einen Einfluß auf die Anzahl der DNA-Addukte des BPDE hat. Während im Fall von NiCl<sub>2</sub> die Adduktbildung konstant blieb, wurde sie in Gegenwart von NiO dosisabhängig auf ca. 68 % der Kontrolle bei 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  NiO vermindert. Die Gründe hierfür sind noch unklar; denkbar wäre eine DNA-Bindung durch Ni<sup>2+</sup>-Ionen, die die Adduktbildung verhindert.

### 3.6 Einfluß von NiCl<sub>2</sub> und NiO auf die Reparatur von DNA-Addukten des BPDE

Ausgehend von früheren Befunden unserer Arbeitsgruppe, wonach NiCl<sub>2</sub> die Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden inhibiert, wurde untersucht, ob es ebenfalls die Entfernung von DNA-Addukten des BPDE beeinflusst. Das Ergebnis ist in Abbildung 5 dargestellt. Bereits eine Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  NiCl<sub>2</sub> führt zu einer deutlichen Reparatur-Inhibition; bei 500  $\mu\text{M}$  ist die Reparatur um ca. 65 % vermindert. Der Einfluß von NiO ist in Abbildung 6 dargestellt: auch hier findet eine dosisabhängige Reparaturinhibition statt; bei 2  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  ist die Reparaturaktivität um 87 % herabgesetzt.



**Abbildung 5:** Einfluß von NiCl<sub>2</sub> auf die Reparatur von DNA-Addukten des BPDE. Logarithmisch wachsende A549-Zellen wurden 18 h mit NiCl<sub>2</sub> vorinkubiert, 2 h in Gegenwart von NiCl<sub>2</sub> mit 50 nM (+)-anti-BPDE behandelt und 6 h in Gegenwart von NiCl<sub>2</sub> nachinkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Bestimmungen  $\pm$  SD.



**Abbildung 6:** Einfluß von NiO auf die Reparatur von DNA-Addukten des BPDE. Logarithmisch wachsende A549-Zellen wurden 22 h mit NiO vorinkubiert, 2 h in Gegenwart von NiO mit 50 nM (+)-*anti*-BPDE behandelt und 8 h in Gegenwart von NiO nachinkubiert. Gezeigt sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen mit den jeweiligen Einzelmessungen.

#### 4 Zusammenfassende Bewertung und Ausblick

Während der ersten Projektphase gelang zunächst die Etablierung eines empfindlichen Nachweises von DNA-Addukten des BPDE, mit dem sowohl die reproduzierbare Quantifizierung der Schadensinduktion als auch der Reparatur erfolgen konnte. Mit Hilfe dieser Methode wurde erstmals gezeigt, daß wasserlösliches  $\text{NiCl}_2$  die Entfernung von BPDE-DNA-Addukten in Lungenzellen inhibiert. Dies deutet darauf hin, daß die zuvor in unserer Arbeitsgruppe beobachtete Hemmung der Reparatur UV-induzierter DNA-Schäden sehr wahrscheinlich die Nucleotid-Exzisionsreparatur generell betrifft, so daß Wirkungsverstärkungen mit einer Reihe von Umweltmutagenen zu erwarten sind. Darüber hinaus wurde eine vergleichbare Reparaturinhibition auch für partikuläres NiO beobachtet; somit trifft die Reparaturhemmung auch für weitgehend wasserunlösliche, umweltrelevante Formen von Nickel zu. Ausgehend von diesen Ergebnissen sind jetzt weitergehende Untersuchungen u.a. zur Wechselwirkung mit DNA-Schäden des B[a]P, zur intrazellulären Verteilung der Nickelionen sowie zum Einfluß beider Nickelverbindungen auf die Induktion und Reparatur oxidativer DNA-Schäden geplant.

#### Danksagung

Unser besonderer Dank gilt Frau Dr. Adriana Oller, Fa. NIPERA, Durham, North Carolina, USA für die Überlassung des NiO.

## Referenzen

- Costa, M., J. Simmons-Hansen, C.W.M. Bedrossian, J. Bonura and R.M. Caprioli (1981) Phagocytosis, cellular distribution and carcinogenic activity of particulate nickel compounds in cell culture. *Cancer Res.*, 41, 2868 - 2876.
- Fletcher, G.G., F.E. Rosetto, J.D. Turnbull and E. Nieboer (1994) Toxicity, uptake, and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds. *Environ. Health Perspect.*, 102, Suppl. 3, 69 - 79.
- Hartwig, A. (2000) Recent advances in metal carcinogenicity. *Pure Appl. Chem.*, 72, 1007 – 1014.
- Kollmeier, H., J. Seemann, P. Wittig, C. Witting and G. Rothe (1985) Metallanreicherungen in Humangewebe. Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz.
- Sambrook, Fritsch, Maniatis (1989) *Molecular cloning*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press.