

Einfluss kanzerogener Metallverbindungen auf den Zellzyklus und seine Kontrolle

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
von der Fakultät für Chemie
der Universität Karlsruhe (TH)
angenommene

Dissertation

von
Diplom-Chemiker
Ingo Ehleben
aus Hamburg

Dekan: Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler

1. Gutachter: Prof. Dr. Andrea Hartwig

2. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Juli 2002

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Einleitung.....	3
2.1	Charakteristika der untersuchten Metalle.....	4
2.1.1	Kanzerogene und toxische Eigenschaften.....	5
2.1.2	Arsen.....	6
2.1.3	Cadmium.....	7
2.1.4	Cobalt.....	8
2.1.5	Nickel.....	9
2.2	UVC-Strahlung.....	11
2.3	Zellzyklus.....	12
2.3.1	Kontrolle des Zellzyklusses.....	13
2.3.2	G ₁ -Phasen-Kontrollpunkt (Restriktionspunkt).....	15
2.3.3	S-Phasen-Kontrollpunkt.....	17
2.3.4	G ₂ -Phasen-Kontrollpunkt.....	18
2.3.5	Spindel-Kontrollpunkt (M-Phasen-Kontrollpunkt).....	19
2.3.6	Das Zellzykluskontrollprotein GADD45.....	19
2.3.7	Das Zellzykluskontrollprotein p21.....	20
2.4	Durchflusszytometrie.....	21
2.5	mRNA-Polymerasekettenreaktion.....	23
3	Fragestellung.....	25
4	Ergebnisse und Diskussion.....	26
4.1	UVC-Bestrahlung.....	26
4.1.1	Koloniebildung.....	26
4.1.2	Zellzyklusphasenverteilung.....	27
4.1.3	mRNA-Gehalt von <i>p21</i> und <i>GADD45</i>	30
4.1.3.1	p21.....	30
4.1.3.2	GADD45.....	32
4.2	Natriumarsenit.....	34
4.2.1	Koloniebildung.....	34
4.2.2	Zellzyklusphasenverteilung.....	35

4.2.3	mRNA-Gehalt von <i>p21</i> und <i>GADD45</i>	38
4.2.3.1	p21	38
4.2.3.2	GADD45	40
4.3	Cadmiumchlorid	42
4.3.1	Koloniebildung	42
4.3.2	Zellzyklusphasenverteilung	43
4.3.3	mRNA-Gehalt von <i>p21</i> und <i>GADD45</i>	45
4.3.3.1	p21	45
4.3.3.2	GADD45	47
4.4	Cobaltchlorid	49
4.4.1	Koloniebildung	49
4.4.2	Zellzyklusphasenverteilung	50
4.4.3	mRNA-Gehalt von <i>p21</i> und <i>GADD45</i>	53
4.4.3.1	p21	53
4.4.3.2	GADD45	55
4.5	Nickelchlorid	57
4.5.1	Koloniebildung	57
4.5.2	Zellzyklusphasenverteilung	58
4.5.3	mRNA-Gehalt von <i>p21</i> und <i>GADD45</i>	61
4.5.3.1	p21	61
4.5.3.2	GADD45	63
5	Zusammenfassende Diskussion und Ausblick	65
6	Material und Methoden	68
6.1	Zellkultur	68
6.1.1	Zellen	68
6.1.2	Koloniebildungsfähigkeit	68
6.2	Inkubation	70
6.2.1	Fluoreszenzfärbung	71
6.2.2	UVC-Bestrahlung	72
6.3	mRNA-PCR	73
7	Literatur	77

8	Anhang	87
8.1	Abkürzungsverzeichnis	87
8.2	Liste der verwendeten Chemikalien	90
8.3	Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien	92
8.4	Verwendete Lösungen und Puffer	94
8.5	Histogramme	96

1 Zusammenfassung

Die Metalle Cadmium, Cobalt und Nickel sowie das Halbmetall Arsen sind toxisch und krebserregend, doch ihre Mutagenität ist nur schwach ausgeprägt. Viele ihrer Verbindungen verstärken die Genotoxizität und Zytotoxizität DNA-schädigender Agenzien und hemmen in nicht-zytotoxischen Konzentrationen DNA-Reparaturprozesse. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Metallverbindungen auch andere zelluläre Kontrollmechanismen stören. Der Einfluss auf die Zellzykluskontrolle wurde zunächst ermittelt, indem die Zellzyklusphasenverteilung von kultivierten Säugerzellen nach Inkubation mit verschiedenen nicht-zytotoxischen Konzentrationen der Metallverbindungen bestimmt wurde. Dabei löste As(III) einen G₂- und einen leichten G₁-Phasen-Arrest aus, während Cd(II), Co(II) und Ni(II) einen G₁-Phasen-Arrest induzierten.

Inwieweit die Metallverbindungen einen Einfluss auf einen vorhandenen Zellzyklusphasen-Arrest haben, wurde durch die zusätzliche Bestrahlung mit UVC untersucht, welche in A549-Zellen einen S-Phasen-Arrest auslöst. Nach gemeinsamer Behandlung mit den Metallionen und UVC konnten deutliche Unterschiede in den Effekten der einzelnen Metalle auf die Zellzyklusphasenverteilung beobachtet werden. Nach Inkubation mit 50 µM As(III) zeigten die Zellen die Verteilung der unbehandelten Kontrollen, weder der G₂-Phasen-Arrest durch As(III), noch der S-Phasen-Arrest durch UVC-Bestrahlung war nachzuweisen. Die Inkubation mit Cd(II) oder Ni(II) und die Bestrahlung mit UVC zeigten ein deutlich verzögertes Auftreten des S-Phasen-Arrestes. Während dieser in Folge der UVC-Bestrahlung acht bis zwölf Stunden nach Behandlung auftrat, verschob er sich nach Cd(II)-Inkubation auf zwölf bis siebzehn Stunden und nach Ni(II)-Inkubation auf sechzehn bis zwanzig Stunden nach erfolgter UVC-Bestrahlung. Demgegenüber befanden sich die Zellen nach Co(II)-Inkubation und UVC-Bestrahlung weiterhin in einem G₁-Phasen-Arrest, ein S-Phasen-Arrest war nicht zu beobachten.

Der zweite Teil dieser Arbeit sollte Erklärungen dafür liefern, welche Faktoren dafür verantwortlich sind, dass der entstehende S-Phasen-Arrest nach gemeinsamer Behandlung mit Metallionen und UVC-Bestrahlung nicht mehr in gleicher Weise auftritt. Hierzu wurden zwei Gene, die in der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, *p21* und *GADD45*, mittels mRNA-PCR auf ihre Expression nach Behandlung mit UVC allein oder gemeinsam mit den Metallionen untersucht. Während As(III) allein eine deutliche Induktion von *p21* hervorrief, kam es nach

gemeinsamer Behandlung mit UVC-Bestrahlung nur zu einer leichten *p21*-Induktion im Vergleich zur As(III)-Inkubation allein. Für *GADD45* zeigte sich eine etwas stärkere Expression nach As(III)-Inkubation. Demgegenüber inhibierte As(III) nach kombinierter Gabe die *GADD45*-Induktion durch UVC.

Die Expression von *p21* wurde durch Cd(II) allein nicht induziert, während sich bei gleichzeitiger Behandlung mit UVC ein deutlicher induktiver Effekt auf die *p21*-Expression nachweisen ließ, das *GADD45*-Signal verdoppelte sich. Eine deutliche Induktion war auch für *GADD45* nach UVC-Bestrahlung und gleichzeitiger Cd(II)-Inkubation zu beobachten.

Während Co(II) keine Induktion bei *p21* hervorrief, zeigten Konzentrationen ab 100 µM Co(II) nach gleichzeitiger UVC-Bestrahlung einen deutlichen Anstieg des *GADD45*-Gehaltes. Bei Ni(II) war für die Induktion von *p21* ein ähnlicher konzentrationsabhängiger Verlauf wie für *GADD45* zu beobachten. Die höheren Ni(II)-Konzentrationen von 375 und 500 µM zeigten bei beiden Genen eine deutliche Verstärkung der Induktion im Vergleich zur Kontrolle.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass der beobachtete Einfluss der toxischen Schwermetalle auf die Zellzyklusphasenverteilung mit einer veränderten Genexpression von *p21* und *GADD45* einher geht.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit ein Effekt einiger toxischer und kanzerogener Schwermetalle auf die Zellzykluskontrolle gezeigt werden, dieser variierte allerdings von Metall zu Metall in seiner Stärke und Art. Darüberhinaus kam es nach einer Inkubation mit Metallionen und UVC-Bestrahlung zu einer veränderten Induktion der Zellzykluskontrollgene *p21* und *GADD45*.

2 Einleitung

DNA-Reparaturprozesse sind seit vielen Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Die angemessene Reaktion der Zelle auf DNA-Schäden ist wichtig, da die auftretenden Fehler zu unkorrekter Replikation und als Folge davon zur Manifestation von Mutationen führen können.

Die Zelle hat verschiedene Mechanismen entwickelt, um auftretende Fehler zunächst zu erkennen und anschließend für deren Beseitigung zu sorgen. Die wichtigsten Reparaturprozesse, die diese Fehlerbereinigung durchführen sind die Nukleotid-exzisionsreparatur (NER), die Basenexzisionsreparatur (BER) und die Mismatchreparatur (MMR). Die NER beseitigt z.B. durch UV-Strahlung oder polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe entstehende sperrige DNA-Addukte (Batty und Wood, 2000), während die BER den großen Bereich der Basenmodifikationen und DNA-Strangbrüche durch ionisierende Strahlung, alkylierende Agenzien oder reaktive Sauerstoffspezies (ROS) repariert (Norbury und Hickson, 2001). Die Mismatchreparatur schließlich beseitigt durch Replikationsfehler verursachte Basenfehlpaarungen (Buermeyer et al., 1999). Die Reparatur der DNA-Schäden ist häufig mit einer Arretierung des Zellzyklusses verbunden, um die notwendige Zeit zur Wiederherstellung des ursprünglichen Zustandes zu gewährleisten. Ist eine Reparatur nicht mehr möglich, wird ein weiterer kontrollierter Mechanismus, der programmierte Zelltod (Apoptose), eingeleitet.

Für die hier untersuchten toxischen Verbindungen von Arsen, Cadmium, Cobalt und Nickel konnte in früheren Studien bereits gezeigt werden, dass sie neben direkten DNA-Schäden auch indirekt genotoxisch wirken, indem sie DNA-Reparaturmechanismen hemmen (Hartwig und Schwerdtle, 2002). Ob diese toxischen Metallverbindungen darüber hinaus auch die Zellzykluskontrolle beeinflussen, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

2.1 Charakteristika der untersuchten Metalle

In der vorliegenden Studie wurden lösliche Verbindungen der Metalle Cadmium, Cobalt und Nickel sowie des Halbmetalls Arsen untersucht. Zur Übersicht sind in Tabelle 1 einige physikalisch-chemische Eigenschaften und Beispiele für ihre Verwendung dargestellt.

Tabelle 1: Physikalisch-chemische Eigenschaften und Verwendung der untersuchten Metalle.
(zusammengestellt aus Riedel, 1999)

Metall	Ordnungs- zahl	Atom- gewicht	Beschreibung	Verwendung
As	33	74,92	Halbmetall, verschiedene Modifikationen; stabilste Form: grau, metallisch glänzend, spröde	Halbleiter, (außerhalb Deutschlands: Pestizide, Holzschutzmittel)
Cd	48	112,41	Silberweiß, glänzend, weich	Akkumulatoren, Batterien, Bildröhren, Galvanik, Legierungen, Stabilisator für Kunststoffe
Co	27	58,93	Silberblau, glänzend, ferromagnetisch	Magnetische Legierungen, Keramiken, Farben, Katalysatoren
Ni	28	58,69	Silberweiß, glänzend, verformbar	Legierungen, Münzen, Katalysatoren, Elektroplattierungen von Metallen, Batterien

2.1.1 Kanzerogene und toxische Eigenschaften

Alle vier untersuchten Metalle haben sich als kanzerogen für Menschen und/oder Versuchstiere erwiesen (Tabelle 2). Ihr Gefährdungspotenzial ist dabei stark von der Bioverfügbarkeit abhängig. So können bei einem Metall die toxischen und kanzerogenen Eigenschaften der einzelnen Verbindungen je nach Löslichkeit und Oxidationsstufe variieren.

Tabelle 2: Klassifizierung der untersuchten Metalle hinsichtlich ihrer krebserzeugenden Wirkung.
(modifiziert nach Beyersmann und Hartwig, 1999)

Metalle oder Metallverbindungen	Bewertung durch IARC			DFG-Klassifikation	EU-Klassifikation
	Epidemiologie	Tierversuche	Gesamtbewertung		
Arsen und seine Verbindungen	+	(+)	1	1	C1
Cadmium und seine Verbindungen	+	+	1	2	C2
Cobaltchlorid, Cobaltsulfat	-	+	2B	2	C2
Cobalt und seine Verbindungen	-	2A	2B	2	C3
Nickel-Metall	-	+	2B	1	C3
Nickeloxide, Nickelsulfide	+	+	1	1	C2
Andere Nickelverbindungen	+	+	1	1	C3

Alle Einstufungen beziehen sich auf atembare Stäube oder Aerosole.

(DFG, 1998; DFG, 2001; IARC, 1980; IARC, 1990; IARC, 1991; IARC, 1993; IARC, 1997a; IARC, 1997b; IARC, 1997c; IARC, 1998)

IARC-Bewertung: +: ausreichende Evidenz; (+): begrenzte Evidenz; -: unzureichende Evidenz;
1: krebserzeugend; 2A: wahrscheinlich krebserzeugend; 2B: möglicherweise krebserzeugend

DFG-Kategorien: 1: krebserzeugend beim Menschen; 2: krebserzeugend im Tierversuch

EU-Kategorien: C1: bekanntermaßen krebserzeugend beim Menschen; C2: als krebserzeugend für den Menschen anzusehen; C3: mögliche krebserzeugende Wirkung.

2.1.2 Arsen

Arsen ist ein toxisches Halbmetall, dessen Essenzialität für den Menschen nicht nachgewiesen ist. Es ist ubiquitär verbreitet, wobei oftmals das Trinkwasser eine wesentliche Kontaminationsquelle darstellt. Die akuten Folgen einer Arsenvergiftung sind Parästhesien an den Extremitäten, Magenschmerzen, Übelkeit und ausgeprägte Hämolyse (Savory und Wills, 1984), bis hin zum Tod. In einigen Ländern wie Taiwan oder Chile sind die Arsenkonzentrationen im Trinkwasser so hoch, dass ein direkter Zusammenhang mit Blasen-, Haut-, Nieren- und Lungenkrebs epidemiologisch nachweisbar ist (NRC, 2001). Arsen akkumuliert in den Nägeln, Haaren und dem Skelett sowie in den Nebenhoden und der Schilddrüse (Hanusch et al., 1988).

Obwohl die krebserzeugende Wirkung gut dokumentiert ist, sind die zugrundeliegenden Mechanismen noch unklar, da die Arsenverbindungen selbst nur schwach mutagen sind. Allerdings zeigen die Forschungen der letzten Jahre, dass Arsenverbindungen die Zytotoxizität, Mutagenität und Klastogenität verschiedener anderer Agenzien additiv oder synergetisch verstärken. So wurde in V79- und CHO-Zellen nach Behandlung mit UVC-Strahlen und dreiwertigem anorganischem Arsen (As(III)) eine Zunahme an Mutationen und Chromosomenaberrationen gefunden (Lee et al., 1985; Okui und Fujiwara, 1986; Huang et al., 1992; Yang et al., 1992). Für die Kombination aus cis-Platin und As(III) beobachteten Lee et al. (1986) in Humanfibroblasten ebenfalls eine erhöhte Zahl an Chromosomenaberrationen sowie eine Steigerung der Zytotoxizität. Ionisierende Strahlung in Kombination mit As(III) führte zu einer Erhöhung der Zahl an Chromosomenaberrationen und Schwester-Chromatidaustauschen (Jha et al., 1992).

Eine mögliche Erklärung für die verstärkenden Effekte besteht in der Hemmung von DNA-Reparaturprozessen. So zeigten Snyder et al. (1989), dass As(III) die Reparatur von Strangbrüchen nach ionisierender Strahlung in HeLa-Zellen deutlich stört. Ähnliches wurde auch für die Reparatur nach UVC-Bestrahlung beobachtet; betroffen waren der Schadenserkennungsschritt und der Ligationsschritt bei der NER und BER in verschiedenen Zelllinien (Li und Rossman, 1989; Hartwig et al., 1997). Während die meisten isolierten DNA-Reparaturenzyme sich als unempfindlich gegenüber Arsenverbindungen erwiesen haben, konnte kürzlich gezeigt werden, dass die poly(ADP-Ribosyl)ierung, eine wichtige Reaktion bei der BER, bereits bei nanomolaren Konzentrationen gehemmt wird (Hartwig et al., eingereicht).

Auch Untersuchungen zum Einfluss von As(III) auf den Zellzyklus, wurden in den letzten Jahren durchgeführt. In HFW-Zellen beobachteten Yih und Lee (2000) einen Arrest in der G₂- (G = engl.: gap, Lücke, siehe auch 2.3) oder Mitose-Phase (M-Phase) des Zellzyklusses nach 24-stündiger Inkubation. Dabei zeigten sie außerdem, dass die Induktion des Tumorsuppressorgens *p53* durch As(III) mechanistisch anders zu verlaufen scheint als durch UVC-Strahlung. Der beobachtete G₂- oder Mitose-Phasen-Arrest könnte sehr wohl auf die nachgewiesene gestörte Spindelbildung während der Mitose zurückzuführen sein (Huang und Lee, 1998).

2.1.3 Cadmium

Die Toxizität von Cadmiumverbindungen sowie deren krebserzeugende Wirkungen, besonders in Lunge und Prostata, sind seit langem bekannt und nachgewiesen (IARC, 1993). Trotzdem sind die mutagenen Eigenschaften nur schwach ausgeprägt. Cadmium akkumuliert in Fischen und Wildtieren, so dass unsere Nahrung neben Müllverbrennungsanlagen und dem Arbeitsplatz eine Hauptquelle der Exposition darstellt.

Durch die ähnlichen chemischen Eigenschaften von Cadmium und Zink, einem essenziellen Spurenelement, können Cadmium und seine Verbindungen verschiedene zinkhaltige Proteine im menschlichen Körper beeinflussen. Darüberhinaus interferieren Cadmium-Ionen mit dem Calcium- und Zinkmetabolismus beim Menschen (Kaim und Schwederski, 1991). Cadmium aktiviert die Metallothionein-Synthese im Körper und bindet an Metallothionein während es sich in der Leber befindet. Nach dem Transport in die Nieren wird es zunächst kurzfristig freigesetzt und akkumuliert anschließend wiederum an Metallothionein gebunden, in den Nierentubuli. So verbleibt es für Jahre in den Nieren und zeigt Halbwertszeiten von bis zu 30 Jahren.

Als direkte DNA-Schädigung ist bekannt, dass Cadmium (Cd(II)) in der Lage ist, Strangbrüche zu induzieren (Tsuzuki et al., 1994; Dally und Hartwig, 1997). Neben diesen direkten Effekten verstärkt Cd(II) in geringen Konzentrationen Zytotoxizität und Genotoxizität verschiedener Agenzien. Untersuchungen über das synergetische Potenzial ergaben, dass die Anzahl der Mutationen nach UVC-Bestrahlung in V79-Zellen (Hartwig und Beyersmann, 1989b) oder auch die Zelltransformationsrate in Kombination mit Benzo[*a*]pyren in SHE-Zellen (Rivedal und Sanner, 1981) erhöht waren.

Ein wahrscheinlicher Mechanismus ist die Hemmung wichtiger Reparaturproteine. Befunde auf molekularer Ebene zeigen, dass sowohl die Schadenserkenkung (Hartmann und Hartwig, 1998) als auch die Ligation (Nocentini, 1987) der NER, aber auch die BER (Dally und Hartwig, 1997) durch Cadmium-Ionen in nicht zytotoxischen Konzentrationsbereichen gestört werden. An isolierten Systemen zeigten Asmuss et al. (2000), dass das Schadenserkenkungprotein XPA (Xeroderma Pigmentosum, Gruppe A) sowie die Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg-Protein) gehemmt werden. Außerdem wird in Zellen die Funktion der Poly(ADP-Ribose)Polymerase (PARP) beeinträchtigt (Asmuss, 2000; Asmuss et al., 2000). Darüberhinaus haben Porter et al. (1997) beobachtet, dass die enzymatische Aktivität des menschlichen MTH1-Proteins sowie des bakteriellen Homologen Mut T, die für die Eliminierung von 8-oxo-Guanin aus dem Nukleotidpool zuständig sind, gehemmt werden.

Aussagen über die Wirkung auf die Zellzykluskontrolle durch Cadmiumverbindungen sind in der Literatur wenig zu finden. In einer Studie wurde nach 72 Stunden Cd(II)-Inkubation ein S-Phasen-Arrest beschrieben (Costa et al., 1982). Eine weitere Studie zeigte, dass Cd(II) in MCF7-Zellen keinen Effekt auf die Zellzyklusphasenverteilung hat, aber in Kombination mit ionisierender Strahlung den durch diese ausgelösten Zellzyklusarrest in der G₁-Phase verhindert (Meplan et al., 1999). Außerdem zeigt Cd(II) durch seine gute Bindungsaffinität zu Thiolgruppen einen Effekt auf die Genregulation diverser Gene in den unterschiedlichsten menschlichen und tierischen Zelllinien (zusammengefasst in Beyersmann und Hechtenberg, 1997). Für p53 konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender Cd(II)-Konzentration die DNA-Bindungsaktivität sinkt (Meplan et al., 1999). Besonders für p53 gibt es eine Reihe von Untersuchungen, die sich mit der Stressinduktion und Funktionsstörungen beschäftigen (zusammengefasst in Hainaut und Mann, 2001).

2.1.4 Cobalt

Cobalt ist ein essenzielles Spurenelement für den Menschen. Es ist Bestandteil von Vitamin B12 und wichtig für die Pyrimidinbiosynthese. Trotzdem erzeugt es in Tierversuchen Tumore (zusammengefasst in IARC, 1991; IARC, 1997b). Darüber hinaus gelten Cobalt und seine Verbindungen nach der neuesten Einstufung durch die DFG als Keimzellenmutagene (DFG, 2001). Besonders kritisch für eine Exposition der Umwelt sind die entstehenden Stäube bei der Hartmetallverarbeitung.

Für Cobaltverbindungen sind DNA-Schädigungen wie DNA-Strangbrüche, DNA-Protein-Vernetzungen und verschiedene klastogene Effekte nachgewiesen (zusammengefasst in Hartwig, 1995). Als zugrundeliegender Mechanismus wird dabei von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies ausgegangen (Lison et al., 1995).

Wie bereits für Arsen und Cadmium beschrieben, können Cobaltverbindungen auch als Ko-Mutagene wirken. Sie erhöhen z.B. die durch UVC-Strahlung verursachte Mutationsrate und Zytotoxizität in V79-Zellen (Hartwig und Beyersmann, 1989a). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die NER inhibiert wird. Der Schadenserkenungs-/Inzisionsschritt wird dabei wohl durch die Hemmung des XPA-Proteins beeinträchtigt (Asmuss et al., 2000), während für die Hemmung des Polymerisationsschrittes die Konkurrenz mit Magnesium verantwortlich ist (Kasten et al., 1997).

Über die Effekte, die Cobaltverbindungen auf den Zellzyklus haben, sind wenige Ergebnisse bekannt. In einer Arbeit von 1982 zeigten Costa et al., dass toxische Metalle, unter anderem auch Cobalt, nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden in CHO-Zellen einen Arrest in der Synthesephase (S-Phase) auslösen.

2.1.5 Nickel

Im Gegensatz zum Menschen konnte die Essenzialität von Nickel für Tiere nachgewiesen werden. Obwohl die Mutagenität nur schwach ausgeprägt ist, haben sich Nickel und seine Verbindungen als kanzerogen beim Menschen und im Tierversuch erwiesen. Dabei haben Partikel mit mittlerer Löslichkeit, wie Nickelsubdisulfid, das höchste krebserzeugende Potenzial (zusammengefasst in Oller et al., 1997). Ein Grund hierfür könnte sein, dass sich die Aufnahmewege in die Zellen des menschlichen Körpers zwischen Partikeln und löslichen Nickelverbindungen unterscheiden und die Partikel dabei besser zum Zellkern vordringen können (u.a. Costa, 1991; Fletcher et al., 1994; Tallkvist and Tjalve, 1998). Möglicherweise spielen aber auch die Retentionszeiten der verschiedenen Verbindungen, insbesondere in der Lunge, eine entscheidende Rolle (zusammengefasst in Hartwig und Schwerdtle, 2002). Die Expositionsquelle des Nickels ist neben dem Arbeitsplatz hauptsächlich die Nahrung, in die es durch Bodeneintrag, aber auch durch die Nahrungszubereitung selbst, gelangt.

Nickelverbindungen haben einen verstärkenden Effekt auf DNA-Schädigungen, die durch verschiedene andere DNA-schädigende Agenzien ausgelöst wurden. So wurde nach

Kombination mit UVC-Bestrahlung in V79-Zellen sowohl eine Erhöhung der Mutationsrate als auch der Zytotoxizität und der Schwester-Chromatidaustausche gefunden (Christie und Tummolo, 1989; Hartwig, 1998). Ebenfalls in V79-Zellen konnte gezeigt werden, dass die von cis-Platin, trans-Platin und Mitomycin-C hervorgerufene Zytotoxizität durch Nickel-Ionen (Ni(II)) verstärkt wird (Krueger et al., 1999). Die Erhöhung der Mutationsraten und Zelltransformationen in Kombination mit Benzo[*a*]pyren konnte in SHE-Zellen beobachtet werden (Rivedal und Sanner, 1980).

Schon in geringen Konzentrationen übt Ni(II) einen inhibierenden Effekt auf die verschiedenen Reparaturmechanismen der Zelle aus. Bei der NER wurden in verschiedenen Zelllinien (CHO, HeLa) die Störung des Inzisions-/Schadenerkennungsschrittes beobachtet (Lee-Chen et al., 1993; Hartwig et al., 1994; Hartmann und Hartwig, 1998; Krueger et al., 1999). Dabei konnte an isolierten Systemen festgestellt werden, dass dies wahrscheinlich durch die Hemmung des Reparaturproteins XPA verursacht wird (Asmuss et al., 2000). In HeLa-Zellen wurde zudem eine Hemmung der Ligation gezeigt (Snyder et al., 1989; Hartwig et al., 1994). Die BER wird ebenfalls in HeLa-Zellen bei nicht zytotoxischen Konzentrationen gestört (Dally und Hartwig, 1997). Dies lässt sich möglicherweise durch die Hemmung der poly(ADP-Ribosyl)ierung, wie sie von Hartwig et al. (eingereicht) beschrieben wurde, erklären. Außerdem wurde eine Inhibierung der O⁶-Methylguanin-Methyltransferase (MGMT), ein an der Reparatur von Alkylierungsschäden beteiligtes Enzym, beobachtet (Iwitzki et al., 1998).

Die Wirkung von Nickelverbindungen auf den Zellzyklus und die Zellzyklusproteine ist kaum untersucht. In einer frühen Studie konnte nach 72 Stunden Ni(II)-Inkubation ein S-Phasen-Arrest beobachtet werden (Costa et al., 1982), während Arbeiten aus dem Jahr 1998 nach langer Inkubationszeit (72 h) einen Arrest in der G₂- oder M-Phase des Zyklusses in CHO-Zellen beschreiben (Lee et al., 1998; Shiao et al., 1998).

2.2 UVC-Strahlung

Als DNA-schädigendes Agens für die Untersuchungen des Einflusses der Metallverbindungen auf die Zellzykluskontrolle wurde UVC-Strahlung eingesetzt. Der Vorteil liegt dabei in der einfachen Handhabung und dem gut definierten Schadensspektrum. Das UV-Licht-Spektrum wird in drei Bereiche unterteilt. UVA umfasst die Wellenlängen von 400 - 320 nm, UVB die von 320 - 290 nm und schließlich UVC die von 290 - 100 nm. Dank der Erdatmosphäre und ihrer Ozonschicht spielen als umweltrelevante, DNA-schädigende Agenzien nur UVA und UVB eine wichtige Rolle. Dabei handelt es sich bei dem durch UVA-Strahlung induzierten Schadensspektrum hauptsächlich um oxidative Basenschäden, während UVB-Strahlung, ähnlich wie UVC-Strahlung, DNA-Photoprodukte induziert (Ravanat et al., 2001). Im Labor wird zumeist UVC-Strahlung eingesetzt, weil damit gut untersuchte und bezüglich ihrer Reparatur charakterisierte Läsionen zu induzieren sind (Friedberg und Walker, 1995), und das mit wesentlich geringeren Bestrahlungsdosen im Vergleich zu UVA oder UVB. Das Absorptionsmaximum der DNA liegt bei ungefähr 260 nm. Wird die DNA mit dieser Wellenlänge bestrahlt, entstehen hauptsächlich zwei Produkte, zum einen Cyclobutyl-Thymin-Dimere und zum anderen die sogenannten (6-4)-Photoprodukte (Abbildung 1) (Balajee et al., 1999). Andere Basenmodifikationen wurden ebenfalls nachgewiesen, spielen aber eine untergeordnete Rolle.

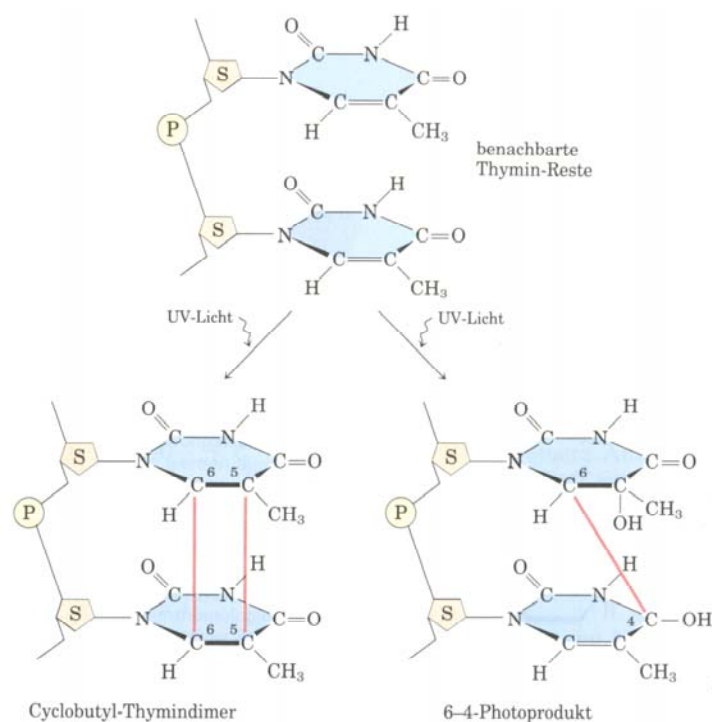


Abbildung 1: Reaktionsschema nach der Bestrahlung der DNA mit UVC.
(aus: Lehninger et al., 1998)

Aufgrund der mit UVC-Strahlung induzierten DNA-Schäden ergibt sich ein weit gefächertes Spektrum an Folgeschäden. In verschiedenen Zelllinien wurden Mutationen, Chromosomenaberrationen und Schwester-Chromatidaustausche beobachtet (zusammengefasst in de Gruijl et al., 2001; Ravanat et al., 2001). Darüber hinaus konnte auch eine Schädigung der Zellmembran nachgewiesen werden (Nishigaki et al., 1998). Die Reparatur dieser UVC-induzierten DNA-Schäden findet hauptsächlich durch die NER statt, die in der Lage ist, ein weites Spektrum an DNA-Läsionen zu reparieren (Friedberg und Walker, 1995). Sind die Schädigungen zu gravierend und nicht reparabel, leiten die Zellen Apoptose ein (Nishigaki et al., 1998; Shaulian et al., 2000; Zeng et al., 2000).

Der Einfluss von UVC-Strahlung auf die Zellzyklusphasenverteilung wurde bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht. Dabei wurden unterschiedliche Effekte beobachtet, die zum Teil auf unterschiedliche Behandlungsmethoden zurückzuführen sind. Am häufigsten wird ein S-Phasen-Arrest beschrieben (Tabelle 3, Seite 15). Dabei spielt neben dem Zelltyp der Synchronisationszustand der Zellen eine wesentliche Rolle. Nicht-synchronisierte Zellen und eine Synchronisation der Zellen in der S-Phase führen zu einem S-Phasen-Arrest während nach einer Synchronisation in der G₂-Phase des Zellzyklusses kein Arrest zu beobachten ist (Nishigaki et al., 1998). UVC-Bestrahlung von konfluenten Zellen dagegen führt zu einem G₁-Phasen-Arrest (Geyer et al., 2000). Weiterhin interessant ist die Tatsache, dass die Mechanismen, welche zur Induktion von Zellzykluskontrollgenen führen, sich zwischen ionisierender Strahlung und UVC-Bestrahlung unterscheiden. Dabei löst UVC-Strahlung, im Gegensatz zu ionisierender Strahlung, einen Arrest des Zellzyklusses aus, ohne p53 zu stabilisieren (Loignon et al., 1997; Geyer et al., 2000; Yih und Lee, 2000).

2.3 Zellzyklus

Der Zellzyklus, der den Verlauf von einer erfolgreichen Zellteilung bis zur nächsten umfasst, wird in vier Phasen unterteilt (Abbildung 2). Er beginnt nach der Mitose mit der sogenannten G₁-Phase (g = engl.: gap, Lücke). In dieser Phase hat die Zelle Zeit, benötigte Nukleotide und Proteine zu synthetisieren und ihr Volumen zu vergrößern. Die Dauer der G₁-Phase unterscheidet sich in verschiedenen Zelltypen deutlich. Dies ist vom Gewebe und den damit verbundenen Aufgaben der Zellen abhängig; embryonale Zellen teilen sich sehr schnell, andere Zellen in Abständen von Tagen oder Wochen (Pagano, 1998). Innerhalb der G₁-Phase gibt es für die Zellen die Möglichkeit in eine Ruhephase (G₀-Phase) überzugehen. In dieser

Phase verharren die Zellen bis sie das Signal zur Weiterführung des Zellzyklusses erhalten. In der Synthesephase wird die DNA im Zellkern repliziert und eine komplette Kopie der DNA erstellt. Die Replikation findet praktisch nur in dieser Phase statt und ist - ebenso wie alle anderen Phasen - ständigen Kontrollen unterworfen.

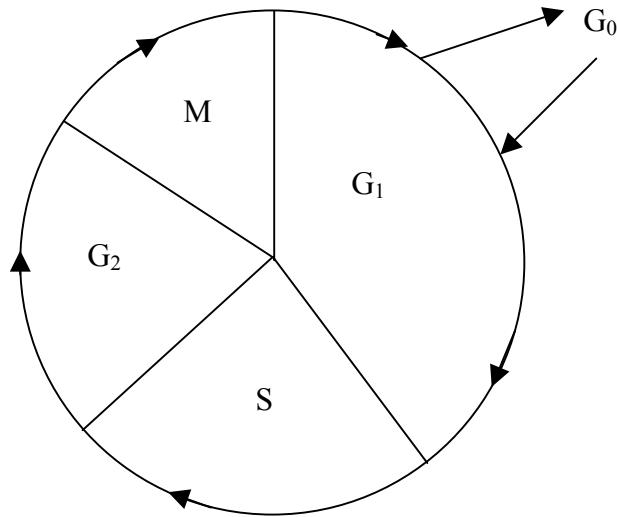


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zellzyklusses.

An die S-Phase schließt sich die zweite Ruhephase, die G₂-Phase, an. Bei der G₂-Phase handelt es sich um eine Sicherheitspause, in der die Vollständigkeit der Replikation überprüft wird. Abschließend findet in der Mitosephase die Zellteilung statt, an deren Ende zwei identische Zellen vorliegen. Die M-Phase unterteilt man üblicherweise in sechs Stadien: Die Prophase, die Prometaphase, die Metaphase, die Anaphase, die Telophase und die Zytokinese. Die Zytokinese ist ein Prozess, der über die ganze M-Phase hinweg stattfindet und den Abschluss der Mitose darstellt.

2.3.1 Kontrolle des Zellzyklusses

Ein komplexes, interagierendes Netzwerk verschiedener regulatorischer Faktoren ist in die Kontrolle des Zellwachstums und der genomischen Stabilität involviert. Jedes einzelne hieran beteiligte Protein ist zumeist nur in einem bestimmten Abschnitt aktiv oder wird nur in bestimmten Phasen gebildet. Die Cycline sind ein Beispiel für eine Proteinklasse, die wichtig für die Zellzyklusmaschinerie ist; sie werden nur zu einem bestimmten Zeitpunkt gebildet und werden anschließend abgebaut. Mit ihrer Bildung und der Bindung an die cyclinabhängigen Kinasen geben sie das Signal dafür, den Zyklus fortzusetzen. Für jede der vier Hauptphasen des Zellzyklusses ist eine Gruppe von Cyclinen zuständig; in der G₁-Phase zum Beispiel die

Cycline der Gruppen D und E und in der M-Phase die Cycline der Gruppen A und B (Pines, 1993; Sherr, 1993).

Viele andere Proteine, die für die Weiterführung des Zyklusses zuständig sind, wie z.B. die cyclinabhängigen Kinasen, Wachstumsfaktoren oder Transkriptionsfaktoren, sind in der Zelle vorhanden und werden durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung aktiviert bzw. deaktiviert. Neben der Aktivierung kommt es zumeist zusätzlich zur Erhöhung der Proteinmenge, z.B. durch Genexpression und/oder Proteinstabilisierung. Solche Abläufe wurden u.a. für den M-Phase-Förderfaktor (MPF) beschrieben (Murray, 1991).

In jeder der vier Hauptphasen des Zyklusses besteht für die Zelle die Möglichkeit, die Weiterführung des Wachstums zu verzögern. Wenn die Herstellung von Nukleotiden, die Replikation oder die Kondensation der DNA nicht abgeschlossen sind, verharrt der Zellzyklus an dieser Stelle, um die Prozesse zu beenden. Das Gleiche tritt ein, wenn Replikationsfehler oder DNA-Schäden festgestellt werden. Die Zellzykluskontrollpunkte stellen sicher, dass richtige, komplette und vollständige Moleküle in die nächste Phase eintreten. Häufig aktivieren oder deaktivieren sie die Komplexe aus Cyclin und cyclinabhängiger Kinase (CdK) und hemmen damit den Zyklus.

Unterschiede in einzelnen Zelltypen und vor allem methodische Unzulänglichkeiten erschweren die eindeutige Festlegung der Position und Anzahl der vorhandenen Kontrollpunkte. Es gibt in menschlichen Zellen mindestens vier Kontrollpunkte, die sich jeweils zwischen Mitte und Ende der einzelnen Phasen befinden. Ist allerdings ein Kontrollpunkt innerhalb einer Phase überwunden und sind trotzdem Fehler vorhanden oder neue Fehler entstanden, schreitet der Zyklus bis zum nächsten Kontrollpunkt voran und der Eintritt in die nächste Phase wird nicht verhindert (Shackelford et al., 1999). Die Wirkung eines schädigenden Agens variiert dabei von Zelllinie zu Zelllinie. So bewirkt ionisierende Strahlung in einer Zelllinie einen G₁-Phasen-, in einer zweiten einen S-Phasen- und in einer weiteren Zelllinie einen G₂-Phasen-Arrest (zusammengefasst in Bernhard et al., 1995). Auch die Zellantwort auf UVC-Strahlung, die in dieser Arbeit eingesetzt wurde, kann unterschiedlich aussehen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Zellantwort auf UVC-Bestrahlung.

Zellantwort	Zelltyp	Autor
G ₁ -Phasen-Arrest	menschl. Brustkrebszellen (MCF7)	Wang et al., 1999
G ₁ -Phasen-Arrest	Maus-Fibroblasten (NIH3T3)	Haapajarvi et al., 1995
G ₁ -Phasen-Arrest	menschl. Fibroblasten (GM6419)	Geyer et al., 2000
G ₁ -Phasen-Arrest	embryonale Ratten-Fibroblasten	Reinke und Lozano, 1997
G ₁ -Phasen-Arrest; S-Phasen-Arrest	Hasen-Augenlinsenzellen (N/N1003A)	Sidjanin et al., 1996
S-Phasen-Arrest	menschl. Brustfibroblasten (HMEC)	Meyer et al., 1999
S-Phasen-Arrest	menschl. Brustkrebszellen (MDA-MB-231)	Wang et al., 1999
S-Phasen-Arrest	Hamster-Zellen (CHO)	Orren et al., 1997
S-Phasen-Arrest	menschl. Gebärmutterhalskrebszellen (HeLa)	Carty et al., 1994
S-Phasen-Arrest	Maus-Fibroblasten (MEF)	Haapajarvi et al., 1999
S-Phasen-Arrest	menschl. Fibroblasten (VH16, VH20-1)	de Laat et al., 1996
S-Phasen-Arrest	Fischzelllinie (OL32)	Nishigaki et al., 1998
G ₂ -Phasen-Arrest	menschl. Fibroblasten (NHF)	Vincent et al., 1999

2.3.2 G₁-Phasen-Kontrollpunkt (Restriktionspunkt)

Der G₁-Phasen-Kontrollpunkt, oft auch Restriktionspunkt genannt, ist der am besten untersuchte Zellzykluskontrollpunkt. Die G₁-Phase ist häufig die längste Phase innerhalb des Zellzyklusses und damit ist die Wahrscheinlichkeit am größten, dass die DNA innerhalb

dieser Zeitspanne durch endogene oder exogene Faktoren geschädigt wird. Dieser Kontrollpunkt soll gewährleisten, dass geschädigte DNA nicht in die Synthesephase gelangt und als Folge davon die Möglichkeit von Replikationsfehlern stark zunimmt.

Die G₁-Phasen-Kontrollproteine werden durch DNA-Schäden - zumeist DNA-Strangbrüche -, wie sie z.B. durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder durch ionisierende Strahlung entstehen, aktiviert und sind dann in der Lage, einen Zellzyklusarrest auszulösen. Indem der Fortgang des Zyklusses bei Schadenserkennung verzögert wird, besteht für die Reparatursysteme die Möglichkeit, auftretende Fehler zu beseitigen. Die Stärke der Antwort ist dabei sowohl vom schädigenden Agens als auch vom Zelltyp abhängig (Nelson und Kastan, 1994). Bei zu starker Schädigung der DNA wird nicht repariert, sondern Apoptose eingeleitet. Bei diesem sogenannten programmierten Zelltod kommt es zu einem kontrollierten Abbau der Zelle, ohne dass die umgebenden Zellen, wie bei der Nekrose, in Mitleidenschaft gezogen werden. Der Prozess dauert bis zu 72 Stunden und beinhaltet eine DNA-Fragmentierung und anschließende Abschnürung kleiner Zellteile, der apoptotischen Körperchen, die dann durch Makrophagen aufgenommen werden.

In Abbildung 3 ist schematisch die Regulation des Überganges von der G₁- in die S-Phase gezeigt. Es sind dabei einige Proteine abgebildet, die im Falle eines DNA-Schadens eine wichtige Rolle bei der Hemmung des Zellzyklusses spielen.

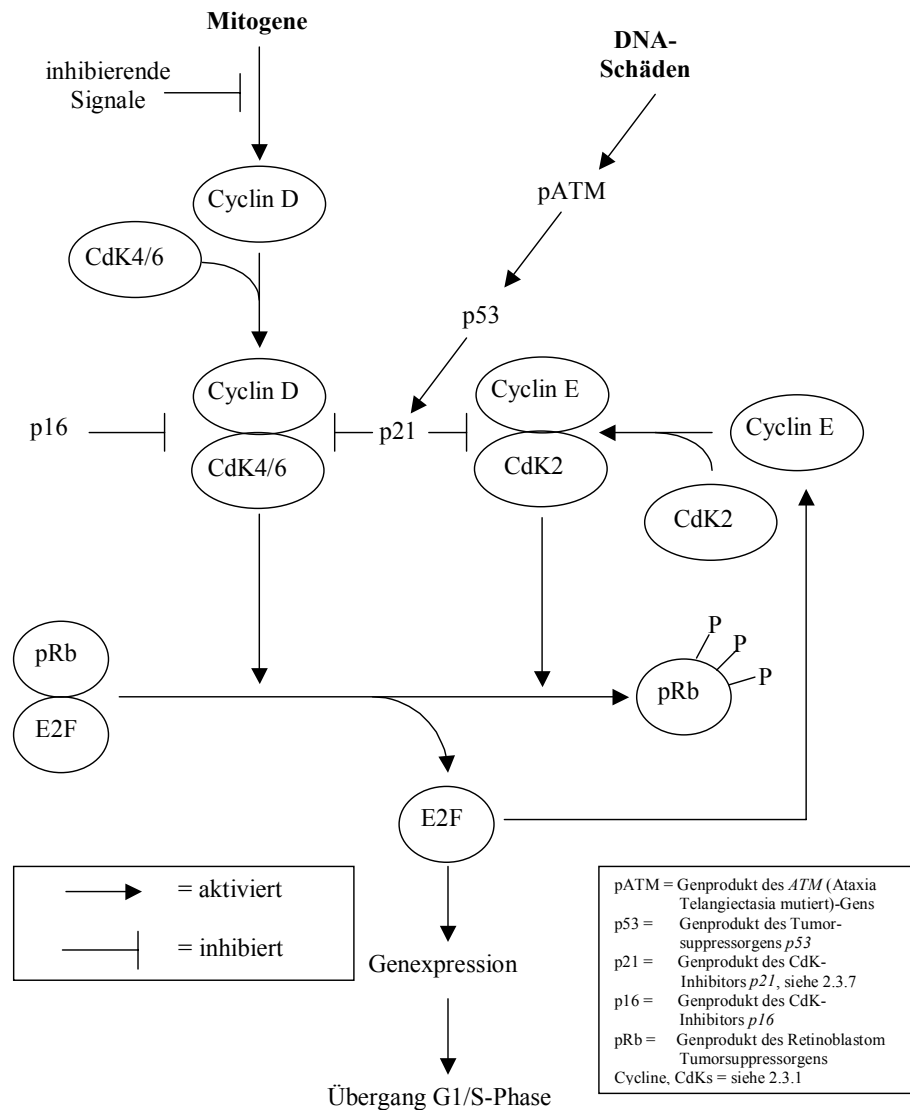


Abbildung 3: Das Zusammenspiel verschiedener Proteine beim Fortgang des Zellzyklusses.
(modifiziert nach Shackelford et al., 1999)

2.3.3 S-Phasen-Kontrollpunkt

Tritt ein Schaden erst nach Überschreiten des Restriktionspunktes auf oder ist er der dortigen Kontrolle entgangen, gibt es während der Synthesephase eine weitere Möglichkeit für die Zelle, das Wachstum zu unterbrechen. Als Folge davon wird die Replikation deutlich verlangsamt oder zum Stillstand gebracht. Wieder haben dann die Reparaturmechanismen Zeit, die DNA-Schäden zu beheben. Allerdings sind einige Unterschiede in den Kontrollmechanismen und ihrer Antwort auf einen Fehler zu beachten. Durch die kürzere Dauer der S-Phase und die sofort beginnende Replikation ist die Zeit für die Kontrollproteine und für die Reaktion auf Schäden deutlich kürzer als in der G₁-Phase. Es zeigt sich außerdem, dass der S-Phasen-Kontrollpunkt empfindlicher auf DNA-Schäden reagiert. Bei Behandlung

der DNA mit DNA-schädigenden Agenzien speziell in der S-Phase kommt es bei deutlich niedrigeren Konzentrationen zu einem Replikationsstopp (zusammengefasst in Kaufmann und Paules, 1996).

Der S-Phasen-Kontrollpunkt stellt einen wichtigen Abschnitt für die Stabilität der genetischen Information dar. Dennoch ist bisher wenig über die molekularen Zusammenhänge dieses Kontrollpunktes bekannt. Das ist auch darin begründet, dass eine partiell defiziente Zelllinie mit fehlendem S-Phasen-Kontrollpunkt, wie sie für die G₁- und G₂-Kontrollpunkte vorhanden sind, bisher noch nicht gefunden wurde. So ist eine Identifikation von Proteinen, die in dieser Phase einen entscheidenden Einfluss haben, ungleich schwerer. Für p53, dem Genprodukt des Tumorsuppressor-Gens *p53*, konnte bisher keinerlei Funktion beim S-Phasen-Arrest nachgewiesen werden (Prost et al., 1998), wohingegen ATM, das Genprodukt des *ATM* (Ataxia-Telangiectasia mutiert)-Gens, wohl auch in der S-Phase eine entscheidende Rolle spielt, indem es die Zellzyklusarretierung auslöst (Dasika et al., 1999; Shackelford et al., 1999).

Neuere Untersuchungen schreiben dem S-Phasen-Kontrollpunkt nicht nur die Aufgabe der Verzögerung bis zur Reparatur zu. Die bisher angenommene Reihenfolge, dass zunächst die Replikation gestoppt und anschließend die Reparatur gestartet wird, scheint nicht korrekt. Vielmehr wird direkt die rekombinante Reparatur aktiviert und als Folge dessen verlangsamt sich die Replikation (Rhind und Russell, 2000).

2.3.4 G₂-Phasen-Kontrollpunkt

Der Kontrollpunkt am Ende der G₂-Phase verhindert, dass Schäden in die Mitose übernommen und an die Tochterzelle weitergegeben werden, was häufig zu einer Chromosomeninstabilität führt. Als wichtigste Antwort auf einen Schaden, der in der späten S-Phase oder während der G₂-Phase auftritt, wird die Aktivierung des Cyclin B-Cdk2-Komplexes verzögert.

Der G₂-Phasen-Kontrollpunkt und die Inhibierung der Cycline und der entsprechenden Kinasen sind in den letzten Jahren gut beschrieben worden, allerdings gibt es über die Beteiligung der „Haupt“-Zellzykluskontrollproteine unterschiedliche Meinungen. Während man eine entscheidende Rolle von ATM nachgewiesen hat, scheint p53 nicht in allen Zelllinien eine Rolle in der Auslösung des G₂-Arrestes zu besitzen (O'Connor, 1997; Stewart

und Pietenpol, 2001). Zusätzlich hängt es vom schädigenden Agens ab, ob ein p53-abhängiger G₂-Phasen-Arrest, wie durch ionisierende Strahlung (Guillouf et al., 1995), oder ein p53-unabhängigen G₂-Phasen-Arrest, wie durch UVC-Bestrahlung, erfolgt (Al-Mohanna et al., 2001).

2.3.5 Spindel-Kontrollpunkt (M-Phasen-Kontrollpunkt)

Der Mitose-Kontrollpunkt überwacht die Spindel-Mikrotubuli-Struktur, die korrekte Ausrichtung der Chromosomen und die richtige Verknüpfung der Chromosomen mit den Kinetochoren während der Mitose. Falls es zu Defekten kommt, wird die Chromosomentrennung verzögert, bis die Fehler in der Mitosespindel behoben sind.

Die Signalwege, die beim Ablauf der Kontrolle der Mitose ablaufen, scheinen dabei teilweise eng mit denen der Synthesephase verknüpft zu sein (Rhind und Russell, 2000). Auch bei diesem Kontrollpunkt ist die Rolle von p53 umstritten, während ATM keine Bedeutung zu haben scheint (Stewart und Pietenpol, 2001).

2.3.6 Das Zellzykluskontrollprotein GADD45

GADD45 (growth arrest and DNA damage inducible gene) ist ein Gen, welches durch DNA-Schäden, DNA-Schäden-verursachende Agenzien oder anderem zellulären Stress induziert wird. Diese Stressinduktion wurde in allen Säugerzellen festgestellt. Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein multifunktionelles Protein (drei verwandte, mit ähnlichen Strukturmerkmalen und Eigenschaften ausgestattete Isoformen, *GADD45α*, *GADD45β*, *GADD45γ*), dem eine Rolle bei der Zellzykluskontrolle, bei der NER und der Stabilisierung der Chromatinstruktur nachgewiesen wurde (Carrier et al., 1999; Hollander et al., 1999).

GADD45 spielt sowohl beim G₁- als auch beim G₂-Phasen-Kontrollpunkt eine bedeutende, wenn auch mechanistisch unklare Rolle (Sheikh et al., 2000). Sicher ist nur, dass es an PCNA (proliferating cell nuclear antigen), p21 (ein CdK-Inhibitor, siehe 1.3.7) und CdK2 bindet. Im G₁-Phasen-Kontrollpunkt hat *GADD45* eine nachgeschaltete Funktion und wird von p53 aktiviert und kann somit p53-unabhängig keinen G₁-Phasen-Arrest auslösen. Demgegenüber deuten einige Ergebnisse in der Literatur darauf hin, dass *GADD45* während der G₂-Phase einen Arrest auslösen kann, selbst wenn vorgeschaltete Gene nicht vorhanden bzw. deaktiviert sind (Chen et al., 2001). Ergebnisse von Smith et al. (2000) zeigen, dass es bei *GADD45*-defizienten Zellen nach UV-Bestrahlung weder zu einem G₁- noch zu einem G₂-Phasen-Arrest kommt, obwohl *p53* aktiv ist. Ebenso wird die Funktion von *GADD45* bei

der Auslösung von Apoptose kontrovers diskutiert. Hollander et al. beobachteten 1999 eine GADD45-unabhängige Apoptose in Mauszellen, während verschiedene andere Arbeiten einen Zusammenhang zwischen Apoptose und GADD45 zeigten (zusammengefasst in Sheikh et al., 2000).

Die *GADD45*-Induktion durch vorgeschaltete Genprodukte ist scheinbar vom schädigenden Agens abhängig. Es zeigte sich, dass es sich dabei nicht um unabhängige Reaktionen auf DNA-Schädigungen handelt, sondern die *GADD45*-Induktion durch p53 unterschiedlich sein kann. Bei ionisierender Strahlung kommt es zu einer direkten Bindung von p53 an den *GADD45*-Promoter, während bei der Behandlung mit Methylmethoxysulfonat (MMS), UVC und bei Serumangel eine transkriptionelle Induktion von *GADD45* durch p53 mittels Protein-Protein-Wechselwirkungen zu beobachten ist. Dabei wurde WT-1 (Wilms Tumor 1) als ein Transkriptionsfaktor identifiziert, der die Induktion von *GADD45* durch p53 übermittelt (Zhan et al., 1998).

2.3.7 Das Zellzykluskontrollprotein p21

p21 ist ein weiteres Zellzykluskontroll-Gen, dessen Expression nach Metall-Inkubation und UVC-Bestrahlung in dieser Arbeit untersucht wurde. Es gehört zu der Familie der so genannten Stress-Antwort-Gene. Weitere bekannte Abkürzungen des Proteins sind WAF1 (wild-type p53 activated factor) und CIP1 (Cdk interacting protein). Das Genprodukt p21 reagiert dabei als Inhibitor des Zellzyklusses, indem es an Cyclin-CdK-Komplexe bindet. *p21* wird durch p53 aktiviert und ist somit ein nachgeschaltetes Zellzykluskontrollgen. Neben der Bindung an CdKs kann p21 auch an PCNA binden. Diese Bindung unterdrückt die Aktivierung der Polymerase δ und spielt so bei der Hemmung der Replikation eine Rolle. Da PCNA sowohl in der BER, in der NER als auch in der Mismatch-Reparatur (Li et al., 1994) beteiligt ist, wird auch eine Funktion von p21 in diesen Reparaturmechanismen diskutiert (Gartel et al., 1996; Kelman und Hurwitz, 1998; Balajee und Geard, 2001). p21 bindet ebenfalls an GADD45 und zeigt ähnliche Eigenschaften und Reaktionen auf bestimmte DNA-Schäden. So werden beide während der G₁-Phase durch p53 aktiviert und konkurrieren um eine Bindung an PCNA (Kelman und Hurwitz, 1998).

Die genaue Rolle von *p21* als Stressantwort ist ähnlich wie bei vielen anderen Genen umstritten. Zum einen geht man davon aus, dass es als *p53*-nachgeschaltetes Gen dessen Rolle als Apoptose-Auslöser unterstützt, zum anderen, dass *p21* eine generell protektive

Funktion gegenüber zellulärem Stress ausübt (zusammengefasst in Gorospe et al., 1999). Schließlich zeigten Medema et al. 1998, dass p21 sowohl im G₁- als auch im G₂-Phasen-Arrest eine Rolle spielt, indem es CdK2 vollständig inhibiert.

2.4 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometer werden zur Messung physikalischer und biologischer Eigenschaften von Partikeln, meist Zellen oder Zellkernen, eingesetzt. Einzelne Partikel werden analysiert, wenn sie in einem flüssigen Medium an einer Anregungslichtquelle (zumeist ein Laser) vorbeiströmen und dabei von dem an die Zellbestandteile gekoppelten Farbstoff emittiertes Licht detektiert wird. Innerhalb von Sekunden können dabei tausende von Zellen vermessen werden. In der Messzelle werden neben der spezifischen Fluoreszenzintensität einer Zelle auch die Lichtstreuungen gemessen, die einen Rückschluss auf ihre strukturellen und morphologischen Eigenschaften gestattet (Eickhoff, 2000). Die Daten werden mittels Computer verarbeitet und anschließend entweder als zweidimensionaler Dot-Blot oder als Histogramm ausgegeben (Abbildung 4). Hierbei entspricht jeder Punkt einem gemessenen Partikel.

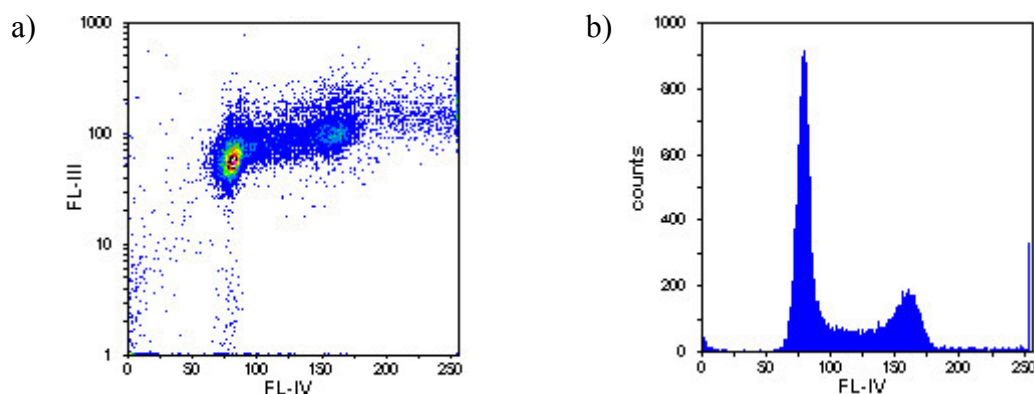
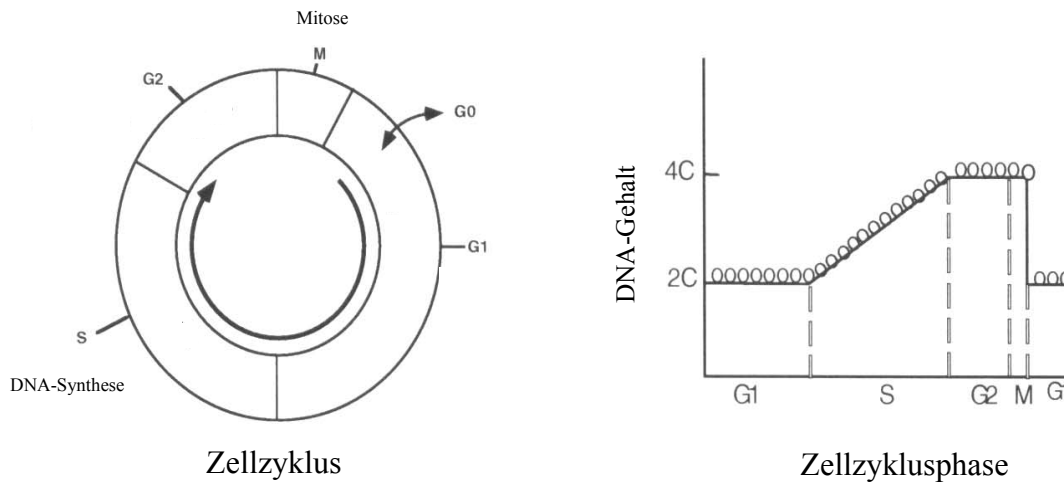


Abbildung 4: a) Dot-Blot und b) Histogramm einer mit dem Durchflusszytometer aufgenommenen Probe.

In dieser Studie wurde die Durchflusszytometrie zur Analyse des DNA-Gehaltes von Zellen verwendet. Durch Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes DAPI (4', 6'-Diamidino-2-Phenylindol), der in den DNA-Doppelstrang zwischen Adenin und Thymin interkaliert, kann eine Zuordnung der Zellen in eine der drei Hauptphasen des Zellzyklusses vorgenommen werden, da die Stärke des Signals proportional der in der Zelle vorhandenen DNA-Menge ist (Abbildung 5). Es kann dabei nicht zwischen G₀- und G₁-Phase sowie zwischen G₂- und

M-Phase unterschieden werden, da in den beiden jeweiligen Phasen die DNA-Mengen gleich sind.

a)



b)

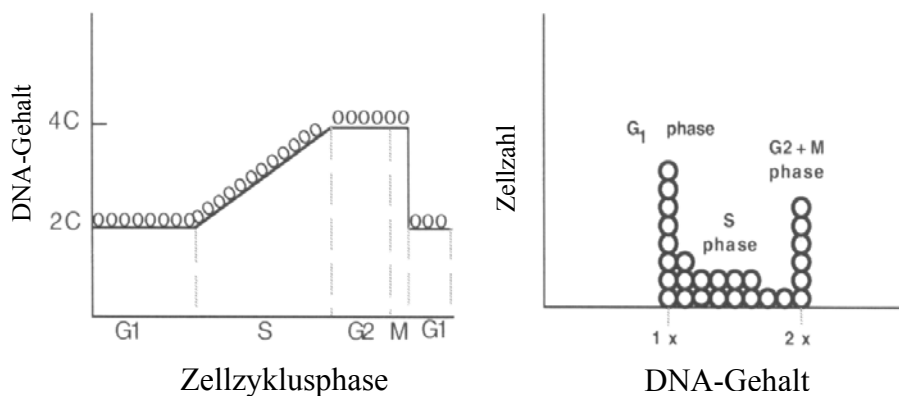


Abbildung 5: a) Schematische Darstellung des Zellzyklusses und des DNA-Gehaltes.
b) Übertragung des DNA-Gehaltes in ein Histogramm.
(Grafiken aus Becton Dickinson LSR Manual, 2000)

Prinzipiell kann man ein Durchflusszytometer in drei Komponenten unterteilen. Hierbei handelt es sich zunächst um das Flüssigkeitssystem, das für die Zufuhr und die Fokussierung der Zellen in der Messzelle sorgt, um das optische System, welches für die Anregung der Zellen bzw. der daran gebundenen Farbstoffe sorgt und die Detektion der emittierten Signale leistet und schließlich um die Elektronik, die die optischen Signale in elektronische überführt und mittels Digitalisierung für die Datenanalyse per Computer zugänglich macht.

2.5 mRNA-Polymerasekettenreaktion

Die von K. B. Mullis entwickelte Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren. Spezifische DNA-Sequenzen können *in vitro* in einem einzigen Reaktionsansatz mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der zellulären DNA-Replikation und ist die enzymatische Vermehrung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotidprimern, die gegenläufig an komplementären DNA-Strängen gebunden sind und den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt begrenzen. Die gesamte Reaktion basiert auf drei Teilschritten, die nacheinander wiederholt werden: Denaturierung, Annealing, Polymerisation (Abbildung 6).

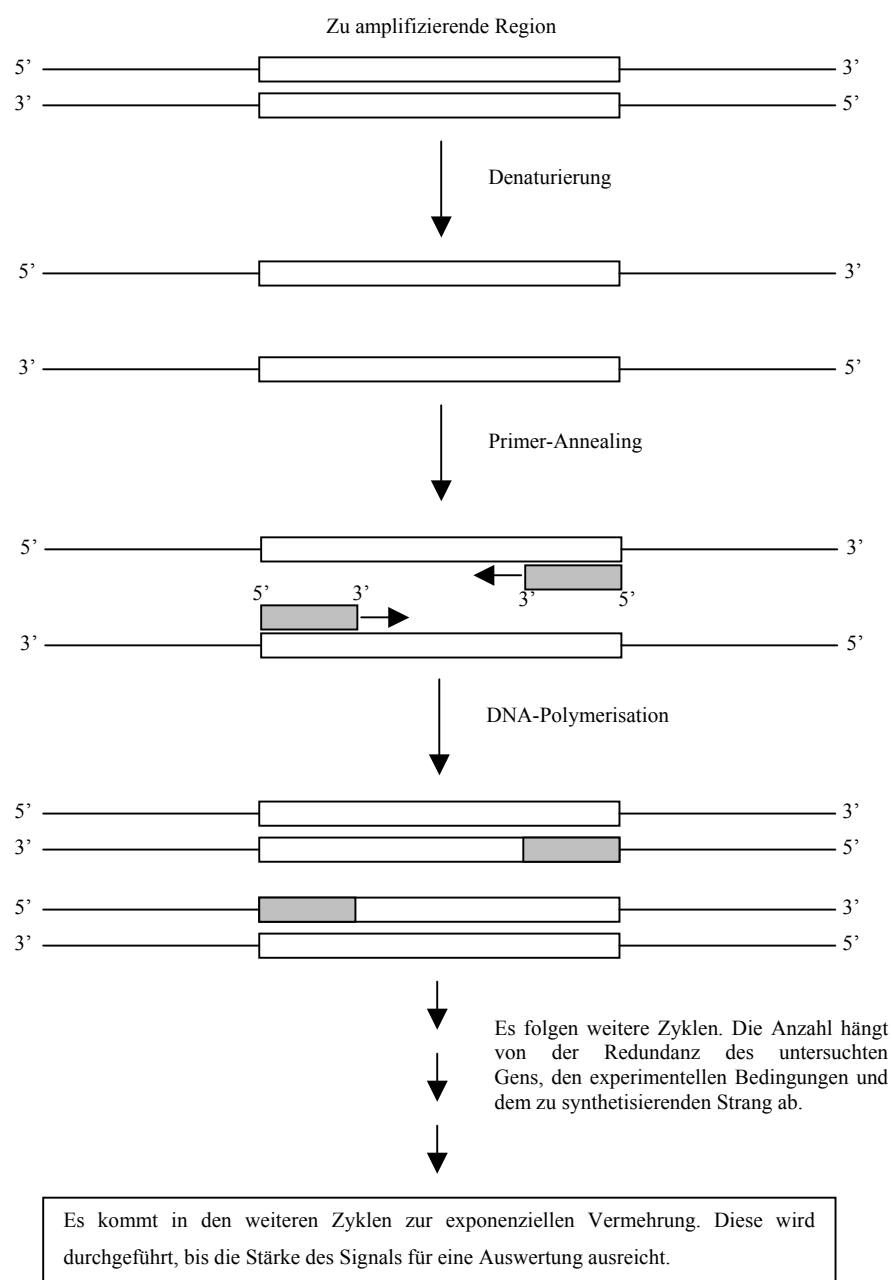


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Polymerasekettenreaktion.

Die genomische DNA, die schließlich amplifiziert wird, kann man dabei direkt aus den Zellen gewinnen oder man isoliert die mRNA aus den Zellen und führt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) eine Retro-Übersetzung in cDNA durch.

3 Fragestellung

Die vier untersuchten Metalle Arsen, Cadmium, Cobalt und Nickel sind bekanntermaßen toxisch und krebserzeugend, obwohl ihre mutagenes Potenzial nur schwach ausgeprägt ist. In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass Verbindungen dieser Metalle einen verstärkenden Effekt auf die Genotoxizität und Zytotoxizität anderer DNA-schädigender Agenzien besitzen und Reparaturprozesse inhibieren. Dieser Effekt auf die Reparatur auftretender DNA-Schäden zeigte, dass zelluläre Kontrollmechanismen durch nicht-zytotoxische Konzentrationen an Metallverbindungen beeinträchtigt werden können. Die Arretierung der Zellen innerhalb des Zellzyklusses nach der Schadenserkenkung ist ein weiterer wichtiger Schutzmechanismus der Zelle, um die Manifestierung von auftretenden Fehlern an der DNA zu verhindern. Diese Pause im Wachstum der Zelle ermöglicht den Reparaturprozessen die Schäden zu beseitigen und gewährleistet so eine korrekte Replikation der DNA. Einzelne Untersuchungen der letzten Jahre zeigten, dass sowohl DNA-schädigende Agenzien als auch Metallverbindungen eine Verzögerung im Zellzyklus hervorrufen. So verursacht UVC-Strahlung DNA-Schäden und induziert einen Zellzyklusarrest, der zumeist in der G₁-Phase oder in der S-Phase stattfindet (Tabelle 3). Für die hier untersuchten Metallverbindungen wurde nach Inkubationszeiten von 72 Stunden ein S-Phasen-Arrest beobachtet (Costa et al., 1982).

Systematisch wurde nun in dieser hier vorliegenden Arbeit untersucht, welchen Effekt die Metallverbindungen auf den Zellzyklus von A549-Zellen haben und wie sie die Zellzykluskontrolle nach UVC-Strahlung beeinflussen. Als Nachweismethode wurde die Durchflusszytometrie eingesetzt.

Das System der Zellzykluskontrolle ist sehr komplex und noch lange nicht vollständig aufgeklärt. Die verschiedenen Signalwege zwischen den beteiligten Genen und Proteinen variieren in ihrer Stärke und Komplexität je nach Art des auftretenden Schadens. Entsprechend schwierig ist die Identifizierung der beteiligten Makromoleküle.

In dieser Arbeit wurde exemplarisch untersucht, ob die Zellzykluskontrollgene *p21* und *GADD45* durch die gleichzeitige Behandlung mit UVC-Strahlung und einer Metallverbindung induziert werden und ein Zusammenhang mit einer auftretenden Veränderung der Zellzyklusphasenverteilung nachgewiesen werden kann.

4 Ergebnisse und Diskussion

Um die Effekte der einzelnen Metallverbindungen übersichtlich darzustellen, werden diese in der vorliegenden Arbeit nacheinander beschrieben und die Ergebnisse aus den unterschiedlichen Teilbereichen der Fragestellung zusammen vorgestellt. Zunächst werden die Effekte durch UVC-Strahlung gezeigt.

4.1 UVC-Bestrahlung

Im Folgenden werden die Einflüsse der UVC-Bestrahlung auf die Koloniebildungsfähigkeit, die Zellzyklusphasenverteilung und die Induktion von *p21* und *GADD45* gezeigt.

4.1.1 Koloniebildung

Für eine Abschätzung der Bestrahlungsdosis, die zum einen eine genügend große Zahl von Schäden verursacht, zum anderen aber auch das Überleben eines großen Anteils der Zellen sicherstellt, wurde die Zytotoxizität der UVC-Strahlung mit Versuchen zur Koloniebildungsfähigkeit bestimmt.

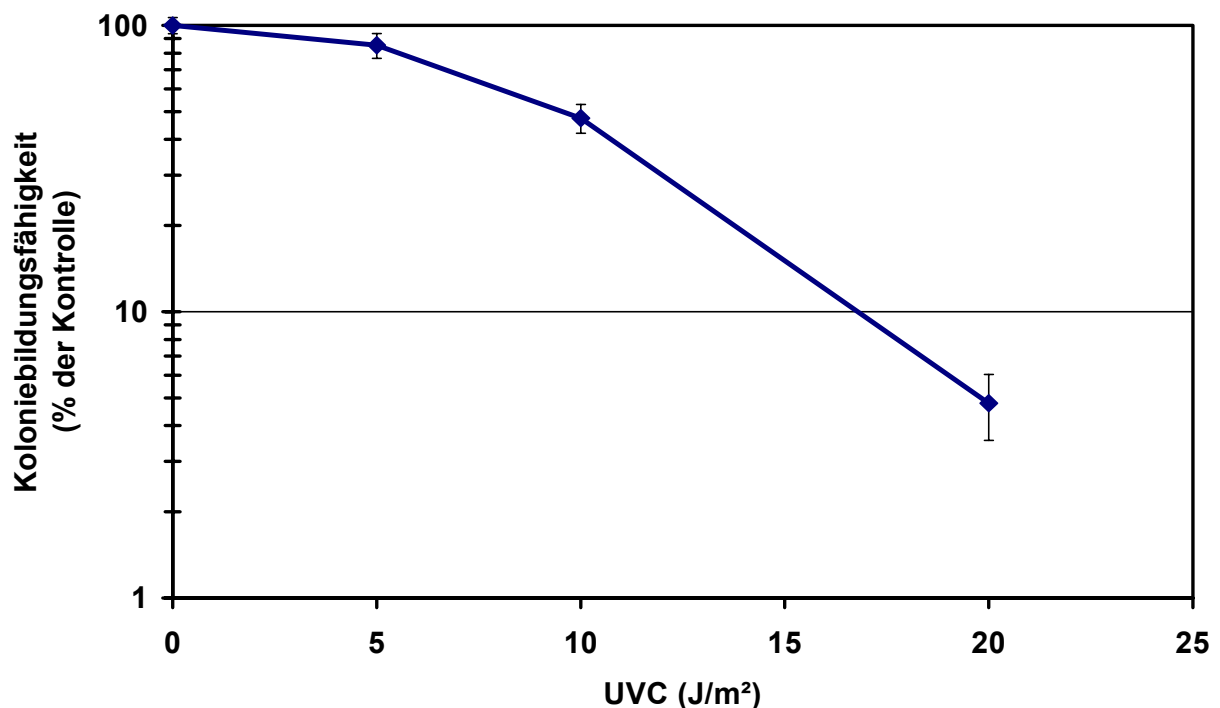


Abbildung 7: Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen nach UVC-Bestrahlung. 5×10^5 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum mit UVC bestrahlt. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert und je 300 Zellen für 7 Tage kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6-fach Bestimmungen \pm Standardabweichung.

Wie in Abbildung 7 zu erkennen ist, nimmt nach Bestrahlung mit einer Dosis von 5 J/m^2 UVC die Anzahl der Kolonien, im Vergleich zur Kontrolle, um 15% ab. Nach 10 J/m^2 UVC sind noch ca. 50% der Zellen in der Lage Kolonien zu bilden, bei 20 J/m^2 sinkt dieser Wert unter 10%. In der Literatur wurde ein IC_{50} -Wert (hemmende Konzentration, inhibitory concentration, 50%) von ca. 10 J/m^2 UVC-Strahlung für andere menschliche Zelllinien, wie HeLa-Zellen (Snyder et al., 1989) oder NHF-Zellen (Cistulli und Kaufmann, 1998), aber auch für tierische Zellen, wie Hasen-Linsen-Zellen (Sidjanin et al., 1996) und MEF-Zellen (Smith et al., 2000), beschrieben.

4.1.2 Zellzyklusphasenverteilung

Zur Bestimmung der Zellzyklusphasenverteilung wurden die Zellen zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung mit 100%igem Ethanol fixiert. Mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurden die Zellen dann gefärbt und schließlich die vom DNA-Gehalt abhängige Fluoreszenz mit Hilfe des Durchflusszytometers bestimmt. In Abbildung 8 ist der Anteil der Zellen in den einzelnen Phasen des Zellzyklusses gegen die Zeit nach UVC-Bestrahlung aufgetragen.

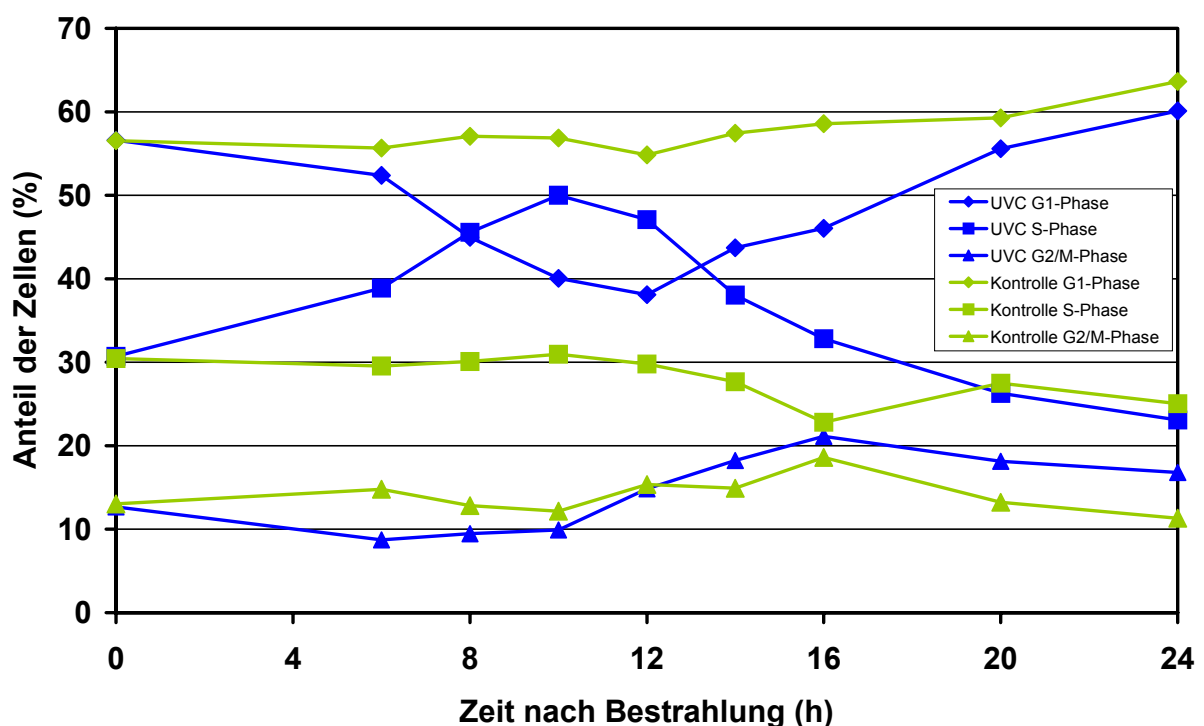


Abbildung 8: Zellzyklusphasenverteilung in Kontrollzellen (grün) und nach 10 J/m^2 UVC. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum mit 10 J/m^2 UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Die Kontrollzellen zeigen bezüglich der Verteilung der Zellen auf die unterschiedlichen Zellzyklusphasen über den gesamten Messzeitraum keine wesentlichen Änderungen (Abbildung 8). Der Anteil der Zellen in der G₁-Phase beträgt zwischen 55 und 59% und steigt nach 24 Stunden auf einen Wert von ca. 64% an. Der Grund dafür könnte in der zunehmenden Konfluenz der Zellen liegen. Ist eine gewisse Zelldichte innerhalb der Schale erreicht, kommt es zur sogenannte Kontaktinhibition und ein Wachstumsstop findet statt; die Zellen verbleiben in der G₁-Phase. Spätere Messzeitpunkte mit einer noch größeren Dichte an Zellen ergeben einen entsprechend höheren Anteil in dieser Phase (nicht gezeigte Ergebnisse). In der Kontrolle liegt der prozentuale Anteil der Zellen in der S-Phase innerhalb des Messzeitraumes zwischen 23 und 31%, der Anteil der G₂/M-Phase-Zellen bei ca. 13 bis 18%.

Der Unterschied zu den bestrahlten Zellen ist deutlich sichtbar. Während in den ersten Stunden nach der Bestrahlung kaum Veränderungen zu beobachten sind, hat sich der Anteil der Zellen in der G₁-Phase nach sechs Stunden deutlich erniedrigt, während der Anteil der S-Phase-Zellen ab diesem Zeitpunkt entsprechend zunimmt. Nach zehn bis zwölf Stunden hat der Anteil der Zellen in der G₁-Phase ein Minimum und in der S-Phase ein Maximum erreicht, anschließend nimmt der G₁-Phasen-Anteil wieder zu und der S-Phasen-Anteil ab. Die UVC-Bestrahlung bewirkt in A549-Zellen einen deutlichen S-Phasen-Arrest. Der Anteil der Zellen in der G₂-Phase schwankt in den ersten zehn Stunden um den Wert von ca. 10% und steigt anschließend auf ein Maximum von etwa 21% nach 16 Stunden an. In den nachfolgenden Stunden sinkt der Wert wieder langsam ab.

Diese zeitlichen Verläufe der Zellzyklusphasenverteilung sind mit einer funktionierenden DNA-Reparatur zu begründen; nach Abschluss der Reparatur wird die Blockade des Zellzyklusses aufgehoben und die Zellen durchlaufen die nächste Phase. Sie erreichen zunächst die G₂- und die Mitose-Phase und anschließend die G₁-Phase. So ist der Anstieg des Anteils an G₂/M-Phase-Zellen vor dem Anstieg des G₁-Phasen-Anteils zu beobachten.

Einige der späteren Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit 5 J/m² UVC-Bestrahlung durchgeführt. Dabei konnten die qualitativ gleichen Effekte beobachtet werden (Abbildung 9). Sechs Stunden nach der Bestrahlung mit UVC ist eine deutliche Abnahme des Zellanteils in der G₁-Phase zu erkennen, während der Anteil der Zellen in der S-Phase deutlich ansteigt. Das Minimum bzw. Maximum ist in dem Bereich von acht bis zwölf Stunden zu finden. In den darauffolgenden Stunden nehmen die Anteile der Zellen in der

G₁-Phase wieder zu, während die in der S-Phase abnehmen. Auch der spätere Beginn der Zunahme des Anteils an G₂-Zellen ist erkennbar.

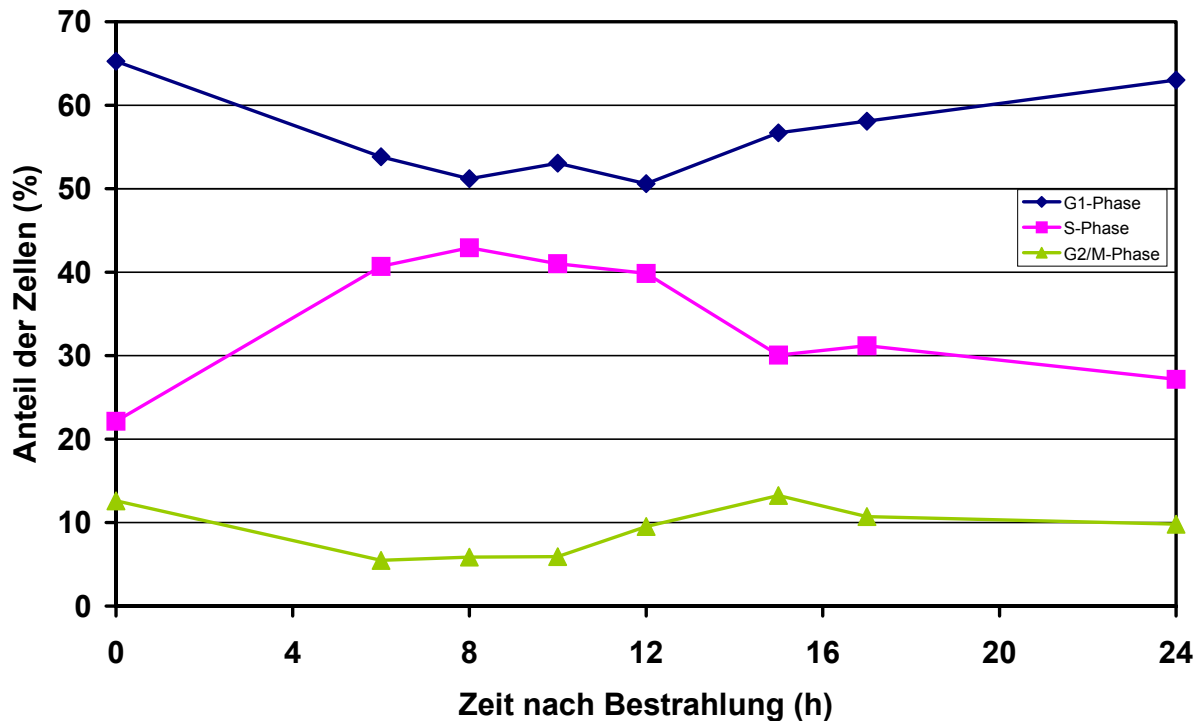


Abbildung 9: Zellzyklusphasenverteilung nach Bestrahlung mit 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Die Untersuchungen zeigen, dass auch eine Bestrahlung mit 5 J/m² UVC ausreicht, um einen Zellzyklusarrest hervorzurufen. UVC-Bestrahlung verursacht somit sowohl nach 5 als auch nach 10 J/m² einen S-Phasen-Arrest.

In der Literatur finden sich widersprüchliche Aussagen zum Einfluss der durch UVC-Strahlung hervorgerufenen Effekte auf die Zellzyklusphasenverteilung. Ebenfalls einen S-Phasen-Arrest beschrieben Carty et al. (1994) nach Bestrahlung von HeLa-Zellen mit 10 J/m² UVC. Demgegenüber beobachteten Geyer et al. (2000) nach UVC-Bestrahlung einen G₁-Phasen-Arrest. Allerdings wurden diese Untersuchungen mit konfluenten Zellen durchgeführt. Bei diesen Zellen, die sich dann vermehrt in der G₁-Phase befinden, ist es denkbar, dass die Zellzyklusproteine der G₁-Phase induzierte DNA-Schäden erkennen und einen G₁-Phasen-Arrest hervorrufen. Den unterschiedlichen Effekt durch UVC-Bestrahlung auf synchronisierte oder nicht-synchronisierte Zellen zeigten Nishigaki et al. (1998). Sie beobachteten bei nicht-synchronisierten oder in der S-Phase synchronisierten

Fisch-Zellen einen S-Phasen-Arrest, den sie nach Synchronisation der Zellen in der G₂-Phase nicht mehr feststellen konnten. Möglicherweise lässt sich ein S-Phasen-Arrest bei logarithmisch wachsenden Zellen durch das UVC-induzierte Schadensspektrum erklären. Es handelt sich nicht um DNA-Strangbrüche, die auf jeden Fall in der G₁- oder G₂-Phase des Zellzyklusses erkannt werden (O'Connor, 1997), sondern um sperrige DNA-Addukte. Diese werden möglicherweise in einigen Zelllinien erst sicher in der S-Phase während der Replikation erkannt und lösen daraufhin einen S-Phasen-Arrest aus, um die Reparatur zu ermöglichen.

4.1.3 mRNA-Gehalt von *p21* und *GADD45*

Am Zellzyklusphasenarrest durch UVC-Bestrahlung sind eine Vielzahl von Genen bzw. Proteinen beteiligt. Exemplarisch wurden die beiden Zellzykluskontrollgene *p21* und *GADD45* untersucht. Zur Analyse der Effekte der UVC-Strahlung auf die mRNA-Menge dieser beiden Gene wurde die Methode der mRNA-PCR verwendet. Hierzu wurden die Zellen mit UVC bestrahlt, danach die RNA isoliert und mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase cDNA hergestellt. Anschließend wurden unter Zuhilfenahme der entsprechenden Primer für *p21* und *GADD45* mittels PCR Fragmente der beiden Gene amplifiziert und abschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Intensitäten der einzelnen Banden der resultierenden Gele wurden densitometrisch ausgewertet.

4.1.3.1 *p21*

Die UVC-Bestrahlung mit 5 J/m² verursachte einen deutlichen Anstieg des mRNA-Pegels von *p21* in Abhängigkeit zur Nachinkubationszeit. Um die Aussagekraft der densitometrischen Auswertung zu zeigen, ist in beispielhaft ein Gel dargestellt, während in Abbildung 11 die quantitative Auswertung mehrerer Gele zusammenfassend gezeigt wird.



Abbildung 10: Expression von *p21* nach Bestrahlung mit 5 J/m² UVC. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Nach den angegebenen Nachinkubationszeiten wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt.

Jede Nachinkubationszeit wurde im Gel doppelt aufgetragen. Die beiden fehlenden Signale jeweils beim zweiten 3 h- und 17 h-Wert sind durch Auftragsfehler zu erklären. Wie in Abbildung 10 zu erkennen ist, erhöht sich mit zunehmender Nachinkubationszeit das p21-Signal, wobei sechs bis zehn Stunden nach UVC-Bestrahlung das Maximum erreicht ist. Bei noch längeren Nachinkubationszeiten ist dagegen wieder eine Abnahme der Signalstärke zu beobachten.

In der folgenden Abbildung 11 sind die Mittelwerte aus allen Bestimmungen nach der densitometrischen Auswertung aufgetragen. Diese grafische Auswertung zeigt ein Maximum der p21-Expression über einen relativ langen Zeitraum von zwei bis zehn Stunden nach Bestrahlung. Die Intensität der Banden hat in diesem Bereich das 2- bis 3-fache der Kontrolle erreicht. Eine solche Steigerung der Intensitäten lässt sich auch mit bloßem Auge im Gel gut erkennen (Abbildung 10).

Diese schnelle aber nicht sehr starke Induktion über einen längeren Zeitraum wird in der Literatur ebenfalls beschrieben. Allerdings findet diese Aktivierung scheinbar nur nach Bestrahlung mit geringen Dosen an UVC statt (mit 10 J/m² aber nicht mit 50 J/m²) (Reinke und Lozano, 1997; Latonen et al., 2001). In synchronisierten Mausfibroblasten dagegen wurde nach Bestrahlung mit UVC eine Erhöhung des mRNA-Gehaltes von *p21* nach sechs bis zwölf Stunden um das 2- bis 3-fache gefunden (Haapajarvi et al., 1997).

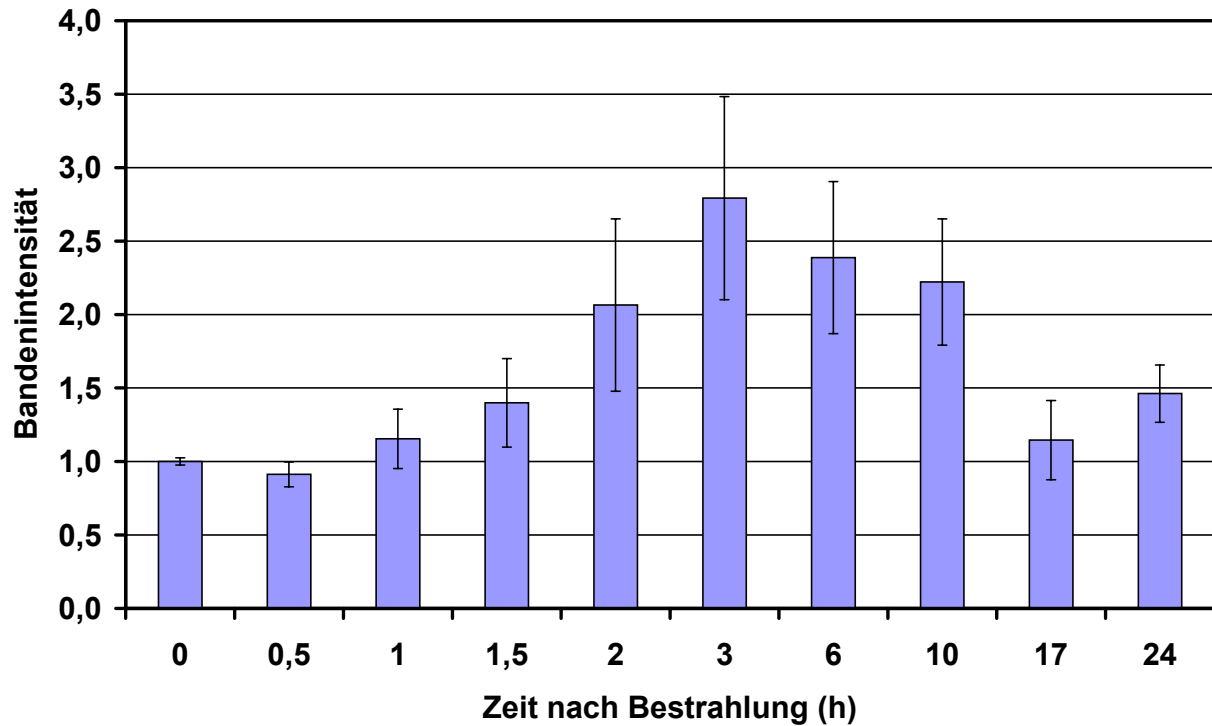


Abbildung 11: Induktion von *p21* nach Bestrahlung mit 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Nach den angegebenen Nachinkubationszeiten wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und anschließend wurden die Banden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen ± Standardabweichung.

In einem A549-Stamm konnten Wang et al. 1999 eine *p21*-Expression nur bei UVC-Dosen ≤ 5 J/m² induzieren. Für MCF7-Zellen beschrieben sie hingegen für 10 J/m² UVC eine Abnahme des *p21*-mRNA-Gehaltes. Allerdings machen die Autoren darauf aufmerksam, dass die Versuchsbedingungen und der Zelltyp eine wichtige Rolle spielen könnten. Eine mögliche Rolle von *p21* als Antwort auf UVC-Strahlung besteht in der diskutierten Beteiligung von *p21* an der DNA-Reparatur (Gartel et al., 1996; Balajee und Geard, 2001). Eine Abnahme des *p21*-Proteingehaltes nach vier Stunden, wie es in einer Arbeit für MCF7-Zellen beschrieben wurde, deutet nach Ansicht der Autoren allerdings darauf hin, dass *p21* nur in der Initiationsphase der DNA-Reparatur benötigt wird (Wang et al., 1999). Allerdings erfordern die Reparaturprozesse Zeit und da *p21* bei einem Arrest nach zellulärem Stress eine entscheidende Rolle spielt (Gorospe et al., 1999), spricht dies für eine längere Beteiligung.

4.1.3.2 *GADD45*

Zur Untersuchung des Einflusses auf die Expression des Zellzykluskontrollgenes *GADD45* wurde ebenfalls eine Bestrahlung mit 5 J/m² UVC-Licht durchgeführt und nach mRNA-PCR die Intensitätsveränderungen zu verschiedenen Nachinkubationszeiten gemessen

(Abbildung 12). Eine *GADD45*-Induktion ist schon nach einer Nachinkubationszeit von 30 min nachweisbar. Die Verstärkung der Bandenintensität bleibt anschließend über den gesamten gemessenen Zeitraum gleichbleibend gering.

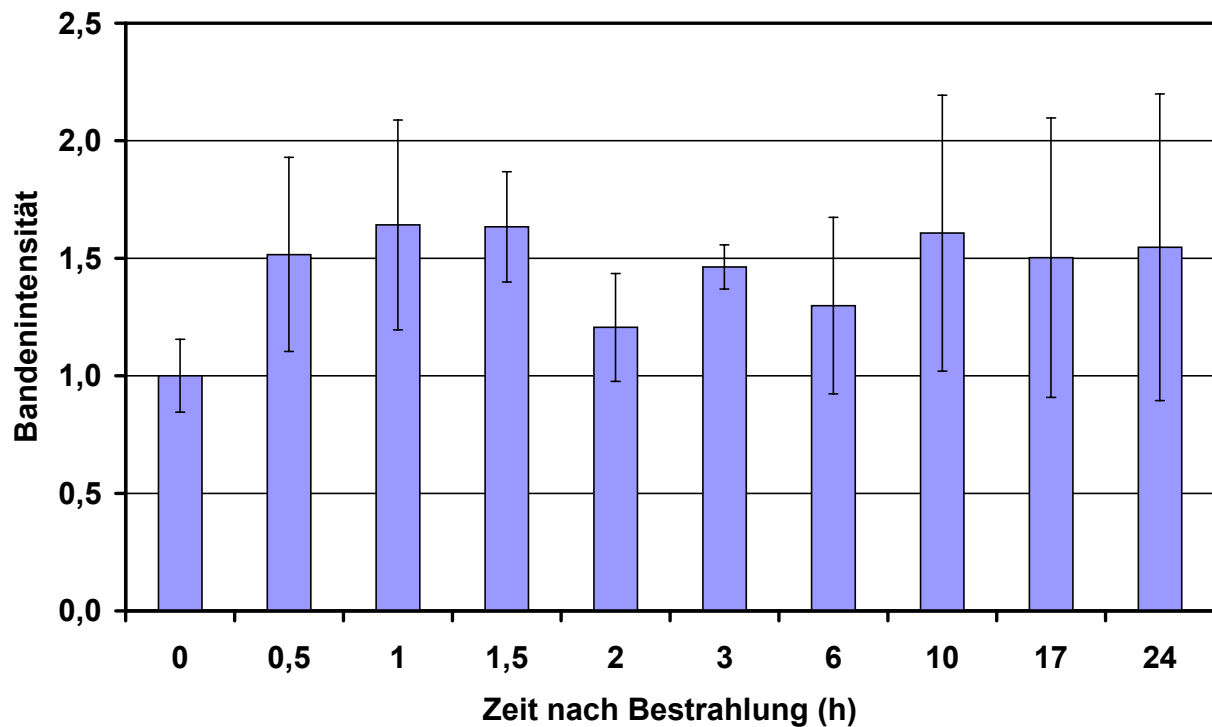


Abbildung 12: Induktion von *GADD45* nach Bestrahlung mit 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Nach den angegebenen Nachinkubationszeiten wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und anschließend wurden die Banden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen ± Standardabweichung.

In menschlichen Hautfibroblasten konnte ebenfalls eine schnelle Induktion beobachtet werden, allerdings war diese deutlich stärker und nach 16 Stunden stark rückläufig (Latonen et al., 2001). Wang et al. (1999) wiederum konnten zeigen, dass sich die *GADD45*-Induktion bei 5 J/m² UVC in MCF7-Zellen verdoppelt, bei 10 J/m² dagegen eine gesteigerte Expression nicht mehr zu beobachten ist und bei Dosen > 10 J/m² eine Abnahme der mRNA-Menge stattfindet. Dagegen wurde ein Anstieg des *GADD45*-mRNA-Gehaltes in Mausfibroblasten nach sechs bis zwölf Stunden um das 2- bis 3-fache beobachtet (Haapajarvi et al., 1997).

Für *GADD45* wird eine Beteiligung an der DNA-Reparatur diskutiert (Carrier et al., 1999) denn *GADD45* konkurriert mit p21 um die Bindung an PCNA (Balajee und Geard, 2001). Möglicherweise haben *GADD45* und p21 überschneidende Funktionen in der Zellzykluskontrolle und der Initiierung der DNA-Reparatur, sodass deren Mengenverhältnis die zellulären Antworten nach der UVC-Bestrahlung beeinflussen (Wang et al., 1999).

4.2 Natriumarsenit

4.2.1 Koloniebildung

Zur Abschätzung der Zytotoxizität von Natriumarsenit allein und in Kombination mit UVC-Bestrahlung wurden A549-Zellen für 20 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen an Arsen(III) inkubiert und anschließend mit 5 J/m² UVC bestrahlt. In Abbildung 13 ist das Ergebnis dieser Untersuchung dargestellt.

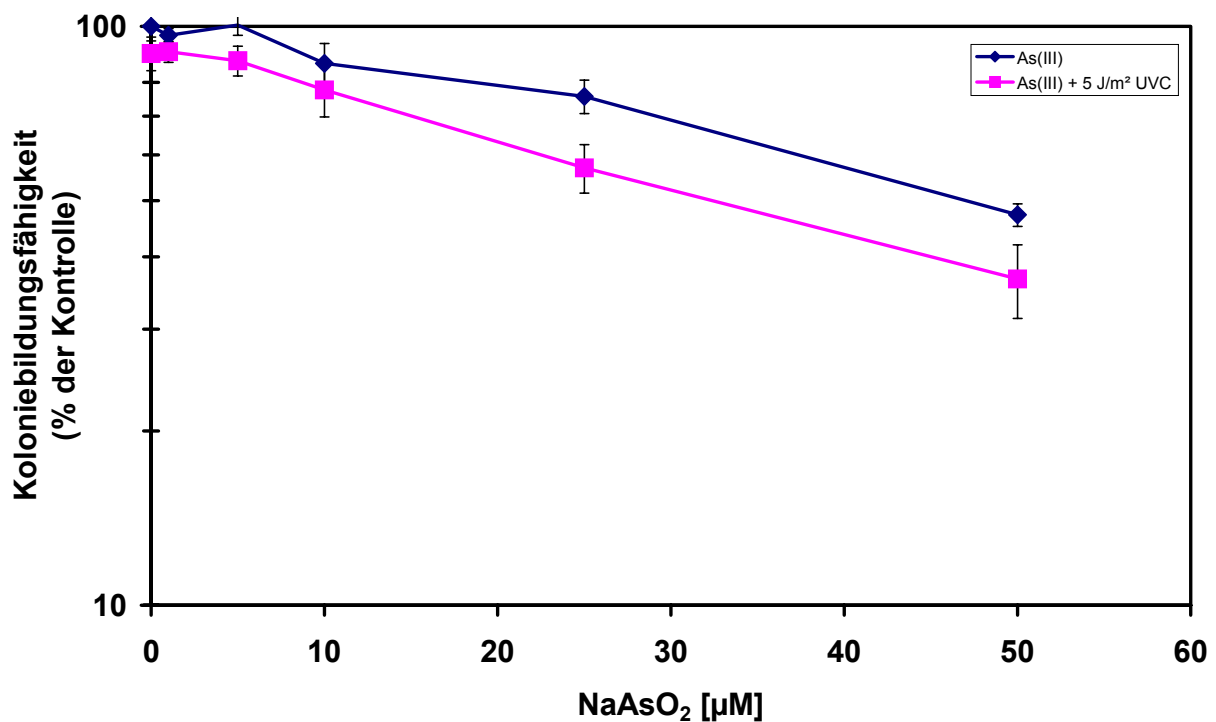


Abbildung 13: Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen nach 20-stündiger Inkubation mit NaAsO₂ und 5 J/m² UVC. 5x10⁵ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 20 Stunden mit NaAsO₂ inkubiert und anschließend mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert und 300 Zellen für 7 Tage kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6-fach Bestimmungen ± Standardabweichung.

Wie in Abbildung 13 zu erkennen, ist bis 5 µM As(III) kein zytotoxischer Effekt festzustellen. Bei höheren Konzentrationen nimmt die Koloniebildungsfähigkeit konzentrationsabhängig von ca. 86% bei 10 µM über ca. 75% bei 25 µM auf ungefähr 47% bei 50 µM As(III) im Vergleich zur Kontrolle ab. Die gleichzeitige Behandlung mit As(III) und UVC-Strahlung zeigt ein ähnliches Ergebnis. Im Vergleich zur Kontrolle sind in Abwesenheit von As(III) 90% überlebende Zellen zu beobachten. Danach nimmt der Anteil der Zellen über ca. 87% bei 5 µM As(III) und etwa 77% bei 10 µM As(III) auf ca. 36% bei 50 µM As(III) im Vergleich

zur Kontrolle ab. Es kommt zu keiner Steigerung der UVC-induzierten Zytotoxizität nach zusätzlicher Inkubation mit As(III).

In der Literatur findet man für die alleinige Behandlung von HeLa-Zellen mit NaAsO₂ einen ähnlichen Verlauf der Zytotoxizität (Trouba et al., 2000). Untersuchungen zur Koloniebildungsfähigkeit nach gemeinsamer Behandlung mit As(III) und UVC in CHO-Zellen zeigten für As(III) allein bei 10 µM eine Koloniebildungsfähigkeit von 50%, die bei 1 bis 2 J/m² UVC nochmals um 90% reduziert war (Yang et al., 1992). Allerdings wurden die Zellen insgesamt 42 Stunden mit As(III) behandelt, was möglicherweise die deutliche Steigerung der Zytotoxizität erklären könnte. Zusätzlich könnte auch der deutlich kürzere Zellzyklus der CHO-Zellen von 12 bis 14 Stunden im Vergleich zu etwa 24 Stunden bei A549-Zellen den Unterschied in der Empfindlichkeit nach gemeinsamer Behandlung mit As(III) und UVC erklären.

4.2.2 Zellzyklusphasenverteilung

Der Einfluss von NaAsO₂ auf die Zellzyklusphasenverteilung wurde allein und in Kombination mit UVC-Strahlung untersucht. In Abbildung 14 ist zunächst der Effekt von verschiedenen As(III)-Konzentrationen auf die Zellzyklusphasenverteilung aufgetragen.

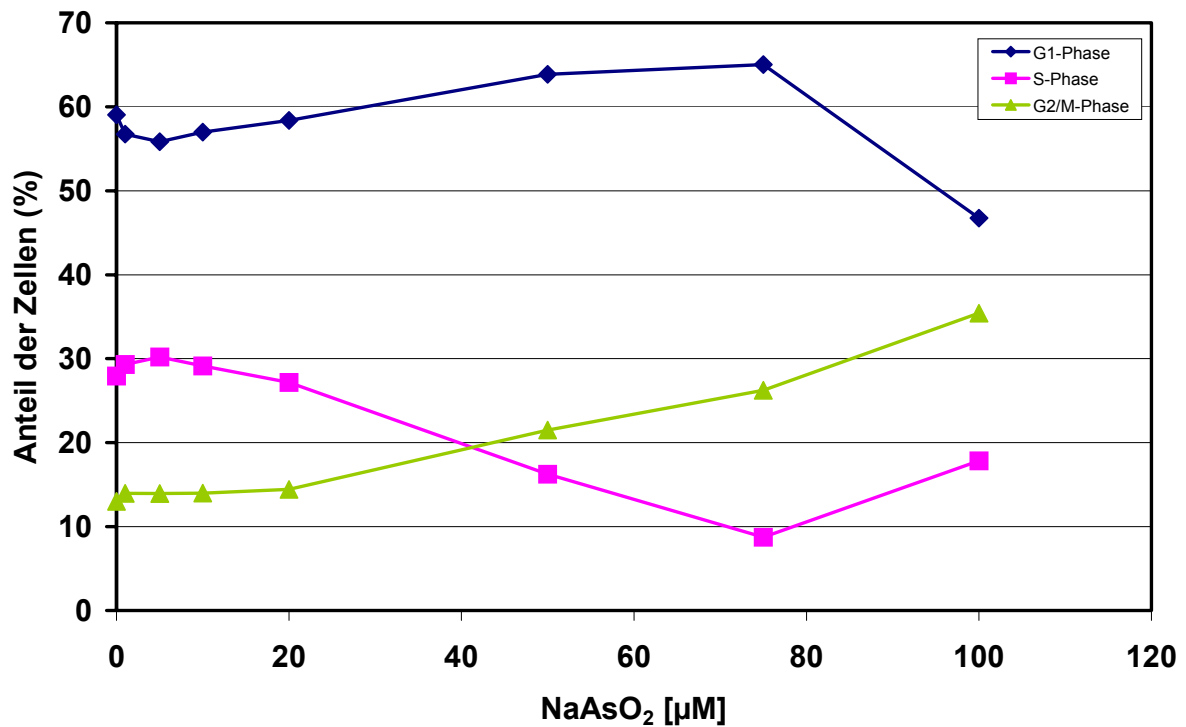


Abbildung 14: Zellzyklusphasenverteilung nach Inkubation mit NaAsO₂. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 20 Stunden mit NaAsO₂ inkubiert. Anschließend wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Konzentrationen $> 20 \mu\text{M}$ As(III) führen zu einer deutlichen Veränderung in der Zellzyklusphasenverteilung. Der Anteil der Zellen in der G₁-Phase nimmt auf einen Wert von ca. 65% bei 75 μM As(III) zu. Gleichzeitig steigt auch der Anteil der G₂/M-Phase-Zellen deutlich an. Entsprechend sinkt der Anteil an S-Phase-Zellen im gleichen Konzentrationsbereich sehr stark ab und liegt bei 75 μM As(III) unter 10%. Während bei hohen Konzentrationen an As(III) der Anteil an G₁-Zellen wieder sinkt, steigt der G₂/M-Anteil weiter. Deutlich ist ein G₂/M-Phasen-Arrest, aber auch ein leichter G₁-Phasen-Arrest, zu beobachten. Ein G₂/M-Phasen-Arrest in HFW-Zellen nach As(III)-Inkubation wurde bereits beschrieben (Yih und Lee, 2000). Zusätzlich konnte in HeLa-Zellen eine gestörte Spindelbildung beobachtet werden, die dann zur Hemmung der Mitose und einem G₂/M-Phasen-Arrest führte (Huang und Lee, 1998).

Ein Arrest sowohl in der G₁- als auch in der G₂-Phase lässt sich mit dem breiten Spektrum an Effekten, die Arsen auf die DNA hat, erklären. Arsen induziert Strangbrüche und andere DNA-Schäden (Dong und Luo, 1993; Yih und Lee, 2000) und stört durch die hohe Affinität zu Thiolgruppen viele Proteine in ihrer Funktion (Kitchin, 2001). So konnten Trouba et al.

(2000) zeigen, dass verschiedene Proteine, die für den Ablauf des Zellzyklusses wichtig sind, durch Arsen gestört werden. Geschädigte Zellen stoppen ihre DNA-Replikation in der G₁- oder G₂-Phase, um den Reparatursystemen die Fehlerkorrektur zu ermöglichen (O'Connor, 1997).

In Abbildung 15 sind die zeitliche Verläufe der S-Phasen-Anteile nach Behandlung mit unterschiedlichen As(III)-Konzentrationen und 10 J/m² UVC-Strahlung zusammengefasst. Die dunkelblaue Linie zeigt die Messwerte der unbehandelten Kontrolle. Dabei erkennt man leichte Schwankungen um einen Wert von ca. 30%. Der abschließende Messpunkt nach 24 Stunden zeigt einen leichten Abfall auf ca. 25% an. Dies könnte in einer zunehmenden Konfluenz der Zellen begründet sein. Der Anteil der S-Phasen-Zellen nach UVC-Bestrahlung (grüne Linie) zeigt einen starken Anstieg im Zeitraum sechs bis zwölf Stunden nach UVC-Bestrahlung (vergleiche Abbildung 8 und Abbildung 9).

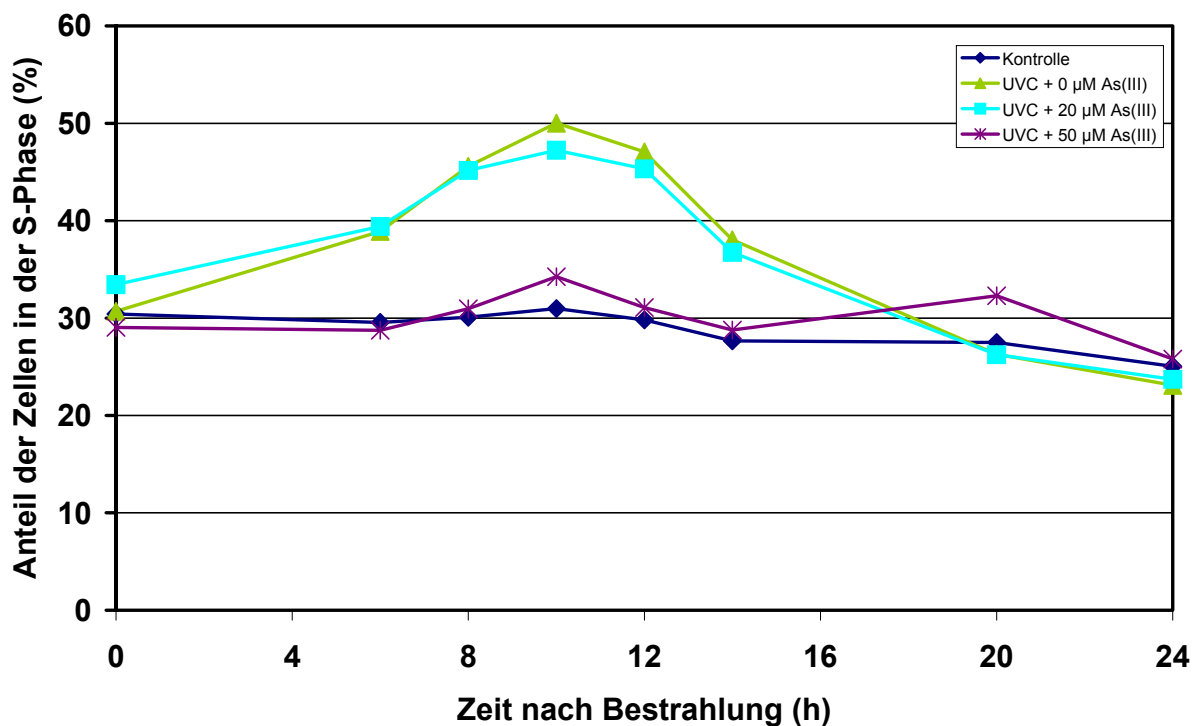


Abbildung 15: Anteil der Zellen in der S-Phase nach Inkubation mit NaAsO₂ und Bestrahlung mit 10 J/m² UVC. 1×10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum 20 Stunden mit NaAsO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 J/m² UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation in Gegenwart von NaAsO₂ wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Nach der Behandlung der Zellen mit 20 µM As(III) und nachträglicher UVC-Bestrahlung erhält man einen fast identischen Verlauf für die Verteilung der Zellen (türkisfarbene Linie), wie nach Behandlung mit UVC allein (grüne Linie). Der entscheidende Unterschied zeigt sich

bei Behandlung mit 50 μM As(III) und UVC (rote Linie). Ein S-Phasen-Arrest ist nun nicht zu erkennen. Die Werte liegen über den gesamten gemessenen Zeitraum im Bereich der unbehandelten Kontrollen. Weder ein S-Phasen-Arrest durch die UVC-Bestrahlung, noch ein G₂/M-Phasen-Arrest durch die Inkubation mit NaAsO₂ ist zu beobachten; beide Effekte werden aufgehoben.

In der Literatur ist ein solcher Effekt bisher selten beschrieben worden. Eine Arbeit mit einem anderen Metall zeigte allerdings, dass ein G₁-Phasen-Arrest durch ionisierende Strahlung nach Cadmiumchlorid-Inkubation nicht mehr zu beobachten war (Meplan et al., 1999). Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Wirkung des Metallions auf p53 und stellte die Vermutung an, dass Strukturänderungen entweder durch direkte Zinkverdrängung aus der Zinkfingerstruktur oder Bindung an Thiolgruppen durch Cadmium der Grund für die Hemmung von p53 und damit des G₁-Phasen-Kontrollpunktes seien.

4.2.3 mRNA-Gehalt von *p21* und *GADD45*

Als nächstes wurde untersucht, ob das zuvor gezeigte Ergebnis unter Umständen auf eine Störung der beiden Zellzykluskontrollgene *p21* und *GADD45* zurückgeführt werden kann. Dazu wurden A549-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an As(III) inkubiert und mit UVC bestrahlt, in Anwesenheit des Metalls nachinkubiert und der Einfluss auf die mRNA-Gehalte von *p21* und *GADD45* untersucht.

4.2.3.1 *p21*

Abbildung 16 zeigt den Effekt von As(III) und UVC-Bestrahlung auf die *p21*-Induktion. Betrachtet man zunächst die As(III)-Inkubation ohne Bestrahlung, zeigt sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Induktion von *p21*. Dabei werden in dem gemessenen Konzentrationsbereich Intensitätssteigerungen um das 3,5-fache erreicht.

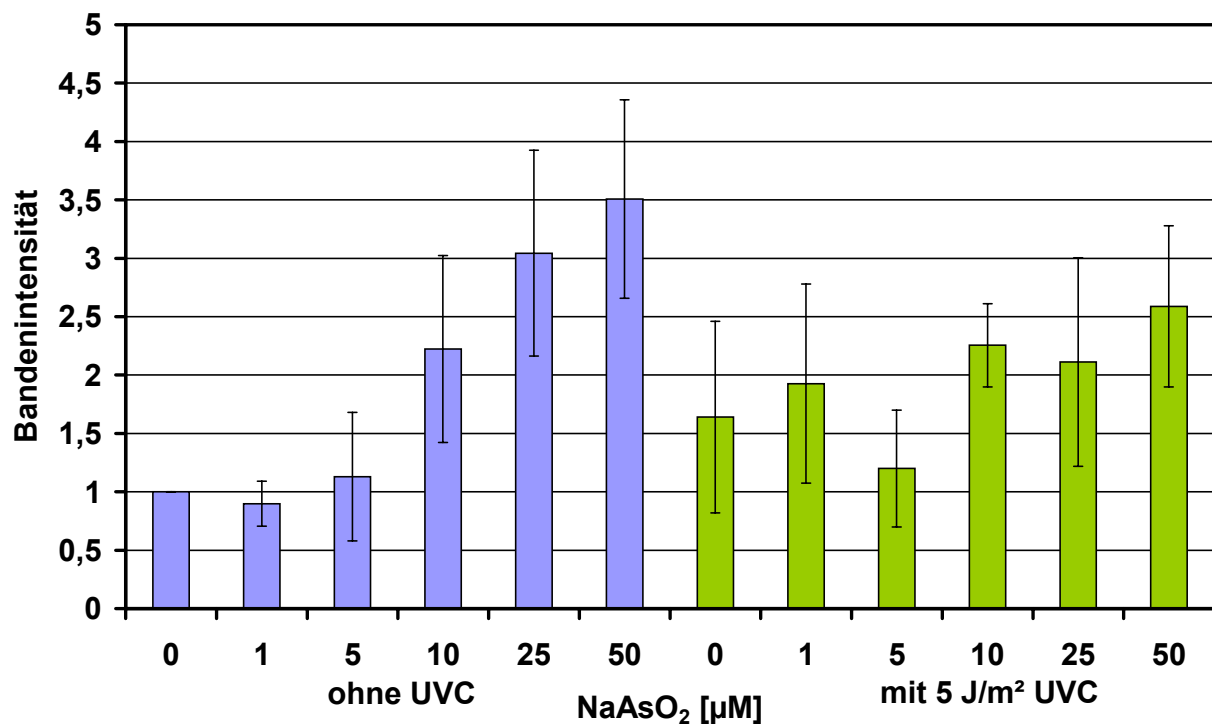


Abbildung 16: Induktion von *p21* nach Inkubation mit NaAsO₂ und 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 20 Stunden mit NaAsO₂ inkubiert. Anschließend wurde mit 5 J/m² UVC bestrahlt und 10 Stunden in Gegenwart von NaAsO₂ nachinkubiert. Danach wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen ± Standardabweichung.

In der Literatur findet man für HFW-Zellen eine Bestätigung dieser deutlichen *p21*-Induktion durch NaAsO₂ (Yih und Lee, 2000). Demgegenüber zeigte sich in W138-Zellen, einer menschlichen Lungenfibroblastenzelllinie, ein solcher Effekt nicht. Hier konnte auch bei 50 µM NaAsO₂ nur eine minimale Induktion von *p21* beobachtet werden und das sowohl nach einmaliger Inkubation als auch nach Langzeitinkubation mit niedrigen As(III)-Konzentrationen (Vogt und Rossman, 2001).

Eine As(III)-Inkubation mit zusätzlicher Bestrahlung induziert einen leichten Anstieg der *p21*-Expression ab As(III)-Konzentration ≥ 10 µM As(III), deren Maximum allerdings deutlich unter dem für 50 µM As(III) allein bleibt. Die zusätzliche Bestrahlung mit 5 J/m² UVC führt also zu einer Abschwächung der As(III)-induzierten *p21*-Expression. Bei einer vergleichbaren Arbeit, bei der die Effekte von As(III) auf die Induktion nach ionisierender Strahlung untersucht wurden, konnte eine deutlich Abnahme der *p21*-Induktion nach gleichzeitiger Behandlung mit 50 µM As(III) und ionisierender Strahlung beobachtet werden (Vogt und Rossman, 2001). Die Autoren deuten diesen Effekt als Folge der Hemmung von

p53 durch As(III), da *p21* durch ionisierende Strahlung nicht p53-unabhängig induziert wird. Die p53-Abhängigkeit von *p21* ist allerdings umstritten (zusammengefasst in Gartel et al., 1996) und so ist es denkbar, dass As(III) die Induktion von *p21* auch unabhängig von der p53-Induktion hervorruft. So ist z.B. eine Strukturänderung von vorgeschalteten Transkriptionsfaktoren nach Bindung von As(III) an Thiolgruppen denkbar.

Die starke *p21*-Induktion nach As(III)-Inkubation deutet auf einen Zusammenhang mit dem auftretenden G₂/M-Phasen-Arrest (Abbildung 14) hin, da eine Beteiligung von p21 im G₂/M-Phasen-Arrest schon beschrieben wurde (Medema et al., 1998). Die deutlich schwächere Induktion nach gemeinsamer Behandlung mit As(III) und UVC und das Ausbleiben eines G₂/M-Arrestes unterstützen diese Annahme.

4.2.3.2 *GADD45*

Der Einfluss einer Behandlung von A549-Zellen mit As(III) und UVC auf das Zellzykluskontrollgen *GADD45* ist in Abbildung 17 dargestellt.

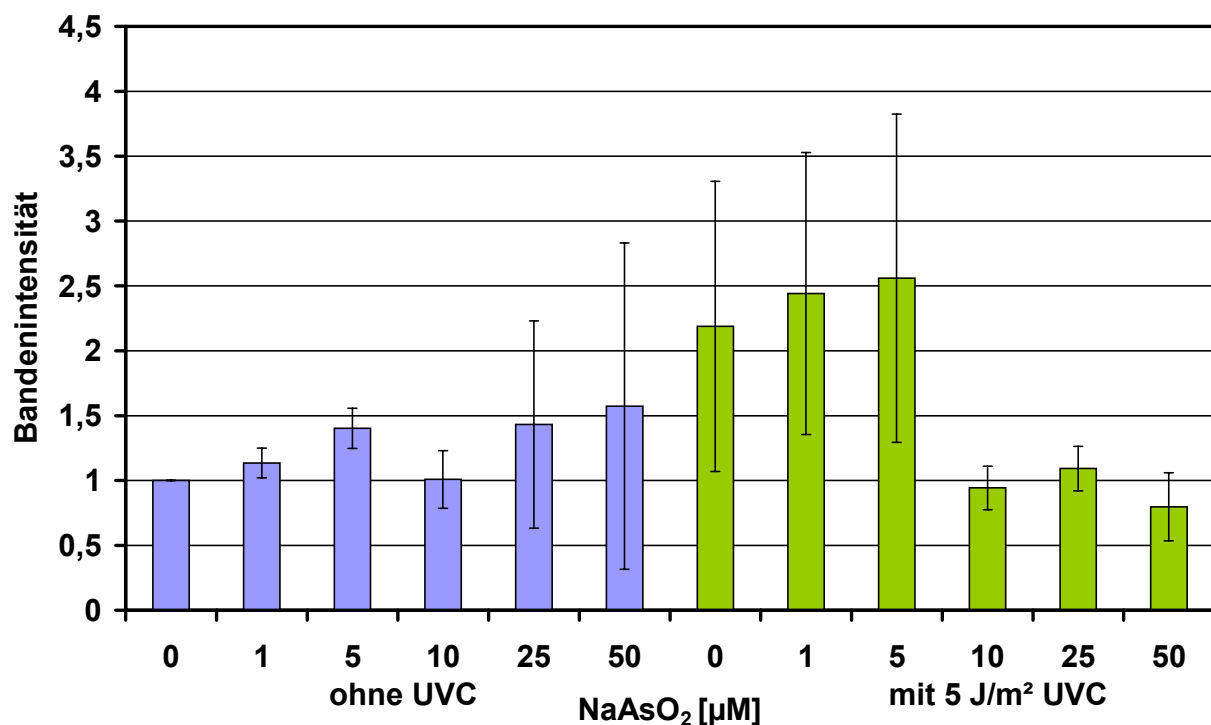


Abbildung 17: Induktion von *GADD45* nach Inkubation mit NaAsO₂ und 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 20 Stunden mit NaAsO₂ inkubiert. Anschließend wurde mit 5 J/m² UVC bestrahlt und 10 Stunden in Gegenwart von NaAsO₂ nachinkubiert. Danach wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen ± Standardabweichung.

In Abbildung 17 ist ein deutlicher Unterschied zu den Ergebnissen für *p21* zu erkennen. Bis 10 μM Arsen(III) ist keine Induktion von *GADD45* zu beobachten und die geringe Steigerung bei den höheren Konzentrationen wird durch die großen Fehlerbalken relativiert. Bei einer Genexpressionsanalyse von UROtsa-Zellen mit Hilfe eines cDNA-Mikroarrays wurde ebenfalls eine schwache *GADD45*-Induktion nach 10 μM As(III) gefunden, die nach As(III)-Inkubation mit 50 μM sehr stark ausgeprägt war (Simeonova et al., 2000).

Die gleichzeitige Behandlung mit As(III) und UVC zeigt im niedrigen Konzentrationsbereich bis zu 5 μM As(III) in etwa den durch UVC-Bestrahlung ausgelösten Anstieg von *GADD45*. Ab 10 μM As(III) ist eine Induktion von *GADD45* nicht mehr zu beobachten, der mRNA-Gehalt befindet sich auf dem Niveau der Kontrollzellen. As(III) verhindert damit die durch UVC-Strahlung ausgelöste *GADD45*-Induktion. Dieser Befund ist interessant und deutet auf einen Zusammenhang zwischen der fehlenden Induktion von *GADD45* und dem ausbleibenden S-Phasen-Arrest nach gemeinsamer Behandlung mit As(III) und UVC, der in den Zellzyklusmessungen beobachtet wurde (Abbildung 15), hin. *GADD45* interagiert (Yang et al., 2000) mit weiteren Zellzyklusproteinen, wie z.B. PCNA, welches eine wichtige Funktion in der S-Phase und in der Reparatur von UVC-induzierten Schäden hat (Balajee und Geard, 2001). Die ausbleibende Induktion von *GADD45* könnte eine Interaktion mit PCNA hemmen und so zu einer Störung der S-Phasen-Kontrolle und der damit verbundenen Aktivierung von Reparaturmechanismen führen.

4.3 Cadmiumchlorid

4.3.1 Koloniebildung

Im folgenden Diagramm (Abbildung 18) ist die Beeinträchtigung der Koloniebildungsfähigkeit durch Cd(II) allein und in Kombination mit UVC-Strahlung dargestellt.

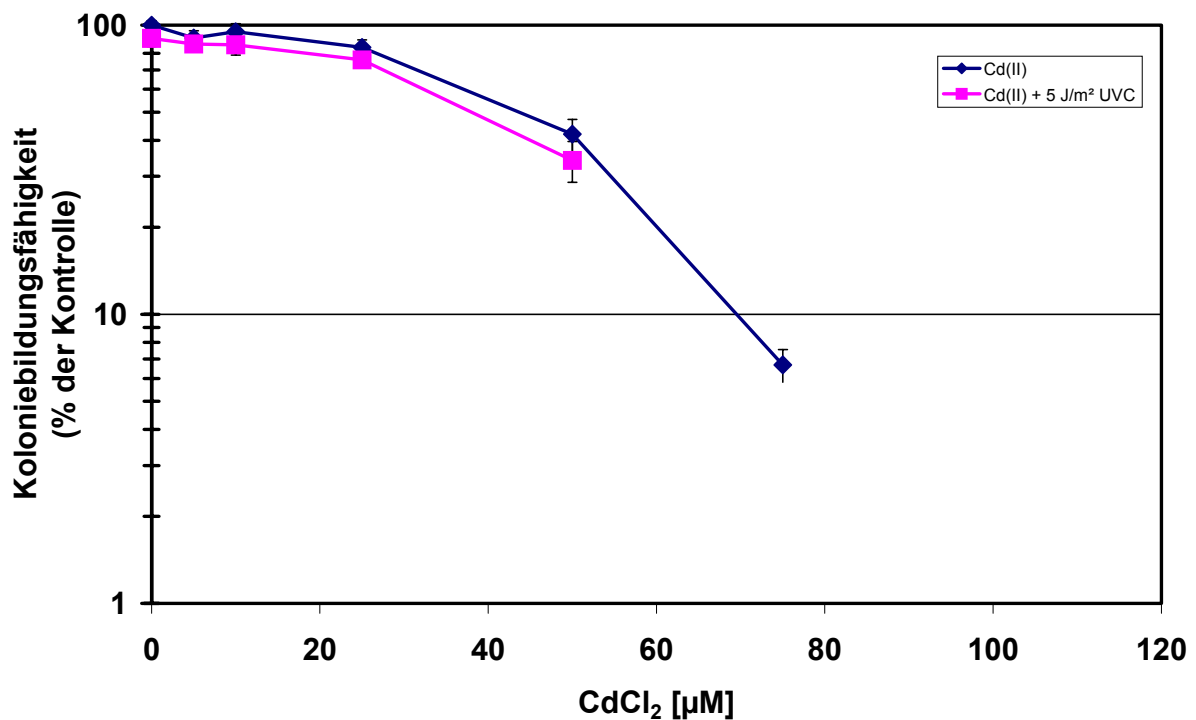


Abbildung 18: Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen nach 18-stündiger Inkubation mit CdCl₂ und 5 J/m² UVC. 5x10⁵ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 18 Stunden mit CdCl₂ inkubiert und anschließend mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert und 300 Zellen für 7 Tage kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6-fach Bestimmungen ± Standardabweichung.

Wie zu erkennen ist, nimmt die Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen konzentrationsabhängig ab. Bis 25 μM Cd(II) sinkt sie nur leicht, und bei ungefähr 30 μM Cd(II) können noch rund 70% der Zellen Kolonien bilden. Auf die Koloniebildungsfähigkeit der A549-Zellen nach UVC-Bestrahlung hat Cd(II) keinen zusätzlichen Effekt. Konzentrationsabhängig nimmt der Anteil der gebildeten Kolonien ab und bei 5 J/m² UVC und 50 μM Cd(II) sind es noch ca. 34% im Vergleich zur Kontrolle. Bei Untersuchungen mit einer 2-stündigen Inkubationszeit war bei 100 μM Cd(II) eine Koloniebildungsfähigkeit von 90% zu beobachten und auch bei 150 μM zeigten noch rund 60% der Zellen diese Fähigkeit (Thuy, 2001).

In der Literatur beschriebene Zytotoxizitätsuntersuchungen mit verschiedenen A549-Stämmen zeigten große Unterschiede. In einem Cadmium-resistenten Stamm wurde ein IC_{50} -Wert von $36,8 \mu\text{M}$ nach einer Langzeitinkubation ermittelt, während in einem anderen Stamm der IC_{50} -Wert bei $6,9 \mu\text{M Cd(II)}$ lag (Hatcher et al., 1995). Dieser gravierende Unterschied ist auf einen erhöhten Glutathionspiegel in der resistenten Zelllinie zurückzuführen (Hatcher et al., 1995; Kang und Enger, 1990). Bei den in dieser Arbeit verwendeten A549-Zellen scheint es sich ebenfalls um einen Cadmium-resistenten Stamm zu handeln.

4.3.2 Zellzyklusphasenverteilung

In Abbildung 19 ist der Effekt von verschiedenen Cd(II) -Konzentrationen auf die Zellzyklusphasenverteilung der A549-Zellen dargestellt.

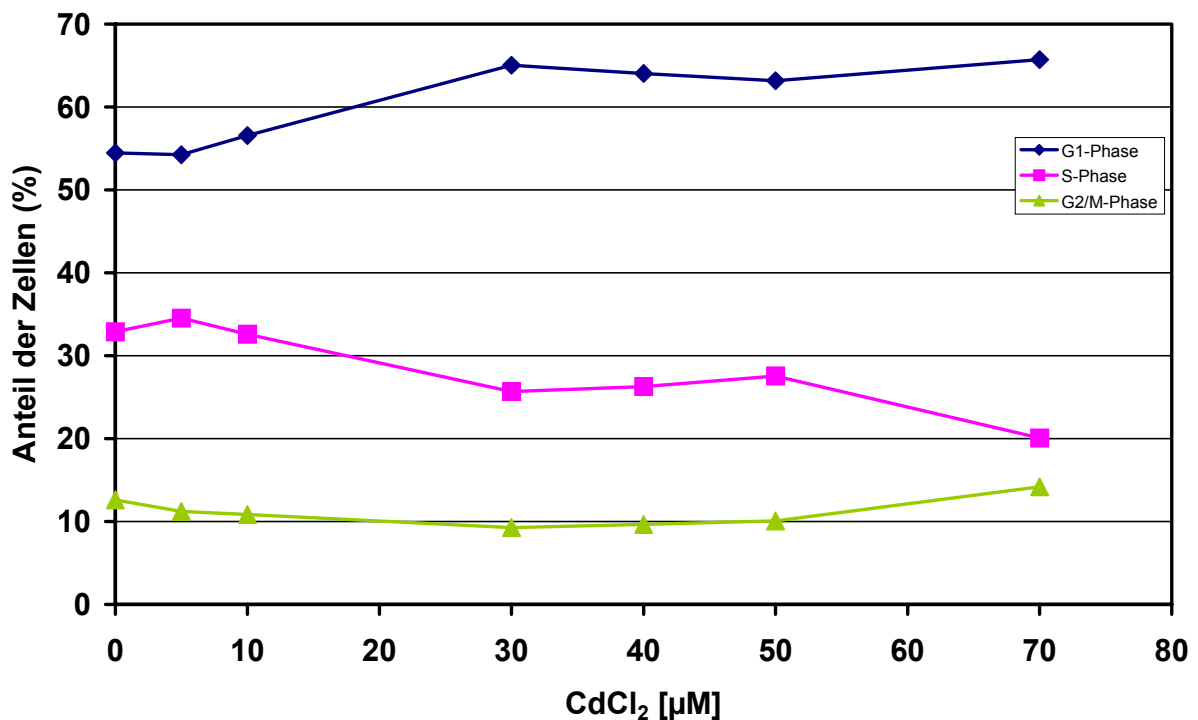


Abbildung 19: Zellzyklusphasenverteilung nach Inkubation mit CdCl_2 . 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 18 Stunden mit CdCl_2 inkubiert. Anschließend wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Es lässt sich erkennen, dass es zu einem leichten, konzentrationsabhängigen G_1 -Phasen-Arrest kommt. Der Anteil der Zellen in der G_1 -Phase erhöht sich im Konzentrationsbereich von 10 bis 30 $\mu\text{M Cd(II)}$ von ca. 55% auf ungefähr 65%. Dieser Anteil an G_1 -Phasen-Zellen bleibt dann im gesamten gemessenen Konzentrationsbereich konstant. Der Anteil der Zellen in der S-Phase sinkt von ca. 33% bei der Kontrolle über etwa 25% bei 30 $\mu\text{M Cd(II)}$ auf ca. 20% bei

70 μM Cd(II). Der G₂/M-Anteil schwankt im gemessenen Konzentrationsbereich zwischen 9 und 14%. Cd(II) verursacht somit ab 30 μM einen G₁-Phasen-Arrest.

In der Literatur wurde bis 30 μM Cd(II) kein Effekt auf die Zellzyklusphasenverteilung von MCF7-Zellen beobachtet (Meplan et al., 1999), allerdings betrug die Inkubationszeit nur vier Stunden. Bei Untersuchungen mit 2-stündiger Inkubationszeit war in A549-Zellen erst bei 150 μM Cd(II) ein G₁-Phasen-Arrest nachzuweisen (Thuy, 2001).

In der folgenden Abbildung sind die Anteile der Zellen in der S-Phase nach Behandlung mit Cd(II) und UVC dargestellt.

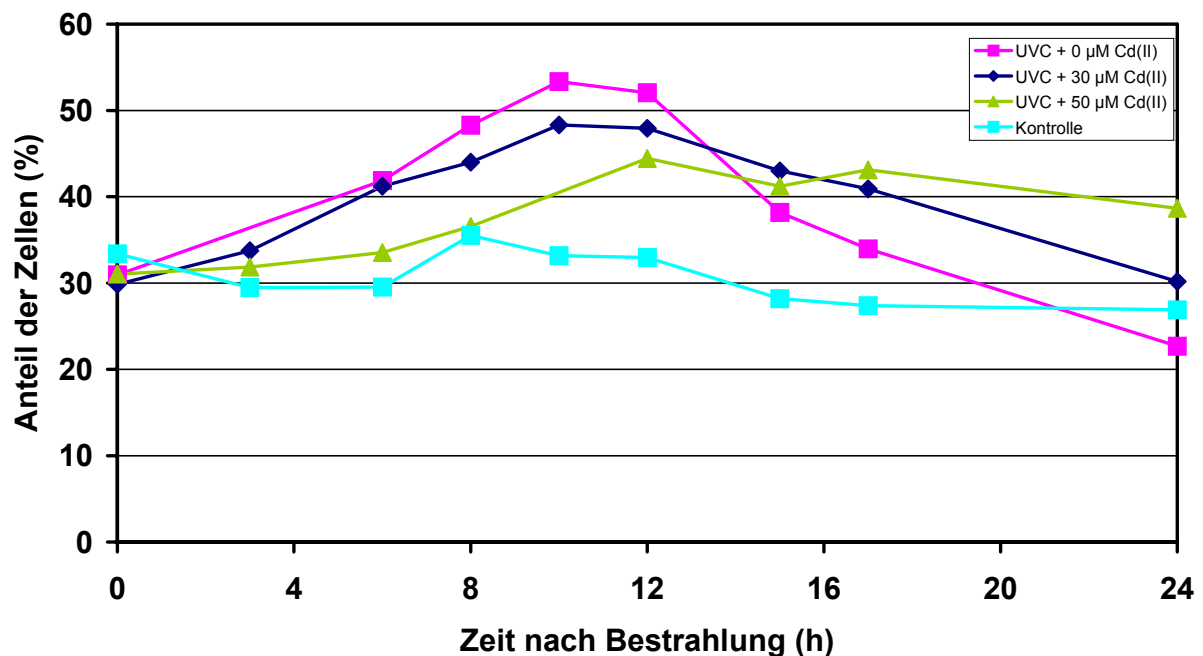


Abbildung 20: Anteil der Zellen in der S-Phase nach Inkubation mit CdCl₂ und Bestrahlung mit 5 J/m² UVC. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 18 Stunden mit CdCl₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation in Gegenwart von CdCl₂ wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Betrachtet man den Anteil der S-Phasen-Zellen im zeitlichen Verlauf über 24 Stunden (Abbildung 20) nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Cd(II) in Kombination mit UVC-Strahlung, dann zeigt sich, dass eine Inhibierung des UVC-induzierten S-Phasen-Arrestes wie bei As(III) beschrieben nicht zu beobachten ist. Es kommt aber zum einen zu einer Verschiebung des S-Phasen-Arrestes auf einen späteren Zeitpunkt und zum anderen zu einer deutlichen Abschwächung. UVC-Bestrahlung ohne zusätzliche Inkubation

mit Cd(II) (rote Linie) bewirkt ein Arrestmaximum nach zehn bis zwölf Stunden und einen Rückgang auf das Kontrollniveau nach 17 bis 24 Stunden. Demgegenüber sind bei der Kombinationsbehandlung mit 30 μM Cd(II) (dunkelblaue Linie) nach 17 Stunden noch über 40% der Zellen in der S-Phase und erst nach 24 Stunden ist das Kontrollniveau erreicht. Bei 50 μM Cd(II) und UVC-Bestrahlung (grüne Linie) ist dagegen ein Arrest mit einem Maximalwert von ca. 44% über ein längeres Zeitintervall (12 bis 17 Stunden) zu beobachten und auch nach 24 Stunden liegt der Anteil der Zellen in der S-Phase noch deutlich über dem des Kontrollniveaus. Der nach alleiniger Behandlung mit Cd(II) aufgetretene G₁-Phasen-Arrest ist in Kombination mit UVC-Strahlung nicht mehr zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

Eine ähnliche Untersuchung nach gemeinsamer Behandlung mit Cd(II) und ionisierender Strahlung in MCF7-Zellen zeigte, dass ein durch ionisierende Strahlung hervorgerufener G₁-Phasen-Arrest bei Cd(II)-Konzentrationen $\geq 20 \mu\text{M}$ aufgehoben wird (Meplan et al., 1999). Diese Arbeit konzentrierte sich auf die Wirkung von Cd(II) auf p53 und vermutete einen Zusammenhang zwischen Strukturänderungen und einer Hemmung des G₁-Phasen-Kontrollpunktes. In der hier vorliegenden Arbeit zeigt sich ein inhibierender Effekt auf die Zellzykluskontrolle erst bei höheren Konzentrationen. Dies könnte mit dem Zelltyp und dem Arrest in der S-Phase zusammenhängen. Trotzdem könnten die Mechanismen, die zur Hemmung des S-Phasen-Kontrollpunktes führen die gleichen sein. Aufgrund der starken Affinität von Cd(II) zu Thiolgruppen können die Strukturen der Kontrollproteine gestört und damit eine Hemmung herbeigeführt werden. Besonders für Kontrollproteine mit Zinkfingerstruktur ist eine Konkurrenz von Cd(II) mit Zn(II) denkbar, was dann zu einer Strukturänderung und Inhibition der Funktion führen könnte (Hartwig, 2001). Für p53 konnte eine abnehmende DNA-Bindungsaktivität durch Strukturänderung nach Cd(II)-Inkubation beobachtet werden (Meplan et al., 1999).

4.3.3 mRNA-Gehalt von *p21* und *GADD45*

4.3.3.1 *p21*

In Abbildung 21 ist der Effekt von Cd(II) und UVC-Bestrahlung auf die *p21*-Induktion dargestellt. Die quantitative Auswertung zeigt bis zu einer Konzentration von 50 μM Cd(II) keinen Effekt. Betrachtet man das Ergebnis nach Cd(II)-Inkubation und UVC-Bestrahlung, so ist eine moderate Erhöhung der Expression zu beobachten. Bei Konzentrationen von 1 bis 30 μM Cd(II) kommt es lediglich zu einer leichten Erhöhung des *p21*-Gehaltes. Für 50 μM

Cd(II) ist eine Verdopplung der Bandenintensität zu beobachten; die UVC und Cd(II)-induzierte *p21*-Expression nimmt deutlich zu.

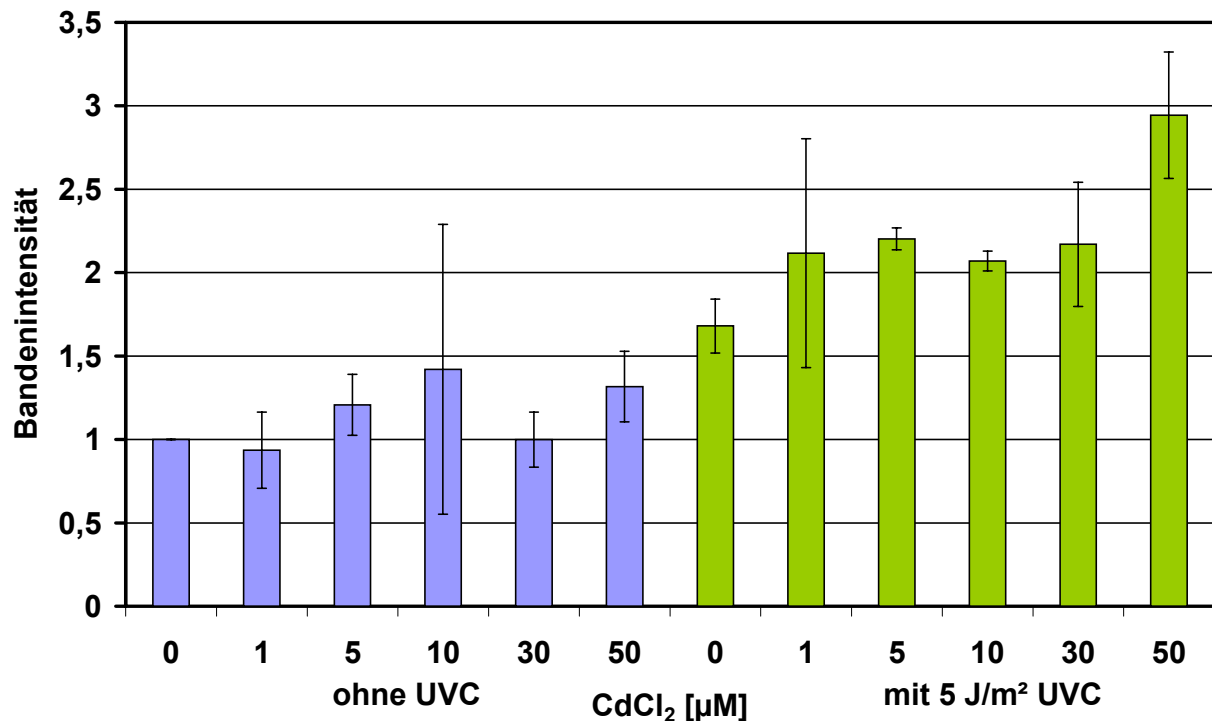


Abbildung 21: Induktion von *p21* nach Inkubation mit CdCl₂ und 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 18 Stunden mit CdCl₂ inkubiert. Anschließend wurde mit 5 J/m² UVC bestrahlt und 10 Stunden in Gegenwart von CdCl₂ nachinkubiert. Danach wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen ± Standardabweichung.

Die Verstärkung der *p21*-Induktion nach gemeinsamer Behandlung mit Cd(II) und UVC könnte auf einen Zusammenhang mit der veränderten Zellzyklusphasenverteilung hindeuten (Abbildung 20). Eine stärkere *p21*-Expression zehn Stunden nach der Behandlung lässt auf ein längeres Anhalten oder eine Verzögerung der Induktion schließen. Handelt es sich um eine verzögert auftretende Induktion würde dies mit dem verzögerten S-Phasen-Arrest nach 50 µM Cd(II) und UVC-Bestrahlung (Abbildung 20) übereinstimmen und diese Verschiebung erklären. Für die Klärung dieser Theorie sind allerdings weitere Untersuchungen über die Zeitabhängigkeit der *p21*-Induktion nach Cd(II)-Inkubation und UVC-Bestrahlung erforderlich.

Dass Cd(II) einen Einfluss auf die Zellzykluskontrollgene hat, ist nicht überraschend. Neben einer Konkurrenz mit Zink in Zinkfingerproteinen, wird auch ein Effekt auf die zellulären Signalwege durch einen Einfluss auf Ca(II) diskutiert, was die Verstärkung oder

Verminderung von Genexpressionsmustern zur Folge haben kann (Beyersmann und Hechtenberg, 1997).

4.3.3.2 *GADD45*

Der Einfluss einer Behandlung von A549-Zellen mit Cd(II) und UVC auf das Zellzykluskontrollgen *GADD45* ist in Abbildung 22 dargestellt.

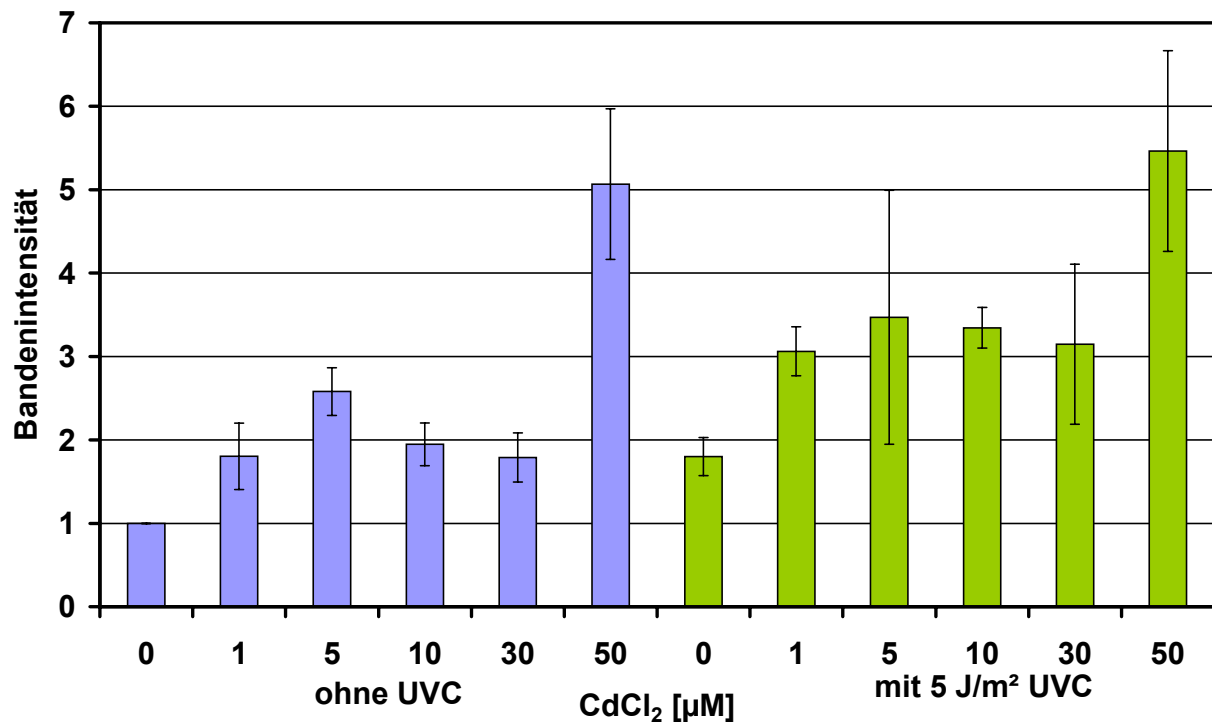


Abbildung 22: Induktion von *GADD45* nach Inkubation mit CdCl₂ und 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 18 Stunden mit CdCl₂ inkubiert. Anschließend wurde mit 5 J/m² UVC bestrahlt und 10 Stunden in Gegenwart von CdCl₂ nachinkubiert. Danach wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen ± Standardabweichung.

Die Inkubation mit 1 µM Cd(II) erzeugt eine Verdopplung der Bandenintensität, die bis 30 µM Cd(II) ungefähr gleichbleibend ist. 50 µM Cd(II) induzieren ein 5-fach stärkeres Signal im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach der Behandlung mit Cd(II) und UVC ist ein ähnlicher konzentrationsabhängiger Verlauf wie nach Cd(II)-Inkubation allein zu beobachten. Für Cd(II)-Konzentrationen von 1 bis 30 µM ist fast eine Verdopplung der *GADD45*-Induktion festzustellen. 50 µM Cd(II) und UVC-Strahlung induzieren *GADD45* sehr deutlich. Diese starke Induktion bei der höchsten Konzentration an Cd(II) könnte eine Ursache für die Verschiebung und Verlängerung des S-Phasen-Arrestes nach gemeinsamer Behandlung mit 50 µM Cd(II) und UVC-Strahlung sein. Wie bereits für *p21* diskutiert

(4.3.3.1), müssten zur Stützung einer solchen Theorie zeitabhängige Untersuchungen zur Induktion von *GADD45* nach Behandlung mit Cd(II) und UVC vorgenommen werden.

4.4 Cobaltchlorid

4.4.1 Koloniebildung

In Abbildung 23 ist die Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen nach Behandlung mit Co(II) allein und zusammen mit 5 J/m² UVC-Bestrahlung dargestellt. Co(II) hat in einem Konzentrationsbereich bis 500 µM Co(II) nur einen schwachen Effekt auf den Anteil der gebildeten Kolonien, im Vergleich zur Kontrolle liegt er bei ca. 84%. Nach der Inkubation mit 800 µM Co(II) liegt der Anteil der Kolonien bei ca. 45% und mit 1000 µM Co(II) bei etwa 25% im Vergleich zur Kontrolle. Erst bei einer Inkubation mit ungefähr 1500 µM Co(II) werden keine Kolonien mehr gebildet (Kostelac, 2001).

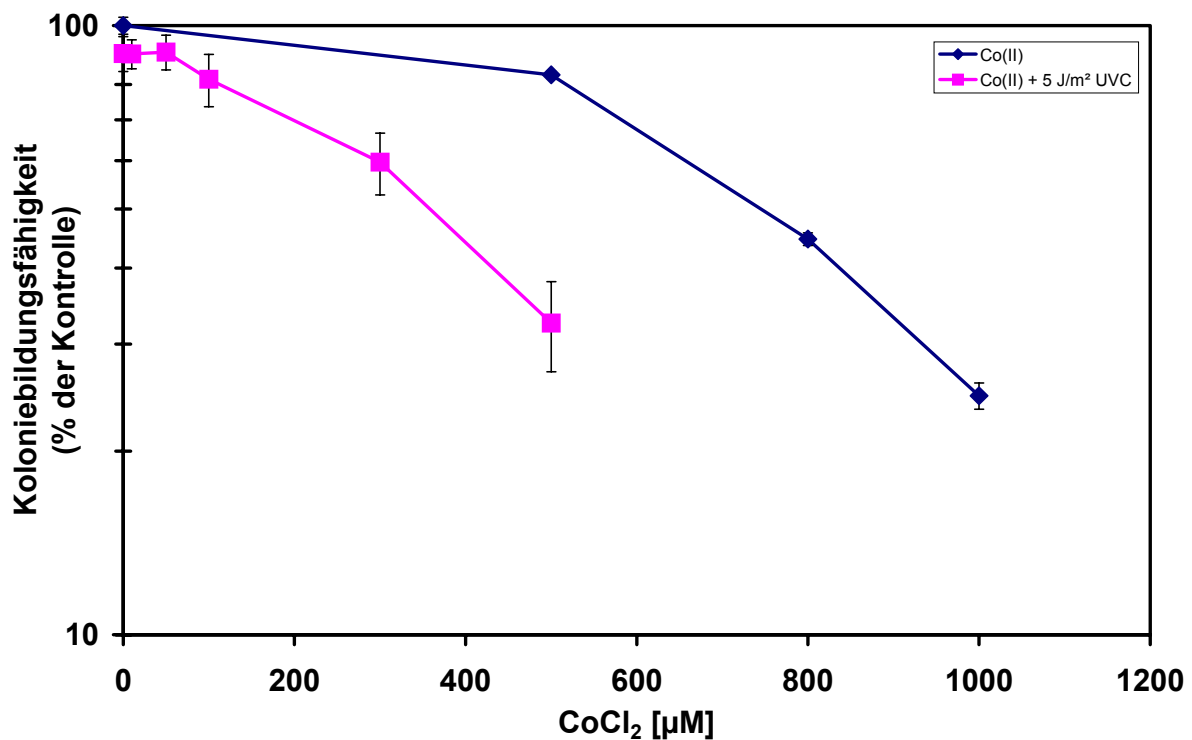


Abbildung 23: Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen nach 25-stündiger Inkubation mit CoCl₂ und 5 J/m² UVC. 5x10⁵ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 25 Stunden mit CoCl₂ inkubiert und anschließend mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert und 300 Zellen für 7 Tage kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6-fach Bestimmungen ± Standardabweichung.

Die zusätzliche Behandlung mit Co(II) verstärkt den UVC-induzierten zytotoxischen Effekt deutlich. Bei den niedrigen Konzentrationen an Co(II) von 50 und 100 µM liegen die Anteile der gebildeten Kolonien etwa 10% unter denen der Kontrolle. Bei 300 µM Co(II) liegt der Kolonienanteil bei ca. 60% und bei 500 µM Co(II) bei etwa 33%. Dieser verstärkende Effekt durch Co(II)-Inkubation nach UVC-Bestrahlung wurde ebenfalls für V79-Zellen beschrieben (Hartwig et al., 1991).

4.4.2 Zellzyklusphasenverteilung

Zunächst wurden Messungen durchgeführt, die den Einfluss steigender Konzentrationen an Co(II) auf die Zellzyklusphasenverteilung untersuchten (Abbildung 24).

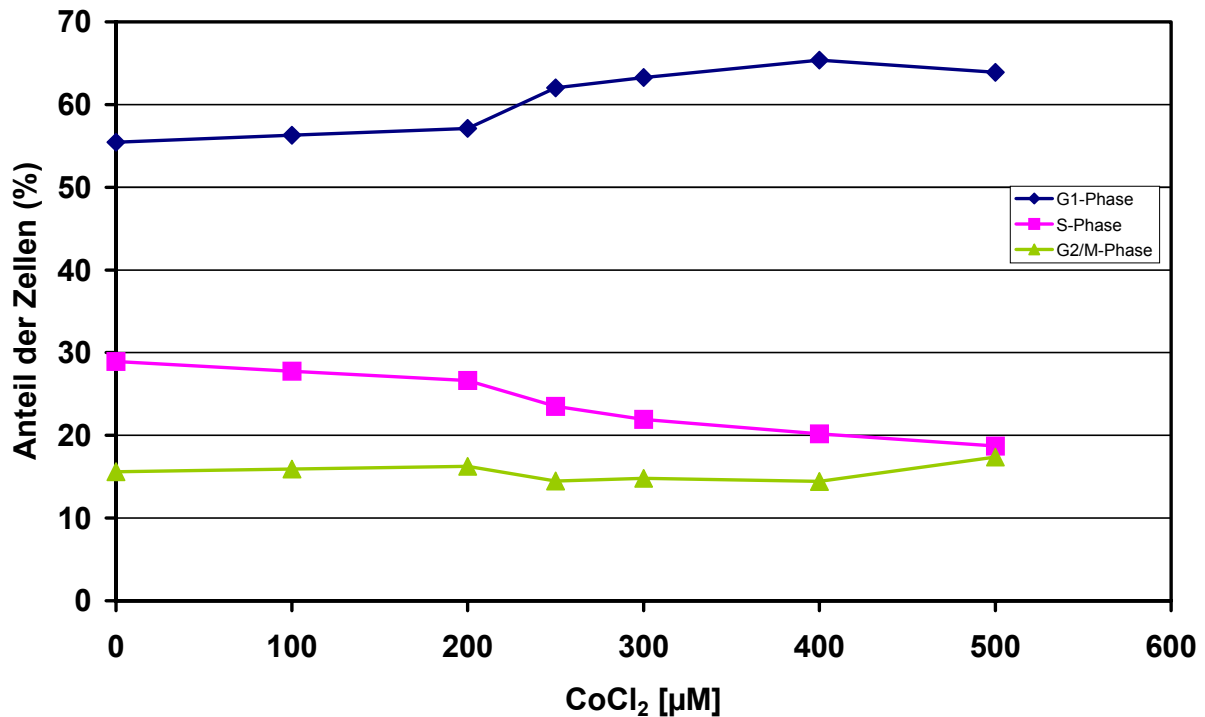


Abbildung 24: Zellzyklusphasenverteilung nach Inkubation mit CoCl₂. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 25 Stunden mit CoCl₂ inkubiert. Anschließend wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Bis zu 200 μM Co(II) ist kein Effekt auf die Verteilung der Zellen in den einzelnen Phasen zu beobachten. Ab 250 μM Co(II) steigt der Anteil der Zellen in der G₁-Phase an und erreicht bei 400 μM ein Maximum. Dort liegt der G₁-Phasen-Anteil ungefähr bei 65%. Der Anteil der Zellen in der S-Phase nimmt im gleichen Konzentrationsbereich entsprechend ab. Die Anteile fallen von ca. 29% bei den unbehandelten Zellen über etwa 27% bei 200 μM Co(II) auf 20% bei 400 μM Co(II). Der Anteil der Zellen in der G₂/M-Phase bleibt dagegen über den gesamten Konzentrationsbereich bei ungefähr 15%. Co(II) verursacht demnach ab Konzentrationen von 250 μM einen G₁-Phasen-Arrest.

Ein solcher Arrest lässt sich dadurch erklären, dass Co(II) direkte Schäden an der DNA verursacht. Geschädigte Zellen stoppen ihre DNA-Replikation in der G₁- oder G₂-Phase, um den Reparatursystemen die Möglichkeit zum Eingreifen zu geben (O'Connor, 1997). Demgegenüber findet sich in der Literatur in CHO-Zellen ein S-Phasen-Arrest nach 72-stündiger Behandlung mit Co(II) (Costa et al., 1982). Die deutlich längere Inkubationszeit

könnte dabei ein Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse sein. Zusätzlich haben der Zelltyp und die Kulturbedingungen einen Einfluss auf die zelluläre Antwort nach exogenem Stress.

In Abbildung 25 ist zunächst der Anteil der Zellen in der G₁-Phase nach Behandlung mit Co(II) und UVC im zeitlichen Verlauf dargestellt.

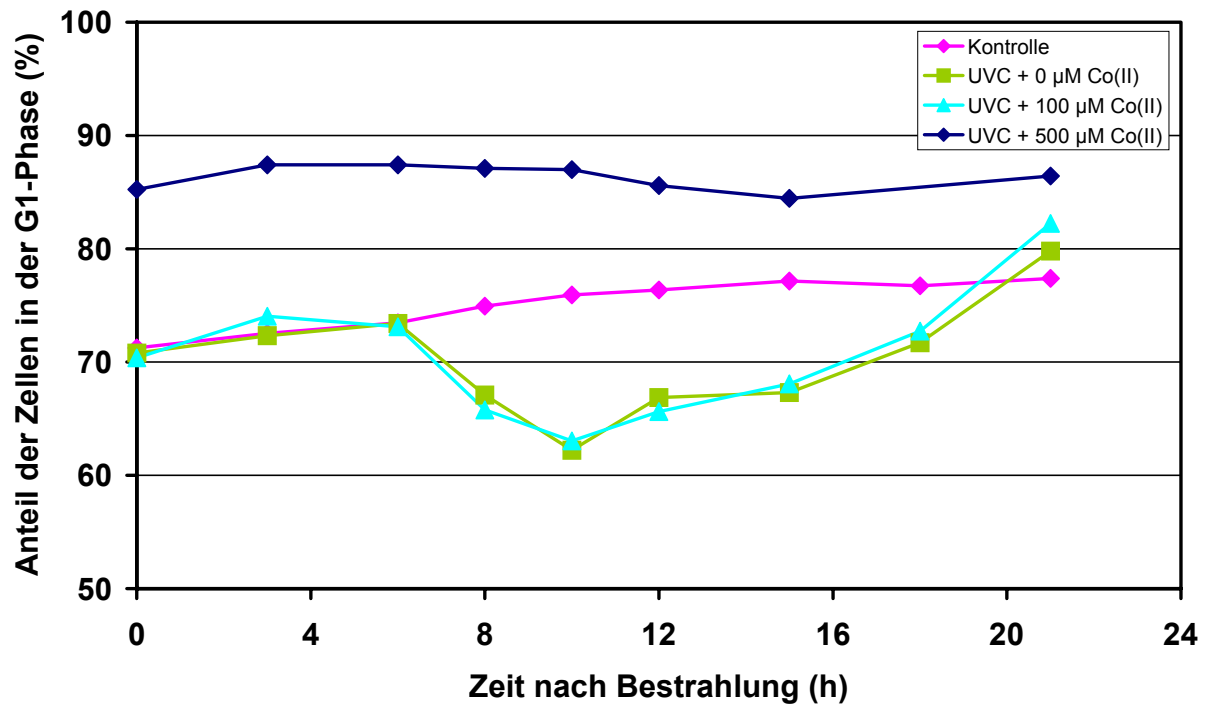


Abbildung 25: Anteil der Zellen in der G₁-Phase nach Inkubation mit CoCl₂ und Bestrahlung mit 5 J/m² UVC. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 25 Stunden mit CoCl₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation in Gegenwart von CoCl₂ wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Die rote Linie zeigt den Verlauf der Messwerte der unbehandelten Kontrolle. Der Anteil in der G₁-Phase beträgt etwa 71% und nimmt während des Messzeitraumes auf einen Anteil von ca. 77% zu. Diese Erhöhung könnte auf eine zunehmenden Konfluenz der Zellen zurückzuführen sein. Im Vergleich zu den bisherigen Messungen ist der Anteil der Zellen in der G₁-Phase um ca. 10% erhöht. Für die Messungen zur Zellzyklusphasenverteilung der A549-Zellen nach Behandlung mit Co(II) und UVC musste ein Durchflusszytometer von Beckton Dickinson benutzt werden. An den qualitativen Aussagen und relativen Änderungen der Zellverteilung änderte dieser Gerätewechsel nichts (die Ergebnisse wurden nachträglich an dem alten Gerät von Partec überprüft und bestätigt, Daten nicht gezeigt), wenn auch die Absolutwerte abweichen.

Für die Zellen, die mit UVC bestrahlt wurden, zeigt sich ein Rückgang des Zellanteils in der G₁-Phase (grüne Linie). Nach acht Stunden sinkt der Anteil der Zellen in der G₁-Phase auf ungefähr 67%. Zehn Stunden nach der Bestrahlung sind etwa 63% der Zellen in der G₁-Phase. Anschließend steigt der Anteil der Zellen langsam wieder an und nach 21 Stunden ist der Kontrollwert erreicht. Bei einer gemeinsamen Behandlung mit 100 µM Co(II) und UVC ist ein fast identischer Verlauf der G₁-Phasen-Verteilung wie bei den UVC-bestrahlten Zellen zu beobachten; diese Konzentration zeigt keinen Einfluss. Demgegenüber ist bei Inkubation mit 500 µM Co(II) und UVC-Bestrahlung ein Absinken des G₁-Anteils nicht mehr zu beobachten. Der Anteil der Zellen in der G₁-Phase liegt im gesamten gemessenen Zeitraum bei ca. 86%; der G₁-Phasen-Arrest ist weiterhin zu beobachten.

In Abbildung 26 sind die Anteile der Zellen in der S-Phase nach Behandlung mit Co(II) und UVC aufgetragen.

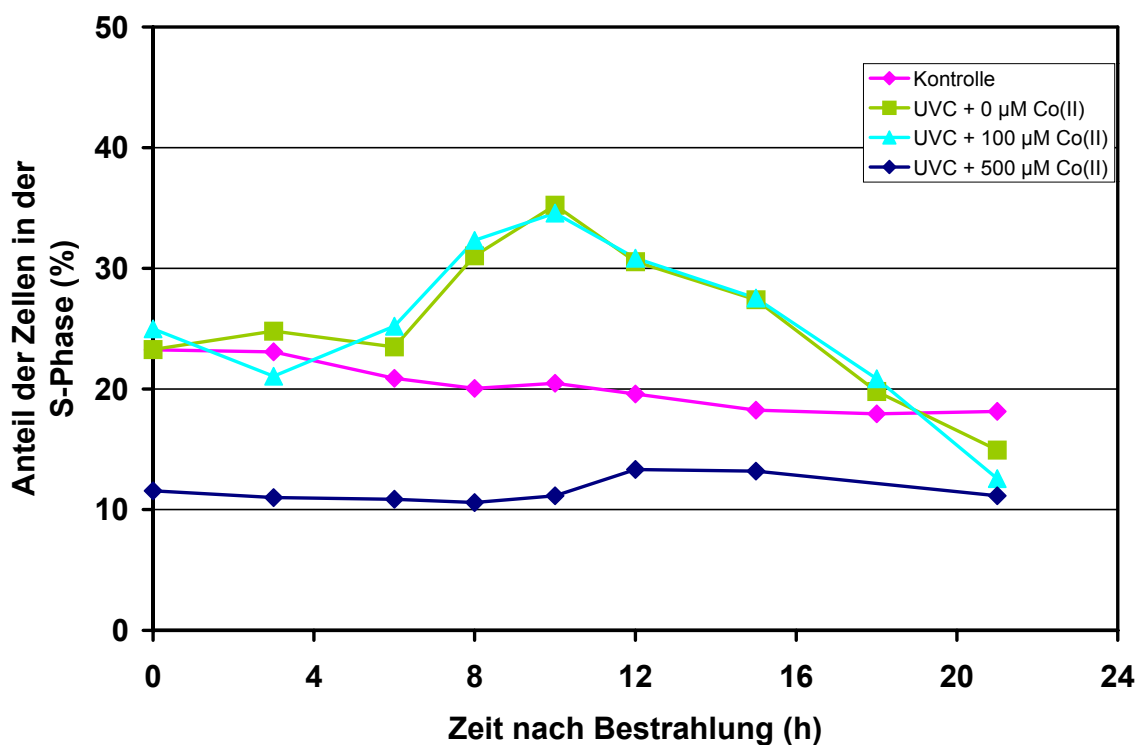


Abbildung 26: Anteil der Zellen in der S-Phase nach Inkubation mit CoCl₂ und Bestrahlung mit 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 25 Stunden mit CoCl₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation in Gegenwart von CoCl₂ wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Der Anteil der Zellen in der S-Phase liegt für die unbehandelten Kontrollen (rote Linie) bei ca. 24%. Im Verlauf von 24 Stunden nimmt dieser Anteil auf etwa 18% ab. Die Anteile der Zellen in der S-Phase sind niedriger als in den vorangegangenen Zellzyklusmessungen (z.B.

Abbildung 15). Dies ist, wie bereits für Abbildung 25 beschrieben, auf die Verwendung eines zweiten Durchflusszytometers zurückzuführen. Die qualitativen Aussagen sind davon aber nicht betroffen.

Betrachtet man die UVC-bestrahlten Zellen, die nicht zusätzlich mit Co(II) (grüne Linie) oder nur mit 100 μM Co(II) (türkisfarbene Linie) behandelt wurden, befinden sich zehn Stunden nach der Bestrahlung 15% mehr Zellen in der S-Phase als bei den Kontrollzellen. Anschließend sinkt der Anteil der Zellen ab und nach etwa 18 Stunden ist der Kontrollwert erreicht. Bei UVC-Bestrahlung und gleichzeitiger Inkubation mit 500 μM Co(II) (dunkelblaue Linie) sind nur noch etwa 12% der Zellen in der S-Phase und ein UVC-induzierter S-Phasen-Arrest ist nicht festzustellen. Der durch 500 μM Co(II) induzierte G₁-Phasen-Arrest scheint so stark zu sein, dass in dem gemessenen Zeitraum die Arretierung nicht aufgehoben wird und der Einfluss durch UVC-Bestrahlung auf den S-Phasen-Arrest nicht zu beobachten ist. Es ist denkbar, dass Messungen nach einer längeren Nachinkubationszeit eine Auflösung des G₁-Phasen-Arrestes gezeigt hätten.

In der Literatur konnte zu Untersuchungen über die Wirkung von Co(II) auf die Zellzyklusphasenverteilung keine Angaben gefunden werden.

4.4.3 mRNA-Gehalt von *p21* und *GADD45*

Als nächstes wurden die Effekte der gemeinsamen Behandlung von Co(II) und UVC auf die beiden Zellzykluskontrollgene *p21* und *GADD45* untersucht.

4.4.3.1 *p21*

Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Co(II) zeigt bis 300 μM keinen Einfluss auf die Erhöhung der *p21*-Expression (Abbildung 27). Bei 500 μM Co(II) steigt die Bandenintensität auf das 1,5-fache.

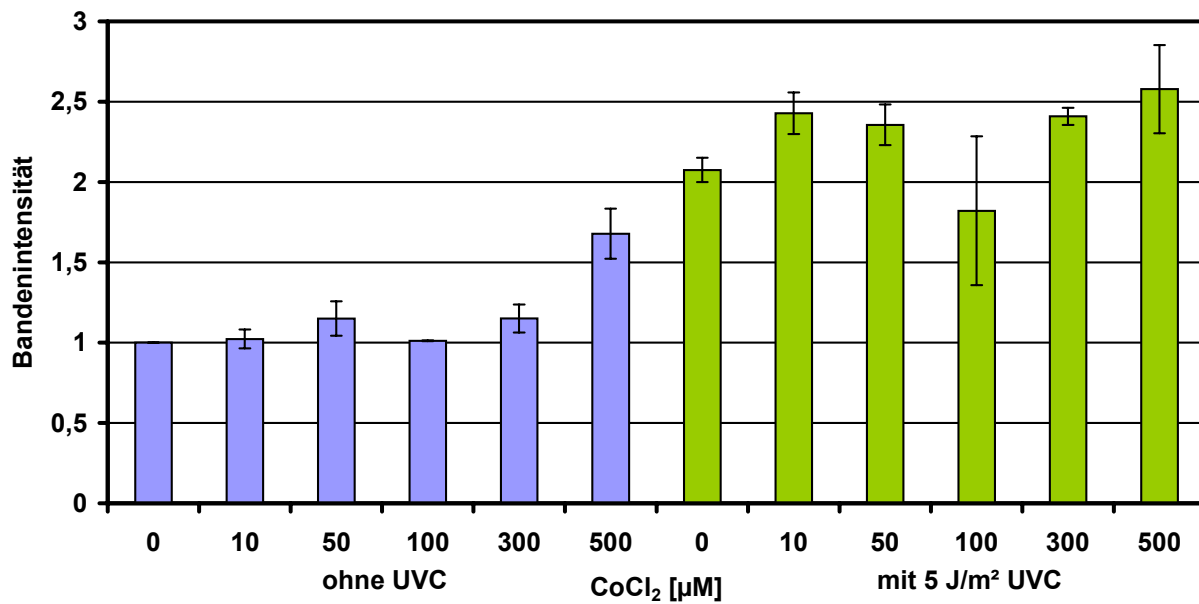


Abbildung 27: Induktion von *p21* nach Inkubation mit CoCl₂ und 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 25 Stunden mit CoCl₂ inkubiert. Anschließend wurde mit 5 J/m² UVC bestrahlt und 10 Stunden in Gegenwart von CoCl₂ nachinkubiert. Danach wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen ± Standardabweichung.

Die Werte für eine Induktion von *p21* nach Inkubation mit Co(II) und zusätzlicher Bestrahlung mit UVC zeigen nur einen geringen Anstieg mit steigender Konzentration an Co(II). Der zusätzliche Effekt von Co(II) auf die durch UVC-induzierte *p21*-Expression ist nur sehr gering, im Vergleich zu den bisher untersuchten Metallen As(III) und Cd(II) (Abbildung 16 und Abbildung 21). Möglicherweise ist deshalb bei der Zellzyklusphasenverteilung nach Co(II)-Inkubation und zusätzlicher UVC-Bestrahlung kein Unterschied im Vergleich zur Co(II)-Behandlung allein zu beobachten (Abbildung 24 und Abbildung 25).

Im Gegensatz zu As(III) und Cd(II) hat Co(II) keine so starke Affinität zu Thiolgruppen und über Wechselwirkungen mit Proteinen ist wenig bekannt, obwohl es den Polymerisationsschritt bei der NER blockiert (Hartwig et al., 1991). Es scheint, dass Co(II) DNA-Schäden verursacht und deshalb einen G₁-Phasen-Arrest hervorruft (O'Connor, 1997), darüber hinaus die Zellzykluskontrolle aber nicht durch direkte Bindung stört. Salnikow et al. 1999 beobachteten demgegenüber, dass durch Co(II)-Inkubation sowohl *p53* als auch *MDM2* (murine double minute 2, *p53*-regulierendes Protein) in MCF7- und A549-Zellen induziert werden. Allerdings vermuten die Autoren, dass es sich nicht um eine direkte Bindung an diese Proteine, sondern um die Induktion eines Transkriptionsfaktors handelt. Co(II) induziert

DNA-Schäden durch die Bildung von ROS (Lison et al., 1995). Möglicherweise ist dieser schadensinduzierende Mechanismus der Grund für den anhaltenden G₁-Phasen-Arrest. Zur Stützung dieser Theorie bedarf es aber noch einer Reihe weiterer Untersuchungen.

4.4.3.2 *GADD45*

In Abbildung 28 ist der Einfluss von Co(II) auf die *GADD45*-Expression nach gemeinsamer Behandlung mit Co(II) und UVC dargestellt.

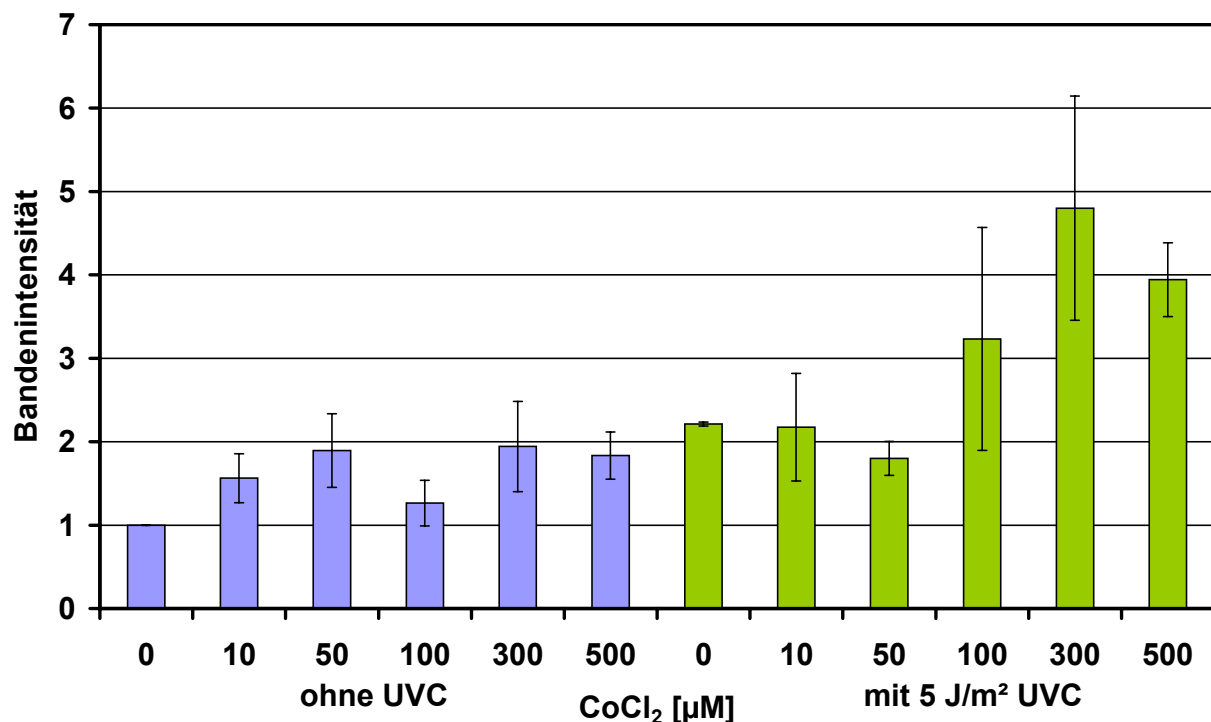


Abbildung 28: Induktion von *GADD45* nach Inkubation mit CoCl₂ und 5 J/m² UVC. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 25 Stunden mit CoCl₂ inkubiert. Anschließend wurde mit 5 J/m² UVC bestrahlt und 10 Stunden in Gegenwart von CoCl₂ nachinkubiert. Danach wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen \pm Standardabweichung.

Die Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Co(II) zeigen eine Erhöhung der *GADD45*-Expression. Bei 50 µM Co(II) ist eine Verdopplung der Bandenintensität zu beobachten, die dann nicht weiter steigt. Allerdings zeigt der Wert für 100 µM Co(II), dass es zu Schwankungen innerhalb der Versuche kommt. Bei der zusätzlichen Bestrahlung mit UVC steigt die Expression ab 100 µM Co(II) an und ist für 300 und 500 µM Co(II) doppelt so hoch wie für die nur mit UVC bestrahlte Kontrolle.

Eine deutliche Induktion von *GADD45* nach gemeinsamer Behandlung mit Co(II) und UVC ist zu beobachten, eine Änderung in der Verteilung der Zellen auf die einzelnen Phasen des Zellzyklusses dagegen nicht; ein G₁-Phasen-Arrest bleibt auch nach kombinierter Gabe bestehen. Auch zehn Stunden nach der UVC-Bestrahlung ist eine starke *GADD45*-Expression nachzuweisen. Dies deutet auf eine starke, lang anhaltende Wirkung von Co(II) auf den Zellzykluskontrollpunkt in der G₁-Phase hin. Erst wenn die *GADD45*-Induktion zurückgeht, wird der Arrest aufgehoben und die Zellen kommen in die S-Phase. Interessant wären in diesem Zusammenhang Untersuchungen zum zeitlichen Verlauf der *GADD45*-Expression.

Ein Einfluss von Co(II) auf der Proteinebene konnte bereits für den Inzisions- und Polymerisationsschritt bei der NER beobachtet werden. Dabei wird das essenzielle Spurenelement Mg(II) aus beteiligten Proteinen verdrängt und damit deren Funktion gestört (Kasten et al., 1997; Hartwig, 1998). Sollte bei einem *GADD45*-vorgeschalteten Transkriptionsfaktor Mg(II) eine Funktion haben, wäre dies eine Erklärung für die starke *GADD45*-Induktion nach gleichzeitiger Behandlung mit Co(II) und UVC.

4.5 Nickelchlorid

4.5.1 Koloniebildung

In Abbildung 29 ist die Koloniebildung sowohl nach Ni(II)-Inkubation allein, als auch nach gemeinsamer Behandlung mit Ni(II) und UVC dargestellt.

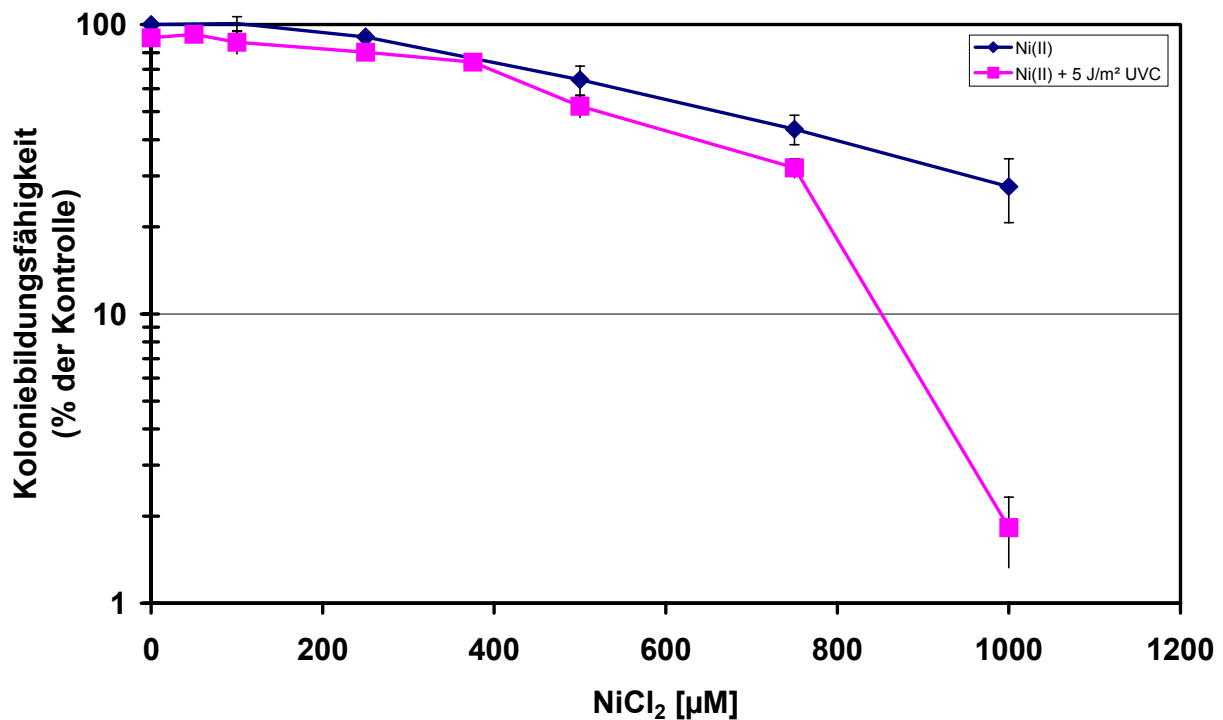


Abbildung 29: Koloniebildungsfähigkeit von A549-Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit NiCl₂ und 5 J/m² UVC. 5×10^5 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 24 Stunden mit NiCl₂ inkubiert und anschließend mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert und 300 Zellen für 7 Tage kultiviert. Dargestellt sind Mittelwerte aus 6-fach Bestimmungen \pm Standardabweichung.

Mit zunehmender Ni(II)-Konzentration sinkt die Koloniebildungsfähigkeit im Vergleich zur Kontrolle ab (Abbildung 29). Ab 250 µM Ni(II) sind es etwa 90%, bei 500 µM ca. 65% und bei 1000 µM noch ungefähr 27% gebildete Kolonien. Bei der zusätzlichen Bestrahlung mit UVC ist ein ähnlicher Verlauf zu beobachten. Bei 500 µM Ni(II) ist der Anteil der Zellen, die Kolonien ausbilden, auf ca. 50% zurückgegangen und bei 1000 µM Ni(II) gibt es nur noch vereinzelte Kolonien. Ni(II) verstärkt ab etwa 500 µM die UVC-induzierte Zytotoxizität. In der Literatur zeigten sich CHO-Zellen (Iwitzki et al., 1998) und V79-Zellen (Krueger et al., 1999) nach Ni(II)-Inkubation als etwas empfindlicher.

4.5.2 Zellzyklusphasenverteilung

A549-Zellen zeigen nach einer Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Ni(II) folgende Zellzyklusphasenverteilung (Abbildung 30).

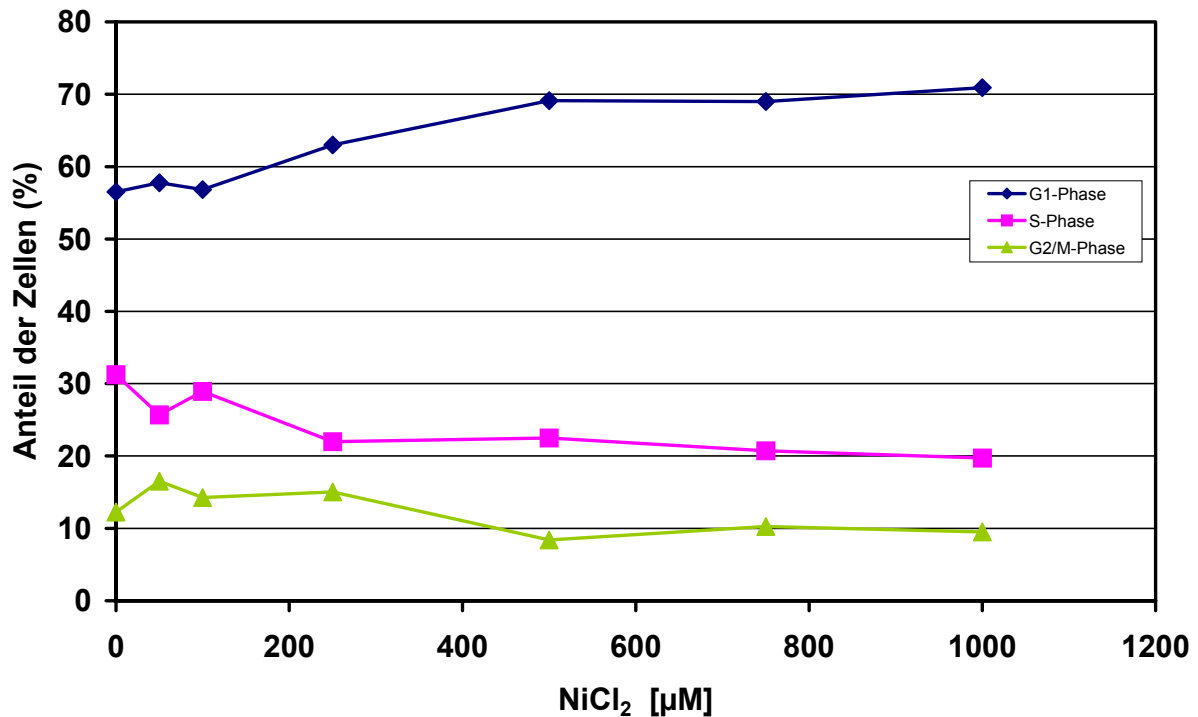


Abbildung 30: Zellzyklusphasenverteilung nach Inkubation mit NiCl₂. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 24 Stunden mit NiCl₂ inkubiert. Anschließend wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Bei 100 μM Ni(II) lässt sich noch kein Einfluss auf die Zellzyklusphasenverteilung feststellen. Mit zunehmender Konzentration an Ni(II) zeigt sich eine Steigerung des Anteils der Zellen in der G₁-Phase, der bei 500 μM ein gleichbleibendes Niveau erreicht. Dort liegt dann der Anteil der Zellen in der G₁-Phase bei etwa 69% im Vergleich zu ca. 57% in der Kontrolle. Gleichzeitig nimmt der Anteil der Zellen in der S-Phase mit steigender Konzentration an Ni(II) ab. Bei 250 μM Ni(II) sind etwa 22% der Zellen in der S-Phase, ebenso bei 500 μM Ni(II), bei 1000 μM Ni(II) dann ca. 20%. Von Schwankungen im niedrigen Konzentrationsbereich abgesehen, liegt der G₂/M-Phasen-Anteil der Zellen ungefähr zwischen 9 und 12%.

In anderen Untersuchungen mit löslichen Nickelverbindungen wurde nach 72-stündiger Inkubationszeit in CHO-Zellen ein G₂/M-Arrest und Apoptose beobachtet (Lee et al., 1998; Shiao et al., 1998). Dieser Unterschied könnte auf die längere Inkubationszeit zurückzuführen sein. Auch der Unterschied im Zelltyp und in den Kulturbedingungen könnten der Grund sein.

Zusätzlich könnte auch der Proteinstatus, insbesondere der p53-Status, eine Rolle spielen. Es zeigte sich, dass *p53*-defiziente Zellen in der G₂/M-Phase arretieren und Apoptose einleiten, während Zellen mit *wt-p53* (Wildtyp-*p53*) diesen Arrest überwinden (Guillouf et al., 1995).

In Abbildung 31 ist der zeitliche Verlauf der Zellzyklusphasenverteilung der Zellen nach der Behandlung mit 500 µM Ni(II) und 10 J/m² UVC gezeigt.

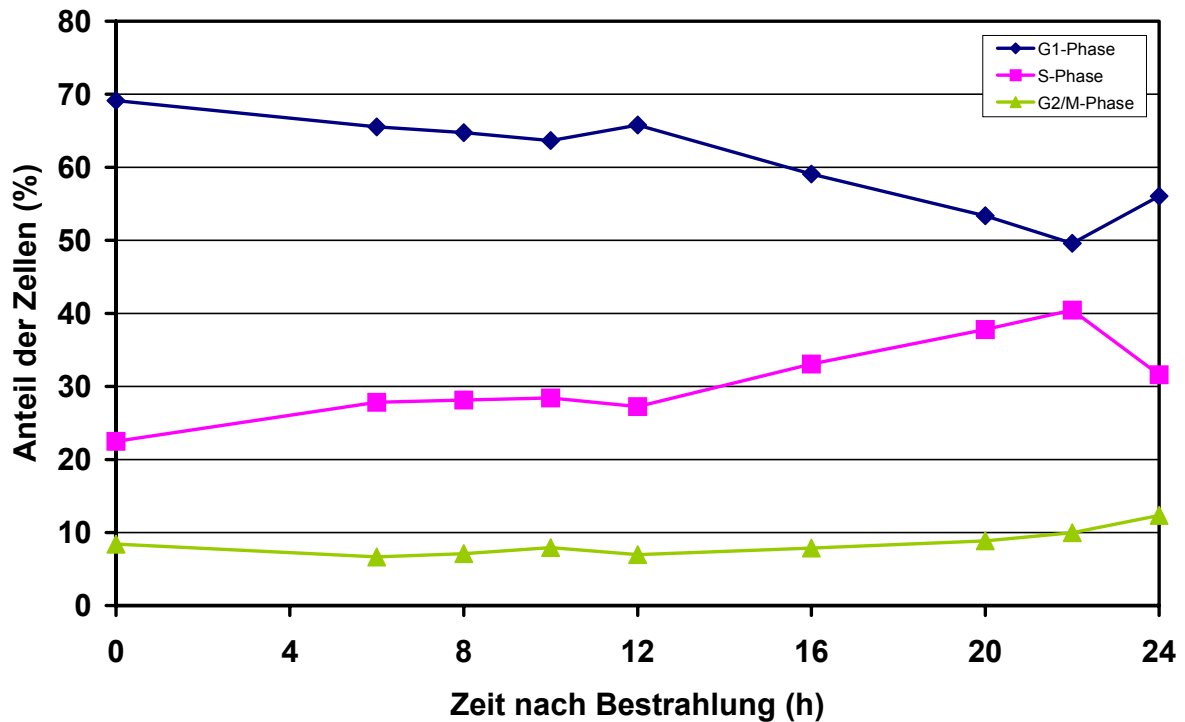


Abbildung 31: Zellzyklusphasenverteilung nach Inkubation mit 500 µM NiCl₂ und Bestrahlung mit 10 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 24 Stunden mit NiCl₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 J/m² UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation in Gegenwart von NiCl₂ wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Der Anteil der Zellen in den drei verschiedenen Phasen bleibt bis zwölf Stunden nach der UVC-Bestrahlung gleich. Danach reduziert sich der Anteil der G₁-Phase-Zellen bis auf etwa 50% 22 Stunden nach der Bestrahlung. Danach steigt der Anteil wieder an und nach 24 Stunden sind ca. 56% der Zellen in der G₁-Phase. Gleichzeitig steigt der Anteil der S-Phase-Zellen deutlich an. Während nach zwölf Stunden ca. 27% der Zellen in der S-Phase sind, erhöht sich der Anteil nach 22 Stunden auf ca. 40%. Danach gibt es einen Abfall auf etwa 32%. Der G₂/M-Anteil der Zellen liegt bis 16 Stunden nach der Bestrahlung bei etwa 8% und steigt anschließend auf einen Anteil von ca. 13% nach 24 Stunden an. Der durch UVC-Bestrahlung ausgelöste S-Phasen-Arrest ist nach acht bis zwölf Stunden nicht mehr zu beobachten, er tritt verzögert nach 16 bis 24 Stunden auf. Ähnlich wie bei Cd(II) (siehe 4.3.2)

kommt es zu einem schwächer ausgeprägten S-Phasen-Arrest, der zu einem späteren Zeitpunkt auftritt. Ein zeitlicher Ablauf, in dem die Zellen zunächst in der G₁-Phase arretiert werden und dann nach dem Übergang in die S-Phase dort erneut gestoppt werden, ist denkbar. Dies würde das schwächere Maximum über einen längeren Zeitraum erklären. Dass die UVC-induzierten Schäden während des G₁-Phasen-Arrestes nicht erkannt werden und es deshalb zu einem nachfolgenden S-Phasen-Arrest kommt, ist allerdings eher unwahrscheinlich.

Die nächste Grafik (Abbildung 32) zeigt den zeitlichen Verlauf der Anteile der Zellen in der S-Phase nach Inkubation mit verschiedenen Ni(II)-Konzentrationen und UVC-Bestrahlung.

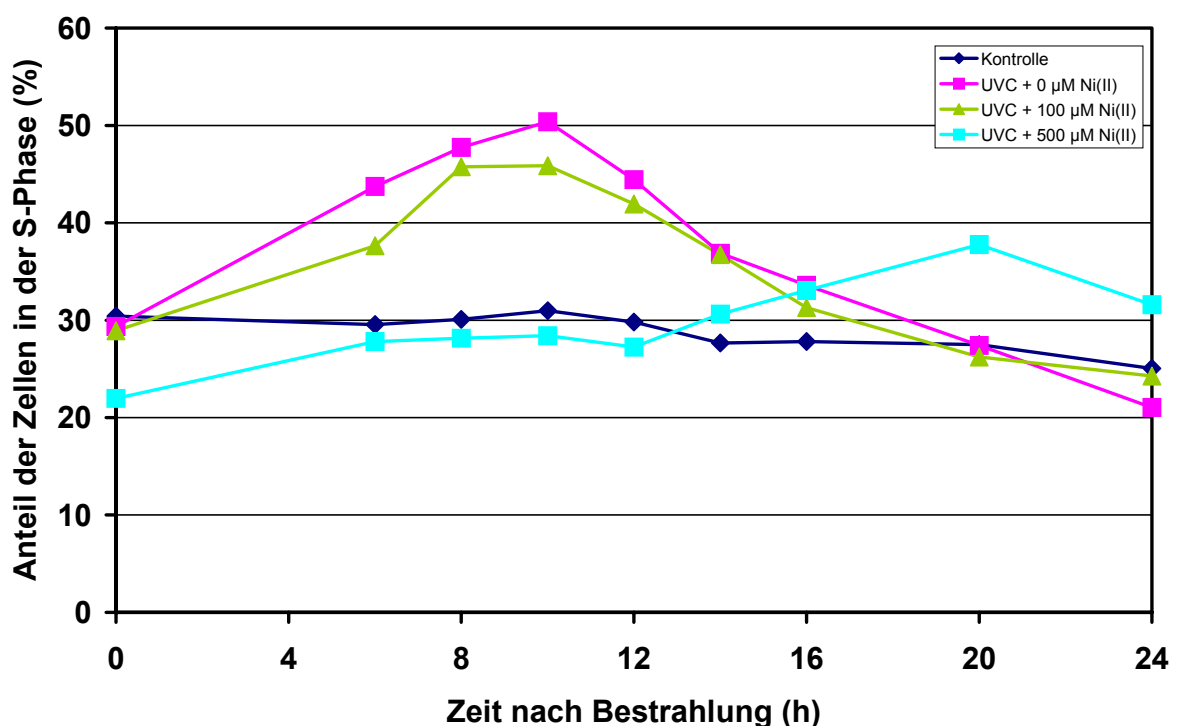


Abbildung 32: Anteil der Zellen in der S-Phase nach Inkubation mit NiCl₂ und Bestrahlung mit 10 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 24 Stunden mit NiCl₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 J/m² UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation in Gegenwart von NiCl₂ wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Der Anteil der unbehandelten Zellen in der S-Phase (dunkelblaue Linie) sinkt innerhalb des Messzeitraums von etwa 30% auf ca. 25%. Dieser leichte Abfall könnte an der steigenden Konfluenz der Zellen liegen. Der Anteil der Zellen in der S-Phase, die nur mit UVC bestrahlt wurden (rote Linie), steigt in den Stunden nach der Bestrahlung deutlich an und nach zehn Stunden sind ca. 50% der Zellen in der S-Phase. Anschließend fällt der Anteil der Zellen wieder ab und nach 20 Stunden ist der Kontrollwert erreicht. Nach einer Behandlung mit 100 μM Ni(II) und UVC ist der S-Phasen-Arrest etwas schwächer ausgeprägt und nach acht

bis zehn Stunden befinden sich etwa 46% der Zellen in der S-Phase. Beim 20 Stunden-Wert ist der gleiche Anteil wie bei den Kontrollzellen erreicht. Nach der Inkubation mit 500 μM Ni(II) und UVC-Bestrahlung zeigt sich bis zwölf Stunden nach der Bestrahlung keine Änderung des S-Phasen-Anteils. Anschließend steigt der Anteil auf ca. 38% nach 20 Stunden an. 24 Stunden nach der Bestrahlung liegt der Anteil der S-Phase-Zellen mit ca. 32% noch deutlich über dem für die unbehandelte Kontrolle. Ein S-Phasen-Arrest findet auch nach Inkubation mit 500 μM Ni(II) statt, allerdings verschiebt er sich um ungefähr zehn Stunden. Das Maximum ist weniger ausgeprägt als nach UVC-Bestrahlung allein.

4.5.3 mRNA-Gehalt von *p21* und *GADD45*

Als nächstes wurden die Effekte der Behandlung mit Ni(II) und UVC auf die Induktion der beiden Zellzykluskontrollgene *p21* und *GADD45* untersucht.

4.5.3.1 *p21*

In Abbildung 33 ist die *p21*-Induktion nach Behandlung mit Ni(II) und UVC dargestellt.

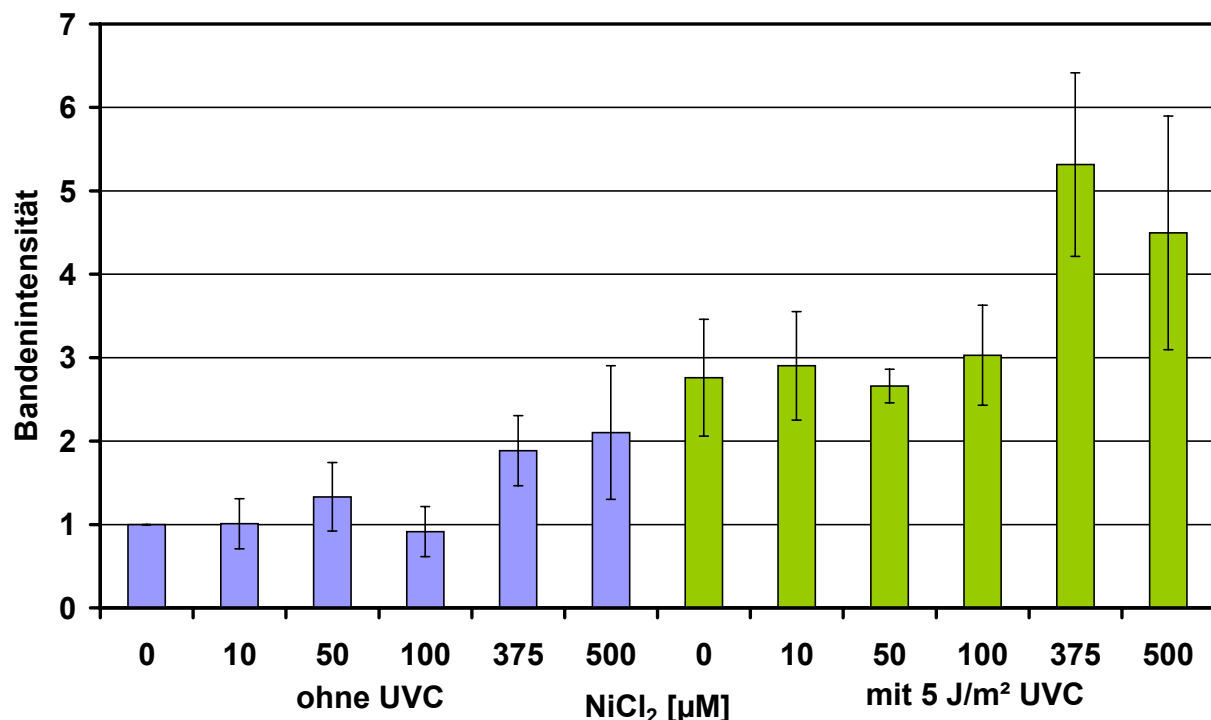


Abbildung 33: Induktion von *p21* nach Inkubation mit NiCl₂ und 5 J/m² UVC. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 24 Stunden mit NiCl₂ inkubiert. Anschließend wurde mit 5 J/m² UVC bestrahlt und 10 Stunden in Gegenwart von NiCl₂ nachinkubiert. Danach wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen \pm Standardabweichung.

Betrachtet man zunächst in Abbildung 33 die *p21*-Induktion durch Ni(II) allein, zeigt sich, dass die beiden höchsten Konzentrationen von 375 und 500 μM Ni(II) eine Verdopplung der Bandenintensitäten zur Folge haben, während für die niedrigeren Konzentrationen kein Einfluss nachweisbar ist. Für die Behandlung mit Ni(II) und UVC ist der gleiche Effekt festzustellen. Konzentrationen von 10 bis 100 μM Ni(II) zeigen keinen Effekt auf die *p21*-Induktion. Demgegenüber ist bei 375 und 500 μM Ni(II) eine starke Induktion zu beobachten.

Ein Zusammenhang zwischen dem bereits beschriebenen verspäteten S-Phasen-Arrest (Abbildung 32) und einer starken Induktion von *p21* bei hohen Konzentrationen an Ni(II) nach gleichzeitiger UVC-Bestrahlung scheint denkbar. Das Expressionssignal ist auch zehn Stunden nach UVC-Bestrahlung stark. Vielleicht handelt es sich dabei um eine verzögerte Induktion von *p21*, wodurch es auch zu einer verspäteten Auslösung des S-Phasen-Arrestes kommt. Zeitabhängige Untersuchungen zur *p21*-Induktion nach gemeinsamer Behandlung mit Ni(II) und UVC könnten darüber Aufschluss geben, ob dieses verstärkte *p21*-Signal verspätet auftritt oder länger anhält.

Die Ni(II)-Affinität gegenüber der DNA ist nicht sehr ausgeprägt, allerdings bindet es gut an Proteine, wie z.B. Histone (Bal et al., 1998). Dabei sind wohl die Aminosäuren Histidin und Cystein bevorzugte Bindungsstellen für die Ni(II)-Ionen. Somit könnte die Bindung an Zellzykluskontrollproteine ein Mechanismus sein, durch den Ni(II) einen Einfluss auf die Zellzykluskontrolle nimmt. Es zeigte sich außerdem, dass Ni(II) in MCF7- und A549-Zellen die Expression von *p53* und *MDM2* induziert, möglicherweise direkt oder durch die Induktion eines Transkriptionsfaktors (Salnikow et al., 1999). Darüberhinaus konnte eine Konkurrenz von Ni(II) mit Mg(II) in Proteinen, die in der NER eine Rolle spielen, beobachtet werden (Hartmann und Hartwig, 1998). Falls es Mg(II)-abhängige Proteine auch in der Zellzykluskontrolle gibt, könnte dies ein weiterer Mechanismus sein, der den Einfluss von Ni(II) auf die Zellzykluskontrolle erklärt.

4.5.3.2 *GADD45*

Abbildung 34 zeigt die *GADD45*-Induktion nach Behandlung mit Ni(II) und UVC.

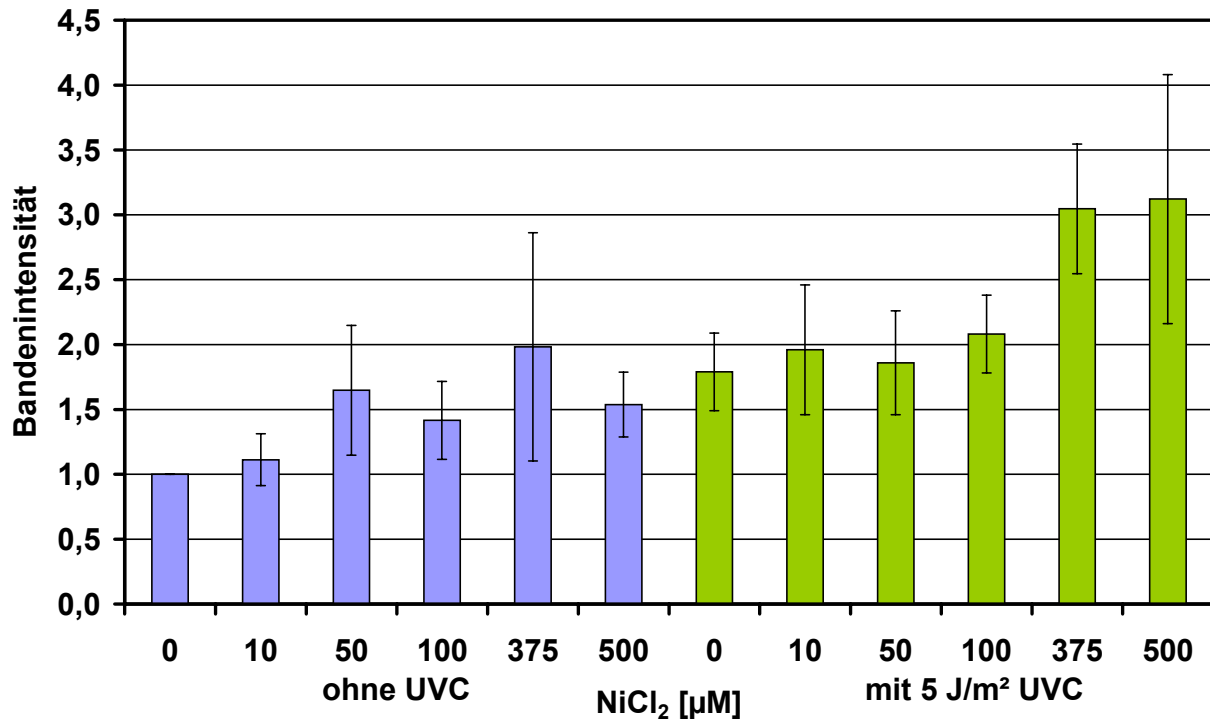


Abbildung 34: Induktion von *GADD45* nach Inkubation mit NiCl₂ und 5 J/m² UVC. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 24 Stunden mit NiCl₂ inkubiert. Anschließend wurde mit 5 J/m² UVC bestrahlt und 10 Stunden in Gegenwart von NiCl₂ nachinkubiert. Danach wurde eine mRNA-PCR mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt und die Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dargestellt sind Mittelwerte aus Mehrfachbestimmungen \pm Standardabweichung.

Die Induktion von *GADD45* nach Ni(II)-Inkubation zeigt bei einer Konzentration von 50 µM einen leichten Anstieg. Bei den höheren Ni(II)-Konzentrationen schwankt die Bandenintensität zwischen der 1,5- bis 2-fachen Stärke im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Behandlung mit Ni(II) und UVC beobachtet man bis zu 100 µM Ni(II) keine Zunahme der *GADD45*-Induktion. Für die Konzentrationen von 375 und 500 µM Ni(II) ist ein Anstieg um 50% zu beobachten.

Ob es einen Zusammenhang mit der veränderten Zellzyklusphasenverteilung nach Behandlung mit Ni(II) und UVC gibt, sollte näher untersucht werden. Dass das *GADD45*-Signal auch zehn Stunden nach der UVC-Bestrahlung so ausgeprägt ist, könnte auf eine verspätete Induktion zurückzuführen sein. Dies wäre dann eine mögliche Erklärung für den

verzögert auftretenden S-Phasen-Arrest (Abbildung 32). Zur Stützung dieser Theorie sind allerdings zeitabhängige Versuche zur *GADD45*-Induktion durchzuführen.

5 Zusammenfassende Diskussion und Ausblick

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Arsen, Cadmium, Cobalt und Nickel sowohl allein als auch nach zusätzlicher Bestrahlung mit UVC einen deutlichen Effekt auf die Zellzyklusphasenverteilung haben. Dabei zeigte sich, dass die Zellzykluskontrollpunkte nach gemeinsamer Behandlung mit Metallionen und UVC in ihrer Funktion gehemmt werden.

In der Literatur findet sich zu dieser Fragestellung nur sehr wenig, dennoch kann man einige Vermutungen anstellen, welche Mechanismen zu der beobachteten Hemmung der Zellzykluskontrolle führen. Die Konformation vorgeschalteter Zellzykluskontrollproteine könnte durch die Bindungen der Metallionen gestört werden und die damit verbundene Strukturänderung zu einer Funktionsstörung, z.B. als Transkriptionsfaktoren führen. Dies kann durch die Bindung der Metalle an die Thiolgruppen der Proteine kommen, wie es z.B. für die Bindung von Ni(II) an Histone gezeigt wurde (Bal et al., 1998). Auch denkbar ist die Konkurrenz der Metalle mit Zink bei solchen Zellzykluskontrollproteinen, die eine Zinkfingerstruktur besitzen, wie z.B. p53 (Palecek et al., 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die DNA-Bindungsaktivität von p53 nach Zugabe von Cd(II) abnimmt (Meplan et al., 1999). Auch bei verschiedenen Reparaturproteinen mit einer Zinkfingerstruktur zeigte sich, dass eine Konkurrenz von toxischen Metallen mit Zink die Funktion hemmen kann (Asmuss, 2000; Asmuss et al., 2000). In diesem Zusammenhang wurde für die Wirkung von As(III) auf die Induktion von *p53*, *p21* und *Cyclin D* auch die Oxidation der Thiolgruppen von Cystein diskutiert (Vogt und Rossman, 2001). Andererseits konnte bei Hitzeschockproteinen nach Metallinkubation eine erhöhte DNA-Bindungsaktivität beobachtet werden (Tchounwou et al., 2001).

Bei Polymerasen konnte gezeigt werden, dass es zur Konkurrenz von Co(II) mit Mg(II) kommt und dadurch deren Funktion gehemmt wird (Kasten et al., 1997). Bei Zellzyklusproteinen mit Metallionen als Kofaktoren wäre dies ein möglicher Mechanismus mit dem der Einfluss der kanzerogenen Metallverbindungen auf die Zellzykluskontrolle erklärt werden könnte.

Möglich wäre auch, dass die Metalle Signaltransduktionswege stören, so z.B. durch die Störung des Calciumhaushaltes, wie es für Cd(II) gezeigt wurde (zusammengefasst in Beyersmann und Hechtenberg, 1997). Es konnte beobachtet werden, dass Calcium während

des Zellzyklusses eine wichtige Funktion hat und der Calciumgehalt während der einzelnen Phasen des Zyklusses variiert (Pande et al., 1996).

Bei den Untersuchungen im zweiten Teil dieser Arbeit fand sich ein Hinweis auf den Zusammenhang zwischen verändertem Induktionsmuster bei *p21* und *GADD45* und der gestörten Zellzykluskontrolle. Die Expression von *GADD45* nach Behandlung mit As(III) und UVC ist deutlich gehemmt (Abbildung 17) und ein Zellzyklusarrest nicht mehr zu beobachten (Abbildung 15). Bei Cd(II) und Ni(II) zeigte sich eine zeitliche Verschiebung des UVC-induzierten S-Phasen-Arrestes (Abbildung 20 bzw. Abbildung 32) bei gleichzeitiger Induktion von *p21* (Abbildung 21 bzw. Abbildung 33) und *GADD45* (Abbildung 22 bzw. Abbildung 34).

Eine wahrscheinliche Erklärung für die beobachteten Modulationen der Genexpression besteht in der Wechselwirkung mit vorgeschalteten Transkriptionsfaktoren; dies muss allerdings noch experimentell geklärt werden. Es wurde gezeigt, dass p53 die Expressionsmuster von *p21* und *GADD45* beeinflusst (Yih und Lee, 2000). p53 selbst ist ein wichtiges Zellzykluskontrollprotein, welches durch MDM2 und JNK (c-Jun N-terminale Kinase), eine stressaktivierte Kinase, stabilisiert wird (Stewart und Pietenpol, 2001). Hier könnte eine Störung der Zellzykluskontrolle, z.B. durch Inaktivierung der Zinkfingerstruktur zu einer veränderten Expression von *p21* und *GADD45* führen. So zeigen viele Untersuchungen zur Beteiligung von p53 im Zellzyklusarrest und während der DNA-Reparatur, dass Strukturänderungen in diesem Protein zu weitreichenden Funktionsstörungen führen können (zusammengefasst in Hainaut und Mann, 2001). Darüber hinaus ist es auch denkbar, dass Acetylasen oder Phosphatasen in ihrer Funktion gestört werden und es zu einer falschen Acetylierung bzw. Phosphorylierung von Aminosäuren innerhalb der Proteinsequenz kommt (Zhou et al., 1998; Latonen et al., 2001). As(III) z.B. induziert die Phosphorylierung des Mre11-Reparaturproteins (Yuan et al., 2002).

Die Wirkungen der Metalle auf die Zellzykluskontrolle sind in ihrer Art und Stärke unterschiedlich. Diese variierenden Einflüsse von Metallverbindungen konnten bereits für die NER (Hartwig, 1995; Hartwig und Schwerdtle, 2002) und speziell für die Reparaturproteine XPA, Fpg und PARP (Asmuss, 2000; Asmuss et al., 2000; Hartwig et al., im Druck) gezeigt werden. Beispielhaft sei hier auch die Induktion von Cap43, einem GTP-bindenden Protein,

erwähnt, welches zwar von Ni(II), aber nicht von anderen Metallionen induziert wird (Zhou et al., 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen - für einige Metallverbindungen erstmals - eine Beeinflussung der Zellzykluskontrolle nach UVC-Bestrahlung. Allerdings wurden die Untersuchungen zur Genexpression in dieser Arbeit nur zu einem definierten Zeitpunkt durchgeführt; von Interesse wäre die Zeitabhängigkeit der Induktion und die Untersuchung der Frage, ob eine erhöhte mRNA-Menge auch zu einer Erhöhung der Proteinmenge führt. Insgesamt wird deutlich, dass die Mechanismen, die für die Genotoxizität und Kanzerogenität verantwortlich sind, für jedes Metall überprüft und diskutiert werden müssen. Entsprechend sind noch viele Untersuchungen über die Einflüsse der Metalle auf die zellulären Kontrollmechanismen durchzuführen. Bezüglich des Einflusses auf die Zellzykluskontrolle ist es wichtig, die in diesem System vorgeschalteten, durch die jeweiligen Metallverbindungen inhibierten, Proteine zu identifizieren. Anschließend müssen auf Proteinebene beeinflussbare Strukturelemente ermittelt werden. So wird es möglich sein, die Mechanismen, die zu der beobachteten Hemmung der Zellzykluskontrolle führen, aufzuklären und das Verständnis über die zellulären Zusammenhänge zu erweitern.

6 Material und Methoden

Eine Auflistung aller eingesetzten Chemikalien und Lösungen und deren Konzentrationen sowie eine Liste der verwendeten Geräte ist im Anhang zu finden. Alle Lösungen wurden mit über Quarz doppelt destilliertem Wasser angesetzt.

6.1 Zellkultur

Medien, Puffer, Lösungen und alle verwendeten Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden sterilfiltriert bzw. autoklaviert, hitzesterilisiert.

6.1.1 Zellen

A549-Zellen werden in einem Einfriermedium aus 90% FKS (Fötales Kälberserum) und 10% DMSO bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen wachsen als Monolayer in DMEM mit 10% FKS und einem Zusatz von 100 Einheiten/ml Penicillin und $100\ \mu\text{g/ml}$ Streptomycin. Bei ca. 70% Konfluenz werden die Zellen abtrypsiniert, in neue Schalen ausgesät und mit neuem Medium versetzt.

6.1.2 Koloniebildungsfähigkeit

Der Test auf Koloniebildungsfähigkeit von Zellen nach der Inkubation mit Reagenzien ist eine gute Methode, um die Zytotoxizität von Verbindungen zu prüfen. Mit diesem Versuch wird getestet, inwieweit Agenzien irreversible Schäden verursachen und zum Zelltod führen. Dabei wird eine definierte Anzahl von Zellen für eine bestimmte Zeit mit der zu untersuchenden Substanz inkubiert. Anschließend lässt man die Zellen unter ihren normalen Wachstumsbedingungen mehrere Tage wachsen. Anhand der Anzahl der gebildeten Kolonien - im Vergleich zu unbehandelten Zellen - lässt sich nun feststellen, ob und welche Konzentrationen des getesteten Agens zu irreparablen Schäden führen.

Durchführung:

1×10^6 Zellen werden in eine Kulturschale (100 x 20 mm) mit 9 ml des Mediums ausgesät. Nun gibt man den Zellen einen Teilungszyklus Zeit (bei A549 Zellen ca. 24 Stunden). Dann findet die Inkubation mit den verschiedenen Konzentrationen der zu untersuchenden Metallsalze statt, indem die entsprechende Menge an jeweiliger Stammlösung

zugegeben wird. Die Inkubationszeiten betragen je nach Metallsalz zwischen 18 und 25 Stunden (Cadmium 18 h, Arsen 20 h, Nickel 24 h und Cobalt 25 h). Nach dieser Zeit wird das Medium abgesaugt und mit FKS-freiem Medium gewaschen.

Bei der Untersuchung der Kombinationswirkung wird nach Ablauf der Metallinkubation das Medium abgesaugt und die Zellen in der Zellkulturschale ohne Flüssigkeit mit der entsprechenden Dosis UVC-Licht bestrahlt.

Anschließend wird die Zellzahl bestimmt und 3×10^2 Zellen in neue Kulturschalen (60 x 15 mm) ausgesät und mit frischem Medium versetzt. Dabei wird pro Konzentration mindestens eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Zellen verbleiben dann für 7-8 Tage im Brutschrank.

Sind die Kolonien mit bloßem Auge gut sichtbar, werden die Zellen von ihrem Medium befreit und nach einem Waschschrift mit PBS mit 2-3 ml 100%igem Ethanol fixiert. Das Anfärben mit Giemsa-Farbstoff (Bodenbedeckung für 1-2 Minuten) und abschließendes Waschen mit Wasser sind die letzten Schritte. Die gebildeten Kolonien können dann mit bloßem Auge ausgezählt werden.

6.2 Inkubation

Für die Versuchsdurchführung gab es ein konkretes Verlaufsschema. Verwendet wurden dabei Zellen aus Zellkulturschalen mit einer Konfluenz von ca. 70%. Die Zellen wurden zunächst mit einer 1%igen Trypsinlösung in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung) abtrypsinisiert und anschließend wie in Abbildung 35 dargestellt behandelt.

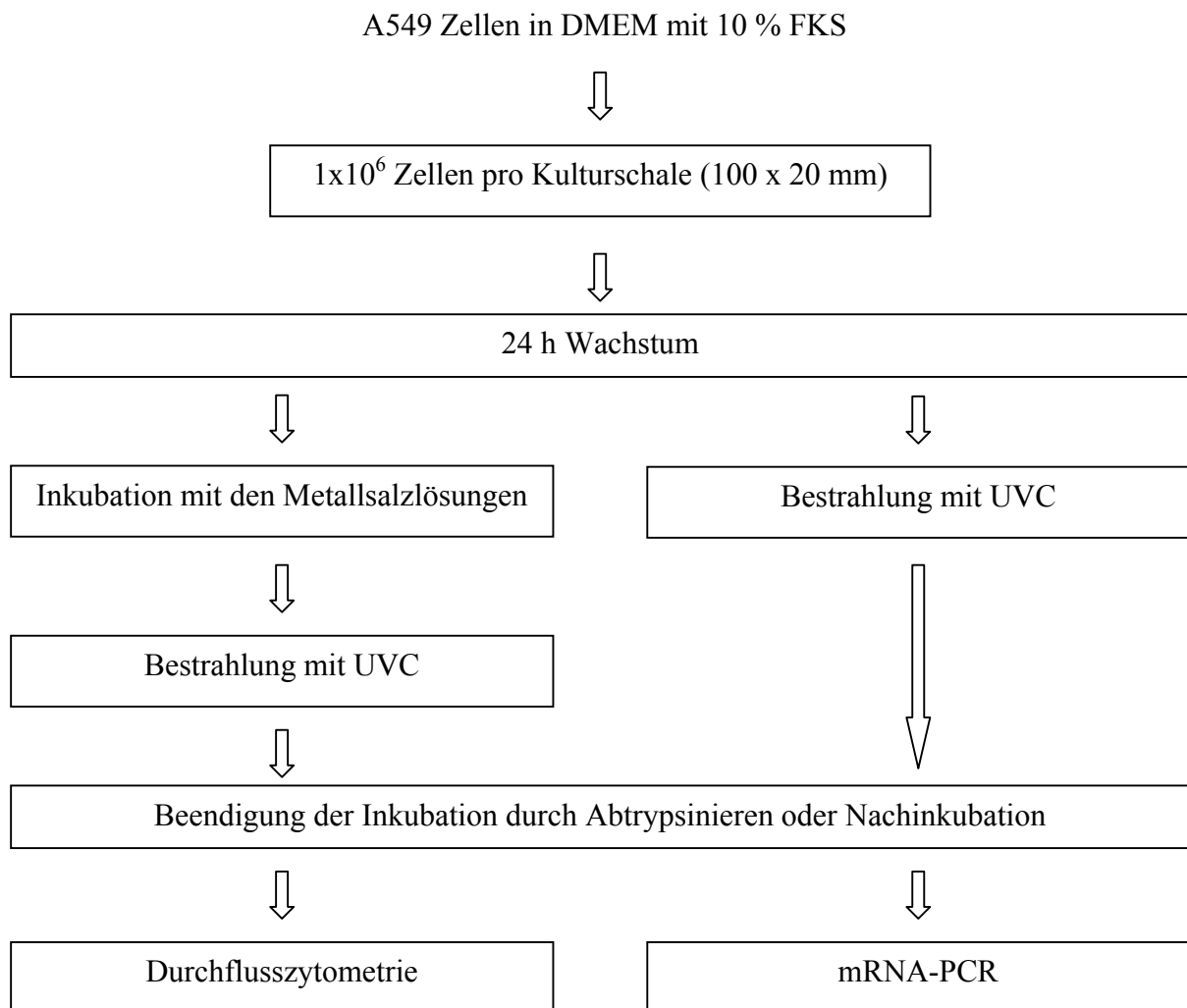


Abbildung 35: Inkubationsschema der durchgeführten Versuche.

6.2.1 Fluoreszenzfärbung

Für die Messungen am Durchflusszytometer müssen die Zellen speziell präpariert werden. Da der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt werden soll, werden die Zellen mit einem Fluoreszenzfarbstoff, der an die DNA bindet, angefärbt. Bei dem Farbstoff, der in dieser Arbeit verwendet wurde, handelt es sich um DAPI (4', 6'-Diamidino-2-phenylindol).

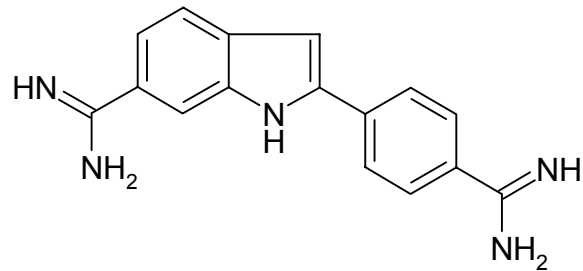


Abbildung 36: Strukturformel des DNA-bindenden Farbstoffes 4',6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI).

Bevor die Zellen vermessen werden können, werden zunächst 1×10^6 Zellen abzentrifugiert, danach mit Ethanol fixiert und zum Abschluss mit einer Fertiglösung aus DAPI und Sulforhodamin (SR; Fluoreszenzfarbstoff, der an Proteine und DNA bindet) gefärbt. Die so präparierten Zellen werden am Durchflusszytometer vermessen.

Durchführung:

Die Zellen werden nach Ablauf ihrer Inkubationszeit gezählt und 1×10^6 Zellen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Zentrifugation bei 1200 rpm wird der Überstand abgesaugt und das Pellet in 1 ml PBS aufgenommen. Anschließend wird unter ständigem Mischen auf dem Vortex-Schüttler 3 ml 100%iges Ethanol (-20°C) zugegeben. Nach diesem Fixierschritt können die Proben für mehrere Tage bei -20°C aufbewahrt werden.

Am Tag vor der Messung wird dann erneut bei 1200 rpm abzentrifugiert, um für eine gute Vereinzelung der Zellen zu sorgen und das Pellet mit 1 ml einer Fertiglösung aus DAPI/SR aufgenommen. Nach einer Lagerzeit von mindestens fünf Stunden (besser: über Nacht) bei $+4^\circ\text{C}$, können die Zellen vermessen werden. Direkt vor der Einführung in das Gerät ist die Lösung noch einmal gut zu durchmischen.

6.2.2 UVC-Bestrahlung

Als DNA-schädigendes Agens für die Kombinationsversuche wurde UVC-Strahlung benutzt. Die Bestrahlung wurde im Dunkeln mit einer Lampe, die Licht mit der Wellenlänge 254 nm emittiert, durchgeführt. Die erforderliche Entfernung und die Dauer der Bestrahlung wurden zuvor mittels eines UV-Meters ermittelt.

Durchführung:

Nach Beendigung der Vorinkubation mit den entsprechenden Metallsalzen bzw. nach Ablauf der Anwachsphase, wird das Inkubationsmedium entfernt. Die Kulturschalen werden ohne Flüssigkeit unter die Lampe gestellt, der Deckel abgenommen und die Bestrahlung durchgeführt (hier: 30 cm Abstand, 9 s (für 10 J/m^2) bzw. 4,5 s (5 J/m^2)). Um andere Einflüsse durch Lichtbestrahlung so weit wie möglich zu vermeiden, findet die Behandlung im Dunkeln statt. Anschließend wird entweder neues Vollmedium oder das Nachinkubationsmedium zugegeben und die Zellkulturschalen im Inkubator gelagert.

6.3 mRNA-PCR

Um die Expression einzelner Gene zu beobachten, ist die mRNA-PCR eine geeignete Methode. Dabei wird zunächst Gesamt-RNA isoliert, welche anschließend durch Reverse Transkriptase in einzelsträngige DNA übersetzt wird. Diese cDNA wird dann mittels PCR vervielfältigt und eine Beobachtung über Zu- oder Abnahme der Expressionsstärke ist möglich.

Durchführung (RNA-Isolierung):

1×10^6 Zellen werden ausgesät und 24 Stunden wachsen gelassen. Anschließend findet die gewünschte Inkubation statt. Nach Beendigung der Inkubationszeit werden die Zellen abtrypsiniert und zentrifugiert. Die RNA-Isolierung wurde nach einem Verfahren und mit den Lösungen von Qiagen durchgeführt (Rneasy Mini Kit, Qiagen). Die Durchführung ist hier noch einmal aufgeführt:

1×10^6 Zellen werden ausgesät und nach 24 Stunden je nach Ansatz die entsprechenden Inkubationen durchgeführt. Nach Ablauf dieser Zeiten werden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann abtrypsiniert. Die Zellen werden dann in 1,5 ml Medium aufgenommen und in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Es folgt eine Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 min (im Protokoll wird 5 min bei 300 g vorgeschlagen, allerdings löst sich das Pellet dann sehr leicht beim Absaugen des Überstandes). Das Pellet wird mit 350 μ l (abhängig von der Zellmenge) RLT Puffer (mit 1 % Mercaptoethanol) aufgenommen und gut durchmischt. Zum Homogenisieren der Proben wird eine 2 ml-Spritze mit dünner Kapillare benutzt und mehrfach aufgesaugt. Anschließend wird das gleiche Volumen (350 μ l) 70%iges Ethanol zugegeben und gut durchmischt. Diese Probe wird dann in ein Reaktionsgefäß mit Filteraufsatz (sogenannte spin column) überführt und bei 10.000 rpm für 15 sek zentrifugiert. Daraufhin werden zum Waschen 700 μ l RW1 Puffer auf den Filter gegeben und ebenfalls 15 sek bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Filter wird auf ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt und diesmal mit 500 μ l RPE Puffer bei 10.000 rpm für 15 sek zentrifugiert. Anschließend wird ein zweites Mal 500 μ l RPE Puffer zugegeben und bei 14.000 rpm 2 min die Zentrifugation durchgeführt. Nach der Überführung des Filters auf ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß wird 30-50 μ l RNase-freies Wasser (abhängig von RNA-Menge) zupipettiert und 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert und damit die RNA in das Reaktionsgefäß eluiert. Mittels Photometer lässt sich abschließend die RNA-Menge bestimmen. Die erhaltene Menge an Gesamt-RNA wird mit einem UV-Photometer überprüft.

Durchführung (cDNA-Herstellung):

Zunächst muss die cDNA hergestellt werden, die dann anschließend für die PCR benutzt wird. Es wird eine Konzentration von 1 µg RNA eingesetzt. Hinzu kommen 1 µl Oligo (dT)₁₂₋₁₈ (500 µg/ml) und 1 µl dNTP (10 mM) Mischung. Die drei Komponenten werden mit H₂O auf 12 µl aufgefüllt. Zur Denaturierung wird dieses Gemisch 5 min auf 65°C erhitzt und hinterher die Renaturierung durch schnelles Platzieren auf Eis verhindert.

Zu dieser Lösung wird dann eine Mischung aus 4 µl Reaktionspuffer, 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl RNase Inhibitor gegeben. Die anschließende Reaktion läuft für 2 min bei 42°C. Nun wird 1 µl der Reverse Transkriptase zupipettiert. Die Reaktion läuft dann für 50 min bei 42°C und wird durch 15 min bei 70°C beendet, wobei das Enzym durch die erhöhte Temperatur inaktiviert wird. Die Ansätze werden einmal mit und einmal ohne Reverse Transkriptase durchgeführt um zu überprüfen, ob die RNA mit genomischer DNA kontaminiert ist und ein eventuell auftretendes Signal bei der PCR daher rührt.

Durchführung (PCR):

Die PCR selbst wird in verschiedenen Varianten durchgeführt. Die erste Variante enthält nur ein Primerpaar und es wird nur die Amplifizierung eines Genes durchgeführt (Ansatz 1). In einem zweiten Ansatz wurden die Primer des Kontrollgenes *GAPDH* sowie die Primer eines der beiden zu untersuchenden Gene, *p21* oder *GADD45*, in einen Ansatz zusammen gegeben und die Gene amplifiziert (Ansatz 2), um die Signalstärken nach der anschließenden Elektrophorese besser vergleichen zu können. Es handelt sich um Primer mit folgenden Sequenzen:

hp21-5: 5'-ATG TCA GAA CCG GCT GGG GAT G-3'

hp21-3: 5'-TTA GGG CTT CCT CTT GGA GAA GAT C-3'

hGADD45-5: 5'-CGA CCC CGA TAA CGT GGT GTT GTG-3'

hGADD45-3: 5'-CAT TGA TCC ATG TAG CGA CTT TCC C-3'

hGAPDH-5: 5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CAC C-3'

hGAPDH-3: 5'-GTC CAC CAC CCT GTT GCT GTA G-3'

Für Ansatz 1 mit einem Volumen von 50 μl sind folgende Komponenten zusammen zu mischen (Konzentrationsangaben siehe Anhang):

5 μl DMSO
5 μl 10xPuffer
1,5 μl MgCl_2
1 μl Primer 3'-Ende
1 μl Primer 5'-Ende
1 μl dNTP
0,5 μl Taq-Polymerase
33 μl H_2O
2 μl cDNA

Für den zweiten Ansatz findet ein zweiter 5'-Primer für *p21* Anwendung, um ein kürzeres Fragment zu amplifizieren und damit die Signale von *p21* und *GAPDH* besser zu trennen.

hp21-5short: 5'-CAC CAC TGG AGG GTG ACT TCG C-3'

Der Ansatz von 50 μl enthält:

5 μl DMSO
5 μl 10xPuffer
1,5 μl MgCl_2
1 μl 3'-Primer *p21* bzw. *GADD45*
1 μl 5'-Primer *p21* bzw. *GADD45*
0,5 μl 3'-Primer *GAPDH*
0,5 μl 5'-Primer *GAPDH*
2 μl dNTPs
31 μl H_2O
2 μl cDNA

Die Ansätze werden in einem PCR-Reaktionsgefäß gut durchmischt, in einen Thermocycler überführt und folgendes Reaktionsprogramm durchgeführt:

Schritt 1:	2 min 95°C
Schritt 2:	30 sek 95°C
	60 sek 60°C
	60 sek 72°C
Schritt 3:	bis zur Entnahme 4°C

Um für jedes Gen ein deutliches Signal zu erhalten, ist es erforderlich Schritt 2 je nach Gen verschieden oft zu wiederholen. So ergeben sich an dem hier benutzten Gerät für *GAPDH* 17 Zyklen, für *p21* 24 Zyklen und für *GADD45* 36 Zyklen.

Der letzte Schritt ist dann die Auftrennung der Proben in einem 1%igem mit TBE-Puffer gegossenem Agarosegel. Als Laufpuffer wird ebenfalls der TBE-Puffer verwendet und die Färbung mit Ethidiumbromid per Nachfärbung durchgeführt. Bei einer angelegten Spannung von 80 Volt kommt es dann zur Auftrennung zwischen den drei Fragmenten.

Die resultierenden Gele werden anschließend mittels eines Auswertungssystems bearbeitet, bei dem die Ethidiumbromidfärbung densitometrisch ausgewertet wird. So erhält man nicht nur einen optischen Eindruck über die Stärke des Signals, sondern auch konkrete Zahlenwerte, die eine Quantifizierung erlauben.

7 Literatur

- Al-Mohanna, M.A., Al-Khodairy, F.M., Krezolek, Z., Bertilsson, P.-A., Al-Houssein, K.A. und Aboussekhra, A. (2001) p53 dispensable for UV-induced cell cycle arrest at late G1 in mammalian cells. *Carcinogenesis*, **22**, 573-578.
- Asmuss, M. (2000) Einfluss toxischer Metallionen auf die Funktion von Zinkfinger-DNA-Reparaturproteinen. *Doktorarbeit*.
- Asmuss, M., Mullenders, L.H., Eker, A. und Hartwig, A. (2000) Differential effects of toxic metal compounds on the activities of fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair [In Process Citation]. *Carcinogenesis*, **21**, 2097-104.
- Bal, W., Lukszo, J., Bialkowski, K. und Kasprzak, K.S. (1998) Interactions of Nickel(II) with histones: interactions of Nickel(II) with CH₃CO-Thr-Glu-Ser-His-His-Lys-NH₂, a peptide modeling the potential metal binding site in the "C-Tail" region of histone H2A. *Chem Res Toxicol*, **11**, 1014-23.
- Balajee, A.S. und Geard, C.R. (2001) Chromatin-bound PCNA complex formation triggered by DNA damage occurs independent of the ATM gene product in human cells. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1341-1351.
- Balajee, A.S., May, A. und Bohr, V.A. (1999) DNA repair of pyrimidine dimers and 6-4 photoproducts in the ribosomal DNA. *Nucleic Acids Res.*, **27**, 2511-2520.
- Batty, D.P. und Wood, R.D. (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA. *Gene*, **241**, 193-204.
- Bernhard, E.J., Maity, A., Muschel, R.J. und McKenna, W.G. (1995) Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. A review. *Radiat Environ Biophys*, **34**, 79-83.
- Beyersmann, D. und Hartwig, A. (1999) Kombinationswirkungen bei krebserzeugenden Metallverbindungen. *ErgoMed*, **23**, 170-175.
- Beyersmann, D. und Hechtenberg, S. (1997) Cadmium, Gene Regulation, and Cellular Signalling in Mammalian Cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **144**, 247-261.
- Buermeyer, A.B., Deschenes, S.M., Baker, S.M. und Liskay, R.M. (1999) Mammalian DNA mismatch repair. *Annual Review of Genetics*, **33**, 533-564.
- Carrier, F., Georgel, P.T., Pourquier, P., Blake, M., Kontny, H.U., Antinore, M.J., Gariboldi, M., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Pommier, Y. und Fornace, A.J., Jr. (1999) Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol Cell Biol*, **19**, 1673-85.

- Carty, M.P., Zernik-Kobak, M., McGrath, S. und Dixon, K. (1994) UV light-induced DNA synthesis arrest in HeLa cells is associated with changes in phosphorylation of human single-stranded DNA-binding protein. *Embo J*, **13**, 2114-23.
- Chen, F., Zhang, Z., Leonard, S.S. und Shi, X. (2001) Contrasting roles of NF-kappaB and JNK in arsenite-induced p53- independent expression of GADD45alpha. *Oncogene*, **20**, 3585-9.
- Christie, N.T. und Tummolo, D.M. (1989) The effect of Ni(II) on DNA replication. *Biol Trace Elem Res*, **21**, 3-12.
- Cistulli, C.A. und Kaufmann, W.K. (1998) p53-dependent signaling sustains DNA replication and enhances clonogenic survival in 254 nm ultraviolet-irradiated human fibroblasts. *Cancer Res*, **58**, 1993-2002.
- Costa, M. (1991) Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **31**, 321-37.
- Costa, M., Cantoni, O., de Mars, M. und Swartzendruber, D.E. (1982) Toxic metals produce an S-phase-specific cell cycle block. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, **38**, 405-19.
- Dally, H. und Hartwig, A. (1997) Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, **18**, 1021-6.
- Dasika, G.K., Lin, S.-C.J., Zhao, S., Sung, P., Tomkinson, A. und Lee, E.Y.H.P. (1999) DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. *Oncogene*, **18**, 7883-7899.
- de Gruijl, F.R., van Kranen, H.J. und Mullenders, L.H. (2001) UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B*, **63**, 19-27.
- de Laat, A., van Tilburg, M., van der Leun, J.C., van Vloten, W.A. und de Gruijl, F.R. (1996) Cell cycle kinetics following UVA irradiation in comparison to UVB and UVC irradiation. *Photochem Photobiol*, **63**, 492-7.
- DFG. (1998) MAK- und BAT-Werte-Liste 1998. Wiley-VCH, Weinheim.
- DFG. (2001) Neuaufnahme und Änderung der MAK- und BAT-Werte-Liste 2001.
- Dong, J. und Luo, X. (1993) Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutat. Res.*, **302**, 97-102.
- Eickhoff, B. (2000) Grundlagen und Einführung in die Durchflusszytometrie. *BioTec*, **5**.

- Fletcher, G.G., Rossetto, F.E., Turnbull, J.D. und Nieboer, E. (1994) Toxicity, uptake, and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds. *Environ Health Perspect*, **102 Suppl 3**, 69-79.
- Friedberg, E.C. und Walker, G.C. (1995) DNA Repair and Mutagenesis. ASM Press, Washington D.C..
- Gartel, A.L., Serfas, M.S. und Tyner, A.L. (1996) p21--negative regulator of the cell cycle. *Proc Soc Exp Biol Med*, **213**, 138-49.
- Geyer, R.K., Nagasawa, H., Little, J.B. und Maki, C.G. (2000) Role and regulation of p53 during an ultraviolet radiation-induced G1 cell cycle arrest. *Cell Growth Differ*, **11**, 149-56.
- Gorospe, M., Wang, X. und Holbrook, N.J. (1999) Functional role of p21 during the cellular response to stress. *Gene Expr*, **7**, 377-85.
- Guillouf, C., Rosselli, F., Krishnaraju, K., Moustacchi, E., Hoffman, B. und Liebermann, D.A. (1995) p53 involvement in control of G2 exit of the cell cycle: role in DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene*, **10**, 2263-70.
- Haapajarvi, T., Kivinen, L., Heiskanen, A., des Bordes, C., Datto, M.B., Wang, X.F. und Laiho, M. (1999) UV radiation is a transcriptional inducer of p21(Cip1/Waf1) cyclin-kinase inhibitor in a p53-independent manner. *Exp Cell Res*, **248**, 272-9.
- Haapajarvi, T., Kivinen, L., Pitkanen, K. und Laiho, M. (1995) Cell cycle dependent effects of u.v.-radiation on p53 expression and retinoblastoma protein phosphorylation. *Oncogene*, **11**, 151-9.
- Haapajarvi, T., Pitkanen, K., Tsubari, M. und Laiho, M. (1997) p53 transactivation and protein accumulation are independently regulated by UV light in different phases of the cell cycle. *Mol Cell Biol*, **17**, 3074-80.
- Hainaut, P. und Mann, K. (2001) Zinc binding and redox control of p53 structure and function. *Antioxid Redox Signal*, **3**, 611-23.
- Hanusch, K., Grossmann, H., Herbst, K.A., Rose, G. und Wolf, H.U. (1988) Arsenic and Arsenic Compounds. Ullmann's Encyclopedia of industrial chemistry, Verlag Chemie, Weinheim., **A3**, 113-141.
- Hartmann, M. und Hartwig, A. (1998) Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis*, **19**, 617-21.
- Hartwig, A. (1995) Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals*, **8**, 3-11.

- Hartwig, A. (1998) Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicol Lett*, **102-103**, 235-9.
- Hartwig, A. (2001) Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function. *Antioxidants & Redox Signaling*, **3**, 625-634.
- Hartwig, A. und Beyersmann, D. (1989a) Comutagenicity and inhibition of DNA repair by metal ions in mammalian cells. *Biol Trace Elem Res*, **21**, 359-65.
- Hartwig, A. und Beyersmann, D. (1989b) Enhancement of UV-induced mutagenesis and sister-chromatid exchanges by nickel ions in V79 cells: evidence for inhibition of DNA repair. *Mutat Res*, **217**, 65-73.
- Hartwig, A., Groblinghoff, U.D., Beyersmann, D., Natarajan, A.T., Filon, R. und Mullenders, L.H. (1997) Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis*, **18**, 399-405.
- Hartwig, A., Mullenders, L.H., Schlepegrell, R., Kasten, U. und Beyersmann, D. (1994) Nickel(II) interferes with the incision step in nucleotide excision repair in mammalian cells. *Cancer Res*, **54**, 4045-51.
- Hartwig, A. und Schwerdtle, T. (2002) Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. *Toxicology Letters*, **127**, 47-54.
- Hartwig, A., Snyder, R.D., Schlepegrell, R. und Beyersmann, D. (1991) Modulation by Co(II) of UV-induced DNA repair, mutagenesis and sister- chromatid exchanges in mammalian cells. *Mutat Res*, **248**, 177-85.
- Hatcher, E.L., Chen, Y. und Kang, Y.J. (1995) Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free Radic Biol Med*, **19**, 805-12.
- Hollander, M.C., Sheikh, M.S., Bulavin, D.V., Lundgren, K., Augeri-Henmueller, L., Shehee, R., Molinaro, T.A., Kim, K.E., Tolosa, E., Ashwell, J.D., Rosenberg, M.P., Zhan, Q., Fernandez-Salguero, P.M., Morgan, W.F., Deng, C.X. und Fornace, A.J., Jr. (1999) Genomic instability in Gadd45a-deficient mice. *Nat Genet*, **23**, 176-84.
- Huang, H., Huang, C.F., Huang, J.S., Wang, T.C. und Jan, K.Y. (1992) The transition from late G1 to early S phase is most vulnerable to the coclastogenic effect of ultraviolet radiation plus arsenite. *Int J Radiat Biol*, **61**, 57-62.
- Huang, S.C. und Lee, T.C. (1998) Arsenite inhibits mitotic division and perturbs spindle dynamics in HeLa S3 cells. *Carcinogenesis*, **19**, 889-96.
- IARC. (1980) Some metals and metallic compounds., **23**.

- IARC. (1990) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 49: Chromium, Nickel and Welding.
- IARC. (1991) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 52: Chlorinated Drinking Water; Chlorination By-Products; Some other Halogenated Compounds; Cobalt and Cobalt Compounds.
- IARC. (1993) Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans, Vol. 58: Beryllium, Cadmium; Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry.
- IARC. (1997a) Supplement: Cadmium and cadmium compounds.
- IARC. (1997b) Supplement: Cobalt and cobalt compounds.
- IARC. (1997c) Supplement: Nickel and nickel compounds.
- IARC. (1998) Supplement: Arsenic and arsenic compounds.
- Iwitzki, F., Schlegel, R., Eichhorn, U., Kaina, B., Beyersmann, D. und Hartwig, A. (1998) Nickel(II) inhibits the repair of O6-methylguanine in mammalian cells. *Arch Toxicol*, **72**, 681-9.
- Jha, A.N., Noditi, M., Nilsson, R. und Natarajan, A.T. (1992) Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat Res*, **284**, 215-21.
- Kaim, W. und Schwederski, B. (1991) Bioorganische Chemie, Verlag B.G. Teubner, Stuttgart.
- Kang, Y.J. und Enger, M.D. (1990) Cadmium cytotoxicity correlates with the changes in glutathione content that occur during the logarithmic growth phase of A549-T27 cells. *Toxicol Lett*, **51**, 23-8.
- Kasten, U., Mullenders, L.H. und Hartwig, A. (1997) Cobalt(II) inhibits the incision and the polymerization step of nucleotide excision repair in human fibroblasts. *Mutat Res*, **383**, 81-9.
- Kaufmann, W.K. und Paules, R.S. (1996) DNA damage and cell cycle checkpoints. *Faseb J*, **10**, 238-47.
- Kelman, Z. und Hurwitz, J. (1998) Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 236-238.
- Kitchin, K.T. (2001) Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol*, **172**, 249-61.
- Kostelac, D. (2001) Einfluss von Cobalt auf die Zellzykluskontrolle. wissenschaftliche Abschlussarbeit Universität Karlsruhe.

- Krueger, I., Mullenders, L.H. und Hartwig, A. (1999) Nickel(II) increases the sensitivity of V79 Chinese hamster cells towards cisplatin and transplatin by interference with distinct steps of DNA repair. *Carcinogenesis*, **20**, 1177-84.
- Latonen, L., Taya, Y. und Laiho, M. (2001) UV-radiation induces dose-dependent regulation of p53 response and modulates p53-HDM2 interaction in human fibroblasts. *Oncogene*, **20**, 6784-6793.
- Lee, S.H., Kim, D.K., Seo, Y.R., Woo, K.M., Kim, C.S. und Cho, M.H. (1998) Nickel (II)-induced apoptosis and G2/M enrichment. *Exp Mol Med*, **30**, 171-6.
- Lee, T.C., Huang, R.Y. und Jan, K.Y. (1985) Sodium arsenite enhances the cytotoxicity, clastogenicity, and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*, **148**, 83-9.
- Lee, T.C., Lee, K.C., Tzeng, Y.J., Huang, R.Y. und Jan, K.Y. (1986) Sodium arsenite potentiates the clastogenicity and mutagenicity of DNA crosslinking agents. *Environ Mutagen*, **8**, 119-28.
- Lee-Chen, S.F., Wang, M.C., Yu, C.T., Wu, D.R. und Jan, K.Y. (1993) Nickel chloride inhibits the DNA repair of UV-treated but not methyl methanesulfonate-treated Chinese hamster ovary cells. *Biol Trace Elem Res*, **37**, 39-50.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. und Cox, M.M. (1998) Prinzipien der Biochemie. 2.Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Li, J.H. und Rossman, T.G. (1989) Inhibition of DNA ligase activity by arsenite: a possible mechanism of its comutagenesis. *Mol Toxicol*, **2**, 1-9.
- Li, R., Waga, S., Hannon, G.J., Beach, D. und Stillman, B. (1994) Differential effects by the p21 CDK inhibitor on PCNA-dependent DNA replication and repair. *Nature (London)*, **371**, 534-7.
- Lison, D., Carbonnelle, P., Mollo, L., Lauwerys, R. und Fubini, B. (1995) Physicochemical mechanism of the interaction between cobalt metal and carbide particles to generate toxic activated oxygen species. *Chem Res Toxicol*, **8**, 600-6.
- Loignon, M., Fetni, R., Gordon, A.J. und Drobetsky, E.A. (1997) A p53-independent pathway for induction of p21waf1cip1 and concomitant G1 arrest in UV-irradiated human skin fibroblasts. *Cancer Res*, **57**, 3390-4.
- Medema, R.H., Klompaker, R., Smits, V.A. und Rijksen, G. (1998) p21waf1 can block cells at two points in the cell cycle, but does not interfere with processive DNA-replication or stress-activated kinases. *Oncogene*, **16**, 431-41.

- Meplan, C., Mann, K. und Hainaut, P. (1999) Cadmium induces conformational modifications of wild-type p53 and suppresses p53 response to DNA damage in cultured cells. *J Biol Chem*, **274**, 31663-70.
- Meyer, K.M., Hess, S.M., Tlsty, T.D. und Leadon, S.A. (1999) Human mammary epithelial cells exhibit a differential p53-mediated response following exposure to ionizing radiation or UV light. *Oncogene*, **18**, 5795-805.
- Murray, A.W. (1991) Coordinating cell cycle events. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **56**, 399-408.
- Nelson, W.G. und Kastan, M.B. (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 1815-23.
- Nishigaki, R., Mitani, H. und Shima, A. (1998) Evasion of UVC-induced apoptosis by photorepair of cyclobutane pyrimidine dimers. *Exp Cell Res*, **244**, 43-53.
- Nocentini, S. (1987) Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc. *Nucleic Acids Res*, **15**, 4211-25.
- Norbury, C.J. und Hickson, I.D. (2001) Cellular responses to DNA damage. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **41**, 367-401.
- NRC. (2001) Arsenic in Drinking Water Update 2001.
- O'Connor, P.M. (1997) Mammalian G1 and G2 phase checkpoints. *Cancer Surv*, **29**, 151-82.
- Okui, T. und Fujiwara, Y. (1986) Inhibition of human excision DNA repair by inorganic arsenic and the co- mutagenic effect in V79 Chinese hamster cells. *Mutat Res*, **172**, 69-76.
- Oller, A.R., Costa, M. und Oberdorster, G. (1997) Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol Appl Pharmacol*, **143**, 152-66.
- Orren, D.K., Petersen, L.N. und Bohr, V.A. (1997) Persistent DNA damage inhibits S-phase and G2 progression, and results in apoptosis. *Mol Biol Cell*, **8**, 1129-42.
- Pagano, M. (1998) Cell Cycle Control. Springer Verlag, Berlin.
- Palecek, E., Brazdova, M., Cernocka, H., Vlk, D., Brazda, V. und Vojtesek, B. (1999) Effect of transition metals on binding of p53 protein to supercoiled DNA and to consensus sequence in DNA fragments. *Oncogene*, **18**, 3617-25.
- Pande, G., Kumar, N.A. und Manogaran, P.S. (1996) Flow cytometric study of changes in the intracellular free calcium during the cell cycle. *Cytometry*, **24**, 55-63.
- Pines, J. (1993) Cyclins and cyclin-dependent kinases: take your partners. *NBS*, **18**, 195-197.

- Porter, D.W., Yakushiji, H., Nakabeppu, Y., Sekiguchi, M., Fivash, M.J., Jr. und Kasprzak, K.S. (1997) Sensitivity of Escherichia coli (MutT) and human (MTH1) 8-oxo-dGTPases to in vitro inhibition by the carcinogenic metals, nickel(II), copper(II), cobalt(II) and cadmium(II). *Carcinogenesis*, **18**, 1785-91.
- Prost, S., Bellamy, C.O., Clarke, A.R., Wyllie, A.H. und Harrison, D.J. (1998) p53-independent DNA repair and cell cycle arrest in embryonic stem cells. *FEBS Lett*, **425**, 499-504.
- Ravanat, J.L., Douki, T. und Cadet, J. (2001) Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. *J Photochem Photobiol B*, **63**, 88-102.
- Reinke, V. und Lozano, G. (1997) Differential activation of p53 targets in cells treated with ultraviolet radiation that undergo both apoptosis and growth arrest. *Radiat Res*, **148**, 115-22.
- Rhind, N. und Russell, P. (2000) Checkpoints: it takes more than time to heal some wounds. *Curr Biol*, **10**, R908-11.
- Riedel, E. (1999) Allgemeine und anorganische Chemie, de Gruyter, Berlin.
- Rivedal, E. und Sanner, T. (1980) Synergistic effect on morphological transformation of hamster embryo cells by nickel sulphate and benz[a]pyrene. *Cancer Lett*, **8**, 203-8.
- Rivedal, E. und Sanner, T. (1981) Metal salts as promoters of in vitro morphological transformation of hamster embryo cells initiated by benzo(a)pyrene. *Cancer Res*, **41**, 2950-3.
- Salnikow, K., An, W.G., Melillo, G., Blagosklonny, M.V. und Costa, M. (1999) Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors. *Carcinogenesis*, **20**, 1819-1823.
- Savory, J. und Wills, M.R. (1984) Arsenic [toxicity]. *Met. Umwelt*, 319-34.
- Shackelford, R.E., Kaufmann, W.K. und Paules, R.S. (1999) Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect*, **107 Suppl 1**, 5-24.
- Shaulian, E., Schreiber, M., Piu, F., Beeche, M., Wagner, E.F. und Karin, M. (2000) The mammalian UV response: c-Jun induction is required for exit from p53-imposed growth arrest. *Cell*, **103**, 897-907.
- Sheikh, M.S., Hollander, M.C. und Fornace, A.J., Jr. (2000) Role of Gadd45 in apoptosis. *Biochem Pharmacol*, **59**, 43-5.
- Sherr, C.J. (1993) Mammalian G1 cyclins. *Cell*, **73**, 1059-65.

- Shiao, Y.H., Lee, S.H. und Kasprzak, K.S. (1998) Cell cycle arrest, apoptosis and p53 expression in nickel(II) acetate- treated Chinese hamster ovary cells. *Carcinogenesis*, **19**, 1203-7.
- Sidjanin, D., Grdina, D. und Woloschak, G.E. (1996) UV-induced changes in cell cycle and gene expression within rabbit lens epithelial cells. *Photochem Photobiol*, **63**, 79-85.
- Simeonova, P.P., Wang, S., Toriuma, W., Kommineni, V., Matheson, J., Unimye, N., Kayama, F., Harki, D., Ding, M., Vallyathan, V. und Luster, M.I. (2000) Arsenic mediates cell proliferation and gene expression in the bladder epithelium: association with activating protein-1 transactivation. *Cancer Res.*, **60**, 3445-3453.
- Smith, M.L., Ford, J.M., Hollander, M.C., Bortnick, R.A., Amundson, S.A., Seo, Y.R., Deng, C.X., Hanawalt, P.C. und Fornace, A.J., Jr. (2000) p53-mediated DNA repair responses to UV radiation: studies of mouse cells lacking p53, p21, and/or gadd45 genes. *Mol Cell Biol*, **20**, 3705-14.
- Snyder, R.D., Davis, G.F. und Lachmann, P.J. (1989) Inhibition by metals of X-ray and ultraviolet-induced DNA repair in human cells. *Biol Trace Elem Res*, **21**, 389-98.
- Stewart, Z.A. und Pietenpol, J.A. (2001) p53 Signaling and cell cycle checkpoints. *Chem Res Toxicol*, **14**, 243-63.
- Tallkvist, J. und Tjalve, H. (1998) Transport of nickel across monolayers of human intestinal Caco-2 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, **151**, 117-22.
- Tchounwou, P.B., Ishaque, A.B. und Schneider, J. (2001) Cytotoxicity and transcriptional activation of stress genes in human liver carcinoma cells (HepG2) exposed to cadmium chloride. *Mol Cell Biochem*, **222**, 21-8.
- Thuy, C. (2001) Einfluss von Cadmium auf die Zellzykluskontrolle. wissenschaftliche Abschlussarbeit, Universität Karlsruhe.
- Trouba, K.J., Wauson, E.M. und Vorce, R.L. (2000) Sodium arsenite-induced dysregulation of proteins involved in proliferative signaling. *Toxicol Appl Pharmacol*, **164**, 161-70.
- Tsuzuki, K., Sugiyama, M. und Haramaki, N. (1994) DNA single-strand breaks and cytotoxicity induced by chromate(VI), cadmium(II), and mercury(II) in hydrogen peroxide-resistant cell lines. *Environ Health Perspect*, **102 Suppl 3**, 341-2.
- Vincent, F., Deplanque, G., Ceraline, J., Duclos, B. und Bergerat, J.P. (1999) p53-independent regulation of cyclin B1 in normal human fibroblasts during UV-induced G2-arrest. *Biol Cell*, **91**, 665-74.

- Vogt, B.L. und Rossman, T.G. (2001) Effects of arsenite on p53, p21 and cyclin D expression in normal human fibroblasts -- a possible mechanism for arsenite's comutagenicity. *Mutat Res*, **478**, 159-68.
- Wang, J.A., Fan, S., Yuan, R.Q., Ma, Y.X., Meng, Q., Goldberg, I.D. und Rosen, E.M. (1999) Ultraviolet radiation down-regulates expression of the cell-cycle inhibitor p21WAF1/CIP1 in human cancer cells independently of p53. *Int J Radiat Biol*, **75**, 301-16.
- Yang, J.L., Chen, M.F., Wu, C.W. und Lee, T.C. (1992) Posttreatment with sodium arsenite alters the mutational spectrum induced by ultraviolet light irradiation in Chinese hamster ovary cells. *Environ Mol Mutagen*, **20**, 156-64.
- Yang, Q., Manicone, A., Coursen, J.D., Linke, S.P., Nagashima, M., Forgues, M. und Wang, X.W. (2000) Identification of a functional domain in a GADD45-mediated G2/M checkpoint. *J. Biol. Chem.*, **275**, 36892-36898.
- Yih, L.H. und Lee, T.C. (2000) Arsenite induces p53 accumulation through an ATM-dependent pathway in human fibroblasts. *Cancer Res*, **60**, 6346-52.
- Yuan, S.-S.F., Su, J.-H., Hou, M.-F., Yang, F.-W., Zhao, S. und Lee, E.Y.H.P. (2002) Arsenic-induced Mre11 phosphorylation is cell cycle-dependent and defective in NBS cells. *DNA Repair*, **1**, 137-142.
- Zeng, X., Keller, D., Wu, L. und Lu, H. (2000) UV but not gamma irradiation accelerates p53-induced apoptosis of teratocarcinoma cells by repressing MDM2 transcription. *Cancer Res*, **60**, 6184-8.
- Zhan, Q., Chen, I.T., Antinore, M.J. und Fornace, A.J., Jr. (1998) Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of the GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding. *Mol Cell Biol*, **18**, 2768-78.
- Zhou, D., Salnikow, K. und Costa, M. (1998) Cap43, a novel gene specifically induced by Ni²⁺ compounds. *Cancer Res*, **58**, 2182-9.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
A549	Menschliche Lungenkrebszelllinie
As	Arsen
BER	Basen-Exzisionsreparatur
Cd	Cadmium
CdC	cell division cycle
CdK	Cyclinabhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
CHO-Zellen	Chinesische Hamster Eierstockzelllinie
Co	Cobalt
DAPI	4', 6'-Diamidino-2-Phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	Dulbeccos Minimum Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1, 4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxytymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fötales Kälberserum
Fpg	Formamidopyrimidin DNA-Glykosylase
g	Erdbeschleunigung
G ₁ /G ₂ -Phase	g = gap
GADD45	growth arrest DNA damage induced gene
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase

h	Stunde
HeLa-Zellen	Menschliche Gebärmutterhalskrebszelllinie
HFW-Zellen	Menschliche Vorhaut-Fibroblasten
hGADD45	humanes GADD45
hp21	humanes p21
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC ₅₀	inhibitory concentration, 50%
J	Joule
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
MCF7-Zellen	Menschliche Brustkrebszelllinie
MDM2	murine double minute 2 (p53-regulierendes Protein)
min	Minute
mm	Milimeter
MMS	Methylmethoxysulfonat
M-Phase	Mitose-Phase
mRNA	Boten-RNA
Mre11	meiotic recombination 11, Reparaturprotein
MTH1	menschliche 8-oxo-dGTPase
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
NHF-Zellen	Normale menschliche Fibroblasten
Ni	Nickel
Oligo(dT)	Oligodesoxythymidin
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion
RLT Puffer	Namensgebung Qiagen
RNA	Ribonukleotidsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPE Puffer	Namensgebung Qiagen
rpm	rounds per minute
RW1 Puffer	Namensgebung Qiagen
sek	Sekunde
SHE-Zellen	Syrische Hamster Embryonalzelllinie
S-Phase	Synthese-Phase

SR	Sulforhodamin
Taq-Polymerase	Thermus aquaticus Polymerase
UROtsa	SV40 immortalisierte menschliche Urothelium Zelllinie
UV	Ultraviolettes Licht
V79-Zellen	Chinesischer Hamster Zelllinie
WT-1	Wilms Tumor 1
wt-p53	Wildtyp p53
XPA	Xeroderma Pigmentosum, Gruppe A

8.2 Liste der verwendeten Chemikalien

<u>Bezeichnung :</u>	<u>Lieferant:</u>
10 x PCR Puffer	Gibco BRL
5 x First Strand Puffer	Gibco BRL
Agarose	Roth
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
$\text{CdCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	Fluka
CoCl_2	Fluka
DAPI/SR-Lösung	Partec
DMEM	Gibco BRL/Sigma
DMSO	Sigma
DNA-Leiter	Gibco BRL
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Invitrogen
DTT	Gibco BRL
EDTA	Merck
Ethanol p.a.	Merck
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälberserum, FKS	Sigma
Giemsa-Farbstoff	Merck
Glycerin	Merck
HCl, 38%	BASF
HCl, 4N	Fluka
KCl puriss p.a.	Fluka
KH_2PO_4 puriss p.a.	Fluka
MgCl_2	Gibco BRL
Na_2HPO_4 puriss p.a.	Fluka
NaAsO_2 p.a.	Fluka
NaCl puriss p.a.	Fluka
NaHCO_3 puriss p.a.	Fluka
NaOH, 4N	Fluka
$\text{NiCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$	Merck
Oligo(dT)	Roche

Penicillin/Streptomycin 5000 IU/ml	Gibco BRL
Primer (p21, GADD45, GAPDH)	MWG-Biotech AG
Reverse Transkriptase („Superskript“)	Invitrogen
RLT Puffer	Qiagen
Rnase Out	Gibco BRL
RPE Puffer	Qiagen
RW1 Puffer	Qiagen
β -Mercaptoethanol	Fluka
Taq Polymerase	Invitrogen
Tris	Sigma
Trypsin 10-fach	Sigma
Xylencyanol	Fluka

8.3 Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

<u>Bezeichnung:</u>	<u>Lieferant:</u>
Bottle Top Filter	Nalgene
Brutschrank Hera cell	Heraeus
Digitalwaage	Sartorius GmbH Göttingen
Durchflusszytometer BD-LCS	Becton - Dickinson
Durchflusszytometer	Partec
Durchflusszytometer Software PAS-III	Partec
Durchflusszytometer Software CellQuest/ModFit	Beston Dickinson
Geldokumentationssystem	Herolab
Gelkammer	Peqlab
Glaspipetten	Brand
Kanülen	Braun
Kryoröhrchen	Greiner Labortechnik
Kühlschrank	Liebherr
Kulturschalen	Biochrom
Küvetten	Eppendorf
Lochplatten	Sarstedt
Mikroskop	Zeiss
Netzgerät	Biorad
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld
PCR-Gefäße	Biozym
pH-Meter	WTW
Photometer	Eppendorf
Pipetten	Eppendorf
Pipettenspitzen	Plastibrand
Pipettierhilfe pipetus akku	Hirschmann Laborgeräte
Reaktionsgefäße, 2 ml	Eppendorf
Spritzen (1 ml)	Braun
Sterilbank Hera safe	Heraeus
Stickstoffbehälter	MVE
Thermocycler	Biorad

UV-Lampe

Bioblock Scientific

UV-Radiometer

PRC Krochmann GmbH

Wasserbad

Memmert

Zellzähler Casy-1

Schärfe System

Zentrifuge

Eppendorf

Zentrifuge, Biofuge

Heraeus

Zentrifugenröhrchen

Sarstedt

8.4 Verwendete Lösungen und Puffer

Alle Lösungen werden mit über Quarz doppelt destilliertem Wasser angesetzt. Die Medien und Lösungen für die Zellkultur werden sterilfiltriert.

PBS-Lösung (pH-Wert: 7,4):

100 mM	NaCl
4,5 mM	KCl
7 mM	Na ₂ HPO ₄
3 mM	KH ₂ PO ₄

PBS-EDTA-Lösung (pH-Wert: 7,4):

100 mM	NaCl
7 mM	Na ₂ HPO ₄
0,5 mM	EDTA
4,5 mM	KCl
3 mM	KH ₂ PO ₄

Trypsin-Lösung:

0,25%	Trypsin in PBS-EDTA
-------	---------------------

Kulturmedium A549-Zellen:

DMEM
10% FKS
100 U Penicillin/ml
100 µg Streptomycin/ml

TBE Puffer:

0,5 M	Tris
0,5 M	Borsäure
0,01 M	EDTA

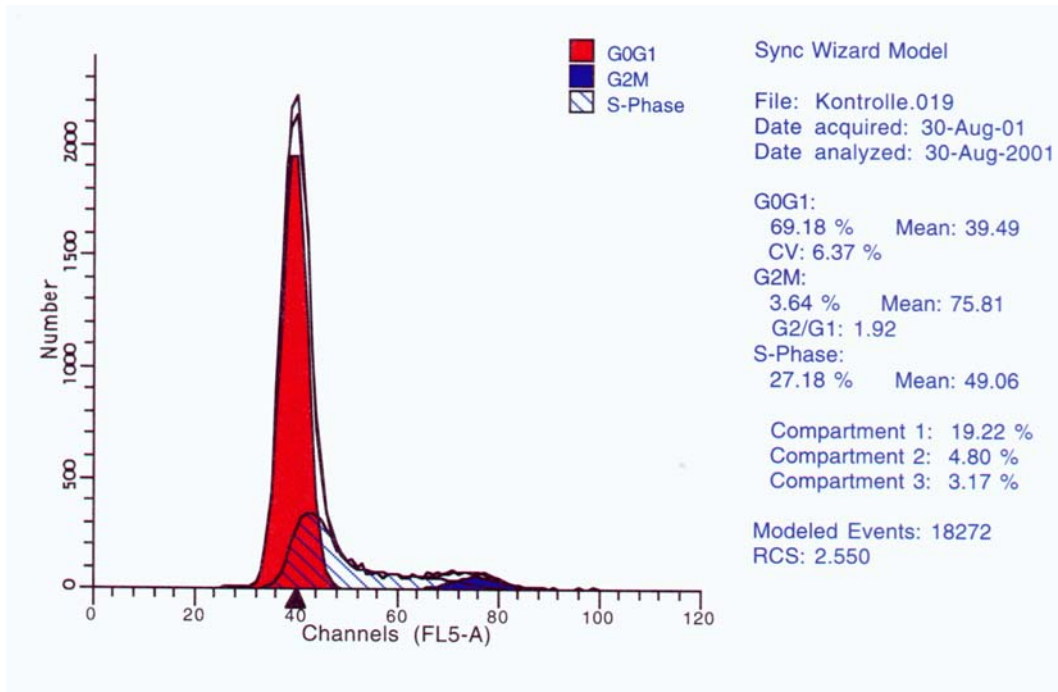
Ladepuffer:

0,25 x	TBE
40%	Glycerol
0,2%	Bromphenolblau
0,2%	Xylencyanol

8.5 Histogramme

Beispielhaft sind im Folgenden einige Histogramme mit der entsprechenden Auswertung dargestellt.

a)



b)

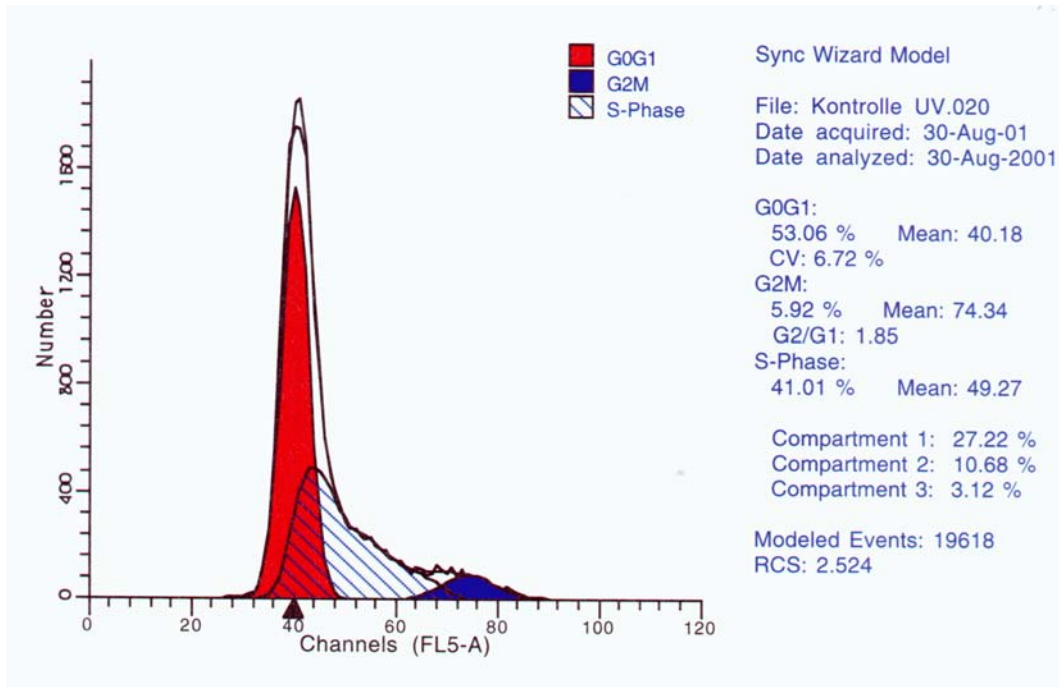


Abbildung 37: Histogramme der Zellzyklusphasenverteilung a) ohne Bestrahlung b) mit 5 J/m² UVC-Bestrahlung im Durchflusszytometer von Becton Dickinson. 1x10⁶ Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum mit 5 J/m² UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

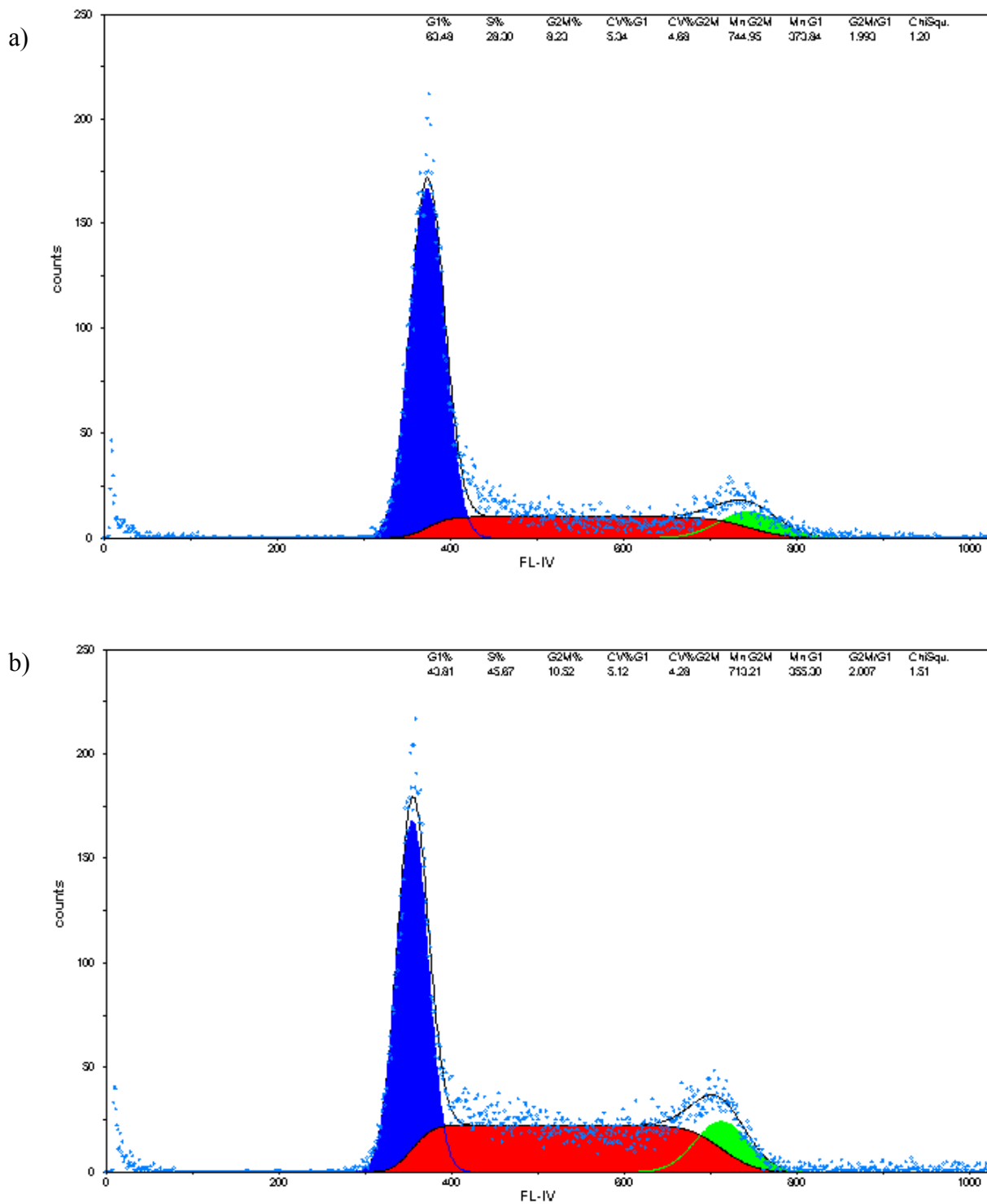


Abbildung 38: Histogramme der Zellzyklusphasenverteilung nach Bestrahlung mit 5 J/m^2 UVC und Inkubation mit a) $100 \mu\text{M Ni(II)}$ und b) $500 \mu\text{M Ni(II)}$ im Durchflusszytometer von Partec. 1×10^6 Zellen wurden ausgesät und nach 24 Stunden Wachstum für 24 Stunden mit Ni(II) inkubiert und danach mit 5 J/m^2 UVC bestrahlt. Im Anschluss an die Nachinkubation in Gegenwart von NiCl_2 wurde die Zellzyklusphasenverteilung im Durchflusszytometer bestimmt.

Publikationsliste

Publikationen in Fachzeitschriften

A. Hartwig, M. Asmuss, I. Ehleben, U. Herzer, D. Kostelac, T. Schwerdtle, A. Bürkle (2002), Interference by toxic metal ions with DNA-repair processes and cell cycle control. Environmental Health Perspectives, im Druck

Veröffentlichte Abstracts

I. Ehleben und A. Hartwig (2000), Einfluss von Ni(II) auf die Zellzykluskontrolle UV-geschädigter Lungenkrebszellen. Lebensmittelchemie 54(4), S. 80-81

D. Kostelac, I. Ehleben, A. Hartwig (2001), Einfluss von Co(II) auf die Zellzykluskontrolle UV-geschädigter Lungenkrebszellen. Lebensmittelchemie 55(5), S. 132-133

Vortrag auf Fachtagung

19. GUM-Tagung 2001, 25.- 28.9., Karlsruhe

Effekte von As(III), Co(II) und Ni(II) auf den Zellzyklus und die Zellzykluskontrolle in der menschlichen Lungenkrebszelllinie A549

Posterbeiträge auf Fachtagungen

28. Jahrestagung der EEMS, 7.-11.9.1998, Salzburg, Österreich

I. Ehleben and A. Hartwig

Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by mercury(II) in mammalian cells

18. GUM-Tagung 2000, 22.-25.2.2000, Ulm

I. Ehleben und A. Hartwig

Einfluss von Ni(II) auf die Zellzykluskontrolle UV-geschädigter Lungenkrebszellen

GDCH Regionalverband Süd-West Arbeitstagung 2000, 3.-4.4.2000, Karlsruhe

I. Ehleben und A. Hartwig

Einfluss kanzerogener Metallverbindungen auf den Zellzyklus nach UV-Schädigung in A549 Lungenzellen

DNA repair 2000, 18.-21.7.2000, Essen

I. Ehleben, A. Hartwig

Einfluss von Nickel auf die Zellzykluskontrolle nach UV-Strahlung

Herbsttagung der GBM, 10.-13.10.2000, München

I. Ehleben und A. Hartwig

Changes in cell cycle progression and control after incubation with nickel or arsenic

GDCH Regionalverband Süd-West Arbeitstagung 2001, 2.-3.4.2001, Kaiserslautern

D. Kostelac, I. Ehleben, A. Hartwig

Einfluss von Co(II) auf die Zellzykluskontrolle UV-geschädigter Lungenkrebszellen

Third International Meeting on molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenicity

2.-5.9.2001, Sardegna, Italy

I. Ehleben, U. Herzer, D. Kostelac, A. Hartwig

Arsenic(III), cobalt(II) and nickel(II) interfere with cell cycle progression and control in A549 human lung cells

43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie 12.-14.3.2002, Mainz

I. Ehleben, U. Herzer, D. Kostelac, C. Thuy, A. Hartwig

Interference of As(III), Cd(II), Co(II) and Ni(II) with cell cycle progression and control in A549 human lung cells

Danksagung

Ich danke Frau **Prof. Hartwig** für die Betreuung und Unterstützung während der Promotion, für die hilfreichen Diskussionen und für das, was ich den letzten Jahren fachlich von ihr gelernt habe.

Mein besonderer Dank gilt **Christina Thuy** und **Drazen Kostelac**, die mit ihren Diplomarbeiten und mit ihrer Freundschaft zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Monika Asmuss, **Ute Herzer**, **Anke Pelzer**, **Tanja Schwerdtle**, **Holger Blessing** und **Andreas Zeller** waren „mein“ Arbeitskreis und ihnen allen danke ich für die hervorragende Atmosphäre. Sie sind alle viel mehr als nur Arbeitskollegen.

Den Kollegen vom Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie und dabei besonders **Stefan Kranz** danke ich für die tolle Arbeitsatmosphäre.

Herrn **Prof. Dr. Weibezahn** und Herrn **Prof. Dr. Krug** am Forschungszentrum Karlsruhe danke ich für die technische Unterstützung und die Bereitstellung der Durchflusszytometer.

Für die fachliche Unterstützung und vor allem ihre Freundschaft möchte ich mich bei **Conny Hodapp** und **Sabine Kulling** bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine liebe Familie. Ohne meine Mutter **Christel Rohde**, meinen Vater **Karlheinz Ehleben**, meinen Stiefvater **Herb Rohde** und meine Oma **Dora Athen** wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Sie haben mir jede mögliche Unterstützung gegeben und waren immer für mich da.

LEBENS LAUF

von Ingo Ehleben

04. August 1969 geboren in Hamburg

1975-1979 Grundschule Langenfort in Hamburg

1979-1988 Gymnasium Uhlenhorst-Barmbek in Hamburg
Abschluss: allgemeine Hochschulreife,

1989-1998 Universität Bremen
Hauptfach: Chemie
Nebenfach: Wirtschaftswissenschaften

1997-1998 Diplomarbeit mit dem Thema:
„Einfluss von Quecksilber(II) auf die Induktion und Reparatur von
oxidativen DNA-Schäden“

1998-2002 Dissertation mit dem Thema:
„Einfluss kanzerogener Metallverbindungen auf den Zellzyklus und
seine Kontrolle“