



KfK 5412 B
November 1994

***In vitro*-Untersuchungen
zum Einfluß toxischer
schwermetallorganischer
Verbindungen auf zellularer
Ebene**

A. Käfer
Institut für Toxikologie

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Kernforschungszentrum Karlsruhe

Institut für Toxikologie

KfK 5412 B

***In vitro*-Untersuchungen zum Einfluß toxischer
schwermetallorganischer Verbindungen auf zellularer
Ebene**

Andrea Käfer

Dissertation genehmigt von der Fakultät für Bio- und Geowissenschaften
der Universität Karlsruhe

Als Manuskript gedruckt
Für diesen Bericht behalten wir uns alle Rechte vor

Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
Postfach 3640, 76021 Karlsruhe

ISSN 0303-4003

ZUSAMMENFASSUNG

Das Interesse an der Wirkung von Organometallverbindungen auf Umwelt und Gesundheit nimmt ständig zu, denn diese Stoffe sind sehr viel giftiger als ihre anorganischen Pendanten. Blei- und zinnorganische Verbindungen sind neurotoxisch und immunotoxisch. Die Mechanismen, die zu dieser Toxizität führen, sind immer noch nicht verstanden. Die vorliegende Arbeit weist die Wirkung blei- und zinnorganischer Verbindungen auf verschiedenen Ebenen der Zelle nach. Dies könnte klinische und auch subklinische Symptome erklären helfen.

1. An der Plasmamembran lösen die verwendeten Organometalle eine calciumabhängige Phospholipase A₂-Aktivierung und damit eine Arachidonsäurefreisetzung aus Membranphospholipiden aus. Arachidonsäure ist Vorstufe wichtiger Entzündungsmediatoren.
2. Die Exposition von Zellen mit organischen Blei- und Zinnverbindungen führt zur Zerstörung der Aktinfilamente. Diese Zytoskelettstrukturen sind an Bewegungsvorgängen der Zelle, an deren Formgebung und an der Zellteilung beteiligt.
3. Inkubation von Zellen mit diesen Verbindungen bewirkt Veränderungen der Zellzyklusverteilung und damit des Proliferationsverhaltens. Immunzellen proliferieren das ganze Leben lang und auch beim sich entwickelnden Nervensystem spielt die ordnungsgemäße Proliferation eine wichtige Rolle.
4. Auch eine erhöhte Expression des Proto-Onkogens *c-jun*, das einen wichtigen Transkriptionsfaktor codiert, wurde gezeigt.

All diese Effekte können möglicherweise helfen, die toxische Wirkung der Substanzen zu verstehen, und die Mechanismen, die zu dieser Wirkung führen, zu erklären. Auch werden mögliche subklinische Veränderungen leichter erkennbar werden.

In vitro examinations about the influence of toxic organometals on cellular level

ABSTRACT

Interest in environmental and health effects of organometals is increasing since it is established that organic heavy metal derivatives are much more toxic than the inorganic counterparts. Organic lead and tin compounds are known to be neurotoxic and immunotoxic. The mechanism by which such compounds act are not fully understood. This work shows that at different cellular levels, organo lead and organo tin compounds influence important mechanisms leading to effects probably involved in clinical and subclinical symptoms of toxicity.

1. At the plasmamembrane they induce a calcium dependent activation of phospholipase A₂ liberating arachidonic acid a precursor of important cellular mediators.
2. After exposure with organometals disruption of actin filaments takes place. These cytoskeletal structures are involved in cellular movements, stabilization and cell division.
3. Alterations in cell cycle distribution are shown. Proliferation plays an important role for immunological cells and for the developing central nervous system.
4. Enhanced expression of the proto-oncogene *c-jun* coding for a transcription factor could be detected.

All these effects may help to explain the overt toxicity of organic lead and organic tin compounds. Attention to possible subclinical effects will be sharpened.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen

1. Einleitung.....	1
1.1 Wirkungen am Gesamtorganismus.....	2
1.2 Wirkungen an Membranen.....	3
1.3 Wirkungen auf das Zytoskelett und den Zellkern.....	5
1.4 Ziel der Arbeit.....	8
2. Material und Methoden.....	9
2.1 Chemikalien und Enzyme.....	9
2.1.1 Reinheit der schwermetallorganischen Verbindungen.....	10
2.1.1.1 Schmelzpunktbestimmung.....	10
2.1.1.2 NMR-Spektroskopie.....	10
2.2 Zellkultur.....	11
2.2.1 HL-60 Zellen.....	11
2.2.1.1 Differenzierung der HL-60 Zellen zu Neutrophilen.....	12
2.2.1.2 Bestimmung des Differenzierungsgrades von HL-60 Zellen (NBT-Test).....	12
2.2.2 NRK-Zellen.....	13
2.2.3 P388D ₁ -Zellen.....	14
2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	14
2.3 Vitalitätstest.....	14
2.4 Bestimmung der Zellzahl.....	15
2.5 Giemsa-Färbung.....	15
2.6 Verteilung der ¹⁴ C-Arachidonsäure innerhalb der Lipidklassen von HL-60 Zellen.....	15
2.6.1 Markierung mit ¹⁴ C-Arachidonsäure.....	15
2.6.2 Inkubation markierter HL-60 Zellen.....	16
2.6.3 Extraktion der Lipide.....	17
2.6.4 Dünnschichtchromatographie.....	17
2.6.5 Autoradiographie und Messung im Flüssigkeitsszintillationszähler....	18
2.7 Färbung von Aktin mit Phalloidin-Rhodamin.....	18
2.8 Bestimmung des DNA-Gehaltes undifferenzierter HL-60 Zellen (Zellzyklus) ..	19
2.8.1 Behandlung der Zellen und Messen des DNA-Gehaltes.....	19
2.8.2 Auswertung der Originalhistogramme.....	20
2.9 Isolierung und Aufarbeitung der RNA aus P388D ₁ -Zellen.....	21
2.9.1 Allgemeines zur Behandlung von Nukleinsäuren.....	21
2.9.2 Inkubation und Ernte der Zellen.....	21
2.9.3 RNA-Extraktion.....	21
2.9.4 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nuklein- säuren.....	22
2.9.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA.....	22
2.9.6 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern blotting).....	23
2.9.7 Hybridisierung mit DNA-Sonden und Autoradiographie.....	24
2.10 DNA-Sonden und ihre Aufarbeitung.....	25
2.10.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA.....	25
2.10.2 DNA-Gelelektrophorese.....	25

2.10.3 Extraktion der DNA aus Agarose	26
2.10.4 Radioaktive Markierung von DNA	26
2.11 Statistik	27
3. Ergebnisse	28
3.1 Triphenylblei und seine Wirkung auf differenzierte HL-60 Zellen	28
3.1.1 Akute Zytotoxizität	28
3.1.2 Freisetzung von ¹⁴ C-Arachidonsäure aus Membranphospho- lipiden	29
3.2 Organometalle und Arachidonsäurehaushalt	31
3.2.1 Der Effekt von Quinacrin die organometallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung	31
3.2.2 Untersuchungen zum Einfluß des extrazellulären Calciums mit Hilfe des Calciumchelators EGTA	32
3.2.3 Der Effekt des Calciumkanalblockers Verapamil auf die organo- metallinduzierte AA-Freisetzung	33
3.2.4 Der Einfluß von Amilorid auf die durch Organometalle erhöhte freie Arachidonsäure	34
3.2.5 Die Wirkung von Pertussis Toxin und seinem B-Oligomer auf die organoschwermetallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung	35
3.2.6 Zusammenwirken von Verapamil und Pertussis Toxin auf die Freisetzung von Arachidonsäure durch Organometalle	37
3.3 Organometalle und Aktinfilamente	38
3.4 Einfluß von Organometallen auf die Proliferation und den Zellzyklus	42
3.4.1 DNA-Histogramme	42
3.4.1.1 Veränderung der Zellzyklusverteilung	42
3.4.1.2 Auftreten eines "Prä-G ₁ -Peaks"	47
3.4.2 Zusätzliche Untersuchungen	47
3.4.2.1 Vergleich der Vitalität und der Zellzahlen von Kontrollen und behandelten Zellen	47
3.4.2.2 Vergleich der Anzahl der Zellkerne	48
3.4.2.3 Differenzierungsgrad der Zellen	48
3.5 Organobleiverbindungen und Expression von Proto-Onkogenen	50
3.5.1 Einfluß von Organobleiverbindungen auf <i>c-jun</i>	50
3.5.2 Einfluß von Triethylblei auf <i>c-myc</i>	51
4. Diskussion	53
4.1. Wirkungen an der Plasmamembran	53
4.2. Wirkungen auf Zytoskelettstrukturen und den Zellzyklus	60
4.3. Wirkungen auf die Genexpression	65
5. Zusammenfassung	71
6. Literaturverzeichnis	72
7. Anhang	

ABKÜRZUNGSLISTE

AA	Arachidonsäure
ATP	Adenosintriphosphat
A23187	Calciumionophor A23187
Bu ₂ Sn	Dibutylzinndichlorid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
Et ₃ Pb	Triethylbleichlorid
FKS	fötales Kälberserum
fMLP	Chemotaktisches Peptid N-Formyl-Methionylleucylphenylalanin
<i>fos</i> ; Fos	ein Proto-Onkogen bzw. dessen mRNA; Genprodukt (Protein)
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hi-FKS	hitze-inaktiviertes FKS
<i>jun</i> ; Jun	ein Proto-Onkogen bzw. dessen mRNA; Genprodukt (Protein)
LC ₅₀	Konzentration, bei der 50% der Zellen abgetötet sind
Me ₃ Pb	Trimethylbleichlorid
Me ₃ Sn	Trimethylzinnchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
<i>myc</i> ; Myc	ein Proto-Onkogen bzw. dessen mRNA; Genprodukt (Protein)
NBT	Nitroblautetrazolium
NMR	"nuclear magnetic resonance" (Kernspinresonanz)
PAF	Plättchen-aktivierender-Faktor
PBS	"phosphate buffered saline"
Ph ₃ Pb	Triphenylbleichlorid
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PT	Pertussis Toxin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	Ultraviolett

Einige verwendete Maßeinheiten:

Bq	Becquerel
°C	Grad Celcius
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/sek ²)
h	Stunde(n)
mA	Milli-Ampere
min	Minute(n)
rpm	Umdrehungen/min (rounds per minute)
sek	Sekunde(n)
U	Enzymeinheit
V	Volt
v	Volumen

1. EINLEITUNG

Metalle gehören zu den ältesten bekanntermaßen toxisch wirkenden Substanzen. Sie selbst und ihre Verbindungen sind häufig organotrop und reichern sich in unterschiedlichen Organen an. Ein wichtiger Angriffspunkt vieler toxischer Metalle, wie z. B. Quecksilber und Blei, ist das Zentralnervensystem. Im Gegensatz zu den genannten Metallen scheint anorganisches Zinn ungiftig zu sein und wird immer wieder als wichtiges Spurenelement diskutiert, jedoch ist bis heute keine essentielle Funktion des Zinns im Körper beschrieben. Um so auffälliger ist, daß seine organischen Abkömmlinge durchaus toxisch sind, im allgemeinen aber weniger giftig wirken als ihre Organoblei- und Organoquecksilberpendants. Während der Mensch schon seit Jahrhunderten mit der Wirkung anorganischer Schwermetallverbindungen Bekanntschaft gemacht hat, kennt man sowohl Organoblei- als auch Organozinnverbindungen erst seit Mitte des 19. Jahrhunderts (Bähr & Langer, 1975; Snoeij *et al.*, 1987). Sie sind vor allem anthropogenen Ursprungs, können jedoch auch durch Biomethylierung aus anorganischen Salzen entstehen. Ihre Herstellung und Verwendung, und damit ihre Verbreitung in der Umwelt, sind seit Beginn dieses Jahrhunderts stark angestiegen. Bleiorganische Verbindungen finden unter anderem Verwendung als Benzinzusätze, Flammenschutzmittel und Antifäulnisanstriche (Bähr & Langer, 1975). Zwei Drittel der Organozinnproduktion dienen großtechnisch der Stabilisierung von PVC. Ein weiteres großes Anwendungsgebiet ist die biozide Aktivität von Organozinnverbindungen, die daher Antifäulnisanstrichen, Holzschutz- und Desinfektionsmitteln zugesetzt sind (Aschner & Aschner, 1992; Craig, 1982).

Gerade aufgrund der bioziden Eigenschaften von schwermetallorganischen Verbindungen steigt deren Produktion ständig an. Laut Grandjean (1983) beträgt die Menge emittierten Organobleis jährlich 7 000 t. Annähernd 35 000 t Organozinn werden pro Jahr produziert (Aschner & Aschner, 1992). Besonders organische Zinnverbindungen werden also in immer größerer Menge in die Umwelt eingetragen und gelangen so in Luft, Gewässer und Boden. Dabei bergen diese Stoffe ein hohes Risiko, denn die überwiegende Mehrheit metallorganischer Verbindungen ist lipidlöslich und reichert sich in der Biosphäre an. Der Mensch wird als Folge dieser Emission über Luft und Wasser sowie über die Nahrungskette mit diesen Substanzen ständig belastet. Täglich werden etwa 3,6 mg Zinn und ungefähr 300 µg Blei mit der Nahrung aufgenommen, wovon jedoch nur ein Bruchteil resorbiert wird. Im menschlichen Blut sind im Durchschnitt 140 µg Zinn/l und 70-220 µg Blei/l enthalten (Baselt, 1982a; 1982b). Die Luft enthält je nach Standort zwischen 12 und 800 ng Zinn/m³. In Städten kann der Organobleigehalt der Luft 300 ng/m³ betragen, wodurch ein Erwachsener in der Stadt im Durchschnitt 20-40 µg Blei täglich inhaliert (Baselt, 1982a; Grandjean, 1983). Aufgenommene Tetraalkylblei- und Tetraalkylzinnverbindungen werden vor allem in der Leber zu den toxischeren trialkylierten Formen umgesetzt (Dauderer, 1990; Grandjean, 1983). Die Organoblei- und Organozinnverbindungen werden vorallem über Urin und Fäces ausgeschieden; je nach Substanz überwiegt einer der beiden Wege.

Da Organometalle ungefähr 1000fach toxischer sind als ihre anorganischen Vertreter, sollte man ihre ökologische Relevanz nicht unterschätzen, zumal in der Umwelt durch ihre Degradierung bzw. Methylierung eine Vielzahl zusätzlicher Species entstehen kann. Bei der Aufnahme in den Körper reichern sich die meisten schwermetallorganischen Verbindungen im Gehirn an und sind wohl daher auch in erster Linie neurotoxisch.

Während es meist relativ einfach ist, akute Symptome durch Exposition mit hohen Dosen einer toxischen Verbindung festzustellen, werden subklinische Veränderungen durch chronische Exposition mit niedrigen Dosen über eine lange Zeit hin unter Umständen nicht erkannt und können damit auch weder vermieden noch behandelt werden. Gerade in der heutigen Zeit geht es aber weniger um akute Vergiftungserscheinungen. Durch eine ausgedehnte Kontamination der Umwelt mit einem Toxin besteht die Möglichkeit gesundheitlicher Schädigungen durch kontinuierliche Aufnahme niedriger Dosen. Zur Feststellung solch chronischer Schäden gibt es aber bis heute keine zuverlässigen Parameter, denn die Mechanismen, mit welchen Chemikalien Zellen schädigen, sind trotz intensiver Anstrengungen vieler Arbeitsgruppen nur unzureichend bekannt. Daher ist es notwendig, die zellularen Mechanismen, derer sich z.B. die Organometalle bedienen, und die schließlich zu den chronischen und akuten Vergiftungserscheinungen führen, näher zu untersuchen und aufzuklären.

1.1 WIRKUNGEN AM GESAMTORGANISMUS

Blei und bleihaltige Verbindungen zeigen wie organische Zinnverbindungen ein breites Spektrum toxischer Effekte auf den Gesamtorganismus. Hierher gehören beispielsweise Wirkungen auf die Blutbildung, die Nierenfunktion, das Immunsystem und das Nervensystem (Craig, 1982). Im Tierversuch zeigte sich, daß die Exposition mit Organozinn und Organoblei schwerwiegende Verhaltensstörungen hervorruft (Bushnell & Evans, 1986; Hagan *et al.*, 1988; Walsh *et al.*, 1986). Diese sind oft begleitet von histologischen Veränderungen des Zentralnervensystems, besonders in Bereichen des limbischen Systems (Reuhl *et al.*, 1985; Walsh *et al.*, 1986). Auch beim Menschen bewirkt Intoxikation mit diesen Stoffen derartige Schäden und kann bis zum Tode führen. Ein trauriges Beispiel hierfür bietet das gegen Staphylokokken verabreichte organozinnhaltige "Stalinon", welches in den 50er Jahren in Frankreich über 100 von 217 Patienten das Leben gekostet hat (Boyer, 1989). Bei Organozinnvergiftung treten unter anderem Lähmungen, Tremor, Kopfschmerz, Erbrechen und Störungen des Gleichgewichtssinnes auf (Boyer, 1989; Dauderer, 1990). Ähnliche Erscheinungen sind auch mit der akuten Exposition mit Blei und seinen organischen Abkömmlingen verknüpft (Craig, 1982; Friberg *et al.*, 1979). Neben ihrer Neurotoxizität sind einige Organometalle auch immunotoxisch. Dies äußert sich beispielsweise in einer Atrophie des Thymus, der Inhibition der T-Lymphozytenaktivität, aber auch in der Reduktion der Chemotaxis von Neutrophilen (Boyer, 1989). Zusätzlich zu diesen Gemeinsamkeiten hat jede schwermetallorganische Verbindung auch ihre ganz eigenen charakteristischen Effekte, was auf unterschiedliche Mechanismen zurückgeführt werden muß.

1.2 WIRKUNGEN AN MEMBRANEN

Das erste Ziel, auf das ein Toxin bei einer Zelle trifft, ist die Plasmamembran. Diese ist leicht vom Toxin erreichbar und funktionell wichtig. Sie ist es, welche Ionengradienten aufrecht erhält, extrazelluläre Signale aufnimmt und in das Innere der Zelle weitergibt. Membranen dienen außerdem der Kompartimentierung der Zelle. Die verschiedenen Kompartimente, sprich Organellen, haben unterschiedliche Funktionen und sind für das Überleben der Zelle unentbehrlich. Wirkungen von Xenobiotika an intrazellulären Membranen können ebenfalls zu Funktionsverlusten und damit zur Schädigung der Zelle führen.

Tributylzinn beispielsweise bindet an die Plasmamembran von Erythrozyten (Ali *et al.*, 1987) und bildet dort elektronendichte Aggregate (Gray *et al.*, 1987). Von verschiedenen Organozinnverbindungen ist bekannt, daß sie die Na^+/K^+ -ATPase und die γ -Aminobuttersäure-Aufnahme hemmen (Costa, 1985). Trialkylierte Blei- und Zinnverbindungen beeinträchtigen die Mitochondrienfunktion, indem sie den Cl^-/OH^- -Austausch über die Membran stören und die ATP-Hydrolyse stimulieren (Aldridge *et al.*, 1977). Die Zellen verlieren damit die für ihr Überleben wichtige Fähigkeit, aus Nährstoffen Energiereserven anzulegen. Triorganozinnverbindungen können auch als Ionophor dienen und den Austausch von Anionen gegen OH^- -Ionen über die Membran modulieren (Selwyn, 1976).

Immer wieder wird von einer durch Organometalle ausgelösten Erhöhung der intrazellulären und intrasynaptosomalen Calciumkonzentration berichtet (Aw *et al.*, 1990; Denny *et al.*, 1993; Kaeber *et al.*, 1988; Komulainen & Bondy, 1987; Krug *et al.*, 1993). Der Gehalt freien Calciums im Zytosol unterliegt einer strengen Kontrolle. An der Plasmamembran wird dabei ein Konzentrationsgradient über mehrere Größenordnungen aufrecht erhalten (mM außen, nM in der Zelle; Carafoli, 1987). Kleinste Änderungen der zytosolischen Calciumkonzentration können von der Zelle für die Signaltransduktion von der Zelloberfläche ins Innere genutzt werden. Viele der in der Zelle ablaufenden Vorgänge sind von einer bestimmten Calciumkonzentration abhängig oder werden in ihrer Aktivität durch Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration reguliert. Ein Eingriff in die Calciumhomöostase kann deshalb weitreichende Folgen haben.

Wie Calcium ist auch die Arachidonsäure Teil von Signalübermittlungskaskaden, deren Störung der Zelle nicht nur kurz- sondern auch längerfristig schaden kann. Daher wird auch die Konzentration der freien Arachidonsäure wie die Calciumkonzentration streng reguliert. Besonders neutrophile Granulozyten treten über Produkte aus der Arachidonsäure-Kaskade mit anderen Zellen, wie z.B. Makrophagen, Mastzellen und Thrombozyten, in Wechselwirkung. In all diesen Zelltypen spielt der Deacylierungs-Reacylierungszyklus der Arachidonsäure, der "Lands-Zyklus" (Abb. 1.1), eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gehaltes an freier, nicht acylierter Arachidonsäure (Lands, 1979). Diese vierfach ungesättigte C_{20} -Fettsäure ist Vorstufe wichtiger Mediatoren, die man zusammenfassend Eicosanoide nennt (Abb. 1.1). Hierher gehören Prostacycline, Prostaglandine und Thromboxane, die über Cycloendoperoxide aus Arachidonsäure entstehen, genauso wie die Leukotriene und Hydroxysäuren, die durch eine Lipxygenase-Reaktion gebildet werden. Neben

vielen anderen Funktionen spielen diese Mediatoren eine Rolle bei Entzündungsreaktionen, bei Allergien und Pseudoallergien, aber auch bei Schmerzphänomenen wie Migräne. Für weitere Informationen sei auf einige Übersichtsartikel verwiesen: Dennis, 1987; Ganong, 1991; Goerig *et al.*, 1985; Irvine, 1982; Scheuer, 1989.

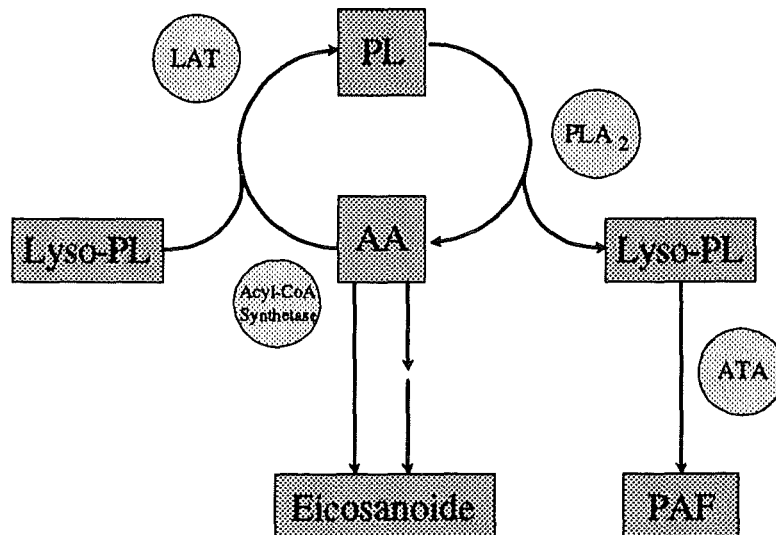


Abb. 1.1: "Lands-Zyklus".

Schematische Darstellung mit zusätzlichen Informationen über den möglichen Verbleib von Lysophospholipiden und Arachidonsäure. PL: Phospholipide; Lyso-PL: Lysophospholipide; AA: Arachidonsäure; PAF: Plättchen aktivierender Faktor; LAT: Lysophospholipid-Acyl-Transferase; PLA₂: Phospholipase A₂; ATA: Acetyltransferase.

Schon seit längerem ist bekannt, daß schwermetallorganische Verbindungen Einfluß auf den Arachidonsäurestoffwechsel nehmen. Die durch Organometalle ausgelöste Thrombozytenaggregation (Hecker *et al.*, 1989; Macfarlane, 1981; O'Brien, 1963) wird auf den Effekt der Erhöhung der freien Arachidonsäurekonzentration zurückgeführt, deren Metabolisierung zu Endoperoxiden und Thromboxanen führt (Krug & Berndt, 1987). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, daß organische Quecksilberverbindungen eine Erhöhung der freien Arachidonsäure bewirken. Dabei wird diskutiert, ob es sich um eine Erhöhung der Deacylierung dieser Fettsäure oder um eine Hemmung ihres Einbaus in Membranphospholipide durch die Reaktion einer Lysophospholipid-Acyl-Transferase handelt (Hecker *et al.*, 1989; Hornberger & Patscheke, 1990; Hunter *et al.*, 1984). Auch die zinn- und bleiorganischen Verbindungen bewirken einen Anstieg freier Arachidonsäure in Zellen, was vor allem auf der Aktivierung einer Phospholipase A₂ (PLA₂) beruht (Käfer *et al.*, 1992; Zaucke, 1993). Außerdem wird durch Triethylbleichlorid die Inkorporation exogen dargebotener Arachidonsäure in die Phospholipide von HL-60 Zellen inhibiert (Krug, 1992). Die Organometalle können den Ablauf des Deacylierungs-Reacylierungszyklus in doppelter Weise beeinträchtigen, indem sie die Reacylierung von Fettsäuren mit Lysophospholipiden inhibieren und die Aktivität der PLA₂ erhöhen. Beides führt zur Erhöhung an freien Fettsäuren, besonders an Arachidonsäure.

Bei der Aktivierung der PLA₂ entstehen neben Arachidonsäure und ihren Abkömmlingen auch Lysophospholipide in äquimolarer Menge (Abb. 1.1). Diese haben selbst schon toxische Wirkung, da sie Detergentien darstellen (Chang *et al.*, 1987). Lysophospholipide können auf zwei verschiedene Weisen metabolisiert werden (Abb. 1.1). Durch die Reaktion des Enzyms Lysophospholipid-Acyl-Transferase entstehen wieder "normale" Phospholipide. Handelt es sich bei dem Lysophospholipid aber um 1-O-Alkyl-2-lyso-*sn*-glycero-3-phosphocholin (Lyso-PC oder Lyso-PAF), kann mit Hilfe eines weiteren Enzyms, der Acetyltransferase, auch der Plättchen-aktivierende-Faktor (PAF) gebildet werden. PAF ist ein wichtiger Mediator, der wie die Eicosanoide zahlreiche biologische Funktionen bei Entzündungsreaktionen, Allergien und pathophysiologischen Reaktionen hat. Einen Überblick über die Synthese, den Metabolismus und die Wirkungen von PAF geben Barnes *et al.* (1988).

Organometalle können durch ihre Interaktion mit diesen Stoffwechselwegen mit krankhaften Reaktionen des Immunsystems, wie Allergien und Pseudoallergien, und mit pathologischen Veränderungen des Blutgefäßsystems in Zusammenhang gebracht werden. Dies ist besonders im Hinblick auf die steigende Zahl an Allergikern nicht zu unterschätzen. Könnte doch eine Anreicherung von Toxinen, wie den Organometallen, im Körper zu einer Prädisposition für allergische Reaktionen führen.

1.3 WIRKUNGEN AUF DAS ZYTOSKELETT UND DEN ZELLKERN

Aufgrund der Löslichkeit vieler Organometalle in polaren und apolaren Lösungsmitteln ist eine Aufnahme dieser Substanzen in die Zelle möglich. Im Zytosol können die Toxine daher zum einen direkte Effekte, zum anderen aber auch plasmamembranvermittelte Reaktionen auslösen. Die an der Plasmamembran ausgelösten Kaskaden können Veränderungen hervorrufen, indem "second messenger"-gesteuerte Reaktionen in der Zelle gestört werden. Hier kommen also calciumabhängige und arachidonsäureabhängige Vorgänge im Falle der Organometalle besonders in Betracht. Zu calciumabhängigen Reaktionen der Zelle gehören unter anderem der Auf- und Abbau von Zytoskelettstrukturen, aber auch Abläufe des Zellzyklusgeschehens. Beispielsweise findet ein Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration während der Mitose (Keith *et al.*, 1985; Poenie *et al.*, 1986), sowie beim Übergang von der G₁- zur S-Phase des Zellzyklus statt (Simons *et al.*, 1993). Viele zytosolische und in Organellen lokalisierte Enzyme können einem direkten Einfluß der Organometalle unterliegen. Tributylzinn hemmt zum Beispiel die mikrosomale Glutathion-Transferase. Dieses Enzym ist an der Detoxifikation vieler pharmakologisch aktiver, toxischer, karzinogener und mutagener Substanzen beteiligt (Mosialou & Morgenstern, 1989). Tributylzinn und auch andere trialkylierte Zinnverbindungen hemmen in hohen Konzentrationen auch die Acetyltransferase, das Schlüsselenzym der PAF-Bildung (Abb. 1.1, Zaucke, 1993). Durch die Hemmung der δ -Aminolaevulinsäure-Dehydratase bewirkt Blei eine verringerte Häm biosynthese und führt damit schließlich zur Anämie (Landrigan, 1989).

Untersuchungen von Gray *et al.* (1987) zeigen, daß Organozinn zu einer Formveränderung von Erythrozyten führt. Solche Formveränderungen werden von Zytoskelettstrukturen vermittelt. Die

Polymerisation und das "Assembling" von Tubulin wird durch trialkylierte Blei- und Zinnverbindungen inhibiert (Zimmermann *et al.*, 1985; 1988; Bondy & Hall, 1986). Audesirk *et al.* (1989) berichten von der Inhibition der Neuriten-Initiation und -Verlängerung an Hühnervenzellen. Fostinis *et al.* (1992) gehen sogar soweit, Triethylblei gleichberechtigt neben Colchicin als Mikrotubuli-Gift einzusetzen.

Auch am Zellkern sind direkte Wirkungen von Organometallen denkbar, daneben sind indirekte Effekte über die Signaltransduktionsketten zu erwarten. Veränderungen von Vorgängen im Zellkern sind besonders gut an anorganischen Schwermetallverbindungen untersucht. Die genotoxische Wirkung von Bleisulfat, -nitrat und -acetat wird in verschiedenen Studien auf die Inhibition von DNA-Reparaturprozessen zurückgeführt (Hartwig *et al.*, 1990; Zelikoff *et al.*, 1988). Auch von Nickel- und Cadmiumchlorid ist der Einfluß auf DNA-Reparaturmechanismen bekannt (Hartwig & Beyersmann, 1989). Bei Untersuchungen von Blakey *et al.* (1992) an CHO-Zellen ("Chinese hamster ovary") erwies sich Triethylbleiacetat als starkes Klastogen. Es bewirkte im mikromolaren Konzentrationsbereich Chromosomenaberrationen, was von den Autoren auf eine direkte Interaktion der Alkylketten des Toxins mit der DNA zurückgeführt wird. Dialkylzinnverbindungen beeinflussen die RNA- und die DNA-Synthese (Snoeij *et al.*, 1987). Hamasaki *et al.* (1992; 1993) befanden eine Reihe von Organozinnverbindungen in bakteriellen Testsystemen als genotoxisch und mutagen.

Nur wenig ist über die Wirkung von Schwermetallen auf die Genexpression bekannt. Gerade solche Effekte von umweltrelevanten Toxinen sind aber von großer Bedeutung, da chronische Belastungen über das Umschalten des genetischen Programmes zu längerfristigen Schädigungen führen könnten. Es ist bekannt, daß Schwermetalle das Metallothionein-Gen und auch das Gen für die Glutathion-Transferase induzieren können (Bergelson *et al.*, 1994; Karin, 1985). Beide Genprodukte spielen eine Rolle bei Entgiftungsvorgängen im Körper.

Die Induktion verschiedener anderer Gene wird in Zusammenhang mit der Krebsentstehung gebracht. Diese sogenannten Proto-Onkogene haben in der gesunden Zelle durchaus eine Funktion. Ihre dauernde Aktivierung durch Überexpression oder Mutation hat jedoch teil an den Vorgängen, die zur Cancerogenese führen. Sie alle können die normale Regulation des Zellwachstums verändern, obwohl sie sehr verschieden voneinander sind. Einige kodieren für Wachstumsfaktoren oder deren Rezeptoren (Baserga *et al.*, 1993), andere wiederum für Transkriptionsfaktoren, die ihrerseits die Expression anderer Gene beeinflussen. Die mit am besten untersuchten Mitglieder dieser Familie sind die den Transkriptionsfaktor AP1 zusammensetzenden Proteine Jun und Fos. Transkriptionsfaktoren binden im Promotorbereich von Genen an die DNA und beeinflussen so deren Transkriptionsrate. Im Falle von AP1 sind dabei verschiedene Kombinationen funktionsfähig. So bindet Jun (kodiert von den Genen *c-jun*, *junB* und *junD*) als Jun-Jun-Homodimer, aber auch als Jun-Jun-Heterodimer. Unter den Jun-Proteinen ist c-Jun der potenteste Transkriptionsaktivator. Im Gegensatz zu Jun kann das Fos-Protein kein Homodimer bilden und muß also mit einem Jun-Protein dimerisieren, um an DNA binden zu können. Dieses Jun-Fos-Dimer bindet besser an Promotoren als die Jun-Dimere. Die Konsensussequenz an welche AP1 bindet, ist als "TPA-responsive element", kurz TRE, bekannt. Die Effektivität von AP1 auf die spezifische Genexpression scheint, wie oben angedeutet, von der

Zusammensetzung des Dimers aus den verschiedenen möglichen Untereinheiten abzuhängen. Einen Einblick in die Thematik der Proto-Onkogene geben Angel & Karin (1991) und Karin & Smeal (1992). Dabei ist *c-jun* für den normalen Ablauf des Zellzyklus notwendig (Kovary & Bravo, 1991; Murakami *et al.*, 1991). Besonders interessant in bezug auf die vorliegende Arbeit ist die Tatsache, daß sowohl das Metallothionein-Gen als auch das Glutathion-Transferase-Gen eine Bindestelle für AP1 aufweisen (Angel & Karin, 1991).

Ein weiteres Proto-Onkogen, *c-myc*, codiert ebenfalls einen Transkriptionsfaktor. Dieser setzt sich aus den Proteinen Myc und Max zusammen und scheint in allen Phasen des Zellzyklus wichtig zu sein (Seth *et al.*, 1993). Auch *myc* wird mit Vorgängen wie Mitogenese und Transformation, daneben aber auch mit dem programmierten Zelltod in Zusammenhang gebracht. Wie Myc diese scheinbar so gegensätzlichen Vorgänge beeinflussen könnte, wird in anschaulicher Weise von Evan & Littlewood (1993) dargestellt. In nicht-transformierten Zellen ist die *c-myc*-Expression eng an mitogene Stimuli geknüpft und eine Voraussetzung für das Zellwachstum. In Rattenfibroblasten können durch das Myc-Max-Dimer sowohl der Zellzyklus als auch apoptotische Vorgänge ausgelöst werden, je nachdem ob Wachstumsfaktoren vorhanden sind oder nicht (Amati *et al.*, 1993). Wu *et al.* (1993) zeigen, daß die durch Vitamin K₃ induzierte Wachstumsinhibition und Apoptose in nasopharyngealen Karzinomzellen des Menschen mit der Induktion von *c-myc* und *c-fos* einhergehen. Nicht zu vergessen ist dabei, daß alle genannten Proto-Onkogene (*jun*, *fos* und *myc*) zur Gruppe der sogenannten "early response genes" gehören. Diese Gruppe von Genen wird in ruhenden Zellen kaum oder gar nicht exprimiert, jedoch durch Behandlung mit Phorbolestern, wie TPA, und bestimmten Wachstumsfaktoren sehr rasch induziert (z.B. Brach *et al.*, 1993).

Eine durch Toxine veränderte Expression der Gene von Transkriptionsfaktoren kann zu Veränderungen des gesamten Programmes führen. Endpunkte einer solchen Veränderung können erhöhte Proliferation aber auch der Tod von Zellen, beispielsweise durch Apoptose, sein.

Jin & Ringertz (1990) berichten über die erhöhte Expression der Proto-Onkogene *c-jun* und *c-myc* durch Cadmium. Das Hepatomitogen Bleinitrat bewirkt laut Coni *et al.* (1993) im Tierversuch ebenfalls die Induktion von *c-jun* und *c-myc*. Auch Zinkchlorid konnte die Expression von *c-jun* stimulieren (Bergelson *et al.*, 1994). Schließlich gibt es Untersuchungen zur Wirkung von Trimethylzinn auf die Expression von *c-fos* im Rattengehirn (Zawia & Harry, 1993).

Physiologische Effekte von Hormonen, Cytokinen und Neurotransmittern werden über die Stimulation von Rezeptoren an der Zelloberfläche bis in den Zellkern vermittelt. Diese transienten Signale verwandeln sich durch die Wirkung signalregulierter Transkriptionfaktoren in langfristige Veränderungen der Genexpression. In diese Kaskaden greifen Organometalle auf den unterschiedlichsten Ebenen ein.

Die hier vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Wirkung von Organoblei- und Organozinnverbindungen auf die verschiedenen Ebenen der Signaltransduktion. Als Grundlage dienten dabei Erkenntnisse zur Wirkung verschiedener Verbindungen auf den Arachidonsäurehaushalt (Käfer, 1991; Käfer *et al.*, 1992) von differenzierten HL-60 Zellen.

1.4 ZIEL DER ARBEIT

Im Vordergrund standen bei dieser Arbeit Untersuchungen zur Beeinflussung von Signaltransduktionswegen durch Organoschwermetalle. Dazu sollten an ausgewählten Zellkultursystemen *in vitro* die Einflüsse verschiedener organischer Verbindungen des Bleis und des Zinns auf unterschiedlichen Ebenen der Zelle, an der Plasmamembran, an Komponenten des Zytosols und am Kern getestet werden:

- Untersuchungen an der Plasmamembran zur Wirkung der Organometalle auf die Arachidonsäurefreisetzung. Durch gezielten Einsatz von Inhibitoren sollten die Mechanismen der durch Organometalle hervorgerufenen Arachidonsäurefreisetzung aufgeklärt werden.
- Prüfung der Wirkung von Organometallen auf Aktinfilamente.
- Analyse möglicher Effekte auf den Zellzyklus.
- Feststellung von Veränderungen der Genexpression durch Organobleiverbindungen. Aufgrund von Hinweisen aus der Literatur standen hierbei *c-jun* und *c-myc* im Vordergrund.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, mögliche Effekte der Xenobiotika im niedrigen, nahe dem derzeitig physiologisch relevanten Konzentrationsbereich nachzuweisen, d. h. es sollten neben akuten Effekten auch mögliche subakute Wirkungen Beachtung finden.

Für jedes der angesprochenen Problemfelder wurde eine für die jeweilige Fragestellung besonders geeignet erscheinende Zellkultur benutzt. In erster Linie wurden Blutzellen verwendet, da Blut ein wichtiges Zielorgan der Organometalle darstellt.

HL-60 Zellen erwiesen sich für Untersuchungen zum Arachidonsäurehaushalt als außerordentlich gutes Modell (Bonser *et al.*, 1981; Käfer, 1991; Zaucke 1993). Da Blutzellen im allgemeinen ein nur schwach ausgeprägtes Aktinskelett aufweisen, und Effekte daher nur schwer zu erkennen sind, sollten zum Studium von Wirkungen der Organometalle auf Aktinfilamente NRK-Zellen verwendet werden, die gut ausgebildete Streßfasern besitzen. P388D₁-Zellen schließlich eignen sich für Untersuchungen zur Genexpression besser als HL-60 Zellen, da letztere *c-myc* in amplifizierter Form enthalten (Wolf & Rotter, 1985). P388D₁-Zellen sind, wie HL-60 Zellen, Leukozyten.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 CHEMIKALIEN UND ENZYME

A23187 (Calciumionophor, Calcimycin)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Amilorid-Hydrochlorid	Sigma (Deisenhofen, BRD)
[1- ¹⁴ C]Arachidonsäure	Amersham International (Braunschweig, BRD)
Dimethylsulfoxid	Serva (Heidelberg, BRD)
EGTA (Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N,N'-tetraessigsäure)	Serva (Heidelberg, BRD)
HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure])	Sigma (Deisenhofen, BRD)
MOPS (3-[N-Morpholino]-propylsulfonsäure)	Roth (Karlsruhe, BRD)
Nonidet P-40	Sigma (Deisenhofen, BRD)
N-Formyl-Methionylleucylphenylalanin (fMLP)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT)	Serva (Heidelberg, BRD)
Organoschwermetalle	Alfa, Johnson Matthey GmbH (Karlsruhe, BRD)
Phalloidin-Rhodamin	Molecular Probes (Eugene, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Life Technologies ≡ Gibco (Eggenstein, BRD)
Pertussis Toxin (PT)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Pertussis Toxin-B-Oligomer	List Biological Laboratories (Campbell, USA)
Quinacrin-Hydrat	Serva (Heidelberg, BRD)
Restriktionsenzyme und deren Puffer	Boehringer (Mannheim, BRD)
Rinderserumalbumin	Sigma (Deisenhofen, BRD)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth (Karlsruhe, BRD)
TAM ((N- α -Tosyl-L-arginin-methylester) x HCl)	Serva (Heidelberg, BRD)
12-O-Tetracarbonylphorbol-13-acetat (TPA)	Sigma (Deisenhofen, BRD)
Tris (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Roth (Karlsruhe, BRD)
Trypanblau	Serva (Heidelberg, BRD)
Verapamil-Hydrochlorid	Sigma (Deisenhofen, BRD)

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien, wie Lösungsmittel (Chloroform, Diethylether, *n*-Hexan, Methanol, Ethanol, Phenol, Isoamylalkohol), Säuren (Essigsäure, Ameisensäure) und Salze wurden, wenn nicht anders erwähnt, von Merck (Darmstadt, BRD) bezogen.

2.1.1 Reinheit der schwermetallorganischen Verbindungen

Trimethylbleichlorid sowie Trimethylzinnchlorid konnten direkt in Wasser gelöst werden. Triethylbleichlorid mußte hierzu aufgereinigt werden (s.u.). Dibutylzinndichlorid wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO), Triphenylbleichlorid in Ethanol gelöst. Bei den Versuchen wurden die jeweiligen Kontrollansätze mit dem entsprechenden Vehikel behandelt, um einen Effekt des Lösungsmittels auszuschließen. Folgende Stammlösungen wurden angesetzt:

Triethylbleichlorid (Et_3Pb)	20 mM
Trimethylbleichlorid (Me_3Pb)	40 mM
Triphenylbleichlorid (Ph_3Pb)	10 mM
Trimethylzinnchlorid (Me_3Sn)	40 mM
Dibutylzinndichlorid (Bu_2Sn)	60 mM

Aufreinigung von Triethylbleichlorid:

Reines Et_3Pb sollte farblos sein. Die in dieser Arbeit verwendete Charge war jedoch gelblich. Löslichkeitsversuche ergaben, daß das von der Firma Alfa gelieferte Et_3Pb Verunreinigungen, wahrscheinlich anorganisches Blei und Diethylblei, enthält. Zur Aufreinigung wurde Et_3Pb daher wie unten beschrieben behandelt. Es handelt sich hierbei um ein modifiziertes Protokoll nach Gelius (1964):

250 mg Et_3Pb wurden mit 2 ml Benzol digeriert (100 ml Benzol lösen bei RT ungefähr 80 g Et_3Pb , 0,004 g Et_2Pb aber praktisch kein PbCl_2) und vom Ungelösten abgetrennt, indem der Ansatz durch eine kleine Fritte mit Filterpapier gesaugt wurde. Der Rückstand wurde zweimal mit 2 ml Benzol nachgewaschen und das Filtrat vorsichtig unter Stickstoff bei 37°C auf einem Metallblock-Thermostat (Labor Technik Barkey) eingeeengt. Schließlich wurde mit dem doppelten Volumen Hexan (4 ml) versetzt. Beim Rühren fällt nun aus der Lösung analysenreines Et_3Pb in farblosen, verfilzten Nadelchen aus. Es wurde im Vakuum getrocknet und anschließend das Pulver nochmals in Aceton aufgenommen und unter Stickstoff, wie oben beschrieben, getrocknet. Die Ausbeute betrug 70-85% der Einwaage.

2.1.1.1 SCHMELZPUNKTBESTIMMUNG

Außer Triethylblei verhielten sich alle verwendeten Organometalle in den Lösungsversuchen wie erwartet. Zusätzlich diente die Bestimmung der Schmelzpunkte und deren Vergleich mit Literaturwerten der Überprüfung der Reinheit (Tab. 2.1).

2.1.1.2 NMR-SPEKTROSKOPIE

Weiterhin wurden zur Überprüfung der Reinheit der metallorganischen Verbindungen Protonen-, Kohlenstoff- und Bleispektren erstellt (^1H , ^{13}C , ^{207}Pb). Bei den Organozinnverbindungen wurde auf Zinnspektren verzichtet, da Lösungsversuche, Schmelzpunktbestimmung und die Protonen- und Kohlenstoffspektren auf eine hohe Reinheit der Substanzen schließen ließen. Als Lösungsmittel dienten D_2O und CDCl_3 . Die NMR-spektroskopischen Untersuchungen wurden freundlicherweise

von Herrn Dr. M. Ackermann, Firma Bruker, Rheinstetten, durchgeführt, dem ich an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte.

Tab. 2.1: Schmelzpunkte der verschiedenen metallorganischen Verbindungen.

Schmelzpunkte [°C]					
Literaturwerte:	Bu ₂ SnCl ₂	Me ₃ SnCl	Me ₃ PbCl	Et ₃ PbCl	Ph ₃ PbCl
(1)	36,5-40 ^b	-----	190 (Subl) ^a	120(Zers) ^a	204-206; 210 ^a
(2)	43; 44-45; 37-38; 37;45; 37,5-39,5	41-42	190 (Zers)	103-104 (Zers)	?
(3)	-----	-----	180 (Subl)	170-175 (Zers)	-----
(4)	39-41	37	187 (Subl)	120 (Zers)	210
Ermittelte Werte:	37,5	38	180 (Zers)	115 (Zers)	190

Anmerkungen: Bei allen nicht zu schmelzenden bleiorganischen Verbindungen (Zers) blieb ein schneeweißer Rückstand. Weiter oben am Schmelzpunktröhrchen bildeten sich braun-gelbe Niederschläge im Falle von Triethylblei, im Falle von Trimethylblei weiße Niederschläge. Zers: Zersetzungspunkt, Subl: Sublimationspunkt.

-----: keine Angaben; ?: nicht recherchiert.

1: Houben-Weyl, a) **Bähr G. & Langer E. (1975):** Organo-blei-Verbindungen. In: Metallorganische Verbindungen, Meth. org. Chemie Bähr G., Langer E. & Segnitz A., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1-260.

b) **Bähr G. & Pawlenko S. (1978):** Methoden zur Herstellung und Umwandlung von Organo-zinn-Verbindungen. In: Metallorganische Verbindungen, Bähr G., Kalinowski H.O. & Pawlenko S., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 181-521.

2: Beilstein, Handbuch der org. Chemie, 4. Auflage, Springer Verlag, Heidelberg.

3: **Gellus (1964),** Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie, 334, 72-80.

4: Produktinformation: **Johnson Matthey GmbH** Karlsruhe (1992); Alfa, Finest inorganic research. Chemicals and metals 1993/94.

2.2 ZELLKULTUR

Sämtliche Zellkulturgefäße (Qualität TC, steril) stammten von der Firma Greiner, Frickenhausen. Petrischalen wurden in der Ausführung mit Belüftungsnocken gewählt.

Die Medien wurden nach dem Ansetzen stets steril filtriert (Bottle Top Filter, Falcon, Heidelberg). Alle Zellkulturen wurden bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre im Brutschrank (Typ B5061 EK-02, Heraeus) bei einer relativen Feuchte von 95% inkubiert.

2.2.1 HL-60 Zellen

Diese Zelllinie wurde zuerst von Collins *et al.* (1977) beschrieben und durch Leukophorese aus dem Blut einer 36jährigen kaukasischen Patientin, die an akuter promyelozytischer Leukämie litt, isoliert (ATCC CCL 240).

HL-60 Zellen wachsen in Suspensionskultur und verdoppeln sich innerhalb von etwa 24 Stunden. Die Zellen wurden daher zweimal in der Woche passagiert. Angesetzt wurden 5×10^6 oder 1×10^7 Zellen pro Zellkulturflasche (250 ml, 75 cm² Kulturfläche) in 20 ml Kulturmedium. Für Versuche wurden nur Zellen bis zur Passage 15 verwendet. Die Zellen wurden für Untersuchungen des Einflusses von Organoschwermetallen auf den Arachidonsäurehaushalt und auf das Proliferationsverhalten verwendet.

Zusammensetzung des HL-60 Standard-Kulturmediums:

450 ml	RPMI 1640 (Gibco)
75 ml	Hi-FKS (15%, fötales Kälberserum, für 30 Minuten bei 56°C hitzeinaktiviert, Gibco)
7,5 ml	L-Glutamin 200 mM
5 ml	Natriumpyruvat 100 mM
5 ml	MEM non essential amino acids (Gibco)
2,5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml, Gibco)

2.2.1.1 DIFFERENZIERUNG DER HL-60 ZELLEN ZU NEUTROPHILEN

Unbehandelte HL-60 Zellen stehen am Anfang der Ausdifferenzierung zu granulozyten- bzw. monozyten-ähnlichen Endstufen. Wird für einige Tage mit geeigneten Konzentrationen DMSO oder anderen polaren Verbindungen inkubiert, so differenzieren sie zu morphologisch ausgereiften Myelozyten, Metamyelozyten oder Neutrophilen aus. Die Zellen werden kleiner, das Kern/Zytoplasma-Verhältnis sinkt, Nucleoli und zytoplasmatische Granula werden reduziert, der Zellkern segmentiert sich, und die Proliferationsfähigkeit geht verloren (Collins *et al.*, 1978; 1979). Weniger als 10% der Zellen sind spontan differenziert. Als Mechanismen, die letztendlich die Differenzierung auslösen, werden die Modulation des Zelloberflächenpotentials (Arcangeli *et al.*, 1993) und die Abgabe eines Differenzierungsfaktors diskutiert (Sparatore *et al.*, 1993).

Während dieser Arbeit wurden die Zellen stets mit DMSO zu Granulozyten differenziert, indem 1×10^8 Zellen in sterilen Blue-Cap-Röhrchen 5 Minuten bei 200 x g abzentrifugiert und anschließend in 100 ml Standard-Kulturmedium incl. 1,3% DMSO (Endkonzentration) resuspendiert und in eine 650 ml-Kulturflasche (175 cm² Kulturfläche) pipettiert wurden. Am sechsten Tag der Differenzierung wurden die Zellen für Versuche verwendet.

2.2.1.2 BESTIMMUNG DES DIFFERENZIERUNGSGRADES VON HL-60 ZELLEN (NBT-TEST)

Zum Nachweis der Differenzierung wurde der NBT-Test nach Collins *et al.* (1979) durchgeführt. 2×10^6 Zellen wurde aus der Kulturflasche entnommen und bei 200 x g zentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus). Nach dem Waschen mit 3 ml PBS ("phosphate buffered saline", s.u.) nimmt man die Zellen

schließlich in 1 ml PBS auf und versetzt mit 1 ml einer 0,2%igen Nitroblautetrazolium-Lösung (in PBS). Nach Zugabe von 10 µl TPA-Lösung (1 mg TPA in 50 ml DMSO) inkubiert man die Zellen für 25 Minuten bei 37°C im Wasserbad. Die Zellen wurden dann wie oben abzentrifugiert und in 0,5 ml PBS aufgenommen. Zu den wichtigsten mikrobiziden Produkten reifer Granulozyten gehören H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$. Mit fortschreitender Differenzierung steigt die produzierte Superoxidationenmenge in HL-60 Zellen auf das 18fache an (Newburger *et al.*, 1979). Durch Reduktion der Nitroverbindung aufgrund gebildeter Sauerstoffradikale entstehen in differenzierten Zellen blauschwarze Formazan-Ablagerungen. Undifferenzierte Zellen erscheinen dagegen weiß. Die Produktion an Sauerstoffintermediaten wird in den reifen HL-60 Zellen bei diesem Test durch TPA induziert. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop (Laborlux 12, Leitz) bei einer Gesamtvergrößerung von 160 x. Der Differenzierungsgrad errechnet sich wie folgt:

$$\text{Differenzierung [\%]} = \frac{\text{Zahl der blau-schwarzen Zellen}}{\Sigma \text{ aller Zellen}} \times 100$$

Der NBT-Test wurde in dieser Arbeit stichprobenweise zur Kontrolle des Differenzierungsgrades angewandt. Nach sechs Tagen DMSO-Behandlung wurde ein Differenzierungsgrad von $\geq 70\%$ erzielt.

PBS:

0,14	M	NaCl
2,7	mM	KCl
0,7	mM	CaCl ₂
0,6	mM	MgCl ₂
6,5	mM	Na ₂ HPO ₄
1,5	mM	KH ₂ PO ₄
auf pH 7,3 einstellen		

2.2.2 NRK-Zellen

Die epithelartigen sogenannten NRK-Zellen stammen aus einer Rattenniere ("normal rat kidney") und bilden in der Kulturflasche einen festsitzenden Monolayer. Zur Passage mußten diese Zellen daher nach dem Absaugen des Mediums für etwa 5 Minuten trypsinisiert werden. Dazu gibt man 2-3 ml einer 0,25% Trypsinlösung mit 0,02% EDTA auf den Zellrasen, läßt kurz einwirken und saugt diese Lösung wieder ab. Nach dem Ablösen der Zellen von der Unterlage gibt man einige ml Kulturmedium zu, mischt und bestimmt die Zellzahl im Coulter Counter (s.u.). Es wurden 2×10^5 Zellen in eine neue Kulturflasche (250 ml, 75 cm² Kulturfläche) pipettiert und mit frischem Medium auf 20 ml aufgefüllt. Die Zellen wurden aufgrund ihres Wachstumsverhaltens zweimal pro Woche umgesetzt und dienten den Untersuchungen zur Wirkung der schwermetallorganischen Verbindungen auf Aktinfilamente.

Zusammensetzung des NRK-Kulturmediums:

450 ml	Dulbecco's MEM (Gibco)
5 ml	MEM non essential amino acids (Gibco)
5 ml	Ultrosor G (Gibco)
5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml, Gibco)

2.2.3 P388D₁-Zellen

Diese Monozyten/Makrophagen entstammen einer DBA/2 Maus (ATCC Nr. TIB 63). Ihre Verdoppelungszeit beträgt in Iscove's modifiziertem Dulbecco Medium (IMDM, s.u.) etwa 26 Stunden (Walser, persönliche Mitteilung). In der Kulturflasche bilden sie einen losen Monolayer, der für die Passage abgeschabt wurde. Nach der Zählung der Zellen wurden 3×10^6 Zellen in eine neue Kulturflasche (250 ml, 75 cm² Kulturfläche) pipettiert und mit frischem Medium auf 20 ml aufgefüllt. Die Zellen dienen der Untersuchung des Einflusses von Organoschwermetallen auf die Genexpression.

Zusammensetzung des P388D₁-Kulturmediums:

450 ml	IMDM (Gibco)
50 ml	Hi-FKS (10%)
5 ml	L-Glutamin 200 mM
5 ml	MEM non essential amino acids (Gibco)
2,5 ml	Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml, Gibco)

2.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen wurde die gewünschte Zahl bei 200 x g abzentrifugiert und in einer Konzentration von 5×10^6 Zellen im jeweiligen Kulturmedium mit 10% DMSO als Gefrierschutz aufgenommen, in Aliquots zu 1 ml auf Einfriergefäße verteilt, über Nacht in einem Styroporgefäß auf -80°C gestellt und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt. Beim Auftauen wurden die Zellen direkt aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad gestellt. Sobald die Zellen aufgetaut waren, wurden sie mit 5 ml vorgewärmten Kulturmedium gewaschen und dann in 20 ml Kulturmedium in eine 250 ml-Kulturflasche gegeben.

2.3 VITALITÄTSTEST

Die Vitalität der Zellen wurde mit Hilfe der Trypanblau-Färbung bestimmt, indem 100 µl Zellsuspension aus den Kulturflaschen bzw. den Versuchsansätzen mit 100 µl bereits in Eppendorfgefäße vorgelegter Trypanblau-Lösung (0,5%ig in 0,9%iger NaCl-Lösung) gemischt wurde. Aktive Zellen bleiben trypanblaufrei, während tote Zellen, deren Membran stark geschädigt ist, diesen Farbstoff anreichern. Die Zahl der blauen Zellen ist somit identisch mit der Zahl der toten

Zellen. Die Zählung erfolgte in einer Neubauer-Kammer unter dem Mikroskop (Laborlux 12, Leitz) bei einer Gesamtvergrößerung von 160 x. Zuerst wurden die lebenden, weißen Zellen gezählt und dann die Gesamtzahl aller Zellen ermittelt. Die Vitalität in Prozent ergab sich aus folgender Berechnung:

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Zahl der lebenden Zellen}}{\Sigma \text{ aller Zellen}} \times 100$$

Mit Hilfe dieses Tests wurde sowohl die Vitalität der laufenden Kultur routinemäßig überprüft als auch die Zytotoxizität eingesetzter Substanzen. Für das letztere wurden undifferenzierte oder differenzierte HL-60 Zellen in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen pro ml Standardkulturmedium oder Inkubationsmedium in Petrischalen (\varnothing 35 mm, Wachstumsfläche $8,7 \text{ cm}^2$) ausgesät und nach 30minütiger Ruhe im Brutschrank entsprechend inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurden je $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension entnommen.

2.4 BESTIMMUNG DER ZELLZAHL

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension aus dem Kulturgefäß entnommen und mit Isoton (Coulter Euro Diagnostics) 1:100 verdünnt. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Coulter Counters (Model D_n, Coulter Electronics Ltd.) in der verdünnten Lösung gezählt.

2.5 GIEMSA-FÄRBUNG

Zur Färbung von Zellen mit Azur-Eosin-Methylenblau wurde Giemsa-Lösung (Merck) stets frisch 1:7 mit abgekochtem Wasser verdünnt. Die Zellen (2×10^6) wurden bei $200 \times g$ abzentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus), in wenig FKS aufgenommen und auf einem Objektträger ausgestrichen. Der Ausstrich wurde mit einem Föhn getrocknet und die Zellen 5 Minuten in absolutem Methanol fixiert. Dann wurden etwa $2,5 \text{ ml}$ der Färbelösung auf den Objektträger gegeben und für 15 Sekunden darauf belassen. Die Lösung wurde dann mit leicht saurem Wasser abgespült. Nach dem Trocknen konnten die gefärbten Zellen sofort unter dem Mikroskop betrachtet werden.

2.6 VERTEILUNG DER ^{14}C -ARACHIDONSÄURE INNERHALB DER LIPIDKLASSEN VON HL-60 ZELLEN

2.6.1 Markierung mit ^{14}C -Arachidonsäure

Am fünften Tag der Differenzierung mit DMSO wurde die für den Versuch benötigte Anzahl Zellen (1×10^7 Zellen/Ansatz) bei $200 \times g$ 5 Minuten abzentrifugiert, das Pellet in 50 ml

Markierungsmedium resuspendiert und in eine 650 ml-Kulturflasche (175 cm² Kulturfläche) gegeben.

Zur Herstellung des Markierungsmediums wurden 92,5 kBq [1-¹⁴C]Arachidonsäure (gelöst in Ethanol) unter Stickstoff getrocknet, in 650 µl DMSO aufgenommen und in 50 ml Standardmedium eingebracht (spezifische Aktivität der ¹⁴C-Arachidonsäure: 2,15 GBq/mmol; DMSO-Endkonzentration: 1,3%). Aus diesem Medium wurden bei jedem Versuch 200 µl als Standard entnommen. Dieser diente einerseits zur Überprüfung der eingesetzten Radioaktivität, andererseits wurde er zur Berechnung der Gesamtbilanz der Radioaktivität herangezogen. Die Zellen wurden anschließend für 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Dieser Zeitraum gewährleistet eine vollständige Aufnahme und eine gleichmäßige Verteilung der Arachidonsäure in den verschiedenen Lipidklassen der Membran (Froissart *et al.*, 1989; Krug & Culig, 1991).

Zusammensetzung des HL-60 Markierungsmediums:

- 50 ml HL-60 Standard-Kulturmedium (s.o.)
- 0,65 ml DMSO incl. 92,5kBq [1-¹⁴C]-Arachidonsäure

2.6.2 Inkubation markierter HL-60 Zellen

Nach erfolgter Markierung wurden die Zellen abzentrifugiert (200 x g, 5 min.), einmal mit 5 ml Inkubationsmedium (s.u.) gewaschen, im entsprechenden Volumen (2 ml/Ansatz) Inkubationsmedium aufgenommen und schließlich auf Petrischalen (Ø 35 mm, Wachstumsfläche 8,7 cm²) verteilt. Aus dem Überstand der Zentrifugation und aus der Waschlösung wurden je dreimal 1 ml entnommen. Diese Proben wurden später im Flüssigkeitsszintillationszähler (1219 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, LKB) gemessen und zur Bilanzierung der Radioaktivität verwendet.

Zusammensetzung des HL-60 Inkubationsmediums:

- 450 ml RPMI 1640 **ohne Phenolrot** (Gibco)
- 7,5 ml L-Glutamin 200 mM
- 5 ml Natriumpyruvat 100 mM
- 5 ml MEM non essential amino acids (Gibco)
- 2,5 ml Penicillin/Streptomycin-Lösung (10000 U/ml bzw. 10 mg/ml, Gibco)
- 3,3 % Hi-FKS wurden kurz vor Versuchsansatz ins Medium gegeben
(Gegebenenfalls enthielt das Medium 5 mM EGTA)

Markierte Zellen dienten der Untersuchung des Einflusses von Pertussis Toxin und dessen B-Oligomer sowie von EGTA, Quinacrin, Verapamil und Amilorid auf die Wirkung metallorganischer Verbindungen auf den Lipidstoffwechsel von HL-60 Zellen. Die Zugabe der verschiedenen Substanzen erfolgte erst nach mindestens 30minütiger Ruhephase im Brutschrank.

Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit dem entsprechenden Vehikel (H₂O, Ethanol, DMSO) inkubiert, als Positivkontrollen wurden das Calciumionophor A23187 (1-10 µM für 10 Minuten) und das chemotaktische Peptid fMLP (1 µM für 10 Minuten) verwendet; beide waren in DMSO gelöst.

2.6.3 Extraktion der Lipide

Die Lipide wurden modifiziert nach Bligh & Dyer (1959) extrahiert. Die Extraktion fand auf Eis statt:

Nach entsprechender Inkubation ¹⁴C-arachidonsäuremarkierter Zellen im Brutschrank (Kap. 2.6.2) wurde der gesamte Inhalt einer Petrischale mit einer Transferpipette in ein Duranglas-Röhrchen (Bender & Hobein, Karlsruhe) überführt, in das 2,5 ml eiskaltes Chloroform vorgelegt ist. Die beiden Phasen wurden durch vorsichtiges Schütteln gemischt. Die Petrischalen wurden zweimal mit 2,5 ml eiskaltem Methanol gewaschen. Nach erneuter Durchmischung wurden 2,5 ml Chloroform und 2,5 ml 0,2%ige Ameisensäure zugegeben. Dann wurde nochmals geschüttelt und mindestens 5 Minuten auf Eis stehen gelassen. Zur besseren Phasentrennung wurden die Röhrchen schließlich 5 Minuten mit 500 × g zentrifugiert. Die untere organische Phase wurde entnommen und bei 37 °C unter ständiger Stickstoffbegasung an einem Abdampfgerät mit Metallblockthermostat (Labor Technik Barkey) getrocknet.

Die Proben wurden dann in 80 µl Chloroform aufgenommen, mit Stickstoff überschichtet, die Glasröhrchen verschlossen und über Nacht bei -20°C aufbewahrt.

2.6.4 Dünnschichtchromatographie

Zur Auftrennung radioaktiver Lipidextrakte aus HL-60 Zellen (Kap. 2.6.1, 2.6.2 und 2.6.3) wurde ein dünnschichtchromatographisches Verfahren angewendet. Die dabei verwendeten Dünnschichtplatten (SIL G Polygram Nr. 805013, Macherey & Nagel, Karlsruhe) waren in einem Chloroform/Methanol-Gemisch (1:2 v/v) vorgelaufen und für mindestens 30 Minuten bei 110°C aktiviert worden.

Die Laufkammern wurden am Tag vor dem Auftragen der Extrakte mit dem entsprechenden Laufmittel gesättigt.

Die in Chloroform aufbewahrten Extrakte wurden mit einer Pipette (Abimed) unter ständiger Begasung mit Stickstoff aufgetragen. Die Glasröhrchen wurden nochmals mit 80 µl Chloroform gespült. Für die optimale Trennung aller zellulärer Lipide wurde die Kombination zweier Laufmittel benutzt (Krug & Culig, 1991):

Laufmittel 1: Hier erfolgte die Trennung der Phospholipide. Neutrallipide, freie Fettsäuren und deren Metabolite liefen mit der Front.

Chloroform	/	Methanol	/	Essigsäure	/	Wasser
56	:	33	:	9	:	2

Die Front lief vom Auftragungspunkt 11 cm nach oben, der erste Lauf dauerte etwa 70 Minuten. Nach kurzem Trocknen mit dem Fön wurde die Platte in die zweite Laufkammer gestellt.

Laufmittel 2: Hier trennten sich die Neutrallipide, die Fettsäuren und deren Metabolite auf.

Hexan	/	Ether	/	Essigsäure
80	:	20	:	1

Dieser Lauf dauerte ungefähr 50 Minuten, in dieser Zeit steigt das Laufmittel bis zum oberen Plattenrand. Nach dem Trocknen mit dem Fön wurde die Platte für 5 Minuten in die Iodkammer gestellt. Die reversible Addition von Iod an die C-C-Doppelbindungen der aufgetrennten Lipide führt zur Bildung von gelblich-braunen Banden. Diese Banden wurden mit einem weichen Bleistift umrandet und aufgrund der R_f -Werte von Standardsubstanzen identifiziert.

2.6.5 Autoradiographie und Messung im Flüssigkeits-szintillationszähler

Das Sichtbarmachen radioaktiver Lipidbanden erfolgte durch das Auflegen eines Röntgenfilmes (HyperfilmTM MP, Amersham International) auf die Dünnschichtplatten. Der Film wurde in einer lichtdichten Kassette 4 Tage bei -20°C exponiert.

Dann wurden die Banden der verschiedenen Lipide aus der Dünnschichtplatte ausgeschnitten und in Szintillationsgefäße (Minis 2000, Zinsser) sortiert. Jedes Gefäß wurde mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Quick Safe A, Zinsser) gefüllt und gut geschüttelt. Die Proben wurden schließlich mit dem Flüssigkeitsszintillationszähler (1219 Rackbeta, LKB) im automatischen Fenster für ¹⁴C gemessen. Die Meßdauer betrug zwei Minuten pro Probe. Die prozentualen Anteile der Aktivität der einzelnen Banden an der Gesamtaktivität wurden errechnet. Die Wiederfindungsrate lag bei allen Versuchen über 75% der Gesamtaktivität.

2.7 FÄRBUNG VON AKTIN MIT PHALLOIDIN-RHODAMIN

Zur Darstellung der Aktinfilamente wurden NRK-Zellen in einer Konzentration von $2,5 \times 10^4$ Zellen/ml in Kulturmedium aufgenommen. Je 2 ml dieser Suspension wurden in Plastikmembraneinsätze (Falcon, Heidelberg) pipettiert, die in mit 2 ml Kulturmedium gefüllten Petrischalen saßen. Die Zellen konnten über Nacht bei 37°C im Brutschrank absitzen. Am folgenden Tag wurde das Medium in den Membraneinsätzen ausgetauscht, das die Einsätze umgebende Medium wurde abgesaugt.

Nach der Inkubation mit den Toxinen und dem Absaugen des Mediums wurden die Membranen mit einem Skalpell ausgeschnitten, die NRK-Zellen mit PHEM-Puffer (s.u.) gewaschen und für 15 Minuten mit 2,5% Glutardialdehyd in Stabilisierungspuffer (s.u.) bei 37°C fixiert. Danach wurde die Membran mit den Zellen nach unten luftblasenfrei auf 50-100 µl Färbelösung (s.u.) gelegt und für

zwei Stunden auf dem Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Membran wurde abermals mit PHEM-Puffer gewaschen und in dieser Lösung bis zur mikroskopischen Untersuchung der Proben bei +4°C aufbewahrt. Photographiert wurde an einem Leitz Laborlux 12 Lichtmikroskop, das mit einer Auflichtfluoreszenzbeleuchtung ausgestattet war. Verwendet wurden Fujichrome DX 400 D-Filme.

PHEM-Puffer:

60 mM Pipes (1,4-Piperazindiethylsulfonsäure)
 25 mM Hepes
 10 mM EGTA
 2 mM MgCl₂
 auf pH 6,9 einstellen

Stabilisierungspuffer:

20 mM Hepes
 5 mM EGTA
 2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
 1 mM MgSO₄
 1 g/l N- α -Tosyl-L-argininmethylester
 20 % Glycerin
 auf pH 6,8 einstellen

Glutardialdehydlösung:

25% Glutardialdehyd (Serva) in Stabilisierungspuffer wurde stets frisch über Aktivkohle filtriert (Faltenfilter, Bender & Hobein, Karlsruhe), dann mit Stabilisierungspuffer 1:10 verdünnt. Um auch kleinste Partikel zu entfernen, wurde gegebenenfalls mit einem Sterilfilter nachfiltriert.

Färbelösung:

3,3 μ M Phalloidin-Rhodamin in Methanol 1:10 mit PHEM-Puffer verdünnen.

2.8 BESTIMMUNG DES DNA-GEHALTES UNDIFFERENZIERTER HL-60 ZELLEN (ZELLZYKLUS)

Um den Einfluß metallorganischer Verbindungen auf die Zellzyklusverteilung undifferenzierter HL-60 Zellen zu überprüfen, wurde der DNA-Gehalt nach Anfärben der DNA mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) durchflußzytometrisch bestimmt. Dieser Farbstoff hat sein Absorptionsmaximum bei 340 nm, sein Fluoreszenzmaximum liegt bei 488 nm. DAPI zeigt ein spezifisches Bindungsvermögen an A-T-reiche DNA und eine hohe UV-Stabilität (SERVA-Produktinformation). Da die DNA der einzelnen Zelle proportional angefärbt wird, ist die Zuordnung der Zellen zu einer der Zyklusphasen (G₁-, S-, G₂/Mitose-Phase) möglich (Göhde *et al.*, 1985).

2.8.1 Behandlung der Zellen und Messen des DNA-Gehaltes

Die gewünschte Anzahl an Zellen wurde nach dem Abzentrifugieren bei 200 x g in Standardkulturmedium in einer Konzentration von 1 x 10⁶/ml resuspendiert. Je 2 ml dieser Suspension wurden zur Inkubation mit den Toxinen auf Petrischalen (\varnothing 35 mm) verteilt und für eine Ruhephase von mindestens 30 Minuten im Brutschrank vorinkubiert. Daraufhin wurden die Organometalle zupipettiert und für 6, 16, 24 oder 48 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit Hilfe einer Transferpipette in 15 ml Blue-Cap-Röhrchen überführt und 5 Minuten bei 200 x g abzentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus). Nach dem einmaligen

Waschen mit 1 ml eiskaltem PBS wurden die Zellen mit 2-4 ml DAPI-Lösung (ca. 1×10^6 Zellen/ml; s.u.) resuspendiert und für mindestens eine halbe Stunde im Dunkeln auf Eis inkubiert. In dieser Zeit findet sowohl die Lyse der Zellen als auch die Färbung der DNA statt. Für die Zellzyklusuntersuchungen wurden also Zellkerne aus behandelten Zellen präpariert. Damit wird die zytoplasmatische Fluoreszenz, die durch Färbung von Doppelstrang-RNA auftreten kann, vermieden. Anschließend wurden die Zellkerne im Durchflußzytometer Pas II der Firma Partec (Münster) bei 340 nm angeregt und die Fluoreszenz bei 488 nm gemessen. Als Lichtquelle diente eine Quecksilberhochdrucklampe (HBO 100 W). Die von den Kernen ausgesandten Lichtimpulse werden in einem nachgeschalteten Vielkanalanalysator nach ihrer Intensität sortiert. Da die Fluoreszenzintensität proportional zur DNA-Menge ist, entspricht ein bestimmter Kanal auch einer bestimmten DNA-Menge. Die in einem Kanal eintreffenden Impulse werden über die Meßdauer aufsummiert, jeder Einzelimpuls entspricht im Prinzip einem Zellkern. Pro DNA-Histogramm wurden 20-80 000 Zellkerne ausgewertet.

DAPI-Lösung:

5,4	μM	DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol; 2 mg/l)
2	mM	MgCl ₂
0,15	M	NaCl
0,1	%	Triton X 100
in: 0,1	M	Tris pH 7,3

2.8.2 Auswertung der Originalhistogramme

Die erstellten Histogramme wurden nachträglich für ein DOS-Betriebssystem lesbar gemacht. Nun erfolgte die mathematische Auswertung mit dem Programm "MultiCycle" (multiple option cell cycle fitting, Rabinovitch, 1987, Phoenix Flow Systems; San Diego, USA). Als Grundlage zur Berechnung der Zellzyklusverteilung dienen diesem Programm die mathematischen Modelle von Dean & Jett (1974) und von Fox (1980). Man geht davon aus, daß alle Zellen der G₁-Phase die gleiche DNA-Menge aufweisen (2 n), somit gleichviel DAPI binden und damit genau einem Kanal zugeordnet werden. Da Zellen der G₂/Mitose-Phase (4 n) doppelt soviel DNA enthalten, sollten diese auch einer doppelt hohen Kanalzahl zugeordnet werden. Zellen, die gerade DNA synthetisieren, werden den ihrer DNA-Konzentration entsprechenden Kanälen zwischen G₁ und G₂/Mitose zugeteilt. Durch Meßungenauigkeiten, biologische und histologische Effekte kommt es jedoch zu Abweichungen von diesem Idealfall und dadurch zur Verbreiterung des G₁- und des G₂/Mitose-Peaks. Zur Berechnung der G-Peaks geht das Programm von einer Normalverteilung aus, die Berechnung der S-Phase im Histogramm erfolgt über ein Polynom zweiten Grades, welches durch Minimierung von Chi-Quadrat iterativ an die gemessene Kurve angepaßt wird. Diese Art der Auswertung beruht auf Daten von Dean & Jett (1974).

2.9 ISOLIERUNG UND AUFARBEITUNG DER RNA AUS P388D₁-ZELLEN

2.9.1 Allgemeines zur Behandlung von Nukleinsäuren

Allgemein müssen bei der Handhabung von RNA sterile Pipettenspitzen, sterile Gefäße und sterile Lösungen verwendet werden, da bei einer Kontamination der Proben mit RNasen, die auf der Haut, in den Haaren und auch im Atem von Menschen zu finden sind, die zelluläre RNA rasch degradiert wird. Auch ist das Reden zu vermeiden. Im Falle von DNA sind solche Vorkehrungen nicht notwendig.

Als Gefäße bei der RNA-Isolierung und Aufarbeitung dienen sterile 15 ml Blue-Cap-Röhrchen von Greiner (Frickenhausen) sowie autoklavierte konische Reaktionsgefäße von Eppendorf (Hamburg) mit dem Fassungsvermögen von 2,2 ml, 1,5 ml und 0,5 ml.

2.9.2 Inkubation und Ernte der Zellen

Für die Gewinnung von RNA aus P388D₁-Zellen wurden die Zellen in einer Konzentration von $0,5-1 \times 10^6$ /ml Kulturmedium (Kap. 2.2.3) in Petrischalen (\varnothing 9,4 cm, Wachstumsfläche 58 cm²) ausgesät und 2-4 Tage im Brutschrank kultiviert. Um genügend RNA zu erhalten, wurden pro Ansatz mindestens zwei vollgewachsene Kulturschalen mit je 4 ml benötigt. Die schwermetallorganischen Verbindungen wurden am Tage der RNA-Isolierung zupipettiert.

Organoschwermetallbehandelte P388D₁-Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit einem Gummischaber von der Kulturschale gelöst, in 15 ml Blue-Cap-Röhrchen überführt, 5 Minuten bei 200 x g zentrifugiert (Digifuge GL, Heraeus) und der Überstand abgenommen. Nach dem Waschen mit 0,3 ml kaltem PBS (Kap. 2.2.1) wurden die Zellen mit 0,3 ml PBS in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt, eine Minute bei 10 000 rpm (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) sedimentiert und das PBS abgesaugt.

2.9.3 RNA-Extraktion

Die Lyse der Zellen erfolgte nach dem Resuspendieren mit 375 µl eiskaltem TNE (s.u.) und der Zugabe von 26 µl 10% Nonidet P-40 (in Wasser) auf Eis (2 min). Danach wurden die Zellbestandteile abzentrifugiert (30 sek, 14 000 rpm, Centrifuge 5415 C, Eppendorf, Hamburg).

Der Überstand wurde mit 375 µl 2 x RNA-Extraktionspuffer (RT, s.u.) in einem 2,2 ml Reaktionsgefäß gemischt. Zur Reinigung der RNA von Proteinen wurde ein Volumen (750 µl) Phenol/Chloroform 1:1 (v/v) zugegeben. Nach dem Vortexen und dem Trennen der Phasen durch Zentrifugation (2 min, 14 000 rpm) wurde die obere wäßrige Phase nochmals auf die gleiche Weise mit Phenol/Chloroform behandelt. Schließlich wurde die wäßrige Phase mit einem Volumen (750 µl) Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 (v/v) ausgeschüttelt und nach dem Trennen der Phasen in ein

Volumen Ethanol überführt und bis zur Fällung bei -20°C aufbewahrt. Die Fällung erfolgte durch Zugabe eines Volumens Ethanol und bei -20°C über Nacht.

TNE:

10	mM	Tris HCl pH 7,0
150	mM	NaCl
1	mM	EDTA

2 x RNA-Extraktionspuffer:

20	mM	Tris HCl pH 7,8
20	mM	EDTA
0,35	mM	NaCl

2.9.4 Spektrophotometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nach Isolierung der RNA aus P388D₁-Zellen wurde ein Aliquot (100 μl) 1:1 mit reinem Ethanol verdünnt und über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Abzentrifugieren (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) in der Kälte bei 14 000 rpm für 25 Minuten wurde die RNA mit 70% Ethanol gewaschen, unter Rotation im Vakuum getrocknet ("speed vac concentrator") und danach in autoklaviertem Wasser aufgenommen. Die Extinktion wurde bei 260 und bei 280 nm bestimmt.

Für die Konzentrationsbestimmung von DNA wurde diese nach der Aufreinigung, Fällung und Trocknung (Kap. 2.10) in einem geringen Volumen H₂O aufgenommen, 1 μl dieser DNA-Lösung 1:400 verdünnt und die Extinktion bei 260 und 280 nm bestimmt.

Das Verhältnis E_{260} zu E_{280} sollte etwa 2:1 bei RNA und 1,8:1 bei DNA sein.

Konzentrationsberechnung: $E_{260} \times 40 = \mu\text{g/ml RNA}$

$E_{260} \times 50 = \mu\text{g/ml DNA}$

2.9.5 Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA

Die Auftrennung der Gesamt-RNA von P388D₁-Zellen erfolgte nach der Molekülgröße in 1-1,5%igen denaturierenden Agarosegelen. Das Volumen der horizontalen Gelkammer betrug 100 ml, entsprechend wurden die Gele wie folgt hergestellt:

1-1,5	mg	Agarose
10	ml	10 x MOPS-Puffer (s.u.)
73	ml	Aqua dest.

mischen, erhitzen bis zur Auflösung der Agarose, auf 50°C abkühlen, Zugabe von:

17	ml	37% Formaldehyd
1	μl	Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

mischen und möglichst blasenfrei in den Geltank gießen.

Nach dem Erstarren wurde mit einem Liter Elektrophoresepuffer (1 x MOPS-Puffer, s.u.) überschichtet.

Pro Probe wurden 25 μg RNA, wie oben beschrieben, ausgefällt, gereinigt und getrocknet, und dann in RNA-Probenpuffer (s.u.) aufgenommen. Nun wurde bei 65°C für fünf Minuten denaturiert und

anschließend auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 3 µl RNA-Ladepuffer (s.u.) wurden die Proben in die mit einem Kamm ausgesparten Taschen des Agarosegels (s.o.) pipettiert und ca. zwei Stunden bei 36 mA (150 V; 5 V/cm Elektrodenabstand) elektrophoretisch aufgetrennt.

RNA-Probenpuffer:

5-10	µl	Aqua dest.
12,5	µl	deionisiertes Formamid
2,5	µl	10 x MOPS (s.u.)
4	µl	37% Formaldehyd

RNA-Ladepuffer:

50	%	Glycerin
0,1	mg/ml	Bromphenolblau

10 x MOPS-Puffer:

200	mM	MOPS
10	mM	EDTA
50	mM	NaAc _{wasserfrei}

Elektrophoresepuffer: 1 x MOPS-Puffer

20	mM	MOPS
1	mM	EDTA
5	mM	NaAc _{wasserfrei}

2.9.6 Transfer von RNA auf Nylonmembranen (Northern blotting)

Nach der Gelelektrophorese wurde das ethidiumbromidgefärbte Gel unter UV-Licht photographiert und anschließend 10 Minuten in Wasser, dann 10 Minuten in 10 x SSC (s.u.) gewaschen. Nun konnte die RNA über Nacht auf eine Nylonmembran (Hybond-N+, Amersham International, Braunschweig) transferiert werden. Hierfür wurde eine Wanne mit 20 x SSC (s.u.) gefüllt und das Gel etwas erhöht auf eine Glasplatte gelegt, die über Whatman 3MM-Papier (Bender & Hobein, Karlsruhe) mit dem Transferpuffer verbunden war. Die Nylonmembran wurde luftblasenfrei auf das Gel aufgelegt, darüber kam eine Lage 3MM-Papier und mehrere Lagen Papierhandtücher. Zusätzlich wurde das Ganze mit einem Gewicht beschwert. Der Aufbau dieser Transfereinheit läßt sich der Abbildung 2.1 entnehmen. Der Puffer wird durch die Kapillarkräfte nach oben gezogen, nimmt dabei die RNA aus dem Agarosegel mit und überträgt sie so auf die Hybridisierungsmembran. Nach 12-20 Stunden ist dieser Vorgang beendet. Dies kann unter UV-Licht überprüft werden, da die RNA noch immer mit Ethidiumbromid angefärbt ist.

Zur Fixierung der RNA wurde die Membran anschließend in 50 mM Phosphatpuffer (s.u.) für zwei Minuten gewaschen, mindestens 30 Minuten bei 80°C gebacken und abschließend mit UV-Licht bestrahlt (UV-Stratalinker 2400; 120 mJ). Alle Membranen wurden in Folie eingeschweißt und bei +4°C aufbewahrt oder direkt einer Hybridisierung (Kap. 2.9.7) unterworfen.

20 x SSC:

3	M	NaCl
0,3	M	NaCitrat

auf pH 6,5 einstellen

0,1 M Phosphatpuffer:

0,1	M	NaH ₂ PO ₄
0,1	M	Na ₂ HPO ₄

auf pH 6,8 einstellen

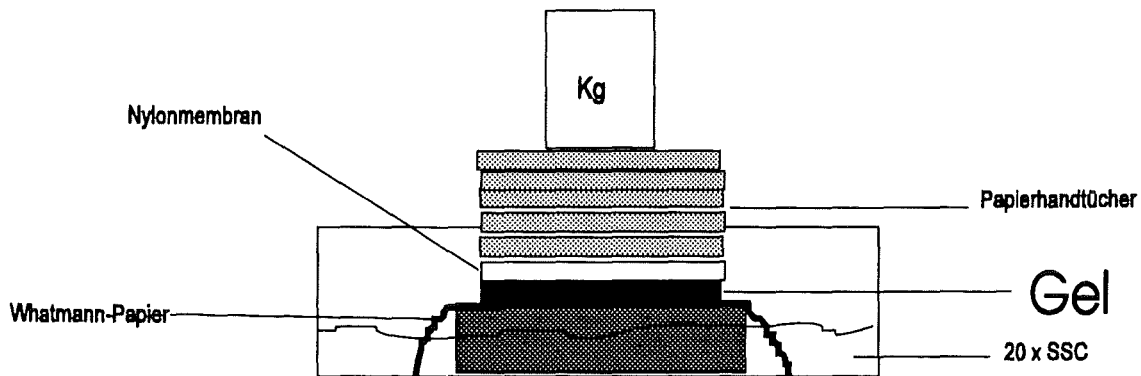


Abb. 2.1: Aufbau einer Transfereinheit.

2.9.7 Hybridisierung mit DNA-Sonden und Autoradiographie

Die Nylonmembranen wurden in einem 100 ml-Polypropylen-Meßzylinder plaziert, pro Membran ca. 5 ml Hybridisierungslösung (s.u.) zugegeben und der Zylinder mit einem Gummistopfen verschlossen. Nun erfolgte für mindestens zwei Stunden die sogenannte Vorhybridisierung bei 65°C und unter Rotation im Hybridisierungsschrank (Bachofer, Reutlingen), um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte nach dem Zugabe einer ³²P-markierten, hitzedenaturierten DNA-Sonde (Kap. 2.10) über Nacht unter denselben Bedingungen wie die Vorhybridisierung. Am nächsten Tag wurden die Membranen in einer Plastikschielle bei 65°C für 5-30 Minuten in 2 x SSC/0,1% SDS unter Schütteln gespült. Zuletzt wurden die Membranen zwischen zwei Saugpapieren kurz getrocknet, in Folie eingeschweißt und in einer lichtdichten Kassette ein Röntgenfilm (Hyperfilm™ MP, Amersham International) aufgelegt. Die Expositionszeit variierte zwischen 8 Stunden und 4 Tagen je nach Sonde. Die Autoradiographien wurden anschließend laserdensitometrisch analysiert und mit Hilfe eines Computerprogrammes ausgewertet. Zur Kontrolle der aufgetragenen RNA-Menge wurden in einer zweiten Hybridisierungsreaktion die Nylonmembranen mit einer Sonde für das Haushaltsenzym Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase behandelt (Kap. 2.10).

Hybridisierungslösung (bei +4°C lagern):

Hybridisierungspuffer (1 l):

300 ml	20 x SSC-Lösung (Kap. 2.9.6)	≅	6	x	SSC-Lösung
50 ml	100 x Denhardts Lösung (s.u.)	≅	5	x	Denhardts Lösung
50 ml	10% SDS	≅	0,5	%	SDS
10 ml	10 mg/ml Heringssperma-DNA	≅	0,1	mg/ml	DNA
10 ml	10 mg/ml Hefe-RNA	≅	0,1	mg/ml	RNA
580 ml	Aqua dest.				

Denhardts-Lösung (100 x)

- 1% Ficoll
- 1% Polyvinylpyrrolidon
- 1% Rinderserumalbumin

Die Heringssperma-DNA und die Hefe-RNA werden in Wasser durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und dann sofort auf Eis gestellt, damit keine Renaturierung mehr stattfindet. Da sich die DNA sehr schlecht löst und die Lösung zunächst sehr zähflüssig ist, sollte sie über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt werden und dann 15 Sekunden bei Stärke 5 beschallt werden.

Falls SDS ausfällt, muß leicht erwärmt werden. Ansonsten muß die Hybridisierungslösung bei +4°C gelagert werden, um eine Renaturierung zu verhindern.

2.10 DNA-SONDEN UND IHRE AUFARBEITUNG

Die verwendeten DNA-Sonden *c-jun*, *c-myc* und GAPDH bzw. die diese DNA-Stücke enthaltenden Vektoren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Angel und Herrn Zawadski, Institut für Genetik, Kernforschungszentrum Karlsruhe, zur Verfügung gestellt, denen ich an dieser Stelle herzlich danken möchte. Die aus den Autoradiographien laserdensitometrisch ermittelte Konzentration der GAPDH-mRNA (die für das Haushaltsenzym Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase codiert) wird als Maß für die pro Spur auf das Gel aufgetragene RNA-Menge verwendet. Der Gehalt an *jun*- und *myc*-mRNA in P388D₁-Zellen unter Einfluß von Organobleiverbindungen wurde auf diesen Wert normalisiert.

GAPDH-Sonde: Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase-Gen der Ratte.

jun-Sonde aus: (Rous-Sarkom-Virus) RSV *c-jun*; HindIII-PSTI geschnitten.

myc-Sonde aus: bakt. Plasmid mit MMTVLTR ("Mouse mamma tumovirus long terminal repeat"), wird PJ5 genannt; ECOR1-BGL2 geschnitten.

2.10.1 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Um die für die Hybridisierungen erforderlichen DNA-Sonden zu erhalten, wurden 5-10 µg einer das DNA-Fragment enthaltenden Plasmid-DNA mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (5-10 U) unter den für das jeweilige Enzym von der Bezugsfirma (Boehringer, Mannheim) angegebenen Bedingungen (Puffer, Temperatur) mindestens eine Stunde inkubiert. Eine Enzymeinheit (1 U) ist definiert als die Menge Enzym, die 1 µg DNA des Bakteriophagen λ in einer Stunde vollständig verdaut.

2.10.2 DNA-Gelelektrophorese

Mit Restriktionsenzymen behandelte DNA wurde 10:1 mit 10 x Ladepuffer (s.u.) verdünnt, auf ein 1%iges Agarosegel (s.u.) aufgetragen und die Teilstücke gelelektrophoretisch aufgetrennt. Das Volumen der horizontalen Gelkammer betrug 100 ml.

Agarosegel:

1 mg	Agarose
100 ml	1 x TAE-Puffer

mischen und bis zur Auflösung der Agarose erhitzen,

1 µl	Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)
------	---------------------------------

mischen und möglichst blasenfrei in den Geltank gießen.

Nach dem Erstarren wurde mit einem Liter Elektrophoresepuffer (1 x TAE-Puffer, s.u.) überschichtet.

1 x TAE-Puffer:

40 mM Tris
40 mM NaAc
2 mM EDTA
auf pH 8,3 einstellen

10 x DNA-Ladepuffer:

20 mM EDTA
20 % Glycerin
0,2 % SDS
0,04 % Bromphenolblau

Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 1-2 Stunden. Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert, danach konnte das gewünschte Fragment ausgeschnitten werden.

2.10.3 Extraktion der DNA aus Agarose

Die Elution der DNA erfolgte durch Zentrifugation (2 min, 6000 rpm). Dazu wurde in ein unten angestochenes Reaktionsgefäß (0,5 ml) eine Spatelspitze silikonisierte Glasperlen gegeben und das Gelstückchen darauf gesetzt. Aufgefangen wurde die DNA-Lösung in einem größeren Reaktionsgefäß. Durch Zugabe eines Volumens Phenol/Chloroform 1:1 (v/v), anschließendes Vortexen und Zentrifugieren (2 min, 14 000 rpm) und Überführen der oberen Phase in ein neues Gefäß wurde die DNA gereinigt. Um die Phenolreste zu entfernen, wurde ein Volumen Chloroform/Isoamylalkohol 24:1 (v/v) zugegeben, gevortext und zentrifugiert (2 min, 14 000 rpm). Nun konnte die DNA durch Zugabe eines geeigneten Volumens 3 M Natriumacetatlösung pH 6,8 (Endkonzentration: 0,2 M) und 2,5 Volumen Ethanol über Nacht bei -20°C ausgefällt werden. Am folgenden Tag wurde in der Kälte für 30 Minuten bei 14 000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die DNA unter Rotation im Vakuum ("speed vac concentrator") getrocknet. Die trockene DNA wurde in wenig H₂O aufgenommen und ihre Konzentration, wie in Kapitel 2.9.4 beschrieben, bestimmt. In dieser Form kann sie nun zur radioaktiven Markierung verwendet werden (Kap. 2.10.4).

2.10.4 Radioaktive Markierung von DNA

Für die Hybridisierungen wurden DNA-Sonden (s.u.) nach dem "random-priming"-Verfahren (Feinberg & Vogelstein, 1983) radioaktiv markiert. Dabei wurde der "prime-it"-Kit von Stratagene eingesetzt: 20-50 ng linearisierte DNA wurden in 20 µl Wasser mit 10 µl Primern versetzt und das Gemisch zur Denaturierung der DNA 5 Minuten bei 100°C auf einem Metallheizblock inkubiert. Der Ansatz wurde danach sofort auf Eis abgekühlt, in der Kälte zentrifugiert und 10 µl Reaktionspuffer (enthält Deoxyribonukleotidtriphosphate) zugegeben. Nach der Zugabe von 3 µl α³²P-dCTP (1,11 x 10⁵ GBq/mmol; 370 MBq/ml) und 2 µl T7-DNA-Polymerase (1U/ml) wurde 5 Minuten bei 37°C inkubiert. In dieser Zeit bildet die DNA-Polymerase des Bakteriophagen T7 zur denaturierten

linearisierten DNA-Probe komplementäre Stränge, in welche radioaktives CTP eingebaut wird. Die markierte DNA wurde von freien Nukleotiden über eine kleine Säule gereinigt. Dazu wurde in ein oben und unten angestochenes Reaktionsgefäß (0,5 ml) eine Spatelspitze mit silikonisierten Glasperlen gegeben und diese mit 500 µl Sephadex G25 in TEN (s.u.) überschichtet. Nun wurde für 2 Minuten bei 3000 rpm (Centrifuge 5415 C, Eppendorf) zentrifugiert, als Auffanggefäß diente ein größeres Reaktions-Hütchen (1,5 ml). Dieser Vorgang wurde wiederholt und dann die radioaktive DNA-Probe aufgetragen und nochmals zentrifugiert. Die überschüssigen Nukleotide werden im Sephadex zurückgehalten, die radioaktive Sonde befindet sich im Eluat und kann direkt in den Hybridisierungszyylinder gegeben werden (Kap. 2.9.7).

TEN:

10 mM Tris
1 mM EDTA
100 mM NaCl
auf pH 8,0 einstellen

2.11 STATISTIK

Bei Angaben zur Statistik wurden von den experimentell ermittelten Daten jeweils die Mittelwerte mit der dazugehörigen Standardabweichung bzw. dem Standardfehler berechnet. Diese Mittelwerte wurden dann mit den Mittelwerten der entsprechenden Kontrollbehandlung mit Hilfe des Student-*t*-Tests verglichen.

Hierbei wurden die folgenden Signifikanzniveaus verwendet:

$p > 0,05$	nicht signifikant
$0,05 > p > 0,01$	signifikant
$0,01 > p$	hoch signifikant

Signifikante Unterschiede sind in Tabellen und Abbildungen mit * bzw. #, hoch signifikante mit ** bzw. ## gekennzeichnet.

3. ERGEBNISSE

3.1 TRIPHENYLBLEI UND SEINE WIRKUNG AUF DIFFERENZIERTE HL-60 ZELLEN

Die akute Toxizität und die Fähigkeit, Arachidonsäure aus der Plasmamembran differenzierter HL-60 Zellen freizusetzen, war für alle verwendeten Organometalle außer Ph_3Pb schon früher untersucht worden (Käfer, 1991). Für Ph_3Pb wurden diese Daten noch ermittelt und sind daher hier aufgeführt.

3.1.1 Akute Zytotoxizität

Die akut zytotoxische Wirkung von Ph_3Pb auf differenzierte HL-60 Zellen wurde mit Hilfe des Trypanblautests (Kap. 2.3) ermittelt und ist in Abbildung 3.1 graphisch dargestellt. Es zeigt sich beim Vergleich der hier gewonnenen Daten mit Daten aus der Literatur (Käfer *et al.*, 1992), daß Ph_3Pb die toxischste der in dieser Arbeit verwendeten Organometallverbindungen ist (Tab. 3.1).

Nur die niedrigste der eingesetzten Konzentrationen ($1 \mu\text{M}$) bewirkt im Zeitraum von fünf Stunden keinen Vitalitätsverlust der HL-60 Zellen. Die nächsthöhere Konzentration ($5 \mu\text{M}$) dagegen ist schon deutlich zytotoxisch. Nach nur 60 Minuten sind im Vergleich zur Kontrolle schon 41% der Zellen schwer geschädigt. Am Ende der Inkubationszeit (5 Stunden) sind nur noch 15% der Zellen vital. Der stärkste Vitalitätsverlust findet in den ersten beiden Stunden statt. $10 \mu\text{M}$ Ph_3Pb führen schon nach einer Stunde zum Absterben der Kultur. Einen ebenso steilen Abfall der Vitalität bewirkt die höchste der eingesetzten Konzentrationen ($100 \mu\text{M}$).

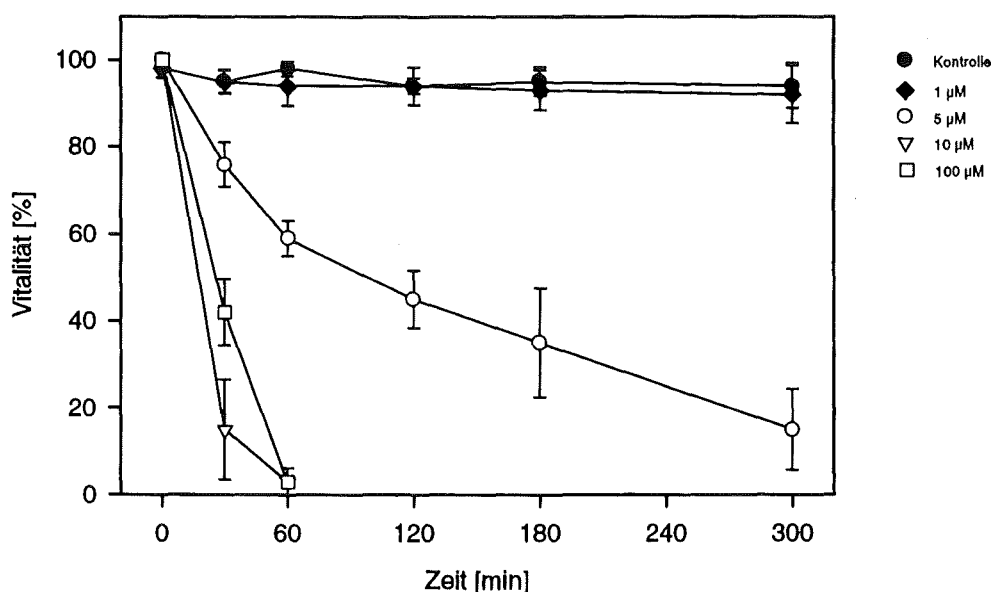


Abb. 3.1: Akute Zytotoxizität von Triphenylbleichlorid.

Bestimmung der Vitalität DMSO-differenzierter HL-60 Zellen mit Trypanblau nach der Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen des Toxins. Die angegebenen %-Werte sind auf die Vitalität der Kontrollzellen bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung aus 4-8 Einzelversuchen.

Tab. 3.1: LD₅₀-Werte der verschiedenen Organometalle.

Organometallverbindung	LD ₅₀ [µM]
Triphenylbleichlorid	3,4
Triethylbleichlorid	31,6 ^b
Trimethylbleichlorid	310,0 ^b
Dibutylzinndichlorid	70,2 ^{a,b}
Trimethylzinnchlorid	5048,0 ^b

Die Werte wurden nach linearer Regression ermittelt. Differenzierte HL-60 Zellen wurden zwei Stunden mit der jeweiligen Substanz inkubiert. a: drei Stunden Inkubationsdauer; b: zugrundeliegende Vitalitätsdaten entstammen Käfer, 1991.

3.1.2 Freisetzung von ¹⁴C-Arachidonsäure aus Membranphospholipiden

Die Menge freier Arachidonsäure in Zellen ist streng reguliert und nur sehr gering. Schon leichte Schwankungen im Gehalt dieser Fettsäure können physiologische Wirkung haben. Bei 24 Stunden und länger mit ¹⁴C-Arachidonsäure markierten DMSO-differenzierten HL-60 Zellen liegt die Menge freier radioaktiver Arachidonsäure durchschnittlich bei 0,2-0,3% der Gesamtaktivität des Lipidextraktes.

Um den Einfluß von Ph₃Pb auf diesen Parameter hin zu untersuchen, wurden DMSO-differenzierte HL-60 Zellen nach der Markierung mit ¹⁴C-Arachidonsäure und ihrer Aussaat in Petrischalen (Kap. 2.6) mit verschiedenen Konzentrationen des Toxins unterschiedlich lange im Brutschrank inkubiert (Tab. 3.2). Durch die anschließende Extraktion der Lipide und ihrer dünnschichtchromatographischen Auftrennung (Kap. 2.6) konnte die prozentuale Verteilung innerhalb der Lipidklassen und die prozentuale Menge freier, nicht acylierter radioaktiver Arachidonsäure bestimmt werden.

Tab. 3.2: Wirkung von Triphenylblei auf den Gehalt freier Arachidonsäure.

Freie Arachidonsäure in % der Aktivität des Gesamtlipidextraktes												
Konz. [µM]	Inkubationsdauer in Minuten											n
	2	5	7,5	10	12,5	15	20	30	60	120	300	
5	0,4 ±0,3	0,4 ±0,2	0,6* ±0,2	0,6** ±0,1	0,7** ±0,3	0,7** ±0,3	1,3** ±0,7	0,7* ±0,5	0,5 ±0,1	0,5 ±0,1	0,4 n=1	6
20	-	-	-	-	-	-	-	0,7** ±0,1	1,0** ±0,0	0,9** ±0,4	1,4** ±0,4	3

-: nicht bestimmt *: signifikant **: hochsignifikant
Angegeben sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichungen.

1 µM Ph₃Pb führt im beobachteten Zeitraum von fünf Stunden zu keiner Erhöhung freier, nicht acylierter ¹⁴C-Arachidonsäure und ist daher auch nicht in Tabelle 3.2 aufgeführt. Diese

Konzentration des Organometalls zeigt auch keinen Effekt auf die Vitalität der HL-60 Zellen (Abb. 3.1).

Die nächsthöhere eingesetzte Konzentration von 5 μM Ph_3Pb bewirkt schon nach wenigen Minuten eine zwar nur leichte, aber signifikante Anreicherung freier Arachidonsäure. Dieser Effekt ist deutlich zeitabhängig und nimmt im Verlauf der ersten 20 Minuten zu (Anstieg von 0,4% auf 1,3% der Gesamtaktivität), um danach wieder abzusinken. Am Ende der fünfstündigen Inkubationszeit ist der Kontrollwert (0,2-0,3%) fast wieder erreicht.

Bei dieser Konzentration ist zu beachten, daß die ^{14}C -Arachidonsäure zeitlich vor dem Einsetzen des Zelltodes aus den Membranphospholipiden freigesetzt wird. Die Verarmung an Fettsäuren in der Membran könnte daher das Absterben der Zellen durch Ph_3Pb zumindest mitverursacht haben. (Es ist bekannt, daß Lysophospholipide, die bei der Deacylierung von Membranphospholipiden auch entstehen, lytische Wirkung auf Zellen haben (Chang *et al.*, 1987).)

Die schon stark zytotoxische Konzentration von 20 μM Ph_3Pb bewirkt nach 30, 60, 120 und 300 Minuten einen hoch signifikanten Anstieg freier Arachidonsäure. Hierbei ist eine schwache Zeitabhängigkeit zu bemerken. Die Arachidonsäurefreisetzung bei dieser Toxin-Konzentration beruht höchstwahrscheinlich auf den allgemeinen Auflösungsprozessen, welche den Zelltod begleiten.

Noch höhere Konzentrationen (50 μM und 100 μM) an Ph_3Pb bewirken weder nach 10 noch nach 30 Minuten eine signifikante Veränderungen im Gehalt freier Arachidonsäure (Daten nicht aufgeführt). Die Zellen sterben bei dieser Konzentration, noch bevor Phospholipasen aktiv werden können (Abb. 3.1).

Da keines der untersuchten Lipide (Phosphatidyl-Inositolphosphat; -Inositol; -Cholin; -Ethanolamin; Sphingomyelin; Neutrallipide und Eicosanoide) signifikante Veränderungen erfährt, ist es recht schwer zu beurteilen, aus welchen Lipiden die freigesetzte Arachidonsäure letztendlich stammt. Phosphatidyl-Inositol und Phosphatidyl-Inositol-Phosphate scheinen zumindest nicht die Hauptquelle zu sein, da hier sehr oft sogar eine Zunahme -ebenfalls nicht signifikant- zu verzeichnen war. Bei 5 μM Ph_3Pb steigt der Gehalt an Phosphatidyl-Inositol-Phosphaten bis zur 7,5ten Minute, der Gehalt an Phosphatidyl-Inositol bis zur 15ten Minute an, danach sinkt der Anteil dieser Lipide an der Gesamtaktivität der Extrakte wieder ab (Daten nicht gezeigt). Diese Substrate würden für eine Beteiligung der Phospholipase C sprechen, während Phosphatidyl-Cholin und Phosphatidyl-Ethanolamin die bevorzugten Lipide der Phospholipase A_2 sind.

Neben Ph_3Pb bewirken auch sämtliche andere in dieser Arbeit verwendeten Organoschwermetalle einen Anstieg an nicht veresterter Arachidonsäure in HL-60 (Käfer, 1991; Käfer *et al.*, 1992) und auch in P388D₁-Zellen (Walser, persönliche Mitteilung).

3.2 ORGANOMETALLE UND ARACHIDONSÄUREHAUSHALT

Bei diesen Untersuchungen fanden die in Tabelle 3.3 aufgelisteten Organoschwermetalle Verwendung.

Tab. 3.3: Bei Untersuchungen zur Arachidonsäurefreisetzung verwendete Verbindungen.

Verbindung	Konzentration	Inkubationsdauer
Me ₃ Pb	500 µM	20 min
Et ₃ Pb	100 µM	20 min
Ph ₃ Pb	5 µM	20 min
Bu ₂ Sn	500 µM	60 min

In unbehandelten differenzierten HL-60 Zellen beträgt der Anteil freier ¹⁴C-Arachidonsäure am Gesamtlipidextrakt etwa 0,3%. Dieser Wert wurde bei den %-Berechnungen der Hemmung/Steigerung in den nun folgenden Unterkapiteln zugrundegelegt und zuvor von den jeweiligen Werten der Versuchsansätze subtrahiert.

3.2.1 Der Effekt von Quinacrin auf die organometall-induzierte Arachidonsäurefreisetzung

Der Wirkstoff Quinacrin wird in der Medizin als Malariamedikament verwendet und ist auf zellulärer Ebene als Phospholipase A₂-Inhibitor bekannt (Bicknell & Vallee, 1989; Testi *et al.*, 1992). Im Falle einer Aktivierung der Phospholipase A₂ durch die Organometalle sollte der Effekt der Arachidonsäurefreisetzung durch die zusätzliche Gabe von Quinacrin verhindert werden können. Die erwartete Hemmung der Organometallwirkung war bei den hier vorliegenden Untersuchungen stets statistisch hoch signifikant (Abb. 3.2).

Der Effekt von Me₃Pb, Et₃Pb und Ph₃Pb auf den Arachidonsäurestoffwechsel nach 20 Minuten Inkubation wird durch 10minütige Vorbehandlung mit 1 mM Quinacrin praktisch vollständig verhindert: Die Hemmung beträgt im Falle von Me₃Pb und Et₃Pb 97%, im Falle von Ph₃Pb 100%.

Im Gegensatz zu den Bleiverbindungen läßt sich die Wirkung des Bu₂Sn durch Quinacrin nur zu 54% hemmen.

Sowohl die Wirkung von 10 µM A23187 (10 min) als auch die Wirkung von 1 µM fMLP (10 min) wird durch Quinacrin vollständig gehemmt (Anhang).

Allgemein ist noch hinzuzufügen, daß Quinacrin selbst zu keiner Veränderung des Arachidonsäuregehaltes in HL-60 Zellen führt, jedoch Eicosanoide verstärkt gebildet werden (Anhang). Dies wurde bei der Betrachtung der Daten stets miteinbezogen.

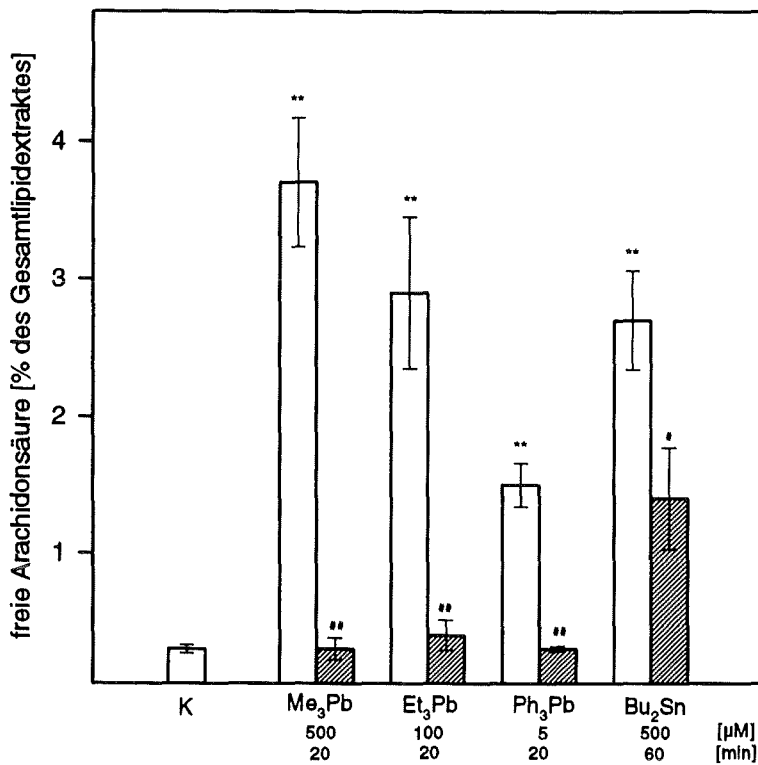


Abb. 3.2: Wirkung des Quinacrins auf die organometallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung.

¹⁴C-Arachidonsäure markierte DMSO-differenzierte HL-60 Zellen wurden direkt mit den verschiedenen schwermetallorganischen Verbindungen inkubiert (weiße Balken), oder die Zellen wurden für 10 Minuten mit 1 mM Quinacrin vorinkubiert und danach mit den Organometallen behandelt (gestreifte Balken). Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardfehler der Arachidonsäurebande aus 5-12 Experimenten.

*: signifikant von der Kontrolle verschieden; **: hoch signifikant von der Kontrolle verschieden; #: signifikant von der Stimulierung verschieden; ##: hoch signifikant von der Stimulierung verschieden.

3.2.2 Untersuchungen zum Einfluß des extrazellulären Calciums mit Hilfe des Calciumchelators EGTA

Alle Phospholipasen sind mehr oder weniger calciumabhängig (Burgoyne *et al.*, 1987; Orrenius *et al.*, 1989). Es sollte daher geklärt werden, ob die Verfügbarkeit extrazellulären Calciums einen Einfluß auf die von den schwermetallorganischen Verbindungen bewirkte Arachidonsäurefreisetzung hat. Die Komplexbildung des extrazellulären Calciums durch EGTA schien dafür geeignet. Es treten bei Verwendung von EGTA bei der Wirkung aller untersuchter Organometalle statistisch signifikante Veränderungen auf (Abb. 3.3).

Eine Konzentration von 5 mM EGTA im Inkubationsmedium verhindert die durch Me₃Pb, Et₃Pb und Ph₃Pb induzierte Arachidonsäurefreisetzung vollständig (100%, 96% bzw. 97% Hemmung). Der Effekt der Zinnverbindung (Bu₂Sn) kann wie im Falle von Quinacrin (Kap. 3.2.1) nur zur Hälfte, auf 52%, reduziert werden.

Das Vorhandensein von EGTA im Inkubationsmedium verringert die Wirksamkeit des Calciumionophors (A23187, 1 µM, 10 min) um 97% (Anhang). EGTA selbst hat keinen Einfluß auf die Menge freier Arachidonsäure und ihrer Metabolite in differenzierten HL-60 Zellen (Anhang).

Die auffällige Übereinstimmung der Abbildungen 3.2 und 3.3 ist Gegenstand im Kapitel Diskussion.

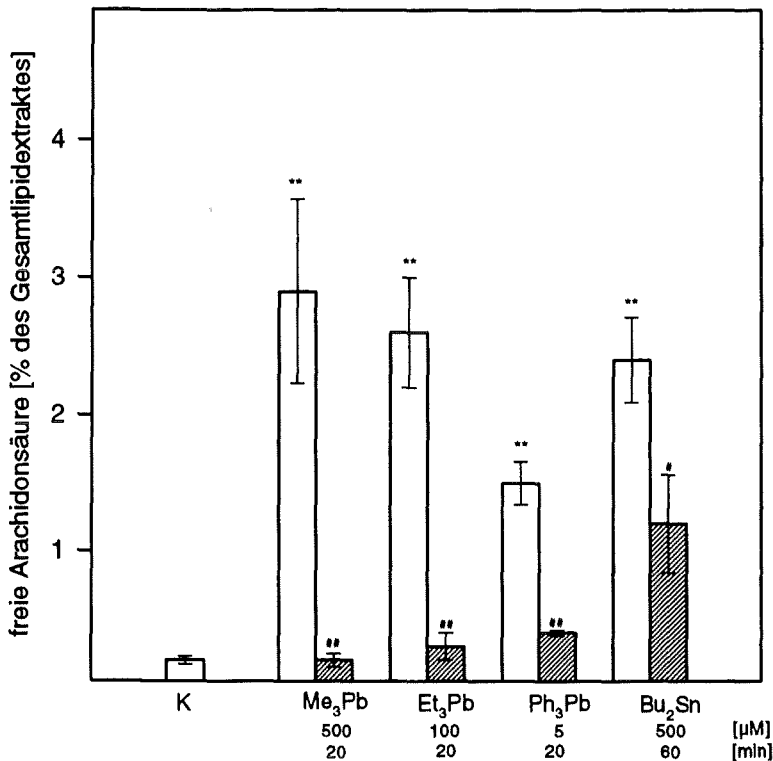


Abb. 3.3: Wirkung von EGTA auf die organometallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung.

Über Nacht mit ¹⁴C-Arachidonsäure markierte DMSO-differenzierte HL-60 Zellen wurden entweder in normalem Inkubationsmedium (weiße Balken) oder in 5 mM EGTA-haltigem Inkubationsmedium (gestreifte Balken) aufgenommen und danach mit den Organometallen behandelt. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardfehler der Arachidonsäurebande aus 3-6 Experimenten.

*: signifikant von der Kontrolle verschieden; **: hoch signifikant von der Kontrolle verschieden; #: signifikant von der Stimulierung verschieden; ##: hoch signifikant von der Stimulierung verschieden.

3.2.3 Der Effekt des Calciumkanalblockers Verapamil auf die organometallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung

Nicht nur der Chelator EGTA verändert die Wirkung der schwermetallorganischen Verbindungen auf den Arachidonsäurestoffwechsel differenzierter HL-60 Zellen. In einer Endkonzentration von 100 µM kann Verapamil, ein Calciumkanalblocker mit vasodilatatorischer und antiarrhythmischer Wirkung, den Effekt aller eingesetzter Organometalle in statistisch signifikanter Weise auf mindestens die Hälfte reduzieren (Abb. 3.4).

Die Induktion der Arachidonsäurefreisetzung aus den Membranphospholipiden durch 20minütige Inkubation mit Me₃Pb bzw. Et₃Pb wird in Anwesenheit von Verapamil zu 67% bzw. 65% reduziert. Ph₃Pb verliert seine Wirkung zu 70%.

Der Bu₂Sn-Effekt wird nicht ganz so stark gehemmt, es findet eine Reduktion der freigesetzten Arachidonsäuremenge um 43% statt.

Die Wirkung von A23187 (1 µM, 10 min) wird durch Verapamil um 76% gehemmt (Anhang).

Verapamil hat wie EGTA keinen Einfluß auf die Menge freier Arachidonsäure und ihrer Abkömmlinge in HL-60 Zellen (Anhang).

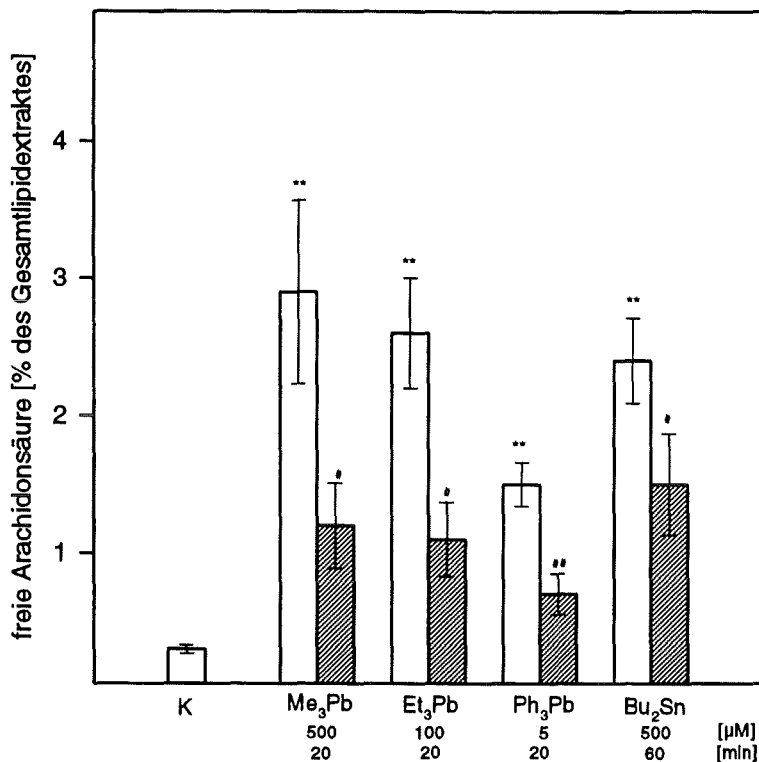


Abb. 3.4: Effekt von Verapamil auf die organometallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung.

Mit ¹⁴C-Arachidonsäure markierte DMSO-differenzierte HL-60 Zellen wurden entweder sofort mit den schwermetallorganischen Verbindungen inkubiert (weiße Balken) oder mit 100 µM Verapamil 5 bis 10 Minuten vorbehandelt (gestreifte Balken). Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardfehler der Arachidonsäurebande aus 3-8 Experimenten.

*: signifikant von der Kontrolle verschieden; **: hoch signifikant von der Kontrolle verschieden; #: signifikant von der Stimulierung verschieden; ##: hoch signifikant von der Stimulierung verschieden.

3.2.4 Der Einfluß von Amilorid auf die durch Organometalle erhöhte freie Arachidonsäurekonzentration

Amilorid ist ein bekannter Inhibitor von Na⁺/Ca²⁺- bzw. Na⁺/H⁺-Kanälen (Siegl *et al.*, 1984) Es findet in der Medizin als mildes Diuretikum Verwendung, da es die Na⁺-Resorption am distalen Tubulus hemmt. Die Verminderung des Abtransportes von Calcium aus dem Zytosol in den Extrazellularraum sollte zu einer Erhöhung des Organometalleffektes führen, falls dieser in Verbindung mit einer Calciumerhöhung im Zytosol steht, welche dadurch noch verstärkt würde.

Bei allen verwendeten schwermetallorganischen Verbindungen bewirkt die 5-10minütige Vorinkubation mit 1 mM Amilorid einen Anstieg der freien Arachidonsäurekonzentration über die Wirkung der Organometalle alleine hinaus, jedoch nicht in statistisch signifikanter Weise (Abb. 3.5).

Die Arachidonsäurefreisetzung durch Me₃Pb steigt bei Anwesenheit von Amilorid von 5,4% auf 6,6% der Gesamtaktivität des Lipidextraktes. Dies entspricht, unter Einbezug der Negativkontrolle (0,3%), einer Erhöhung um 24%. Die Wirkung des Et₃Pb kann um 10% (5% auf 5,5% Gesamtaktivität) gesteigert werden. Der Ph₃Pb-Effekt erfährt eine Zunahme um 50% (1,5% auf 2,1% Gesamtaktivität). In der selben Größenordnung (45%, von 2,3% auf 3,2% Gesamtaktivität) liegt auch die Steigerung der Bu₂Sn-Wirkung.

Auch die durch A23187 ausgelöste Arachidonsäurefreisetzung wird erhöht (11%), im Gegensatz dazu wird der fMLP-Effekt reduziert (-9%). Beide Veränderungen sind nicht statistisch signifikant (Anhang).

Wie Quinacrin erhöht Amilorid selbst den Gehalt freier Arachidonsäure in den Lipidextrakten differenzierter HL-60 Zellen nicht, jedoch werden die Eicosanoide signifikant angereichert (Anhang). Dies wurde bei den Ansätzen mit Amilorid und Organometall stets beachtet.

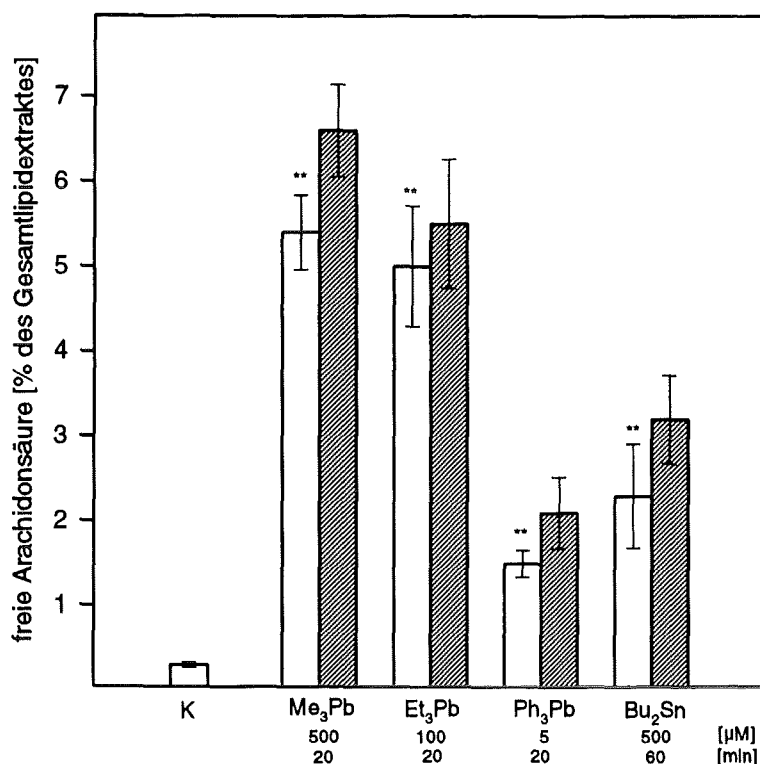


Abb. 3.5: Amilorid und seine Wirkung auf die organometall-induzierte Arachidonsäurefreisetzung.

Über Nacht mit ¹⁴C-Arachidonsäure markierte DMSO-differenzierte HL-60 Zellen erhielten entweder vorab 1 mM Amilorid (10 min) (gestreifte Balken) oder wurden nur mit den Organometallen behandelt (weiße Balken).

Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardfehler der Arachidonsäurebande aus 5-6 Experimenten.

*: signifikant von der Kontrolle verschieden; **: hoch signifikant von der Kontrolle verschieden;

#: signifikant von der Stimulierung verschieden; ##: hoch signifikant von der Stimulierung verschieden.

3.2.5 Die Wirkung von Pertussis Toxin und seinem B-Oligomer auf die organoschwermetallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung

In der Literatur werden mehrere Wege diskutiert, die zu einer Erhöhung der freien Arachidonsäure in der Zelle führen können (Goerig *et al.*, 1985; Irvine, 1982). Bei all diesen Stoffwechselwegen wird die Beteiligung von G-Proteinen zumindest angenommen (Cockcroft & Stutchfield, 1989; Birnbaumer, 1990; Burch, 1989). Daher war es von Interesse, ob der Einfluß auf den Arachidonsäurestoffwechsel der in dieser Arbeit verwendeten Toxine über G-Proteine mediiert wird. Das Gift des Keuchhustenerregers, Pertussis Toxin (PT), ist dafür bekannt, daß es bestimmte G-Proteine enzymatisch inaktivieren kann. PT ist deshalb ein geeignetes Instrument zur

Untersuchung der Beteiligung von G-Proteinen an zellularen Vorgängen. Um auszuschließen, daß auftretende Wirkungen einzig auf die Interkalation des PT in die Plasmamembran und nicht auf seine katalytische Aktivität der G-Protein-Phosphorylierung zurückzuführen ist, wurde in Parallelansätzen die Effektivität des B-Oligomers untersucht. Diese Untereinheit des PT ist für die Verankerung des Gesamtproteins in der Zellmembran verantwortlich, hat aber keinerlei katalytische Aktivität.

Abbildung 3.6 zeigt die Wirkung einer dreistündigen Vorbehandlung mit PT bzw. dessen B-Oligomer auf die fMLP-, A23187- oder organometallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung, ausgedrückt in Prozent der jeweils zugehörigen Stimulierung ohne Vorinkubation mit PT bzw. dessen B-Oligomer. Aufgetragen sind die Mittelwerte aus 5-12 Experimenten und ihre Standardabweichungen.

Die Wirkung des chemotaktischen Peptids fMLP (1 μ M, 10 min) auf den Gehalt freier Arachidonsäure in differenzierten HL-60 Zellen kann durch dreistündige Vorinkubation mit 500 ng/ml PT auf 20% der Kontrollstimulierung reduziert werden. Die durch das Calciumionophor A23187 (10 μ M, 10 min) hervorgerufene Arachidonsäurefreisetzung wird von der selben Menge PT dagegen nur um 25% verringert. Das B-Oligomer, welches stets äquimolar zu PT eingesetzt wurde, hat einen kleineren Effekt auf die Freisetzung von Arachidonsäure aus den Membranphospholipiden. Dieser überall auftretende kleine Effekt (um die 10%) kann wahrscheinlich auf eine Verunreinigung des B-Oligomers mit PT zurückgeführt werden.

Der Effekt aller untersuchten blei- und zinnorganischen Verbindungen kann durch die Gabe von 1500 ng/ml PT drei Stunden im voraus vermindert werden.

Am deutlichsten ist dies im Falle von Me_3Pb und Ph_3Pb . Durch Vorinkubation mit PT kann die Arachidonsäurefreisetzung im Mittel um 44% reduziert werden. Die Effekte von Et_3Pb und Bu_2Sn sind dagegen nur um etwa 30% verringert. Bei Verwendung einer höheren Konzentration an Bu_2Sn (5 mM, ebenfalls 60 min) kann die Wirkung durch PT um 47% erniedrigt werden (Daten nicht gezeigt).

Bei der Versuchsreihe mit Ph_3Pb wurde auf die Verwendung des B-Oligomers verzichtet.

Allgemein ist zu diesen Versuchsreihen zu bemerken, daß die biologische Variabilität hier besonders zum Tragen kam, was in der Größe der Standardabweichungen seinen Ausdruck findet. Die Versuche waren nicht nur von der jeweiligen "Konstitution" der Zellkultur abhängig, deren Schwanken durch die Inkubationsansätze mit fMLP nachvollzogen werden konnte, sondern auch vom Funktionieren des verwendeten Enzyms PT und seiner Untereinheit, dem B-Oligomer. Hier waren verschiedene Chargen verwendet worden, was unter Umständen zu der Schwankungsbreite der vorliegenden Daten beigetragen hat.

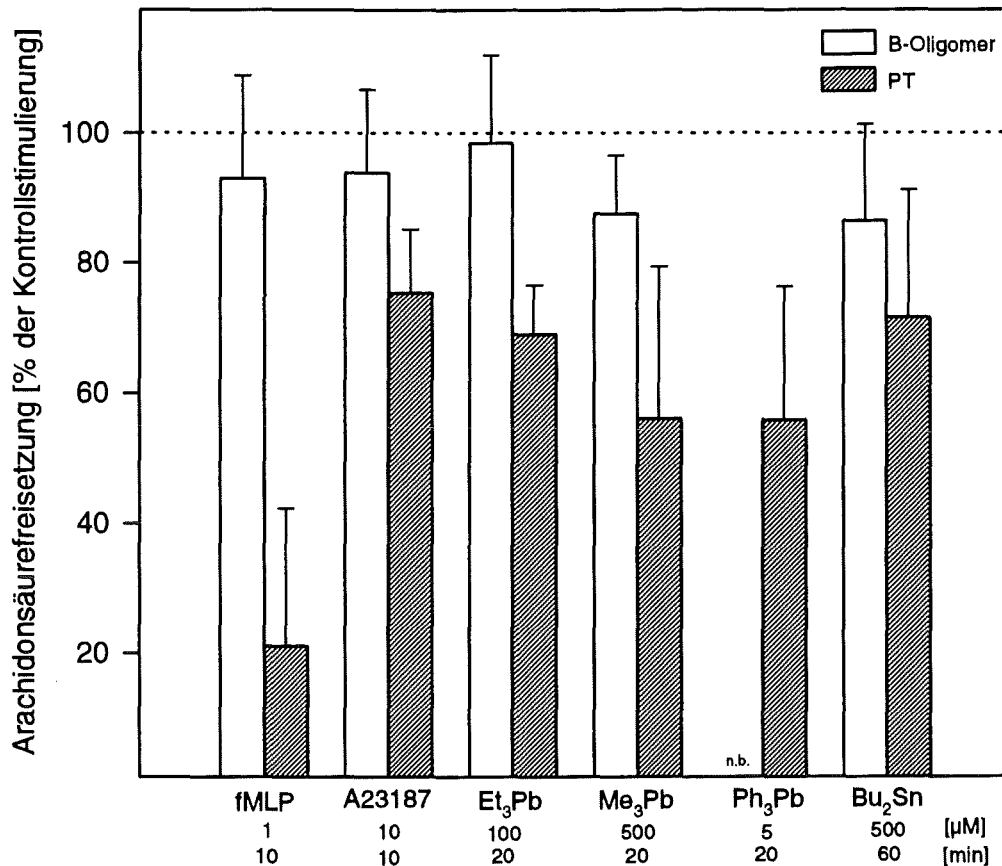


Abb. 3.6: Pertussis Toxin und seine Wirkung auf die organometallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung.

DMSO-differenzierte mit ¹⁴C-Arachidonsäure markierte HL-60 Zellen wurden mit PT bzw. seinem B-Oligomer für drei Stunden vorinkubiert und anschließend mit den verschiedenen Substanzen behandelt. Parallel dazu fanden Stimulierungen mit den Verbindungen ohne PT bzw. seinem B-Oligomer statt. Die Kontrollstimulierungen jedes Versuches wurden auf 100% gesetzt und der Prozentanteil der zugehörigen Inkubation mit PT bzw. seinem B-Oligomer berechnet. Aufgetragen sind die Mittelwerte ± Standardabweichung aus 5-6 Experimenten. n.b.: nicht bestimmt.

3.2.6 Zusammenwirken von Verapamil und Pertussis Toxin auf die Freisetzung von Arachidonsäure durch Organometalle

Es sollte die mögliche synergistische Wirkung des Calciumkanalblockers Verapamil und des G-Protein-Inhibitors Pertussis Toxin in bezug auf die durch schwermetallorganische Verbindungen induzierte Arachidonsäurefreisetzung aus Membranphospholipiden untersucht werden. G-Protein-abhängige Calciumkanäle stehen im Verdacht, an der Aktivierung von Phospholipasen beteiligt zu sein, außerdem sind Phospholipasen selbst G-Protein-reguliert.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind der Abbildung 3.7 zu entnehmen. Die Lipidextrakte markierter HL-60 Zellen, die mit Verapamil/Organometall, PT/Organometall bzw. PT/Verapamil/Organometall behandelt worden waren, wurden mit Ansätzen, die nur die schwermetallorganische Verbindung erhielten, verglichen (Konzentrationen und Inkubationsdauern wie bei den anderen Versuchsreihen; Tab. 3.3). Mit Verapamil und PT wurde dabei, wie schon beschrieben, vorinkubiert (Kap. 3.2.3 u. 3.2.5).

In dieser Versuchsreihe wird der Effekt von Et_3Pb durch Verapamil um 68%, durch PT um 41% gehemmt. Gemeinsame Gabe von PT und Verapamil reduzieren die Et_3Pb -Wirkung um 82%. Ähnlich sieht es auch für Me_3Pb aus. Verapamil hemmt um 53%, PT um 41%. Gemeinsam hemmen PT und Verapamil zu 75%. Die Wirkung der dritten bleiorganische Verbindung (Ph_3Pb) erfährt durch Verapamil eine Reduktion um 70%, durch PT um 53%. Zusammen erreichen Verapamil und PT hier nur eine Hemmung von 68%.

Bei allen Organobleiverbindungen (Et_3Pb , Me_3Pb bzw. Ph_3Pb) ist die Summe der Einzelwirkungen von Verapamil und PT größer (109%, 94% bzw. 123%) als die gemeinsame Wirkung (82%, 75% bzw. 68%).

Beim Bu_2Sn ist das Gegenteil der Fall. Die Summe der Einzelwirkungen (s.u.) ist kleiner als die gemeinsame Wirkung von PT und Verapamil (77% Hemmung). Dies könnte ein allgemeiner Unterschied zwischen blei- und zinnorganischen Substanzen sein. Verapamil reduziert den Bu_2Sn -Effekt um 49%. PT erreicht in dieser Versuchsreihe nur eine Reduktion um 18%.

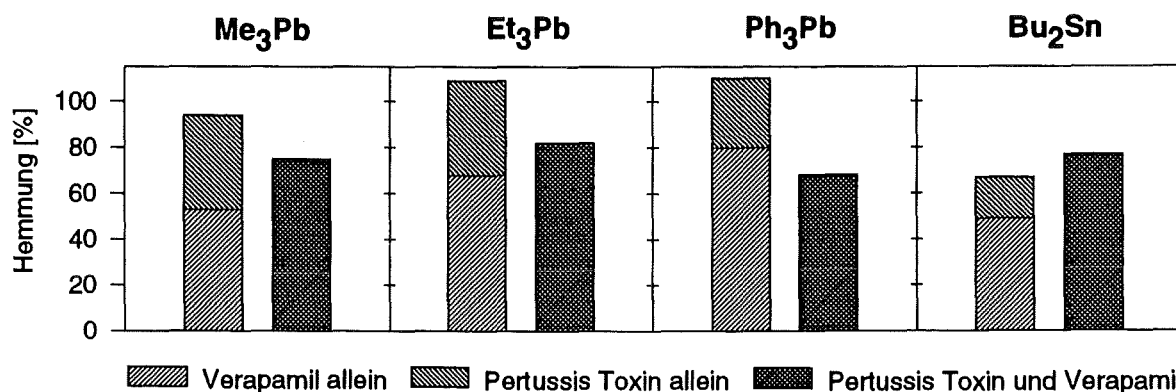


Abb. 3.7: Hemmung der organometallinduzierten Arachidonsäurefreisetzung durch PT und Verapamil.

^{14}C -Arachidonsäure markierte DMSO-differenzierte HL-60 Zellen wurden mit den schwermetallorganischen Verbindungen wie in Tab. 3.3 aufgelistet inkubiert. Parallel dazu erfolgte eine Vorinkubation mit 1500 ng/ml PT oder 100 μM Verapamil. Zusätzlich wurden Zellen sowohl mit PT als auch mit Verapamil vorbehandelt. Es wurde die prozentuale Hemmung der metallinduzierten Arachidonsäurefreisetzung durch Verapamil, PT und beiden zusammen berechnet. Übereinanderaufgetragen sind die Werte für die Wirkung von Verapamil und PT alleine (diese Säule entspricht daher der Summe der Einzelwirkungen). Die Säulen daneben zeigen die durch gleichzeitige Gabe von PT und Verapamil erreichte Reduktion der Organoschwermetallwirkung. (n stets ≥ 3 , die Hemmung der metallinduzierten Arachidonsäurefreisetzung war bei gleichzeitiger Gabe von PT und Verapamil hoch signifikant.)

3.3 ORGANOMETALLE UND AKTINFILAMENTE

Schon im Lichtmikroskop konnten Formveränderungen differenzierter und undifferenzierter HL-60 Zellen beobachtet werden, die als Beeinträchtigung der Zytoskelettorganisation gewertet wurden. Um dies näher zu untersuchen, wurden die Aktinfilamente Et_3Pb - (als Beispiel für eine bleiorganische Verbindung) und Bu_2Sn - (als Beispiel für eine zinnorganische Verbindung) sowie unbehandelte NRK-Zellen mit Phalloidin-Rhodamin angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 500fachen Vergrößerung photographiert (Abb. 3.8). Diese epithelartigen Zellen besitzen im Gegensatz zu Blutzellen gut ausgebildete Streifasern und eignen sich daher für diese

Untersuchungen besser als HL-60 Zellen. Phalloidin, das Gift des Knollenblätterpilzes, ist ein zyklisches Peptid, welches spezifisch an Aktin bindet. Das an dieses Peptid gebundene Rhodamin ist ein rot fluoreszierender Farbstoff, der die Bindung des Phalloidins an Aktin sichtbar macht.

Während in unbehandelten Kontrollzellen die sogenannten Streßfasern parallele Bündel bilden, die quer durch die Zelle ziehen (Abb. 3.8.A), sind in mit $100 \mu\text{M Et}_3\text{Pb}$ für eine Stunde behandelten Zellen keine Aktinfilamente mehr zu erkennen (Abb. 3.8.B). Das Aktin ist depolymerisiert und bildet kleine Aggregate. Die Zellränder sind stärker gefärbt, was auf von innen enganliegendes monomeres oder auch polymeres Aktin schließen läßt. Dieser Effekt des Et_3Pb ist auch bei niedrigeren Konzentrationen, hier jedoch erst nach längeren Inkubationszeiten zu beobachten. Abbildung 3.8.C zeigt 18 Stunden mit $1 \mu\text{M Et}_3\text{Pb}$ behandelte NRK-Zellen.

Zellen, die 60 Minuten mit $500 \mu\text{M Bu}_2\text{Sn}$ inkubiert wurden, zeigen eine zwar schwächere aber dennoch deutliche Depolymerisation des Aktins (Abb. 3.8.D). In den meisten Zellen sind die Steßfasern verschwunden, verbliebene Filamente sind nicht mehr parallel angeordnet, sondern bilden stern- oder ringförmige Strukturen. Die Fluoreszenz, und damit das Aktin, scheint gleichmäßig über die ganze Zelle verteilt zu sein.

Abb. 3.8: Organisation von Aktin in organometallbehandelten NRK-Zellen.

NRK-Zellen wurden nach Inkubation mit Et_3Pb bzw. Bu_2Sn gewaschen, fixiert und mit Phalloidin-Rhodamin gefärbt. Gesamtvergrößerung: $\sim 2500\times$.

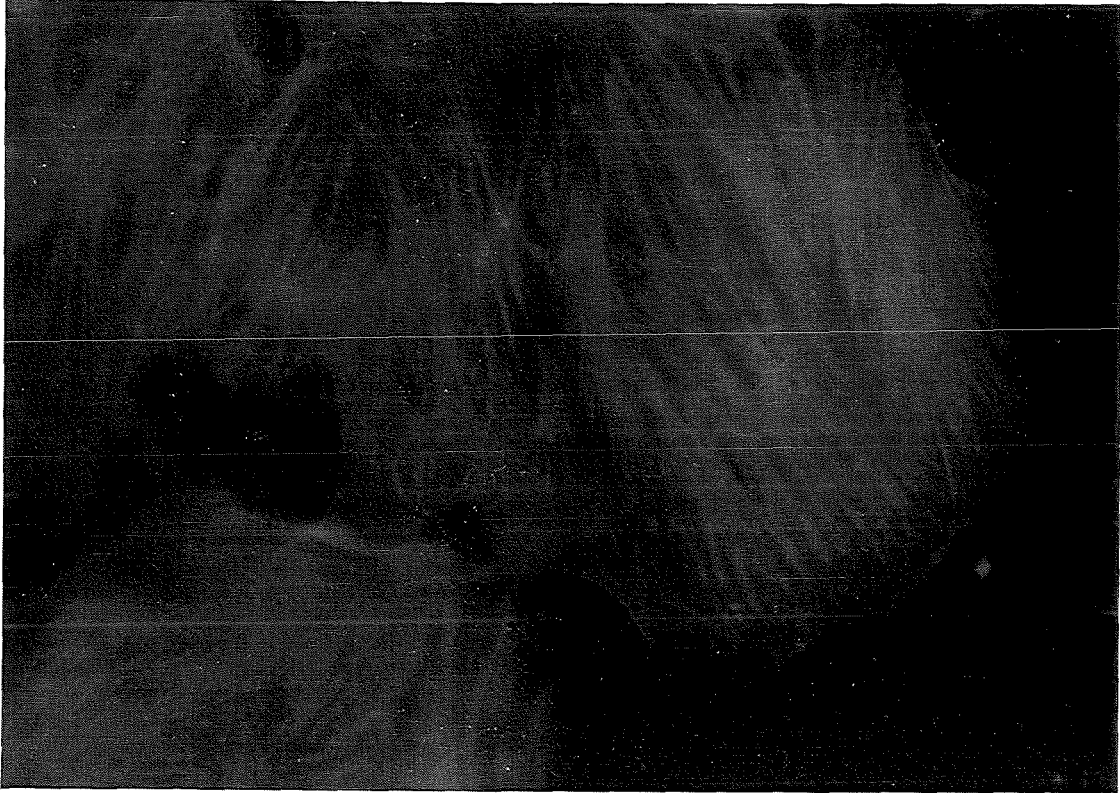
A: unbehandelte Kontrollzellen, das Aktin bildet sogenannte Streßfasern.

B: nach Behandlung mit $100 \mu\text{M Et}_3\text{Pb}$ (60 min) ist das Aktin deutlich depolymerisiert.

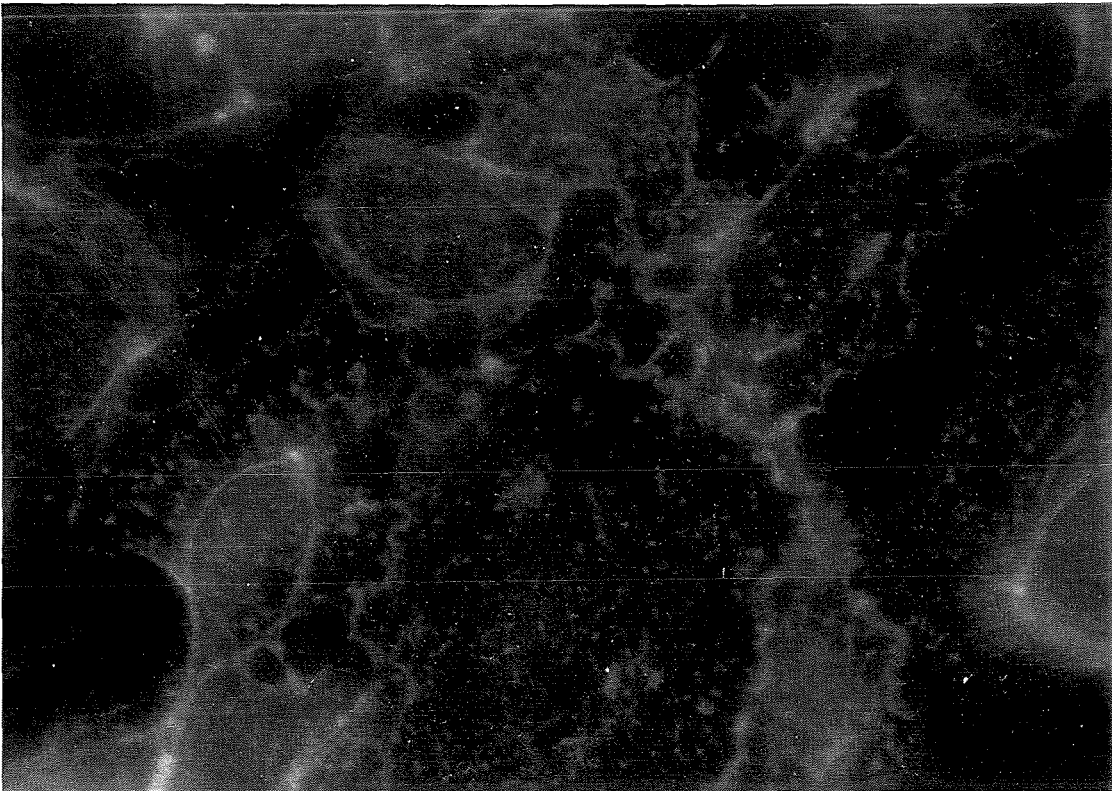
C: nach Behandlung mit $1 \mu\text{M Et}_3\text{Pb}$ (18 Stunden) beginnt auch die sichtbare Zerstörung des Aktin-Gerüsts.

D: nach Behandlung mit $500 \mu\text{M Bu}_2\text{Sn}$ (60 min) bildet Aktin ring- oder sternförmige Strukturen.

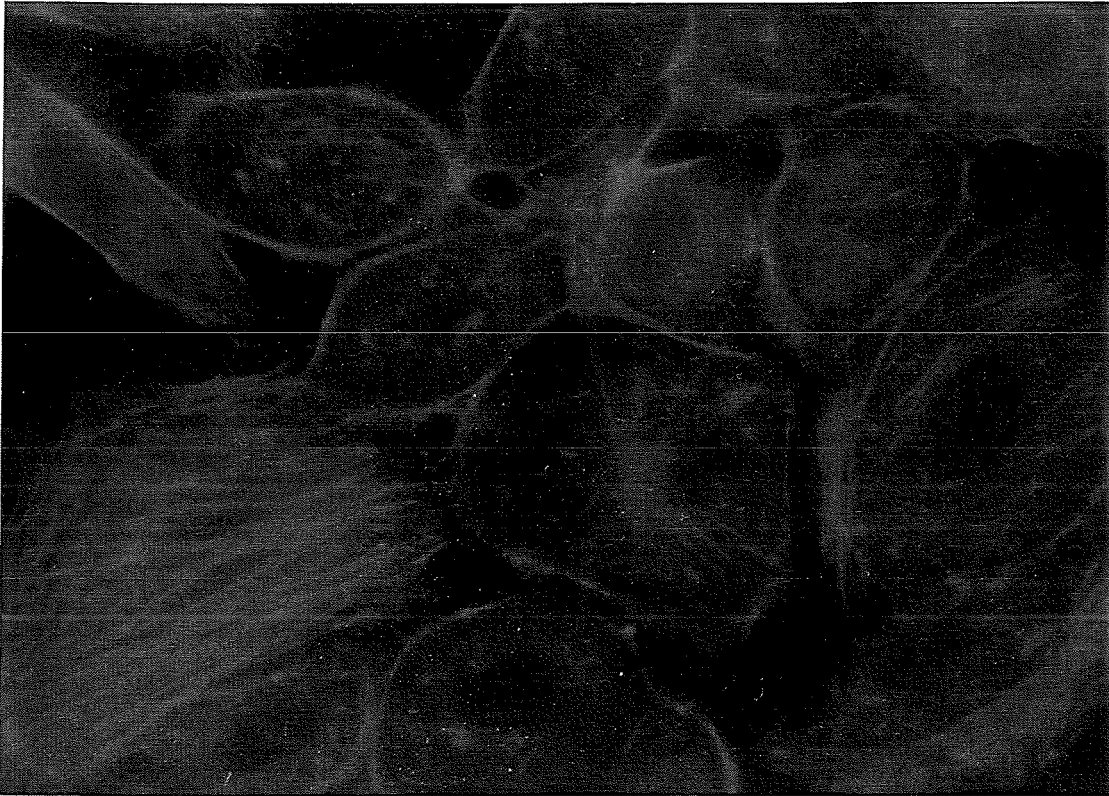
3.8.A



3.8.B



3.8.C



3.8.D



3.4 EINFLUß VON ORGANOMETALLEN AUF DIE PROLIFERATION UND DEN ZELLYKLUS

Da schwermetallorganische Verbindungen die Zytoskelettorganisation beeinträchtigen können (Kap. 3.3), war es naheliegend, das Teilungsverhalten der undifferenzierten HL-60 Zellen unter Einwirkung dieser Toxine zu untersuchen. Für eine reguläre Zellteilung müssen sowohl Mikrotubuli als auch Aktinfilamente in funktionstüchtigem Zustand sein.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Proliferationsverhalten undifferenzierter HL-60 Zellen sind in der Tabelle 3.4 am Ende dieses Unterkapitels zusammenfassend dargestellt. Es fanden folgende Organoschwermetalle Verwendung (Konzentrationsangaben in Klammer):

Et_3Pb (1 μM , 0,1 μM), Me_3Pb (5 μM , 1 μM), Ph_3Pb (0,5 μM , 0,1 μM), Me_3Sn (10 μM , 1 μM) und Bu_2Sn (0,1 μM , 0,05 μM).

3.4.1 DNA-Histogramme

3.4.1.1 VERÄNDERUNG DER ZELLYKLUSVERTEILUNG

In den Abbildungen 3.9-13 ist die Wirkung der blei- und zinnorganischen Verbindungen auf die Zellzyklusverteilung nach 6, 16, 24 und 48 Stunden Inkubation graphisch dargestellt. Dabei wurde nur die höhere der beiden von jedem Toxin eingesetzten Konzentrationen berücksichtigt, da in jedem Fall die niedrigere Konzentration auch nach 48 Stunden keinen Einfluß zeigte.

Eine Konzentration von nur 1 μM Et_3Pb (Abb. 3.9; Tab. 3.4) führt schon nach 6 Stunden zu einer statistisch signifikanten Verringerung des Anteils an G_1 -Phasezellen von 48% (Kontrolle) auf 44,4%. Die beiden anderen Zyklusphasen sind in dieser Zeit leicht erhöht, jedoch nicht in statistisch signifikanter Weise. Nach 16 Stunden ist die G_1 -Phase um etwa 18% im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt, die S-Phaseanteile sind durchschnittlich um 8%, die G_2 /Mitose-Phaseanteile um 10% erhöht. Alle genannten Veränderungen sind zu diesem Zeitpunkt statistisch signifikant. Wird einen Tag lang mit Et_3Pb inkubiert, kommt es zu einer signifikanten Veränderung der G_1 - und der G_2 /Mitose-Phaseanteile. Während der G_1 -Wert um etwa 9% sinkt, nimmt der G_2 /Mitose-Wert um eben diesen Betrag zu. Die S-Phaseanteile sind zu diesem Zeitpunkt von denen der Kontrollen nicht zu unterscheiden. Nach 48stündiger Inkubation ist der Effekt des Et_3Pb auf die G_2 /Mitose-Phaseanteile noch viel deutlicher ausgeprägt als nach nur 24 Stunden. Es findet im Vergleich zur Kontrolle ein Anstieg um über 20% statt. Gleichzeitig gehen sowohl die G_1 -Phaseanteile als auch die S-Phaseanteile (um ca. 10% bzw. 11%) zurück. Alle Veränderungen zu diesem Zeitpunkt sind statistisch signifikant. Et_3Pb bewirkt also im Verlauf der Inkubation ein deutlich zeitabhängiges Auflaufen der Zellen im G_2 /Mitose-Stadium.

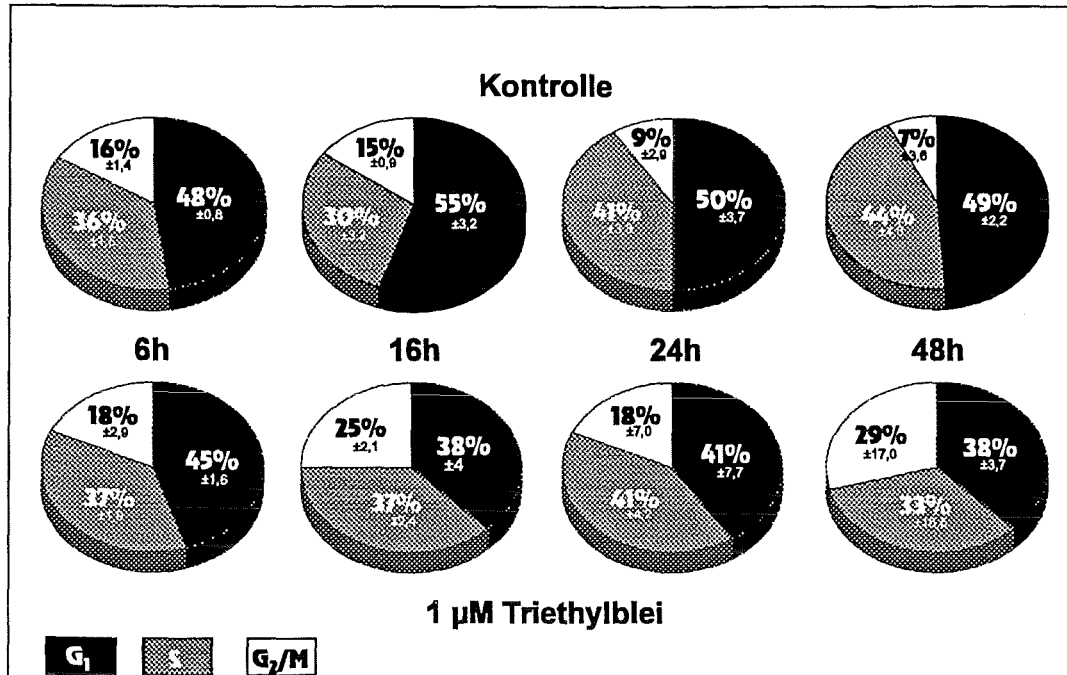


Abb. 3.9: Veränderung der Zellzyklusverteilung undifferenzierter HL-60 Zellen durch Et₃Pb. 6, 16, 24 und 48 Stunden mit Et₃Pb behandelte Zellen wurden mit DAPI behandelt und der DNA-Gehalt wurde durchflußzytometrisch ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte aus n ≥ 3 Experimenten ± Standardabweichung. Obere Reihe: Kontrollzellen. Untere Reihe: Behandelte Zellen.

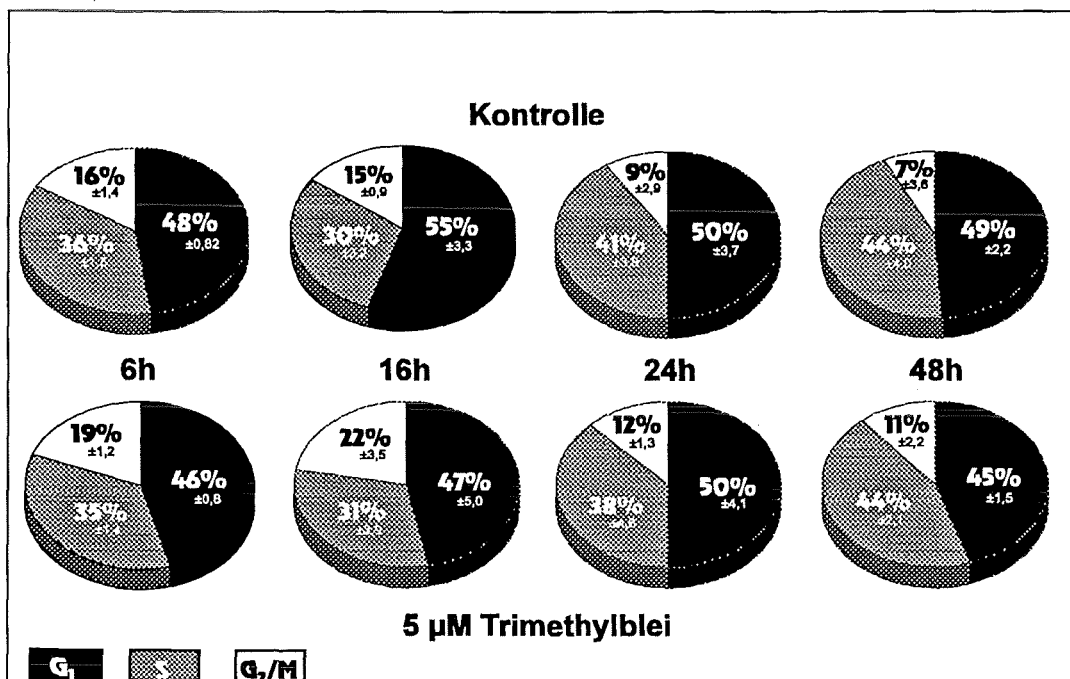


Abb. 3.10: Veränderung der Zellzyklusverteilung undifferenzierter HL-60 Zellen durch Me₃Pb. 6, 16, 24 und 48 Stunden mit Me₃Pb behandelte Zellen wurden mit DAPI behandelt und der DNA-Gehalt wurde durchflußzytometrisch ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte aus n ≥ 3 Experimenten ± Standardabweichung. Obere Reihe: Kontrollzellen. Untere Reihe: Behandelte Zellen.

Me_3Pb ($5 \mu\text{M}$, Abb. 3.10, Tab. 3.4) hat einen mit Et_3Pb vergleichbaren, aber, obwohl fünffach höher konzentriert, nicht so ausgeprägten Effekt. Auch hier ist schon nach 6 Stunden der G_1 -Phaseanteil im Vergleich zur Kontrolle von 48% auf 45,6% statistisch signifikant erniedrigt. Einen Zuwachs an Zellen (um etwa 3% aller Zellen) erfährt in diesem Falle allein die G_2 /Mitose-Phase. Diese Veränderung ist ebenfalls statistisch signifikant. Nach 16 Stunden sind die G_1 -Phaseanteile 7,5% niedriger, die G_2 /Mitose-Phaseanteile 6,7% höher als bei der Kontrolle. Beide Veränderungen sind statistisch sicher. Die S-Phase bleibt praktisch unverändert. Obwohl auch nach 24 Stunden Inkubation mit Me_3Pb noch eine statistisch signifikante Erhöhung der G_2 /Mitose-Phaseanteile zu verzeichnen ist (2,7%), scheint der Effekt der Organometallverbindung jedoch zurückzugehen. Nach zweitägiger Behandlung ist G_1 wieder signifikant um etwa 3% erniedrigt und dafür G_2 /Mitose um diesen Anteil erhöht. Die S-Phase bleibt, wie schon nach 6, 16 und 24 Stunden, unbeeinflusst. Im Gegensatz zu Et_3Pb bewirkt Me_3Pb also keinen sukzessiven Anstieg der G_2 /Mitose-Phaseanteile über den gesamten Inkubationszeitraum. Dennoch ist auch bei dieser Verbindung eine Zeitabhängigkeit des Effektes zu bemerken. Zunächst steigt der Anteil Zellen in G_2 /Mitose bis zur 16ten Stunde an, dann scheinen die Zellen sich wieder ihrem normalen Teilungszyklus anzunähern.

Die dritte Bleiverbindung (Ph_3Pb , Abb. 3.11, Tab. 3.4) bewirkt in beiden verwendeten Konzentrationen und im Zeitraum von zwei Tagen keine statistisch sicheren Veränderungen der Zellzyklusverteilung von undifferenzierten HL-60 Zellen. Jedoch wird nach 48 Stunden bei der höheren Konzentration ($0,5 \mu\text{M}$) eine Erhöhung des G_2 /Mitosen-Phaseanteils um 4,7% ermittelt. Es scheint, als ob auch diese Substanz wie Et_3Pb und Me_3Pb zu einem G_2 /Mitose-Block führt.

Ganz im Gegensatz zu dem bisher beschriebenen Effekt von Organobleiverbindungen bewirkt Me_3Sn in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ keinen G_2 /Mitose-Block, sondern "arretiert" die Zellen in G_0/G_1 (Abb. 3.12, Tab. 3.4). Dieser deutlich zeitabhängige Effekt ist schon nach 16stündiger Inkubationsdauer feststellbar (Erhöhung von G_1 um etwa 2,5%), jedoch erst nach 24 Stunden statistisch sicher (Erhöhung von G_1 um etwa 4,7%). Die G_2 /Mitose-Phaseanteile sind nun sogar signifikant niedriger als bei der Kontrolle, der Unterschied beträgt etwa 5%. Ansonsten sind zu keinem Zeitpunkt statistisch sichere Veränderungen von G_2 /Mitose- bzw. S-Phaseanteilen zu verzeichnen. Nach zweitägiger Behandlung mit Me_3Sn ist der G_1 -Phaseanteil um fast 10% höher als bei der Kontrolle. Die S- und G_2 /Mitose-Phaseanteile sind verringert, was aber nicht statistisch abzusichern war.

Bu_2Sn wurde bei diesen Untersuchungen in Konzentrationen von $0,1 \mu\text{M}$ und $0,05 \mu\text{M}$ eingesetzt und hat weder nach 6, 16 und 24 Stunden noch nach zwei Tagen einen statistisch sicheren Effekt auf den Zellzyklus. Nach 48 Stunden scheint bei der höheren Konzentration ($0,1 \mu\text{M}$) der S-Phaseanteil um 4% erhöht und der G_2 /Mitose-Phaseanteil entsprechend erniedrigt zu sein (Abb. 3.13, Tab. 3.4).

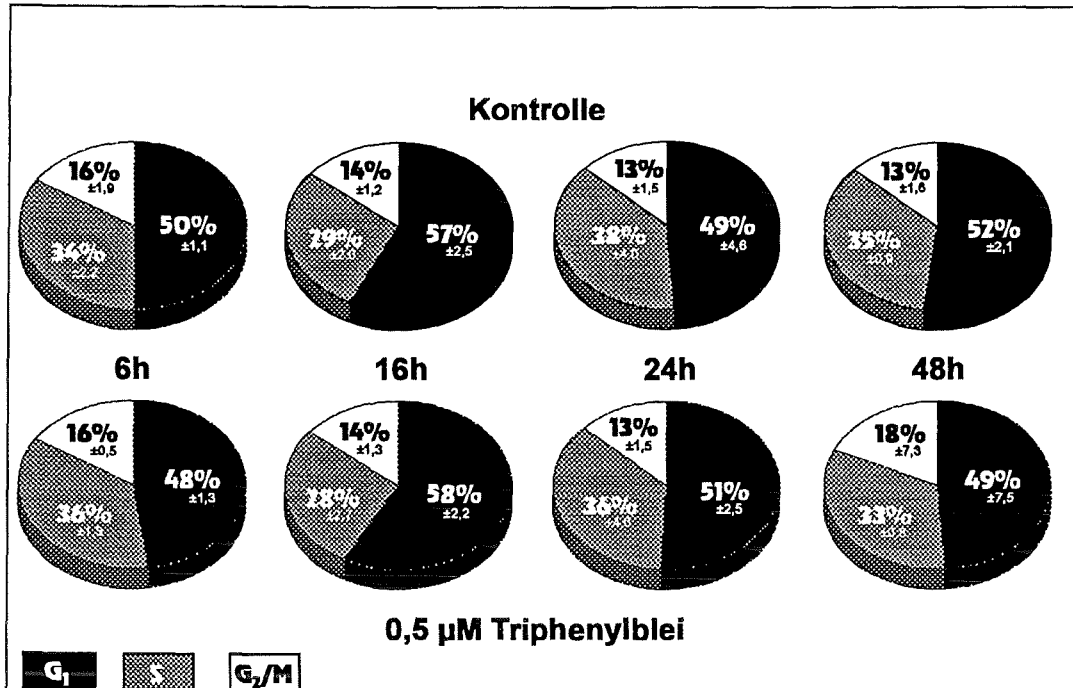


Abb. 3.11: Veränderung der Zellzyklusverteilung undifferenzierter HL-60 Zellen durch Ph₃Pb. 6, 16, 24 und 48 Stunden mit Ph₃Pb behandelte Zellen wurden mit DAPI behandelt und der DNA-Gehalt wurde durchflußzytometrisch ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte aus n ≥ 3 Experimenten ± Standardabweichung. Obere Reihe: Kontrollzellen. Untere Reihe: Behandelte Zellen.

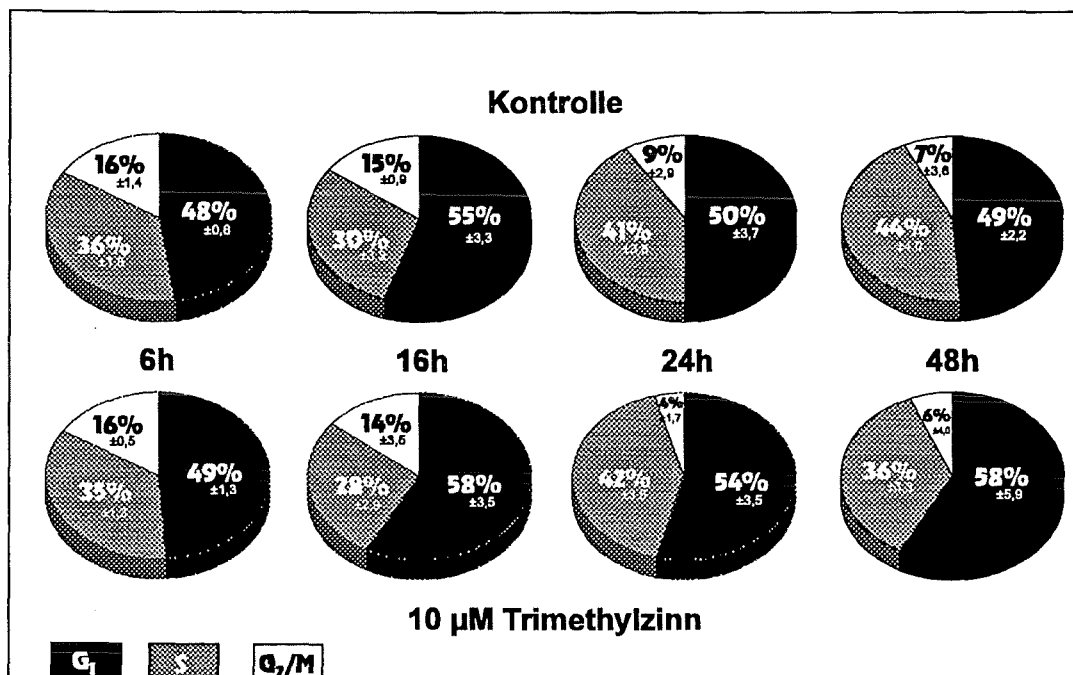


Abb. 3.12: Veränderung der Zellzyklusverteilung undifferenzierter HL-60 Zellen durch Me₃Sn. 6, 16, 24 und 48 Stunden mit Me₃Sn behandelte Zellen wurden mit DAPI behandelt und der DNA-Gehalt wurde durchflußzytometrisch ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte aus n ≥ 3 Experimenten ± Standardabweichung. Obere Reihe: Kontrollzellen. Untere Reihe: Behandelte Zellen.

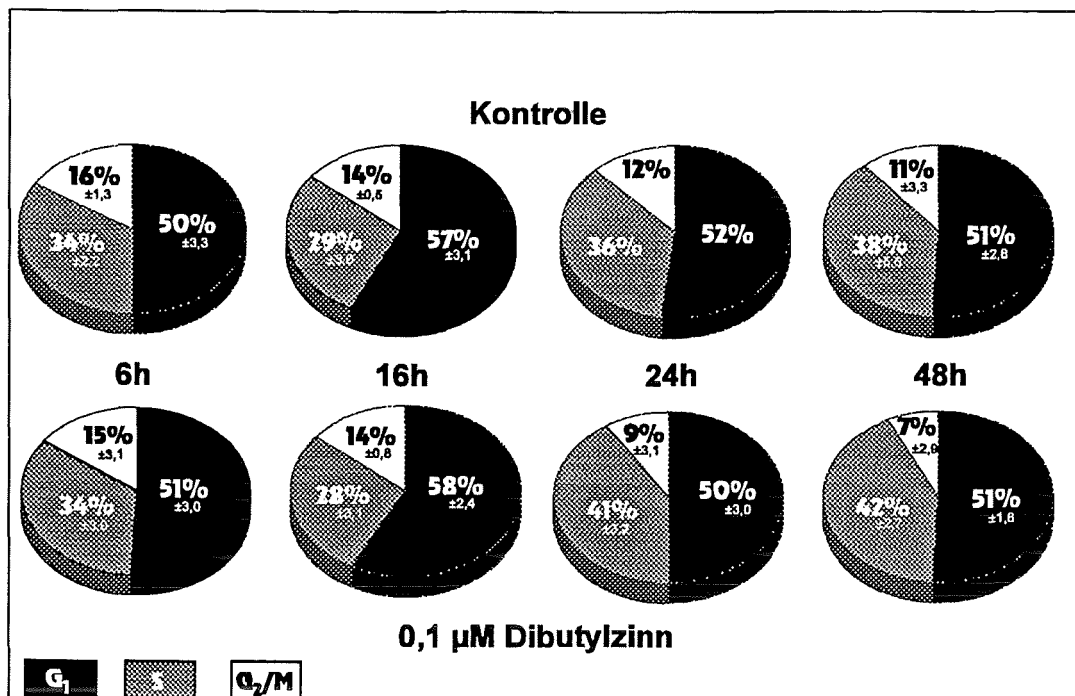


Abb. 3.13: Veränderung der Zellzyklusverteilung undifferenzierter HL-60 Zellen durch Bu₂Sn. 6, 16, 24 und 48 Stunden mit Bu₂Sn behandelte Zellen wurden mit DAPI behandelt und der DNA-Gehalt wurde durchflußzytometrisch ermittelt. Angegeben sind die Mittelwerte. Bei n ≥ 3 Experimenten wurde die Standardabweichung ebenfalls angegeben. Obere Reihe: Kontrollzellen. Untere Reihe: Behandelte Zellen.

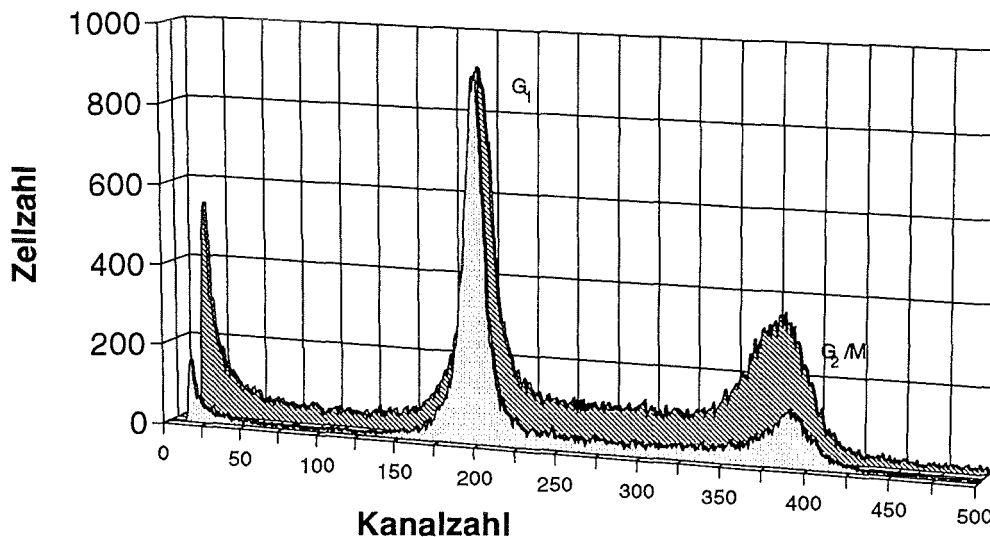


Abb. 3.14: DNA-Histogramm undifferenzierter HL-60 Zellen.

Vordergrund: Kontrollzellen; Hintergrund: 16 h 1 µM Et₃Pb. Bei Behandlung mit Et₃Pb kommt es im Vergleich zur Kontrolle zu einer deutlichen Anhäufung der Zellen in G₂/Mitose und zu einer sichtbaren Debrisbildung. Näheres siehe Text.

3.4.1.2 AUFTRETEN EINES "PRÄ-G₁-PEAKS"

Abbildung 3.14 zeigt ein typisches Histogramm von undifferenzierten HL-60 Kontrollzellen und von für 16 Stunden mit 1 μM Et_3Pb behandelten Zellen. Der erste Peak der Kontrolle repräsentiert die normalen, diploiden sogenannten G_0/G_1 -Phasenzellen. Der zweite Peak steht für die G_2/Mitose -Phase diploider und für die G_0/G_1 -Phase tetraploider Zellen. Der Bereich zwischen diesen beiden Hauptpeaks steht für die S-Phasezellen.

Bemerkenswert ist das Auftreten eines "Prä-G₁-Peaks" bei Behandlung mit Et_3Pb (Abb. 3.14) aber auch mit Me_3Pb in den Histogrammen. Das Auftreten dieses Effektes weist auf eine DNA-Zerstückelung hin und ist ein typisches Kennzeichen apoptotischer Zellen. Unter anderem aufgrund dieses Hinweises wurden Untersuchungen zur Genexpression sogenannter "early-response genes" durchgeführt (Kap. 3.5).

3.4.2 Zusätzliche Untersuchungen

3.4.2.1 VERGLEICH DER VITALITÄT UND DER ZELLZAHLEN VON KONTROLLEN UND BEHANDELTEN ZELLEN

Die Vitalität der behandelten HL-60 Zellen wurde nach Ablauf der Inkubationszeiten (6, 16, 24 und 48 Stunden) mittels Trypanblau-Test bestimmt. Die Daten sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Die für die Untersuchungen zum Proliferationsverhalten eingesetzten Organometallkonzentrationen wurden so gewählt, daß im betrachteten Zeitraum von 48 Stunden keine Abnahme der Vitalität auf weniger als 80% der Kontrolle festzustellen ist. Vitalitätsverluste sind nur in Ansätzen mit Et_3Pb und Me_3Pb und dies auch nur nach der längsten Inkubationsdauer statistisch signifikant. Die Vitalität der Zellen, die mit Me_3Sn oder Bu_2Sn behandelt wurden, liegt nach 6, 16, 24 und 48 Stunden im Bereich der Kontrollwerte. Eine Ausnahme macht Ph_3Pb . Nach 16 Stunden ist die Vitalität auf 79% der Kontrolle abgesunken. Dies ist aufgrund der großen Schwankungsbreite der Werte jedoch nicht statistisch signifikant.

Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Zellzahlen pro ml in den Ansätzen mit Et_3Pb , Me_3Pb und Me_3Sn schon nach nur 16 Stunden, also nach knapp einer Generationszeit, in statistisch signifikanter Weise von den Kontrollwerten. Dieser Effekt bleibt über die gesamte Inkubationsdauer (48 Stunden) erhalten (Tab. 3.4).

16stündige Behandlung mit Et_3Pb resultiert in der Verringerung der Zellzahl um 18%. Die Me_3Pb -Einwirkung führt dazu, daß nur 87% der Kontrollzellzahl erreicht werden. Me_3Sn reduziert das Wachstum der Zellen auf 86% der Kontrolle. Nach 24 Stunden liegen die Werte für Et_3Pb bei 85%, für Me_3Pb bei 89% und für Me_3Sn bei 92%. Einen Tag später (48 Stunden) ist die Zellzahl Et_3Pb -behandelter Proben auf 72% des Kontrollansatzes erniedrigt. Etwa 10% mehr Zellen (83% der Kontrolle) befinden sich in den mit Me_3Pb inkubierten Petrischalen. Der Wert für Me_3Sn liegt

nochmals etwa 10% höher bei 91% der Kontrolle. Me_3Sn führt also zunächst (16 Stunden) zu einer ebenso deutlichen Beeinträchtigung der Zellvermehrung wie Et_3Pb und Me_3Pb , zu späteren Zeitpunkten ist der Effekt dieser Verbindung jedoch deutlich geringer.

Ph_3Pb und Bu_2Sn haben in den hier untersuchten Konzentrationen und Inkubationszeiträumen keinen Einfluß auf die Zellzahl.

3.4.2.2 VERGLEICH DER ANZAHL DER ZELLKERNE

Nach der Inkubation der undifferenzierten HL-60 Zellen wurde mit Giemsa-Lösung angefärbt und der Prozentanteil ein- bzw. mehrkerniger Zellen ausgezählt (Tab. 3.4). Die Zahl vielkerniger Zellen wird durch die Behandlung mit den Organometallen in den hier untersuchten Inkubationszeiträumen (24 und 48 Stunden) und Konzentrationen nicht erhöht.

3.4.2.3 DIFFERENZIERUNGSGRAD DER ZELLEN

Die Einwirkung von Me_3Sn ($10 \mu\text{M}$) bewirkt zwar eine Blockierung in G_1 , jedoch keine terminale Differenzierung der HL-60 Zellen. Aktive Sauerstoffintermediate können -wie der NBT-Test zeigte- nicht vermehrt gebildet werden (Tab. 3.4). Dies gilt auch für die anderen in dieser Arbeit verwendeten Organometalle.

Tab. 3.4: Veränderungen der Zellzyklusverteilung, der Vitalität, der Zellzahl, der Anzahl der Kerne und des Differenzierungsgrades undifferenzierter HL-60 Zellen nach Behandlung mit schwermetallorganischen Verbindungen.

Behandlung	[h]	Zellzyklusverteilung [%]			Vitalität	Zellzahl	Vielkernige Zellen	Differenzierung
		G ₁	S	G ₂ /M	[% der Kontrolle]	[% der Kontrolle]	[%]	[%]
Kontrolle H ₂ O 2 ‰	6	48,0 ±0,8	35,7 ±1,5	16,3 ±1,4	100	100	n.b.	n.b.
	16	55,3 ±3,3	29,5 ±3,2	15,3 ±0,9	100	100	n.b.	n.b.
	24	49,7 ±3,7	41,2 ±3,8	9,0 ±2,9	100	100	2,2	6,7
	48	48,6 ±2,2	44,1 ±4,0	7,4 ±3,6	100	100	0,4	6,5
Et ₃ Pb ⁺ 1 µM	6	44,4 ±1,6**	37,0 ±1,9	18,4 ±2,4	100 ±2,5	103 ±15,0	n.b.	n.b.
	16	37,5 ±4,0*	37,3 ±2,4*	25,0 ±2,1*	102 ±0,5	82 ±8,5*	n.b.	n.b.
	24	41,0 ±7,7*	41,5 ±4,2	17,8 ±7,0*	95 ±9,3	85 ±7,8*	1,4	8,0
	48	38,0 ±3,7**	33,4 ±16,5*	28,6 ±17,0**	86 ±9,2	72 ±9,0*	0,6	13,7
Me ₃ Pb ⁺ 5 µM	6	45,6 ±0,8**	35,4 ±1,4	19,2 ±1,2*	101 ±1,5	103 ±15,0	n.b.	n.b.
	16	47,8 ±5,0*	30,8 ±2,9	22,0 ±3,5*	101 ±4,0	87 ±3,8*	n.b.	n.b.
	24	49,8 ±4,1	38,3 ±4,8	11,7 ±1,3*	95 ±3,4	89 ±6,7*	0,5	3,0
	48	45,5 ±1,5**	43,7 ±2,1	10,8 ±2,2*	95 ±3,1	83 ±4,6*	0,7	8,0
Me ₃ Sn ⁺ 10 µM	6	48,3 ±1,3	35,3 ±1,3	16,3 ±0,5	99 ±0,5	93 ±3,5*	n.b.	n.b.
	16	57,8 ±3,5	27,8 ±2,9	14,6 ±0,8	104 ±0,5	86 ±5,0*	n.b.	n.b.
	24	54,4 ±3,5*	41,8 ±3,5	3,8 ±1,7**	102 ±3,1	92 ±1,9**	0,8	6,7
	48	58,3 ±5,9**	36,5 ±3,3	5,9 ±4,0	100 ±2,5	91 ±5,7*	1,0	8,3
Kontrolle EtOH 5 ‰	6	49,5 ±1,1	34,3 ±2,2	16,8 ±1,9	100	100	n.b.	n.b.
	16	57,0 ±2,5	29,2 ±2,0	13,8 ±1,2	100	100		
	24	49,3 ±4,5	37,8 ±4,0	13,5 ±1,5	100	100		
	48	51,3 ±2,1	35,3 ±0,9	13,0 ±1,6	100	100		
Ph ₃ Pb ⁺ 0,5 µM	6	48,3 ±1,3	35,3 ±1,3	16,3 ±0,5	105 ±1,5	109 ±1,0**	n.b.	n.b.
	16	57,6 ±2,2	28,0 ±2,7	14,0 ±1,3	79 ±15,5	101 ±15,6	n.b.	n.b.
	24	51,5 ±2,5	36,0 ±4,0	13,0 ±1,5	98 ±8,4	99 ±7,0		4,0
	48	49,7 ±7,3	33,0 ±0,8*	17,7 ±7,5	104 ±5,2	98 ±3,7		7,0
Kontrolle DMSO 1,7 ‰	6	49,7 ±3,3	34,0 ±2,2	16,3 ±1,3	100	100	n.b.	n.b.
	16	56,7 ±3,1	29,0 ±3,6	14,7 ±0,5	100	100		
	24	52,0	36,0	12,0	100	100		
	48	50,8 ±2,8	38,0 ±5,6	11,2 ±3,3	100	100		
Bu ₂ Sn ²⁺ 0,1 µM	6	51,0 ±3,0	34,0 ±3,0	15,0 ±3,1	111 ±9,0	95 ±1,5*	n.b.	n.b.
	16	57,7 ±2,4	28,0 ±3,1	14,0 ±0,8	93 ±5,0	95 ±2,8		n.b.
	24	50,2 ±3,0	41,0 ±3,2	9,0 ±3,1	107 ±5,7	99 ±17,2		5,0
	48	51,0 ±1,6	41,7 ±2,7	7,2 ±2,9	100 ±6,0	99 ±7,3		7,3

Angegeben sind Mittelwerte ± Standardabweichung bei n ≥ 3 unabhängigen Experimenten.

n.b.: nicht bestimmt

3.5 ORGANOBLEIVERBINDUNGEN UND EXPRESSION VON PROTO-ONKOGENEN

Lichtmikroskopische Befunde und das Auftauchen eines "Prä-G₁-Peaks" in DNA-Histogrammen ließen vermuten, daß bei der Inkubation mit Organoschwermetallen apoptotische Prozesse an der letztendlich zytotoxischen Wirkung dieser Verbindungen beteiligt sein könnten. Die Blockierung von Zellen in G₀/G₁ durch Me₃Sn gab Hinweise auf die Wirkung der verwendeten Organometalle auf den Zellzyklus ohne Beteiligung der Zytoskelettstrukturen. Daher sollte die Wirkung der Organometalle auf das Genexpressionsmuster untersucht werden. Die Proto-Oncogene *c-jun* und *c-myc* werden oft in Zusammenhang mit dem Ablauf des Zellzyklus, der Proliferation und dem Zelltod gebracht. *C-jun* und *c-myc* gehören zur Familie der sogenannten "early response genes". Diese kodieren für Proteine, die ihrerseits die Expression von Genen regulieren, die für den normalen Ablauf des Zellzyklus vonnöten sind (Angel & Karin, 1991; Evan & Littlewood, 1993). Da Organometalle den Ablauf des Zellzyklus beeinträchtigen und auch apoptotische und/oder nekrotische Vorgänge auslösen können, stellte sich die Frage, ob derartige Gene in ihrer Expression durch Inkubation mit Organometallen verändert werden. Daher wurde die Expression von *c-jun* und *c-myc* nach Inkubation von P388D₁-Zellen mit Organobleiverbindungen untersucht.

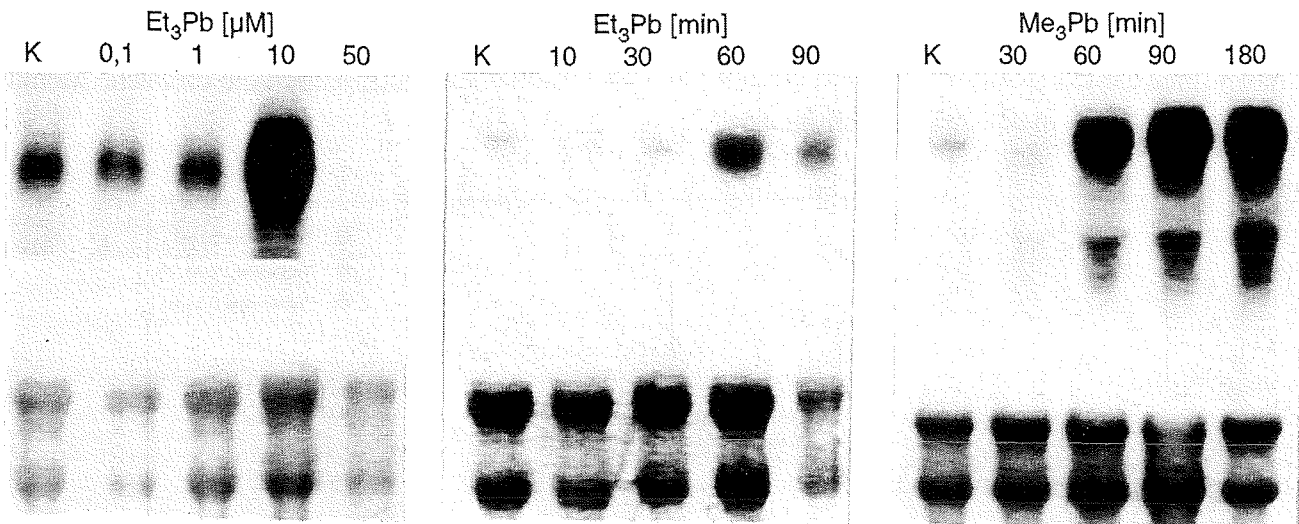
3.5.1 Einfluß von Organobleiverbindungen auf *c-jun*

In den Abbildungen 3.15a-b sind Autoradiographien, die eine konzentrationsabhängige (a) und auch eine zeitabhängige Wirkung (b) des Et₃Pb auf die *c-jun*-mRNA-Menge zeigen, dargestellt.

Et₃Pb-Konzentrationen unter 10 µM (0,1 µM, 1 µM) bewirken keine Anreicherung der *c-jun*-mRNA in P388D₁ Zellen im Inkubationszeitraum von einer Stunde. Höhere Konzentrationen führen zur Degradation der gesamten RNA (Abb. 3.15a). 60minütige Inkubation mit 10 µM Et₃Pb führt zu einer deutlichen Anreicherung der *c-jun*-mRNA (Abb. 3.15b).

Da es sich in sämtlichen Versuchsreihen zeigte, daß Me₃Pb bei einer fünffach höheren Konzentration wie Et₃Pb seine Wirkung entfaltet, wurde hier hauptsächlich der Effekt dieser Verbindung bei einer Konzentration von 50 µM untersucht (Abb. 3.15c). Höhere Konzentrationen führen ebenfalls zum Abbau der RNA (nicht gezeigt).

In den unteren Teilen der Abbildung 3.15a-c wird durch die ribosomale RNA (ethidiumbromidgefärbt) gezeigt, daß vergleichbare RNA-Mengen auf die einzelnen Spuren der Gele aufgetragen wurden. Unterschiede der *c-jun*-mRNA-Menge rühren also nicht von Unterschieden der aufgetragenen Gesamt-RNA-Menge her. Für die Darstellung der ribosomalen RNA wurden die ethidiumbromidgefärbten Agarosegele fotografiert und die Photos anschließend eingescannt. Um den Vergleich der beiden Abbildungsteile (Autoradiographie und Photo) für das Auge zu erleichtern, wurden die Hell- und Dunkelwerte der Photos umgekehrt. Daher erscheint die ethidiumbromidgefärbte RNA dunkel.



3.15a

3.15b

3.15c

Abb. 3.15: Autoradiographien von mit *c-jun* hybridisierten Membranen.

Oben: *jun*-Bande; Unten: rRNA-Banden. Die RNA von P388D₁-Zellen wurde wie in Kapitel 2 beschrieben bearbeitet.

3.15a: Konzentrationsabhängigkeit der Induktion von *c-jun* durch Et₃Pb (60 min). **3.15b:** Zeitabhängigkeit der *c-jun*-Induktion durch 10 μM Et₃Pb. **3.15c:** Zeitabhängigkeit der *c-jun*-Induktion durch 50 μM Me₃Pb.

Abbildung 3.16 zeigt die Zeitabhängigkeit der *c-jun*-mRNA-Induktion bei Behandlung von P388D₁-Zellen mit den verschiedenen Bleiverbindungen graphisch. Die von den Autoradiographien der Hybridisierungsreaktionen erstellten laserdensitometrischen Daten wurden auf eine Kontrollhybridisierung mit der RNA des Haushaltsenzym Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) bezogen. Hierdurch werden mögliche Unterschiede der aufgetragenen Gesamt-RNA-Menge ausgeglichen und nicht mit einem Effekt der Organometalle auf die Genexpression verwechselt.

10 μM Et₃Pb bewirken schon nach 30 Minuten eine leichte Erhöhung der Konzentration an *c-jun*-mRNA um das 2,5fache, nach einer Stunde ist der Gehalt dieser RNA im Mittel um den Faktor 6,6 höher als bei der unbehandelten Kontrolle. Auch nach 90 Minuten und 3 Stunden ist immer noch eine Erhöhung feststellbar (Faktor 3,9 bzw. 5,6). 50 μM Me₃Pb bewirken nach 60 Minuten eine Erhöhung des Gehaltes an *c-jun*-mRNA um den Faktor 6. Nach weiteren 30 Minuten ist die *c-jun*-mRNA-Konzentration auf das 18fache angestiegen, um im weiteren Verlauf auf die 8fache Induktion abzusinken. Beiden Substanzen ist gemeinsam, daß sie eine relativ langandauernde Induktion von *c-jun* bewirken, einem Gen, dessen mRNA ansonsten nur kurzfristig erhöht wird.

Die dritte der verwendeten Bleiverbindungen, Ph₃Pb (0,5 μM), bewirkt praktisch keine Erhöhung an *c-jun*-mRNA um mehr als den Faktor 2.

3.5.2 Einfluß von Triethylblei auf *c-myc*

Die Wirkung der Organobleiverbindung Et₃Pb auf das Proto-Oncogen *c-myc* ist in Abbildung 3.17 graphisch dargestellt. Als Kontrolle der aufgetragenen RNA-Gesamtmenge diente wiederum die Hybridisierung mit GAPDH (Kap. 3.5.1). Auch hier bewirkt die Organometallverbindung eine Akkumulation der mRNA, jedoch nicht im selben Maße wie bei *c-jun*. Bis zu einer Stunde nach

Zugabe des Toxins ist der Gehalt dieser RNA in behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen um weniger als das Doppelte erhöht. Nach 90 und 180 Minuten ließ sich jedoch die dreifache Menge an *c-myc*-mRNA in den Zellen nachweisen.

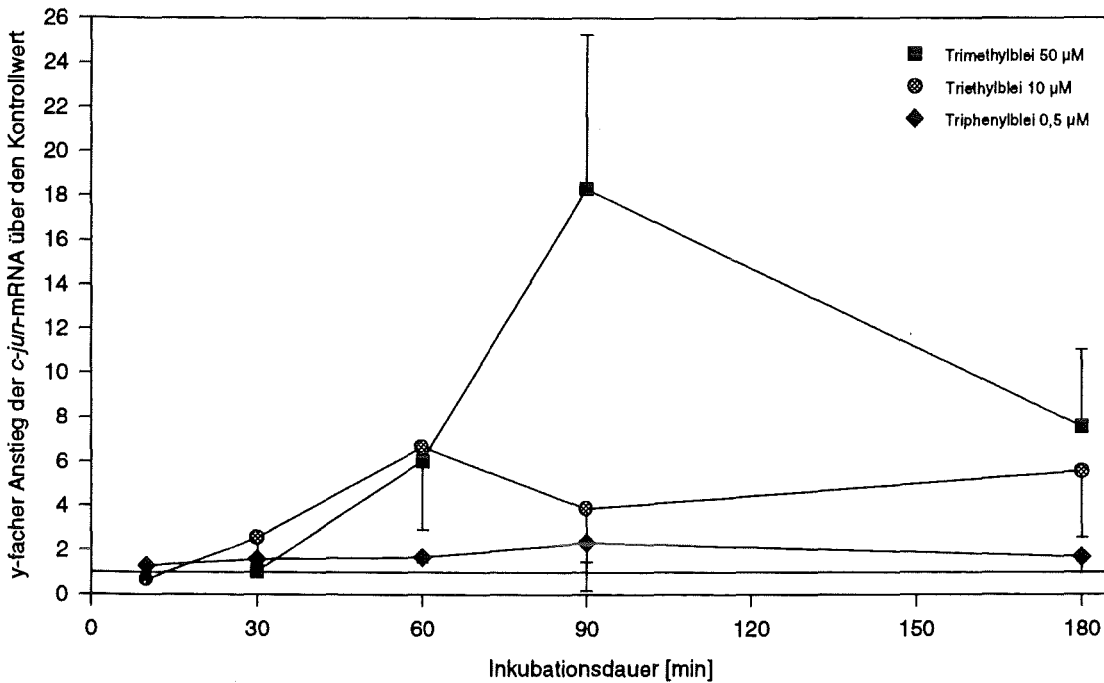


Abb. 3.16: Zeitabhängigkeit der Induktion von *c-jun*-mRNA nach Behandlung mit Organoblei.

Die RNA behandelter P388D₁-Zellen wurde wie in Kapitel 2 beschrieben aufgearbeitet und auf Nylonmembranen transferiert. Daraufhin wurden die Filter mit einer radioaktiven *c-jun*- und anschließend mit einer radioaktiven GAPDH-Sonde hybridisiert. Nach der laserdensitometrischen Auswertung der Autoradiogramme wurden die Daten anhand der Meßwerte für GAPDH normalisiert. Aufgetragen ist der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung.

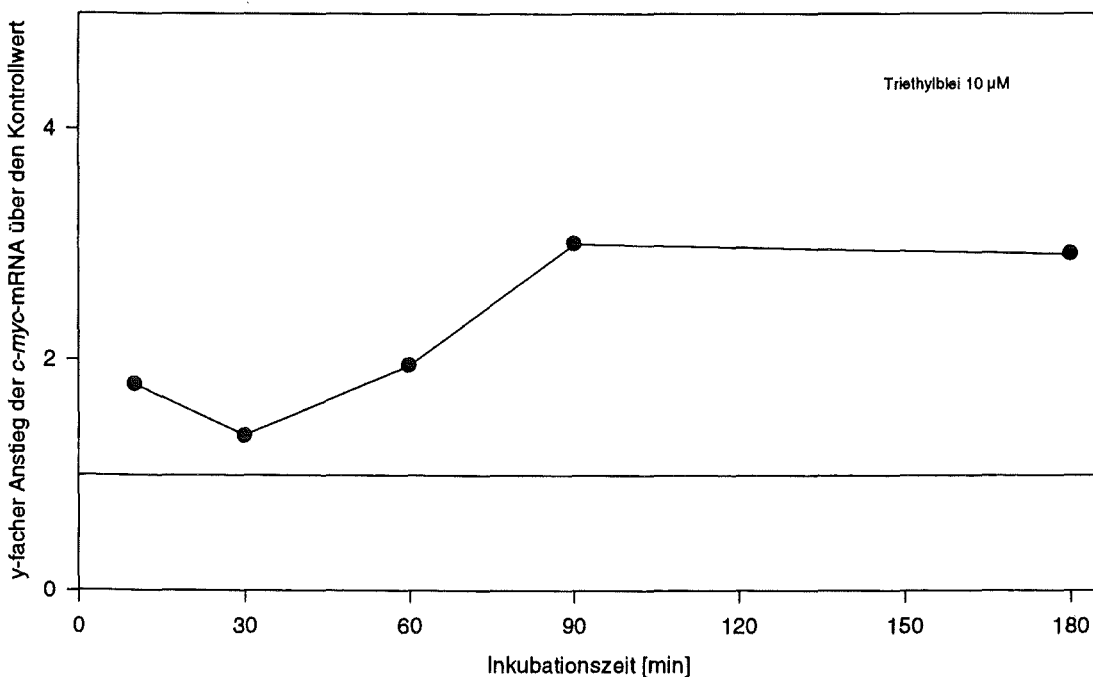


Abb. 3.17: Induktion von *c-myc* durch Et₃Pb.

Aufgetragen ist der Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten. Weiteres s. Abb. 3.16 und Text.

4. DISKUSSION

Ob ein Toxin über die Haut, oral oder inhalatorisch in den Körper aufgenommen wird, früher oder später gelangt es in die Blutbahn und trifft dort auf Blutzellen. Blut ist damit ein wichtiges Zielorgan, und die im folgenden diskutierten Ergebnisse wurden daher vorwiegend an von Blutzellen abstammenden Zelllinien gewonnen. Ein weiterer Grund für deren Verwendung ist die Immunotoxizität mancher Organometallverbindungen bei Versuchstieren und bei Zellen in Kultur (Boyer, 1989; Raffray & Cohen 1991; 1993). Dabei handelt es sich um Wirkungen auf die zelluläre Immunabwehr, die auch beim Menschen auftreten können. So fanden Bergeret *et al.* (1990) bei Neutrophilen von mit Blei exponierten Arbeitern eine signifikant verringerte Chemotaxis.

4.1 WIRKUNGEN AN DER PLASMAMEMBRAN

Trifft eine Substanz auf eine Zelle, in Kultur oder im Organismus, so ist das erste Ziel die Plasmamembran. Daher wurde in dieser Arbeit zunächst die Wirkung der Organometalle auf Komponenten der Zellmembran untersucht. Eine besondere Rolle spielt hier der "Lands-Zyklus" (Abb. 1.1). Effekte von Organometallen, die auf eine Beeinflussung dieses Zyklus zurückführbar sind, kennt man seit längerem.

Schon 1963 berichtete O'Brien von der thrombozytenaggregierenden Wirkung des Triethylzinn. Andere Arbeitsgruppen finden eine organoquecksilber-bedingte Thrombozytenaggregation (Hecker *et al.*, 1989; Macfarlane, 1981). Krug und Berndt (1987) zeigten den selben Effekt auch für Et_3Pb . Diese Aggregation beruht auf der Anreicherung von freier Arachidonsäure und der nachfolgenden Metabolisierung dieser Fettsäure zu Eicosanoiden (Krug & Berndt, 1987; Krug, 1992). Es konnte auch gezeigt werden, daß die triethylblei-induzierte Arachidonsäurefreisetzung nicht auf Thrombozyten beschränkt ist, sondern auch bei der promyeloischen Leukämiezelllinie HL-60 stattfindet (Krug & Culig, 1991). Auch andere Organobleiverbindungen und Organozinnverbindungen erzeugen diesen Effekt an DMSO-differenzierten HL-60 Zellen (Käfer, 1991; Käfer *et al.*, 1992; Zaucke, 1993). Durch die Inkubation mit DMSO können HL-60 Zellen zu neutrophilen-ähnlichen Zellen ausdifferenziert werden und als Modell für diese Blutzellen dienen.

In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, daß nicht nur alkylierte Verbindungen des Bleis, sondern auch eine Arylbleiverbindung, das Triphenylblei, zur Erhöhung der freien Arachidonsäure in DMSO-differenzierten HL-60 Zellen führt. Aufgrund der hohen akuten Zytotoxizität (Kap. 3.1.1, Abb. 3.1) dieser Substanz können für Untersuchungen zu ihrem Wirkmechanismus nur verhältnismäßig niedrige Konzentrationen eingesetzt werden. Ihr LC_{50} -Wert beträgt bei zweistündiger Inkubationszeit nur $3,35 \mu\text{M}$. Dies ist etwa um den Faktor 10 niedriger als der LC_{50} -Wert des Et_3Pb ($31,6 \mu\text{M}$, Tab. 3.1). Et_3Pb ist nach Ph_3Pb die toxischste der verwendeten Verbindungen. Wahrscheinlich ist dies der Grund für die im Vergleich zu den von uns untersuchten weiteren Organoblei- und Organozinnverbindungen recht moderate aber dennoch signifikante Erhöhung der freien Arachidonsäure durch $5 \mu\text{M}$ Ph_3Pb (Kap. 3.1.2, Tab. 3.2: 1,3% freie

Arachidonsäure nach 20 Minuten; Kontrollwert: 0,2-0,3%). Höhere Konzentrationen sind zu stark zytotoxisch (Kap. 3.1.1, Abb. 3.1) und töten die Zellen, noch bevor freie Arachidonsäure angereichert werden kann. Wie bei allen anderen Verbindungen, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, gilt auch für 5 μM Ph_3Pb die Regel, daß die Arachidonsäureanreicherung zeitlich vor dem Absterben der Zellen stattfindet.

Sowohl undifferenzierte als auch differenzierte HL-60 Zellen haben einen sehr niedrigen Spiegel an freier Arachidonsäure (Bonser *et al.*, 1981). Auf physiologische Stimuli setzen Granulozyten und mit DMSO differenzierte HL-60 Zellen Arachidonsäure aus der Plasmamembran ins Zytosol frei. Dort werden dann Lipidmediatoren wie Eicosanoide (via Cyclooxygenase und Lipoxygenase) gebildet (Kap. 1, Abb. 1.1). Die Arachidonsäurefreisetzung kann im Prinzip von verschiedenen Enzymen bewerkstelligt werden (Goerig *et al.*, 1985; Irvine, 1982). Der wahrscheinlichste und direkteste Weg ist die Aktivierung einer PLA_2 , denn dieses Enzym schneidet Fettsäuren an der *sn*-2 Position von Membranphospholipiden ab (Dennis, 1987). Die Hauptmenge an Arachidonsäure ist in Säugerzellen genau an dieser Position zu finden. Die bei dieser Reaktion gleichzeitig entstehenden Lysophospholipide können zur Bildung des Thrombozyten-aktivierenden-Faktors (PAF) herangezogen werden (Kap. 1, Abb. 1.1 und Barnes *et al.*, 1988). In den letzten 20 Jahren wurde die Bedeutung von Phospholipasen und Lipidmediatoren bei physiologischen und pathologischen Prozessen erkannt. (Einen Überblick hierzu bieten alle in diesem Absatz genannten Autoren sowie Ganong, 1991, und Scheuer, 1989.) Besonders die PLA_2 ist dabei von Interesse, da sie das Substrat zur Bildung von Entzündungsmediatoren (Eicosanoide, PAF etc.) bereitstellt. Außerdem können bei der Freisetzung der Arachidonsäure auch Inositolphosphate und Diacylglycerin entstehen. Alle diese Produkte könnten bei der organometallmedierten Toxizität eine Rolle spielen. Daher war zunächst die Frage zu beantworten, ob eine Inhibition der PLA_2 zur Verminderung der durch Organometalle ausgelösten Arachidonsäurefreisetzung führt.

Eine kurze Vorbehandlung mit Quinacrin, einer Substanz die als PLA_2 -Inhibitor gilt (Bicknell & Vallee, 1989; Testi *et al.*, 1992), führt zu einer statistisch signifikanten Verringerung der durch die Organometalle ausgelösten Arachidonsäurefreisetzung (Kap. 3.2.1, Abb. 3.2). Diese Hemmung beträgt bei den drei Organobleiverbindungen 97-100% und bei Bu_2Sn 54%. Nakashima *et al.* (1989) berichten, daß Quinacrin die PAF-induzierte Freisetzung von [^3H]-Arachidonsäure in menschlichen Neutrophilen effektiv unterdrückt, und führen dies auf die inhibitorische Wirkung des Quinacrins auf die PLA_2 zurück. Auch in Meerschweinchenneutrophilen kann die fMLP- und die A23187-Wirkung auf die Arachidonsäurefreisetzung durch Quinacrin gehemmt werden (Bokoch & Gilman, 1984). Überraschenderweise zeigen die hier diskutierten Ergebnisse der Quinacrin-Wirkung dasselbe Muster wie die durch den Calciumchelator EGTA bewirkte Inhibition der Arachidonsäurefreisetzung durch Organometalle (Kap. 3.2.2, Abb. 3.3). Das Antimalaria-Medikament Quinacrin wirkt möglicherweise eher als Calciumantagonist denn als PLA_2 -Inhibitor. Dafür spricht auch die 100%ige Hemmung der Wirkung des Calciumionophors A23187 in HL-60 Zellen (Anhang) und Meerschweinchenneutrophilen (Bokoch & Gilman, 1984). Die calciumantagonistischen Eigenschaften des Quinacrins zeigen sich auch in der Hemmung des Calciumflusses über die

Membran, wobei das Potential von Quinacrin, als Calciumantagonist zu wirken, mit dem konventioneller Calciumkanalblocker vergleichbar ist (Filippov *et al.* 1989). Stokke *et al.* (1992a u. 1992b) diskutieren, daß Quinacrin an einen oder nahe bei einem Calciumkanal bindet. Die Hemmung der PLA₂-Aktivität durch Quinacrin rührt nicht von einer direkten Inhibition des Enzyms her und könnte daher auf einer für das Enzym verminderten Calcium-Verfügbarkeit beruhen. Dies ist auch eine mögliche Erklärung für die nur etwa 50%ige Hemmung der Bu₂Sn-Wirkung durch Quinacrin (und EGTA). Aufgrund seiner im Vergleich zu den anderen verwendeten Substanzen höheren Lipophilie könnte Bu₂Sn leichter an Membranen im Zellinneren gelangen und dort, wie an der Plasmamembran, zu Permeabilitätsveränderungen führen. So könnten intrazelluläre Calciumspeicher aktiviert und damit der Effekt des Quinacrins als Calciumantagonist reduziert werden. Eine im Vergleich zu den Bleiverbindungen mehr direkte, calciumunabhängige Wirkung des Bu₂Sn auf die PLA₂ oder ein anderes Enzym, das zur Erhöhung freier Arachidonsäure beitragen kann, ist jedoch nicht auszuschließen und wird an anderer Stelle diskutiert (s.u.).

Wie oben schon angedeutet, sind Phospholipasen calciumabhängig. Calcium gilt als Hauptkandidat für die Regulation der PLA₂, und eine Calciumbindestelle auf diesem Enzym wurde beschrieben (Chang *et al.*, 1987). Auch gibt es in der Literatur viele Hinweise auf die Wirkung von schwermetallorganischen Verbindungen auf die Calciumhomöostase. Die Zugabe der Quecksilberverbindung Thimerosal beispielsweise bewirkt in menschlichen Thrombozyten (Hecker *et al.*, 1989) und in Mausmakrophagen (Kaefer *et al.*, 1988) einen Anstieg des Calciumgehaltes. Andere Alkylmetalle bewirken nach einem kurzen Peak einen linearen Anstieg von Calcium in Synaptosomen (Komulainen & Bondy, 1987). Es wird auch vermutet, daß Calcium für die Vermittlung der Neurotoxizität von Cyanid, Blei, Methylquecksilber, Chlordecone und Organozinnverbindungen verantwortlich ist (Komulainen & Bondy, 1988). Auch die in dieser Arbeit verwendeten bleiorganischen Substanzen sind im Tierversuch neurotoxisch. In Ratten bewirkt das Et₃Pb Abnormalitäten im Hippocampus und im dorsalen Wurzelganglion, Me₃Pb verändert dagegen hauptsächlich Strukturen des Hirnstammes und des Rückenmarks (Walsh *et al.*, 1986). Bei Intoxikation mit Me₃Sn wurden nekrotische Vorgänge im Zentralnervensystem beobachtet (Boyer, 1989; Reuhl *et al.*, 1985; Snoeij *et al.*, 1987). Untersuchungen in unserem Labor zeigten, daß die hier verwendeten Organoblei- und Organozinnverbindungen in differenzierten HL-60 Zellen und auch anderen Kulturzelllinien zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führen (Krug *et al.*, 1993; Ade & Krug, unveröffentlicht). Aus diesen Gründen sollte untersucht werden, ob extrazelluläres Calcium für den Effekt der Organometallverbindungen auf den Spiegel freier Arachidonsäure in differenzierten HL-60 Zellen notwendig ist. Der Calciumchelator EGTA bewirkt wie Quinacrin (s.o.) eine vollständige Hemmung (96-100%) der organoblei-induzierten Arachidonsäurefreisetzung in differenzierten HL-60 Zellen (Kap. 3.2.2, Abb. 3.3). Dies zeigt deutlich, daß für die Wirkung von Organoblei auf den Arachidonsäurestoffwechsel extrazelluläres Calcium vorhanden sein muß und der organometallinduzierte Calciuminflux in die Zelle an der Arachidonsäurefreisetzung beteiligt ist. Auch der Effekt von A23187 wird durch EGTA inhibiert (Anhang). Beispielsweise muß extrazelluläres Calcium für die fMLP- und die A23187-

induzierte Arachidonsäurefreisetzung in Meerschweinchenneutrophilen vorhanden sein (Okajima & Ui, 1984). Diese Befunde stehen im Gegensatz zu Erkenntnissen über die PAF-induzierte Arachidonsäurefreisetzung menschlicher Neutrophiler (Nakashima *et al.*, 1989). Bei dieser rezeptorvermittelten Reaktion kann die Arachidonsäurefreisetzung trotz Chelatieren des extrazellulären Calciums durch EGTA noch zur Hälfte induziert werden. Analog dazu konnte der Effekt von Bu_2Sn durch Gabe von EGTA (und Quinacrin, s.o.) auch nur zur Hälfte inhibiert werden. Möglicherweise kann Bu_2Sn wie PAF intrazelluläre Calciumspeicher aktivieren und dadurch zur Erhöhung der PLA_2 -Aktivität beitragen. Der PAF-medierte Anstieg freier Arachidonsäure konnte durch intrazelluläre Calciumantagonisten vollständig inhibiert werden (Nakashima *et al.*, 1989). Aber auch andere Gründe für diesen Effekt des Bu_2Sn sind denkbar, wie an anderer Stelle ausführlich diskutiert (s.u.). Das Chelatieren des extrazellulären Calciums mit EGTA bewirkt auch keine vollständige Hemmung der intrazellulären Calciumerhöhung durch die quecksilberorganische Verbindung Thimerosal (Hecker *et al.*, 1989). Gerade bei quecksilberorganischen Substanzen wird eine inhibitorische Wirkung auf das Enzym Lysophospholipid-Acyl-Transferase für die Erhöhung freier Arachidonsäure verantwortlich gemacht (Hornberger & Patscheke, 1990; Hunter *et al.*, 1984). Diese Daten zeigen deutlich, daß Calcium für die Aktivität der PLA_2 eine wichtige Rolle spielt. Die Calciummobilisierung alleine reicht jedoch zur Aktivierung dieses Enzyms höchstwahrscheinlich nicht aus, wie Studien an menschlichen Neutrophilen und HL-60 Zellen zeigen (Cockcroft & Stutchfield, 1989). Die Calciumabhängigkeit eines Enzyms bedeutet nicht unbedingt eine Regulation der Enzymaktivität über den Calciumspiegel. Auch kennt man calciumunabhängige intrazelluläre PLA_2 in Säugerzellen (Lehmann *et al.*, 1993; Strosznajder & Samochocki, 1991). Der Anstieg des intrazellulären Calciumspiegels während physiologischer Aktivierung von Phospholipasen ist weitaus niedriger als die Calciumkonzentration, die für diese Enzyme *in vitro* als notwendig ermittelt wurde (Burgoyne *et al.*, 1987). So fanden Rehfeldt *et al.* (1993) in einer menschlichen Monozytenzelllinie eine PLA_2 , die schon bei 300 nM Calcium aktiv ist und deren Calciumabhängigkeit durch Veränderungen am Enzym modifiziert werden kann. Calciumströme an der Membran könnten stellenweise sehr hohe Calciumkonzentrationen erzeugen und dadurch benachbarte membranständige Enzyme wie Phospholipasen aktivieren, ohne meßbare bzw. starke Veränderungen der zytosolischen Calciumkonzentration.

Die Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration könnten Organometalle direkt durch Interkalieren in die Membran und die dadurch erzeugte Permeabilitätsveränderung bewirken. Elektronendichte Aggregate von Organozinn in Membranen wurden von Gray *et al.* (1987) beschrieben. Aber auch Wirkungen der Verbindungen an Calciumkanälen und -pumpen sind denkbar. Fernández & Balsinde (1991) berichten, daß Verapamil, das als Calciumantagonist verwendet wird, die Arachidonsäurefreisetzung in Makrophagen blockiert. Die Autoren halten einen Einfluß spannungsgesteuerter Calciumkanäle bei der Regulation der PLA_2 für möglich. Daher wurde untersucht, ob die organometallbedingte Arachidonsäurefreisetzung in differenzierten HL-60 Zellen durch Verapamil beeinflusst wird.

Die kurzzeitige Vorbehandlung mit Verapamil verringert den organoblei- und organozinninduzierten Effekt auf die Menge freier Arachidonsäure in HL-60 Zellen zwar signifikant, führt aber nicht zu dessen vollständiger Inhibition (Kap. 3.2.3, Abb. 3.4: 60-70%ige Reduktion im Falle der Organobleiverbindungen, 43% Reduktion bei Bu_2Sn). Der bei allen Substanzen verbleibende Anstieg an freier Arachidonsäure rührt von einem verbleibenden Einstrom von Calcium über die Plasmamembran her. Ade & Krug (unveröffentlichte Daten) konnten zeigen, daß Verapamil den organometallinduzierten Calciumeinstrom in HL-60 Zellen nicht verhindern kann. Ein möglicher Grund hierfür ist, daß HL-60 Zellen keine spannungsabhängigen Calciumkanäle zu besitzen scheinen, sondern eher unspezifische Kationenkanäle aufweisen (Krautwurst *et al.*, 1992). Wie schon Quinacrin und EGTA kann auch Verapamil die organozinninduzierte Erhöhung freier Arachidonsäure nicht im selben Maße hemmen wie die organobleimedierte Arachidonsäurefreisetzung. Hierfür sind zusätzliche Fähigkeiten des Bu_2Sn , eine Erhöhung der freien Arachidonsäure zu bewirken, verantwortlich. Die verschiedenen Möglichkeiten des Bu_2Sn für einen zusätzlichen Effekt auf den Arachidonsäurehaushalt werden an anderer Stelle diskutiert (s.u.). In ihrem Übersichtsartikel berichten Chang *et al.* (1987) über die Möglichkeit der PLA_2 -Inhibition durch Verapamil. Dies wird eher der Bildung unspezifischer Verapamil-Phospholipid-Komplexe zugeschrieben, als der Blockade von Calciumkanälen. Die Reduktion der Wirkung des Ionophors A23187 durch Verapamil um 76% unterstützt diese Theorie (Anhang).

Während die Gabe von Quinacrin, EGTA und Verapamil zu einer signifikant verringerten Arachidonsäureanreicherung durch die Organometalle führt, bewirkt die Vorbehandlung der differenzierten HL-60 Zellen mit Amilorid eine systemische Verstärkung des Effektes (Kap. 3.2.4, Abb. 3.5). Amilorid hemmt neben Na^+/H^+ -Pumpen auch $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen der Plasmamembran (Carafoli, 1987). Durch den verminderten Abtransport des Calciums aus dem Zytosol erhöht sich der organometallinduzierte Anstieg des intrazellulären Calciums. Dies bewirkt eine Verstärkung der Arachidonsäurefreisetzung. So könnte auch die Steigerung des Effektes von A23187 erklärt werden (Anhang). Andere Gruppen beschreiben dagegen eine Hemmung der A23187-induzierten Arachidonsäurefreisetzung in Mastzellen (Linnebjerg *et al.*, 1989).

Innerhalb der Arachidonsäurefreisetzungskaskade gibt es viele mögliche Angriffspunkte für die Organometallverbindungen. Von verschiedenen membranassoziierten Signaltransduktionswegen einschließlich Phospholipasen und Ionenkanälen ist die Beteiligung von G-Proteinen bei der Regulation der Signalübertragung bekannt (Übersicht: Birnbaumer, 1990). Die verschiedenen Phospholipase-C-Isoenzyme sind eindeutig G-Protein-abhängig (Cockcroft *et al.*, 1991), und für die PLA_2 häufen sich die Hinweise auf eine solche Regulation (Axelrod *et al.*, 1988; Burch, 1989). Auch sind viele Calciumkanäle G-Protein-reguliert (Holz *et al.*, 1986; Kleuss *et al.*, 1991; Lewis *et al.*, 1986). So ist es durchaus denkbar, daß Störungen der Signaltransduktion durch Toxine G-Protein-vermittelt oder zumindest teilweise G-Protein-abhängig sind. Ein Beispiel ist das bakterielle Pertussis Toxin (PT), das hochspezifisch G-Proteine enzymatisch inaktiviert und daher häufig dazu verwendet wird, die Beteiligung von G-Proteinen an Signaltransduktionsmechanismen zu untersuchen. Nakashima *et al.* (1989) konnten zeigen, daß die PAF-induzierte Arachidonsäurefreisetzung in

menschlichen Neutrophilen durch PT vollständig inhibiert wird. Die Autoren vermuten ein PT-sensitives G-Protein als regulatives Element bei der PLA₂-Aktivierung. Der ebenfalls durch PAF induzierte Calciumeinstrom bleibt in diesem System von PT unbeeinflusst. Auch an Thrombozyten (Kajiyama *et al.*, 1989), Meerschweinchenneutrophilen (Bokoch & Gilman, 1984; Okajima & Ui, 1984; Ohta *et al.*, 1985), FRTL5-Zellen (Burch *et al.*, 1986; Di Girolamo *et al.*, 1991) sowie an menschlichen Neutrophilen und HL-60 Zellen (Cockcroft & Stutchfield, 1989) wurde eine PT-sensitive Arachidonsäurefreisetzung beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde die Beeinflussung des organometallinduzierten Effekts auf den Arachidonsäurestoffwechsel durch PT untersucht. Bei einer vollständigen Inhibition der Organoschwermetallwirkung durch PT wäre der PLA₂-aktivierende Effekt dieser Substanzen auf einer Ebene vor dem membranständigen Enzym anzusiedeln. Denkbar wäre ein Einfluß auf Rezeptorebene oder auf G-Proteinebene bzw. eine Verhinderung der gegenseitigen Kontrolle dieser zu einer Kaskade gehörenden Komponenten. Die Vorbehandlung differenzierter HL-60 Zellen mit PT führt jedoch nur zu einer teilweisen Hemmung des Organometalleffektes um 30-40% (Kap. 3.2.5, Abb. 3.6). Diese Hemmwirkung ist wohl auf eine sekundäre PT-sensitive Arachidonsäurefreisetzung zurückzuführen. Durch eine "Primärwirkung" der Organometalle wird Arachidonsäure freigesetzt (60-70%, PT-insensitiv). Ihre Metabolisierung und Abgabe in den Extrazellularraum aktiviert entsprechende Rezeptoren an der Zellmembran, die ihrerseits G-Protein-gekoppelt weitere Phospholipasen aktivieren und damit zu verstärkter sekundärer Arachidonsäurefreisetzung führen. Diese "Sekundärreaktion" ist PT-sensitiv und wird bei Anwesenheit des PT verhindert (Abb. 4.1). Dasselbe gilt auch bei A23187. Die Wirkung des chemotaktischen Peptids fMLP ist dagegen zu 80% hemmbar, da diese Substanz direkt an einen Rezeptor bindet, welcher G-Protein-gekoppelt Phospholipasen aktiviert. Ähnliche Wirkungen von PT auf die fMLP- und A23187-induzierte Arachidonsäurefreisetzung wie die hier vorliegenden sind an Meerschweinchenneutrophilen beschrieben (Bokoch & Gilman, 1984; Ohta *et al.*, 1985).

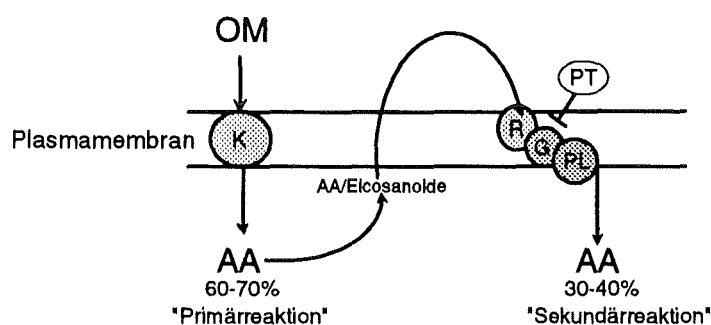


Abb. 4.1: PT inhibiert die "Sekundärreaktion" der Organometalle.

Organometalle (OM) wirken auf eine (mehrere) Komponente(n) der Plasmamembran (K), wodurch sich freie Arachidonsäure (AA) anreichert. Diese und ihre Metabolite bewirken über Rezeptoren (R) eine G-Protein-abhängige (G) Aktivierung von Phospholipasen (PL) und so eine sekundäre AA-Anreicherung. Diese Sekundärreaktion wird durch Pertussis Toxin (PT) verhindert.

PT besteht aus zwei funktionellen Untereinheiten und interkaliert in die Plasmamembran. Dort inaktiviert es G-Proteine durch eine sogenannte ADP-Ribosylierung. Um auszuschließen, daß die bloße Interkalation des Proteins für den inhibitorischen Effekt des PT ausreicht, wurde parallel der

alleinige Effekt der interkalierenden Untereinheit, des B-Oligomers, untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die Hemmwirkung des B-Oligomers geringer ist als die des Gesamttoxins. Die dennoch verbliebene Wirkung kann wohl auf eine mögliche Verunreinigung des B-Oligomers mit PT zurückgeführt werden (Kap. 3.2.5, Abb. 3.6).

Da im Gegensatz zu Quinacrin und EGTA Verapamil und PT in keinem Fall zu einer völligen Inhibition des Organometalleffektes auf den Spiegel freier Arachidonsäure führen, sollte die mögliche synergistische Wirkung von Verapamil und PT untersucht werden. Dabei zeigt sich wiederum ein deutlicher Unterschied zwischen der Wirkung von Organobleiverbindungen und dem Bu_2Sn (Kap. 3.2.6, Abb. 3.7). Bei allen Organobleiverbindungen ist die Summe der Einzelwirkungen höher als die Wirkung von Verapamil und PT gemeinsam. Hier überschneiden sich somit die inhibitorischen Wirkungen. Verapamil hemmt sowohl Teile der "Primärreaktion" als auch Teile der "Sekundärreaktion", indem es mit Phospholipiden unspezifische Komplexe bildet. PT hemmt die sekundäre Arachidonsäurefreisetzung (Abb. 4.1). Gibt man beide Substanzen zusammen, ist von Verapamil nur die Hemmung der Primärreaktion sichtbar. Der gemeinsame Effekt kann also unter diesen Vorgaben niemals mehr als additiv sein, und es ist kein Wunder, wenn er geringer als additiv ist. Beim Bu_2Sn dagegen ist ein mehr als additiver Effekt von PT und Verapamil zu verzeichnen. Dies ist ein weiterer Hinweis auf die schon vielfach angedeuteten zusätzlichen Wirkungen des Bu_2Sn auf den Gehalt freier Arachidonsäure. Die synergistischen Effekte von PT und Verapamil lassen sich noch nicht erklären. Die unvollständige Hemmung der Bu_2Sn -Wirkung durch Quinacrin und EGTA läßt auf eine Aktivierung zusätzlicher Calciumspeicher durch Bu_2Sn schließen. Es könnte aber auch eine zusätzliche calciumunabhängige "primäre" Arachidonsäurefreisetzung aktiviert werden. Ein weiterer Grund für Unterschiede der Bu_2Sn -Wirkung im Vergleich zu den Organobleiverbindungen wäre beispielsweise eine zusätzliche Inhibition der Lysophospholipid-Acyl-Transferase. Dieses Enzym ist für den Einbau von Fettsäuren in Lysophospholipide verantwortlich. Die Inhibition der Lysophospholipid-Acyl-Transferase spielt die Hauptrolle bei der durch quecksilberorganische Verbindungen ausgelösten Arachidonsäureanreicherung (Hornberger & Patscheke, 1990; Hunter *et al.*, 1984). Dieser Effekt könnte auch bei der dialkylierten Organozinnverbindung eine größere Rolle spielen als bei den Bleiverbindungen. Die Aufnahme exogen dargebotener Arachidonsäure wird zwar auch durch Et_3Pb inhibiert, was höchstwahrscheinlich auf der Hemmung von Lysophospholipid-Acyl-Transferasen beruht (Krug, 1992). Jedoch spielt bei Et_3Pb und anderen zinn- und bleiorganischen Substanzen die Aktivierung der Deacylierung der Arachidonsäure aus Membranphospholipiden eine größere Rolle als die Inhibition der Reacylierung (Krug, 1992). Der Grund für diese Unterschiede liegt einmal am unterschiedlichen Zentralatom der Verbindungen. Zusätzlich, und dies wird der ausschlaggebende Punkt sein, handelt es sich bei den Bleiverbindungen um trialkylierte bzw. -arylierte Substanzen, während Bu_2Sn nur zwei Alkylreste trägt. Über die Zusammenhänge zwischen Toxizität und Molekülstruktur von Organometallen wird ausführlich bei Zaucke (1993) berichtet.

Die untersuchten Effekte der Organometalle auf die Plasmamembran lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Die Hemmung der PLA₂ führt zur Reduktion des Organometalleffektes.

Der Organometalleffekt auf den Arachidonsäurestoffwechsel ist calciumabhängig. Dabei gibt es deutliche Unterschiede zwischen den Organobleiverbindungen und Bu₂Sn. Dies muß auf zusätzliche Wirkungen des Bu₂Sn auf andere, die Konzentration der freien Arachidonsäure ebenfalls beeinflussenden Enzyme zurückzuführen sein.

Die organometallinduzierte Arachidonsäurefreisetzung ist zumindest teilweise G-Protein-abhängig, wie Versuche mit PT zeigen. Dabei scheint vor allem eine "Sekundärreaktion" durch PT verhindert zu werden, während der primäre Effekt der Organometalle unbeeinflusst bleibt (Abb. 4.1).

Durch die Beeinflussung des Lipidstoffwechsels können organische Schwermetallverbindungen zur vermehrten Bildung von Entzündungsmediatoren beitragen und dadurch möglicherweise an pathologischen Reaktionen des Immunsystems beteiligt sein.

Neben diesen Erkenntnissen zur Wirkung von Organoschwermetallen auf den Arachidonsäurehaushalt konnten zusätzlich Hinweise auf den Wirkmechanismus verschiedener Pharmaka gewonnen werden. Die vorliegenden Daten verstärken den Eindruck, daß die Inhibition der PLA₂ durch Quinacrin auf calciumantagonistischen Eigenschaften dieser Substanz beruht. Die Tatsache, daß Verapamil zur Hemmung der organometallinduzierten Arachidonsäurefreisetzung führt, und dies bei HL-60 Zellen nicht auf einen verminderten Calciumeinstrom über die Membran zurückzuführen ist, unterstützt Hinweise auf die Bildung unspezifischer Verapamil-Phospholipid-Komplexe. Diese Komplexe könnten für die Hemmung der PLA₂ durch Verapamil verantwortlich sein.

4.2 WIRKUNGEN AUF ZYTOSKELETTSTRUKTUREN UND DEN ZELLZYKLUS

Bei den Untersuchungen zur Wirkung der Organoschwermetalle auf die Plasmamembran wurden die behandelten und die unbehandelten Zellen auch licht- und elektronenmikroskopisch beobachtet. Dabei fiel stets auf, daß die unregelmäßig geformten differenzierten HL-60 Zellen bei Behandlung eine Formveränderung erfahren (Käfer *et al.*, 1992). Dieser Effekt war auch für die Wirkung verschiedener Organozinnverbindungen an Erythrozyten bekannt (Gray *et al.*, 1987), und Macfarlane (1981) beobachtete eine methylquecksilberinduzierte Formveränderung an Thrombozyten. Auch bei den noch undifferenzierten runden HL-60 Zellen konnten Veränderungen beobachtet werden. Undifferenzierte HL-60 Zellen besitzen auf ihrer Oberfläche viele Mikrovilli, die sie durch die Behandlung mit schwermetallorganischen Verbindungen verlieren (Käfer *et al.*, 1992). Mikrovilli enthalten eine Seele aus Aktin, einem wichtigen Zytoskelettbaustein (Alberts *et al.*, 1986a). Drastische Formveränderungen an Zellen und der Verlust von Mikrovilli lassen sich nicht alleine durch eine Änderung der Membranzusammensetzung, z.B. durch Arachidonsäurefreisetzung, erklären. Es muß zumindest parallel dazu auch zu einer Veränderung der Zytoskelettorganisation kommen. Das Zytoskelett hat eine wichtige Aufgabe bei der Formgebung der Zellen, aber auch bei

der Migration und der Zellteilung. In jüngster Zeit wird verstärkt die Beteiligung von Zytoskelettelementen an der Signaltransduktion diskutiert. Hierbei sollen auch G-Proteine eine Rolle spielen (Wang & Rasenick, 1991). Die im folgenden diskutierte Wirkung der Organometalle auf die Zytoskelettorganisation ist ein Beispiel für Effekte dieser Substanzen im Inneren der Zelle. Dabei könnten diese Effekte direkt durch die Toxine oder aber indirekt über Wirkungen an der Plasmamembran ausgelöst werden.

5-10% des Gesamtproteingehaltes einer Zelle bestehen aus Aktin, welches in Form von F-Aktin die Mikrofilamente bildet. In der vorliegenden Arbeit wurde beispielhaft an Et_3Pb (Beispiel für ein Organoblei) und Bu_2Sn (Beispiel für ein Organozinn) untersucht, ob Organometalle Aktinfilamente zerstören. Der Verlust der Mikrovilli undifferenzierter HL-60 Zellen wurde hierfür als Indiz gewertet. Da Blutzellen aber im allgemeinen ein nur schwach ausgeprägtes Aktinskelett aufweisen, wurden für diese Versuche NRK-Zellen verwendet. Et_3Pb und auch Bu_2Sn führen zur Depolymerisation von F-Aktin (Kap. 3.3, Abb. 3.8A-D). Besondere Beachtung verdient dabei die Tatsache, daß hohe Konzentrationen dieser Substanzen relativ rasch einen Effekt zeigen (100 μM Et_3Pb u. 500 μM Bu_2Sn , 60 min Inkubation), der jedoch auch mit niedrigeren Konzentrationen bei längerer Inkubationszeit (1 μM Et_3Pb , 18 Stunden) zu erreichen ist. Auch andere in dieser Arbeit verwendete Organometallverbindungen schädigen das Aktingerüst von NRK-Zellen. So führt auch eine 18stündige Behandlung mit 5 μM Me_3Pb zu einer deutlichen, mit der Et_3Pb -induzierten vergleichbaren, Schädigung des Aktinnetzwerkes (Krug, unveröffentlichte Daten).

Neben dieser Wirkung auf Aktin ist aus der Literatur der Effekt des Triethylbleis und auch anderer Organometalle auf Mikrotubuli (Bondy & Hall, 1986; Fostinis *et al.*, 1992; Zimmermann *et al.*, 1985; 1988), Intermediärfilamente (Zimmermann *et al.*, 1986) und auch auf Neurofilamente (Zimmermann *et al.*, 1987) gut bekannt. Gerade die Wirkung auf Zytoskelettcomponenten könnte in Zusammenhang mit der bei Organometallen so häufig beobachteten Neurotoxizität stehen (s.o. und Einleitung). Das Zytoskelett von Nervenzellen besteht hauptsächlich aus Mikrotubuli, Neurofilamenten und Aktin. Es hält die Form des Neurons aufrecht, was bei dieser Zellart besonders wichtig ist (Axone, Dendriten), und sorgt für den axonalen Transport. Beim sich entwickelnden Neuron und damit beim sich entwickelnden Nervensystem ist das Zytoskelett für die Bewegungen des Wachstumskegels wesentlich. Hier spielt Aktin eine wichtige Rolle. Es füllt die sogenannten Mikrodornen aus, die sich vom Wachstumskegel fingerförmig ausbreiten. Ohne Aktin kann sich der Neurit also nicht vorwärtsbewegen. Neurone, die, aus welchen Gründen auch immer, keine Verbindung mit anderen eingehen, sterben ab. Die Bedeutung des Zytoskeletts für das Nervensystem ist ausführlich bei Alberts *et al.* (1986b) beschrieben.

Marinovich *et al.* (1990) beobachteten eine Verringerung des F-Aktin-Anteils nach Behandlung mit Tributyl- und Triphenylzinn. Im Gegensatz dazu schädigt das in dieser Arbeit verwendete Me_3Sn Aktinfilamente (Krug, unveröffentlichte Daten) in viel schwächer ausgeprägter Form. Dies gilt auch für die Wirkung des Me_3Sn auf Mikrotubuli (Bondy & Hall, 1986), was für den noch zu diskutierenden Effekt dieser Substanz auf den Zellzyklus (s.u.) von Bedeutung ist.

Die Wirkungen von Organometallen auf Bestandteile des Zytoskeletts könnten einerseits durch die beobachtete Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (Krug *et al.*, 1993; Ade & Krug, unveröffentlicht) ausgelöst werden, denn die Aktin- und die Tubulinpolymerisationen sind stark calciumabhängig und werden auch über die Calciumkonzentration reguliert. Andererseits könnten Organoschwermetalle, wenn sie ins Zytosol gelangen, direkt mit den Bestandteilen des Zytoskeletts interagieren und dadurch dessen Organisation stören. Dabei kommt besonders eine Wechselwirkung mit SH-Gruppen der Proteine in Betracht, wie es Zimmermann *et al.* (1985) im Falle der Wirkung des Et_3Pb auf die Mikrotubuli vermuten. Wie dieselben Autoren zeigten, sind jedoch, zumindest *in vitro*, die Polymerisation und die Depolymerisation des Aktins von Et_3Pb unbeeinflusst. Dieser Befund spricht dafür, daß bei dem in dieser Arbeit verwendeten zellulären System die Deorganisation des Aktinnetzwerkes durch Et_3Pb und Bu_2Sn calciumvermittelt ist.

Da sowohl Mikrotubuli als auch Aktinfilamente für eine ordnungsgemäße Zellteilung vonnöten sind, wurde der Einfluß der Organoblei- und Organozinnverbindungen auf die Zellzyklusverteilung undifferenzierter HL-60 Zellen untersucht (Kap. 3.4). Die hierbei verwendeten Toxinkonzentrationen haben nur geringen Einfluß auf die Vitalität der Zellen (Tab. 3.4).

1 μM Et_3Pb und 5 μM Me_3Pb haben schon nach nur sechsständiger Inkubation signifikante Wirkungen auf den Zyklus (Abb. 3.9-10, Tab. 3.4). Die dritte untersuchte Organobleiverbindung Ph_3Pb zeigt bei einer Konzentration von 0,5 μM erst nach 48 Stunden Inkubationsdauer einen leichten Effekt. Bei allen drei Organobleiverbindungen laufen die Zellen in G_2/Mitose auf. Me_3Sn , welches viel moderatere Auswirkungen auf das Zytoskelett hat (s.o.), bewirkt diesen Effekt nicht (Abb. 3.12, Tab. 3.4). Dieser läßt sich daher mit der Störung der Mitosespindel (bestehend aus Mikrotubuli) erklären. In zweiter Linie könnte eine Beeinträchtigung des kontraktilen Ringes (bestehend aus Aktin) durch die Bleiverbindungen eine Rolle spielen. Nach der Kernteilung können sich die Zellen dann nicht in der Mitte durchschnüren. Ein Anstieg an Zellen, die erfolgreich den Kern teilten, aber noch keine Cytokinese durchlaufen haben, läßt sich bei keiner der daraufhin untersuchten Substanzen feststellen (Tab. 3.4). Andere Autoren (Zimmermann *et al.*, 1985) finden jedoch vermehrt zweikernige Zellen nach Behandlung mit 1 μM Et_3Pb (48 Stunden, EAT-Zellen). Dieser Befund zeigt, daß auch die Störung des Aktins Einfluß auf den Ablauf des Zellzyklus haben könnte, indem die Cytokinese gehemmt wird.

Gerade im Falle von Et_3Pb und Me_3Pb treten in den DNA-Histogrammen sehr häufig Debris-Peaks auf (Abb. 3.14). Diese werden schon nach 16ständiger Inkubation festgestellt, also zu Zeiten, bei welchen noch kein Vitalitätsverlust auftritt. Solche Prä- G_1 -Peaks sind Anzeichen für eine DNA-Zerstückelung. Auch dies könnte neben der gestörten Ausbildung der Mitosespindel und des kontraktilen Rings mit ein Grund für den beobachteten G_2/Mitose -Block sein, denn Eukaryonten prüfen vor Eintritt in die Mitose die Unversehrtheit ihres Genoms. Im Falle nötiger Reparaturen kann die Dauer von G_2 erhöht werden (Hartwell & Weinert, 1989).

Da bei der vorliegenden durchflußzytometrischen Methode die Zellen nach ihrem DNA-Gehalt den Zyklusphasen zugeordnet werden, ist es nicht möglich, zwischen Zellen in G_2 und Zellen in der

Mitose zu unterscheiden. Ebenso kann keine Unterscheidung zwischen Zellen in G_0 und Zellen in G_1 getroffen werden. Die Wirkung von Me_3Sn auf die Zellzyklusverteilung undifferenzierter HL-60 Zellen (Abb. 3.11, Tab. 3.4: hier kam es zu einem Anstieg an Zellen in der G_1/G_0 -Phase) könnte daher einerseits auf einen differenzierenden Effekt der Verbindung zurückzuführen sein, andererseits könnte Me_3Sn den Übertritt in die Synthese-Phase des Zyklus verhindern. Für eine Ausdifferenzierung der Zellen unter der Wirkung von Me_3Sn liegen jedoch keinerlei Indizien vor. Die Differenzierung von HL-60 Zellen ist assoziiert mit der Ausbildung immunologischer Funktionen, die für reife myeloide Zellen charakteristisch sind (Collins *et al.*, 1978; 1979; Harris & Ralph, 1985). Dazu gehören z.B. die Chemotaxis, die Phagozytose und auch die Fähigkeit, aktive Sauerstoffintermediate zu bilden. Der in unserem Labor routinemäßig durchgeführte Differenzierungstest beruht auf der Fähigkeit differenzierter HL-60 Zellen, Nitroblautetrazolium zu reduzieren, und sprach bei Me_3Sn -behandelten Zellen nicht an. Dieser funktionelle Test wird in den meisten Studien zur Bestimmung des Differenzierungsgrades von HL-60 Zellen verwendet (z.B. Sandler *et al.*, 1993).

Im Vergleich zu den Myriaden an Haushaltsprozessen einer Zelle gibt es nur wenige bekannte Kontrollvorgänge, die die Proliferation und damit den Zellzyklus betreffen. Modulationen von Haushaltsfunktionen bewirken keine Veränderungen im Zellzyklusgeschehen. Ist jedoch eine Haushaltsfunktion schwer beeinträchtigt, wird natürlich auch die Zellproliferation gestoppt. Hierbei handelt es sich jedoch nicht um physiologische Kontrollmechanismen. Beim Einwirken von Toxinen auf Zellen kann man mit schwerwiegenden Beeinträchtigungen bestimmter Funktionen rechnen. Es ist bekannt, daß trialkylierte Blei- und Zinnverbindungen die ATP-Synthesefunktion der Mitochondrien hemmen können und damit zu einer Verarmung der Zellen an Energie führen (Aldridge *et al.*, 1977). Eine solche Wirkung könnte für den Effekt des Me_3Sn auf die G_1 -Phase des Zellzyklus verantwortlich sein. Die Feststellung, daß sich vermehrt Zellen in G_1 befinden, bedeutet nicht automatisch, daß hier ein G_1 -Block vorliegt. Genauso gut könnte es sich um eine drastische Verlängerung der G_1 -Dauer handeln. Die G_1 -Phase besteht im Prinzip aus zwei Teilen (Murray *et al.*, 1991). Erstens wird in G_1 genügend Masse für eine Zellteilung angehäuft, zweitens laufen G_1 -spezifische Ereignisse ab. Der vollständige Abschluß beider Teile ist für die folgende S-Phase Voraussetzung. Die G_1 -Dauer wird daher vom zeitraubenderen der beiden Teile bestimmt (Murray *et al.*, 1991). Da sie an Masse zunehmen müssen, reagieren Zellen gerade in G_1 recht empfindlich auf das Nahrungsangebot, sprich auf die Verfügbarkeit von Energie. Bei der Inkubation von Rattenthymozyten mit Trialkylzinn wurde ein deutlicher Anstieg des Glucoseverbrauchs und eine deutliche Anhäufung von Lactat festgestellt (Snoeij *et al.*, 1987). Wiebkin *et al.* (1982) fanden bei der Behandlung von Rattenhepatozyten mit Tri- und Diethylzinn eine reduzierte O_2 -Aufnahme und eine Abnahme des ATP-Gehaltes. Die Dauer der G_1 -Phase ist abhängig von der Umsetzung der Nährstoffe in ATP, denn nur bei genügender Energieversorgung kann eine Zelle auch schnell wachsen. Für eine Verlängerung der G_1 -Dauer bei Behandlung mit Me_3Sn spricht auch, daß diese Verbindung die Proliferation der Zellen zunächst genauso stark beeinträchtigt wie Et_3Pb und Me_3Pb . Dann aber scheint sich die Proliferationsrate neu, auf ein niedrigeres Niveau, einzupendeln. Der

Gesamtzyklus dauert nun länger, wodurch sich die mit Me_3Sn behandelten Populationen langsamer vermehren als die Kontrollen. Me_3Sn könnte einen "Flaschenhals" im Zellzyklus bewirken, an dem die Zellen sich aufstauen, da sie für seine Passage im Mittel länger brauchen als für den Rest des Zyklus. Eine Übersicht zum Ablauf und zu Theorien des Zellzyklusgeschehens bieten Hartwell & Weinert (1989), McIntosh & Koonce (1989), Murray & Kirschner (1989), O'Farrell & Mitarbeiter (1989) und Pardee (1989) sowie Skehan (1988).

Im Gegensatz zu allen anderen in dieser Arbeit verwendeten schwermetallorganischen Verbindungen hat Bu_2Sn in keiner der hier verwendeten Konzentrationen und Inkubationszeiten einen signifikanten Effekt auf die Zellzyklusverteilung (Kap. 3.4, Tab. 3.4, Abb. 3.13). Noch höhere Konzentrationen können aufgrund der akuten zytotoxischen Wirkung dieser Verbindung nicht verwendet werden (Kap. 3.1, Tab. 3.1).

Alle den Zellzyklus beeinflussenden Verbindungen bewirken auch eine erniedrigte Proliferationsrate der HL-60 Zellen. Dies kann neben einer echten Blockade bestimmter Zellzyklusvorgänge, beispielsweise im Falle von Et_3Pb und Me_3Pb durch Störung der Mitosespindel, wie oben eingehend beschrieben, auf eine Verlängerung der Zyklusdauer zurückgeführt werden. Nicht auszuschließen ist auch ein Absterben von Zellen. Das Ausmaß der Zellproliferation hängt von drei Mechanismen ab (Baserga *et al.*, 1993). Erstens erhöht eine Verkürzung der Zyklusdauer die Zellproduktion pro Zeiteinheit, die Verlängerung der Zyklusdauer (Beispiel Me_3Sn) bewirkt das Gegenteil. Zweitens bewirkt eine Abnahme der Zelltodesrate einen Zuwachs in der Population und *vice versa*. Drittens wird die Zuwachsrate durch den Anteil an Zellen, die sich im Zellzyklus befinden, festgelegt. Ein Aussteigen von Zellen aus dem Zyklus, z.B. durch Differenzierung, führt zur Abnahme des Zuwachses pro Zeiteinheit.

Man kann also zusammenfassend festhalten, daß Organometallverbindungen die Deorganisation von am Zytoskelett beteiligten Strukturen bewirken, was mit einer gestörten Zellteilung einhergehen kann (Bsp. Et_3Pb und Me_3Pb). Daneben können Organometalle aber auch unabhängig von Zytoskelettbestandteilen Einfluß auf den Zellzyklus und damit die Proliferation von Zellen nehmen (Bsp. Me_3Sn). Die Beeinträchtigung der Organisation von Bestandteilen des Zytoskeletts und die Störung der Proliferation könnten eine wichtige Rolle bei der Immunotoxizität und auch bei der Neurotoxizität der Organometalle spielen. Gerade Zellen des Immunsystems müssen zur Migration fähig sein und proliferieren zeitlebens. Die durch die Gabe von Dialkylzinnverbindungen bei Mäusen und Ratten ausgelöste Thymusatrophie wird auf eine direkte Wirkung auf die Proliferation der Thymozyten zurückgeführt (Boyer, 1989). Auch für das sich entwickelnde Nervensystem sind Proliferation und Migration wichtige Vorgänge. Beispielsweise bewirkt Methylquecksilber die Hemmung der Zellteilung im Gehirn zwei Tage alter Mäuse (Clarkson, 1987), und bei der Minamata-Katastrophe zeigte sich, daß pränatale Exposition des Menschen mit Methylquecksilber ebenfalls cerebrale Störungen bewirkt (Craig, 1982). Zusätzlich spielen bei Nervenzellen der axonale Transport sowie die Ausbildung von Zellfortsätzen (Axone, Dendriten) und damit die Form eine große Rolle. Die toxische Wirkung von Organometallen auf das Nervensystem kann sich daher

besonders während der Gehirnentwicklung und -reifung entfalten. Letztere ist beim Menschen erst nach dem 10. Lebensjahr gänzlich abgeschlossen.

4.3 WIRKUNGEN AUF DIE GENEXPRESSION

Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* wird die Zellproliferation durch Signale aus der Umgebung der Zellen reguliert. Hierzu gehören z.B. die Kontaktinhibition aber auch die sogenannten Wachstumsfaktoren. Diese Signale aus der Umgebung induzieren in Zellen eine Antwort, die je nach Signal zur Proliferation oder zum Wachstumsstillstand führt. In Abhängigkeit von diesen äußeren Faktoren gibt es auch intrazelluläre Faktoren, die den Zellzyklus kontrollieren. Die sogenannten "early response genes" (oder auch "immediate-early genes") werden als solche Faktoren betrachtet. Sie werden in ruhenden Zellen wenig oder gar nicht exprimiert, können aber durch eine Vielzahl von Differenzierungs- und Proliferationsstimuli induziert werden. Viele Proto-Onkogene, wie z.B. *c-fos*, *c-jun* und *c-myc*, zählen zu dieser Familie (Brach *et al.*, 1993; Hickman *et al.*, 1992; Pardee, 1989). Bei den genannten Genen handelt es sich um transaktivierende Faktoren, die an bestimmte DNA-Sequenzen binden und so weitere Gene in ihrer Expression modulieren (Pardee, 1989). Signale von der Zelloberfläche werden so in Veränderungen der Genexpression übersetzt, wodurch wiederum Vorgänge wie Proliferation, Differenzierung aber auch Zelltod ausgelöst werden können. Solche transaktivierende Faktoren werden häufig auch als "third messengers" bezeichnet (z.B.: Endo *et al.*, 1993; Wilson *et al.*, 1993).

Wie dargelegt, beeinflussen metallorganische Verbindungen den Ablauf des Zellzyklusgeschehens. Da auch Wirkungen der Organometalle auf der Ebene des Kerns untersucht werden sollten, lag es nahe, die Expression der Gene *c-jun* und *c-myc* in Abhängigkeit von der Exposition mit Organoblei zu untersuchen. Dazu war es notwendig, die Methoden der RNA-Isolierung und Aufarbeitung sowie die Technik der Nukleinsäure-Hybridisierung am Institut für Toxikologie zu etablieren. Die beiden Proto-Onkogene *jun* und *myc* sind im Zusammenhang mit der Wirkung umweltrelevanter Toxine in dreierlei Hinsicht von Interesse.

Erstens werden sie sehr häufig mit dem Zellzyklusgeschehen, aber auch mit dem Tod von Zellen in Beziehung gebracht:

Beispielsweise induziert der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) je nach der Zellart entweder Wachstumsinhibition oder -stimulation. Für die TNF-induzierte Wachstumsstimulation in Fibroblasten wird die Aktivität von *c-jun* benötigt. Verhindert man die Translation der *jun*-mRNA durch deren Hybridisierung mit *jun*-"Antisense"-Oligonukleotiden, so wird die Wirkung des TNF, d.h. die Stimulation der Proliferation, verhindert (Brach *et al.*, 1993). Auch ist die Expression der Gene *jun* und *fos* für den Übertritt aus der G₁-Phase in die S-Phase des Zellzyklus notwendig, und Antikörper gegen ihre Genprodukte, Jun und Fos, verhindern den Ablauf des Zellzyklus in menschlichen Fibroblasten (Kovary & Bravo, 1991). Jun und Fos regulieren gemeinsam in Form des Aktivator-Proteins 1 (AP1) die Expression anderer Gene, die für den Fortlauf des Zyklus

nötig sind (Angel & Karin, 1991). *C-jun* wird in Fibroblasten beim Übergang von G_0 nach G_1 aktiviert (Ryseck *et al.*, 1988) und scheint für die DNA-Replikation nötig zu sein (Murakami *et al.*, 1991). Riabowol *et al.* (1992) halten Veränderungen der AP1-Aktivität für das Unvermögen gealterter Fibroblasten auf Mitogene zu reagieren, für verantwortlich. Bei hämatopoetischen Zellen werden durch den Entzug von Interleukinen schnell *jun* und *fos* induziert. Später tritt der sogenannte programmierte Zelltod ein. Die Reduktion der *jun*- und *fos*-Transkripte durch "Antisense"-Oligonukleotide verhindert die Apoptose der Zellen (Colotta *et al.*, 1992).

Evan & Littlewood (1993) geben eine Übersicht über die Rolle des *c-myc*-Genes beim Zellwachstum aber auch beim Zelltod. Sein Genprodukt Myc wird bei proliferierenden Zellen kontinuierlich exprimiert und scheint über den ganzen Zyklus hinweg notwendig zu sein (Seth *et al.*, 1993). Verschiedene Substanzen, die den Zellzyklus beeinflussen und zur Apoptose einer menschlichen Leukämiezelllinie führen, verringern die Myc-Expression (Hickman *et al.*, 1992). Der Entzug von Wachstumsfaktoren führt in jeder Phase des Zellzyklus bei Fibroblasten zum Verschwinden der *c-myc*-mRNA (Evan & Littlewood, 1993). *C-myc*-"Antisense"-Oligonukleotide hemmen den Übertritt von T-Lymphozyten aus G_1 in die S-Phase (Heikkila *et al.*, 1987) und führen so zu einem G_1 -Block. Jansen-Dürr *et al.* (1993) beschreiben einen Zusammenhang zwischen *myc* und der Expression von Cyclin-Genen. Cycline sind Proteine, die als Regulatoren des Zellzyklus angesehen werden.

Zweitens spielen sie eine Rolle bei der Tumorentstehung:

Jedes dieser Gene besitzt ein virales onkogenes Gegenstück. So wurde *jun* in seiner viralen Form in einem Sarkome auslösenden Retrovirus, dem avian sarcoma virus 17 entdeckt. Der Name "*jun*" kommt aus dem Japanischen ju-nana, was 17 bedeutet (Maki *et al.*, 1987). Auch *myc* ist in seiner viralen Form im Genom verschiedener Vogel-Retroviren enthalten (Hayflick *et al.*, 1985).

Drittens wird die Expression von *c-jun* aber auch von *c-myc* durch eine Vielzahl von Substanzen in Zellkulturen und im Tierversuch induziert:

Beispielsweise wird die Aktivität von *c-jun* durch Asbest (Heintz *et al.*, 1993; Ratten- und Hamsterzellen), anorganische Schwermetalle wie Zinkchlorid (Bergelson *et al.*, 1994; Leber- und Embryozellen), Bleinitrat (Coni *et al.*, 1993; Rattenleber) und Cadmiumchlorid (Jin & Ringertz, 1990; Myoblastenkultur), aber auch cis-Platin (Rubin *et al.*, 1992; Leukämiezellkulturen) erhöht. Zusätzlich steigern die anorganischen Schwermetalle Bleinitrat (Coni *et al.*, 1993) und Cadmiumchlorid (Jin & Ringertz, 1990) auch die *myc*-Expression. Besonders im Hinblick auf die vielfach zitierte Neurotoxizität organometallischer Verbindungen ist die Wirkung des ebenfalls neurotoxischen Acrylamid interessant. Endo *et al.* (1993) berichten vom Anstieg der *c-jun* Expression im Gehirn von Ratten *in vivo* bei akuter und bei chronischer Acrylamidexposition. Auch das Proto-Onkogen *c-fos* wird von neurotoxischen Stoffen aktiviert. So induziert Metrazol *c-fos* im Gehirn von Mäusen, aber nicht in anderen Organen (Morgan *et al.*, 1987). Die

Neurotoxizität von Me_3Sn wird von Zawia & Harry (1993) auf die *fos*-Aktivierung im Rattengehirn zurückgeführt.

Die im folgenden diskutierten Ergebnisse stammen aus Untersuchungen an P388D_1 -Mausmakrophagen. HL-60 Zellen enthalten *c-myc* in amplifizierter Form (Wolf & Rotter, 1985) und zeigen außerdem eine relativ hohe Schwankungsbreite ihrer Chromosomenzahl (Collins *et al.*, 1977), so daß sie uns für Untersuchungen an Vorgängen im Kern als ungeeignet erschienen. P388D_1 -Zellen gehören als Makrophagen ebenso wie HL-60 Zellen zur zellularen Immunabwehr. Eine Aufgabe solcher Zellen ist die Bildung von Entzündungsmediatoren, die von Arachidonsäure abgeleitet sind. P388D_1 -Zellen besitzen Phospholipase-Aktivität (Ross *et al.*, 1985). Eine membrangebundene, calciumabhängige Form der PLA_2 wurde aus ihnen isoliert (Ulevitch *et al.*, 1988) und charakterisiert (Lister *et al.*, 1988). Dieses Enzym soll hier, wie bei menschlichen Neutrophilen (Nakashima *et al.*, 1989) und HL-60 Zellen (Cockcroft & Stutchfield, 1989), für die Arachidonsäurefreisetzung aus Membranphospholipiden verantwortlich sein (Lister *et al.*, 1989). P388D_1 -Zellen reagierten auf die Organometalle bezüglich der Arachidonsäurefreisetzung im selben Maße wie die HL-60 Zellen (Walser & Krug, unveröffentlichte Daten). Sie wurden aufgrund dieser Ähnlichkeiten mit HL-60 Zellen verwendet.

In der hier vorliegenden Arbeit dient der Gehalt der zugehörigen mRNA als Maß für die Expression eines Gens. Es ist mit den verwendeten Methoden nicht zu unterscheiden, ob die mRNA auf einen Stimulus hin verstärkt gebildet oder langsamer abgebaut wird. Auch können letztendlich keine Aussagen darüber gemacht werden, ob eine Erhöhung des Gehalts einer bestimmten mRNA auch zu einer Erhöhung des zugehörigen Proteins führt. Begriffe wie Expression, Aktivierung und Induktion beziehen sich in den folgenden Absätzen daher stets auf die Konzentration der jeweiligen mRNA.

$10 \mu\text{M Et}_3\text{Pb}$ erhöhen binnen einer Stunde die Expression des *c-jun*-Proto-Onkogens in signifikanter Weise um den Faktor 6 (Kap. 3.5, Abb. 3.16). Diese Wirkung ist deutlich konzentrations- und zeitabhängig (Kap. 3.5, Abb. 3.15a, b). In sämtlichen Versuchsreihen konnte durch eine fünffach höhere Konzentration an Me_3Pb ein der Wirkung von Et_3Pb vergleichbarer Effekt erzielt werden. Dies bestätigt sich auch hier. $50 \mu\text{M Me}_3\text{Pb}$ bewirken eine zeitabhängige *jun*-Induktion (Kap. 3.5, Abb. 3.15c), die nach 90minütiger Inkubation ein Maximum erreicht (Kap. 3.5, Abb. 3.16: Faktor 18 nach 90 Minuten). Die Wirkung des Me_3Pb auf die Konzentration der *c-jun*-mRNA ist deutlich stärker als der Effekt des Et_3Pb . Auch findet sich bei Et_3Pb kein so ausgeprägtes Maximum wie bei Me_3Pb . Eher scheint die Aktivierung von *jun* in der ersten Stunde der Expositionszeit anzusteigen, um dann auf einem Plateau zu bleiben. Wie es zu dieser unterschiedlichen Wirkung der beiden trialkylierten Bleiverbindungen kommt, ist unklar. Mögliche Gründe könnten in der unterschiedlichen Länge der Alkylketten zu finden sein. Bei höheren Konzentrationen an Et_3Pb und Me_3Pb konnte im betrachteten Inkubationszeitraum keine Aktivierung von *c-jun* mehr nachgewiesen werden (Kap. 3.5, Abb. 3.15a). Die RNA befindet sich bei diesen Konzentrationen schon in Auflösung, möglicherweise aufgrund der Aktivität von Nukleasen. Analog führen $5\text{-}10 \mu\text{M}$ Cadmiumchlorid nach 2-4 Stunden

Inkubation zu einer deutlichen Anreicherung der *c-jun*-RNA, während höhere Konzentrationen diese Wirkung nicht haben (Jin & Ringertz, 1990).

Die Wirkung des Ph_3Pb ist in der eingesetzten Konzentration ($0,5 \mu\text{M}$) und während der untersuchten Inkubationsdauer weit weniger ausgeprägt (Kap. 3.5, Abb. 3.16). Ein Effekt höherer Konzentrationen des Ph_3Pb auf die Geninduktion ist nicht auszuschließen. Diese Verbindung hat aber eine so hohe akute Toxizität (LC_{50} : $3,4 \mu\text{M}$ bei zweistündiger Inkubation), daß Konzentrationen über $0,5 \mu\text{M}$, die möglicherweise eine Geninduktion bewirken, nicht getestet wurden. Auch bezüglich der Arachidonsäurefreisetzungsaktivität ist Ph_3Pb in einsetzbaren Konzentrationen nicht so aktiv wie Et_3Pb und Me_3Pb . Auf die Zellzyklusverteilung kann mit Konzentrationen, die die Vitalität der Zellen nicht erheblich einschränken, nur eine schwache Wirkung erzielt werden. Eine mögliche Erklärung dieser Unterschiede liegt in der Molekülstruktur begründet. Aufgrund seiner drei aromatischen Reste ist Ph_3Pb um einiges umfangreicher als Me_3Pb und Et_3Pb . Gleichzeitig ist es lipophiler. Destruktion oder Veränderungen der Fluidität der Plasmamembran könnten für die sehr hohe Zytotoxizität dieser Substanz verantwortlich sein. Die Wirkung auf andere Komponenten der Zelle treten durch den starken Effekt auf die Vitalität der Zellen in den Hintergrund. Möglich ist auch, daß Ph_3Pb aufgrund seiner Größe und Lipophilie nur schwer direkt in die Zelle gelangen kann, um dort weitere Effekte auszulösen.

Der Effekt von $10 \mu\text{M}$ Et_3Pb auf die Expression von *c-myc* ist nur sehr schwach. Es fand während der dreistündigen Inkubation eine Erhöhung der *c-myc*-mRNA um den Faktor 3 statt. Aufgrund dieses sehr schwachen Effektes wurde die Wirkung der anderen Organobleiverbindungen im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter verfolgt. Im Gegensatz zu der in dieser Arbeit verwendeten organischen Bleiverbindung Et_3Pb führt das anorganische Bleinitrat parallel zur Induktion von *c-jun* und *c-myc* (Coni *et al.*, 1993). Auch Cadmiumchlorid ($5\text{-}10 \mu\text{M}$) bewirkt schon nach zwei Stunden eine starke Aktivierung von *c-myc*, die dann 24 Stunden erhalten bleibt (Jin & Ringertz, 1990).

Transkriptionsfaktoren wie *c-jun* und *c-myc* könnten primäre Effekte von Toxinen in langfristige Veränderungen der Genexpression verwandeln. Hierauf könnten adaptive Veränderungen des Phänotyps beruhen. Jedoch ist auch die Aktivierung genetischer Programme, die zum Zelltod, z.B. durch Apoptose oder Nekrose, führen, denkbar. (Evan & Littlewood, 1993; Coni *et al.*, 1993). In der neueren Literatur wird gerade die Induktion des *jun*-Proto-Onkogens als allgemeine Reaktion von Zellen auf eine von außen kommende Schädigung, sei es durch Chemikalien oder UV- und ionisierende Strahlung, diskutiert (Bergelson *et al.*, 1994; Endo *et al.*, 1993; Manome *et al.*, 1993; Rubin *et al.*, 1992). Viele Autoren bringen eine Schädigung der DNA mit der Induktion von *c-jun* in Zusammenhang (Manome *et al.*, 1993; Rubin *et al.*, 1992). Auch Et_3Pb und Me_3Pb haben, wie die Prä- G_1 -Peaks der DNA-Histogramme zeigen (Kap. 3.4, Abb. 3.14), zumindest sekundär eine Wirkung auf die DNA. Der Vergleich der *jun*-Induktion mit dem bakteriellen SOS-System drängt sich geradezu auf und wird auch in der Literatur angeführt (Manome *et al.*, 1993; Rubin *et al.*, 1992). Die Induktion von *jun* durch Et_3Pb und Me_3Pb könnte auch eher unspezifischer Natur sein und nichts mit Veränderungen an der DNA zu tun haben. So steht *jun* bekanntermaßen auch unter dem Einfluß des intrazellulären Calciums (Werlen *et al.*, 1993), welches durch die bleiorganischen

Verbindungen erhöht wird (Ade & Krug, unveröffentlicht). Die Störung der Calciumhomöostase durch die Organometalle ist jedoch erst bei weitaus höheren Konzentrationen festzustellen (Ade & Krug, unveröffentlicht), als für die Induktion des *jun*-Genes nötig sind (Tab. 4.1). Auch Arachidonsäure und ihre Abkömmlinge werden häufig in Zusammenhang mit der Genexpression genannt. Beispielsweise erhöht Prostaglandin E₂ in HL-60 Zellen die *c-jun*-Expression (Nakamura *et al.*, 1990). Arachidonsäure selbst und die über den Cyclooxygenaseweg gebildeten Hydroxysäuren induzieren *c-fos* (Haliday *et al.*, 1991; Tebbey & Buttke, 1993). Hemmt man die Metabolisierung von Arachidonsäure durch die Cyclooxygenase, so wird die EGF-induzierte *c-myc*-Expression verringert (Handler *et al.*, 1990). Dabei könnte die hauptsächlich als "first messenger" diskutierte Arachidonsäure durchaus auch wie ein "second messenger" wirksam werden, d.h. direkt in der Zelle. Auch hier gilt jedoch, daß die für die Arachidonsäurefreisetzung benötigte Organometallkonzentration um den Faktor 10 größer ist als die Konzentration, die zur Induktion von *c-jun* benötigt wird (Tab. 4.1). Lokale Konzentrationserhöhungen von Calcium und Arachidonsäure sind nicht auszuschließen. Sie können mit den von uns angewandten Methoden möglicherweise nicht erfaßt werden und so eine unbemerkte Rolle in der Kaskade, die zur Geninduktion führt, wahrnehmen.

Wahrscheinlicher ist, daß Toxine je nach ihrer Konzentration unterschiedliche Wirkungen entfalten können bzw. unterschiedliche Effekte der Toxine bei verschiedenen Konzentrationen dominieren. So wird neben der Et₃Pb-induzierten Arachidonsäurefreisetzung auch der Einbau dieser Fettsäure durch Et₃Pb gehemmt; beide Reaktionen haben aber unterschiedliche "Konzentrationsoptima" (Krug, 1992). Tributylzinn bewirkt in niedriger Konzentration (1 µM) eine Stimulierung der Acetyltransferase in differenzierten HL-60 Zellen, während 10 µM Tributylzinn dieses Enzym deutlich hemmen (Zaucke, 1993). Die Acetyltransferase ist für die Synthese von PAF aus Lysophospholipiden und Acetyl-CoA verantwortlich (Abb. 1.1).

Organometallverbindungen schädigen strukturelle und funktionelle Eigenschaften der Zelle. Angriffsziele hierbei sind die Plasmamembran, das Zytoskelett, das Proliferationsverhalten und die Genexpression. Bei keiner dieser Wirkungen ist eine direkte Einflußnahme der Toxine auszuschließen, aber auch nicht unbedingt notwendig. An der Plasmamembran ausgelöste Reaktionen könnten durch "second messenger" wie z.B. Calcium, aber auch Arachidonsäure über das Zytoplasma bis in den Kern vermittelt werden.

Die unterschiedlichen Ebenen der Zelle, Membran, Zytosol und Kern, werden durch unterschiedliche Toxinkonzentrationen und Inkubationszeiten erreicht (Tab. 4.1). Bemerkenswert ist dabei, daß die effektiven Konzentrationen für die Wirkungen an der Membran höher sind als für die Effekte im Inneren der Zelle. Dies läßt unterschiedliche Auswirkungen zwischen akuten und chronischen Belastungen mit umweltrelevanten Organometallen erwarten, unabhängig davon ob die Dosis offene Vergiftungssymptome auslöst oder nicht. Auch könnten primäre Effekte einer relativ hohen Dosis gefolgt sein von sekundären Wirkungen, die durch niedrigere Dosen mit langer Verweildauer im

Organismus ausgelöst werden. In der Tabelle 4.1 sind die dargelegten Zusammenhänge am Beispiel des Triethylbleichlorids zusammenfassend dargestellt.

Tab. 4.1: Die Wirkung des Triethylbleis auf den verschiedenen Ebenen der Zelle.

Ziel Zellart	untersuchter Parameter	Triethylblei- Konzentration	Inkubationszeit
Plasmamembran HL-60 Zellen	Calciumeinstrom ^a freie AA	200 µM 100 µM	4 min 20 min
Zytoskelett NRK-Zellen	F-Aktin	100 µM 1 µM	1 h 18 h
Zellzyklus HL-60 Zellen	DNA-Gehalt	1 µM	6, 16, 24, 48 h
Zellkern P388D ₁ -Zellen	Expression von <i>c-jun</i>	10 µM	1 h-3 h

a: Ade & Krug, unveröffentlicht

Die Toxizität der Organometallverbindungen ist höchstwahrscheinlich nicht auf einen einzigen "Schlüsseleffekt" zurückführbar, sondern eher kumulativer Natur. Die Wirkung der Organometalle auf den Arachidonsäurestoffwechsel ist verknüpft mit der Bildung zahlreicher Entzündungsmediatoren und bringt diese Substanzen daher in Zusammenhang mit allergischen und pseudoallergischen Reaktionen. Die Störung der Zytoskelettorganisation ist besonders im Hinblick auf die Neurotoxizität der schwermetallorganischen Verbindungen interessant, da die Funktion von Nervenzellen stark an die Form gebunden ist. Die Störung der Proliferation und der Zytoskelettorganisation können für das sich entwickelnde Nervensystem ebenso bedeutsam sein wie für das Immunsystem, dessen Zellen zeitlebens proliferieren und migrieren. Veränderungen im Zellteilungsverhalten und die Erhöhung der Expression sogenannter Proto-Onkogene lassen schließlich die mögliche cancerogene oder zumindest co-cancerogene Wirkung von organischen Metallverbindungen wieder in den Vordergrund treten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit sollte zur Aufklärung der Toxizität von Organoblei- und Organozinnverbindungen auf zellulärer Ebene beitragen. Für die *in vitro*-Untersuchungen wurden Zelllinien verwendet, die für die jeweilige Fragestellung besonders geeignet waren (Arachidonsäurestoffwechsel, Proliferation und Zellzyklus: HL-60 Zellen; Aktinfilamente: NRK-Zellen; Proto-Onkogenexpression: P388D₁-Zellen). Es wurden vorallem Blutzelllinien verwendet, da Blut ein wichtiges Zielorgan darstellt. Alle Untersuchungen zeigen, daß Organoschwermetalle erheblich in die Signalübertragungsmechanismen von Zellen eingreifen.

-Arachidonsäurefreisetzung an der Plasmamembran:

Der wichtige Mechanismus der Arachidonsäurefreisetzung wird durch die Organometalle stimuliert. Die Aktivierung des entscheidenden Enzyms Phospholipase A₂ durch einen Calciumeinstrom ist sehr wahrscheinlich, wie die Versuche mit **Quinacrin**, **EGTA** und Kanalblockern, wie **Verapamil**, bestätigen konnten. Einen weiteren Hinweis auf diesen Mechanismus der Organometallwirkung geben die Experimente mit **Amilorid**.

Eine zusätzliche Aktivierung über einen rezeptor-gekoppelten Weg konnte mit **Pertussis Toxin** vorerst ausgeschlossen werden. Die teilweise Hemmung der organometallinduzierten Arachidonsäurefreisetzung durch Pertussis Toxin ist eher auf einen sekundären Effekt zurückzuführen: Die aus Arachidonsäure gebildeten Eicosanoide können nicht mehr über Rezeptoren stimulierend wirken.

Der genaue Wirkmechanismus, der zur Arachidonsäurefreisetzung führt, ist auch von der Molekülstruktur des Organometalls beeinflusst.

-Zytoskelett und Zellzyklus:

Triethylbleichlorid und Dibutylzinndichlorid führen zur Deorganisation der **Aktinfilamente** von NRK-Zellen.

Erstmals konnte eine Wirkung von Organometallen auf den Zellzyklus gezeigt werden und zwar an undifferenzierten HL-60 Zellen:

Triorganobleiverbindungen führen zu einem Block der G₂/Mitose-Phase; Trimethylzinchlorid dagegen erhöht die Zahl der Zellen in der G₁-Phase.

-Genexpression:

Während *c-myc* durch Triethylbleichlorid nicht induziert wird, führen trialkylierte Bleiverbindungen zur starken Aktivierung der Expression des Transkriptionsfaktors *c-jun*.

Es zeigte sich, daß für die verschiedenen zellulären Ebenen (Membran, Zytosol, Kern) die effektiven Konzentrationen der Xenobiotika von "außen nach innen" deutlich abnehmen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J.D. (1976a). Das Cytoskelett. In: *Molekularbiologie der Zelle*. Jaenicke L., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 607-678.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. & Watson J.D. (1976b). Erhaltung und Entwicklung der Nervenzellstruktur. In: *Molekularbiologie der Zelle*. Jaenicke L., VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 1197-1205.

Aldridge W.N., Street B.W. & Skilleter D.N. (1977). Oxidative phosphorylation: halide-dependent and halide-independent effects of triorganotin and triorganolead compounds on mitochondrial functions. *Biochem. J.*, **168**, 353-364.

Ali A.A., Upreti R.K. & Kidwai A.M. (1987). Interaction of di- and tributyltin chloride with human erythrocyte membrane. *Toxicol. Lett.*, **38**, 13-18.

Amati B., Littlewood T.D., Evan G.I. & Land H. (1993). The c-Myc protein induces cell cycle progression and apoptosis through dimerization with Max. *The EMBO Journal*, **12**, 5083-5087.

Angel P. & Karin M. (1991). The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim. Biophys. Acta*, **1072**, 129-157.

Arcangeli A., Carla M., Del Bene M.R., Becchetti A., Wanke E. & Olivotto M. (1993). Polar/apolar compounds induce leukemia cell differentiation by modulating cell-surface potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5858-5862.

Aschner M. & Aschner J.L. (1992). Cellular and molecular effects of trimethyltin and triethyltin: relevance to organotin neurotoxicity. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **16**, 427-435.

Audesirk G., Shugarts D., Nelson G. & Przekwas J. (1989). Organic and inorganic lead inhibit neurite growth in vertebrate and invertebrate neurons in culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, **25**, 1121-1128.

Aw T.Y., Nicotera P., Manzo L. & Orrenius S. (1990). Tributyltin stimulates apoptosis in rat thymocytes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **283**, 46-50.

Axelrod J., Burch R.M. & Jelsema C.L. (1988). Receptor-mediated activation of phospholipase A₂ via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. *Trends Neurosci.*, **11**, 117-123.

Bähr G. & Langer E. (1975). Organo-blei-Verbindungen. In: *Metallorganische Verbindungen*, Bähr G., Langer E. & Segnitz A., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1-260.

Bähr G. & Pawlenko S. (1978). Methoden zur Herstellung und Umwandlung von Organo-zinn-Verbindungen. In: *Metallorganische Verbindungen*, Bähr G., Kalinowski H.O. & Pawlenko S., Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 181-521.

Barnes P.J., Chung K.F. & Page C.P. (1988). Platelet-activating factor as a mediator of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, **81**, 919-934.

- Baselt R.C. (1982a).** Lead. In: *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*, Baselt R.C., Biomedical Publications, Davis (USA), 420-425.
- Baselt R.C. (1982b).** Tin. In: *Disposition of toxic drugs and chemicals in man*, Baselt R.C., Biomedical Publications, Davis (USA), 736-738.
- Baserga R., Porcu P. & Sell C. (1993).** Oncogenes, growth factors and control of the cell cycle. *Cancer Surveys*, **16**, 201-213.
- Bergelson S., Pinkus R. & Daniel V. (1994).** Induction of AP-1 (Fos/Jun) by chemical agents mediates activation of glutathione S-transferase and quinone reductase gene expression. *Oncogene*, **9**, 565-571.
- Bergeret A., Pouget E., Tedone R., Meygret T., Cadot R. & Descotes J. (1990).** Neutrophil functions in lead-exposed workers. *Human & Experimental Toxicol.*, **9**, 231-233.
- Bicknell R. & Vallee B.L. (1989).** Angiogenin stimulates endothelial cell prostacyclin secretion by activation of phospholipase A₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1573-1577.
- Birnbaumer L. (1990).** G proteins in signal transduction. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 675-705.
- Blakey D.H., Bayley J.M. & Douglas G.R. (1992).** Induction of chromosomal aberrations in chinese hamster ovary cells by triethyllead acetat. *Mutation Res.*, **298**, 1-7.
- Bligh E.G. & Dyer W.J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.
- Bokoch G.M. & Gilman A.G. (1984).** Inhibition of receptor-mediated release of arachidonic acid by pertussis toxin. *Cell*, **39**, 301-308.
- Bondy S.C. & Hall D.L. (1986).** The relation of the neurotoxicity of organic tin and lead compounds to neurotubule disaggregation. *NeuroToxicol.*, **7**, 51-56.
- Bonser R.W., Siegel M.I., Chung S.M., McConnell R.T. & Cuatrecasas P. (1981).** Esterification of an endogenously synthesized lipoxygenase product into granulocyte cellular lipids. *Biochemistry*, **20**, 5297-5301.
- Boyer I.J. (1989).** Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to humans and to experimental animals. *Toxicology*, **55**, 253-298.
- Brach M.A., Gruss H.J., Sott C. & Herrmann F. (1993).** The mitogenic response to tumor necrosis factor alpha requires c-Jun/AP-1. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4284-4290.
- Burch R.M. (1989).** G protein regulation of phospholipase A₂. *Mol. Neurobiol.*, **3**, 155-171.
- Burch R.M., Luini A. & Axelrod J. (1986).** Phospholipase A₂ and phospholipase C are activated by distinct GTP-binding proteins in response to α 1-adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 7201-7205.

Burgoyne R.D., Cheek T.R. & O'Sullivan A.J. (1987). Receptor-activation of phospholipase A₂ in cellular signalling. *Trends Biochem. Sci.*, **12**, 332-333.

Bushnell P.J. & Evans H.L. (1986). Diurnal patterns in homecage behavior of rats after acute exposure to triethyltin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **85**, 346-354.

Carafoli E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Ann. Rev. Biochem.*, **56**, 395-433.

Chang J., Musser J.H. & McGregor H. (1987). Phospholipase A₂: function and pharmacological regulation. *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 2429-2436.

Clarkson T.W. (1987). Metal toxicity in the central nervous system. *Environm. Health Persp.*, **75**, 59-64.

Cockcroft S., Geny B. & Thomas G.M. (1991). Regulation of cytosolic phosphoinositide-phospholipase C by G-protein, Gp. *Biochem. Soc. Transact.*, **19**, 299-302.

Cockcroft S. & Stutchfield J. (1989). The receptors for ATP and fMetLeuPhe are independently coupled to phospholipases C and A₂ via G-protein(s). Relationship between phospholipase C and A₂ activation and exocytosis in HL-60 cells and human neutrophils. *Biochem. J.*, **263**, 715-723.

Collins S.J., Gallo R.C. & Gallagher R.E. (1977). Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension cultur. *Nature*, **270**, 347-349.

Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E. & Gallo R.C. (1978). Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 2458-2462.

Collins S.J., Ruscetti F.W., Gallagher R.E. & Gallo R.C. (1979). Normal functional characteristics of cultured human promyelocytic leukemia cells (HL-60) after induction of differentiation by dimethylsulfoxide. *J. Exp. Med.*, **149**, 969-974.

Colotta F., Polentarutti N., Sironi M. & Mantovani A. (1992). Expression and involvement of *c-fos* and *c-jun* protooncogenes in programmed cell death induced by growth factor deprivation in lymphoid cell lines. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18278-18283.

Coni P., Simbula G., Carcereri De Prati A., Menegazzi M., Suzuki H., Sarma D.S.R., Ledda-Columbano G.M. & Columbano A. (1993). Differences in the steady-state levels of *c-fos*, *c-jun* and *c-myc* messenger RNA during mitogen-induced liver growth and compensatory regeneration. *Hepatology*, **17**, 1109-1116.

Costa L.G. (1985). Inhibition of γ -[³H]aminobutyric acid uptake by organotin compounds *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **79**, 471-479.

Craig P.J. (1982). Environmental aspects of organometallic chemistry. In: *Comprehensive Organometallic Chemistry: The Synthesis Reactions Structures of Organometallic Compounds*, Wilkinson G., Stone F.G. & Abel E.W., Pergamon Press, London 979-1020.

- Dauderer M. (1990).** III. Toxikologische Einzelstoffinformation, Zinn. In: *Handbuch der Umweltgifte: Klinische Umwelttoxikologie für die Praxis*, Dauderer M., ecomed Verlag, Landsberg/Lech, Band II, 1-20.
- Dean P.N. & Jett J.H. (1974).** Mathematical analysis of DNA distributions derived from flow microfluorometry. *J. Cell Biol.*, **60**, 523-527.
- Dennis E.A. (1987).** Phospholipase A₂ mechanism: inhibition and role in arachidonic acid release. *Drug Dev. Res.*, **10**, 205-220.
- Denny M.F., Hare M.F. & Atchison W.D. (1993).** Methylmercury alters intrasynaptosomal concentrations of endogenous polyvalent cations. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **122**, 222-232.
- Di Girolamo M., D'Arcangelo D., Bizzarri C. & Corda D. (1991).** Muscarinic regulation of phospholipase-A₂ and iodide fluxes in FRTL-5 thyroid cells. *Acta Endocrinol.*, **125**, 192-200.
- Endo H., Sabri M.I., Stephens J.M., Pekala P.H. & Kittur S. (1993).** Acrylamide induces immediate-early gene expression in rat brain. *Brain Res.*, **609**, 231-236.
- Evan G.I. & Littlewood T.D. (1993).** The role of *c-myc* in cell growth. *Curr. Opin. Gen. Dev.*, **3**, 44-49.
- Feinberg A.P. & Vogelstein B. (1983).** A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**, 6-13.
- Fernández B. & Balsinde J. (1991).** Receptor-mediated activation of arachidonic acid release in mouse peritoneal macrophages is linked to extracellular calcium influx. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **180**, 1036-1040.
- Filippov A., Skatova G., Porotikov V., Kobrinsky E. & Saxon M. (1989).** Ca²⁺-antagonistic properties of phospholipase A₂ inhibitors, mepacrine and chloroquine. *Gen. Physiol. Biophys.*, **8**, 113-118.
- Fostinis Y., Theodoropoulos P.A., Gravanis A. & Stournaras C. (1992).** Heat shock protein HSP90 and its association with the cytoskeleton: a morphological study. *Biochem. Cell Biol.*, **70**, 779-786.
- Fox M.H. (1980).** A model for the computer analysis of synchronous DNA distributions obtained by flow cytometry. *Cytometry*, **1**, 71-77.
- Friberg L., Nordberg G.F. & Vouk V.B. (1979).** Tetraethyllead. In: *Handbook on the toxicology of metals*, Friberg L., Nordberg G.F. & Vouk V.B., Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 476-478.
- Froissart P., Unligil P., Aubry H. & Proulx P. (1989).** Modulation by phorbol 12-myristate 13-acetate of arachidonic acid release from rat basophilic leukemia cells stimulated with A23187. *Biochim. Biophys. Acta*, **1002**, 376-381.
- Ganong B.R. (1991).** Roles of lipid turnover in transmembrane signal transduction. *Am. J. Med. Sci.*, **302**, 304-312.

Gelius R. (1964). Die Umsetzung von Organobleiverbindungen mit Thionylchlorid. *Z. anorg. allg. Chem.*, **334**, 72-80.

Göhde W., Schliermann M., Miltenburger H.G. & Schumann J. (1985). Durchfluß-Zytofluorometrie zur Routineuntersuchung von Zellkulturen in der Biotechnologie (Rapid quality control in cell culture systems using flow cytometry). *forum mikrobiologie*, **4**, 231-237.

Goerig M., Habenicht A.J. & Schettler G. (1985). Eicosanoide und Phospholipasen. *Klin. Wochenschr.*, **63**, 293-311.

Grandjean P. (1983). Health significance of organolead compounds. In: *Lead versus health*, Rutter M. & Jones R.R., John Wiley & Sons, London, 179-189.

Gray B.H., Porvaznik M., Flemming C. & Lee L.H. (1987). Organotin-induced hemolysis, shape transformation and intramembranous aggregates in human erythrocytes. *Cell Biol. Toxicol.*, **3**, 23-38.

Hagan J.J., Jansen J.H. & Broekkamp C.L. (1988). Selective behavioural impairment after acute intoxication with trimethyltin (TMT) in rats. *NeuroToxicol.*, **9**, 53-74.

Haliday E.M., Ramesha C.S. & Ringold G. (1991). TNF induces *c-fos* via a novel pathway requiring conversion of arachidonic acid to a lipoxygenase metabolite. *The EMBO Journal*, **10**, 109-115.

Hamasaki T., Sato T., Nagase H. & Kito H. (1992). The genotoxicity of organotin compounds in SOS chromotest and rec-assay. *Mutation Res.*, **280**, 195-203.

Hamasaki T., Sato T., Nagase H. & Kito H. (1993). The mutagenicity of organotin compounds as environmental pollutants. *Mutation Res.*, **300**, 265-271.

Handler J.A., Danilowicz R.M. & Eling T.E. (1990). Mitogenic signaling by epidermal growth factor (EGF), but not platelet-derived growth factor, requires arachidonic acid metabolism in BALB/c 3T3 cells. Modulation of EGF-dependent *c-myc* expression by prostaglandins. *J. Biol. Chem.*, **265**, 3669-3673.

Harris P. & Ralph P. (1985). Human leukemic models of myelomonocytic development: a review of the HL-60 and U937 cell lines. *J. Leukocyte Biol.*, **37**, 407-422.

Hartwell L.H. & Weinert T.A. (1989). Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*, **246**, 629-634.

Hartwig A. & Beyersmann D. (1989). Comutagenicity and inhibition of DNA repair by metal ions in mammalian cells. *Biol. Trace Element Res.*, **21**, 359-365.

Hartwig A., Schlepegrell R. & Beyersmann D. (1990). Indirect mechanism of lead-induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutation Res.*, **241**, 75-82.

- Hayflick J., Seeburg P.H., Ohlsson R., Pfeifer-Ohlsson S., Watson D., Papas T. & Duesberg P.H. (1985). Nucleotide sequence of two overlapping *myc*-related genes in avian carcinoma virus OK10 and their relation to the *myc* genes of other viruses and the cell. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 2718-2722.
- Hecker M., Brüne B., Decker K. & Ullrich V. (1989). The sulfhydryl reagent thimerosal elicits human platelet aggregation by mobilization of intracellular calcium and secondary prostaglandin endoperoxide formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **159**, 961-968.
- Heikkila R., Schwab G., Wickstrom E., Loke S.L., Pluznik D.H., Watt R. & Neckers L.M. (1987). A *c-myc* antisense oligodeoxynucleotide inhibits entry into S phase but not progress from G₀ to G₁. *Nature*, **328**, 445-449.
- Heintz N.H., Janssen Y.M. & Mossman B.T. (1993). Persistent induction of *c-fos* and *c-jun* expression by asbestos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3299-3303.
- Hickman J.A., Beere H.M., Wood A.C., Waters C.M. & Parmar R. (1992). Mechanisms of cytotoxicity caused by antitumour drugs. *Toxicol. Lett.*, **64/65**, 553-561.
- Holz G.G., Rane S.G. & Dunlap K. (1986). GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels. *Nature*, **319**, 670-672.
- Hornberger W. & Patscheke H. (1990). Primary stimuli of icosanoid release inhibit arachidonoyl-CoA synthetase and lysophospholipid acyltransferase. Mechanism of action of hydrogen peroxide and methyl mercury in platelets. *Eur. J. Biochem.*, **187**, 175-181.
- Hunter S.A., Burstein S. & Sedor C. (1984). Stimulation of prostaglandin synthesis in WI-38 human lung fibroblasts following inhibition of phospholipid acylation by *p*-hydroxymercuribenzoate. *Biochim. Biophys. Acta*, **793**, 202-212.
- Irvine R.F. (1982). How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.*, **204**, 3-16.
- Jansen-Dürr P., Meichle A., Steiner P., Pagano M., Finke K., Botz J., Wessbecher J., Draetta G. & Eilers M. (1993). Differential modulation of cyclin gene expression by *myc*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 3685-3689.
- Jin P. & Ringertz N.R. (1990). Cadmium induces transcription of proto-oncogenes *c-jun* and *c-myc* in rat L6 myoblasts. *J. Biol. Chem.*, **265**, 14061-14064.
- Käfer A. (1991). Schwermetallorganische Verbindungen und ihre Wirkungen auf den Arachidonsäurestoffwechsel in HL-60 Zellen. *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe.
- Käfer A., Zöltzer H. & Krug H.F. (1992). The stimulation of arachidonic acid metabolism by organic lead and tin compounds in human HL-60 leukemia cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **116**, 125-132.
- Kaever V., Goppelt-Strübe M. & Resch K. (1988). Enhancement of eicosanoid synthesis in mouse peritoneal macrophages by the organic mercury compound thimerosal. *Prostaglandins*, **35**, 885-902.

Kajiyama Y., Murayama T. & Nomura Y. (1989). Pertussis toxin-sensitive GTP-binding proteins may regulate phospholipase A₂ in response to thrombin in rabbit platelets. *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**, 200-208.

Karin M. (1985). Metallothioneins: protein in search of function. *Cell*, **41**, 9-10.

Karin M. & Smeal T. (1992). Control of transcription factors by signal transduction pathways: the beginning of the end. *Trends Biochem. Sci.*, **17**, 418-422.

Keith C.H., Ratan R., Maxfield F.R., Bajer A. & Shelanski M.L. (1985). Local cytoplasmic calcium gradient in living mitotic cells. *Nature*, **316**, 848-850.

Kleuss C., Hescheler J., Ewel C., Rosenthal W., Schultz G. & Wittig B. (1991). Assignment of G-protein subtypes to specific receptors inducing inhibition of calcium currents. *Nature*, **353**, 43-48.

Komulainen H. & Bondy S.C. (1987). Increased free intrasynaptosomal Ca²⁺ by neurotoxic organometals: distinctive mechanisms. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 77-86.

Komulainen H. & Bondy S.C. (1988). Increased free intracellular Ca²⁺ by toxic agents: an index of potential neurotoxicity? *Trends Pharmacol. Sci.*, **9**, 154-156.

Kovary K. & Bravo R. (1991). The Jun and Fos protein families are both required for cell cycle progression in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4466-4472.

Krautwurst D., Seifert R., Hescheler J. & Schultz G. (1992). Formyl peptides and ATP stimulate Ca²⁺ and Na⁺ inward currents through non-selective cation channels via G-proteins in dibutyryl cyclic AMP-differentiated HL-60 cells. *Biochem. J.*, **288**, 1025-1035.

Krug H.F. (1992). The toxic effects of organometals on the Lands cycle in HL-60 cells. *Appl. Organomet. Chem.*, **6**, 297-304.

Krug H.F. & Berndt J. (1987). Stimulation of arachidonic acid metabolism via phospholipase A₂ by triethyl lead. *Eur. J. Biochem.*, **162**, 293-298.

Krug H.F. & Culig H. (1991). Directed shift of fatty acids from phospholipids to triacylglycerols in HL-60 cells induced by nanomolar concentrations of triethylleadchloride: involvement of a pertussis toxin-sensitive pathway. *Mol. Pharmacol.*, **39**, 511-516.

Krug H.F., Käfer A. & Dieterich H. (1993). The biochemical mechanisms of cellular toxicity of organolead and -tin compounds. In: *Frontiers of organogermanium, -tin and -lead chemistry*, Lukevics E. & Ignatovich L., Latvian Institute of Organic Synthesis, Riga, 273-281.

Landrigan P.J. (1989). Toxicity of lead at low dose. *Brit. J. Ind. Med.*, **46**, 593-596.

Lands W.E. (1979). In: *Geometrical and positional fatty acid isomers*, Emken E.A. & Dutton H.J., American Oil Chemists Society, Champaign, Illinois, 181.

- Lehman J.J., Brown K.A., Ramanadham S., Turk J. & Gross R.W. (1993).** Arachidonic acid release from aortic smooth muscle cells induced by [Arg⁸]vasopressin is largely mediated by calcium-independent phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.*, **268**, 20713-20716.
- Lewis D.L., Weight F.F. & Luini A. (1986).** A guanine nucleotide-binding protein mediates the inhibition of voltage-dependent calcium current by somatostatin in a pituitary cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 9035-9039.
- Linnebjerg H., Hansen H.S. & Jensen B. (1989).** Effect of amiloride on arachidonic acid and histamine release from rat mast cells. *Agents Actions*, **27**, 39-42.
- Lister M.D., Deems R.A., Watanabe Y., Ulevitch R.J. & Dennis E.A. (1988).** Kinetic analysis of the Ca²⁺-dependent, membrane-bound, macrophage phospholipase A₂ and the effects of arachidonic acid. *J. Biol. Chem.*, **263**, 7506-7513.
- Lister M.D., Glaser K.B., Ulevitch R.J. & Dennis E.A. (1989).** Inhibition studies on the membrane-associated phospholipase A₂ *in vitro* and prostaglandin E₂ production *in vivo* of the macrophage-like P388D₁ cell. Effects on manoilide, 7,7-dimethyl-5,8-eicosadienoic acid, and *p*-bromophenacyl bromide. *J. Biol. Chem.*, **264**, 8520-8528.
- Macfarlane D.E. (1981).** The effects of methyl mercury on platelets. Induction of aggregation and release via activation of the prostaglandin synthesis pathway. *Mol. Pharmacol.*, **19**, 470-476.
- Maki Y., Bos T.J., Davis C., Starbuck M. & Vogt P.K. (1987).** Avian sarcoma virus 17 carries the *jun* oncogene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2848-2852.
- Manome Y., Datta R. & Fine H.A. (1993).** Early response gene induction following DNA damage in astrocytoma cell lines. *Biochem. Pharmacol.*, **45**, 1677-1684.
- Marinovich M., Sanghvi A., Colli S., Tremoli E. & Galli C.L. (1990).** Cytoskeletal modifications induced by organotin compounds in human neutrophils. *Toxic. in vitro*, **4**, 109-113.
- McIntosh J.R. & Koonce M.P. (1989).** Mitosis. *Science*, **246**, 622-628.
- Morgan J.I., Cohen D.R., Hempstead J.L. & Curran T. (1987).** Mapping patterns of *c-fos* expression in the central nervous system after seizure. *Science*, **237**, 192-197.
- Mosialou E. & Morgenstern R. (1989).** Activity of rat liver microsomal glutathione transferase toward products of lipid peroxidation and studies of the effect of inhibitors on glutathione-dependent protection against lipid peroxidation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **275**, 289-294.
- Murakami Y., Satake M., Yamaguchi-Iwai Y., Sakai M., Muramatsu M. & Ito Y. (1991).** The nuclear protooncogenes *c-jun* and *c-fos* as regulators of DNA replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3947-3951.
- Murray A.W. & Kirschner M.W. (1989).** Dominoes and clocks: the union of two views of the cell cycle. *Science*, **246**, 614-621.

- Murray L.E., Singer R.A., Fenwick R.G. & Johnston G.C. (1991).** The G₁ interval in the mammalian cell cycle: dual control by mass accumulation and stage-specific activities. *Cell Prolif.*, **24**, 215-228.
- Nakamura T., Datta R., Sherman M.L. & Kufe D. (1990).** Regulation of *c-jun* gene expression by cAMP in HL-60 myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **265**, 22011-22015.
- Nakashima S., Suganuma A., Sato M., Tohmatsu T. & Nozawa Y. (1989).** Mechanism of arachidonic acid liberation in platelet-activating factor-stimulated human polymorphonuclear neutrophils. *J. Immunol.*, **143**, 1295-1302.
- Newburger P.E., Chovaniec M.E., Greenberger J.S. & Cohen H.J. (1979).** Functional changes in human leukemic cell line HL-60. A model for myeloid differentiation. *J. Cell Biol.*, **82**, 315-322.
- O'Brien J.R. (1963).** The effect of the alkyl tins on platelet aggregation. *Thromb. Diath. Haemorrh.*, **9**, 330-334.
- O'Farrell P.H., Edgar B.A., Lakich D. & Lehner C. (1989).** Directing cell division during development. *Science*, **246**, 635-640.
- Ohta H., Okajima F. & Ui M. (1985).** Inhibition by islet-activating protein of a chemotactic peptide-induced early breakdown of inositol phospholipids and Ca²⁺ mobilization in guinea pig neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **260**, 15771-15780.
- Okajima F. & Ui M. (1984).** ADP-ribosylation of the specific membrane protein by islet-activating protein, pertussis toxin, associated with inhibition of a chemotactic peptide-induced arachidonate release in neutrophils. A possible role of the toxin substrate in Ca²⁺-mobilizing biosignaling. *J. Biol. Chem.*, **259**, 13863-13871.
- Orrenius S., McConkey D.J., Bellomo G. & Nicotera P. (1989).** Role of Ca²⁺ in toxic cell killing. *Trends Pharmacol. Sci.*, **10**, 281-285.
- Pardee A.B. (1989).** G₁ events and regulation of cell proliferation. *Science*, **246**, 603-614.
- Poenie M., Alderton J., Steinhardt R. & Tsien R. (1986).** Calcium rises abruptly and briefly throughout the cell at the onset of anaphase. *Science*, **233**, 886-889.
- Raffray M. & Cohen G.M. (1991).** Bis(tri-*n*-butyltin)oxide induces programmed cell death (apoptosis) in immature rat thymocytes. *Arch. Toxicol.*, **65**, 135-139.
- Raffray M. & Cohen G.M. (1993).** Thymocyte apoptosis as a mechanism for tributyltin-induced thymic atrophy *in vivo*. *Arch. Toxicol.*, **67**, 231-236.
- Rehfeldt W., Resch K. & Goppelt-Struebe M. (1993).** Cytosolic phospholipase A₂ from human monocytic cells: characterization of substrate specificity and Ca²⁺-dependent membrane association. *Biochem. J.*, **293**, 255-261.
- Reuhl K.R., Gilbert S.G., Mackenzie B.A., Mallett J.E. & Rice D.C. (1985).** Acute trimethyltin intoxication in the monkey (*Macaca fascicularis*). *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **79**, 436-452.

- Riabowol K., Schiff J. & Gilman M.Z. (1992).** Transcription factor AP-1 activity is required for initiation of DNA synthesis and is lost during cellular aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 157-161.
- Ross M.I., Deems R.A., Jesaitis A.J., Dennis E.A. & Ulevitch R.J. (1985).** Phospholipase activities of the P388D₁ macrophage-like cell line. *Arch. Biochem. Biophys.*, **238**, 247-258.
- Rubin E., Kharbanda S., Gunji H., Weichselbaum R. & Kufe D. (1992).** cis-Diamminedichloroplatinum(II) induces *c-jun* expression in human myeloid leukemia cell: potential involvement of a protein kinase C-dependent signaling pathway. *Cancer Res.*, **52**, 878-882.
- Ryseck R-P., Hirai S.I., Yaniv M. & Bravo R. (1988).** Transcriptional activation of *c-jun* during the G₀/G₁ transition in mouse fibroblasts. *Nature*, **334**, 535-537.
- Scheuer W. (1989).** Phospholipase A₂ - regulation and inhibition. *Klin. Wochenschr.*, **67**, 153-159.
- Selwyn M.J. (1976).** Triorganotin compounds as ionophores and inhibitors of ion translocating ATPases. In: *Organotin compounds: New chemistry and applications*, Zuckerman J.J., American Chemical Society, Washington D.C., 204-226.
- Sendler A., Kaffenberger W., Nuyken I. & van Beuningen D. (1993).** Proliferation kinetics and PCNA expression of HL-60 cells following ionizing irradiation and granulocytic differentiation. *Cell Prolif.*, **26**, 531-543.
- Seth A., Gupta S. & Davis R.J. (1993).** Cell cycle regulation of the c-Myc transcriptional activation domain. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 4125-4136.
- Siegl P.K.S., Cragoe E.J., Trumble M.J. & Kaczorowski G.J. (1984).** Inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchange in membrane vesicle and papillary muscle preparation from guinea pig heart by analogs of amilorid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 3238-3242.
- Simons M., Morgan K.G., Parker C., Collins E. & Rosenberg R.D. (1993).** The proto-oncogene *c-myb* mediates an intracellular calcium rise during the late G₁ phase of the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, **268**, 627-632.
- Skehan P. (1988).** Control models of cell cycle transit, exit, and arrest. *Biochem. Cell Biol.*, **66**, 467-477.
- Snoeij N.J., Penninks A.H. & Seinen W. (1987).** Biological activity of organotin compounds - an overview. *Environm. Res.*, **44**, 335-353.
- Sparatore B., Passalacqua M., Patrone M., Pessino A., Melloni E. & Pontremoli S. (1993).** Differentiation of HL-60 promyelotic cells is promoted by a differentiation enhancing factor produced by erythroleukemia cells. *FEBS Lett.*, **334**, 198-202.
- Stokke M., Hagelin E.M., Poulsson C. & Brørs O. (1992a).** Ca²⁺ modulates the inhibition of (+)-[³H]isradipine binding by amiloride and quinacrine. *Europ. J. Pharmacol. - Molecular Pharmacology Section*, **227**, 379-384.

- Stokke M., Hagelin E.M., Poulsson C., Patel R., Haile Y. & Brørs O. (1992b).** Inhibition by amiloride and quinacrine of specific [³H]nitrendipine binding to rat cardiac membranes. *J. Pharmacol. Exp. Therap.*, **260**, 1366-1372.
- Strosznajder J. & Samochocki M. (1991).** Ca²⁺-independent, Ca²⁺-dependent, and carbachol-mediated arachidonic acid release from rat brain cortex membrane. *J. Neurochem.*, **57**, 1198-1206.
- Tebbey P.W. & Buttke T.M. (1993).** Independent arachidonic acid-mediated gene regulatory pathways in lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **194**, 862-868.
- Testi R., Pulcinelli F.M., Cifone M.G., Botti D., Del Grosso E., Riondino S., Frati L., Gazzaniga P.P. & Santoni A. (1992).** Preferential involvement of a phospholipase A₂-dependent pathway in CD69-mediated platelet activation. *J. Immunol.*, **148**, 2867-2871.
- Ulevitch R.J., Watanabe Y. & Sano M. (1988).** Solubilization, purification, and characterization of a membrane-bound phospholipase A₂ from the P388D₁ macrophage-like cell line. *J. Biol. Chem.*, **263**, 3079-3085.
- Walsh T.J., McLamb R.L., Bondy S.C., Tilson H.A. & Chang L.W. (1986).** Triethyl and trimethyl lead: effects on behavior, CNS morphology and concentrations of lead in blood and brain of rat. *NeuroToxicol.*, **7**, 21-34.
- Wang N. & Rasenick M.M. (1991).** Tubulin-G protein interactions involve microtubule polymerization domains. *Biochemistry*, **30**, 10957-10965.
- Werlen G., Belin D., Conne B., Roche E., Lew D.P. & Prentki M. (1993).** Intracellular Ca²⁺ and the regulation of early response gene expression in HL-60 myeloid leukemia cells. *J. Biol. Chem.*, **268**, 16596-16601.
- Wiebkin P., Prough R.A. & Bridges J.W. (1982).** The metabolism and toxicity of some organotin compounds in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 409-420.
- Wilson R.E., Taylor S.L., Atherton G.T., Johnston D., Waters C.M. & Norton J.D. (1993).** Early response gene signalling cascades activated by ionising radiation in primary human B cells. *Oncogene*, **8**, 3229-3237.
- Wolf D. & Rotter V. (1985).** Major deletions in the gene encoding the p53 tumor antigen cause lack of p53 expression in HL-60 cells. *Proc. Natl. Acad. USA*, **82**, 790-794.
- Wu F.Y.H., Chang N.T., Chen W.J. & Juan C.C. (1993).** Vitamin K3-induced cell cycle arrest and apoptotic cell death are accompanied by altered expression of *c-fos* and *c-myc* in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncogene*, **8**, 2237-2244.
- Zaucke F. (1993).** Struktur-Wirkungs-Beziehungen trialkylierter Zinnverbindungen bei der Zytotoxizität und ihren biochemischen Wirkungen in menschlichen HL-60 Zellen. *Diplomarbeit*, Universität Karlsruhe.
- Zawia N.H. & Harry G.J. (1993).** Trimethyltin-induced *c-fos* expression: adolescent vs neonatal rat hippocampus. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **121**, 99-102.

Zelikoff J.T., Hartwig A., Wang X.W., Costa M. & Rossman T.G. (1988). Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis*, **9**, 1727-1732.

Zimmermann H.P., Doenges K.H. & Röderer G. (1985). Interaction of triethyl lead chloride with microtubules *in vitro* and in mammalian cells. *Exp. Cell Res.*, **156**, 140-152.

Zimmermann H.P., Faulstich H., Hänsch G.M., Doenges K.H. & Stournaras C. (1988). The interaction of triethyl lead with tubulin and microtubules. *Mutation Res.*, **201**, 293-302.

Zimmermann H.P., Plagens U. & Traub P. (1987). Influence of triethyl lead on neurofilaments *in vivo* and *in vitro*. *NeuroToxicol.*, **8**, 569-578.

Zimmermann H.P., Plagens U., Vorgias C.E. & Traub P. (1986). Changes in the organization of non-epithelial intermediate filaments induced by triethyl lead chloride. *Exp. Cell Res.*, **167**, 360-368.

ANHANG

Wirkung von Quinacrin, EGTA, Verapamil und Amilorid auf die fMLP- bzw- Ionophor-induzierte Arachidonsäure-Freisetzung in DMSO differenzierten HL-60 Zellen.

		Arachidonsäure- und Eicosanoid-Gehalt in % der Gesamttaktivität des Lipidextraktes ¹⁴ C-markierter HL-60 Zellen nach 10minütiger Behandlung mit fMLP bzw. A23187 unter Einfluß verschiedener Substanzen							
Behandlung	Konzentration	Kontrolle		fMLP 1 µM		A23187 10 µM		A23187 1 µM	
		freie AA	Eicosanoide	freie AA	Eicosanoide	freie AA	Eicosanoide	freie AA	Eicosanoide
Kontrolle	-	0,3 ± 0,03	0,7 ± 0,08	1,3 ± 0,44	0,8 ± 0,10	8,2 ± 1,49	4,1 ± 0,72	6,5 ± 1,1	2,6 ± 0,27
Quinacrin	1 mM	0,2 ± 0,04	2,7 ± 0,03	0,2 ± 0,11	2,5 ± 0,37	0,3 ± 0,09	2,9 ± 0,21	n.b.	n.b.
EGTA	5 mM	0,2 ± 0,02	0,6 ± 0,07	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,5 ± 0,19	0,6 ± 0,04
Verapamil	100 µM	0,3 ± 0,10	1,0 ± 0,15	0,3	0,56	n.b.	n.b.	1,8 ± 0,19	1,0 ± 0,21
Kontrolle	-	0,3 ± 0,06	0,7 ± 0,1	3,5 ± 0,57	1,1 ± 0,29	16,1 ± 2,75	4,4 ± 0,44	-	-
Amilorid	1 mM	0,3 ± 0,05	1,4 ± 0,32	3,2 ± 0,62	0,9 ± 0,18	18,2 ± 2,48	3,7 ± 0,31	n.b.	n.b.

Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardfehler. Bei Angabe des Standardfehlers wurden drei oder mehr unabhängige Experimente durchgeführt.
n.b.: nicht bestimmt.