

Entwicklung neuer Biomarker zur Detektion von Umweltbelastung

Untersuchungen zur Genotoxizität von UV-Strahlung und Schwermetall-Ionen bei Invertebraten (Schwammzellen) sowie bei höheren Vertebraten (humane Zelllinien)

Dissertation

Zur Erlangung des Grades
Doktorin der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Aus dem Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie,
Abteilung für Angewandte Molekularbiologie**

Vorgelegt von: Dipl. Biologin Nazar Janipour

	Inhaltverzeichnis	Seite
1	Einleitung	1
1.1	Schwämme	1
1.1.1	Besonderheiten von Schwämmen	1
1.1.2	Bioaktive Substanzen aus Schwämmen	5
1.2	DNA-Schädigung und Reparatur	7
1.2.1	Struktur der DNA	7
1.2.2	Ursachen der DNA-Schädigung	9
1.2.3	Formen der DNA Schädigung	10
1.2.3.1	Spontane Mutationen der DNA	10
1.2.3.2	A-Purin und A-Pyrimidinstellen	12
1.3	UV-Strahlung	13
1.3.1	UV-Strahlung auf der Erdoberfläche	13
1.3.2	Negative Wirkung der UV-Strahlung auf den Menschen	13
1.3.3	UV-Strahlung und Hautkrebs	14
1.3.4	Behandlungsmethoden	15
1.3.5	Therapieansätze der aktuellen Forschung auf den Menschen	17
1.3.6	Positive Wirkungen der UV-Strahlung auf den Menschen	18
1.4	DNA-Schäden durch chemische Einflüsse	19
1.4.1	Radikalbildner	19
1.4.2	Aromatische Nitroverbindungen	21
1.4.3	Schwermetall-Ionen	22
1.4.3.1	Cadmium und seine physiologische Wirkung	22
1.4.3.2	Zink und seine physiologische Bedeutung	23

1.4.3.3	Kobalt und seine physiologische Wirkung	24
1.4.3.4	Kupfer und seine physiologische Wirkung	25
1.4.3.5	Nickel und seine physiologische Wirkung	25
1.5	Reparatur	26
1.6	Die Bedeutung von Schwermetallen und anderen gentoxischen Substanzen für Umwelt und Gesundheit	29
2	Zielstellung der Arbeit	31
3	Material und Chemikalien	32
3.1	Chemikalien	32
3.2	Geräte	33
3.3	Laborzubehör und Verbrauchsmaterialien	33
3.4	Medien und Seren	34
3.5	Zellen	34
3.6	Puffer und Lösungen	34
4	Methoden	36
4.1	Kultur und Isolation	36
4.1.1	Kultivieren von HeLa-Zellen	36
4.1.2	Isolierung von Schwammzelle S. domuncula	36
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl	37
4.2	Benutze Lampe	38
4.2.1	StrataLinker UV-Crossliker	38
4.2.2	Bestrahlung am Linearbeschleuniger der Klinik und Poliklinik für Radiologie	38
4.2.3	UV-Bestrahlung und Induktion der Zellen	38
4.2.4	Bestrahlung des Zellen für Reparaturversuche	39

4.3	NQO-Behandlung	39
4.3.1	Behandlung mit Schwermetall-ionen	39
4.4	DNA- Strangbruch Assay	39
4.4.1	Detaillierter Ablauf	40
4.4.2	Auswertung	40
5	Ergebnisse	41
5.1	Untersuchungen mit HeLa-Zellen	41
5.1.1	Einfluss von NQO auf HeLa-Zellen	41
5.1.2	Einfluss von energiereicher Strahlung auf HeLa-Zellen	43
5.1.3	Effekt von UV-C Strahlung auf HeLa-Zellen	46
5.1.4	Effekt von UV-C Strahlung und Cadmium auf HeLa-Zellen	47
5.1.5	Effekt von UV-B-Strahlung auf HeLa-Zellen	49
5.1.6	Effekt von UV-A-Strahlung auf HeLa-Zellen	50
5.2	Untersuchungen mit Schwammzellen (<i>Subrites domuncula</i>)	52
5.2.1	Effekt von UV-B und UV-A auf Schwammzellen	52
5.2.2	Effekt von UV-B und UV-A auf Schwammzellen und deren Reparatur	53
5.2.3	Reparatur in Abhängigkeit von der Zeit nach induzierter Schädigung mit UV-A und UV-B	54
5.3	Effekt einer Kombinierten Bestrahlung von Schwammzellen mit Cd und UV-B	56
5.3.1	Cadmiuminduzierte DNA-Schäden in <i>S. domuncula</i>	56
5.3.2	Effekt einer kombinierten Cadmium und UV-A- Bestrahlung der DNA	57

5.3.3	Auswirkung von Cadmium in Kombination mit UV-B oder UV-A und anschließender Reparatur der DNA-Schäden	58
5.4	UV-Bestrahlungen von Schwammzellen in unterschiedlichen Medien	60
5.4.1	Effekt von UV-B und UV-A auf Schwammzellen in verschiedenen Umgebungsmedien und Reparatur	61
5.4.1.1	Schwammzellen nach UV-Bestrahlung und 30 Minuten Reparatur	61
5.4.1.2	Schwammzellen nach UV-Bestrahlung und 60 Minuten Reparatur	62
5.4.1.3	Schwammzellen nach UV-Bestrahlung bei 24h Reparatur	63
5.5	Effekt von verschiedenen Schwermetall-Ionen auf Schwammzellen	65
5.5.1	Behandlung von Schwammzellen mit Schwermetall-ionen und	66
5.6	Effekt von Schwermetall-Ionen in verschiedenen Konzentrationen auf die DNA-Integrität.	67
5.6.1	Effekt der Cd-Konzentration auf Schwammzellen	67
5.6.2	Effekte von Nickel sowie verschiedenen Medien auf die DNA	68
5.6.3	Effekt von Kobalt auf Schwammzellen	69
5.6.4	Effekt von Kupfer auf die DNA	70
5.6.5	Effekt von Zink auf die DNA	71
5.7	Effekt von verschiedenen Schwermetall-Ionen in Kombination mit UV-A bzw. UV-B auf Schwammzellen	72
5.7.1	Effekt von Kobalt und gleichzeitiger UV-Bestrahlung auf die DNA	72
5.7.2	Effekt von Nickel bei gleichzeitiger UV-Bestrahlung	

	auf die DNA	73
5.7.3	Effekt von Kupfer bei gleichzeitiger UV-Bestrahlung auf die DNA	74
5.7.4	Effekt von Zink mit gleichzeitiger UV Bestrahlung auf die DNA	76
6	Diskussion	77
7	Zusammenfassung	86
8	Abkürzungsverzeichnis	88
9	Literaturverzeichnis	90

1 Einleitung

1.1 Schwämme

1.1.1 Besonderheiten von Schwämmen

Schwämme oder Poriferen bilden einen eigenen Tierstamm, der als Metazoa bezeichnet wird. Schwämme sind die am einfachsten organisierten Vielzeller. Sie sind mehr als eine Milliarde Jahre alt. Die stammesgeschichtliche Herkunft der Poriferen war bis vor kurzem unbekannt (Kästner, 1993). Es blieb unklar, ob diese niedersten Metazoen sich unabhängig von einer getrennten Protozoen-Linie ableiten (polyphyletischer Ursprung der Tiere) oder sich mit den übrigen Metazoen vor etwa 800 Millionen Jahren aus den gleichen Einzellern zu multizellulären Tieren entwickelt haben (Monophylie). Mit dem Auffinden von molekularen Strukturen der extrazellulären Matrix bei Schwämmen, die als charakteristisch für höhere Metazoa angesehen werden (Müller *et al.*, 1997), konnte der monophyletische Ursprung der Metazoa begründet werden (Abb. 1, aus: Müller *et al.*, 1993).

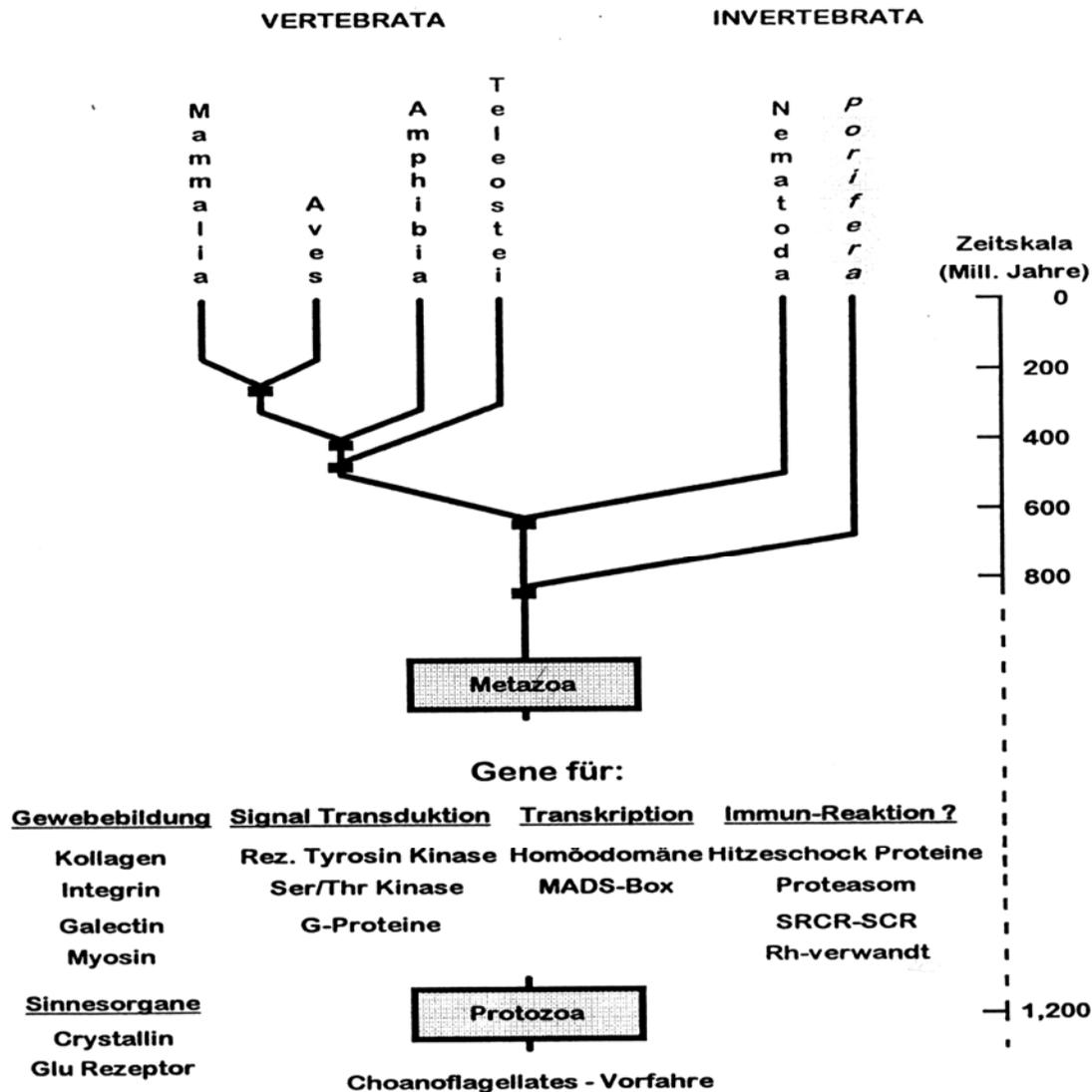


Abb. 1.1: *Phylogenetischer Stammbaum. Nach Müller, 1998, modifiziert.*

Es existieren mehrere tausend Schwammarten, von denen etwa 120 Arten im Süßwasser zu finden sind. Porifera sind aquatische Metazoa mit formschönem Bauplan. Sie unterscheiden sich von allen anderen Tierstämmen durch das Fehlen von Muskelgewebe sowie Sinnes und Nervenzellen.

Der gesamte Bauplan der Schwämme ist auf das Herbeistrudeln und Abfiltrieren kleinster Nahrungspartikel zugeschnitten, was vom Litoral bis in größere Tiefen geschieht (Wehner, 1990). Die Grundform der Schwämme ist ein Schlauch, der am unteren Ende festgewachsen ist und mit der oberen Öffnung (Osculum) nach

außen mündet. Die gesamte Oberfläche des Schwammes ist mit zahlreichen Poren übersät. Durch diese Poren strömt Wasser in den Gastralraum ein, der den Körper durch die obere Öffnung verlässt (Storch & Welsch, 1991). Der Wasserstrom wird durch Kragengeißelzellen (Choanozyten) erzeugt. Entwicklungsgeschichtlich entspricht die Auskleidung des Gastralraumes durch die Choanozyten dem Entoderm der übrigen Metazoen. Die Hauptmasse des Körpers ist ein gallertartiges Bindegewebe, ein Mesenchym.

Die Körperbedeckung ist das Ektoderm; es wird meist als Plattenepithel bezeichnet. Die Mesenchymzellen sind zum Teil Wanderzellen, die der Nahrungsverarbeitung und dem Stofftransport dienen. Ferner bilden sie Stützstrukturen oder scheiden als Skleroblasten das innere Skelett der Schwämme ab. Dieses besteht aus Nadeln oder Fasern aus Kalk, Kieselsäure oder Spongin. Es gibt dem sonst weichen Körper Festigkeit, dient als Schutz gegen Tierfraß und gegen das Eindringen größerer Körper in die Gastralhöhle, da die Nadeln über die Oberfläche des Schwammes herausragen können. Aus Mesenchymzellen bilden sich die Geschlechtszellen, die im Bindegewebe verstreut liegen (Wehner, 1990).

Die Schwämme weisen drei prinzipielle Bautypen auf: den Ascontyp, den Sycontyp und den Leucontyp (Abb.1 2).

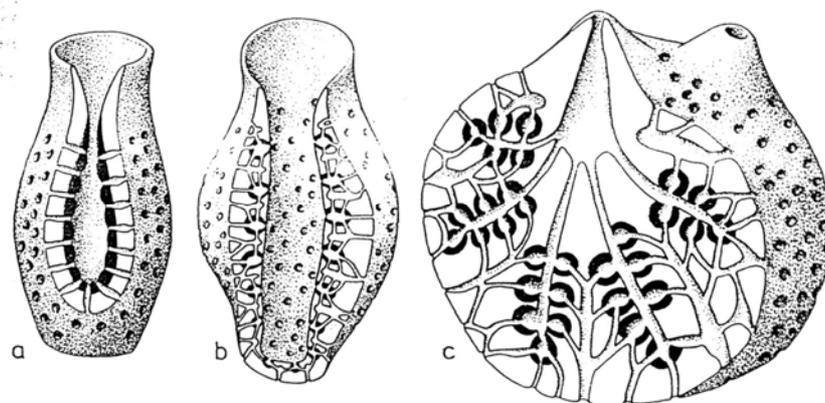


Abb. 1.2: Baupläne der Schwämme. Gastrodermis (Entoderm) dick schwarz. a. Ascontyp, b. Sycontyp, c. Leucontyp. Von Storch und Welsch (1991) übernommen.

Die primitivste Form ist ein einheitlicher Hohlraum, der in seiner ganzen Ausdehnung von Kragengeißelzellen ausgekleidet wird (Ascontyp, Abb. 1.2a). Die zweite Bauform zeigt einen durch Entwicklung von Radialtuben erzielten Oberflächenzuwachs des Hohlraumes (Sycontyp, Abb. 1.2b). Die dritte Bauform weist zahlreiche, in das Dermallager eingebettete Geißelkammern auf, deren Kanäle in zentrale, innere Hohlräume münden (Leucontyp, Abb. 1.2c). Dadurch wird die resorptionsfähige Oberfläche vervielfacht. Der Aufbau beim Leucontyp, der bei den meisten Kalkschwämmen, aber auch bei anderen Schwämmen vorkommt, ermöglicht diesen Proiferen ein sehr schnelles und ausgedehntes Wachstum. Durch die Vergrößerung der der Nahrungsaufnahme dienenden Epithelfläche in den engen Räumen wird den winzigen Geißeln optimale Wirksamkeit verliehen (Sara, 1983).

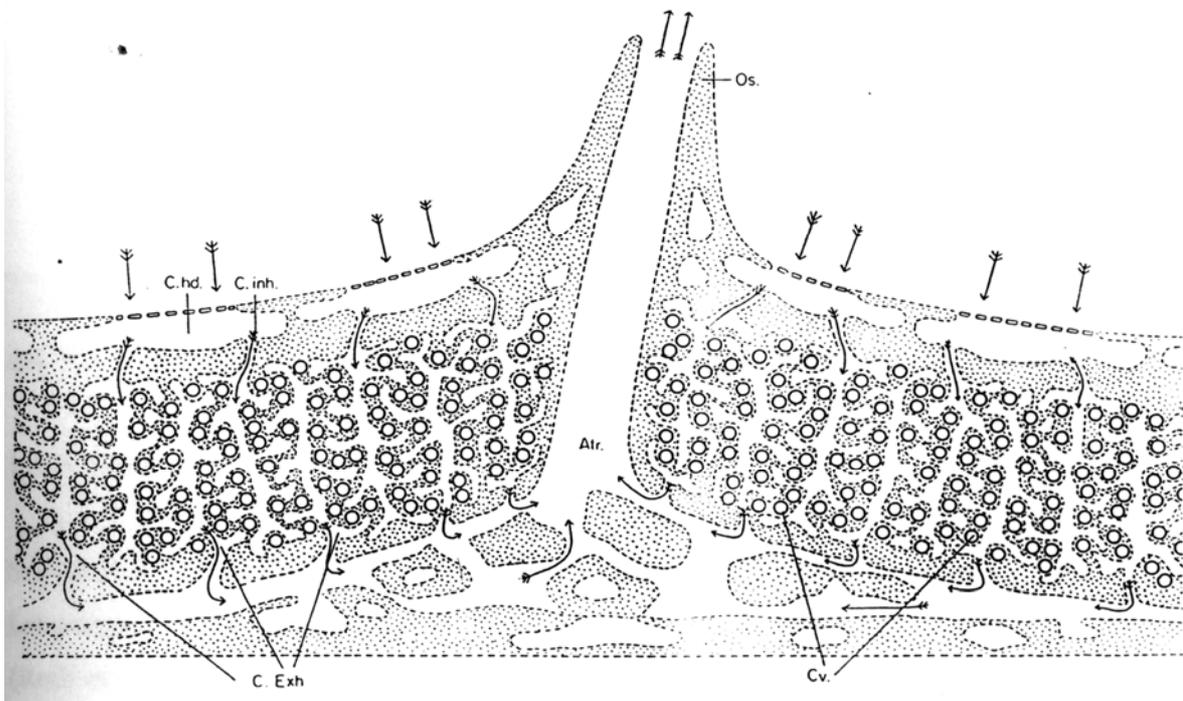


Abb. 1. 3: Schema des Aufbaus eines Schwammes vom Leucontyp in einer Kolonie. Os. Osculum, Atr. Innere Höhlung (Atrium), C.hd. hypodermale Höhlungen und

Einströmkanäle, C. inh. Einströmkanäle, C. Exh. Auströmkanäle, Cv. Kammern mit Cillien. Erkennbar sind auch die drei Schichten des Mesenchym; Ectoderm, Choanoderm und Mesohyl. Die Pfeile verdeutlichen die Richtung des Wasserstromes. Von Brien (1968) übernommen.

1.1.2 Bioaktive Substanzen aus Schwämmen

Schwämme bieten einer ganz erstaunlichen Vielfalt von "Bewohnern" Raum. Lebensgemeinschaften mit Algen (Trigt, 1912), Bryozoen (Wierzycki, 1935), Pilzen (Roth *et al.*, 1962) und Bakterien (Bertrand und Vacelet *et al.*, 1973) sind beschrieben worden.

Die Erforschung möglicher Regulationsprinzipien, die gegenseitige Vorteile für die verschiedenen Mitglieder der Lebensgemeinschaft bieten und somit Symbiosen begründen würden, führte zur Entdeckung Wachstumsfördernder und wachstumshemmender Substanzen. Als Wachstums promotoren wurden in erster Linie einige Lektine aus verschiedenen Poriferen erkannt (Bretting *et al.*, 1981; Dodd *et al.*, 1968; Müller *et al.*, 1981a & 1983).

Auch die Suche nach Wachstumsinhibitoren führte zur Entdeckung einiger Substanzen, die das Wachstum sowohl von prokaryontischen als auch eukaryotischen Zellen hemmen. Diese Verbindungen stellten sich als nicht einheitliche Substanzklasse dar. Es wurden Nucleoside (1- β -D-Arabinofuranosylcytosin, 1- β -D-Arabinofuranosylthymidin und 1- β -D-Arabinofuranosyluracil; *Cryptoththia crypta*; (Bergmann & Burk, 1955; Bergmann & Feeney, 1951; Müller *et al.*, 1972 und 1978; Müller & Zahn, 1979), Sesquiterpene (Avarol & Avaron; *Dysidea avara*; Müller *et al.*, 1985 und 1985a), ein Tryptophanderivat (Aplysinopsin; *Verongia spengelii*; Chen *et al.*, 1993; Hollenbeak & Schmitz, 1977), Peptide (Axinastatin 1, 2 und 3, *Axinella sp.*; Pettit *et al.*, 1991 und 1994) und eine Fülle von halogenierten Tyrosinabkömmlingen (z.B. Dichloroverongiaquinol, Bromoverongiachinol, Aerolysin-1, Aerolysin-2, Aerothionin, *Verongia species*, Ambrosio *et al.*, 1983 und 1984; Andersen &

Faulkner, 1973; Buckley, 1992; Burkholder & Rützler, 1969; Chib *et al.* 1977; Fattorusso *et al.*, 1970 und 1970a; Sharma & Burkholder *et al.*, 1967) gefunden. Des Weiteren wurde aus dem Schwamm *Cliona vastifica* eine Sustanz isoliert, die spezifisch Calciumkanäle blockiert, die vom Nicht-L-Typ sind (Morel *et al.*, 1997). Die Blockade von Calciumkanälen ist einer der Ansätze in der Therapie von Schlaganfällen und anderen ischämischen Krankheiten.

1.2 DNA-Schädigung und Reparatur

1.2.1 Struktur der DNA

Zu den wichtigsten zellulären Makromolekülen zählen Proteine, Lipide, Kohlenhydrate und Nucleinsäuren. Charakteristisch für alle diese Moleküle ist, dass sie aus niedermolekularen Bausteinen durch kovalente Bindungen zu polymeren Strukturen verknüpft sind.

Nucleinsäuren sind die zellulären Makromoleküle, die als Träger und Überträger der genetischen Information dienen. Die Nucleinsäuren lassen sich nach ihrer chemischen Struktur in Desoxyribonucleinsäuren und Ribonucleinsäuren untergliedern.

Bereits gegen Ende des 19. Jahrhunderts wurden entscheidende Aufschlüsse gewonnen, die darauf hindeuteten, dass der Kernsubstanz im Rahmen der Vererbung eine zentrale Rolle zugemessen werden muss (Alberts, 1986). Obwohl es Friedrich Miescher bereits 1869 gelang, eine Substanz zu isolieren, die er aufgrund ihrer Herkunft aus dem Nucleus als Nuclein bezeichnete, dauerte es dennoch bis in die vierziger Jahre des 20. Jahrhunderts, bis man hierin die DNA erkannte. Zur Aufklärung der DNA-Struktur führten schließlich die röntgenstrukturanalytischen Untersuchungen von Watson und Crick (Watson & Crick, 1953).

Ähnlich wie Proteine bilden DNA Moleküle aus niedermolekularen Bausteinen polymere unverzweigte Ketten. Die besondere Struktur dieser Makromoleküle prädestiniert die DNA als Träger der genetischen Information (Löffler & Petrides 1998). Bausteine der DNA sind die Nucleotide, die sich aus einer organischen Base (Purin oder Pyrimidin), der Pentose Desoxyribose und einem Phosphatrest zusammensetzen. Zu den in der DNA vorkommenden Basen zählen die Purinbasen Adenin und Guanin sowie die Pyrimidinbasen Cytosin und Thymin. Die Basen sind jeweils über eine N-glykosidische Bindung mit dem C-Atom 1' der Pentose verbunden. Durch Veresterung der OH-Gruppe am C-Atom 5' mit einer

Phosphatgruppe entsteht ein Nucleotid (Knippers *et al.*, 1990; Löffler *et al.*, 1998). Über Phosphodiesterbindungen zwischen am 3'-C-Atom der einen Pentose und dem 5'-C-Atom der folgenden Pentose bilden die einzelnen Mononucleotide eine lange, unverzweigte Kette aus. In der DNA sind zwei solcher Polynucleotidketten aneinandergelagert und werden über eine Vielzahl molekularer Wechselwirkungen zusammengehalten. In der DNA bildet jeweils eine Purinbase mit einer Pyrimidinbase über Wasserstoffbrückenbindungen ein komplementäres Basenpaar. Hierbei kommt es zwischen Adenin und Thymin zur Ausbildung von zwei, zwischen Guanin und Cytosin von drei H-Brücken. Aufgrund der komplementären Basenpaarung sowie von hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Basen schlugen Watson und Crick für die Struktur der DNA ein räumliches Modell vor, das durch spätere Untersuchungen bestätigt werden konnte (Watson & Crick, 1953). Hiernach ist die DNA als Doppelhelix angeordnet, die sich aus zwei zueinander komplementären, antiparallel verlaufenden Strängen zusammensetzt. Die hydrophoben Basen zeigen in dieser Struktur nach innen, die nach außen gerichteten hydrophilen Bestandteile (Desoxyribosen und Phosphatreste) stellen quasi das Rückgrat der Doppelhelix dar. Durch röntgenstrukturanalytische Untersuchungen fand man heraus, dass es drei verschiedene Konformationen gibt, in denen die Doppelhelix angeordnet sein können die A, die B und die Z-Form. Der überwiegende Teil der DNA liegt in vivo in der B-Form vor, die aus einer rechts gewundenen Doppelhelix mit ca. zehn Basen je Windung auf einer Länge von 3,3 nm besteht. Ihr Durchmesser beträgt 2,37 nm. Durch Dehydratisierung kann die B-Form in die A-Form übergehen. Auch die A-Form stellt eine rechtsgewundene Doppelhelix dar. Sie hat jedoch einen größeren Durchmesser, wobei eine Windung etwa 11 Basen umfasst. Bei der Z-Form handelt es sich um eine linksgängige Doppelhelix mit einer Ganghöhe von 4,56 nm und einer Anordnung von 12 Basen je Windung. Sie macht jedoch nur einen sehr geringen Anteil der zellulären DNA aus (Löffler & Petrides *et al.* 1998).

1.2.2 Ursachen der DNA-Schädigung

Aufgrund ihrer Funktion als Träger der Erbinformation der Zellen ist die Integrität der DNA eine Grundvoraussetzung für das Überleben und die Vermehrung. Nur geringfügige Veränderungen können toleriert werden (Lehninger, *et al.*, 1998). Dennoch ist die DNA ein relativ instabiles Molekül, das sogar spontan, d.h. ohne exogene Einflüsse, eine Desintegrationsrate von mehr als 100.000 Basen pro Zellen und Tag aufweist (Friedberg *et al.*, 1985).

Veränderungen der DNA können auf vielfältige Weise, zum Beispiel durch die Einwirkung von chemischen Agentien oder durch energiereiche Strahlung wie Röntgen-, Gamma- oder UV-Strahlung, aber auch spontan, entstehen. Die Schädigung der DNA durch UV-Strahlung ist in der Abb. 1.4 dargestellt. Der überwiegende Teil der DNA-Schädigungen wird jedoch nicht manifest, da Sie von zellulären Reparatursystemen erkannt und eliminiert werden (Schröder *et al.*, 1986). Den Schädigungen der DNA kommt eine zentrale Bedeutung im Rahmen von Alterungsprozessen und bei der Tumorgenese zu.

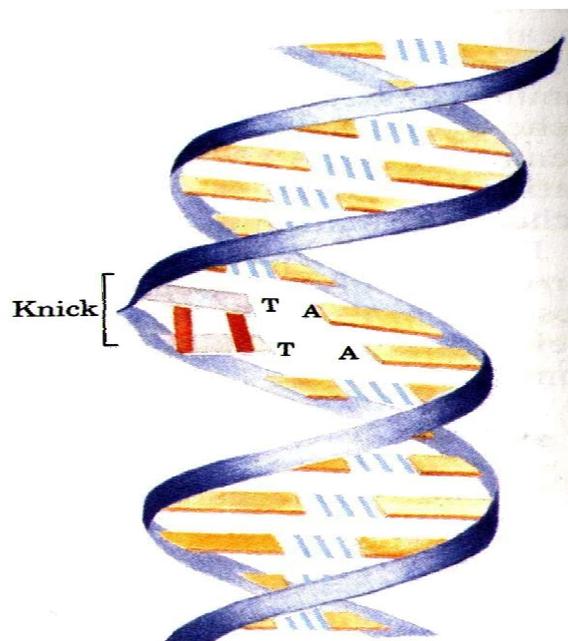


Abb. 1.4: Ursachen von DNA-Schäden. Durch UV-Licht ausgelöste Bildung von Thymindimeren, modifiziert nach (Lehninger *et al.*, 1998).

1.2.3 Formen der DNA-Schädigung

1.2.3.1 Spontane Mutationen der DNA

Während der DNA-Replikation kann es gelegentlich dazu kommen, dass an Stelle der korrekten Base eine falsche Base eingebaut wird. Während des Prozesses der Replikation bilden sich Wasserstoffbrückenbindungen zwischen einem Nucleotid des Matrizenstranges und dem neu hinzukommenden Nucleotid aus. Die korrekte Basenpaarung hat für die Synthese des neu synthetisierten DNA-Strangs zwei wichtige Konsequenzen. Einerseits sind Wasserstoffbrücken, die zwischen korrekt gepaarten Basen zustande kommen, stabiler als solche, die sich zwischen falsch gepaarten Basen bilden. Andererseits bewirken korrekt eingebaute Nucleotide eine stärkere Konformationsänderung der DNA-Polymerase und somit einen höheren Aktivierungsgrad des Enzyms, was für die Knüpfung der Phosphodiesterbindung zwischen Nucleotid und Primer von zentraler Bedeutung ist (Knippers, 2001). Zwar verlässt durch diese Mechanismen normalerweise kein unkorrekt gepaartes Basenpaar das aktive Zentrum des Enzyms, aber hin und wieder kann es trotzdem im Rahmen der DNA-Replikation zum Falscheinbau einer Base kommen. Bereits Watson und Crick haben auf diese Möglichkeit der falschen Basenpaarung hingewiesen (Watson & Crick 1953). Nach Watson und Crick kommt die Base Thymin in geringem Maße statt in der normalen Ketoform in der Enolform vor und kann so mit Guanin an Stelle von Adenin paaren. In der gleichen Weise kann die Base Guanin statt in der Aminoform in der Iminoform vorkommen, wodurch eine Paarung zwischen Guanin und Thymin möglich wird (Löffler & Petrides, 1998; Knippers, 2001).

Falsch eingebaute Nucleotide können noch während des Prozesses der DNA Replikation von einer 3'5' Exonucleaseaktivität, die eine Teilaktivität von zahlreichen DNA-Polymerasen darstellt, erkannt und beseitigt werden (Löffler & Petrides; 1998; Knippers *et al.*, 1990, 2001).

Eine weitere Möglichkeit, Veränderungen, die durch falsch eingebaute Basen entstehen, zu korrigieren, liefert das sogenannte Mismatch-Reparatur-System, das

zunächst an *E.coli* Mutanten untersucht wurde. Bei Eukaryonten ist es weniger gut erforscht (Leninger *et al.*, 1998).

Grundlage dieses Systems ist die Methylierung der Sequenz GATC im Genom von *E.coli*. Da bei der Replikation die DNA Methylierung quasi „hinterher hinkt“ ist vorübergehend nur ein Teil der beiden Stränge methyliert. Hierdurch kann der nicht methylierte, neu synthetisierte DNA-Strang als solcher erkannt und repariert werden (Knippers *et al.*, 1990 & 2001).

Das Reparatursystem besteht aus einem Proteinkomplex, der sich aus den Proteinen MutS, MutH, MutL, einer DNA-Helikase II, SSB-Proteinen, einer 3'5'-Exonuclease (Exonuclease I) sowie einer 5'3' Exonuclease (RecJ-Protein oder Exonuclease VII), der DNA-Polymerase III und einer Ligase zusammensetzt (Modrich, 1991; Modrich *et al.*, 1996). Den ersten Schritt im Rahmen dieses Reparaturmechanismus stellt die Bindung von MutS an das falsche Basenpaar dar. Hierdurch wird die Anlagerung von MutL und im Anschluss die Bindung des Proteins MutH, das den DNA-Strang im Bereich der unmethylierten Basenfolge GATC schneidet, möglich. Durch das Enzym Helikase wird der Strang entwunden und dann durch die Aktivität der Exonucleasen I und VII abgebaut. Die entstandene Lücke wird durch Neusynthese, katalysiert durch das Enzym DNA-Polymerase III sowie durch die anschließende Ligation der neu synthetisierten Abschnitte, geschlossen. Das Mismatch-Reparatur-System der Eukaryonten ist im Vergleich zum Reparatursystem von *E.coli* in der Lage, auch längere DNA-Abschnitte zu entfernen. Eine wichtige klinische Bedeutung kommt diesem System bei der Genese des nicht polypösen Colonicarcinoms zu (Knippers, 2001).

1.2.3.2 A-Purin- und A-Pyrimidinstellen

Durch die Einwirkung von Chemikalien oder durch hohe Temperaturen auf die DNA kann es über hydrolytische Spaltung der N-glycosidischen Bindung zwischen Base und Desoxyribose zur Ausbildung von so genannten A-Purin-Stellen kommen. Nach Entfernung der Base verbleibt das Zucker-Phosphatgerüst an der Stelle der fehlenden Base.

Bei der Bildung von A-Pyrimidinstellen entsteht zunächst durch Desaminierung aus der Base Cytosin Uracil. Diese Veränderung kommt spontan bis zu 400-mal im Säugergenom vor. Viel seltener ist im Gegensatz hierzu die Desaminierung von Adenin zu Hypoxanthin (Löffler & Petrides, 1998; Knippers *et al.*, 1990, 2001). Da Uracil im Gegensatz zu Cytosin mit Adenin paart, wird statt der korrekten Base Guanin die Base Adenin in den DNA-Strang eingebaut. Um solche mutationsbedingten Falscheinbauten zu vermeiden, besitzt die Zelle eine Uracil-DNA-Glycosylase (Löffler & Petrides, 1998; Knippers *et al.*, 1990 & 2001). Das Enzym erkennt die normalerweise in der DNA nicht vorkommende Base Uracil und spaltet die N-glykosidische Bindung zwischen Base und dem Zuckerphosphatgerüst. Hierbei entsteht eine AP-Stelle.

Da AP-Stellen Orte gesteigerter Mutagenese sind, muss die Zelle über ein entsprechendes Reparatursystem verfügen. Als Reparatursystem steht der Zelle eine AP-Endonuclease zur Verfügung. Das Enzym ist in der Lage, den DNA-Strang am 5'-Ende nahe der AP-Stelle aufzuschneiden, wodurch auf der einen Seite der Strangöffnung ein Desoxyribose-Phosphatrest, auf der anderen ein freies 3' OH-Ende entsteht. Der Desoxyribose-Phosphatrest wird von einer Desoxyribophosphodiesterase (dRPase) abgebaut. Anschließend wird die entstandene Lücke durch Neusynthese und Ligation wieder geschlossen. Dieser Prozess wird von den Enzymen DNA-Polymerase und einer Ligase katalysiert (Knippers, 2001).

1.3 UV-Strahlung

1.3.1 UV-Strahlung auf der Erdoberfläche

Die von der Sonne ausgesendete optische Strahlung reicht von Wärmespendender Infrarotstrahlung (IR) über die sichtbare Strahlung (Licht - VIS) bis hin zur ultravioletten Strahlung (UV). Etwa 6% der gesamten auf die Erde treffenden Sonnenstrahlung ist unsichtbare ultraviolette Strahlung. Je nach

Wellenlänge wird sie in verschiedene Bereiche aufgeteilt: UV-A: 320-400 nm; UV-B: 280-320 nm; UV-C; 200-280 nm. Je kürzer die Wellenlänge ist, desto energiereicher ist die Strahlung, und desto höher ist ihre biologische Wirksamkeit. Die biologische Wirksamkeit hängt von der Energie und von Extinktions-Koeffizienten der UV-Absorption der Moleküle ab.

In den oberen Schichten der Atmosphäre wird die UV-C-Strahlung durch molekularen Sauerstoff nahezu vollständig absorbiert. Dabei wird Ozon gebildet. Ozon ist ein sehr reaktives Gas mit der chemischen Formel O_3 . Dieses Ozon wirkt seinerseits als Filter für ultraviolette Strahlung. Die Filterwirkung von Ozon hängt wesentlich von der Wellenlänge der Strahlung ab. Im energiereichen kurzwelligeren UV-B-Bereich ist diese besonders groß. Dadurch fällt auf der Erdoberfläche bei Wellenlängen zwischen 305 nm und 295 nm die UVB-Bestrahlung um das Tausendfache ab. Man spricht von einer *UV-B-Kante*. Daher macht sich im Bereich der UV-B-Strahlung eine Änderung des Ozongehaltes stark bemerkbar. Im Gegensatz hierzu erreicht die längerwellige UV-A Strahlung fast vollständig die Erde. (Website, Bundesamt für Strahlenschutz, www.bfs.de).

1.3.2 Negative Wirkung der UV-Strahlung auf den Menschen

Je intensiver die Sonne strahlt, desto höher ist die Belastung der Haut durch UV-Strahlung. Das ungeschützte Auge sowie die ungeschützte Haut unterliegen generell einem strahlenbedingten Risiko durch UV-Strahlen. Bei der biologischen Wirkung dieser Strahlen muss zwischen akuter und chronischer Wirkung unterschieden werden. Zu den akuten Wirkungen zählen Erytheme (Sonnenbrand) und Bindehautentzündungen der Augen. Im Sommer kann ungeschützte und nicht lichtgewöhnte Haut in Abhängigkeit vom Hauttyp in einer halben Stunde die Erythemschwelle erreichen (Website, Bundesamt für Strahlenschutz, <http://www.bfs.de>). Die minimale erythemwirksame Strahlendosis wird durch diejenige Energiemenge pro Flächeneinheit (J/m^2) ausgedrückt, die eine klar abgegrenzte Hautrötung auf der sonnen-exponierten Hautfläche bewirkt (Sonnenbrand). Eine minimale erythemwirksame Dosis

entspricht beim Menschen einem UV-Strahlungsfluss von etwa 200 J/m² bei einer Wellenlänge von 297 nm.

Am Auge bewirken langfristig stark erhöhte UV-B-Expositionen Linsentrübungen (Grauer Star). Auch Deformationen der Linsenkapseln sind als Wirkung bekannt. Bei Zunahme der UV-B-Strahlung durch Abnahme des Gesamtzongehalts würden diese Krankheitsbilder vermehrt auftreten.

Auch über Einflüsse der UV-Strahlung auf das Immunsystem wurde berichtet. Da chronische UV-Exposition zu einer Schwächung des Immunsystems beitragen kann, ist ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von Infektionskrankheiten vorhanden (Website, Bundesamt für Strahlenschutz, www.bfs.de).

Neben vorzeitiger Hautalterung kann als schwerwiegendste Folge einer chronischen UV- Exposition Hautkrebs auftreten.

1.3.3. UV-Strahlung und Hautkrebs

Weltweit nehmen Hautkrebserkrankungen der hellhäutigen Bevölkerung alarmierend zu. Krebs ist keine einheitliche Krankheit, sondern ein Oberbegriff für mehr als hundert verschiedene Formen bösartiger maligner Erkrankungen. Nahezu jedes Gewebe des menschlichen Körpers kann solche Entartungen hervorbringen, manchmal sogar mehrere verschiedene Typen. Trotz dieser Verschiedenheiten entstehen alle Tumore offensichtlich durch recht ähnliche grundlegende Prozesse (Vogelstein & Kinzler, 1993).

Vor allem drei Charakteristika machen die besondere Schädlichkeit vieler Krebsformen aus:

- ungebremste Vermehrungsfähigkeit der entarteten Zellen (Zelltransformation).
- Eindringen in das umgebende normale Gewebe (Verlust der Proliferationskontrolle) und

- Metastasenbildung (Verlust der Positionskontrolle).

Da Hauttumore sich sehr langsam entwickeln, scheint zwischen der Entstehung von Melanomen und der UV-B-Bestrahlung ein direkter Zusammenhang zu bestehen: Bei einer langfristigen Ozonabnahme um 1% steigt die Häufigkeit bösartiger Melanome um 2%. Melanome sind aufgrund ihres Gehaltes an Melanin gelb bis schwarz gefärbte melanozytäre Tumore. Zu einer anderen Tumorart, die unter erhöhter Sonneneinstrahlung beobachtet wurden, zählen die Karzinome. Bei den meisten handelt es sich da bei um so genannten Plattenepithelkarzinomen.

1.3.4 Behandlungsmethoden

Bis jetzt konnte noch keine zufrieden stellende Therapie gegen Krebs gefunden werden. Alle bisher verwendeten Methoden haben entscheidende Nachteile, die vor allem durch Nebenwirkungen bedingt sind. Deshalb befasst sich die aktuelle Forschung mit der Suche nach Therapien oder Medikamenten deren Nebenwirkungen entscheidend schwächer sind als die der bisher bekannten, oder die überhaupt keine Nebenwirkungen besitzen, was dem Idealfall entspräche (Hellman & Vokes, 1996).

Heute werden normalerweise drei Behandlungsmethoden kombiniert angewandt:

- Operation
- Strahlentherapie
- Chemotherapie

Die älteste und immer noch effektivste Methode ist die Operation, die vor allem bei Krebs im Frühstadium die größten Erfolge erzielt. Bei der anschließenden Strahlentherapie wird der betroffene Körperteil intensiven Röntgen- oder Gammastrahlen ausgesetzt. Auf diese reagieren Zellen, die sich teilen, empfindlich. Da Tumorzellen sich besonders schnell teilen, sterben diese schneller ab, bzw. erholen sich schlechter von der Einwirkung der Strahlung als die gesunden Zellen. Eine solche Therapie kann damit die anatomische Struktur rings

um die Geschwulst erhalten und Krebs ohne bleibende Funktionseinbußen heilen. Allerdings betrifft die Strahlentherapie auch normale Zellen, die sich permanent teilen, wie z.B. Blutzellen, oder die Zellen von Haut und Haaren. Der dritte Weg der Behandlung, die Chemotherapie, ist dazu gedacht, Metastasen zu zerstören.

Die vier wichtigsten Gruppen von Wirkstoffen sind heute:

- Antimetabolite, die die Replikation der DNA stören (Leninger *et al.*, 1998)
- Topoisomerase-Hemmer, die durch Hemmung der Topoisomerase Strangbrüche in der DNA verursachen und damit die Apoptose auslösen (Caldecott *et al.*, 1990; Kohn *et al.*, 1987; Wartens *et al.*, 1991).
- alkylierende Wirkstoffe, die sich mit bestimmten DNA-Bausteinen verbinden, dadurch Strangbrüche verursachen und damit letztendlich wieder die Apoptose auslösen, und
- pflanzliche Alkaloide, die durch Bindung an Tubulin die Zellteilung verhindern.

Diese Medikamente können jedoch schwere Nebenwirkungen auslösen, welche wiederum die zulässigen Dosen einschränken (Hellman & Vokes, 1996). Des Weiteren wurde festgestellt, dass Tumorzellen im Gegensatz zu gesunden Zellen bei längerer Anwendung von kombinierter Strahlen- und Chemotherapie resistent gegen die zytotoxische Wirkung dieser Behandlungen werden (Osmak & Perovic, 1989).

1.3.5 Therapieansätze der aktuellen Forschung auf den Menschen

Neuartige Ansätze, die teilweise schon klinisch erprobt werden, versprechen eine gezielte Behandlung von Krebs, ohne die starken Nebenwirkungen vieler konventioneller Therapien.

Einige Versuche zielen darauf, das Immunsystem für die Zerstörung entarteter Zellen zu rekrutieren. Dieser Vorschlag wurde schon 1957 von Prehen und Main gemacht. Die Idee ist, die Oberflächenproteine zu isolieren, die sich bei Tumorzellen von denen gesunder Zellen unterscheiden, und dann mit einem dazu passenden Antikörper das Immunsystem gegen diese Zellen zu aktivieren

(Bergers et al.; 1992 & 1993; Ho *et al.*, 1990, Jiskoot *et al.*, 1989; Shibata *et al.*, 1991; Srivastava, 1991; Stevenson; 1992).

Andere nutzen die Fülle neuer Erkenntnisse darüber, wie Tumore wachsen und metastasieren. Die in den letzten Jahren entdeckten Abnormitäten in Genetik, Stoffwechsel und Signalaustausch von Krebszellen dienten zur Entwicklung von molekularen Behandlungsstrategien, bei denen Gene in Zellen eingeschleust werden, die bestimmte Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen. Diese Gene sollen die Zerstörung des Tumors von innen einleiten (Bishop, 1991; Boguski & McCormick, 1993; Ho & Sapolsky, 1998). Weitere molekulare Methoden zielen auf das Blockieren bestimmter Enzyme oder die Aktivierung der Kontrolle des DNA-Reparatur – Mechanismus (Oliff *et al.*, 1996).

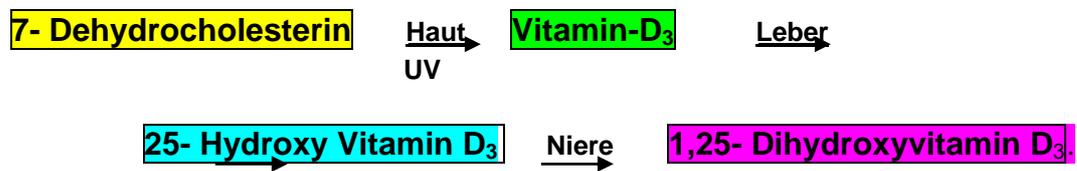
In weiteren vielversprechenden Ansätzen wird versucht, das Wachstum von Gefäßen in Tumoren zu verhindern, so dass die Zufuhr von Sauerstoff, Nährstoffen und anderen Faktoren abgeschnitten wäre (O'Reilly *et al.*, 1996; Teicher *et al.*, 1995).

Außerdem werden Therapien erprobt, bei denen die Tumorzellen mittels Wärme bekämpft werden. Die Zellen des Patienten werden hierbei unter starken Stress gesetzt, indem die Körpertemperatur auf über 41°C erwärmt wird.

1.3.6 Positive Wirkungen der UV-Strahlung auf den Menschen

In Hinblick auf den positiven Wirkungen der UV-Strahlung ist vor allem die lebensnotwendige Bildung von Vitamin D₃ zu nennen. Bei der Vitamin-D₃-Synthese im menschlichen Körper kann Vitamin-D₃ endogen aus Cholesterol hergestellt werden. Vit-D₃ wird zur Vorsorge gegen Rachitis (Knochenweiche) gebraucht. Es entsteht aus 7-Dehydrocholesterin in der Haut durch ultraviolette Photolyse in der Haut. Vitamin-D₃ ist zunächst inaktiv, es wird jedoch durch zwei Hydroxylierungsreaktionen, die in verschiedenen Organen stattfinden, aktiviert. Die erste Reaktion findet in der Leber statt und führt zu 25-Hydroxyvitamin-D₃. Die zweite Hydroxylierung findet in der Niere statt und führt zu 1,25-Dihydroxyvitamin-D₃.

Schematische Darstellung:



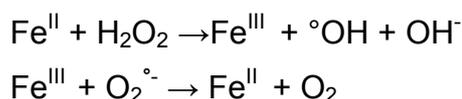
Positive Wirkungen werden durch Licht und UV-Strahlung auch bei therapeutischen Anwendungen, z.B. zur Behandlung von Hautkrankheiten, zugeschrieben. Daneben ist für viele Menschen die erwünschte Bräunung der Haut mit UV-Strahlung von hohem subjektivem Wert (Selbstwertgefühl, Modebewusstsein) (Lubert Stryer, 1991).

1.4 DNA- Schäden durch chemische Einflüsse

1.4.1 Radikalbildner

Im Hinblick auf die Tumorgenese und Gewebeschädigung haben in jüngster Zeit die so genannten freien Radikale eine immer größere Aufmerksamkeit erlangt (Böcker, Denk, Heitz; 2001).

Hierbei handelt es sich um Substanzen, die entstehen, wenn „einzelne“ Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden, wobei Singulett-Sauerstoff entsteht durch Spinumkehr der beiden ungepaarten Elektronen des Triplett-Sauerstoffs unter anderem Singulett-Sauerstoff und in dessen Folge das Superoxyradikal entsteht. Als zentraler Mechanismus, der zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies führt, ist hier die Einwirkung von reaktiven Substanzen wie Ozon oder Schwefeldioxid (Hoigne & Bader., 1975; Staehelin & Hoigne *et al.*, 1985) zu nennen. Ein weiterer Reaktionsmechanismus bei der Bildung von Superoxidradikalen stellt die so genannte Fenton-Reaktion dar, bei der durch die katalytische Wirkung von Fe-Ionen Elektronen auf Sauerstoff übertragen werden (Halliwell & Aruoma *et al.*, 1991).



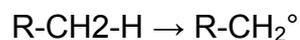
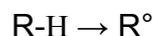
Obwohl die Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffspezies auf die DNA vor allem bei *E.coli* untersucht wurden, lassen sich hieraus dennoch wichtige Hinweise auf mögliche, für den menschlichen Organismus relevante, DNA-schädigende Mechanismen gewinnen (Feig *et al.*, 1994).

Unter der Exposition mit reaktiven Sauerstoffmolekülen wurde hauptsächlich Transversionen (C zu G, G zu C, A zu T-) beobachtet ((McBride *et al.*, 1991)). Eine weitere, unter H_2O_2 und CuCl_2 beobachtete Mutation waren CC- und TT-Dimere, wobei diese letztendlich auch auf die durch diese Verbindungen hervorgerufene Bildung von Superoxid-, Hydroxyl und anderen reaktiven Radikalen zurückzuführen ist (Tkeshelashvili *et al.*, 1991). Interessanterweise

konnten Pyrimidindimere wie TT und CC-Tandems auch unter Exposition mit ultraviolettem Licht beobachtet werden. In Modellexperimenten, die mit gezielten Deletionen arbeiteten, konnte bei *E.coli*, gezeigt werden, dass die Art der Mutation sehr stark von der jeweiligen DNA-Polymerase abhängig ist. So führte die Verwendung von DNA-Polymerase I hauptsächlich zu A-C, C-T, G-C und G-T-Transversionen, während unter Polymerase III C-A, G-A und C zu T Substitutionen auftraten (Feig & Loeb *et al.*, 1993). Dies lässt darauf schließen, dass reaktive Sauerstoffverbindungen nicht nur ihren Angriffspunkt auf der DNA selbst haben, sondern auch zu Veränderungen an DNA-Polymerasen führen (Loeb *et al.*, 1994).

DNA-Mutationen, die durch reaktive Sauerstoffmoleküle induziert werden, haben im Rahmen der humanen Tumorgenese in jüngster Zeit eine immer größere Bedeutung erfahren. Beispielhaft soll hier auf die Genese des auf dem Boden einer Hepatitis B sich entwickelnden Leberzellkarzinoms erwähnt werden. Neben Aflatoxin werden als kanzerogene Agentien auch Sauerstoffradikale, die im Rahmen der Entzündungsreaktion gebildet werden, diskutiert (Chirsari *et al.*, 1989; Feig *et al.*, 1994; Böcker, *et al.*, 2001).

Bedeutung von Radikalfängern im Organismus: Die Sauerstoffradikale reagieren mit Lipiden, DNA-Basen und Proteinen. Eine Besonderheit der Reaktionen von freien Radikalen mit anderen Molekülen besteht darin, dass das Reaktionsprodukt wieder ein freies Radikal ist, z. B



Dadurch entstehen gefährliche Kettenreaktionen! Radikalfänger unterbrechen diese Kettenreaktionen!

Beispiel für Radikalfänger Vit C, Vit E, Harnsäure

Antioxidantien, z.B. Resveratol (Rotwein) (Uni-Leipzig; Biochemie Vorlesung 2002/ Oxidasen.)

1.4.2 Aromatische Nitroverbindungen

Aromatische Nitroverbindungen gelten als starke Karzinogene. Ein wichtiger Vertreter dieser Substanzklasse ist 4-Nitrochinoline -1-Oxid (NQO). Die stark karzinogene Aktivität von 4-Nitrochinoline -1-Oxid (NQO) wurde schon 1957 beschrieben (Nakahara *et al.*, 1957). Bei Ratten verursacht es bei oraler Verabreichung Lungenkrebs (Ohne *et al.*, 1985) und bei tropischer Applikation Mundkrebs (Crane *et al.*, 1986). Die hohe Mutagenität konnte auch im Ames-Test nachgewiesen werden (McCann, 1975).

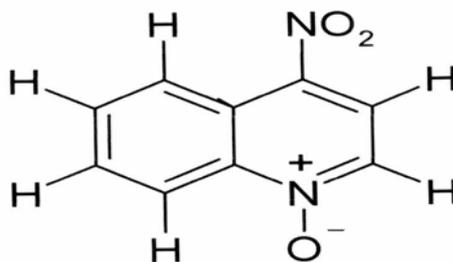


Abb. 1.5: 4- Nitrochinolin-1-Oxid Strukturformel

Wie viele andere aromatische Nitroverbindungen wird auch NQO sowohl in Bakterien als auch in Säugerzellen durch Reduktion in hochreaktive freie Radikalmetaboliten umgewandelt (Rosenkranz, Memmerstein, 1983, Rickert, 1987). Als Katalysatoren fungieren hierbei mikrosomale und zytosolische Nitroreduktasen, wie z.B. die mikrosomale NADPH-Cytochrom P450 Reduktase oder die zytosolische Xanthinoxidase (Mason, 1982; Mason, Josephy, 1985). Das dabei durch Reduktion an der Nitrogruppe entstehende 4-Hydroxyaminochinolin 1-Oxid (4-HAQO) wird anschließend unter Vermittlung der Seryl-t-RNA-Synthetase durch einen Seryl-AMP Enzymkomplex acyliert. Dabei entsteht das vermutliche Hauptmutagen Seryl-4-hAQO (Singer, Grunberger *et al.*, 1983). Einen weiteren wichtigen Metaboliten stellt 4- Nitrosochinolin N-Oxid (4-NOQ) dar, es handelt sich hierbei um ein 2- Elektronenreduktionsprodukt von NQO (Ishizawa, Endo, 1967). Nitro-Anionenradikale können direkt Membranen, Proteine und DNA schädigen (Wardman *et al.*, 1995). Darüber hinaus können sie in einen Redoxzyklus mit

Sauerstoff eintreten, wobei unter Regeneration der Ausgangssubstanzen (=NQO) Superoxid-Radikale entstehen (Mason & Holtzman; 1975), die wiederum die Zellen schädigen.

1.4.3 Schwermetall Ionen

1.4.3.1 Cadmium und seine physiologischen Wirkungen

Cadmium kommt natürlicherweise in Felsen und Böden vor, gewöhnlich in Konzentrationen von weniger als 1 µg/g (Thornton *et al.*, 1992). Industriell wird es genutzt als Komponente von Pigmenten, in Cadmium enthaltenden Batterien wurde als Stabilisator benutzt. Höhere Konzentrationen von Cadmium werden in verschmutzten Küstenregionen, insbesondere im Bereich von Flussmündungen, gefunden (Thornton *et al.*, 1992). Verglichen mit dem offenen Meer ist Cadmium in doppelt so hohen Mengen in marinen Sedimenten angereichert; lokale Konzentrationen können um das 5-10 fache höher liegen (Jensen & Bro-Rasmussen, 1992). Menschliche Quellen für Cadmiumverschmutzung sind unter anderem der Einsatz von Düngemitteln oder das Ausbringen von Abwasserschlamm (Thornton *et al.*, 1992). Obwohl Cadmium in den Meeren nur in Spuren vorkommt, können in marinen Organismen höhere Konzentrationen des Metalls durch Bioakkumulation auftreten (Ray *et al.*, 1986; Clark *et al.*, 1997).

Der Körper des Erwachsenen enthält ca. 30 mg Cd, das ein nicht-essentielles Element ist. Im Organismus wird es an Metallothionein gebunden transportiert. Es wird über Calcium-Kanäle der Plasmamembranen in die Zellen aufgenommen (Beyersmann & Hechtenberg, 1997). Cadmium ist für Menschen und Tiere genotoxisch und krebserregend (Shiraishi *et al.*, 1995, Latinwo *et al.*, 1997).

Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, dass Cadmium Karzinome induziert, deren Genese Gemeinsamkeiten zu humanen Tumoren erkennen lassen (L.S. Clesceri *et al.*, 1989, 382ff). Weiterhin wurde gezeigt, dass bereits geringe Mengen zu vaskulären Veränderungen der Nierenarterien führen. Außerdem kann die orale Aufnahme von löslichen Cadmiumssalzen Erbrechen und andere Krankheiten wie Störungen im Gastrointestinaltrakt, Leberschädigungen und Krämpfe auslösen. (Braun & Dönhardt, 1987, S.89ff.)

Von Cadmium-Verbindungen wurde gezeigt, dass sie DNA-Strangbrüche induzieren, Chromosomale Abweichungen hervorrufen und eine Hemmung der

DNA-Reparaturprozesse bewirken (Hartwig, 1994). Zudem kann Cadmium apoptotische DNA-Fragmentation induzieren; wie es zum Beispiel in Testisgewebe von Ratten (Xu *et al.*, 1996) und in Schweinenieren (Ishido *et al.*, 1995) nachgewiesen wurde. In menschlichen Nierenzellen wird Apoptose durch polymerisiertes Cadmium-Metallothionein induziert (Hamada *et al.*, 1996). Außerdem hemmen höhere Konzentrationen dieses Metallions die DNA-, RNA- und Protein-Biosynthese. Auf der anderen Seite werden durch Cadmium auch Schutzsysteme stimuliert, z.B. die Induktion von Metallothioneinen (Baumen *et al.*, 1993) oder Glutathion (Mikhailova *et al.*, 1997; Bagchi *et al.*, 1996).

1.4.3.2 Zink und seine physiologische Bedeutung

Zink (Zn) ist ein für Menschen, Tiere, Pflanzen und Mikroorganismen lebensnotwendiges Spurenelement. Zink wird im allgemein mit Fleisch, Milch, Fisch, sowie mit Getreideprodukten in ausreichender Menge aufgenommen. Der Zink-Gehalt des menschlichen Organismus beträgt 2-4 g. Blut enthält 6-12 mg/l, Leber 15-93 mg/kg, und Gehirn 5-15 mg/kg, am Zink-reichsten ist die Prostata mit (ca.9 mg/g). Beobachtete Schwankungen dürften im Zusammenhang mit dem Insulin- Stoffwechsel stehen, da Insulin mit 2 od. 4 Zn^{2+} -Ionen Aggregate bilden kann.

Zinkionen sind als Bestandteil vieler Enzyme an der Katalyse zahlreicher Reaktionen beteiligt. Wichtige so genannte Zink-Metalloenzyme sind z.B. die Carboanhydrase, die Carboxypeptidase A, die Superoxiddismutase, die Alkohol-Dehydrogenase und verschiedene Alkoholphosphatasen. Andere Enzyme wie z. B. Oxidoreduktasen oder DNA-Polymerasen werden durch Zink aktiviert (Kägi & Nordberg, 1979). Bei Mikroorganismen ist Zink ein begrenzender Faktor der Biosynthese von DNA und Protein. Zink spielt auch eine wichtige Rolle bei der Wundheilung und bei den Nachtsehern.

Bei Säugern und Vögeln äußert sich Zink-Mangel in verschiedenartigen Krankheiten, wie Wachstumsstörungen, Haarausfall, Lethargie oder Hypogonadismus.

Toxische Konzentrationen von metallischem Zink und Zink-Salzen liegen weit höher als bei anderen essentiellen Spurenelementen. Die orale Aufnahme von 1 bis 2 g Zink-Salz wie Zinkchlorid od. Zinksulfat führt beim Menschen nach wenigen Minuten zu einer akuten, aber vorübergehenden Übelkeit. Die Symptome können Unpässlichkeit, Schwindel, Erbrechen, Kolik und Durchfall einschließen.

1.4.3.3 Kobalt und seine physiologische Wirkung

Bedeutung besitzt Kobalt (Co) als essentielles Spurenelement. Es ist das Zentralatom im Vitamin B12, das hauptsächlich zur Bildung der roten Blutkörperchen benötigt wird. Der Tagesbedarf beim Menschen beträgt $3\mu\text{g}$ Vitamin B12 (0, $1\mu\text{g}$ Cobalt) (Recommended Dietary of Allowances, Wash.: National Academy of Sciences 1980). Wiederkäuer benötigen Co, damit Vitamin B12 durch Bakterien im Pansen synthetisiert werden kann.

In Regionen mit Kobalt-armen Böden können deshalb Mangelkrankheiten (Hinsch-Krankheit; Bush Sickness) auftreten, die sich durch geringe Co-Gabe in Form von Co(II)-Salzen vermeiden lassen (Merian, 1984).

Kobalt besitzt bei oraler Aufnahme für den Menschen eine relative geringe Giftigkeit. Erst bei Dosierungen von 25-30 mg pro Tag tritt eine toxische Wirkung auf, die zu Haut- und Lungenerkrankungen, Magenbeschwerden, Leber, Herz und Nierenschäden führt.

1.4.3.4 Kupfer und seine physiologische Wirkung

Das Metall Kupfer ist sowohl für den Menschen und höhere Tiere als auch für zahlreiche Pflanzen ein essentielles Spurenelement, und zwar als Bestandteil

von kupferhaltigen Enzymen, z.B. Cytochrom-Oxidase, Lysyloxidase und Superoxiddismutase. Daneben zeigt Kupfer insofern physiologische Wirkung, als dass es in saurer Umgebung Spuren von löslichen Salzen abgibt, die Cu-Ionen bilden. Diese wirken auf niedere Pflanzen (Algen, Kleinpilze, Bakterien) schon in sehr geringen Mengen als starkes Gift. Die molluskizide Wirkung des Cu versuchte man zur Bekämpfung von Bilharziose- Zwischenwirten zu nutzen.

Vom tierischen Organismus werden im Allgemeinen verhältnismäßig große Mengen Cu ohne besondere Nachteile vertragen. So hat man gefunden, dass der Mensch mit der Nahrung täglich bis zu 1-5 mg Cu aufnimmt, davon wird aber nur weniger als (0,5-2 mg) resorbiert. Die Inhalation von Dämpfen und Rauch kann jedoch das so genannte Metall-Fieber verursachen (Braun-Dönhardt, 1987).

1.4.3.5 Nickel und seine physiologische Wirkung

Nickel zählt zu den essentiellen Spurenelementen: Der menschliche Körper enthält ca. 10 mg. Zur biologischen Rolle ist noch wenig bekannt, doch scheint es am Kohlenhydrat-Stoffwechsel beteiligt zu sein. Die Konzentration im Serum und Harn beträgt ca. 2,5 µg/l, in den Haaren dagegen 220 µg/kg.

Atembare Stäube oder Aerosole von Nickel-Metall, NiS, NiO und NiCO₃ gelten als eindeutig krebserzeugend. Nickel kann sensibilierend wirken und bei empfindlichen Personen Dermatitis auslösen. Lösliche Nickelverbindungen sind beim Verschlucken Magen-Darm-reizend und können bei lokaler Exposition zu Haut-, Augen und Atemwegsreizungen führen (Braun-Dönhardt, 1987, S.270; Ludewig-Los, 1984, S.321f).

1.5 Reparatur

DNA-Schädigung ist ein häufiges Ereignis. Die meisten Schäden werden jedoch nicht manifest, weil sie durch zelluläre Reparatursysteme korrigiert werden.

Generell kann die Reparatur entweder zu einer fehlerfreien Korrektur des DNA-Schadens führen, oder durch Einbau einer komplementären Base gegenüber oder an Stelle des DNA-Schadens zu einer Mutation führen.

Die wichtigsten Reparatursysteme sind:

Nuclotidexzisionsreparatur (NER)

SOS-System

Bei der fehlerfreien Nuclotidexzisionsreparatur (NER) codieren die drei Gene *uvrA*, *B* und *C* für die Polypeptide der Exzisionsreparaturendonuclease. Dieses Enzym erkennt eine Verzerrung der DNA-Helix, die z.B durch Thymindimere oder Methylreste an den Basen hervorgerufen wurden und schneidet an jeder Seite der Mutation, 12-13 Nucleotide voneinander entfernt, die DNA ein. Diese Reaktion generiert freie 3'-Hydroxylgruppen, die als Primer für die DNA-Polymerase und Ihre Reparaturfunktion dienen. Die defekte DNA zwischen den beiden DNA- Einzelstrangbrüchen wird durch die 5`-3`- Exonucleaseaktivität der *E.coli* DNA-Polymerase I abgebaut und gleichzeitig die korrekten komplementären Nucleotide eingeligiert. Die freien Enden werden dann, wie üblich, durch die DNA-Ligase verbunden (Braun-Dönhardt *et al.*, 1987).

Die DNA-Polymerase I repariert auch jede doppelsträngige DNA mit einer einzelsträngigen DNA-Region. Das vollständige Entfernen der geschädigten Basen gab diesem Reparaturweg seinen Namen Nuclotidexzisionsreparatur. Die darauf folgende Anlagerung der komplementären Basen erfolgt im Prinzip fehlerfrei und führt deshalb selten oder gar nicht zu Mutationen. Die NER wird vor der Replikation durchgeführt und repariert bevorzugt den transkribierten Strang der jeweiligen Gene.

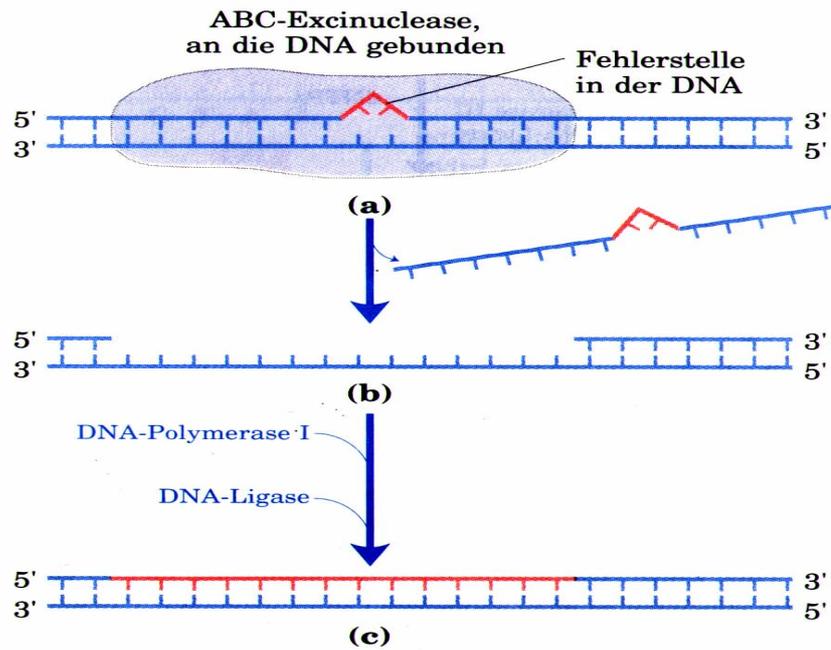


Abb. 1.6: Mechanismen der Nucleotid-Excisionsreparatur bei *E. Coli*. a) Eine spezielle Nuclease bindet an der sperrigen Fehler stelle an die DNA und spaltet den schadhafte Strang an der achten Phosphodiesterbindung auf der 5'- Seite des Fehlers sowie an der vierten oder fünften Phospho-diesterbindung auf der 3'- Seite. b) Dann entfernt die Excinuclease das resultierende aus 12 bis 13 Basen-Paaren bestehende Oligonucleotid, das die schadhafte Base enthält. c) Die entstandene Lücke wird von der DNA-Polymerase I aufgefüllt und von der Ligase verschlossen. (Leninger et, al., 1996)

Postreplikative DNA-Reparatur erfolgt bei Bakterien über das SOS-System unter Beteiligung des RecA-Proteins. Bei der Replikation eines DNA-Strangs mit einem Schaden wird gegenüber diesem DNA-Schaden eine Lücke auf dem neu synthetisierten Tochterstrang gelassen. RecA katalysiert unter ATP-Verbrauch mit einem Stück des anderen Elternstrangs, der diese Lücke auffüllt. Nach erfolgter Replikation dieses DNA-Stücks ist der Schaden allerdings immer noch auf einem der Tochter-DNA-Stränge enthalten. Der Schaden wird durch das UvrABC-Exisionsreparatursystem herausgeschnitten und mit den richtigen Basen gegenüber dem eingesetzten. Das nun gegenüber dem zweiten Tochterstrang fehlende Stück wird durch die DNA-Polymerase anhand des

Tochterstrangtemplates aufgefüllt und durch die DNA-Ligase verbunden. So werden beide Stränge annähernd fehlerfrei über einen Schaden hinaus repliziert. Diese Reparatur ist jedoch nicht mehr fehlerfrei möglich, wenn mehrere Schäden in unmittelbarer Nähe auf beiden Strängen gegenüber liegen, weil dann kein ungeschädigter Templatestrang mehr zur Verfügung steht. Außerdem liegen die Gene *umuD* und *umuC* unter der Kontrolle des *lexA*-Repressors im SOS-Reparatursystem. Die Genprodukte dieser Gene werden für die SOS-Induzierte Mutagenese benötigt, so dass der Reparaturweg auch zur Manifestation von Mutationen führt.

Es gibt zusätzlich die Möglichkeit der Synthese des Tochterstrangs an dem Schaden vorbei, ohne dass ein Strangaustausch stattfindet. In diesem Fall stoppt die Polymerase an einem Schaden und das RecA-Protein lagert sich zu einem ss-DNA-RecA-Komplex, der eine katalytische Aktivität aktiviert durch Spaltung des LexA-Protein, das ein Repressorprotein für die SOS-Gene ist. Eines dieser nun transkribierten SOS-Gene codiert für ein Protein, das die Polymerase veranlasst, ohne Korrektur (Proofreading) Basen gegenüber dem Schaden einzusetzen und die DNA-Polymerisierung so über die geschädigte Stelle hinweg weiterzuführen. Dadurch können nicht komplementäre, falsche Basen gegenüber der fehlerhaften Stelle eingefügt werden, die so zu Mutationen führen.

Im Vordergrund bei der Entstehung dieser Mutationen steht die Bildung von 8-Oxo-Guanin, das während der DNA-Replikation sowohl zum Einbau eines normalen Cytosins als auch zum Einbau von Thymin führt, wobei die Korrekturlesefunktion der 3'5'-Exonuclease nicht in der Lage ist, das falsch gepaarte Nucleotid zu erkennen (Grollman & Moriya, 1993; Knippers, 2001). In *E. coli* eliminiert das MutT-Genprodukt 8-Oxo-Guanin, indem es die endständige Phosphatgruppe abspaltet (Ebenda). Das MutM-Genprodukt, das auch in ähnlicher Form in Eukaryonten vorkommt, codiert für eine 8-Oxo-Guanin-Glycosylase, eine AP-Lyase sowie die Aktivität zur Bildung eines freien 3'OH-Endes. Die 8-Oxo-Glycosylase erkennt das falsche Nucleotid, das dann unter Bildung einer AP-Stelle, ähnlich wie im Falle der Uracil-DNA-Glycosylase entfernt wird (Knippers, 2001).

1.6 Die Bedeutung von Schwermetallen und anderen genotoxischen Substanzen für Umwelt und Gesundheit

Schwermetalle kommen überall vor, etw. im Boden, im Hausstaub oder im Leitungswasser.

Die Aufnahme der Schwermetalle erfolgt über die Luft, das Wasser und die Nahrung. Die Toxizität eines Schwermetalls beruht im Wesentlichen auf seiner hohen Affinität zu Proteinen. Die Proteine werden durch die Intoxikation strukturell verändert und daher biologisch inaktiv. Körpereigene Strukturen werden dabei so verändert, dass sie zum Angriffsziel des Immunsystems werden. Schwermetalle konkurrieren im Körper auch mit essentiellen Biometallen. Dieses führt daher auch zu einem Mangel an Spurenelementen, der dann typische Mangelerscheinungen auslöst. Die Blockade von einem Stoffwechsel-relevanten Enzym durch Schwermetalle führt je nach Belastung zu einer schleichenden Intoxikation, zu Schädigung und chronischer Vergiftung. Cadmium kann die Leberfunktion und die Nieren Funktion stören, zu Osteoporose, Spontan Fraktur, Knochenschmerzen, und Tumorbildung führen.

Ein anderes Schwermetall ist Zink. Zink ist Bestandteil des Insulins und verschiedener Enzyme. Eine ganze Reihe von Enzymen wird durch Zink aktiviert. Zink hat bei der Insulinspeicherung in der Bauchspeicheldrüse eine nicht unwesentliche Bedeutung. Das Verhältnis von Zn und Cu reguliert den Cholesteringehalt des Bluts. Ein Verhältnis 5:1 sorgt für einen normalen Cholesteringehalt im Blut. Wenn das Verhältnis von Zink zu Kupfer auf 10:1 gesteigert wird, erhöhen sich die Cholesterinwerte und begünstigen somit die Bildung einer Arteriosklerose. Zink hat eine Rolle bei der Inaktivierung von Viren und wirkt daher gegen Erkältungen und Virusinfektionen. Da Zink die Ausschüttung des Vitamins A aus der Leber anregt, ist es wichtig für die Gewebshheilung (Wundheilung). Bei Zinkmangel wird das Vitamin A vermehrt in der Leber gespeichert, wo es Schäden verursachen kann.

Kupfer spielt eine Rolle bei der Bildung roter Blutkörperchen, ist wichtig für die Funktion des Zentralnervensystems und für den Pigmentstoffwechsel. Kupfer ist auch wichtig für den Abwehrmechanismus (Immunantwort). Es eliminiert bestimmte Giftstoffe und beeinflusst sogar Allergien günstig.

Kupfer rückte in den letzten Jahren als möglicher Verursacher einer bestimmten Form von *Leberzirrhose* bei Säuglingen ins Blickfeld.

Kupfer spielt eine Rolle bei Krankheiten wie zum Beispiel *Morbus Wilson*, wo infolge beschränkter Ausscheidungskapazität ein *Kupferüberschuss* entsteht, der aber nicht nur Leberschäden hervorrufen, sondern auch zu neurologischen Ausfällen mit den Symptomen der Parkinson-Krankheit führt.

Dadurch werden Persönlichkeitsveränderungen, Depressionen und Schizophrenie ausgelöst. Die molekularen Mechanismen sind aber noch unbekannt. Die im Gehirn neurologisch auffälliger Wilson-Patienten gemessenen Cu-Konzentrationen sind diffus verteilt, während die funktionellen Störungen vor allem mit einer Störung der Funktion der Basalganglien in Verbindung zu bringen sind. Andere Krankheiten, die durch Cu verursacht werden, sind die neurodegenerative Erkrankung Amyotrophe Lateralsklerose und die Alzheimer-Krankheit (gilt als die häufigste Form der Demenz-Erkrankungen. (Umweltgift-Schwermetalle und ihre Auswirkungen aus Internet.)

2 Zielstellung der Arbeit

In dieser Arbeit wurden die (genetischen) Effekte der global zunehmenden UV-B Strahlung, die Bedeutung sowie Effekte von Schwermetall-Ionen und von aromatischen Nitroverbindungen auf die Integrität der DNA untersucht. Die genetischen Effekte der globalen UV-Strahlung und die Auswirkungen von Schwermetallionen auf die Integrität der DNA wurden anhand von zwei verschiedenen Zellmodellen untersucht: 1) von Schwammzellen als Vertreter von niederen und 2) von humanen HeLa-Zellen als Vertreter der höheren tierischen Organismen. Die Arbeiten sollten dazu dienen, ein besseres Verständnis der Auswirkungen von UV-Strahlung auf lebende Organismen zu gewinnen. Diese Fragestellung erlangt insbesondere vor dem Hintergrund einer zunehmenden UV-B-Bestrahlung als Folge der geringeren Filterung stratosphärischer UV-Bestrahlung durch die Atmosphäre der Erde eine immer größere Relevanz. Die Bedeutung aromatischer Nitroverbindungen wurde anhand der menschlichen HeLa-Zellen untersucht.

Eine Besonderheit der Arbeit lag darin, diese Untersuchungen mit einer neuartigen analytischen Methode, der so genannten Fast Micromethod zu analysieren. Die Fast Micromethod ist eine fluorimetrische Hochdurchsatzmethode und wurde von Batel et al. 1998 entwickelt. Die Vorteile dieser Methode im Vergleich zu herkömmlichen Methoden bestehen in einem äußerst geringen Probenbedarf (2500-3000 Zellen), dem geringen Zeitbedarf (weniger als 3 Stunden), einem hohen Probendurchsatz, der einfachen Handhabung und der hohen Empfindlichkeit.

Mit Hilfe dieser neuen Methode zum Nachweis von DNA-Schäden sollte beantwortet werden, wie sich Bestrahlungen in verschiedenen UV-Spektralbereichen und Dosen in Gegenwart von Schwermetallionen auf die Integrität der DNA auswirken. Zudem wurden die Wirkungen auf menschliche HeLa-Zellen mit denen auf Schwammzellen verglichen.

3 Material und Chemikalien

3.1 Chemikalien

Cadmiumchlorid	Sigma, Deisenhofen
Cobaltoulsulfat Pentahydrat	Sigma, Deisenhofen
Kupfer(II)- Sulfat Pentahydrat	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dinatrium-Dihydrat (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Roth, Karlsruhe
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
4- Nitrochinolin-Oxid	Sigma, Deisenhofen
Nickelsulfat	Sigma, Deisenhofen
PicoGreen	Molekular Probes, Leiden, Niederlande
Rotisol	Roth, Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Roth, Karlsruhe
Seewasser (SW)	Sigma, Deisenhofen
Harnstoff	Roth, Karlsruhe
Zinkchlorid	Sigma, Deisenhofen

3.2 Geräte

Brutschrank: Queue CO2-Wassermantel- Inkubator, Modell QWJ 500 SVUA	Nunc, Wiesbaden
Mikroplattenreader (Fluoroscans II)	Labsystems, Helsinki, Finnland
Heizrührer MR82	Labotec, Wiesbaden
Laminar- Flow Sterilbank	Slee, Mainz
Mikroskop: Wilovert S	Hund, Wetzlar
Zählkammer nach Neubauer	Renner, Dannstadt
pH-Meter Typ CG 840	Schott, Mainz
Roller, 15 U/min	Reichert; Mainz
Schüttler	tech Werkstatt des Instituts
Spectrophotometer DM64	Beckmann; München
Stratalinker UV Crosslinker 1800	Stratagene, LaJolla, USA
SOL-500- Lampe(Sonnenlichtsimulation) - Mit Filter H1+H2	Dr. Höhnle GmbH, UV- Technologie München
Vortexer Typ Reax 2000	Heidolph, Kehlheim
Zentrifugen: Eppendorf 5402	Eppendorf, Hamburg

3.3 Laborzubehör und Verbrauchsmaterialien

Eppendorfcaps: 1,5 und 2 ml (Safe Lock)	Plastikbrand, Werheim
Falcontubes: (5 , 15 , 50)ml	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen	Nunc, Wiesbaden
Laborhandschuhe Rotiprotect	Roth, Karlsruhe
Nescofilm (Parafilm)	Roth, Karlsruhe
Pasteurpipetten (Volac)	John Poulten LTD, Barking, GB
Petrischalen	Nunc, Wiesbaden
Petrischalen Groß Ø 18,5 cm	Schott, Mainz
Pipettenspitzen: gelb, weiß, und blau	Roth, Karlsruhe

Des Infektions- Mittel	Bode, Hamburg
96-Well-Mikrotiterplatten (FluoroNunc Module)	Nunc, Weisbaden
6-Well- und 24-Well-Zellkulturplatten	Nunc, Weisbaden

3.4 Medien und Seren

Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco, Berlin
RPMI 1640	Sigma, Deisenhofen

3.5 Zellen

HeLa-Zellen:

Die HeLa-Zelllinie stammt ursprünglich von einer 31 jährigen, schwarzen Patientin mit Zervix-Karzinom und HPV-18 (Humanes Papilloma Virus 18). HeLa-Zellen werden routinemäßig im Institut kultiviert.

Schwammzellen:

Die Schwämme (Spezies: *Subrites domuncula*) wurden in der nördlichen Adria in der Nähe von Rovin (Kroatien) gesammelt und in Mainz bis zur Verwendung in Aquarien unter Belüftung und Filterung bei 16°C gehalten.

3.6 Puffer und Lösungen

LyseLösung: 4,5 M Harnstoff
20 mM EDTA
0,1% SDS
pH 10,0

Lyse Lösung mit PicoGreen: 20µl PicoGreen/1 ml Lyse Lösung

NaOH - Lösung: 0,1 mM NaOH/20 mM EDTA; pH 12,4

PBS Lösung:

Einwaage für 1l	
NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄	1,44 g
KH ₂ PO ₄	0,24 g

Die entsprechenden Einwaagen werden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst, auf einen pH - Wert von 7,4 mit Salzsäure eingestellt und zuletzt auf einen Liter mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

CMFSW (Calcium-Mg-freies Seewasser):

NaCl	460 mM
Na ₂ SO ₄	7 mM
KCl	10 mM
Hepes	10 mM
Penicillin/Streptomycin	4 ml

(mit 10,000 units/ml Penicillin und 10 mg/ml Streptomycin in 0,9% Natrium Chlorid)

CMFSW +EDTA: CMFSW+2,5 mM EDTA

4 Methoden

4.1 Kultur und Isolation

4.1.1 Kultivieren von HeLa- Zellen

Zur Kultivierung mussten die Zellen alle 1-3 Tage im Wechsel im Verhältnis 1:2 bzw. 1:3 in frischem Medium aufgenommen werden. Die Zellen wurden in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium mit 10% FCS sowie Glutamin als Kohlenstoffquelle überführt. Die Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen in einem Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 98-100% und einem CO₂-Anteil von 5% kultiviert. Die HeLa-Zellen verdoppeln sich in etwa 25-35 Stunden. HeLa-Zellen sind adhärenente Zellen. Mit einem Zellschaber können die Zellen vom Untergrund gelöst werden. Um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen in der Zellkulturflasche zu gewährleisten werden die Zellen nach dem Lösen vom Boden mit einer Pipette gut resuspendiert. Damit werden die Zellen aus dem Zellverband gelöst und die so erhaltenen Einzelzellen können sich in der neuen Zellkulturflasche weiter vermehren. Es wurde darauf geachtet, dass sich die jeweils im Versuch eingesetzten Zellen in den Phasen des exponentiellen Wachstums befinden.

Die Zellzahl muss nach 48-72 h zwischen 5×10^5 - 8×10^8 Zellen liegen, damit die Zellkultur im logarithmischen Wachstum bleibt.

4.1.2 Isolierung von Schwammzellen *S. domuncula*

Mit einem Skalpell wurde ein kleiner Teil des Schwammes noch unter Seewasser herausgeschnitten und in ein mit Seewasser (vom selben Aquarium) gefülltes 50 ml Falconröhrchen überführt. Damit wurde gewährleistet, dass das vom Schwamm abgeschnittene Stück nicht mit Luft in Berührung kam.

Das Schwammstück wurde Sterile aus dem Röhrchen entnommen und in CMFSW+EDTA (Calcium²⁺-Magnesium²⁺-freies-Seewasser mit EDTA-Zusatz) aufgenommen. Das Schwammstück wurde mit dem Skalpell in einer Petrischale im CMFSW+EDTA so klein wie möglich geschnitten. Der zerkleinerte Schwamm wurde nun in ein großes Falcon aufgenommen, und mit 40 ml CMFSW+EDTA für eine Stunde gerollert. Anschließend wurde die Suspension mit einer 10 ml Pipette resuspendiert. Dadurch konnte die Ausbeute an Zellen noch erhöht werden. Ein zuvor mit Rotisol gereinigtes getrocknetes Planktonnetz wurde mit 70% Ethanol gewaschen. Das zweilagige Planktonnetz wurde über einem Gefäß mit einem Auslauf befestigt. Die Schwammzellensuspension mit noch kleinen Gewebestücken wurde durch das Planktonnetz in ein neues großes Falcon überführt. Die Schwammzellen sind klein genug, um das Planktonnetz passieren zu können, und werden in einem Falcon Röhrchen gesammelt. Da EDTA den Schwammzellen auf längere Zeit schadet, wurden die Zellen nun gewaschen. Zunächst wurde die Schwammzellensuspension 10 Minuten bei 1900 U/min (Kontron-Zentrifuge, Z364) zentrifugiert. Der Überstand wurde nach der Zentrifugation verworfen und das Zellpellet in 40 ml CMFSW+EDTA mit einer Pipette resuspendiert. Dieser Waschschrift wurde ein weiteres Mal wiederholt. Diese so erhaltenen Schwammzellen konnten nun direkt mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt und für das Experiment eingesetzt werden.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Um die Vergleichbarkeit der Versuche zu gewährleisten, wurde immer die gleiche Zahl von Zellen eingesetzt. Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach Neubauer verwendet. Die Zellsuspension wurde auf die Zählkammer aufgetragen. Jeweils vier große Quadranten wurden unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Anschließend wurde der Mittelwert von vier Quadranten gebildet. Ein großer Quadrant hat die Fläche von 1 mm² und eine Tiefe von 0,1 mm. Daraus ergibt sich ein Volumen von 0,1 mm³. Um die Zellzahl pro 1 ml zu erhalten. Wurde mit 10.000 multipliziert. Die Zellsuspension wurde mit PBS auf eine Zellzahl von 150x10³ /ml verdünnt.

4.2 Benutzte Lampe

Die benutzte Lampe ist eine Sonnensimulation Lampe und umfasst das gesamte solare Spektrum Mit den Filtern H1(≥ 320 nm); und H2 (≥ 295 nm), ergibt sich eine Bestrahlungseinheit, die UV-A+sichtbaren Licht bzw. UV-B+sichtbares Licht liegt

4.2.1 StrataLinker UV-Crossliker

Die andere UV-Lampe ist StrataLinker UV Crosslinker. Die Lampe besteht aus 5 Lampen, die im Gerät vorhanden sind mit je 8 Watt. Ihre strahlen mit einer Wellenlänge von 254 nm wie bei UV-C Bereich liegen. Damit ist eine Bestrahlung von ungefähr 3000 $\mu\text{Watt}/\text{cm}^2$ möglich.

4.2.2 Bestrahlung am Linearbeschleuniger der Klinik und Poliklinik für Radiologie

Am Linearbeschleuniger (6 MV, Linac Mevatron–KD2, Siemens) der Klinik und Poliklinik für Radiologie wurden 1ml HeLa-Zellen Suspension in PBS Überstand in Eppendorfcaps mit Dosen von 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8; 16 Gy bestrahlt. Der Hin und Rücktransport der Zellen fand jeweils auf Eis statt.

4.2.3 UV-Bestrahlung und Induktion der Zellen

Je 1ml von der Zellsuspension wurde in 6 Wells-Platte pipettiert. Die Platte wurde zur Kühlung auf Eis gestellt und bestrahlt. Die UV Lampe wurde 5 bis 10 Minuten vor der Bestrahlung angeschaltet, damit sie stabiles Licht aussendet. Der Abstand der Lampe zu den Zellen betrug 5 cm. Nach der Bestrahlung wurden jeweils 25 μl Zellsuspension Zelle in 96 Wells einer schwarzen Mikrotiter Platte überführt und dann mit 25 μl Lyse-Lösung PicoGreen versetzt.

PicoGreen ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet.

4.2.4 Bestrahlung des Zellen für Reparaturversuche

In diesen Versuchen wurden die Zellen für bestimmte Zeiten (10-60 Minuten) nach der Bestrahlung inkubiert. Die Inkubation fand bei verschiedenen Temperaturen statt. Die HeLa-Zellen wurden bei 37°C und die Schwammzellen bei 17°C inkubiert. Danach wurden die Zellen in 96 Well-Platten überführt und der Fast-Mikro Assay durchgeführt.

4.3 NQO – Behandlung

4-Nitrochinolin-1-Oxid (NQO) wurde in einer Konzentration von 10 mM in DMSO gelöst. Die verwendeten Endkonzentrationen von NQO lagen zwischen 0,1 und 3 µM, die DMSO-Konzentration war dem zufolge unkritisch. Die Inkubation der Zellen fand 90 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank statt. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 1ml PBS aufgenommen.

4.3.1 Behandlung mit Schwermetall-Ionen

Jeweils 1ml Zellsuspension wurde mit 10 µl Konzentrierter Schwermetall Lösung versetzt, (Endkonzentration 1µg/ml). Dann wurde für 0-60 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit der Fast-Mikromethod untersucht.

4.4 DNA-Strangbruch Assay

DNA- Einzelstrangbrüche und alkali-labile Stellen (ALS) wurden durch die Fast Micromethod I (Müller *et al.*, 1997) quantifiziert. Diese neuartige Methode ist zum schnellen und empfindlichen Nachweis von DNA-Schäden und Reparatur geeignet (Chauvin *et al.*, 1998; Elmendorff-Dreikorn *et al.*, 1999): Der Assay basiert auf der Tatsache, dass sich DNA, die Einzelstrangbrüche enthält, unter alkalischen Bedingungen schneller entwindet als unbeschädigte DNA. Die Abnahme des Anteils an doppelsträngiger DNA und damit die Geschwindigkeit

der Entwindung kann durch Zugabe von PicoGreen, einem Fluoreszenzfarbstoff, der spezifisch an doppelsträngige DNA bindet (Haugland *et al.*, 1996), verfolgt werden.

4.4.1 Detaillierter Ablauf

Jeweils 25 µl der Zellsuspension wurden in die Wells einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Für die Lyse der Zellen wurden pro Ansatz 25 µl Lyse-Lösung mit PicoGreen zugefügt. Die Lyse erfolgte direkt in den Mikrotiterplatten für 45 min im Dunklen bei Raumtemperatur. Durch Zugabe von 250 µl einer 0,1M NaOH/20mM EDTA Lösung pro Well wurde der pH-Wert der Ansätze auf 12,4 erhöht und somit die Denaturierung der DNA ausgelöst. Die Fluoreszenz der Proben wurde nach der Zugabe der NaOH+EDTA Lösung für etwa 1 Stunde in 5 min Intervallen mit dem Fluoroskan II bei einer Excitationswellenlänge von 480 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm gemessen.

4.4.2 Auswertung

Für die statistische Auswertbarkeit wurden für alle Proben mindestens vier Replikate aufgetragen. Von den gemessenen Originalwerten wurde der Mittelwert errechnet und der jeweilige Mittelwert des Leerwerts abgezogen. Als Leerwert diente je nach verwendeten Zellen das entsprechende Medium oder PBS.

Die gemessenen Effekte wurden als ‚Strand Scission Faktors‘(SSF) ausgedrückt und nach einer Denaturierungszeit von 20 min wie folgt berechnet:

$$\text{SSF} = \log(\% \text{ dsDNA in der behandelten Probe} / \% \text{ dsDNA in der Kontrolle})$$

Hierbei wurde die Fluoreszenz der Kontrolle zum Zeitpunkt Null als 100 % dsDNA gesetzt. Negative SSF-Werte indizieren einen erhöhten Anteil von DNA-Einzelstrangbrüchen.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen mit HeLa-Zellen

5.1.1 Einfluss von NQO auf HeLa-Zellen

Zu Beginn der Untersuchungen wurde der Effekt von chemischen Substanzen mit der Potenz zur DNA-Schädigung an Hand der bekannten genotoxischen Modellsubstanz NQO an HeLa-Zellen untersucht, um die Fast-Mikromethode für dieses Zellsystem zu etablieren. Dazu wurden HeLa-Zellen mit NQO Konzentrationen von 0,1, 0,3, 1, 3, und 10 μM behandelt.

Zu den Zellsuspensionen wurden jeweils 10 μl NQO-Lösung in DMSO bis zu den angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt und die Ansätze (1 ml) anschließend im Dunkeln bei Raumtemperatur für 1.5 h inkubiert.

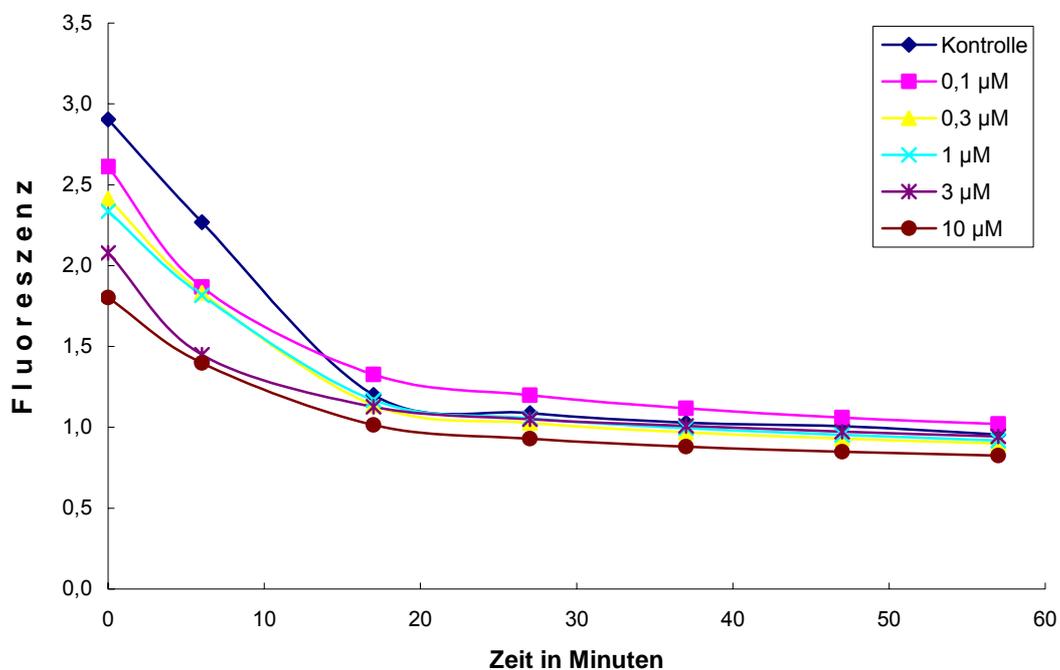


Abb. 5a: Entwindungskurven NQO-Behandlung von HeLa-Zellen

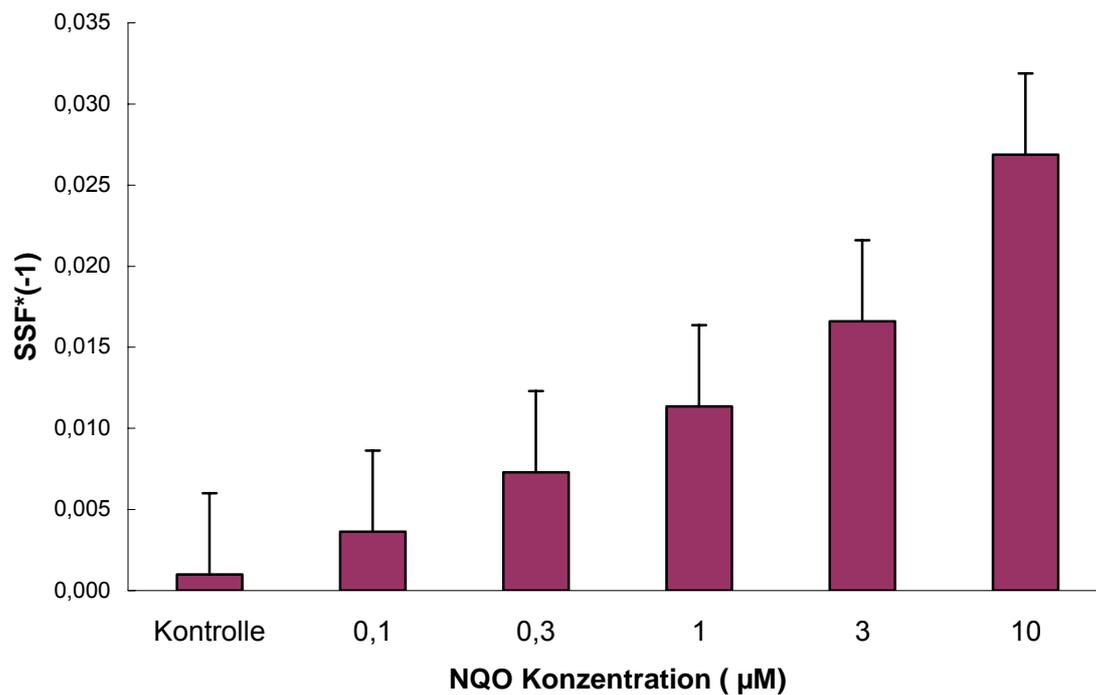


Abb. 5b: Effekt von NQO auf DNA- Integrität in HeLa-Zellen

Die Abbildung 5a dokumentiert typische DNA Entwindungskurven sowie die zunehmende Geschwindigkeit der Entwindung bei steigender Konzentration an NQO, was auf die ansteigende Schädigung der DNA hinweist. Der starke konzentrationsabhängige Effekt von NQO auf die DNA-Integrität wird in der Abbildung 5b, in der die SSF-Werte dargestellt sind, noch deutlicher. Schon bei einer Konzentration von 0,1 µM ist eine signifikante DNA-Schädigung im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Bis zu der untersuchten Konzentration von 10 µM ist eine klare Dosis-Wirkung zu erkennen. Aufgrund dessen kann man die Fast-Micromethod als geeignetes System für die Untersuchung der Wirkung genotoxischen Substanzen auf HeLa-Zellen anerkennen.

Die Entwindungs-Kinetik (Abb. 5a) hat gezeigt, dass man den SSF-Wert in dem Kurvenbereich bestimmen muss, in dem die Entwicklungskurve noch nicht die Plateauphase ermöglicht hat. Je nach Zeitbedarf der Entwindung ergeben sich leicht schwankende Angaben für die Messzeit.

5.1.2 Einfluss von energiereicher Strahlung auf HeLa-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, dass die Fast Micromethod zur Messung von durch genotoxischen Substanzen induzierten DNA-Schäden geeignet ist, wurde getestet, ob mit dieser Methode ebenfalls die DNA-Schädigung durch Bestrahlung mit Gamma-Strahlen gemessen werden kann. Dazu wurden die HeLa-Zellen am Linearbeschleuniger (Gamma-Strahlen) verschiedenen Strahlungsdosen (Dosis 0,2; 0,4; 0,8; 1; 2; 4; 8; 16 Gy.) ausgesetzt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen zum Transport auf Eis gelagert. Unmittelbar nach dem Transport (ca. 15 min) wurde die Fast Micromethod durchgeführt.

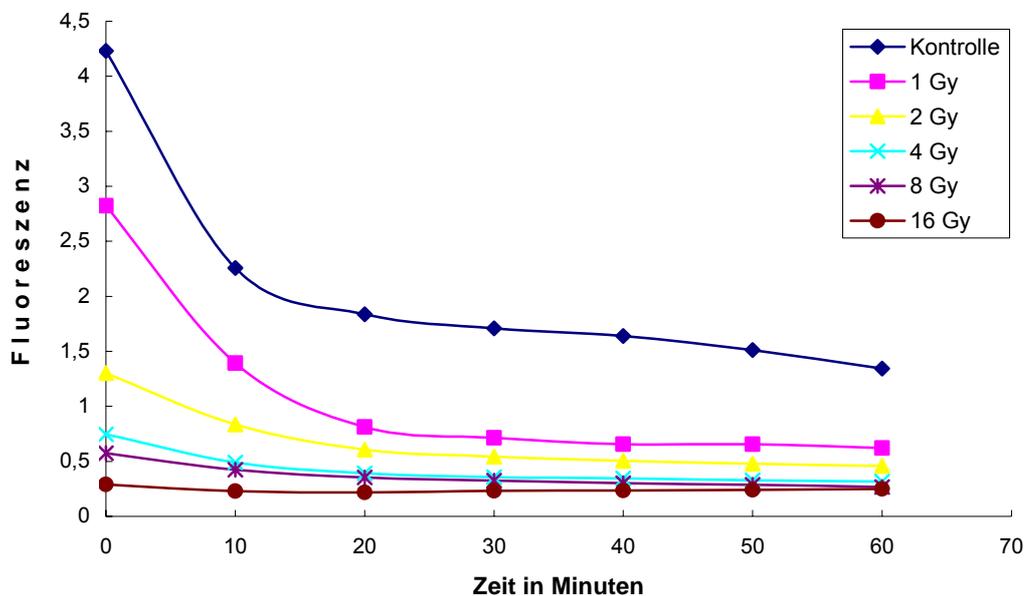


Abb. 6a: Entwindungs-Kurve energiereicher Gamma-Strahlung von (1-16 Gy) auf HeLa-Zellen

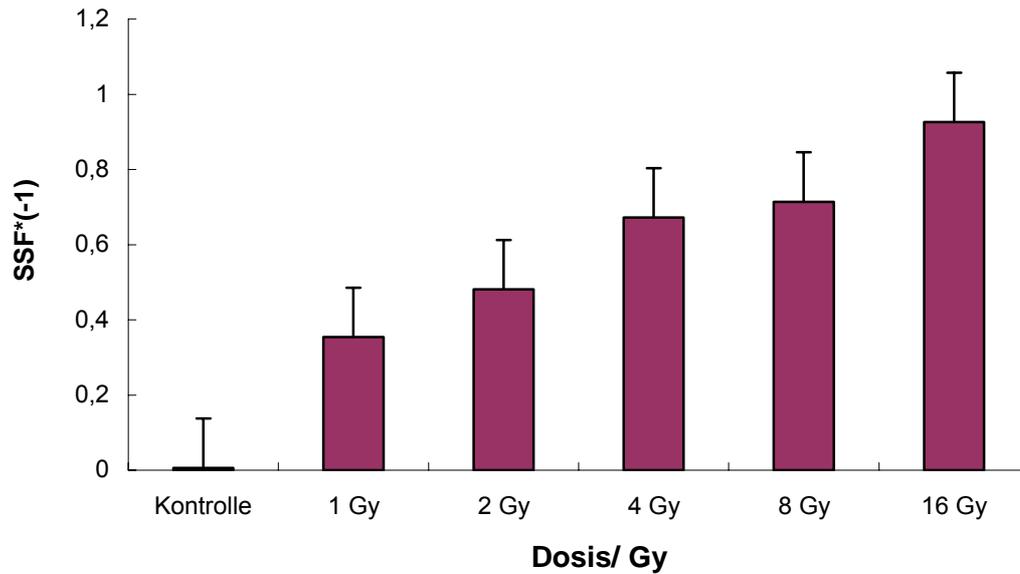


Abb.6b: Einfluss von energiereicher Strahlung auf HeLa-Zellen (1-16 Gy)

Abbildung 6a und 6b zeigen die Stärke der DNA-Schädigung bei unterschiedlichen Bestrahlungsdosen. Die verwendeten Strahlendosen betragen 1 Gy, 2 Gy, 4 Gy, 8 Gy und 16 Gy. Je höher die Bestrahlungsdosis ist, desto mehr DNA -Strangbrüche sind zu beobachten.

Die Abbildung 6a zeigt die DNA-Entwindungskurven bei verschiedenen Bestrahlungsdosen. Der starke konzentrationsabhängige Effekt von Gamma-Strahlung auf die DNA-Integrität wird in der Abbildung 6b, in der die SSF-Werte dargestellt sind, noch deutlicher. Schon bei einer Konzentration von 1 Gy ist eine signifikante DNA-Schädigung im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Bis zu der untersuchten Konzentration von 16 Gy ist eine klare lineare Dosis-Wirkung zu erkennen.

Da sich schon bei einer Dosis von 1 Gy starke DNA-Schäden zeigten, wurden in einem weiteren Experiment niedrigere Bestrahlungsdosen eingesetzt, um herauszufinden, ob auch diese noch signifikante Effekte haben.

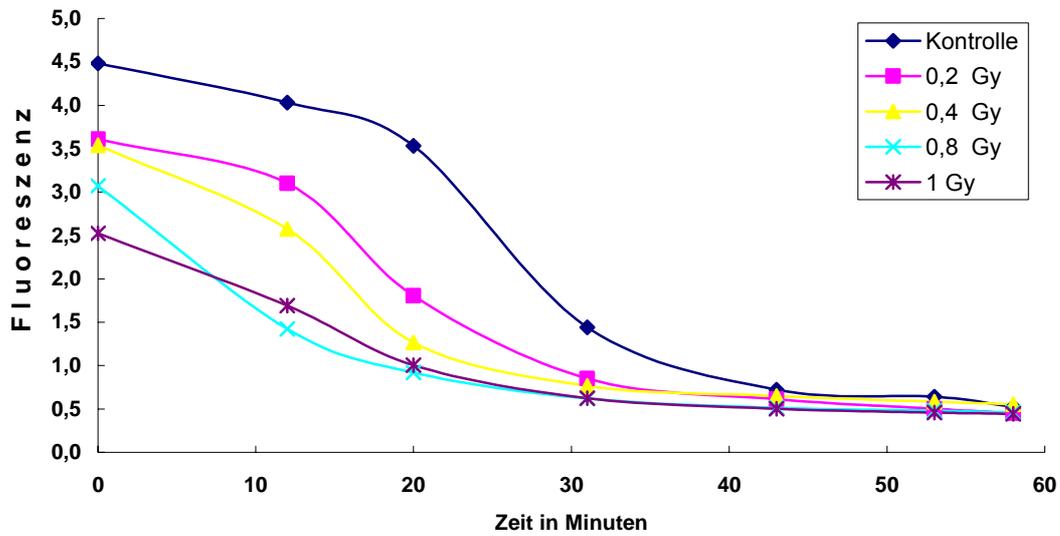


Abb. 7a: Entwindungskurven Gamma-Bestrahlung von (0,2-1 Gy) HeLa-Zellen

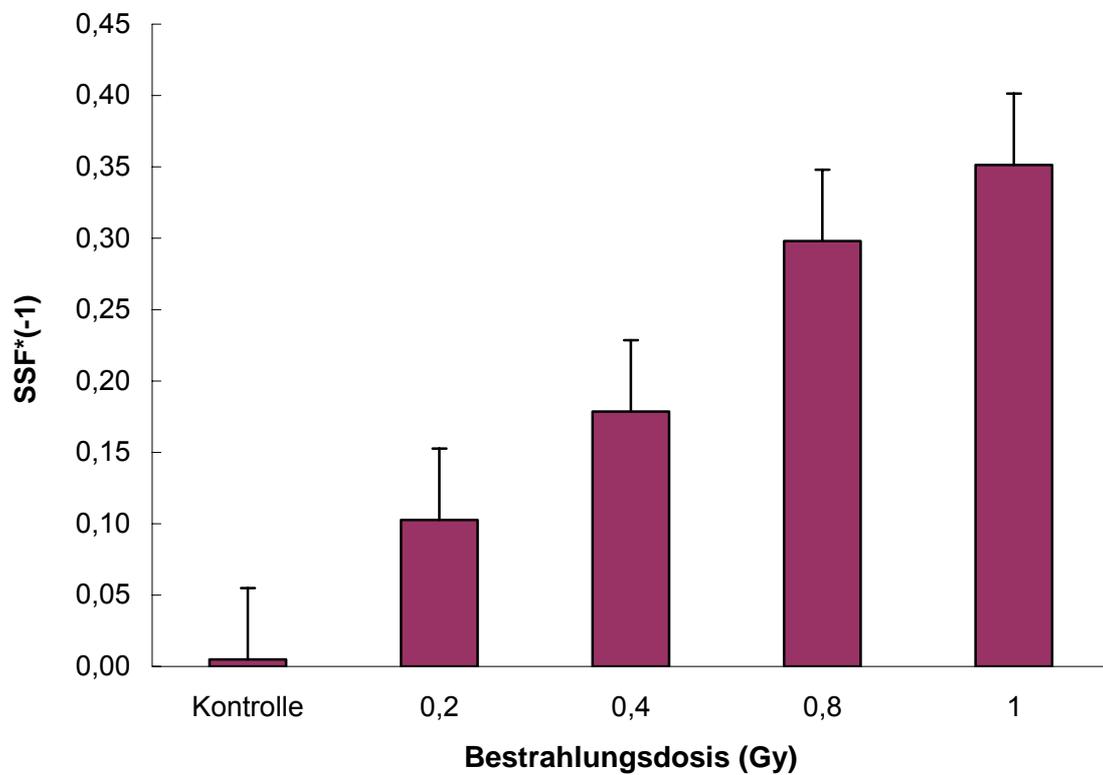


Abb. 7b: Effekt von energiereicher Gamma-Strahlung von (0,2-1 Gy) auf HeLa-Zellen

Die Abbildung 7a zeigt die DNA Entwindungskurven bei verschiedenen Bestrahlungsdosen. Bei steigender Bestrahlungsdosis nimmt die Geschwindigkeit der Entwindung zu. Der starke dosisabhängige Effekt von Gamma-Strahlung auf die DNA-Integrität wird in der Abbildung 7b, in der die SSF-Werte dargestellt sind, noch deutlicher. Schon bei einer Dosis von 0,2 Gy ist eine signifikante DNA-Schädigung im Vergleich zur Kontrolle zu sehen. Bis zu der untersuchten Dosis von 1 Gy ist eine klare lineare Dosis-Wirkung zu erkennen.

5.1.3 Effekt von UV-C Strahlung auf HeLa-Zellen

Mit Hilfe der Fast-Micromethod wurde auch der Effekt einer anderen energiereichen Strahlung, der UV-C-Strahlung, getestet. Dazu wurden die Zellen mit UV-C-Strahlung in verschiedenen Dosen (10; 20; 30; 50; 100; 200; 300; 500; 1000) J/m² bestrahlt.

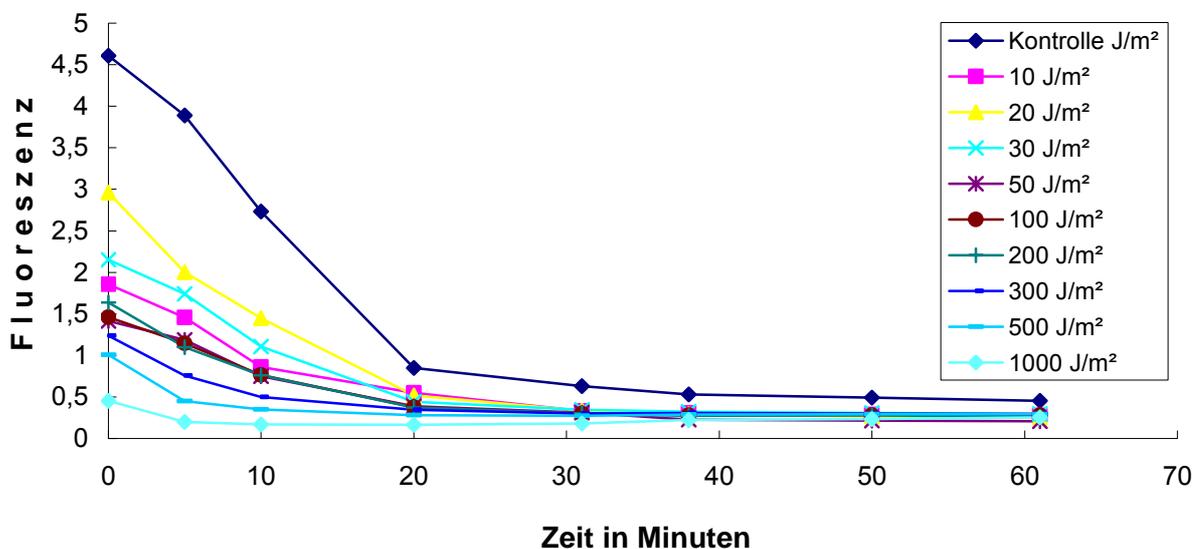


Abb. 8a: Darstellung der Entwindung bei UV-C

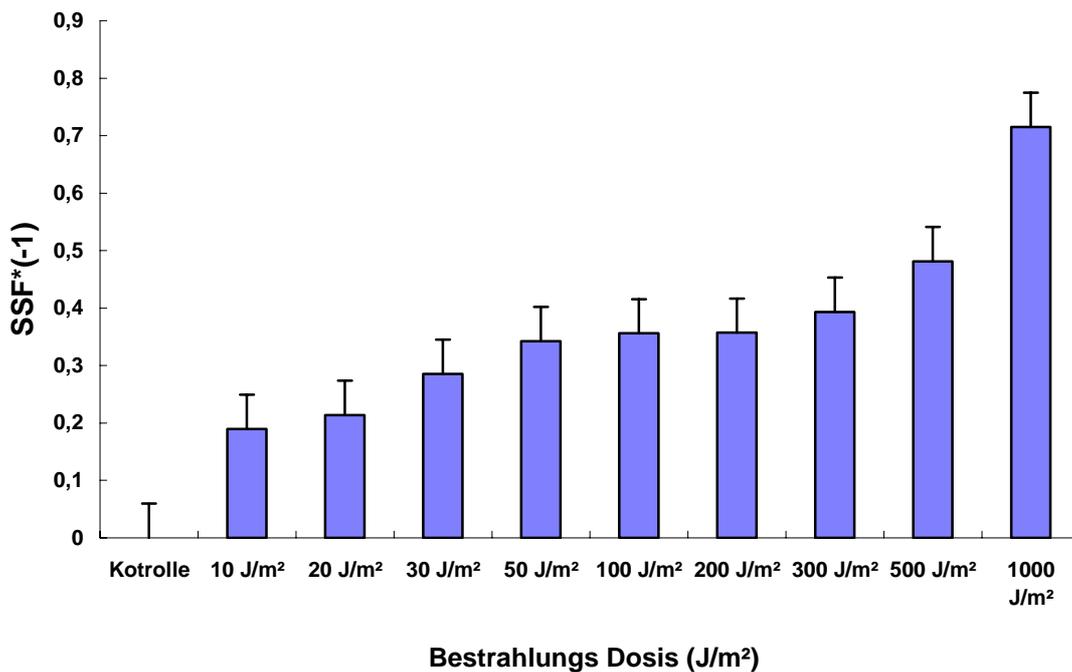


Abb. 8b: Effekt von UV-C auf den Grad der DNA-Schädigung

In Abbildung 8a und 8b ist der Einfluss von UV-C auf die DNA-Integrität dargestellt.

Die HeLa Zellen wurden mit UV-C in verschiedenen Dosen (10; 20; 30; 50; 100; 200; 300; 500; 1000 J/m²) bestrahlt. Mit der steigenden Dosis nimmt das Ausmaß der DNA-Strangbrüche zu. Bei 1000 J/m² wurde der maximale Effekt erreicht. Damit wurde gezeigt, dass mit Hilfe der Fast Micromethod auch die DNA-schädigende Wirkung von UV-C-Strahlen analysiert werden kann.

5.1.4 Effekt von UV-C-Strahlung und Cadmium auf HeLa-Zellen

Weiterhin wurden die DNA-schädigende Wirkung von Cadmium (Cd) und UV-C allein sowie der kombinierte Effekt von UV-C und Cadmium untersucht. Dafür wurden HeLa-Zellen mit Cadmium (End-Konzentration: 1 µg/ml) und UV-C Strahlung (500 J/m²) entweder allein oder kombiniert behandelt. Nach der

Behandlung wurden die Zellen 2 h bei 37°C inkubiert, anschließend erfolgte die Messung. Die Cadmium zugabe erfolgte unmittelbar vor der Bestrahlung.

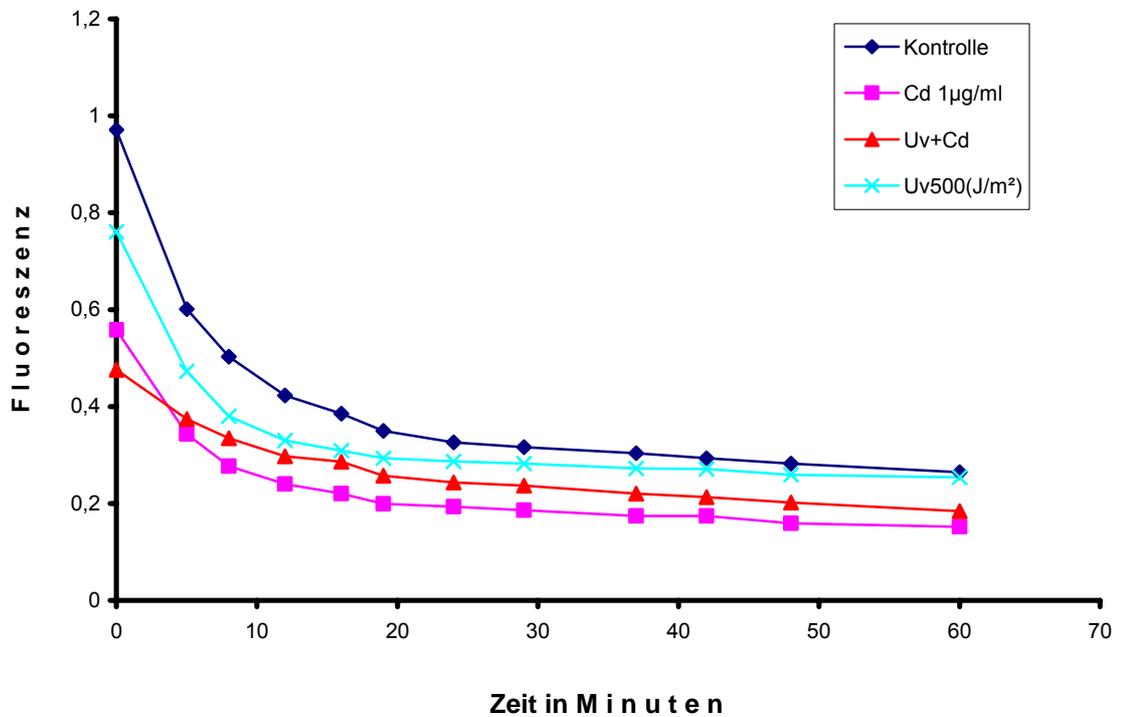


Abb. 9a: Zeitlicher Verlauf der DNA-Entwindung nach UV-C-Bestrahlung und Reparatur in Abwesenheit und Gegenwart von Cadmiumchlorid.

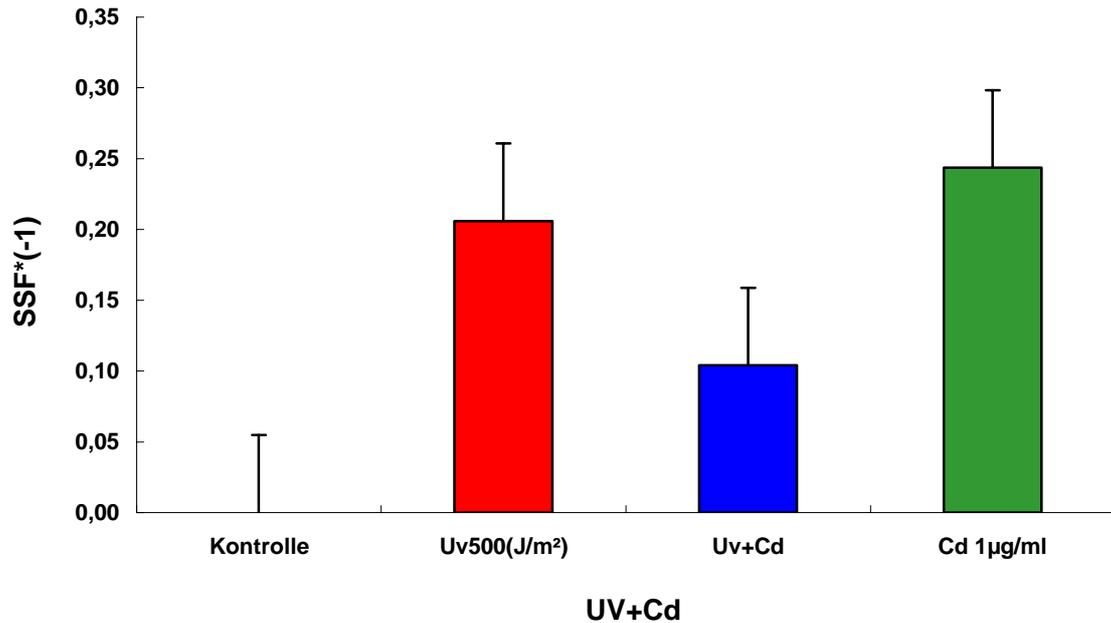


Abb. 9b: Einfluss von UV-C Strahlung und Cadmium-Ionen auf DNA-Integrität u. DNA-Reparatur in HeLa-Zellen

Die in Abbildung. 9 a und b dargestellten Ergebnisse zeigen, dass eine Inkubation mit Cadmium allein einen größeren Effekt auf die inkubierte DNA von HeLa Zellen hat, als dies bei gleichzeitiger UV-Bestrahlung der Fall ist. Eine UV-Bestrahlung allein zeigte den gleichen Effekt wie bei Cadmium allein. Der geringere Effekt der kombinierten Behandlung mit Cadmium und UV-Bestrahlung gegenüber der Behandlung mit Cadmium allein lässt sich durch die Entstehung von Quervernetzungen oder andere Schädigungen erklären.

5.1.5 Effekt von UV-B-Strahlung auf HeLa-Zellen

Neben der Behandlung von HeLa-Zellen mit UV-C-Strahlung wurde auch der DNA-schädigende Effekt von UV-B-Strahlen untersucht. Die HeLa-Zellen wurden mit der UV-B Lampe mit Bestrahlungs-Dosen von (15; 30; 45; 90) J/m² bestrahlt. Anschließend wurden sie für 2 h bei 37°C inkubiert, danach wurde der DNA-schädigende Effekt mit der Fast Micromethod ermittelt.

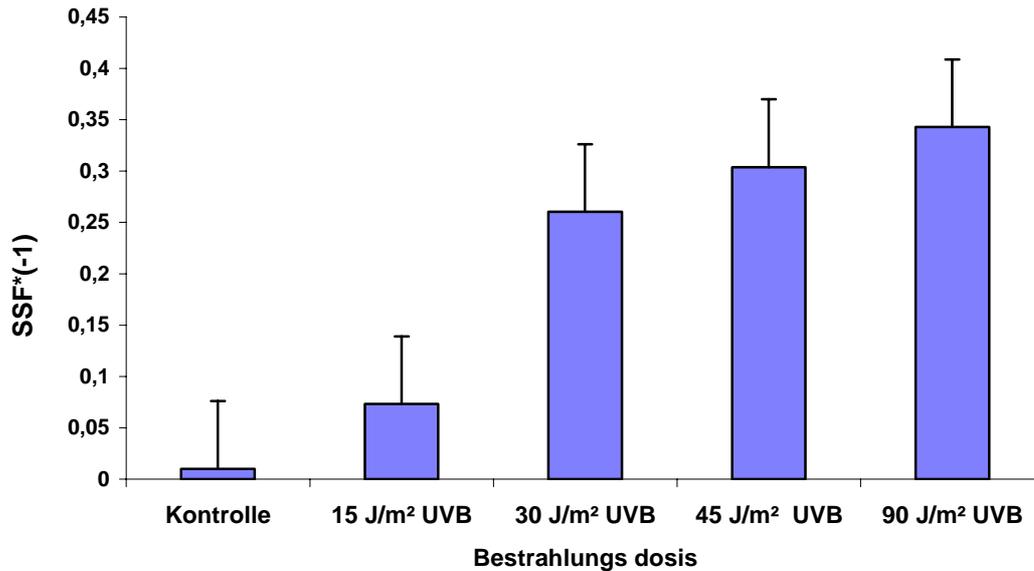


Abb. 10: Effekt UV-B auf DNA-Schädigung

Die in Abbildung 10 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass auch UV-B-Strahlen eine starke DNA-schädigende Wirkung haben. Dies beruht auf dem im Vergleich zu UV-A höheren Energiegehalt Strahlen.

5.1.6 Effekt von UV-A-Strahlung auf HeLa-Zellen

Die HeLa-Zellen wurden mit längerwelligerer, energieärmerer UV-A-Strahlung in verschiedener Bestrahlungsdosis bestrahlt. Die Zellisolierung wurde in PBS durchgeführt. Die Zellkonzentration betrug $150 \times 10^3/\text{ml}$ in PBS. Die bestrahlten Zellen wurden für 2 h bei 37°C inkubiert.

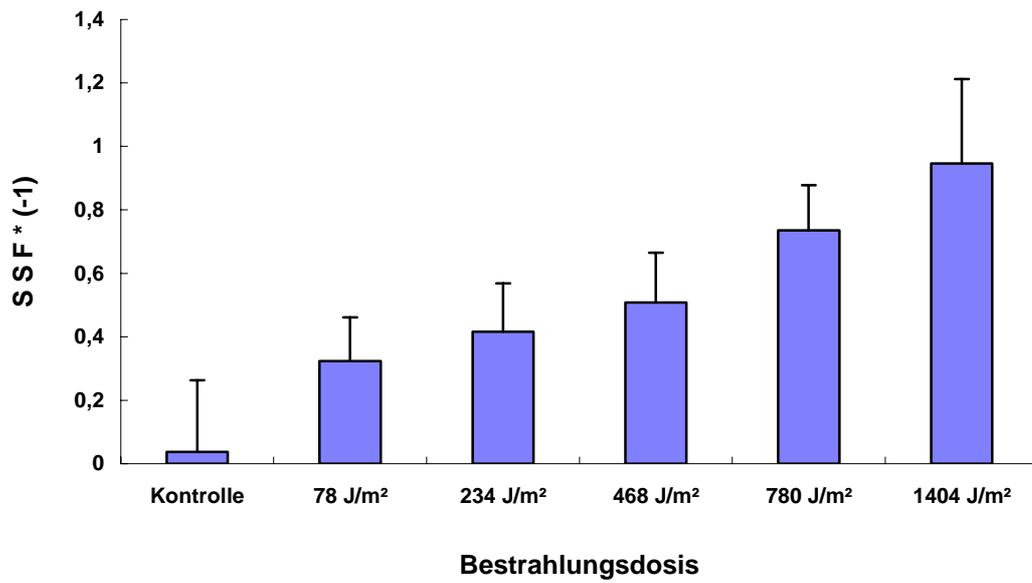


Abb. 11: Effekt von UV-A-Strahlung auf HeLa-Zellen

In Abbildung.11 ist die Etablierung von DNA-Strangbrüchen durch UV-A-Strahlung gezeigt. Mit steigender Bestrahlungsdosis nimmt die Zahl der DNA-Strangbrüche in den Zellen zu.

5.2 Untersuchungen mit Schwammzellen (*Subrites domuncula*)

5.2.1 Effekt von UV-B und UV-A Strahlen auf Schwammzellen

Bis jetzt wurden die Versuche mit HeLa-Zellen als Vertreter von Vertebraten mit UV und Schwermetallionen durchgeführt. Zum Vergleich wurde die DNA aus Schwammzellen als Vertreter eines phylogenetisch alten Organismus nach UV-Bestrahlung untersucht.

Die Zellen wurden mit verschiedenen Bestrahlungsdosen an UV-A (78; 234; 468; 936) J/m²; bzw. UV-B (5; 15; 30; 60) J/m² bestrahlt.

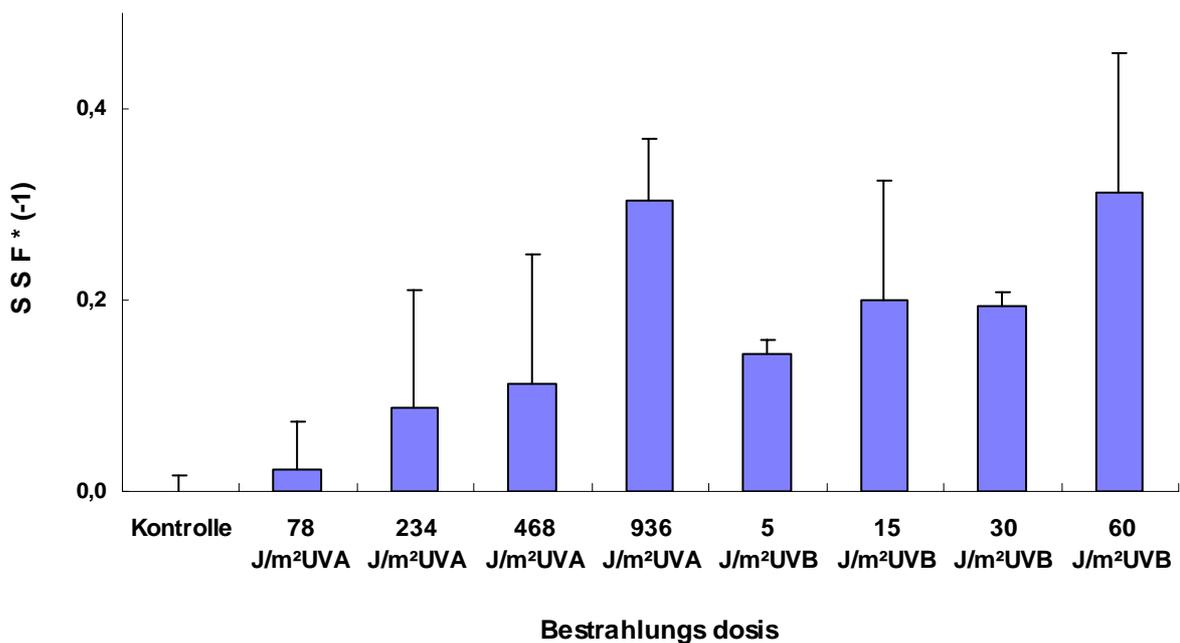


Abb. 12: DNA-Schädigung von Schwammzellen durch UV-A und UV-B

In Abbildung 12 sind die Effekte der Bestrahlung mit UV-A und UV-B-Strahlung in verschiedenen Dosen dargestellt. Im Bereich der niedrigen Dosen nehmen die Effekte nach 10 Minuten Bestrahlung zu. Die Effekte der UV-A-Bestrahlung bei 234 und 468 J/m² sind etwa gleich stark, während der SSF-Wert bei 936 J/m²

deutlich und signifikant höher ist als bei 78 J/m². Die SSF-Werte bei UV B-Bestrahlung mit Dosen von 5; 15 und 30 J/m² sind beinahe gleich hoch, bei 60 J/m² wird ein deutlich stärkerer Effekt erzielt, ähnlich dem von UV A-Bestrahlung mit einer Dosis von 936 J/m².

5.2.2 Effekt von UV-B und UV-A-Strahlung auf Schwammzellen und deren Reparatur

Schwammzellen der Art *S. domuncula* wurden mit UV-A bzw. UV-B bestrahlt. Die Bestrahlungsdosis betrug 234; 468; 936 J/m² UV-A, bzw. 15; 30; 60 J/m² UV-B. Nach der Bestrahlung wurden die Proben für 90 Minuten bei 17°C inkubiert. Anschließend wurde das Ausmaß der DNA-Schädigung analysiert

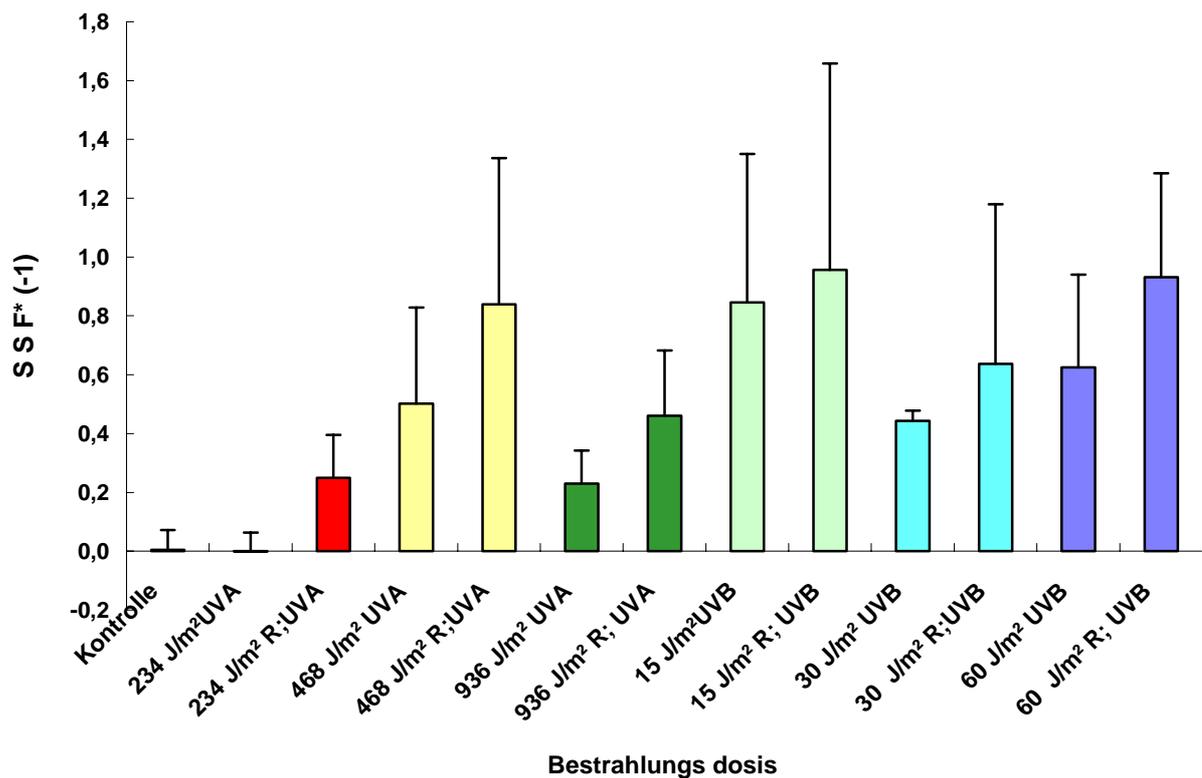


Abb. 13: Reparatur von DNA-Einzelstrangbrüchen die durch UV-A und UV-B-Strahlung induziert wurden. R= Reparatur.

Abbildung 13 zeigt die SSF-Werte von Schwammzellen, die mit UV-A und UV-B bestrahlt wurden. Die Hälfte der Proben wurde direkt nach der Bestrahlung gemessen, die andere Hälfte wurde für 90 Minuten bei 17°C inkubiert, um eine Reparatur zu ermöglichen. Die SSF-Werte wurden in nach einer Entwindungsperiode von 18 Minuten bestimmt. Die Effekte auf die DNA steigen bei niedrig dosierten Bestrahlungen. Nach einer Reparaturzeit von 90 Minuten waren die SSF-Werte höher als direkt nach der Bestrahlung. Dies zeigt, dass im Verlauf des Reparaturprozesses durch Reparaturenzyme (Nucleasen) offenbar weitere Strangbrüche entstehen. Bei einer UV-A-Bestrahlung von 234 J/m² ohne Reparatur ist z.B. der SSF-Wert sehr niedrig, bei derselben Bestrahlungsdosis mit Reparatur ist der SSF-Wert höher. Bei hohen Bestrahlungsdosen, z.B. UV-A-Bestrahlung mit 936 J/m², wurden sich niedrigere SSF-Werte bestimmt. Dies beruht vermutlich auf dem Entstehen von DNA-Quervernetzungen bei höheren Dosen.

5.2.3 Reparatur in Abhängigkeit von der Zeit nach induzierter Schädigung mit UV-A und UV-B

In Abbildung 14 ist der Effekt verschiedener Bestrahlungsdosen und Reparaturzeiten dargestellt. Das Experiment zeigt, dass das Auftreten von DNA Einzelstrangbrüchen von der Art der UV-Strahlung und der Länge der Reparaturzeit (R) abhängig ist.

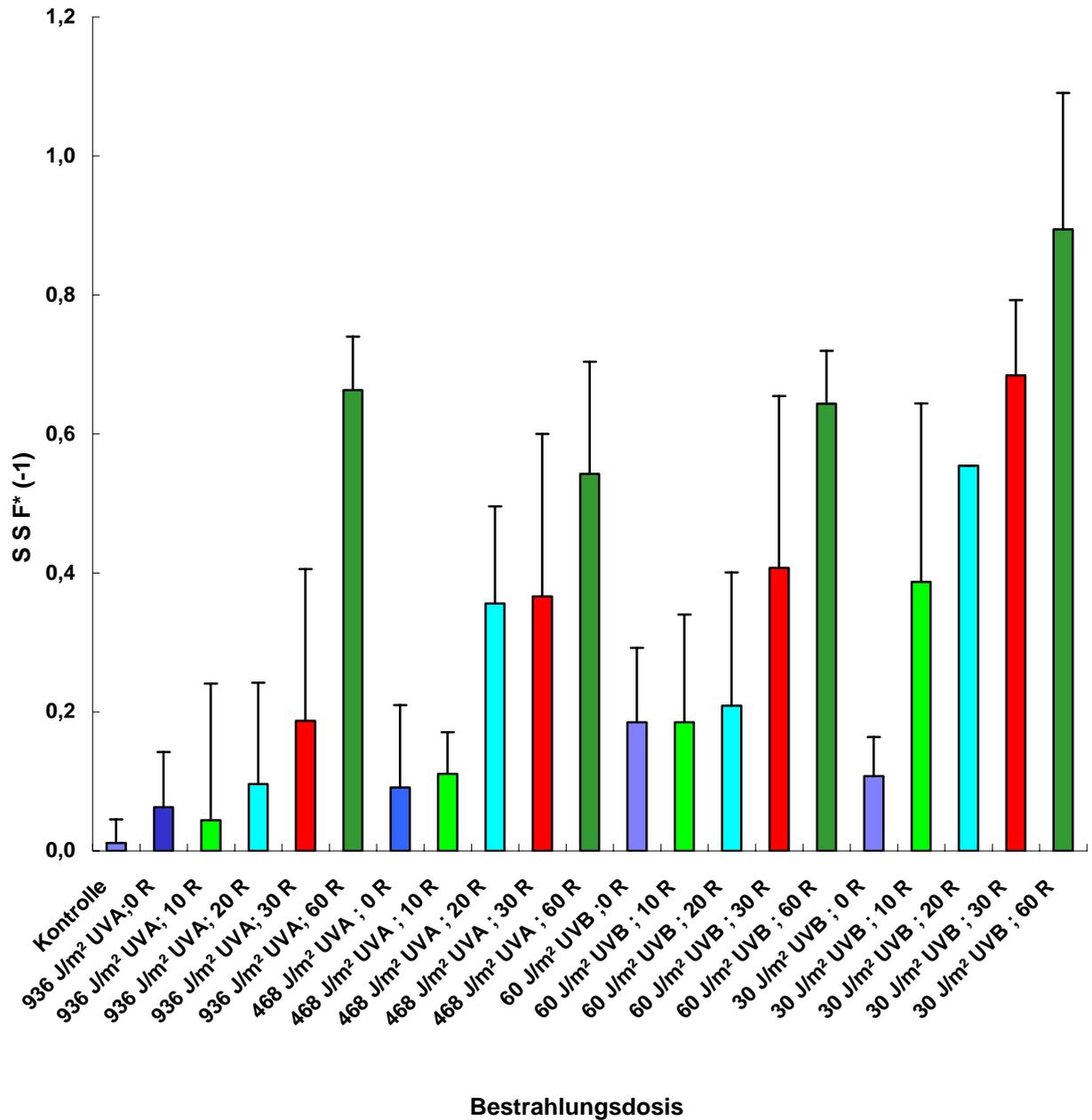


Abb. 14: Induktion von DNA-Einzelstrangbrüchen durch UV-A und UV-B Bestrahlung und deren Reparatur in Schwammzellen von *S. domuncula*. R= Reparatur (z.B. 0' R= 0 min Reparatur; 10' R= 10 min Reparatur etc.)

Die Schwammzellen wurden mit UV-A (936; 468 J/m²); UV-B (60; 30) J/m²; bestrahlt. Die Proben wurden danach bei 17°C 10; 20; 30; und 60 Minuten lang inkubiert.

Die SSF-Werte wurden nach einer Entwindungsperiode von 18 Minuten bestimmt. Ohne Reparatur wurden mit den eingesetzten Intensitäten an UV-A und UV-B-Strahlung nur relativ geringer Effekte erzielt. Allerdings zeigen sich deutliche Unterschiede, wenn man die nachfolgende Reparaturphase berücksichtigt.

5.3 Effekt einer kombinierten Bestrahlung von Schwammzellen mit Cd und UV-B

5.3.1 Cadmiuminduzierte DNA-Schäden in *S. domuncula*

Für das Experiment wurden die Schwammzellen mit 1 µg/ml Cadmiumchlorid behandelt. Die Zellkonzentration betrug 170×10^3 / ml CMFSW. 10 µl des konzentrierten Cadmiumchlorids wurde sofort vor der Bestrahlung in die Proben gegeben. Die Bestrahlung geschieht mit der UV-B-Lampe (Dr. Höhle GmbH), bei der Bestrahlungsdosis von (5; 15; 30; 45; 60 J/m²). Nach der Bestrahlung wurde die DNA-Integrität in den Zellen mit dem Farbstoff PicoGreen und danach mit einem Zusatz von alkalischer Lösung behandelt und direkt mit Fluorocan II gemessen.

Das Vorkommen von DNA-Einzelstrangbrüchen in Schwämmen, die 1 µg/ml Cadmiumchlorid ausgesetzt waren, wurde mit der Fast Micromethod bestimmt, welche das Entwinden von DNA unter alkalischen Bedingungen misst. Es wurde gefunden, dass die Anzahl der Einzelstrangbrüche durch die Cadmiumchlorid-Konzentration nicht beeinflusst wird.

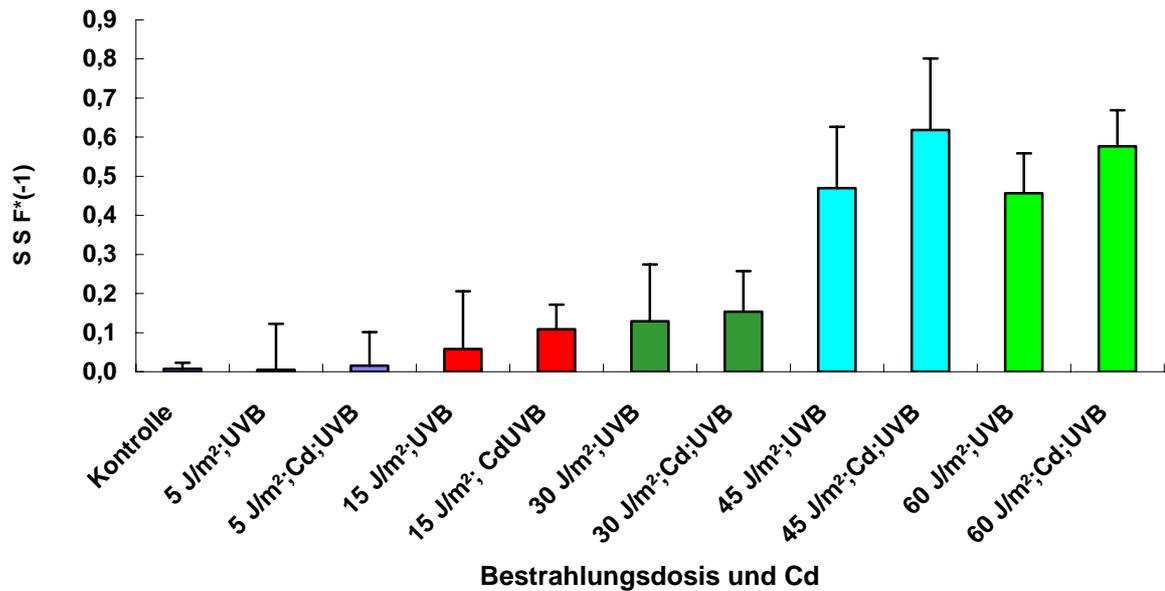


Abb. 15a: Effekt von Cadmium bei zusätzlich UV-B-Strahlung auf die DNA -Integrität

Die Abbildung 15a zeigt den Effekt einer reinen UV-B-Bestrahlung im Vergleich zu einer kombinierten Bestrahlung mit UV-B und Cd. Die DNA-schädigende Wirkung der UV-B-Strahlung steigt ab einer Dosis von 45 J/m² sprunghaft an. Bis zu einer Bestrahlungsdosis von 60 J/m² UV-B hat Cd keinen signifikanten Effekt

5.3.2 Effekt einer kombinierten Cadmium und UV-A-Bestrahlung der DNA

Die Zellen wurden mit langwelliger UV-A-Bestrahlung zusammen mit Cadmium bestrahlt. Cadmium wurde in einer Endkonzentration von 1 µg/ml kurz vor der Bestrahlung hinzugefügt. Die Zellen wurden anschließend mit UV-A der folgenden Dosen (78; 234; 468; 702; 936 J/m²) bestrahlt. Die Zellzahl der Suspension betrug 170 x 10³/ml CMFSW. Unmittelbar nach der Bestrahlung wurde der Fast Micro Test durchgeführt.

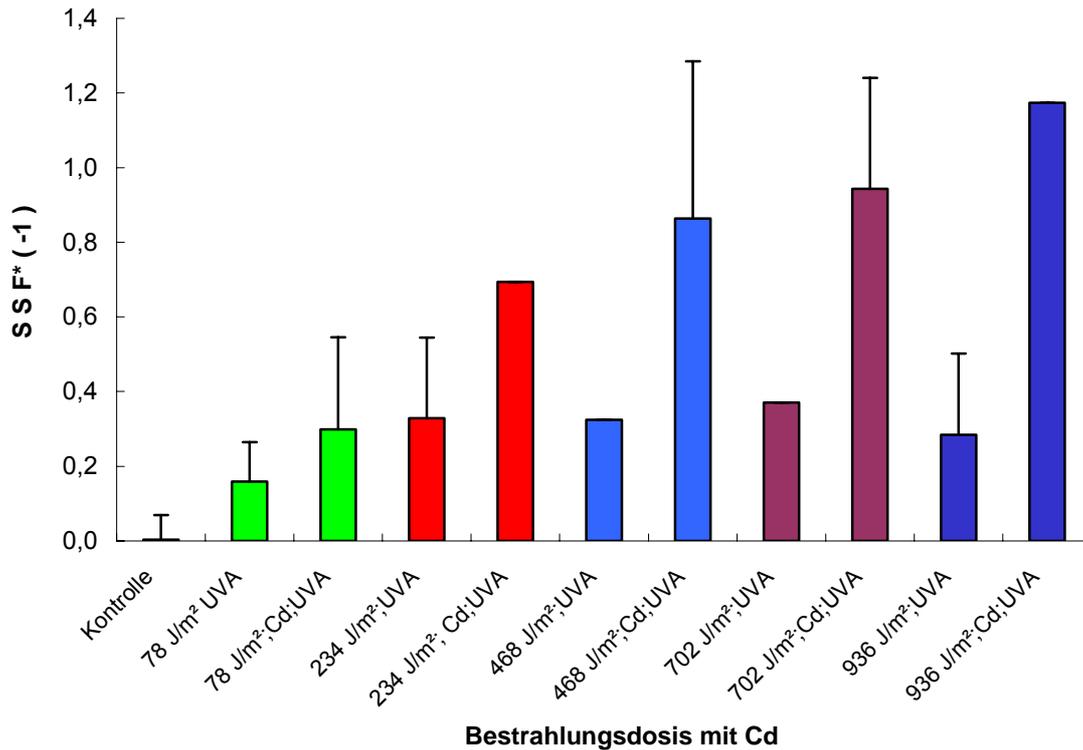


Abb. 15b: Effekt von Cadmium bei zusätzlicher UV-A-Bestrahlung auf DNA-Integrität

In der Abbildung 15b kann man die Wirkung von Cadmium auf DNA bei verschiedenen UVA Dosen beobachten. Die SSF-Werte wurden nach 18 Minuten Entwindung ausgewertet. Die Werte steigen im Vergleich zur Kontrolle bei der niedrigen Dosis 78 J/m², aber die kombinierte Wirkung von Cd und UV-A ist deutlich höher als die Wirkung reiner UV-A-Strahlung, die bei 234 J/m² einer Sättigung erreicht.

5.3.3 Auswirkung von Cadmium in Kombination mit UV-B oder UV-A und anschließender Reparatur der DNA-Schäden

Nachdem die kombinierte Wirkung von Schwermetall-Ionen bei zusätzlicher UV-Bestrahlung untersucht wurde, wurde jetzt die Reparaturfähigkeit der Zellen getestet. Die Cadmium-Konzentration betrug 1µg/ml. Ein Teil der Zellen wurden mit, der andere Teil ohne Cd behandelt. Sie wurden bei (468; 936 J/m²) UVA und (30; 60 J/m²) UV-B bestrahlt. und bei 17°C für (0; 30; 60) Minuten Reparaturzeit

inkubiert. Sie wurden dann mit der neuen, hoch sensitiven und schnellen Fast Micromethod getestet.

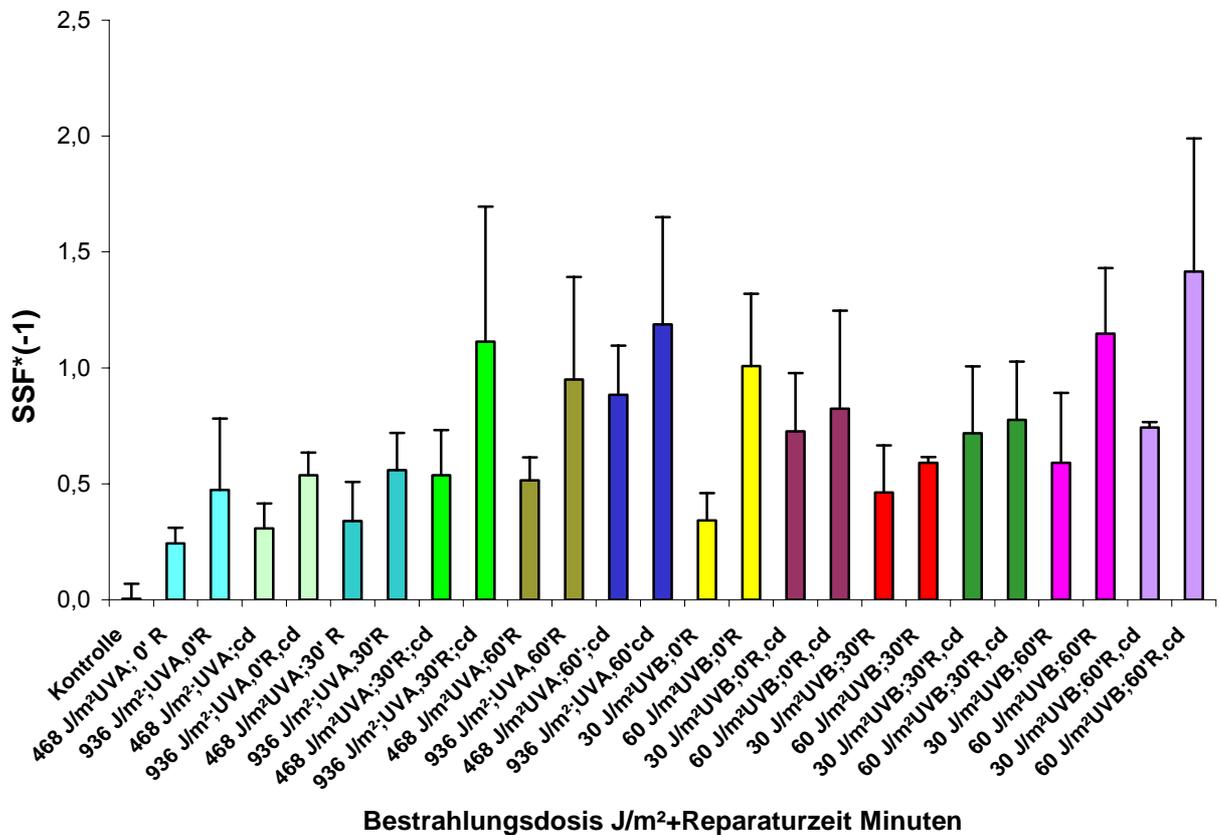


Abb. 15c: Die Auswirkung von Cadmium auf DNA-Integrität und DNA-Reparatur in Schwammzellen nach UV-A und UV-B -Bestrahlung

Die Anzahl der Einzelstrangbrüche wird durch Cadmiumchlorid beeinflusst. Bei 1µg/ml Cadmiumchlorid sind bei verschiedenen Reparaturzeiten (0, 30, 60) min die DNA-Einzelstrangbrüche unterschiedlich stark ausgeprägt.

Die Abbildung 15c zeigt, dass alle drei untersuchten Faktoren (Dosis, Reparatur, und Cadmium) eine Steigerung der SSF-Werte verursachen. Die maximalen Effekte wurden bei der jeweils höchsten Reparaturzeit in Kombination mit Cadmium beobachtet

5.4 UV-Bestrahlungen von Schwammzellen in unterschiedlichen Medien

Um zu testen, ob das Medium die UV-Effekten auf die DNA beeinflusste, haben wir die Experimente mit verschiedenen Medien durchgeführt.

ml der Suspension wurden in CMFSW suspendiert. Von dieser Lösung wurde jeweils 1 ml Zellsuspension in drei verschiedene 15 ml Röhren pipettiert und mit CMFSW, Seewasser und CMFSW+EDTA auf 5 ml aufgefüllt und auf eine Zellzahl von $170 \times 10^3/\text{ml}$ eingestellt.

Die Zellen wurden in SW, CMFSW, bzw. CMFSW+EDTA aufgenommen. Die Schwammzellen wurden mit UV-B bei (5; 30 J/m^2) bzw. mit UV-A bei (78; 468 J/m^2) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden Fast-Mikro Test durchgeführt.

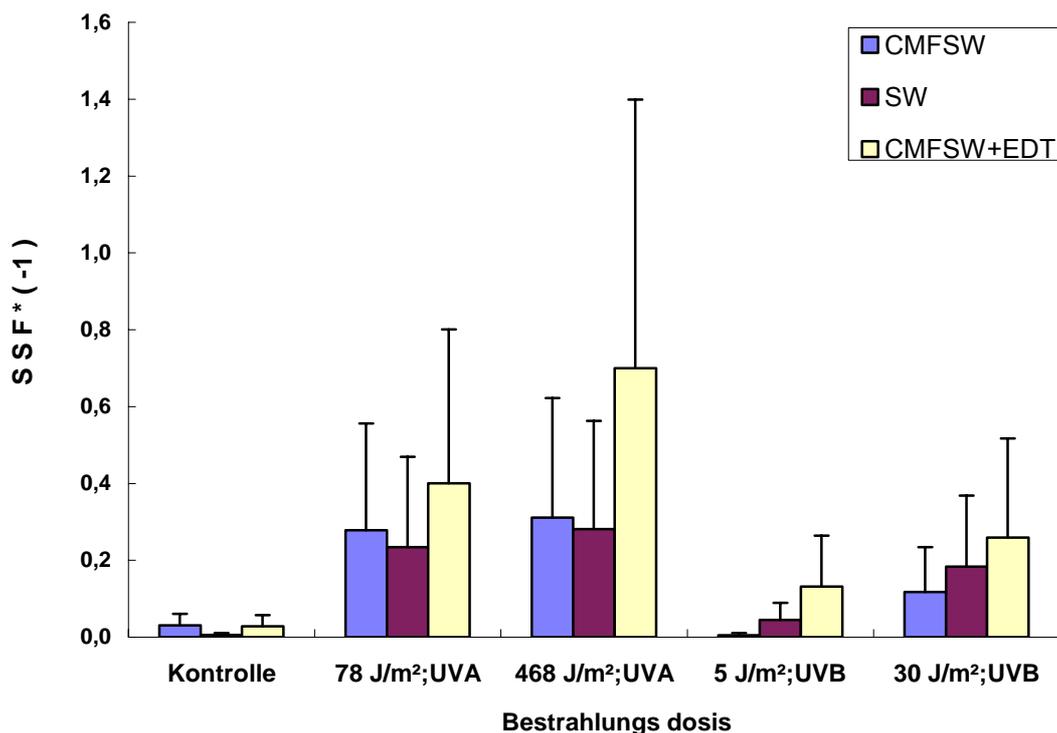


Abb. 16a: Einfluss des Mediums auf die durch UV-A bzw. UV-B induzierten Einzelstrangbrüche.

In Abbildung 16a bei dem Experiment wurde keine Inkubation erforderlich. Die meisten Strangbrüche wurden mit den in CMFSW+EDTA suspendierten Zellen

beobachtet. Die höheren SSF-Werte in CMFSW+EDTA im Vergleich zum CMFSW und SW beruhen höchstwahrscheinlich auf der Tatsache, dass nur in dem erstgenannten Medium die Zellen vollständig dissoziiert vorliegen und des halb der Strahlung mehr exponiert sind. Die eingesetzten UV-A-Intensitäten waren wirksamer als die geringeren UV-B-Intensitäten.

5.4.1 Effekt von UV-B und UV-A auf Schwammzellen in verschiedenen Umgebungsmedien und nach Reparatur

5.4.1.1 Schwammzellen nach UV-Bestrahlung und 30 Minuten Reparatur

Die Schwammzellen wurden in SW, CMFSW, bzw. CMFSW+EDTA aufgenommen. Die Zellkonzentration betrug $170 \times 10^3/\text{ml}$. Dann wurden die Suspensionen mit UV-A bei (78; 468 J/m²) und UV-B bei (5; 30 J/m²) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 30 Minuten bei 17°C inkubiert und mit der Fast Micromethod durchgeführt.

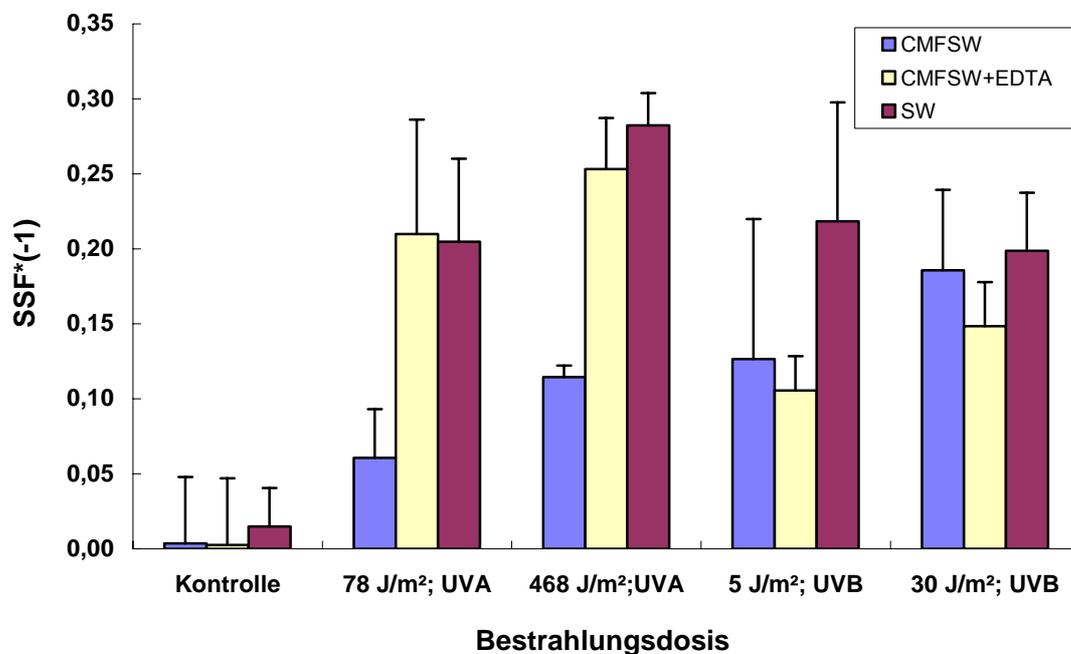


Abb. 16b: Der Einfluss des Mediums auf das Vorliegen Strahlung induzierte DNA-Einzelstrangbrüche bei 30 Minuten Reparatur

Abbildung 16b: Die Schwammzellen wurden mit UV-A bzw. UV-B bestrahlt. Sie wurden anschließend für 30 Minuten Reparaturzeit bei 17°C inkubiert. Die SSF-Werte wurden nach 18 Minuten Entwindung ausgewertet. Ein deutlicher DNA schädigender Effekt bei bestrahlten Zellen im Vergleich zur Kontrolle ist zu erkennen. Bei der UV-A sind die Werte je nach Bestrahlungsdosis angestiegen. Bei SW bzw. CMFSW+EDTA haben die SSF-Werte Maximalenwerte von etwa 0,30. Im Seewasser (SW) liegen die Zellen aggregiert als Primmorphe vor. CMFSW+EDTA hatte bei UV-A einen großen Effekt, der bei UV-B aufgrund von Quervernetzung wieder geringer ausfiel. Die SSF-Werte sind in Gegenwart von EDTA erhöht, weil die Bestrahlung bei den dissoziierten Zellen größere Schäden verursacht.

5.4.1.2 Schwammzellen nach UV-Bestrahlung und 60 Minuten Reparatur

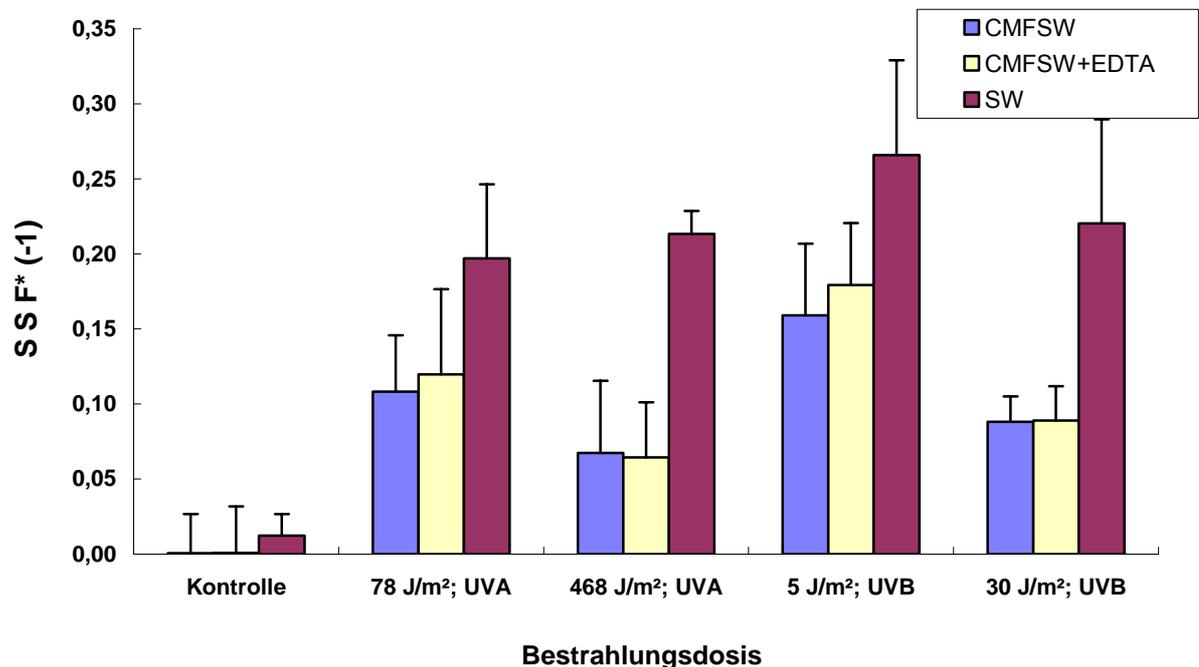


Abb. 16c: Der Einfluss des Mediums auf die durch Bestrahlung und 60 Minuten Reparatur versuchten DNA-Einzelstrangbrüche

Medium und UV Bestrahlung haben Einfluss auf die Schwammzellen. Es fällt auf, dass die Schwammzellen in CMFSW bzw. CMFSW+EDTA nach 60 Minuten Reparatur die gleichen SSF-Werte erreicht haben.

Abbildung 16c zeigt den Effekt auf die Integrität der DNA Strangbrüchen bei (78; 468 J/m²) Bestrahlung mit UV-A. Der SSF-Wert ist nach 20 Minuten Messung ausgewertet. Es zeigt sich ein großer Unterschied zwischen Abb. 16a (ohne Reparatur) und Abb.16c mit 60 Minuten Reparatur. Dadurch wurde nachgewiesen, dass die Zellen zur Reparatur befähigt sind und die Reparaturzeit abhängig ist. Im CMFSW+EDTA finden nur Strangbrüche ohne Reparatur statt, da die Zellen nicht aggregiert waren. Dagegen traten im SW mehr DNA-Strangbrüche auf da in den aggregierten Zellen durch Endonucleasen eine erhöhte Reparatur aktiviert vorliegt.

5.4.1.3 Schwammzellen nach UV-Bestrahlung bei 24h Reparatur

Die Zellen wurden nach der Bestrahlung mit UV-A (78; 468 J/m²) oder UV-B (5; 30 J/m²) im Brutschrank bei 17°C über Nacht aufbewahrt. Nach 24h Inkubation (Reparatur) wurden die Proben nach der Fast-Micromethod getestet.

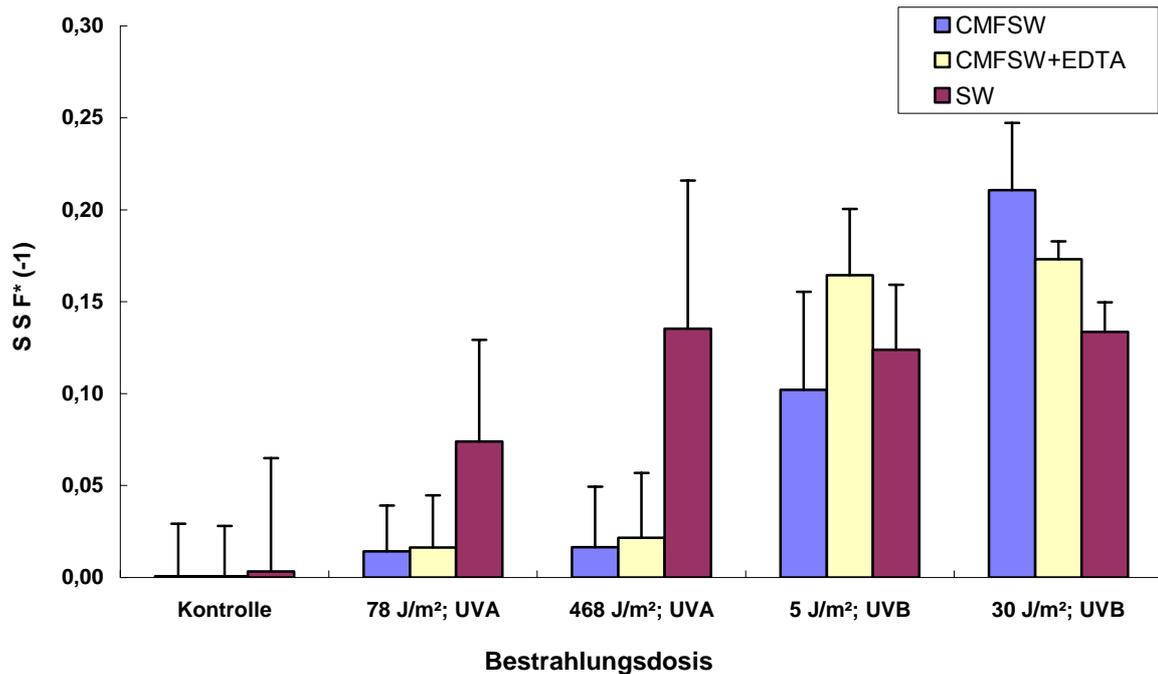


Abb. 16d: Der Einfluss des Mediums auf die durch Bestrahlung und 24h Reparatur versuchten DNA-Einzelstrangbrüche

Abbildung 16d zeigt die Integrität DNA. Die SSF-Werte wurden nach 20 Minuten Messung ausgewertet. Es zeigten sich keinen Unterschieden zwischen den Werten in CMFSW und in CMFSW+EDTA nach UV-A Bestrahlung. Nach UV-B Bestrahlung mit 5 J/m² war in CMFSW und in CMFSW+EDTA im Vergleich zur Kontrolle noch ein deutlicher Anstieg zu beobachten. Bei UV-B-Bestrahlung traten deshalb nicht mehr DNA-Strangbrüche auf, weil die Reparatur abgelaufen ist. Bei UV-A-Bestrahlung wurde im SW die bessere Reparatur erreicht.

Wie zu erwarten erfolgte bei der längeren Inkubationszeit mehr Reparatur. In CMFSW+EDTA und SW sind wegen Quervernetzung oder apoptotischen Zellen die SSF-Werte zurückgegangen.

5.5 Effekt von verschiedenen Schwermetall-Ionen auf Schwammzellen

Zur Durchführung der Versuche wurden Schadstoffe gewählt, die eine toxikologische Relevanz für die zu untersuchenden Organismen besitzen, die in den gewählten Zellen gut akkumuliert werden, außerdem persistent sind und die in den Meeren bereits anzutreffen sind. Die Schwamm-Zellen mit (Cd, Ni, Cu, Co, Zn) wurden aufgrund der prinzipiell unterschiedlichen Wirkungen nach der Fast-Mikromethod getestet. Die Zellkonzentration betrug 180×10^3 in CMFSW. Die Zellen für 10 min bei 17°C inkubiert.

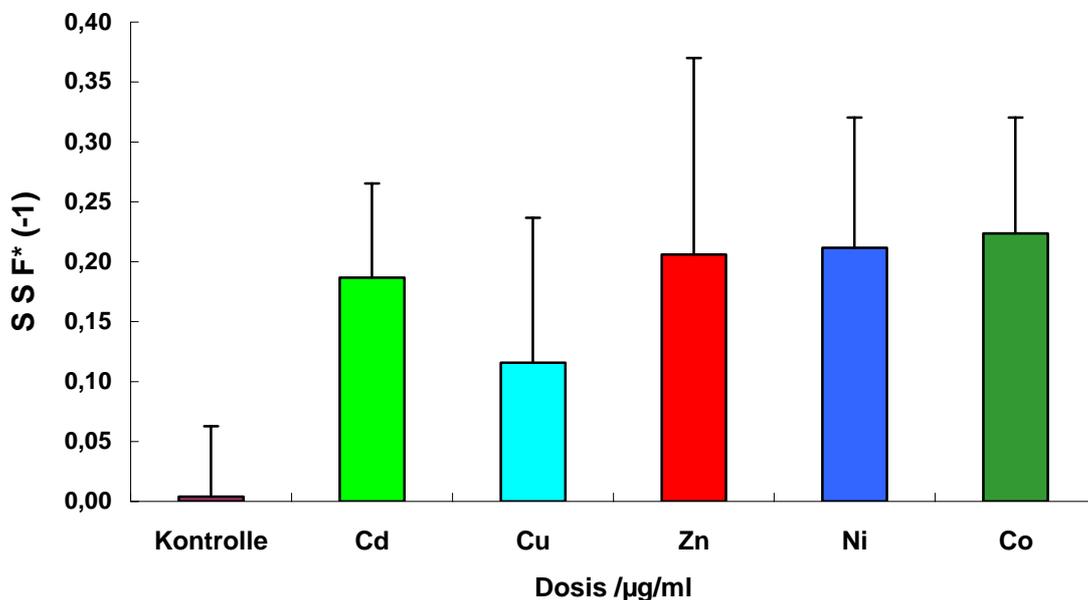


Abb. 17 Einfluss verschiedener Metall-Ionen auf die DNA-Integrität in Schwammzellen

In Abbildung 17 zeigt die Effekte von verschiedenen Schwermetallionen (Cd; Cu; Zn; Ni; Co bei $1\mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) auf Schwammzellen (*S. domuncula*). Die SSF-Werte wurden nach 20 Minuten Entwindung ausgewertet. Die Werte der Proben sind im Vergleich zu Kontrolle bereits nach einer solchen kurzen Inkubationszeit allgemein angestiegen, alle Metalle zeigen eine ähnliche Wirksamkeit.

5.5.1 Behandlung von Schwammzellen mit Schwermetall-Ionen

Die Schwammzellen sind im CMFSW aufgenommen. Die Zellen wurden mit Schwermetall-Ionen (Cd; Ni; Co; Cu; Zn Endkonzentration 1 µg/ml) behandelt und anschließend im Brutschrank bei 17°C in verschieden lang (0; 30; 60; 120 Minuten).inkubiert.

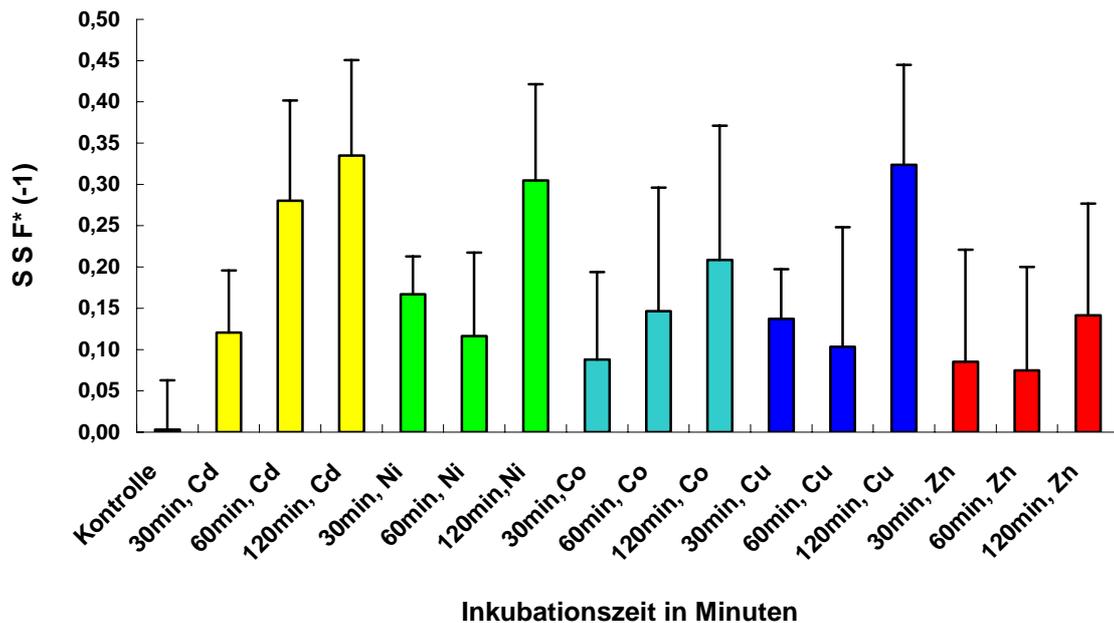


Abb. 18: Vergleich des Effekts von Schwermetallionen auf Schwammzellen bei verschiedenen Reparaturzeiten

Abbildung 18 zeigt die Effekte von Schwermetall-Ionen auf die DNA Integrität. Die SSF-Werte steigen bei allen Metallen mit zunehmender Inkubationszeit an. Die bei 60 min Inkubation beobachteten Rückgänge der SSF-Werte (Ni, Co, Zn) sind wohl das Ergebnis von Quervernetzungen.

5.6 Effekt von Schwermetall-Ionen in verschiedenen Konzentrationen auf die DNA-Integrität.

5.6.1 Effekt der Cadmium Konzentration auf Schwammzellen

Die Schwammzellen wurden in verschiedenen Medien CMFSW; SW, bzw. CMFSW+EDTA aufgenommen. Die Zellkonzentration beträgt $180 \times 10^3/\text{ml}$ und es wurde Cadmium (Cd) in verschiedenen Konzentrationen dazugefügt. Die Proben wurden für 2h bei 17°C inkubiert. Die Schwammzellen sind mit verschiedenen Cd-Konzentrationen (10^{-12} ; 10^{-10} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} $\mu\text{g}/\text{ml}$) ausgesetzt.

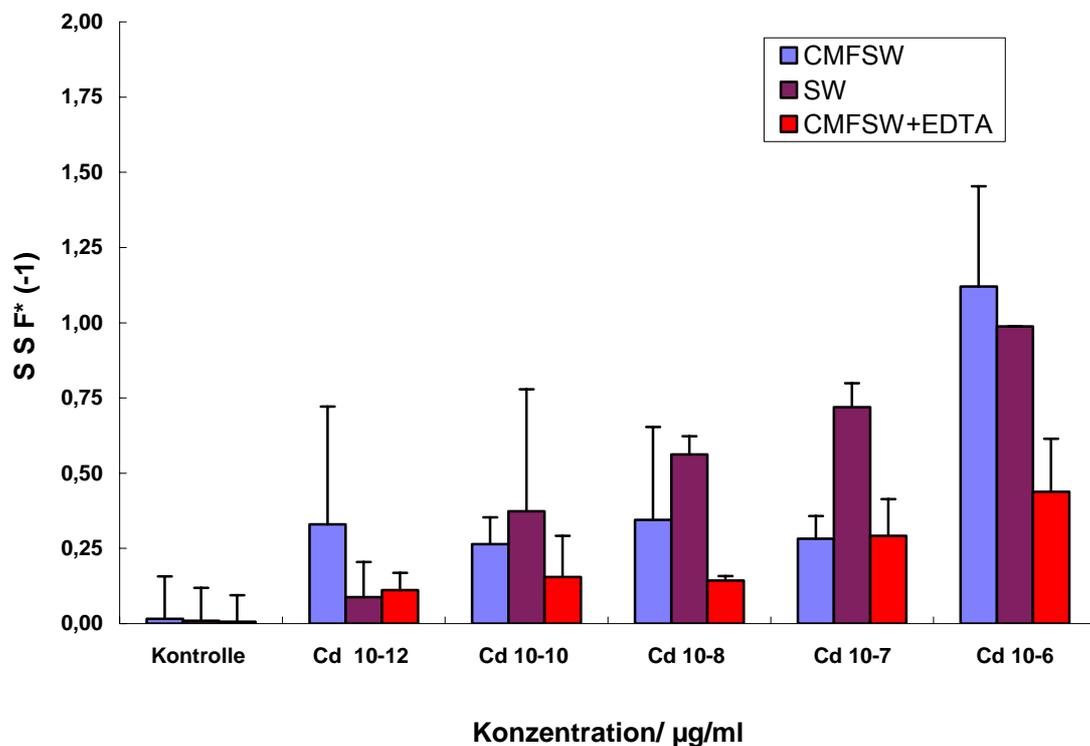


Abb. 19: Einfluss unterschiedlicher Cd-Konzentrationen auf der DNA-Integrität von Schwammzellen. Die Kontrolle sind unbehandelte Schwammzellen.

Abbildung 19 zeigt die Integrität der DNA nach Cd-Inkubation in Fast Micro Test. Die SW Proben zeigte einen kontinuierlichen Anstieg des SSF-Wertes, bei CMFSW bewirkte Cd in allen niedrigen Konzentrationen zwischen 10^{-12} und 10^{-7}

$\mu\text{g/ml}$ ein geringes Auftreten von Strangbrüchen, bei 10^{-6} $\mu\text{g/ml}$ dann jedoch einen sprunghaften Anstieg. Die Gegenwart von EDTA verminderte das Auftreten von Strangbrüchen erheblich, möglicherweise durch Komplexbildung mit den Metallen, wodurch die effektive Metall Konzentration verringert wäre.

5.6.2. Effekt von Nickel sowie verschiedenen Medien auf die DNA

Die Schwammzellen wurden in verschiedenen Medien wie CMFSW, SW, CMFSW+EDTA aufgenommen. Es wurde Nickel in verschiedenen Endkonzentrationen (10^{-12} ; 10^{-10} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6}) dazugefügt. Dann wurden die Proben für 2 Stunden bei 17°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Fast Micro Test durchgeführt.

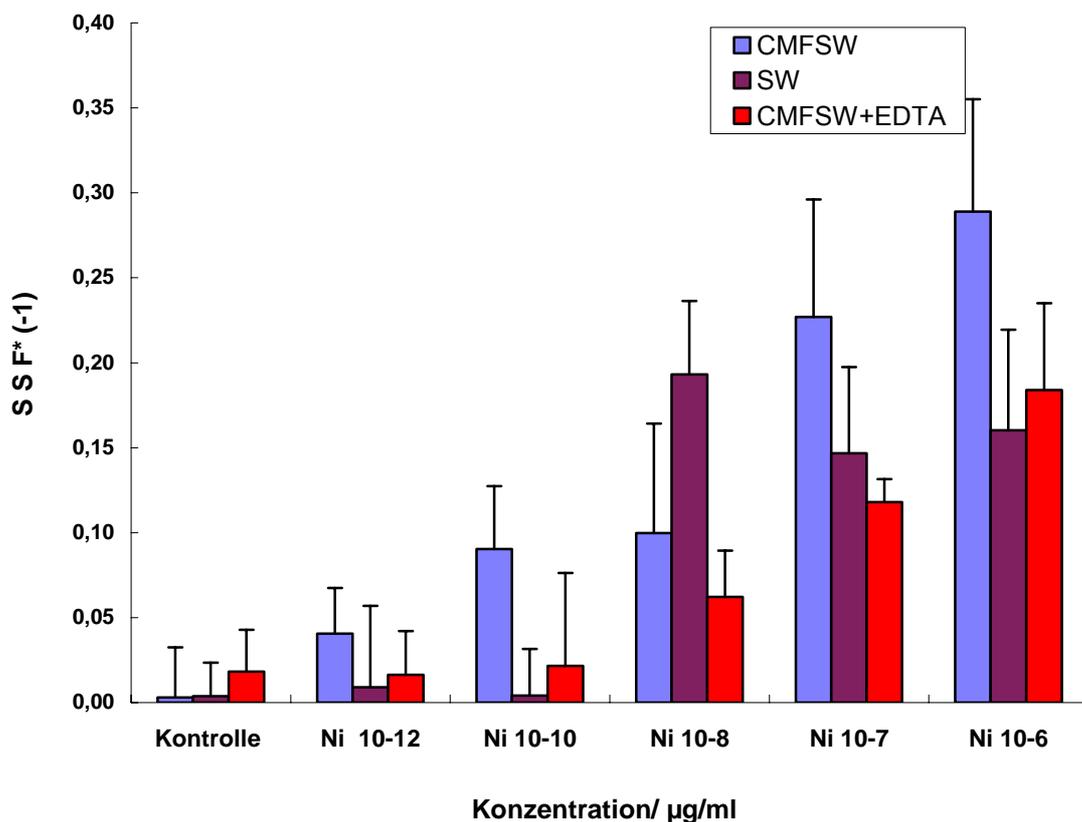


Abb. 20: Schädigender Effekt von Nickel auf DNA

Abbildung 20 zeigt die erhaltenen Ergebnisse Die SSF-Werte wurden nach 19 Minuten Entwindung/Denaturierung bestimmt. In CMFSW zeigen sich bis 10^{-8}

$\mu\text{g/ml}$ ein relativ geringer Effekt und darüber ein deutlicher Anstieg des SSF-Wertes. Mit CMFSW+EDTA werden bei prinzipiell ähnlicher Konzentrationsabhängigkeit insgesamt geringere SSF-Werte erhalten. Die Gegenwart von EDTA verminderte das Auftreten von Strangbrüchen erheblich, möglicherweise durch Komplexbildung mit den Metallen, wodurch die effektive Metallkonzentration verringert wäre.

5.6.3 Effekt von Kobalt auf Schwammzellen

Die Schwammzellen wurden nach der Zellisolierung in verschiedenen Medien CMFSW, SW, CMFSW+EDTA aufgenommen. Den Suspension wurden verschiedene Kobaltkonzentrationen zugesetzt (10^{-12} ; 10^{-10} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} $\mu\text{g/ml}$) und die Zellen wurden anschließend für 2 Stunden bei 17°C inkubiert.

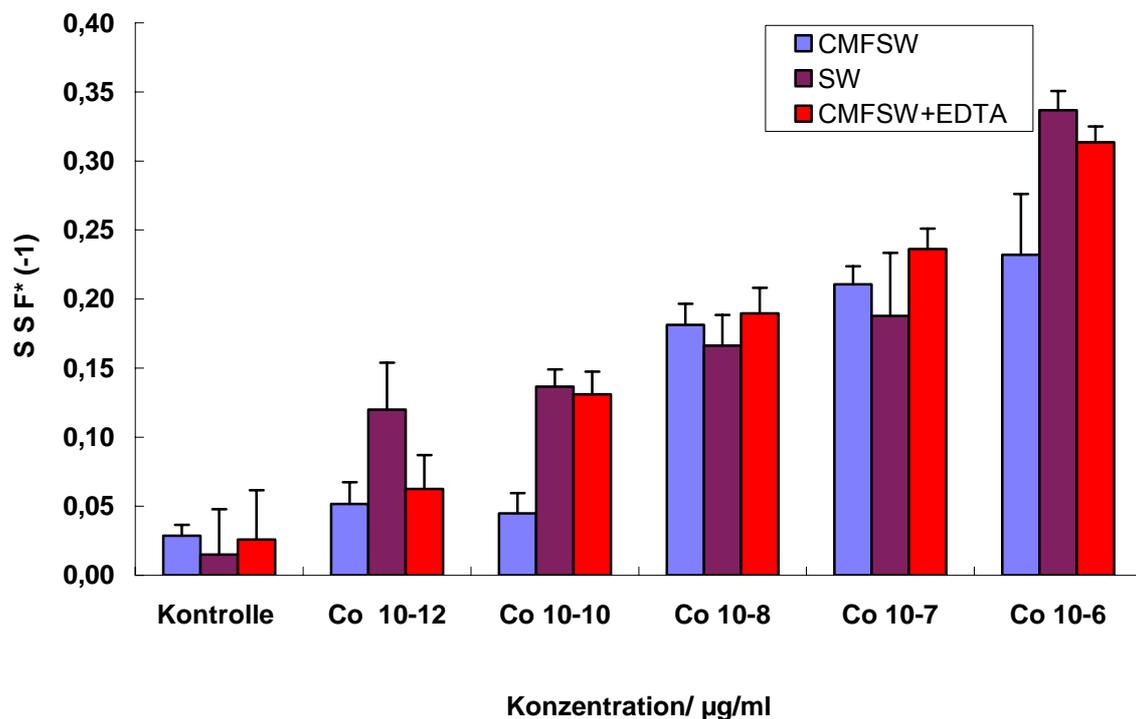


Abb. 21: Effekte von Kobalt auf die DNA

Abbildung 21 zeigt den Einfluss von Kobalt auf die DNA-Integrität. Die Proben wurden nach der Inkubationszeit nach der Fast-Micromethod getestet. Die SSF-

Werte wurden nach 19 min Entwindung ausgewertet. Nach den SSF-Werten zu urteilen, induzieren bereich extrem niedrige Co-Konz. DNA-Strangbrüche.

5.6.4 Effekte von Kupfer auf die DNA

Die Schwammzellen wurden in verschiedenen Medien (CMFSW, SW, CMFSW+EDTA) aufgenommen. Die Schwammzellen wurden anschließend mit verschiedenen Cu Konzentrationen (10^{-12} ; 10^{-10} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} $\mu\text{g/ml}$) versetzt und wurden dann 2 Stunden bei 17°C inkubiert.

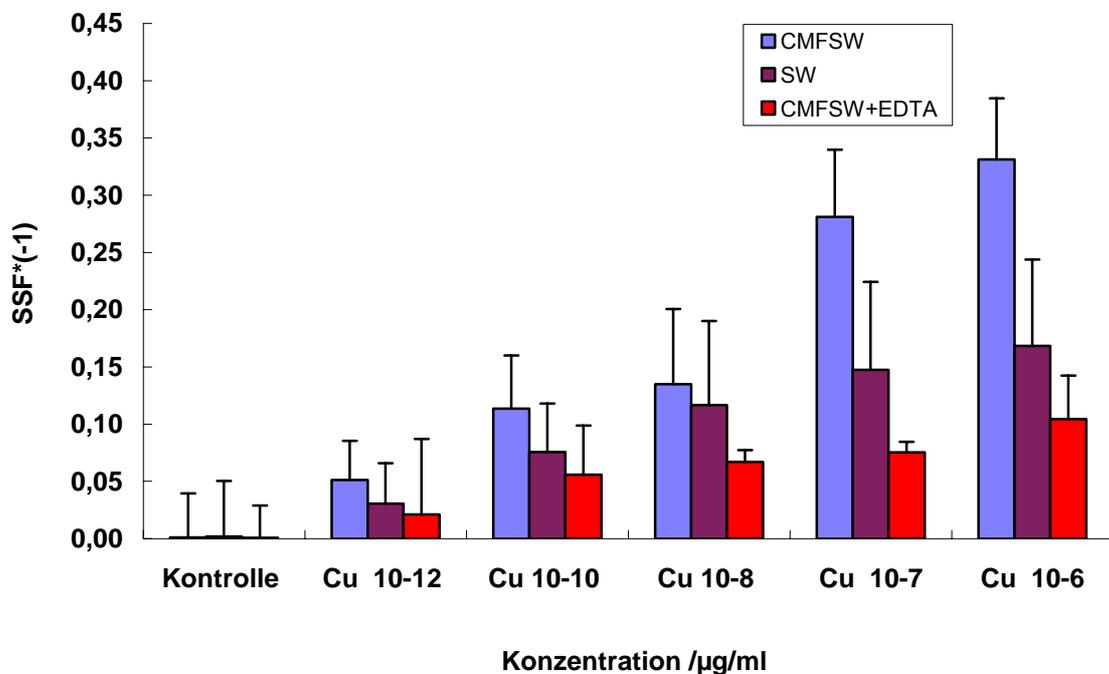


Abb. 22: DNA-Schädigung durch Kupfer

Abbildung 22 zeigt die Effekte von Kupfer auf DNA. Die behandelten Zellen wurden mit der Fast-Micromethod untersucht. Die SSF-Werte wurden nach 20 Minuten Denaturierungszeit ausgewertet. In CMFSW versuchen ansteigende Cu Konzentrationen eine Zunahme der DNA-Strangbrüche. Dieser DNA-schädigende Effekt wird ab einem Gehalt von 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ besonders auffällig. Der geringere Effekt von Cu in SW-Medium kann mit Zellaggregationen zusammen hängen. Zu

EDTA-haltigen CMFSW treten niedrigsten Effekte auf. Wahrscheinlich wird die wirksame Cu-Konzentration durch die Komplexbildung mit EDTA stark vermindert.

5.6.5 Effekt von Zink auf die DNA

Die Schwammzellen wurde in verschiedenen Medien CMFSW; SW; CMFSW+EDTA aufgenommen. Sie wurden mit verschiedenen Zi-Konzentrationen (10^{-12} ; 10^{-10} ; 10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} $\mu\text{g/ml}$) versetzt. Die Inkubationszeiten betrug 2 Stunden bei 17°C , die Zellkonzentration 200×10^3 .

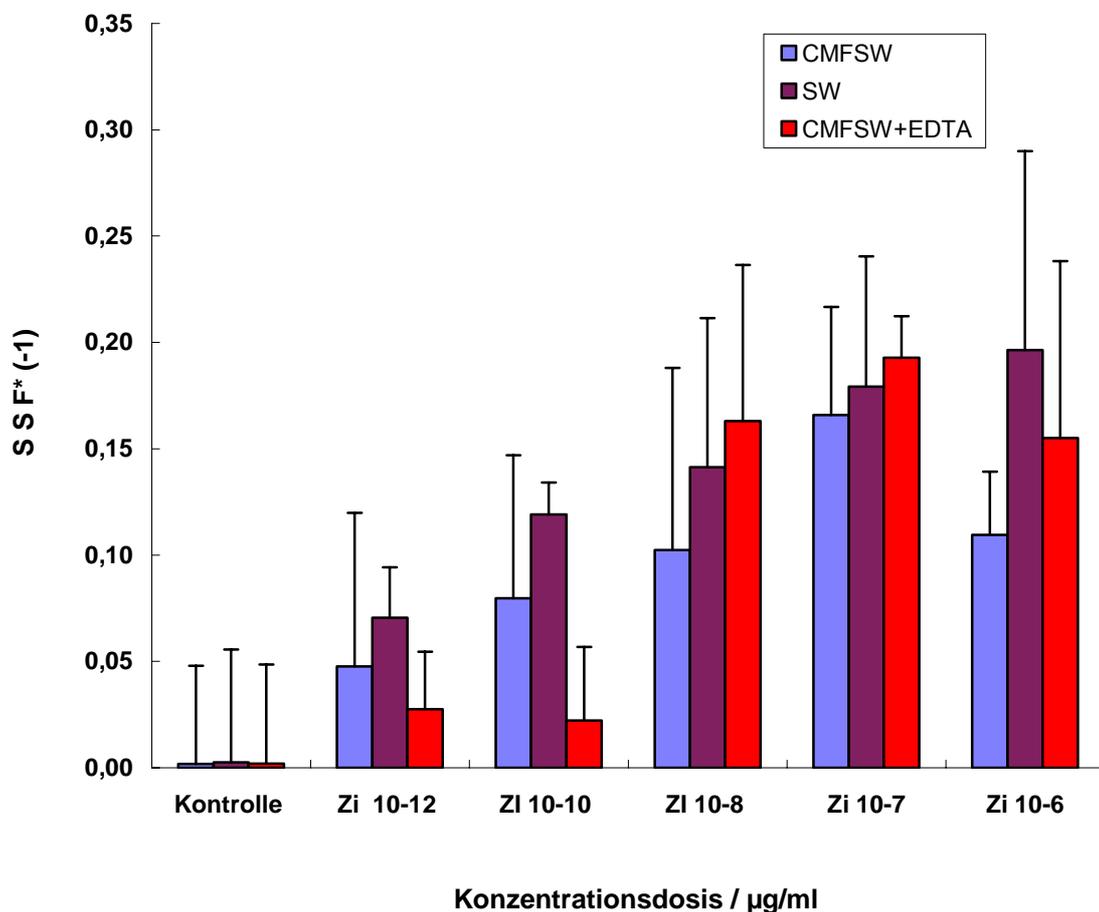


Abb. 23: Die Effekte von Zink auf DNA

Abbildung 23 zeigt die Effekte von Zink auf DNA. Die Zellen wurden wie oben nach der Inkubationszeit nach der Fast Micromethod getestet. Die SSF-Werte

wurden nach 19 Minuten DNA-Entwindung gemessen und ausgewertet. Die SSF-Werte zeigen, dass in allen Proben steigende Zi-Konzentration eine Zunahme der Strangbrüche verursacht.

5.7 Effekt von verschiedenen Schwermetall-Ionen in Kombination mit UV-A bzw. UV-B auf Schwammzellen

5.7.1 Effekt von Kobalt und gleichzeitiger UV-Bestrahlung auf die DNA

Die Schwammzellen wurden mit UV-A mit einer Dosis von 78; bzw. 468 J/m² und UV-B von 5 bzw. 30 J/m² bestrahlt. Die bestrahlten Proben wurden für 30 und 60 Minuten im Berutschrank bei 17°C inkubiert; und dann die DNA-Schäden mit der Fast Micromethod analysiert. Die Zellkonzentration betrug 200 x 10³ in CMFSW. Die Auswertung erfolgte nach 20 min Entwindung.

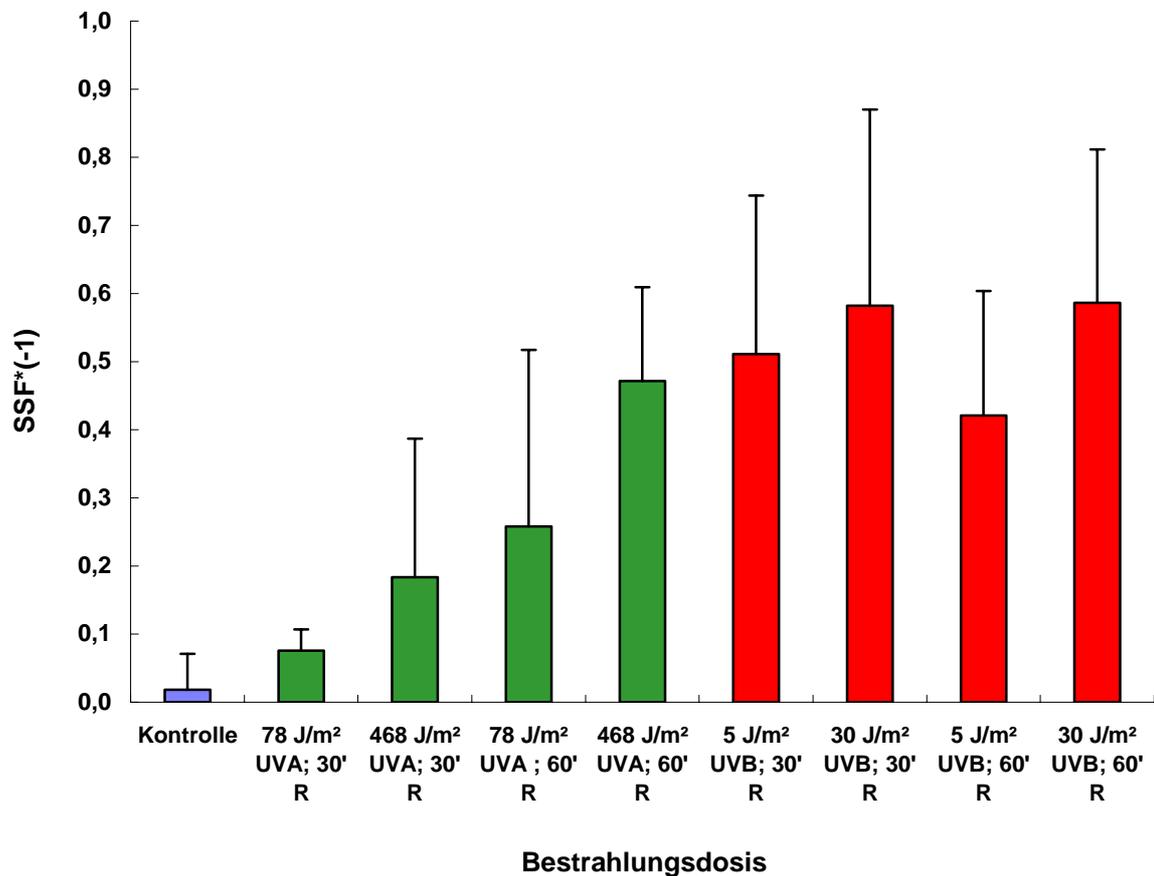


Abb. 24: Effekt von Co auf die DNA bei gleichzeitiger UV-Bestrahlung sowie 30 und 60 Minuten Reparatur

Abbildung 24 dokumentiert, dass die SSF-Werte bei gleicher Reparaturzeit mit Zunahme der Strahlungs-dosis ansteigen. Die SSF-Werte wurde nach 20 Minuten Messung ausgewertet Die SSF-Werte steigen bei UV-A-Bestrahlung bei gleicher Strahlungs-dosis auch mit Steigender Reparaturzeit an.

5.7.2 Effekt von Nickel bei gleichzeitiger UV-Bestrahlung auf die DNA

Die Schwammzellen wurden mit Nickel (Endkonzentration 1µg/ml) versetzt. Die Proben wurden mit UV-B und UV-A bestrahlt und nach der Bestrahlung wurden sie 30 bzw. 60 Minuten bei 17°C inkubiert und nach Fast Micromethod getestet. Zellkonzentration betrug 200×10^3 /ml in CMFSW.

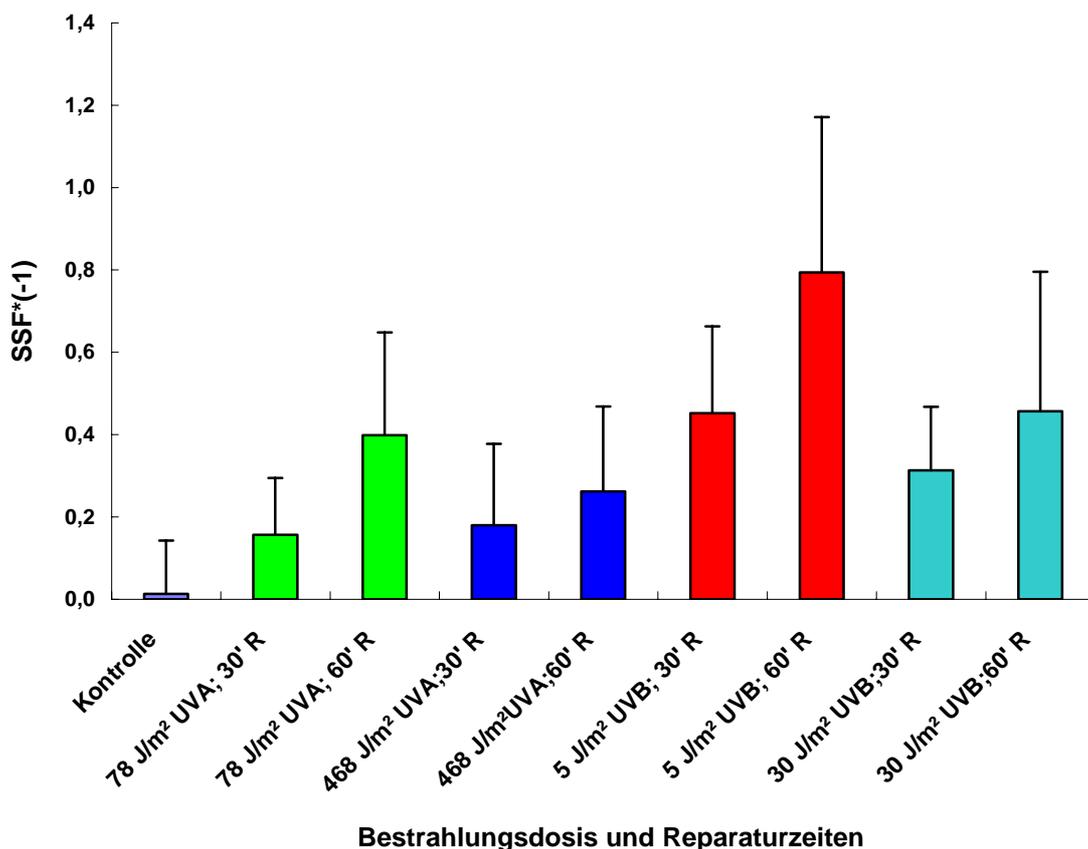


Abb. 25: Effekt von Nickel und UV auf DNA

Nach der Exposition wurden die SSF-Werte der Probe nach 20 Minuten Entwindungszeit bestimmt. Abbildung 25 zeigt, dass die SSF-Werte je nach

Reparaturzeit angestiegen sind. Allerdings mit Ausnahme der 30 Minuten Reparaturwerte der UV-A-Bestrahlungen bei 78 J/m² und 468 J/m² eine Abnahme der SSF-Werte bei der jeweils höheren Dosis ein. Im Gegenteil UV-B-Bestrahlung bei 5 J/m² Bestrahlung mit 60 min Reparaturzeit höherer SSF-Werte erreicht hat.

5.7.3 Effekt von Kupfer bei gleichzeitiger UV-Bestrahlung auf die DNA

Die Schwammzellen wurden mit 1µg/ml Endkonzentration Kupfer behandelt. Die Zellkonzentration betrug 200 x 10³/ml in CMFSW.

Die Proben wurden mit UV-B der Dosis 5; 30 J/m² und UV-A der Dosis 78; 468 J/m² bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden die Zellen für 30 bzw. 60 Minuten bei 17°C im inkubiert. Dann wurden sie nach der Fast Micromethod durchgeführt.

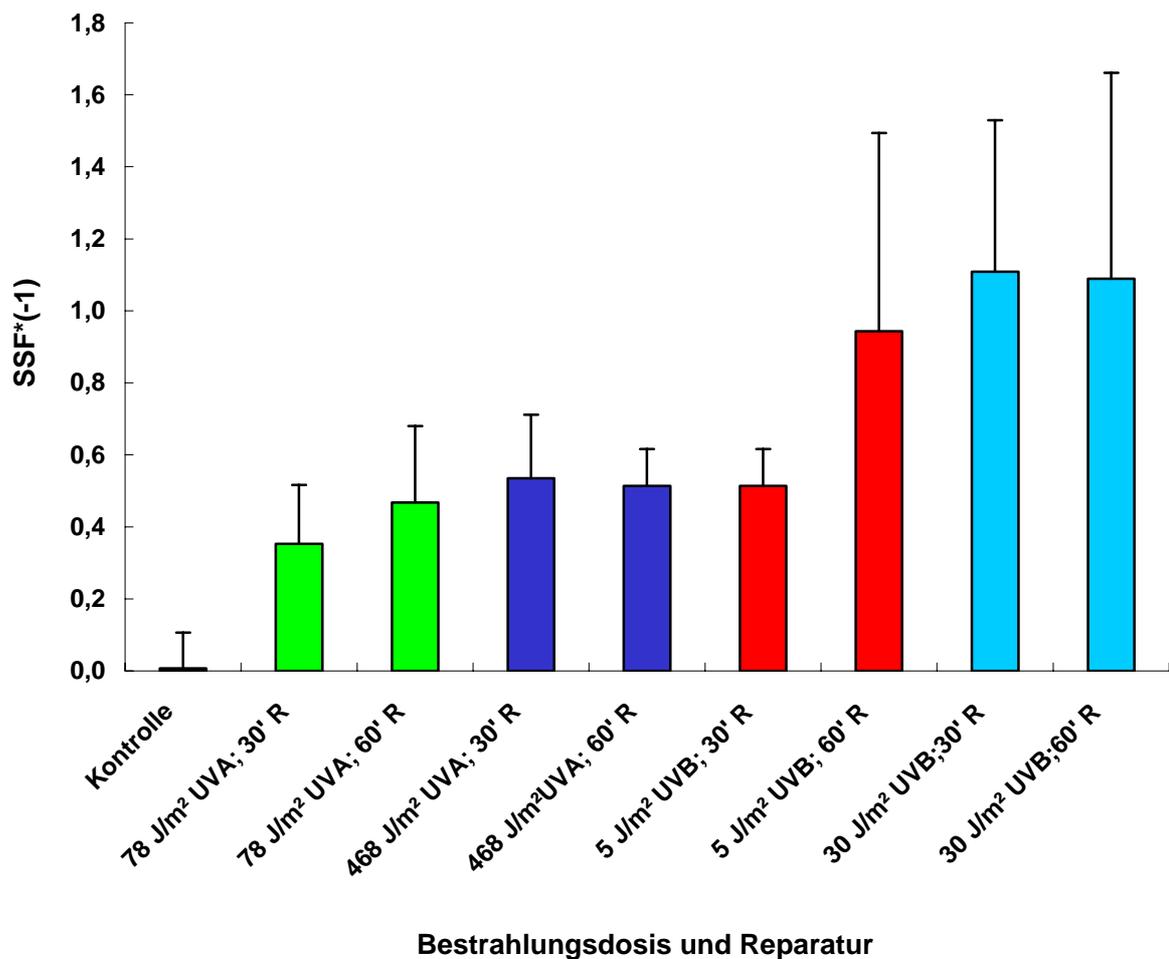


Abb. 26: Einfluss von Kupfer und UV auf DNA

Abbildung 26 zeigt die Effekte von Kupfer auf DNA-Strangbrüche in Kombination mit UV-A bzw. UV-B. Die SSF-Werte wurden nach 20 Minuten Entwindung gemessen und ausgewertet. Die Werte zeigen für UV-A eine geringe bzw. keine Dosisabhängigkeit. Bei der UV-B-Bestrahlung zeigt bei 5 bzw. 30 J/m² bei 30 und 60 Minuten Reparaturwerten eine Dosisabhängigkeit.

5.7.4 Effekt von Zink mit gleichzeitiger UV-Bestrahlung auf die DNA

Die Zellkonzentration Schwammzellen von *S. domuncula* betrug 200×10^3 in CMFSW. Die Zellen sind in $1 \mu\text{g/ml}$ Endkonzentration Zi suspendiert, und die Proben wurden mit UV-B (5; 30 J/m²) bzw. UV-A (78; 468 J/m²) bestrahlt. Nach der Bestrahlung wurden sie für 30 und 60 Minuten bei 17°C inkubiert, anschließend wurde der Fastmicro Test durchgeführt.

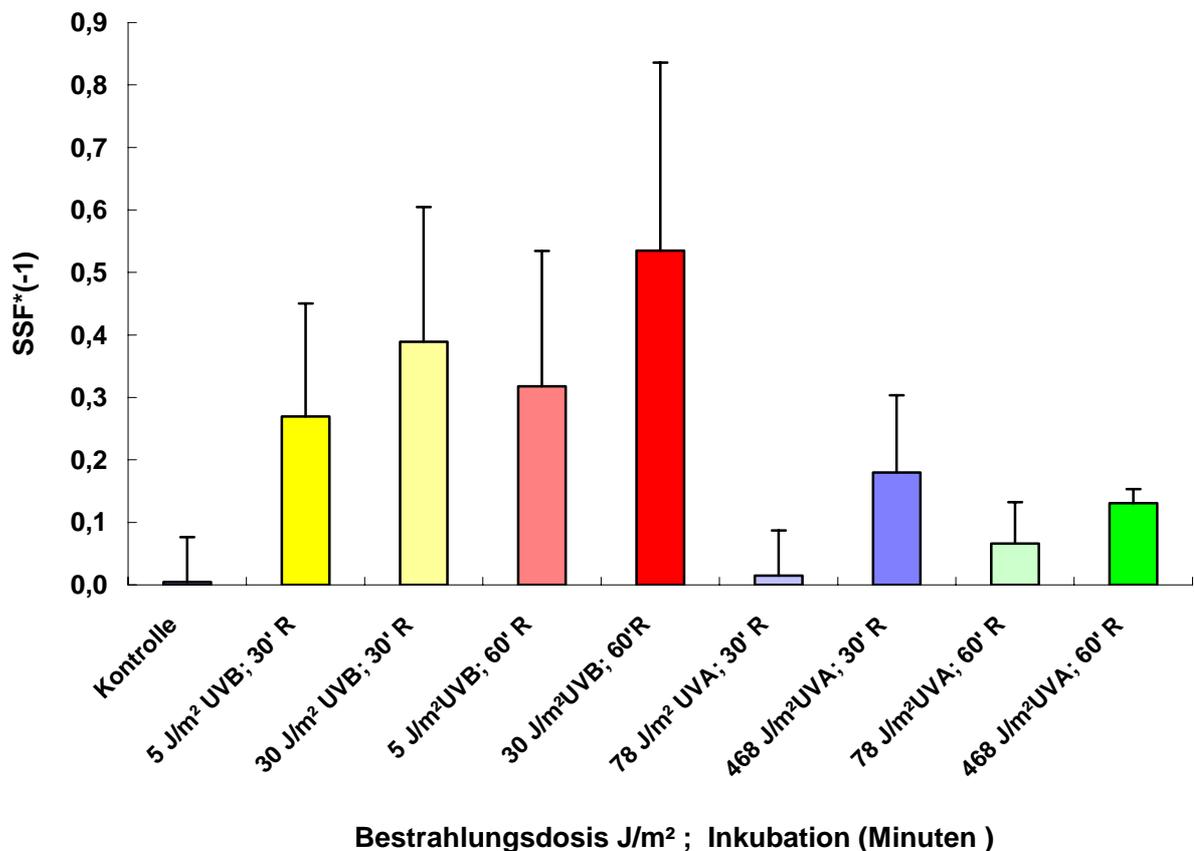


Abb. 27: Effekt von Zink und UV-Bestrahlung auf DNA

Abbildung 27 zeigt die Effekte von Schwermetall-Ionen zusammen mit UV-B bzw. UV-A auf DNA-Strangbrüche. Die SSF-Werte wurden nach 20 Minuten Denaturierung gemessen und ausgewertet. Das ist auffällig, dass mit UV-B im Vergleich zu den Ergebnissen mit den anderen Metall-Ionen ein weitaus größerer Unterschied zu UV-A vorliegt.

6. Diskussion

Es war das Ziel dieser Arbeit, den Effekt von UV-Bestrahlung auf HeLa-Zellen bzw. Schwammzellen und insbesondere hinsichtlich verschiedener Schadstoffe zu untersuchen. Die hierzu eingesetzte Fast-Micromethod basiert im Prinzip auf der Entwindung von DNA unter alkalischen Bedingungen. Sie bietet den Vorteil einer hohen Sensitivität und erlaubt die Analyse von DNA-Schäden, die durch chemische Faktoren wie z. B. Schwermetall-Ionen, und physikalische Ursachen, z. B. UV, induziert wurden.

Grundlage dieser Untersuchungsmethode ist die Tatsache, dass UV-Licht auch in größere Wassertiefen bis zu 30m eindringen kann (Smith R.C; Prezelin BB 1992). Deswegen ergab sich die Frage, ob der UV-B-Anteil einen schädigenden Effekt auf Schwämme ausüben kann. Schwämme wurden für diese Arbeit als Testorganismen ausgewählt, weil sie in marinen Ökosystemen einen größeren Teil der Biomasse darstellen. Zunächst wurde die Fast-Micromethod zur Untersuchung von chemisch induzierten Strangbrüchen eingesetzt.

Verwendet wurde die bekannte Substanz NQO und verschiedenen Arten energiereicher Strahlungen. Als Vergleich dienten HeLa-Zellen, weil für dieses Zellsystem zahlreiche Daten über DNA-Strangbrüche zur Verfügung stehen. Somit konnte es als ein etabliertes Zellsystem den noch weniger bekannten Schwammzellen gegenübergestellt werden.

Gewählt wurde die schnelle Mikromethode (Fast-Micromethod). Die schnelle Mikromethode kann in verschiedenen Bereichen eingesetzt werden. Untersuchungsobjekte und Induktion der DNA-Schäden können variieren. Der Test wurde von mir an zwei Zelltypen, HeLa-Zellen bzw. Schwamm-Zellen zum Nachweis von Schwermetall induzierten Strangbrüchen verwendet. Weiterhin wurden mit dem Fast-Micro Test entsprechend den oben genannten Versuchsbedingungen (Behandlung mit NQO Abb. 5b; Cd Abb. 9b; energiereiche Strahlung Abb. 6b) in HeLa-Zellen Einzelstränge nachgewiesen. Das gentoxische

Potential der gewählten Behandlungen und die Anwendbarkeit des Fast-Micro Tests zum Nachweis von Einzelstrangbrüchen ist damit gezeigt worden.

Mit diesen erprobten Methoden sollte dann das Testsystem Schwamm untersucht werden.

Hierbei wurde das Schwammprimmorphsystem verwendet (Custodio, M.R. *et al.*; 1998). Diese Primmorphen wurden durch Dissoziation von Schwammgewebe in Gegenwart von EDTA erhalten. Die erhaltenen, Einzelzellen zeigen jedoch keine weitere Proliferation und sterben nach weiterer Inkubation in CMFSW durch Apoptose ab. Es kommt zur Bildung von Primmorphen, wenn zu den Zellsuspensionen Calciumhaltiges Seewasser gegeben wird.

Die Primmorphen zeigen im Gegensatz zu Schwammeinzelzellen Proliferation und Differenzierung. Daher ist davon auszugehen, dass die Zellen von Primmorphen auch über effektive DNA-Reparatursysteme verfügen. Die Zellen dieser Primmorphen gehen im Gegensatz zu Schwammeinzelzellen auch keine Apoptose ein. Der Hauptgrund hierfür scheint in der Tatsache zu liegen, dass die Zellen der Primmorphen im Gegensatz zu den Schwammeinzelzellen über eine hohe Telomeraseaktivität verfügen. (Le Penneec; *et al.*; 2003).

Die Abbildung unten zeigt die Schwammzellen in CMFSW isoliert, wobei die Schwammzellen als Einzelzellen erscheinen.

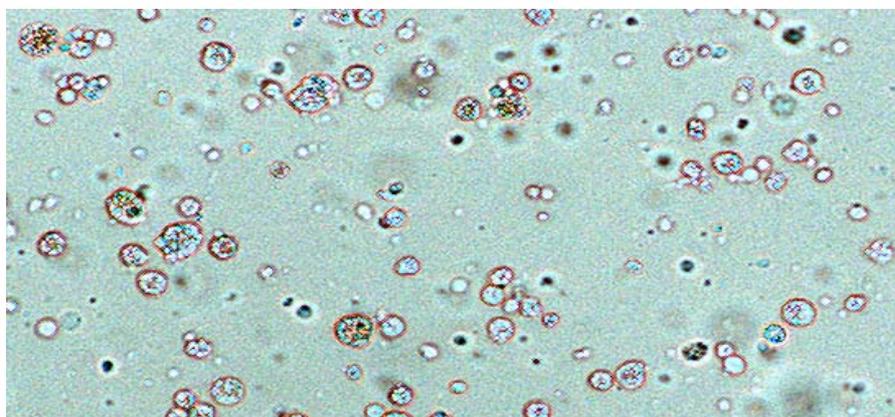
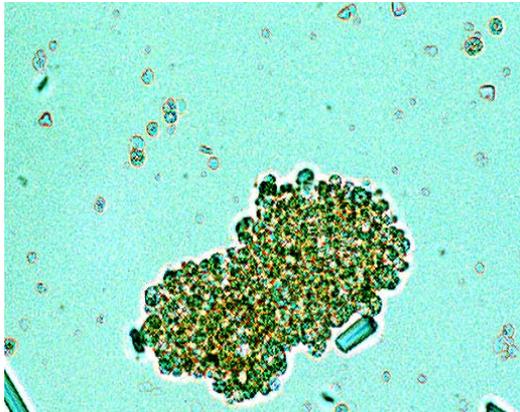
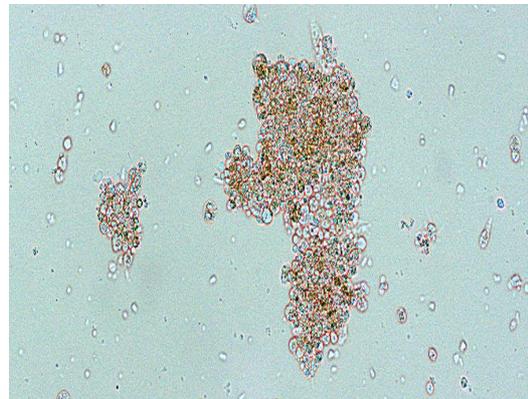


Abb. 6.1 Normale Schwammzellen



a



b

Abb. 6.2. Schwammzellen in Seewasser sind verklumpt.

Inkubation nach 60 Minuten (a); Inkubation nach 24 h (b)

Schwammzellen sind in verschiedenen Medien wie CMFSW, CMFSW+EDTA, und Seewasser unterschiedlich organisiert. Im SW erfolgt eine Aggregation (flächig oder räumlich, in CMFSW erscheinen lineare Aggregat ausformen).

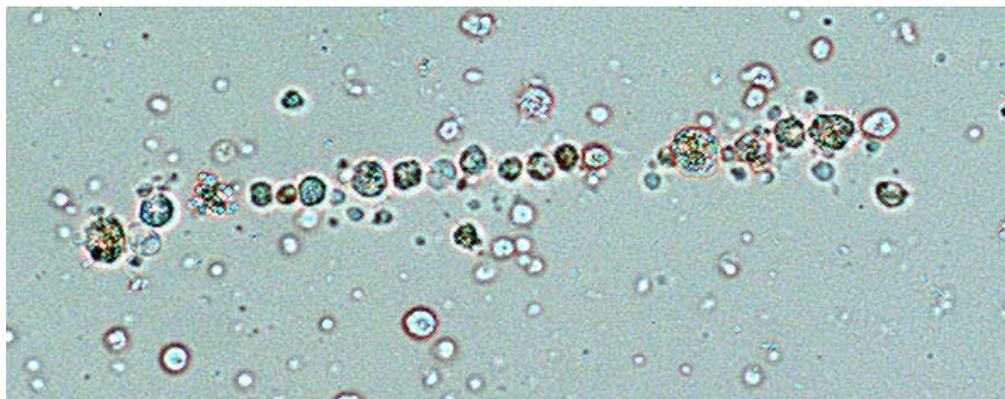


Abb. 6.3. Die Schwammzellen in CMFSW nach 60 Minuten Inkubation.

Der Befund, dass das Ausmaß der Strangbrüche (ausgedrückt durch SSF- Werte) bei zusätzlicher Inkubation nach der Bestrahlung zunimmt, kann dadurch erklärt werden, dass durch DNA-Reparatursystem an den Stellen, wo durch das UV-Licht

DNA-Schäden wie die Bildung von Thymindimeren gesetzt wurden, Einzelstrangbrüche erzeugt werden. Diese werden dann sekundär im weiteren Verlauf des Reparaturprozesses eliminiert.

Unter diesem Aspekt sind längere Reparaturzeiten interessant. Hier sollten Strangbrüche eigentlich abnehmen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen aber, dass die zu erwartende Reparatur durch Schwermetall-Ionen wie Cadmiumeffekten gehemmt wird.

Schwämme sind aufgrund ihrer Lebensweise als Filtrierer sehr geeignete Indikatoren für Schadstoffbelastungen mariner Ökosysteme.

Deshalb werden schädliche Umwelteffekte von ihnen frühzeitig erkannt und Schutzmechanismen schnell aufgebaut. Die Schwämme werden wegen ihrer Reaktionseigenschaften bei der Suche nach Biomarker-Genen für die Detektion zunehmender UV-B-Strahlung infolge des Ozonlochs genutzt. Durch die Möglichkeit der Zellkultur können Schwämme zum Bio-Monitoring eingesetzt werden. Mit Hilfe der Schwamm-Zellkultur (Primmorphe) konnte jetzt gezeigt werden, dass UV-Belastung auch die Expression von Genen für Immun-Proteine und damit die Immunkompetenz von Schwämmen beeinflusst.

Es wurde in dieser Arbeit herausgefunden, dass bei der Bestrahlung von Schwämmen das DNA-schädigende Potential von UV-Licht insbesondere in Gegenwart von Schwermetallen von großer Bedeutung ist. Wie meine Untersuchungen gezeigt haben, sind diese Schwermetalle einerseits in der Lage, selbst DNA-Strangbrüche zu induzieren. Die Induktion der DNA-Strangbrüche durch Schwermetallionen zeigte wiederum eine deutliche Dosis-Wirkungsabhängigkeit bei Schwamm-Zellen mit Cd, Cu, Zn, Co, Ni in verschiedenen Dosen. Andererseits können diese Schwermetalle auch Reparaturenzyme (Reparatur-Nuclease) hemmen, die im Verlauf des Reparaturprozesses Einzelstrangbrüche der DNA erzeugen. Dadurch nimmt die Häufigkeit von Strangbrüchen zu, wie an den SSF-Werten zu erkennen ist.

Die vergleichende Untersuchung des Einflusses von verschiedenen Schwermetallionen auf die Reparatur von UV induzierten DNA-Strangbrüchen hat gezeigt, dass Cadmium (Cd) hierbei die größten Effekte hervorruft. Diese Ergebnisse sind von Bedeutung, weil Cadmium (Cd) einen weit verbreiteten Schadstoff in der marinen Umwelt darstellt.

Die Experimente wurden mit der neuen Fast Micromethod durchgeführt. Die Methode wurde mit HeLa-Zellen getestet und konnte auch bei den Schwammzellen erfolgreich durchgeführt werden. Es gibt keine Anhaltspunkte dafür, dass andere Zellen nicht für diese Methode geeignet wären. Auch Gewebeproben können eingesetzt werden (Hohmann 1999).

Durch verschiedene Agenzien konnte auch die Induktion von Einzelstrangbrüchen gezeigt werden. Wenn auch sowohl bei NQO und Schwermetallionen als auch bei ionisierender Strahlung bei zunehmenden Dosen jeweils auch höhere Strangbruch-Häufigkeiten gemessen wurden, so war die Charakteristik dieses Anstiegs doch unterschiedlich.

Bei UV-A und UV-B mit Schwammzellen ist als ähnliches Phänomen eine exponentielle Zunahme der Strangbrüche bekannt. Während bei UV-Bestrahlung und Gammastrahlung die Einzelstrangbrüche als lineare Funktion der Dosis dargestellt werden können, ist dies bei Schwermetallionen nicht der Fall. (Chen, Sutherland, 1989).

Nach der Messung der Induktion von Einzelstrangbrüchen kann auch deren Reparatur untersucht werden. Der neue Test ist hierzu besonders gut geeignet, da Messungen innerhalb kurzer Intervalle möglich sind.

In verschiedenen Kapiteln wurden sowohl die Reparatur der untersuchten Einzelstrangbrüche nach Gamma Strahlung als auch nach NQO Exposition in HeLa-Zellen (Abb.5) untersucht. Weiterhin wurden Schwammzellen von *S. domuncula* (Kapitel 5.2 nach Abb. 12; Abb.13 und Abb. 14) nach Cadmium (Abb.15a; 15b; 27), Kupfer (Abb.26), Kobalt (Abb. 24), Nickel (Abb. 25) und Zink-Schwermetallionen-Exposition (Abb. 28) untersucht.

Bei allen Experimenten konnte eine starke Reparaturaktivität in den ersten Minuten nach Exposition festgestellt werden. Allerdings kam es bei den Strangbrüchen analog zu neueren Ergebnissen anderer Autoren zu keiner vollständigen Reparatur (Foray *et al.*, 1999).

Die DNA-Strangbrüche können natürlich auch physikalisch durch UV induziert werden. Wie bereits erwähnt (s. 1.2.2), können Strangbrüche auch im Rahmen von endogenen Prozessen entstehen und sich mit UV anhäufen. Darüber hinaus können interindividuelle Unterschiede in der Anzahl der spontanen und der bereits vorhandenen Strangbrüche angenommen werden.

Es ist schon länger bekannt, dass bestimmte DNA-Veränderungen mit zunehmender Reparaturzeit entstehen, so. z. B. alkali-labile Stellen (Zahn *et al.*, 1996).

Ist die DNA nur relativ kurz oder mit nur wenigen Quervernetzungen, wie zum Beispiel zu Proteinen, versehen, so schreitet eine Entwindung bzw. Denaturierung der DNA bei Alkalisierung sehr schnell voran. Bei Organismen, die eine kürzere DNA haben als der Mensch, sollte der pH-Wert des Mediums niedriger sein, um DNA-Werte schneller messen zu können. Bei komplexen DNAs mit zudem noch vielen Quervernetzungen zu Proteinen benötigt die DNA zur Entwindung und Denaturierung mehr Zeit. Zwei hier aufgeführte unterschiedliche Zelltypen machen das deutlich: Ein Versuch mit HeLa-Zellen zeigt, dass ein pH-Wert von 12,4 für HeLa-Zellen verwendet wird. DNA-Schäden wurden in diesem Beispiel durch Bestrahlung mit UV-A, UV-B und UV-C in verschiedenen hohen Dosen induziert. In Schwammzellen wurde mit pH 12,6 fast der gleiche pH-Wert wie bei menschlichen Zellen bestimmt. Bei einem pH-Wert von 12,4 in HeLa-Zellen konnte eine Dosis-Wirkungs-Abhängigkeit in der Berechnung der SSF(-1)-Werte bis zu maximalen Werten gezeigt werden.

Darüber hinaus wurden in allen Fällen mit der schnellen Mikromethode Dosis-Wirkungsabhängigkeiten gezeigt. DNA-Einzelstrangbrüche können durch die unterschiedlichsten Agentien oder Strahlenarten herbeigeführt werden. Bei den

chemischen Substanzen konnten erfolgreich NQO und Schwermetallionen getestet werden. Bei Bestrahlungen wurden energiereiche Photonen wie Gamma-Strahlung, UV-A, UV-B und UV-C im Experiment untersucht. Außer Dosis-Wirkungs-Abhängigkeiten konnte auch die Reparaturfähigkeit der Zellen nach induziertem DNA-Schaden erfolgreich geprüft werden. Zum Beispiel wurde an HeLa-Zellen die Reparaturfähigkeit des durch Cadmium (Cd) hervorgerufenen DNA-Schadens geprüft. Bei allen Proben wurden Schwamm und HeLa-Zellen einer Endkonzentration von 1 µg/ml Schwermetall-Ionen ausgesetzt. Die Kontrolle wurde weder mit Schwermetallionen noch mit UV behandelt. Die Proben wurden nach dem Ansetzen mit Schwermetall-Ionen zwischen 10 Minuten und 2 Stunden für Schwamm-Zellen bei 17°C und für HeLa-Zellen bei 37°C inkubiert. Nach Inkubation war der durch die Schwermetallionen diesem Versuch hervorgerufene DNA-Schaden in beiden Zellarten repariert.

Aufgrund der Messung der SSF(-1)-Werte sind bei den Zellen unterschiedliche Ergebnisse aufgetreten. Beschädigte DNA-Stränge und entstandene Thyminidimere wurden vermutlich durch Reparaturenzyme zunächst aus dem DNA-Strang herausgeschnitten. Dies führt zu einer schnelleren DNA-Entwindung und Denaturierung und damit zu entsprechenden SSF(-1)-Werten.

Bei den Untersuchungen auf durch Schwermetalle eventuell hergerufene DNA-Schäden in den Schwämmen konnten mit der Fast-Micromethod in den meisten Fällen erhöhte DNA-Einzelstrangbruchwerte gefunden werden.

Es konnte ein Anstieg der DNA-Einzelstrangbruchrate bei Exposition von Schwammzellen mit Schwermetallionen festgestellt werden. Beim Vergleich verschiedener Konzentrationen wie 10^{-12} ; 10^{-10} ; 10^{-8} und 10^{-6} µg/ml wurde eine höhere Signifikanz bei einer Konzentration von 10^{-6} erreicht (Müller *et al.*, 1998). Diese trat besonders stark bei der höchsten eingesetzten Konzentration in Erscheinung. Schwermetall-Ionen können die DNA-Reparaturprozesse auch hemmen. Für Cu^{2+} und Zn^{2+} wurde gezeigt, dass im Zusammenhang mit der Excisionsreparatur der DNA nach DNA-Strangbrüchen das Schließen dieser Brüche verhindert wird (Hartwig, 1994). Von Kupferionen ist bekannt, dass sie

DNA-Schäden durch Vermittlung einer Reihe von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) von O_2 und H_2O_2 durch die Fenton-Reaktion (Cai *et al.*, 1995) induzieren.

Es ist unbekannt, ob die verwendeten Schwämme die Verbindungen aktivieren können. Über metabolische Aktivierungen in Schwämmen ist noch nicht viel bekannt (De Flora *et al.*, 1995). Marine Schwämme können den polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoff Benzolpyren sowie einige, precarcinogenen aromatischen Amine nicht aktivieren (Kurelec *et al.*, 1987; De Flora *et al.*, 1995).

Solare ultraviolette Strahlung (UV) stellt einen der wichtigsten Umwelteinflüsse dar. Dies gilt insbesondere für den mittelwelligen UV-B Anteil (290-320 nm), da dieser nicht nur den Sonnenbrand verursacht, sondern auch für die massive Zunahme von Hautkrebs verantwortlich ist und eine wesentliche Rolle bei der vorzeitigen Hautalterung spielt. UV-B ruft eine Vielzahl biologischer Effekte hervor. Unter anderem induziert es Entzündung, apoptotischen Zelltod und eine Unterdrückung des Immunsystems. Genaue Kenntnisse der Mechanismen, die diesen Phänomenen zugrunde liegen, werden zu einem besseren Verständnis der pathologischen UV-B-Effekte beitragen und darüber hinaus Wege aufzeigen, wie die therapeutischen Effekte besser genutzt werden können.

Wegen der allgemein zunehmenden Umweltbelastung steigt das Interesse an Methoden wie der Fast-Micromethod, mit denen die Präsenz gentoxischer Substanzen in Ökosystemen nachgewiesen werden kann.

Um Gentoxizität zu bestimmen, bei der zunehmenden Umweltverschmutzung wächst das Interesse an Fast Micromethod mit unterschiedlichem Testen, die zur Untersuchung des Zustandes und der Entwicklung von Ökosystem geeignet sind. Durch Gewebeanalyse von Schwämmen kann z. B. die Belastung von marinen Ökosystemen mit Schwermetallen abgeschätzt werden (Shugart *et al.*; 1989, Shugart, 1990). Vor allem, weil Einzelstrangbrüche besser zu reparieren sind, stellen sie einen besonders wichtigen Faktor als Expositionsindikator gegenüber Genotoxinen dar. Gentoxizitätstests werden zur Bestimmung des mutagenen und damit potentiell karzinogenen Potentials von Schadstoffen eingesetzt. Diesen Tests wird nach wie vor eine große Bedeutung zukommen,

Weil ständig neue Substanzen entwickelt und verwendet werden. Darüber hinaus gibt es weitere bekannte Tests in diesem Zusammenhang wie z. B den Ames-Test, bei dem die Mutagenität eines Stoffes in Bezug auf Salmonellen untersucht werden kann (Ames *et al.*, 1973). Zur Beurteilung der Gefährlichkeit eines Stoffes für Mensch und Tier ist dieser Test alleine jedoch nicht ausreichend, sondern sollte ergänzt werden durch Tests auf Strangbrüche und DNA-Reparatur (Classen, 1987).

Die Toxizität der Schwermetalle beruht im wesentlichen auf ihrer hohen Affinität zu Proteinen. Die Proteine werden durch die Intoxikation strukturell verändert und daher biologisch inaktiv. Die Schwermetallionen führen zur Blockade von für den Stoffwechsel relevanten Enzymen, zusätzlich je nach Belastung zu einer schleichenden Intoxikation und chronischen Vergiftung.

Körpereigene Strukturen werden dabei so verändert, dass sie zum Angriffsziel des Immunsystems werden. Die Schwermetalle konkurrieren im Körper auch mit essentiellen Biometallen. Dies führt daher auch zu einem Mangel an Spurenelementen, die dann typische Mangelerscheinungen auslösen.

7. Zusammenfassung

Es wurde bis heute meist mit relativ aufwendigen Methoden nach dem Vorkommen von Strangbrüchen in der DNA gesucht. Die hier verwendete Fast-Micromethod steht jetzt neben mehreren bereits etablierten Methoden zur qualitativen und quantitativen Erfassung von DNA-Strangbrüchen zur Verfügung. Die Methode wurde zur schnellen und empfindlichen Messung von DNA-Schäden und deren Reparatur unter Verwendung von PicoGreen, einem spezifisch an DNA-Einzelstränge bindenden Fluoreszenzfarbstoff, durchgeführt.

Die Methode wurde in der vorliegenden Arbeit für verschiedene Zellarten wie HeLa-Zellen und Schwamm-Zellen mit Schwermetallionen verwendet. Sie wurde ebenfalls bei verschiedenen Strangbruch-induzierenden Stoffen wie NQO und physikalischen Faktoren wie UV-Bestrahlung und Gammastrahlung erfolgreich eingesetzt.

Die Strangbrüche wurden bei HeLa-Zellen mit 10 μ M NQO nach 90 Minuten Inkubation und ebenso bei Gammastrahlung mit 16 Gy gemessen. An Schwammzellen wurden Effekte von Schwermetallionen und UV, auch einschließlich nachgeschalteter Reparaturaktivität, gemessen. Dabei war die Reparatur jedoch nicht ganz vollständig.

Durch die Fast-Micromethod wurde DNA-Schädigung durch UV-Bestrahlung und Gentoxizität von Schwermetall-Ionen an HeLa-Zellen nachgewiesen.

Die Schwammzellen wurden mit verschiedenen Schwermetall-Ionen in verschiedenen Konzentrationen getestet und mit UV bei verschiedenen Dosen bestrahlt. Teilweise wurde nach dem Einfluss die DNA-Reparatur erfasst.

Schwammzellen wurden in den drei häufig verwendeten Medien CMFSW, CMFSW+EDTA und Seewasser aufgenommen. Im Seewasser waren die Zellen nach 60 Minuten Inkubationszeit aggregiert (Primmorphe). Im CMFSW+EDTA Medium lagen dagegen nur Einzellen vor, da die Zellen im EDTA-Medium dissoziiert wurden und auch nicht mehr proliferierten.

Summary

In the past, the occurrence of DNA strand breaks has generally been assessed using complex methods. Besides the already established methods for qualitative and quantitative assessment of DNA strand breaks, a further method is now available, the Fast Micromethod, which has been applied in this study. This method allows a rapid and sensitive evaluation of DNA damage and its repair using PicoGreen, a fluorescent dye which specifically binds to DNA single strands. In the present study, this method was used in various cell types, including HeLa cells and sponge cells with heavy metal ions. It was also successfully applied using various substances which induce strand breaks such as NQO and with physical factors such as UV-irradiation and gamma irradiation.

DNA strand breaks were measured in HeLa cells after incubation for 90 minutes with 10 μ m NQO or 16 Gy gamma irradiation. The effects of heavy metal ions and UV-irradiation and the subsequent repair activity were measured in sponge cells following UV-irradiation, whereby the repair was not complete.

Using the Fast Micromethod, DNA damage induced by UV-irradiation and genotoxicity due to heavy metal ions could be proven in HeLa cells.

Sponge cells were subjected to different concentrations of heavy metal ions and various doses of UV-irradiation. Subsequent DNA repair was assessed in some instances.

Sponge cells were placed in three frequently used media; CMFSW, CMFSW+EDTA or sea water. In sea water, the cells were seen to aggregate (Primmorphs) after 60 minutes incubation. In CMFSW+EDTA however, only single cells were observed since the cells in this EDTA-containing medium dissociated and no longer proliferated.

8. Abkürzungsverzeichnis

Aquabdest	Aquabidestillata
Ca	Calcium
Cd	Cadmium
Cm	Zentimeter
Cm ²	Quadratzenimeter
Co ₂	Kohlendioxid
Cu	Kupfer
CMFSW	Calcium-Magnesium-Freies SeeWasser
CMFSW+EDTA	Calcium-Magnesium-Freies SeeWasser + Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
DMSO	Dimethylsulfatoxid
DNA	Desoxyribonuceinsäure
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
E.coli	Escherichia coli
FCS	Fötale Kälberseum
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCL	Salzsäure
HeLa	Helen Laine
J/m ²	Joule pro Quadratmeter
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
N	Stickstoff
NaOH	Natriumhydroxid
Ni	Nickel
nm	Nanometer
NQO	4-Nitroquinoline-1-Oxid
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
PBS	Phosphate buffered Saline

RT	Raumtemperatur
SSF	Strand scission factor'
SW	SeeWasser
UV	Ultraviolett
UV-A	380-315 nm
UV-B	315-280 nm
UV-C	280-200 nm
Zn	Zink

9. Literaturverzeichnis

- Acevedo, J. und Nolan, C. (eds) (1993):** Environmental UV Radiation: Causes - Effects - Consequences. Commission of the European Communities, Directorate-General XII for Science, Research and Development, Environment Programme, Bruxelles, Belgium
- Alberts, B:** Makromoleküle Struktur, Form und Information, in: B. Alberts (Hrsg.), Molekularbiologie der Zelle (1986)
- Ambrosio, M. D.; Guerriero, A.; De Clauser, R.; De Stanchino, G. und Pietra, F. (1983):** Dichloroverongiaquinol, a new marine antibacterial compound from *Aplysina cavernicola*; Isolation and synthesis, Experientia 39: 1091-1092
- Ames, B.; Lee, F. und Durston, W. (1973):** An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 782-786
- Anderson, R. J. und Faulkner, D. J. (1973):** A novel antibiotic from a sponge of the genus *Verongia*; Tetrahedron Lett. 14:1175-1178
- Bagchi, D. M.; Hassoun, E. A. und Stohs, S. J. (1996):** Cadmium induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA daglutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague Dawley rats. Biol. Trace Element Res.; 52: 143-154
- Batel, R.; Fafandjel, M.; Blumbach, B.; Schröder, H. C.; Hassanien, H. M. A.; Müller, I. M. und Müller, W.E.G. (1998):** Expression of the human XPB/ERCC-3 excission repair gene-homolog in the sponge *Geodia cydonium* after exposure to ultraviolet irradiation. Mutat. Res. 409, 123-133

- Baumen, J. W; Liu J. und Klaassen, C D (1993):** Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals. *Fundam. Appl. Toxicol.*; 21: 15-22
- Bergers, J. J; Den Otter W., De Groot, J. W.; De Blois, A. W.; Dullens, H. F. J.; Steerenberg, P. A. und Crommelin, D. J. A. (1992):** Reconstituted membranes of tumor cells (proteoliposomes) induced specific protection to marina lymphoma cells. *Cancer Immunol. Immunother.* 34: 233-240
- Bergers, J. J.; Den Otter, W.; Dullens, H. F. J.; De Groot, J. W.; Steerenberg, P. A.; Mimpfen, M. W. H. und Crommelin D. J. A. (1993):** Critical factors for liposome–incorporated tumor–associated antigens to induce protective tumor immunity to SL 2 Lymphoma cells in mice; *Cancer Immunol. Immunother.*37:271-279
- Bergmann, W. und Burk, D. C. (1955):** Contribution to the study of marine products; the nucleosides of sponge. *J Org. Chem.* 20: 1501-1507
- Bergmann, W. und Feeney, R. J. (1951):** Contribution to the study of marine products; the nucleosides of sponges I. *J. Org. Chem.* 16:981-987
- Beyersmann, D. und Hechtenberg, S. (1997):** Cadmium, gene regulation and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*; 144: 247-252
- Bishop J. M. (1991):** Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64: 235-248
- Bishop, J. M. (1995):** Cancer: The rise of genetic paradigm. *Genes and Development* 9: 1309-1311
- Böcker, Denk, Heitz, Auflage 2; Pathologie (2001):** Urban und Fischer Verlag.

- Boguski, M. S und McCormick, F. (1993):** Proteins regulating rats and its relatives. *Nature* 366:643-654
- Bohr, V. A. und Evans, K. (1990):** Heterogeneity of DNA repair: Implications for human disease and oncology. *Pediatric Hematology and Oncology* (7): 47-69
- Braun-Dönhardt; und Ludwig-Los. und Reismann (1987):** Summary Review on the Health Effects Associated with Copper, Springfield, VA: EPA. S. 270-272
- Bretting H.; Donadey C.; Vacelet J., Jacobs G., (1981):** Investigations on the occurrence of lectins in marine sponges with special regard to some species of the family Axinellidae. *Comp Biochem. Physiol.* 70: 69-76
- Buckley, J. T. (1992):** Crossing three membranes: channel formation by aerolysin; *FEBS Lett.* 307:30-33
- Bundesamt für Strahlenschutz** www.bfs.de
- Burkholder, P. R. und Rützler, K. (1969):** Antimicrobial activity of some marine sponges; *Nature* 222: 983–984
- Caldecott, K.; Banks G. und Jego P. (1990):** DNA double-strand break repair pathways and cellular tolerance to inhibitors of topoisomerase II. *Cancer Res.* 50: 5778-5783
- Chauvin, C.; Heidenreich, E.; Elmendorff-Dreikorn, K.; Slor, H., Kutzner, J.; Batel, R. und Schröder, H.C. (1998):** Lack of Correlation between apoptosis and DNA single-strand breaks in X-irradiated human peripheral blood mononuclear cells. *Mench. Ageing Dev.* 106: 117-128

- Chen, D. Z. X.; Boland, M. P.; Smilie, M. A.; Klux H. Ptak C.; Andersen R. J. und Holmes, C.F.B. (1993):** Identification of protein phosphatase inhibitors of the microcystin class in the marine environment. *Toxicon* 31: 1407-1414
- Chip, J. S.; Stempien, M. F. Jr.; Mierzwa, R. A.; Ruggiere G. D. und Nigrelli, R. F.; (1977):** Physiological active substances from sponges V; Isolation of physiological active compounds from the sponge *Verongia archeri*. *Pharm. Sci.* 67:264-265
- Chirsari, F. V.; Klopchin, K.; Moriyama, T.; Pasquinelli, C., Dunsford, H. A.; Sell, S.; Pinkert, P. A.; Brinster, R. L. und Palmiter, R. D. (1989):** Molecular pathogenesis of hepatocellular carcinoma in hepatitis B virus transgenic mice. *Cell* 59 1145-1156
- Clark R. B. (1997):** Marine Pollution. Clarendon Press, Oxford
- Closteri, L.S. (1989):** Standard methods for the examination of water and waste water, 17 ed. 382ff
- Crane, I. J.; Luker, J.; Stone, A.; Scully, C. und Prime, S. S. (1986):** Characterization of malignant rat culture following the induction of oral squamous cell carcinomas in vivo. *Carcinogenesis* 7: 1723-1727
- Custodio, M. R.; Prokic, I; Steffen, R; Koziol, C; Borojevic, R;. Brümmer, F.; Nickel, M; und. Müller, W. E. G. (1998):** Primmorphs generated from dissociated cell of the sponge *S. domuncula*: a model system for studies of cell proliferation and cell death. *Mech. Ageing Develop.* 105: 45-59
- De Flora, S., Bagnasco, M.; Bennicelli, C.; Camoirano, A., Bojnemirski, A.; Kurelec, B. (1995):** Biotransformation of genotoxic agents in marine sponges. Mechanisms and modulation. *Mutagenesis* 10: 357-364
- Dodd, R. Y.; Lennan, A. P.; Mac, D. C. und Hawkins, D. C. (1968):** Hem agglutination from marine sponges. *Vox. Sang.* 15:368-391

- Eastman, A.; Barry, M.A. (1992):** The origins of DNA breaks: consequence of DNA damage. DNA repair or apoptosis? *Cancer Investigation* 10: 229-240
- Feig, D. I., Reid, T. M.; und Loeb, L. A. (1994):** Reactive oxygen species in tumorigenesis. *Cancer Res.* 54: 1890
- Feig, D. I. und Loeb, L. A. (1993):** Mechanisms of mutation by oxidative DNA damage: reduced fidelity of mammalian DNA polymerase β , *Biochemistry* 32 4466-4473
- Fattorusso, E.; Minale, L. und Sodano, G. (1970a):** Aerolysin-1 a new bromo-compound from *Aplysina aerophoba*; *J. Chem. Soc. Section D: Chem. Commun.* 6: 751-752
- Fattorusso E., Minale L. und Sodano G. (1970b):** Aerothionin a tetrabromo-compound from *Aplysina aerophoba* and *Verongia thiona*. *J. Chem. Soc. Section D: Chem. Commun.* 6: 752-753
- Foray N., Arlett, C., Malaise, E.P. (1999):** Underestimation of the small residual damage when measuring DNA double-strand breaks (DSB): Is the repair of radiation-induced DSB complete? *International Journal of Radiation Biology* 75: 1589-1595
- Friedberg, E. C. (1985):** DNA repair. New York, Freeman
- Grollman, A. P. und Moriya, M. (1993):** Mutagenesis by 8-oxoguanine. An enemy within. *Trends Gen.* 9 246-249
- Halliwell, B. und. Aruoma, O. (1991):** DNA damage by oxygen derived species, *FEBS Let.* 281: 9-19
- Hamada, T.; Sasaguri, A.; Tanimoto, N.; Arima, S.; Shimajiri, T.; Abe, und Sasaguri, Y. (1996):** Apoptosis in human kidney 293 cells is promoted by

polymerized cadmium metallothioein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 219: 829-834

Hartwig, A. (1994): Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity. A review. *Environ. Health Perspect.* 102 Suppl 3: 45-50

Hellman, S. und Vokes E. E. (1996): Fortschritte in der herkömmlichen Krebstherapie; *Spektrum der Wissenschaften Spezial 5: Krebsmedizin*:59-65

Ho, R. J. Y., Burke R. L., Merigan T. C. (1990): Physical and characterization of antigen presentino liposome formulations: relative efficacy for the treatment of recurrent genital HSV-2 in guinea pigs. *Antiviral Res.* 13: 187-199

Ho, D. Y. Und Sapolsky, R. M. (1998): Konzepte zur Getherapie des Zentralnervensystems. *Spektrum der Wissenschaft*: 46-52

Hohmann, C. (1999): Entwicklung einer neuen Methode zur Messung von DNA-Doppelstrangbrüchen. Fachbereich Biologie, Johannes Gutenberg Universität Mainz.

Hoigne, J. und Bader, H. (1975): Ozonation of water: role of hydroxyl radicals as oxidizing intermediates, *Science* 190 782-784

Hollenbeak, K. H. und Schmitz, F. J. (1977): Aplysinopsin; Antineoplastic tryptophan derivative from the marine sponge *Verongia spengelii*. *Lloydia* 40: 479-481

Ishido, M.; Homma, S. T.; Leung, P. S. und Tohyama, C. (1995): Cadmium induced DNA fragmentation is inhibitable by zinc in porcine kidney LLC PK1 cells.

- Ishizawa, M.; und Endo, H. (1968):** On the mode of action of a potent carcinogen 4- hydroxylaminoquinoline 1-oxide on bacteriophage T4. *Biochem. Pharmacol* 16: 637-646
- Jensen, A.; und. Bro-Rasmussen, F. (1992):**. Enviromental cadmium in Europe. *Rev. Environ. Contam. Toxicol* 125: 101-181
- JisKoot, W.; Van Hertrooij, J. J. C. C.; Klein Gebbinick J W. T. M.; Van der Velden-de Groot, T.; Crommelin, D. J. A.und Beuvery, E. C. (1989):** Two-step purification of a murinie monoclonal antibody intended for therapeutic application in man. Optimisation of purification and scaling up; *J.Immunol . Methods* 124:143-156
- Kägi und Nordberg. (1979):** Metallthionein (*Experientia Sppl.* 34), Basel: Birkhäuser
- Kästner, A . (1993):** Lehrbuch der Speziellen Zoologie ; Band 1.1, Seiten 245-288. Gustav Fischer Verlag Jena – Stuttgart – NewYork
- Knippers, R. (2001):** Mutationen, DNA-Schäden und DNA-Reparatur, in: R. Knippers (Hrsg.), *Molekulare Genetik* 245-283
- Knippers, R.; Philippsen, P.; Schäfer, K. P. und Fanning, E. (1990):** *Molekulare Genetik* 23-63
- Kohn, K. W.; Pommier Y., Kerrigan D.; Markovits J. und Covey J. (1987):** Topoisomerase II as a target of anticancer drug action in mammalian cells; *NCI Monograph* 4: 61-71
- Kurelec, B.; Britvic, S; Krea, S.; Müller, W. E. G;. Zahn, R. K. (1987):** Metabolism of some carcinogenic aromatic amines in four species of marine sponges. *Comp. Biochm. Physiol* C86: 17-22

Latinwo, L. M.; Ikediobi, C. O.; Singh, N. P; Sponholtz, G.; Fasanya, C. und Riley, L. (1997): Comparative studies of *in vivo* genotoxic effects of cadmium chloride in rat brain. kidney and liver cells. Cell Mol. Biol. 43: 203-210

Lehninger, Albert I.; Nelson, D. I.; Cox, M.M. (1998): Prinzipien der Biochemie Übers. Hrsg. Von Harald Tschesche. Übers. Von Elke Buchholz.-2. Aufl. Heidelberg; Berlin. Oxford: Spektrum. Akad. Verl.

Le Pennec, Gael.; Perovic, S.; Shokry, M A. Ammar.; Grebenuk, Vladislav A. Steffen, R.; Bümmer, F. und Müller, W. E. G. (2003): Cultivation of primmorphs from the marine sponge *S. domuncula*: mophogenetic potential of silicon and iron. Journal of Biotechnology 100, 93-108

Löffler, G. (1998): Nucleotide und Nucleinsäuren, Replikation und Genetik, in: G. Löffler-P. E. Petrides. Biochemie und Pathobiochemie, 6. 136-147; 206-237

Ludewig-Lohs, (1982): Problems in the diagnosis and treatment of acute poisoning, Arzt Fortbild (Jena).1982 May 15; 76 (10):433-7. German. No abstract available. PMID: 7136025 [PubMed-indexed for MEDLINE]

Mason, R. P., und Holtzman, J. L. (1975): The role of catalytic superoxide formation in the O₂ inhibition of nitroreductase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67: 1267-1274

Mason, R. P. (1982): Free radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals. S.161-222 In: Pryor W.A. Free Radicals in Biology. Academic Press, New York

Mason R.P., Josephy, P. D. (1985): Free radical mechanisms of nitroreductase. S. 121-140 In: Rickert D.E. (Ed.) Toxicity of nitroaromatic compounds. New York, Hemisphere.

- Mc Bride, T. J.; Schneider, J. E.; Floyd, R. A. und Loeb, L. A. (1992):** Mutations induced by methylene blue plus light in single stranded M13mp2, Proc. Nat. Acad. Sci USA 89, 6866-6870
- Mc Cann J. (1975):** Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester with R factor plasmids. Proc. Natl. Acad. Sci. 72: 979-983
- Merian (Hrsg.) (1984):** Metalle in der Umwelt, Verteilung. Analytik u. Biologische Relevanz, S. 425-33. Weinheim: Verlag. Chemie 1984
- Mikhailova, M. V.; Littlefield, N. A.; Hass, B. S; Poirier, L. A.; Chou, M. W (1997):** Cadmium-induced 8-hydroxydeoxyguanosine formation, DNA strands breaks and antioxidant enzyme activities in lymphoblastoid cells. Cancer Lett. 115: 141-148
- Modrich P und Lahne, R., (1996):** Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology. Ann Rev. Gen. 65: 101-133
- Modrich, P. (1991):** Mechanisms of biological effects of mis match repair. Ann Rev Gen. 25: 229
- Morel, J.-L.; Drobecq, H.; Sautiere, P.; Tartar, A., Mironneau, J.; Qar, J.; Lavie, J-L. und Hugues, M. (1997):** Purification of a new dimeric protein from *Cliona vastifica* sponge, which specifically blocks a non -L-type calcium channel in mouse duodenal myocytes. Mol. Pharmacol. 51: 1042-1052
- Müller, W. E. G.; Yamazaki, Z. I.; Sögtrop, H. H. und Zahn, R. K. (1972):** Action of 1- β -D-Arabinofuranosytosine on mammalian tumor cell-2; Inhibition of mammalian and oncogenic viral polymerises. Eur. J. Cancer 8: 421-428
- Müller, W.E.G.; Zahn, R. K. und Arendes J. (1978):** Arabinofuranosyl nucleosides XIII; Influence of arabinofuranosylthymine on

DNA-, RNA- and protein synthesizing systems in vitro. Chem.- Interactions
23: 151-158

Müller, W.E.G. und Zahn R. K. (1979): Metabolism of 1-β-D-Arabinofuranosyluracil in mouse L5178y cells. Cancer Res. 39: 1102-1107

Müller, W.E.G., Zahn R. K., Kurelec B., Lucu C., Müller I. und Uhlenbruck, G. (1981a): Lectin a possible basis for symbiosis between bacteria and sponges. J. Bacteriol. 145: 548-558

Müller, W.E.G., Conrad J., Schroeder H. C., Zahn R. K., Kurelec B., Dreesbach, K. und Uhlenbruck, G. (1983): Characterization of the trimeric; self-recognizing Geodia cydonium Ictin I. Eur: J. Biochem. 133: 263-267

Müller, W.E.G.; Dogovic, N.; Zahn, R. K.; Maidhof, A.; Diehl-Seifert, B.; Becker, C.; Sachsse, W.; Gasic, M. J. und Schöder, H. C. (1985): Inhibition of mitosis by avarol, a natural product isolated from the sponge Dysidea avara; Bas. Appl. Histochem.29:321-330

Müller W.E.G. (1995): Molecular phylogeny of metazoa (animals): Monophyletic origin. Naturwiss. 82; 321-329

Müller W.E.G.; Batel, R.; Zahn, R. K.; Bihari, N.; Schröder, ; H. C. (1997): Mikro- Methode zur Schnellbestimmung von DNA-Schäden und deren Reparatur unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs PicoGreen und ihre Anwendung Patent application 19724781.4(1206.1997)

Müller, W. E. G. (1998): Origin of Metazoa: Sponges as living fossils. Natuwissenschaften 85: 11-25

Nakahara, W.; Fukuoka, F. und Sugimura, T. (1957): Carcinogenic action of 4-nitroquinoline-N-oxid. Gann 48: 129-137

- Ohne, M.; Satoh, T.; Yamada, S. und Takai, H. (1985):** Experimental tongue carcinoma of rats induced by oral administration of 4 nitoquinoline 1-oxid in drinking water. Oral Surg 59: 43-47
- Oliff, A.; Gibbs, J.B. und McCormick F. (1996):** New molekulare Angriffsziele für Krebstherapie; Spektrum der Wissenschaften Spezial 5: Krebsmedizin: 85-90
- Osmak, M. und Perovic, S. (1989):** Multiple fractions of gamma rays induced resistance to cis – Dichlorodiammineplatinum II and Methotrexate in human HeLa Cells; Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 16: 1537-1541
- O`Reilly, M. S.; Holmgren, L.; Chen C. und Folkman J. (1996):** Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice; Nature Med. 2: 689-692
- Ray, S. (1986):** Bioaccumulation of cadmium in marine organisms. Experientia Suppl. 50: 65-75
- Recommended Dietary of Allowances, Wash. (1980):** National Academy of Sciences
- Reilly, M. S.; Holmgren, L.; Chen, C. und Folkman J. (1996):** Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice; Nature Med.2: 689-692
- Rickert, D. E. (1987):** Metabolism of nitroaromatic compounds. Drug Metab. Rev. 18: 23-53
- Rosenkranz, H. S. und Memmerstein, R. (1983):** Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes, all nitro-containing chemicals were not created equal. Mutat. Res. 114: 217-267

- Roth, F. J.; Achearn, D. G.; Fell, J. W.; Meyers, S. P. und Meyer, S. A. (1962):** Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates, *Limnol. Oceanogr.* 7:178-185
- Sara, M. (1983):** Stamm porifera (Spongiaria, Schwämme). In: Fauna und Flora des Mittelmeeres, ed. Riedl R., Paul Parey- Verlag, Hamburg und Berlin, 3. Auflage, S.127-148.
- Schröder, H. C. (1986):** Biochemische Grundlagen des Alterns, *Chem. in unserer Zeit* 20 128-138
- Shibata, R.; Noguchi, T.; Sato, T.; Akiyoshi, K.; Sunamoto, J.; Shiku, H. und Nakayama E. (1991):** Induction of in vitro and in vivo anti- tumor responses by sensitization of mice with liposomes containing a crude butanol extract of leukemia cells and transferred intermembranously with cell-surface proteins; *Int. J. Cancer* 48: 434-442
- Shiraishi, N.; Hochadel, J. F.; Coogan, T. P.; Koropatinck, J. und Waalkes, M. P. (1995):** Sensitivity to cadmium-induced genotoxicity in rat testicular cells is associated with minimal expression of metallothionein gene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 130: 229-236
- Shugart, L. R., Adams, S.M.; Jimenez, B.D.; Talmage, S .S. und McCarthy, J. F. (1989):** Biological markers to study exposure in animals and bioavailability of environmental contaminants. Biological monitoring for pesticide exposure: measurement, estimation and risk reduction. In: Wang R.G.M., Franklin, C.A., Honeycutt R.C., Reinert J.C. Washington D.C. American Chemical Society. 382: 86-97
- Shugart, L.R. (1990):** Biological monitoring: testing for genotoxicity. Biological markers of environmental contaminants. McCarthy J.F., S.L.R. Boca Raton: 205-216

- Singer, B. und Grundberg, D. (1983):** Molecular Biologie of mutagens and carcinogens. Plenum, New York
- Smith, R. C.; Prezelin, B. B.; Baker, K. S.; Bidigare, R. R.; Boucher, N. P.; Coley, T.; Karentz, D.; MacIntyre, S.; Matlick, H. A.; Menzies, D.; Ondrusek, M.; Wan, Z. und Waters, K. J. (1992):** Ozone depletion: ultraviolet radiation and phytoplankton biology in Antarctic waters. *Science* 255:952-959
- Srivastava P. K. (1991):** Protein tumor antigens. *Curr.Opin. Immunol.* 3: 654-658
- Stahelin, J. und Hoigne, J. (1985):** Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environ. Sci. Technol.* 19: 1206-1213
- Stevenson, F. K. (1992):** Update on tumor vaccines. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 22: 84-89
- Storch, V. und Welsch, U. (1991):** Unterreich: Metazoa (Vielzeller). In: *Systematische Zoologie*, eds Storch V., Welsch U., Gustav Fischer Verlag, 4. Auflage, S 36-42
- Stryer, Lubert. (1991):** Biochemie ; Aus d. Amerikan übers. von Brigitte Pfeiffer und Johannes Guglielmi.- Korr. Nachdruck, 1991 der völligen Neubearbeitung. Auflage 1990 -Heidelberg; Berlin; New York: Spektrum Akademie. Verlag 1991
- Teicher, B. A.; Dupis, N.; Kusomoto, T.; Robinson, M. F.; Liu, F.; Menon, K.; und Coleman, C. N. (1995):** Antiangiogenic agents can increase tumor oxygenation and reponse to radiation therapy. *Rad. Oncol. Invest.* 2: 269-279
- Thornton, I. (1992):** Sources and pathwayset of cadmium in the environment. *IARC Sci. Publ;* 118: 149-162

- Trig, H. V. (1912):** A contribution to the physiologie of freshwater sponges (Spongillidae) ; Tijdschr : Ned . Dierkd. Ver. 17:1-220
- Tkeshelashvili, L. K.; McBride, T. J.; Spence, K. und Loch, L. A. (1991):** Mutation spectrum of copper induced DNA damage, J. Biol Chemie 266: 6401-6406
- Vogelstein, B. und Kinzler, K. W. (1993):** The multistep nature of cancer; Trends in Genetics 9: 138-141
- Wardman, P.; Dennis, M. F.; Everett, S. A.; Patal, K. B.; Stralford, M. R. L. und Tracy, M. (1995):** Radicals form one-electron reduction of nitro compounds, aromatic N-oxides and quinones: the kinetic basis for hypoxia-selective, bioreductive drugs. S.171-194. In: Rico-Evans, C., Halliwell, B., Lunt, F.-G. (Eds.) Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, drugs and food additives. Essex, U.K, Portiand Press.
- Warters, R. L.; Lyons, B. W.; LiT, M. und Chen D. J. (1991):** Toposimerase II activity in a DNA Double strand break repair deficient Chinese hamster ovary cell line; Mutat. Res. 254: 167-174
- Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953a):** Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic acid, Nature 171: 737-738
- Watson, J. D. and Crick, F. H. C. (1953b):** Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid, Nature 171: 964-967
- Wehner, R; (1990):** Porifera (Schwämme) . In: Allgemeine Zoologie, eda Gehring W., Wehner R. Geörg Thieme Verlag Stuttgart, 22. Auflage, S.375-377
- Wierzyski, A. (1935):** Süßwasserspongien; Mem. Acta Polon. 9:1-24

Xu, C. Y.; Johnson, J. E.; Singh, P. K.; Jones, M. M.; Yan, H. P. und Carter, C. E. (1996): In vivo studies of cadmium induced apoptosis in testicular tissue of the rat and its modulation by a chelating agent. *Toxicology*, 107: 1-8

Zahn, R. K.; Jaud, S.; Schröder, H. C. und Zahn-Daimler, G. (1996): DNA status in brain and heart as prominent co-determinant for life span? Assessing the different degrees of DNA damage, damage susceptibility, and repair capability in different organs of young and old mice. *Mech Ageing Dev* 89: 79-94