

Programm Lebensgrundlage Umwelt
und ihre Sicherung (BWPLUS)

Abschlussbericht

**Kombinationswirkungen umweltrelevanter Metallverbindungen in
Lungenzellen**

T. Schwerdtle, H. Blessing, I. Mackiw, A. Pelzer, C. Thuy, A. Hartwig
Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe

Förderkennzeichen: BWB 99007

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

Oktober 2003

Kombinationswirkungen umweltrelevanter Metallverbindungen in Lungenzellen

T. Schwerdtle, H. Blessing, I. Mackiw, A. Pelzer, C. Thuy, A. Hartwig
Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe

Summary

This project aimed to investigate direct and indirect genotoxicity of water soluble and particulate, environmentally relevant metal compounds in cultured human cells. Special attention has been given to the combination effects of single metal compounds with the environmental mutagen benzo[*a*]pyrene. Our experiments show that all investigated compounds of arsenic, cadmium and nickel induce oxidative DNA damage and inhibit repair of BPDE-DNA-adducts in cultured human cells, thereby showing for the first time a repair inhibition by environmentally relevant nickel and cadmium compounds and biomethylated arsenicals. These results indicate a general inhibition of the nucleotide excision repair by nickel, cadmium and arsenic independent of the compound applied. As humans are frequently exposed to both metal compounds and mutagens under occupational and environmental (smoking, coal fly ash) conditions, these indirect genotoxic effects appear to be of major importance for metal carcinogenicity and have to be taken into account for risk assessment. Regarding the genotoxicity of the trivalent and pentavalent methylated arsenicals, our results indicate that biomethylation increases inorganic arsenic-induced genotoxicity and thus may be involved in inorganic arsenic-induced carcinogenicity.

Zusammenfassung

Gesamtziel des Projektes war die Abklärung der direkten und indirekten Genotoxizität von wasserlöslichen und partikulären, umweltrelevanten Metallverbindungen in kultivierten menschlichen Zellen. Ein Schwerpunkt sollten hierbei Kombinationswirkungen einzelner Metallverbindungen mit dem Umweltmutagen Benzo[*a*]pyren sein. Unsere Untersuchungen verdeutlichen, dass alle untersuchten Verbindungen von Nickel, Cadmium und Arsen oxidative DNA-Schäden induzieren und die Reparatur von BPDE-DNA-Addukten in kultivierten menschlichen Zellen hemmen. Hierbei konnte zum ersten Mal eine Reparaturinhibition durch umweltrelevante partikuläre Nickel- und Cadmiumverbindungen sowie durch biomethylierte Arsenverbindungen gezeigt werden. Diese Ergebnisse sprechen unabhängig von der eingesetzten Verbindung für eine generelle Hemmung der Nukleotidexzisionsreparatur durch Arsen, Cadmium und Nickel. Vor dem Hintergrund, dass vor allem Arbeiter der Metallindustrie aber auch die Allgemeinbevölkerung u.a. durch Rauchen oder Flugasche einer Mischexposition von oftmals partikulären Metallverbindungen und zahlreichen Mutagenen ausgesetzt sind, gewinnt dieser Aspekt der indirekten Genotoxizität in der metallinduzierten Kanzerogenese zunehmend an Bedeutung. Berücksichtigt man das genotoxische Potenzial der dreiwertigen und fünfwertigen Arsenmetabolite, so trägt die Biomethylierung in den vorgestellten Testsystemen zur Genotoxizität und damit vermutlich auch zur Kanzerogenität von anorganischen Arsenverbindungen bei.

1 Einleitung

Aufgrund ihrer weiten Verbreitung hat die Gruppe der krebserzeugenden Metallverbindungen sowohl in der Umwelt als auch am Arbeitsplatz eine große Bedeutung. Vor allem in der Metallindustrie sind Arbeiter chronisch gegenüber verschiedenen partikulären und löslichen Cadmium- und Nickelverbindungen exponiert, oftmals in Kombination mit anderen DNA-schädigenden Agenzien wie z.B. polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK). Da die chronische Arsenexposition über belastetes Trinkwasser ein weltweites Problem ist und zahlreiche epidemiologische Studien eine signifikante Korrelation zwischen den Arsengehalten im Trinkwasser und dem vermehrten Auftreten verschiedener Tumorarten zeigen (NRC, 2001), haben wir uns dazu entschlossen, zusätzlich zu Nickel und Cadmium auch die Genotoxizität verschiedener Arsenverbindungen im Rahmen dieses Projektes zu untersuchen.

Die zugrundeliegenden Mechanismen der Arsen-, Cadmium- und Nickel-induzierten Kanzerogenese sind nach wie vor unklar. Diskutiert werden in diesem Zusammenhang u.a. die Induktion von oxidativem Stress und die Störung von DNA-Reparaturprozessen, die zu Wirkungsverstärkungen in Kombination mit anderen DNA-schädigenden Agenzien führen können. So verstärken Verbindungen von Arsen, Nickel und Cadmium die Zytotoxizität, Genotoxizität und Mutagenität verschiedener DNA-schädigender Agenzien (zusammengefasst in Hartwig, 1995). Neben einer Hemmung der Nukleotidexzisionsreparatur (NER), die für die Reparatur helixverzerrender DNA-Addukte zuständig ist, konnte auch eine Hemmung der Basenexzisionsreparatur (BER), welche oxidative DNA-Schäden entfernt, gezeigt werden (Hartwig et al., 1998). Da oxidative DNA-Schäden in der Zelle bereits endogen im Laufe des Sauerstoffmetabolismus permanent induziert werden und die DNA zudem ständig einer Schädigung durch exogene Agenzien unterliegt, ist die Aufrechterhaltung der DNA-Reparatur essenziell für die genetische Stabilität.

Gesamtziel des Projektes waren Untersuchungen zur direkten Genotoxizität von umweltrelevanten Arsen-, Nickel- und Cadmiumverbindungen bezüglich der Induktion von oxidativen DNA-Schäden, sowie zu ihrer indirekten Genotoxizität in Form einer Hemmung der NER am Modell der Reparatur von Benzo[*a*]pyrendiolepoxid (BPDE)-induzierter DNA Schäden in kultivierten menschlichen Lungenzellen als Zielzellen der Metall-induzierten Kanzerogenese. Im Falle von Cadmium und Nickel sollte untersucht werden ob die bislang für wasserlösliche Verbindungen beobachteten Effekte auch für partikuläre Verbindungen zutreffen. Für die stärkere Kanzerogenität partikulärer gegenüber löslicher Metallverbindungen werden Unterschiede in ihrer Bioverfügbarkeit vermutet. So sollen infolge der Phagozytose von partikulären Verbindungen sehr viel höheren Nickelkonzentrationen im Kern erreicht werden, wohingegen nach der vergleichsweise langsamen Aufnahme von löslichen Verbindungen Nickel vorwiegend im Cytoplasma an Proteine gebunden werden soll (Costa et. al., 1981; Fletcher et al., 1994). Im Falle von Arsen sollten die Versuche Aufschluss darüber liefern, ob es sich bei der Biomethylierung von anorganischem Arsen - wie bislang häufig angenommen - um eine Detoxifizierung handelt oder nicht.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

Die menschlichen Zelllinien HeLa S3 und A549 wurden in F12-Medium bzw. DMEM-Medium bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit in Gewebekulturschalen kultiviert.

2.2 Ermittlung der Zytotoxizität

Die Zytotoxizität der zu untersuchenden Verbindungen wurde anhand der Beeinflussung der Zellzahl und der Koloniebildungsfähigkeit untersucht. Logarithmisch wachsende Zellen wurden entsprechend der jeweiligen Versuchsbedingungen inkubiert, abtrypsiniert, die Zellzahl bestimmt und jeweils 300 Zellen zur Koloniebildung ausgesät (Zwischenbericht 2002, Schwerdtle et al., 2002).

2.3 Alkalische Entwindung – Oxidative DNA-Schäden in kultivierten Zellen

Bei der Alkalischen Entwindung handelt es sich um ein Testsystem zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen in Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Alkalische Entwindung kombiniert mit dem Einsatz der bakteriellen Formamidopyrimidin-DNA-Glykosylase (Fpg), wodurch auch oxidative DNA-Schäden, die durch die Fpg erkannt werden, quantifiziert werden können. Substrate der Fpg sind neben 8-Oxoguanin imidazolringoffene Purine (Fapy) und AP-Stellen. Die Durchführung und Berechnung der induzierten DNA-Schäden erfolgte nach Hartwig et al. (1996). (Zwischenbericht 2002, Schwerdtle et al., 2003a)

2.4 PM2-Test – Oxidative DNA-Schäden in isolierter PM2 DNA und Fpg-Hemmung

Beim PM2-Test handelt es sich um einen sensitiven DNA-Relaxationsassay zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen mit anschließender elektrophoretischer Trennung. Zusätzlich kann mit dem PM2-Assay eine Aktivitätshemmung der Fpg gegenüber oxidativ-geschädigter PM2 DNA durch die zu untersuchenden Verbindungen ermittelt werden (Müller et al., 1990; Asmuss et al., 2000, Zwischenbericht 2003, Schwerdtle et al., 2003a, b).

2.5 HPLC-Fluoreszenz-Assay zur Quantifizierung von BPDE-DNA-Addukten

Die Etablierung des Testsystems und die Bestimmung von BPDE-DNA-Addukten in zellulärer DNA erfolgte wie im Zwischenbericht 2001 und in Schwerdtle et al. (2002) beschrieben.

2.6 Bestimmung der intrazellulären Nickelverteilung in A549 Zellen mittels Graphitrohr-Atomabsorptionsspektroskopie (AAS)

Die Quantifizierung von Nickel in der Gesamtzelle, dem Cytoplasma und der Zellkernfraktion erfolgte wie im Zwischenbericht 2002 erläutert.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichende Untersuchungen mit löslichem NiCl₂ und partikulärem NiO

Für das Metall Nickel wurden im Rahmen dieser Arbeit vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von NiCl₂ und NiO auf die Zytotoxizität, die intrazelluläre Verteilung von Nickel, die Induktion von oxidativen DNA-Schäden, die (+)-*anti*-BPDE-induzierte DNA-Adduktbildung sowie die Reparatur der induzierten Addukte in menschlichen A549 Lungenzellen durchgeführt. Partikuläres schwarzes NiO wurde uns freundlicherweise von Frau Dr. Adriana Oller (NIPERA - Nickel Producers Environmental Research Association) zur Verfügung gestellt. Die Partikel sind bezüglich der Oberflächeneigenschaften gut charakterisiert; rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die verwendeten Partikel < 5 µm (zumeist 0,5 – 3 µm) sind (Abb. 1).

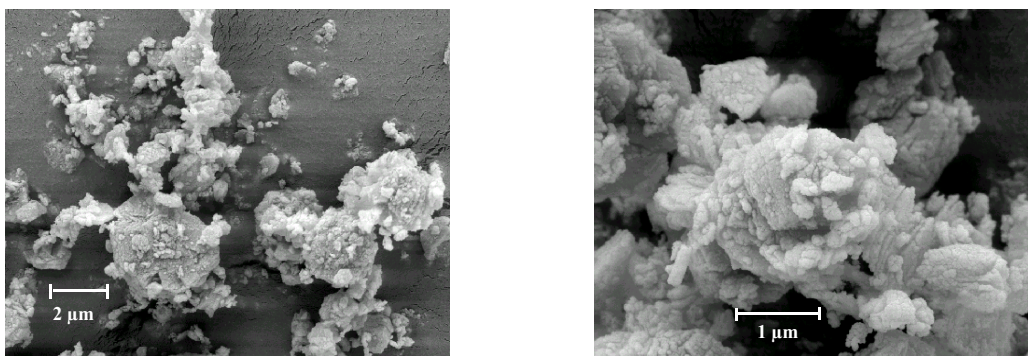


Abb. 1: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verwendeten NiO Partikel.

Die intrazelluläre Verteilung von Nickel(II) wurde nach Inkubation von A549 Zellen mit NiCl₂ und NiO anhand der Bindung an Cytoplasma- und Kernproteine mittels Graphitrohr-AAS untersucht. Nickel findet sich nach beiden Expositionen sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma, wobei die Bindung an Kernproteine im Falle von NiO stärker ausgeprägt ist (Abb. 2A, B).

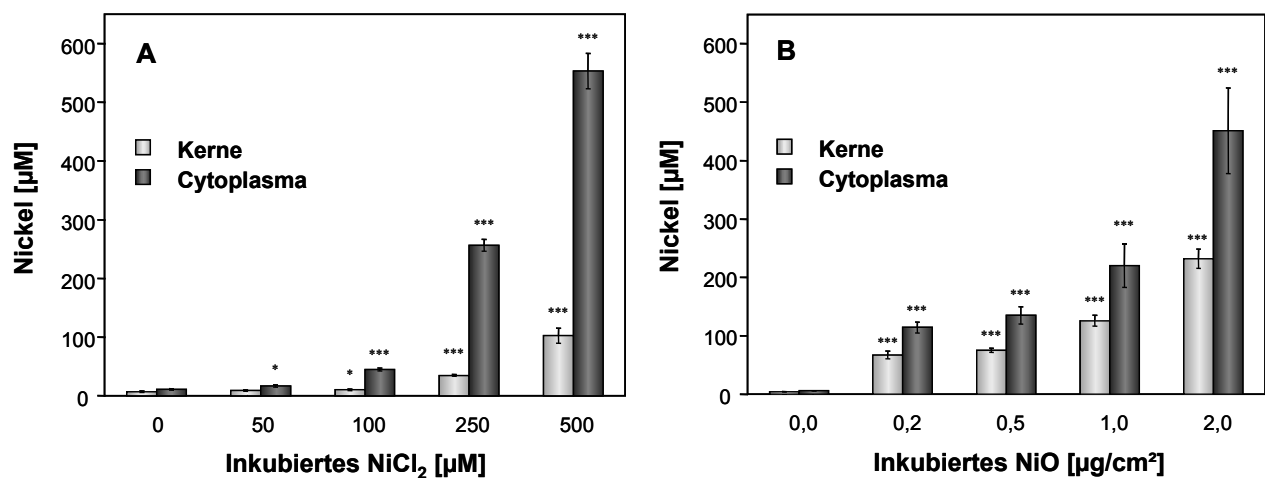


Abb. 2: Intrazelluläre Nickelverteilung nach 20 / 24 h Inkubation von A549 Zellen mit NiCl₂ bzw. NiO. Das Zellvolumen wurde mittels eines automatischen Zellszählgerätes zu $1,96 \cdot 10^{-12}$ l bestimmt, das Zellkernvolumen mit $2,68 \cdot 10^{-13}$ l bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte aus mind. vier unabhängigen Bestimmungen \pm SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Student'scher t-Test).

Gleichzeitig zeigen diese Ergebnisse aber auch entgegen anders lautenden Vermutungen in der Literatur (Oller et al., 1997), dass Nickel nach Inkubation mit löslichem Nickel in den Zellkern gelangt, was für die Risikobewertung von großer Bedeutung ist.

Die Induktion von DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen durch NiCl₂ und NiO wurde nach Kurzzeit- und Langzeitinkubation in A549 Zellen mittels Alkalischer Entwindung untersucht. Während nach 2 h Inkubation für beide Nickelverbindungen in nicht-zytotoxischen Konzentrationen keine signifikante Induktion von oxidativen DNA-Schäden nachgewiesen werden konnte (Daten nicht dargestellt), induzierten beide Verbindungen nach 20 bzw. 24 h Inkubation bereits in nicht-zytotoxischen Konzentrationen in erster Linie Fpg-sensitive Stellen. Ausgeprägte Effekte traten jedoch erst bei hohen zytotoxischen Konzentrationen (> 500 µM NiCl₂ bzw. > 1 µg/cm² NiO) auf (Abb. 3A, B).

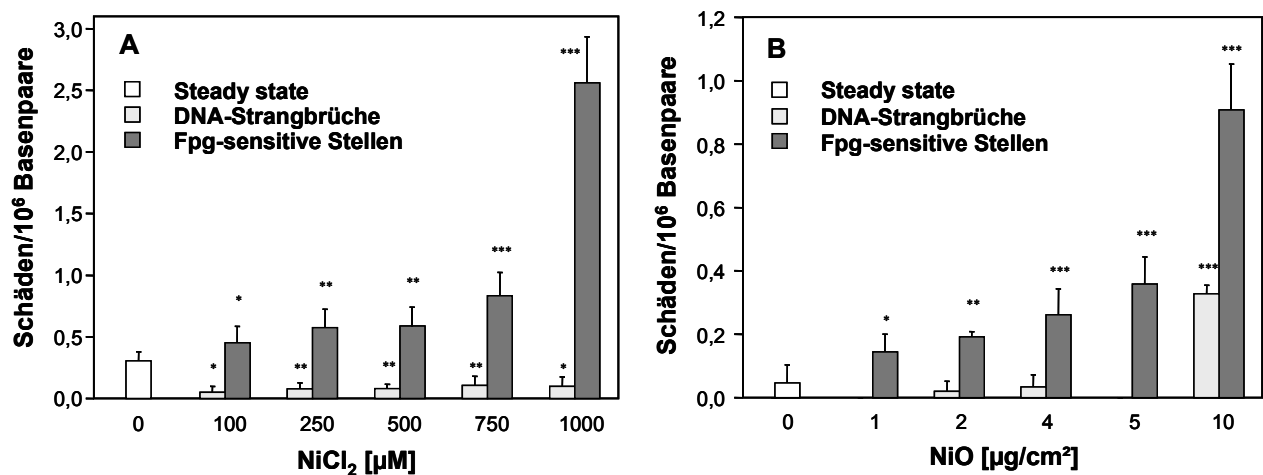


Abb. 3: Oxidative DNA-Schäden nach 20 / 24 h Inkubation mit NiCl₂ bzw. NiO in A549 Zellen. Logarithmisch wachsende Zellen wurden inkubiert und DNA-Strangbrüche und Fpg-sensitive Stellen mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 6 Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden vom steady state der Zellen: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (Student'scher t-Test).

Als Modell für die Nukleotidexzisionsreparatur diente für unsere Untersuchungen die Reparatur von Benzo[*a*]pyren-induzierten DNA-Addukten in A549 Zellen. Um Wechselwirkungen der Metalle mit dem Phase-I-Metabolismus von Benzo[*a*]pyren (B[*a*]P) zu vermeiden, wurde hierzu der reaktive Metabolit (+)-*anti*-BPDE (Benzo[*a*]pyrendiolepoxid) als schädigendes Agens eingesetzt, welcher stabile N²-Guanin-Addukte bildet und aus heutiger Sicht maßgeblich zur kanzerogenen Wirkung von B[*a*]P beiträgt. Vorversuche zum Schadensspektrum von B[*a*]P in A549 Zellen zeigten eine bis zu 20fach stärkere Induktion von BPDE-DNA-Addukten im Vergleich zu oxidativen DNA-Schäden (Zwischenbericht 2002). Dies verdeutlicht die Bedeutung der BPDE-DNA-Addukte für die Exposition gegenüber B[*a*]P und somit auch die Relevanz der durchgeführten Untersuchungen zur Reparaturhemmung dieser Addukte.

Die Quantifizierung der BPDE-DNA-Addukte erfolgte über eine im Rahmen dieser Arbeit optimierte HPLC/Fluoreszenz-Methode. Das Testsystem zeichnet sich durch eine hohe Reproduzierbarkeit und Sensitivität aus. Es ermöglicht die Quantifizierung von 0,5 Addukten/10⁸ Basenpaare, was in etwa 30 Läsionen/Zelle entspricht.

Während beide Nickelverbindungen die BPDE-induzierte Adduktbildung nicht verstärkten (Daten nicht dargestellt), inhibierten NiCl₂ und NiO die Reparatur der induzierten Addukte konzentrationsabhängig in nicht-zytotoxischen Konzentrationen signifikant ab 100 µM NiCl₂ bzw. 0,2 µg/cm² NiO (Abb. 4A, B). Beide Verbindungen verstärkten zudem die BPDE-induzierte Zytotoxizität in A549 Zellen (Schwerdtle et al, 2002).

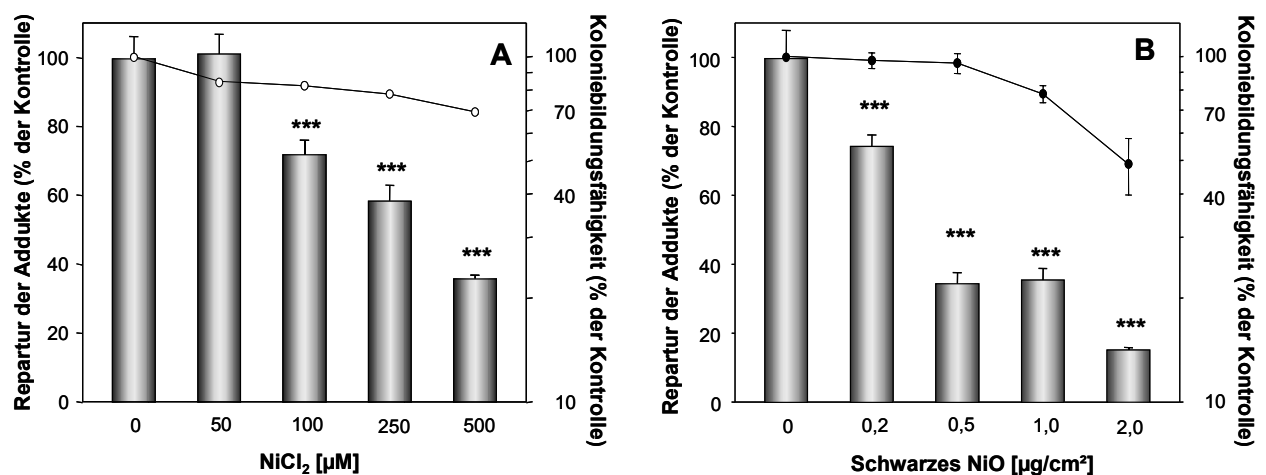


Abb. 4: Einfluss von NiCl₂ (A) und NiO (B) auf die Reparatur von BPDE-DNA-Addukten in A549 Zellen. Logarithmisch wachsende Zellen wurden 18 bzw. 22 h mit NiCl₂ oder NiO vorinkubiert, 2 h mit 50 nM (+)-anti-BPDE koinkubiert und 6 bzw. 8 h in Gegenwart von NiCl₂ oder NiO nachinkubiert. 100 % beziehen sich auf die Reparatur in Abwesenheit von Nickel. Nach 6 bzw. 8 h betrug die Reparatur der Kontrolle 41,3 ± 2,5 %, bzw. 44,9 ± 2,9 %. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 4 unabhängigen Bestimmungen ± SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrollreparatur: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (Student'scher t-Test).

Als ein Grund für die beobachtete Reparaturinhibition konnte in einer früheren Studie eine Beeinträchtigung der DNA-Bindung des Reparaturproteins Xeroderma pigmentosum A (XPA) durch NiCl₂ gezeigt werden (Asmuss et al., 2000). Innerhalb dieses Projektes wurden nun in Kooperation mit Herrn PD Dr. Wojciech Bal (Universität Warschau) im Rahmen eines Forschungsaufenthaltes in unserem Labor die molekularen Wechselwirkungen von NiCl₂ mit XPA weiter aufgeklärt. Hierfür wurden Untersuchungen zu Zink-Nickel-Interaktionen an einem synthetischen Peptid aus den 37 Aminosäuren des XPA Zinkfingers (XPAzf) durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass im nickelsubstituierten XPAzf die Zinkfingerstruktur, welche für die Funktion des Proteins essenziell ist, verloren geht und das Peptid zudem in Gegenwart von Nickel unter bestimmten Bedingungen weitaus oxidationsempfindlicher ist (Daten nicht dargestellt). Die Schädigung von XPAzf kann hierbei durch eine Substitution von Zink oder durch Oxidation der Thiolgruppen erfolgen (Bal et al., 2003).

3.2 Vergleichende Untersuchungen mit löslichem CdCl₂ und partikulärem CdO

Analog zu Nickel wurden für Cadmium vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von wasserlöslichem CdCl₂ und partikulärem CdO auf die Zytotoxizität, die Induktion von oxidativen DNA-Schäden, die BPDE-DNA-Adduktbildung sowie die Reparatur der induzierten BPDE-DNA-Addukte in A549 Zellen durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen zeigten, dass die verwendeten CdO Partikel < 1 µm sind (Abb. 5).

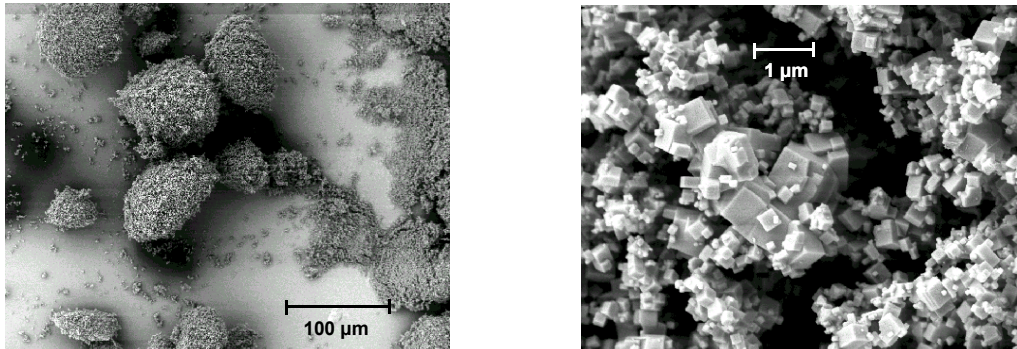


Abb. 5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der verwendeten CdO Partikel.

CdCl₂ induzierte in A549 Zellen nach 2 h Inkubation in nicht-zytotoxischen Konzentrationen zwar Fpg-sensitive Stellen, nach 24 h Inkubation konnte jedoch bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen (bis 50 µM) kein signifikanter Anstieg an DNA-Schäden mehr nachgewiesen werden (Abb. 6A, B). Für CdO konnte nach 2 h und in stärkerem Ausmaß nach 24 h Inkubation eine zeit- und konzentrationsabhängige Induktion von DNA-Strangbrüchen und Fpg-sensitiven Stellen bereits in nicht-zytotoxischen Konzentrationen (< 2 µg/cm²) gezeigt werden (Abb. 6C, D). Das partikuläre CdO ist folglich in A549 Zellen im Gegensatz zum löslichem CdCl₂ in der Lage, in nicht-zytotoxischen Konzentrationen nach Langzeitinkubation oxidative DNA-Schäden zu induzieren. Ob dieser Effekt durch eine verstärkte bzw. anhaltende Induktion von oxidativen DNA-Schäden oder durch eine Reparaturhemmung verursacht wurde, kann zum derzeitigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden und wird gegenwärtig untersucht.

Ähnlich wie bei den Nickelverbindungen inhibierten sowohl wasserlösliches CdCl₂ als auch partikuläres CdO deutlich die Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Addukten in nicht-zytotoxischen Konzentrationen (Abb. 7A, B); CdCl₂ verstärkte zudem die BPDE-induzierte DNA-Adduktbildung bereits in nicht-zytotoxischen Konzentrationen (Abb. 7A). Beide Verbindungen verstärkten zudem die BPDE-induzierte Zytotoxizität in A549 Zellen (Daten nicht dargestellt). Befunde auf molekularer Ebene zeigten, dass CdCl₂ sowohl die Schadenserkenkung (Hartmann and Hartwig, 1998) als auch die Ligation (Nocentini, 1987) der NER inhibiert. Die Hemmung der Schadenserkenkung könnte hierbei unter anderem durch die Inaktivierung von XPA durch Cadmium(II) bedingt sein. So führte CdCl₂ zu einer ausgeprägten Hemmung der

DNA-Bindungsfähigkeit des isolierten XPA-Proteins. Die beobachtete Inhibition konnte hierbei durch gleichzeitige Inkubation mit Zink verhindert werden, was auf eine Inaktivierung des für die DNA-Bindung essentiellen Zinkfingers durch eine Konkurrenz zwischen Cadmium(II) und Zink(II) schließen lässt (Asmuss et al., 2000). Um einen genaueren Einblick in den Mechanismus zu erhalten, werden zur Zeit analog zu Nickel Untersuchungen zu Zink-Cadmium-Interaktionen an XPAzf durchgeführt.

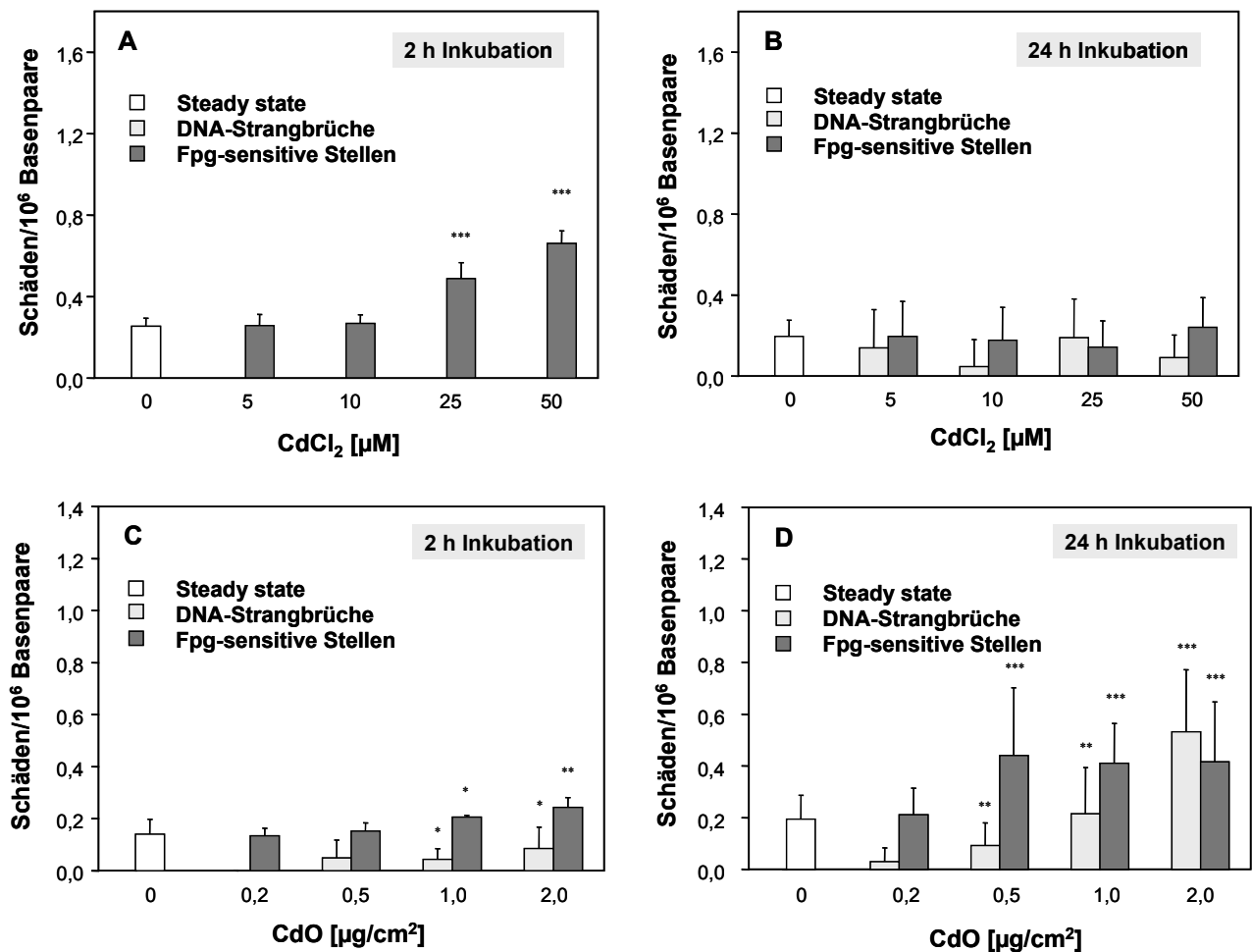


Abb. 6: Oxidative DNA-Schäden nach 2 oder 24 h Inkubation mit CdCl₂ bzw. CdO in A549 Zellen. Logarithmisch wachsende Zellen wurden inkubiert und DNA-Strangbrüche und Fpg-sensitive Stellen mittels Alkalischer Entwindung quantifiziert. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 6 Bestimmungen + SD. Statistisch signifikant verschieden vom steady state der Zellen: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (Student'scher t-Test).

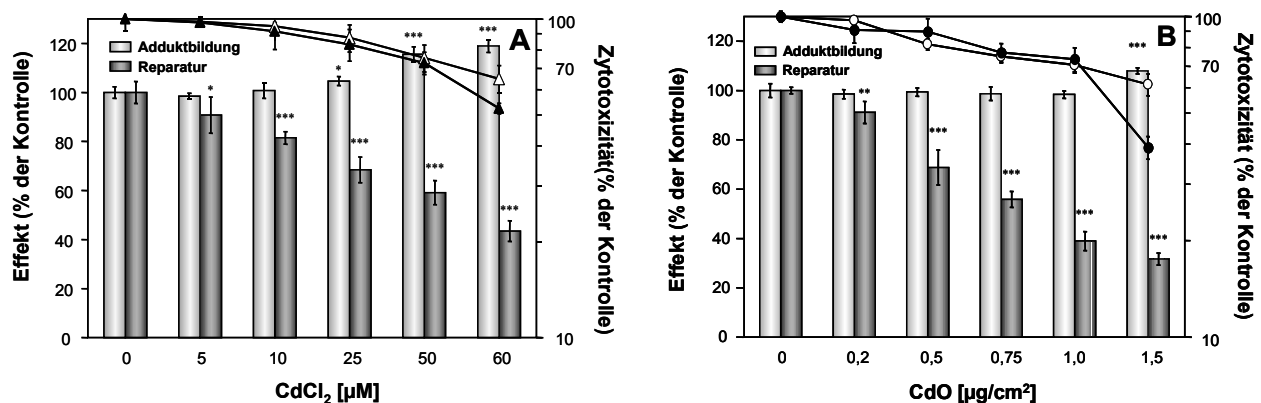


Abb. 7: Einfluss von CdCl₂ bzw. CdO auf die Bildung und Reparatur von BPDE-DNA-Addukten. A549 Zellen wurden 22 h mit CdCl₂ bzw. CdO vorinkubiert, 2 h mit 50 nM (+)-anti-BPDE koinkubiert und 0 bzw. 8 h in Gegenwart von Cadmium nachinkubiert. 100 % beziehen sich auf die Adduktbildung (385,9 ± 10,4 bzw. 391,2 ± 15,3 Addukte/10⁸ Bp) bzw. Reparatur in Abwesenheit von Cadmium. Nach 8 h betrug die Reparatur in der Kontrolle 44,3 ± 2,5 % bzw. 45,1 ± 0,5 %. Dargestellt sind Mittelwerte aus mind. 4 unabhängigen Bestimmungen ± SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001 (Student'scher t-Test).

Bei der Allgemeinbevölkerung liegen die Cadmiumkonzentrationen in der Lunge bei 1,3 µg/g Trockengewicht (Kollmeier et al., 1985), für Nickel werden Werte von etwa 0,2 - 2 µg/g Trockengewicht gefunden (Kollmeier et al., 1985; Andersen and Svenes, 1989; Adachi et al., 1991). Bei Arbeitern der metallverarbeitenden Industrie liegen diese Konzentrationen um ein Vielfaches höher. So werden z.B. bei Nickelraffineriearbeitern Spitzenkonzentrationen von bis zu 1344 µg Nickel/g Trockengewicht erreicht. In der vorliegenden Arbeit hemmen bereits 0,2 µg/cm² NiO und CdO, 100 µM NiCl₂ und 10 µM CdCl₂ die Reparatur der induzierten Addukte signifikant, dies entspricht Konzentrationen von 0,94, 1,05, 5,87 und 1,12 µg Metall pro ml bzw. cm³. Geht man davon aus, dass 1 cm³ Lungengewebe äquivalent zu 1 g Nassgewicht ist und in etwa 0,1 g Trockengewicht entspricht (Edelman and Roggli, 1989), so wird deutlich, dass die eingesetzten Konzentrationen physiologisch relevant sind. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass gerade bei wasserunlöslichen Metallpartikeln lokal über die Phagozytose wesentlich höhere Konzentrationen erreicht werden.

3.2 Vergleichende Untersuchungen mit Arsenit und seinen methylierten Metaboliten

Im Projektzeitraum wurden zusätzlich zu den ursprünglich geplanten Versuchen auch vergleichende Untersuchungen zum Einfluss von Arsenit und seinen drei- und fünfwertigen methylierten Metaboliten monomethylarsonige (MMA(III)) und dimethylarsinige (DMA(III)) Säure, Monomethylarsonsäure (MMA(V)) und Dimethylarsinsäure (DMA(V)) auf die Zytotoxizität, die Induktion von oxidativen DNA-Schäden in menschlichen Zellen und isolierter DNA, auf die BPDE-DNA-Adduktbildung, sowie die Reparatur der induzierten BPDE-DNA-Addukte in A549 Zellen und auf die Aktivität isolierter Fpg durchgeführt.

In HeLa S3 und A549 Zellen zeigten die dreiwertigen methylierten Arsenverbindungen sowohl bezüglich der Zellzahl als auch der Koloniebildungsfähigkeit eine stärkere Zytotoxizität als Arsenit. Die fünfwertigen methylierten Metabolite hingegen waren bezüglich beider Parameter um ein Vielfaches weniger zytotoxisch als Arsenit (Schwerdtle et al., 2003 a, b).

Arsenit induzierte nach 0,5 - 3 h Inkubation bereits in sehr geringen nanomolaren Konzentrationen oxidative DNA-Schäden in zwei verschiedenen menschlichen Zelllinien. So konnte nach 3 h Inkubation mit 10 nM Arsenit eine Induktion von 1,34 Fpg-sensitiven Stellen/ 10^6 Basenpaare in HeLa S3 Zellen gezeigt werden, was in etwa 7400 Läsionen pro Zellen entspricht. Die physiologische Relevanz der durchgeführten Versuch wird deutlich, wenn man die Arsenkonzentrationen im Blut näher betrachtet. In der Allgemeinbevölkerung findet man Arsengehalte von 4-27 nM im Gesamtblut, erhöhte Arsenkonzentrationen von 100, 200 und 400 µg/l resultieren in Blutkonzentrationen von 55, 133 und 172 nM (National Research Council, 1999; 2001).

Aber nicht nur Arsenit selbst, sondern auch seine drei- und fünfwertigen methylierten Metabolite induzierten bereits in nicht-zytotoxischen nanomolaren bzw. mikromolaren Konzentrationen oxidative DNA-Schäden nach 3 h Inkubation, und im Gegensatz zu Arsenit konnte für alle Metabolite auch nach 18 h Inkubation eine hohe Anzahl an DNA-Strangbrüchen und/oder Fpg-sensitiven Stellen nachgewiesen werden. Die dreiwertigen Metabolite waren dabei nach 18 h Inkubation in tieferen Konzentrationen als Arsenit weitaus potenter. Diese unterschiedliche Persistenz der Schädigung resultiert wahrscheinlich aus verschiedenen Schädigungsmechanismen und/oder Schädigungsspektren der einzelnen Verbindungen; zudem sollte auch die Möglichkeit einer Reparaturhemmung oxidativer DNA-Schäden durch die Metabolite in Betracht gezogen werden. In isolierter DNA generierte lediglich DMA(III) oxidative DNA-Schäden und zwar ausschließlich DNA-Strangbrüche (zusammengefasst in Tabelle 1; Schwerdtle et al., 2003a). Diese Untersuchungen an isolierter DNA unterstützen erneut die These, dass man bei den verschiedenen Arsenverbindungen nicht von einem gemeinsamen Schädigungsmechanismus ausgehen kann.

Tabelle 1: Induktion oxidativer DNA-Schäden durch Arsenit und die methylierten Metabolite in HeLa S3 Zellen und isolierter DNA.

	Arsenite	MMA(III)	DMA(III)	MMA(V)	DMA(V)
HeLa S3, 3 h	+++ > 1 nM	++ ≥ 0.1 µM	++ ≥ 0.1 µM	+++ ≥ 100 µM	+++ ≥ 100 µM
HeLa S3, 18 h	+ ≥ 0.1 µM	++ ≥ 0.1 µM	++ ≥ 0.1 µM	+++ ≥ 10 µM	+++ ≥ 10 µM
Isolated DNA	- ≤ 1 mM	- ≤ 1 mM	+++ ≥ 10 µM	- ≤ 1 mM	- ≤ 1 mM

+++ : starker Effekt, ++ : mittlerer Effekt, + : geringer aber signifikanter Effekt, - : kein signifikanter Effekt; statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle (Student'scher t-Test).

Unsere Versuche zur Hemmung der NER durch die Arsenverbindungen in menschlichen Lungenzellen zeigen, dass Arsenit und alle vier untersuchten Metabolite die Reparatur der BPDE-induzierten DNA-Addukte in nicht-zytotoxischen Konzentrationen dosisabhängig hemmen. So inhibierten bereits 5 µM Arsenit (Abb. 8), 2,5 µM MMA(III) und DMA(III) (Abb. 9A, B) bzw. 250 µM MMA(V) und DMA(V) (Daten nicht dargestellt) die Reparatur der induzierten BPDE-DNA-Addukte signifikant. Arsenit und MMA(III) verstärkten zudem bereits die BPDE-induzierte DNA-Adduktbildung (Schwerdtle et al., 2003b).

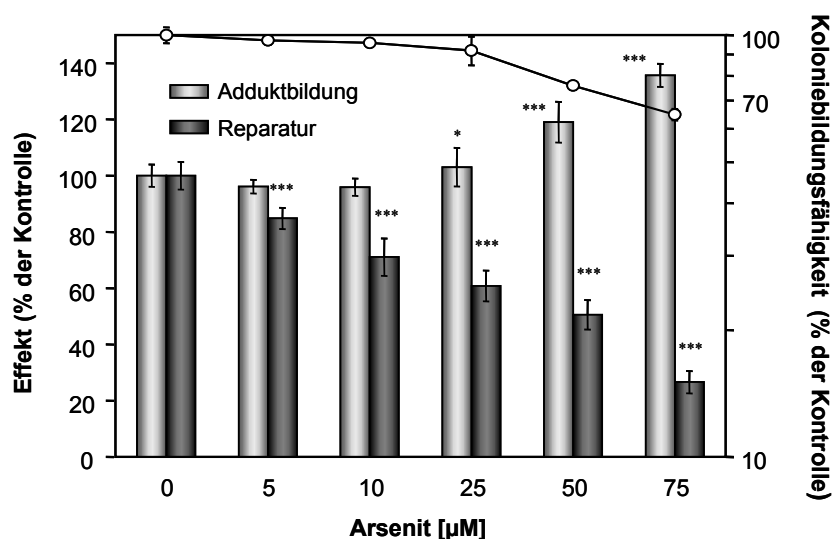


Abb. 8: Einfluss von Arsenit auf die Bildung und Reparatur von BPDE-DNA-Addukten. A549 Zellen wurden 16 h mit Arsenit vorinkubiert, 2 h mit 50 nM (+)-anti-BPDE koinkubiert und 0 bzw. 8 h in Gegenwart von Arsenit nachinkubiert. 100 % beziehen sich auf die Adduktbildung ($389 \pm 15,6$ Addukte/ 10^8 Bp) bzw. Reparatur in Abwesenheit von Arsenit. Nach 8 h betrug die Reparatur in der Kontrolle $43,3 \pm 2,2$ %. Dargestellt sind Mittelwerte aus mind. 6 unabhängigen Bestimmungen \pm SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Student'scher t-Test).

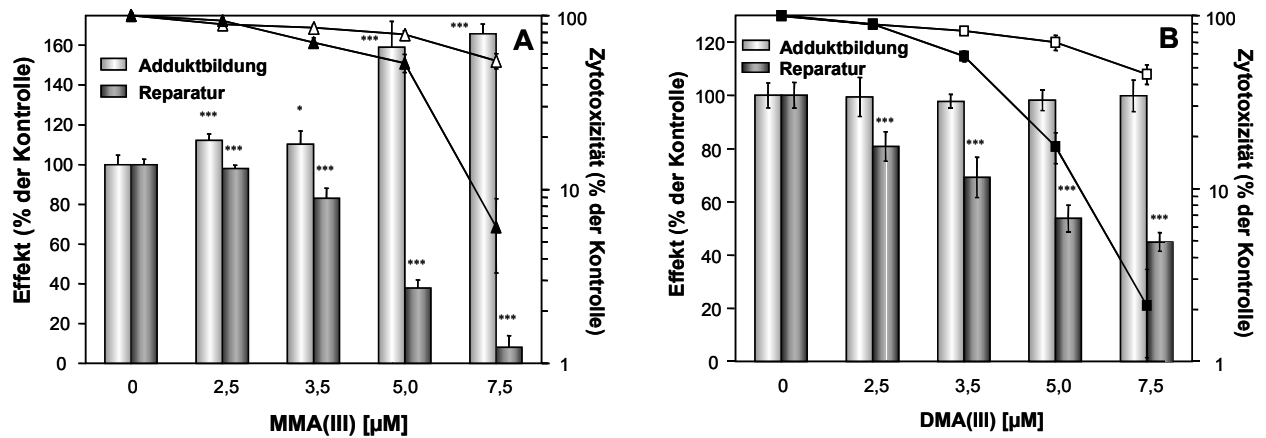


Abb. 9: Einfluss von MMA(III) bzw. DMA(III) auf die Bildung und Reparatur von BPDE-DNA-Addukten. A549 Zellen wurden 16 h mit MMA(III) bzw. DMA(III) vorinkubiert, 2 h mit 50 nM (+)-anti-BPDE koinkubiert und 0 bzw. 8 h in Gegenwart von MMA(III) oder DMA(III) nachinkubiert. 100 % beziehen sich auf die Adduktbildung ($395 \pm 19,6$ Addukte/ 10^8 Bp) bzw. Reparatur in Abwesenheit der Arsenverbindungen. Nach 8 h betrug die Reparatur in der Kontrolle $45,1 \pm 0,5$ bzw. $44,1 \pm 2,2$ %. Dargestellt sind Mittelwerte aus mind. 4 unabhängigen Bestimmungen \pm SD. Statistisch signifikant verschieden von der Kontrolle: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Student'scher t-Test).

Die Untersuchungen zum Einfluss der Arsenverbindungen auf die Aktivität des Zinkfinger-BER-Enzyms Fpg sollten Aufschluss darüber geben, ob Arsenit und seine methylierten Metabolite in der Lage sind, ein isoliertes Reparaturenzym zu hemmen. Während Arsenit und die fünfwertigen methylierten Metabolite MMA(V) und DMA(V) in Konzentrationen von bis zu 10 mM keinen Effekt zeigten, inhibierten DMA(III) und MMA(III) die Aktivität der Fpg konzentrationsabhängig (Abb. 10).

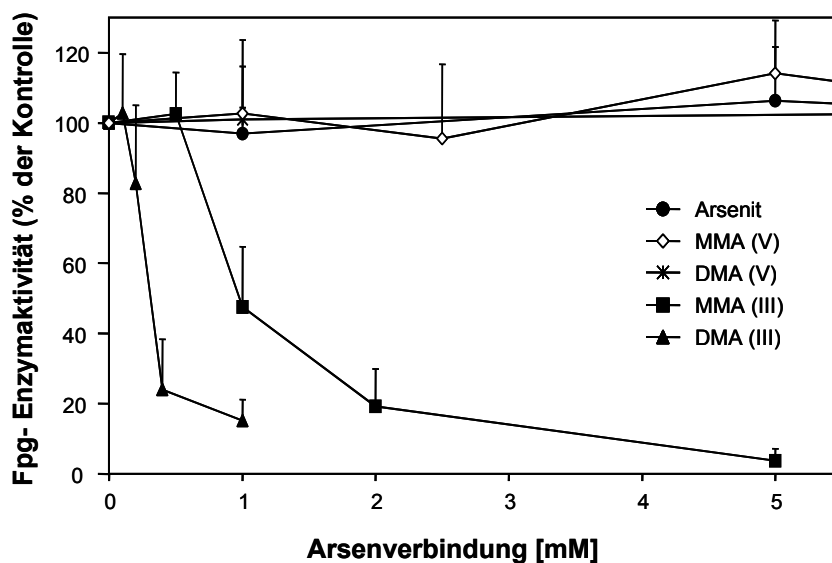


Abb. 10: Einfluss der Arsenverbindungen auf die Fpg-Aktivität. Isolierte Fpg wurde 30 min bei 37°C mit den Arsenverbindungen inkubiert und die Aktivität gegenüber oxidativ geschädigter DNA mittels PM2 Assay bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus mindestens 4 Bestimmungen + SD.

Weitere Versuche an dem bereits erwähnten synthetischen Peptid XPAzf, welches die Zinkfingerdomäne des humanen XPA-Proteins repräsentiert, verdeutlichten, dass alle untersuchten dreiwertigen Arsenverbindungen in der Lage sind Zink aus XPAzf freizusetzen, wobei die methylierten Metabolite weitaus effektiver waren als Arsenit. Die fünfwertigen Metabolite zeigten keinen bzw. nur einen schwachen Effekt (Schwerdtle et al., 2003b).

Insgesamt könnte die Inaktivierung von Thiolgruppen in Zinkfingerdomänen ein möglicher Mechanismus für die Hemmung der NER durch Arsenit und seine dreiwertigen methylierten Metabolite sein.

4 Zusammenfassende Bewertung

Im Rahmen dieses Projektes konnte gezeigt werden, dass verschiedene lösliche und partikuläre Verbindungen von Nickel, Cadmium und Arsen oxidative DNA-Schäden in kultivierten menschlichen Zellen induzieren und die Reparatur von BPDE-DNA-Addukten hemmen.

Die Reparatur der BPDE-DNA-Addukte in kultivierten menschlichen Zellen ist auch in Abwesenheit von Metallverbindungen unvollständig und selbst nach 48 h Reparatur sind noch 20 – 35 % der Addukte vorhanden (Zwischenbericht 2001). Eine Persistenz zumindest eines Teils der induzierten BPDE-DNA-Addukte konnte auch beim Menschen gezeigt werden (Lodovici et al., 1998). Da die Anzahl der stabilen durch PAK induzierten Addukte nachweislich mit dem kanzerogenen Potenzial korreliert (Melendez-Colon et al., 1999) und die Metallverbindungen diese ohnehin unvollständige Reparatur der Addukte in physiologisch relevanten Konzentrationen hemmen, ist eine Wirkungsverstärkung bei einer Mischexposition zu erwarten. Die beobachtete Hemmung der Reparatur von BPDE-induzierten DNA-Addukten im Zusammenhang mit früheren Studien, die eine Reparaturinhibition UV-induzierter DNA-Addukte zeigen, sprechen zudem dafür, dass Arsen, Cadmium und Nickel die NER generell hemmen.

Im Rahmen dieses Projektes konnte zudem zum ersten Mal eine Reparaturinhibition durch umweltrelevante partikuläre Nickel- und Cadmiumverbindungen und biomethylierte Arsenverbindungen gezeigt werden.

Die vergleichenden Untersuchungen von partikulären und löslichen Nickel- und Cadmiumverbindungen zeigten hierbei insgesamt etwas stärkere Effekte durch die partikulären Verbindungen in menschlichen Lungenzellen. Berücksichtigt man zudem, dass für partikuläres NiO im Vergleich zu löslichen Nickelverbindungen in der Lunge bis zu 1000fach längere Retentionszeiten gefunden wurden (Dunnick et al., 1995), so muss im Fall von NiO mit einer chronischen Reparaturhemmung und DNA-Schädigung gerechnet werden. Dies könnte die höhere Kanzerogenität der partikulären im Vergleich zu löslichen Nickelverbindungen erklären.

Vor dem Hintergrund, dass vor allem Beschäftigte der metallveredelnden und –verarbeitenden Industrie aber auch die Allgemeinbevölkerung u.a. durch Rauchen oder Flugasche einer Mischexposition von oftmals partikulären Metallverbindungen (häufig Oxiden) und zahlreichen mutagenen Substanzen wie z.B. PAKs ausgesetzt sind, gewinnt dieser Aspekt in der metallinduzierten Kanzerogenese zunehmend an Bedeutung.

Berücksichtigt man das genotoxische Potenzial der dreiwertigen und fünfwertigen Arsenmetabolite, so zeigt sich, dass man keinesfalls davon ausgehen kann, dass die Biomethylierung von anorganischem Arsen beim Menschen nur ein Detoxifizierungsmechanismus ist. Vielmehr kann die Methylierung in den vorgestellten Testsystemen zur direkten und indirekten Genotoxizität und damit vermutlich auch zur Kanzerogenität von anorganischen Arsenverbindungen beitragen.

Danksagung

Unser besonderer Dank gilt Herrn Dr. S. Boiteux, Fontenay aux Roses, Frankreich, für die freundliche Überlassung des Fpg-Proteins, Herrn Prof. Dr. W. R. Cullen, University of British Columbia, Canada, für die Synthese der dreiwertigen methylierten Arsenmetabolite und Frau Dr. A. Oller, NIPERA, Durham, North Carolina, USA, für die Bereitstellung des schwarzen NiO. Frau C. Glaser vom Institut der Werkstoffe der Elektrotechnik der Universität Karlsruhe danken wir für die Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der NiO und CdO Partikel.

Referenzen

- Adachi, S., Takemoto, K., Ohshima, S., Shimizu, Y. and Takahama, M. (1991): Metal concentrations in lung tissue of subjects suffering from lung cancer. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **63**. 193-97.
- Andersen, I. and Svenes, K. B. (1989): Determination of nickel in lung specimens of thirty-nine autopsied nickel workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* **61**. 289-95.
- Asmuss, M., L.H. Mullenders, A. Eker and A. Hartwig (2000): Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair. *Carcinogenesis* **21**(11). 2097-104.
- Bal, W., T. Schwerdtle and A. Hartwig (2003): Mechanism of nickel assault on the zinc finger of DNA repair protein XPA. *Chem. Res. Tox.* **16** (2). 242-8.
- Costa, M., Simmons-Hansen, J., Bedrossian, C. W., Bonura, J. and Caprioli, R. M. (1981): Phagocytosis, cellular distribution, and carcinogenic activity of particulate nickel compounds in tissue culture. *Cancer Res.* **41**(7). 2868-76.
- Dunnick, J. K., Elwell, M. R., Radovsky, A. E., Benson, J. M., Hahn, F. F., Nikula, K. J., Barr, E. B. and Hobbs, C. H. (1995): Comparative carcinogenic effects of nickel subsulfide, nickel oxide, or nickel sulfate hexahydrate chronic exposures in the lung. *Cancer Res.* **55**(22). 5251-6.
- Edelman, A. E. and Roggli, V. L. (1989): The Akkumulation of Nickel in Human Lungs. *Environ. Health Perspect.* **81**(221-4).
- Fletcher, G. G., Rossetto, F. E., Turnbull, J. D. and Nieboer, E. (1994): Toxicity, uptake, and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds. *Environ. Health Perspect.* **102**. 69-79.
- Hartmann, M. and Hartwig, A. (1998): Disturbance of DNA damage recognition after UV-irradiation by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells. *Carcinogenesis* **19**(4). 617-21.
- Hartwig, A. (1995): Current aspects in metal genotoxicity. *Biometals* **8**(1). 3-11.
- Hartwig, A., H. Dally and Schleppegrell, R. (1996): Sensitive analysis of oxidative DNA damage in mammalian cells: use of the bacterial Fpg protein in combination with alkaline unwinding. *Toxicol. Lett.* **88**(1-3). 85-90.
- Hartwig, A., L.H. Mullenders, M. Asmuss, H. Dally and M. Hartmann (1998): Disruption of DNA repair processes by carcinogenic metal compounds. *Fresenius J. Anal. Chem.* **361**. 377-80.
- Kollmeier, H. (1985): Metallanreicherung in Humangewebe. *Schriftenreihe der Bundesanstalt für Arbeitsschutz.*
- Lodovici, M., Akpan, V., Giovannini, L., Migliani, F. and Dolara, P. (1998): Benzo[a]pyrene diol-epoxide DNA adducts and levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in autoptic samples from human lungs. *Chem. Biol. Interact.* **116**(3). 199-212.

- Melendez-Colon, V. J., Luch, A., Seidel, A. and Baird, W. M. (1999): Cancer initiation by polycyclic aromatic hydrocarbons results from formation of stable DNA adducts rather than apurinic sites. *Carcinogenesis* **20**(10). 1885-91.
- Müller, E., S. Boiteux, R.P. Cunningham and B. Epe (1990): Enzymatic recognition of DNA modifications induced by singlet oxygen and photosensitizers. *Nucleic Acid Res.* **18**(20). 5969-73
- Nocentini, S. (1987): Inhibition of DNA replication and repair by cadmium in mammalian cells. Protective interaction of zinc. *Nucleic Acid Res.* **15**. 4211-25
- National Research Council (1999). *Arsenic in drinking water*. Washington, D.C., National Academy Press.
- National Research Council (2001). *Arsenic in drinking water 2001 update*. Washington, D.C., National Academy Press.
- Oller, A. R., Costa, M. and Oberdorster, G. (1997): Carcinogenicity assessment of selected nickel compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**(1). 152-66.
- Schwerdtle, T., A. Seidel and A. Hartwig (2002): Effect of soluble and particulate nickel compounds on the formation and repair of stable benzo[*a*]pyrene DNA adducts in human lung cells. *Carcinogenesis* **23**. 47-53.
- Schwerdtle, T., I. Walter, I. Mackiw and A. Hartwig (2003a): Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. *Carcinogenesis* **24** (5). 967-74.
- Schwerdtle, T., I. Walter and A. Hartwig (2003b): Arsenite and its biomethylated metabolites interfere with the formation and repair of stable BPDE-induced DNA adducts in human cells and impair XPAzf and Fpg. *DNA Repair*, in press.

Liste der wissenschaftlichen Veröffentlichungen zum Vorhaben

Publikationen in Fachzeitschriften

Hartwig, A. (2002): Role of DNA repair in particle –and fiber-induced lung injury. **Inhalation Toxicology**, 14, 91-100

Schwerdtle, T., A. Seidel and A. Hartwig (2002): Effect of soluble and particulate nickel compounds on the formation and repair of stable benzo[*a*]pyrene DNA adducts in human lung cells. **Carcinogenesis**, 23: 47-53.

Hartwig, A. and T. Schwerdtle (2002): Interactions by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes: toxicological implications. **Toxicology Letters**, 127 (1-3): 47-54

Hartwig, A., M. Assmus, I. Ehleben, U. Herzer, D. Kostelac, T. Schwerdtle and A. Bürkle (2002): Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms. **Environmental Health Perspectives**, 110 (5): 797-801.

Bal, W., T. Schwerdtle, A. Hartwig (2003): Mechanism of nickel assault on the zinc finger of DNA repair protein XPA. **Chemical Research in Toxicology**, 16 (2): 242-8

Schwerdtle, T., I. Walter, I. Mackiw, A. Hartwig (2003): Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites in cultured human cells and isolated DNA. **Carcinogenesis**, 24 (5): 967-74

Hartwig, A., H. Blessing, T. Schwerdtle, I. Walter (2003): Modulation of DNA repair processes by arsenic and selenium compounds. **Toxicology**, im Druck.

Hartwig, A., T. Schwerdtle and I. Walter (2003): *Current aspects on the genotoxicity of arsenite and its methylated metabolites: Oxidative stress and interactions with the cellular response to DNA damage*. Proceedings Workshop “Metall(oid)organische Verbindungen in der Umwelt”, Springer Verlag 2003, Berlin / Heidelberg, im Druck.

Schwerdtle, T., I. Walter and A. Hartwig (2003): Arsenite and its biomethylated metabolites interfere with the formation and repair of stable BPDE-induced DNA adducts in human cells and impair XPAzf and Fpg. **DNA Repair**, in press.

Veröffentlichte Abstracts

Schwerdtle, T. and A. Hartwig (2000): Benzo[a]pyren-induzierte DNA-Schäden: Sensitive Quantifizierung der Adduktbildung und Reparatur in kultivierten Säugerzellen mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion. **Lebensmittelchemie**, 54 (4): 80.

Schwerdtle T. and A. Hartwig (2000): Influence of different nickel compounds on BPDE-DNA adduct formation and repair. **Biological Chemistry**, 381: 245.

Schwerdtle T., A. Nold und A. Zeller (2001): Einfluss partikuläre Nickelverbindungen auf die Induktion und Reparatur von DNA-Schäden. **Lebensmittelchemie**, 55 (5): 133-134.

Zeller, A., T. Schwerdtle und A. Hartwig (2001): Oxidative DNA-Schäden durch Benzo[a]pyren in kultivierten Säugerzellen. **Lebensmittelchemie**, 55 (5): 133.

Schwerdtle T., I. Mackiw, A. Bayerl and A. Hartwig (2002): Arsenite and its methylated metabolites MMAA and DMAA induce oxidative DNA damage in HeLa S3 cells. **Archives of Pharmacology**, 365 (1): R135 (526).

Schwerdtle, T., I. Mackiw, I. Walter, A. Hartwig (2002): Genotoxizität von Arsenit und seinen methylierten Metaboliten I: kultivierte menschliche Zellen. **Lebensmittelchemie**, 56 (6): 136-137.

I. Walter, T. Schwerdtle, H. Blessing, A. Hartwig (2002): Genotoxizität von Arsenit und seinen methylierten Metaboliten I: subzelluläre Systeme. **Lebensmittelchemie**, 57 (1): 4.

Schwerdtle, T., I. Walter, I. Mackiw, A. Hartwig (2003) Comparative genotoxicity of arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites. **Archives of Pharmacology**, 367 (1): R138 (537)

Walter, I., T. Schwerdtle, A. Hartwig (2003) Interference by inorganic arsenic and its methylated metabolites with zinc finger proteins. **Archives of Pharmacology**, 367 (1): R146 (571)

Vorträge auf Fachtagungen

Workshop German MAK Commission „Carcinogenicity of Fibers and Particles“, München, 26./27. 10. 2000: A. Hartwig: *Role of DNA-repair in particle-induced lung injury.*

42. Frühjahrstagung der DGPT, 13. - 15. 3. 2001, Mainz: A. Hartwig: *Modulation of DNA repair processes by environmental pollutants.*

31st Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society: Genetic susceptibility at low dose exposure, Ghent, Belgien, 1. – 5. 9. 2001: A. Hartwig: *Carcinogenic metal compounds: interference with DNA repair processes and cell cycle control.*

Third International Meeting on Molecular Mechanisms of Metal Toxicity and Carcinogenicity, Sardinien, Italien, 2. – 5. 9. 2001: A. Hartwig: *Interference by carcinogenic metal compounds with DNA repair processes and cell cycle control.*

Eurotox 2001, Istanbul, Türkei, 13. – 16. 9. 2001: A. Hartwig: *Carcinogenic metal compounds: Interference with DNA repair processes.*

19. GUM-Tagung, 25. – 28. 9. 2001, Karlsruhe: T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Genotoxicity of soluble and particulate nickel compounds: Induction of oxidative DNA damage and repair inhibition of benzo[a]pyrene-induced DNA adducts.*

31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 9. – 11. 9. 2002, Frankfurt: T. Schwerdtle, I. Mackiw, I. Walter, A. Hartwig: *Genotoxizität von Arsenit und seinen Metaboliten MMAA und DMAA.*

7. Tagung des DNA-Reparaturnetzwerks, 17. – 20. 9. 2002, Karlsruhe: T. Schwerdtle, I. Mackiw, I. Walter, A. Hartwig: *Induction of DNA damage and interference with nucleotide excision repair by arsenite and its pentavalent methylated metabolites.*

Workshop “Organometalloid compounds in the Environment”, 14. –16. 10. 2002: A. Hartwig: *Current aspects on the genotoxicity of metal and semimetal species: Oxidative stress and interactions with the cellular response to DNA damage.*

44. Tagung der DGPT und 20. Tagung der GUM, 17 - 20. 3. 2003, Mainz: T. Schwerdtle, I. Walter, A. Hartwig: *Genotoxizität von Arsenit und seinen dreiwertigen und fünfwertigen methylierten Metaboliten.*

Posterbeiträge auf Fachtagungen

18. GUM-Tagung, 22. – 25. 2. 2000, Ulm: T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Sensitive Quantifizierung von anti-BPDE DNA-Addukten in kultivierten Säugerzellen mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion.*

GDCH Regionalverband Süd-West Arbeitstagung, 3. – 4. 4. 2000, Karlsruhe: T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Benzo[a]pyren-induzierte DNA-Schäden: Sensitive Quantifizierung der Adduktbildung und Reparatur in Säugerzellen mittels HPLC mit Fluoreszenzdetektion.*

6. Tagung des DNA-Reparaturnetzwerks, 18. – 21. 7. 2000, Essen: T. Schwerdtle, A. Hartwig: *DNA adducts, rates of repair and cytotoxic effects induced by benzo[a]pyrene and its metabolites in cultured human cells and modulating effects of nickel compounds.*

Deutscher Lebensmittelchemikertag, 11. – 13. 9. 2000, Stuttgart Hohenheim: T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Einfluss von Nickelverbindungen auf die Induktion und Reparatur von Benzo[a]pyren-induzierten DNA-Addukten.*

GBM Herbsttagung, 10. – 13. 10. 2000, München: T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Influence of different nickel compounds on BPDE-DNA adduct formation and repair.*

GDCH Regionalverband Süd-West Arbeitstagung 2001, 2.– 3. 4. 2001, Kaiserslautern: T. Schwerdtle, A. Nold und A. Hartwig: *Einfluss partikulärer Nickelverbindungen auf die Induktion und Reparatur von DNA-Schäden.*

GDCH Regionalverband Süd-West Arbeitstagung, 2. – 3. 4. 2001, Kaiserslautern: A. Zeller, T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Oxidative DNA-Schäden durch Benzo[a]pyren in kultivierten Säugerzellen.*

GDCH Regionalverband Süd-West Arbeitstagung, 2. – 3. 4. 2001, Kaiserslautern: M. Opiolka, T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Induktion oxidativer DNA-Schäden durch sichtbares Licht und Nickel in reparaturkompetenten und partiell reparaturdefizienten Mausfibroblasten.*

Third International Meeting on Molecular mechanisms of Metal Toxicity & Carcinogenicity, 2.– 5. 9. 2001, Sardegna, Italy: T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Effects of soluble and particulate nickel compounds on the induction and repair of DNA damage.*

19. GUM-Tagung, 25. – 28. 9. 2001, Karlsruhe: T. Schwerdtle, I. Mackiw, A. Bayerl, A. Hartwig: *Induction of oxidative DNA damage by arsenite and its methylated metabolites MMAA and DMAA in HeLa S3 cells.*

19. GUM-Tagung, 25. – 28. 9. 2001, Karlsruhe: A. Zeller, T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Spectrum of oxidative DNA damage in human lung cells by benzo[a]pyrene.*

43. Frühjahrstagung der DGPT, 12. – 14. 3. 2002, Mainz: T. Schwerdtle, I. Mackiw, A. Bayerl, A. Hartwig: *Arsenite and its methylated metabolites MMAA and DMAA induce oxidative DNA damage in HeLa S3 cells.*

32nd Annual Meeting of the EEMS, 3. - 7. 9. 2002, Warsaw, Poland: T. Schwerdtle, I. Walter, I. Mackiw, A. Hartwig: *Genotoxicity of arsenite and its trivalent and pentavalent methylated metabolites.*

32nd Annual Meeting of the EEMS, 3. - 7. 9. 2002, Warsaw, Poland: W. Bal, T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Mechanism of nickel assault on the zinc finger of DNA repair protein XPA.*

31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, 7. – 11. 9. 2002, Frankfurt: I. Walter, T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Einfluss von methylierten Arsenverbindungen auf die Induktion und Reparatur oxidativer DNA-Schäden.*

7. Tagung des DNA-Reparaturnetzwerks, 17 – 20. 9. 2002, Karlsruhe: T. Schwerdtle, A. Hadamek, A. Hartwig: *Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: interference with nucleotide excision repair and induction of oxidative DNA damage.*

7. Tagung des DNA-Reparaturnetzwerks, 17 – 20. 9. 2002, Karlsruhe: I. Walter, T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Genotoxicity of trivalent arsenic metabolites.*

ESCODD plenary meeting 2003, 12. – 13. 1. 2003, Firenze, Italy: T. Schwerdtle, I. Walter, A. Hartwig: *Genotoxicity of biomethylated arsenicals in cultured human cells.*

44. Tagung der DGPT und 20. Tagung der GUM, 17 - 20. 3. 2003, Mainz: I. Walter, T. Schwerdtle, A. Hartwig: *Einfluss von Arsenit und seinen methylierten Metaboliten auf Zinkfingerproteine.*

33rd Annual Meeting of the EEMS, 24.8. - 28. 8. 2003, Aberdeen, Great Britain: T. Schwerdtle, I. Walter, A. Hartwig: *Arsenite and its biomethylated metabolites induce oxidative DNA damage and interfere with DNA repair in cultured human cells and subcellular systems.*