

Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Plastische Gesichtschirurgie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. med. dent. A. C. Kübler

*Identifizierung von Biomarkern der Belastung  
von Mundschleimhautzellen mit Schwermetallen und  
polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen*

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Andreas Wannhoff

aus Langenfeld (Rhld.)

Würzburg, September 2011

**Referent:** Privatdozent Dr. med. Dr. med. dent. T. Reuther

**Koreferent:** Professor Dr. rer. nat. J. Groll

**Dekan:** Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 02. August 2012

Der Promovend ist Arzt

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die menschliche Mundschleimhaut . . . . .	1
1.1.1	Anatomie . . . . .	1
1.1.2	Physiologie . . . . .	3
1.1.3	Ausgewählte Schädigungsmuster und Erkrankungen der oralen Mukosa . . . . .	3
1.2	Schwermetalle . . . . .	4
1.2.1	Blei . . . . .	5
1.2.2	Blei und seine Auswirkungen auf den menschlichen Organismus . . . . .	5
1.3	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe . . . . .	6
1.3.1	Benzo[ $\alpha$ ]pyren . . . . .	6
1.3.2	Benzo[ $\alpha$ ]pyren und seine Auswirkungen auf den menschlichen Organismus . . . . .	7
1.4	Das Apoptose-System . . . . .	7
1.4.1	Überblick . . . . .	7
1.4.2	Aktivierung der Apoptose . . . . .	8
1.4.3	Die Familie der Caspasen . . . . .	11
1.4.4	Caspase-3 . . . . .	12
1.4.5	Regulatoren und Inhibitoren der Apoptose und Caspasen . . . . .	13
1.5	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen . . . . .	15
1.5.1	Physiologie . . . . .	15
1.5.2	Zelluläre Abwehrmechanismen, sowie oxidativer und nitrogener Stress . . . . .	16
1.5.3	Pathologische Bedeutung . . . . .	17
1.5.4	Proteinperoxidation und Nitrotyrosin . . . . .	19
1.5.5	Lipidperoxidation und Isoprostane . . . . .	21
1.6	Gegenstand der Arbeit - Fragestellung . . . . .	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Patientenselektion und Probengewinnung . . . . .	25

## *Inhaltsverzeichnis*

2.2	Organbadversuch . . . . .	26
2.2.1	Versuchsprotokoll . . . . .	26
2.2.2	Benötigte Ansätze . . . . .	27
2.3	Kryoschnitte . . . . .	29
2.4	Immunhistochemie . . . . .	30
2.4.1	Versuchsprotokoll . . . . .	30
2.4.2	Benötigte Ansätze . . . . .	32
2.4.3	Verwendete Antikörper . . . . .	33
2.5	Fotografieren der gefärbten Schnitte am Mikroskop . . . . .	35
2.6	Auswertung . . . . .	35
2.6.1	Messen der Grauwerte . . . . .	35
2.6.2	Statistische Auswertung . . . . .	36
2.7	Materialien . . . . .	36
2.7.1	Laborgeräte . . . . .	36
2.7.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	38
2.7.3	Chemikalien . . . . .	39
2.7.4	Antikörper . . . . .	41
2.7.5	Blei und Benzo[ $\alpha$ ]pyren . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>43</b>
3.1	Patientenkollektiv . . . . .	43
3.2	Blei . . . . .	44
3.2.1	Aktive Caspase-3 . . . . .	44
3.2.2	8-epi-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> . . . . .	46
3.2.3	Nitrotyrosin . . . . .	47
3.3	Benzo[ $\alpha$ ]pyren . . . . .	49
3.3.1	Aktive Caspase-3 . . . . .	49
3.3.2	8-epi-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> . . . . .	51
3.3.3	Nitrotyrosin . . . . .	53
3.4	Einflüsse von Tabakrauch . . . . .	55
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1	Auswirkungen der Inkubation in Blei auf die untersuchten Biomarker	59
4.2	Benzo[ $\alpha$ ]pyren-bedingte Änderungen der untersuchten Biomarker . .	62
4.3	Unterschiede zwischen den Schichten des Str. basale und Str. spinosum	66
4.4	Eignung von Caspase-3, 8-epi-PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> und Nitrotyrosin als Biomarker einer Blei- oder BaP-Exposition . . . . .	67
4.5	Unterschiede zwischen Proben von Rauchern und Nichtrauchern . . .	68

*Inhaltsverzeichnis*

<b>5 Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>71</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>73</b>



# Abkürzungsverzeichnis

3-NT	3-Nitrotyrosin
AIF	Apoptoseinduzierender Faktor ( <i>engl.: apoptosis-inducing factor</i> )
ALA	$\delta$ -Aminolävulinsäure
Apaf-1	Apoptotische Proteasen aktivierender Faktor-1 ( <i>engl.: apoptotic protease activating factor 1</i> )
Aqua dest.	Destilliertes Wasser ( <i>lat.: Aqua destillata</i> )
Asp	Aspartat
BAK	BCL-2 homologer Antagonist/Killer ( <i>engl.: BCL-2 homologous antagonist/killer</i> )
BaP	Benzo[ $\alpha$ ]pyren
BAX	BCL-2-assoziiertes X-Protein ( <i>engl.: BCL-2-associated X protein</i> )
BCL-2	B-Zell-Lymphom 2 ( <i>engl. B-cell lymphoma 2</i> )
BH3	BCL-2-Homologie-Domäne
BSA	Rinder-Serumalbumin ( <i>engl.: bovine serum albumine</i> )
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	Calciumchlorid-Dihydrat
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DAB	Diaminobenzidin
DD	Todesdomäne ( <i>engl.: death domain</i> )
DED	Todeseffektordomäne ( <i>engl.: death effector domain</i> )
DIABLO	Direkt IAP-bindendes Protein mit niedrigem pI ( <i>engl.: direct IAP-binding protein with low pI</i> )
DISC	Totinduzierender Signalkomplex ( <i>engl.: death-inducing signaling complex</i> )
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA-PKcs	Katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase ( <i>engl.: DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit</i> )
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS) ( <i>engl.: desoxyribonucleic acid</i> )

## Abkürzungsverzeichnis

DR.....	Todesrezeptor ( <i>engl.: death receptor</i> )
ER.....	Endoplasmatisches Retikulum
EZM.....	Extrazellulärmatrix
FADD.....	Fas-assoziierte Todesdomäne ( <i>engl.: Fas-associated death domain</i> )
FasL.....	Fas-Ligand
FasR.....	Fas-Rezeptor
FLIP.....	FADD-ähnliches ICE-Inhibitionsprotein ( <i>engl.: FADD-like ICE inhibitory protein</i> )
GF-R.....	Wachstumsfaktor-Rezeptor ( <i>engl.: growth factor receptor</i> )
GF.....	Wachstumsfaktor ( <i>engl.: growth factor</i> )
GSH.....	Gluthation
GSSG.....	Glutathion-Disulfid
H <sup>+</sup> .....	Proton
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	Wasserstoffperoxid
H <sub>2</sub> O.....	Wasser
HCl.....	Salzsäure
Hepa1c1c7.....	Murine Hepatomzelllinie
HMW.....	Hochmolekulargewichtig ( <i>engl.: high molecular weight</i> )
HO <sub>2</sub> .....	Hydroperoxy-Radikal
IAP.....	Apoptoseinhibierendes Protein ( <i>engl.: inhibitor of apoptosis protein</i> )
ICE.....	Interleukin-1 $\beta$ -konvertierendes Enzym ( <i>engl.: Interleukin-1<math>\beta</math>-converting enzyme</i> )
KCl.....	Kaliumchlorid
KHK.....	Koronare Herzkrankheit
MDA.....	Malondialdehyd
MgCl <sub>2</sub> · 6 H <sub>2</sub> O.....	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
MHC.....	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>engl.: major histocompatibility complex</i> )
MOMP.....	Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran ( <i>engl.: mitochondrial outer membrane permeabilization</i> )
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2 H <sub>2</sub> O.....	Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat
NaCl.....	Natriumchlorid
NAD(P)H.....	Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O.....	Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat
NaHCO <sub>3</sub> .....	Natriumhydrogencarbonat

## Abkürzungsverzeichnis

NaOH.....	Natronlauge
NH <sub>4</sub> Cl.....	Ammoniumchlorid
NiSO <sub>4</sub> · 6 H <sub>2</sub> O.....	Nickel-(II)-sulfat-Hexahydrat
NO·.....	Stickstoffmonoxid
NOS.....	NO-Synthase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	Superoxid-Anion-Radikal
O <sub>2</sub> .....	Molekularer Sauerstoff
OH·.....	Hydroxy-Radikal
ONOO <sup>-</sup> .....	Peroxyinitrit
<i>p</i> .....	Signifikanzwert
PAK.....	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PARP.....	Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
Pb.....	Chem. Symbol für Blei
PBS.....	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>engl.: phosphate buffered saline</i> )
PFA.....	Paraformaldehyd
PGF.....	Prostaglandin F
PKCδ.....	Proteinkinase Cδ
PTP-Protein.....	Permeabilitäts Durchgangspore ( <i>engl.: permeability transition pore</i> )
Rb.....	Retinoblastomprotein
RNS.....	Reaktive Stickstoffspezies ( <i>engl.: reactive nitrogen species</i> )
ROS.....	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>engl.: reactive oxygen species</i> )
Ser.....	Serin
sGC.....	Lösliche Guanylylzyklase ( <i>engl.: soluble guanylyl cyclase</i> )
Smac.....	Zweiter mitochondrialer Caspaseaktivator ( <i>engl.: second mitochondria-derived activator of caspases</i> )
SOD.....	Superoxiddismutase
Str.....	Stratum
TBS.....	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>engl.: tris-buffered saline</i> )
TNF-R.....	Tumornekrosefaktor-Rezeptor
TNF.....	Tumornekrosefaktor
Xaa.....	Nicht spezifizierte Aminosäure



# 1 Einleitung

## 1.1 Die menschliche Mundschleimhaut

### 1.1.1 Anatomie

Die menschliche Mundhöhle (Cavitas oris) wird anatomisch in drei Bezirke unterteilt: das Vestibulum oris, welches durch die Alveolarfortsätze von Ober- und Unterkiefer sowie durch die Zahnreihen von der Cavitas oris propria, der Mundhöhle im engeren Sinne, abgegrenzt wird. Zum Rachen hin schließt sich der durch die Schlundbögen gebildete Isthmus faucium an [Benninghoff und Drenckhahn (2003)].

Die Mundschleimhaut, welche die Mundhöhle auskleidet, besteht aus mehrschichtigem Plattenepithel, welches je nach Region unterschiedliche Verhornungsgrade aufweist. Im hinteren Zungendrittel entstammt sie dem Endoderm, ansonsten ist sie ektodermaler Herkunft und zeigt somit einen der menschlichen Haut ähnlichen, typisch epithelialen Aufbau mit insgesamt allerdings geringerer Verhornungstendenz [Bork et al. (1993)]. Aufgrund struktureller Eigenschaften, welche eng mit der jeweiligen Funktion korrelieren, lassen sich drei unterschiedliche Formen von Mundschleimhaut abgrenzen:

1. Mastikatorische Schleimhaut, die beim Kauen besonderen mechanischen Belastungen ausgesetzt ist und daher ein verhorntes Epithel aufweist. Sie findet sich im Bereich des Zahnfleisches und des harten Gaumens, wo sie der Unterlage jeweils ohne zwischengeschaltetes Bindegewebe fest anhaftet.
2. Auskleidende Schleimhaut bestehend aus unverhorntem Plattenepithel und Submukosa mit Drüsen, die neben Lippen und Wangen auch Mundboden, weichen Gaumen und Zunge bedeckt.
3. Spezialisierte Schleimhaut auf dem Zungenrücken, die mit den Papillen die Geschmackswahrnehmung vermittelt [Lüllmann-Rauch (2003); Mackenzie und Binnie (1983)].

Von der Basalmembran ausgehend unterscheidet man im Bereich der orthokeratinisierten, mastikatorischen Schleimhaut die folgenden vier Schichten:

## 1 Einleitung

1. Das Stratum basale mit seinen einschichtigen, kubischen oder zylindrischen Zellen mit einer großen Kern/Plasma-Relation.
2. Das Stratum spinosum bestehend aus mehreren Schichten polygonaler Zellen, welche lichtmikroskopisch durch ihre zahlreichen Zell-Zell-Kontakte ein stacheliges Aussehen besitzen.
3. Das Stratum granulosum, welches vor allem in verhornten Bereichen vorkommt, zeichnet sich durch basophile, keratohyaline Granula aus. Die Zellen zeigen bereits eine erkennbare Abflachung.
4. Im Bereich von verhornter Schleimhaut schließt sich das Stratum corneum mit avitalen, kernlosen Zellen an.

Die Zellschichten des Stratum basale und Stratum spinosum werden auch als Stratum germinativum bezeichnet. Von hier geht die Erneuerung des Epithels aus, indem aus Stammzellen neue Epithelzellen entstehen, welche dann einem Differenzierungsprozess unterliegend in Richtung Oberfläche aufsteigen [Avery (2002)].

Im Bereich von unverhornter Schleimhaut finden sich keine Strata granulosa et cornea. Hier zeigen die Zellen zur Oberfläche hin zwar eine zunehmend schuppige Abflachung, behalten jedoch immer ihren Zellkern und verhornen nicht, sie lagern also keine Keratinfilamente ein. An die Schichten des Stratum germinativum schließen sich hier ein Stratum intermedium und Stratum superficiale an. Unverhorntes Plattenepithel findet sich im Bereich der auskleidenden Schleimhäute [Avery (2002)].

Im Bereich der Mundschleimhaut unterscheidet man ferner ein parakeratinisiertes, mehrschichtiges Plattenepithel, welches Eigenschaften von unverhorntem und orthokeratinisiertem Epithel besitzt. Das Stratum corneum ist hier nur gering ausgeprägt und die oberflächlichen Zellen sind weiterhin kernhaltig, ähneln aber ansonsten den übrigen Hornzellen. Diese Epithelform findet sich besonders im Bereich der Gingiva. [Lüllmann-Rauch (2003)].

Unter Gingiva versteht man den Anteil der Mundschleimhaut, welcher den Zahnhals und den apikalen Alveolarknochen umgibt und im Bereich der mukogingivalen Junktion in Mundschleimhaut übergeht.

Im Bereich der Lippen geht die unverhornte Mundschleimhaut, mit von innen nach außen zunehmender Keratinisierung, in die verhornte Haut des Gesichtes über. Im Bereich des Rachens schließt sich die Schleimhaut des Verdauungstraktes an.

Neben Keratinozyten finden sich im Bereich der Mundschleimhaut noch weitere intraepithelial gelegene Zellen. Dies sind vor allem Langerhans-Zellen, Merkel-Zellen, Melanozyten und Lymphozyten. Deren Bedeutung ist in 1.1.2 näher erläutert.

### 1.1.2 Physiologie

Die Organe der Mundhöhle sind vor allem an der Nahrungsaufnahme und Schluckfunktion, sowie der Sprechfunktion beteiligt. In diesem Rahmen nimmt die Mundschleimhaut in erster Linie eine Barrierefunktion wahr. Hierbei handelt es sich zum größten Teil um eine mechanische Funktion, welche durch Zell-Zell- und Zell-EZM-Verbindungen ausgeführt wird. Neben der Barrierefunktion von außen nach innen, welche die Passage von Mikroorganismen oder toxischen Produkten verhindern soll, besteht zugleich auch eine Barriere in umgekehrter Richtung, um den Verlust von Flüssigkeit und Elektrolyten zu begrenzen. Diese Barriere ist jedoch keineswegs absolut und es besteht die Möglichkeit zur resorptiven Aufnahme bestimmter Substanzen über die Mundschleimhaut. Diese Permeabilität, zum Beispiel für Medikamente, kann im Rahmen einer Pharmakotherapie genutzt werden. Auffällig ist, dass sich im Bereich der Mundschleimhaut eine im Vergleich zur Haut größere Ausziehung der Reteleisten mit vermehrter Kontaktfläche zwischen Epithel und Submukosa findet. Dies ermöglicht eine bessere Haftung der Schleimhaut am Subepithel und stellt eine Anpassung an die teils hohen Kräfte im Rahmen des Kau- und Schluckvorgangs dar.

Die bereits erwähnte mechanische Barriere wird weiterhin durch eine immunologische Abwehrfunktion verstärkt. Hierbei spielen sowohl Speichelbestandteile als auch intraepitheliale Lymphozyten und dendritische Zellen eine entscheidende Rolle. Die dendritischen Langerhanszellen, welche zumeist suprabasal gelegen sind, stellen hierbei die periphersten Außenposten des Immunsystems dar. Da sich auch in gesunder Mundschleimhaut, trotz Fehlen von intraluminalen Antigenen oder pathologischen Veränderungen, intraepitheliale Lymphozyten finden, könnte dies Ausdruck einer lokalen, sekundär lymphatischen Funktion ähnlich der Darmmukosa sein [Mackenzie und Binnie (1983)].

Die Vermittlung von Geschmackswahrnehmungen ist eine besondere Aufgabe der spezialisierten Schleimhaut und der Papillen im Bereich der Zunge.

Die Speichelproduktion ist von großer Bedeutung, da Speichel neben Abwehrfunktionen auch einen Schutz vor Austrocknung bietet. Die Mundschleimhaut ist hierzu mit zahlreichen Ausführungsgängen der Speicheldrüsen durchzogen [Avery (2002)].

### 1.1.3 Ausgewählte Schädigungsmuster und Erkrankungen der oralen Mukosa

Im folgenden sollen häufige Schädigungen und Erkrankungen der Mundschleimhaut beschrieben werden, für die ein Zusammenhang mit exogenen Einflüssen und Noxen gesichert ist.

### **Leukoplakie**

Bei der Leukoplakie handelt es sich um eine fakultative oder obligate Präkanzerose, welche klinisch als eine weiße, nicht abwischbare Makula der Schleimhaut imponiert und keiner anderen Erkrankung zugeordnet werden kann. Als Ursachen werden Alkohol, Nikotin oder mechanische Irritationen angenommen. Histologisch zeigt sich eine Hyper- oder Dyskeratose des Epithels. Eine histologische Aufarbeitung zum Ausschluß einer bereits erfolgten malignen Transformation ist anzustreben.

Zu den obligaten Präkanzerosen gehört vor allem das Carcinoma in situ, welches die Basalmembran noch nicht durchdrungen hat, aber bereits Zeichen einer malignen Zellveränderung zeigt [Berchtold et al. (2008)].

### **Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle**

Das Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle tritt bevorzugt an Zunge, Lippen und Mundboden auf. Ätiologisch spielen exogene Noxen, insbesondere Nikotin und Alkohol, sowie mechanische Irritationen (schlecht sitzende Prothesen) oder mangelnde Mundhygiene eine Rolle. Bevorzugt betroffen sind Männer zwischen 50 und 70 Jahren. Klinisch imponiert der Tumor als exo- oder endophytisch wachsende Läsion, bei fortgeschrittenem Wachstum können zudem Funktionsstörungen der Zungenmotilität oder Mundöffnung auftreten. Die Metastasierung erfolgt per continuitatem und lymphogen, bevorzugt in die regionären, submentalen oder submandibulären Lymphknoten. Aufgrund der gemeinsamen Ätiologie treten Zweittumoren im Mund- oder Rachenbereich sowie in der Speiseröhre gehäuft auf. Therapieoptionen sind neben der Radikaloperation, meist in Kombination mit einer Neck-Dissection, vor allem die Radiochemotherapie [Berchtold et al. (2008); Bühling et al. (2004)].

## **1.2 Schwermetalle**

Der Begriff Schwermetalle ist, obwohl er häufig verwendet wird, bis heute nicht eindeutig definiert. Laut Brockhaus-Enzyklopädie (1992) handelt es sich hierbei um Metalle mit einer Dichte  $\geq 3,5 - 5,0 \text{ g/cm}^3$ . Dazu gehören einerseits für den Menschen essentielle Spurenelemente (z. B. Eisen, Kupfer und Zink), andererseits aber auch toxische Vertreter wie Blei, Cadmium und Quecksilber. Insgesamt sind die verschiedenen Definitionen allerdings nicht einheitlich, wobei die genannte Toxizität der hiermit beschriebenen Metalle aber ein häufig genanntes Kriterium darstellt [Duffus (2002)]. Diese Arbeit behandelt vor allem den Einfluss von Blei, einem klassischen Vertreter der toxischen Schwermetalle.

### 1.2.1 Blei

Blei ist das chemische Element (Symbol: Pb), welches im Periodensystem an Position 82 steht. Es gehört zu den Metallen und wird typischerweise zu den Schwermetallen gerechnet. Blei kommt als natürlicher Bestandteil der Erdkruste vor.

#### Vorkommen und Bleiverbindungen

Neben dem natürlichen Vorkommen in der Erdkruste kommt Blei heutzutage in vielen Verbindungen mit verschiedensten Verwendungszwecken vor. Hierzu zählen die Verarbeitung in Wasserrohren, Wandfarben, Kraftstoffen, Glasuren von Töpferwaren, Batterien und Akkumulatoren, sowie die metallverarbeitende Industrie. Hohe Konzentrationen finden sich weiterhin im räumlichen Umfeld von Bleiminen. Aufgrund der bekannten toxischen Eigenschaften ist die Verwendung von Blei in vielen Ländern inzwischen reguliert oder verboten. Im Zuge der Umstellung auf bleifreie Kraftstoffe ist es zu einer deutlichen Reduktion der Blei-Level im Blut von Kindern in den U.S.A. gekommen. Insbesondere aus Kraftstoffen freigewordene Bleialkyle zeigen eine gute transdermale Resorption. Auch heute noch kommt Bleitetraethyl mit einer ebenfalls guten transdermalen Aufnahme in Flugbenzinen vor. Zu den Verbindungen des Bleis gehört auch das Blei-II-Acetat (oft auch Bleizucker genannt), welches beispielsweise in Haarfärbemitteln benutzt wird [IARC (2006); Aktories et al. (2009); Cohen und Roe (1991); Patrick (2006a); DGUV (2009)].

### 1.2.2 Blei und seine Auswirkungen auf den menschlichen Organismus

Die Aufnahme in den menschlichen Körper erfolgt vor allem durch Inhalation oder Ingestion, wobei organische Bleiverbindungen auch über die Haut aufgenommen werden können. Blei wird im Gastrointestinaltrakt eher schlecht resorbiert, während die inhalative Aufnahme mit höheren Resorptionsquoten einhergeht. Ausnahmen bilden hierbei Kinder, bei denen die intestinale Resorptionsquote deutlich höher liegt. Die Hauptangriffspunkte im menschlichen Körper sind neben dem erythrozytären System vor allem die glatte Muskulatur, das motorische Nervensystem und die Nieren. Man unterscheidet eine akute Bleivergiftung ohne erhöhte Bleidepots von einer chronischen Bleivergiftung, bei der es meist zu einer beständigen Aufnahme geringer Bleimengen mit der Folge einer Depotbildung und Ablagerung im Skelettsystem kommt. Die typischen Symptome einer chronischen Bleiintoxikation sind Anämie und eventuell Lähmungen („Bleilähmungen“). Die akute Intoxikation führt dagegen eher zu Koliken („Bleikoliken“) und vor allem im Kindesalter auch zu

## 1 Einleitung

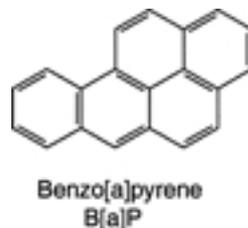
enzephalopathischen Erscheinungen, welche in bis zu 1/3 der Fälle tödlich enden. Man vermutet, dass die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies eine zentrale Rolle in der toxischen Blei-Wirkung spielt (s. 1.6). Sowohl für Blei als auch das Blei-II-Acetat werden karzinogene Eigenschaften beschrieben, im Falle des Blei-II-Acetats konnte eine karzinogene Wirkung auch im Tiermodell nachgewiesen werden: es fanden sich vermehrt Nieren- und Hirntumoren im Mausmodell [Aktories et al. (2009); IARC (2006)].

### 1.3 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAK) bestehen aus mehreren, verbundenen, aromatischen Ringsystemen und entstehen meist durch die unvollständige Verbrennung von organischem Material oder durch die Pyrolyse von Kohlenhydraten oder Aminosäuren [Aktories et al. (2009)]. Wichtige Belastungen für den Menschen entstehen vor allem durch berufliche Exposition (Straßenbau), Aufnahme mit der Nahrung oder beim Tabakrauchen. Durch das Vorkommen in der Umgebungsluft kommt es zudem zu einer kontinuierlichen Belastung einer großen Anzahl von Menschen. Wie von Baek et al. (1991) beschrieben, stammte 1981 in den USA ca. 1/5 bis 1/4 der atmosphärischen PAK-Belastung aus der Verbrennung von Kraftstoffen in Autos und anderen Kraftfahrzeugen. Neben dem kanzerogenen Benzo[ $\alpha$ ]pyren gehören unter anderem auch Antracen und Fluoren zu den PAK [IARC (1983)].

#### 1.3.1 Benzo[ $\alpha$ ]pyren

Benzo[ $\alpha$ ]pyren (Struktur s. Abbildung 1.1) ist ein pentazyklischer, aromatischer Kohlenwasserstoff und gilt als Leitsubstanz der PAK. Es kommt vor allem in Zigarettenrauch, Autoabgasen oder gegrillten Nahrungsmitteln vor [Zeeck et al. (2003)], so dass die Hauptaufnahmewege Inhalation und Ingestion sind.



**Abbildung 1.1:** Chemische Struktur von Benzo[ $\alpha$ ]pyren (modifiziert nach Solhaug et al. (2004)).

### 1.3.2 Benzo[ $\alpha$ ]pyren und seine Auswirkungen auf den menschlichen Organismus

Neben den oben beschriebenen Hauptaufnahmewegen ist aufgrund der organischen Struktur und lipophilen Eigenschaft auch eine transdermale Aufnahme möglich. Aus Tierexperimenten ist über Benzo[ $\alpha$ ]pyren eine karzinogene Wirkung bekannt. Ebenso wirkt es embryotoxisch und teratogen. Nach metabolischer Aktivierung des Prokarzinogens zu einem reaktiven Elektrophil, insbesondere dem Diolepoxid (Benzo[ $\alpha$ ]pyren-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxid), kommt es zur kovalenten Bindung an die DNA und somit zur Schädigung der Zelle. Es resultieren Mutationen und Chromosomenveränderungen. Die kanzerogene Wirkung von Benzo[ $\alpha$ ]pyren konnte unter anderem für die Entstehung von Bronchialkarzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle bewiesen werden. Metabolisierungsprodukten der PAK, die keine DNA-Addukte bilden, fehlen diese schädigenden Eigenschaften und sind daher nicht kanzerogen [Aktories et al. (2009); IARC (1983)].

## 1.4 Das Apoptose-System

### 1.4.1 Überblick

Apoptose, der programmierte Zelltod, ist essentieller Bestandteil der Entwicklung und Aufrechterhaltung multizellulärer Organismen wie dem menschlichen Körper. Diese kontrollierte Form des Zelluntergangs, welche für die normale Entwicklung und Einhaltung der Homöostase unabdingbar ist, stellt gewissermaßen das Gegenstück zum unkontrollierten Zelltod, der Nekrose, dar [Zimmermann und Green (2001)].

Apoptose spielt eine wichtige Rolle, um nicht mehr benötigte, gealterte, potentiell gefährliche oder zu stark beschädigte Zellen zu beseitigen. Physiologische Prozesse, während derer Apoptose auftritt, sind die Embryogenese, die hormonabhängige Gewebeinvolution oder die Immunzellentwicklung. Weiterhin tritt Apoptose aber auch im Rahmen pathologischer Veränderungen auf. Hierzu zählen irreparable DNA-Schäden, die Akkumulation falsch gefalteter Proteine oder virale Infektionen [Kumar et al. (2004)]. Ein dysreguliertes Auftreten von Apoptose spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Tumoren, Autoimmunerkrankungen oder der Genese neurodegenerativer Erkrankungen [Cohen (1997)].

Apoptotische Zellen zeichnen sich durch eine bestimmte Abfolge morphologischer und biochemischer Veränderungen aus, die bereits auf ein festes, zugrundeliegendes Zelltodprogramm hindeuten. Morphologisch erfolgt zunächst die Separation aus dem Zellverband und die anschließende Kondensation von nukleärem und zytoplasmati-

## 1 Einleitung

schem Material. Es folgt die Fragmentation dieses Materials in unterschiedlich große, membranumhüllte Partikel („apoptotic bodies“) und hierauf deren Phagozytose durch umliegende Zellen oder spezialisierte Phagozyten [Wyllie et al. (1980)]. Dieser Prozess läuft für gewöhnlich ohne inflammatorische Begleitreaktion ab. Biochemisch stehen vor allem die Fragmentation der DNA, der proteolytische Abbau intrazellulärer Substrate und die Veränderung der Plasmamembran im Vordergrund. Die Plasmamembran bleibt während dieses Prozesses zwar weitestgehend intakt, so dass eine Entzündungsreaktion vermieden wird, Membranveränderungen führen jedoch zu einer vermehrten Phagozytose der abgeschnürten, membranumhüllten Partikel [Kumar et al. (2004)]. Die zentrale Rolle in der Ausführung dieser Prozesse kommt einer Gruppe von Cysteinproteasen, den Caspasen, zu (s. 1.4.3). Die Aktivierung der Caspasen ist das gemeinsame Endstück zweier unterschiedlicher Signalwege (s. Abbildung 1.2), welche beide für sich in der Lage sind eine apoptotische Reaktion auszulösen [Zimmermann und Green (2001)]:

1. Der extrinsische Weg über einen Todesrezeptor.
2. Der intrinsische Weg, ausgelöst in den Mitochondrien [Hengartner (2000)].

### 1.4.2 Aktivierung der Apoptose

Die Apoptose und damit insbesondere die Aktivität der Caspasen wird hauptsächlich über zwei Signalwege aktiviert. Einerseits über den extrinsischen Weg, welcher mit der Aktivierung eines Todesrezeptors beginnt und andererseits über den intrinsischen Weg, welcher seinen Ursprung in den Mitochondrien hat. Neben diesen beiden Aktivierungswegen existieren weitere Möglichkeiten zur Aktivierung des Apoptosegeschehens, wie ein durch das Endoplasmatische Retikulum ausgelöster Aktivierungsweg oder der Granzyme-B-vermittelte Weg [Chowdhury et al. (2008)].

#### Der Aktivierungsweg über den „Todesrezeptor“

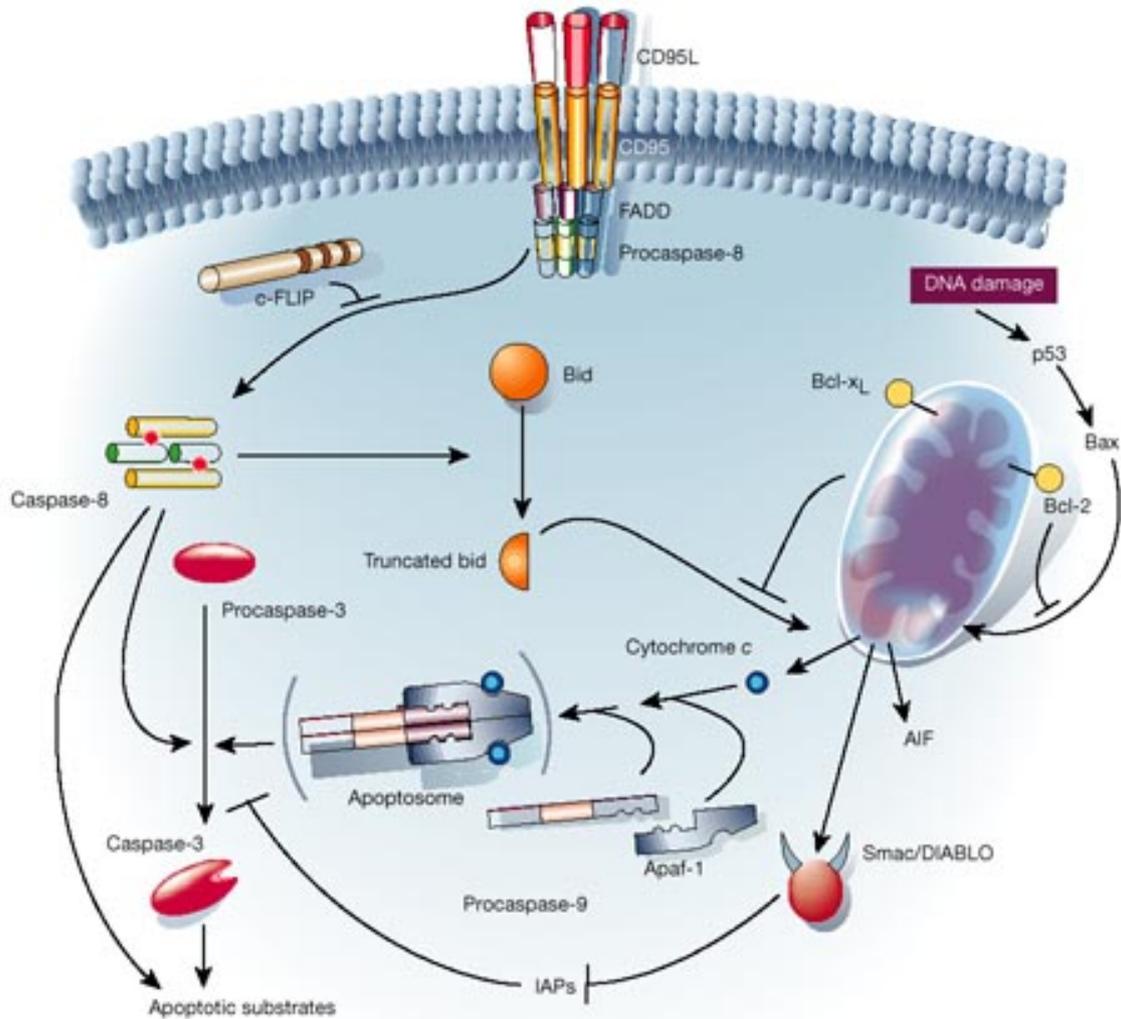
Die Todesrezeptoren gehören zu den Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-R), einer Familie von transmembranösen Proteinen, die pro-apoptische Signale vom Zelläußeren in das Zellinnere übersetzen. Zu der TNF-R-Familie gehören aktuell sechs verschiedene Rezeptoren: TNF-R1, Fas, DR3<sup>1</sup>, DR4, DR5 und DR6. Ihnen gemeinsam ist eine extrazelluläre Domäne für die Bindung der entsprechenden Liganden, eine transmembranöse Domäne und eine intrazelluläre Todesdomäne (DD<sup>2</sup>).

---

<sup>1</sup>DR = Death receptor

<sup>2</sup>DD = Death domain

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.2:** Übersicht über die zwei Hauptaktivierungswege der Apoptose, den extrinsischen und den intrinsischen Weg [Hengartner (2000)].

Die Liganden gehören zu der Familie der Tumornekrosefaktoren und bilden eine Gruppe verwandter Zytokine, welche vor allem auto- oder parakrine Wirkungen erzielen [Rossi und Gaidano (2003)].

Im Folgenden soll der sich anschließende Signalweg anhand des Fas-Rezeptors (FasR) dargestellt werden (s. a. Abbildung 1.2):

Nach der extrazellulären Bindung des Fas-Liganden (FasL) kommt es zur Homotrimerbildung des Fas-Rezeptors mit daraus resultierender Aktivierung [Hengartner (2000)]. Dies führt zu einer intrazellulären Rekrutierung von Adapterproteinen, im Falle des Fas-Rezeptors wird das FADD-Protein<sup>3</sup> über seine eigene Todesdomäne (DD) an die des Rezeptors gekoppelt. Über einen weiteren Proteinab-

<sup>3</sup>FADD = Fas-associated death domain protein

## 1 Einleitung

schnitt (DED<sup>4</sup>) des FADD-Proteins wird Procaspase-8 rekrutiert. Der so entstandene Tod-induzierende Signalkomplex (DISC<sup>5</sup>) besteht nun aus aktiviertem FasR, FADD und Caspase-8 [Scaffidi et al. (1998)]. Die Aktivierung von Procaspase-8 zu aktiver Caspase-8 scheint dann durch eine gegenseitige Cross- oder Auto-Aktivierung mehrerer im DISC nahe beieinander liegender Procaspasen-8 zu geschehen [Hengartner (2000); Muzio et al. (1998)]. Caspase-8 setzt nun die Kaskade von Effektor-Caspasen (s. Tabelle 1.1) in Gang.

### Der intrinsische Aktivierungsweg

Verschiedene Stimuli führen zu einer Translokation von Cytochrom C aus dem Mitochondrieninneren ins Cytosol. Typische Stimuli, die diesen Weg auslösen sind DNA-Schäden, oxidativer oder zytotoxischer Stress, aber auch das Fehlen von Wachstumsfaktoren und Überlebensstimuli [Chowdhury et al. (2008); Rossi und Gaidano (2003)]. Die Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Stimuli steht unter strenger Kontrolle der BCL2-Proteinfamilie (s. 1.4.5). Ins Cytosol gelangtes Cytochrom C ist hierbei der wichtigste Induktor der Apoptose, benötigt zur Apoptoseaktivierung jedoch noch die Interaktion mit Apaf-1<sup>6</sup>. Cytochrom C und Apaf-1 sind neben Procaspase-9 die wichtigsten Bestandteile des Apoptosoms, eines hochmolekularen Komplexes, welcher für die Aktivierung von Procaspase-9 entscheidende Bedeutung besitzt [Ledgerwood und Morison (2009)]. Nun schließt sich wie beim extrinsischen Weg die Aktivierung der Effektorcaspasen, insbesondere Caspase-3, an. Neben Cytochrom C können weitere pro-apoptotische Substanzen aus den Mitochondrien ins Cytosol freigesetzt werden. Hierzu gehören das Smac/DIABLO-Protein<sup>7</sup>, welches das IAP-Protein<sup>8</sup> (1.4.5) blockiert, sowie das AIF-Protein und die Procaspasen-2, -3 und -9 [Loeffler und Kroemer (2000)].

### Weitere Möglichkeiten der Aktivierung

Weiterhin besteht die Möglichkeit, Apoptose über einen ER-abhängigen Weg zu initiieren. Hierzu kann es im Rahmen von Proteinfaltungfehlern („protein missfolding“) kommen. Eine weitere Möglichkeit bietet der Granzyme B-vermittelte Aktivierungsweg, an dem vor allem zytotoxische T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen beteiligt sind. Nach der Ausschüttung von Granzyme B kann dieses aufgrund seiner

---

<sup>4</sup>DED = Death effector domaine

<sup>5</sup>DISC = Death-inducing signaling complex

<sup>6</sup>Apaf-1 = Apoptotic protease-activating factor-1

<sup>7</sup>Smac = second mitochondria-derived activator of caspases, DIABLO = direct IAP-binding protein with low pI

<sup>8</sup>IAP = Inhibitor-of-apoptosis

proteolytischen Aktivität Procaspasen in der Zielzelle spalten und aktivieren [Afonina et al. (2010); Malhotra und Kaufman (2007)].

### 1.4.3 Die Familie der Caspasen

Caspasen sind während der Evolution hoch konservierte Proteasen, welche in ihrem aktiven Zentrum einen Cystein-Rest tragen und in ihren Substraten eine hohe Spaltungsspezifität nach Aspartat aufweisen [Alnemri et al. (1996)]. Alle Caspasen liegen innerhalb der Zelle zunächst als inaktive Procaspasen vor, die durch proteolytische Prozesse in die aktiven Formen überführt werden. Die inaktive Proform besteht aus einer N-terminalen Prodomain und zwei Subunits (p10 und p20), die teilweise durch eine kurze Aminosäuresequenz getrennt sind. Zur Aktivierung ist die Spaltung an spezifischen Aspartatresten notwendig, um so die Spaltprodukte, welche sich zu der aktiven, tetramerischen Form zusammenlegen, zu generieren [Cohen (1997)]. Die als Spaltprodukte entstandenen Subunits p20 und p10 bilden Heterodimere, wovon sich jeweils zwei durch hydrophobische Kräfte zu enzymatisch aktiven Heterotetrameren zusammenlagern [Chowdhury et al. (2008)]. Wie bereits in 1.4.2 beschrieben, sind Caspasen in der Lage weitere Caspasen zu aktivieren. Dies ist, wenn man die Aspartatspezifität der Caspasen und die Spaltung der Procaspasen an zwei Aspartatresten berücksichtigt, nicht verwunderlich.

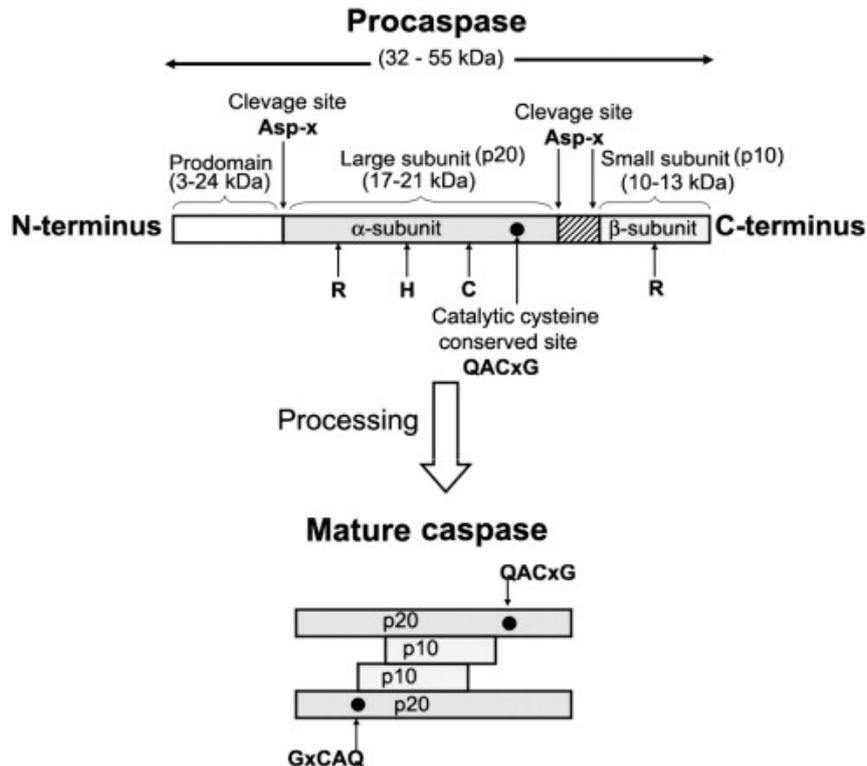
Nach ihrem „Aufgabengebiet“ teilt man die Caspasen in zwei Gruppen ein: zum einen die inflammatorischen Caspasen und zum anderen die apoptotischen Caspasen, welche sich wiederum in Initiator- und Effektor-Caspasen unterteilen lassen [Chowdhury et al. (2008)]. Die Aktivierung der apoptotischen Caspasen ist das zentrale Element des programmierten Zelltodes. Die Initiatorcaspasen zeichnen sich dabei durch zwei Details aus: einerseits können Sie über ihre DED an den DISC gebunden und aktiviert werden, andererseits können sie im Anschluss an ihre Aktivierung die Effektorcaspasen durch proteolytische Spaltung aktivieren. Den Effektorcaspasen fehlt die DED und sie sind somit zur eigenen Aktivierung in hohem Maße auf die Initiatorcaspasen angewiesen. Einmal aktiviert, haben sie jedoch die Fähigkeit zur Degradation zellulärer Strukturen, wie für Caspase-3 in Tabelle 1.2 aufgeführt [Rossi und Gaidano (2003)].

Initiator-Caspasen	Effektor-Caspasen
Caspase-2	Caspase-3
Caspase-8	Caspase-6
Caspase-9	Caspase-7
Caspase-10	

**Tabelle 1.1:** Einteilung der Caspasen nach ihrem Aufgabengebiet [Nuez et al. (1998)].

Es konnte gezeigt werden, dass auch die apoptotischen Caspasen zusätzlich nicht-

## 1 Einleitung



**Abbildung 1.3:** Typischer struktureller Aufbau der Procaspasen und fertig prozessierten Caspasen [Chowdhury et al. (2008)].

apoptotische Aufgaben erfüllen. Hierbei unterscheidet man zwischen proteolytischen und nicht-proteolytischen Funktionen, welche durch verschiedene Prodomänen vermittelt werden. Neben der selektiven Spaltung einzelner Substrate wirken sie mit bei der Zelldifferenzierung, -proliferation und -migration oder der Interleukinproduktion im Rahmen von immunologischen Aufgaben [Chowdhury et al. (2008)].

### 1.4.4 Caspase-3

Aktivierte Caspase-3<sup>9</sup> ist die wichtigste Effektorcaspase im Rahmen des Apoptosevorgangs und spaltet einen Großteil wichtiger Zellproteine. Caspase-3 gehört zur Subfamilie der CED-3-<sup>10</sup>, bzw. ICE-Caspasen<sup>11</sup>. Im Genom des Nematoden *Caenorhabditis elegans* wurde erstmals das für die Apoptose essentielle Gen *ced-3* identifiziert, welches große Homologien zum Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-converting enzyme der Säugetiere aufweist. Bei dem ICE handelt es sich um eine Cysteinprotease mit hoher Spaltungsspezifität an Aspartatresten. Basierend hierauf konnte Caspase-3 als

<sup>9</sup>Weitere Bezeichnungen sind: CPP32, Apopain und Yama (der hinduistische Gott des Todes) [Cohen (1997)]

<sup>10</sup>*ced-3*-Gen: *Caenorhabditis elegans* death gen

<sup>11</sup>ICE: Interleukin-1 $\beta$ -converting enzyme

## 1 Einleitung

wichtiger Bestandteil der menschlichen Apoptose identifiziert werden [Nicholson et al. (1995); Tewari et al. (1995)]. Caspase-3 wird aus einem Proenzym mittels Spaltung durch Caspase-8 oder -9 aktiviert [Kumar (2007)], wobei das Proenzym die typische Struktur der anderen Caspasen aufweist (s. Abbildung 1.3). Die aktivierte Enzymform zeigt eine sehr hohe Spaltungsselektivität an einer Asp-Xaa-Xaa-Asp-Sequenz [Cohen (1997)]. Diese Sequenz findet sich auch im PARP<sup>12</sup>-Protein, welches an der DNA-Reparatur vor allem nach umweltbedingtem Stress beteiligt ist. Dieses Enzym ist eines der wichtigsten Spaltprodukte aktivierter Caspase-3 [Nicholson et al. (1995)]. Neben der DNA-Reparatur sind im Rahmen des Apoptosegeschehens weitere Substrate der Caspase-3 zum Beispiel an der Zellzyklusregulation beteiligt (s. Tabelle 1.2).

Substrat	Funktion
Procaspase-6, -7, -9	Apoptose
PARP	DNA-Reparaturenzym
DNA-PKcs	Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen
Rb	Zellzyklusregulation
PKC $\delta$	Durch Caspase-3 aktiviert
Laminine	Bestandteile der Basallaminae
Topoisomerase I	DNA-Verdrillung

**Tabelle 1.2:** Substrate von aktiver Caspase-3 und deren Bedeutung im Rahmen des programmierten Zelltodes [Chowdhury et al. (2008); Cohen (1997)].

### 1.4.5 Regulatoren und Inhibitoren der Apoptose und Caspasen

Neben den beschriebenen Wegen zur Aktivierung der Apoptose und Caspasen existieren eine Vielzahl von Regulations- und Inhibitionsmechanismen, welche auf verschiedenen Ebenen in die Apoptosereaktion eingreifen.

#### **IAP = Inhibitor of apoptosis protein**

Die Gruppe der IAPs kann über verschiedene Subdomänen an die Caspasen-3, -7 und -9 binden und somit deren Aktivierung und Aktivität hemmen. Diese Proteine haben über die Inhibition von Caspase-3 einen entscheidenden Einfluss auf den extrinsischen Weg, indem sie die Kaskade am Übergang von Caspase-8 zu Caspase-3 inhibieren. Der intrinsische Weg wird über die Bindung an Caspase-9 gehemmt. Die

<sup>12</sup>PARP = Poly(ADP-Ribose) Polymerase

## 1 Einleitung

IAPs selbst werden wiederum durch die im Rahmen der Apoptose aus den Mitochondrien freigesetzten, pro-apoptotischen Smac/DIABOLO-Proteine gehemmt [Chowdhury et al. (2008); Hengartner (2000)].

### **FLIP = FADD-like ICE inhibitory protein**

Hierbei handelt es sich einerseits um virales v-FLIP, welches u. a. in Herpesviren nachgewiesen wurde und eine DED besitzt und hiermit FADD binden und inhibieren kann. In virusbefallenen Zellen kann somit die Apoptose unterdrückt werden und eine erhöhte Virsuproduktion und Persistenzrate erreicht werden [Bertin et al. (1997); Thome et al. (1997)]. Weiterhin existiert ein zelluläres c-FLIP, welches ein inaktives Caspase-Homolog mit Caspase-ähnlicher Domäne darstellt und an Proaspase-8 binden und so deren Aktivierung blockieren kann [Chowdhury et al. (2008)].

### **Familie der BCL-2-Proteine**

In dieser Familie unterscheidet man klassischerweise drei verschiedene Gruppen. Einerseits anti-apoptotisch wirkenden Proteine (z. B. BCL-2<sup>13</sup>, BCL-XL<sup>14</sup>), daneben pro-apoptotische Proteinen (z. B. BAX<sup>15</sup>, BAK<sup>16</sup>) und letztlich die BH3-Proteine<sup>17</sup> (z. B. BIM<sup>18</sup>, BIK<sup>19</sup>). BAX und BAK üben ihre pro-apoptotische Wirkung durch ihren Einfluss auf die Mitochondrien aus, indem sie die Freisetzung von Proteinen aus dem intermembranösen Spalt fördern (MOMP<sup>20</sup>). Hierbei kommt es neben der Freisetzung von Cytochrom C auch zur Freisetzung des DIABLO/Smac-Proteins. Weiterhin bewirken BAX und BAK eine Fragmentation der Mitochondrien. BCL-2 seinerseits wirkt hemmend auf die BAX- und BAK-Proteine und kann so deren pro-apoptotische Funktion inhibieren. Der Gruppe der BH3-Proteine scheint eine besondere Rolle im Rahmen des intrinsischen Aktivierungsweges zuzukommen, da sie durch zellschädigende Einflüsse (z. B. UV-Licht, Virusinfektionen, Wachstumsfaktor-Mangel) aktiviert werden. In der aktivierten Form hemmen sie nun BCL-2 und heben so die Inhibition von BAX und BAK auf: es kommt zur Freisetzung von Cytochrom C und Bildung des Apoptosoms [Youle und Strasser (2008)].

---

<sup>13</sup>BCL-2: B-cell lymphoma 2

<sup>14</sup>BCL-XL: B-cell lymphoma-extra large

<sup>15</sup>BAX; BCL-2-associated X protein

<sup>16</sup>BAK: Bcl-2 homologous antagonist/killer

<sup>17</sup>BH-3: Bcl-2 homology domain 3

<sup>18</sup>BIM: Bcl-2-interacting mediator of cell death

<sup>19</sup>Bcl-2-interacting killer

<sup>20</sup>MOMP = Mitochondrial outer membrane permeabilization

## Weitere Regulationsmöglichkeiten

Alternative Isoformen der aktiven Caspasen können die Caspaseaktivität regulieren, indem sie als Inhibitoren wirken oder inaktive Komplexe mit den Caspasen bilden [Cohen (1997)].

## 1.5 Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen

Unter reaktiven Sauerstoff- und Stickstoffspezies versteht man außerordentlich reaktive und daher für Biomoleküle schädliche Verbindungen. Diese können spontan oder enzymatisch katalysiert entstehen (s. 1.5.1) [Löffler (2003)]. Die Gruppe der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS<sup>21</sup>) umfasst dabei das Superoxid-Anion-Radikal ( $O_2^-$ ), Hydroxyl-Radikal ( $OH^\cdot$ ), Hydroperoxyl-Radikal ( $HO_2^\cdot$ ), sowie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), welches allerdings kein Radikal darstellt. Zu den reaktiven Stickstoffspezies (RNS<sup>22</sup>) zählen vor allem das Radikal Stickstoffmonoxid ( $NO^\cdot$ ) und das nicht-Radikal Peroxynitrit-Anion ( $ONOO^-$ ) [Valko et al. (2007); Dröge (2002)].

### 1.5.1 Physiologie

Die Entstehung von ROS und RNS ist vielfältig und im Rahmen physiologischer Prozesse sinnvoll und sogar notwendig, sie kann aber auch unphysiologischer Herkunft sein und schädliche Auswirkungen haben.

Physiologischerweise entstehen Superoxid-Anionen und Peroxid als unerwünschte, aber unvermeidliche Nebenprodukte der Oxidations- und Reduktionsvorgänge der Atmungskette. Das in der inneren Mitochondrienmembran gelegene Protein Cytochrom C katalysiert hierbei die Übertragung von vier Elektronen auf ein  $O_2$ -Molekül. Dabei entstehen durch Reaktion mit vier Protonen ( $H^+$ ) zwei Moleküle Wasser. In geringem Maße kommt es hierbei allerdings auch zur Übertragung von nur einem oder zwei Elektronen auf  $O_2$ , was zur Entstehung von Superoxid-Anionen, bzw. Peroxid führt [Berg et al. (2003)].

Stickstoffmonoxid ( $NO^\cdot$ ), mit einer Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden, spielt im menschlichen Körper eine wichtige Rolle als Signal- und Überträgerstoff. Es wird vor allem durch die Stickoxid-Synthetase (NOS) aus Arginin synthetisiert. Dieses Enzym kommt in drei Isoformen vor: einer endothelialen (eNOS), einer neuronalen (nNOS) und einer induzierbaren (iNOS) Form, wobei die ersten beiden dauerhaft exprimiert werden. Das produzierte  $NO^\cdot$  aktiviert nun die lösliche Gua-

---

<sup>21</sup>ROS = Reactive oxygen species

<sup>22</sup>RNS = Reactive nitrogen species

## 1 Einleitung

nylatcyclase (sGC) und setzt so die Signalübertragung fort. Im Gefäßsystem führt die NO<sup>•</sup>-Produktion zu einer Muskelrelaxation mit folgender Gefäßweitstellung, aber auch zu einer Modifikation der Thrombozytenadhäsion, während NO<sup>•</sup> im Bereich des Nervensystems als Transmitter zwischen Nervenzellen agiert [Fredstrom (2002); Valko et al. (2007)]. Weitere NO<sup>•</sup>-vermittelte Effekte sind Wachstumsförderung und Angiogenese. Die NO<sup>•</sup>-Produktion durch die induzierbare Isoform (iNOS) ist in den meisten Fällen Teil einer Inflammations- oder Abwehrreaktion. So kann diese Isoform neben zahlreichen Zytokinen auch durch Tumorzellen oder mikrobielle Agenzien induziert werden. Dies kann sowohl in Zellen des Immunsystems, aber auch in Hepatozyten, Endothelzellen, etc. geschehen. Da die NO<sup>•</sup>-Produktion durch iNOS meist länger andauert als durch die nicht-induzierbaren NOS-Formen, treten hierbei häufiger Gewebeschäden und Zelltod als unerwünschte Folge auf [Nathan und Xie (1994)]. Die iNOS ist jedoch nicht zwangsweise mit schädigenden Wirkungen im Organismus assoziiert, sondern kann ebenfalls für physiologische Vorgänge von Bedeutung sein [Kubes (2000)].

Die Bildung von ROS ist weiterhin essentieller Bestandteil der menschlichen Immunabwehr. Phagozytäre Leukozyten, wie Monozyten und neutrophile Granulozyten, sind im Rahmen der mikrobiellen Abwehr zur Bildung von ROS befähigt. Während des sogenannten Respiratory Burst kommt es nach Aktivierung dieser Zellen zu einem stark ansteigenden O<sub>2</sub>-Verbrauch mit Bildung von Superoxid-Anionen, wofür vor allem die NADPH-Oxidase verantwortlich ist. Das gebildete O<sub>2</sub><sup>-</sup> ist selbst noch nicht stark antimikrobiell wirksam, es führt jedoch zur Entstehung anderer ROS mit stärkeren antimikrobiellen Potenzen. Möglicherweise spielen die hier gebildeten Substanzen ebenfalls eine wichtige Rolle für die im Rahmen von Inflammationsreaktionen entstehenden Schäden an umliegenden Geweben, so dass eine strenge Kontrolle des Respiratory Burst und der NADPH-Oxidase wichtig ist [El-Benna et al. (2005); Dahlgren und Karlsson (1999); Robinson (2009)].

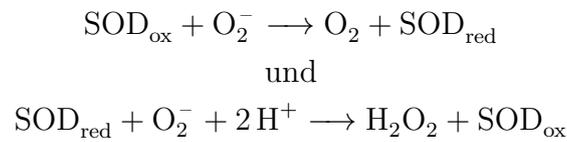
### 1.5.2 Zelluläre Abwehrmechanismen, sowie oxidativer und nitrogener Stress

Da ROS und RNS grundsätzlich auch schädliche Wirkungen entfalten können, sind Abbaumechanismen für die Zellen von großer Bedeutung. Diese Funktion wird in erster Linie von den Enzymen Superoxid-Dismutase, Katalase und Gluthathion-Peroxidase wahrgenommen.

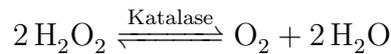
Die Superoxid-Dismutase (SOD) reagiert dabei in ihrer oxidierten Form mit einem Superoxid-Anion unter der Bildung von O<sub>2</sub> und ihrer reduzierten Form. Die reduzierte Form kann nun mit einem weiteren Superoxid-Anion und zwei Protonen

## 1 Einleitung

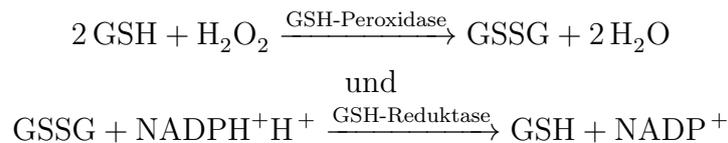
zu Wasserstoffperoxid reagieren und dabei wieder in die oxidierte Form überführt werden.



Das hierbei oder in anderen Prozessen gebildete Wasserstoffperoxid wird nun von der Katalase in molekularen Sauerstoff und Wasser überführt.



Als weiterer Schutzmechanismus steht der Zelle das Glutathion-System zur Verfügung. Glutathion (GSH) kann durch die GSH-Peroxidase unter Verbrauch von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert werden, wobei das Wasserstoffperoxid in zwei Moleküle Wasser entgiftet wird. GSSG wird im Anschluss durch die GSH-Reduktase wieder in GSH überführt.



Sollten die zellulären Ausgleichsmöglichkeiten durch einen übermäßigen Anfall von ROS oder RNS überstiegen werden, kommt es zum oxidativen, bzw. nitrogenen Stress [Berg et al. (2003); Löffler (2003); Patrick (2006b)].

### 1.5.3 Pathologische Bedeutung

Reaktive Sauer- und Stickstoffspezies sind sowohl mit dem Alterungsprozeß als auch mit einer Vielzahl von pathologischen Vorgängen und Erkrankungen assoziiert. Hierzu gehören verschiedenste Tumoren, kardiovaskuläre Erkrankungen, sowie Diabetes mellitus und neurologische Erkrankungen. ROS und RNS führen zur Schädigung von zellulären Strukturen, der DNA und Nukleinsäuren, sowie zur Veränderung von Lipiden und Proteinen [Valko et al. (2007)]. Insbesondere das Hydroxyl-Radikal verfügt über die Potenz die DNA zu oxidieren. Eine permanente Veränderung kann so Mutationen und Kanzerogenese auslösen. Neben  $\text{OH}^\cdot$  ist eine kanzerogene Wirkung auch für Malondialdehyd (MDA) (Endprodukt eines Peroxidations-Prozesses von Peroxyl-Radikalen) beschrieben. Im Bereich von zellulären Proteinen kann es im Rahmen von oxidativem Stress zur Oxidation von Aminosäureseitenketten, insbesondere von Methionin und Cystein, kommen. Im Falle der Cystein-Oxidation kann

## 1 Einleitung

die Bildung von Disulfidbrücken resultieren und Proteineigenschaften verändert werden. Die Metall-induzierte Bildung von ROS führt neben der Veränderung von DNA auch zu Modifikationen von Phospholipiden [Leonard et al. (2004); Marnett (2000); Valko et al. (2006, 2007)].

Metalle wie Arsen, Cadmium, Nickel und auch Blei scheinen ihre schädlichen Einflüsse auf den Organismus zumindest teilweise über die Generierung von ROS auszuüben. Dabei scheint die ROS-Entstehung über wenige gemeinsame Mechanismen abzulaufen. Der wichtigste Weg der Metall-bedingten ROS-Bildung stellt eine Fenton-Reaktion dar. Ein Metallion bildet mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  unter Oxidation des Metalls ein Hydroxyl-Radikal. Dieser Mechanismus ist vor allem für Chrom, Nickel und Cobalt von Bedeutung. Eine weitere Möglichkeit der ROS-Bildung durch Metalle besteht in einer Hauber-Weiss-Reaktion.  $\text{O}_2^-$  reduziert ein oxidiertes Metallion, welches nun wieder mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagieren und  $\text{OH}^\cdot$  bilden kann. Im Rahmen des Respiratory Burst dienen Metallionen als Katalysatoren für die schnelle Bildung großer Mengen  $\text{OH}^\cdot$ . Weiterhin können Metallionen in direkten Reaktionen mit zellulären Proteinen zur Radikalenbildung beitragen [Leonard et al. (2004)].

Grundsätzlich unterscheidet man zwei Hauptentstehungsgruppen von oxidativem Stress. Bei Tumoren und Diabetes mellitus Typ-II scheint vor allem eine Veränderung des Redox-Status von Disulfiten durch Prooxidantien eine Rolle zu spielen, während bei kardiovaskulären Erkrankungen eher inflammatorisch bedingte Aktivitätssteigerungen von NAD(P)H- und Xanthin-Oxidase im Vordergrund stehen [Valko et al. (2007)]. Für viele Tumoren konnten durch ROS bedingte Veränderungen nachgewiesen werden. Chronisch erhöhte Level von ROS und RNS führen zu permanenten DNA-Veränderungen, Strangbrüchen oder Modifikationen von Signaltransduktionswegen, woraus Mutationen und Kanzerogenese resultieren können. Ebenfalls scheint es zu Veränderungen der mitochondrialen DNA durch oxidative Vorgänge zu kommen. Solche veränderten, mitochondrialen DNA-Produkte lassen sich in vielen Tumoren nachweisen [Valko et al. (2007)]. Als Ursache für die erhöhten ROS-Level konnten unter anderem Tabakrauch, aber auch Metalle nachgewiesen werden. Für kolorektale Karzinome vermutet man einen Zusammenhang mit Eisen-Ionen [Valko et al. (2001)].

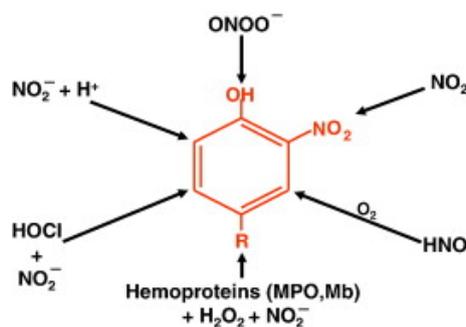
Bei kardiovaskulären Erkrankungen besteht eine Assoziation zwischen ROS-induziertem Stress in kardialen und vaskulären Myozyten und Gewebeschäden. Die vermehrte ROS-Produktion ist hierbei Folge einer überhöhten Aktivität von NAD(P)H- und Xanthin-Oxidase, sowie NOS [Berry und Hare (2004); Valko et al. (2007)].

In der Pathogenese des Diabetes mellitus Typ-II scheinen die toxischen Auswirkungen der chronischen Hyperglykämie ebenfalls ROS-vermittelt zu sein [Valko et al.

(2007)].

### 1.5.4 Proteinperoxidation und Nitrotyrosin

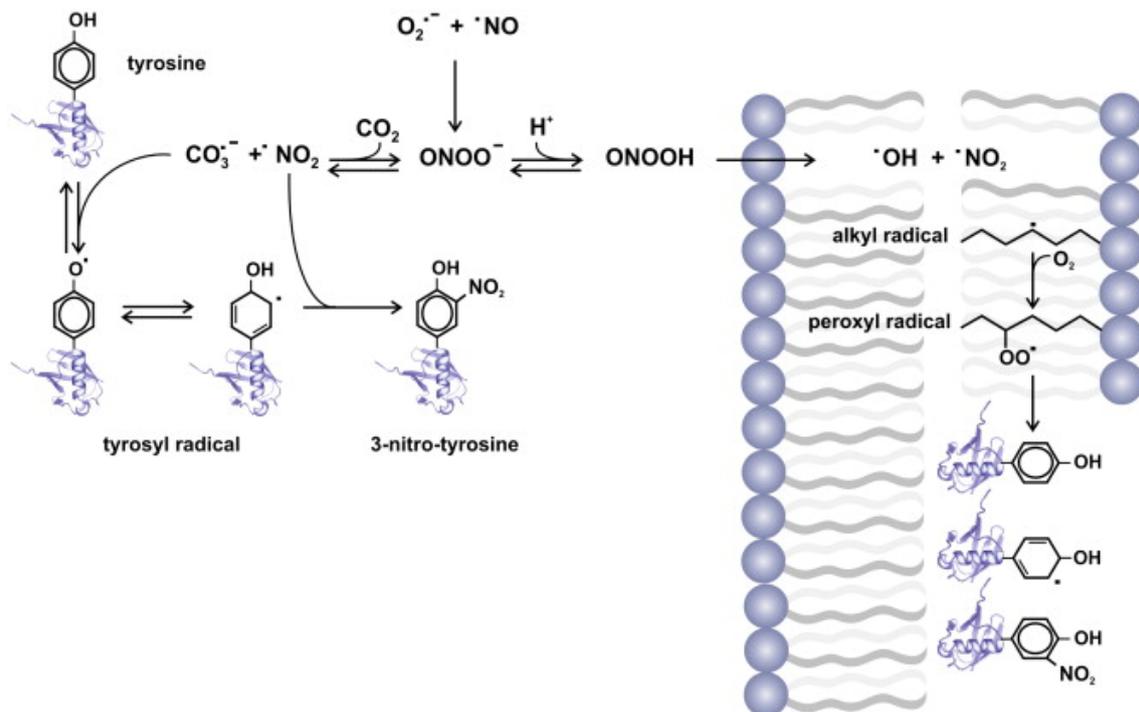
Im Rahmen von oxidativem und nitrogenem Stress kommt es neben der Peroxidation von Lipiden auch zu Nitrosierungs-Reaktionen von Lipiden und Proteinen. Dabei spielt unter anderem die Modifikation der Aminosäuren Tyrosin, Cystein und Tryptophan eine Rolle. In Bezug auf Tyrosin und Tyrosin-Reste innerhalb von Proteinen ist dies die Bildung von Nitrotyrosin. Dieses kann das Resultat verschiedenster Reaktionen von reaktiven Stickstoffspezies mit Tyrosin sein (s. Abbildung 1.4) [van der Vliet et al. (1995)].



**Abbildung 1.4:** Möglichkeiten der Entstehung von 3-Nitrotyrosin [Bryan und Grisham (2007)].

Dabei tragen sowohl  $\text{ONOO}^-$  als auch  $\text{NO}_2$  zur Entstehung von Nitrotyrosin und Dityrosin bei. Dies geschieht vermutlich über die Zwischenstufe eines Tyrosin-Radikals [van der Vliet et al. (1995)].

Basierend auf den verschiedenen Wegen der Bildung von 3-Nitrotyrosin scheint es sich beim Nachweis von Nitrotyrosin nicht um einen spezifischen Marker für  $\text{ONOO}^-$ -bedingten Stress zu handeln, sondern um einen allgemeineren Marker für oxidativen und nitrogenen Stress. Zu beachten ist, dass eine akute inflammatorische Reaktion ebenfalls zu erhöhten 3-Nitrotyrosin-Leveln führen kann [Halliwell (1997); Bryan und Grisham (2007)]. Klinische Relevanz erlangt die Nitrotyrosinbildung, da ein Zusammenhang zwischen dem 3-NT-Level und dem KHK-Risiko zu bestehen scheint. Weiterhin besteht eine Assoziation mit Arteriosklerose, Multipler Sklerose, Alzheimer-Demenz und verschiedenen Autoimmunerkrankungen [Birnboim et al. (2003)]. Auf molekularer Ebene scheinen dabei nicht alle zellulären Proteine gleichermaßen verändert zu werden, sondern einige bevorzugt. Weiterhin scheinen nur wenige bestimmte Tyrosinreste innerhalb eines Proteins von Nitrosierungsreaktionen betroffen zu sein [Rubbo und Radi (2008)]. Die Folgen dieser Veränderungen



**Abbildung 1.5:** Der Einfluss von ONOO<sup>-</sup> und NO<sup>•</sup> auf die Nitrotyrosinbildung unter Zwischenstufe eines Tyrosinradikals [Rubbo und Radi (2008)].

können Funktionsänderungen oder gain-, bzw. loss-of-function-Veränderungen bedeuten. Es kann zu Änderungen des pK<sub>a</sub>-Wertes oder der Konformation kommen oder die Phosphorylierung von Tyrosin kann verhindert werden. Für eine loss-of-function-Beeinträchtigung eines Proteins müsste es allerdings zu einer sehr hohen Nitrosierungsrate von kritischen Tyrosinresten eines Proteins kommen, was in vivo eher unwahrscheinlich erscheint. Eine gain-of-function-Veränderung hingegen konnte für Fibrinogen, Proteinkinase C und Cytochrom C gezeigt werden [Radi (2004)]. Im Falle von Cytochrom C bewirken hohe intramitochondriale Level von reaktiven Stickstoffspezies eine Nitrosierung. Dies kann die zyttoplasmatische Freisetzung von Cytochrom C verursachen und die Apoptose in Gang setzen (s. 1.4.2) [Radi et al. (2002)]. Neben der Veränderung von Enzymaktivitäten führt die 3-NT-Bildung zur Modifikation von zellulären Signalwegen. Der Eingriff in immunologische Reaktionen durch 3-NT, indem es entweder als Autoantigen wirkt oder die T-Zell-Antwort über eine veränderte MHC-Präsentation modifiziert, ist eine weitere Folge der Protein nitrosierung [Birnboim et al. (2003)].

Zelluläre Schutzmechanismen bestehen vor allem aus den generellen Abwehrmechanismen gegenüber oxidativem Stress, sowie speziellen Peroxiredoxinen, die insbesondere ONOO<sup>-</sup> neutralisieren und so die Rate der Tyrosinnitrosierung reduzieren können [Szab et al. (2007)].

### 1.5.5 Lipidperoxidation und Isoprostane

Ein zentrales Element von oxidativem Stress ist die Peroxidation von Lipiden. Dabei entstehen aus Arachnidonsäure Cyclooxygenase-unabhängig Prostaglandin-ähnliche Verbindungen, die Gruppe der Isoprostane. Diese scheinen in vivo vornehmlich als Esterverbindungen mit Phospholipiden zu entstehen und dann unter dem Einfluss von Phospholipasen freigesetzt zu werden [Morrow und Roberts (1996)].

Die Isoprostane besitzen sowohl potente biologische Aktivität, können aber auch als Mediatoren der oxidativen Schädigung wirken. In Modellversuchen konnte gezeigt werden, dass die Isoprostan-Konzentrationen unter dem Einfluss von freien Radikalen, aufgrund der dadurch bedingten Lipidperoxidationen, stark anstiegen, während durch die Zugabe von Antioxidantien eine Suppression der Isoprostan-Level erreicht werden konnte. Die Bestimmung von F<sub>2</sub>-Isoprostanen kann somit einen messbaren Parameter für oxidativen Stress darstellen [Morrow et al. (1990, 1992b)].

Die Tatsache, dass Isoprostane in vivo initial als Phospholipid-Esterverbindungen entstehen, könnte weiterhin die bei oxidativem Stress auftretenden Veränderungen von biologischen Membranen erklären [Morrow et al. (1992a)].

Zu der Gruppe der Isoprostane gehört auch das biologisch unglaublich potente 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, für welches eine sehr stark vasokonstriktorische Wirkung auf die renale und pulmonale Zirkulation nachgewiesen werden konnte. Auf den Thromboxan-Rezeptor und die Thrombozytenaggregation besteht hingegen nur ein geringer Einfluss, so dass möglicherweise ein spezifischer „Isoprostan“-Rezeptor im Bereich der glatten Gefäßmuskulatur vorkommt [Banerjee et al. (1992); Morrow und Roberts (1996)].

## 1.6 Gegenstand der Arbeit - Fragestellung

Die menschliche Haut und die orale Schleimhaut sind den in der Umwelt vorkommenden Noxen, wie polyzyklischen, aromatischen Kohlenwasserstoffen und Schwermetallen, direkt ausgesetzt. Besonders exponiert für Einflüsse dieser Stoffe sind Personen mit chronischer, privater oder beruflicher Exposition. Für beide Stoffgruppen sind zellschädigende, mutagene und kanzerogene Wirkungen bekannt. So konnte für Hauptvertreter beider Gruppen, für Benzo[α]pyren und Blei, Einflüsse auf das Apoptosesystem, sowie die Bildung freier Radikale und reaktiver Sauer- und Stickstoffspezies aufgezeigt werden.

Die Mundschleimhaut ist einer Belastung mit Benzo[α]pyren vor allem durch Tabakrauch, aber auch durch in Speisen enthaltenes Benzo[α]pyren ausgesetzt. Dieses wird aufgrund seiner lipophilen Struktur ins Epithel aufgenommen und akkumuliert

## 1 Einleitung

dort in den basalen Zellschichten, von denen die bei Tabakrauchern deutlich häufigeren Karzinome der Mundschleimhaut zumeist ausgehen. Die schädigende Wirkung des Benzo[ $\alpha$ ]pyren wird vor allem auf die Bildung reaktiver Metaboliten zurückgeführt. Diese metabolische Aktivierung geschieht durch Oxygenasen der CYP450-Familie, welche zudem durch Benzo[ $\alpha$ ]pyren induziert werden können. Für orale Epithelzellen konnte eine Benzo[ $\alpha$ ]pyren- und Tabakrauch-induzierte Mehrexpression des CYP1B1-Enzyms gezeigt werden [Port et al. (2004); Walle et al. (2006); Wen und Walle (2005)]. Die gebildeten, reaktiven Elektrophile führen zur Bildung von DNA-Addukten, welche die Zellintegrität stören können. Solche Addukte konnten in oralen Epithelzellen in deutlich vermehrtem Maße bei Rauchern verglichen mit Nichtrauchern dargestellt werden [Besaratina et al. (2000); Romano et al. (1999)]. Sollte eine Reparatur dieser DNA-Schäden nicht möglich sein und zudem durch die DNA-Polymerasen im Rahmen der DNA-Synthese nicht ausgeglichen werden können, kann es zu Fehlablesungen und daraus resultierenden Mutationen (auch im Bereich von Tumorsupressor- oder Protoonkogenen) kommen oder es kann ein Stopp der DNA-Synthese mit nachfolgender Apoptose der Zelle eintreten [Pfeifer et al. (2002)]. Apoptose kann ebenfalls das Resultat von BaP-bedingten Veränderungen an anderen zellulären Makromolekülen sein. Im Rahmen von genotoxischem Stress und DNA-Schäden spielt weiterhin das Tumorsupressorgen p53 eine entscheidende Rolle. Dessen Aktivierung führt zu einem Stopp des Zell-Zyklus und zur Apoptose, indem eine Spaltung von Caspasen initiiert wird. Unter dem Einfluss von Benzo[ $\alpha$ ]pyren konnte ein deutlicher Anstieg der zellulären p53-Konzentration und Phosphorylierung am Ser15 (mit der Folge der Stabilisierung des p53 [Thompson et al. (2004)]) in hepatischen Zelllinien gezeigt werden [Solhaug et al. (2004)]. Neben diesen apoptotischen Wirkungen von BaP, entwickelt es andererseits aber auch anti-apoptotische, wachstumsfördernde Wirkungen. So kommt es über ein Wachstumsfaktor-Mimikry zur Aktivierung des GF-Rezeptors und des anschließenden Signalweges mit der Folge von Zellwachstum und -vermehrung. Weiterhin kommt es durch Metabolisierungsprozesse zur Entstehung von BaP-Quinonen, welche die Möglichkeit zur Generierung von ROS, wie  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$  besitzen. Diese ROS können die Phosphorylierung von Komponenten von Wachstumsfaktor-Signalwegen induzieren und somit diese Signalwege aktivieren, wiederum mit der Folge einer vermehrten Zellvermehrung [Burdick et al. (2003)]. Über eine Stimulation der iNOS und damit einhergehender vermehrter  $NO^\cdot$ -Produktion kann BaP zudem die Zelltransformation und Tumorangiogenese beeinflussen [Chen et al. (2005)].

Eine Bleibelastung der Mundschleimhaut ist häufig Folge einer beruflichen Exposition, kann aber auch auf den anderen in 1.2.1 genannten Quellen beruhen. Blei

## 1 Einleitung

besitzt dabei ebenfalls eine DNA-schädigende und potentiell mutagene und kanzerogene Wirkung. Es kann zu genotoxischen Schäden in fast allen Organen kommen. Für eine chronische Bleiexposition konnten mehrfach erhöhte Raten chromosomaler Aberrationen festgestellt werden [Xu et al. (2008); Khan et al. (2010)]. Reaktive Sauerstoffspezies werden dabei als eine Hauptursache für die DNA-Schädigung diskutiert [Xu et al. (2008)]. Die bleibedingte Bildung von ROS ist hier entweder Folge einer vermehrten ROS-Produktion und/oder Folge einer Abbauminderung. Blei stimuliert sowohl die ROS-Bildung als auch die Peroxidation von Lipiden [Patrick (2006b)]. Hierbei ist wahrscheinlich auch eine Fenton-Reaktion (s. 1.5.3) von Bedeutung. Möglicherweise spielt in diesem Zusammenhang  $\delta$ -Aminolävulinsäure (ALA) als Prooxidant eine wichtige Rolle. Erhöhte ALA-Level, welche nach bleibedingter Inhibition der  $\delta$ -Aminolävulinsäure-Dehydratase auftreten, bewirken eine gegenseitige Autooxidation und die Bildung von ROS [Hermes-Lima et al. (1991)]. Als Hinweise für eine verminderte ROS-Entgiftung konnten Aktivitätsminderungen von Catalase, Superoxid-Dismutase und Glutathion-Peroxidase nach Bleiexposition gezeigt werden. Blei bindet zudem direkt an Glutathion und Glutathion-Reduktase und vermindert so den zellulären, antioxidativen Schutz. Glutathion nimmt somit eine Funktion in der Entfernung von toxischem Blei wahr, dies allerdings zu Lasten des zellulären ROS-Entgiftungspotentials. Insgesamt kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen ROS-Produktion und -Abbau [Patrick (2006b); Xu et al. (2008)]. Bei chronischer Bleiexposition von Arbeitern in Batteriefabriken fanden sich deutliche Veränderungen in allen untersuchten Markern für oxidativen Stress. Die klinischen Symptome einer chronischen Bleivergiftung korrelierten hierbei außerdem eng mit den untersuchten Lipidperoxidations-Markern, so dass die Peroxidation von Lipiden mit für die schädigenden Bleiwirkungen und die Symptomentstehung verantwortlich sein könnte [Gurer-Orhan et al. (2004)]. Bei der bleivermittelten Apoptose spielen die Mitochondrien eine zentrale Rolle, wobei mehrere Wege der Apoptoseaktivierung diskutiert werden. Einerseits scheint die übermäßige Bildung von ROS und die konsekutive Translokation von Cytochrom C ins Zytosol beteiligt zu sein. Weiterhin scheint Blei jedoch eine Calcium-ähnliche Wirkung zu haben und so zu einer Depolarisation der Mitochondrienmembran mit Öffnung von Permeabilitätsporen zu führen, was wiederum Cytochrom C freisetzt. Dieser Vorgang scheint nicht ROS-vermittelt zu sein, sondern auf einer BAX-Translokation ins Mitochondrium zu basieren. Es kommt zu einem Anstieg des BAX/BCL-2-Quotienten, mit Abfall von BCL-2 und Anstieg von BAX. Diese Vorgänge konnten im Tiermodell in neuronalen Zellen gezeigt werden [Pulido und Parrish (2003)]. Die Auswirkungen einer chronischen Bleiexposition auf das Apoptoseverhalten von oralen Epithelzellen wurde

## 1 Einleitung

kürzlich in einer Studie an indischen Malern/Lackierern nachgewiesen. Als Marker für eine erhöhte Apoptoserate fanden sich hierbei vermehrt Karyorrhesis und Karyolysis in mukosalen Zellen. Weiterhin fand sich eine erhöhte Rate an Micronuclei, was als Hinweis auf ein gesteigertes Karzinomrisiko der exponierten Arbeiter gewertet wurde [Khan et al. (2010)].

Es sollte nun untersucht werden, inwieweit der Nachweis von Apoptosemarkern und Markern für oxidativen und nitrogenen Stress in Mundschleimhautzellen mit einer Exposition gegenüber Blei oder Benzo[ $\alpha$ ]pyren korreliert und ob sich Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention ergeben. Hierbei war diese Arbeit Teil eines dreigliedrigen Projekts:

1. Untersuchung von humanen, immortalisierten Keratinozyten, die UV-Strahlung, Schwermetallen oder polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen ausgesetzt wurden auf Veränderungen, die mit Apoptose- und Nekrosevorgängen oder der Bildung von ROS und RNS (insbesondere NO $\cdot$ ) zusammenhängen.
2. Immunhistochemische Untersuchungen von Gewebeproben gesunder, menschlicher Mundschleimhaut nach deren Inkubation in Blei, bzw. Benzo[ $\alpha$ ]pyren. Die Frage, ob sich dabei Biomarker für Apoptose oder oxidativen Stress als Folge einer Exposition feststellen lassen ist Gegenstand dieser Arbeit.
3. Versuch der Beeinflussung der in Phase 1 und 2 bestimmten Signalwege durch Enzym- und Apoptoseinhibitoren oder Radikalfänger, um so die Schädigung durch die Noxen zu minimieren.

## 2 Material und Methoden

Die Durchführung des Versuches gliederte sich in zwei größere Abschnitte: nach der Probenentnahme erfolgte zunächst die Inkubation in Blei, bzw. Benzo[ $\alpha$ ]pyren im Organbad und daraufhin die Fixation in Paraformaldehyd. Nach Anfertigung von Cryoschnitten wurden die Präparate dann immunhistochemisch gefärbt, unter dem Mikroskop fotografiert und am Computer ausgewertet.

### 2.1 Patientenselektion und Probengewinnung

Die Gewinnung von Mundschleimhautproben erfolgte bei Patienten, welche sich einem stationären oder ambulanten Eingriff in der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer-, und Plastische Gesichtschirurgie des Universitätsklinikums Würzburg unterzogen. Voraussetzung für die Probenentnahme waren neben der rechtskräftigen Einwilligung nach Aufklärung des Patienten, vor allem eine gesunde Mundschleimhautsituation. Ausschlusskriterien waren daher insbesondere akute Erkrankungen der Mundschleimhaut, wie z. B. entzündliche Prozesse. Bei Patienten mit aktueller oder früherer Neoplasie der Mundschleimhaut erfolgte keine Probenexzision, ebenso bei Patienten, bei denen eine Entnahme aus operationstechnischer Sicht nicht möglich war. Die Entscheidung zur Probenentnahme lag beim verantwortlichen Operateur.

Die Exzision der Mundschleimhautprobe erfolgte intraoperativ durch den verantwortlichen Operateur. Es wurde eine Probengröße von bis zu 1 cm<sup>2</sup> angestrebt. Wichtig war, dass die Probe mindestens bis zur epithelialen Basalmembran reichte und somit sämtliche epithelialen Schichten der oralen Mukosa umfasste.

Unmittelbar nach der intraoperativen Entnahme wurde die gewonnene Mundschleimhautprobe in 10 mL-Falcons in Ringer-Lösung eingelegt und ins Labor transportiert.

Zwischen Probengewinnung und Inkubation im Organbad sollte eine Zeitspanne von max. 10 – 15 Minuten nicht überschritten werden.

## 2.2 Organbadversuch

Nach Eintreffen der Proben im Labor folgte nun die Inkubation in Blei oder Benzo[ $\alpha$ ]pyren, sowie die Anfertigung der dazugehörigen Kontrollen. Große Schleimhautproben konnten zunächst in zwei Stücke geteilt und somit für die Durchführung von zwei Inkubationsvorgängen genutzt werden. Die Organbad-Stammlösungen I und II, die Tyrodelösung, sowie das 4 % PFA und die 18 % Saccharose mussten bereits vorher angesetzt werden. Ebenso musste das Organbad frühzeitig eingeschaltet werden, damit dieses bis zum Inkubationsbeginn auf  $+37^{\circ}\text{C}$  aufgeheizt war.

### 2.2.1 Versuchsprotokoll

Die Inkubation erfolgte möglichst zeitnah nach der Entnahme nach folgendem Protokoll:

- Jeweils 10 mL Tyrodelösung wurden in 2 Falcons gefüllt: eines für die Verumprobe und eines für die Kontrollprobe. Beide wurden im Wasserbad auf  $+37^{\circ}\text{C}$  vorgewärmt.
- Die Probe wurde dann mit einem scharfen Skalpell in zwei gleich große Stücke geteilt. Wichtig war, dass der Schnitt senkrecht durch das Epithel ging und beide Stücke Epithelanteile enthielten. Ein Stück diente als Verum-, das andere als Kontrollprobe.
- Kurz vor Inkubationsbeginn wurden die Substanzen in der entsprechenden Konzentration zur Tyrodelösung gegeben:
  - Für die Inkubation in  $100\ \mu\text{M}$  Blei-II-Acetat-3-Hydrat:
    - \* Verumfalcon:  $150\ \mu\text{L}$   $0,01\ \text{M}$  Blei-Stammlösung mit Aqua dest. auf  $5\ \text{mL}$  auffüllen und zur Tyrode geben.
    - \* Kontrollfalcon:  $5\ \text{mL}$  Aqua dest. zur Tyrode geben.
  - Für die Inkubation in  $1\ \mu\text{M}$  Benzo[ $\alpha$ ]pyren:
    - \* Verumfalcon:  $1,5\ \mu\text{L}$  der frisch aufgetauten  $0,01\ \text{M}$  BaP-Stammlösung mit Aqua dest. auf  $5\ \text{mL}$  auffüllen und zur Tyrode geben.
    - \* Kontrollfalcon:  $1,5\ \mu\text{L}$  DMSO mit Aqua dest. auf  $5\ \text{mL}$  auffüllen und zur Tyrode geben.
- Nun wurden die beiden Probenstücke auf die Falcons verteilt.

## 2 Material und Methoden

- Die Proben wurden für 5, 10 oder 15 Minuten, bzw. für 1, 3 oder 6 Stunden bei  $+37^{\circ}\text{C}$  und leichtem Schütteln im Wasserbad inkubiert.
- Anschließend wurden die Proben mit einer feinen Pinzette aus den Falcons entnommen und in zwei getrennten 2 mL-Eppendorfgefäßen in 1 mL 4 % PFA eingelegt und über Nacht bei  $+4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Das 4 % PFA musste hierzu rechtzeitig aufgetaut werden.
- Am nächsten Tag wurde das 4 % PFA mit einer Pasteurpipette abgesaugt und anschließend wurde 1 mL 18 % Saccharose in 0,1 M PBS zugegeben und für eine weitere Nacht bei  $+4^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die 18 % Saccharose musste ebenfalls frühzeitig aufgetaut werden.

Im Anschluss an die Inkubation im Organbad wurden die Proben bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach Entnahme der Proben aus der 18 % Saccharose wurden diese in den Cryo-Mold Einbetttschälchen parallel zum Boden platziert, um das spätere Anfertigen von Kryoschnitte zu erleichtern. Es entstanden somit später Schnitte, welche durch alle histologischen Schichten des mukosalen Epithels reichten. Nach der Positionierung der Probe im Einbetttschälchen wurde dieses mit Tissue-Tek aufgefüllt und anschließend für ca. 1 h bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Dann war das Tissue-Tek gefroren und die Probe konnte zusammen mit dem umgebenden Tissue-Tek-Block aus dem Einbetttschälchen gedrückt und in Alufolie eingewickelt bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert werden.

### 2.2.2 Benötigte Ansätze

Für die Durchführung des Organbadversuches war es notwendig vorher die folgenden Ansätze herzustellen:

#### **Blei-II-Acetat-3-Hydrat**

Das Blei-II-Acetat-3-Hydrat wurde in Aqua dest. zu einer 0,01 M Stammlösung gelöst und anschließend in 1 mL-Eppendorfgefäße aliquotiert und bei Raumtemperatur gelagert.

#### **Benzo[ $\alpha$ ]pyren**

Das Benzo[ $\alpha$ ]pyren wurde laut Herstellerangaben in DMSO zu einer 0,01 M Stammlösung gelöst und anschließend in Eppendorfgefäße aliquotiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Kurz (ca. 5 Minuten) vor Gebrauch wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut.

### Organbadstammlösung I

Pro 1 L Aqua dest. wurden die folgenden Substanzen unter Rühren gelöst:

- 6,63 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 5,34 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$
- 200,0 g NaCl
- 10,0 g KCl

Die Organbadstammlösung I wurde wöchentlich frisch hergestellt und bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert.

### Organbadstammlösung II

Unter Rühren wurden 2,9 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  pro 1 L Aqua dest. gelöst.

Die Stammlösung II wurde ebenfalls bei  $+4^\circ\text{C}$  gelagert und wöchentlich neu angesetzt.

### Tyrode-Lösung [pH 7,4]

Die Tyrode-Lösung konnte im Gegensatz zu den Stammlösungen nicht aufbewahrt werden und musste jeden Tag frisch angesetzt werden.

Hierzu wurden 2,0 g D(+)-Glucose und 2,0 g  $\text{NaHCO}_3$  in 950 mL Aqua dest. gelöst und 40 mL Stammlösung I und 10 mL Stammlösung II zugegeben. Anschließend wurde ein pH-Wert von pH 7,4 eingestellt.

### 0,2 M PBS [pH 7,4]

Das 0,2 M PBS wurde zur Herstellung des 4 % PFA und nach vorheriger 1:1 Verdünnung mit Aqua dest. zu 0,1 M PBS zur Herstellung der 18 % Saccharose benötigt.

Für die 0,2 M Stammlösung wurden die folgenden Substanzen pro 1 L Aqua dest. unter Rühren gelöst:

- 28,8 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
- 5,2 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
- 17,53 g NaCl

Vor dem endgültigen Auffüllen auf 1000 mL mit Aqua dest. wurde der pH-Wert auf pH 7,4 eingestellt und erst anschließend mit Aqua dest. auf 1 L aufgefüllt.

### **0,1 M PBS [pH 7,4]**

Für die 0,1 M PBS [pH 7,4] wurde das obige Gemisch entweder 1:1 mit Aqua dest. verdünnt oder ein eigener Ansatz mit jeweils der halben Menge der oben angegebenen Substanzen durchgeführt.

### **4 % PFA**

4,0 g Paraformaldehyd wurden bei 60 °C in 40 mL Aqua dest. gelöst. Anschließend wurde die Lösung mit 1 N NaOH geklärt und abgekühlt. Nun wurde 1:1 mit 0,2 M PBS verdünnt und das Gemisch filtriert und letztlich mit Aqua dest. auf 100 mL aufgefüllt.

Das fertige 4 % PFA konnte nun in Aliquots von ca. 10 mL in Falcons bei –20 °C eingefroren und so bis zum Gebrauch gelagert werden. Frühzeitig vor der Verwendung musste ein Aliquot aufgetaut werden und konnte dann bei +4 °C für 2 Wochen aufbewahrt werden.

### **18 % Saccharose**

18,0 g Saccharose wurden unter Rühren in 1000 mL 0,1 M PBS gelöst und anschließend in Aliquots à 10 mL bei –20 °C in Falcons eingefroren und gelagert.

Am Tag vor Gebrauch wurde ein Aliquot aufgetaut und konnte dann bei einer Lagerung bei +4 °C für bis zu 1 Woche benutzt werden.

## **2.3 Kryoschnitte**

Von den bei –80 °C gelagerten Proben wurden nun Kryoschnitte angefertigt und anschließend immunhistochemisch gefärbt. Pro Probe (sowohl Verum als auch Kontrolle) wurden jeweils drei Objektträger (je einer pro Primärantikörper) mit Schnitten bestückt: pro Objektträger drei Schnitte für die Färbung mit dem entsprechend Primärantikörper und zwei Schnitte zur Kontrolle der Immunhistochemie (IHC).

Die Kryoschnitte wurden im Kryostaten bei –21 °C – –22 °C angefertigt. Nach Einlegen des Schnittmessers wurde die Probe samt dem umgebenden Tissue-Tek-Block mit Tissue-Tek auf dem Probenhalter fixiert und dieser anschließend in den Schlitten eingespannt. Mit einer Rasierklinge wurde überschüssiges Tissue-Tek abgetragen und der Probenhalter anschließend korrekt zur Klinge ausgerichtet. Bei einer Schnittdicke von 20 µm wurde nun bis zum Erreichen des mukosalen Epithels geschnitten. Dies wurde mit probeweise auf Objektträger gezogenen Schnitten

visuell kontrolliert. Sobald dies der Fall war, konnte die Schnittdicke auf  $6\ \mu\text{m}$  eingestellt und die endgültigen Schnitte angefertigt werden. Diese wurden auf Polysinebeschichtete Objektträger übernommen und anschließend bei  $-80\ ^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.4 Immunhistochemie

Die Färbung der angefertigten Kryoschnitte erfolgte mittels Immunhistochemie. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mit einem Primärantikörper gegen die zu untersuchende Struktur inkubiert. Später wurden Sekundärantikörper gegen diese Primärantikörper verwendet, welche zusätzlich biotinyliert waren. An diese Biotin-Gruppen band die anschließend zugesetzte biotinylierte Streptavidin Meerrettich-Peroxidase über ihre Biotin-Bindestellen am Streptavidin. Die als Konjugat an das Streptavidin gebundene Peroxidase setzte nun die DAB-Färbelösung um und führte zur Färbung der Schnitte.

### 2.4.1 Versuchsprotokoll

Um ein Austrocknen der Schnitte auf den Objektträgern zu verhindern, wurden die Färbekästen mit Aqua dest. befüllt und bei längeren Wartezeiten Deckel benutzt. Die Färbung erfolgte nach folgendem Protokoll:

- Die zu färbenden Objektträger wurden aus der Tiefkühltruhe ( $-80\ ^\circ\text{C}$ ) entnommen und 30 Min. bei Raumtemperatur in den Färbekästen aufgetaut und beschriftet.
- Für 3 x 5 Minuten wurde mit 0,05 M TBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschvorgang wurden mit einem PAP-Pen die IHC- und Verum-Schnitte getrennt voneinander umrandet.
- 25 Minuten lang wurde mit 20 mL Methanol + 5 mL 3 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  inkubiert. Dieses wurde frisch hergestellt aus 20 mL Methanol + 4,5 mL Aqua dest. + 0,5 mL 30 %  $\text{H}_2\text{O}_2$ .
- 3 x 5 Minuten wurde mit 0,05 M TBS gewaschen.
- Für 10 Minuten wurde mit 0,5 M Ammoniumchlorid + 0,25 % Triton X in TBS inkubiert (0,59 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 50  $\mu\text{L}$  Triton X + 20 mL TBS).
- Für 3 x 5 Minuten wurde mit 0,05 M TBS gewaschen.
- 60 Minuten lang wurde mit 5 % BSA in TBS inkubiert.

## 2 Material und Methoden

- Die Primärantikörper wurden zur Inkubation in 0,8 % BSA in TBS verdünnt:
  - Anti-Nitrotyrosin 1:500
  - Anti-8-epi-PGF<sub>2α</sub> 1:1500
  - Anti-Aktive-Caspase-3 1:500

Die Verdünnungen für die jeweiligen Primärantikörper waren aus vorherigen Versuchen in unserem Labor bereits bekannt. Auf eine Bestimmung der optimalen Konzentration wurde deshalb und aufgrund der mit diesen Verdünnungen erzielten, guten Ergebnisse verzichtet. Die Kontroll-Schnitte wurden nicht mit einem Primärantikörper, sondern nur mit 0,8 % BSA in TBS inkubiert.

- Für 3 x 5 Minuten wurde mit 0,05 M TBS gewaschen.
- Für 60 Minuten wurde mit dem entsprechenden Sekundärantikörper 1:400 in 0,05 M TBS inkubiert:
  - Rabbit-anti-Goat bei Anti-8-epi-PGF<sub>2α</sub>
  - Goat-Anti-Rabbit bei Anti-Nitrotyrosin und bei Anti-Aktive-Caspase-3
- 3 x 5 Minuten mit 0,05 M TBS waschen.
- 60 Minuten wurde mit dem Horseradish-Peroxidase-Komplex 1:150 verdünnt in 0,05 M TBS inkubiert.
- Für 3 x 5 Minuten wurde mit 0,05 M TBS gewaschen.
- Entwicklung mit der DAB-Färbelösung:

Hierzu wurden in 15 mL 0,1 M PB [pH 7,4] zunächst die folgenden Substanzen gelöst und das Gemisch anschließend filtriert:

- 150  $\mu$ L DAB
- 150  $\mu$ L NH<sub>4</sub>Cl
- 300  $\mu$ L NiSO<sub>4</sub> · 6 H<sub>2</sub>O
- 300  $\mu$ L 10 %-Glucose
- 50  $\mu$ L Glucose-Oxidase

Diese Substanzen wurden in den oben genannten Mengen als Aliquots eingefroren und dann ca. 15 Minuten vor Gebrauch bei Raumtemperatur aufgetaut.

## 2 Material und Methoden

Das Resultat der Entwicklung mit dem DAB-Gemisch war eine Schwarzfärbung. Um die Intensität der Anfärbung vergleichen zu können, wurde die Entwicklungszeit so bestimmt, dass die Färbung weder übersättigt noch zu schwach ausgeprägt war.

Die Entwicklungszeiten wurden bei der ersten Färbung mit jedem Antikörper festgelegt. Hierzu wurde die Entwicklung der Schwarzfärbung unter dem Mikroskop beobachtet und abgebrochen, sobald die ersten Schnitte eine deutliche Schwarzfärbung zeigten. Für alle Färbungen mit einem Antikörper wurde die gleiche Entwicklungszeit verwendet:

- Anti-Nitrotyrosin: 8 Minuten
- Anti-8-epi-PGF<sub>2α</sub>: 22 Minuten
- Anti-Aktive-Caspase-3: 12 Minuten

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Entwicklerlösung abgesaugt und 3 x 5 Minuten mit 0,05 M TBS gewaschen.

- Die Schnitte wurden der Reihe nach jeweils 5 Minuten in 70 %, 96 %, 100 % Ethanol und in Xylol entwässert.
- Mit Entellan und einem Deckglässchen wurden die Schnitte abschließend eingedeckelt.

### 2.4.2 Benötigte Ansätze

#### 0,05 M TBS [pH 7,6]

Der Tris-Base-Puffer wurde für alle Waschschrirte bei der Immunhistochemie benötigt.

In Aqua dest. wurden 8,766 g NaCl und 6,057 g Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan gelöst und anschließend der pH-Wert auf pH 7,6 eingestellt und mit Aqua dest. auf 1000 mL aufgefüllt.

Der TBS-Puffer konnte bei +4 °C aufbewahrt werden, solange er klar war.

#### 5 % und 0,8 % BSA in TBS

Zur Herstellung des 5 % BSA in TBS wurden 5,0 g Rinderserumalbumin (BSA) pro 100 mL TBS auf dem Schüttler gelöst. Hierzu durfte nicht der Magnetrührer verwendet werden, da das Magnetfeld die Struktur des BSA verändert hätte.

Nach der folgenden Formel wurde 0,8 % BSA in TBS aus 5 % BSA durch Verdünnung mit TBS hergestellt:

## 2 Material und Methoden

$$\frac{x \text{ mL}}{5\%} \times 0,8\% = y \text{ mL},$$

wobei  $x$  die gewünschte Menge 0,8% BSA und  $y$  die benötigte Menge 5% BSA angibt. Die  $y$  mL 0,8% BSA wurden anschließend mit  $x - y$  mL TBS aufgefüllt.

Alternativ konnte auch ein Direktansatz mit 0,8 g BSA pro 100 mL TBS erfolgen.

### 0,1 M PB [pH 7,4]

Der Phosphatpuffer (PB) wurde für die Entwicklung mit DAB benötigt. Es wurden 14,4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  und 2,6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  pro 1000 mL Aqua dest. unter Rühren gelöst. Der pH-Wert musste auf pH 7,4 eingestellt werden, bevor endgültig mit Aqua dest. auf 1000 mL aufgefüllt werden konnte.

### Ansatz der Substanzen für die DAB-Entwicklung

- **DAB:** 5000 mg/100 mL Aqua dest.  
In Aliquots von je 150  $\mu\text{L}$ , dies entsprach 7,5 mg DAB, zur Lagerung eingefroren.
- **$\text{NH}_4\text{Cl}$ :** 4000 mg/100 mL Aqua dest.  
In Aliquots von je 150  $\mu\text{L}$ , dies entsprach 6,0 mg  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , zur Lagerung eingefroren.
- **$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ :** 130 mg/10 mL Aqua dest.  
In Aliquots von je 300  $\mu\text{L}$ , dies entsprach 3,9 mg  $\text{NiSO}_4$ , zur Lagerung eingefroren.
- **10% Glucose:** 10 g  $\beta$ -D-Glucose/100 mL Aqua dest.  
In Aliquots von je 300  $\mu\text{L}$ , dies entsprach 0,03 mg Glucose, zur Lagerung eingefroren.
- **Glucose-Oxidase:** 1,2 mg/1 mL Aqua dest.  
In Aliquots von je 50  $\mu\text{L}$ , dies entsprach 0,06 mg Glucose-Oxidase, zur Lagerung eingefroren.

### 2.4.3 Verwendete Antikörper

Für die Immunhistochemie wurden die folgenden Primärantikörper und Sekundärantikörper verwendet:

### Primärantikörper

- **Anti-Nitrotyrosin-Antikörper**

Polyklonaler Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen Nitrotyrosin. Der Antikörper reagiert gegen alle Spezies. Die Stammkonzentration von 1mg/mL wurde 1:500 in 0,8 % BSA verdünnt. Die Lagerung des Antikörpers erfolgte bei +4 °C.

- **Anti-Aktive-Caspase-3-Antikörper**

Polyklonaler Primärantikörper aus dem Kaninchen gegen die aktivierte Form der Caspase-3. Der Affinitäts-gereinigte Antikörper reagiert bevorzugt gegen menschliche und murine Caspase-3, mit einer 50-fachen Präferenz für die aktive Form. Der Antikörper wurde bei +4 °C gelagert. Die Verwendung erfolgte 1:500 in 0,8 % BSA.

- **Anti-8-epi-PGF<sub>2α</sub>-Antikörper**

Dieser polyklonale IgG-Primärantikörper aus der Ziege reagiert bevorzugt gegen das Isoprostan 8-epi-PGF<sub>2α</sub>. Der Antikörper wurde in Aliquots, um wiederholtes Auftauen und Einfrieren zu verhindern, bei -80 °C gelagert. Für die Immunhistochemie wurde die Stammkonzentration von 1,0 mg/mL 1:1500 in 0,8 % BSA verdünnt.

### Sekundärantikörper

- **Rabbit Anti-goat-Antikörper**

Dieser Sekundärantikörper aus dem Kaninchen reagiert gegen aus Ziegenserum isolierte Immunglobuline, hauptsächlich gegen IgG. Dieser Antikörper ist ebenfalls Affinitäts-gereinigt. Zusätzlich ist der Antikörper biotinyliert mit aktiviertem Biotin. Verwendet wurde der Antikörper 1:400 verdünnt in TBS. Die Lagerung erfolgte bei +4 °C.

- **Goat Anti-rabbit-Antikörper**

Dieser Sekundärantikörper aus der Ziege reagiert gegen aus Kaninchenserum isolierte Immunglobuline, hauptsächlich gegen IgG. Dieser Antikörper ist ebenfalls Affinitäts-gereinigt. Zusätzlich ist der Antikörper biotinyliert mit aktiviertem Biotin. Verwendet wurde der Antikörper 1:400 verdünnt in TBS. Die Lagerung erfolgte bei +4 °C.

## 2.5 Fotografieren der gefärbten Schnitte am Mikroskop

Im nächsten Schritt erfolgte die Dokumentation der immunhistochemisch gefärbten Schnitte mit digitalen Fotos zur späteren Auswertung. Hierzu wurde bei 400-facher Vergrößerung ein Epithel-Ausschnitt des Stratum basale und Stratum spinosum eingestellt und am Mikroskop fotografiert. Die Digitalkamera war mittels Adapter am Mikroskop angebracht. Pro Verum- und Kontrollprobe wurden jeweils ca. 3 Bilder angefertigt. Dabei waren die verwendeten Mikroskop- und Kameraeinstellungen (2272 x 1704 px, ISO 100, 21 mm Brennweite, Blitz aus) für alle Fotos festgelegt.

## 2.6 Auswertung

### 2.6.1 Messen der Grauwerte

Die Auswertung der digitalen Bilder erfolgte am Computer mit dem Programm ImageJ. Hierzu wurden die Bilder einzeln in ImageJ geladen. Mit dem Freihand-Selektionstool konnten anschließend einzelne Zellen am Zellrand umrandet und somit ausgewählt werden. Die Messfunktion (STRG + M) diente zur Messung des Grauwertes des markierten Areals. Dies wurde für insgesamt bis zu 100 Zellen pro Präparat wiederholt, je 50 Zellen aus dem Stratum basale und je 50 aus dem Stratum granulosum.



**Abbildung 2.1:** Demonstration, wie die Zellen im Str. basale (weiße Umrandung) und Str. spinosum (schwarze Umrandung) zur Messung des Grauwertes markiert wurden. (Vergr. 400-fach)

## 2.6.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte am Computer mit SPSS, die Diagramme wurden mit OpenOffice.org Calc erstellt. Zunächst wurden die Ergebnisse jeder einzelnen Verumprobe mit der dazugehörigen Kontrollprobe verglichen: die Mittelwerte und Standardabweichungen der im Stratum basale und Stratum spinosum gemessenen Grauwerte wurden bestimmt. Anschließend wurden für jeden Zeitpunkt und jede Zellschicht separate Mittelwerte und deren Standardabweichungen errechnet. Die Mittelwertunterschiede wurden anschließend mittels t-Test auf Signifikanz untersucht. Der Vergleich von Raucher- und Nichtraucher-Proben wurde ebenfalls mit Hilfe des t-Tests angefertigt. Bei allen Untersuchungen wurde ab einem  $p$ -Wert von  $< 0,05$  im zweiseitigen t-Test von einem statistisch signifikanten Unterschied ausgegangen. Zur Quantifizierung und zum Vergleich der Unterschiede wurden diese zudem als prozentuale Veränderungen im Verhältnis zur Kontrollprobe errechnet.

## 2.7 Materialien

### 2.7.1 Laborgeräte

Produkt	Hersteller
<i>Kryostat:</i>	
Kryostat HM 500 OM	Microm International GmbH Walldorf, Deutschland
Kryostat MNT	SLEE Medical GmbH Mainz, Deutschland
<i>Digitalkamera:</i>	
C4040z	Olympus Corporation Tokio, Japan
<i>Magnetrührer:</i>	
MR 3001	Heidolph Instruments GmbH + Co. KG Schwabach, Deutschland
<i>Mikroskop und Objektive:</i>	
DM RBE	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Deutschland
PL Fluotar 10x /0,30, 20x /0,50 und 40x /0,70	Leica Microsystems GmbH Wetzlar, Deutschland

## 2 Material und Methoden

### *pH-Messer:*

inolab pH/Cond Level 1 Set

WTW Wissenschaftlich-  
Technische Werkstätten GmbH  
Weilheim, Deutschland

### *Pipetten:*

accu-jet®pro

Brand GmbH + Co. KG  
Wertheim, Deutschland

Research®(variabel)

Eppendorf AG  
Hamburg, Deutschland

### *Pumpe:*

Absaugpumpe

KNF Neuberger GmbH  
Freiburg, Deutschland

### *Schüttler:*

Mini Rocker MR-1

PEQLAB Biotechnologie GmbH  
Erlangen, Deutschland

### *Software:*

ImageJ 1.43u

U. S. National Institutes of Health  
Bethesda, USA

OpenOffice.org 3.2.0 Calc

Oracle Corporation  
Redwood Shores, USA

PASW Statistics 18

SPSS Inc.  
Chicago, USA

### *Waage:*

KB-Präzisionswaage

Gottl. Kern + Sohn GmbH  
Balingen-Frommern, Deutschland

### *Wasserbad:*

Schüttelwasserbad

GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH  
Burgwedel, Deutschland

### *Zentrifuge:*

Spectrafuge Mini

Labnet  
Edison, USA

## 2.7.2 Verbrauchsmaterialien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Gefäße:</i>	
Safe-Lock Tubes 1,5 mL, 2,0 mL	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Röhrchen PP 15 mL, 50 mL	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
<i>PAP-Stift:</i>	
Pap Pen Immunostaining Pen	G. Kisker GbR Steinfurt, Deutschland
<i>Pipetten (-spitzen):</i>	
Einmal-Pasteurpipetten	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland
Serologische Pipette 10 mL, 25 mL	Greiner Bio-One GmbH Frickenhausen, Deutschland
epT.I.P.S. 0,1–10 $\mu$ L, 2–200 $\mu$ L, 50–1000 $\mu$ L	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
<i>Skalpelle und Klengen:</i>	
CUTFIX Einmalskalpell	Aesculap AG Tuttlingen, Deutschland
Einwegklengen für Kryostat HM 500 OM	Microm International GmbH Walldorf, Deutschland
Einwegklengen für Kryostat MNT	SLEE Medical GmbH Mainz, Deutschland
<i>Objektträger und Deckgläschen:</i>	
Polysine-Slides	Menzel GmbH + Co. KG Braunschweig, Deutschland
Deckgläschen 24 x 60 mm	A. Hartenstein GmbH Würzburg, Deutschland

### 2.7.3 Chemikalien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
70 %, 96 % und 100 % Ethanol	Apotheke des Klinikums der Universität Würzburg, Deutschland
Ammoniumchlorid	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Aqua dest.	eigene Herstellung
Bovine Serum Albumine	PAA Laboratories GmbH Pasching, Österreich
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
DAB-Puffertabletten	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
D(+)-Glucose	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Di-Natriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Entellan Neu	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Glucose-Oxidase	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Methanol	Mallinckrodt Baker B. V. Deventer, Niederlande
Natriumchlorid	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland

## 2 Material und Methoden

Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat- Monohydrat	Sigma-Aldrich St. Louis, USA
Natronlauge 1n	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Nickel(II)-sulfat-Hexahydrat	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Saccharose	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Salzsäure 1n	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Streptavidin-Biotinylated Horseradish Peroxidase Complex	GE Healthcare Chalfont St. Giles, Großbritannien
Tissue-Tek O.C.T. Compound	Sakura Finetek Europe B. V. Alphen aan den Rijn, Niederlande
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Schwarz/Mann Biotech Cleveland, USA
Xylol (Isomere)	Carl Roth GmbH + Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland

## 2.7.4 Antikörper

### Primärantikörper

*Antikörper:* Rabbit Anti-Nitrotyrosin Polyclonal Antibody

*Hersteller:* Chemicon International Inc., Temecula, USA

*Artikelnummer:* AB5411

*Antikörper:* Affinity Purified, Rabbit Anti-Active Caspase-3 Polyclonal Antibody

*Hersteller:* BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA

*Artikelnummer:* 557035

*Antikörper:* Anti-8-epi-PGF<sub>2α</sub> Purified IgG

*Hersteller:* Oxford Biomedical Research Inc., Rochester Hills, USA

*Artikelnummer:* IS20

### Sekundärantikörper

*Antikörper:* Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobolins/Biotinylated

*Hersteller:* DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

*Artikelnummer:* E0466

*Antikörper:* Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobolins/Biotinylated

*Hersteller:* DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

*Artikelnummer:* E0432

## 2.7.5 Blei und Benzo[α]pyren

### Blei-II-Acetat-3-Hydrat

*Hersteller:* Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

*Artikelnummer:* 467863

*Anwendung:* In Aqua dest. zu 0,01 M Stammlösung gelöst

*Lagerung:* Als Aliquots bei Raumtemperatur

## 2 Material und Methoden

### **Benzo[ $\alpha$ ]pyren**

*Hersteller:* Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

*Artikelnummer:* B1760

*Anwendung:* In DMSO zu 0,01 M Stammlösung gelöst

*Lagerung:* Als Aliquots bei  $-20^{\circ}\text{C}$

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Patientenkollektiv

Insgesamt wurden 72 Proben von 53 verschiedenen Spendern inkubiert. Hierbei konnten die Proben von 2 Patienten für je drei Inkubationsvorgänge und die Proben von 15 Patienten für je zwei Inkubationsvorgänge verwendet werden. Unter den 53 Spendern befanden sich 27 (50,9 %) männliche Patienten und 26 (49,1 %) weibliche Patientinnen, das Durchschnittsalter betrug 37,8 Jahre. 9 Spender waren Raucher (17,0 %) mit durchschnittlich 12 gerauchten Zigaretten pro Tag, 27 Nichtraucher (50,9 %) und bei 17 (32,1 %) weiteren Spendern konnte diesbezüglich keine Information erhoben werden. Aufgrund der teilweisen Mehrfachspende und der Verwendung einer Spende für einen Blei- und BaP-Inkubationsvorgang, ergaben sich für die Proben die in Tabelle 3.1 angegebenen Werte.

**Tabelle 3.1:** Kennzahlen zu Alter und Rauchverhalten der Probenspender und der inkubierten Proben.

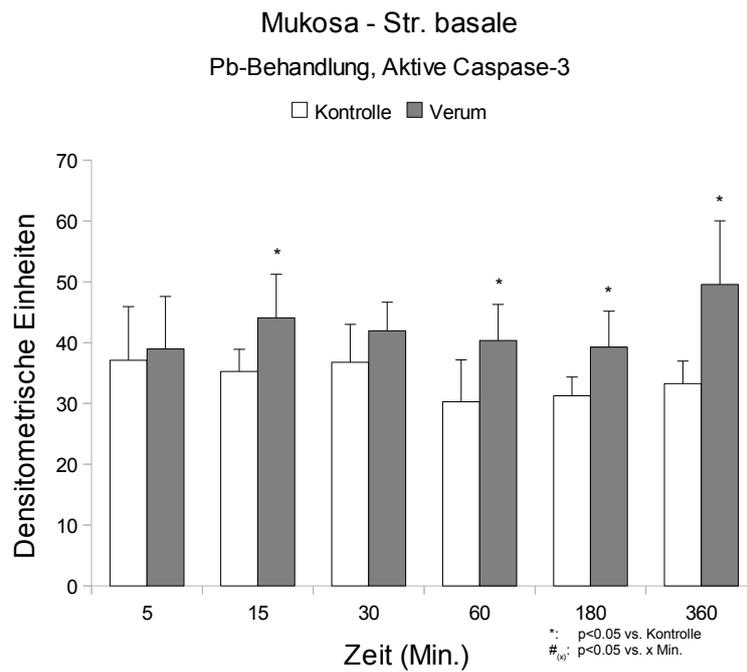
	<b>Blei</b>	<b>Benzo[<math>\alpha</math>]pyren</b>
1. Patienten		
Anzahl	28 (m: 18x, w: 10x)	26 (m: 9x, w: 17x)
Alter	42,9 Jahre	32,8 Jahre
Raucher	ja: 4, nein: 15, k. A.: 9	ja: 5, nein: 12, k. A.: 9
2. Proben		
Anzahl	36	36
Alter	42,7 Jahre	32,3 Jahre
Raucher	ja: 4, nein: 21, k. A.: 11	ja: 8, nein: 17, k. A.: 11

## 3.2 Blei

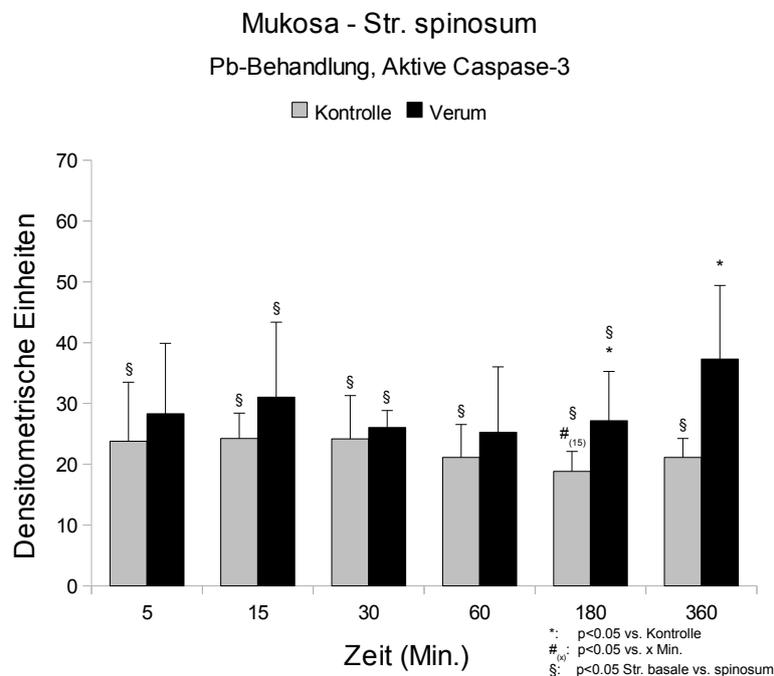
### 3.2.1 Aktive Caspase-3

Insgesamt zeigte sich ein eindrücklicher Effekt der Bleiinkubation auf die Aktivität von Caspase-3 (s. Abbildungen 3.1, 3.2). Die Durchschnittsgrauwerte der Verumproben lagen sowohl für die Zellen des Str. basale als auch des Str. spinosum für jede untersuchte Zeiteinheit über den Durchschnittswerten der Kontrollproben. Auffällig waren insbesondere die längeren Inkubationszeiten, die signifikant höhere Durchschnittswerte bedingten. Signifikante Unterschiede mit  $p < 0,05$  zwischen Verum- und Kontrollproben bestanden im Str. basale neben 15 Min., vor allem bei 60, 180 und 360 Min. Bei 360 Min. lag die Steigerung gegenüber dem Kontrollwert bei 49,1 %, während es bei 60 Min. noch 33,3 % und bei 180 Min. noch 25,6 % waren. Für das Str. spinosum waren ebenfalls die Werte für 180 und 360 Min. signifikant erhöht, wobei es von 180 zu 360 Min. nochmals zu einer deutlichen Zunahme kam. Bei 180 Min. war der Verummittelwert um 44,3 % gegenüber dem Kontrollwert erhöht, bei 360 Min. waren es 76,6 %. Die Kontrollbedingungen führten, bis auf eine Absenkung des 180-Min.-Wertes im Str. spinosum, zu keinen relevanten Änderungen der Caspase-3-Aktivität, weder im Str. basale noch im Str. spinosum. Während bei den Kontrollproben der Durchschnittswert der basalen Zellschicht bei allen Zeiteinheiten signifikant über dem des Str. spinosum lag, war dies in den Verumproben nur für 15, 30 und 180 Min. zu beobachten. Die übrigen Werte lagen zwar auch über denen des Str. spinosum, jedoch war hierbei  $p \geq 0,05$  und somit nicht signifikant. Die diesbezüglichen Unterschiede zwischen den Zellschichten nahmen durch die Bleiinkubation demnach ab, wobei sich kein eindeutig zeitlicher Zusammenhang darstellte.

### 3 Ergebnisse



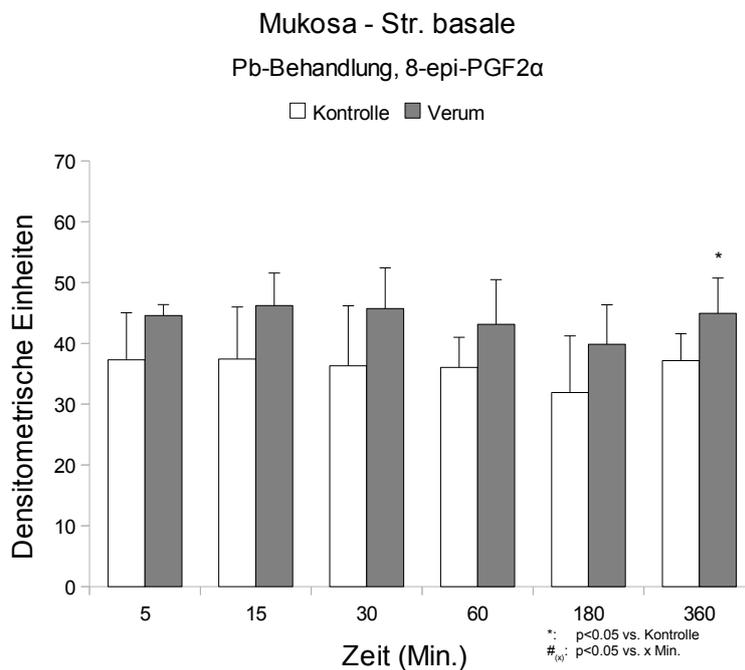
**Abbildung 3.1:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von aktiver Caspase-3 im Str. basale der in Blei inkubierten Kontroll- und Verumproben.



**Abbildung 3.2:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von aktiver Caspase-3 im Str. spinosum der in Blei inkubierten Kontroll- und Verumproben.

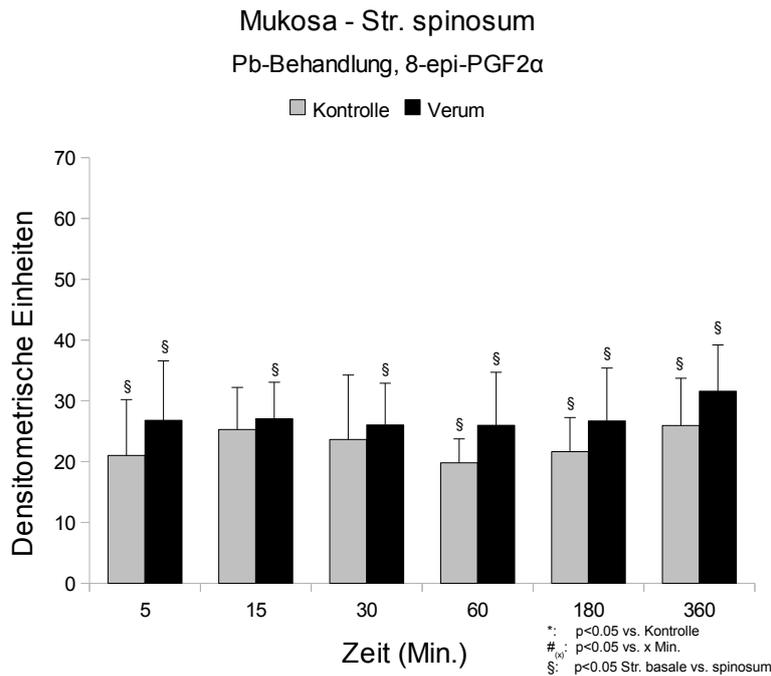
### 3.2.2 8-epi-PGF<sub>2α</sub>

Deutliche Einflüsse auf die Bildung von Isoprostanen unter Bleiinkubation fielen nicht auf (s. Abbildungen 3.3, 3.4). Zwar lagen sämtliche Durchschnittswerte der Verumproben sowohl im Str. basale als auch im Str. spinosum über denen der Kontrollproben, jedoch war der Unterschied nur im Str. basale nach 360-minütiger Inkubation signifikant. Hier lag der 360-Min.-Verumwert 20,9 % über dem Kontrollwert. In den Kontrollproben fanden sich keine signifikanten Mittelwertunterschiede im Str. basale oder spinosum, die Menge an gebildetem 8-epi-PGF<sub>2α</sub> blieb hier über die Zeit also konstant. Die Mittelwerte der Verumproben unterschieden sich untereinander ebenfalls nur mit  $p \geq 0,05$ . Der 360-Min.-Wert aus dem Str. basale war zwar signifikant gegenüber den Kontrollproben verändert, nicht jedoch gegenüber den Verumwerten bei anderen Zeiteinheiten. Nach Bleiinkubation kam es zu einer deutlicheren Unterscheidung der 8-epi-PGF<sub>2α</sub>-Menge zwischen Str. basale und spinosum. Unter Kontrollbedingungen bestanden bei vier von sechs Zeiteinheiten, nach Bleiinkubation bei allen geprüften Zeiteinheiten signifikante Unterschiede.



**Abbildung 3.3:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von 8-epi-PGF<sub>2α</sub> im Str. basale der in Blei inkubierten Kontroll- und Verumproben.

### 3 Ergebnisse

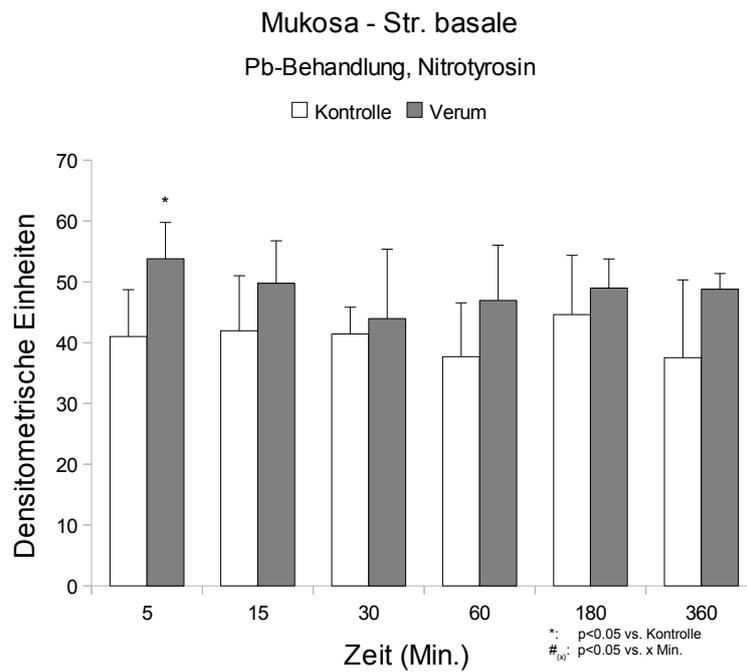


**Abbildung 3.4:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von 8-epi-PGF<sub>2α</sub> im Str. spinosum der in Blei inkubierten Kontroll- und Verumproben.

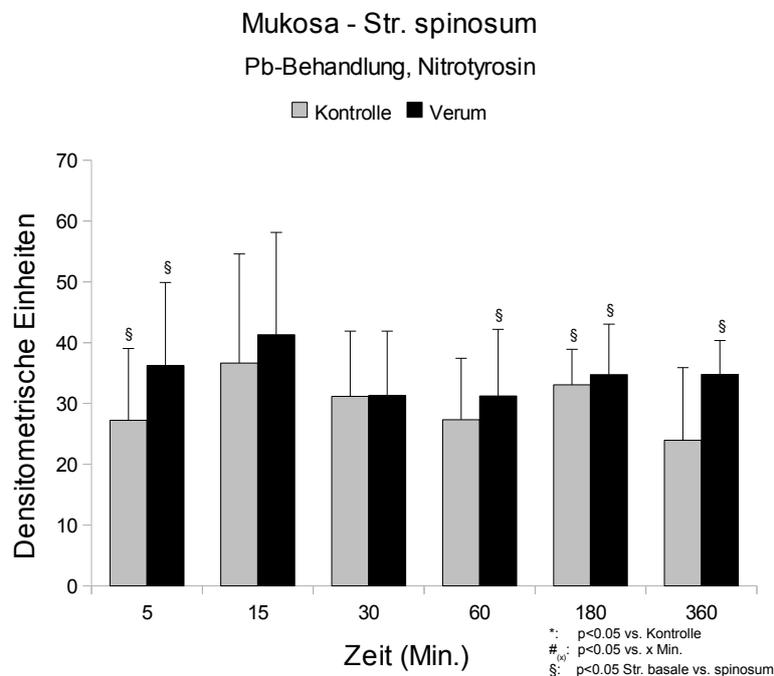
#### 3.2.3 Nitrotyrosin

Insgesamt waren die Veränderungen ebenfalls eher unauffällig (s. Abbildungen 3.5, 3.6). Ein mit  $p < 0,05$  erhöhter Verumwert fand sich nur im Str. basale nach 5-minütiger Inkubation. Hier lag der Verumwert 31,2% über der Kontrolle. Alle weiteren Verumwerte lagen zwar im Str. basale und spinosum über den Kontrollwerten, weitere signifikante Unterschiede bestanden jedoch nicht. Auch der Vergleich innerhalb der Verum- und Kontrollproben ergab keine signifikanten Veränderungen im zeitlichen Verlauf. Es kam hierbei unter Kontrollbedingungen also zu keiner ausgeprägten Änderung der Parameter über die Zeit. Die Bleiinkubation bewirkte beim Vergleich von Str. basale und spinosum, ähnlich wie beim 8-epi-PGF<sub>2α</sub>, eine Zunahme der signifikanten Unterschiede von zwei von sechs Zeitpunkten auf vier von sechs Zeitpunkten.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.5:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von Nitrotyrosin im Str. basale der in Blei inkubierten Kontroll- und Verumproben.



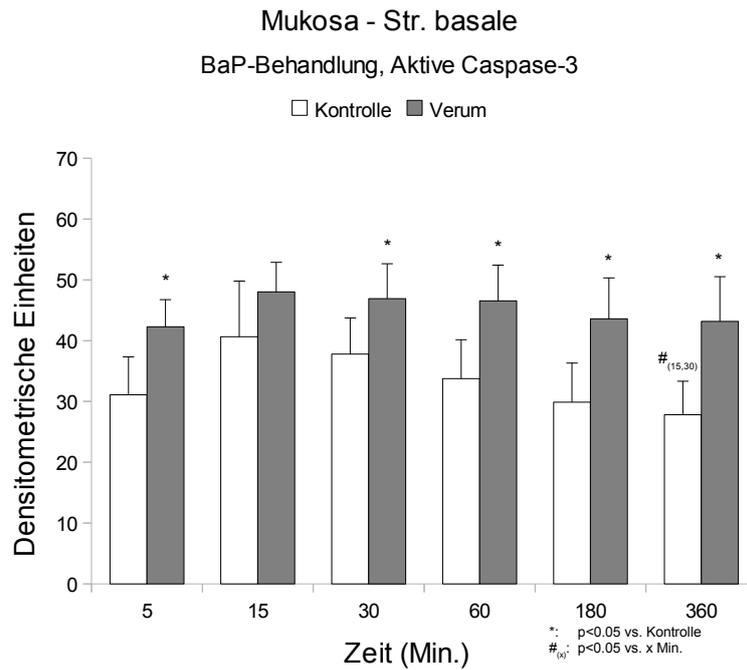
**Abbildung 3.6:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von Nitrotyrosin im Str. spinosum der in Blei inkubierten Kontroll- und Verumproben.

## 3.3 Benzo[ $\alpha$ ]pyren

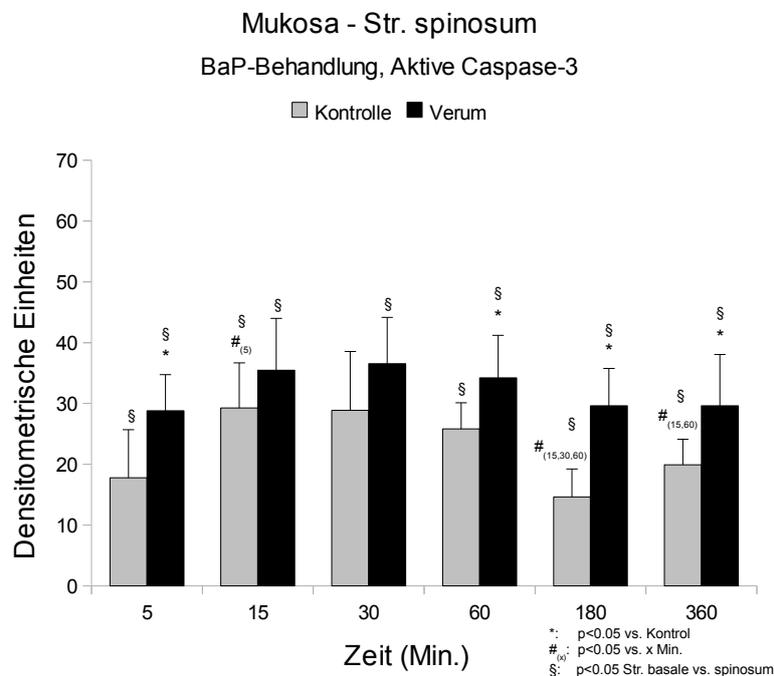
### 3.3.1 Aktive Caspase-3

Die Inkubation in Benzo[ $\alpha$ ]pyren führte zu deutlichen Veränderungen der Caspase-3-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollproben (s. Abbildungen 3.7, 3.8). Für beide untersuchten Zellschichten lagen die Mittelwerte für jede Zeiteinheit in den Verumproben über denen der Kontrollproben. Signifikant waren diese Unterschiede vor allem bei längeren Inkubationszeiten. Neben dem 5-Min.-Wert waren in beiden Zellschichten die Werte für 60, 180 und 360 Min. mit  $p < 0,05$  erhöht. Im Str. basale war zusätzlich der 30-Min.-Wert signifikant erhöht gegenüber der Kontrolle. Es zeigte sich also ein ähnlicher Verlauf für das Str. basale und Str. spinosum. Im Str. basale lag der 5-Min.-Wert 36,0 % über dem Kontrollwert, der 60-Min.-Wert 37,9 % darüber. Der Unterschied stieg bis zum 360-Min.-Wert auf 55,3 % an. Im Str. spinosum betrug der Unterschied bei 5 Min. 62,1 %. Von 32,6 % bei 60 Min. kam es dann zu einem starken Anstieg auf 102,5 % bei 180 Min., ehe der Unterschied bei 360 Min. wieder auf 48,9 % abfiel. Unter Kontrollbedingungen alleine zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede über die Zeit in beiden Zellschichten. Im Str. spinosum war bereits der 15-Min.-Wert mit  $p < 0,05$  erhöht gegenüber dem 5-Min.-Wert. Die folgenden Werte für 30 und 60 Min. waren jedoch nicht mehr auffällig verändert, bevor es zu einem deutlichen Abfall der Caspase-3-Aktivität bei 180 und 360 Min. kam. Beide Werte lagen signifikant unter den vorhergehenden Werten. Ein ähnlicher Kurvenverlauf, mit initialem Anstieg und folgendem Abfall bei längeren Inkubationszeiten, zeigte sich auch für die Werte des Str. basale, wobei hier nur der Abfall des 360-Min.-Wertes im Vergleich zu den 15- und 30-minütigen Werten signifikant war. Ein Anstieg nach 15 Min. war zwar auch zu erkennen, jedoch nur mit  $p \geq 0,05$  gegenüber 5 Minuten. Sowohl für die Verum- als auch Kontrollbedingungen wurden signifikant höhere Caspase-3-Aktivitäten im Str. basale im Vergleich zum Str. spinosum festgestellt. Die einzige Ausnahme bildeten die 30-Min.-Werte unter Kontrollbedingungen.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.7:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von aktiver Caspase-3 im Str. basale der in BaP inkubierten Kontroll- und Verumproben.

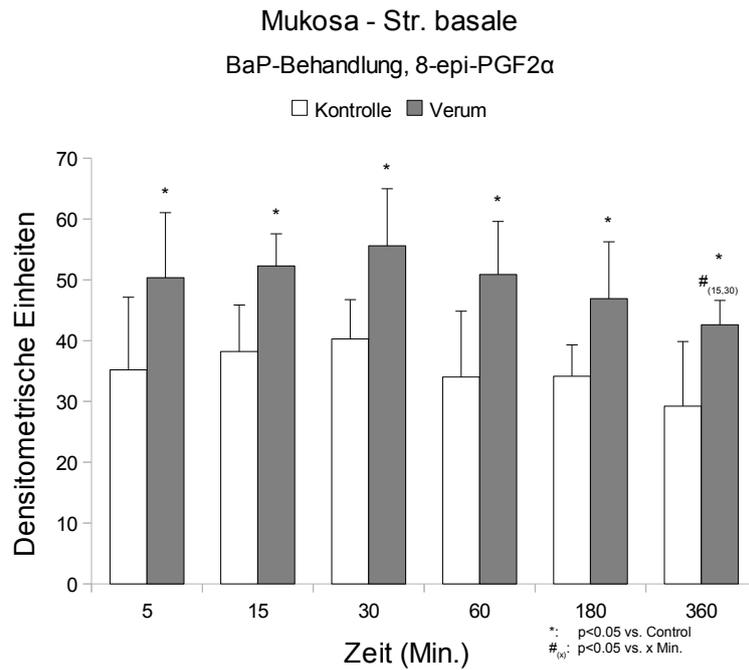


**Abbildung 3.8:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von Nitrotyrosin im Str. spinosum der in BaP inkubierten Kontroll- und Verumproben.

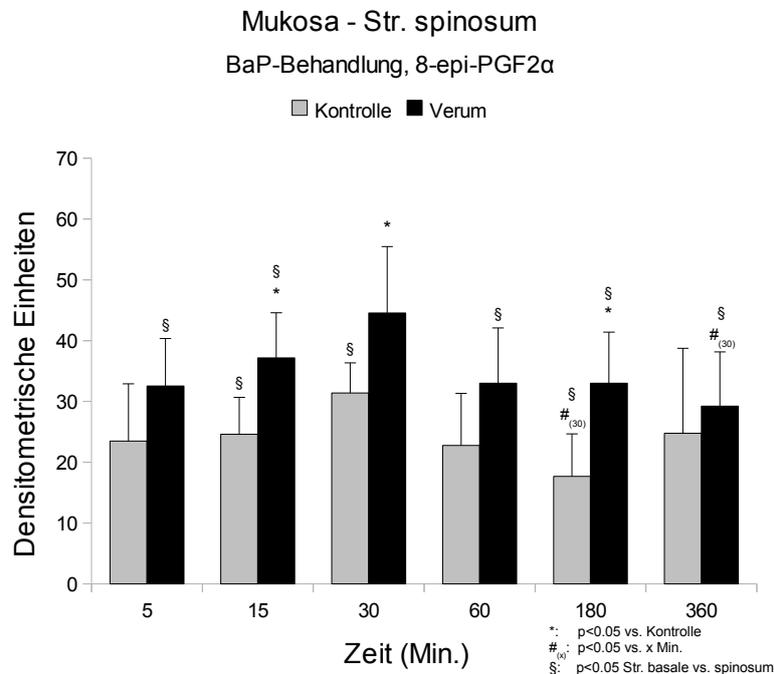
### 3.3.2 8-epi-PGF<sub>2α</sub>

Es zeigten sich nach Inkubation in Benzo[α]pyren klare Veränderungen in der gebildeten 8-epi-PGF<sub>2α</sub>-Menge, vor allem unter Verumbedingungen (s. Abbildungen 3.9, 3.10). Für das Str. basale fanden sich zu jedem untersuchten Zeitpunkt signifikant erhöhte Werte unter Verumbedingungen im Vergleich zu den Kontrollproben. Der Unterschied schwankte dabei über die Zeit zwischen ca. 36% – 49% höheren Werten für die Verumproben. Bemerkenswert war hierbei lediglich, dass die Durchschnittswerte im Laufe der Zeit abnahmen. Deutlich wurde dies besonders im Verlauf von 30 zu 360 Min., der Wert für 360 Min. lag signifikant unter den Werten nach 15-, bzw. 30-minütiger Inkubation. Im Str. spinosum lagen die Verumdurchschnittswerte zwar auch kontinuierlich über den Kontrollwerten, signifikante Unterschiede bestanden jedoch nur bei 15, 30 und 180 Min. Zu betonen ist der signifikante Abfall der Verumwerte bei längerer Inkubationsdauer, ähnlich wie im Str. basale. Der 360-Min.-Wert war mit  $p < 0,05$  erniedrigt gegenüber dem 30-Min.-Wert. Während die Kontrollwerte im Str. basale zu keinen eindeutigen Veränderungen führten, kam es im Str. spinosum zu einem signifikanten Abfall des 180-Min.-Wertes im Vergleich zum 30-Min.-Wert. Alle weiteren Werte unterschieden sich nur mit  $p \geq 0,05$ . Insgesamt kam es unter Verumbedingungen häufiger zu signifikanten Unterscheidungen zwischen der 8-epi-PGF<sub>2α</sub>-Menge in Str. basale und Str. spinosum als unter Kontrollbedingungen.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.9:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von 8-epi-PGF<sub>2α</sub> im Str. basale der in BaP inkubierten Kontroll- und Verumproben.

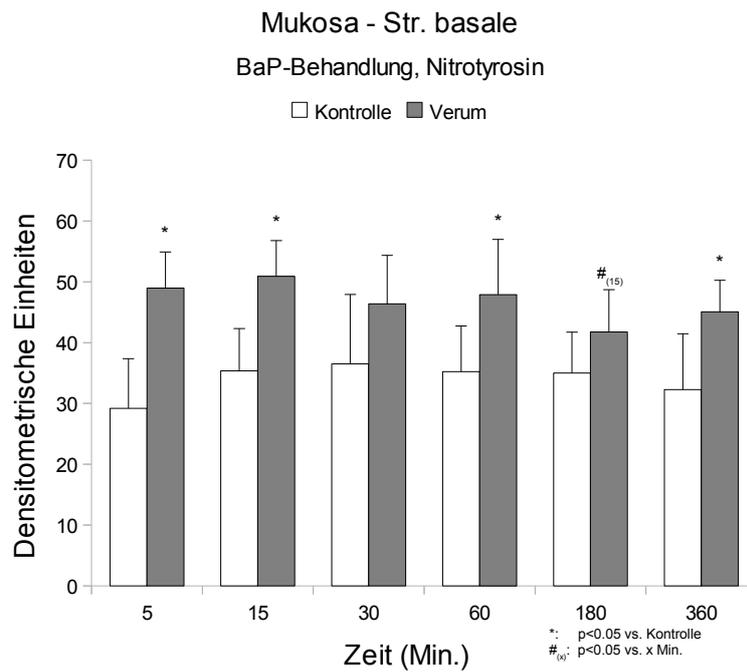


**Abbildung 3.10:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von 8-epi-PGF<sub>2α</sub> im Str. spinosum der in BaP inkubierten Kontroll- und Verumproben.

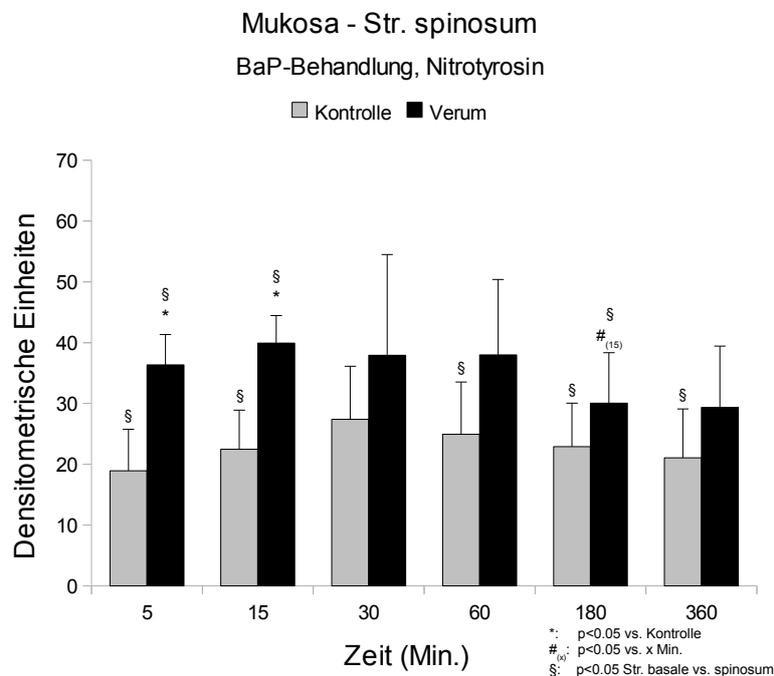
### 3.3.3 Nitrotyrosin

Im Str. basale fielen insbesondere nach 5 und 15 Minuten signifikante Veränderungen der Nitrotyrosinmenge unter Verumbedingungen im Vergleich zu den Kontrollproben auf (s. Abbildungen 3.11, 3.12). Der 5-Min.-Wert lag 67,7 %, der 15-Min.-Wert 44,0 % über den jeweiligen Kontrollwerten. Weitere signifikante Veränderungen bestanden bei 60 und 180 Minuten, mit einem Unterschied von 36,0 % und 39,6 %. Auffällig war weiterhin der signifikante Abfall des Verumwertes nach 180-minütiger Inkubation im Vergleich zum 15-Min.-Wert. Diese besonders deutlichen Veränderungen bei kurzen Inkubationszeiten fanden sich auch im Str. spinosum. Hier waren lediglich die Werte nach 5- und 15-minütiger Inkubation in Benzo[ $\alpha$ ]pyren mit  $p < 0,05$  gegenüber den Kontrollwerten erhöht, nach 5 Min. um 92,1 % und nach 15 Min. um 77,6 %. Die weiteren Werte unterschieden sich nicht nennenswert von den Kontrollwerten, der 180-Min.-Wert war jedoch signifikant gegenüber dem 15-Min.-Verumwert erniedrigt, was ebenfalls dem Verlauf im Str. basale entsprach. Ein zeitabhängiger Einfluss der Kontroll- oder Verumbedingungen auf die Nitrotyrosinmenge im Str. spinosum fiel nicht auf, die Werte unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt mit  $p < 0,05$  voneinander. Bei Betrachtung des Unterschiedes zwischen Str. basale und Str. spinosum war auffällig, dass dieser durch Benzo[ $\alpha$ ]pyreninkubation abnahm. Unter Kontrollbedingungen bestand noch bei fünf von sechs Zeitpunkten ein signifikanter Unterschied, nach Inkubation bestanden nur noch bei 5, 15 und 180 Min. signifikante Unterschiede. Die Unterschiede bei 60 und 360 Min. fanden sich nicht mehr.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.11:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von Nitrotyrosin im Str. basale der in BaP inkubierten Kontroll- und Verumproben.

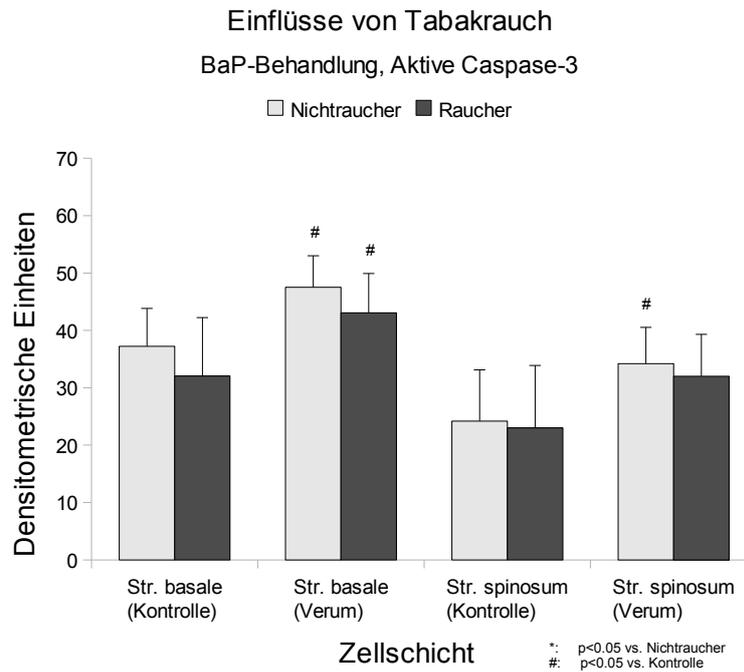


**Abbildung 3.12:** Darstellung der zeitabhängigen Entwicklung der mittleren Grauwerte nach immunhistochemischer Färbung von Nitrotyrosin im Str. spinosum der in BaP inkubierten Kontroll- und Verumproben.

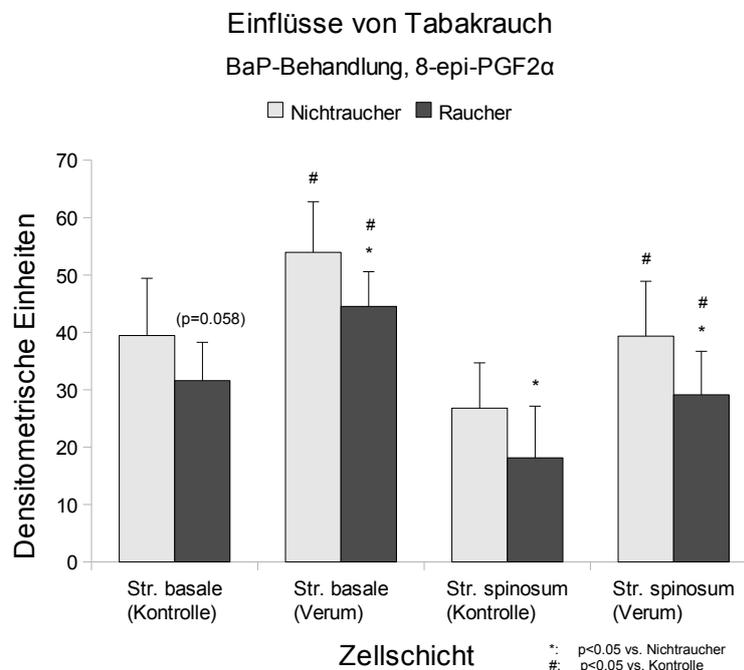
### 3.4 Einflüsse von Tabakrauch

Zur Analyse des Einflusses des Rauchverhaltens auf die Ergebnisse wurden Proben von Rauchern und Nichtrauchern verglichen (s. Abbildungen 3.13, 3.14 und 3.15). Aufgrund der geringen Probenzahl ( $n = 4$ ) von Rauchern unter den in Blei inkubierten Proben wurden hierfür keine Vergleiche durchgeführt. Beim Vergleich der in BaP-inkubierten Proben zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Raucher- und Nichtraucher-Proben. Für die Aktivität von Caspase-3 konnten keinerlei Differenzen mit  $p < 0,05$  aufgezeigt werden, während sowohl die Nitrotyrosin- als auch die 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Mengen bei Rauchern signifikant unter denen bei Nichtrauchern lagen. Die Werte der Raucher befanden sich jedoch auch für Caspase-3, allerdings mit  $p \geq 0,05$ , unter denen der Nichtraucher. Für 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  bestanden Unterschiede mit  $p < 0,05$  für beide Zellschichten der Verumproben und für das Str. spinosum der Kontrollproben, während der Unterschied im Str. basale der Kontrollproben mit  $p = 0,058$  knapp nicht signifikant war. Bei den Nitrotyrosinuntersuchungen zeigten sich ebenfalls signifikante Unterschiede in beiden Zellschichten der Verumproben und diesmal im Str. basale der Kontrollproben, während der Unterschied im Str. spinosum nicht signifikant war. Betrachtet man den Unterschied zwischen Verum- und Kontrollproben getrennt nach Raucher- und Nichtraucherproben, so fällt auf, dass die Verumproben von Nichtrauchern in beiden Zellschichten und für alle drei untersuchten Biomarker signifikant erhöht sind. Bei den Raucherproben ist dies im Str. basale auch für alle drei Marker der Fall, im Str. spinosum trifft dies jedoch nur für 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  zu. Für aktive Caspase-3 und Nitrotyrosin unterscheiden sich die Werte im Str. spinosum von Raucherproben nicht signifikant zwischen Verum und Kontrolle, liegen in der Verumprobe aber trotzdem jeweils über den Kontrollwerten.

### 3 Ergebnisse

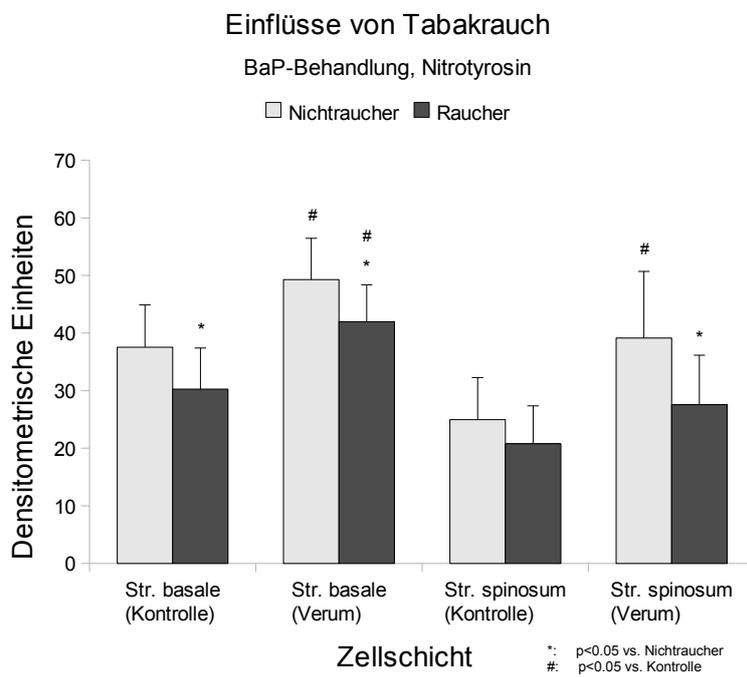


**Abbildung 3.13:** Einfluss von Tabakrauch auf die Resultate der Immunhistochemie für aktive Caspase-3 in beiden Zellschichten bei den in BaP inkubierten Kontroll- und Verumproben unabhängig von der Inkubationszeit.



**Abbildung 3.14:** Einfluss von Tabakrauch auf die Resultate der Immunhistochemie für 8-epi-PGF<sub>2α</sub> in beiden Zellschichten bei den in BaP inkubierten Kontroll- und Verumproben unabhängig von der Inkubationszeit.

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 3.15:** Einfluss von Tabakrauch auf die Resultate der Immunhistochemie für Nitrotyrosin in beiden Zellschichten bei den in BaP inkubierten Kontroll- und Verumproben unabhängig von der Inkubationszeit.



## 4 Diskussion

### 4.1 Auswirkungen der Inkubation in Blei auf die untersuchten Biomarker

Blei kann sowohl zellschädigende als auch mutagene und kanzerogene Einflüsse auf menschliche Organe ausüben. Zu den exponierten Organen zählt hierbei insbesondere die Mundschleimhaut, welche sowohl inhalativer als auch peroraler Bleiaufnahme ausgesetzt ist.

Unter chronischer Bleiexposition konnten Veränderungen des Apoptoseverhaltens von oralen Epithelzellen aufgezeigt werden. In den Mukosazellen von Maler- und Lackierarbeitern fanden sich deutlich erhöhte Werte für Karyolyse und -rrhexis als Apoptosemarker [Khan et al. (2010)]. Diese Werte werden durch die nach Blei-inkubation im Organbad gefundenen, deutlich zeitabhängigen Veränderungen der Menge aktiver Caspase-3 gestützt. Die bleiexponierten Proben zeigten signifikante, zeitabhängige Unterschiede zwischen Verum- und Kontrollproben. Dabei bewirkten längere Inkubationszeiten einen größeren Unterschied sowohl für das Str. basale als auch das Str. spinosum. Die Aktivität von Caspase-3 blieb innerhalb der Kontrollproben über den Zeitverlauf konstant. Der Anstieg nach längerfristiger Inkubation ist somit auf die Bleiexposition und nicht auf Organbad-bedingte Veränderungen zurückzuführen. Die erhöhten Apoptosemarker nach längerer Bleiexposition decken sich somit mit den von Khan et al. (2010) publizierten Daten. Weitere Untersuchungen zeigten ebenfalls eine Apoptoseinduktion durch Blei in anderen Organen. Besonders gut untersucht ist der Einfluss von Blei auf die Apoptose in retinalen Zellen [Lidsky und Schneider (2003)]. Hierzu liegen Daten aus Zellkulturen und Tiermodellen vor. Im Zellkulturmodell isolierter Retinazellen von Ratten führte  $1 \mu\text{M Pb}_2^+$  zu einem deutlichen Anstieg von apoptotisch veränderten Zellen und HMW-Fragmenten<sup>23</sup> der DNA und zu vermehrter Caspase-3-Aktivität [He et al. (2000)]. Diese Ergebnisse zeigten sich ebenfalls im Tiermodell nach 6-wöchiger Bleiexposition. Es kam zu typisch apoptotischen Veränderungen retinaler Zellen bei adulten

---

<sup>23</sup>HMW = High molecular weigh. Diese hochmolekularen DNA-Fragmente entstehen typischerweise relativ früh während der Apoptose [Slagsvold et al. (2000)].

## 4 Diskussion

Ratten, in noch verstärktem Maße bei neugeborenen Ratten [Fox et al. (1997)]. Interessant ist, dass bei den in dieser Studie gewählten, im Vergleich eher kurzen Inkubationszeiten, bereits signifikante Veränderungen der Caspase-3-Aktivität auftraten. Die schädliche Bleiwirkung scheint also nicht nur nach chronischer oder längerer Exposition die Apoptose zu stimulieren, sondern dies geschieht bereits bei Inkubationszeiten von wenigen Stunden. Für den Mechanismus, über welchen Blei die apoptotischen Veränderungen initiiert, erscheinen mehrere Alternativen möglich. Einerseits kann Blei zu einer Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels führen oder einen solchen imitieren, auf der anderen Seite scheint die Bildung von ROS beteiligt zu sein. Im Zentrum des Geschehens stehen auf jeden Fall die Mitochondrien. Hier kann Blei ähnlich wie Calcium eine porenöffnende Wirkung entfalten und die Cytochrom C-Freisetzung ermöglichen [Pulido und Parrish (2003)]. Dabei bindet Blei wahrscheinlich an eine Metallbindestelle für zweiwertige Metallionen am mitochondrialen PTP-Protein<sup>24</sup>, an die auch Calcium binden kann, und löst so die Freisetzung von Cytochrom C aus [He et al. (2000)]. Weiterhin kommt es zu einer BAX-Translokation ins Mitochondrium, was zu einer Abnahme des mitochondrialen Membranpotentials und der Freisetzung von Cytochrom C führt. BAX sensibilisiert dabei die Mitochondrien gegenüber einer  $\text{Ca}_2^+$ -induzierten Öffnung der membranständiger Poren, so dass es bereits bei geringerer  $\text{Ca}_2^+$ -Konzentration zur Cytochrom C-Freisetzung kommt [He et al. (2003)]. Die Blei-induzierte Bildung von ROS vermag ebenfalls die Apoptoseauslösung zu erleichtern. Auch hierbei spielt die Calcium-vermittelte Porenöffnung der Mitochondrienmembran eine wichtige Rolle. ROS-bedingt kommt es weiterhin zur Oxidation von Cardiolipin, an welches Cytochrom C innerhalb der Mitochondrien gebunden ist. Nach Oxidation nimmt diese Bindungsstärke ab und die Cytochrom C-Freisetzung wird erleichtert. [Orrenius (2007)].

Auf die Blei-vermittelte Induktion von oxidativem und nitrogenem Stress wurde bereits initial eingegangen. Einerseits kommt es zur vermehrten Bildung von ROS und RNS. Hierbei sind sowohl die Fenton-Reaktion als auch die pro-oxidative Wirkung von erhöhten ALA-Leveln als Mechanismen zur ROS-Entstehung beschrieben worden [Leonard et al. (2004); Hermes-Lima et al. (1991)]. Andererseits wird eine verminderte zelluläre Abbaufunktion von ROS und RNS nach Bleiexposition angeführt, wofür erniedrigte Aktivitätslevel von Catalase, SOD und GSH-Peroxidase verantwortlich sind [Farmand et al. (2005); Patrick (2006b)]. Die Veränderungen von 8-epi-PGF<sub>2α</sub> und Nitrotyrosin nach Organbadinkubation waren zwar nicht so eindrucksvoll wie für aktivierte Caspase-3, es zeigten sich aber dennoch eindeuti-

---

<sup>24</sup>PTP = Permeability transition pore

## 4 Diskussion

ge Hinweise für die Bildung von oxidativem und nitrogenem Stress. Hervorzuheben ist in erster Linie der signifikante Anstieg der 8-epi-PGF<sub>2α</sub>-Menge nach 360-minütiger Inkubation, während kürzere Inkubationszeiten noch ohne nennenswerten Effekt blieben. Diese Beobachtung, vor allem das Ansteigen nach langer Inkubationszeit, korreliert dabei mit den von Gurer-Orhan et al. (2004) beschriebenen Veränderungen nach chronischer Bleiexposition: bei Arbeitern in einer Batteriefabrik fanden sich sowohl eine Korrelation von Blei-bedingten Symptomen mit Lipidperoxidations-Markern als auch eine Erhöhung für die untersuchten ROS-Marker. Die signifikante Erhöhung des 5-Min.-Wertes in den Nitrotyrosin-Untersuchungen ist hiermit jedoch nicht zu erklären, auch bleibt hier ein Anstieg nach längerer Inkubationsdauer aus. Gurer-Orhan et al. (2004) untersuchten zwar nicht explizit die Nitrotyrosinlevel, bei gemessenem oxidativem Stress ist eine Mitentstehung von nitrogenem Stress und Proteinnitrosierungen jedoch nicht unwahrscheinlich. Möglicherweise war die maximale Inkubationsdauer von 360 Min. zu kurz gewählt um einen Anstieg mit der Zeit zu detektieren. Man kann aufgrund der Ergebnisse also nur von einem kurzzeitigen Einfluss von Blei auf die Nitrotyrosinbildung schließen, welcher bei  $\geq 15$  Min. nicht mehr auftrat, möglicherweise aufgrund zellulärer Ausgleichsmechanismen. Eine weitere Erklärung des isoliert erhöhten 5-Min.-Wertes stellen Veränderungen dar, die bereits durch Operation, Probenentnahme oder Transport entstanden und bei Inkubationsdauern  $\geq 15$  Min. bereits kompensiert waren. Auch für diese beiden Parameter (8-epi-PGF<sub>2α</sub> und Nitrotyrosin) fanden sich keine signifikanten Änderungen innerhalb der Kontrollproben über die Zeit, so dass auch hier von einem Effekt durch Blei ausgegangen werden kann und Veränderungen aufgrund des Versuchsaufbaus unwahrscheinlich erscheinen.

Die hier im Organbad verwendete Konzentration von 100  $\mu$ M Pb-II-Acetat lag in einem Bereich, für den bereits Veränderungen an anderen Organ- oder Zellsystemen gezeigt wurde. Shabani und Rabbani (2000) verwendeten die gleiche Konzentration (100  $\mu$ M) für Untersuchungen an Alveolarmakrophagen. Sie lag allerdings deutlich über den von He et al. (2000) verwendeten 1  $\mu$ M, welche aber zur Inkubation von Zellkulturen und nicht von zusammenhängenden Gewebestücke verwendet wurde. Die vom CDC<sup>25</sup> empfohlene Maximaldosis von 10 ng/ml (ca. 0.48 mM) im kindlichen Blut wurde nicht überschritten, es konnten jedoch auch schon unterhalb dieser Schwelle toxische Effekte auf das sich entwickelnde Nervensystem von Kindern gezeigt werden [Lidsky und Schneider (2003); Garza et al. (2006)].

---

<sup>25</sup>CDC = Centers for Disease Control and Prevention

## 4.2 Benzo[ $\alpha$ ]pyren-bedingte Änderungen der untersuchten Biomarker

Eine Hauptbelastungsquelle der menschlichen Mundschleimhaut mit Benzo[ $\alpha$ ]pyren ist Tabakrauch, eine Zigarette enthält ca. 9 ng Benzo[ $\alpha$ ]pyren [Pfeifer et al. (2002)]. Eine Schleimhautexposition gegenüber BaP erfolgt ferner durch den Genuss gegrillter Nahrungsmittel und die Inhalation von Autoabgasen. Die lipophile Struktur ermöglicht dabei eine gute Aufnahme in die Zellen und erleichtert die dortige Akkumulation.

Die in dieser Studie verwendete Konzentration von 1  $\mu$ M Benzo[ $\alpha$ ]pyren ist den von Costa et al. (2010) verwendeten 5  $\mu$ M ähnlich, so dass diese Konzentration zur Untersuchung von Biomarkern für Apoptose und oxidativen und nitrogenen Stress geeignet scheint.

Die BaP-Inkubation im Organbad zeigte eindeutige Effekte auf Caspase-3 und somit auf die Apoptoseaktivität der Zellen. Sowohl für das Str. basale als auch Str. spinosum zeigten sich signifikante und zeitlich zunehmende Unterschiede bei Inkubationen  $\geq 30$  Min, bzw.  $\geq 60$  Min. Ebenfalls signifikant verändert war die Menge aktiver Caspase-3 nach 5 Min. Zwar konnten Schwartz et al. (2004) zeigen, dass Dibenz[a,l]pyrene, ein weiterer PAK, bei Hamstern zur Induktion von Apoptose und zur malignen Entartung von oralen Mucosazellen führte, eine Apoptosesteigerung war trotzdem nicht unbedingt zu erwarten, da die Effekte von BaP auf Apoptosevorgänge durchaus gegensätzlich ausfallen können. Insgesamt beschreibt jedoch die Mehrzahl der Autoren eine Apoptoseinduktion, ähnlich wie in den vorliegenden Versuchsergebnissen. In normalen ektozervikalen Epithelzellen bewirken PAK eine Verminderung der Zellproliferation und Erhöhung der Apoptoserate. Im Vergleich dazu kommt es in Zellen mit inaktiviertem p53 zu den gegensätzlichen Effekten, so dass p53 in der PAK-vermittelten Apoptose eine Schlüsselrolle zuzukommen scheint [Rorke et al. (1998)]. In retinalen Pigmentepithelzellen konnte durch Zugabe von Memantine oder Genistein eine Reduktion der BaP-induzierten Apoptose erreicht werden [Mansoor et al. (2010)]. Pro-apoptotische Effekte von Benzo[ $\alpha$ ]pyren wurden ebenfalls für epitheliale Zellen aus Rattenlebern gezeigt. Nach 72 h in 50 nM BaP kam es zu einem deutlichen Anstieg der Caspase-3-Aktivität und DNA-Fragmentierung [Huc et al. (2003)]. Dabei scheint die Änderung des zellulären pH-Wertes von Bedeutung zu sein, während bei Hepa1c1c7 (murine Hepatomzelllinie), für die zwar auch eine Apoptoseinduktion gezeigt wurde, die BAX-Translokation ins Mitochondrium vorrangig zu sein scheint [Holme et al. (2007)]. Dies verdeutlicht, dass BaP auf mehreren Wegen zur Apoptoseaktivierung beitragen kann. Diese beschrieb-

nen Daten unterstützen die im Organbadversuch gezeigte Aktivitätssteigerung von Caspase-3. Im Gegensatz dazu bewirkte eine BaP-Exposition von Lungengewebe einen signifikanten Abfall der Apoptoserate [da Silva et al. (2010)]. Diese gegensätzlichen BaP-Effekte zeigen sich besonders deutlich bei der Wirkung auf humane Lymphozyten. Dort wirken höhere BaP-Dosen immunotoxisch und lösen Apoptose aus, während geringere Konzentrationen eine Verstärkung von Immunreaktionen und wachstumsfördernden Signalwegen hervorrufen. Eine konzentrationsabhängige Modifikation von Signaltransduktionswegen erklärt diese Beobachtungen [Burchiel und Luster (2001)].

Der Mechanismus, über welchen Benzo[ $\alpha$ ]pyren Apoptose auslöst ist also keineswegs einheitlich, sondern es scheinen mehrere Möglichkeiten zu existieren. Ein wichtiger Schritt zur Toxizität von Benzo[ $\alpha$ ]pyren ist die metabolische Aktivierung durch CYP450-Enzyme. Dies geschieht auch in oralen Epithelzellen [Port et al. (2004)]. Hierbei entstehen reaktive Metaboliten, die zur DNA-Adduktbildung fähig sind und die Zelle somit schädigen können. Sollten diese DNA-Fehler nicht repariert werden, kommt es zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose oder aber zur Mutation und kanzerogenen Entartung [Pfeifer et al. (2002)]. In diesem Zusammenhang ist weiterhin das p53-Tumorsuppressorgen von Bedeutung, welches durch Benzo[ $\alpha$ ]pyren in seiner Aktivität und Funktion verändert werden kann. Analog zu Blei verfügt auch BaP über das Potential zur Generierung von ROS. In diesem Fall ist dies insbesondere mit sog. BaP-Quinonen verbunden. Vermittelt durch diese ROS verfügt BaP auch über das Potential zur Induktion von Zellvermehrung und -wachstum, indem intrazelluläre Signalwege modifiziert und der zelluläre Calciumhaushalt beeinflusst werden (bzgl. Benzo[ $\alpha$ ]pyren und Apoptose s.a. 1.6) [Burchiel und Luster (2001); Burdick et al. (2003)].

Auffällig an den Ergebnissen ist, dass bereits innerhalb der Kontrollbedingungen signifikante Unterschiede über die Zeit auftraten. Im Str. basale kam es zu einem signifikanten Abfall des Wertes nach 360 Min. im Vergleich zur 15- und 30-minütigen Inkubation. Im Str. spinosum traten ebenfalls signifikante Absenkungen der 180- und 360-Min.-Werte auf. Zusätzlich kam es hier von 5 zu 15 Min. zu einem signifikanten, initialen Anstieg der Caspase-3-Aktivität. In beiden untersuchten Zellschichten zeigten die Änderungen also einen ähnlichen zeitlichen Verlauf, während solche Differenzen in den Blei-Kontrollproben nicht beobachtet wurden. Es ist also von einem Einfluss von Dimethylsulfoxid auf die Apoptoserate auszugehen. DMSO ist ein in der Laborarbeit häufig verwendetes Lösungsmittel für hydrophobe Substanzen, welches zugleich aber auch eigene Einflüsse auf Zellen ausübt. Aufgrund seiner anti-inflammatorischen Wirkung wurde es unter anderem bereits zur klini-

schen Therapie der rheumatoiden Arthritis und im Tiermodell zur Therapie der Arteriosklerose eingesetzt. Interessant sind vor allem die von Laskar et al. (2010) beschriebenen anti-apoptotischen Wirkungen von DMSO bei zeitgleicher Zugabe einer pro-apoptotischen Substanz. Hierzu trägt unter anderem eine ROS-eliminierende Wirkung und die Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials bei. Möglicherweise ist DMSO somit auch teilweise verantwortlich für die anti-apoptotische Wirkung von darin gelösten Apoptoseinhibitoren [Assimakopoulos et al. (2009)]. Konträr dazu werden jedoch auch pro-apoptotische und zellschädigende Effekte von DMSO beschrieben, wobei aufgrund der aktuellen Datenlage von Dosis-abhängigen Effekten ausgegangen werden muss. Für Konzentrationen von 2,5 % DMSO konnte die Induktion von Apoptose gezeigt werden, während bei 0,5 % – 1,5 % DMSO keine vermehrte Apoptose auftrat. Die in den BaP-Kontrollproben verwendeten 0,01 % DMSO liegen also weit unterhalb des Schwellenwertes, der eigene apoptotische Veränderungen auslösen kann [Laskar et al. (2010)]. Auch wenn bereits unter Kontrollbedingungen Veränderungen auftraten, so lagen die gemessenen Werte unter BaP-Behandlung trotzdem zu allen Zeitpunkten über den Kontrollwerten. Für diese Unterschiede zwischen den Verum- und Kontrollproben lag  $p$  abhängig von der untersuchten Zellschicht für fünf, bzw. vier von sechs Zeitpunkten bei kleiner 0,05. Es bestand also ein Effekt, der trotz der Einflüsse von DMSO eindeutig auf Benzo[ $\alpha$ ]pyren zurückgeführt werden kann.

Bei Betrachtung der Marker für oxidativen und nitrogenen Stress, 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und Nitrotyrosin, fallen nach Benzo[ $\alpha$ ]pyren-Inkubation ebenfalls interessante, zeitabhängige Veränderungen auf. BaP bewirkte im Falle des 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  einen Abfall der gemessenen Werte nach längerer Inkubation. Der 360-Min.-Wert war jeweils signifikant gegenüber dem 30-Min.-Wert erniedrigt. Die Nitrotyrosin-Werte waren für beide Zellschichten vor allem nach kurzer Inkubation (5 und 15 Min) signifikant gegenüber den Kontrollwerten erhöht. Es zeigte sich dann eine Abnahme der Werte innerhalb der Verumgruppe über die Zeit. BaP bewirkte unter den hier verwendeten Bedingungen insgesamt einen Anstieg beider verwendeten ROS- und RNS-Marker gegenüber den Kontrollen, wobei die Stärke dieses Effekts mit zunehmender Zeit nachließ.

Daten über die Induktion von ROS und RNS durch Benzo[ $\alpha$ ]pyren konnten bereits in anderen Geweben aufgezeigt werden. Die Exposition von menschlicher Haut mit 2  $\mu$ M BaP für 18 h führte zu signifikanten Anstiegen von ROS gegenüber unbehandelten Hautproben. Dabei zeigte sich ebenfalls eine starke Induktion der BaP-metabolisierenden CYP450-Enzyme [Costa et al. (2010)]. Im Rahmen der BaP-Metabolisierung kommt es zur Bildung von BaP-Quinonen, welche hauptsächlich

für die Entstehung von oxidativem Stress verantwortlich gemacht werden. Quinone sind hochreaktive, redoxaktive Metaboliten, die neben der Generierung von ROS auch eigenständige DNA- und Proteinschäden hervorrufen können. Sie sind außerordentlich wichtig für die PAK-induzierte Kanzerogenese und entstehen durch Metabolisierung mittels Dihydrodiol-Dehydrogenase aus PAK-Metaboliten. Einmal generiert können sie reversibel Oxidations-Reduktions-Zyklen durchlaufen. Dabei kommt es unter Ein-Elektronübertragung und Bildung eines radikalischen Zwischenprodukts zur Entstehung von Superoxid-Anion und Wasserstoffperoxid [Bolton et al. (2000); Lorentzen und Ts'o (1977)]. In Endothelzellen konnte eine durch BaP verstärkte Bildung von  $O_2^-$  und Peroxid gezeigt werden. Vermutlich beruht hierauf ein Mechanismus der BaP-induzierten Arterioskleroseentstehung [Yang et al. (2009)]. Im Zellkulturmodell führte die Exposition gegenüber Benzo[ $\alpha$ ]pyren zum Anstieg von ROS-Markern, während die Zugabe von SOD oder Catalase diesen Anstieg und die resultierenden, oxidativen DNA-Veränderungen blockieren konnte. Dies konnte im Tierversuch an Mäusen bestätigt werden [Wells et al. (1997)]. Neben diesen pro-oxidativen Veränderungen durch Benzo[ $\alpha$ ]pyren sind jedoch auch Induktionen von ROS-detoxifizierenden Enzymen beschrieben worden. Eine Verminderung der zellulären ROS- und RNS-Belastung könnte die Folge sein. In humanen Hepatomzelllinien bewirkten  $10 \mu\text{M}$  BaP über 24 h keinen Anstieg von ROS, aber einen Anstieg von GSH und  $\gamma\text{-GCS}^{26}$ , sowie einen Abfall von GSH-Reduktase [Lin und Yang (2007)]. Nach i. v.-Applikation von Benzo[ $\alpha$ ]pyren kam es in Erythrozyten von Ratten zu einem signifikanten Anstieg von SOD ( $> 6$  h) und Catalase ( $> 12$  h) mit einem Maximum nach 24 h [Kim et al. (2000)]. Zigarettenrauch und Benzo[ $\alpha$ ]pyren führten im Tiermodell ebenfalls zum Anstieg von GSH [Gupta et al. (1988)].

Diese gegensätzlichen Effekte von ROS zeigten sich auch in dieser Studie. Der Abfall von 8-epi-PGF $_{2\alpha}$  nach längeren Inkubationzeiten könnte demnach eine Folge der Induktion von ROS-detoxifizierenden Enzymen sein. Deren Expression nimmt, wie bereits dargelegt, erst nach längerer Inkubation mit BaP signifikant zu. Die initiale Zunahme von Nitrotyrosin dürfte jedoch auf die BaP-bedingte Generation von ROS und RNS zurückzuführen sein, während die Abnahme mit dem zeitlichen Verlauf ebenfalls durch anti-oxidative Schutzmechanismen erklärt werden könnte.

Burdick et al. (2003) zeigten an humanen, epithelialen Zelllinien, dass BaP-Quinone die Bildung von  $O_2^-$  und  $H_2O_2$  bewirken und eine Stimulation des Zellwachstums auftritt. Dies geschieht vermutlich über die Phosphorylierung und Aktivierung von GFR-Signaltransduktionswegen. Auf diesem Weg kann in BaP-induzierten Tumoren das Tumorstadium weiter stimuliert werden [Burdick et al. (2003)]. Zusammen-

---

<sup>26</sup> $\gamma\text{-GCS}$  =  $\gamma$ - Glutamylcysteinsynthetase, ein Enzym der GSH-Biosynthese.

fassend können ROS sowohl pro-apoptotische Effekte, z. B. über die Schädigung der DNA, auslösen als auch zur Wachstumsförderung beitragen.

Unter Kontrollbedingungen (0,01 % DMSO) zeigte sich für die 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Menge in beiden Zellschichten ein ähnlicher Abfall der Werte bei zunehmender Zeit, bei Nitrotyrosin blieben die Kontrollproben ohne Veränderung. Signifikant war bezüglich des 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  jedoch einzig die Abnahme des 180-Min.-Wertes im Str. spinosum. Diese Veränderungen könnten wiederum auf einen DMSO-Effekt zurückgeführt werden. So wurde von Laskar et al. (2010) die anti-apoptotische Wirkung von DMSO vor allem durch einen ROS-eliminierenden Effekt erklärt. Ein solcher zeigte sich auch hier im zeitlichen Verlauf. Obwohl die Str. basale Verumwerte zu allen Zeitpunkten über den Kontrollwerten lagen, also ein positiver Effekt durch BaP auf die 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Menge bestand, kann nicht ausgeschlossen werden, dass der Abfall in den Verumpoben auf dieser protektiven DMSO-Wirkung beruhte. Andererseits ist dieser Abfall durchaus auch auf die positiven Effekte von Benzo[ $\alpha$ ]pyren auf ROS-abbauende Enzyme zu erklären. Diese zeigten in bisherigen Studien erst nach mehreren Stunden einen signifikanten Aktivitätsanstieg [Kim et al. (2000)].

### 4.3 Unterschiede zwischen den Schichten des Str. basale und Str. spinosum

Für alle untersuchten Biomarker finden sich nach Inkubation in Blei, Benzo[ $\alpha$ ]pyren oder unter Kontrollbedingungen höhere Werte im Str. basale verglichen mit dem Str. spinosum. Diese Unterschiede treten in allen durchgeführten Versuche unabhängig von der Inkubationszeit auf. In einem Großteil der Fälle sind diese Unterschiede zwischen den Zellschichten signifikant mit  $p < 0,05$ , sowohl für die Verum- als auch die Kontrollproben. Ein eindeutiger Zusammenhang mit der erfolgten Inkubation lässt sich nicht erkennen. Vielmehr scheint es so zu sein, dass das Str. basale insgesamt eine höhere apoptotische Aktivität und Menge an oxidativem und nitrogenem Stress zeigt. Unter Beachtung der Funktion der verschiedenen epithelialen Zellschichten, ist eine solche Differenz mit der hohen mitotischen Aktivität im Str. basale zu erklären. Das Str. basale ist Sitz der Stammzellen und hier erfolgt die Zellvermehrung, bevor es dann beim Aufsteigen der Zellen zu einem Differenzierungsprozess kommt. Wie bereits beschrieben, sind Fehler im Rahmen der DNA- und Zellvermehrung in der Lage eine apoptotische Reaktion auszulösen. Basierend auf diesem Hintergrund wäre durchaus zu erwarten gewesen, dass die Inkubation in Blei oder Benzo[ $\alpha$ ]pyren den Unterschied zwischen beiden Zellschichten nochmals verstärkt. Dies ist aus den hier angegebenen Daten jedoch nicht zu ermitteln, da lediglich die Signifikanz

der Unterschiede zwischen beiden Zellschichten, nicht aber der relative Unterschied vor und nach Inkubation untersucht wurde. Zur Beantwortung der Frage, ob das Str. basale also wirklich „vulnerabler“ auf diese exogenen Noxen reagiert, sind somit weitere Analysen der Ergebnisse und insbesondere auch auf diese Fragestellung hin ausgerichtete Untersuchungen notwendig.

### **4.4 Eignung von Caspase-3, 8-epi-PGF<sub>2α</sub> und Nitrotyrosin als Biomarker einer Blei- oder BaP-Exposition**

Die in dieser Studie untersuchten Markerproteine und ihre Veränderungen können unter bestimmten Bedingungen als Biomarker für eine Exposition gegenüber Blei oder Benzo[α]pyren verwendet werden. Wichtigste Einschränkung ist hierbei, dass Veränderungen in der Aktivität und Menge von aktivierter Caspase-3, 8-epi-PGF<sub>2α</sub> und Nitrotyrosin nicht spezifisch sind für eine Schädigung durch Blei oder BaP. Die Spezifität der verwendeten Marker ist also eher gering und für ein Expositionsscreening somit eher ungeeignet. Andererseits fällt jedoch auf, dass sowohl Blei als auch Benzo[α]pyren in dieser Studie zu Veränderungen der verwendeten Marker-Proteine geführt haben. Nach bekannter Exposition könnte eine Untersuchung der Biomarker somit verwendet werden, um festzustellen ob es zu einer signifikanten Schleimhautbelastung gekommen ist. Bei erhöhten Markern und fehlender anderer Ursache muss davon ausgegangen werden, während normale Marker eine Exposition eher unwahrscheinlich erscheinen lassen. Die Sensitivität ist somit höher einzuschätzen als die Spezifität, wobei dies insbesondere für die folgenden, in dieser Studie identifizierten Fälle gilt:

1. Aktivierte Caspase-3: Sowohl für die Blei- als auch BaP-Inkubation, insbesondere nach längeren Inkubationszeiten
2. 8-epi-PGF<sub>2α</sub>: Für Blei nur bei langen Inkubationszeiten, bei BaP für alle Inkubationszeiten, wobei mit längerer Dauer eine Abnahme der Werte eintritt.
3. Nitrotyrosin: Nur nach sehr kurzer Blei-Inkubation und für lange und kurze BaP-Inkubationszeiten.

Einschränkend muss hinzugefügt werden, dass bisher keinerlei Aussagen über quantitative Grenzwerte gemacht werden können, sondern sich diese Untersuchung auf Vergleiche von exponierten zu nicht exponierten Proben bezieht. Zunächst sind also

noch weitere, vor allem auch in vivo durchgeführte Untersuchungen notwendig, um die Ergebnisse zu bestätigen und den praktischen Einsatz als Biomarker zu erproben und Grenzwerte näher zu definieren.

### 4.5 Unterschiede zwischen Proben von Rauchern und Nichtrauchern

Ein Vergleich von Raucher- und Nichtraucherproben wurde nur für die in BaP inkubierten Proben durchgeführt, da unter den mit Blei inkubierten Proben nur vier Proben von Rauchern stammten und somit eine zu geringe Probenzahl für stichhaltige Aussagen zur Verfügung stand. Die Auswertung der BaP-Proben zeigte im Hinblick auf die Caspase-3-Aktivität keine signifikanten Unterschiede zwischen Nichtrauchern und Rauchern. Beide Marker für oxidativen und nitrogenen Stress waren bei Rauchern jedoch signifikant erniedrigt gegenüber Nichtrauchern. Bei Nichtrauchern bestanden häufiger signifikante Erhöhungen der Verumwerte gegenüber den Kontrollwerten. Bei Rauchern bewirkte Benzo[ $\alpha$ ]pyren demnach teilweise keine signifikanten Unterschiede zwischen Verum und Kontrolle.

Tabakrauch ist ein bekanntes Karzinogen für viele Tumoren, insbesondere für die Plattenepithelkarzinome der Mundhöhle und Luftwege. Zu den schädlichen Inhaltsstoffen von Tabakrauch zählen verschiedene PAK, unter ihnen auch Benzo[ $\alpha$ ]pyren. Einwirkungen von Tabakrauch auf Apoptose und die Entstehung reaktiver Metaboliten ist ebenfalls bekannt.

Möglicherweise stehen die hier aufgezeigten, erniedrigten ROS- und RNS-Marker nach chronischem Tabakgenuss mit einer gesteigerten Aktivität von SOD, Catalase und GSH in Verbindung. Wie bereits dargestellt, kann Benzo[ $\alpha$ ]pyren und somit auch Tabakrauch zur Induktion dieser Enzyme führen. Dies könnte einen BaP-bedingten Anstieg von ROS und RNS kompensieren. Gupta et al. (1988) beschrieben, dass Tabakrauch sowohl die Lipidperoxidation als auch das GSH-Level erhöht. BaP bewirkt zudem eine Aktivitätsteigerung von GSH-Peroxidase in der Lunge und hepatischer SOD. Von York et al. (1976) konnte nach Tabakrauchinhalation zusätzlich ein Anstieg von GSH-Peroxidase und GSH-Reduktase im Lungengewebe von Ratten gezeigt werden. Bei Nichtrauchern liegt die Stimulation solcher Entgiftungsenzyme hingegen nicht vor. Sie hätten demnach im Gegensatz zu Rauchern geringere Abwehrmechanismen gegenüber BaP-bedingter ROS- und RNS-Bildung.

Die Aktivität von Caspase-3 war zwischen beiden Gruppen nicht signifikant verändert, wobei die Mittelwerte der Raucherproben unter denen der Nichtraucher lagen. Ebenfalls bewirkte BaP keinen signifikanten Unterschied in der Caspase-3-Aktivität

#### 4 Diskussion

im *Str. spinosum*. Aufgrund der chronischen Exposition gegenüber den toxischen Inhaltsstoffen des Tabakrauches konnte man zunächst von einer erhöhten Apoptoserate in den nicht inkubierten Raucherproben gegenüber Nichtraucherproben ausgehen. Diese Vermutung konnte hier jedoch nicht bestätigt werden, die Kontrollproben unterschieden sich diesbezüglich nicht von den Nichtraucherproben. Möglicherweise hat die chronische Exposition bei Rauchern bereits zu einer von Pfeifer et al. (2002) beschriebenen „Evasion of Apoptosis“ geführt. Es würde sich hierbei um erste Schädigungen handeln, die eine Apoptose verhindern und den Weg zu einer kanzerogenen Entartung bereiten könnten. Das Umgehen der Apoptose scheint nämlich essentiell für ein ungezügelteres Tumorstadium zu sein. Der Verlust des Tumorsuppressorgens p53, welches Apoptose aufgrund von DNA-Schädigung initiieren kann, ist daher ein häufig gefundenes Phänomen in entarteten Zellen [Hanahan und Weinberg (2000)].

Weiterhin wäre es möglich, dass die nicht erhöhten Apoptosewerte mit den erniedrigten Werten für 8-epi-PGF<sub>2α</sub> und Nitrotyrosin zusammenhängen. Der bei Rauchern geringere oxidative Stress stellt einen Schutz der Zellen vor ROS- und RNS-bedingten apoptotischen Wirkungen dar. Allerdings scheint bei Rauchern weiterhin ein Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Effekten zu bestehen, da keine signifikanten Unterschiede zu Nichtrauchern bestanden. Die Komponenten in diesem Verhältnis sind bei Rauchern jedoch möglicherweise anders verteilt als bei Nichtrauchern, worauf die erniedrigten 8-epi-PGF<sub>2α</sub>- und Nitrotyrosin-Werte hinweisen. Zur Klärung dieses Sachverhaltes sind weitere Untersuchungen notwendig.



## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die menschliche Mundschleimhaut ist zahlreichen Umwelttoxinen und anderen Giftstoffen auf besondere Weise ausgesetzt, da viele dieser Stoffe über Inhalation und Ingestion aufgenommen werden und so in Kontakt mit der Schleimhaut kommen können. Zu diesen Schadstoffen gehört auch die weit verbreitete Gruppe der Schwermetalle, mit dem u.a. in Akkumulatoren vorkommenden Blei, und die Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe, mit der Leitsubstanz Benzo[ $\alpha$ ]pyren, welche bei unvollständiger Verbrennung organischen Materials entstehen. Das Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut ist assoziiert mit einer der Hauptnoxen der Mundschleimhaut, dem Tabakrauch, welcher unter anderem Benzo[ $\alpha$ ]pyren enthält. Sowohl für Blei als auch für Benzo[ $\alpha$ ]pyren sind gesundheitsschädliche und karzinogene Wirkungen nachgewiesen. Der Mechanismus, der diesen Schädigungen zugrunde liegt, ist bis jetzt nicht vollständig aufgeklärt. Es konnte jedoch für beide Substanzen gezeigt werden, dass sie das Apoptosegeschehen und die Bildung radikaler Sauer- und Stickstoffspezies beeinflussen. Inwieweit diese Veränderungen aber bei der Schädigung von Mundschleimhautzellen eine Rolle spielen ist nicht bekannt. Zur Klärung der Frage, ob sich nach Blei- oder Benzo[ $\alpha$ ]pyrenexposition Veränderungen im Apoptoseverhalten oder der Bildung von ROS und RNS ergeben, wurden 72 Mundschleimhautproben von gesunden Probanden nach ihrer Inkubation in Blei oder Benzo[ $\alpha$ ]pyren immunhistochemisch untersucht. Die Primärantikörper waren hierbei gegen aktive Caspase-3, 8-Epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und Nitrotyrosin gerichtet. Die Anfärbung erfolgte nach Inkubation mit biotinylierten Sekundärantikörpern über eine Peroxidase-Reaktion.

Die Bleiexposition bewirkte vor allem eine deutliche, zeitabhängige Zunahme der Menge aktiver Caspase-3, sowie einen Anstieg der 8-Epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -Menge nach längerer Inkubation, die Nitrotyrosin-Menge war nur nach 5-minütiger Inkubation erhöht. Unter dem Einfluss von Benzo[ $\alpha$ ]pyren waren ebenfalls Veränderungen in allen drei Systemen zu erkennen. Eine zunehmend signifikant erhöhte Aktivität der Caspase-3 zeigte sich vor allem mit zunehmender Inkubationsdauer, während die Marker für oxidativen und nitrogenen Stress mit der Zeit abfielen. Auffällig war weiterhin, dass DMSO einen protektiven Einfluss auf die Mundschleimhautzellen ausübte und zwei

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Biomarker unter DMSO-Behandlung der Kontrollproben mit der Zeit deutlich abfielen. Insgesamt führten sowohl Blei als auch Benzo[ $\alpha$ ]pyren zu Veränderungen der untersuchten Parameter im Vergleich zu den Kontrollproben, so dass diese Systeme als mögliche Ursache für schädigende Wirkungen von Benzo[ $\alpha$ ]pyren und Blei auf Mundschleimhautzellen in Frage kommen. Interessanterweise lieferten Proben von Rauchern signifikant niedrigere Ergebnisse in der Densitometrie; die chronisch vorhandene Tabakrauchexposition führte also zu verminderten Mengen an 8-epi-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  und Nitrotyrosin.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lassen sich eindeutige Schlüsse zum Einfluss von Blei und Benzo[ $\alpha$ ]pyren auf die menschliche Mundschleimhaut ziehen, für ein genaueres Verständnis der Mechanismen sind jedoch weitere Studien und Untersuchungen notwendig. Ziel weiterer Untersuchungen sollte sein, genauere Informationen zu erhalten, wie Blei und Benzo[ $\alpha$ ]pyren in Mundschleimhautzellen die Apoptose induzieren und oxidativen Stress auslösen. Weiterhin stellt sich die Frage, ob Tabakrauch tatsächlich eine protektive Wirkung aufweist oder ob den gemessenen Unterschieden zwischen Rauchern und Nichtrauchern bereits tiefgreifendere zelluläre Veränderungen zu Grunde liegen. In diesem Zusammenhang wäre es auch interessant, die beschriebene, positive Wirkung von DMSO näher zu charakterisieren. Ziel weiterer Untersuchungen muss dabei sein, Schädigungen möglichst früh zu erkennen und Interventionsmöglichkeiten zu entwickeln.

# Literaturverzeichnis

- Afonina, I. S., Cullen, S. P., und Martin, S. J. (2010). Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the ctl/nk protease granzyme b. *Immunol Rev*, 235(1):105–116.
- Aktories, K., Förstermann, U., Hofmann, F. B., und Starke, K., Hrsg. (2009). *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer/Elsevier, München, 10. Auflage.
- Alnemri, E. S., Livingston, D. J., Nicholson, D. W., Salvesen, G., Thornberry, N. A., Wong, W. W., und Yuan, J. (1996). Human ice/ced-3 protease nomenclature. *Cell*, 87(2):171.
- Assimakopoulos, S. F., Scopa, C. D., und Vagianos, C. E. (2009). On the confounding role of administration solvents (vehicles) in animal experimental studies: Z-lly-fmk or dimethyl sulfoxide (dms) attenuates intestinal apoptosis in bile duct-ligated rats? *Dig Dis Sci*, 54(12):2767–2768.
- Avery, J. K. (2002). *Oral development and Histology*. Thieme, Stuttgart, 3. Auflage.
- Baek, S. O., Field, R. A., Goldstone, M. E., Kirk, P. W., Lester, J. N., und Perry, R. (1991). A review of atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Sources, fate and behavior. *Water Air Soil Pollut*, 60:273–300.
- Banerjee, M., Kang, K. H., Morrow, J. D., Roberts, L. J., und Newman, J. H. (1992). Effects of a novel prostaglandin, 8-epi-pgf2 alpha, in rabbit lung in situ. *Am J Physiol*, 263(3 Pt 2):H660–H663.
- Benninghoff, A. und Drenckhahn, D., Hrsg. (2003). *Anatomie*, Band 1. Urban & Fischer/Elsevier, München, 16. Auflage.
- Berchtold, R., Bruch, H.-P., und Trentz, O., Hrsg. (2008). *Chirurgie*. Urban & Fischer/Elsevier, München, 6. Auflage.
- Berg, J. M., Tymoczko, J. L., und Stryer, L. (2003). *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 5. Auflage.

## Literaturverzeichnis

- Berry, C. E. und Hare, J. M. (2004). Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol*, 555(Pt 3):589–606.
- Bertin, J., Armstrong, R. C., Otilie, S., Martin, D. A., Wang, Y., Banks, S., Wang, G. H., Senkevich, T. G., Alnemri, E. S., Moss, B., Lenardo, M. J., Tomaselli, K. J., und Cohen, J. I. (1997). Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both fas- and tnfr1-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(4):1172–1176.
- Besaratinia, A., Nia, A. B., Straaten, H. W. V., Godschalk, R. W., Zandwijk, N. V., Balm, A. J., Kleinjans, J. C., und Schooten, F. J. V. (2000). Immunoperoxidase detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-dna adducts in mouth floor and buccal mucosa cells of smokers and nonsmokers. *Environ Mol Mutagen*, 36(2):127–133.
- Birnboim, H. C., Lemay, A.-M., Lam, D. K. Y., Goldstein, R., und Webb, J. R. (2003). Cutting edge: Mhc class ii-restricted peptides containing the inflammation-associated marker 3-nitrotyrosine evade central tolerance and elicit a robust cell-mediated immune response. *J Immunol*, 171(2):528–532.
- Bolton, J. L., Trush, M. A., Penning, T. M., Dryhurst, G., und Monks, T. J. (2000). Role of quinones in toxicology. *Chem Res Toxicol*, 13(3):135–160.
- Bork, K., Burgdorf, W., und Hoede, N., Hrsg. (1993). *Mundschleimhaut- und Lippenkrankheiten: Klinik, Diagnostik und Therapie. Atlas und Handbuch*. Schattauer, Stuttgart, 2. Auflage.
- Brockhaus-Enzyklopädie (1992). *Brockhaus-Enzyklopädie*, Band 19. F.A. Brockhaus, Mannheim, 19. Auflage.
- Bryan, N. S. und Grisham, M. B. (2007). Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. *Free Radic Biol Med*, 43(5):645–657.
- Bühling, K. J., Lepenies, J., und Witt, K., Hrsg. (2004). *Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pathologie*. Urban & Fischer/Elsevier, München, 3. Auflage.
- Burchiel, S. W. und Luster, M. I. (2001). Signaling by environmental polycyclic aromatic hydrocarbons in human lymphocytes. *Clin Immunol*, 98(1):2–10.

- Burdick, A. D., Davis, J. W., Liu, K. J., Hudson, L. G., Shi, H., Monske, M. L., und Burchiel, S. W. (2003). Benzo(a)pyrene quinones increase cell proliferation, generate reactive oxygen species, and transactivate the epidermal growth factor receptor in breast epithelial cells. *Cancer Res*, 63(22):7825–7833.
- Chen, J., Yan, Y., Li, J., Ma, Q., Stoner, G. D., Ye, J., und Huang, C. (2005). Differential requirement of signal pathways for benzo[a]pyrene (b[a]p)-induced nitric oxide synthase (inos) in rat esophageal epithelial cells. *Carcinogenesis*, 26(6):1035–1043.
- Chowdhury, I., Tharakan, B., und Bhat, G. K. (2008). Caspases - an update. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 151(1):10–27.
- Cohen, A. J. und Roe, F. J. (1991). Review of lead toxicology relevant to the safety assessment of lead acetate as a hair colouring. *Food Chem Toxicol*, 29(7):485–507.
- Cohen, G. M. (1997). Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J*, 326 ( Pt 1):1–16.
- Costa, C., Catania, S., Pasquale, R. D., Stancanelli, R., Scribano, G. M., und Melchini, A. (2010). Exposure of human skin to benzo[a]pyrene: role of cyp1a1 and aryl hydrocarbon receptor in oxidative stress generation. *Toxicology*, 271(3):83–86.
- da Silva, B. A. K., Aydos, R. D., Silva, I. S., Pereira, D. M., de Tarso Camillo de Carvalho, P., Dourado, D. M., dos Reis, F. A., und Nacer, R. S. (2010). Lung apoptosis after intra-pulmonary instillation of benzo(a)pyrene in wistar rats. *Acta Cir Bras*, 25(1):117–120.
- Dahlgren, C. und Karlsson, A. (1999). Respiratory burst in human neutrophils. *J Immunol Methods*, 232(1-2):3–14.
- DGUV (2009). *Handlungsanleitung fr die arbeitsmedizinische Vorsorge nach dem Berufsgenossenschaftlichen Grundsatz G 3 Bleialkyle*. Deutsche Gesetzliche Unfallversicherung (DGUV), bgi/guv-i 504-3. Auflage.
- Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*, 82(1):47–95.
- Duffus, J. (2002). „heavy metals,, - a meaningless term. *Pure Appl Chem*, 74(5):739–807.

## Literaturverzeichnis

- El-Benna, J., Dang, P. M.-C., Gougerot-Pocidallo, M.-A., und Elbim, C. (2005). Phagocyte nadph oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 53(3):199–206.
- Farmand, F., Ehdaie, A., Roberts, C. K., und Sindhu, R. K. (2005). Lead-induced dysregulation of superoxide dismutases, catalase, glutathione peroxidase, and guanylate cyclase. *Environ Res*, 98(1):33–39.
- Fox, D. A., Campbell, M. L., und Blocker, Y. S. (1997). Functional alterations and apoptotic cell death in the retina following developmental or adult lead exposure. *Neurotoxicology*, 18(3):645–664.
- Fredstrom, S. (2002). Nitric oxide, oxidative stress, and dietary antioxidants. *Nutrition*, 18(6):537–539.
- Garza, A., Vega, R., und Soto, E. (2006). Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Med Sci Monit*, 12(3):RA57–RA65.
- Gupta, M. P., Khanduja, K. L., und Sharma, R. R. (1988). Effect of cigarette smoke inhalation on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in the rat. *Toxicol Lett*, 41(2):107–114.
- Gurer-Orhan, H., Sabir, H. U., und Ozgne?, H. (2004). Correlation between clinical indicators of lead poisoning and oxidative stress parameters in controls and lead-exposed workers. *Toxicology*, 195(2-3):147–154.
- Halliwell, B. (1997). What nitrates tyrosine? is nitrotyrosine specific as a biomarker of peroxynitrite formation in vivo? *FEBS Lett*, 411(2-3):157–160.
- Hanahan, D. und Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1):57–70.
- He, L., Perkins, G. A., Poblenz, A. T., Harris, J. B., Hung, M., Ellisman, M. H., und Fox, D. A. (2003). Bcl-xl overexpression blocks bax-mediated mitochondrial contact site formation and apoptosis in rod photoreceptors of lead-exposed mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(3):1022–1027.
- He, L., Poblenz, A. T., Medrano, C. J., und Fox, D. A. (2000). Lead and calcium produce rod photoreceptor cell apoptosis by opening the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 275(16):12175–12184.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805):770–776.

- Hermes-Lima, M., Pereira, B., und Bechara, E. J. (1991). Are free radicals involved in lead poisoning? *Xenobiotica*, 21(8):1085–1090.
- Holme, J. A., Gorria, M., Arlt, V. M., Ovreb, S., Solhaug, A., Tekpli, X., Landvik, N. E., Huc, L., Fardel, O., und Lagadic-Gossmann, D. (2007). Different mechanisms involved in apoptosis following exposure to benzo[a]pyrene in f258 and hepa1c1c7 cells. *Chem Biol Interact*, 167(1):41–55.
- Huc, L., Gilot, D., Gardyn, C., Rissel, M., Dimanche-Boitrel, M.-T., Guillouzo, A., Fardel, O., und Lagadic-Gossmann, D. (2003). Apoptotic mitochondrial dysfunction induced by benzo(a)pyrene in liver epithelial cells: role of p53 and phi changes. *Ann N Y Acad Sci*, 1010:167–170.
- IARC (1983). Polynuclear aromatic compounds, part 1: Chemical, environmental and experimental data. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 32:211–224.
- IARC (2006). Inorganic and organic lead compounds. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 87:1–471.
- Khan, M. I., Ahmad, I., Mahdi, A. A., Akhtar, M. J., Islam, N., Ashquin, M., und Venkatesh, T. (2010). Elevated blood lead levels and cytogenetic markers in buccal epithelial cells of painters in india: genotoxicity in painters exposed to lead containing paints. *Environ Sci Pollut Res Int*, 17(7):1347–1354.
- Kim, H. S., Kwack, S. J., und Lee, B. M. (2000). Lipid peroxidation, antioxidant enzymes, and benzo[a]pyrene-quinones in the blood of rats treated with benzo[a]pyrene. *Chem Biol Interact*, 127(2):139–150.
- Kubes, P. (2000). Inducible nitric oxide synthase: a little bit of good in all of us. *Gut*, 47(1):6–9.
- Kumar, S. (2007). Caspase function in programmed cell death. *Cell Death Differ*, 14(1):32–43.
- Kumar, V., Abbas, A. K., und Fausto, N., Hrsg. (2004). *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease*. Saunders, 7. Auflage.
- Laskar, A., Yuan, X.-M., und Li, W. (2010). Dimethyl sulfoxide prevents 7beta-hydroxycholesterol-induced apoptosis by preserving lysosomes and mitochondria. *J Cardiovasc Pharmacol*, 56(3):263–267.
- Ledgerwood, E. C. und Morison, I. M. (2009). Targeting the apoptosome for cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 15(2):420–424.

## Literaturverzeichnis

- Leonard, S. S., Harris, G. K., und Shi, X. (2004). Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med*, 37(12):1921–1942.
- Lidsky, T. I. und Schneider, J. S. (2003). Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*, 126(Pt 1):5–19.
- Lin, T. und Yang, M. S. (2007). Benzo[a]pyrene-induced elevation of gsh level protects against oxidative stress and enhances xenobiotic detoxification in human hepg2 cells. *Toxicology*, 235(1-2):1–10.
- Loeffler, M. und Kroemer, G. (2000). The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res*, 256(1):19–26.
- Löffler, G. (2003). *Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie*. Springer, Berlin, 5. Auflage.
- Lorentzen, R. J. und Ts'o, P. O. (1977). Benzo[a]yrenedione/benzo[a]pyrenediol oxidation-reduction couples and the generation of reactive reduced molecular oxygen. *Biochemistry*, 16(7):1467–1473.
- Lüllmann-Rauch, R. (2003). *Taschenlehrbuch Histologie*. Thieme, Stuttgart, 1. Auflage.
- Mackenzie, I. C. und Binnie, W. H. (1983). Recent advances in oral mucosal research. *J Oral Pathol*, 12(6):389–415.
- Malhotra, J. D. und Kaufman, R. J. (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol*, 18(6):716–731.
- Mansoor, S., Gupta, N., Patil, A. J., Estrago-Franco, M. F., Ramirez, C., Migon, R., Sapkal, A., Kuppermann, B. D., und Kenney, M. C. (2010). Inhibition of apoptosis in human retinal pigment epithelial cells treated with benzo(e)pyrene, a toxic component of cigarette smoke. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 51(5):2601–2607.
- Marnett, L. J. (2000). Oxyradicals and dna damage. *Carcinogenesis*, 21(3):361–370.
- Morrow, J. D., Awad, J. A., Boss, H. J., Blair, I. A., und Roberts, L. J. (1992a). Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (f2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(22):10721–10725.

## Literaturverzeichnis

- Morrow, J. D., Awad, J. A., Kato, T., Takahashi, K., Badr, K. F., Roberts, L. J., und Burk, R. F. (1992b). Formation of novel non-cyclooxygenase-derived prostanoids (f2-isoprostanes) in carbon tetrachloride hepatotoxicity. an animal model of lipid peroxidation. *J Clin Invest*, 90(6):2502–2507.
- Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F., und Roberts, L. J. (1990). A series of prostaglandin f2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(23):9383–9387.
- Morrow, J. D. und Roberts, L. J. (1996). The isoprostanes. current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol*, 51(1):1–9.
- Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., und Dixit, V. M. (1998). An induced proximity model for caspase-8 activation. *J Biol Chem*, 273(5):2926–2930.
- Nathan, C. und Xie, Q. W. (1994). Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*, 78(6):915–918.
- Nicholson, D. W., Ali, A., Thornberry, N. A., Vaillancourt, J. P., Ding, C. K., Gallant, M., Gareau, Y., Griffin, P. R., Labelle, M., und Lazebnik, Y. A. (1995). Identification and inhibition of the ice/ced-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535):37–43.
- Nuez, G., Benedict, M. A., Hu, Y., und Inohara, N. (1998). Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene*, 17(25):3237–3245.
- Orrenius, S. (2007). Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev*, 39(2-3):443–455.
- Patrick, L. (2006a). Lead toxicity, a review of the literature. part 1: Exposure, evaluation, and treatment. *Altern Med Rev*, 11(1):2–22.
- Patrick, L. (2006b). Lead toxicity part ii: the role of free radical damage and the use of antioxidants in the pathology and treatment of lead toxicity. *Altern Med Rev*, 11(2):114–127.
- Pfeifer, G. P., Denissenko, M. F., Olivier, M., Tretyakova, N., Hecht, S. S., und Hainaut, P. (2002). Tobacco smoke carcinogens, dna damage and p53 mutations in smoking-associated cancers. *Oncogene*, 21(48):7435–7451.

- Port, J. L., Yamaguchi, K., Du, B., Lorenzo, M. D., Chang, M., Heerdt, P. M., Kopelovich, L., Marcus, C. B., Altorki, N. K., Subbaramaiah, K., und Dannenberg, A. J. (2004). Tobacco smoke induces cyp1b1 in the aerodigestive tract. *Carcinogenesis*, 25(11):2275–2281.
- Pulido, M. D. und Parrish, A. R. (2003). Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res*, 533(1-2):227–241.
- Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(12):4003–4008.
- Radi, R., Cassina, A., Hodara, R., Quijano, C., und Castro, L. (2002). Peroxynitrite reactions and formation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 33(11):1451–1464.
- Robinson, J. M. (2009). Phagocytic leukocytes and reactive oxygen species. *Histochem Cell Biol*, 131(4):465–469.
- Romano, G., Sgambato, A., Boninsegna, A., Flamini, G., Curigliano, G., Yang, Q., Gioia, V. L., Signorelli, C., Ferro, A., Capelli, G., Santella, R. M., und Cittadini, A. (1999). Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbon-dna adducts in exfoliated oral cells by an immunohistochemical assay. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 8(1):91–96.
- Rorke, E. A., Sizemore, N., Mukhtar, H., Couch, L. H., und Howard, P. C. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons enhance terminal cell death of human ectocervical cells. *Int J Oncol*, 13(3):557–563.
- Rossi, D. und Gaidano, G. (2003). Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease. *Haematologica*, 88(2):212–218.
- Rubbo, H. und Radi, R. (2008). Protein and lipid nitration: role in redox signaling and injury. *Biochim Biophys Acta*, 1780(11):1318–1324.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Kramer, P. H., und Peter, M. E. (1998). Two cd95 (apo-1/fas) signaling pathways. *EMBO J*, 17(6):1675–1687.
- Schwartz, J., Baker, V., Larios, E., Desai, D., und Amin, S. (2004). Inhibition of experimental tobacco carcinogen induced head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol*, 40(6):611–623.
- Shabani, A. und Rabbani, A. (2000). Lead nitrate induced apoptosis in alveolar macrophages from rat lung. *Toxicology*, 149(2-3):109–114.

## Literaturverzeichnis

- Slagsvold, H. H., Marvik, O. J., Eidem, G., Kristoffersen, N., und Paulsen, R. E. (2000). Detection of high molecular weight dna fragments characteristic of early stage apoptosis in cerebellar granule cells exposed to glutamate. *Exp Brain Res*, 135(2):173–178.
- Solhaug, A., Refsnes, M., und Holme, J. A. (2004). Role of cell signalling involved in induction of apoptosis by benzo[a]pyrene and cyclopenta[c,d]pyrene in hepa1c1c7 cells. *J Cell Biochem*, 93(6):1143–1154.
- Szab, C., Ischiropoulos, H., und Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 6(8):662–680.
- Tewari, M., Quan, L. T., O'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D. R., Poirier, G. G., Salvesen, G. S., und Dixit, V. M. (1995). Yama/cpp32 beta, a mammalian homolog of ced-3, is a crma-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(adp-ribose) polymerase. *Cell*, 81(5):801–809.
- Thome, M., Schneider, P., Hofmann, K., Fickenscher, H., Meinl, E., Neipel, F., Mattmann, C., Burns, K., Bodmer, J. L., Schrter, M., Scaffidi, C., Krammer, P. H., Peter, M. E., und Tschopp, J. (1997). Viral flce-inhibitory proteins (flips) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature*, 386(6624):517–521.
- Thompson, T., Tovar, C., Yang, H., Carvajal, D., Vu, B. T., Xu, Q., Wahl, G. M., Heimbrook, D. C., und Vassilev, L. T. (2004). Phosphorylation of p53 on key serines is dispensable for transcriptional activation and apoptosis. *J Biol Chem*, 279(51):53015–53022.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., und Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*, 39(1):44–84.
- Valko, M., Morris, H., Mazr, M., Rapta, P., und Bilton, R. F. (2001). Oxygen free radical generating mechanisms in the colon: do the semiquinones of vitamin k play a role in the aetiology of colon cancer? *Biochim Biophys Acta*, 1527(3):161–166.
- Valko, M., Rhodes, C. J., Moncol, J., Izakovic, M., und Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*, 160(1):1–40.
- van der Vliet, A., Eiserich, J. P., O'Neill, C. A., Halliwell, B., und Cross, C. E. (1995). Tyrosine modification by reactive nitrogen species: a closer look. *Arch Biochem Biophys*, 319(2):341–349.

## Literaturverzeichnis

- Walle, T., Walle, U. K., Sedmera, D., und Klausner, M. (2006). Benzo[a]pyrene-induced oral carcinogenesis and chemoprevention: studies in bioengineered human tissue. *Drug Metab Dispos*, 34(3):346–350.
- Wells, P. G., Kim, P. M., Laposa, R. R., Nicol, C. J., Parman, T., und Winn, L. M. (1997). Oxidative damage in chemical teratogenesis. *Mutat Res*, 396(1-2):65–78.
- Wen, X. und Walle, T. (2005). Preferential induction of cyp1b1 by benzo[a]pyrene in human oral epithelial cells: impact on dna adduct formation and prevention by polyphenols. *Carcinogenesis*, 26(10):1774–1781.
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., und Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol*, 68:251–306.
- Xu, J., jun Lian, L., Wu, C., feng Wang, X., yu Fu, W., und hong Xu, L. (2008). Lead induces oxidative stress, dna damage and alteration of p53, bax and bcl-2 expressions in mice. *Food Chem Toxicol*, 46(5):1488–1494.
- Yang, H., Zhou, L., Wang, Z., Roberts, L. J., Lin, X., Zhao, Y., und Guo, Z. (2009). Overexpression of antioxidant enzymes in apoe-deficient mice suppresses benzo(a)pyrene-accelerated atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 207(1):51–58.
- York, G. K., Peirce, T. H., Schwartz, L. W., und Cross, C. E. (1976). Stimulation by cigarette smoke of glutathione peroxidase system enzyme activities in rat lung. *Arch Environ Health*, 31(6):286–290.
- Youle, R. J. und Strasser, A. (2008). The bcl-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(1):47–59.
- Zeeck, A., Fischer, S. C., und Grond, S. (2003). *Chemie für Mediziner*. Urban & Fischer/Elsevier, München, 5. Auflage.
- Zimmermann, K. C. und Green, D. R. (2001). How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*, 108(4 Suppl):S99–103.

# Danksagung

Ich danke Herrn Privatdozent Dr. Dr. T. Reuther für die freundliche Überlassung des Themas, für die wertvollen Anregungen, seine Diskussionsbereitschaft und gute Betreuung.

Mein Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. W. Bloch und Frau Dr. B. Bölck von der Deutschen Sporthochschule in Köln für ihre Unterstützung und Hilfe bei allen methodischen Fragen.

Zu besonderem Dank bin ich auch Herrn Professor Dr. Dr. A. Kübler, Ärztlicher Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und plastische Gesichtschirurgie der Universität Würzburg, und seinen Mitarbeitern verpflichtet, die für Patientenauswahl und Probenentnahme verantwortlich waren.

Meine freundlicher Dank gilt Frau M. Schleyer und Frau U. Kriegebaum für ihre hilfreiche Unterstützung bei den Laborarbeiten. Beide haben zu deren guten Gelingen beigetragen.

Frau M. Ghilav von der Deutschen Sporthochschule in Köln verdanke ich die freundliche Einweisung in den Themenkomplex der Immunhistochemie.