

---

**Beitrag zur Untersuchung der Elementverteilungsmuster und zur  
Elementspeziesanalyse bei Neoplasien des Gastrointestinaltraktes**

Von der Fakultät für Naturwissenschaften

der

Universität Duisburg-Essen

zur Erlangung der Lehrbefähigung im

Lehrgebiet Analytische Chemie

genehmigte Habilitationsschrift

von

Dr. rer. nat. Evelin Denkhaus

aus

Duisburg

Genehmigt am: 27. Mai 2003



## **Vorwort**

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich auf der einen Seite mit der Analytik der Makro- und Mikroelemente in humanen Gewebeproben und auf der anderen Seite mit dem Einfluss der Elemente in der Humanmedizin, in diesem speziellen Fall mit der Bedeutung der Mengen- und Spurenelemente auf Krebserkrankungen. Im Zuge fachübergreifender Forschung wurde eine Bearbeitung der Thematik auf interdisziplinärer Ebene angestrebt, um die Erkenntnisse unterschiedlicher Forschungsrichtungen einzubeziehen und ein einheitliches Bild der Krebserkrankung in Form eines Beitrages zum veränderten Metabolismus von Krebszellen zu vermitteln. Um dem Nichtmediziner zu einem Verständnis der vorliegenden Forschungsergebnisse, die nicht rein analytisch ausgerichtet sind, zu verhelfen, wurde eine ausführliche Einleitung vorangestellt.

Aufgrund der in den Jahren 1992-2001 durchgeführten Forschungsarbeiten konnten viele Ansätze für weiterführende Studien erarbeitet werden, wobei in dieser Arbeit nur einige ausgewählte ausführlich diskutiert werden. Durch intensive inländische Kontakte (in erster Linie mit Herrn Priv.-Doz. Dr. Andreas Prange, GKSS Forschungszentrum, Geesthacht) und mit ausländischen Partnern (Dr. Konstantin Salnikow, Medical Center, New York, USA) konnten in Form von Kooperationen weiterführende Projekte in die Wege geleitet werden.

Die vorliegende systematische Studie wurde vom Ministerium für Wissenschaft und Forschung des Landes Nordrhein-Westfalen finanziell unterstützt. Eine weitere Förderung konnte durch eine Dauerleihgabe eines Analysengerätes durch das Institut für Energie- und Umwelttechnik, Duisburg, realisiert werden.

Mein besonderer Dank gilt hauptsächlich zwei Menschen ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre, Herrn Prof. Dr. Golloch unserem Fachgebietsleiter, der mich in allen fachlichen und akademischen Belangen beraten hat und die im Rahmen der Forschung angefallenen Ergebnisse mit großem Interesse mitverfolgt hat und Herrn Dr. med. Kraemer vom Allgemeinen Kreiskrankenhaus in Viersen, der uns die Gewebeproben zur Verfügung gestellt hat und gegenüber allen wissenschaftlichen Fragestellungen aufgeschlossen war.

Ferner bin ich meiner Kollegin und Freundin Frau Dr. Telgheder zu Dank verpflichtet, die im letzten Jahr unsere gemeinsamen Aufgaben im Fachgebiet allein übernommen hat und eine unverzichtbare Diskussionspartnerin bei fachlichen Fragestellungen war. Auch möchte ich allen Mitarbeitern danken, die im Bearbeitungszeitraum mit zu den vorliegenden Forschungsergebnissen beigetragen haben. Mein Dank gilt insbesondere Herrn Dipl. Chem. Bonsack, der durch seine Kooperationsbereitschaft und seinen Arbeitseifer die vorliegende Arbeit wesentlich unterstützt hat.

Ich möchte mich aber auch bei meinen Eltern und meiner Familie ganz herzlich für die Geduld, den Verzicht und die Rücksichtnahme, die sie mir in dieser Zeit entgegengebracht hat, bedanken.

Duisburg, im September 2002  
*Evelin Denkhaus*



## Glossar

<i>Ätiologie</i>	Lehre von den Krankheitsursachen
<i>Adaptation</i>	Durch biochemische oder morphologische Veränderungen bedingte Anpassung einer Zelle oder eines Organismus an die veränderten Bedingungen
<i>Adenom</i>	benigner (gutartiger) Tumor
<i>Allele</i>	Zustandsformen eines Gens, die zu unterschiedlicher Ausprägung des betreffenden Merkmals führen können
<i>Anaplasie</i>	Übergang höher differenzierter Zellen in weniger differenzierte
<i>Antionkogen</i>	Tumorsuppressorgen
<i>Apoprotein</i>	Eiweißkomponenten zusammengesetzter Proteine
<i>Apoptose</i>	programmierter Zelltod
<i>atrophisch</i>	organrückbildend
<i>benigne</i>	gutartig
<i>Cadherine</i>	Klasse von Zell-Adhäsionsmolekülen, die $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig und gewebespezifisch für das Aneinanderhaften gleichartiger Zellen sorgen. Bei metastasierenden Tumorzellen ist die Synthese der Cadherine gestört.
<i>Chromatid</i>	Einzelstrang der DNA (Chromosomenfaden)
<i>Chromatin</i>	Bezeichnung für das aus Zellkernen der Interphase gewinnbare, mit basischen Farbstoffen anfärbbare, fadige Material. Es besteht aus DNA und fünf verschiedenen Histonen sowie Nicht-Histonen-Proteinen
<i>Colitis ulcerosa</i>	unspezifische, meist chronisch wiederkehrende entzündliche Erkrankung des Dickdarms
<i>dermal</i>	die Haut betreffend
<i>distal</i>	weiter vom Rumpf entfernte Teile der Extremitäten
<i>DNA</i>	Desoxyribonukleinsäure
<i>Duodenum</i>	Zwölffingerdarm
<i>endemisch</i>	(gr.: endemos) einheimisch
<i>Endocytose</i>	intrazelluläre Aufnahme von Stoffen aus den Extrazellularräumen

<i>endogen</i>	im Körper selbst entstanden, nicht von außen zugeführt
<i>Epidemiologie</i>	Wissenschaftszweig, der sich mit der Verteilung von übertragbaren und nicht übertragbaren Krankheiten und deren physikalischen, chemischen, psychischen und sozialen Determinanten und Folgen in der Bevölkerung befasst
<i>epidemisch</i>	(gr.: epidemos) im Volk verbreitet
<i>epigenetisch</i>	nicht gentoxisch, cytotoxisch, oder rezeptorabhängige Wirkung, führt indirekt zur Tumorentstehung. Krebsentstehung über Mechanismen, die keine Wechselwirkung mit DNA beinhalten.
<i>Exocytose</i>	Ausscheidung von Material aus Zellen durch Verschmelzung von intrazellulären Vesikeln (Bläschen) mit der Zellmembran und Entleerung ihres Inhalts nach außen
<i>exogen</i>	von außerhalb in den Organismus eindringend
<i>Exposition</i>	Belastung, aufgenommene Menge eines Stoffes
<i>exprimieren</i>	Übertragung der genetischen Information in ein Genprodukt
<i>Exzision</i>	Ausschneidung
<i>Gastritis</i>	Entzündung der Magenschleimhaut
<i>Gastrointestinal</i>	zum Magen-Darmtrakt gehörend
<i>Gen</i>	DNA-Abschnitt, der eine Polypeptidkette kodiert
<i>Genamplifikation</i>	Vermehrung der Kopienzahl eines Gens
<i>Genexpression</i>	Umsetzung genetischer Information in Proteine
<i>Grading</i>	Differenzierungsgrad einer transformierten Zelle
<i>Hepatozelluläres</i>	
<i>Karzinom</i>	Leberzellkarzinom
<i>Histone</i>	Gruppenbezeichnung für aufgrund ihres hohen Gehalts an L-Lysin und L-Arginin-Resten basisch reagierende globuläre (weit verbreitet) Proteine mit $M_R$ zwischen 10 – 20 kDa, die in Zellkernen aller eukaryontischen Organismen vorkommen.
<i>Homöostase</i>	Aufrechterhaltung des inneren Milieus des Körpers mit Hilfe von Regelsystemen

<i>Hyaluronsäure</i>	saures Glykosaminoglykan, das Bestandteil aller Bindegewebe (Ausnahme. Augen-Hornhaut) ist.
<i>Hypogammaglobulinanämie</i>	nach der Geburt verzögernd einsetzende Synthese von Immunglobulinen der Klasse IgG
<i>Ileum</i>	Krummdarm; an das Jejunum anschließender Teil des Dünndarms, der in das Caecum mündet
<i>Immunglobuline</i>	Glykoproteine
<i>interstitiell</i>	im Zwischengewebe liegend
<i>interzellulär</i>	zwischen den Zellen liegend
<i>Intestinal</i>	zum Darmkanal gehörend
<i>intrazellulär</i>	innerhalb einer Zelle liegend
<i>invasiv</i>	eindringend
<i>Inzidenz</i>	Häufigkeit des Neuauftretens einer bestimmten Krankheit innerhalb eines bestimmten Zeitraumes
<i>Irritation</i>	Erstes Stadium der Krebsentstehung, DNA-Schädigung durch einen krebserzeugenden Stoff
<i>Jejunum</i>	an den Zwölffingerdarm anschließender Teil des Dünndarms
<i>karzinogen</i>	kanzerogen, Karzinom erzeugend
<i>Karzinogene</i>	Substanzen oder Faktoren, die bei einem Menschen oder im Tierversuch die Inzidenz maligner Tumoren erhöhen, die Latenzzeit der Karzinogenese verkürzen oder das Tumorspektrum in einem Gewebe verändern
<i>Karzinose</i>	ausgedehnte Besiedlung des gesamten Körpers oder von Körperhöhlen mit Metastasen eines Karzinoms
<i>Karzinogenese</i>	Entstehung maligner Tumoren ( Verlauf nach der Mehrstufenhypothese )
<i>Karzinogenität</i>	Potential eines Agens Krebs auszulösen
<i>Karzinom</i>	vom Epithel ausgehender maligner Tumor
<i>Kolon</i>	Dickdarm
<i>Kolon ascendens</i>	aufsteigender Dickdarm
<i>Kolon transversum</i>	querverlaufender Dickdarm
<i>Kolon descendens</i>	absteigender Dickdarm

<i>Kolon sigmoidum</i>	S-förmiger Dickdarm
<i>kolorektal</i>	Kolon und Rektum betreffend
<i>Läsion</i>	Schädigung, Verletzung, Störung
<i>maligne</i>	bösartig
<i>Mesenchym</i>	embryonales Bindegewebe oder nichtepitheliales Gewebe
<i>Metastase</i>	Krebszellabsiedlungen vom Primärtumor in andere angrenzenden oder entfernteren Gewebe über das Blut und Lymphsystem
<i>Mikrosatelliten</i>	repetitive DNA mit zwei bis zehn Basenpaar-Repeats. Jeder Mikrosatellitenmarker weist in allen Körperzellen eines Individuums eine charakteristische Anzahl von Motivwiederholungen auf, die interindividuell variieren können.
<i>Mikrotubuli</i>	schlauchförmige Zellstrukturen, die in allen zellkernhaltigen pflanzlichen und tierischen Zellen vorhanden sind. Ein einzelner Mikrotubulus besteht aus 13 Protofilamenten, die zusammen die Röhrenstruktur bilden
<i>Mikrovilli</i>	feine zytoplasmatische Fortsätze an der freien Zelloberfläche
<i>mitogen</i>	Zellteilung induzierend
<i>Mitose</i>	(auch M-Phase) Teilung der Zellkerne: Identische Reduplikation des genetischen Materials und Verteilung je eines vollständigen Chromosomensatzes auf die Tochterzellen, Unterteilung in vier Phasen: <i>Prophase:</i> Die bereits längsgespaltenen Chromosomen werden sichtbar, die Kernhülle löst sich auf. <i>Metaphase:</i> Die Chromosomen ordnen sich in der Äquatorialebene an. <i>Anaphase:</i> Die Spalthälften der Chromosome werden durch den Spindelapparat auseinandergezogen <i>Telophase:</i> Die Chromosomen werden erneut längsgespalten und von einer Kernmembran umgeben, die Kerne der beiden Tochterzellen gehen in die Interphase über
<i>Mortalitätsrate</i>	Sterberate
<i>Mukosa</i>	Schleimhaut



<i>Mutagene</i>	Mutationen auslösende Agenzien
<i>Mutagenese</i>	Vorgang der Auslösung einer Mutation
<i>Mutagenität</i>	Potential eines Agens, eine Mutation auszulösen
<i>Mutation</i>	Veränderung des genetischen Materials
<i>Neoplasie</i>	Neubildung von Geweben unter Verlust der Wachstumsregulation
<i>Noxe</i>	krankheitserregende Ursache
<i>onkogen</i>	biologische, chemische und physikalische Faktoren, die über ganz unterschiedliche Mechanismen normale Zellen zur malignen Transformation veranlassen
<i>Onkogen</i>	Gen, dessen Genprodukt das Wachstum und die Differenzierung von Zellen beeinflusst. Bei Veränderungen ( Mutationen ) können Tumore induziert werden.
<i>Operon</i>	Gruppe von benachbarten und in ihrer Funktion meist eng verwandten Strukturgenen, die zusammen mit kontrollierenden Elementen in einer Transkriptionseinheit auf dem Genom organisiert sind.
<i>Pathogenese</i>	Krankheitsentstehung
<i>Phagocytose</i>	Inkorporierung fester Teilchen
<i>Phänotyp</i>	vorhandene Merkmale, äußere Erscheinungsform und funktionelle Eigenschaften
<i>Pinocytose</i>	intrazelluläre Aufnahme von gelösten Stoffen aus dem Extrazellulärraum
<i>Polyposis</i>	Vorkommen mehrerer Polypen in einem Hohlorgan
<i>Progression</i>	Drittes Stadium der Krebsentstehung, das hauptsächlich durch die Zunahme des zerstörerischen Potentials und der Metastasierungsfähigkeit des Tumorgewebes charakterisiert ist.
<i>Prädisposition</i>	Zustand, der eine Krankheit bedingt
<i>Proliferation</i>	gesteigerte Vermehrung von Zellen
<i>Promotion</i>	zweites Stadium der Krebsentstehung, in dem Zellen, die eine Irritation erfahren haben, bevorzugt vermehrt werden
<i>Prophylaxe</i>	Vorbeugung

<i>proximal</i>	rumpfwärtsgelegener Teil einer Extremität
<i>Resektion</i>	Entfernung von Organteilen
<i>reseziert</i>	entfernt
<i>Rektum</i>	Mast-/ Enddarm
<i>Retroviren</i>	Viren, die einsträngige RNA und das Enzym „Reverse Transcriptase„ enthalten
<i>RNA</i>	Ribonukleinsäure
<i>Rezeptor</i>	Protein, das spezifisch bestimmte Substanzen bindet, wodurch Folgereaktionen in der Zelle ausgelöst werden
<i>S-Phase</i>	DNA-Synthesephase (Reduplikation); die DNA wird verdoppelt, die Zelle wird tetraploid
<i>second messenger</i>	Kleine Moleküle oder Ionen, die als intrazelluläre Boten in der Signaltransduktionskette agieren
<i>Signaltransduktionskette</i>	Informationsübertragung mittels Botenstoffe
<i>Stroma</i>	bindegewebiges Stützgewebe eines Organs bzw. eines Tumors
<i>Transkription</i>	Synthese eines mRNA-Stranges, der komplementär zur DNA eines bestimmten Abschnittes ist
<i>Tumorigenese</i>	Entstehung einer Geschwulst, die gutartig (benigne) oder bösartig (maligne) sein kann
<i>Tumorsuppressorgen</i>	Bezeichnung für bestimmte Gene, deren Proteinprodukte die Zellvermehrung hemmen. Bei Funktionsausfall durch Mutation tritt Tumorwachstum auf.
<i>ubiquitär</i>	in der Umwelt vorkommend
<i>Zelltransformation</i>	Zellumbildung, maligne Entartung von eukaryonten Zellen (in vitro) durch chemische oder physikalische Noxen oder onkogene Viren

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Verschiedene Ansätze in der Krebsforschung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Der ätiologische Aspekt.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	<i>Die Ätiologie und Epidemiologie des Magenkarzinoms .....</i>	<i>4</i>
1.1.2	<i>Epidemiologie, Ätiologie und Prophylaxe von Kolon- und Rektumkarzinomen .....</i>	<i>5</i>
<b>1.2</b>	<b>Der zelluläre Aspekt .....</b>	<b>6</b>
1.2.1	<i>Die Mehrstufen-Karzinogenese .....</i>	<i>7</i>
1.2.2	<i>Veränderter Zellstoffwechsel von Tumorgeweben.....</i>	<i>13</i>
1.2.2.1	<i>Die Zellmembran von Krebszellen .....</i>	<i>13</i>
1.2.2.2	<i>Das Zytoplasma von Krebszellen.....</i>	<i>15</i>
1.2.2.3	<i>Der Zellkern von Krebszellen .....</i>	<i>16</i>
1.2.2.4	<i>Der Zellzyklus von Krebszellen .....</i>	<i>17</i>
1.2.2.5	<i>Die interzelluläre Verbindung und Kommunikation von Krebszellen</i>	<i>18</i>
1.2.2.6	<i>Wechselwirkung zwischen Krebszellen und dem Organismus .....</i>	<i>19</i>
1.2.2.7	<i>Fazit .....</i>	<i>22</i>
1.2.3	<i>Tumorgenese gastrointestinaler Tumoren .....</i>	<i>22</i>
1.2.3.1	<i>Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP).....</i>	<i>23</i>
1.2.3.2	<i>Hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome (HNPCC).....</i>	<i>23</i>
1.2.3.3	<i>Hereditäre Aspekte des Magenkarzinoms .....</i>	<i>24</i>
1.2.3.4	<i>Sporadische kolorektale Tumoren .....</i>	<i>24</i>
1.2.3.5	<i>Molekulargenetische Parameter als Prognosefaktoren bei gastrointestinalen Karzinomen .....</i>	<i>26</i>
1.2.3.6	<i>Weitere zelluläre Aspekte beim Magen-, Kolon- und Rektumkarzinom .....</i>	<i>27</i>
<b>1.2</b>	<b>Der Wachstumsaspekt .....</b>	<b>29</b>
1.3.1	<i>Klassifikation und Tumorausbreitung des Magenkarzinoms.....</i>	<i>31</i>
1.3.2	<i>Klassifikation und Tumorausbreitung des Kolon- und Rektumkarzinoms ...</i>	<i>33</i>

<b>2</b>	<b>Bedeutung der Mengen- und Spurenelemente in der Humanmedizin .....</b>	<b>35</b>
<b>2.1</b>	<b>Mengen- und Spurenelemente in der Humanmedizin .....</b>	<b>35</b>
2.1.1	<i>Einteilung und Funktion der bioanorganischen Elemente.....</i>	35
2.1.2	<i>Toleranzgrenzen der Spurenelementaufnahme .....</i>	39
2.1.3	<i>Veränderungen der organspezifischen Elementgehalte im Verlauf einer Erkrankung .....</i>	42
<b>2.2</b>	<b>Analysenverfahren in der klinischen Medizin .....</b>	<b>44</b>
2.2.1	<i>Analysenverfahren in der klinischen Medizin zur Bestimmung von Makro- und Mikroelementen .....</i>	44
2.2.2	<i>Kopplungstechniken in der bioanorganischen Speziesanalyse .....</i>	46
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil .....</b>	<b>48</b>
<b>3.1</b>	<b>Probenherkunft, Patientendaten und pathologische Befunde .....</b>	<b>49</b>
<b>3.2</b>	<b>Probennahme, Probentransport und Probenlagerung.....</b>	<b>56</b>
<b>3.3</b>	<b>Probenvorbereitung .....</b>	<b>57</b>
3.3.1	<i>Probenvorbereitung zur Bestimmung von Elementgehalten in malignen und gesunden Humangeweben des Gastrointestinaltraktes .....</i>	57
3.3.2	<i>Probenvorbereitung zur Bestimmung der Elementgehalte, der Enzymaktivitäten und Elementspezies im Cytosol von malignen und gesunden Kolongeweben .....</i>	59
<b>3.4</b>	<b>Analysenverfahren .....</b>	<b>60</b>
3.4.1	<i>Bestimmung der Elemententgehalte in Humangeweben mit Totalreflexionsröntgenfluoreszenzspektrometrie und Hydrid-Atomabsorptionsspektrometrie.....</i>	61

3.4.2	<i>Photometrische Bestimmung der Gesamtproteingehalte und Enzymaktivitäten in Cytosolen</i> .....	62
3.4.3	<i>Online Kopplungstechniken zur Bestimmung der Elementspezies in Cytosolen</i> .....	64
3.4.3.1	Die CE/ICP-MS Kopplung.....	64
3.4.3.2	Die SEC/ICP-MS Kopplung .....	65
3.4	<b>Datenanalyse</b> .....	66
4	<b>Analytische Qualitätskontrolle und –sicherung</b> .....	67
4.1	<b>Probenrepräsentanz</b> .....	67
4.2	<b>Methodenentwicklung und –validierung</b> .....	69
4.2.1	<i>Methodenentwicklung und -validierung bei der Bestimmung von Elementgehalten in malignen und gesunden Humangeweben</i> .....	69
4.2.2	<i>Methodenentwicklung und -validierung bei der Bestimmung der Elementgehalte, des Gesamtproteingehaltes und der Enzymaktivitäten in Cytosolen</i> .....	70
4.2.3	<i>Methodenentwicklung und -validierung zur Nickelspeziesanalyse in Cytosolen mittels CE/ICP-MS</i> .....	72
4.3	<b>Qualitätskontrolle und –sicherung</b> .....	73
4.3.1	<i>Qualitätskontrolle und -sicherung bei der Bestimmung von Elementgehalten in malignen und normalen Humangeweben</i> .....	73
4.3.2	<i>Qualitätskontrolle und –sicherung bei der Bestimmung der Elementgehalte, des Gesamtproteingehaltes und der Enzymaktivitäten im Cytosol</i> .....	75
4.3.3	<i>Qualitätskontrolle und –sicherung bei der Nickelspeziesanalyse mittels CE/ICP-MS</i> .....	76
4.3.4	<i>Qualitätskontrolle und –sicherung bei der Nickelspeziesanalyse mittels SEC/ICP-MS</i> .....	77

<b>5</b>	<b>Mengen- und Spurenelemente in normalen und malignen Humangeweben des Gastrointestinaltraktes .....</b>	<b>78</b>
<b>5.1</b>	<b>Verteilung der Mengen- und Spurenelemente in normalen und malignen Gewebeproben .....</b>	<b>78</b>
5.1.1	<i>Gewebetypklassifizierung mittels chemometrischer Methoden .....</i>	<i>87</i>
5.1.2	<i>Elementkorrelationen in malignen und normalen Geweben .....</i>	<i>96</i>
<b>5.2</b>	<b>Verteilung der Mengen- und Spurenelemente in Cytosolen von normalen und malignen Gewebeproben .....</b>	<b>101</b>
5.2.1	<i>Bedeutung des Calciums bei Krebserkrankungen des Gastrointestinaltraktes .....</i>	<i>106</i>
5.2.2	<i>Die Bedeutung des Nickels bei der Tumorprogression gastrointestinaler Neoplasien .....</i>	<i>110</i>
<b>5.3</b>	<b>Bedeutung des oxidativen Stresses bei der Karzinogenese kolorektaler Krebserkrankungen .....</b>	<b>112</b>
5.3.1	<i>Aktivität der Glutathionperoxidase (Gpx) in malignen und normalen Geweben .....</i>	<i>114</i>
5.3.2	<i>Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) in malignen und normalen Geweben .....</i>	<i>117</i>
<b>5.4</b>	<b>Elementspeziesanalyse im Cytosol von malignen und normalen Geweben mittels SEC/ICP-MS .....</b>	<b>120</b>
5.4.1	<i>Vanadiumspezies im Cytosol von kolorektalen Humangeweben .....</i>	<i>122</i>
5.4.2	<i>Arsenspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe .....</i>	<i>123</i>
5.4.3	<i>Molybdänspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe .....</i>	<i>125</i>
5.4.4	<i>Iodspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe .....</i>	<i>126</i>
5.4.5	<i>Zinnspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe .....</i>	<i>128</i>
5.4.6	<i>Cadmium- und Bleispezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe .....</i>	<i>129</i>
5.4.7	<i>Manganspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe .....</i>	<i>131</i>
5.4.8	<i>Selen- und Zinkspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe .....</i>	<i>132</i>
5.4.9	<i>Kupferspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe .....</i>	<i>134</i>

<b>5.5</b>	<b>Analyse der Nickelspezies im Cytosol von malignen und normalen Geweben mittels CE/ICP-MS und SEC/ICP-MS .....</b>	<b>137</b>
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>143</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>147</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>195</b>





## 1 Verschiedene Ansätze in der Krebsforschung

Die Betrachtung des Krebsproblems und theoretische Aussagen darüber werden durch die Arbeitsrichtungen der betreffenden Wissenschaftler bestimmt. Die Sicht eines Toxikologen [1] ist eine andere als die eines Molekularbiologen [2] oder Biochemikers [3,4]. Um die Krebskrankheit als Gesamtbild erfassen zu können, müssen folgende drei Aspekte berücksichtigt werden:

- ⇒ Der ätiologische Aspekt (Herstellung der Kausalität zwischen exogenen und / oder endogenen Faktoren und der Karzinogenese),
- ⇒ Der zelluläre Aspekt (Intrazelluläre biologisch-chemische Veränderungen, die zur Transformierung einer normalen Körperzelle zu einer Krebszelle führen. Ein Teilaspekt sind die genetischen Veränderungen),
- ⇒ Der Wachstumsaspekt (Vermehrung von Krebszellen zum klinisch manifesten Tumor, wobei nicht nur intrazelluläre Vorgänge seitens der Krebszellen eine Rolle spielen, sondern auch interzelluläre Vorgänge und insbesondere die Wechselwirkungen zwischen Wirtsorganismus und Krebszellen zu berücksichtigen sind).

### 1.1 Der ätiologische Aspekt

Unter dem Begriff Ätiologie verbirgt sich die Krankheitsentstehung, wobei es sich in erster Linie um die Forschung nach exogenen und / oder endogenen Noxen handelt. Eine gezielte und intensive Ursachenforschung wurde im Zuge der Industrialisierung bereits zu Beginn dieses Jahrhunderts eingeleitet, spätestens seit Pott, v. Volkmann, Rehn u.a. beobachtet hatten, dass Krebs unter Einwirkung chemischer Substanzen (exogene Noxen) entstehen kann. Sie führten den Begriff des „Berufskrebses“ ein [5]. Die systematische Epidemiologie wurde bereits 1842 von Stern vorgeschlagen, wurde aber zunächst auf das Arbeitsgebiet der geographischen Pathologie (Krankheitshäufigkeiten in Abhängigkeit von der geographischen Lage in Verbindung mit Lebensgewohnheiten, Sitten, Gebräuchen und Lebensbedingungen) beschränkt [6]. Als Beispiel sei der Magenkrebs genannt, der in Entwicklungsländern (vorwiegend asiatischen Ländern) fast doppelt so häufig auftritt wie in industrialisierten Ländern

[7]. Ausnahme ist Japan, Japaner sind mit einer Frequenz von 77,9 bezogen auf 100.000 männliche Einwohner und 33,3 bezogen auf 100.000 weibliche Einwohner am häufigsten betroffen. Niedrige Magenkrebsraten sind in Ost- und Nordafrika, Nordamerika, Süd und Süd-Ost Asien zu verzeichnen. Die Magenkrebshäufigkeit ist mittlerweile weltweit rückgängig. Dieser Rückgang ist zum Teil auf die Entdeckung des Bakteriums *Helicobacter pylori*, dessen Karzinogenität momentan noch zu beweisen ist, allerdings von der International Agency of Research on Cancer (IARC) bereits als Karzinogen eingestuft wurde [8], und auf die Änderung der Lebensbedingungen zurückzuführen. Eine *Helicobacter pylori* Infektion ist vor allem in den asiatischen Ländern registriert, wo die hygienischen Bedingungen entsprechend schlecht sind.

Anders verhält es sich beim Kolon- und Rektumkrebs. Die Inzidenz des kolorektalen Karzinoms ist in industrialisierten Ländern um den Faktor 2 höher als in Entwicklungsländern bezogen auf neu aufgetretene Krebsfälle ab 1990. Intestinale Krebserkrankungen in industrialisierten Ländern werden mit zu hohem tierischen Fettkonsum, übermäßigem Alkohol- und Tabakgenuss in Verbindung gebracht [7].

Der meist verbreitete Krebs ist der Lungenkrebs. Die Lungenkrebshäufigkeit für Männer liegt weltweit bei 18% gefolgt von der Magenkrebshäufigkeit, die weltweit bei 10% liegt. Die häufigste Krebsart bei der Frau ist das Mammakarzinom mit einer Rate von 21%, wobei die seit 1990 neu aufgetretenen Fälle in Industrieländern um den Faktor 1,5 höher sind als in Entwicklungsländern.

Prinzipiell lassen sich exogene Noxen in drei Kategorien unterteilen:

- ⇒ Chemische Karzinogene,
- ⇒ Physikalische Karzinogene,
- ⇒ Biologische Karzinogene.

Unter chemische Karzinogene fallen alle chemischen Substanzen, die Tumore induzieren. Sie werden über die Nahrung, über Inhalation und über dermalen Kontakt inkorporiert. Die Quellen für die karzinogenen Stoffe sind sehr vielschichtig, die größten Eintragsquellen sind Industriebetriebe, Straßenbau, der weltweit zunehmende Ausstoß an Autoabgasen und der als Lebensgewohnheit weltweit verbreitete Tabakkonsum.

Physikalische Kanzerogene sind ionisierende Strahlung (UV- und  $\gamma$ -Strahlung), wobei bei direkter Tumorinduktion die kanzerogene Wirkung dosisunabhängig ist, und mechanischer Druck.

Unter biologische Karzinogene fallen onkogene DNA- und RNA-Viren (Oncorna-Viren) [2,3]. Viren sind infektiöse Assoziante aus einer Nukleinsäure (DNA oder RNA), die von symmetrisch angeordneten Proteinen eingehüllt wird. Sie werden nach ihrer Nukleinsäure, die einzel- oder doppelsträngig, linear oder zirkulär sein kann, unterschieden. Das erste krebserzeugende Virus (Rous-Sarkom-Virus) wurde bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts nachgewiesen. Das zur Gruppe der onkogenen RNA-Viren zählende Virus löst bösartige Geschwulste bei einer Vielzahl von Säugetieren aus. RNA-Viren integrieren ihre genetische Information nach Umschreibung der RNA in DNA (Provirus) durch das viruscodierte Enzym „reverse Transkriptase“. Viren mit stark zelltransformierenden Eigenschaften besitzen ein sogenanntes Onkogen (virales Src-Gen, das für die schnelle Transformation zuständig ist). Dieses Gen löst die Phosphorylierung von Membran- und Cytoskelett-Proteinen aus. Die Phosphorylierung von Proteinen spielt eine entscheidende Rolle bei der Krebsentstehung. Retroviren besitzen dieses Gen nicht. Sie transformieren die Zelle, indem das Retrovirus in unmittelbarer Nähe eines zellulären Onkogens, das ebenfalls Src-Sequenzen enthält, ins Wirtsgenom eingebaut wird. Dadurch wird das Wirtsgenom vermehrt exprimiert (Übertragung der genetischen Information in ein Genprodukt (Polypeptid oder Protein)). Folgende Viren können bestimmte Krebserkrankungen auslösen bzw. stehen im Verdacht an der Tumorgenese beteiligt zu sein:

- ⇒ Hepatitis B-Viren können hepatozelluläre Karzinome nach chronischer Hepatitis B Infektion hervorrufen [9]. Die molekularen Zusammenhänge sind allerdings noch unklar.
- ⇒ Das humane T-lymphotrope Retrovirus kann eine bestimmte Form der Leukämie verursachen. Diese spezielle Form der Leukämie tritt allerdings in Europa extrem selten auf [3].
- ⇒ Human pathogene Papillomvirustypen (HPV) können zur Tumorgenese von Gebärmutterhalskrebs beitragen [10]. In allen HPV-positiven Karzinomen (90% der Gebärmutterhalsneoplasien) sind zwei der Virusgene aktiv. Die onkogene Wirkung der Viren entsteht dadurch, dass sie zelluläre Antionkogene bzw. Tumorsuppressorgene inaktivieren. Die Inaktivierung des zellulären p53-Antionkogenprodukts durch das sogenannte virale E6-Genprodukt und des

zellulären Rb-Tumorsuppressorgenprodukts durch das sogenannte virale E7-Genprodukt.

Unter endogenen Noxen werden die individuellen, körpereigenen Bedingungen, wie Alter, Hormon-, Immun- und Stoffwechselstatus, Psyche und Erbgut, zusammengefasst. Details sind in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführt.

### *1.1.1 Die Ätiologie und Epidemiologie des Magenkarzinoms*

Die Ätiologie des Magenkarzinoms ist weitgehend ungeklärt, da die kanzerogene Bedeutung zahlreicher exogener und in der Nahrung enthaltener Substanzen durch epidemiologische Studien nicht gesichert werden konnte. Selbst Nitrosamin, das sich im Tierexperiment als karzinogen erwies, konnte beim humanen Magenkarzinom nicht eindeutig als Krebsauslöser bestätigt werden. Eine Studie über die in der Nahrung enthaltenen möglichen Karzinogene führte lediglich zu dem Schluss, dass durch die Ergebnisse eine Krebsprophylaxe der in der späten Lebensphase auftretenden Tumore (Alterstumore) eingeleitet werden kann [11,12]. Die Diskussion um die karzinogene Wirkung des Bakteriums *Helicobacter pylori* ist zur Zeit noch im vollen Gang und muss zunächst molekularbiologisch und molekulargenetisch abgesichert werden. Erste Hinweise einer Korrelation zwischen dem Zigarettenkonsum und dem *Helicobacter pylori* Infektionsstatus konnten über eine randomisierte epidemiologische Untersuchung erhalten werden [13]. Prinzipiell können aber Risikogruppen definiert werden. Darunter fallen bestimmte Berufsgruppen, Gruppen mit niedrigem sozioökonomischen Status und Gruppen mit spezieller Ernährung, wie z.B. der übermäßige Konsum von Räucherfleisch oder gepökelten Speisen. Ein weiterer Risikofaktor ist das Alter in Korrelation mit Vorerkrankungen des Magens. In diesem Zusammenhang sind folgende Erkrankungen zu nennen, die präkanzeröse Läsionen auslösen können:

- ⇒ die chronische atrophische Gastritis des Typs A und B,
- ⇒ Morbus Ménétrier,
- ⇒ genetische Faktoren (Das diffuse Magenkarzinom tritt signifikant häufiger bei Menschen der Blutgruppe A, bei familiärer Karzinomhäufigkeit und bei familiärer Hypogammaglobulinanämie auf),

- ⇒ resezierter Magen mit erhöhter Magenkarzinominzidenz 15-20 Jahre nach Resektion.

In Deutschland beträgt die Inzidenz des Magenkarzinoms des Mannes 29,8 auf 100.000 Einwohner und die der Frau 13,2 auf 100.000 Einwohner. Die Mortalitätsraten für das Magenkarzinom zeigen ein deutliches Süd-Nord-Gefälle.

Das Magenkarzinom wird nach folgenden pathologisch-anatomischen Typen gemäss Laurén unterschieden [14]:

- ⇒ Der diffuse Typ (endemische Form), der vermutlich eher mehr durch individuelle Faktoren als durch Umweltfaktoren beeinflusst ist,
- ⇒ Der intestinale Typ (epidemische Form), der eindeutig durch exogene Faktoren beeinflusst ist.

### *1.1.2 Epidemiologie, Ätiologie und Prophylaxe von Kolon- und Rektumkarzinomen*

Epidemiologische Studien haben gezeigt, dass die 5-Jahresüberlebensrate in der weißen Bevölkerung 60% und in der schwarzen Bevölkerung 48% für die an Kolonkrebs erkrankten Patienten beträgt. Eine ähnliche Diskrepanz von 54% zu 41% wird für das Rektumkarzinom gefunden [7]. Diese Beobachtungen führen zu der Annahme, dass es genetische Unterschiede in den verschiedenen Bevölkerungsgruppen gibt. In Deutschland sind 29,9 Sterbefälle bzw. 10,2 je 100.000 Einwohner bei Frauen und 22,8 bzw. 10,1 Sterbefälle je 100.000 Einwohner bei Männern aufgrund eines Kolon- bzw. Rektumkarzinoms zu verzeichnen [6]. Das Häufigkeitsmaximum liegt bei 65 Jahren und tritt fast immer erst oberhalb von 50 Jahren auf. Die altersstandardisierte Mortalitätsrate der an einem Rektumkarzinom erkrankten Patienten ist rückläufig.

Auch beim kolorektalen Karzinom ist die Ätiologie weitestgehend unbekannt. Die Inzidenz und die Mortalitätsrate werden hauptsächlich durch diätische, genetische und Umweltfaktoren beeinflusst. Zu den gesicherten Risikofaktoren gehören der Konsum von Alkohol und Tabak, familiäre Erkrankungen und genetische Veränderungen [15-18]. Der viel zitierte Genuss fett- und kalorienreicher Kost mit geringem Faseranteil hat offenbar nur einen geringen Einfluss auf die Karzinogenese [6].

Erhöhte Inzidenz des kolorektalen Karzinoms besteht bei folgenden Risikogruppen [19-21]:

- ⇒ Patienten mit autosomal-dominant vererbter adenomatöser Polyposis (FAP) haben höchstes Erkrankungsrisiko.
- ⇒ Familien mit Lynch-Syndrom (Hereditäre Nicht-Polypöse Colorectale Carcinome HNPCC) haben ein erhöhtes Erkrankungsrisiko.
- ⇒ Patienten mit Colitis ulcerosa haben ein deutlich erhöhtes Erkrankungsrisiko.
- ⇒ Patienten mit Morbus Crohn haben ein geringfügig erhöhtes Erkrankungsrisiko.

## 1.2 Der zelluläre Aspekt

Die Entstehung höherer vielzelliger Organismen beruht auf der Spezialisierung verschiedener Einzelzellen. Die Entwicklung, die zu den einzelnen Arten spezialisierter Zellen führt, wird als Differenzierung bezeichnet. Als Folge davon nehmen Regulations- und Steuerungsmechanismen zu. Allgemein kann Krebs als intrazelluläre Regulationsstörung aufgefasst werden, bei der die biochemischen Stoffwechselprozesse, allen voran die Synthese der für die Regulation notwendigen Makromoleküle, verändert sind [2]. In Anbetracht der Tatsache, dass Zellen molekulare Netzwerke sind, kann Krebs auch als Entgleisung der normalen Kommunikation betrachtet werden [22]. Aus molekulargenetischer Sicht ist Krebs eine genetische Erkrankung mit individuellem Fingerabdruck (die geschädigten Gene zeigen ein sehr unterschiedliches, d.h. ein individuelles Muster).

Die Vorstellungen über die intrazellulären Veränderungen während der Karzinogenese konnten in den letzten Jahren durch die Fortschritte in der molekularen Biologie präzisiert und transparent gemacht werden [5]. Unter diese Arbeitsrichtung fällt die Aufklärung der Funktion und Wirkung der Gene auf molekularer Ebene und des gen-regulierten Zellstoffwechsels.

Die sich durch ein Ungleichgewicht der Proliferation und Differenzierung einerseits und dem programmierten Apoptose (Zelltod) andererseits bildenden Tumore können benigne (gutartig) oder maligne (bösartig) sein [3]. Je nachdem, ob die Tumoren von Mesenchym- oder Epithelzellen ausgehen, wird zwischen Sarkomen und Karzinomen unterschieden. Tumoren der blutbildenden Zellen werden als Leukämien be-

zeichnet und stellen neben den Lymphomen (in den Lymphknoten bzw. in der Milz werden atypisch große Mengen Lymphozyten produziert) Untergruppen der Sarkome dar [2,3].

Alle diese Krebsarten weisen charakteristische Eigenheiten auf, durch die sie als Neoplasma gekennzeichnet sind: Unkontrolliertes irreguläres, invasiv destruktives Wachstum, Ent- bzw. Dedifferenzierung sowie die Fähigkeit Absiedlungen (Vorgang der Metastasierung) zu bilden. Histopathologisch zeigen sich die Besonderheiten der Krebszellen im

- ⇒ Mitosereichtum – atypische Mitosefiguren,
- ⇒ verändertes Verhältnis zwischen Zellkern und Zytoplasma,
- ⇒ Destruktion oder Fehlen der Basalmembran,
- ⇒ fehlende Differenzierung – Anaplasie
- ⇒ invasives Wachstum [2].

### *1.2.1 Die Mehrstufen-Karzinogenese*

Generell wird die Karzinogenese als Mehrstufenprozess akzeptiert [2,3,6,23-26]. Die einzelnen Stufen repräsentieren jeweils Genmutationen oder epigenetische Veränderungen wie z.B. Methylierungen, die sowohl die Aktivierung von dominant agierenden Onkogenen als auch die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen auslösen können. Die Latenzzeit zwischen den ersten gentoxischen Ereignissen und dem Auftreten eines klinisch manifesten Tumors beträgt zehn bis über 20 Jahre.

Der erste Schritt des Mehrstufenprozesses ist die Tumorinitiation. Sie beinhaltet die Exposition normaler Zellen durch chemische, physikalische oder mikrobiologische Karzinogene, durch die eine oder mehrere genetische Veränderungen (DNA-Schädigung) verursacht werden [26,27]. Die Initiation wird als irreversibler Vorgang angesehen. Bei ausreichender Dosierung kann ein Initiator auch ohne nachfolgende Applikation eines Promotors Tumoren erzeugen (komplette Kanzerogene). Die Effekte des Promotors dagegen sind reversibel. Die Promotion ist die Beschleunigung der Tumorentstehung durch die präferentielle (bevorzugte) Vermehrung initiiert Zellen. Ein klinisch manifester Tumor stellt weder phänotypisch noch genotypisch einen Endzustand dar. Neue Mutationen führen zu einer Zunahme der Wachstumsautonomie, des destrukturierenden Potentials und der Metastasierungsfähigkeit des Tumorge-

webes. Dieses Stadium der Zunahme der Malignität der Tumorzellen durch neue mutative Ereignisse wird als Progression bezeichnet. Komplette Kanzerogene können alleine angewandt alle drei Stadien auslösen und einen klinisch manifesten Tumor erzeugen.

In der Literatur sind zwei verschiedene Modelle der Tumorevolution, das Modell *inverse Pyramide* und das Modell *Verknüpfung (Nexus)*, beschrieben [25]. Beide Modelle sind in Abb. 1-1 dargestellt. Die Buchstaben des Alphabets stehen jeweils für ein spezifisches Gen, das mutiert ist. Jede Stufe repräsentiert eine Anzahl alternativer Gene, die mutiert sein können. Beide Hypothesen lassen die Interpretation hinsichtlich Mutationsinstabilitäten und Mutationsraten offen. Der Selektionsdruck ist in der Hauptsache von der Umgebung der einzelnen Mutationen geprägt. Beim Modell der inversen Pyramide bestimmt die erste Mutation die Selektion der zweiten Mutation (interne Selektion). Beide interagieren um die optimale Aktivität sicherzustellen und zusammen bilden sie die Basis für die Selektion der dritten Mutation usw. bis die Anzahl der nötigen Mutationen, die zu einem klinisch manifesten Tumor führen, erreicht sind, wobei weitere Mutationen in der Phase der Progression die Mutagenität der Tumorzellen erhöhen können. Dieses Modell deckt sich mit den Beobachtungen, dass Mutationen nicht statistisch verteilt in einem bestimmten Gen, sondern gehäuft in bestimmten Regionen auftreten. Jedes Mutagen bzw. jeder mutagene Prozess hinterlässt einen charakteristischen Fingerabdruck von DNA-Veränderungen.

Eine Alternative zum Modell der inversen Pyramide ist das Modell der Verknüpfung (Nexus), bei dem zwar ebenfalls Interaktionen der Mutationen untereinander angenommen wird, allerdings ohne strikte Abhängigkeit voneinander. In diesem Fall kann die Tumorentstehung zwar als Verknüpfung von miteinander verbundener Mutationen angesehen werden, wobei aber der Selektionsdruck auf jede einzelne Mutation lastet, so dass vorherige Mutationen nicht länger essentiell für das Überleben der transformierten Zelle sind. Die Mutationen jeder passierten Stufe sind irreversibel, während sie nach dem Modell der inversen Pyramide im günstigsten Fall (Kombination der Mutationen nach Durchlaufen der einzelnen Stufen: ADGLR) reversibel sind (Pyramidenkollaps). Vermutlich verläuft die in vivo Tumorgenese nach einer Kombination aus beiden Modellen.



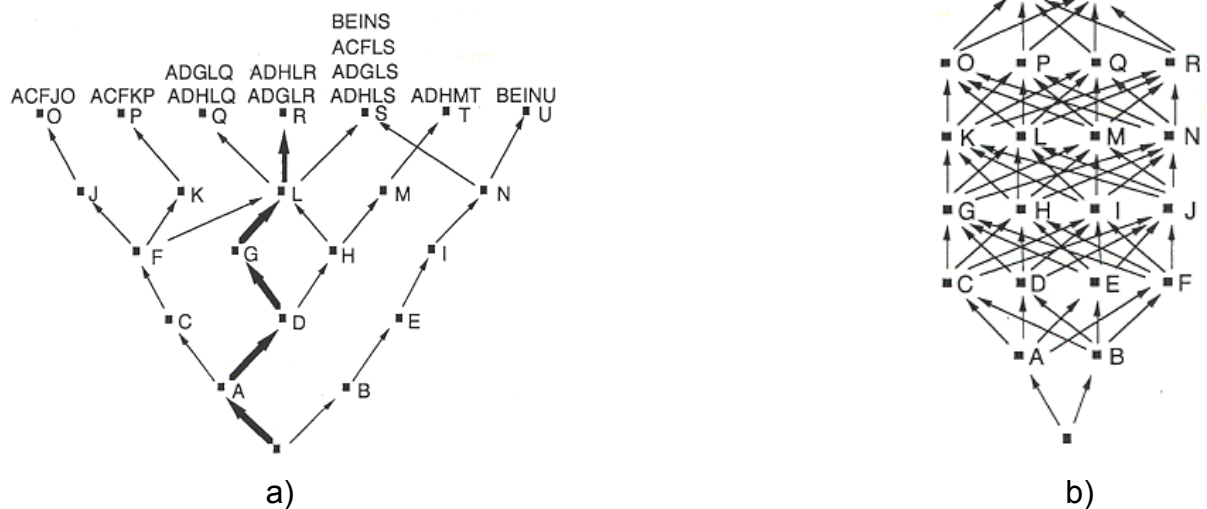


Abb. 1-1 Modelle der *Tumorgenese* a) **Inverse Pyramide** b) **Nexus** (Verknüpfung) [25]

Die wichtigsten DNA-Schäden, die nicht repariert zu bleibenden Veränderungen im Genom führen, sind nachfolgend aufgeführt [26,27]:

- ⇒ Bestimmte DNA-Basenmodifikationen (z.B. Bildung von DNA-Addukten durch Reaktion elektrophiler Fremdstoffe oder im Organismus entstehender Fremdstoffmetaboliten mit DNA-Basen; Thymindimere unter Einwirkung von UV-Strahlung; O<sup>6</sup>-Methylguanin durch Dimethylnitrosamin usw.),
- ⇒ DNA-Strangbrüche (DNA-Einzelstrangbrüche durch reaktive Sauerstoffradikale; DNA-Doppelstrangbrüche durch Aktivierung calciumabhängiger Endonukleasen),
- ⇒ AP-Läsionen (Verlust einer DNA-Base durch Hydrolyse der glykosidischen Bindung),
- ⇒ Quervernetzungen (Crosslinks zwischen zwei Basen des gleichen DNA-Stranges oder zwischen der DNA und einem Kernprotein),
- ⇒ Interkalation (Veränderung der räumlichen Struktur des DNA-Doppelstranges).

Wesentliches Ziel der Krebsforschung auf molekulargenetischer Ebene ist die Identifizierung der für die drei Phasen (Tumorinitiation, -promotion und -progression) der einzelnen Tumorerkrankungen beim Menschen verantwortlichen Gene. Zu diesen sog. Krebsgenen gehören Onkogene (Protoonkogene) und Antionkogene, die die Tumorgenese fördern bzw. supprimieren (unterdrücken) [23,28-32]. Diese Gene sind

im normalen, d.h. genetisch nicht veränderten Zustand als Schlüsselgene für die Transduktion physiologischer Signale vom Zelläußeren zum Zellkern verantwortlich. Extrazelluläre Information gelangt in Form von Signalmolekülen oder Liganden an die Zellmembran. Diese first messenger (Botenstoffe) können Neurotransmitter, Hormone oder Wachstumsfaktoren sein. Der Informationsempfang erfolgt über an der Oberfläche befindliche Erkennungsmoleküle (Rezeptoren), die externe in interne Signale umwandeln. Die Andockung des Botenstoffs löst eine Konformationsänderung des Rezeptors nicht nur auf der Zelloberfläche, sondern auch im Inneren der Zelle aus, wodurch die Informationsweitergabe gesichert wird. Im Zellinneren erfolgt eine weitere Informationsübermittlung über Brückenmodule (in den meisten Fällen phosphorylierende Proteinkinasen) an intrazelluläre Proteine (second messenger), die eine Veränderung der Genexpression bewirken (siehe dazu Abb. 1-2).

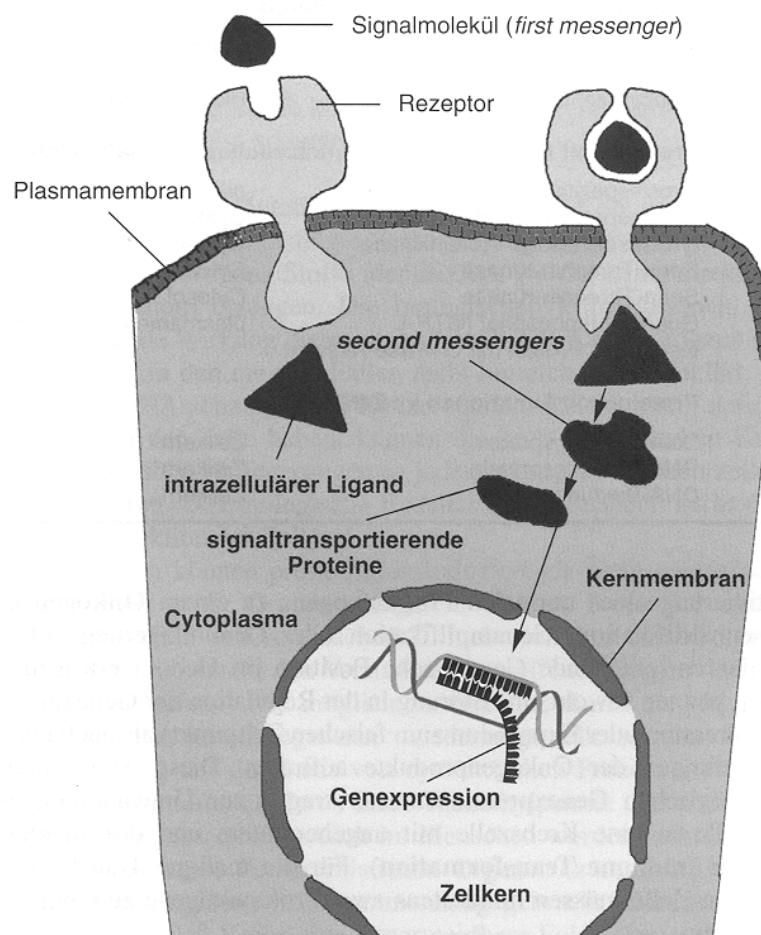


Abb. 1-2 Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion [26]

Zwischen den Produkten von Protoonkogenen und Antionkogenen, den Onkoproteinen und Antionkogenproteinen, besteht ein exakt reguliertes Gleichgewicht. Wird dieses Gleichgewicht durch die konstitutive Aktivierung von Protoonkogenen (c-Onkogene) oder die Inaktivierung von Antionkogenen gestört, so wird die Tumorentstehung begünstigt. Die Aktivierung eines Protoonkogens zu einem Onkogen kann durch Basenmodifikation, Genamplifikation oder Genumlagerung auf neue, für das entsprechende Gen falsche Position im Genom erfolgen. Die von Protoonkogenen codierten Proteine sind an der Regulation der Proliferation und Differenzierung beteiligt. In Tabelle 1-1 sind einige der wichtigsten Protoonkogene, deren Funktion und die Lokalisation der von den Protoonkogenen codierten Proteine aufgelistet.

Tab. 1-1 Wichtige Protoonkogene und die Funktion und Lokalisation der von ihnen codierten Proteine [26]

<i>Protoonkogen</i>	<i>Funktion des Proteins</i>	<i>Lokalisation des Proteins</i>
<b>Proteine als Zelloberflächenrezeptoren</b>		
erb B	epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor	Plasmamembran
ros	Insulinrezeptor	Plasmamembran
<b>Proteine mit Funktionen in der intrazellulären Signaltransduktion</b>		
src	tyrosinspezifische Proteinkinase	plasmamembranassoziiert
abl	tyrosinspezifische Proteinkinase	Cytosol
fes	tyrosinspezifische Proteinkinase	Cytosol
mos	Serin-Threonin-Kinase	Cytosol
raf	Serin-Threonin-Kinase	Cytosol
ras	Guanosintriphosphat (GTP-) bindendes Protein mit GTPase-Aktivität	plasmamembranassoziiert
<b>Proteine mit Funktionen im Zellkern</b>		
myc	DNA-Bindungsprotein	Zellkern
fos	DNA-Bindungsprotein	Zellkern
myb	DNA-Bindungsprotein	Zellkern

Störungen können in der Regulation der Genexpression (erhöhte Expression) als auch in quantitativen oder qualitativen Veränderungen der Onkogenprodukte auftreten.

Eine Zentralstellung in der Signaltransduktion hat das ras-Onkogen, dessen Proteinprodukt (Ras-Protein) nach Aktivierung durch Wachstumsfaktoren mit Tyrosinkinaseaktivität Guanosintriphosphat (GTP) bindet und somit die Signaltransduktionskaskade weiterleitet [33-36]. Kontrolliert wird das Ras-Protein durch das sogenannte GAP-Protein (GTPase activating protein), indem GAP die GTPase-Aktivität von ras und damit eine Inaktivierung von Ras einleitet. Wird eine Aminosäure im Ras-Protein ausgetauscht, so ist eine Bindung des GAP-Proteins an das Ras-Protein nicht mehr möglich. Folge ist eine Daueraktivierung der Zelle.

Der Verlust von Antionkogenen (Tumorsuppressorgenen), die für Proteine codieren, wie z.B. die Antionkogenproteine Rb105 und p53, die ihrerseits die Expression von Zellteilungsproteinen hemmen und damit die Zellteilung kontrolliert verhindern, führt zu einer Überproduktion von Zellteilungsproteinen. Das Rb-Genprodukt hemmt über die Inaktivierung der Transkriptionsfaktoren E2F und DP1 den Eintritt in die S-Phase der Zellteilung [37] und das p53-Genprodukt [33,34,38-41] hemmt den Übergang in die S-Phase bei DNA-Schädigungen. Es werden aber auch andere Funktionen von Antionkogenprodukten diskutiert, wie z.B. DNA-Reparaturfunktionen. Die möglichen Funktionen sind nachfolgend aufgelistet [3]:

- ⇒ Induktion terminaler Differenzierung,
- ⇒ Aufrechterhaltung genomischer Stabilität (Mutator-Gene),
- ⇒ Triggerung des Alterungsprozesses,
- ⇒ Regulation des Zellwachstums,
- ⇒ Hemmung von Proteinasen,
- ⇒ Modulation von Histokompatibilitätsantigenen,
- ⇒ Regulation der Angiogenese (Neubildung von Gefäßen),
- ⇒ Vermittlung der Zell-Zell-Kommunikation.

Ein ähnliches Gleichgewicht wie zwischen Onkoproteinen und Antionkogenproteinen muss für die Gene herrschen, die für die Begünstigung oder Hemmung der Ausbreitung von Zellen (Metastogene und Antimetastogene) verantwortlich sind [3].

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Karzinogenese ein Mehrstufenprozess ist, in dem multiple genetische und epigenetische Ereignisse in Protoonkogenen, Tumorsuppressorgenen und Antimetastogenen involviert sind. Da praktisch jedes in humanen Zellen erzeugte Protein von einer Mutation betroffen sein kann und jedes Protein, sei es Enzym, Hormon, Rezeptor, Transkriptionsfaktor, Cytoskelettprotein, Ionenkanal usw. Bestandteil eines komplexen Systems darstellt, führt die Mutation zu einer Störung in dem Netzwerk der Beziehungen (siehe dazu Begriffsdefinition Krebs), die das mutierte Protein mit den anderen Teilnehmern des Netzwerkes besitzt.

### *1.2.2 Veränderter Zellstoffwechsel von Tumorgeweben*

Um die veränderten Zellstoffwechselprozesse von Tumorgeweben im Vergleich zu Normalgeweben zu systematisieren, ist es sinnvoll die Unterschiede jeweils für die einzelnen Bestandteile einer Zelle (Zellmembran, Cytoplasma und Zellkern), für den Zellzyklus und für die interzellulären Verbindungen und Kommunikation aufzuzeigen.

#### *1.2.2.1 Die Zellmembran von Krebszellen*

Das Bauprinzip der Zellmembran neoplastischer Zellen unterscheidet sich grundsätzlich nicht von dem normaler Zellen [2,3]. Hauptkomponente der Zellmembran sind die Lipide, in deren Doppelschicht Proteine eingebaut sind, wobei an beide Molekülarnten Kohlenhydrate gekoppelt sein können. Der Unterschied zwischen Krebs- und Normalzellen kann sowohl qualitativer als auch quantitativer Art sein. Die Zellmembran ihrerseits ist an vielen biologischen und physiologischen Prozessen beteiligt, wie z.B. Wachstum, Vermehrung, Ortsbeweglichkeit, Differenzierung und interzelluläre Kommunikation. Alle diese Prozesse sind bei Krebszellen verändert, wobei die erworbenen Eigenschaften von Krebszellen auf komplexen Modifikationen beruhen, die letztendlich auch zur Individualität eines jeden Tumors beitragen.

Die meisten Alterationen der nachfolgend aufgeführten Veränderungen in den Hüllmembranen von Krebszellen sind entweder auf den Mangel oder den Verlust bestimmter Normalkomponenten zurückzuführen [2].

- ⇒ Ausbildung neuer Membranantigene (Makromoleküle aus Proteinen, Lipiden oder Polysacchariden oder aus deren Kombination), die nicht unbedingt immunogen wirken. Als Beispiel seien die Neoantigene (MNA) genannt, die nur von Tumorzellen synthetisiert werden.
- ⇒ Verlust normaler Membranantigene, wie z.B. Fibronectin, auch als „large external transformation sensitive“ LETS-Protein bezeichnet, wird von Krebszellen nicht produziert und kann von außen an Krebszellen nicht andocken.
- ⇒ Die Membranglykoproteine sind in Krebszellen verändert. Der Saccharidanteil der bislang identifizierten Membranglykoproteine setzt sich im wesentlichen aus fünf verschiedenen Zuckermolekülen zusammen: Glukosamin, Mannose, Fukose, Galaktose und Neuraminsäure. Sie können in Variationen und Permutationen verschieden lange Oligosaccharidketten aufbauen, wobei die Glykoproteine je nach Größe des Saccharidanteils in drei Gruppen eingeteilt werden: Gruppe **A** (Glykoproteine mit  $M_R$  von 4600 Da), Gruppe **B** (Glykoproteine mit  $M_R$  von 3600-3800 Da) und Gruppe **C** (Glykoproteine mit  $M_R$  von 2900 Da). In transformierten Zellen treten die Glykoproteine der Gruppe **A** vermehrt, die der Gruppe **B** wenig verändert und die der Gruppe **C** vermindert auf. Neben quantitativen Unterschieden wurden auch qualitative gefunden. (Fehlen oder Austausch ganz bestimmter Saccharidmoleküle). Die Vermehrung der Glykoproteine der Gruppe **A** in transformierten Zellen ist gleichzeitig mit einer Produktionserhöhung des zur Synthese notwendigen Enzyms (Sialyltransferase) verbunden (Erhöhung der Sialyltransferase-Aktivität). Die Funktionen der Glykoproteine liegen in der interzellulären Kommunikation, der gegenseitigen Erkennung, der Adhäsion und der Aggregation, die allesamt beim invasiven Wachstum von Krebszellen und bei der Metastasierung eine wichtige Rolle spielen.
- ⇒ Veränderungen von Membranglykolipiden in Krebszellen sind ebenfalls nachweisbar. Die bei neoplastischen Zelltransformationen identifizierten Glykolipidveränderungen werden in sieben Typen unterteilt, wobei die Veränderungen von Typ 1 bis Typ 4 durch unvollständige Synthese der Glykolipide und die Alterationen des Typs 5 bis Typ 7 durch Synthese neuer Kohlenhydratreste hervorgerufen wird. Die Glykolipide selbst bilden Erkennungsmerkmale an Zellen, die vom Immunsystem registriert werden. Gleichzeitig können sie dessen Reaktionen beeinflussen.

- ⇒ Veränderungen in der Phagozytosefähigkeit (ausgelöst durch das Fehlen von Transportregulatorien), der Membranpermeabilität (Krebszellen sind für bestimmte Stoffe durchlässiger), der Haftfähigkeit (sie ist in Krebszellen wesentlich geringer als in Normalzellen), der Beweglichkeit der Membranbausteine (Membranbausteine sind in transformierten Zellen beweglicher), der Agglutinierbarkeit durch Lektine (ist in Krebszellen erhöht), im Muster der Oberflächenenzyme und in der Oberflächenladung.
- ⇒ Die Veränderungen in der Glukoseaufnahme können immens sein. Die in entarteten Zellen beobachtbare, erhöhte Glukoseaufnahme kann entweder auf einer Veränderung des Zuckertransportsystems oder der Alteration der physikalischen und funktionellen Eigenheiten der Zellmembran beruhen. Dieser Fakt wird bei einem bildgebenden Verfahren in der Tumordiagnostik (Positronen-Emissions-Tomographie, abgek. PET) genutzt [42].

#### 1.2.2.2 Das Zytoplasma von Krebszellen

Im Zytoplasma von transformierten Zellen lassen sich die gleichen Strukturen und Teilchen (Mitochondrien, endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Lysosomen und Zytoskelett) wie in Normalzellen nachweisen [2,3]. Unterschiede können auch hier wieder quantitativer oder qualitativer Art sein. In Tumorzellen, die eine hohe Glykolyserate zeigen, ist z.B. der Gehalt an Mitochondrien bis auf 50% gegenüber Normalzellen reduziert. Auch das Proteinmuster der Mitochondrienmembran ist unterschiedlich. Im Zytoskelett sind die Mikrofilamente und Mikrotubuli von Krebszellen gegenüber Normalzellen verändert. Möglicherweise sind die Alterationen in den fibrillären Strukturen auf eine Wechselwirkung zwischen Zellmembranrezeptoren und Liganden im Zytoplasma zurückzuführen. Das mikrotubuläre Netzwerk ist in neoplastischen Zellen dichter als in normalen.

Der Ablauf der Prozesse der Proteinsynthese in Krebszellen ist der gleiche wie in Normalzellen. Alterationen finden sich in den einzelnen Komponenten, wie z.B. den Transfer-RNA-Spezies die in neoplastischen Zellen verändert sind (Modifikation der Nucleotidsequenz). Die Alterationen äußern sich sowohl in der quantitativen Veränderung der Proteinsynthesekapazität als auch in qualitativer Hinsicht. Als Beispiele seien die Asparagin-t-RNA und die Tryptophan-t-RNA genannt, die nur in humanen

neoplastischen Zellen auftreten. Die Produktion dieser beiden t-RNA-Spezies kann auf die Repression oder Derepression bestimmter t-RNA-Gene beruhen oder durch modifizierte Enzyme ausgelöst werden. Tumorassoziierte t-RNA weist zusätzlich wesentlich mehr methylierte Basen auf. Die Kontrollmechanismen der Proteinsynthese sind in transformierten Zellen ebenfalls alteriert.

### 1.2.2.3 Der Zellkern von Krebszellen

Die Zellkerne von malignen Zellen unterscheiden sich von denen normaler Zellen nicht nur morphologisch, sondern auch biochemisch und immunologisch [2,3]. Im Nukleolus von transformierten Zellen kann ein Antigen nachgewiesen werden, das in den Nukleoli aller bisher untersuchter Normalzellen fehlt. Ferner ist das Größenverhältnis zwischen Nukleolus und Kernplasma in neoplastischen Zellen gegenüber normalen erhöht. Die DNA selbst ist ebenfalls verändert (siehe Mehrstufenprozess der Karzinogenese). Die Muster der mit der DNA verbundenen Histon- und Nicht-Histon-Proteine des Zellkerns sind ebenfalls verändert. Darunter fallen:

- ⇒ nukleoläre Proteine, wie ribosomale Präkursor-Proteine, Strukturproteine, r-DNA kontrollierende Proteine, Phosphoproteine und Enzyme,
- ⇒ nukleoplasmatische Proteine (Zytokleoproteine, Rezeptoren, Proteine der Ribonukleoproteinteilchen, Informosom-Proteine, Enzyme),
- ⇒ Kernmembran-Proteine (Struktur-, Transportproteine, Verarbeitungsenzyme, Proteine der Kernsporen).

Die Histone stellen eine spezielle Gruppe von Proteinen dar, die sich selektiv an DNA anlagern können und auf diese Weise die Struktur der Chromatinteilchen bilden. Die Modifikation der Histone stellt ein Regulationsprinzip dar, da sie zu Form- und Strukturveränderung des Chromatins führt. Die Modifikation erfolgt durch:

- ⇒ Methylierung,
- ⇒ Acetylierung,
- ⇒ Phosphorylierung,
- ⇒ ADP-Ribosylierung,
- ⇒ Bildung von Ubiquitin-Protein, das in die Regulation der Zellteilung eingreift.



Die Funktion der Histone liegt einerseits in der Spiralisierung der DNA-Kette und andererseits in der unspezifischen Unterdrückung der Transkription der DNA-Bereiche, die normalerweise permanent unterdrückt sind (etwa 80% der gesamten Gene).

#### 1.2.2.4 Der Zellzyklus von Krebszellen

Der Zellzyklus einer normalen und malignen Zelle kann in vier Phasen unterteilt werden [3,26]:

- ⇒ G<sub>1</sub>-Phase (Zelle wächst zu ihrer normalen Größe heran. Gleichzeitig werden die zur Verdopplung des Chromosomensatzes notwendigen Komponenten synthetisiert. Die RNA-Synthese wird gestartet und die Proteinsyntheseaktivität nimmt zu),
- ⇒ S-Phase (Stadium, in dem neue DNA-Moleküle synthetisiert werden; Replikationsfehler werden durch sog. Reparaturenzyme behoben),
- ⇒ G<sub>2</sub>-Phase (In dieser Phase werden vor allem RNA- und Proteinmoleküle synthetisiert, die zur Einleitung und Durchführung der Mitose benötigt werden. Ist die Konzentration hoch genug, wird die Zellteilung initiiert),
- ⇒ Zellteilungsphase (Sie umfasst die Teilung des Kerns (Mitose) und die Teilung des Zytoplasmas (Zytokinese)).

Bei Krebszellen ist die Dauer der Phasen im Vergleich zu Normalzellen verändert, womit sich gleichzeitig auch der zeitliche Ablauf des gesamten Zellzyklus ändert. Der Zellteilungsmechanismus bleibt unverändert. Unterschiede treten jedoch in der Mitose auf und betreffen Enzyme, Metabolite und Komponenten der Zellmembran. Während sich die Oberflächenmembran normaler Zellen während des Zellzyklus ständig ändert, bleibt sie bei neoplastischen Zellen unverändert. Krebszellen weisen an ihrer Membran eine besonders hohe Aktivität an Proteasen auf. Dadurch, dass Krebszellen ihre Membranschädigung nicht normalisieren, wird die Regulation des Zellzyklus beeinflusst. Ferner bleiben Krebszellen nach der Zellteilung im stimulierten Zustand, d.h. sie zeichnen sich durch erhöhte Ca-, K- und Phosphataufnahme aus, neben erhöhter Aufnahme von Glukose, Aminosäuren sowie der Erhöhung intrazellulärer Konzentration an zyklischen Nukleotiden. Die Glykolyserate ist ebenfalls erhöht.

#### 1.2.2.5 Die interzelluläre Verbindung und Kommunikation von Krebszellen

Zellen verfügen über mehrere Bindungsmöglichkeiten. Es lassen sich 3 Arten von Zellverbindungen aufführen [3]:

- ⇒ Desmosomen (feste Haftstellen, die sich über einen größeren Membranbereich ausdehnen. Hauptbestandteile sind Keratinfasern. Sie kommen besonders ausgeprägt in der Epidermis und im Darmepithel vor.),
- ⇒ Tight junctions (feste undurchlässige Verbindungen. In Epithelgewebe sind sie besonders undurchlässig),
- ⇒ Gap junctions (feste durchlässige Verbindungen in Form von Zellverklebungen mit Hohlräumen. Der Molekülaustausch ist für Moleküle bis zu einer bestimmten Größe möglich).

Bei Zellverbindungen über Desmosomen und tight junctions ist ein Stoffaustausch über extrazelluläre Räume nicht möglich. Im Bereich in denen Actinfilamente des Zytoskeletts, an der Zell-Zell- bzw. Zell-Matrix-Verknüpfungen beteiligt sind, spricht man im Fall von Epithelzellen von Zonulaadhaerens. Die Zell-Zell-Verbindung wird durch Cadherine geknüpft, bei Epithelzellen durch E-Cadherin [43]. Bei der Verknüpfung des Zellkontaktes assoziieren je zwei Cadherine benachbarter Zellen (homophile Bindung). Für die Verankerung mit den Actinfilamenten des Zytoskeletts ist der intrazelluläre C-Terminus der Cadherine verantwortlich. Die Aufgabe von Cadherin ist die Aufrechterhaltung Calcium-abhängiger Zelladhäsion. Über eine als Catenine bezeichnete Familie von Proteinen erfolgt die Bindung an Actin. Eine Calcium-unabhängige Zell-Zell-Adhäsion wird durch die Mitglieder einer zur Immunglobulin-Großfamilie gehörenden Gruppe von Zelladhäsionsmolekülen katalysiert. Sie werden als CAMs bezeichnet (Cell Adhaesion Molecule). Das als Tumormarker für Tumorerkrankungen des Kolons und Rektums gemessene carcinoembryonale Antigen (CEA) ist ebenfalls ein Mitglied dieser Proteinfamilie [6].

Bei neoplastischen Zellen sind die Verbindungen untereinander verändert. Bei stark entarteten werden interzelluläre Bindungen seltener ausgebildet als bei mäßig entarteten oder normalen. Bestimmte Arten von Zellverbindungen können gänzlich verloren gehen. Gap junctions sind allerdings auch in transformierten Zellen noch nachweisbar, aber in reduzierter Anzahl. Fazit ist, dass die interzelluläre Verständigung von Krebszellen gestört bzw. unterbrochen ist. Werden Krebszellen auf adhäsiven

Oberflächen gezüchtet, so bilden sie kaum bis gar keine Aggregate, während in Suspensionskulturen ein inverses Verhalten beobachtet werden kann [2]. Die erhöhte Aggregatbildung in Suspensionen wird auf die für Tumore spezifische Ausbildung von Mikrovilli auf der Tumorzelloberfläche zurückgeführt. Die interzelluläre Kommunikation erfolgt über den Stoffaustausch benachbarter Zellen, über gap junctions oder mit Hilfe informationstragender Botenstoffe, lösliche Stoffe wie Hormone, Wachstumsfaktoren und andere humurale Signalmoleküle.

### 1.2.2.6 Wechselwirkung zwischen Krebszellen und dem Organismus

Um körperfremde von körpereigenen Stoffen zu unterscheiden, wird im Organismus das immunologische Überwachungssystem aktiviert, mit dem Ziel das Fremdantigen (Stoff, der zur Bildung von Antikörpern führt, meist Proteine, aber auch Saccharide, Nukleinsäuren oder Lipide) zu eliminieren [2,3]. Tumorassoziierte Antigene sind bereits zahlreich identifiziert worden. Sie werden je nach Lokalisation in Zellmembran- und Intrazellulärantigene eingeteilt. Zu den membranassoziierten Tumorantigenen gehören die Neo(MNA)-Antigene, die onkofötalen Membranantigene (OFMA), die membranassoziierten Tumorantigene (MATA), die Kryptantigene und die Alloantigene (AA). Zu den intrazellulären Antigenen zählen die intrazellulären Neoantigene (ICNA) und die onkofötalen Antigene (OFA) neben der Gruppe von Nukleo-, der Nekrose- und der Pseudotumorantigene. Die Genprodukte tumorassoziiierter Antigene werden als sog. Tumormarker in der Tumordiagnostik eingesetzt [6]. Neben den Antikörpern werden ebenfalls Leukozyten und Makrophagen aktiviert (unspezifische Immunantwort).

Prinzipiell setzt sich das immunologische Abwehrsystem aus zellulären (T-Lymphozyten, B-Lymphozyten und Makrophagen) und humoralen Komponenten (alle im Blut zirkulierenden Antikörper und Lymphokine) zusammen. Der erste Schritt der Eliminierung von Krebszellen erfolgt durch ganz bestimmte Lymphozyten, die die Neoantigene der Membran von Krebszellen erkennen und eine Immunantwort (adaptive Immunantwort) auslösen, wobei die Antigen-tragenden Strukturen zerstört werden. Sind die Neoantigene günstig lokalisiert, so können Krebszellen auch von sog. Killer- bzw. K-Zellen zerstört werden, wobei die Erkennung der Krebszellen keinen vorheri-

gen Kontakt der K-Zellen mit Tumorzellen voraussetzt (nicht adaptiv). Kern- oder Zytosolantigene agieren erst immunologisch, wenn die Tumorzelle zerfallen ist.

Die wichtigsten im Humanserum nachweisbaren Antikörper sind die Immunglobuline der Klasse IgG, IgM und IgA [3]. IgG und IgM sind gegen Bakterien und Viren, IgA dagegen nur gegen Viren gerichtet. Die Unterschiede der Immunglobuline bestehen in der Molekülstruktur und in ihrer Halbwertszeit. Neben den Antikörpern spielen auch die Lymphokine eine wichtige Rolle bei der humoralen Immunantwort. Der bekannteste Vertreter der Lymphokine ist das Interferon ( $M_R$  110 kDa), das häufig in der Krebstherapie eingesetzt wird. Die Funktionen des Interferons sind in Tab. 1-2 aufgeführt.

Tab. 1-2 Funktionen des Lymphokins Interferon [3]

---

#### Funktionen des Interferons

---

Inhibierung der Zellvermehrung

Inhibierung der Vermehrung von Viren

Induzierung einer Antitumorsubstanz

Modifizierung von zellulären Funktionen

Veränderungen an der Zelloberfläche

Verstärkung der spezifischen Zytotoxizität sensibilisierter Lymphozyten

Erhöhung der Aktivität von K-Zellen

Erhöhung der Phagozytoseleistung von Makrophagen

---

Spezielle Eigenschaften der Tumorzellen (Antigenlokalisation, -maskierung, -modulation) und des Organismus (genetische Faktoren, Alter, Stress, Karzinogene, onkogene Viren, chemische und physikalische Immunsuppressiva und immunologische Blockierfaktoren) führen zur Ausschaltung des immunologischen Überwachungssystems. Die Regulation des Immunsystems kann über 3 verschiedene Mechanismen erfolgen, die allerdings ineinander greifen:

- ⇒ die Antigen-abhängige Regulation,
- ⇒ die Antigen-unabhängige Regulation,
- ⇒ die genetische Steuerung.

Immunologische Prozesse sind neben der Regulation auch durch hormonelle und neurale Faktoren beeinflussbar. Da Hormone sowohl stimulierende als auch inhibie-

rende Wirkung auf das Wachstum und die Vermehrung von Zellen haben, nehmen sie indirekt Einfluss auf die Tumorgenese. Sie zeigen Promotor-Wirkung (sie wirken an der Onkogenese mit).

Ein wichtiger Teil der Koordination verschiedener Gewebe und Organe erfolgt durch die hormonelle Regulation von Stoffwechselprozessen [2,3]. Eine Reihe von Hormonen wird in endokrinen Drüsen gebildet. Sie werden als „glanduläre Hormone“ bezeichnet. Endokrine Drüsen sind die Hypophyse, die Langerhans'schen Inseln des Pankreas, die Schilddrüse, die Nebenschilddrüsen, die Nebennieren, die männlichen und weiblichen Keimdrüsen und die Placenta. Im Gegensatz zu glandulären Hormonen werden die Gewebshormone von besonderen in den verschiedensten Geweben verstreuten Zellen synthetisiert. Gastrointestinale Hormone, wie Gastrin, Bombesin, Sekretin, Somatostatin, Neurotensin, Enteroglucagen, Cholecystokinin (CCK), gastroinhibitorisches Peptid (GIP), Motilin usw., erreichen ihre Zielzelle über den Blutweg. Rezeptoren für Bombesin, Gastrin, Somastatin, CCK und GIP konnten auf gastrointestinalen Tumorzelloberflächen des Kolons und Rektums nachgewiesen werden [6].

Eine wichtige Rolle innerhalb der Gewebshormone spielen die Zytokine (regulatorische Peptidfaktoren) [2,3]. Sie regulieren die Proliferation bzw. Differenzierung und Funktion ihrer Zielzellen und sind von besonderer Bedeutung bei der Metastasierung (Prozesse, bei denen eine Absiedlung von Krebszellen oder Krebszellverbänden über den Blut- oder Lymphweg in primär nicht erkrankte Körperregionen erfolgt. Die wichtigsten Zytokine sind EGF (Epidermal Growth Factor, ein monomeres Protein, das mitogen für viele Zellarten wirkt), IFN (Interferone mit antiviraler und antiproliferativer neben immunmodulierender Wirkung), IL (Interleukine mit mitogener und differenzierender Wirkung auf Lymphozyten, Makrophagen und anderen Zellen),  $TGF\alpha$  (Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  bewirkt die Zytolyse von Tumorzellen in vitro, hat chemotaktische Wirkung, wirkt auf das Wachstum von Epithelzellen und wirkt mitogen für Fibroblasten) und  $TGF\beta$  (Tumor Necrosis Factor  $\beta$ , zeigt die gleiche Wirkung wie  $TGF\alpha$ ).

Grundsätzlich sind Hormone bzw. Zytokine extrazelluläre Signalmoleküle (first messenger). Die Interaktion mit einem spezifischen Rezeptor ist der erste Schritt der Hormonwirkung, wobei sich der Rezeptor an der Zellmembran oder im Zytosol befinden kann. Hormone, die ihren Rezeptor an der Plasmamembran besitzen, wirken über das zyklische Adenosinmonophosphat (c-AMP) oder analoge zyklische Nukleo-

tide. Zu den Hormonen, die nicht über einen Zellmembranrezeptor aufgenommen werden, zählt das Östrogen. Östrogen bindet an das Östrogen-Operon, wodurch De-repressor-RNA-Moleküle synthetisiert werden. Diese heben die Unterdrückung des Enzym-Operons auf, wandern ins Zytoplasma und verbinden sich mit den Ribosomen, an denen neue Proteine gebildet werden. Der Chromatinprotein-Östrogen-Komplex stimuliert die Aktivität der Adenylatzyklase und erhöht den c-AMP-Gehalt. Östrogen ist der häufigste Promotor von Mammakarzinomen (Hormon-induzierte Neoplasie).

### 1.2.2.7 Fazit

Die in den Kapiteln 1.2.2.1 – 1.2.2.6 aufgeführten Veränderungen im Metabolismus von Tumorzellen, der Einfluss humoraler und immunologischer Faktoren und die molekulargenetischen Veränderungen während der Karzinogenese lässt die Komplexität einer Krebserkrankung aber auch ihre Individualität erkennen. Eine eingeleitete Betrachtungsweise führt letztendlich nicht zur Aufklärung des Krebsproblems, sondern es müssen molekulargenetische, molekularbiologische, toxikologische, biochemische und pathobiochemische sowie pathohistologische Aspekte berücksichtigt werden und wie Mosaiksteinchen zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden. Jeder Beitrag bezüglich des veränderten Stoffwechsels von Krebszellen kann ein solches Mosaiksteinchen sein, genauso wie jedes neu identifizierte „Krebsgen“. Auch lassen sich genetische und molekulare sowie phänotypische Veränderungen prognostisch nutzen.

Um in Zukunft gute Therapieerfolge durch z.B. immunologische, enzymatische, anti-angiogene (Verhinderung der Neubildung von Gefäßen) oder molekulargenetische Therapien in Verbindung mit klassischen chemotherapeutischen Therapien zu erzielen, muss die Individualität der Krebserkrankung berücksichtigt werden.

### 1.2.3 Tumorgenese gastrointestinaler Tumoren

Unter Tumorerkrankungen die den Dickdarm und das Rektum, aber auch andere Organe des Gastrointestinaltraktes betreffen können, muss zwischen den sporadisch auftretenden Tumoren, bei denen die Mutationen der Protoonkogen / Onkogen und

Tumorsuppressorgenen im Laufe der Zeit erworben werden (somatische Mutation) und den erblichen Tumorerkrankungen, bei denen die Mutation bereits über die Keimbahn vererbt wurde (Keimbahnmutation), unterschieden werden [3,6,19,25,44]. Zu den angeborenen Erkrankungen des Kolons oder Rektums zählen, wie bereits in Kapitel 1.1.2. aufgeführt, die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP) oder die nicht-polypösen kolorektalen Tumorerkrankungen.

### 1.2.3.1 Die familiäre adenomatöse Polyposis (FAP)

Die familiäre adenomatöse Polyposis wird autosomal dominant vererbt [19]. Bei Trägern einer Adenomatous Polyposis Coli (APC)-Keimbahnmutation kommt es nur dann zur Entwicklung von Neoplasien in der Darmschleimhaut, wenn auch die zweite intakte Kopie des Gens ausfällt. Das FAP-Gen gehört zur Klasse der Tumorsuppressorgene und ist auf Chromosom 5q21 positioniert. Die Keimbahnmutationen können sehr unterschiedlich sein. Die meisten sind Rasterschubmutationen (durch Deletion oder Insertion) die zu Replikationsfehlern führen und einen vorzeitigen Abbruch der Translation mit Bildung eines verkürzten Proteins zur Folge haben. Dem Genprodukt des FAP-Gens wird eine Funktion als Zelladhäsionsmolekül durch Wechselwirkung mit  $\alpha$ - und  $\beta$ -Catenin zugeschrieben [6,25].

### 1.2.3.2 Hereditäre nicht-polypöse kolorektale Karzinome (HNPCC)

Hereditäre Syndrome machen etwa 5-15 % der Dickdarmerkrankungen aus, wobei die Tumoren im mittleren Lebensalter (ca. 45 Jahre) auftreten und bevorzugt im rechten Hemikolon (60-70 % der Tumoren) lokalisiert sind [6,20,25]. Häufig treten synchron oder metachron (zeitversetzt) Zweitkarzinome des Kolons und Rektums auf. Auch andere Organe, wie Magen, abführende Harnwege, Mamma, Dünndarm, Ovar und Gehirn können betroffen sein. Die genetischen Defekte beruhen auf unterschiedlichen Längen der Allele, was auf veränderte Dinukleotidrepeats zurückzuführen ist [3]. Veränderungen dieser Mikrosatelliten (repetitive DNA mit 2-10 Basenpaar-Repeats) wurden im gesamten Genom gefunden. Die Lokalisation lässt darauf schließen, dass es sich um Gene, die für die Reparatur von Basenfehlpaarungen zuständig sind und für sogenannte „mismatch repair“ Enzyme kodieren, handelt.

Diese Gene werden als Mutatorgene bezeichnet. Keimbahnmutationen dieser Mutatorgene führen zu einem Funktionsverlust mit Akkumulation von Fehlpaarungen mit DNA-Replikationsfehlern. Bei etwa 15 % der Patienten mit sporadischen kolorektalen Tumoren können Defekte dieser Mutatorgene ebenfalls nachgewiesen werden [25]. Es wird angenommen, dass diese Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) für Mutationen anderer Gene verantwortlich ist (siehe dazu Mehrstufenprozess der Tumorgenese) [25,31]. Werden in einem Tumor MSI nachgewiesen, so wird der Tumor als RER+ (replication error positive) bezeichnet.

### 1.2.3.3 Hereditäre Aspekte des Magenkarzinoms

Eine genetische Prädisposition wird hauptsächlich für den diffusen Typ des Magenkarzinoms gefunden [6,45]. Magenkarzinome treten aber auch vermehrt im Rahmen von autosomal dominant vererbten Tumorerkrankungen (FAP, HNPCC) auf. Eine wesentliche Rolle in der Promotion der Magenkarzinogenese scheint das pS2 Gen (Tumorsuppressorgen) zu spielen, das für das pS2 Protein, ein Mitglied einer kleeblattartigen Peptidfamilie, kodiert [46,47]. Die Funktion des pS2 Proteins ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass das pS2 als Wachstumsfaktor, als Proteaseinhibitor oder als Mucinstabilisator wirkt, um das Zellwachstum zu modulieren und um die Integrität der Magenschleimhaut zu schützen. Ein Defekt des pS2 Gens wird durch DNA-Methylierung in der pS2 Region verursacht. Während eine Überexpression von pS2 mit schlecht differenzierten Adenokarzinomen (diffuser Typ) assoziiert ist, ist die Expression von pS2 bei gut differenzierten Adenokarzinomen (intestinaler Typ) reduziert oder pS2 wird gar nicht mehr exprimiert (in normalen Epithelzellen des Magens wird pS2 exprimiert).

### 1.2.3.4 Sporadische kolorektale Tumoren

Die meisten kolorektalen Karzinome entstehen aus Adenomen (gutartige Tumore) [6,25]. Die Tumorgenese von normalen Mucosaepithel über die Hyperplasie, die unterschiedlichen Adenomformen bis zum klinisch manifesten Karzinom ist in Abb. 1-3 dargestellt.



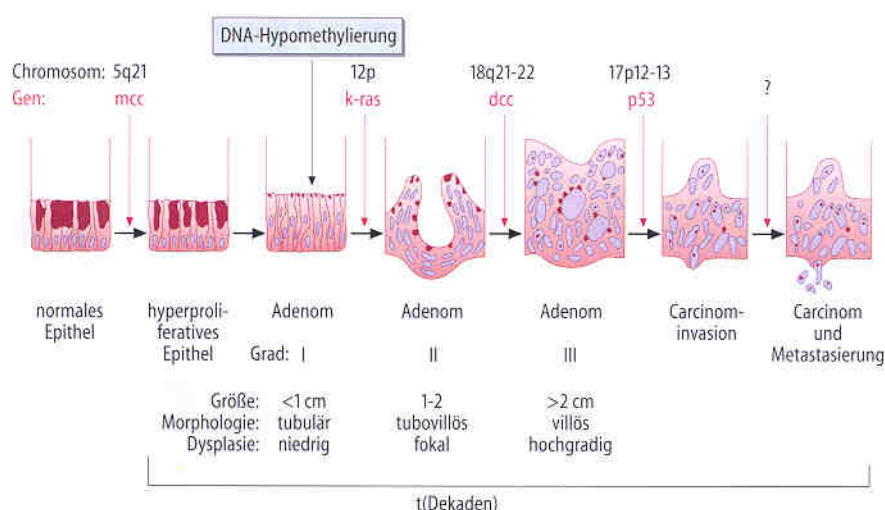


Abb. 1–3 Genetische Veränderungen bei der Progression vom Kolonadenom zum Kolonkarzinom [3]

Im Gegensatz zum normalen Epithelwachstum besteht in der frühen Tumorgenese ein hypoproliferativer Regenerationszustand von Kolonepithelien. An diesem Zustand ist das *mcc*-Gen (mutated in colon carcinoma) auf Chromosom 5q21 beteiligt. Das Auftreten des Adenomphänotyps wird von einer verringerten DNA-Methylierung in Verbindung mit genomischer Instabilität begleitet. Im weiteren Verlauf der Tumorgenese treten *ras*-Mutationen (Wie bereits in Kapitel 1.2.1 erwähnt, kodiert das *ras*-Onkogen für ein membranassoziiertes Guaninnucleotid-bindendes Protein, das sog. RAS-Protein) auf. Bis zu 10 % der Kolonadenome < 1 cm, aber 50% der Adenome > 1 cm und die Hälfte aller Karzinome weisen *ras*-Mutationen auf. Daneben können andere Onkogene wie z.B. *neu*-, *c-myc*- oder *c-myb*-Onkogene aktiviert sein. Im fortgeschrittenen Stadium des Adenoms kommt es zum Verlust verschiedener Regionen im Bereich des kurzen Arms von Chromosom 17, die bei etwa 75 % aller Patienten mit Karzinomen auftreten. Allen Verlusten gemeinsam ist die Region p12-13, in der das *p53*-Antionkogen (kodiert für das *p53*-Protein, das als Hemmstoff für das Zellwachstum fungiert) lokalisiert ist. Zudem wurden Punktmutationen in dem zweiten *p53*-Allel in Zusammenhang mit dem Verlust des anderen Allels, was häufig bei kolorektalen Karzinomen auftritt, gefunden. Der zweite, wichtige Allelverlust betrifft das *dcc*-Gen, das auf Chromosom 18q21-22 lokalisiert ist. Es ist bei etwa 70% der Tumoren und etwa 50% der späten Adenome verloren. Das *dcc*-Gen kodiert für ein Polypeptid, das eine signifikante Homologie zur Familie der Zelladhäsionsproteine aufweist. Dieses Gen wird in 75% der kolorektalen Tumoren vermindert exprimiert. Es

sind allerdings auch Allelverluste in anderen chromosomalen Regionen (z.B. auf 1q, 4p, 6p, 8p, 9q, 22q) für die kolorektale Tumorgenese verantwortlich. Die Akkumulation der genetischen Veränderungen (es müssen mindestens 6-10 Mutationen induziert werden) ist verantwortlich für die Progression vom Adenom zum Karzinom.

#### 1.2.3.5 Molekulargenetische Parameter als Prognosefaktoren bei gastrointestinalen Karzinomen

Die genetischen Aberrationen, die beim gastrointestinalen Karzinom auftreten, betreffen im wesentlichen die Onkogene, die für die Tyrosinkinase-Rezeptoren kodieren (c-erb B-2), Gene, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren kodieren (EGF-Rezeptor, cripto), Gene, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt sind (K-ras, H-ras, N-ras), Regulatoren des Zellzyklus (p16), Transkriptionsfaktoren (c-fos, c-jun), Tumorsuppressorgene (p53, APC, bcl-2) und die Mikrosatelliteninstabilität [6,25].

c-erb B-2 erweist sich beim Magenkarzinom von prognostischer Relevanz, wobei die Überlebenschance drastisch reduziert ist, in dem Fall, dass dieses Onkogen genetisch verändert ist [48].

Beim kolorektalen Karzinom scheinen die Mutationen des c-ras und p53 Gens von prognostischer Bedeutung zu sein [49-54]. Bestätigungen durch multivariate Analysen werden derzeit erwartet.

nm23, ein Tumorsuppressorgen, das für eine Nucleotid-Diphosphat-Kinase und PuF, einen c-myc-Transkriptionsfaktor, kodiert, spielt sowohl eine Rolle in der Tumorentstehung als auch in der Metastasierung. Eine Korrelation zwischen Metastasierung und Mutation des nm23 Gens konnte für das Magenkarzinom und das kolorektale Karzinom aufgezeigt werden [55-58].

Eine Mutation des bcl-2 Gens, die häufig mit zunehmender Malignität auftritt, konnte sowohl für Magen- als auch für Darm- und Rektumkarzinome nachgewiesen werden [25]. Ihre prognostische Relevanz ist allerdings noch nicht geklärt.

#### 1.2.3.6 Weitere zelluläre Aspekte beim Magen-, Kolon- und Rektumkarzinom

Die nachfolgend aufgeführten zellulären Faktoren, die entweder hoch- oder herunterreguliert sein können, resultieren aus multiplen Genmutationen und sind quasi

Symptome der genetischen Alterationen. Wie bereits erwähnt, regulieren Tumorzellen die Expression von Adhäsionsmolekülen herab, um sich vom primären Tumorzellverband zu lösen [3,6,59]. Für die Invasion in umliegende Gewebe werden zudem tumorassoziierte Protease / Protease-Inhibitor-Systeme überexprimiert [60]. Tumorzellen benötigen für die Ausbildung einer manifesten Metastase proteolytische Enzyme neben angiogenetischen (gefäßneubildenden) Faktoren, Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren.

Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass einige Protease-Systeme in Tumoren überexprimiert werden, und dass Tumore mit hohem Nachweis proteolytischer Parameter aggressiver sind als solche mit niedrigerer Expression. Für das Magenkarzinom konnte eine Überexpression des Urokinase-Typ-Plasminogen-Aktivator (uPA)-Systems ermittelt werden [56-58,61,62]. Das uPA-System setzt sich aus der 55 kDa-Serinprotease uPA, ihrem spezifischen zellmembrangebundenen Rezeptor (uPA-R) und den spezifischen Inhibitoren, Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI)1 und 2 zusammen. Auch für das kolorektale Karzinom konnte eine Assoziation des uPA-Systems mit der Prognose gefunden werden.

Weitere Faktoren für das Magenkarzinom sind die Matrix-Metalloproteine MMP-2 der 72 kDa-Form der Kollagenase IV und MMP-9 [63,64]. Matrix-Metalloproteinasen stellen eine große Klasse Zink-abhängiger Proteasen dar [63-66]. Für das Kolonkarzinom scheint das MMP-1 von prognostischer Bedeutung zu sein. MMP-1 ist eine interstitielle Kollagenase, die die wesentlichen Kollagene des interstitiellen Bindegewebes degradiert.

Beim Magenkarzinom kann Cathepsin D, zur Klasse präferentiell lysomal lokalisierter Proteasen gehörend, an Invasionsfronten nachgewiesen werden. Die Funktionen von Cathepsin D sind vielfältig. Sie übernehmen Aufgaben beim intrazellulären Protein-Metabolismus, beim Abbau von Proteoglykanen und bei der Aktivierung von Cathepsin B, das wiederum uPA aktiviert [58,66]. Cathepsin B scheint von möglicher Relevanz bei gastrointestinalen Karzinomen zu sein. Seine Relevanz muss allerdings noch in entsprechenden Studien nachgewiesen werden [66].

Eine Dysregulation von Adhäsionsmechanismen führt zu einer Loslösung von Tumorzellen aus dem Primärverband. Beim Magenkarzinom zeigt sich eine reduzierte Expression von E-Cadherin (membranassoziiertes Adhäsionsmolekül,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig, gewebespezifisch) in 92% der Fälle [67-70]. Der Grad der Expressionsreduzierung ist mit dem Differenzierungsgrad gekoppelt. E-Cadherin-Mutationen scheinen

beim diffusen Magenkarzinom eine besondere Rolle zu spielen. Auch bei kolorektalen Karzinomen konnte eine Reduzierung von E-Cadherin bei den Krebszellen nachgewiesen werden.

Ein weiteres Adhäsionsmolekül von Bedeutung ist CD44 aus der Familie der Hyaluronat-Rezeptoren [71-73]. Es bindet spezifisch an Hyaluronsäure (Glykosaminoglykan) und wird von einem großen Spektrum an Zelltypen exprimiert. Es existiert in verschiedenen Isoformen, die durch alternatives mRNA-Splicing und differentielle Glykosylierung entstehen. Bestimmte Isoformen haben teilweise ihre Fähigkeit zur Bindung an Hyaluronsäure als Komponente der extrazellulären Matrix verloren. Beim Magenkarzinom wurden CD44-Splicevarianten nachgewiesen, wobei unterschiedliche Varianten bevorzugt im diffusen oder intestinalen Typ auftreten. Für das Kolonkarzinom liegen bis dato keine kompletten Studien bezüglich CD44-Splicevarianten vor. Der Nachweis der Nutzbarkeit von CD44-Adhäsionsmolekülen als Prognosefaktor muss noch erbracht werden.

Östrogen- und Progesteronrezeptoren wurden auf humanen gastrointestinalen Tumorzellen nachgewiesen, wobei 8-23% der kolorektalen Tumorzellen Östrogenrezeptoren aufwiesen. Beim Magenkarzinom konnten 12-50% der Fälle Östrogenrezeptoren und in 25% Progesteronrezeptoren festgestellt werden [74-75].

Ein weiterer, möglicherweise zur Prognose geeigneter Parameter ist die differentielle Expression von Stickstoffmonoxid-Synthase in Magenkarzinomen [76,77]. Hohe Konzentrationen an NO und dessen Metabolite verursachen DNA-Schäden. Ferner inhibiert NO die DNA-Ligaseaktivität (Akkumulierung von DNA-Strangbrüchen) und unterdrückt die immunologische Anti-Tumorantwort, so dass davon ausgegangen werden kann, dass NO eine Rolle bezüglich des Tumorwachstums, der Progression und der Metastasierung spielt. Es zeigte sich, dass die NO-Synthaseaktivität (Isoenzyme der NO-Synthase) in Tumorgewebe um 70% höher ist als in Normalgewebe, wobei die Aktivität mit abnehmendem Differenzierungsgrad signifikant zunimmt. Ein differentieller Anstieg der NO-Synthaseexpression mit dem Differenzierungsgrad in der Mukosa kolorektaler Tumore gegenüber der Mukosa von kolorektalem Normalgewebe konnte ebenfalls beobachtet werden [78].

## **1.2 Der Wachstumsaspekt**

Das Tumorwachstum ist ein Prozess, in welchen mindestens drei Faktoren eingehen, die Malignität der Tumorzelle, die Reaktion des die Tumorzelle unmittelbar umgebenden Gewebes und die (hormonelle, konstitutionelle usw.) Gesamtsituation des Wirtsorganismus. Die Massenzunahme von Tumoren ist als die Summe von ungesteuertem Wachstum und reduziertem Zellsterben durch eine verminderte Apoptoserate zu erklären [79]. Die Apoptosesensitivität wird durch genetische Veränderungen so beeinflusst, dass intrazelluläre antiapoptotische Programme empfindlich gestört werden. Die meisten bildgebenden Verfahren in der Diagnostik sind erst ab einer Tumorgroße von 1 cm (entspricht ungefähr 10 Milliarden Zellen) in der Lage den Tumor sichtbar zu machen [2,3,6]. In diesem Stadium hat sich der Tumor bereits klinisch manifestiert. So können veränderte Stoffwechseleigenschaften erst in der klinisch manifesten Phase untersucht werden.

Auch die Metastasierung ist unter dem Aspekt des Wachstums zu sehen. Invasion, Infiltrierung und Metastasierung beruhen auf einer Kaskade von miteinander verbundenen und nacheinander ablaufenden Schritten, die viele Wirt-Tumor-Wechselwirkungen beinhalten. Für die Metastasierung muss eine Zelle oder eine Zellgruppe den Primärtumorverband durch Überwindung der Basalmembran verlassen, in das örtliche Stroma eindringen, Anschluss an die Zirkulation finden, im entfernten Gefäßbett stecken bleiben, in das Zielorgan extravadiere und als sekundäre Kolonie proliferieren. Voraussetzung für die Größenzunahme des Primärtumors oberhalb 2 mm ist die Neubildung von Gefäßen (Angiogenese). Die Gefäßneubildung ist ebenso wichtig für die Vergrößerung von Metastasen. Die Metastasierung als Mehrschrittprozess ist in Abb. 1-4 dargestellt. Sogenannte Fernmetastasen werden nach Transport von losgelösten Krebszellen oder Mehrzellaggregaten über die Lymphgefäße oder über die Blutbahn und anschließender Invasion ins Zielgewebe ausgelöst.

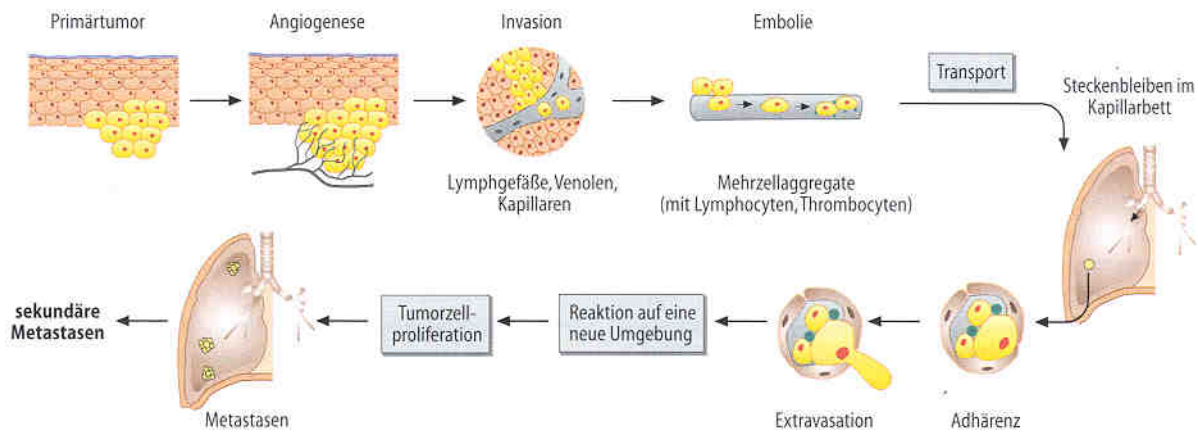


Abb. 1-4 Mehrstufenprozess der Metastasierung [3]

Pathohistologisch wird ein Tumor nach seiner Malignität in Form des Malignitätsgrades, nach der Größe des Primärtumors in Form des Tumorstadiums und der Metastasierung klassifiziert [6].

Die Typisierung der Karzinome erfolgt grundsätzlich nach WHO (World Health Organisation) [80]. Im histopathologischen Grading (Differenzierungsgrad) nach WHO werden vier Malignitätsgrade unterschieden:

- G1 – geringer Malignitätsgrad (hoher Differenzierungsgrad, gut differenziert)
- G2 – mittlerer Malignitätsgrad (mittlerer Differenzierungsgrad, mäßig differenziert)
- G3 – hoher Malignitätsgrad (geringer Differenzierungsgrad, schlecht differenziert)
- G4 – hoher Malignitätsgrad (undifferenziert).

Die Festlegung der Tumorausbreitung (Staging) erfolgt nach der sog. TNM-Klassifikation der malignen Tumoren der UICC (Union Internationale Contre le Cancer) [81]. Mit der TNM-Klassifikation werden der Primärtumor, die Lymphknotenmetastasen und die Fernmetastasen beurteilt:

- T – Primärtumor
- N – Lymphknotenmetastasen
- M – Fernmetastasen.

Um das pathologisch-anatomische Tumorstaging am Resektat (exzisiertes Gewebe) vom klinischen zu unterscheiden, wird es mit dem Präfix p (pT, pN, pM) versehen. Liegen die Minimalerfordernisse zur Bestimmung des Primärtumors, von Lymphkno-

ten- oder von Fernmetastasen nicht vor, so wird die Klassifikation mit dem Zusatz x versehen (pTx, pNx, pMx).

Für eine komplette Tumorklassifizierung muss die R-(Residualtumor-) Klassifikation, die Auskunft über die Radikalität der Operation gibt, zugefügt werden.

R0 – kein Residualtumor

R1 – mikroskopisch nachweisbarer Residualtumor

R2 – makroskopisch nachweisbarer Residualtumor

Ein Residualtumor liegt dann vor, wenn eine Resektionslinie durch einen Ausläufer des Primärtumors oder durch eine Metastase verläuft oder wenn Metastasen zurückbleiben.

### *1.3.1 Klassifikation und Tumorausbreitung des Magenkarzinoms*

Magenkarzinome werden laut WHO-Klassifikation folgendermaßen histologisch typisiert [6]:

- ⇒ Adenokarzinom mit einer Gesamthäufigkeit von ca. 70%, wobei das tubuläre Adenokarzinom mit einer Häufigkeit von 50% und das papilläre sowie das mucinöse mit Häufigkeiten von jeweils 10% angegeben wird. Der Differenzierungsgrad ist im Bereich von G1-G3 festzulegen.
- ⇒ Siegelringzellkarzinom mit einer Gesamthäufigkeit von ca. 10%. Die Einstufung des Differenzierungsgrades erfolgt immer nach G3.
- ⇒ Adenosquamöses Karzinom, Plattenepithelkarzinom, kleinzelliges Karzinom und undifferenzierte Karzinome kommen mit einer Häufigkeit von insgesamt 20% vor. Die Einstufung des Differenzierungsgrades erfolgt gemäß G4.

Wie bereits erwähnt, werden zwei Karzinomtypen nach Laurén unterschieden. 46% aller Magenkarzinome entsprechen dem intestinalen Typ (kompakt gebaut, meist gut begrenzt), 36% dem diffusen Typ (schlecht begrenzt, ausgedehntere Infiltration der Magenwand, weit verstreute Tumorzellen) und 18% dem Mischtyp. Beim sog. Frühkarzinom ist laut Definition nur die Mukosa bzw. die Mukosa und Submukosa infiltriert. Sie sind überwiegend im distalen (unteren) Magenabschnitt (proximales (oberes) Drittel 15%, mittleres Drittel 35%, unteres Drittel 50%) lokalisiert. Bei fortgeschrittenen Karzinomen ist die Muskelwand (muscularis) bereits infiltriert. Der Tumor

ist mit einer Häufigkeit von 40% im mittleren, mit 30% im oberen und mit 20% im unteren Magendrittel lokalisiert. Bei den fortgeschrittenen Tumoren kommt es zu einem hohen Prozentsatz durch Implantation von teilungsfähigen Zellen in der Peritonealhöhle (Bauchhöhle) zu einer Peritonealkarzinose und je nach Lokalisation des Tumors zu einer Infiltration von Nachbarorganen (Leber, Bauchspeicheldrüse, Milz, Colon transversum, Netz). Während Karzinome, die auf die Schleimhaut beschränkt sind, lediglich in 5% der Fälle Lymphknotenmetastasen zeigen, sind es bei Infiltration der Submukosa bereits 20% der Fälle. Es besteht eine enge Korrelation zwischen Infiltrationstiefe und der Rate von Lymphknotenmetastasen. (siehe Abb. 1-5).

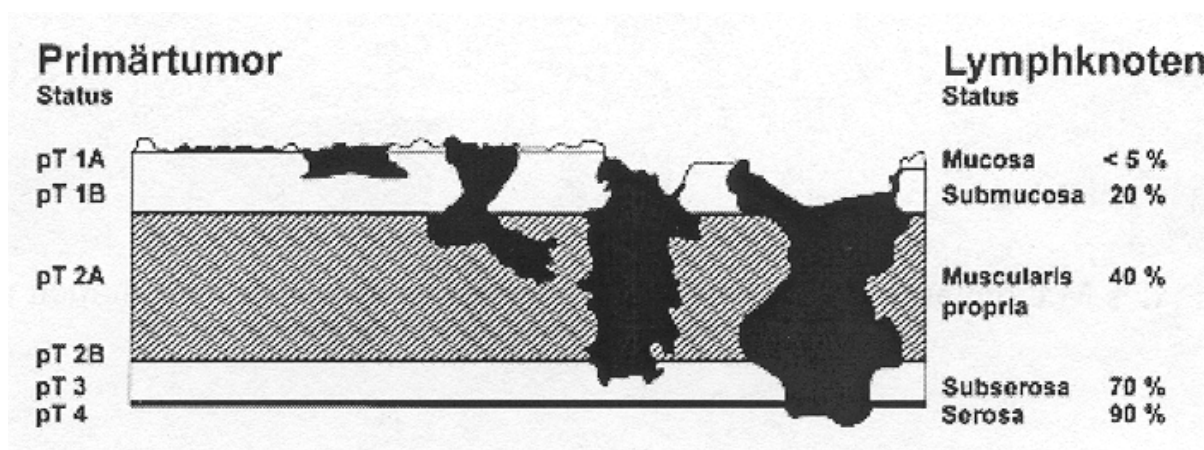


Abb. 1-5 Infiltrationstiefe und Rate von Lymphknotenmetastasen [6]

Zu Fernmetastasen kommt es bei direktem Einbruch des Tumors oder von Lymphknotenmetastasen in Blutgefäße, wobei über das Pfortadersystem in der Leber Metastasen entstehen. Dies tritt am häufigsten bei Tumoren vom intestinalen Typ auf, während Tumore des diffusen Typs über die Lymphwege eher Lungenmetastasen hervorrufen. Gelangen Tumorzellen in das Peritoneum, können sog. Abklatschmetastasen, z.B. an den Ovarien resultieren.

Eine Stadiengruppierung ist nachfolgend tabellarisch aufgeführt (Tab. 1-3).



Tab. 1-3 Stadiengruppierung des Magenkarzinoms

Stadium	Primärtumor	Regionäre Lymphknoten	Fernmetastasen
0	Tis*	N0	M0
I A	T1	N0	M0
I B	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
II	T1	N2	M0
	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
III A	T2	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0	M0
III B	T3	N2	M0
IV	T1,T2,T3	N3	M0
	T4	N1,N2,N3	M0
	Jedes T	Jedes N	M1

\* Carcinoma in situ: intraepithelialer Tumor ohne Infiltration der Lamina propria.

### 1.3.2 Klassifikation und Tumorausbreitung des Kolon- und Rektumkarzinoms

Kolonkarzinome sind zu 30% im Colon ascendens, zu 15% im Colon transversum, zu 10% im Colon descendens und zu 45% im Sigma lokalisiert. Knapp 50% aller Kolon- und Rektumkarzinome treten im Rektum auf (bis 16 cm oberhalb der Anocutanlinie). Für die Definition Rektumkarzinom entscheidend ist der mit dem starren Rektoskop gemessene untere Tumorrand. Histopathologisch werden nach WHO folgende Typen unterschieden:

Adenokarzinom mit einer Häufigkeit von 85-90%

Mucinöses Adenokarzinom mit einer Häufigkeit von 5-10%

Siegelringzellkarzinom mit einer Häufigkeit von 1%

Undifferenziertes Karzinom mit einer Häufigkeit von 1%

Adenosquamöses Karzinom

Kleinzelliges Karzinom (Haferzellkarzinom).

Bei Rektumkarzinomen treten auch Plattenepithelkarzinome auf, wobei es sich dann um hochgewachsene Analkarzinome handelt. Auch Melanome des Rektums kommen vor. Adenokarzinome zeigen Differenzierungen im Bereich von G1-G4. Kleinzellige und undifferenzierte sowie Siegelringzellkarzinome sind in G4 einzugruppieren. Die Ausbreitung des Kolon- und Rektumkarzinoms erfolgt lokal in das angrenzende Fettgewebe, über die Lymphbahnen und bei Infiltrierung von Blutgefäßen über das Blutbahnsystem. Die Metastasierung eines Kolonkarzinoms läuft in den meisten Fällen lymphogen ab. Die distalen Lymphknoten befinden sich nicht weiter als 2-3 cm vom Tumorunterrand. Entsprechend dem venösen Abfluss über das Pfortadersystem betrifft die Metastasierung der Kolon- und Rektumkarzinome in erster Linie die Leber. Aber auch Lungen-, Skelett-, Nebennieren- und Hirnmetastasen können neben Peritonealmetastasen auftreten. In Tabelle 1-4 ist die Stadiengruppierung aufgelistet.

Tab. 1-4 Stadiengruppierung des Kolon- und Rektumkarzinoms

Stadium	Primärtumor	Regionäre Lymphknoten	Fernmetastasen	Einteilung nach <i>Duke</i>
0	Tis*	N0	M0	
I	T1,T2	N0	M0	A
II	T3,T4	N0	M0	B
III	Jedes T	N1,N2	M0	C
IV	Jedes T	Jedes N	M1	C

\* Carcinoma in situ: Tumorzellen intraepithelial oder in der Lamina propria, ohne dass eine Ausbreitung durch die Muscularis mucosae in die Submukosa feststellbar ist.

## 2 Bedeutung der Makro- und Spurenelemente in der Humanmedizin

### 2.1 Mengen- und Spurenelemente in der Humanmedizin

Das Interesse an bioanorganischen Elementen insbesondere an Spurenelementen in der Medizin hat in den letzten Jahren deutlich zugenommen, wobei einerseits toxische Effekte im Rahmen der Umweltmedizin und andererseits die Aufklärung der Beteiligung von Spurenelementen an biogenen Prozessen an Bedeutung gewonnen hat. Das hat dazu geführt, dass die Medizin mit vielen diagnostischen und therapeutischen Implikationen für Spurenelemente konfrontiert wurde, die die bisher bekannten traditionellen Applikationen vor allem im therapeutischen Bereich weit überschreiten [82,83].

#### 2.1.1 Einteilung und Funktion der bioanorganischen Elemente

Im Bereich der klinischen Chemie und der Ernährungsforschung werden anorganische Elemente aufgrund ihrer Funktion bzw. aufgrund der Größenordnung ihrer täglichen Aufnahme über die Nahrung in vier Gruppen unterteilt [83,84]:

- ⇒ Die essentiellen Makroelemente, auch bezeichnet als Makronährstoffe, Mineralelemente oder Mengenelemente, sind die wichtigsten am humanen Zellstoffwechsel beteiligten Elemente. Sie sind hauptsächlich im Elektrolythaushalt involviert und sind Bestandteile der Knochen und Zähne. Der Bedarf an Makroelementen beträgt mehr als 100 mg/Tag. Die Konzentration der Makroelemente im menschlichen Organismus liegt teilweise über 1g/kg Feuchtgewebe. Zu den essentiellen Makronährstoffen gehören die Elemente **Calcium, Phosphor, Natrium, Kalium, Chlor, Magnesium** und **Schwefel**.
- ⇒ Die essentiellen Mikroelemente, auch bezeichnet als Mikronährstoffe oder Spurenelemente, führen bei unzureichender Zufuhr nachweislich zu Mangelkrankungen (Manifestation klinischer Symptome) beim Menschen. Der tägliche Bedarf an Spurenelementen beträgt nur wenige mg. Viele der essentiellen Spurenelemente fungieren im Organismus als prothetische Gruppen von Enzymen. Die Anzahl der als gesichert essentiell geltenden Spurenelemente hat in den letzten zwei Jahrzehnten zugenommen, wobei einige Spu-

renelemente und deren Funktion im menschlichen Organismus noch kontrovers diskutiert werden (z.B. Silizium, Lithium, Vanadium). Spurenelemente, deren Essentialität als eindeutig gesichert gelten, sind **Eisen, Kupfer, Kobalt, Zink, Mangan, Jod, Molybdän, Selen, Fluor** und **Chrom** [3,4,82-86].

- ⇒ Zu den Mikroelementen, deren Funktion für den Menschen noch nicht eindeutig gesichert sind, in Tierexperimenten aber bereits die Entwicklung von Abnormalitäten der Versuchstiere (z.B. teratogener Art) bei defizitärer Versorgung gezeigt werden konnte, gehören **Zinn, Nickel, Vanadium, Arsen**, und **Silizium** [3,84,86].
- ⇒ Mikroelemente, die in höheren Konzentrationen beim Menschen toxisch wirken (sie können, müssen aber nicht notwendigerweise eine erkennbare Funktion haben), sind **Cadmium, Blei, Quecksilber, Arsen, Bor, Zinn, Barium, Strontium** und **Molybdän**. Sie werden über die Nahrung als umweltrelevante Kontaminationen aufgenommen [3,84,86].

Wie bereits erwähnt, kann eine Unterteilung der Spurenelemente auch nach ihrer Funktionalität erfolgen [84,86]:

- ⇒ Spurenelemente mit hormoneller Funktion, wie z.B. Jod,
- ⇒ Spurenelemente mit struktureller Funktion, wie z.B. Kobalt, Eisen, Molybdän, Selen, Zink,
- ⇒ Spurenelemente mit anderen Funktionen, wie z.B. Eisen und Selen.

Ein und dasselbe Spurenelement kann im Zellstoffwechsel verschiedene Aufgaben übernehmen, so dass eine Zuordnung zu mehreren Funktionsklassen möglich ist. In Tab. 2-1 sind die Funktionen der an biogenen Prozessen beteiligten Elemente aufgeführt, wobei das Kriterium der Vollständigkeit nicht beansprucht wird [3,4,84-88].

Tab. 2-1 Ausgewählte Funktionen essentieller und möglicher essentieller Makro- und Mikroelemente im menschlichen Organismus

<i><b>Element</b></i>	<i><b>Funktion</b></i>
<b>Makroelemente</b>	
<i>Calcium</i>	Enzymaktivator; Signalübertragung; Struktur; Ladungsträger; Elektrolyt; Bestandteil von Knochen- und Zahnschmelze
<i>Phosphor</i>	Baustein von Nukleinsäuren; Nukleinsäurestoffwechsel; Enzymaktivator; Aufbau von Schichten-Strukturen in Form von Membranlipiden
<i>Schwefel</i>	Bestandteil von Enzymen, Coenzymen und Vitaminen; Baustein der Aminosäuren Cystein und Methionin
<i>Kalium</i>	Enzymaktivator; Elektrolyt (osmotisches Gleichgewicht); Ladungsträger
<i>Natrium</i>	Wasserbalance; osmotisches Gleichgewicht
<i>Chlorid</i>	Wasserbalance; osmotisches Gleichgewicht
<i>Magnesium</i>	Enzymaktivator; Struktur
<b>Mikroelemente (Spurenelemente)</b>	
<i>Eisen</i>	Enzymaktivator; Sauerstofftransport und –speicherung; Elektronenübertragung; Stickstoff-Fixierung; Metalloenzym
<i>Zink</i>	Enzymaktivator; Struktur; DNA-Reparatur; Metalloenzym; Transkription
<i>Kupfer</i>	Sauerstofftransport; Elektronenübertragung; Metalloenzym; Elastin-Vernetzung
<i>Jod</i>	Bestandteil von Schilddrüsenhormonen
<i>Fluorid</i>	Enzymhemmung (Glykolyse); Bestandteil von Knochen- und Zahnschmelze
<i>Mangan</i>	Struktur; Metalloenzym; Enzymaktivator; Metabolismus der Mucopolysaccharide
<i>Molybdän</i>	Stickstoff-Fixierung; Oxo-Transfer; Metalloenzym
<i>Chrom</i>	Steigerung der Wirksamkeit von Insulin (Glucosetoleranzfaktor)
<i>Kobalt</i>	Metalloenzym; Enzymaktivator; Baustein von Vitamin B12
<i>Selen</i>	Antioxidative Funktion (Glutathion-Peroxidase); Bestandteil von Enzymen
<i>Vanadium</i>	Redoxsystem; Hemmung der Cholesterin-Synthese; Bedeutung für den Mineralisierungsprozess im Knochen- und Zahngewebe
<i>Silizium</i>	Wachstumsförderung; Komponente von Knorpel, Bindegewebe und Haut; Mucopolysaccharid-Stoffwechsel
<i>Nickel</i>	Wechselwirkung mit Eisen-Resorption; Enzymaktivator; Verstärkung der Insulinwirkung; Aktivierung der Immunantwort

Makro- und Spurenelemente treten in biologischen Systemen im häufigsten Fall als Cofaktoren von Proteinen (Metalloproteine) auf, wobei aber ihre Funktionen sehr unterschiedlich sein können [85]. Sie übernehmen auf der einen Seite strukturelle Aufgaben, indem sie auf die Faltung und Querverknüpfung von Biopolymeren einwirken und sind auf der anderen Seite für Elektronenübertragungen zwischen Proteinen verantwortlich. Sie binden und aktivieren neben unterschiedlichen Substraten auch Enzymreaktionen, indem sie die strukturelle Voraussetzung im Apoprotein für die Erkennung, Bindung und chemische Umsetzung des Substrates schaffen, und sind an bestimmten Übertragungsreaktionen (Atom- oder Atomgruppenübertragung) beteiligt.

Eine spezielle Klasse der Metalloproteine sind die Metalloenzyme, die spezifische katalytische Funktionen haben und durch eine koordinative Bindung an das Apoenzym zum festen Bestandteil des Proteinmoleküls werden. Eine wichtige Aufgabe der Metalloenzyme ist ihre Mitwirkung am zellulären Schutz, wobei die Zellmembran durch die Metalloenzyme vor destruktiven OH-Radikalen geschützt wird, indem die Thiol-Gruppen durch Bildung stabiler Merkaptide abgeschirmt werden. Nicht enzymatische Metalloproteine sind ebenfalls bekannt, wobei es sich entweder um Transportproteine des Blutes mit unterschiedlicher Spezifität oder um Kontrollproteine hoher Spezifität handelt, die die Bindung bzw. Freigabe bestimmter Spurenelemente regulieren und auf diese Weise Prozesse steuern, die von Spurenelementen abhängig sind.

Einigen Spurenelementen kommen sehr spezifisch regulierende Schlüsselfunktionen in der immunologischen Abwehr zu. Als Beispiel sei hier das Element Nickel genannt, dessen Rolle bei der Immunantwort derzeit intensiv diskutiert wird. Grundlage hierzu sind Untersuchungen des Einflusses von Nickel auf die Immunantwort bei nickel-sensitiven Personen und Normalkollektiven [89,90].

Metall-Ionen können auch kommunikative Funktionen haben.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  lösen z.B. Zellreaktionen aus [3].  $\text{Ca}^{2+}$  wird als sekundärer Botenstoff bezeichnet, da primäre Signale, wie die Bindung von Hormonen an die entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche in sekundäre Signale umgesetzt, eine intrazelluläre Ca-Konzentrationsänderung bewirken [3,4,22,26,86,88].

Die Regulation der Eigenschaften aktiver Metallzentren wird durch die Einbettung in eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine, durch die Koordinationszahl, durch die Art der koordinierten Liganden, durch lokale strukturelle und dielektrische Bedingungen sowie durch substratbindende Gruppen der umgebenden Proteinmatrix erreicht [85]. Die Auswahl des richtigen Metallions ist für die Biosynthese von Metallbiomolekülen entscheidend. Sie ist abgesehen von thermodynamischen und kinetischen Faktoren auch davon abhängig, in welcher Konzentration das Metallion sowohl intra- als auch extrazellulär vorliegt.

### *2.1.2 Toleranzgrenzen der Spurenelementaufnahme*

Die Konzentrationen der Metallionen in den verschiedenen Biofluida und Kompartimenten des menschlichen Organismus hängt stark von exogenen Faktoren, wie Rauch- und Ernährungsgewohnheiten, Immissionsbelastung, Gehalte in den tierischen und pflanzlichen Nahrungsmitteln sowie im Trinkwasser, als auch von endogenen Faktoren, wie Alter, körperliche Belastung, Stress und Hormonstatus, ab [3,87,88]. Die biologische Verfügbarkeit, d.h. die Form in der das jeweilige Spurenelement dem Organismus zur Verfügung steht, spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle bezüglich der individuellen Unterschiede in den Konzentrationen der Metallionen. Wechselwirkungen im Intermediärstoffwechsel können die Verwertung der Spurenelemente ebenfalls beeinflussen. Die Resorptionsrate stellt einen nicht zu vernachlässigenden Einflussfaktor dar. Resorptionsorte sind sowohl Magen als auch Darm, wobei spezielle Liganden (z.B. konstitutioneller Faktor für Kobalt, Transmanganin für Mangan usw.) für die Resorption essentiell sind [87]. In Tab. 2-2 sind die Resorptionsraten, Resorptionsorte, der Resorptions- und Transportmechanismus für ausgewählte Spurenelemente zusammengefasst.

Tab. 2-2 Resorptionsort und Resorptionsmechanismus von Spurenelementen [87]

Element	Resorptionsort*	Beteiligte Liganden	Resorption und Transportmechanismus
<i>Co</i>	Magen Duodenum	Konstitutioneller Faktor; Transcobalamin	Komplexbildung mit Pyrrolringen zu Cobalamin
<i>Cr</i>	Proximaler Dünndarm	Sauerstoff und Stickstoff	Oxidationsstufe III und VI; Komplexbildung mit Transferrin; Glukosetoleranzfaktor;
<i>Cu</i>	Duodenum Jejunum	Ceruloplasmin	zweibindig
<i>F</i>	Magen Darm		Niedermolekulare organische F-Verbindungen
<i>J</i>	Mukosa	Trijodothyronin Thyroxin	äußerst instabil
<i>Mo</i>	?	Hochmolekulare Komplexe, die Flavin beinhalten	Fünfbindig; Protein unbekannt
<i>Mn</i>	Duodenum Ileum	Transmanganin	Zweibindig; bevorzugte Komplexbildung mit Nukleinsäuren
<i>Se</i>	Distales Ileum	Aminosäuren	Se-Methionin-Komplex
<i>Sn</i>	?	Kovalente Bindung an Kohlenstoff	Zinn(IV)-Sulfat
<i>Si</i>	?	Hyaluronsäure Chondroitin-4-sulfat Heparansulfat Dermatan	Si-O-Si; Si-C
<i>V</i>	?	Protein-Vanadium-Komplex	Vier- und fünfbindig; Pyrovanadat
<i>Zn</i>	Duodenum Jejunum	Zn-bindendes Protein in der Schleimhaut	Zinkoxid; Zinksulfat; Zinksulfid; Komplexbildung mit Aminosäuren

\* Siehe Abb. 3-1



Der Transport der Spurenelemente vom Resorptionsorgan über das Speicherorgan (Knochen, Haare, Lunge, Gehirn, Milz, Herz, Prostata, Pankreas, Niere, Haut und Leber) zum Wirkungsort bzw. zum Ausscheidungsorgan erfolgt in erster Linie über die Blutbahn, wobei die Spurenelemente vorwiegend in gebundener Form vorliegen [87,88]. Die Serumkonzentrationen der meisten Makro- und Mikroelemente unterliegen der Regulierung. An der Aufrechterhaltung eines Spurenelementgleichgewichtes im menschlichen Körper sind unter anderen Metallothioneine beteiligt, die die Bindungs- und Transportformen der zweiwertigen Spurenelemente darstellen [91-93].

Die Festlegung von Normalwerten in physiologischen Bereichen ist trotz der Regulationsmechanismen, die für die Konstanz der Spurenelementgehalte sorgen (sie unterliegen allerdings in den einzelnen Geweben, in den Zellen bzw. in zellulären Subfraktionen rhythmischen Schwankungen), nicht ganz einfach. Analytisch bestimmte Konzentrationen sollten daher immer individuell interpretiert werden [94-97].

Normalerweise wird innerhalb bestimmter Grenzkonzentrationen ein Gleichgewicht zwischen Aufnahme, Nutzung, Speicherung und Ausscheidung (Homöostase) der entsprechenden bioanorganischen Elemente erreicht. In Abb. 2-1 ist der Zusammenhang zwischen Essentialität, Defizit und Toxizität dargestellt [85,98]. Der Plateaubereich stellt ein Optimum für Wachstum, Gesundheit und Reproduktion dar. Die Konzentrationsspanne des Plateaubereiches, Anstieg und Abfall ist elementabhängig. Ein enger Grenzkonzentrationsbereich deutet auf eine hohe Toxizität des entsprechenden Elementes hin. Als Beispiel seien Selen und Fluor genannt.

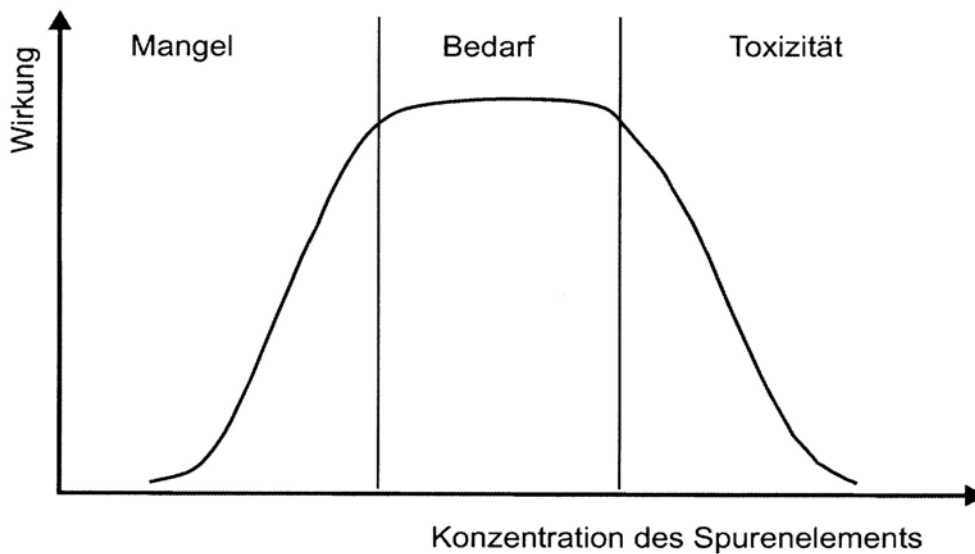


Abb. 2-1 Darstellung des Aktivitätsspektrums eines Spurenelementes in Abhängigkeit von der Konzentration [98]

Um die Toleranzgrenzen festlegen zu können, sind Kenntnisse der metabolischen Prozesse der Absorption, Verteilung, Biotransformation und Ausscheidung des entsprechenden Makro- bzw. Mikroelementes erforderlich. Die Toleranz des Organismus gegenüber einem bioanorganischen Element wird durch die Dosis-Wirkungs-Beziehung festgelegt [26,98]. Dazu müssen Daten über die Exposition des jeweiligen Elementes neben Daten der Resorptionsrate, biologische Halbwertszeit und kritisches Organ vorliegen.

### 2.1.3 *Veränderungen der organspezifischen Elementgehalte im Verlauf einer Erkrankung*

Vielfältige Beziehungen der Elemente zu den Proteinen insbesondere zu den Enzymen spiegeln sich im Ablauf der Differenzierungs-, Wachstums- und Regenerationsprozesse wider [99]. Obwohl häufig die molekularen Mechanismen dieser Beziehungen noch nicht aufgeklärt sind, haben die Makro- und Mikroelemente für die Medizin im Zusammenhang mit der Pathogenese, Diagnostik, Therapie, Prognose und Pro-

phylaxe zunehmend an Bedeutung gewonnen, wobei die Zusammenhänge mit der Ernährung nicht außer Acht gelassen werden dürfen [100,101].

Neben der Aufklärung von pathogenetischen und pathophysiologischen Zusammenhängen konzentrieren sich die Spurenelementuntersuchungen in der Humanmedizin im wesentlichen auf die Schwerpunkte:

- ⇒ Diagnostik von Mangelzuständen und sekundäre Konzentrationsänderungen als Folge von Krankheitsprozessen,
- ⇒ Therapie unter dem Gesichtspunkt der Kontrolle,
- ⇒ Prophylaxe einer Unterversorgung bzw. einer übermäßigen Zufuhr.

Konzentrationsänderungen der Makro- und Mikroelemente können sowohl Ursache als auch Folge einer Erkrankung sein [98]. Bei Erkrankungen, die stoffwechselaktive Organe oder solche betreffen, die für die Spurenelementkinetik bedeutsam sind, kommt es zu sekundären Konzentrationsänderungen. Von besonderem Interesse sind unter den gastroenterologischen Erkrankungen, diejenigen, die die Leber als zentrales Stoffwechselorgan betreffen. Aber auch Niere, Magen und Darm sind von Bedeutung.

Bereits Anfang der sechziger Jahre wurden Spurenelementuntersuchungen im Rahmen von Krebserkrankungen durchgeführt, auch um krebserzeugende Noxen nachweisen zu können [102,103]. Die meisten der bis heute erhaltenen Kenntnisse beziehen sich auf die primäre (Krebsverhütung), sekundäre (Krebsfrüherfassung) und tertiäre Prävention (Beurteilung von Therapieeffektivität).

Unter die primäre Prävention fallen Untersuchungen, die Korrelationen zwischen Spurenelementaufnahme und Krebserkrankungen aufzeigen (z.B. Signifikant negative Korrelationen wurden zwischen der Selenaufnahme, Krebs des Verdauungstraktes, der Prostata und Brustdrüse, der Lungen und für die Leukämie gefunden. Eine Korrelation zwischen der Krebsmortalität und der Zn-, Cu-, Cd-, und Cr-Aufnahme wurde ebenfalls gefunden) [11,18,102,103].

Im Rahmen der sekundären Prävention lassen sich mit Hilfe von Zn- und Cu-Bestimmungen im Haar maligne von benignen Prozessen trennen [104,105]. Prozesse mit einer schnellen Gewebsvermehrung weisen einen gesteigerten Eisenbedarf auf, der sich in Änderungen des Fe-Plasmaspiegels zeigt [3,106]. Bei der Beurteilung von Therapieerfolgen und zur Erkennung von Rezidiven kann beim Corpus- und Ovarialkarzinom der Cu/Fe-Quotient hilfreich sein (Quotient steigt bei Auftreten von Rezidi-

ven an) [107]. Gleiche Bedeutung kommt dem Plasmakupfergehalt beim Morbus Hodgkin zu [108].

Über die Bestimmung von Spurenelementgehalten in gesunden und malignen Geweben konnten sekundäre Konzentrationsänderungen als Folge der Erkrankung aufgezeigt werden [109-130]. Bereits 1971 konnte Mulay et al. erste Hinweise der Funktion von Zinn im menschlichen Organismus liefern [109]. Er zeigte, dass der Zinngehalt in der malignen Darmmukosa um den Faktor 2 gegenüber dem in der gesunden Darmmukosa erniedrigt ist. Mit den heutigen Kenntnissen ist dieses Messergebnis nicht verwunderlich, da Zinn ein Bestandteil des gastrointestinalen Hormons Gastrin ist [86], dessen Produktion in der malignen Mukosa gegenüber der gesunden erniedrigt ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die praktische Bedeutung der Spurenelemente in der klinischen Medizin insgesamt zwar noch begrenzt ist, was letztendlich auch auf den hohen analytischen Aufwand zurückzuführen ist, der betrieben werden muss, um qualitätsgesicherte Analysenergebnisse zu erhalten [131,132]. Auf der anderen Seite kann aber eine Bestimmung der Makro- und Mikroelemente in den unterschiedlichen Organen und Körperflüssigkeiten wertvolle Hinweise über den veränderten Metabolismus bei diversen Erkrankungen, in diesem speziellen Fall der Krebserkrankung, und Anhaltspunkte für neue prognostische Faktoren oder Therapiekonzepte liefern.

## **2.2 Analysenverfahren in der klinischen Medizin**

### *2.2.1 Analysenverfahren in der klinischen Medizin zur Bestimmung von Makro- und Mikroelementen*

Makro- und Mikroelemente kommen aufgrund ihrer diversen physiologischen Funktionen in den Organen in sehr unterschiedlichen Konzentrationen vor. In Humange-weben liegen die Elementkonzentrationen im Bereich von  $10^{-3}$  bis  $10^{-12}$  g/g Feuchtgewicht [3,86,133]. Unter dem Gesichtspunkt einer qualitätsgesicherten Analytik muss der Konzentrationsbereich bei der Auswahl einer oder mehrerer analytischer Methoden berücksichtigt werden. Eine Reihe von Analysenverfahren haben sich für die Bestimmung von Spurenelementen in den letzten Jahren etabliert, von denen

einige inzwischen als Routineverfahren auch in das klinische Laboratorium Einzug gehalten haben. Dazu gehören:

- ⇒ die Photometrie,
- ⇒ die Atomabsorptionsspektrometrie (AAS),
- ⇒ die Flammenemissionsspektrometrie (FES),
- ⇒ die optische Atomemission mit induktiv gekoppeltem Plasma (ICP-OES),
- ⇒ und die Voltammetrie.

Unter den mehr wissenschaftlichen Verfahren haben sich folgende Multielementmethoden zur Bestimmung von Spurenelementen durchgesetzt:

- ⇒ die Neutronenaktivierungsanalyse (NAA),
- ⇒ die Massenspektrometrie mit induktiv gekoppelten Plasmen (ICP-MS),
- ⇒ die Isotopenverdünnungsanalyse in Kombination mit der Massenspektrometrie (ID-MS),
- ⇒ die Protonen induzierte Röntgenemission (PIXE),
- ⇒ die Röntgenfluoreszenzanalyse (XRF),
- ⇒ und die Totalreflektionsröntgenfluoreszenzspektrometrie (TXRF) [134-145].

Einen kompletten Überblick über Applikationen diverser analytischer Verfahren im biologischen und medizinischen Bereich erscheint jährlich im *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* [146]. In Vergleichsstudien wurde die analytische Leistungsfähigkeit der wissenschaftlichen Verfahren anhand der Bestimmung diverser Elementgehalte in biologischen und umweltrelevanten zertifizierten Referenzmaterialien gegenübergestellt [147-151]. Es zeigte sich, dass bei allen angewendeten Analysenmethoden die erreichbare Genauigkeit auch im  $\mu\text{g/kg}$ -Konzentrationsbereich der interessierenden Analyten groß ist, während die Präzision eindeutig von der Analysentechnik und von der Konzentration des Analyten abhängt. Die Präzision, angegeben als relative Standardabweichung von Wiederholmessungen war für alle mittels TXRF gemessenen Elemente sehr gut bis gut. Ausnahmen sind Elemente, deren Gehalte in den entsprechenden Referenzmaterialien an der Nachweisgrenze für TXRF-Messungen lagen. Hier ist im allgemeinen unabhängig von der analytischen Methode die Varianz der Analysenergebnisse sehr groß. Dadurch, dass neben den Spurenelementen auch Mineralelemente wie K und Ca in medizinischen Proben bestimmt werden sollten, ist der TXRF gegenüber der ICP-MS der Vorzug zu geben, da bei Einsatz der ICP-MS Verdünnungsschritte zur Bestimmung der Mineralelemente und das Additionsverfahren zur Kalibrierung unumgänglich sind, während die

simultane Elementbestimmung mittels TXRF ohne Verdünnungsschritt und die Kalibrierung mit Hilfe eines internen Standards erfolgt, was einen weiteren Vorteil gegenüber der ICP-MS darstellt. NAA und PIXE sind analytische Verfahren, die einen Teilchenbeschleuniger benötigen, im Falle der NAA sogar einen Reaktor, der nur in wenigen Großforschungseinrichtungen in Deutschland zugänglich ist, was deren Anwendung enorm einschränkt. Auch die reinen Messzeiten können erheblich sein, teilweise bis zu mehreren Tagen. Unter dem Gesichtspunkt des Kostenfaktors (Kosten pro Analyse) sind die klassische XRF neben der TXRF die empfehlenswertesten Verfahren. Unter dem Blickwinkel der Nachweis- bzw. Bestimmungsgrenzen ist der TXRF gegenüber der klassischen XRF der Vorzug zu geben.

### 2.2.2 *Kopplungstechniken in der bioanorganischen Speziesanalyse*

Um tiefere Einblicke in biochemische Abläufe unter Beteiligung von Makro- und Mikroelementen im menschlichen Organismus zu bekommen, müssen deren chemische Form und Bindungspartner ermittelt werden. Die Elementspeziesanalytik hat sich in den letzten 10 Jahren zu einem integralen Bestandteil interdisziplinärer Forschung entwickelt [152-155].

Neben der Bestimmung von Elementspezies in humanen Biofluida [156,157] werden zunehmend in-situ Messungen zur chemischen Charakterisierung der Elementspezies in menschlichen Geweben und Zellen durchgeführt [152]. Das umfasst im ersten Schritt die Isolierung der Elementspezies von der biologischen Matrix ohne eine chemische Veränderung der Spezies zu provozieren (matrixangepasste Probenvorbereitung) [158,159]. Dazu werden die Humangewebe zunächst einem Zellaufschluss unterzogen und die festen Bestandteile (höhermolekulare Spezies) durch Ultrazentrifugation von den löslichen Bestandteilen (niedermolekulare Spezies) extrahiert [160]. Üblicherweise wird zur Herstellung von Cytosolen aus Softgeweben unter Zusatz von Pufferlösung ein Potter-Eveljhem-Homogenisator im Anschluss an eine Ultraturrax-Behandlung (zur groben Gewebe- bzw. Zellzerkleinerung eingesetzt) [160,161]. Zur weiteren Separierung der löslichen Bestandteile können klassische chromatographische und elektrophoretische Trennmethode eingesetzt werden [162-164]. Die Detektion der getrennten Elementspezies kann dann mit Hilfe der unter Punkt 2.4 aufgeführten spektroskopischen Verfahren erfolgen (off-line Verfahren). Im

Zuge der Weiterentwicklung instrumenteller Analysengeräte auf dem Gebiet der Speziesanalytik hat sich die Online Kopplung eines Trennmoduls mit einem Detektormodul durchgesetzt [165]. Die Anzahl an Publikationen über Online Kopplungstechniken - vorwiegend die Kopplung zwischen einem Hochdruckflüssigkeitschromatographen (HPLC) oder Kapillarelektrophorese (CE) mit einem massenspektrometrischen Detektor (ICP-MS, ESI-MS, ESI-MS/MS) - im Bereich der Elementspeziesanalyse von biologischen Proben haben seit Mitte der neunziger Jahre exponentiell zugenommen [166-205]. Zur Charakterisierung und Identifizierung von bioanorganischen Spezies eignen sich vor allem die Kopplung einer Trenneinheit mit einem induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometer [167,169-205]. Zur Separierung von metallhaltigen Spezies eignen sich vor allem die Kapillarelektrophorese und die Größenausschlusschromatographie, da keine chemischen und keine physikalischen Wechselwirkungen der zu trennenden Spezies mit der stationären Phase auftreten. Die Elementspeziesanalyse unter Erhalt der nativen Form der Spezies erfordert eine der Aufgabenstellung angepasste Analysenstrategie, in der in erster Linie die Probennahme, der Probentransport, die Probenlagerung und die Probenvorbereitung einbezogen werden müssen. Daneben müssen die analytischen Ergebnisse über eine entsprechende Qualitätskontrolle gesichert werden. Dies erfordert ein hohes Maß an analytischer Erfahrung und interdisziplinärer Weitsicht.

### 3 Experimenteller Teil

Aufgrund der unterschiedlichen biologisch-medizinischen Fragestellungen, die sich im Hinblick auf den Metabolismus und die gegenseitigen Wechselbeziehungen von Mineral- und Spurenelementen im menschlichen Organismus und vor allem im Hinblick auf den veränderten Zellstoffwechsel von Makro- und Mikroelementen in neoplastischen Zellen ergeben, wurde eine Analysenstrategie erarbeitet, die sowohl die Bestimmung aller interessierenden Elemente im Gesamtgewebe als auch eine Speziesanalyse im Cytosol von Gewebeproben erlaubt. Das gesamte Analysenkonzept, das sowohl die Probennahme, die Probenaufbewahrung, die Probenvorbereitung als auch das entsprechende Analysenverfahren mit einbezieht, ist in Abbildung 3-1 dargestellt.

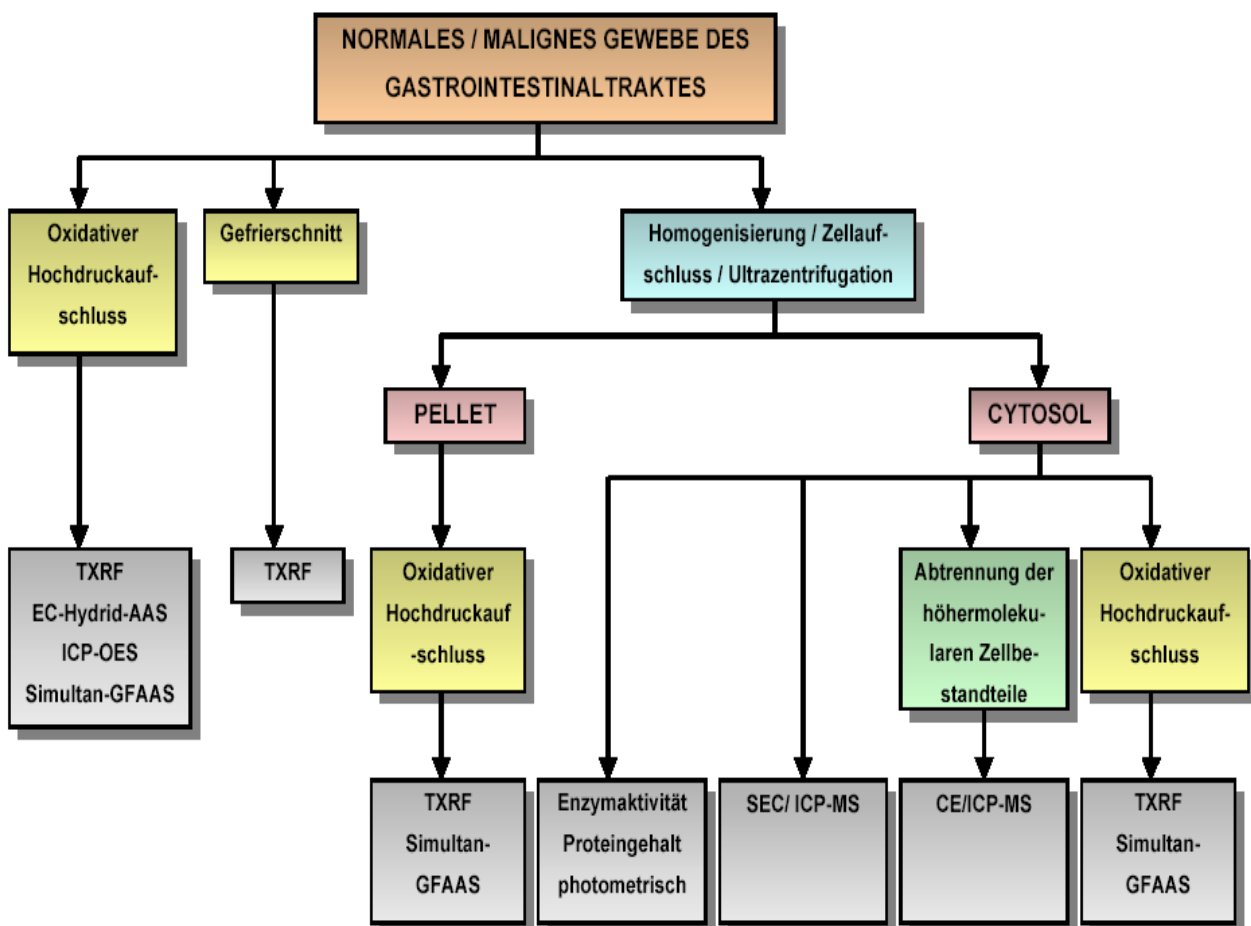


Abb. 3-1 Analysenkonzept zur Bestimmung von Mineral- und Spurenelementgehalten in Gewebeproben und zur Analyse niedermolekularer Elementspezies



Die Wahl des Probenmaterials fiel auf den Gastrointestinaltrakt (hier: Magen, Kolon, Rektum), da das Kolonkarzinom die zweithäufigste Todesursache in industrialisierten Ländern ist, also eine genügend hohe Anzahl an Probanden zur Verfügung stand, und der Kenntnisstand von der Karzinogenese des Kolonkarzinoms unter molekulargenetischem Aspekt relativ hoch ist. Bei der Elementspeziesanalyse wurden die Optimierungen der eingesetzten Analysenverfahren in erster Linie auf die Nickelspeziesanalyse abgestimmt. Es wurden neben Nickelspezies auch weitere Elementspezies von Zn, Mo, Cu, Se, Mn, V, As, Cd, J, Pb und Sn untersucht.

### **3.1 Probenherkunft, Patientendaten und pathologische Befunde**

Alle untersuchten Gewebeproben wurden durch das Chirurgenteam des Allgemeinen Kreiskrankenhauses, Viersen-Dülken, entnommen und zur Verfügung gestellt. Bei den Probanden handelt es sich ausschließlich um Personen aus dem Einzugsbereich Kreis Viersen, in dem laut Krebsstatistik des Landes NRW die Krebsmortalität von Frauen aufgrund eines Magen- bzw. Kolon- bzw. Rektumkarzinoms (alte ICD-Nr. 151 für Magen, 153 für Kolon bzw. 154 für Rektum, neuer ICD-Schlüssel C16.9 für Magen, C18 mit weiterer Unterteilung für Kolon bzw. C20 für Rektum) relativ hoch ist (5. Quintil) bezogen auf alle in NRW registrierten Fälle zwischen 1980-1991 [206]. Die relative Krebssterblichkeitsrate der Männer in Folge von Magen- bzw. Dickdarm- bzw. Enddarmkrebs liegt im mittleren Bereich (4. bzw. 3. bzw. 4. Quintil).

Von jedem Probanden wurden die individuellen Patientendaten (Geschlecht, Alter, Rauch- und Essgewohnheiten, präoperative Medikation etc.) in Form eines Fragebogens (siehe Anhang) unter Einhaltung des Datenschutzes gespeichert. Der Fragebogen wurde in Anlehnung an die Protokollrichtlinien des EU-TRACY-Projektes zur Datenerfassung von Nickelreferenzwerten in humanen Körperflüssigkeiten erarbeitet [207]. Die Gewebeentnahmestellen wurden schriftlich dokumentiert, die postoperativen pathologischen Berichte wurden ebenfalls unter Einhaltung des Datenschutzes zur Verfügung gestellt. Da sich im Laufe der Patientenbefragung die Frage nach den Essgewohnheiten als relativ schwierig herausstellte, wurden sie im weiteren Verlauf der analytischen Auswertung nicht berücksichtigt. In Tabelle 3-1 sind die persönlichen Patientendaten aller Probanden, die bei der chemometrischen Auswertung der Ergebnisse in Zusammenhang mit den ermittelten Elementgehalten in den ent-

sprechenden Gewebeproben berücksichtigt wurden, aufgelistet. Die zusammengefassten Daten der pathologischen Befunde (Resektatlänge, Entfernung Tumorsektatrand, Typisierung nach WHO und Tumorausbreitung) sind ebenfalls in Tabelle 3-1 aufgeführt. Zur genaueren Lokalisierung der Gewebeproben sind die Entnahmestellen der einzelnen Gewebeproben in Abbildung 3-2 mit der entsprechenden Patientennummer eingezeichnet.

Tab. 3-1 Persönliche und pathologische Daten der Probanden (Bestimmung der Elementgehalte im Gewebe)

Proben-Nr.	Alter	Geschlecht	Rauchge- wohnheiten	ICD-Nr. <sup>§</sup>	Resektat- länge / cm	Entfernung Tumorsektat- rand / cm	Tumor- Länge / cm	Differen- zierungsgrad	Tumorklassifikation nach TNM		
3	67	m	passiv	C20	k.A.	k.A.	k.A.	G2-3	k.A.		
4	72	m	nein	C20	1,5	k. A.	k.A.	G2	k.A.		
5	79	m	nein	C20	20	1,5	5,5	G2	T3	N0	Mx
7	69	w	nein	C18.2	35	8	4	G2	T3	N0	Mx
9	70	m	nein	C18.4	48	11	6	G2	T3	N1	Mx
10	69	w	ja k.A.	C18.4	61	16	8	G2	T4	N0	M1
11	27	w	nein	C20	27	1,5	3	G3	T2	N0	Mx
12	86	w	passiv	C16.9	15 / 26 <sup>§</sup>	5	2,5	G3	T1	N0	Mx
13	43	m	60 <sup>+</sup> / 30*	C16.9	18 / 26 <sup>§</sup>	0	7	G2-3	T2	N0	Mx
14	67	m	20 <sup>+</sup> / 15*	C20	28	0,4	7,5	G2	T3	N0	Mx
15	52	m	20 <sup>+</sup> / 16*	C20	35	4	4,5	G2	T3	N3	Mx
16	81	m	nein	C18.2	30	10	3	G2	T2	N1	Mx
17	83	w	passiv	C18.4	25	5	6	G2	T3	N1	Mx
18	71	w	20 <sup>+</sup> / 20*	C18.1	19	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.		
19	69	w	passiv	C18.2	26	8	4,6	G3	T3	N0	Mx
20	76	m	nein	C16.9	19 / 17 <sup>§</sup>	4,5	5	G3	T2	N0	Mx
21	76	m	nein	C18.4	48	14	5,5	G2	T3	N0	Mx
23	67	w	passiv	C18.7	15	1,5	3,5	G2	k.A.		
24	64	m	40 <sup>+</sup> / 10*	C20	32	7,5	3,5	G2	T3	N0	Mx
25	72	m	k.A.	C16.9	19 / 24 <sup>§</sup>	1	13	G3	T3	N2	Mx
26	65	m	nein	C20	22	4	5,5	G2	T3	N0	Mx
28	75	m	20 <sup>+</sup> / 15*	C18.2	25	10	5,5	G3	T3	N0	Mx
29	69	w	nein	C18.2	25	11	5,5	G3	T3	N0	Mx
31	69	m	passiv	C20	35	2,5	5,5	G2	T3	N1	Mx
32	68	w	nein	C20	25	5	2,5	G2	T3	N0	Mx
33	69	w	passiv	C20	24	2,2	2	G3	T2	N0	Mx

k.A. keine Angaben; m männlich; w weiblich; <sup>+</sup> Anzahl pro Tag; \*Zigarettenkonsum in Jahren; <sup>§</sup> Magen: kleine Kurvatur / große Kurvatur; <sup>§</sup> ICD-Schlüssel ab 2000; Mx Minimalerfordernisse zur pathologischen Beurteilung von Metastasen liegen nicht vor

Fortsetzung Tab. 3-1 Persönliche und pathologische Daten der Probanden (Bestimmung der Elementgehalte im Gewebe)

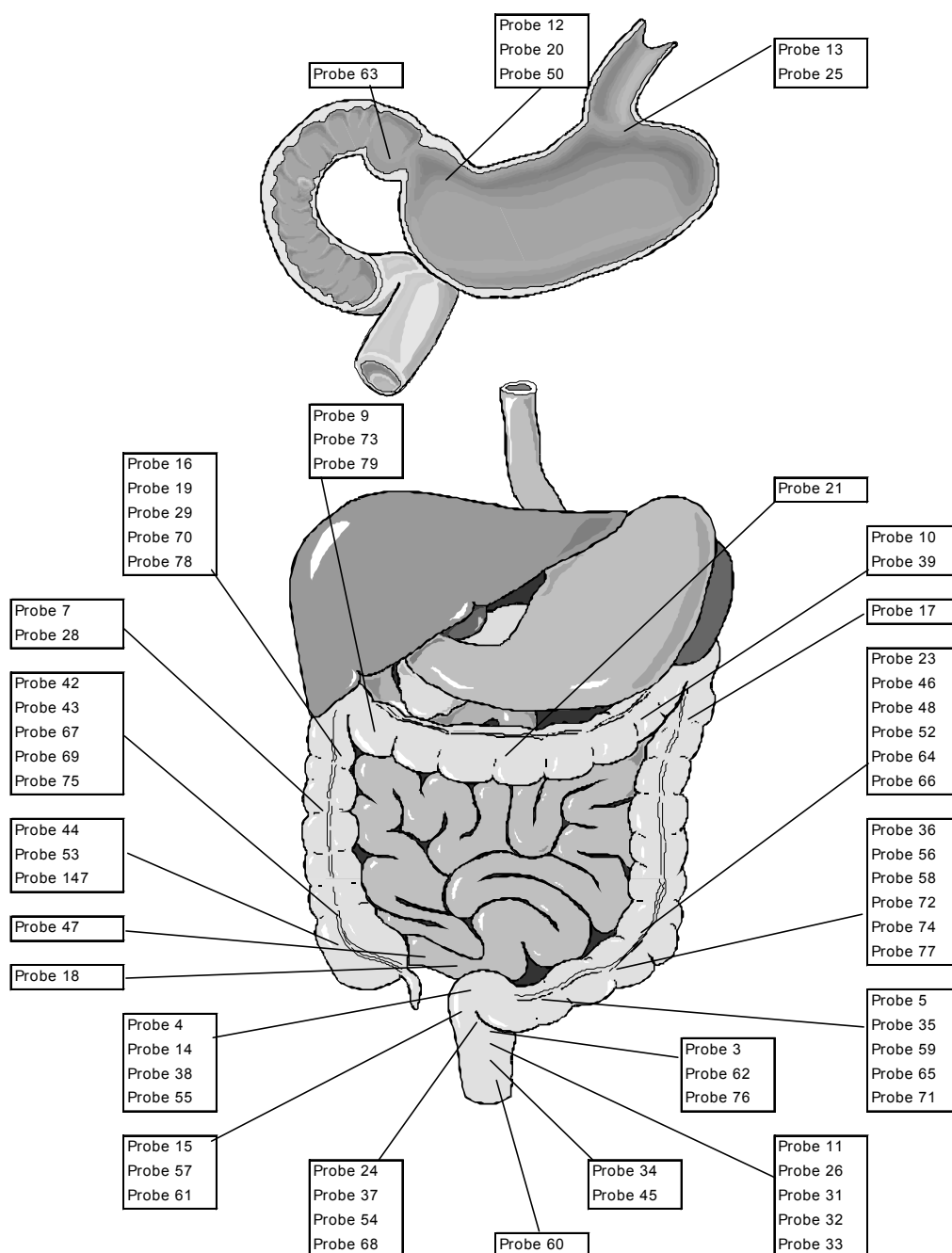
Proben-Nr.	Alter	Geschlecht	Rauchge- wohnheiten	ICD-Nr.	Resektat- länge / cm	Entfernung Tumorsektat- rand / cm	Tumor- Länge / cm	Differen- zierungsgrad	Tumorklassifikation nach WHO		
34	63	m	passiv	C18.7	k.A.	k.A.	k.A.	G2	k.A.		
35	52	m	nein	C18.7	23	10	4	G2	T3	N0	Mx
36	73	w	nein	C18.7	24	10	4,5	G3	T3	N1	Mx
37	80	w	nein	C20	29	k.A.	5,5	G2	T3	N0	Mx
38	76	m	nein	C18.7	20	k.A.	7	G2	T3	N0	Mx
39	74	m	2 <sup>+</sup> / k.A.	C18.4	k.A.	k.A.	k.A.	G3	k.A.		
42	73	w	60 <sup>+</sup> / k.A.	C18.2	k.A.	k.A.	k.A.	G3	T4	N3	M1
43	67	m	nein	C18.2	37	k.A.	7	G2	T3	N1	Mx
44	83	w	nein	C18.2	18	k.A.	5	G3	T4	N0	Mx
45	76	m	nein	C20	37	2,5	3	G1-2	T1	N0	Mx
46	80	m	k.A.	C18.7	14,5	2	4,5	G2	T4	N0	Mx
47	72	m	nein	C18.2	40	6	1,5	G3	T4	N1	M1
48	66	w	nein	C18.7	21	8	2,5	G3	T3	N0	Mx
50	53	m	nein	C16.9	15 / 28 <sup>§</sup>	k.A.	k.A.	G3	T2	N2	Mx
52	61	w	k.A.	C18.7	18	1	7	G2	T3	N0	Mx
53	66	m	nein	C18.2	35	9	5	G2	T2	N0	Mx
54	72	m	passiv	C20	32	2,5	3,5	G3	T2	N0	Mx
55	86	m	nein	C20	222	0,7	5	G2	T2	N0	Mx
56	61	m	nein	C18.7	18,5	8	8	G2	T4	N1	Mx
57	67	m	nein	C18.7	17	5	3	G2	T2	N0	Mx
58	61	w	nein	C18.7	18	7,5	5	G2	T3	N1	Mx
59	55	m	ja k.A.	C18.7	41	k.A.	4	G2	T2	N1	Mx
60	75	w	k.A.	C20	30	1,2	4,5	G2	T3	N1	Mx
61	63	m	50 <sup>+</sup> / 20*	C20	36	12	3,3	G3	T3	N2	Mx
62	83	w	nein	C20	25	3,5	2,5	G2	T2	N2	Mx
63	75	w	k.A.	C16.9	14 / 19,5 <sup>§</sup>	8	3,5	G2-3	T3	N1	Mx

k.A. keine Angaben; m männlich; w weiblich; <sup>+</sup> Anzahl pro Tag; \*Zigarettenkonsum in Jahren; <sup>§</sup> Magen: kleine Kurvatur / große Kurvatur; <sup>§</sup> ICD-Schlüssel ab 2000; Mx Minimalerfordernisse zur pathologischen Beurteilung von Metastasen liegen nicht vor

Fortsetzung Tab. 3-1 Persönliche und histopathologische Daten der Probanden (Bestimmung der Elementgehalte im Gewebe)

Proben-Nr.	Alter	Geschlecht	Rauchge- wohnheiten	ICD-Nr.	Resektat- länge / cm	Entfernung Tumorsektat- rand / cm	Tumor- Länge / cm	Differen- zierungsgrad	Tumorklassifikation nach WHO		
64	53	w	passiv	C18.7	20	8	2,2	G2-3	T2	N3	Mx
65	64	m	30 <sup>+</sup> / 25*	C18.7	29	2,5	6,5	G1	T2	N0	Mx
66	68	m	nein	C18.7	50	20	3,5	G3	T3	N0	Mx
67	67	w	k.A.	C18.2	17	k.A.	7	G2-3	T3	N3	Mx
68	52	m	20 <sup>+</sup> / 20*	C20	28	4	5	G2	T4	N1	M1
69	71	m	nein	C18.2	23	k.A.	12	G2	T4	N1	Mx
70	68	m	nein	C18.2	29	10,5	9	G3	T4	N0	Mx
71	89	w	nein	C18.7	14	3	4	G3	T3	N2	Mx
72	75	w	nein	C18.7	40	14	7	G2	T4	N1	Mx
73	68	m	30 <sup>+</sup> / 30*	C18.4	24	k.A.	4	G2	T3	N0	Mx
74	70	m	nein	C18.7	31	8	8	G2-3	T3	N2	Mx
75	63	m	nein	C18.2	42	k.A.	6,5	G3	T3	N3	Mx
76	64	m	nein	C20	18	k.A.	7,5	G3	T4	N0	Mx
77	84	w	nein	C18.7	21	8	2	G2	T3	N1	Mx
78	65	m	k.A.	C18.2	25	15	6,5	G2	T3	N0	Mx
79	73	w	nein	C18.4	30	8	7	G3	T4	N0	Mx

k.A. keine Angaben; m männlich; w weiblich; <sup>+</sup> Anzahl pro Tag; \*Zigarettenkonsum in Jahren; § Magen: kleine Kurvatur / große Kurvatur; § ICD-Schlüssel ab 2000; Mx Minimalerfordernisse zur pathologischen Beurteilung von Metastasen liegen nicht vor



**Abb. 3-2** Entnahmestellen der Gewebeproben und Probandennummer (Bestimmung der Elementgehalte in den Feuchtgeweben)

Tabelle 3-2 enthält die entsprechend reduzierten Patientendaten, die zur Auswertung der Ergebnisse bei der Elementspeziesbestimmung in den Cytosolen von malignen und gesunden Gewebeproben herangezogen wurden. Die Patientennummern sind

mit dem Index c versehen, um eine Verwechslung mit den in Tabelle 3-1 aufgeführten Proben zu vermeiden. In Abbildung 3-3 sind die entsprechenden Resektionsstellen eingezeichnet.

**Tab. 3-2** Reduzierte persönliche und pathologische Patientendaten (Elementspeziesanalyse im Cytosol)

<i>Proben-Nr.</i>	<i>Alter</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>ICD-Nr.<sup>§</sup></i>	<i>Differenzierungsgrad</i>	<i>Tumorklassifikation nach TNM</i>		
1c	74	w	C18.2	G2-3	T4	N0	Mx
2c	84	w	C20	G3	T3	N1	Mx
3c	60	m	C18.2	G2	T4	N0	Mx
4c	60	m	C18.4	k.A.	entzündetes Gewebe		
5c	53	m	C18.7	G3	T4	N1	Mx
6c	71	m	k.A. <sup>1</sup>	k.A.	kein Anhalt für Malignität		
8c	79	m	C18.7	G2-3	T3	N0	M0
9c	65	w	C18.7	G3	T3	N2	Mx
10c	67	m	D12.8	G2	k.A.		
11c	70	w	C18.7	G2	T0		
12c	58	m	C18.7	G3	T3	N0	Mx
13c	78	w	C18.2	G2	k.A.		
14c	72	m	C18.4	G2	T2	N0	Mx
15c	72	m	C18.7	G2	T2	N0	Mx

w weiblich; m männlich;

<sup>§</sup> ICD-Schlüssel ab 2000: C18.2 Colon ascendens, C18.4 Colon transversum, C18.7 Colon sigmoidum, C20 Rektum; <sup>1</sup> Bauchdecke; D12.8 tubulovillöses Rektumadenom  
Mx Minimalerfordernisse zur Beurteilung von Metastasen liegen nicht vor;  
k.A. keine Angaben

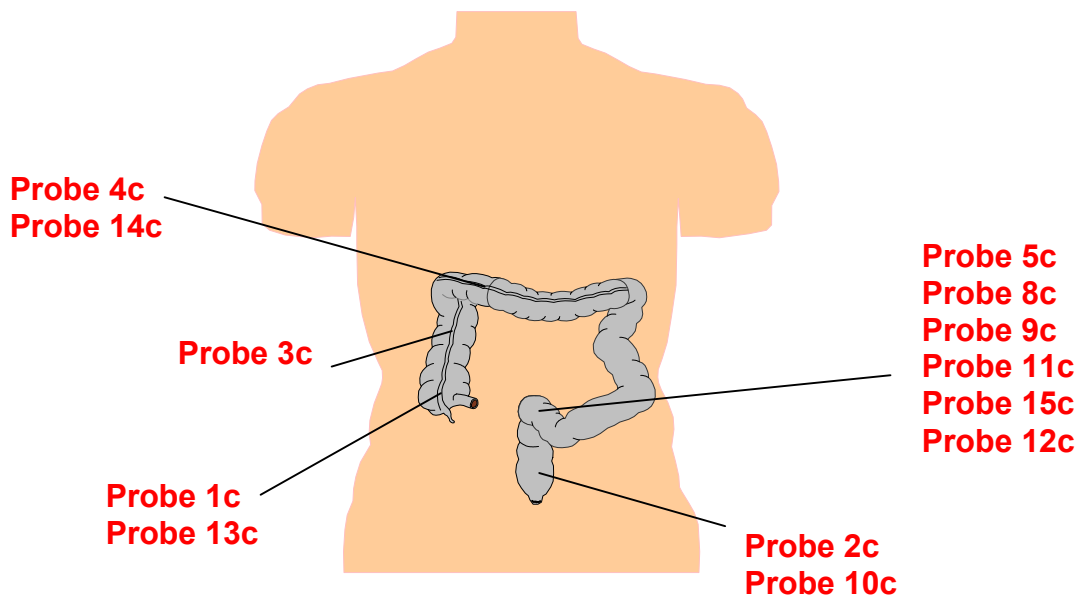


Abb. 3-3 Resektionsstellen der Gewebeprobe und Probandennummer (Bestimmung der Elementspezies in den Cytosolen)

### 3.2 Probennahme, Probentransport und Probenlagerung

Die Entnahme der Gewebeprobe erfolgte direkt im Anschluss an den chirurgischen Eingriff. Dazu wurden aus den entsprechenden Resektaten mit Hilfe eines chirurgischen Messers ca. 2 x 2 cm große Gewebestücke, jeweils aus der Tumorregion und der gesunden Resektatregion (äußerer Resektatrand) entnommen. Der Schnitt erfolgte vertikal (siehe Abb. 1-5), so dass die Infiltrationstiefe des Tumors sichtbar war. In den meisten Fällen war bereits der *muscularis propria* befallen. Entsprechend wurde mit der Entnahme der gesunden Gewebeprobe verfahren. Die Proben wurden in PE-Folien eingeschweißt, mit einer Patientennummer und dem Hinweis, ob es sich um eine Tumor- oder Normalgewebeprobe handelt, versehen und schockgefroren. Der Transport zum Labor erfolgte auf schnellstem Weg in einer Kühlbox bei  $-70^{\circ}\text{C}$ . Die maximale Aufbewahrungszeit betrug 3 Wochen bei  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Um Kontaminationen durch Abrieb von chirurgischen Utensilien und durch die Umgebungsluft zu minimieren, wurden die Gewebeprobe vor dem Aufschluss bzw. vor dem Mikrotomschnitt in flüssigen Stickstoff getaucht und in einer Reinraumwerkbank



mit einem Quarzmesser in kleinere Aliquote geschnitten. Zur weiteren Probenvorbehandlung wurden nur Gewebestücke aus dem Inneren der jeweiligen Proben verwendet. Als Schneidunterlage diente eine Quarzglasplatte.

### 3.3 Probenvorbereitung

Ausnahmslos wurden alle Probenvorbehandlungsschritte in einer Laminar-Flow-Box der Fa. Beck & Thies, Langenfeld, oder in einem Reinraum Klasse 1000 (Forschungszentrum GKSS, Geesthacht) durchgeführt. Es wurden, soweit sie kommerziell erhältlich waren, Chemikalien der Reinheit *suprapur* eingesetzt. Die verwendeten Säuren wurden durch Destillation unterhalb des Siedepunktes und der verwendete Tris-Puffer (Tris-hydroxymethyl-aminomethan- $\text{HNO}_3$ -Puffer) über einen konditionierten Ionenaustauscher (*Chelax 100*, Austausch der  $\text{Na}^+$ - durch  $\text{NH}_4^+$ -Ionen) nachgereinigt. Die Lagerung des Tris-Puffers erfolgte nach Entgasung unter Argonatmosphäre in einem PFA-(Perfluoralkoxy)-Gefäß bei 4°C. Die benutzten Chemikalien standen unter permanenter Qualitätskontrolle. Alle benutzten Gefäße zur Aufbewahrung, Verbrauchsmaterialien, wie Pipettenspitzen und Kryoröhrchen, Probenträger sowie alle Instrumentarien zur Probenvorbereitung (Aufschlussgefäße, Mikrotommesser, Ultra-Turrax, pH-Elektrode, Potter-Eveljhem-Homogenisator, Ultraschalldesintegrator) wurden vor und nach Benutzung mit verdünnter, nachgereinigter Salpetersäure gesäubert und anschließend mit Reinstwasser (Wasseraufbereitungssystem Milli-Q Plus der Fa. Millipore, Eschborn) gespült.

#### 3.3.1 *Probenvorbereitung zur Bestimmung von Elementgehalten in malignen und gesunden Humangewebe des Gastrointestinaltraktes*

Zur Bestimmung des Gesamtgehaltes der Makro- und Mikroelemente in den Gewebeproben wurde ein Aufschlussverfahren unter Hochdruck und ein Verfahren zur Anfertigung von Gewebeschnitten definierten Volumens entwickelt [208, 209]. Die verwendeten Aufschlussbomben des Autoklavensystems MKP-01 der Fa. ANCON-AT, Moskau, Russland, sind aus Titan gefertigt, die Reaktionsgefäße aus modifiziertem PTFE (Polytetrafluorethylen) wurden von der Fa. Bohlender, Lauda, bezogen. Es

wurden 250 – 400 mg Feuchtgewebe mit 3 mL Salpetersäure unter Zusatz eines internen Standards (jeweils 10  $\mu\text{L}$  einer 1000 mg/L konzentrierten Yttrium- und Gallium-Standardlösung) bei 180°C über einen Zeitraum von 2 h aufgeschlossen. Es wurden jeweils 20  $\mu\text{L}$  der Aufschlusslösung auf den Quarzglassträger aufpipettiert und bis zur Trockene eingeeengt. Von jeder Gewebeprobe wurden 3 Aufschlüsse (N=3), sofern genügend Probenmaterial zur Verfügung stand, angefertigt. Die Aufschlusslösungen selbst wurden jeweils zweimal (n=2) und die auf den Quarzglassträger aufgebrachte Probe durch Drehen des Quarzglassträgers um 180° ebenfalls zweimal (n=2) vermessen, so dass sich insgesamt eine Anzahl von 12 Wiederholmessungen ergibt. Um die Repräsentanz der Probennahme zu validieren, wurde eine kleine Anzahl an Gewebeproben (N=4) vor dem Aufschluss mit Hilfe eines Achatmörser unter Zusatz von flüssigem Stickstoff homogenisiert. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4 Analytische Qualitätskontrolle aufgeführt.

Zur Anfertigung der Gefrierschnitte wurde das Probenmaterial für einige Sekunden in Flüssigstickstoff getaucht und anschließend mit Hilfe eines speziell angeschliffenen Quarzrohres definierten Durchmessers (3,5 mm) excidiert. Die zylinderförmigen Gewebestücke wurden auf einem Aluminiumträger mit Hilfe eines Einbettmediums (keine Kontamination nachweisbar) fixiert und bei -28°C unter Verwendung des Gefrierschnittmikrotoms MHR der Fa. SLEE Technik GmbH, Mainz, in 10  $\mu\text{m}$  dicke Gewebeschnitte excisiert. Das Volumen der wie oben beschrieben präparierten Gewebeschnitte beträgt 0.096  $\text{mm}^3$ . Bei einer ermittelten, durchschnittlichen Dichte der Gewebe von 1,0  $\text{g}/\text{cm}^3$  ergibt sich eine Masse von 0,096 mg pro Gewebeschnitt. Da die Bestimmung der Elementgehalte in den Gewebeschnitten ausschließlich mittels TXRF erfolgte, wurde der Schnitt durch Konvektion auf einen silikonisierten Quarzglassträger aufgebracht. Nach einem Trocknungsschritt von 1 h bei ca. 80°C wurden 10  $\mu\text{L}$  einer 1000  $\mu\text{g}/\text{L}$  konzentrierten Yttrium-Standardlösung (entspricht einem Absolutgehalt des internen Standards von 10 ng) auf den getrockneten Gewebeschnitt aufpipettiert und erneut getrocknet. Die TXRF-Messungen erfolgten direkt im Anschluss an die Präparation der Gewebeschnitte. Es wurden von jeder Gewebeprobe drei Gewebestücke excisiert (N=3) und davon jeweils wieder drei Gefrierschnitte (n=3) angefertigt, so dass sich eine Anzahl von 9 Wiederholmessungen ergab.

### 3.3.2 *Probenvorbereitung zur Bestimmung der Elementgehalte, der Enzymaktivitäten und Elementspezies im Cytosol von malignen und gesunden Kolongeweben*

Alle Probenvorbereitungsschritte zur Cytosolherstellung wurden unter Argonschutzatmosphäre durchgeführt, um eine Oxidation der im Cytosol enthaltenen löslichen Bestandteile zu vermeiden. Der auf einen pH-Wert von 7,4 – entspricht dem physiologischen pH-Wert in den Zellen - eingestellte Tris-HNO<sub>3</sub>-Puffer (20 mmol/L) wurde zusätzlich mit Dithiothreitol (5 mmol/L) versetzt um eine Oxidation der intrazellulären Bestandteile durch gelösten Sauerstoff zu unterdrücken. Die gesamten Probenvorbereitungsschritte zur Cytosolherstellung erfolgten bei +4°C zur Sicherung der nativen Form der im Cytosol enthaltenen Spezies. Das Gewichtsverhältnis Gewebematerial/Tris-HNO<sub>3</sub>-Puffer wurde mit 1:2 gewählt. Die Gewebe wurden mit dem Ultra-Turrax T8 der Fa. IKA Labortechnik, Staufen, 5 min bei höchster Stufe vorzerkleinert und homogenisiert, um anschließend im Potter-Eveljhem-Homogenisator der Fa. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, mechanisch aufgeschlossen zu werden. Das Zellhomogenisat wurde 150 min bei 100.000 g zentrifugiert (Analytische Zentrifuge der Fa. Beckmann Coulter GmbH, Krefeld) und portionsweise in Kryoröhrchen bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren. Der höhermolekulare Anteil (Pellet) wurde nach der Zentrifugation mehrmals mit dem Tris-HNO<sub>3</sub>-Puffer gewaschen und erneut bei 100.000 g für 20 min zentrifugiert. Die überstehende wässrige Phase wurde abgezogen und die verbleibenden Pellets oxidativ unter Hochdruck aufgeschlossen, um eine Massenbilanzierung machen zu können (siehe Kapitel 4). Die Einwaagen der Pellets lagen bei 200-350 mg. Der Aufschluss wurde entsprechend den Aufschlüssen der Gewebeproben durchgeführt. Es konnten aufgrund der geringen Massen der Pellets jeweils nur ein bis zwei Aufschlüsse angefertigt werden. Pro Aufschlusslösung wurden drei Wiederholungsmessungen durchgeführt. Die Proben 10c-15c wurden im Forschungszentrum Geesthacht aufgeschlossen. Im Gegensatz zur oben beschriebenen Cytosolherstellung wurde kein Dithiothreitol zugesetzt. Das Zellhomogenisat wurde bei 25.000 g 99 min zentrifugiert (Zentrifuge 5417 R der Fa. Eppendorf, Hamburg). Der Zellaufschluss der Proben 6c-9c erfolgte mittels Ultraschalldesintegrator Sonfier 450 der Fa. Branson, Danbury, USA. Dazu wurden die Proben ohne vorherige Vorhomogenisierung in den Ultraschalldesintegrator überführt. Bei höchster Beschallungsleistung betrug die Beschallungsdauer

15 min mit einem Beschallungsintervall von 50%. Die Zentrifugation erfolgte wie zuvor beschrieben.

Im Falle der elektrophoretischen Trennung der cytosolischen Elementspezies wurde vor der Cytosolaufgabe eine Fällung der höhermolekularen Zellbestandteile durch Zugabe von Acetonitril im Verhältnis Cytosol/Acetonitril 1:1 durchgeführt [210,211]. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde das Cytosolgemisch kurz geschüttelt und bei 25.000 g 30 min zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde bis zur weiteren Verwendung bei -25°C unter Argonatmosphäre gelagert.

Zur Bestimmung der Elementgehalte in den Cytosol-Puffer-Gemischen der Proben 1c-5c wurden diese oxidativ unter Hochdruck aufgeschlossen (Autoklavensystem s.o.). Zu ca. 450 mg des Cytosol-Puffer-Gemisches wurde eine definierte Menge einer 10 mg/L konzentrierten Yttrium-Standardlösung und 500 µL HNO<sub>3</sub> gegeben. Der Aufschluss erfolgte bei 160°C, die Aufschlussdauer betrug 2 h. Die Proben 6c-15c wurden nicht unter Hochdruck aufgeschlossen, sondern es wurden jeweils 10 µL des Cytosols direkt auf den Quarzglassträger aufgegeben, mit 10 µL HNO<sub>3</sub> und mit 2,5 µL einer 2 mg/L konzentrierten Yttriumstandardlösung (entspricht einem Absolutgehalt von 5 ng Y) versetzt und bis zur Trockene eingengt.

#### 3.4 Analysenverfahren

Zur Bestimmung von Elementverteilungen in malignen und gesunden Geweben und in Cytosolen von malignen und gesunden Geweben des Gastrointestinaltraktes wurde die Totalreflexionsröntgenfluoreszenzspektrometrie (TXRF) als ein Vertreter der Multielementtechnik eingesetzt. Mittels TXRF konnten alle biologisch interessierenden Elemente mit einer Ordnungszahl zwischen 15 und 56 quantifiziert werden [208,209]. Die Elementgehalte von Na und Mg wurden mittels induktiv gekoppelter Plasma-Atomemissionsspektrometrie (AE-Spektrometer Plasma 40 der Fa. Perkin-Elmer, Überlingen) nach dem oxidativen Hochdruckaufschluss in den Gewebeproben 61-79 und in zertifizierten Referenzmaterialien (siehe Kapitel 4) über eine Standardkalibrierung ermittelt. Zur Quantifizierung von As und Se in den Gewebeaufschlüssen kam zusätzlich die elektrolytische Hydrid-Atomabsorptionsspektrometrie zum Einsatz [212,213]. Als Referenzmethode wurde die Graphitofen-Atomabsorptionsspektrometrie (GF-AAS) genutzt. Die analytische Verfahrensweise ist den entsprechenden

Literaturstellen zu entnehmen [214-218]. Die Elemente Mn, Fe, Cu, Zn und Se wurden sowohl in zertifizierten Referenzmaterialien (siehe Kapitel 4) als auch in 10% der Gewebeproben mit Hilfe des simultan-messenden Atomabsorptionsspektrometers SIMAA 6000 mit Zeeman-Untergrundkompensation und automatischem Probengeber bestimmt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Additionsverfahren.

Zur Charakterisierung der Elementspezies mit Priorität auf die Nickelspeziesanalyse wurden Online Kopplungen von Kapillarelektrophorese (CE) und Größenausschlusschromatographie (SEC) mit der induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometrie eingesetzt.

#### *3.4.1 Bestimmung der Elementgehalte in Humangeweben mit Totalreflexionsröntgenfluoreszenzspektrometrie und Hydrid-Atomabsorptionsspektrometrie*

Die totalreflexionsröntgenfluoreszenzspektrometrischen Bestimmungen der Elementgehalte in den Gewebeproben 3-79 und in den Cytosolen und Pellets der Proben 1c-5c wurden mit dem TXRF-Spektrometer EXTRA II der Fa. Richard Seifert & Co, Ahrensburg, durchgeführt [208,209]. Die Feinfokus-Röntgenröhren (Mo und W) wurden bei 48 kV (Mo) unter Einsatz eines 150  $\mu\text{m}$  Mo-Filters bzw. 50 kV (W) unter Einsatz eines 100  $\mu\text{m}$  Ni-Filters betrieben. Der Strom wurde so justiert, dass die resultierende Zählrate von 10.000 counts/s (das entspricht einer Totzeit von 45 %) nicht überschritten wurde. Die absolute Messzeit betrug 300 s. Die resultierende Fluoreszenzstrahlung wurde energiedispersiv mit einem Si(Li)-Detektor (Detektoroberfläche 30  $\text{mm}^2$ ) aufgenommen. Die spektrale Auflösung für die Fe- $K_{\alpha}$  Linie betrug 152 eV. Detektor, Vielkanalanalysator und Software (QX 2000, System 860/500) wurden von der Fa. Link Systems bezogen.

Die Cytosolproben 1c-15c wurden mit dem TXRF Spektrometer 8030C der Fa. Atomika, München, Primärstrahlung Mo- $K_{\alpha}$ , Filter  $\text{Zr}_2\text{O}$ , mit einer Systemauflösung von 107 eV, einer Zählrate zwischen 12.000 und 15.000 counts/s bei einer Totzeit von 35-45%, und einer absoluten Messzeit von 500 s analysiert. Es wurden 6 Wiederholmessungen durchgeführt.

Die Elemente As und Se in den aufgeschlossenen Gewebeproben wurden durch elektrolytische Hydridgenerierung und anschließender atomabsorptionsspektrometrischer Detektion über die Standardkalibrierung quantifiziert. Aufgrund der erheblichen

Analysendauer wurden neben der Analyse zertifizierter Referenzmaterialien (siehe Kapitel 4) nur stichprobenartig die Ergebnisse der TXRF-Messungen überprüft. Die optimierten Bedingungen der elektrolytischen Hydridgenerierung sind in den entsprechenden Publikationen aufgeführt [212,213]. Zur As-Bestimmung wurde eine Hg-Ag-Kathode und zur Se-Bestimmung eine Glaskohlenstoff-Kathode eingesetzt. Die entstandenen Hydride wurden in ein elektrisch beheiztes Quarzrohr (T-Typ) überführt und atomisiert. Die Absorption wurde mit dem SpectraAA 10 Plus Spektrometer der Fa. Varian, Darmstadt, ausgestattet mit dem Temperaturkontroller ETC 50, ermittelt.

#### *3.4.2 Photometrische Bestimmung der Gesamtproteingehalte und Enzymaktivitäten in Cytosolen*

Der Gesamtproteingehalt der Cytosolproben 1c-5c wurde photometrisch (CADAS 100, Dr. Lange, Düsseldorf) bei einer Wellenlänge von 660 nm nach der Biuret-Lowry-Methode (Testkit zur Gesamtproteinbestimmung der Fa. Sigma Aldrich, München) bestimmt [219, 220]. Eine definierte Menge jeder Cytosolprobe (10-20 µL) wurde mit Tris-HNO<sub>3</sub>-Puffer auf ein Volumen von 200 µL aufgefüllt und mit 2,2 mL Biuret-Reagenz (0,75 mmol/L Kupfersulfat und 94 mmol/L Natriumchlorid) vermischt. Die Inkubationszeit betrug 10 min. Im Anschluss wurde dem Gemisch 0,1 mL des Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenzes (Phosphatmolybdat-Phosphatwolframat) zugesetzt. Eine Einwirkzeit von 30 min wurde exakt eingehalten. Die im ersten Schritt gebildeten Kupfer-Protein-Komplexe reduzieren das Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz, wodurch eine intensive Blaufärbung der Lösung resultiert. Der Gesamtproteingehalt wurde jeweils dreimal in jedem Cytosol (n = 2) bestimmt, so dass sich eine Anzahl von 6 Wiederholmessungen ergab. Die Quantifizierung erfolgte sowohl über eine Standardkalibrierung mit einem Proteinstandard in unterschiedlichen Konzentrationen unter Zugabe des Tris-HNO<sub>3</sub>-Puffers als auch über das Additionsverfahren.

Zusätzlich wurden in den Cytosolproben 1c-5c die Aktivitäten der Glutathionperoxidase (Gpx) und der Superoxiddismutase (SOD) bestimmt. Die Bestimmung der Gpx-Aktivität erfolgte auf Basis von enzymkinetischen Messungen nach [221]. Dazu wurde das Ransel Kit der Fa. Randox, Krefeld eingesetzt. Das Prinzip der enzymkinetischen Messungen ist relativ einfach: Gpx katalysiert die Oxidation von Glutathion (GSH) durch Cumol-Hydroperoxid (ROOH). In Anwesenheit von Glutathion-Reduk-

tase (GR) und Nikotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH) wird das oxidierte Glutathion (GSSG) wieder in die reduzierte Form überführt, wobei NADPH zu  $\text{NADP}^+$  oxidiert wird. Die Abnahme der Absorption wurde photometrisch bei  $\lambda = 350 \text{ nm}$  bestimmt. Die Messlösungen wurden bei konstanter Temperatur von  $37^\circ \text{ C}$  und konstantem pH von 7,0 wie folgt angesetzt: 50  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Cytosols wurden mit 1 mL Verdünnungsmittel und nach 5 min mit 1 mL Drabkin's Reagenz-Lösung (Kaliumhexacyanoferrat (III), Kaliumcyanid) - zur Unterdrückung der pseudooxidativen Wirkung des Hämoglobins und anderer Peroxidasen – versetzt [222]. Zu einem Aliquot von 20  $\mu\text{L}$  dieser Mischung wurden 1000  $\mu\text{L}$  eines Reagenzes aus 4 mmol/L GSH, 0,5 U/L GR und 0,34 mmol/L NADPH und 40  $\mu\text{L}$  Cumol-Hydroperoxidlösung zugegeben. Die Absorptionen wurden nach 1 min und erneut nach einer weiteren min ermittelt. Üblicherweise wird die Aktivität in U/mL angegeben, wobei 1 U der Gpx-Aktivität in mmol pro min entspricht. Der Reagenzienleerwert wurde ebenfalls ermittelt und von den berechneten Gpx-Aktivitäten der Cytosol-Puffergemische subtrahiert. Alle Gpx-Aktivitätsbestimmungen wurden 3 mal je Cytosol ( $n = 2$ ) wiederholt, so dass sich eine Anzahl von 6 Wiederholmessungen ergab.

Zur Bestimmung der SOD-Aktivität wurde eine modifizierte Methode nach L'Abbé und Fischer [223] - anstelle von Cytochrom C wird 2-(4-Iodophenyl)-3-(4-Nitrophenol)-5-Phenyltetrazolium-chlorid (INT) als Redoxsystem eingesetzt - in Form des Ransod Kits der Fa. Randox, Krefeld, verwendet. Dabei wird die katalytische Wirkung der SOD bei der Umwandlung freier radikalischer Verbindungen, wie z.B. die bei oxidativen Energieprozessen im Organismus gebildeten Superoxidanionen, in  $\text{H}_2\text{O}_2$  und  $\text{O}_2$  genutzt. Zur Erzeugung von Superoxidanionen wird Xanthin und Xanthin-Oxidase (XOD) verwendet, wobei die Superoxidanionen mit INT zu einem roten Formazan-Farbstoff abreagieren. Die Absorption dieses Farbstoffs wird bei  $\lambda = 505 \text{ nm}$  photometrisch bestimmt. Je 50  $\mu\text{L}$  der Cytosolproben wurden mit 1,7 mL des Substrates (0,05 mmol/L Xanthin, 0,025 mmol/L INT) und 0,25 mL Xanthin-Oxidase (Aktivität: 80 U/L) versetzt. Die erste Absorption wurde nach 30 s und die zweite nach 180 s ermittelt. Es wird die Inhibierung der Reaktion in % berechnet. Die Aktivitätsmessungen der Cytosolproben ( $n = 2$ ) wurden 3 mal wiederholt, so dass sich eine Anzahl von 6 Wiederholmessungen ergab. Die SOD-Aktivitäten in den Cytosolen wurden mit Hilfe der ermittelten Kalibrierfunktion aus Messungen von 4 Standardlösungen bekannter Aktivität berechnet.

### 3.4.3 Online Kopplungstechniken zur Bestimmung der Elementspezies in Cytosolen

Beide nachfolgend beschriebenen Online Kopplungstechniken wurden auf die Nickelspeziesanalyse im Cytosol von neoplastischen und normalen Geweben optimiert. Nähere Beschreibungen dieser Kopplungen sind in Publikationen zu finden [198,224-228]. Für die elementspezifische Detektion hat sich der Einsatz eines Sektorfeld-Massenspektrometers aufgrund seiner Nachweisstärke bewährt. Daher wurde das induktiv gekoppelte Plasma Sektorfeld Massenspektrometer der Fa. Thermo-Finnigan, Bremen, ausgestattet mit einem „Shield Torch System“ zur Bündelung des Ionenstrahls und Platinkonen zur Minimierung der Ni-Kontaminationen, eingesetzt. Während aufgrund unterschiedlicher Flussraten bei der CE/ICP-MS Kopplung ein Interface benötigt wird, kann die SEC-Einheit direkt mit einem ICP-Massenspektrometer nach vorangegangener Zerstäubung (Meinhard Zerstäuber der Fa. Spetec GmbH, Erdingen, mit einer Zerstäuberleistung von 2,7 mL/min) gekoppelt werden. Für die CE/ICP-MS Kopplung wurde das von der Fa. Cetac Technologies, Omaha, USA vertriebene Interface mit der Bezeichnung CEI 100 verwendet [225].

#### 3.4.3.1 Die SEC/ICP-MS Kopplung

Die SEC-Trennungen der Cytosol-Puffergemische erfolgte mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographen der Fa. Waters, Eschborn unter Einsatz der SEC Säule Hi Load 16/60 Superdex 75 der Fa. Pharmacia Biotech, Freiburg mit einem angegebenen Trennbereich von 3 bis 70 kDa. Als mobile Phase wurde ein 20 mol/L konzentrierter Tris-HNO<sub>3</sub>-Puffer mit einem pH-Wert von 7,4 bei einer Flussrate von 2,0 mL/min verwendet. Die Probenaufgabe erfolgte über eine Probenschleife mit einem Volumen von 500 µL und über ein Vorfiltersystem auf die Säule. Da durch Vorversuche gezeigt werden konnte, dass die detektierten Nickelspezies sowohl temperatur- als auch oxidationsunempfindlich sind, wurde eine Säulentemperatur von 20°C gewählt und auf die Zugabe von Dithiothreitol zu den Cytosolproben 6c-15c verzichtet. Die SEC-Fraktionen wurden über eine Teflon-Kapillare und vorgeschaltetem Split zur Reduktion der Flussrate (von 2,0 mL/min auf 0,4 mL/min) in den Meinhard Zerstäuber überführt. Der Zerstäubergasfluss betrug 1,0 L/min. Die Zerstäuberkammer wurde auf 4°C gekühlt. Die Messparameter für die ICP-MS Messungen wurden wie folgt gewählt: RF-Leistung 1075 W, Plasmagasfluss 15 L/min, Hilfsgasfluss 0,9 L/min, Dauer eines Massenscans 8,4 s bei einer Massenauflösung von 300.



Um Anhaltspunkte bezüglich der molaren Massen der detektierten Nickelspezies zu bekommen, wurde eine Massenkalisierung mit Hilfe von 9 Einzelproteinstandards (Albumin Rinderserum, Albumin vom Ei und Cyanocobalamin, Fa. Acros Organica; Blue Dextran, Transferrin,  $\alpha$ -Chymotrypsinogen A, Myoglobin, Aprotinin, Arsenobetain, Fa. Sigma) unter Einsatz eines UV-Detektors, Typ 1100 der Fa. Agilent Waldbronn, durchgeführt. Die Trennbedingungen entsprachen den oben angeführten, die Detektion erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm.

#### 3.4.3.2 Die CE/ICP-MS Kopplung

Zur elektrophoretischen Trennung der Elementspezies in den Cytosolen wurde die Kapillarelektrophorese 3 D CE der Fa. Agilent, Waldbronn, eingesetzt. Die Konditionierung der Quarzkapillare (Länge 70 cm, Innendurchmesser 75  $\mu\text{m}$ , Außendurchmesser 360  $\mu\text{m}$ ) erfolgte mittels 0,1 mol/L konzentrierter KOH-Lösung über 5 min, anschließend Spülen mit Reinstwasser über einen Zeitraum von 3 min und Spülen mit 20 mmol/L Tris- $\text{HNO}_3$ -Puffer über 5 min. Als optimierte Säulentemperatur wurde 15°C ermittelt, die angelegte Spannung betrug 30 kV. Die Probenaufgabe erfolgte hydrodynamisch (Druck 20 mbar·s), was einem Probenaufgabevolumen von 2,2 nL entspricht. Alle Optimierungen der kapillarelektrophoretischen Parameter wurden unter Verwendung eines Proteinstandardgemisches (Cd-beladenes Metallothionein, Isoform I und II, MG 7-9 kDa der Fa. Sigma Aldrich) durchgeführt. Das Probenaufgabevolumen der Cytosol-Puffergemische wurde aufgrund der geringen Gehalte der Nickelspezies auf 43,4 nL erhöht. Zur Normierung der Signalintensitäten wurde der Make-up Lösung (10 mmol/L Ammoniumnitratpuffer pH 7,4) eine 5  $\mu\text{g/L}$  konzentrierte Germaniumstandardlösung zugesetzt. Die Flussrate betrug 8,5  $\mu\text{L/min}$ . Die Messbedingungen für die ICP-MS Messungen wurden wie in Kap. 3.4.3.1 angegeben gewählt. Die Dauer eines Massenscans wurde auf 800 ms reduziert.

### 3.5 Datenanalyse

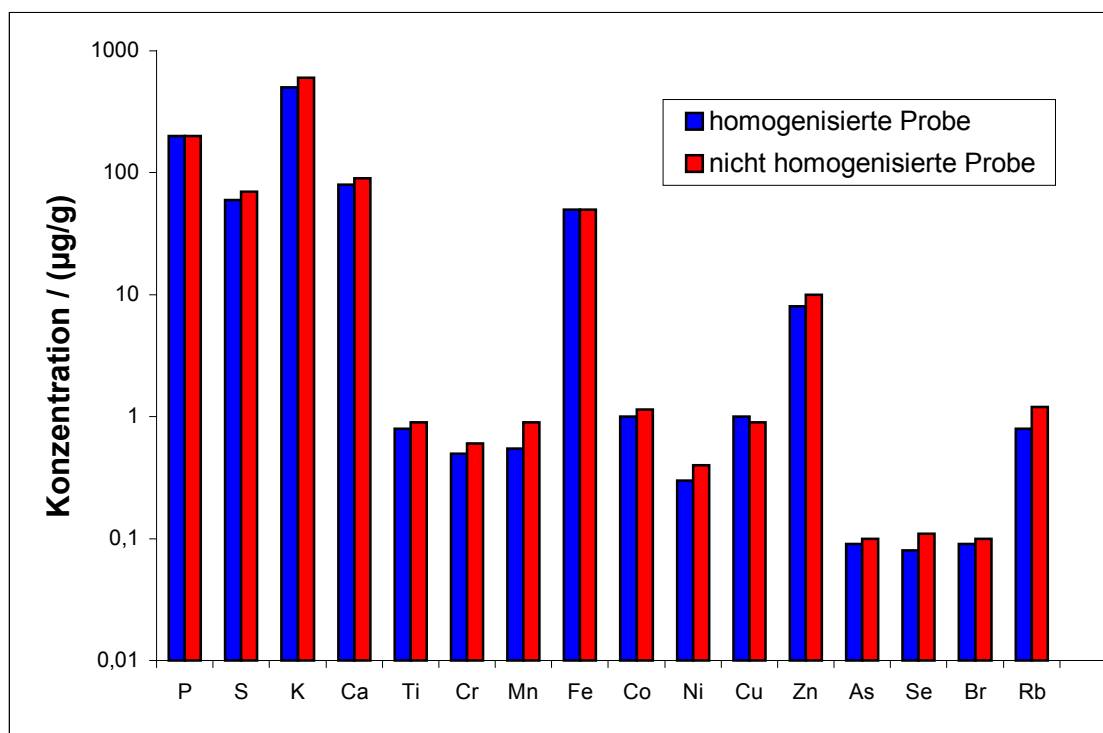
Alle Messdaten und Analysenprotokolle wurden in MS-Access 97 archiviert und zunächst mit dem Tabellenkalkulationsprogramm EXCEL® der Fa. Microsoft weiterverarbeitet. Die aus den Spektren errechneten Messwerte wurden mittels Q-Ausreißertest nach Dixon überprüft und gegebenenfalls aus dem Datensatz entfernt

(Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$ ) [229]. Zur Prüfung der Normalverteilung der Messwerte wurde der Kolmogoroff-Smirnov-Test für kleine Stichprobenumfänge angewandt (Signifikanzniveau  $\alpha = 0.05$ ) [230,231]. Signifikant abweichend verteilte Messwerte wurden logarithmiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen aus den Spektren berechneten Elementgehalte wurden für jede Gewebeprobe aus diesen Einzelwerten errechnet. Zum Vergleich der jeweiligen Mittelwerte wurde der erweiterte t-Test und der F-Test zur Überprüfung signifikanter Varianzen angewendet [229-231]. Für beide Tests wurde das Signifikanzniveau mit  $p = 0,05$  festgelegt. Zur multivariaten Datenanalyse wurde das Programm Statgraphics Plus (Manugistics Inc., Rockville, USA) eingesetzt. Zwecks Mustererkennung und Klassifizierung der malignen und normalen Gewebeproben wurde die Clusteranalyse nach der Wards-Methode, die Hauptkomponentenanalyse (PCA) und die Diskriminanzanalyse durchgeführt [232-235]. Für die Clusteranalyse wurden die Mittelwerte der Elementgehalte der einzelnen Gewebeproben und die p-Werte des t-Tests als Datenmatrizen verwendet. Bei der Hauptkomponentenanalyse wurden die Hauptkomponenten aus den Mittelwerten der Elementgehalte in den einzelnen Geweben nach dem Eigenwert-eins-Kriterium ermittelt. Bei der anschließenden Regressionsanalyse wurden in die Datenmatrizes auch die persönlichen Patientendaten und die pathologischen Befunde miteinbezogen [236,237]. Die linearen und nichtlinearen multivariaten Regressionen wurden mit dem Programm MS-EXCEL 97 der Fa. Microsoft durchgeführt. Die Faktoren wurden iterativ über den Solver (Zusatzprogramm Addin) errechnet.

## **4 Methodenentwicklung, Qualitätskontrolle und -sicherung**

### **4.1 Probenrepräsentanz**

Die Genauigkeit einer Bestimmung hängt nicht nur von der Wahl eines geeigneten Analysenverfahrens ab, sondern auch von der Richtigkeit der analytischen Daten. Die Richtigkeit der analytischen Daten wird zu einem hohen Anteil von der Qualität der Probennahme geprägt. Da es sich bei Humangewebe um äußerst inhomogenes Probenmaterial handelt, muss die Gewebeprobe repräsentativ für das gesamte Gewebe sein. Um diesem Anspruch zu genügen, wurde bei der Probennahme darauf geachtet, dass Teilresektate sowohl aus dem Tumorgewebe als auch aus dem gesunden Gewebe nach vorgeschriebenen Kriterien gewonnen wurden (siehe dazu Kapitel 3.2). Um die Probenrepräsentanz zu überprüfen, wurden in einem Vorversuch Gewebeproben ( $N = 4$ ) mit großen Probenvolumina drei verschiedenen Probenvorbereitungsmethoden unterzogen: a. Homogenisierung des Gewebes mit anschließendem oxidativen Hochdruckaufschluss, b. oxidativer Hochdruckaufschluss von Gewebeproben mit einem Feuchtgewicht von 250 – 400 mg ohne Homogenisierung, c. Anfertigung eines Gefrierschnittes definierten Volumens. Die Gewebeproben wurden wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben vorbehandelt, und die Mineral- und Spurenelementgehalte wurden wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben ermittelt. Es zeigte sich, dass die Elementgehalte in den Gewebeproben mit und ohne Homogenisierung des Gewebematerials im wesentlichen übereinstimmten. Die Inhomogenität des Probenmaterials wirkte sich weniger auf die Elementgehalte aus, sondern vielmehr auf die Standardabweichungen der Einzelmessungen bzw. der Mittelwerte der Einzelmessungen (siehe Abbildung 4-1). Die Variationskoeffizienten lagen bei den ermittelten Elementgehalten nach Homogenisierung zwischen 3 und 10% je nach analysiertem Element, während sie ohne Homogenisierung des Gewebematerials bei 10 – 25 % lagen. Da eine ausreichend hohe Anzahl an Wiederholmessungen ( $n = 9$ ) durchgeführt wurde, konnte im weiteren Verlauf der Untersuchungen auf eine Homogenisierung des Probenmaterials verzichtet werden. Gleichzeitig konnte die Probenrepräsentanz, soweit dies bei biologischen Proben möglich ist, gezeigt werden.



**Abb. 4-1** Ergebnisse der Bestimmung von Elementgehalten in Abhängigkeit von der Probenpräparation

Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei der Bestimmung der Elementgehalte in Gefrierschnitten mit denen, die nach oxidativem Hochdruckaufschluss ermittelt wurden, ist nicht möglich. Hier zeigt sich die Inhomogenität des Probenmaterials ganz deutlich. Die Variationskoeffizienten der Einzelmessungen liegen zwischen 10 – 50% je nach analysiertem Element. Da bei der Auswertung die ermittelten Elementmuster der gesunden Gewebe im Vergleich zu den tumorösen Geweben im Vordergrund standen, konnte eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse über die Berechnung von Elementverhältnissen malignes / normales Gewebe erreicht werden.

## 4.2 Methodenentwicklung und –validierung

### 4.2.1 Methodenentwicklung und -validierung bei der Bestimmung von Elementgehalten in malignen und gesunden Humangeweben mittels TXRF

Die Beurteilung der Messwerte von Proben mit sehr geringen Gehalten bestimmter Elemente, wie es bei Gewebeproben der Fall ist, ist relativ problematisch, da die Präzision bei niedrigen Konzentrationen gering ist. Die Bestimmung der Nachweis-Erfassungs- und Bestimmungsgrenze erfolgt bei TXRF-Messungen mittels Standardlösungen definierter Konzentration, wobei je nach Lage der Elemente im TXRF-Spektrum, die Standardlösungen aus mehreren Elementen zusammengesetzt waren. Alle ermittelten *Nachweisgrenzen* lagen in dem für die TXRF üblichen Bereich (für die meisten interessierenden Elemente  $< 5$  pg). Wird eine reale Probe analysiert, so wird jedes Element, das unterhalb der Nachweisgrenze liegt, im Spektrenprotokoll sichtbar gekennzeichnet. Zusätzlich wird für alle Elemente der Variationskoeffizient für die jeweilige Messung angegeben, so dass bei erhöhtem Variationskoeffizient auf eine Messung nahe der Nachweisgrenze oder auf methodische Fehler rückgeschlossen werden konnte. Die *instrumentelle Wiederholbarkeit* lag für die meisten bestimmten Elemente unterhalb von 3 % RSA.

Um die Richtigkeit und die Präzision der durch die entwickelte Methode erhaltenen Ergebnisse zu ermitteln, wurden die Elementgehalte von Mn, Fe, Cu, Zn, Se in fünf verschiedenen *zertifizierten Referenzproben* (Rindermuskel BCR 184, Rinderleber BCR 185, Schweineiere BCR 186, Schweineleber GBW 08551 und Rinderleber SRM 1577b, bezogen über die Fa. Promochem, Wesel) bestimmt und mit den zertifizierten Werten verglichen. Für das Referenzmaterial GBW 08551 waren ebenfalls die Gehalte von K und Ca und für das Referenzmaterial SRM 1577b die Gehalte von P, S, K, Ca, Rb und Sr angegeben. Die Wiederfindungsraten lagen für die Elemente Mn, Fe, Cu, Zn zwischen 96 und 105 %, für die leichteren Elemente P, S, K und Ca zwischen 80 und 90 % und für Se bei 72 und 75 %. Obwohl die gemessenen Gehalte von P, S, K und Ca prinzipiell 15 - 20 % und von Se 25 % unter den zertifizierten Werten lagen, sind sie trotzdem für die nachfolgenden Auswertungen von Interesse, da der Vergleich von Messreihen (Tumorgewebe / Normalgewebe) im Vordergrund steht. Gleiche Ergebnisse ergaben sich bei der Bestimmung der Präzision, berechnet als absolute Standardabweichung bzw. als Variationskoeffizient. Für die Bestimmung

der Elementgehalte von Fe, Mn, Cu, Zn und Se konnten ähnliche Standardabweichungen ermittelt werden wie sie für die zertifizierten Referenzmaterialien angegeben sind (Variationskoeffizienten 2 - 5 %), während die Variationskoeffizienten für P, S, K und Ca bei 15 % lagen. Die Berechnung der Messunsicherheiten erfolgte auf der Grundlage der Varianzen bei 9 Wiederholungsmessungen der eigentlichen Messgröße (Elementgehalt). Sie wurde für die Bestimmung der meisten interessierenden Elemente mit  $\leq 10\%$  berechnet. Des weiteren wurde die analytische Qualität der TXRF-Messungen durch Vergleichsmessungen mittels GFAAS gesichert (*Methodenvergleich*).

#### *4.2.2 Methodenentwicklung und -validierung bei der Bestimmung der Elementgehalte, des Gesamtproteingehaltes und der Enzymaktivitäten in Cytosolen*

Die Kenngrößen, Nachweis-, Bestimmungs- und Erfassungsgrenze sowie die instrumentelle Wiederholbarkeit bei der Bestimmung der Elementgehalte in den Cytosolen entsprechen denen, die bei der Bestimmung der Elementgehalte in den Gewebeproben ermittelt wurden, und können dem vorangegangenen Kapitel entnommen werden. Die Richtigkeit der durch die entwickelte Methode erzielten Ergebnisse konnte nicht über die Verwendung von zertifizierten Referenzproben ermittelt werden, da Cytosole mit zertifizierten Elementgehalten nicht kommerziell erhältlich sind. Da die Richtigkeit und Präzision in erheblichem Umfang von der Probenpräparation, d.h. von der Cytosolherstellung abhängt, wurde eine Massenbilanzierung durchgeführt, indem die Elementgehalte sowohl im Gesamtgewebe als auch im Cytosol und im verbleibenden Feststoffrückstand (Pellet) bestimmt wurden. Die Wiederfindungsraten lagen im Mittel für das Element Kalium bei 85 %, für die Elemente P, Ca und Fe bei 105 %, für die Elemente Sr, Se und Rb bei 110 % und für die Elemente Mn, Ni, Cu und Zn bei 125 %. Die erhöhten Wiederfindungsraten für die Elemente Mn, Ni, Cu und Zn sind zum einen auf mögliche Kontaminationen während der Probenpräparation aber auch auf die Messungen der Elemente nahe der Bestimmungsgrenze zurückzuführen. Die niedrige Wiederfindungsrate von Kalium ist insofern erklärlich, als dass K nicht in gebundener Form vorliegt, und durch Spülen des Pellets mit dem Tris-HNO<sub>3</sub>-Puffer leicht ausgewaschen werden konnte. Die relativen Standardabweichungen der Einzelmessungen konnten bei 9 Wiederholungsmessungen mit  $< 10\%$

ermittelt werden, unabhängig ob es sich um die Bestimmung der Elementgehalte im Pellet oder im Cytosol handelte. Zur weiteren Validierung der Methode wurden Vergleichsanalysen der Cytosole der Proben 1c-5c im Forschungszentrum Geesthacht (siehe Kapitel 3.3.2) durchgeführt. Die Messergebnisse stimmten unabhängig vom bestimmten Element überein (Abweichung < 10 %).

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes in den Cytosolproben wurde eine Standardkalibrierung mit Proteinstandardlösungen durchgeführt. Die Anzahl der Wiederholmessungen wurde mit  $n = 5$  festgesetzt. Der Variationskoeffizient konnte mit maximal 1,8 % bei der kleinsten Proteinkonzentration ermittelt werden. Das Bestimmtheitsmaß der Kalibrierfunktion wurde mit  $R^2 = 0,997$  berechnet. Die Nachweisgrenze der Proteinbestimmungsmethode wurde aus 10 Blindwertmessungen mit 0,19 mg und die Erfassungsgrenze mit 0,36 mg Proteine pro mL Cytosol bestimmt. Die Bestimmungsgrenze wurde mit 0,57 mg Proteine pro mL Cytosol abgeschätzt. Vergleichsmessungen unter Anwendung des Additionsverfahrens mit Hilfe von Proteinstandardlösungen bekannter Konzentration führten zu den gleichen Ergebnissen wie bei Anwendung der Standardkalibrierung.

Eine Methodenvalidierung der Bestimmung der Glutathionperoxidaseaktivität konnte nicht durchgeführt werden, da die photometrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 350 nm statt bei 340 nm durchgeführt werden musste, so dass auch bei der Analyse eines Kontrollreagenzes mit bekannter Gpx-Aktivität kein Ergebnisvergleich möglich war.

Die Bestimmung der Superoxiddismutaseaktivität erfolgte ebenfalls über eine Standardkalibrierung mit Standardlösungen bekannter SOD-Aktivität. Es wurden jeweils 3 Wiederholmessungen durchgeführt. Der Variationskoeffizient, berechnet aus den Ergebnissen der Wiederholmessungen, lag zwischen 15 und 25 %. Das Bestimmtheitsmaß wurde mit  $R^2 = 0,990$  ermittelt. Zur weiteren Validierung der Methode wurde ein Kontrollreagenz (Rindervollblut) bekannter SOD-Aktivität ( $196 \pm 36$  U/mL) analysiert. Für das Kontrollreagenz konnte eine mittlere SOD-Aktivität von  $182 \pm 37,5$  U/mL ermittelt werden, was einer Wiederfindungsrate von 93% entspricht.

##### 4.2.3 Methodenentwicklung und -validierung zur Nickelspeziesanalyse in Cytosolen mittels CE/ICP-MS

Die Methodenentwicklung zur Nickelspeziesanalyse in Cytosolen mittels CE/ICP-MS erfolgte, wie bereits in Kapitel 3.4.3.2 erwähnt, mit Hilfe des kommerziell erhältlichen Cd-beladenen Metallothioneinstandardgemisches (Metallothionein I und II und deren Isoformen). Die relativen Standardabweichungen der Migrationszeiten für Metallothionein I und II und deren Isoformen konnten bei 10 Wiederholmessungen mit < 1% ermittelt werden (*instrumentelle Wiederholbarkeit*). Die Variationskoeffizienten bei der Flächenbestimmung der 4 Peaks im Elektroferrogramm lagen unter 5%. Da kein Nickelproteinstandard kommerziell erhältlich ist, wurde die Nachweisgrenze mit Hilfe von  $\text{Ni}^{2+}$ -Standardlösungen verschiedener Konzentration ermittelt. Die Berechnung der Nachweisgrenze erfolgte aus den Kalibrierkenndaten bei Varianzenhomogenität mit 3,7  $\mu\text{g/L}$ . Die Bestimmungsgrenze wurde mit 14,9  $\mu\text{g/L}$  abgeschätzt und die relative Verfahrensstandardabweichung konnte mit 2,4 % ermittelt werden.

Zur weiteren Validierung der Methode wurde ein Methodenvergleich auf Basis einer SEC-Trennung und ICP-massenspektrometrischer Detektion durchgeführt. Die Messbedingungen der SEC-Trennung wurden entsprechend den in der Literatur angegebenen, gewählt [238]. Es zeigte sich, dass eine Trennung der niedermolekularen Nickelspezies im Molmassenbereich von 4 bis 40 kDa sowohl mittels SEC- als auch mit CE-Trennung möglich ist. In den resultierenden SE-Chromatogrammen wurden im Bereich von 4 bis 15 kDa fünf Nickelspezies gefunden, wobei die Peakflächen von zwei Peaks sehr klein waren. In den Elektroferrogrammen wurden drei Nickelspezies gefunden, wobei es sich um die gleichen Nickelspezies handelt, wie sie bei der SEC-Trennung gefunden wurden. Eine Zuordnung der Nickelspezies in den Elektroferrogrammen und den Chromatogrammen war durch eine im Cytosol enthaltene Cu-Spezies möglich. Die Migrationszeit bzw. die Retentionszeit der Cu-Spezies im Peakmaximum war identisch mit der Migrationszeit bzw. Retentionszeit im Peakmaximum der Nickelspezies mit einer molaren Masse von 6 kDa. Für weitere Messungen konnte die Cu-Spezies als innerer Standard genutzt werden. Die unterschiedliche Anzahl der gefundenen Nickelspezies wird darauf zurückgeführt, dass zwei der fünf Nickelspezies bei der CE/ICP-MS Kopplung unter der Nachweisgrenze liegen. Dies ist aufgrund der unterschiedlichen Aufgabevolumina – bei der SEC 500  $\mu\text{L}$  und bei der CE 43 nL – erklärlich.



### 4.3 Qualitätskontrolle und –sicherung

#### 4.3.1 Qualitätskontrolle und -sicherung bei der Bestimmung von Elementgehalten in malignen und normalen Humangeweben mittels TXRF

Es wurde ein Konzept zur Fehlererkennung erarbeitet mit dessen Hilfe systematische Fehler sowohl bei der Bestimmung der Elementgehalte in Aufschlussproben als auch in Gefrierschnitten erkennbar waren. Fehler bei der Probenpräparation wurden durch Kontrolle des Rückstands auf dem Quarzglassträger nach Trocknen der Aufschlusslösung bzw. der Positionierung und der Qualität des Gewebeschnittes (unsymmetrischer Probenauftrag) minimiert. Der Aufschluss selbst wurde über die Bestimmung des Massenverlustes während des Aufschlusses (in Relation zur Masse des Feuchtgewebes) überwacht. Da bei fettreichen Proben der Massenverlust größer ist als bei fettarmen Proben, konnten fettreiche Proben sowohl visuell als auch experimentell und anschließend statistisch über die Häufigkeitsverteilung (*Normalverteilung*) ermittelt werden. Die Messdaten fetthaltiger Proben und Proben mit erhöhten Gewichtsverlusten wurden zur weiteren Auswertung nicht herangezogen. Gefrierschnitte fetthaltiger Proben ließen sich aufgrund ihrer eher weichen Konsistenz nicht anfertigen.

Die instrumentelle Überwachung erfolgte mit einer Fe-Standardlösung, die vor und nach jedem Messzyklus analysiert wurde (Überprüfung der Auflösung und der Lage der Fe-K $\alpha$ -Linie im Spektrum). Eine weitere Qualitätskontrolle bot der im Spektrenprotokoll aufgelistete Fit-Index. Bei niedrigem Fit-Index ist die Güte der Messung sehr gut, während bei erhöhtem Fit-Index auf eine Fehlmessung oder auf eine Messung nahe der Nachweisgrenze rückgeschlossen werden kann. Sowohl Fit-Indices als auch die Standardabweichungen der Einzelmessungen wurden streng kontrolliert. Weiterhin wurden stichprobenartig Aufschlusslösungen mittels GFAAS analysiert und Kontrolltests mittels zertifizierter Referenzproben durchgeführt.

Für alle Messdaten einer Messreihe (9 Wiederholmessungen pro Gewebeart) wurde die empirische Verteilungsfunktion ermittelt und mit der hypothetischen Verteilungsfunktion verglichen (Differenzbildung), um zu prüfen, ob die Messdaten normal verteilt waren. Messdaten, die nicht normal verteilt waren, wurden wie bereits in Kapitel 3.5 erwähnt, logarithmiert. In Tabelle 4-1 sind die gemittelten Variationskoeffizienten

bei der Bestimmung der Elementgehalte in allen Gewebeproben (N = 136, 68 normale und 68 maligne Gewebe) in Abhängigkeit von der Gewebeart, von dem bestimmten Element und von der Probenvorbereitung aufgelistet.

Tab. 4-1 Durchschnittliche Variationskoeffizienten bei der Bestimmung der Elementgehalte nach oxidativem Hochdruckaufschluss bzw. in Gefrierschnitten (N = 136)

	<i>Gewebeaufschlüsse</i> <i>Variationskoeffizient / %</i>		<i>Gefrierschnitte</i> <i>Variationskoeffizient / %</i>	
	<i>normales Gewebe / malignes Gewebe</i>		<i>normales Gewebe / malignes Gewebe</i>	
<b>P</b>	15,1	17,9	16,4	13,2
<b>S</b>	15,8	17,4	14,6	10,3
<b>Cl</b>	n.b.	n.b.	26,3	23,8
<b>K</b>	14,4	14,2	13,5	12,9
<b>Ca</b>	14,4	18,5	17,7	18,6
<b>Cr</b>	59,8	56,9	n.b.	n.b.
<b>Mn</b>	30,9	28,8	n.b.	n.b.
<b>Fe</b>	15,9	13,9	25,2	24,9
<b>Ni</b>	37,3	31,9	n.b.	n.b.
<b>Cu</b>	13,4	12,5	30,8	26,1
<b>Zn</b>	11,7	10,8	16,9	12,5
<b>Se</b>	27,5	28,0	n.b.	n.b.
<b>Br</b>	n.b.	n.b.	19,8	21,8
<b>Rb</b>	10,2	10,3	19,5	15,5
<b>Sr</b>	28,8	32,6	n.b.	n.b.

n.b. nicht bestimmt

Hohe Variationskoeffizienten bei der Bestimmung der Gehalte von Cr, Ni, Sr und Se sind in erster Linie darauf zurückzuführen, dass an der Bestimmungsgrenze gemessen wurde. Die Inhomogenität des Probenmaterials trägt zu erhöhten Variationskoeffizienten bei.

#### 4.3.2 Qualitätskontrolle und –sicherung bei der Bestimmung der Elementgehalte, des Gesamtproteingehaltes und der Enzymaktivitäten im Cytosol

Es wurden von jeder Gewebeprobe mindestens zwei Zellaufschlüsse angefertigt, die jeweils nach dem oxidativen Hochdruckaufschluss (Proben 1c-5c) oder direkt (Probe 6c-15c) mit Hilfe der TXRF analysiert wurden. Es wurden 3 Wiederholmessungen, d.h. pro Gewebeprobe insgesamt 6 Bestimmungen durchgeführt. In Tabelle 4-2 sind die gemittelten Variationskoeffizienten bei der Bestimmung der Elementgehalte in den Cytosolen in Abhängigkeit von der Gewebeart aufgeführt. Insgesamt wurden die Cytosole von 22 Gewebeproben (N = 22) untersucht.

Tab. 4-2 Durchschnittliche Variationskoeffizienten bei der Bestimmung der Elementgehalte in den Cytosolen von normalen und malignen Geweben (N = 22)

<i>Element</i>	<i>Variationskoeffizient / %</i>	
	<i>Cytosol normales Gewebe</i>	<i>Cytosol malignes Gewebe</i>
<b>P</b>	9,2	14,3
<b>S</b>	13,4	17,1
<b>K</b>	5,0	10,3
<b>Ca</b>	6,3	5,8
<b>Cr</b>	9,7	13,2
<b>Mn</b>	5,4	5,6
<b>Fe</b>	7,1	7,0
<b>Ni</b>	9,6	6,8
<b>Cu</b>	3,2	3,4
<b>Zn</b>	2,1	1,8
<b>Se</b>	4,3	5,2
<b>Rb</b>	1,4	4,1
<b>Sr</b>	5,7	7,3

Die photometrische Bestimmung der Proteingehalte in den Cytosolen der Proben 1c-5c wurde durch Einsatz einer Kontrollprobe (Proteinstandard mit bekannter Konzen-

tration) nach jeder zweiten Cytosolprobe überwacht. Der mittlere relative Variationskoeffizient wurde mit 5 % berechnet. Messungen, die einen Variationskoeffizienten > 10 % zeigten, wurden nicht in die Auswertung einbezogen, sondern die Messungen wurden erneut durchgeführt.

Zur Kontrolle der Gpx-Aktivitätsmessungen wurde ebenfalls nach jeder zweiten Cytosolprobe ein Kontrollenzym mit bekannter Aktivität analysiert. Die Variationskoeffizienten bei der Bestimmung der Gpx-Aktivitäten in den Cytosolen lagen zwischen 3 und 7 %, die Variationskoeffizienten bei der Bestimmung der SOD-Aktivitäten durchschnittlich bei 6,5 % mit einer maximalen relativen Standardabweichung von 9,6 %. Auch hier wurden die SOD-Aktivitäten eines Kontrollenzyms nach jeder zweiten Cytosolprobe bestimmt.

#### *4.3.3 Qualitätskontrolle und –sicherung bei der Nickelspeziesanalyse mittels CE/ICP-MS*

Während der CE/ICP-MS Messungen wurde permanent der Strom und die angelegte Spannung kontrolliert. Es kamen keine Messungen zur Auswertung, bei denen ein Stromabbruch oder Zerstäuberprobleme auftraten. Die Probenzerstäubung der CE-Fractionen wurde mit Hilfe einer Germaniumlösung bekannter Konzentration kontrolliert. Alle berechneten Peakflächen wurden auf die Intensität des Ge-Signals normiert. Da sich im weiteren Verlauf die Auswertung ausschließlich auf die Nickelspezies mit einer Molmasse von ca. 6 (Nickelspezies I) bzw. 9 kDa (Nickelspezies II) reduziert, wurde die Qualitätskontrolle und –sicherung auf diese beiden Spezies beschränkt. Es wurden je Cytosolaufschluss 3 Wiederholmessungen durchgeführt. Insgesamt wurden 22 Cytosole (N = 22) analysiert. Die durchschnittliche Migrationszeit für die Nickelspezies I, gemittelt über alle 132 erhaltenen Messwerte, wurde mit  $422 \pm 50$  s bestimmt. Der Variationskoeffizient betrug 12 %. Der Variationskoeffizient bei 6 Wiederholmessungen (Dreifachbestimmung von jeweils zwei Zellaufschlüssen einer Gewebeprobe) betrug maximal 2 %. Für die Nickelspezies II ergab sich eine mittlere Migrationszeit von  $439 \pm 75$  s mit einem Variationskoeffizienten von 17 %. Die relative Standardabweichung der Nickelspezies I und II lag zwischen 10 – 12 %. Da bei der Auswertung das Peakflächenverhältnis von Peak I zu Peak II von Inte-

resse war, wurde die Wiederholbarkeit bei der Verhältnisbildung überprüft. Der Variationskoeffizient wurde mit  $< 2 \%$  bestimmt.

#### *4.3.2 Qualitätskontrolle und –sicherung bei der Nickelspeziesanalyse mittels SEC/ICP-MS*

Da der Probenverbrauch bei der SEC/ICP-MS Kopplung relativ hoch ist (siehe Kapitel 4.2.3) war nur eine Dreifachbestimmung möglich. Der Variationskoeffizient bei Wiederholmessungen wurde für die Retentionszeit der 5 Nickelspezies mit jeweils  $< 1 \%$  bestimmt. Der Variationskoeffizient bei der Bestimmung der Peakflächen lag für Peak 1 bei  $20 - 25 \%$ , für Peak 2 bei  $30 - 40 \%$ , für Peak 3 bei  $50 - 55 \%$ , bei Peak 4 bei  $60 - 65 \%$  und für Peak 5 bei  $15 - 20 \%$ . Grund für die hohen Variationskoeffizienten ist der Einsatz eines Vorfilters in der SEC, der hauptsächlich höhermolekulare Bestandteile aus dem Cytosol herausfiltern sollte. Da in erster Linie Peak 3 (Nickelspezies I bei der CE-Trennung) und Peak 4 (Nickelspezies II bei der CE-Trennung) von Interesse waren, wurde das Peakflächenverhältnis dieser beiden Peaks bestimmt. Der Variationskoeffizient bei der Verhältnisbildung lag bei  $10 - 15 \%$ . Die mittleren Retentionszeiten über alle 22 Cytosole lagen für Peak 1 bei  $1408 \pm 50$  s, für Peak 2 bei  $1641 \pm 42$  s, für Peak 3 bei  $3025 \pm 75$  s, für Peak 4 bei  $3203 \pm 99$  s und für Peak 5 bei  $3478 \pm 71$  s. Der Variationskoeffizient lag zwischen  $2,0$  und  $3,5 \%$ .

## **5 Mengen- und Spurenelemente in normalen und malignen Humangeweben des Gastrointestinaltraktes**

### **5.1 Verteilung der Mengen- und Spurenelemente in normalen und malignen Gewebeproben [239,240]**

Das größte Problem bei der Bewertung von Elementverteilungen in Verbindung mit einer Erkrankung, in diesem Falle einer Krebserkrankung der gastrointestinalen Organe, ist die Festlegung von Referenzwerten\* bzw. Kontrollwerten, da die Elementgehalte großen Schwankungen unterliegen, die vom individuellen Status der Probanden abhängen [96,97,241-244]. Das Konzept der Referenzwerte beinhaltet eine Theorie für die Beurteilung von klinisch-chemischen Analysenergebnissen und beschreibt die Prinzipien und die Verfahrensweisen für die Auswahl der Referenzpopulation und die Gewinnung von Referenzwerten. Ein weiteres Problem ist, dass in Publikationen die Elementgehalte häufig in  $\mu\text{g/g}$  Trockenmasse des Gewebes angegeben sind, so dass eine Vergleichbarkeit mit Literaturdaten schwierig ist. Nur unter der Annahme, dass der Wassergehalt (Kolongewebe 77% [3]) keinen größeren Schwankungen unterliegt, ist eine Umrechnung möglich. Die Angabe von Literatur- bzw. Referenzwerten sollte allerdings in  $\mu\text{g/g}$  Feuchtmasse erfolgen um eine Vergleichbarkeit zu erreichen [96,97,241-244]. Zusätzlich sind nur wenige Daten bezüglich der Elementgehalte in Geweben des Gastrointestinaltraktes veröffentlicht, die meisten Daten stammen aus den siebziger und achtziger Jahren, in denen auch nur die Elementgehalte im Kolongewebe angegeben sind [109,116,245-247]. Die entsprechenden Literaturwerte (umgerechnet auf Feuchtmasse) sind den in dieser Arbeit ermittelten Elementgehalten in Tabelle 5-1 gegenübergestellt [116].

---

\* Literaturstelle Referenzwertkonzept: Recommendations on the Theory of Reference Values. Part 1. The concept of reference values. Clin. Chim. Acta **87** (1978), 459F-465F. Clin. Chem. **25** (1979), 1506-1508. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. **22** (1979), 337-339

Tab.5-1 Vergleich der ermittelten Elementgehalte mit Literaturwerten

<i>Element</i>	<i>Literaturwerte [116]</i>		<i>Ermittelte Werte</i>	
	<i>/ µg/g Feuchtmasse</i>		<i>/ µg/g Feuchtmasse</i>	
	<b>NG</b>	<b>TG</b>	<b>NG</b>	<b>TG</b>
<b>Ca</b>	<b>118</b>	<b>79</b>	<b>131</b>	<b>111</b>
<b>Cr</b>	<b>0,262</b>	<b>0,242</b>	<b>0,283</b>	<b>0,335</b>
<b>Mn</b>	<b>0,584</b>	<b>0,336</b>	<b>0,240</b>	<b>0,232</b>
<b>Fe</b>	<b>37,8</b>	<b>25,8</b>	<b>28,7</b>	<b>26,9</b>
<b>Ni</b>	<b>0,188</b>	<b>0,176</b>	<b>0,148</b>	<b>0,129</b>
<b>Cu</b>	<b>2,82</b>	<b>1,78</b>	<b>1,63</b>	<b>1,97</b>
<b>Zn</b>	<b>12,8</b>	<b>19,6</b>	<b>19,2</b>	<b>19,8</b>
<b>Se</b>	<b>0,306</b>	<b>0,252</b>	<b>0,115</b>	<b>0,167</b>
<b>Br</b>	<b>3,68</b>	<b>2,68</b>	<b>3,95*</b>	<b>3,41*</b>
<b>Rb</b>	<b>3,86</b>	<b>4,08</b>	<b>2,63</b>	<b>3,69</b>
<b>Sr</b>	<b>0,298</b>	<b>0,194</b>	<b>0,162</b>	<b>0,157</b>

\* Bromgehalt wurde über die Analyse von Gefrierschnitten ermittelt

Es ist festzustellen, dass die Literaturwerte für die Elementgehalte im Tumorgewebe sehr gut mit den ermittelten Referenzwerten übereinstimmen, während die Elementgehalte in den Normalgewebeproben nur im Fall von Ca, Cr und Nickel annähernd übereinstimmen. Da es sich bei den Literaturwerten um einen Datensatz von nur 15 Gewebeproben handelt, ist eine größere Abweichung in den Elementgehalten von Mn, Fe, Cu und Zn zu erklären, da die Schwankungen dieser Elementgehalte in den Gewebeproben von Proband zu Proband sehr groß sind.

In Tabelle 5-2 sind die gemittelten Elementgehalte und Gehaltsintervalle über alle Gewebeproben jeweils für die gesunden und die malignen Gewebe aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit bestimmt wurden.

Tab. 5-2 Mittelwerte und Intervalle der Elementgehalte in normalen und malignen Geweben des Gastrointestinaltraktes (N = 68); Aufschlussproben

<i>Element</i>	<i>Elementgehalt normales Gewebe</i>		<i>Elementgehalt malignes Gewebe</i>	
	<i>/ <math>\mu\text{g/g}</math> Feuchtmasse</i>		<i>/ <math>\mu\text{g/g}</math> Feuchtmasse</i>	
	Mittelwert	Intervall	Mittelwert	Intervall
<b>Na*</b>	<b>2317 <math>\pm</math> 313</b>	1322 – 3175	<b>2187 <math>\pm</math> 297</b>	978 - 2926
<b>Mg*</b>	<b>131 <math>\pm</math> 43</b>	56 – 187	<b>176 <math>\pm</math> 57</b>	97 - 247
<b>P</b>	<b>1143 <math>\pm</math> 364</b>	288 – 2083	<b>1873 <math>\pm</math> 635</b>	572 - 3327
<b>S</b>	<b>1307 <math>\pm</math> 372</b>	344 – 2388	<b>1499 <math>\pm</math> 382</b>	712 - 2306
<b>Cl</b>	<b>3008 <math>\pm</math> 684<sup>§</sup></b>	121 – 9684	<b>2322 <math>\pm</math> 478<sup>§</sup></b>	229 - 7803
<b>K</b>	<b>1699 <math>\pm</math> 491</b>	634 – 2963	<b>2355 <math>\pm</math> 723</b>	581 - 4328
<b>Ca</b>	<b>131 <math>\pm</math> 54</b>	27 – 287	<b>111 <math>\pm</math> 33</b>	50 - 196
<b>Cr</b>	<b>0,284 <math>\pm</math> 0,273</b>	0,038 – 1,576	<b>0,335 <math>\pm</math> 0,230</b>	0,072 – 0,893
<b>Mn</b>	<b>0,240 <math>\pm</math> 0,097</b>	0,073 – 0,498	<b>0,232 <math>\pm</math> 0,073</b>	0,107 – 0,451
<b>Fe</b>	<b>28,7 <math>\pm</math> 13,3</b>	6,9 – 68,7	<b>26,9 <math>\pm</math> 10,3</b>	10,0 – 52,8
<b>Ni</b>	<b>0,148 <math>\pm</math> 0,090</b>	0,003 – 0,393	<b>0,129 <math>\pm</math> 0,070</b>	0,009 – 0,315
<b>Cu</b>	<b>1,63 <math>\pm</math> 0,59</b>	0,75 – 3,36	<b>1,97 <math>\pm</math> 0,64</b>	0,75 – 3,95
<b>Zn</b>	<b>19,2 <math>\pm</math> 5,5</b>	4,4 – 32,3	<b>19,8 <math>\pm</math> 6,1</b>	6,9 – 36,8
<b>Se</b>	<b>0,115 <math>\pm</math> 0,032</b>	0,054 – 0,183	<b>0,167 <math>\pm</math> 0,061</b>	0,060 – 0,338
<b>Br</b>	<b>3,95 <math>\pm</math> 0,66<sup>§</sup></b>	0,59 - 8,18	<b>3,41 <math>\pm</math> 0,82<sup>§</sup></b>	1,11 – 6,31
<b>Rb</b>	<b>2,63 <math>\pm</math> 0,87</b>	1,01 – 4,70	<b>3,69 <math>\pm</math> 1,22</b>	1,12 – 6,36
<b>Sr</b>	<b>0,162 <math>\pm</math> 0,061</b>	0,035 – 0,308	<b>0,157 <math>\pm</math> 0,062</b>	0,043 – 0,317

\* Anzahl der untersuchten Gewebeproben (N = 19); § über die Analyse von Gefrierschnitten ermittelt

Um Unterschiede in der Verteilung der Mengen- und Spurenelemente in normalen im Vergleich zu malignen Geweben feststellen zu können, wurden zunächst die Ergebnisse der Elementgehaltsbestimmung jeder einzelnen Gewebeprobe paarweise betrachtet und signifikante Unterschiede mit Hilfe des erweiterten t-Testes nach vorangegangener Anwendung des F-Testes ermittelt. Dabei zeigten sich signifikante Unterschiede in den Elementgehalten von Magnesium, Phosphor, Kalium, Selen und Rubidium, wobei diese Elemente signifikant in den neoplastischen Geweben gegenüber den gesunden Geweben erhöht waren. Bei einem Signifikanzniveau von  $P <$



0,01 konnte in 73 bzw. 71% aller Fälle eine signifikante Erhöhung des Phosphorgehaltes bzw. des Magnesiumgehaltes in malignen Geweben festgestellt werden. In 5% der Fälle war ein signifikant niedrigerer P-Gehalt in den malignen Geweben zu verzeichnen. Sowohl für Kalium als auch für Rubidium konnte in 70% aller Fälle ein erhöhter Gehalt in malignem Gewebe bestimmt werden, in 5 % der Fälle waren die Gehalte beider Elemente im Tumorgewebe erniedrigt. Interessanterweise ist in 62% der Fälle Selen im Tumorgewebe angereicht und nur in einem Fall signifikant abgereichert. Für das Element Kupfer zeigt sich ein ähnliches Bild, in 60% der Fälle ist Kupfer vermehrt in malignem Gewebe, in 19% vermehrt im Normalgewebe vorzufinden. Die Elemente Strontium und Calcium zeigen in 40 bzw. 44% der Fälle einen signifikant niedrigeren Gehalt und in 3 bzw. 14% der Fälle einen signifikant höheren Gehalt im malignen Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe. Ein weiteres sehr interessantes Ergebnis zeigte sich bei dem Element Nickel, dessen Gehalt in 60% der Fälle im karzinösen Gewebe signifikant niedriger war als in gesundem Gewebe. Nur in 6% der Fälle konnte eine signifikante Anreicherung von Nickel im Tumorgewebe festgestellt werden. Das Element Zink zeigt keine erkennbaren Tendenzen, denn in 33% der Fälle zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Zinkgehalt bei Vergleich der beiden Gewebearten, in 35% der Fälle ist Zink vermehrt im malignen Gewebe vorzufinden und in 32% der Fälle ist der Zinkgehalt im Normalgewebe signifikant höher als im Tumorgewebe. Für die Elemente Mangan und Chrom konnte in 66 bzw. 60% der Fälle kein signifikanter Unterschied in den Gehalten im malignen im Vergleich zum gesunden Gewebe festgestellt werden, in 16 bzw. 7% der Fälle war Mangan bzw. Chrom signifikant im Tumorgewebe und in 18 bzw. 33% der Fälle signifikant im Normalgewebe erhöht. Bei Eisen zeigt sich ein ähnliches Bild wie bei Zink, in 33% der Fälle ist kein signifikanter Unterschied zu beobachten, in 40% der Fälle ist Fe im karzinösen Gewebe angereichert und in 27% der Fälle ist Fe im Normalgewebe höher. Bei Betrachtung der prozentualen Verteilung der Fälle auf Signifikanzen bei den Elementgehalten, die nach alternativer Probenvorbereitung (Gefrierschnitte) ermittelt wurden, konnten übereinstimmende Ergebnisse festgestellt werden. Daher seien hier lediglich die Ergebnisse der Bestimmung der Chlor- und Bromgehalte, die nach oxidativem Hochdruckaufschluss nicht bestimmt werden konnten, aufgeführt. Die Chlor- bzw. Bromgehalte in malignen im Vergleich zu normalen Geweben unterschieden sich in 41 bzw. 33% der Fälle nicht signifikant, in 35 bzw. 37% der Fälle

waren die beiden Elemente signifikant im neoplastischen Gewebe und in 24 bzw. 30% der Fälle im Normalgewebe erhöht.

Die Elementgehalte, die in den Gefrierschnitten ermittelt wurden, lagen generell höher als die, die nach einem oxidativen Hochdruckaufschluss bestimmt wurden. Hier zeigt sich die Matrixabhängigkeit der Methode, obwohl der Variationskoeffizient bei der Bestimmung der Elementgehalte unabhängig von der Probenvorbereitungsmethode ist (siehe Kapitel 4.3.1). Werden die Elementgehalte von Tumor- und Normalgewebe ins Verhältnis gesetzt, so sind die Ergebnisse ebenfalls unabhängig von der Probenvorbereitung.

Um eine weitere Differenzierung der Ergebnisse durchführen zu können, wurden signifikante Unterschiede in den Elementgehalten in Abhängigkeit von dem Organ des Verdauungstraktes mittels erweitertem t-Test berechnet. Die gemittelten, Organ und Gewebeart bezogenen Elementgehalte sind in den nachfolgenden Balkendiagrammen (Abbildungen 5-1 und 5-2) aufgeführt. Die Elementgehalte von Na und K wurden mittels ICP-OES, die Elementgehalte von Cl und Br in den Gefrierschnitten und die Gehalte der restlichen Elemente nach oxidativem Hochdruckaufschluss mittels TXRF ermittelt.

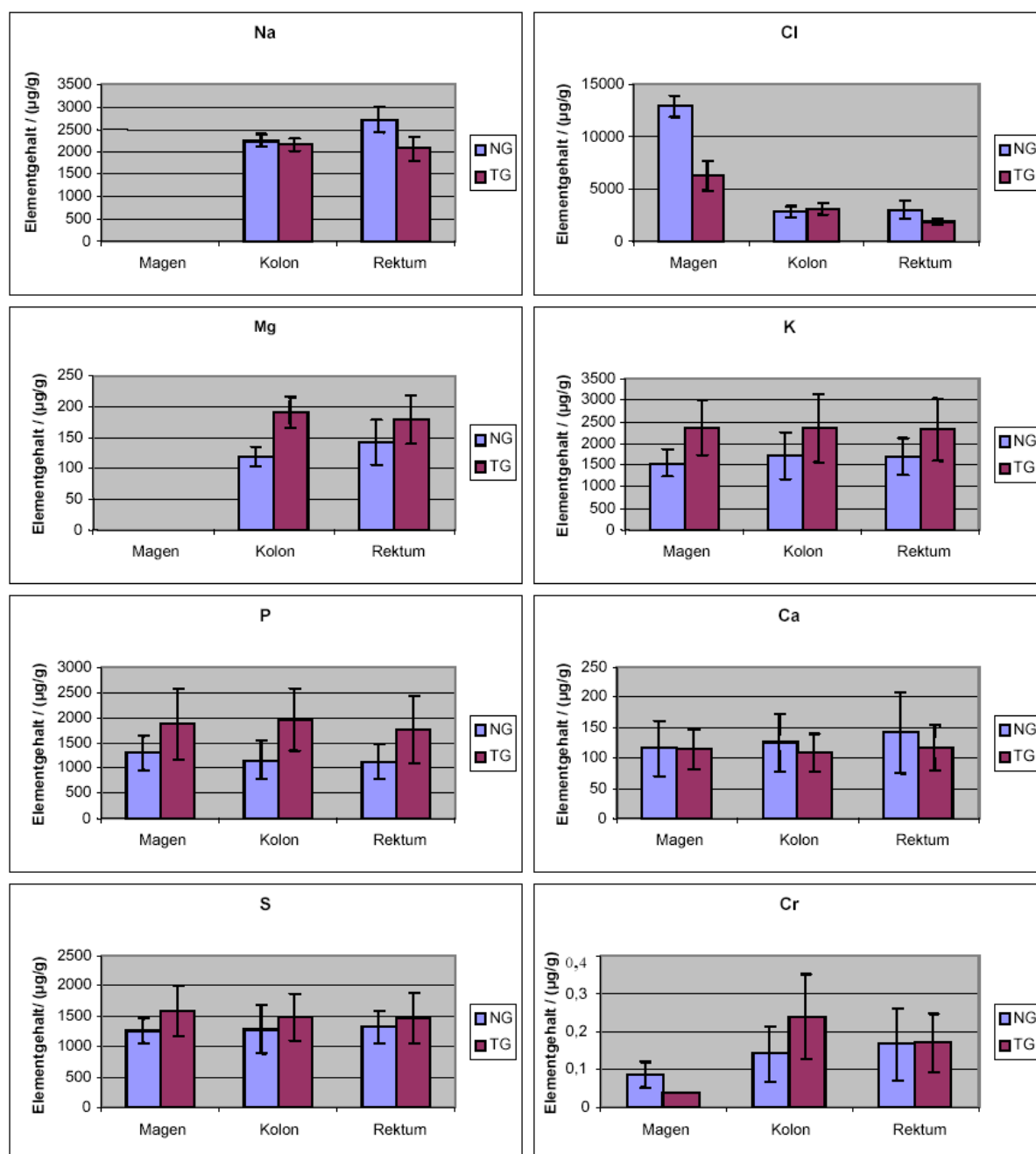


Abb. 5-1 Elementgehalte von Na, Mg, P, S, Cl, K, Ca und Cr in normalen und malignen Geweben des Gastrointestinaltraktes (Magen N = 6, Kolon N = 42, Rektum N = 20)

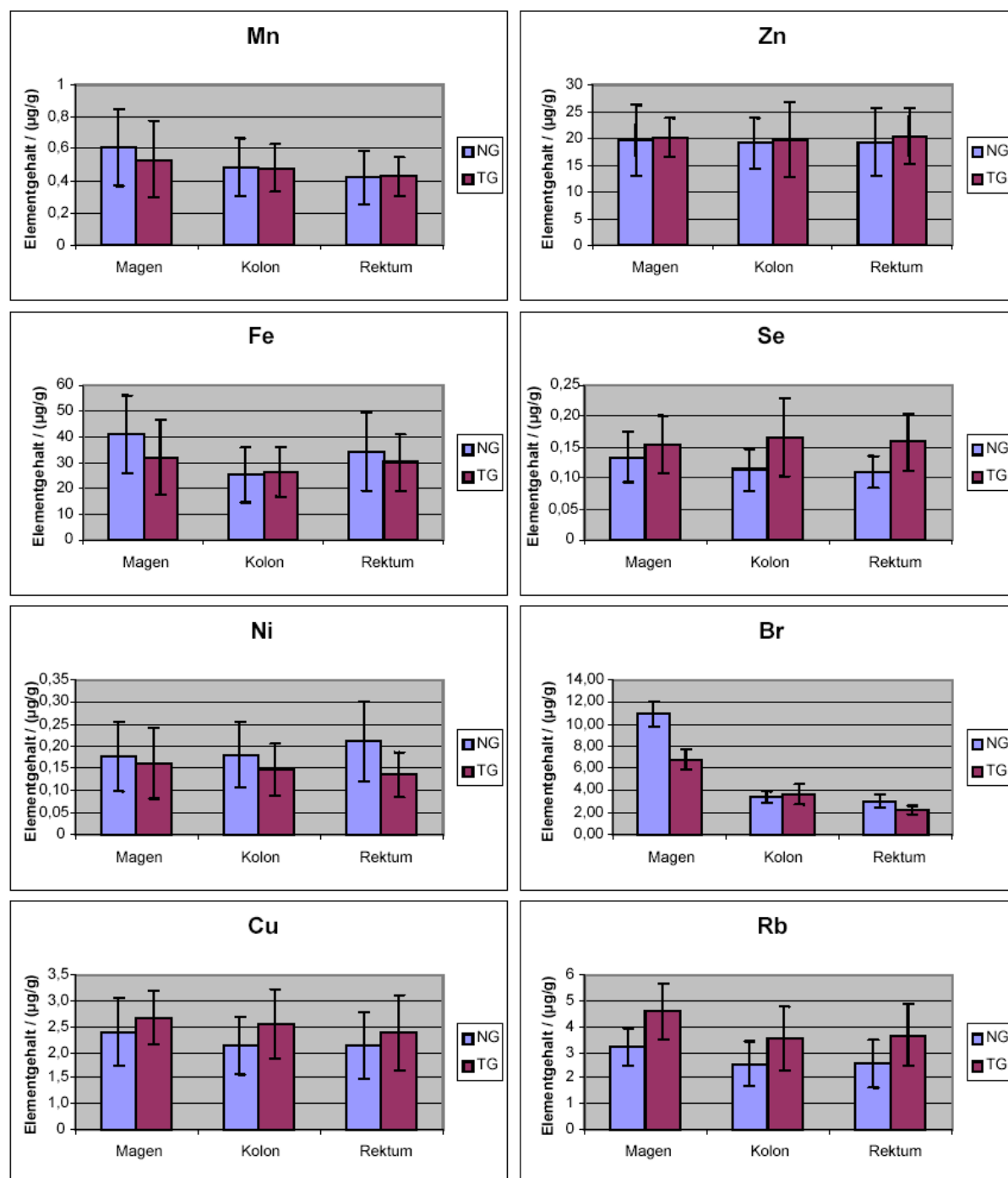


Abb. 5-2 Elementgehalte von Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br und Rb in normalen und malignen Geweben des Gastrointestinaltraktes (Magen N = 6, Kolon N = 42, Rektum N = 20)

Die Ergebnisse des erweiterten t-Testes ergaben eine Art Muster der Elemente, deren Gehalte entweder signifikant im Tumorgewebe erhöht oder erniedrigt waren. Das Signifikanzniveau wurde zwar mit  $P < 0,05$  festgelegt, lag aber mit einer Ausnahme immer unter 0,01. In der nachfolgenden Tabelle 5-3 ist ein solches Signifikanzmuster aufgeführt.

Tab. 5-3 Signifikanzmuster der Elemente in Abhängigkeit von dem Organ des Verdauungstraktes; Signifikanz:  $P < 0,01$

<i>Element</i>	<i>Magen</i>	<i>Kolon</i>	<i>Rektum</i>
<b>Na</b>	n.b.	NG	NG
<b>Mg</b>	n.b.	TG	TG
<b>P</b>	TG	TG	TG
<b>S</b>	-	TG	-
<b>Cl</b>	-	-	-
<b>K</b>	TG	TG	TG
<b>Ca</b>	-	NG	NG
<b>Cr</b>	-	-	-
<b>Mn</b>	-	-	-
<b>Fe</b>	-	-	-
<b>Ni</b>	-	NG	-
<b>Cu</b>	-	TG	-
<b>Zn</b>	-	-	-
<b>Se</b>	-	TG	TG
<b>Br</b>	-	-	-
<b>Rb</b>	TG	TG	TG

n.b. nicht bestimmt; - keine Signifikanz;  
 TG im malignen Gewebe erhöhter Gehalt;  
 NG im normalen Gewebe erhöhter Gehalt

Die Anreicherung von Phosphor im neoplastischen Gewebe ist aufgrund der erhöhten Proliferation von Krebszellen und dem damit erhöhten Energiebedarf erklärlich. Weiterhin ist die Akkumulierung von intrazellulärem Kalium über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pumpen (Transmembranproteine) ein energieverbrauchender Prozess, wobei diese Proteine (ATPasen) katalytisch ATP hydrolysieren oder aus ADP und anorganischem Phosphat synthetisieren. Für jeweils zwei hineingepumpte Kaliumionen werden drei Natriumionen exportiert. Das bedeutet gleichzeitig, dass bei Anreicherung von Kalium in den malignen Geweben eine Verminderung des Natriumgehaltes im Cytoplasma einhergeht, was durch die oben aufgeführten Ergebnisse eindeutig bestätigt werden kann.

Der erhöhte Schwefelgehalt in den malignen Kolongeweben gegenüber den entsprechenden Normalgeweben des Kolons ist ebenfalls auf die erhöhte Proliferation neoplastischer Zellen zurückzuführen. Da sich auf der einen Seite im malignen Gewebe wesentlich mehr Zellen in einer Zellteilungsphase befinden und die G1-Phase des Zellzyklus mit einer Erhöhung der RNA- und der Proteinsynthese verknüpft ist, und auf der anderen Seite Schwefel ein Bauelement der Aminosäuren Cystein und Methionin und der aus ihnen aufgebauten Proteine ist, neben schwefelhaltigen Eisen-Proteinen, ist der erhöhte Gehalt von Schwefel in malignen Zellen eine Konsequenz der Eigenschaften proliferierender Zellen.

Die Anreicherung von Alkalielementen, wie Kalium und Rubidium, in proliferierenden Geweben – dabei kann es sich auch um benigne Tumore oder wuchernde Gewebe handeln – ist in der Literatur bereits für normales und verändertes Schilddrüsengewebe und für das Mammakarzinom beschrieben worden [102,116,117,119,123,124, 248]. Statistisch signifikante Unterschiede der Gehalte an Alkalimetallionen (K und Rb) und Halogenelementen (Br und Cl) in kolorektalen Karzinomgeweben im Vergleich zu den korrespondierenden Normalgeweben konnten bereits für eine geringe Anzahl an Probanden (Patientenkollektiv: israelische Bevölkerung) ermittelt werden [245]. Die Ergebnisse sind mit den hier aufgeführten Daten in Übereinstimmung. Sie lassen den Schluss zu, dass die gefundenen Umverteilungen der Elemente eine Folge der Krebserkrankung und des damit veränderten Zellstoffwechsels ist. Diese These wird unterstützt durch die Ergebnisse einer Blutuntersuchung bei Patienten mit einem Kolonkarzinom im Vergleich zu einem Normalkollektiv. Dabei wurde festgestellt, dass die Konzentrationen von Br, Rb, Fe, K und Se signifikant niedriger bei Patienten mit einem malignen Tumor gegenüber dem Normalkollektiv sind [249]. Hier wird eine direkte Korrelation der Elementgehalte im Blut mit denen im Gewebe deutlich, denn mit Ausnahme von Fe sind alle Elemente im Tumorgewebe erhöht, die im Vollblut erniedrigt sind. Gleiche Korrelationen wurden auch bei anderen Krebsarten gefunden, sind aber bisher nicht in Publikationen beschrieben. Eine umfassende Studie diesbezüglich würde sicherlich weitere Aufschlüsse über derartige Zusammenhänge zulassen.

Interessant ist die Frage, ob zwischen der vermehrten Aufnahme von Kalium und Rubidium ein Zusammenhang besteht und wie das Rubidiumkation in das Zellplasma gelangt. Auf der einen Seite könnte das Rubidium über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  Pumpe und auf der anderen Seite über Kaliumkanäle (diese Art der Kanäle sind ionenspezifisch und

werden von Ionengradienten angetrieben) in das Cytoplasma transportiert werden, obwohl der Ionenradius des Rubidioms im Vergleich zu dem des Kaliums größer ist. Da die freie Hydratationsenergie von  $\text{Rb}^+$  geringer ist als die von  $\text{K}^+$  ist die Permeabilität von  $\text{Rb}^+$  für  $\text{K}^+$ -Kanäle vermutlich relativ groß. Weiterhin stellt sich die Frage wie Rubidium in der Zelle vorliegt, ionisch oder findet eine Akkumulation von Rubidium in subzellulären Organellen statt. Die an dieser Stelle offenen Fragen werden in den nachfolgenden Kapiteln geklärt werden.

#### *5.1.1 Gewebetypklassifizierung mittels chemometrischer Methoden [239,240]*

Zur Bestätigung der Ergebnisse des erweiterten t-Testes und zur Gewebetypklassifizierung mit Hilfe chemometrischer Methoden wurde sowohl die hierarchische Clusteranalyse und die Hauptkomponentenanalyse (PCA – Principal Component Analysis), als Vertreter des unüberwachten Lernens, als auch die lineare Diskriminanzanalyse (LDA – Linear Discriminant Analysis), als Vertreter des überwachten Lernens, angewendet. Dabei entsprechen die Gewebeproben den Objekten und die Elementgehalte den Merkmalen der Objekte. Bei der Anwendung der verschiedenen chemometrischen Methoden wurde immer die gleiche Datenmatrix nach Bereinigung der Rohdaten (Anwendung des Ausreißertests und Prüfung auf Normalverteilung) benutzt.

Bei der hierarchischen Clusteranalyse konnten mit Hilfe der Elementgehalte von P, K, Rb und Se maligne und gesunde Gewebe in ihre korrespondierenden Cluster eingeordnet werden. Die Clusterwichtungen konnten mit 47% zu 53% kalkuliert werden. Es kann also eine eindeutige Gewebetypklassifizierung durchgeführt werden. Nur in 3% aller Fälle konnte eine Fehlzuordnung registriert werden. Bei einer 100%igen Klassifizierungsgenauigkeit müssten die Clusterwichtungen 50% zu 50% sein [250]. Eine weitere chemometrische Methode, die mit der Lösung eines Eigenwertproblems verbunden ist, ist die Hauptkomponentenanalyse, die zur visuellen Darstellung komplexer Zusammenhänge zwischen einer großen Datenmatrix und einer großen Anzahl an Variablen geeignet ist [251-259]. Grundlage der PCA ist die Konstruktion von Linearkombinationen aus den Originaldaten, so dass die neuen synthetischen Variablen nicht mehr miteinander korrelieren. Diese synthetischen Variablen (Hauptkomponenten) beschreiben den größten Teil der Datenvarianz. Je kleiner die Anzahl der

synthetischen Variablen ist, umso größer ist die Korrelation zwischen den Variablen und den Daten. Idealerweise werden nur zwei Hauptkomponenten gebraucht um eine 100%ige Klassifikation zu erreichen. Bei der Hauptkomponentenanalyse des kompletten Datensatzes aus den Ergebnissen der Elementgehaltsbestimmung der aufgeschlossenen Proben konnte eine Datenreduktion auf vier synthetische Variablen erreicht werden, wobei bereits die erste Hauptkomponente 1/3 der Datenvarianz erklärte (Variablen bei einem Eigenwert  $< 1$  wurden bei der weiteren Klassifizierung nicht berücksichtigt). Eine eindeutige Trennung von malignen Geweben und normalen Geweben konnte jedoch nur unter Berücksichtigung der Resektionsstelle im Verdauungstrakt erzielt werden. Es erfolgte eine Unterteilung in Magen, Kolon ascendens (aufsteigend), Kolon transversum (querverlaufend), Kolon descendens (absteigend), Kolon sigmoidum (S-förmig) und Rektum. Die berechneten Hauptkomponentengewichte ließen sich am besten auf die Trennung von Tumor- und Normalgewebe des Kolons sigmoidum und des Rektums anwenden. In Abbildung 5-3 sind die Komponentenwichtungen für die Hauptkomponenten eins und zwei dargestellt und die Trennlinie zwischen Tumor- und Normalgewebe eingezeichnet.

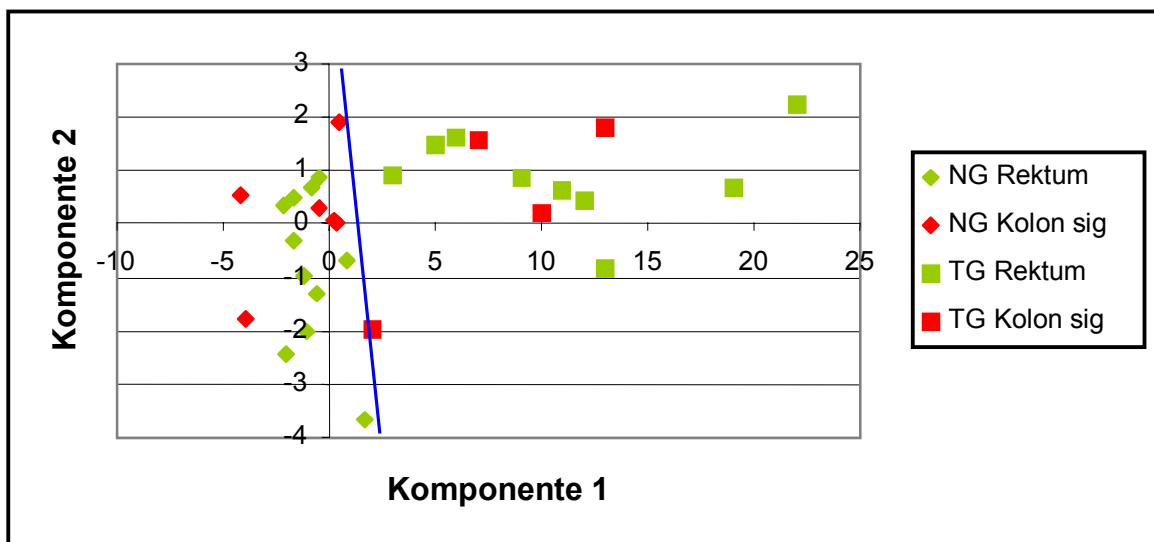


Abb. 5-3 Darstellung der Komponentenwichtungen der 1. und 2. Hauptkomponente zur Gewebeklassifizierung unter Berücksichtigung der Resektionsstelle (Datensatz: Aufschlussproben)

Bei Anwendung der Hauptkomponentenanalyse auf die Daten der Gefrierschnitte der Gewebeproben zeigte sich, dass bereits 3 Hauptkomponenten das Eigenwert-Eins-



Kriterium erfüllten (Erklärung von 78% der Varianz). Eine exakte Trennung von karzinösem und gesundem Gewebe war auch hier nur unter Berücksichtigung der Probeentnahmestelle möglich. Zusätzlich wurde die Malignität und die Tumorausbreitung als Trenneigenschaft berücksichtigt (siehe Abbildung 5-4). Die Korrelation von Elementverteilungen in Geweben und dem Differenzierungsgrad von Krebszellen wurde bereits für das Prostatakarzinom und das Mammakarzinom gezeigt [111,112, 260-262]. Über die Spurenelementverteilung in Seren von Lungenkrebspatienten im Vergleich mit den Seren einer Kontrollgruppe konnte ebenfalls eine Korrelation der Elementverteilung und der Malignität nachgewiesen werden [263]. In weiteren Arbeiten konnte eine Korrelation zwischen Elementgehalten in gutartigen und bösartigen Tumorgeweben beobachtet werden [117,121]. Daten, die eine solche Korrelation aufzeigen, sind allerdings nur in geringem Umfang vorhanden. Hier besteht Handlungsbedarf, da die Ergebnisse gewebespezifisch sind.

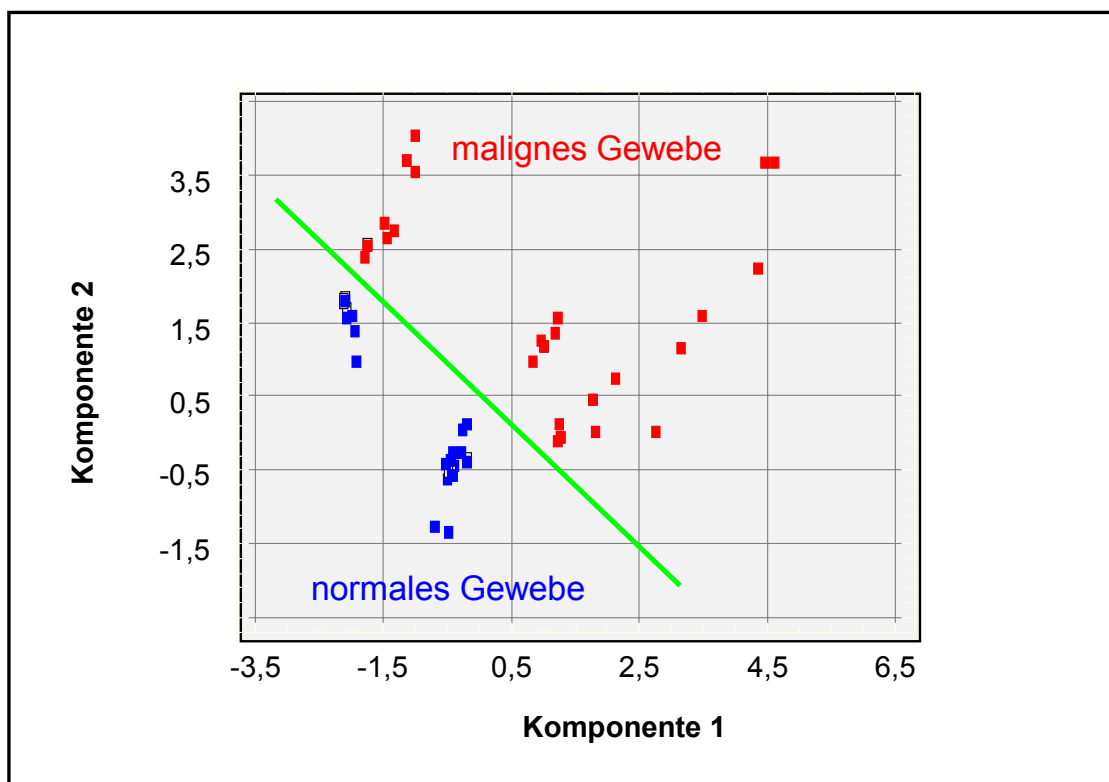


Abb. 5-4 Darstellung der Komponentenwichtungen der 1. und 2. Hauptkomponente zur Gewebeklassifizierung unter Berücksichtigung der pathologischen Daten (Datensatz: Gefrierschnitte des Kolons sigmoidum: Differenzierungsgrad G2, Tumorausbreitung T3)

Eine weitere Methode der Einteilung von Datensätzen in Klassen ermöglicht die lineare Diskriminanzanalyse mit deren Hilfe die Varianz zwischen den Klassen maximiert und innerhalb der Klassen minimiert wird. Zur Berechnung der Diskriminanzfunktion wird ein Lerndatensatz genutzt, die Güte der Funktion wird über einen Testdatensatz geprüft. Als Lerndatensatz wurde die gleiche Matrix verwendet, mit der die Hauptkomponentenanalyse durchgeführt wurde, wobei ein Teil des Datensatzes als Testdatensatz verwendet wurde. In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der linearen Diskriminanzanalyse zur Klassifizierung des Gewebetyps angegeben.

Tab. 5-4 Anwendung der Diskriminanzanalyse auf den Testdatensatz zur Klassifizierung von malignen-normalen Geweben des Gastrointestinaltraktes (Datensatz: aufgeschlossene Proben)

Gruppe	Gruppengröße	vorhergesagt:	
		Gruppe 1	Gruppe 2
1	44	42 ( 95,5%)	2 ( 4,5%)
2	46	8 ( 17,4%)	38 ( 82,6%)

Insgesamt wurden 89% der Gewebeproben korrekt der korrespondierenden Klasse zugeordnet. Bei Auswertung der Falschzuordnung zeigte sich, dass es sich bei den Proben ausschließlich um Magen- und Rektumproben handelte, die mit Hilfe der ermittelten Diskriminanzfunktion nicht richtig zugeordnet werden konnten. Das lässt den Umkehrschluss zu, dass eine 100%ige Zuordnung aller Kolonproben über die Elementgehalte von P, S, K, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Se und Rb in ihre korrespondierenden Klassen (malignes-normales Gewebe) über die ermittelte Diskriminanzfunktion möglich ist. Dieses Ergebnis wird in der Literatur bestätigt, allerdings wurde die Diskriminanzfunktion über andere Elementgehalte als die der vorgestellten ermittelt [116]. Anhand dieser exakten Gewebeklassifizierung über die Elementgehalte zeigt sich, dass eine kollektive Festlegung von Elementgehaltsbereichen in Geweben ergänzende Informationen bei der Diagnose und eventuell bei der Prognose von kolorektalen Krebserkrankungen liefern kann.

Eine weitere Unterteilung der Tumorgewebeklasse in Klassen mit unterschiedlichen Differenzierungsgraden oder mit einer unterschiedlichen Tumorausbreitung war nur in 61 bzw. 51% möglich. Um eine korrektere Zuordnung zu erzielen, muss der Lern-

datensatz vergrößert werden. Eine Unterteilung der Normalgewebe in Bezug auf individuelle Daten, wie Raucher/Nichtraucher oder Geschlecht, führte in 68% zu einer richtigen Zuordnung. Wird die Diskriminanzanalyse mit dem aus den Gefrierschnitten erhaltenen Datensatz durchgeführt, so konnten nur 84% der Gewebeproben korrekt ihrer entsprechenden Klasse zugeordnet werden. Bei Betrachtung der Falschzuordnung ergab sich, dass in den meisten Fällen die Rektumproben nicht richtig zugeordnet werden konnten. Eine 100%ig korrekte Zuordnung von Kolonproben mit Hilfe der berechneten Diskriminanzfunktion war trotzdem nicht möglich.

Um die Zusammenhänge zwischen den individuellen Patientendaten (Einflussgrößen) und den Elementgehalten (Messgrößen) zu beschreiben, wurde ein Modell auf Basis der univariaten linearen Regression und der multiplen linearen Regression aufgestellt. Die persönlichen und pathohistologischen Patientendaten wurden skaliert, um sie in den Datensatz miteinbeziehen zu können. Die Korrelation zwischen den Einfluss- und Messgrößen wurde als Pearson-Koeffizient berechnet. Im Idealfall beträgt der Pearson-Koeffizient eins. Bei medizinischen Proben wird bereits von einer Korrelation ausgegangen, wenn der Koeffizient  $r > 0,55$  ist.

Zwischen den Elementgehalten, die in den aufgeschlossenen Proben der Normalgewebe bestimmt wurden, und den individuellen Patientendaten, wie Rauchgewohnheiten, Alter und Geschlecht, konnten keine Korrelationen auf Basis der univariaten linearen Regression festgestellt werden. Eine mögliche Korrelation konnte zwischen dem Kupfergehalt und dem Alter ermittelt werden (Pearson-Koeffizient 0,33), wobei der Kupfergehalt um ca.  $0,2 \mu\text{g/g}$  Feuchtmasse pro Jahr ansteigt. Es konnte auch kein Zusammenhang zwischen den Elementgehalten in den malignen Geweben und dem Malignitätsgrad oder der Tumorausbreitung hergestellt werden. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Chromgehalt und dem Geschlecht konnte in den malignen Geweben hergestellt werden. Der Pearson-Korrelationskoeffizient wurde hier mit  $r = 0,42$  bestimmt. Die Ergebnisse des erweiterten t-Testes konnten durch Anwendung der univariaten linearen Regression auf die Elementgehalte in den normalen Gewebeproben im Vergleich mit denen in den malignen Gewebeproben bestätigt werden. Die Resultate bei Anwendung der linearen Regression auf die Elementgehalte in den Gefrierschnitten in Verbindung mit den individuellen Patientendaten stimmten mit den oben vorgestellten Ergebnissen überein.

Ein multivariates Modell sollte in Form der multiplen linearen Regression (MLR) eine verbesserte Geradenanpassung ergeben. Diese Methode lässt sich als Regression einer Matrix abhängiger Variablen auf eine Matrix unabhängiger Variablen formulieren. Die Faktoren wurden durch Minimierung der Fehlerquadrate von berechneten zu gemessenen Elementgehalten im Tumorgewebe ermittelt. Da ein gesicherter Zusammenhang zwischen den Elementgehalten in den malignen und normalen Geweben eines Probanden aufgrund seines individuellen Status (genetischer Faktor, Stressfaktor, Hormonstatus, Immunsystem, exogene Einflüsse usw.) besteht, wurden die Elementgehalte des gesunden Gewebes als Faktor (Normalgewebefaktor) in die Modellierung miteinbezogen. Um die Vergleichbarkeit der berechneten Steigungen zu erhöhen, wurden die Daten vor der Regression normiert (Normierung aller Daten auf den Mittelwert 0 und die Standardabweichung 1). Sowohl für die Datenmodellierung aus Elementgehalten in aufgeschlossenen Gewebeproben als auch für die Datenmodellierung aus Elementgehalten in Gefrierschnitten konnten für alle Elemente Pearson-Korrelationen mit  $r > 0,6$  berechnet werden. In den Tabellen 5-5 und 5-6 sind die Ergebnisse der multiplen linearen Regression aufgelistet.

**Tab. 5-5** Ergebnisse der multiplen linearen Regression unter Berücksichtigung aller individuellen Patientendaten und des Normalgewebefaktors  
(Datensatz:Aufschlussproben)

	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Cr</b>	<b>Mn</b>	<b>Fe</b>	<b>Ni</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Se</b>	<b>Rb</b>	<b>Sr</b>
<b>Pearson</b>	<b>0,70</b>	<b>0,76</b>	<b>0,69</b>	<b>0,79</b>	<b>1,00</b>	<b>0,59</b>	<b>0,70</b>	<b>0,61</b>	<b>0,67</b>	<b>0,74</b>	<b>0,77</b>	<b>0,82</b>	<b>0,88</b>
Elementgehalt NG	0,65	0,81	0,61	0,57	-0,09	0,15	0,52	0,02	0,53	0,33	0,42	0,53	1,13
Lage NG	0,59	0,34	0,37	0,31	0,61	0,50	-0,04	0,63	-0,07	-0,01	-0,57	-0,19	0,28
Lage TG	-0,63	-0,55	-0,40	-0,73	0,85	-0,60	0,18	-0,61	-0,27	-0,28	0,56	-0,09	-0,37
Alter	-0,25	-0,25	-0,25	0,20	0,52	-0,07	0,17	0,22	0,08	0,03	-0,17	-0,30	-0,02
Geschlecht	0,27	0,06	0,17	-0,04	0,28	0,35	-0,08	0,20	-0,06	-0,18	0,44	-0,07	-0,15
Raucher	-0,30	-0,05	-0,17	-0,13	0,34	-0,10	0,00	-0,06	-0,18	-0,14	-0,48	-0,27	-0,24
Resektatlänge	-0,21	-0,03	-0,14	0,17	0,65	-0,20	-0,12	0,28	0,17	-0,06	-0,30	-0,04	-0,20
Entfernung Tumorsektatrand	0,03	-0,17	0,16	-0,27	0,60	0,06	0,26	-0,45	-0,44	-0,06	0,19	0,04	0,19
Tumurlänge	-0,19	-0,25	-0,03	-0,56	0,03	0,08	-0,21	-0,12	-0,18	-0,56	0,00	-0,02	-0,02
Differenzierungsgrad	-0,14	0,04	-0,02	-0,14	1,27	-0,20	-0,30	0,13	-0,08	-0,26	-0,11	-0,29	-0,67
Tumorklassifikation	-0,08	0,03	-0,21	0,06	-0,32	-0,25	-0,07	-0,44	0,11	-0,03	-0,14	-0,19	-0,36
Konstante*	0,07	0,05	0,17	-0,04	0,01	0,13	-0,12	-0,13	0,20	0,04	0,07	0,14	0,00

NG Normalgewebe; TG Tumorgewebe; Konstante\* = Achsenabschnitt

**Tab. 5-6** Ergebnisse der multiplen linearen Regression unter Berücksichtigung aller individuellen Patientendaten und des Normalgewebefaktors  
(Datensatz: Gefrierschnitte)

	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>Cl</b>	<b>K</b>	<b>Ca</b>	<b>Fe</b>	<b>Cu</b>	<b>Zn</b>	<b>Br</b>	<b>Rb</b>
<b>Pearson</b>	<b>0,74</b>	<b>0,79</b>	<b>0,76</b>	<b>0,77</b>	<b>0,78</b>	<b>0,75</b>	<b>0,70</b>	<b>0,70</b>	<b>0,66</b>	<b>0,78</b>
Elementgehalt NG	0,21	0,14	0,50	-0,04	0,64	0,13	0,33	-0,10	0,33	0,22
Lage NG	-0,42	-0,49	0,75	-0,29	0,52	0,06	0,81	0,19	0,70	0,32
Lage TG	0,14	0,61	-0,99	0,38	-0,22	-0,22	-0,97	0,16	-0,58	-0,45
Alter	-0,23	-0,45	-0,18	-0,26	-0,13	-0,16	-0,08	-0,48	-0,29	-0,21
Geschlecht	0,15	0,23	0,19	0,25	-0,21	-0,24	-0,09	0,10	0,06	0,32
Raucher	-0,06	-0,13	-0,04	-0,03	-0,27	0,03	0,05	0,00	0,23	-0,04
Resektatlänge	0,47	0,27	0,31	0,36	-0,02	0,07	0,23	0,02	0,02	-0,18
Entfernung Tumorsektatrand	-0,28	-0,24	-0,28	-0,07	0,21	0,08	-0,02	-0,14	-0,13	0,29
Tumurlänge	0,31	0,34	0,02	0,50	0,58	-0,54	0,44	-0,04	0,17	0,22
Differenzierungsgrad	-0,02	0,17	0,21	0,16	0,12	-0,43	-0,17	0,18	-0,14	-0,09
Tumorklassifikation	-0,32	-0,32	-0,08	-0,54	-0,83	-0,12	-0,50	-0,48	-0,02	-0,48
Konstante*	0,15	-0,01	-0,01	0,14	-0,17	-0,11	0,01	-0,09	0,02	0,19

NG Normalgewebe; TG Tumorgewebe; Konstante\* = Achsenabschnitt

Mit Hilfe der multiplen linearen Regression konnte ein Zusammenhang zwischen allen individuellen Patientendaten und den pathologischen Befunden hergestellt werden. Um neben der medizinischen Relevanz (nachfolgende Kapitel) dieser Ergebnisse einen praktischen Nutzen zu haben, wurde im weiteren getestet, ob eine Vorhersage von histopathologischen Parametern über die Elementgehalte in Schnellschnitten, die während des chirurgischen Eingriffs nach Probennahme im pathologischen Labor zur Optimierung der Operationsstrategie bewertet werden, möglich ist. Zur Modellierung der pathologischen Daten werden die Funktionen so umgestellt, dass sie als Ergebnis ein solches Merkmal ergeben. Die Pearson-Korrelationskoeffizienten, die aus den Elementgehalten der Gefrierschnitte und aus den berechneten individuellen und pathologischen Daten ermittelt wurden, liegen zwischen 0,87 und 1,00. Da in erster Linie für den Operateur die Tumorklassifikation und der Malignitätsgrad von Interesse ist, ist in den nachfolgenden Abbildungen 5-5 und 5-6 die aus den Gefrierschnitten berechnete Tumorklassifikation bzw. berechneter Malignitätsgrad gegen die aus den Elementgehalten in den Gefrierschnitten ermittelte aufgetragen.

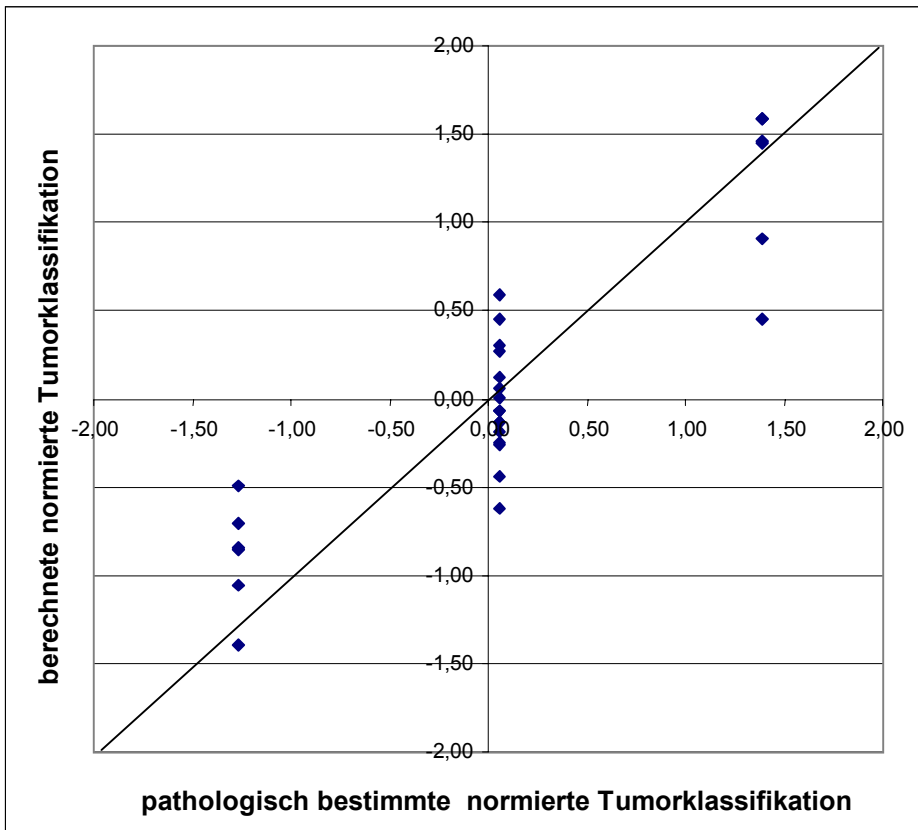


Abb. 5-5 Zusammenhang zwischen pathologisch bestimmter und aus den Elementgehalten in den Gefrierschnitten berechneter Tumorklassifikation

Aus der graphischen Darstellung ist eindeutig die Bestimmbarkeit der Tumorklassen T2 und T4 erkennbar, während die Festlegung auf die Tumorklasse T2 oder T3 bzw. T3 oder T4 mit einem Unsicherheitsfaktor behaftet ist. Eine eindeutige Zuordnung der Malignität (Differenzierungsgrad G2, G2-3 und G3) ist über die Elementgehalte in Gefrierschnitten möglich.

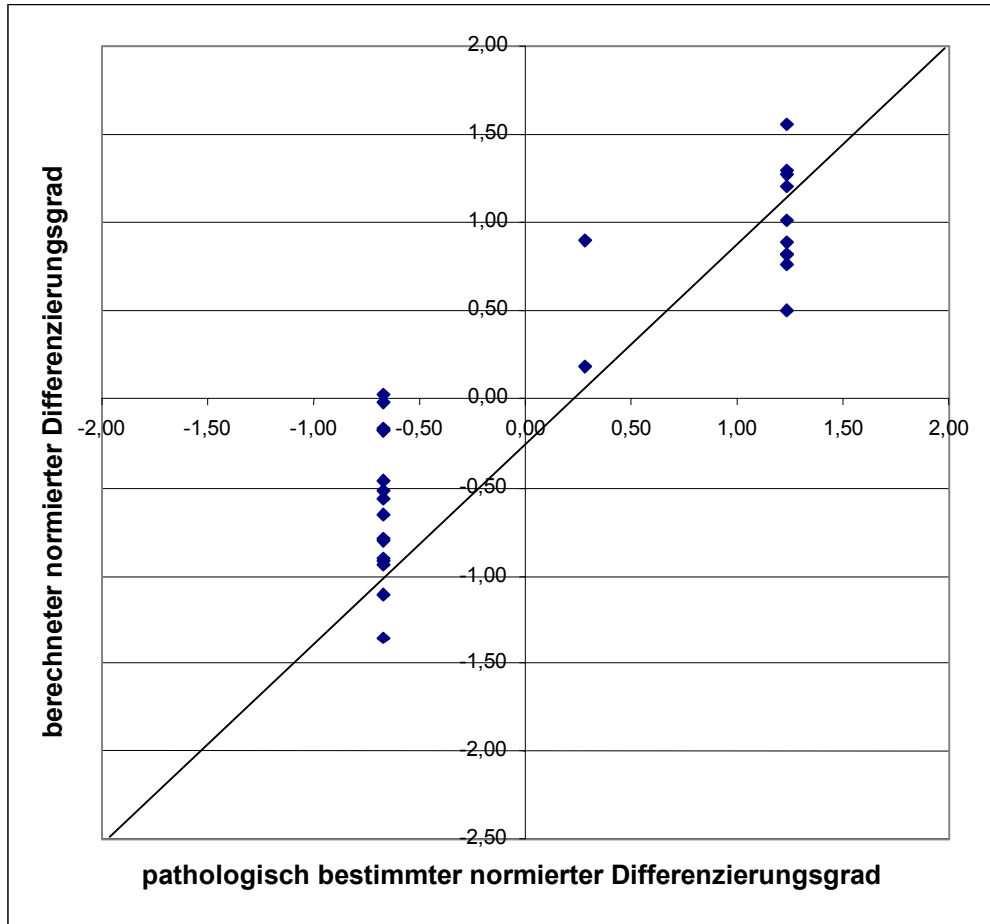


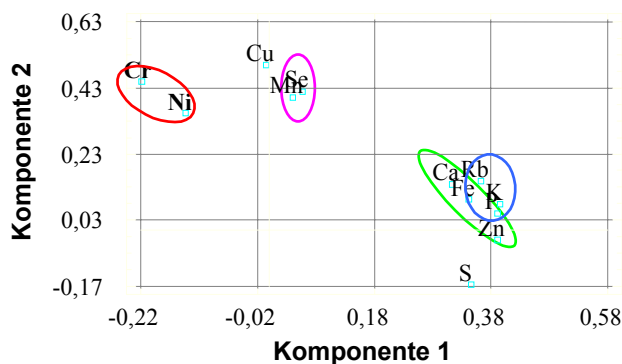
Abb. 5-6 Zusammenhang zwischen pathologisch bestimmtem und aus den Elementgehalten in den Gefrierschnitten berechnetem Differenzierungsgrad

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die mit Hilfe der TXRF ermittelten Elementgehalte in Aufschlussproben von malignen und gesunden Geweben des Gastrointestinaltraktes für beide Gewebearten Referenzwerte für die Elemente P, S, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Rb und Sr festgelegt werden konnte und dass über die Elementgehalte in den Gefrierschnitten eine Zuordnung im Rahmen der Tumorklassifikation und der Malignität erreicht werden kann. Dadurch kann ein Beitrag zur diagnostischen und prognostischen Unterstützung bei Krebserkrankungen der Verdauungsorgane Magen, Kolon und Rektum geleistet werden. Ob sich dieses entwickelte Verfahren in der Praxis bewährt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

### 5.1.2 Elementkorrelationen in malignen und normalen Geweben [239,240,275,302]

Zur Identifizierung von Wechselwirkungen der Mineral- und Spurenelemente untereinander in malignen sowie in gesunden Geweben, die einen Beitrag zur Aufklärung aber auch zu Veränderungen biochemischer Prozesse liefern können, wurden chemometrische Methoden (Hauptkomponentenanalyse und univariate lineare Regression) genutzt. Dabei werden ähnliche Merkmale geclustert (variablenorientierte Entfaltung), in diesem Fall entspricht jeweils ein Merkmal einem bestimmten Element. In Abbildung 5-7 sind die entsprechenden Elementcluster als sog. Variablenpunktwolken farbig umrandet. Bei dem Datensatz handelt es sich um Elementgehalte, die in aufgeschlossenen Gewebeproben des Magens ermittelt wurden.

a)



b)

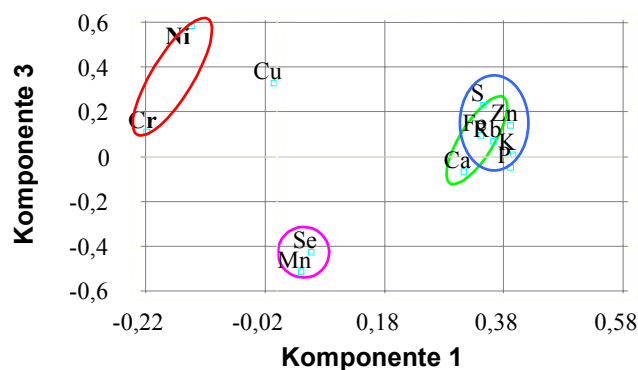


Abb. 5-7 Variablendarstellung der Hauptkomponentenanalyse zur Ermittlung von Elementkorrelationen in Gewebeproben des Magens: a) für die 1. und 2., b) für die 1. und 3. Hauptkomponente



Von einer eindeutigen Elementkorrelation kann ausgegangen werden, wenn die umrandete Gruppierung für die Komponenten eins und zwei auch bei Einbeziehung der dritten Komponente stabil bleibt. Mit allen weiteren Datensätzen zur Darstellung der Elementkorrelationen im Kolon und im Rektum wurde, wie in Abb. 5-7 exemplarisch für die Gewebeproben des Magens gezeigt, verfahren. Die Hauptkomponentenanalyse wurde auch auf die Datensätze der Elementgehalte in den Gefrierschnitten angewendet. Nach variablenorientierter Entfaltung ergaben sich die in Tabelle 5-7 zusammengestellten, organspezifischen Elementcluster.

Tab. 5-7 Mittels PCA ermittelte Elementcluster in Abhängigkeit von dem Organ des Gastrointestinaltraktes

Elementcluster	Organ		
	<i>Magen</i>	<i>Kolon</i>	<i>Rektum</i>
	K/Rb/P	K/Rb/P	K/Rb/P
	Cr/Ni	Cr/Ni	Cr/Ni
	Cl/Br	Cl/Br	Cl/Br
	Se/Mn	S/Zn	S/Zn
	Fe/Ca/Zn	S/Se	Fe/Ca

Die Korrelation zwischen Kalium, Rubidium und Phosphor wurde bereits in Kapitel 5.1 vorgestellt. Mit Hilfe der univariaten linearen Regressionsanalyse konnte der Pearson Korrelationskoeffizient von Rubidium und Kalium in den gesunden Geweben mit  $r = 0,86$  und in den malignen Geweben mit  $r = 0,79$  berechnet werden. Die entsprechende graphische Darstellung für die Korrelation von K und Rb im Normalgewebe ist in Abbildung 5-8 zu sehen.

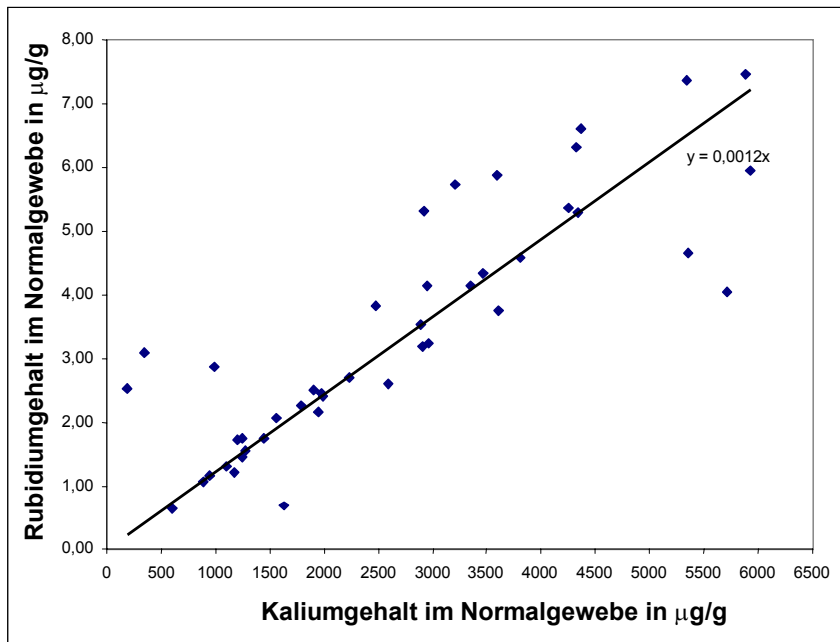


Abb. 5-8 Elementkorrelation von Kalium und Rubidium im Normalgewebe des Gastrointestinaltraktes (Datensatz: Gefrierschnitte; Angabe der Gehalte in µg/g Feuchtmasse)

Da eine weitere Korrelation mit Phosphor vorliegt, ist davon auszugehen, dass Rubidium sowohl über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Pumpe als auch über die K-Kanäle in die Zelle gelangt. Dies wird in der Literatur bestätigt. Zum einen wird die Aufnahme von Rb in die Zelle über den  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ -Cotransport beschrieben, wobei der Mechanismus mit der Stimulierung des Bradykinin Rezeptors assoziiert, und zum anderen über die K-Kanäle [267-269]. Ein weiterer interessanter Aspekt im Zusammenhang mit Kalium und Rubidium ist, dass der Anstieg der Aktivität der Kaliumkanäle mit einem Anstieg der Proliferationsrate von Epithelzellen verbunden ist [270]. Wird die Mitose stimuliert, so steigt die Expression der  $\text{K}^+$ -Kanäle an, es wird vermehrt Kalium in die Zelle geschleust. Die gleichzeitig gesteigerte Aufnahme von Rubidium in das Cytoplasma ist ein weiterer Beweis dafür, dass Rb über die  $\text{K}^+$ -Kanäle in die Zelle transportiert wird. Die Essentialität von Rubidium für den Menschen konnte bisher nicht nachgewiesen werden, da ausreichend Rb über die Nahrung dem menschlichen Organismus zugeführt wird [271-274]. Die tägliche Rb-Aufnahme liegt im Mittel zwischen 1,5 und 2,0 mg/Tag. Rb wird zu 70% renal (Exkretion über die Niere) und zu 30% fäkal (Exkretion über den Stuhl) ausgeschieden. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass der Futterverzehr, das Wachstum und die Reproduktionsleistung intraute-

rin Rb verarmter Tiere signifikant vermindert waren. Die Abortrate Rb arm ernährter Tiere lag bei 88%, was auf eine biologische Funktion von Rubidium schließen lässt. Die Essentialität von Rubidium für den menschlichen Organismus wird durch die vorgestellten Ergebnisse untermauert, da sowohl in malignen als auch in normalen Geweben eine signifikante Korrelation zwischen K und Rb besteht, wobei diese Korrelation nicht organspezifisch ist.

Ein Zusammenhang zwischen Chrom und Nickel ist bisher nicht in der Literatur beschrieben, obwohl beide Elemente chemisch verwandt sind und eine Korrelation naheliegend ist [274]. Bei beiden Elementen handelt es sich um Mikronährstoffe, wobei der Nickelbedarf mit 25-35 µg Ni pro Tag und der Chrombedarf mit 10-20 µg Cr pro Tag abgeschätzt wird [275-278]. Die prozentuale Aufnahme von Cr und Ni aus der Nahrung hängt im wesentlichen von der Bioverfügbarkeit der Elemente in der Nahrung ab. Zu den einflussnehmenden Faktoren gehören die Oxidationsstufen der Ni- bzw. Cr-Verbindungen, die Wasserlöslichkeit der Verbindungen, die Säurestärke des Magensaftes und die individuelle Kapazität zur Ni- bzw. Cr-Aufnahme [278-280]. Die tägliche Aufnahme von Ni und Cr ist mehr als dreimal bzw. zweimal so hoch wie der Tagesbedarf. Zwar gilt die Essentialität von Chrom für den Menschen als gesichert, über die Essentialität von Nickel wird allerdings noch spekuliert [278,281-283]. Beim Vergleich der biologischen Funktionen der beiden Elemente fallen eindeutige Ähnlichkeiten auf. Sowohl Nickel als auch Chrom liegen nur in gebundener Form vor, nickel- bzw. chromhaltige Enzyme im menschlichen Organismus sind nicht bekannt [284-286]. Sowohl Chrom als auch Nickel steigern die Wirksamkeit von Insulin, d.h. ihnen kommt eine Bedeutung bei der Glukoseverwertung zu [86,287,288]. Beide Metalle beeinflussen die Eisen-Resorption im Intestinaltrakt [289,290]. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass es bei Chrom- bzw. Nickelmangelzuständen zu einer verringerten Fe-Absorption kommt und dass die spezifische Aktivität von Enzymen, die am Kohlehydrat- und Aminosäuremetabolismus beteiligt sind, vermindert wird [286,291]. Die Enzyme agieren dabei in Synergie mit Vitaminen. Weiterhin sind Nickel und Chrom am Lipidstoffwechsel beteiligt [292,293]. Der Zusammenhang zwischen den beiden Elementen wird durch die Ergebnisse, die in Kapitel 5.2 vorgestellt werden, weiter untermauert. Bei den gezeigten Ergebnissen kann davon ausgegangen werden, dass sowohl Chrom als auch Nickel eine biologische Rolle spielen wenngleich sie nur indirekt in metabolische Prozesse involviert sind.

Eine weitere Gemeinsamkeit dieser beiden Elemente ist ihre Immunsystem stimulierende Wirkung, die sich bei hypersensibilisierten Patienten in Form einer Kontaktdermatitis auswirkt [90,294-296]. Beide Elemente zeigen, in hohen Dosen appliziert, ausgeprägte cytotoxische Eigenschaften neben ihrer kanzerogenen, mutagenen und teratogenen Wirkung, wobei die Mutagenität von Nickel eher schwach ausgeprägt ist [297-302]. Die kanzerogene Wirkung von Ni und Cr hängt in erster Linie von der Art ihrer Verbindungen ab. Bis heute sind die Mechanismen der Ni- bzw. Cr-Karzinogenese nicht vollständig aufgeklärt, da sie vielfältiger Art sein können [297,298,301,302]. Beide Elemente sind nicht signifikant in den malignen Geweben des Gastrointestinaltraktes im Vergleich zu den gesunden Geweben angereicht. Vielmehr ist in 60% bzw 33% der Fälle der Nickel- bzw. Chromgehalt in den gesunden Geweben höher als in den malignen Geweben. In Verbindung mit den im vorangegangenen Kapitel aufgeführten Ergebnissen, kann vermutet werden, dass weder Nickel noch Chrom am Initialschritt bzw. als Promotor an der Tumorgenese von Neoplasien des gastrointestinalen Traktes beteiligt sind. Weiterhin wird die Hypothese, dass  $\text{Ni}^{2+}$  und  $\text{Cr}^{3+}$  an der Regulierung der intramolekularen immunologischen Prozesse beteiligt sind, erhärtet. Hier bietet sich ein Ansatzpunkt für weitere Forschungsaktivitäten, denn in dem Fall, dass sich Nickel tatsächlich positiv auf die Immunantwort auswirkt und gleichzeitig in hohen Konzentrationen cytotoxisch wirkt, könnte ein Zusatz von Nickel zu herkömmlichen Cytostatika die Effektivität des Therapieansatzes erhöhen.

Eine weitere Organ unabhängige Elementkorrelation konnte für die Elemente Cl und Br ermittelt werden. Bei der univariaten Regressionsanalyse ergab sich ein Pearson-Korrelationskoeffizient für Brom und Chlor im gesunden Gewebe von  $r = 0,68$  und im malignen Gewebe von  $r = 0,31$ . Während sich der Zusammenhang von K und Rb in beiden Geweben gleich deutlich zeigte, ist die Korrelation von Cl und Br nach maligner Transformation der gastrointestinalen Zellen nicht mehr signifikant. Gleiche Beobachtung konnte eine Arbeitsgruppe bei der Ermittlung von Elementkorrelationen in gesunden und malignen Geweben der weiblichen Brust machen [119]. Eine Korrelation von Ca und Sr konnte ebenfalls nur für das gesunde Gewebe gefunden werden. Allen Elementen ist gemeinsam, dass ihr Gehalt in neoplastischen Geweben niedriger ist als in gesunden Geweben. Dieses konnte ebenfalls von Shenberg und Mitarbeiter beobachtet werden [245]. Eine Erklärung für die veränderte Korrelation in ma-

lignen Geweben kann an dieser Stelle nicht gegeben werden, da weder die biologische Relevanz von Sr noch die von Br bekannt ist [303].

Alle weiteren Elementkorrelationen sind organspezifisch und ebenfalls nicht in der Literatur beschrieben. Um Aussagen über den Zusammenhang zwischen Fe und Ca machen zu können, müssten weitere Untersuchungen auf molekularbiologischer Basis durchgeführt werden, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter verfolgt werden konnten.

Eine konkretere Aussage ist im Fall der Schwefel-Selen-Korrelation in kolorektalen Geweben möglich, da der größte Teil der bisher bekannten Selenoproteine oder Selenoenzyme schwefelhaltige Aminosäuren wie Cystein und Methionin enthalten, an denen das Selen gebunden ist [305-307]. Interessanterweise ist auch hier die Korrelation der beiden Elemente im gesunden Gewebe deutlicher erkennbar ( $r = 0,39$ ) als in den malignen Geweben ( $r = 0,14$ ), obwohl Selen signifikant in malignen Geweben gegenüber den normalen Geweben erhöht ist. Hier liegt die Vermutung nahe, dass in malignen Geweben des Kolons quantitative Unterschiede selenhaltiger Verbindungen (Umverteilung selenhaltiger Proteine und Enzyme) bestehen oder möglicherweise andere bisher unbekannte bioorganische Selenverbindungen vorhanden sind. Ein für den Magen-Darmtrakt bedeutsames Selenoprotein ist die gastrointestinale Glutathionperoxidase, auf die im Kapitel 5.3 näher eingegangen wird (Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen). Über eine Umverteilung selenhaltiger Verbindungen könnte eine quantitative Speziesanalyse Aufschluss geben.

## **5.2 Verteilung der Mengen- und Spurenelemente in Cytosolen von normalen und malignen Gewebeproben**

Die in Tabelle 5-8 aufgeführten Mittelwerte der Elementgehalte in dem cytosolischen Anteil der Gewebeproben wurden aus den Elementgehalten der Cytosole der Proben 1c – 5c und 10c – 15c ermittelt. Die Proben 6c – 9c wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt, da sie mittels Ultraschalldesintegrator aufgeschlossen wurden, der sich im weiteren Verlauf der Speziesanalyse als nicht geeignete Zellaufschlussmethode für Gewebe des Verdauungstraktes erwies.

Tab. 5-8 Mittelwerte und Intervalle der Elementgehalte im Cytosol von normalen und malignen Geweben des Gastrointestinaltraktes (N = 11)

Element	Elementgehalt Cytosol normales Gewebe		Elementgehalt Cytosol malignes Gewebe	
	/ $\mu\text{g/g}$ Feuchtmasse		/ $\mu\text{g/g}$ Feuchtmasse	
	Mittelwert	Intervall	Mittelwert	Intervall
P	<b>175 <math>\pm</math> 98</b>	16 - 366	<b>234 <math>\pm</math> 137</b>	33-545
S	<b>239 <math>\pm</math> 127</b>	92 - 408	<b>291 <math>\pm</math> 153</b>	111-544
K	<b>473 <math>\pm</math> 266</b>	47 - 842	<b>544 <math>\pm</math> 183</b>	97-996
Ca	<b>16,5 <math>\pm</math> 19,3</b>	1,0 - 76	<b>12,5 <math>\pm</math> 5,6</b>	4,7-25,3
Cr	<b>0,062 <math>\pm</math> 0,056</b>	0,003 - 0,163	<b>0,082 <math>\pm</math> 0,084</b>	0,008-0,309
Mn	<b>0,044 <math>\pm</math> 0,023</b>	0,003 - 0,082	<b>0,068 <math>\pm</math> 0,062</b>	0,018-0,248
Fe	<b>9,06 <math>\pm</math> 6,30</b>	0,24 - 23,93	<b>7,43 <math>\pm</math> 4,16</b>	2,41-16,68
Ni	<b>0,069 <math>\pm</math> 0,048</b>	0,013 - 0,186	<b>0,108 <math>\pm</math> 0,071</b>	0,025-0,275
Cu	<b>0,302 <math>\pm</math> 0,238</b>	0,012 - 0,877	<b>0,296 <math>\pm</math> 0,181</b>	0,035-0,678
Zn	<b>2,76 <math>\pm</math> 1,66</b>	0,11 - 5,21	<b>2,89 <math>\pm</math> 1,11</b>	0,43-4,70
Se	<b>0,023 <math>\pm</math> 0,011</b>	0,004 - 0,048	<b>0,024 <math>\pm</math> 0,012</b>	0,007 - 0,032
Rb	<b>0,660 <math>\pm</math> 0,402</b>	0,048 - 1,343	<b>0,830 <math>\pm</math> 0,448</b>	0,109 - 1,672

Bei der anschließenden Signifikanzanalyse konnte kein signifikanter Unterschied der Elementgehalte in den Cytosolen von malignen gegenüber gesunden Geweben festgestellt werden. Dieses ist in erster Linie auf die stark differierenden Elementgehalte in den Cytosolproben zwischen den einzelnen Probanden und auf die geringe Anzahl der Proben zurückzuführen. Werden die Signifikanzen für die Einzelproben berechnet, so ergibt sich in 6 von 11 betrachteten Fällen kein signifikanter Unterschied in den Elementgehalten von P, Fe und K, in 4 Fällen ist P und K im Cytosol von malignen Geweben vermehrt vorzufinden und nur in einem einzigen Fall ist der P- und K-Gehalt im Cytosol des Normalgewebes höher als im Cytosol des malignen Gewebes. Im Falle von Fe ist in 4 Fällen der Fe-Gehalt im Cytosol des Tumorgewebes reduziert und in einem Fall erhöht. Die Gehalte von S und Se sind in 7 von 11 Fällen nicht signifikant unterschiedlich, in 2 Fällen ist der Elementgehalt im Cytosol der neoplastischen Gewebe erhöht und in 2 Fällen ist er im Cytosol des malignen Gewebes vermindert. Die Elementgehalte von Nickel, Chrom und Rubidium sind in 7 Fällen im

Cytosol von malignen Geweben erhöht, in 3 Fällen ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen und nur in einem Fall ist der Ni-, Cr- und Rb-Gehalt im Cytosol der transformierten Zellen erniedrigt. Die Gehalte von Mn und Cu sind in 5 von 11 Fällen im Cytosol maligner Gewebe erhöht, in 5 bzw. 4 Fällen sind die Elementgehalte in den Cytosolen maligner Gewebe und normaler Gewebe nicht signifikant unterschiedlich, in 1 bzw. 2 Fällen ist der Gehalt im Normalgewebe erhöht. In 4 Fällen ist der Zn-Gehalt im Cytosol der Normalgewebe und in 4 Fällen im Cytosol der Normalgewebe erhöht, in 3 Fällen ist der Unterschied nicht signifikant. Der Calciumgehalt ist in 5 von den 11 cytosolischen Proben nicht signifikant unterschiedlich, in 4 Fällen ist er in dem Cytosol des malignen Gewebes erhöht und in 3 Fällen erniedrigt. Ähnliche Verteilungen konnten auch für die Elementgehalte in den Gesamtgewebeproben ermittelt werden (siehe Kapitel 5.1).

In Tabelle 5-9 ist die prozentuale Verteilung der Elementgehalte zwischen dem Cytosol und dem Pellet nach einem Zellaufschluss und anschließender Ultrazentrifugation angegeben.

Tab. 5-9 Prozentualer Anteil der Elementgehalte im Cytosol von normalen und malignen Geweben bezogen auf den Elementgehalt im Gesamtgewebe (N = 5)

<i>Element</i>	<i>Anteil Elementgehalt im Cytosol normaler Gewebe / %</i>	<i>Anteil Elementgehalt im Cytosol maligner Gewebe / %</i>
<b>P</b>	<b>29,7 ± 10,3</b>	<b>19,2 ± 5,5</b>
<b>S</b>	<b>18,9 ± 10,7</b>	<b>19,4 ± 11,9</b>
<b>K</b>	<b>78,0 ± 20,9</b>	<b>72,0 ± 12,0</b>
<b>Ca</b>	<b>23,7 ± 12,3</b>	<b>16,5 ± 5,0</b>
<b>Cr</b>	<b>22,8 ± 10,9</b>	<b>24,6 ± 15,0</b>
<b>Mn</b>	<b>29,3 ± 5,7</b>	<b>28,7 ± 6,4</b>
<b>Fe</b>	<b>32,4 ± 11,9</b>	<b>28,8 ± 9,7</b>
<b>Ni</b>	<b>47,3 ± 18,7</b>	<b>84,1 ± 21,3</b>
<b>Cu</b>	<b>71,0 ± 21,5</b>	<b>61,7 ± 10,2</b>
<b>Zn</b>	<b>50,7 ± 15,4</b>	<b>42,0 ± 11,7</b>
<b>Se</b>	<b>37,0 ± 5,7</b>	<b>45,5 ± 16,7</b>
<b>Rb</b>	<b>86,7 ± 13,3</b>	<b>83,5 ± 16,5</b>

Um pauschale Aussagen über die Verteilung der Elementgehalte zwischen Cytosol und Pellet machen zu können, vor allem im Hinblick auf die Verteilung der Elementgehalte im Cytosol von malignen Geweben im Vergleich mit denen im Cytosol von gesunden Geweben, muss eine größere Anzahl an Gewebeproben analysiert werden. An dieser Stelle sei auch darauf hingewiesen, dass eine Betrachtung der Daten mit den individuellen Patientendaten korreliert werden sollte, um ein umfassendes Gesamtbild der veränderten Elementverteilung Cytosol/Pellet zu bekommen. Ein deutlicher Unterschied zeigt sich bei dem Element Nickel, wobei der prozentuale Anteil des Nickels im Cytosol von malignen Geweben 84% beträgt, während im Cytosol von gesunden Geweben nur 47% des Nickelgesamtgehaltes gefunden wurden. Aber auch dieses Ergebnis müsste verifiziert werden.

Die meisten der aufgeführten Elemente im Cytosol sind vorwiegend an Proteine gebunden. Ausnahmen sind Kalium und Rubidium, die im Cytosol in ionischer Form vorliegen, und Phosphor, der im Cytosol größtenteils in Form von organischen und anorganischen Phosphaten (Phosphatester, Phosphorsäure etc.) vorkommt. Da Calcium unter anderem im Cytosol in ionischer Form vorliegt (Konz.  $< 10^{-7}$  mol/L), ist es sinnvoll eine Quantifizierung bezogen auf den Proteingehalt des Cytosols nur für die Elemente Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn und Se durchzuführen. Dazu wurden zunächst die Proteingehalte in den Cytosol-Puffer-Gemischen bestimmt. Die Ergebnisse der Gesamtproteinbestimmung und der Elementgehalte bezogen auf den cytosolischen Proteingehalt sind in Tabelle 5-10 aufgelistet. Der durchschnittliche Proteingehalt der Cytosole von Normalgewebeproben wurde mit  $3,2 \pm 3,0$  mg/mL Cytosol ermittelt. Der durchschnittliche Proteingehalt der Cytosole von malignen Geweben betrug  $3,8 \pm 1,5$  mg/mL Cytosol. In den Cytosolen der malignen Gewebeproben 1c, 2c und 5c wurden signifikant höhere Proteingehalte im Vergleich zu den Gehalten im Cytosol der normalen Gewebeproben gefunden ( $p < 0,001$ ). Aufgrund der erhöhten Permeabilität von malignen Epithelzellen und des erhöhten hydrostatischen Druckes in intestinalen Blutgefäßen, der bei einer größeren Anzahl gastrointestinaler Erkrankungen auftreten kann (unter anderem auch bei maligner Zelltransformation), erfolgt ein Protein Austritt unabhängig von der Molekularmasse des Proteins über die intestinalen Blutgefäße in den Intestinaltrakt und anschließend in das Darmlumen (Hohlraum von Kolon und Rektum) [307]. Folge ist eine Verschiebung des Plasmaproteinprofils und



eine zeitweilige Erhöhung der Proteingehalte in gastrointestinalen Zellen. Bei Probe 3c ist ein signifikant höherer Proteingehalt in dem Cytosol des Normalgewebes festzustellen, was an dieser Stelle nicht interpretiert werden kann. Erwartungsgemäß wurde in Probe 4c kein signifikanter Unterschied in den cytosolischen Proteingehalten von Normal- und Tumorgewebe gefunden, da es sich bei der Tumorgewebeprobe um entzündetes Gewebe handelt (laut Pathologiebericht ist kein Anhaltspunkt für Malignität vorhanden).

Tab. 5-10 Gehalte von Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn und Se bezogen auf den cytosolischen Proteingehalt (N = 5)

Probe	Proteingehalt/ mg/mL	$\mu\text{g Cr}/$ g Protein	$\mu\text{g Mn}/$ g Protein	$\mu\text{g Fe}/$ g Protein	$\mu\text{g Ni}/$ g Protein	$\mu\text{g Cu}/$ g Protein	$\mu\text{g Zn}/$ g Protein	$\mu\text{g Se}/$ g Protein
MG 1c	2,55 ± 0,08	0,004	0,004	1,499	0,008	0,016	0,214	0,001
NG 1c	1,49 ± 0,04	0,011	0,007	2,197	0,019	0,038	0,434	0,004
MG 2c	3,05 ± 0,20	0,024	0,005	0,471	0,021	0,031	0,264	0,004
NG2c	0,29 ± 0,02	0,817	0,191	27,155	0,408	1,597	9,937	0,101
MG 3c	2,54 ± 0,06	0,027	0,008	1,489	0,020	0,055	0,406	0,009
NG 3c	6,41 ± 0,22	0,004	0,003	0,677	0,002	0,020	0,233	0,002
MG 4c	5,67 ± 0,64	0,007	0,005	0,715	0,005	0,018	0,192	0,002
NG 4c	6,55 ± 0,24	0,004	0,005	1,289	0,002	0,019	0,182	0,002
MG 5c	4,94 ± 0,27	0,006	0,007	0,305	0,016	0,034	0,174	0,003
NG 5c	1,35 ± 0,09	0,050	0,014	0,845	0,052	0,074	0,804	0,005

MG Cytosol malignes Gewebe; NG Cytosol normales Gewebe

Beim Vergleich der Elementgehalte pro g cytosolisches Protein zeigt sich, dass in den Cytosolen der Normalgewebe der Proben 1c, 2c und 5c die Gehalte proteingebundener Spurenelemente deutlich höher sind als in den Cytosolen der malignen Gewebe. Im Cytosol des Normalgewebes der Probe 3c ist der Gehalt proteingebundener Spurenelemente deutlich niedriger als im Cytosol des Karzinomgewebes. Wie bereits erwähnt handelt es sich bei der Probe MG 4c nicht um malignes Gewebe sondern um entzündetes und teilweise nekrotisches Gewebe, was durch die Ergebnisse der Gehalte proteingebundener Elemente bestätigt werden kann. Die Gehalte

von Cr, Mn, Ni, Cu, Zn und Se pro g Protein sind in beiden Gewebearten gleich, einzige Ausnahme ist der Gehalt von Fe, der im Cytosol des inflammatorischen Gewebes deutlich niedriger ist als im Cytosol des Normalgewebes.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich eine Änderung der Stoffwechselprozesse transformierter Zellen des Gastrointestinaltraktes sowohl in einem übersteigerten als auch in einem reduzierten Stoffwechsel, an dem die aufgeführten Spurenelemente beteiligt sind, zeigt, während sich der Stoffwechsel von Geweben vom gleichen histopathologischen Typ nicht unterscheidet. Weiterhin hat sich die Quantifizierung proteingebundener Spurenelemente als sinnvoll erwiesen.

### *5.2.1 Bedeutung des Calciums bei Krebserkrankungen des Gastrointestinaltraktes*

Calcium ist ein essentielles Element, das weder redoxreaktiv ist noch eine signifikante Rolle bei der direkten Enzymkatalyse spielt. Die höchsten Calciumkonzentrationen sind in den Calcium-transportierenden Geweben, wie z.B. im Darm, in der Niere oder in der Placenta zu finden, wobei Calcium in erster Linie über das intestinale Calcium-bindende Protein Calbindin transportiert wird. Calbindin kann in zwei verschiedenen Formen vorliegen, als Calbindin D<sub>9K</sub> und als Calbindin D<sub>28K</sub>, wobei die Konzentration der beiden Proteine in den intestinalen Epithelzellen hormonabhängig durch Vitamin D kontrolliert wird [308]. Neben dem individuell variierenden Ca-Gehalt der Ca-Speicher im endoplasmatischen Retikulum und aufgrund der Abhängigkeit der cytosolischen Calbindinkonzentration vom Hormonstatus des einzelnen Probanden sind die gefundenen, großen Abweichungen der Ca-Gehalte in den Cytosolen zu erklären (siehe Tabelle 5-8). Auffällig ist, dass die Abweichung des Ca-Gehaltes im Cytosol von malignen Geweben unterschiedlicher Probanden wesentlich geringer ist als die Abweichung im Cytosol von gesunden Geweben unterschiedlicher Probanden. Um Aussagen über den veränderten Metabolismus von transformierten Zellen machen zu können, müssen die Ca-Gehalte individuell für jeden Patienten ausgewertet werden und ein Zusammenhang zwischen den Veränderungen, dem Stadium der Krebserkrankung und mit den Funktionen von Calcium und Calcium-bindenden Proteinen hergestellt werden.

Die Hauptfunktion des Calciums ist die Kontrolle des Zellkommunikationsnetzwerkes zwischen extrazellulären und intrazellulären Kompartimenten. Calcium informiert das

Cytoplasma der Zellen, welche Bedingungen außerhalb der Zelle vorherrschen, d.h. Calcium übt eine Signalfunktion bei der Zellaktivierung aus und überträgt die Information von der Membran der aktivierten Zelle auf Rezeptormoleküle innerhalb der Zelle. Man spricht daher bei Calcium von einem Botenstoff zweiter Art. Das wohl bekannteste Calcium-bindende Protein, das an der Zellkommunikation beteiligt ist, ist das Calmodulin [308]. Das monomere Calmodulin hat eine Molekularmasse von ca. 16,7 kDa mit 4 Bindungsstellen für Calcium. Es reguliert eine Vielzahl fundamentaler Zellaktivitäten, so z.B. den zyklischen Nukleotid- und den Glykogenmetabolismus, die intrazelluläre Beweglichkeit, den Calciumtransport, und die Calcium-abhängigen Kinasen. Zudem vermittelt Calmodulin die Aktivierung von intrazellulären Enzymen, wie z.B. die Phosphodiesterase und Phosphorylasekinasen.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass Calmodulin in erhöhten Konzentrationen während der G1/S-Zellteilungsphase einen Anstieg der Proteinsynthese bewirkt. Das lässt darauf schließen, dass Calmodulin für das Zellwachstum und für die Zellproliferation enorm wichtig ist. Eine weitere Funktion des Calmodulins ist seine Mediatorrolle bei der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalübertragung.  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin und die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängigen Enzyme sind essentielle Komponenten der Signalübertragungskaskaden, die in der Regulierung des Zellzyklus und der Zellproliferation involviert sind [309]. Auch die Gentranskription wird von  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin reguliert. Ist das Gleichgewicht gestört, so wird der Zellzyklus und die Zellproliferation beeinflusst - steigt die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration an, so nimmt die Proliferationsrate zu, das Gewebe beginnt zu wuchern. Änderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Cytosol hat auch eine Alterierung des zyklischen Adenosinmonophosphats (c-AMP) zur Folge, das ebenfalls als Botenstoff zweiter Art agiert. Bei Krebserkrankungen des Kolons ist der  $\text{Ca}^{2+}$ -Zufluss durch die zunehmende Aktivierung von  $\text{K}^+$ -Kanälen erhöht, die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nimmt zu. Möglicherweise nimmt auch die Konzentration des cytosolischen Calmodulins in den kolorektalen Krebszellen zu, so wie es für Neuroblastomzellen beschrieben wird [310]. Der cytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt reguliert den Zelltod, hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen führen zum Zelltod, niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen verhindern den Zelltod [311].

Ein auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration einflussnehmender Faktor ist der Anti-Apoptose Regulator BCL-2, der in neoplastischen kolorektalen Zellen in Abhängigkeit von dem Tumorstadium über- bzw. unterexprimiert ist und so zu einer Unterdrückung bzw. zu einer Übersteigerung der Zelltodfunktion durch  $\text{Ca}^{2+}$  führt. Das Tumorzellwachstum

ist demnach Folge einer Störung der Balance zwischen der Proliferationsrate und dem Zelltod [312-315]. Das Ausmaß der Störung spiegelt sich in dem Tumorstadium (Festlegung des Tumorstadiums nach Dukes\*) wieder und kann als Prognosefaktor verwendet werden [316]. Wurden die Ergebnisse der cytosolischen Calciumgehalte mit dem Stadium nach Dukes korreliert, so zeigte sich, dass sich im Stadium Dukes A die Ca-Gehalte in den Cytosolen von gesunden und malignen Zellen nicht signifikant unterschieden. Im Stadium Dukes B konnte ein signifikant ( $p < 0.001$ ) erhöhter Ca-Gehalt im Cytosol von malignen Geweben im Vergleich zum Ca-Gehalt im Cytosol von gesunden Geweben festgestellt werden. Im Stadium Dukes C alterierte der Ca-Gehalt in den Cytosolen der neoplastischen Zellen mit der Tendenz in Richtung signifikanter Abreicherung des Calciums im Cytosol der malignen Gewebe im Vergleich zum Normalgewebe (siehe Abbildung 5-8).

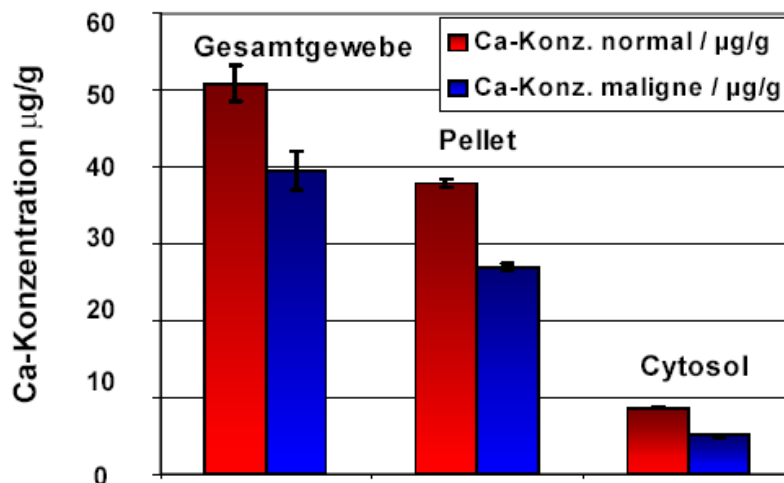


Abb. 5-9 Calciumgehalt im Gesamtgewebe, Pellet und Cytosol der Probe 2c (Stadium: T3, N1, MX, Dukes C; Differenzierungsgrad: G3)

Sollte sich diese Korrelation über eine große Anzahl von Proben verifizieren lassen, so könnte der cytosolische Ca-Gehalt in Verbindung mit der Stadieneinteilung nach Dukes als molekularer Marker zur Prognose von Überlebenschancen der an kolorektalem Krebs erkrankten Patienten eingesetzt werden.

\* Stadieneinteilung nach Dukes: Dukes A (T1-T2, N0, M0) ; Dukes B (T3-T4, N0, M0); Dukes C (jedes T, N1-N3, M0)

Ein weiteres in Bezug auf Krebserkrankungen des Kolons interessantes Ca-bindendes Protein ist das E-Cadherin, das sich auf der Zelloberfläche von Epithelzellen befindet [317,318]. Die Funktion oder die Bildung von E-Cadherinen ist in den meisten Kolonkarzinomen gestört, so dass sie zum Metastasierungsprozess beitragen. E-Cadherin (Cadherine sind gewebespezifisch, der Index E steht für epitheliale Zellen) ist ein über die Zellmembran in das Cytoplasma hineinreichendes Glykoprotein, das Ca-abhängig die Zellmembran stabilisiert und für die interzelluläre Adhäsion (Zell-Zell Adhäsion) sorgt. Es ist über ein Bindungsmolekül, dem  $\beta$ -Catenin, mit dem Zellskelett verbunden. Wird  $\beta$ -Catenin durch Tyrosinkinasen verändert, oder fehlt E-Cadherin auf der Zelloberfläche von neoplastischen Epithelzellen, so können die Zellen nicht mehr miteinander verknüpft werden, die Zell-Zell-Verbindungen lösen sich und die malignen Zellen gelangen über das Lymph- bzw. Blutsystem in andere Bereiche des Organismus, wo sie Metastasen ausbilden können. Die Funktion der Zelladhäsionsmoleküle beschränkt sich nicht nur auf den Zusammenhalt von Zellen, sondern sie tragen auch zum intrazellulären Informationsaustausch bei. Das  $\beta$ -Catenin als Verbindungsmolekül zwischen Zellmembran und Zellskelett hat neben der Zellstabilisierung eine Signalübermittlungsfunktion, indem es mit weiteren Regulatormolekülen eine Verbindung eingeht, wie z.B. mit  $\alpha$ -Catenin oder mit APC, dem Produkt eines Tumorsuppressorgens. Die Konzentration von  $\beta$ -Catenin wird durch Conductin reguliert, indem Conductin das Enzym GSK3 $\beta$  (Serin/Threonin-Kinase) veranlasst  $\beta$ -Catenin zu phosphorylieren. Anschließend wird das  $\beta$ -Catenin in sogenannte Proteasomen (Proteinpartikel mit multikatalytischer Funktion) eingeschlossen und abgebaut. Erhält die Zelle ein sog. Wnt-Signal über Transmembranrezeptoren so wird das GSK3 $\beta$ -Enzym blockiert und das  $\beta$ -Catenin stabilisiert.  $\beta$ -Catenin wiederum bindet im Zellkern an Transkriptionsfaktoren aus der LEF-1/TCF-Familie. In Krebszellen wird trotz fehlendem Wnt-Signal das  $\beta$ -Catenin stabilisiert und es kommt zu einer unregulierten Transkription von z.B. dem Onkogen c-Myc. Dadurch gerät das Zellwachstum außer Kontrolle. Bei Fehlen oder einer Funktionsstörung der Ca-abhängigen E-Cadherine nach maligner Transformation nimmt der Bedarf an Calcium zur Stabilisierung der Zell-Zell-Adhäsion ab, was sich beim Vergleich der Ca-Konzentrationen im Pellet von malignen Geweben mit den Ca-Konzentrationen im Pellet von gesunden Geweben widerspiegelt (siehe Abbildung 5-9). Eine Stadiumabhängigkeit wie es im Fall des cytosolischen Ca-Gehaltes der Fall ist, konnte aufgrund der zu geringen An-

zahl der Proben (N = 5) nicht nachgewiesen werden und müsste gegebenenfalls verifiziert werden. Die Vermutung, dass Calcium an der Tumorprogression beteiligt ist, wird durch die vorliegenden Ergebnisse untermauert.

#### *5.2.2 Die Bedeutung des Nickels bei der Tumorprogression gastrointestinaler Neoplasien [302]*

Im Gegensatz zu dem Element Chrom ist die Verteilung von Nickel auf das Pellet und das Cytosol nach maligner Transformation verändert. Während der Anteil des cytosolischen Nickelgehaltes rund 50% des Gesamtnickelgehaltes in gesunden Geweben des Gastrointestinaltraktes beträgt, erhöht sich der Anteil des cytosolischen Nickelgehaltes auf ca. 85% des Nickelgesamtgehaltes in neoplastischen Zellen. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass sich die Bindungspartner von Nickel während der Tumorgenese ändern. Möglicherweise sind Bindungspartner, die sich auf der Zelloberfläche befinden, wie z.B. das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1), das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül-1 (VCAM-1) und das endotheliale Leukozyten Adhäsionsmolekül (ELAM-1), bzw. höher molekulare Bindungspartner unterexprimiert oder fehlen gänzlich, so dass der größte Teil des Nickels an entsprechende Partner im Cytosol gebunden ist. Ein wichtiger Aspekt dieser Umverteilung ist, dass möglicherweise der erhöhte cytosolische Nickelgehalt dazu führt, dass Nickel an der Tumorprogression beteiligt ist, da die durch Nickel induzierte Karzinogenese entscheidend von der intrazellulären Nickelkonzentration abhängig ist [319]. Die Mechanismen der nickelinduzierten Karzinogenese sind vielfältig. Neben chromosomalen Abberationen, die Nickel verursachen kann, ist der Einfluss von Nickelverbindungen auf Transkriptionsfaktoren (Veränderungen in den Genexpressionen von z.B. Thrombospondin, das in hohen Dosen das Wachstum von Blutgefäßen unterdrückt, durch cytosolisches Nickel jedoch runterreguliert wird oder von HIF-1, das die Transkription von Genen, die für den Glukosetransport und die Glykolyse kodieren, reguliert, wobei durch Nickel in Anwesenheit von Sauerstoff die Konzentration an glykolytischen Enzymen herunterreguliert wird oder von NF- $\kappa$ B, das in der Expression von Adhäsionsmolekülen, in der Apoptose und in Entzündungsprozessen involviert ist, unter Zusatz von Nickel eine Abnahme der Expression der Adhäsionsmoleküle aufgrund zunehmender Bindung von NF- $\kappa$ B an die DNA erfolgt), die Hemmung

von Signalwegen und der DNA-Reparatur, der Einfluss von Nickel auf den Calcium-metabolismus, die Bindung von Nickel an bestimmte Proteine, die dadurch ihre Regulatoreigenschaften verlieren, und die Rolle von Nickel bei der oxidativen Schädigung der DNA von Interesse [302,320-322]. Um konkretere Aussagen über die Bedeutung des Nickels bei der Tumorprogression gastrointestinaler Tumore machen zu können, sollten alle in vivo vorliegenden Bindungspartner von Nickel, sowohl in gesunden als auch in malignen Geweben und den entsprechenden Zellkompartimenten, charakterisiert und identifiziert werden.

An dieser Stelle wird nur kurz der Einfluss von Nickel auf freies, cytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  behandelt. Wie bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt, hat eine Veränderung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels im Cytosol eine Änderung des Zellwachstums, der Zelldifferenzierung und der Apoptose zur Folge. In in vitro Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch eine nickelinduzierte Zelltransformation die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit gleichzeitigem Anstieg der *Cap43* Expression (die Expression von *Cap43* wird speziell durch Nickel induziert) anstieg [323]. Der Mechanismus ist allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist fraglich, ob der in dieser Arbeit beobachtete Anstieg des cytosolischen Calciums im Stadium Dukes B seine Ursache in dem Anstieg des cytosolischen Nickelgehaltes hat. Weitaus wichtiger scheint zu sein, dass Nickel als Blocker von Calciumkanälen fungiert, was zunächst zu einer Abnahme des intrazellulären Calciumgehaltes führt, wobei die Abnahme durch den Anstieg von freiem  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern (endoplasmatisches Retikulum) kompensiert wird, indem Nickel die Abgabe von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern über die Einbindung von Zellrezeptoren evoziert [324]. In 80% der untersuchten Fälle konnte eine Korrelation zwischen dem cytosolischen Nickel- und Calciumgehalt festgestellt werden, was darauf schließen lässt, dass Nickel den Calcium-abhängigen Signalweg, die Calcium-abhängige Apoptose, die Zellteilungsrate und die Zelldifferenzierung beeinflusst.

### **5.3 Bedeutung des oxidativen Stresses bei der Karzinogenese kolorektaler Krebserkrankungen**

Als Konsequenz des aerobischen Metabolismus werden permanent geringe Gehalte an reaktiven Sauerstoffspezies, wie Hydroxylradikale, Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Lipidperoxide und Sauerstoff im Singulettzustand, im Organismus erzeugt [325]. Die Hauptquellen der Superoxidanionen sind die Atmungskette der Mitochondrien und das endoplasmatische Retikulum. Alle biologischen Systeme, die  $O_2^{\cdot-}$  erzeugen, generieren automatisch  $H_2O_2$ , das im Gegensatz zum Superoxidanion zellmembrangängig ist. Innerhalb der Zellen kann es unter der katalytischen Wirkung von  $Fe^{2+}$  und  $Cu^+$  gemäß der Fenton/Haber-Weiss-Reaktion zu einer Autoxidation des Superoxidanions und des Wasserstoffperoxids kommen [326]. Dabei werden hochreaktive Hydroxylradikale erzeugt. Als Begleitprodukte können auch hochreaktive Metallooxo- und Metalloperoxospezies entstehen. Neben den essentiellen Elementen Eisen und Kupfer sind auch Nickel, Chrom, Cadmium und weitere, toxisch wirkende Metalle wie Blei, Arsen und Quecksilber an der Hydroxylbildung beteiligt. Wasserstoffperoxid hat in geringen Konzentrationen in Kombination mit Glutathion, indem der intrazelluläre Glutathiongehalt bei Anwesenheit von  $H_2O_2$  reduziert wird, eine Funktion in der intra- und extrazellulären Signalübertragung (Botenstoff zweiter Art). Die Funktion als Botenstoff bei der intrazellulären Signalübertragung besteht in der Aktivierung der Apoptose [327]. Aber nicht nur die Apoptose wird durch Sauerstoffspezies aktiviert, sondern auch ein Wachstumsstillstand initiiert. So z.B. hemmt Sauerstoff die Proliferation von Lymphozyten und Fibroblasten (Vorstufe spindelförmiger Zellen des Bindegewebes) [328,329]. Sauerstoffspezies sind aber auch in der Stimulierung des Immunsystems und in der Abwehr von Mikroorganismen involviert. Werden reaktive Sauerstoffspezies in höheren Konzentrationen erzeugt, so haben extra- und intrazelluläre Antioxidantien, wie die Superoxiddismutase (SOD), die Glutathionperoxidase (Gpx), die Catalase (CAT) und die Thioredoxinreduktase, die Aufgabe diese wieder in ihre weniger reaktive Form zu reduzieren [330]. Diese enzymatisch wirkenden Antioxidantien werden dem Radikalabwehrsystem der 1. Art zugeordnet. Zu den nicht enzymatischen Antioxidantien gehören Vitamin C, Vitamin A, Vitamin E, Glutathion (GSH) und  $\beta$ -Carotin, die dem Radikalabwehrsystem der 2. Art zugeordnet werden. Kommt es zu einem Ungleichgewicht der Redoxreaktionen, so



sind die betroffenen Zellen dem sog. oxidativen Stress ausgesetzt. Selbst bei geringer Abweichung der physiologischen Aktivität der antioxidativ wirkenden Enzyme kommt es durch reaktive Sauerstoffspezies zu einer Zellschädigung oder zum Zelltod. Die Art der Zellschädigung kann vielfältig sein [321,322,325,327,330,331]. Neben strukturellen Schädigungen der DNA, die in Anwesenheit von Übergangsmetallen in Form von DNA-Strangbrüchen, Basenhydroxylierungen und Baseninsertionen auftreten, was zu Basensequenzmutationen oder Mutationen der Aminosäureeinheiten oder dem Zelltod führt, kann auch die Signalübertragung durch Botenstoffe verschiedener Klassen, wie Wachstumsfaktoren, Prostaglandine, Transkriptionsfaktoren (NF- $\kappa$ B, AP-1, p53, Fos, Jun) und Stickstoffoxid, gestört werden [330,332]. Weitere redox-sensitive Signalmoleküle sind  $\kappa$ B (Inhibitorprotein- $\kappa$ B) und Proteine der p21<sup>ras</sup> Familie [333,334].

Im Zusammenhang mit der Karzinogenese können durch oxidativen Stress chromosomale Veränderungen zusätzlich zu Punktmutationen hervorgerufen werden, die ihrerseits wiederum in einer Inaktivierung oder in einem Allelverlust eines mutierten Protoonkogens oder Tumorsuppressorgens involviert sein können. Weiterhin können durch reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies die Aktivität von Proteinen und Genen, die Zellproliferation, die Zelldifferenzierung und der Zelltod reguliert werden. So kann z.B. Wasserstoffperoxid die Transkription von c-jun stimulieren und die mitogen-aktive Proteinkinase aktivieren [335]. Die Aktivierung und Deaktivierung von Peptiden und Proteinen können über unterschiedliche Mechanismen erfolgen, z.B. über die Oxidation/Reduktion oder über die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Serinen, Threoninen, Tyrosinen oder Histidinen. Redoxmodifikationen von Proteinen erfolgen hauptsächlich an Cysteinen, z.B. durch S-Nitrosation, oder durch Oxidation des Thiois oder Reduktion der Disulfidbindungen. Der Redoxstatus des Proteins ist maßgeblich für dessen molekulare Konformation und Funktion verantwortlich. Das empfindliche Redoxsystem wird hauptsächlich durch das Ref-1 Protein reguliert. Gleichzeitig übernimmt es als Mitglied der Klasse der II A/P Endonukleasen die Reparatur von oxidativ verursachten DNA-Läsionen und nimmt damit eine Schlüsselfunktion bei der Pathogenese verschiedener durch oxidativen Stress verursachter Erkrankungen, wie z.B. bei dem hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC), ein.

Neben der Prävention von Schädigungen durch oxidativen Stress ist die Prävention der Lipidperoxidation ein essentieller Prozess in aerobischen Organismen, da neben

den reaktiven Sauerstoffspezies auch die Lipidperoxidaionsprodukte DNA-Schädigungen hervorrufen und Proteine wie die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase hemmen können. Eine ansteigende Lipidperoxidation verbunden mit einer abnehmenden Antioxidantienunterstützung führt zur Generierung von Epoxiden, die spontan mit den nukleophilen Zentren in den Zellen reagieren und dabei kovalente Bindungen zur DNA, RNA und Proteinen eingehen. Solche Reaktionen können cytotoxische, allergische, mutagene und/oder karzinogene Wirkungen haben. Die Pathogenese kolorektaler Krebserkrankungen korreliert mit einem Anstieg der Lipidperoxidation in malignen Geweben verglichen mit der in gesunden Geweben [336-339].

Ein für die Therapie der kolorektalen Krebserkrankung wichtiger Aspekt ist, dass der intrazelluläre Anstieg von Glutathion und Glutathionperoxidase für die Resistenz gegenüber Strahlen- und/oder Chemotherapie verantwortlich gemacht wird [340-343]. Während zahlreiche Literaturstellen bezüglich des Redoxstatus von Patienten mit diversen Krebserkrankungen in Form von Aktivitätsmessungen der am Redoxsystem beteiligten Enzyme in Blutseren vorliegen, sind nur wenige Publikationen erschienen, die Ergebnisse von Enzymaktivitätsmessungen in Gewebeproben zeigen. Um Aufschluss über die Korrelation von Redoxstatus und Karzinogenese kolorektaler Tumore zu bekommen, sollen im weiteren die Ergebnisse der Enzymaktivitätsbestimmungen der Glutathionperoxidase und der Superoxiddismutase in Gewebeproben vorgestellt werden.

### *5.3.1 Aktivität der Glutathionperoxidase (Gpx) in malignen und normalen Geweben*

30–40% der bekannten selenhaltigen Proteine sind cytosolische Glutathionperoxidasen (Gpx). Sie enthalten eine einzelne Selenocysteineinheit in jeder der vier identischen Untereinheiten. Diese Selenocysteineinheiten sind essentiell für die Enzymaktivität [344]. Die Molmasse der Gpx beträgt ca. 80 kDa, wobei fünf Isoformen der Glutathionperoxidase bisher identifiziert werden konnten (Gpx5 konnte nur in der Epididymis (Nebenhoden) der Maus gefunden werden). Ihre Konzentration und ihre Verteilung hängt von der Gewebeart ab. Die Isoform Gpx1 katalysiert die Reduktion von Hydroperoxiden (Fettsäureperoxide und  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) durch Glutathion zu Alkohol und oxidiertem Glutathion. Gpx4 reduziert direkt Phospholipidhydroperoxide, Fettsäurehydroperoxide und Cholesterolhydroperoxide, die in peroxidierten Membranen und

oxidierten Lipoproteinen generiert werden. In Cytosolen der gastrointestinalen Gewebe sind die Isoformen Gpx1, Gpx2, Gpx3 und Gpx4 enthalten. Bei Gpx3 handelt es sich um eine extrazelluläre Glutathionperoxidase.

Die aus 5 cytosolischen Gewebeprobepaaren (jeweils malignes und gesundes Gewebe) gemittelten Aktivitäten der Glutathionperoxidase wurden mit  $1.20 \pm 0.58$  U/g Protein in den Cytosolen der malignen Gewebe und mit  $3.12 \pm 4.32$  in den Cytosolen der Normalgewebe ermittelt. Eine statistisch positive Korrelation ( $p < 0.001$ ) wurde für den Selengehalt ( $\mu\text{g Se/g Protein}$ ) und der Gpx-Aktivität (U/g Protein) gefunden. Aufgrund der extrem individuell variierenden Selenkonzentrationen und Gpx-Aktivitäten werden im folgenden die Ergebnisse für jedes Gewebeprobenpaar einzeln aufgeführt. Wie in Abbildung 5-10 zu erkennen ist, ist in 3 Fällen sowohl der Selengehalt als auch die Glutathionperoxidaseaktivität in den Cytosolen der Normalgewebe höher als in den Cytosolen der neoplastischen Gewebe. In einem Fall (Probe 3c) ist das Verhältnis reziprok. Unter Berücksichtigung des Malignitätsgrades und des Tumorstadiums können die ermittelten Ergebnisse mit Literaturdaten untermauert werden, da unabhängig von der Art der Krebserkrankung (Brust- bzw. Lungen-, bzw. Kolonkrebs, entsprechend der Krebserkrankungen, die mit der Pathogenese durch reaktive Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht werden) gezeigt werden konnte, dass sowohl die Selengehalte als auch die Gpx-Aktivitäten vom Tumorstadium bzw. vom Differenzierungsgrad der transformierten Zellen abhängig sind [349-351]. Während in Stadien Dukes A und B (entsprechend Tumorstadium I – IIIA) in Verbindung mit geringem bis mittleren Malignitätsgrad (G1-G2) die Selengehalte und die Gpx-Aktivitäten in den malignen Geweben signifikant höher sind als in den gesunden Geweben (Probe 3c), sind sie ab dem Tumorstadium Dukes C (entsprechend Tumorstadium IIIB – IV) und hohem Malignitätsgrad (G2,5 – G3) im neoplastischen Gewebe niedriger als in dem korrespondierenden Normalgewebe (Probe 1c, 2c, 5c).

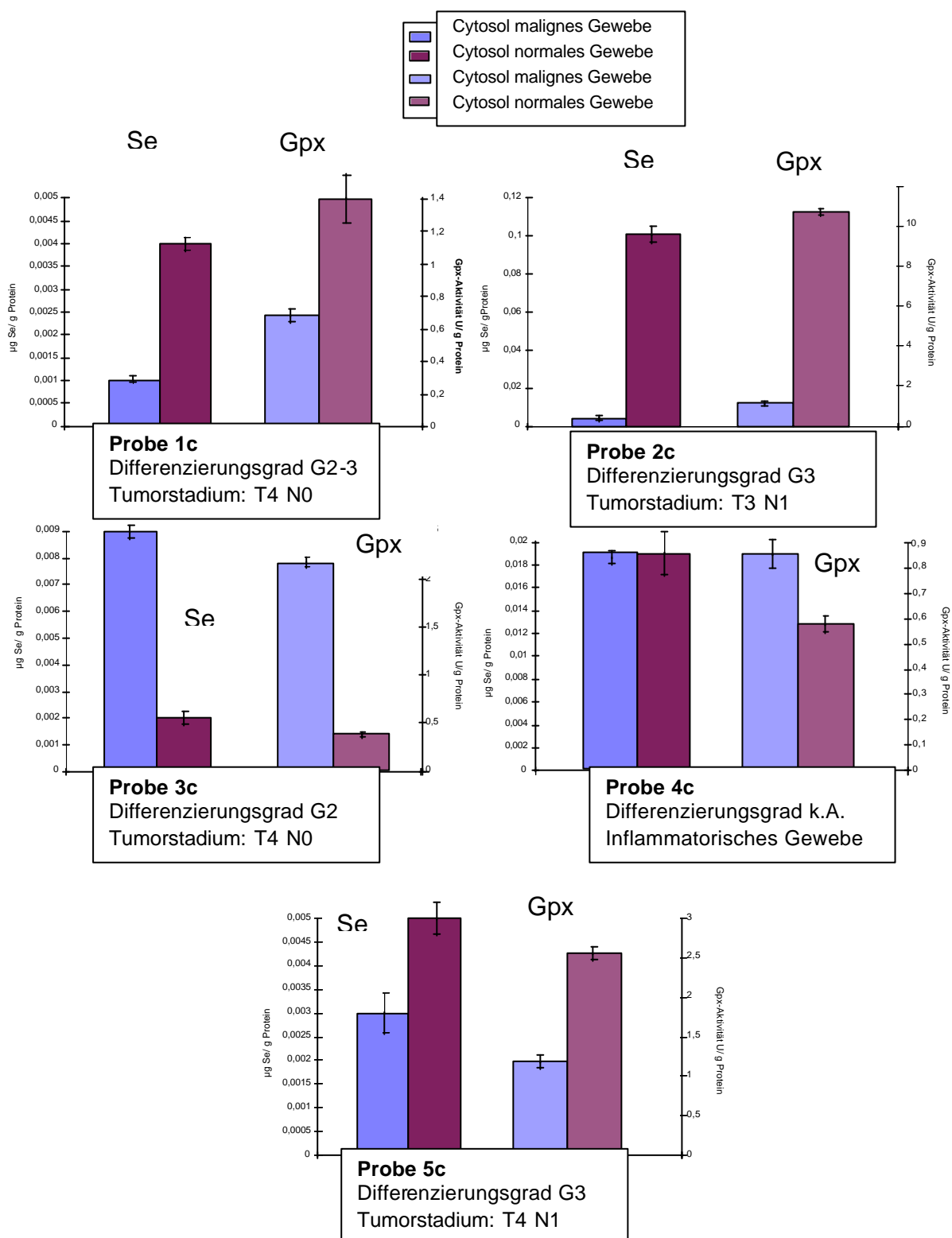


Abb. 5-10 Selengehalte und Glutathionperoxidase-Aktivitäten in den Cytosolen von malignen und normalen Geweben des Intestinaltraktes

Gleichzeitig konnte ein starker Anstieg der Lipidperoxidation in den kolorektalen Krebsgeweben im Vergleich zu den gesunden Geweben festgestellt werden [351]. Das führt dazu, dass DNA-Schädigungen und Funktionsstörungen der Signalübertragung mit zunehmendem Malignitätsgrad bei ansteigender Lipidperoxidation und abnehmender Gpx-Aktivität zunehmen. Bei der Probe 4c handelt es sich bei dem als Tumorgewebe bezeichneten Gewebe nicht um ein malignes sondern um ein inflammatorisches Gewebe. Der Selengehalt in dem Cytosol des Normalgewebes unterscheidet sich nicht signifikant von dem im Cytosol des Nekrosegewebes. Die Gpx-Aktivität im Cytosol des inflammatorischen Gewebes ist allerdings signifikant höher als im gesunden Gewebe. Ein Ungleichgewicht der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies spielt auch bei entzündlichen Prozessen eine Rolle, was sich in einer Erhöhung der Enzymaktivitäten des antioxidativen Systems widerspiegelt [345-348]. Entzündliche Prozesse können ebenfalls eine Zunahme von DNA-Schädigungen hervorrufen, indem die vermehrt gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies Prokarzino-gene wie aromatische Amine, Aflatoxine, Östrogene, Phenole und polyzyklische Aromaten chemisch so verändern, dass sie DNA-Schädigungen verursachen können [335].

### *5.3.2 Aktivität der Superoxiddismutase (SOD) in malignen und normalen Geweben*

Die Superoxiddismutase (SOD) ist ein Antioxidantienenzym, das die Dismutation der hochreaktiven Superoxidanionen zu  $O_2$  oder zu dem weniger reaktiven  $H_2O_2$  katalysiert. Im menschlichen Organismus koexistieren drei verschiedene Formen der SOD: die cytosolische Cu/Zn-SOD, die mitochondriale Mn-SOD und die extrazelluläre SOD (EC-SOD). Mn-SOD hat eine molare Masse von 96 kDa. Ihre Konzentration ist in den verschiedensten Tumorzellen reduziert. Es wird angenommen, dass das Gen, das für die Expression von Mn-SOD verantwortlich ist, ein Tumorsuppressorgen ist. Der Mechanismus der Unterdrückung der Krebsentstehung durch Mn-SOD ist allerdings noch nicht bekannt [327,330]. Die Cu/Zn-SOD enthält zwei identische Untereinheiten von ca. 32 kDa. Jede dieser Untereinheiten enthält einen Metallcluster (aktives Zentrum), wobei ein Kupfer- und ein Zinkatom über eine Histidineinheit miteinander verknüpft sind. Das Konzentrationsverhältnis von Mn-SOD / Cu/Zn-SOD ist 2:1. Die extrazelluläre SOD ist ein tetrameres Cu und Zn enthaltendes Glykoprotein, das in den

interstitiellen Bereichen der Gewebe und in extrazellulären Fluiden gefunden wird. Die Konzentration der EC-SOD ist in den interstitiellen Bereich vernachlässigbar klein. Die mittlere SOD-Aktivität, berechnet für die Proben 1c-5c, beträgt  $0.41 \pm \text{U/g}$  Protein im Cytosol der malignen Gewebe und  $2.16 \pm 3.0 \text{ U/g}$  Protein im Cytosol der normalen Gewebe. Es konnte eine signifikante Korrelation zwischen der SOD-Aktivität und den Cu/Zn-Gehalten sowie den Mn-Gehalten ermittelt werden ( $p < 0.01$ ). Damit liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der ermittelten SOD-Aktivität um die Aktivität der beiden Formen der SOD handelt. Da die individuellen SOD-Aktivitäten starken Schwankungen unterlagen, wurden, wie bereits bei der Betrachtung der Gpx-Aktivitäten verfahren, die Unterschiede einzeln betrachtet (siehe Abbildung 5-11). Aufgrund der extrem hohen Zn-Gehalte und SOD-Aktivitäten in dem Cytosol des normalen Gewebes der Probe 2c im Vergleich zu denen in dem korrespondierenden Cytosol des malignen Gewebes (Faktor 30) wurden die Ergebnisse (in Form eines Balkendiagramms) getrennt voneinander abgebildet. Insgesamt zeigte sich auch hier eine Abhängigkeit von dem Malignitätsgrad bzw. des Tumorstadiums. Die SOD-Aktivität ist in den Cytosolen der malignen Zellen mit hohen Malignitätsgraden (G2,5 bis G3) – dabei handelt es sich um die Proben 1c, 2c und 5c – sind deutlich niedriger als in den Cytosolen der korrespondierenden Normalgewebe. Bei Probe 3c, mit einem Malignitätsgrad von G2, ist das Verhältnis wiederum reziprok. Die ermittelten Ergebnisse sind mit den in der Literatur gefundenen entsprechend den pathologischen Befunden korrelierbar [351]. Die SOD-Aktivität in dem Cytosol des inflammatorischen Gewebes der Probe 4c unterscheidet sich nur unwesentlich von der, die in dem korrespondierenden Cytosol des Normalgewebes gefunden wurde.

Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln festgestellt, korrelieren die Bestimmungsp Parameter, wie z.B. die Se-Gehalte, in Geweben mit denen im Blut. Auch im Falle der SOD-Aktivität ist eine Korrelation erkennbar. Während die SOD-Aktivitäten in Erythrozyten von Patienten mit gastrointestinalen Krebserkrankungen gegenüber dem Normalkollektiv erhöht sind, nimmt sie im Cytosol von malignen Geweben, entsprechend der vorgestellten Ergebnisse, ab [352]. Besonders deutlich ist die Zunahme der SOD-Aktivität in Erythrozyten von Patienten mit einem Rektumkarzinom, was ebenfalls mit den vorgestellten Ergebnissen korreliert (bei Probe 2c handelt es sich um eine Rektumprobe, in der die SOD-Aktivität in dem Cytosol des malignen Gewebes um den Faktor 30 vermindert ist).

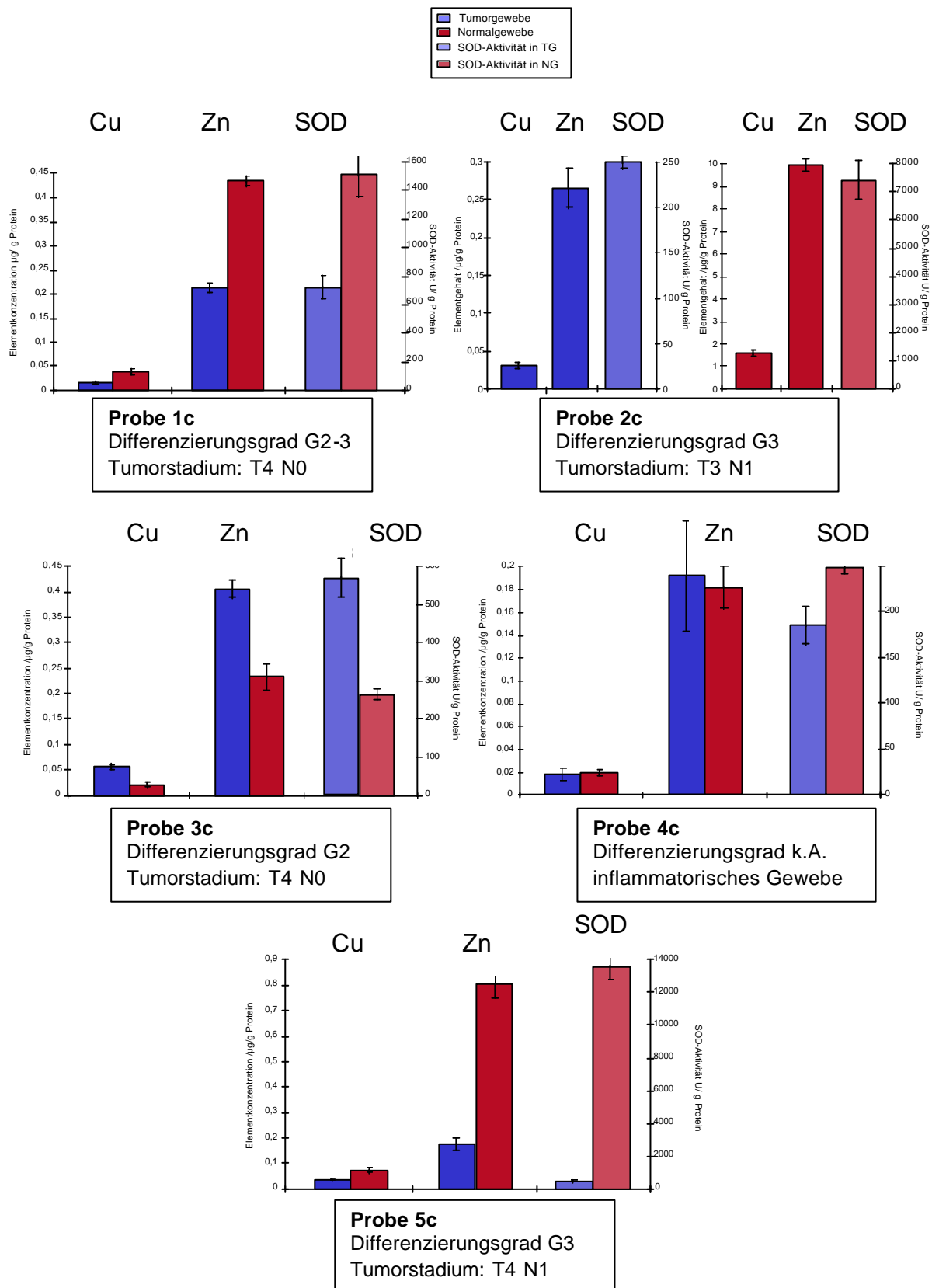


Abb. 5-11 Kupfer-, Zinkgehalte und Superoxiddismutase-Aktivitäten in den Cytosolen von malignen und normalen Geweben des Intestinaltraktes

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der Redoxstatus in malignen Geweben vom Tumorstadium bzw. vom Malignitätsgrad abhängig ist, was anhand der Ergebnisse der Enzymaktivitätsmessungen in Verbindung mit Literaturdaten gezeigt werden konnte. Es sei nochmals erwähnt, dass dies in erster Linie für Krebsarten gilt, die mit der Pathogenese durch reaktive Sauerstoffspezies in Verbindung gebracht werden. Eine derartige Korrelation ist bisher nicht in Publikationen beschrieben worden, obwohl die Ergebnisse darauf hindeuten. Die Ergebnisse sollten jedoch durch eine größere Anzahl an Proben verifiziert werden.

#### **5.4 Elementspeziesanalyse im Cytosol von malignen und normalen Geweben mittels SEC/ICP-MS**

Wie bereits im experimentellen Teil dieser Arbeit erwähnt, wurde die Optimierung der beiden verwendeten Trennverfahren im Hinblick auf die Analyse von Nickelspezies durchgeführt. Mit Hilfe der SEC/ICP-MS-Kopplung wurden zusätzlich die Spezies der Elemente Mn, Cu, Zn, Cd, Pb, Zn, V, As, Se, Mo, Sn und J analysiert. Zur Ermittlung des selektiven Permeationsbereichs der verwendeten Säule und zur Massenkali-brierung wurden 6 Proteinstandards (siehe Kapitel 3.4.3.1) mit bekannten Molmas-sen UV-spektrometrisch detektiert. Der Permeationsbereich wurde mit 4-35 kDa er-mittelt. Wird das Chromatogramm von einem Cytosol eines Normalgewebes mit dem eines Tumorgewebes verglichen, so zeigt sich ein deutlicher Unterschied bei einer Retentionszeit von 3500-4000 s. In diesem Bereich konnten UV-aktive Spezies im Normalgewebe detektiert werden, die im Cytosol des malignen Gewebes in geringe-ren Konzentrationen vorlagen bzw. gar nicht detektierbar waren (siehe Abbildung 5-11).



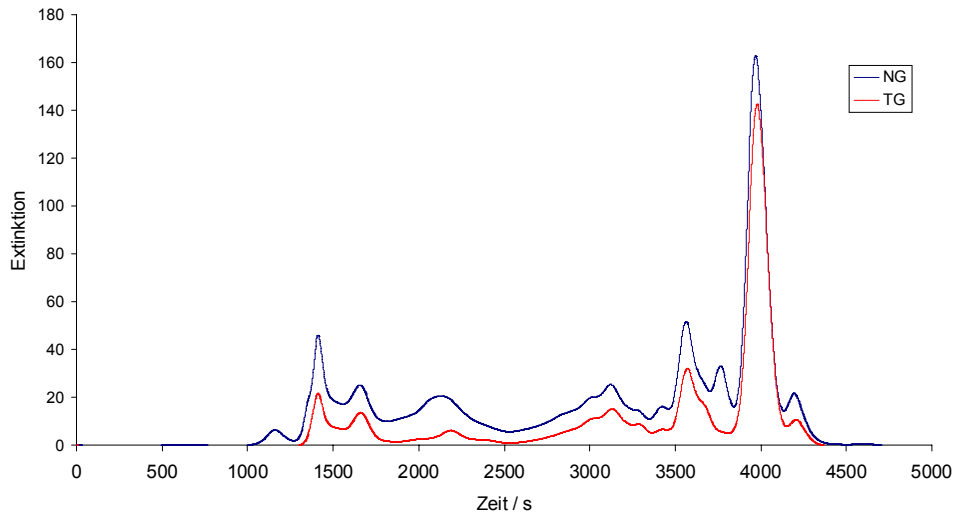


Abb. 5-12 Chromatogramme von einem Cytosol eines Normalgewebes (NG) und eines malignen Gewebes (TG); UV-Detektion bei 254 nm

Um Fehlinterpretationen bei der Speziesanalyse mittels SEC/ICP-MS durch spektrale Interferenzen zu vermeiden, wurden mehrere Isotope eines Elementes detektiert. In Tabelle 5-11 sind die entsprechenden Isotope der analysierten Elemente aufgelistet.

Tab. 5-11 Detektierte Elementisotope (in Klammern natürliche Häufigkeit)

<i>Element</i>	<i>Isotop</i>
<b>V</b>	V <sup>51</sup> (99,75 %)
<b>Mn</b>	Mn <sup>55</sup> (100 %)
<b>Ni</b>	Ni <sup>58</sup> (68,27%); Ni <sup>60</sup> (26,10 %)
<b>Cu</b>	Cu <sup>63</sup> (69,17 %) ; Cu <sup>65</sup> (30,83 %)
<b>Zn</b>	Zn <sup>64</sup> (48,6 %) ; Zn <sup>66</sup> (27,9 %)
<b>As</b>	As <sup>75</sup> (100 %)
<b>Se</b>	Se <sup>80</sup> (49,7 %) ; Se <sup>82</sup> (9,2 %)
<b>Mo</b>	Mo <sup>96</sup> (16,50 %) ; Mo <sup>98</sup> (23,75 %)
<b>Cd</b>	Cd <sup>112</sup> (24,07 %) ; Cd <sup>114</sup> (28,86 %)
<b>Sn</b>	Sn <sup>118</sup> (24,22 %) ; Sn <sup>120</sup> (32,59 %)
<b>J</b>	J <sup>127</sup> (100 %)
<b>Pb</b>	Pb <sup>206</sup> (23,6 %) ; Pb <sup>208</sup> (52,3 %)

Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte in erster Linie qualitativ oder semi-quantitativ über Peakflächenberechnungen. Zur Charakterisierung der elementspezifischen Unterschiede zwischen den Cytosolen der Normalgewebe des Intestinaltrak-

tes und den Cytosolen der Tumorgewebe wurden die Chromatogramme der Cytosole der Proben 1c - 5c und 10c - 15c ausgewertet.

#### 5.4.1 Vanadiumspezies im Cytosol von kolorektalen Humangeweben

In dem Molmassenbereich von 4 - 35 kDa wurde eine Vanadiumspezies mit einer molaren Masse zwischen 5,0 – 5,5 kDa sowohl im Cytosol des gesunden als auch im Cytosol des malignen Gewebes gefunden. Es konnte in allen untersuchten Proben kein quantitativer Unterschied zwischen dem Gehalt der Vanadiumspezies im Cytosol des gesunden und dem Cytosol des malignen Gewebes festgestellt werden. Die individuellen Gehalte der Vanadiumspezies variierten um den Faktor 1,5.

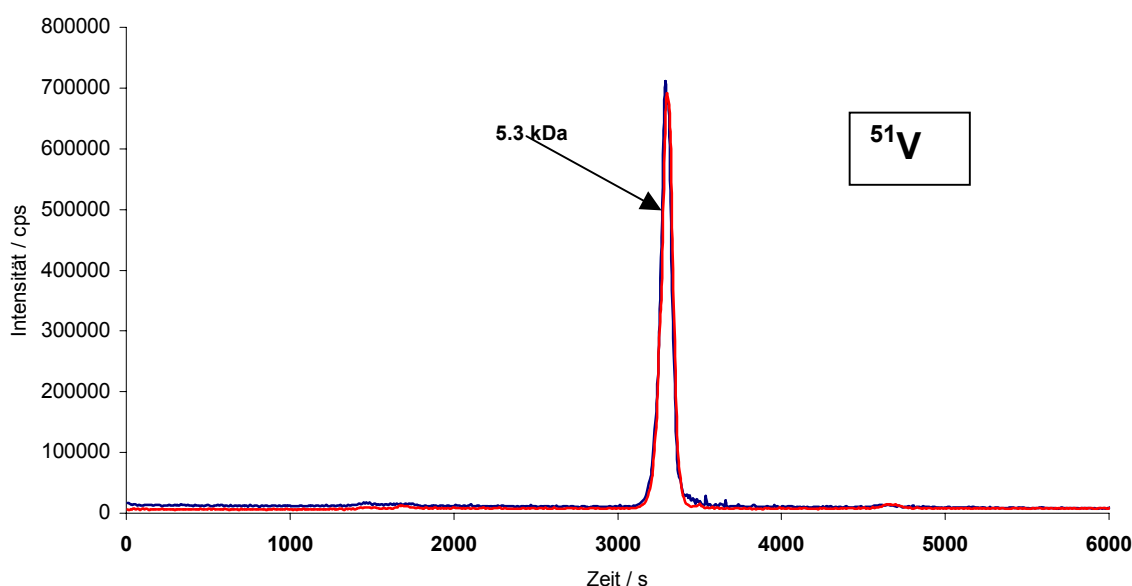


Abb. **5-13** Vanadiumspezies bei 5.3 kDa im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 10c; Trennbereich 4 – 35 kDa

Vanadium kommt in biologischen Systemen hauptsächlich in der Oxidationsstufe IV (Vanadyl) oder V (Vanadat) vor, wobei das Vanadyl stärkere Bindungen mit Biomolekülen ausbildet als das Vanadat [353]. In Anwesenheit von Sauerstoff wird das Vanadyl sehr schnell zu Vanadat oxidiert. Vanadium ist ein essentielles Element, das zum normalen Wachstum von Tieren benötigt wird. Da durch die tägliche Zufuhr von Vanadium über die Nahrung kein Vanadiumdefizit im menschlichen Organismus auf-

tritt, ist die Essentialität des Vanadiums für den Menschen noch nicht vollständig geklärt. In tierexperimentellen Versuchen zeigte sich, dass bei einem Vanadiumdefizit der Cholesterol- und Triglyceridspiegel im Plasma ansteigt. Vanadium stimuliert dabei die Oxidation von Phospholipiden und senkt die Cholesterinsynthese durch Hemmung der Squalensynthese (Enzymsystem in der Leber). Vanadium interagiert mit ATPasen, da Vanadat(V) kompetitiv zum Phosphat in dessen Stoffwechsel durch Stimulierung oder Inhibierung von Enzymen eingreifen kann [354]. Obwohl Vanadium möglicherweise ein essentielles Element ist und therapeutisch eingesetzt wird, z.B. als Cytostatika in Form von Peroxovanadat(V)-Komplexen oder als Antidiabetika (aufgrund der insulinartigen Wirkung von Vanadiumverbindungen), sind Untersuchungen zur Elementspeziesanalytik des Vanadiums rar [355,356]. Durch Radio-tracerversuche an Ratten und ENDOR-Spektroskopie (Electron Nuclear Double Resonance) konnten mehrere hochmolekulare Bindungspartner des Vanadiums identifiziert werden, das Transferrin, das Ferritin, die D-Xylose-Isomerase und die niedermolekulare Vanadiumspezies Nephrocalcin, ein Glykoprotein das die Steinbildung in den Nierenkanälchen hemmt [354,357]. Mittels Anionenaustauschchromatographie und Gelfiltration konnte eine weitere niedrig molekulare Fraktion in einem Molmassenbereich von 1 - 10 kDa unabhängig von der Gewebeart (Niere, Lunge, Leber, Milz und Hoden) detektiert werden [357]. Die gleiche Fraktion konnte auch im Urin der Ratten nachgewiesen werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den vorgestellten Ergebnissen der Vanadiumspeziesanalyse im Cytosol humaner Gewebeproben, die auch nach maligner Transformation weder einen qualitativen noch einen quantitativen Unterschied zeigten. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich entweder um ein metabolisches Endprodukt oder um eine ubiquitär in tierischen und humanen Organismen vorkommende Vanadiumspezies handelt. Eine konkrete Aussage über den möglichen niedermolekularen Bindungspartner des Vanadiums kann an dieser Stelle nicht gemacht werden, da dazu weitere analytische Verfahren, wie z.B. die SEC/ESI-MS-MS, zur Strukturaufklärung eingesetzt werden müssten.

#### *5.4.2 Arsenspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe*

Anorganische Arsenverbindungen werden hauptsächlich durch das Trinkwasser aufgenommen und durch Methylierung in die Endprodukte Monomethylarsinsäure

(MMA) und Dimethylarsinsäure (DMA) metabolisiert, die renal ausgeschieden werden [358,359]. Eine Speicherung des Arsens erfolgt bevorzugt in Haut und Haaren durch Bindung des Arsens an die Thiolgruppen des Keratins. Arsen ist in allen tierischen und humanen Geweben zu finden. Die biologische Bedeutung des Arsens beruht in erster Linie auf seiner Inhibitorwirkung für freie Thiolgruppen bestimmter Enzymsysteme. In tierexperimentellen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Arsen den Kohlehydratumsatz steigert. Eine übersteigerte Aufnahme von Arsen kann zu Intoxikationen führen, Expositionen über längere Zeit können die Tumorigenese diverser Krebsarten begünstigen. Die Mechanismen der arseninduzierten Karzinogenese sind ähnlich wie die der durch Nickel induzierten Karzinogenese [360]. Die Speziesanalytik beschränkte sich bisher auf umweltrelevante Matrices, so dass keine Literaturvergleiche möglich sind. Zudem wurden im wesentlichen die metabolischen Endprodukte MMA und DMA quantitativ erfasst. Bei der in Abbildung 5-13 mittels SEC/ICP-MS detektierten Arsenspezies mit einem Peakmaximum bei 5,5 kDa handelt es sich um eine noch nicht identifizierte arsenorganische Verbindung, die mit Hilfe zusätzlicher analytischer Methoden charakterisiert und identifiziert werden müsste.

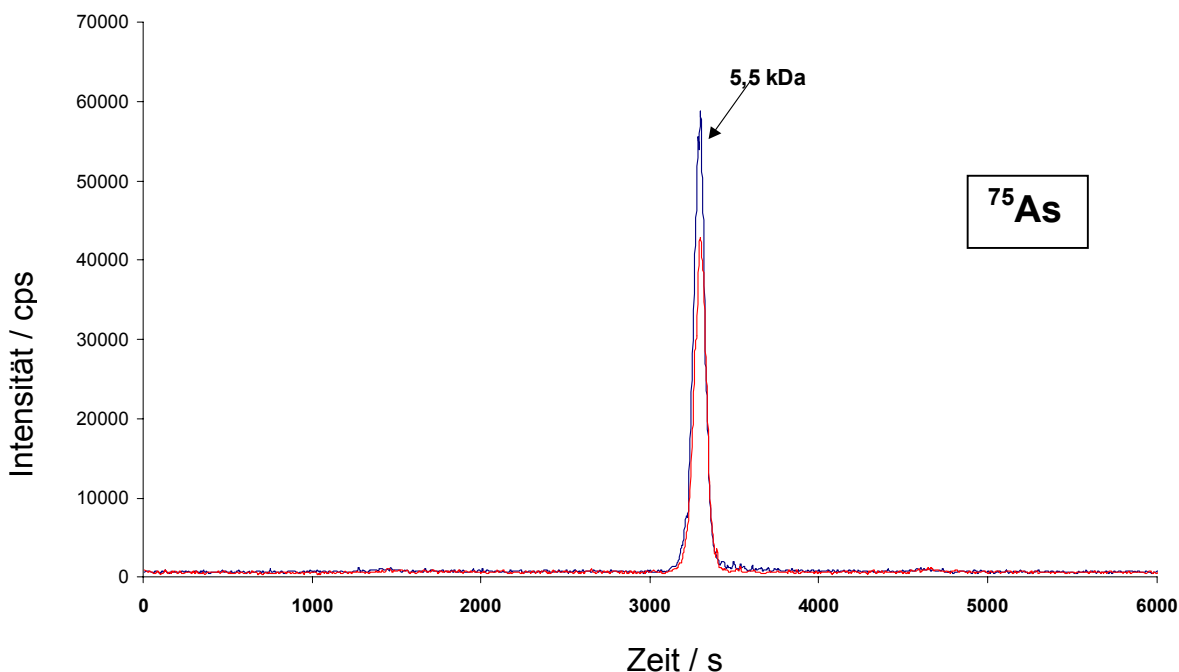


Abb. 5-14 Arsenspezies bei 5.5 kDa im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 10c; Trennbereich 4 – 35 kDa

Ein signifikanter quantitativer Unterschied der Arsenspezies im Cytosol des gesunden Gewebes im Vergleich mit der im Cytosol des malignen Gewebes konnte nicht gefunden werden. Die individuellen Unterschiede in dem Gehalt der cytosolischen Arsenspezies waren relativ gering (Faktor 1,3).

#### 5.4.3 Molybdänspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe

Molybdän gehört zu den Übergangsmetallen, dessen Essentialität gesichert ist, obwohl Molybdänmangelzustände im humanen Organismus nicht bekannt sind. Möglicherweise tritt ein Mangelzustand mit klinisch manifesten Symptomen nicht auf, da Kupfer antagonistisch wirkt und die Funktion von Molybdän übernimmt. Beide Spurenelemente sind an Redoxreaktionen beteiligt und wirken als Elektronenüberträger. Es sind vier molybdänhaltige, höhermolekulare Enzyme im tierischen Organismus (sie gehören zu der Gruppe der Flavoenzyme) bekannt, die Xanthinoxidase, die Aldehydoxidase, die Sulfitoxidase und die Formiatdehydrogenase [354].

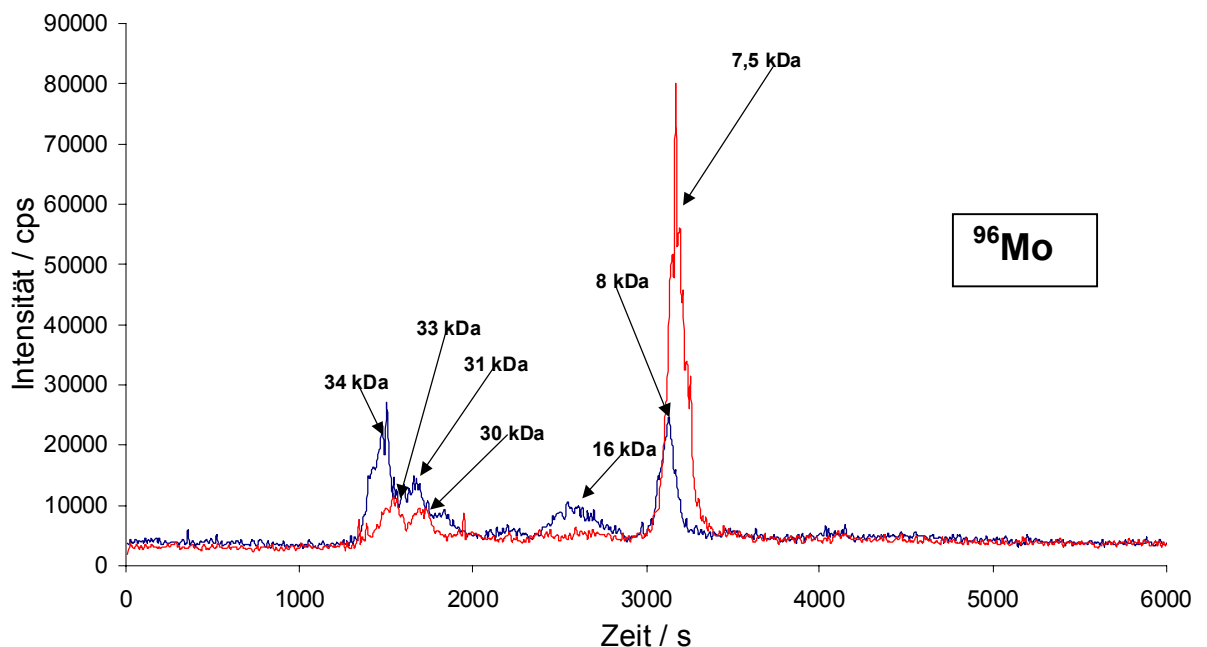


Abb. 5-14 Molybdänspezies im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 3c; Trennbereich 4 – 35 kDa

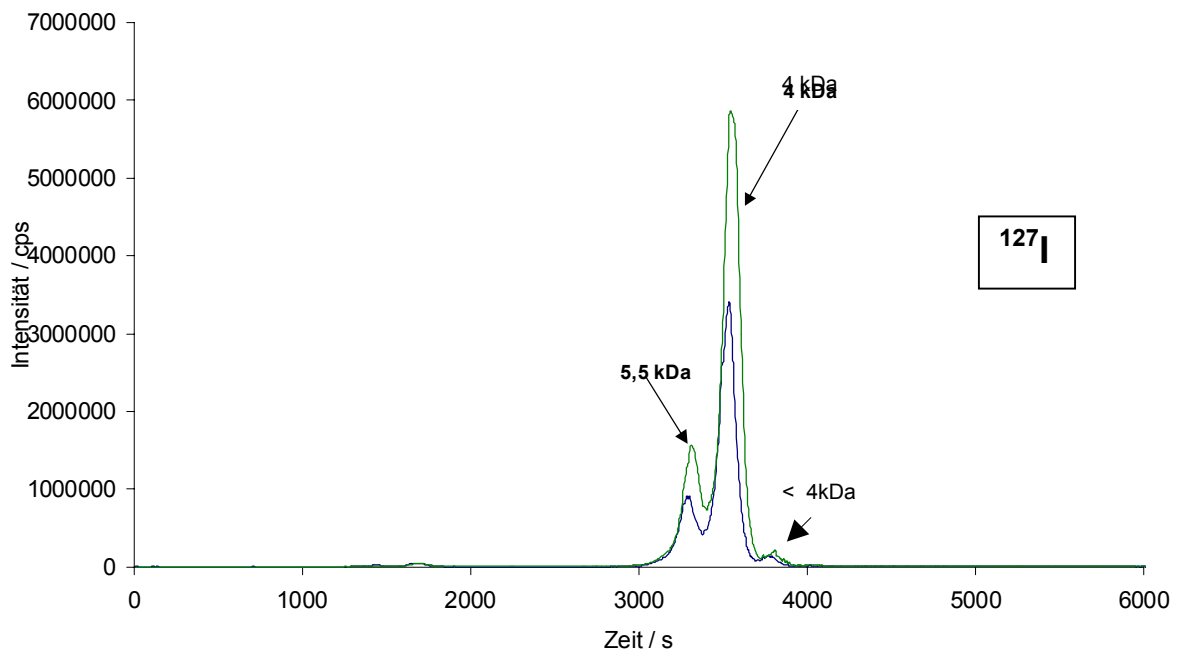
Weitere Bindungspartner des Molybdäns in humanen Cytosolen sind in der Literatur nicht beschrieben. Die Chromatogramme der Cytosole von malignen Geweben und deren korrespondierenden Normalgeweben zeigten keine qualitativen Unterschiede. Es konnten vier Peaks mit Peakmaxima von 33-34 kDa bzw. 30-31 kDa bzw. 16 kDa bzw. 7-8 kDa registriert werden (siehe Abbildung 5-14), wobei die Peaks 30-31 kDa und 16 kDa aufgrund ihrer geringen Gehalte nur in Probe 3c und 11c deutlich erkennbar waren.

Auffällig ist, dass der Gehalt der Molybdänspezies im Molmassenbereich von 7-8 kDa in den Cytosolen der Normalgewebe um den Faktor 2 höher ist als in den Cytosolen der neoplastischen Gewebe, während bei den Molybdänspezies in dem molekularen Massenbereich von 33-34 kDa keine Tendenz erkennbar ist. Einzige Ausnahme ist die Probe 3c, bei der offensichtlich der cytosolische Gehalt der Molybdänspezies im Molmassenbereich von 7-8 kDa im Tumorgewebe höher ist als im Normalgewebe, während die Fraktionen zwischen 30 bis 34 kDa ein reziprokes Verhältnis zeigen. Da molybdänorganische Verbindungen vermutlich extrem oxidationsempfindlich sind, ist nicht ganz auszuschließen, dass es sich bei dem Peak mit einem Maximum zwischen 7-8 kDa um ein Oxidationsprodukt handelt. Dieses müsste in weiteren Analysen untersucht werden und die Probenvorbereitung hinsichtlich einer Molybdänspeziesanalyse optimiert werden. Eine Identifizierung der Mo-Bindungspartner müsste ebenfalls über andere analytische Methoden erfolgen, um dann Aussagen über die biochemische Relevanz der Mo-Spezies machen zu können.

#### *5.4.4 Iodspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe*

99% des inkorporierten Iods liegt in Form des Thyroxins und des 3,3',5-Triiod-L-thyronins und anderen Iodaminosäuren in der Schilddrüse vor. Jod wird aus der Nahrung vollständig aus anorganischen Salzen von der Darmmukosa resorbiert. In den Cytosolen der intestinalen Gewebeproben konnten mehrere Jodfraktionen detektiert werden, 2 Peaks mit Peakmaxima  $\geq 35$  kDa und 1-2 Peaks mit einem Peakmaximum zwischen 5,5 – 6,0 kDa bzw. 4 kDa. Eine weitere Fraktion mit jodhaltigen Spezies unterhalb 4 kDa konnte ebenfalls registriert werden. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um Thyroxin und 3,3',5-Triiod-L-thyronin (Molmasse 0,77 kDa bzw. 0,65 kDa). Die Gehalte der Jodspezies in den höhermolekularen Fraktionen waren relativ

gering, während die Gehalte der 4 kDa Spezies in den Cytosolen aller untersuchten Proben relativ hoch waren (bevorzugter Bindungspartner). Die individuellen Gehalte schwankten um den Faktor 10. Dieser Unterschied könnte dadurch begründet sein, dass der Mukosaanteil der Gewebeproben deutlich unterschiedlich war und Jod, wie bereits erwähnt, über die Mukosa inkorporiert wird.



**Abb.5-15** Jodspezies im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des inflammatorischen Gewebes (grün); Probe 4c; Trennbereich 4 – 35 kDa

Die 6 kDa Spezies konnte nur dann detektiert werden, wenn der Jodgehalt im Cytosol extrem hoch war (siehe Abbildung 5-15). Es ist davon auszugehen, dass Jod bevorzugt an die Partner mit geringerer Molmasse bindet. Bei einem Vergleich der Peakverhältnisse 6 kDa : 4 kDa : < 4 kDa konnte nur in zwei Proben (Probe 3c und 11c) ein Anstieg des Verhältnisses im Cytosol des malignen Gewebes gegenüber dem Cytosol des gesunden Gewebes festgestellt werden. Bei allen anderen Cytosolproben blieb das Peakverhältnis unverändert. Zur weiteren Identifizierung der Bindungspartner müssten andere analytische Methoden eingesetzt werden.

#### 5.4.5 Zinnspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe

Zinn ist in vielen Humangeweben vorhanden, obwohl die intestinale Resorptionsrate von Zinn relativ gering ist. Ob Zinn eine biologische Relevanz hat, ist bis heute ungeklärt. Es wird vermutet, dass Zinn Cofaktor des Gastrins, eines Hexadecapeptidhormons (Molmasse 2,1 kDa) des Antrums (Teil des Magens) ist.

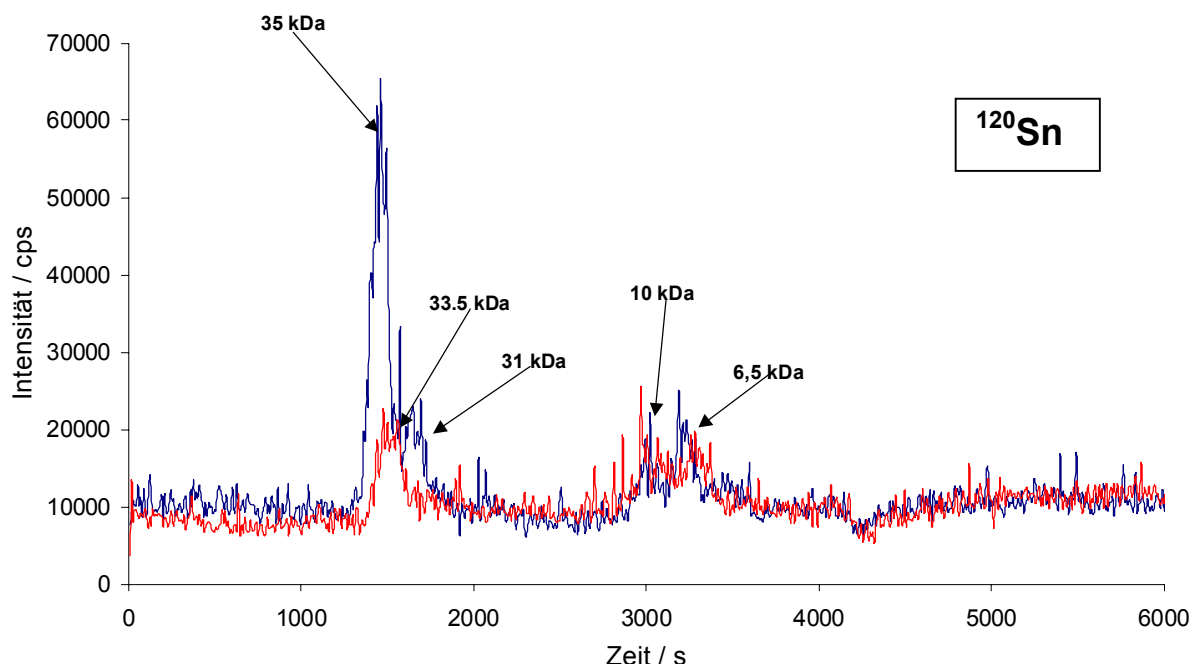


Abb. **5-16** Zinnspezies im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 3c; Trennbereich 4 – 35 kDa

Das Redoxpotential von  $\text{Sn}^{2+} \rightleftharpoons \text{Sn}^{4+}$  beträgt 0,13 V und liegt damit nahe an dem Redoxpotential von Flavinenzymen. Möglicherweise spielt Zinn in diesem Redoxsystem eine Rolle. Wie in Abbildung 5-16 ersichtlich, ist Zinn hauptsächlich an höhermolekulare Biomoleküle gebunden. Zusätzlich wurden mindestens 3 weitere Spezies mit molekularen Massen von ca. 31 kDa, 10 kDa und 5,5 - 6,5 kDa detektiert. Eine nähere Charakterisierung der Bindungspartner war nicht möglich. Die individuellen Gehalte der Sn-Spezies variierten stark. Es konnte kein signifikanter quantitativer Unterschied zwischen den Gehalten der Sn-Spezies in den Cytosolen der malignen Gewebe und denen in den Cytosolen der normalen Gewebe festgestellt werden.



#### 5.4.6 Cadmium- und Bleispezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe

Cadmium und Blei sind nicht-essentielle Elemente mit kumulativer Eigenschaft. Cadmium wird im Knochenmark, Leber und Niere angereichert, Blei kumuliert im Knochenmark, in den Zähnen und den Haaren. Eine chronische Exposition von Blei oder eine Bleiintoxikation führt zur Blockierung der freien Thiolgruppen vor allem von Enzymen der Porphyrinsynthese (Porphobilinogensynthase, Coproporphirinogenoxidasase und Ferrochelatase). Nachfolgend sind die mittels SEC in einem Trennbereich von 4 – 35 kDa separierten Blei- und Cadmiumspezies abgebildet.

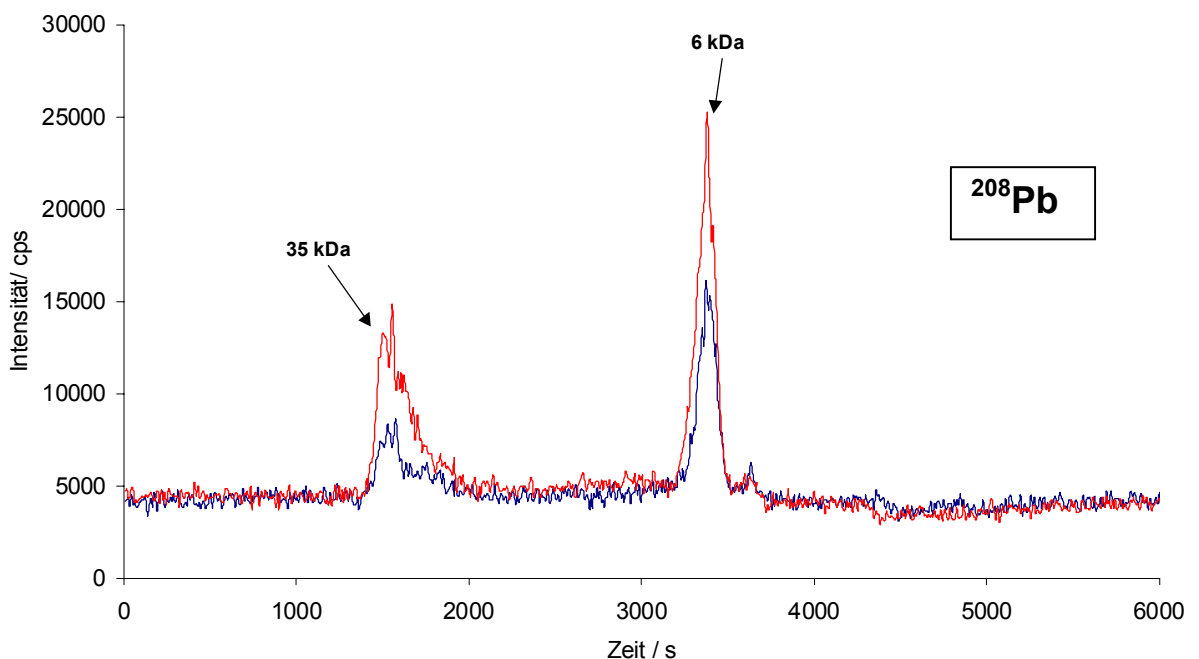


Abb. 5-17 Bleispezies im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 15c; Trennbereich 4 – 35 kDa

In den Geweben sind die Schwermetalle hauptsächlich an nicht enzymatisch wirkende Metalloproteine gebunden, unter anderem auch an das Metallothionein (MT). Metallothionein ist ein cysteinreiches (ca. 30%) Metalloprotein mit einer Molmasse von 6-7 kDa. Es fungiert hauptsächlich als Regulator und Speicherprotein für Zink und Kupfer [361]. Eine weitere Funktion des MT ist die Detoxifikation von Schwermetallen. Es sind bis heute vier verschiedene Isoformen der Metallothioneine be-

kannt. Eine Trennung der Isoformen mittels SEC/ICP-MS ist allerdings nicht möglich [362]. Die Affinität der Metalle zu den Thiolgruppen der Metallothioneine nimmt in der Reihenfolge  $\text{Zn(II)} < \text{Pb(II)} < \text{Cd(II)} < \text{Cu(I)}, \text{Ag(I)}, \text{Hg(II)}$  und  $\text{Bi(III)}$  ab.

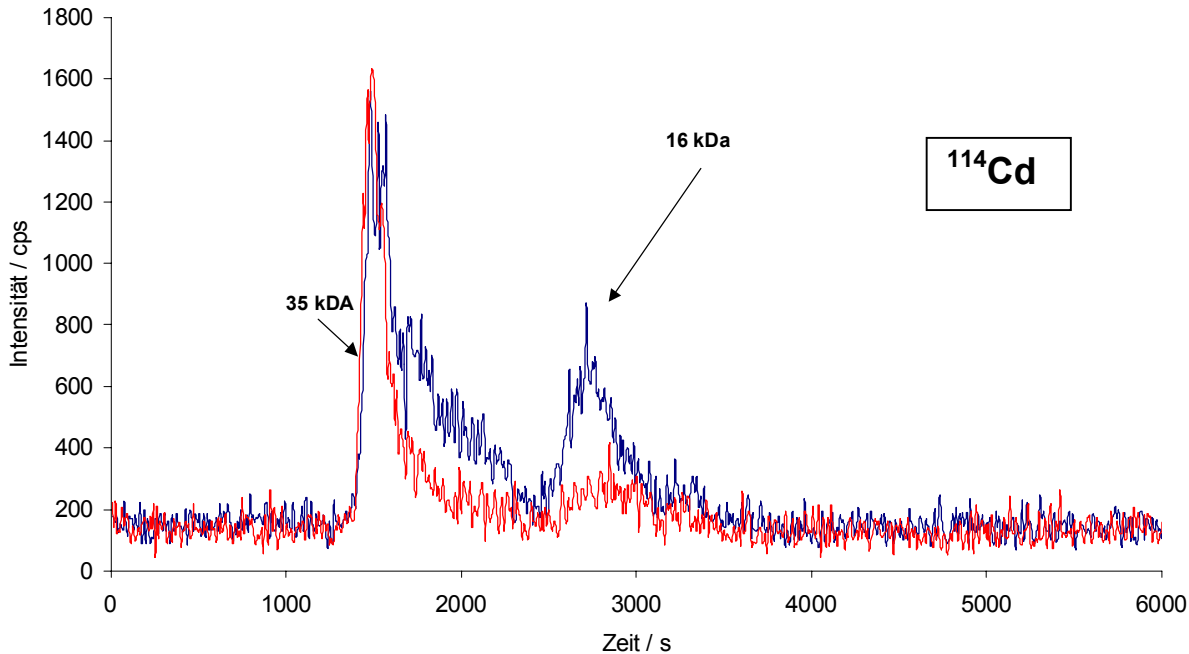


Abb. 5-18 Cadmiumspezies im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 15c; Trennbereich 4 – 35 kDa

Es konnten höhermolekulare Bleispezies mit Molmassen von  $> 35$  kDa und 31 - 33 kDa neben niedermolekularen Spezies mit einer Molmasse von ca. 6 - 6,5 kDa und  $< 4$  kDa gefunden werden. In einigen wenigen Proben konnte eine Bleispezies mit einer Molmasse von ca. 19 kDa detektiert werden. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei der 6 - 6,5 kDa-Fraktion um Pb-beladenes Metallothionein (MT) handelt, da auch mittels CE/ICP-MS ein Peak in einem Bereich detektiert werden konnte, in dem die MT-Standardgemische detektiert werden. Eine Trennung der MT-Isoformen konnte auch mittels CE/ICP-MS nicht erreicht werden. Möglicherweise bindet Blei bevorzugt an eine bestimmte Isoform. Dieses müsste in weiteren Experimenten getestet werden. Der Gehalt der Pb-Spezies und die Verteilung auf höhermolekulare bzw. niedermolekulare Bindungspartner variierte in den Cytosolen der Gewebeproben verschiedener Probanden um den Faktor 10. Die Bleispeziesgehalte in den Cytosolen der malignen Geweben im Vergleich mit ihren korrespondierenden Normalgeweben variierten ebenfalls. Bei 5 Proben war der Gehalt in den neoplastischen

Gewebe höher, bei 5 Proben in den Normalgeweben und bei einer Probe war kein Unterschied zu erkennen. Für Cadmium zeigte sich eine Fraktion bei 33 - 35 kDa und bei 16-18 kDa. In einigen wenigen Proben konnten zusätzlich Cadmiumsfraktionen mit einer Molmasse von ca. 25 kDa bzw. 9 kDa gefunden werden. Niedrigmolekulare Cd-Spezies konnten nicht detektiert werden. Dies ist in Übereinstimmung mit den in der Literatur angegebenen Gehalten an Cd- beladenem Metallothionein in humanen Autopsieproben des Magens und des Dünndarms [363]. Bezüglich der Gehalte der Cadmiumspezies und deren Verteilung zeigte sich das gleiche Bild wie bei den Bleispezies. Interessant ist, dass in dem Fall höherer Pb-Speziesgehalte in den Cytosolen der malignen Gewebeproben gleichzeitig auch die Gehalte der Cd-Spezies im Vergleich mit denen im Cytosol der gesunden Gewebe erhöht waren. Diese Beobachtung müsste allerdings durch die Quantifizierung der Pb- bzw. Cd-Spezies in einer größeren Anzahl an Proben verifiziert werden. Metallothioneine spielen bei der Pathogenese diverser Erkrankungen, unter anderem auch beim Krebs, eine Rolle [364,365]. Inwieweit die vorgestellten Ergebnisse zur Interpretation der Multifunktionalität der Metallothioneine beitragen, unterliegt weiteren Forschungsaktivitäten auf dem Gebiet der MT-Speziation. Die weitläufige Annahme, dass Cd schon in den Darmmukosazellen an Metallothionein bindet, konnte nicht bestätigt werden [366]. Auf der anderen Seite besitzt Cadmium eine hohe Proteinbindungsfähigkeit, was sich durch die vorliegenden Ergebnisse untermauern lässt.

#### *5.4.7 Manganspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe*

Mangan ist ein essentielles Element, das zur Aktivierung vieler Enzyme beiträgt. Manganhaltige Proteine sind die Pyruvatcarboxylase, die PEP-Carboxykinase, die Arginase, die Glutaminsynthetase, die Isocitratdehydrogenase und die Superoxid-dismutase, wie bereits in Kapitel 5.3.2 erwähnt. Mangan ist auch in einigen verschiedenen Peptidasen und Glycosyltransferasen enthalten. Dabei handelt es sich um hochmolekulare Mn-Spezies. Mn wird über den Gastrointestinaltrakt in geringem Umfang resorbiert und wird über das Transportmolekül  $\beta_1$ -Globulin an das Blut abgegeben. Antagonisten des Mangans sind Magnesium und Calcium. Es konnten 3 manganhaltige Fraktionen mit Peakmaxima bei 33 – 35 kDa, 30 kDa und  $\leq 4$  kDa detektiert werden, wobei die Verhältnisse der Peaks individuell schwankten, während

sich die Peakverhältnisse beim Vergleich Cytosol des malignen Gewebes mit dem korrespondierenden Cytosol des gesunden Gewebes nicht unterschieden (Abbildung 5-19). Eine Identifizierung der Bindungspartner ist erst durch Anwendung weiterer strukturaufklärender Analysemethoden möglich.

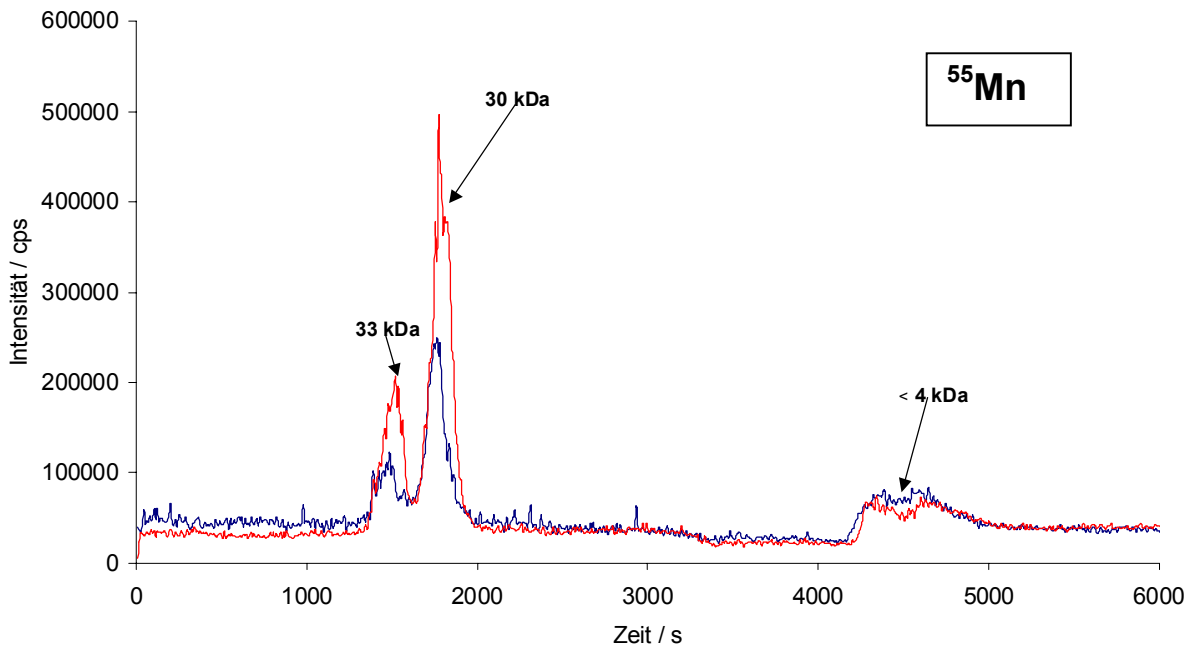


Abb. 5-19 Manganspezies im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 3c; Trennbereich 4 – 35 kDa

#### 5.4.8 Selen- und Zinkspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe

Zink und Selen sind essentielle Spurenelemente und zeigen bei Mangelzuständen klinisch manifeste Krankheitsbilder. Die selenhaltigen Proteine wurden bereits in Kapitel 5.1.2 aufgeführt. In dem Trennbereich von 4 – 35 kDa konnten drei selenhaltige Fraktionen mit Peakmaxima von  $> 35$  kDa, 30 – 32 kDa und  $< 4$  kDa detektiert werden (Abbildung 5-20). In den meisten Cytosolen der neoplastischen Gewebe war der Selengehalt der Fraktion  $> 35$  kDa geringfügig höher als im Cytosol der Normalgewebe. Die Fraktion  $< 4$  kDa zeigte dagegen keinen Unterschied. Auch die individuellen Selengehalte in den selenhaltigen Fraktionen variierten nur um den Faktor 1,5. Um eine Korrelation mit der im Cytosol enthaltenen Glutathionperoxidase

herstellen zu können, muss eine SEC-Säule mit einem Trennbereich bis 100 kDa verwendet werden, was weiterführenden Untersuchungen vorbehalten ist.

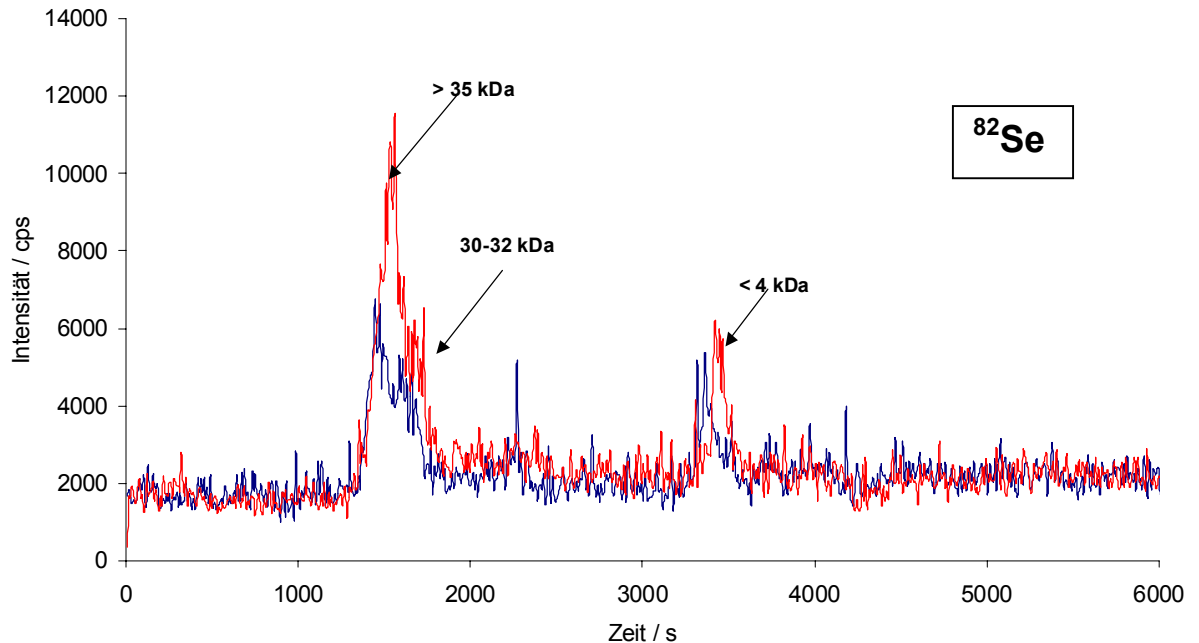


Abb. 5-20 Selenspezies im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 3c; Trennbereich 4 – 35 kDa

Zink ist Bestandteil von mehr als 300 hundert Enzymen in Form von Carboanhydrase, alkalische Phosphatase, Dehydrogenasen und Matrix-Metalloproteinasen. Zink wirkt membranstabilisierend und ist Bestandteil DNA-bindender Proteine (genregulatorische Transkriptionsfaktoren). Die für die Bindung der Zn-Proteine an die DNA verantwortliche strukturelle Domäne sind Proteinabschnitte mit Cysteinyresten oder Cysteiny- und Histidinyresten, an die zwei oder drei Zinkatome gebunden sind. Die Bezeichnung der zinkhaltigen Transkriptionsfaktoren richtet sich nach ihrer dreidimensionalen Struktur. Dabei sind die Zinkfingerproteine, die auch in der DNA-Reparatur involviert sind, die bekanntesten. Aufgrund ihrer genregulatorischen Wirkung spielen sie bei der malignen Transformation auf molekularbiologischer Ebene eine wichtige Rolle. In dem Trennbereich von 4 – 35 kDa zeigten die Chromatogramme intensive Banden mit Bandenmaxima von  $\geq 35$  kDa, 30 – 34 kDa, 26 kDa, 17 - 19 kDa, 6 - 9 kDa und  $< 4$  kDa. Die individuellen Schwankungen waren erheblich. Die zinkhaltigen Fraktionen zeigten auch deutliche Unterschiede beim Vergleich der Cytosole von malignen Geweben mit denen von gesunden Geweben, wobei die Ge-

halte niedermolekularer Zinkproteine (6 – 19 kDa) in den Tumorgeweben tendenziell niedriger waren als in den korrespondierenden Normalgeweben. In diesem molekularen Bereich sind viele Transkriptionsfaktoren zu finden.

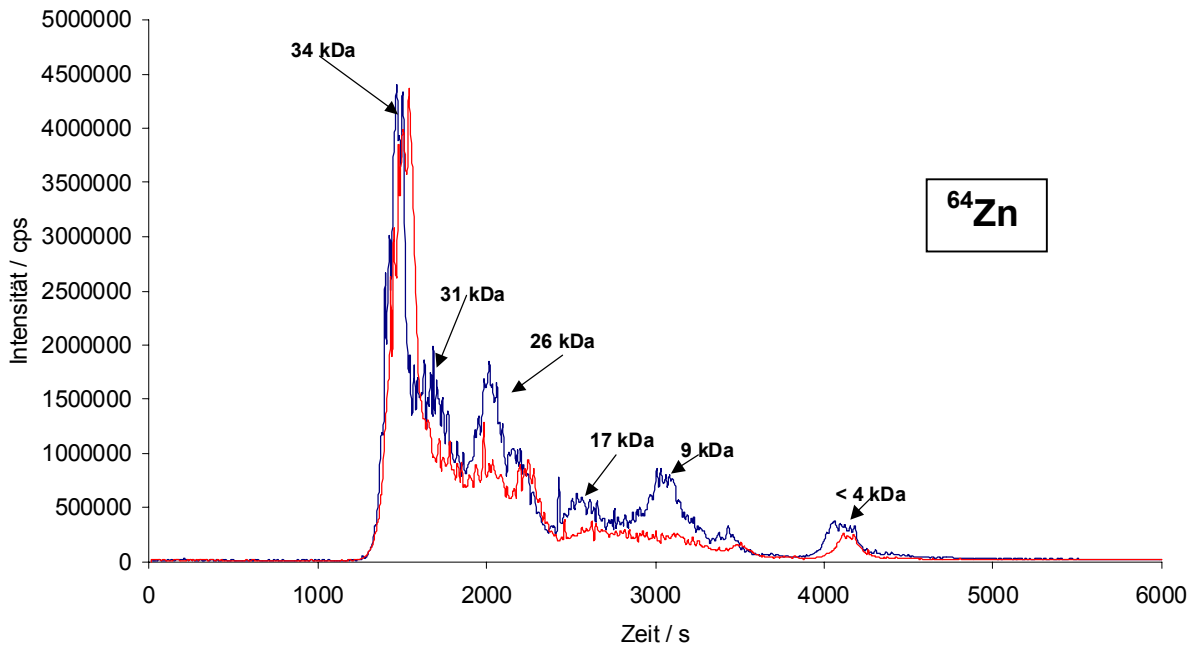


Abb. 5-21 Zinkspezies im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 3c; Trennbereich 4 – 35 kDa

Um konkretere Aussagen über den individuellen Fingerprint der Zinkproteine machen zu können, müssten Genotypisierungen der maligne transformierten Zellen neben der Zinkspeziesanalyse durchgeführt werden.

#### 5.4.9 Kupferspezies im Cytosol kolorektaler Humangewebe

Die Kupferspeziesanalyse in kolorektalen Geweben ist von besonderer Bedeutung, da einerseits im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass sich Kupfer in den neoplastischen Geweben anreichert und andererseits Kupfer an der Angiogenese (Blutgefäßneubildung) während der Wachstumsphase von Tumoren beteiligt ist. Aktuelle Bestrebungen sind, überschüssiges Kupfer durch orale Gabe von Kupferkomplexbildnern, wie das Tetrathiomolybdat, aus dem Organismus zu entfernen, um das Tumorstadium zu unterdrücken [367-369]. Kupfer ist Bestandteil wichtiger Metal-

loproteine, wobei zwischen drei Kupferproteintypen unterschieden wird, Kupferproteine, die an Elektronenübertragungsreaktionen beteiligt sind (Typ 1), Kupferproteine, die Oxidationsprozesse katalysieren (Typ 2) und Kupferproteine mit Funktionen im Sauerstofftransport und in der Sauerstoffaktivierung (Typ 3) [370,371]. Es sind aber auch nichtklassische Kupferproteine bekannt, die ebenfalls drei verschiedenen Klassen zugeordnet werden können, den Metallothioneinen, den Proteinen mit Cu<sub>A</sub>-Kupferzentren (z.B. Cytochrom-c-Oxidase, N<sub>2</sub>O-Reduktase) und den Proteinen vom Typ (2 + 3)-Trimer-Kupferzentren (z.B. Laccase, Ascorbat-Oxidase). Die Kupfer-Homöostase hängt entscheidend von den Regulations-, Speicher- und Transportproteinen ab (Cu-Metallothionein, Kupfer-Transport-ATPase, die auch als Kupferpumpe bezeichnet wird, und CUP2-Protein). Zwei genetisch bedingte Kupferstoffwechselstörungen sind Morbus Wilson (Defekt eines Gens, das für ein Kupfertransportprotein der Familie der P-Typ-ATPasen kodiert, wobei Kupfer in der Leber akkumuliert wird) und Menkes-Erkrankung (eine neurodegenerative Erkrankung, bei der die intrazelluläre Kupferverteilung gestört ist, wodurch Kupfer vermehrt in der Darmmukosa, den Nieren und dem Bindegewebe deponiert wird). Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der gefundenen Kupferakkumulierung in den malignen Geweben und den Gendefekten bei der Wilson- bzw. Menkes-Erkrankung. Eine weitere, erst seit einigen Jahren untersuchte Klasse kupferhaltiger Proteine sind die sog. Kupferchaperone. Dabei handelt es sich um Hilfsproteine, die als Aktivatoren der Proteinfaltung wichtiger Kupferproteine fungieren und für die Verteilung der Kupferproteine verantwortlich sind [372]. In invitro Versuchen konnte z.B. gezeigt werden, dass das humane Kupferchaperon HAH1 (Molmasse 7,4 kDa) direkt mit dem Wilson- und dem Menke-Protein interagiert [373,374]. Ein weiteres interessantes cytosolisches Kupferchaperon ist das humane CCS, das die Insertion des Kupfers in die Cu/Zn-Superoxiddismutase unterstützt [375-378]. Das hCCS mit einer molaren Masse von ca. 27 kDa hat aber auch einen Einfluss auf die mitochondriale Mn-Superoxiddismutase [379]. Wird die hCCS-Synthese unterdrückt, so ist der Mn-SOD-Gehalt in den Mitochondrien gering, wird sie gesteigert erhöht sich der Mn-SOD-Gehalt.

In Abbildung 5-22 sind exemplarisch für alle analysierten Cytosole die erhaltenen SE-Chromatogramme für das Cytosol der Gewebeprobe 15c dargestellt. In dem Trennbereich von 4 – 35 kDa konnten 5 Banden mit Bandenmaxima von 33-34 kDa, 26-27 kDa, 16-18 kDa, 6-7 kDa und < 4 kDa detektiert werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei dem Peak mit einem Peakmaximum von 33-34

kDa um die Cu/Zn-Superoxiddismutase, bei dem Peak mit einem Maximum bei 26-27 kDa um das Kupferchaperon hCCS und dem Peak mit einem Maximum bei 6-7 kDa um das Cu-beladene Metallothionein handelt. Es konnte kein qualitativer Unterschied zwischen den Chromatogrammen von Cytosolen der malignen Gewebe und denen der gesunden Gewebe gefunden werden. Es zeigte sich aber eine Umverteilung der Kupferspezies in 6 Probenzytosolen maligner Gewebe, wobei die Gehalte von hCCS, die Fraktion mit einem Maximum bei 16-18 kDa und das Cu-Metallothionein erhöht waren, unabhängig von der Höhe der individuellen, cytosolischen Kupferbeladung. Die Kupferspeziesgehalte in den Cytosolen unterschiedlicher Probanden variierten sehr stark (Faktor 10). Eine Zuordnung zu histopathologischen Daten war nicht möglich.

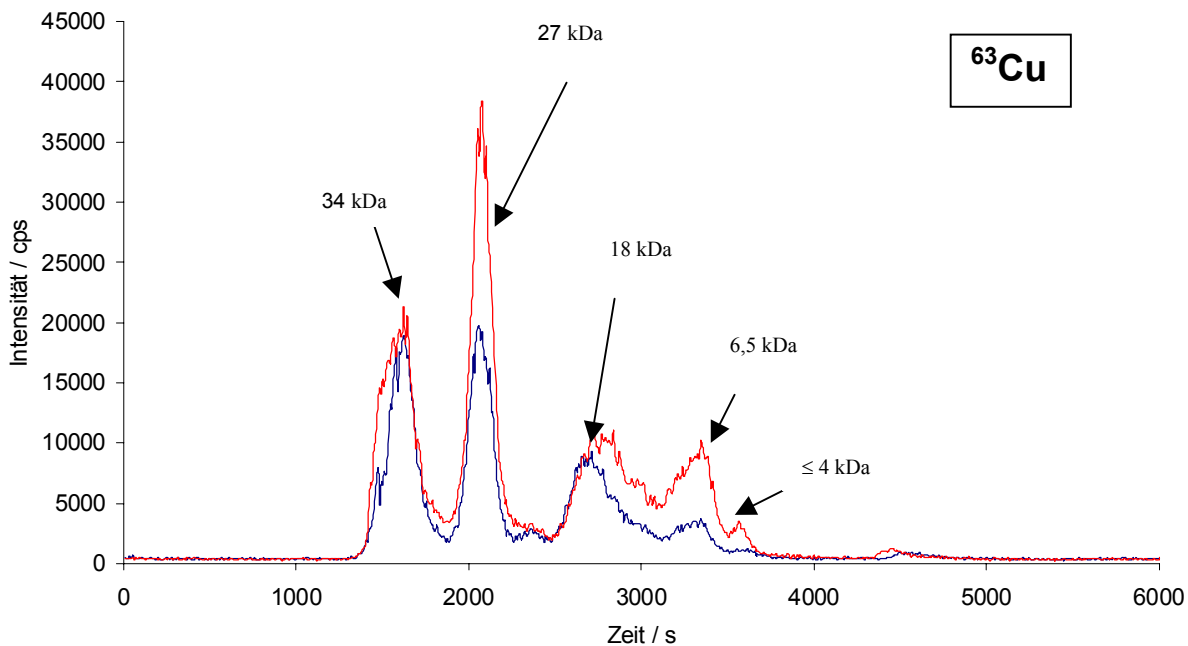


Abb. 5-22 Kupferspezies im Cytosol des Normalgewebes (blau) und des malignen Gewebes (rot); Probe 15c; Trennbereich 4 – 35 kDa

Sollte sich bei einer Vielzahl von Proben die vorgestellten Ergebnisse verifizieren lassen, so sollte das Therapiekonzept der Kupferkomplexierung mittels Tetrathiomolybdat auch den Vorteil haben, dass der Resistenz gegenüber konventionellen Chemotherapeutika vorgebeugt wird, indem die Aktivierung der mitochondrialen Mn-SOD durch hCCS unterdrückt würde (siehe dazu Kapitel 5.3).



### **5.5 Analyse der Nickelspezies im Cytosol von malignen und normalen Geweben mittels CE/ICP-MS und SEC/ICP-MS**

Das Interesse an dem Element Nickel ist durch seine karzinogene Wirkung besonders groß. Aufgrund seiner ubiquitären Präsenz und dadurch hohen Wahrscheinlichkeit exogener Kontaminationen der Analysenproben und seiner geringen Konzentration in humanen Gewebeproben ist die Nickelspeziesanalyse bisher hauptsächlich mit Hilfe von tierexperimentellen Versuchen forciert worden [380-382]. Nur in ganz wenigen Publikationen ist das native Verteilungsmuster der Nickelspezies in humanen Proben beschrieben [383-385]. Auf der anderen Seite ist schon lange bekannt, dass Nickel mit Proteinen interagiert. Die Stärke der Wechselwirkung hängt von den im Protein enthaltenen Aminosäuren ab, wobei Nickel bevorzugt an Histidin bindet. Diese Affinität des Nickels zum Histidin wird verstärkt, wenn in dem Protein wiederkehrende Histidineinheiten vorzufinden sind [386-388]. Zur Reinigung von rekombinanten Proteinen mit wiederkehrenden Histidineinheiten wird diese Eigenschaft genutzt, wobei immobilisierte Nickelionen (eingebettet in Agarose) als stationäre Phase eingesetzt werden (Nickel-Affinitäts-Chromatographie) [389,390]. In den letzten Jahren konnten einige nickelhaltige Proteine identifiziert werden, die hauptsächlich im Nickeltransport, in der Detoxifikation und der Exkretion involviert sind. Interessanterweise ist Metallothionein in diversen Geweben kein dominierender Bindungspartner des Nickels [391]. Nickel wird über einen L-Histidin-Nickel-Komplex durch die Zellmembran in das Cytoplasma der Zelle transportiert. Der systemische Nickeltransport erfolgt hauptsächlich über einen Nickel-Albumin-Komplex [392]. Weitere Bindungspartner von Nickel sind  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_1$ -Lipoprotein und Lipovitellin 2 $\beta$  (Eigelbprotein) [380,383,393]. In der menschlichen Niere wurden zwei Nickelkomplexe mit molaren Massen von 4 kDa detektiert, wobei es sich bei einem der beiden Bindungspartner um ein sulfatiertes Oligosaccharid handelt [385]. Durch tierexperimentelle Untersuchungen an *Xenopus laevis* (afrikanischer Frosch) konnten zwei weitere Nickelproteine identifiziert werden, die Ähnlichkeiten mit humanen, im Cytosol enthaltenen Proteine aufweisen. Dabei handelt es sich um das Protein pNiXa (Molmasse 45 kDa), das Ähnlichkeit mit dem humanen EP45, einem östrogenregulierten Serpin, das auf die Meiose Einfluss nimmt, hat und um das pNiXc (Molmasse 40 kDa), das eine 96%-ige Übereinstimmung mit der humanen Aldolase A besitzt [394,395].

Ein weiteres Protein, das ein nickelbindendes Motiv aufweist, ist das hochmolekulare Glutathion-S-Transferase DAN Fusionsprotein [396]. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression des DAN-Gens in transformierten Zellen signifikant reduziert ist. Bei weiteren molekulargenetischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass es sich bei dem DAN-Gen wahrscheinlich um ein Tumorsuppressorgen handelt, das den Eintritt in die S-Phase der Zellteilung blockiert und somit das Zellwachstum verzögert [397]. Die Separation der Nickelspezies in den Cytosolen von normalen und malignen Kolo- rektalgeweben wurde kapillarelektrophoretisch und gelpermeationschromatogra- phisch durchgeführt. Es konnten bei Anwendung beider Methoden keine qualitativen Unterschiede der Nickelspezies in gesunden im Vergleich mit neoplastischen Geweben festgestellt werden (siehe Abbildung 5-23).

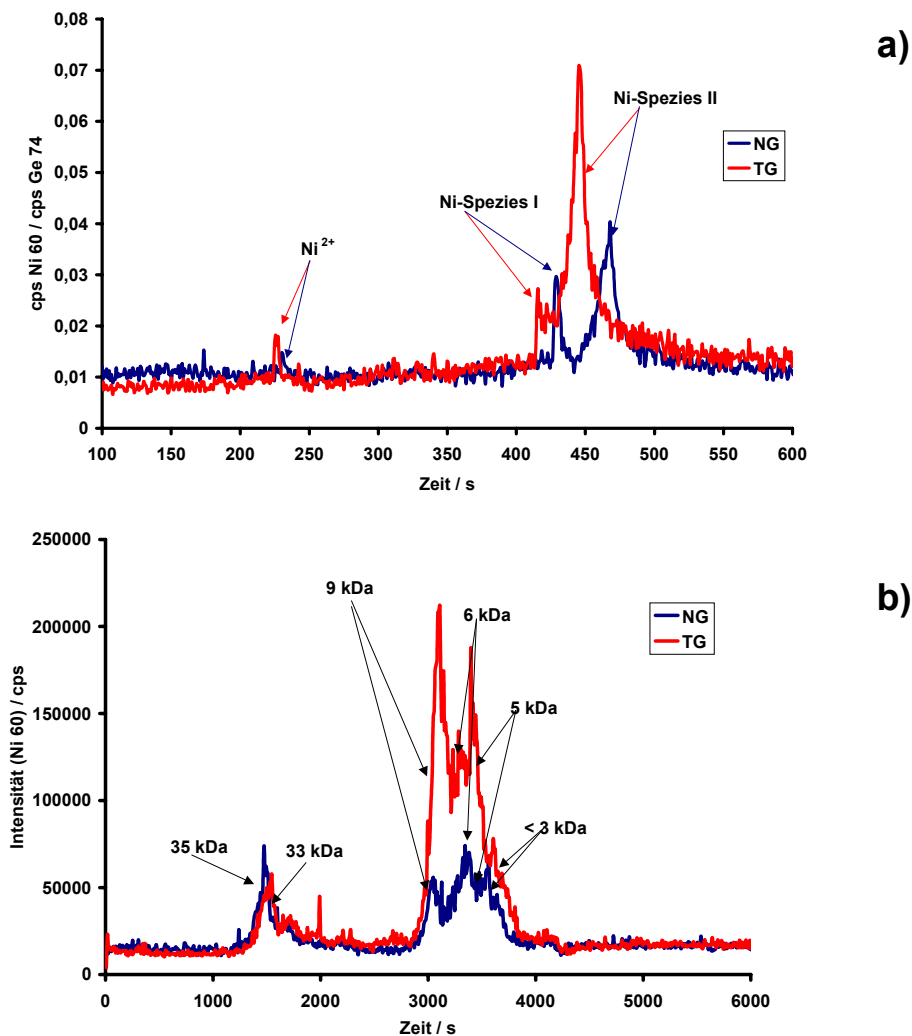


Abb. 5-23 Separation der cytosolischen Nickelspezies im malignen (TG) und normalen Gewebe (NG) der Probe 3c mittels a) CE/ICP-MS b) SEC/ICP-MS

Nach kapillarelektrophoretischer Separation der Nickelspezies konnten 3 Fraktionen und nach gelpermeationschromatographischer Separation konnten in dem Trennbereich von 4 – 35 kDa 5 Fraktionen mit Peakmaxima bei  $\geq 35$  kDa, 30 – 33 kDa, 28 kDa, 9 kDa, 6 kDa und 4 – 5 kDa detektiert werden. Da vor den Analysen mittels CE/ICP-MS eine Acetonitrilfällung zur Abtrennung höhermolekularer Spezies durchgeführt wurde, konnten nur die Spezies mit einer molaren Masse von 6 bzw. 9 kDa detektiert werden. Bei der dritten Spezies mit einer durchschnittlichen Migrationszeit von 250 s handelte es sich um freies  $\text{Ni}^{2+}$ , das mit Hilfe einer Nickelstandardlösung identifiziert werden konnte. Die weitere Peakzuordnung in den Elektroferrogrammen erfolgte mit Hilfe des kupferbeladenen Metallothioneins (Molmasse ca. 6 kDa), das sowohl im Cytosol der neoplastischen als auch im Cytosol der gesunden Gewebe gefunden wurde. Dieser interne Standard hatte den Vorteil, dass eine matrixunabhängige Zuordnung möglich war. Eine Zuordnung über die Migrationszeiten war nicht möglich, da diese probenabhängig variierten. Bei der mit Ni-Spezies I bezeichneten Fraktion handelt es sich um ein oder mehrere Nickelproteine mit einer Molmasse von ca. 6 kDa und bei der Ni-Spezies II um ein oder mehrere Nickelproteine mit einer molekularen Masse von ca. 9 kDa. Unabhängig von der Separationsmethode und den individuellen cytosolischen Nickelgehalten zeigte sich in den Cytosolen der malignen Gewebe eine Verschiebung des nativen Verteilungsmusters gegenüber dem in den Cytosolen der Normalgewebe in der Weise, dass das Peakflächenverhältnis der 6 kDa-Fraktion zur 9 kDa-Fraktion in den Cytosolen der malignen Gewebe signifikant kleiner war als in den korrespondierenden Cytosolen der Normalgewebe ( $p < 0.01$ ). Ausnahmen waren die Proben 4c und 14c. Bei dem Tumorgewebe der Probe 4c handelte es sich nicht um malignes sondern um inflammatorisches Gewebe, so dass das Peakflächenverhältnis der beiden korrespondierenden Cytosolproben identisch sein sollte, was unabhängig von der eingesetzten analytischen Methode gezeigt werden konnte. Bei der Probe 14c (Tumorstadium Dukes A) wird angenommen, dass das Gen wofür das nickelhaltige Protein kodiert, nicht unterexprimiert ist, also nicht mutiert ist, während es in den anderen Gewebeproben möglicherweise defekt ist. Um welche Genprodukte es sich bei der Ni-Spezies I bzw. II handelt, konnte mit Hilfe der eingesetzten analytischen Methoden nicht ermittelt werden. Die Ergebnisse der Berechnung der Peakflächenverhältnisse sind in Tabelle 5-12 zusammengefasst.

Tab. 5-12 Peakflächenverhältnisse der Nickelspezies I (6 kDa) zur Nickelspezies II (9 kDa) in Cytosolen von normalen und malignen Kolorektalgeweben

Probe	Flächenverhältnis Ni-Spezies I / Ni-Spezies II Analytische Methode: CE/ICP-MS		Flächenverhältnis Ni-Spezies I / Ni-Spezies II Analytische Methode: SEC/ICP-MS	
	Normalgewebe	Tumorgewebe	Normalgewebe	Tumorgewebe
1c	1,00	0 <sup>§</sup>	0,63	0 <sup>§</sup>
2c	0,38	0,10	n.b.	n.b.
3c	0,46	0,09	2,08	0,09
4c	0,37	0,37*	0,32	0,29*
5c	1,14	0,19	0,90	0,49
10c	0,99	0,10	0,59	0,47
11c	1,04	0,40	0,89	0,60
12c	0,61	0,48	n.b.	n.b.
13c	0,28	0 <sup>§</sup>	1,20	0 <sup>§</sup>
14c	0,23	0,24	0,46	0,48
15c	0,62	0,28	0,86	0,33

\* inflammatorisches Gewebe; § Nickelspezies I nicht detektierbar; n.b. nicht bestimmt (Cytosolausbeute zu gering)

Unter der Annahme, dass Nickel in erster Linie an Proteine mit hohem Histidinanteil bindet, könnte es sich bei der Ni-Spezies I um die Transkriptionsfaktoren c-jun, c-fos und c-myc (Protoonkogenprodukte mit molekularen Massen von 5-7 kDa) handeln. Bei der Nickelspezies II könnte es sich um das humane Östrogenrezeptor-Protein, das Transskriptionsrepressorprotein hNot4 und oder das Rev-Erb( $\alpha$ )-Protein (orphan nuclear receptor protein) mit Molmassen von ca. 9-10 kDa handeln. Alle diese Genprodukte stehen im Zusammenhang mit der kolorektalen Krebserkrankung. Zur Identifizierung der Bindungspartner müssten weitere analytische Methoden, wie die CE/ESI-MS-MS eingesetzt werden.

Bei der SE-Fraktion mit einem Peakmaximum > 35 kDa handelt es sich wahrscheinlich um höhermolekulare Nickelverbindungen, die bereits in der Literatur beschrieben sind. Durch Verwendung einer Säule mit einem größeren Trennbereich sollten auch die höhermolekularen, cytosolischen Nickelkomplexe in kolorektalen Geweben sepa-

rierbar sein. Dieses ist weiteren Aktivitäten vorbehalten. Bei der Fraktion mit einem Peakmaximum zwischen 30 und 33 kDa könnte es sich um das nickelbindende Protein Lipovitellin 2 $\beta$  und oder um die in allen Geweben vorkommende Carboanhydrase handeln. Bei der Fraktion mit einem Peakmaximum von 28 kDa könnte es sich um das glykolisierte Protein TIMP1, einem Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen (Molmasse 28,5 kDa), das im Zusammenhang mit der kolorektalen Krebserkrankung steht, handeln [398].

Um die Eigenschaften der getrennten Ni-Spezies, wie Bindungsstärke, Oxidationsempfindlichkeit etc. zu untersuchen, wurde jeweils das Cytosol einer malignen Gewebeprobe und das korrespondierende Cytosol der normalen Gewebeprobe mit EDTA verschiedener Konzentrationen zur Komplexbildung bzw. mit Zn<sup>2+</sup>-Lösungen verschiedener Konzentrationen zur Verdrängung des Ni<sup>2+</sup> (siehe dazu Abbildung 5-24) aus den Proteinen versetzt. Erst ab einer Zugabe von 0,07 mmol EDTA zu den Cytosolen, konnte eine geringfügige Komplexbildung erreicht werden.

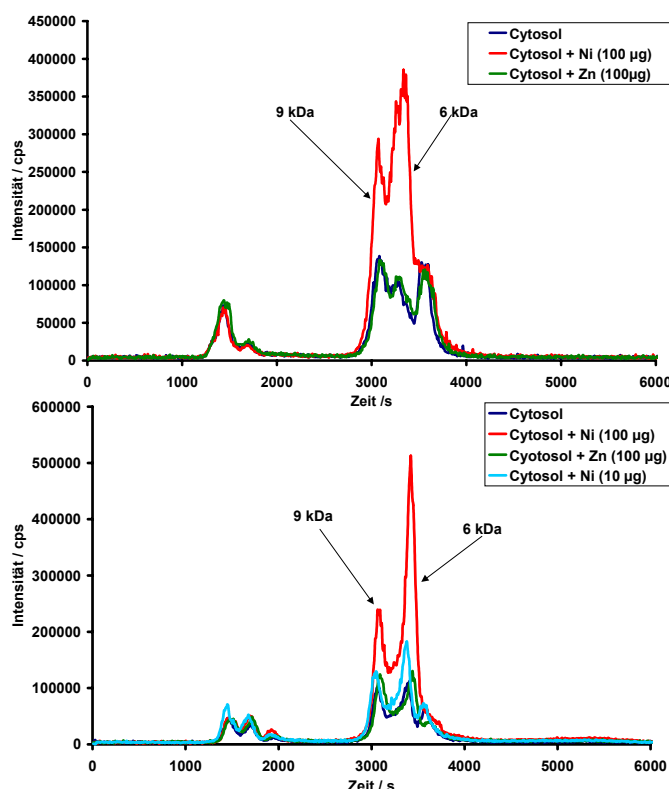


Abb. 5-24 Verhalten der Ni-Spezies gegenüber Zn<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup>; analytische Methode: SEC/ICP-MS; Cytosolprobe 10c; a) normales b) malignes Gewebe

Wie aus Abbildung 5-24 ersichtlich, ließ sich Nickel durch Zugabe hochkonzentrierter  $\text{Zn}^{2+}$ -Lösungen nicht verdrängen. Bei Zugabe einer  $\text{Ni}^{2+}$ -Lösung zu den Cytosolen, konnte gezeigt werden, dass sich Nickel bevorzugt an die in den Fraktionen mit Molmassen von 6 kDa bzw. 9 kDa enthaltenen Proteine bindet. Dabei blieb das Peakflächenverhältnis in den Cytosolen der neoplastischen Gewebe bzw. der gesunden Gewebe unverändert. Weiterhin zeigten sich die Nickelspezies oxidationsunempfindlich. Durch Zusatz von Arsenobetain zum Cytosol konnte nach kapillarelektrophoretischer Trennung der Ni-Komplexe gezeigt werden, dass es sich bei den Ni-Spezies I und II um positiv geladene Nickelverbindungen handeln muss.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mindestens zwei vorher unbekannte Nickelspezies in den Cytosolen der kolorektalen Gewebeproben mittels SEC/ICP-MS und CE/ICP-MS detektiert werden konnten, deren natives Verteilungsmuster in den transformierten Zellen verändert ist.

## 6 Zusammenfassung

Das kolorektale Karzinom ist die zweithäufigste Ursache der Krebssterblichkeit in hochentwickelten Industrieländern. Die Wahrscheinlichkeit an dieser Neoplasie zu erkranken, beträgt 6% bei durchschnittlichem individuellem Risiko. Aus molekularbiologischer Sicht ist diese Krebsart besonders gut zu klinischen Studien geeignet, da die Tumorigenese über Vorstadien in Form von adenomatösen Polypen oder Dysplasien hin zu Karzinomen mit schlechter Prognose über einen größeren Zeitraum verläuft. Das Auffinden der molekularen Unterschiede zwischen Normal- und Krebszellen bedeutet nicht nur die Grundlage zum Verständnis der malignen Transformation sondern eröffnet auch neue Wege in der Entwicklung von Krebstherapeutika. Mineral- und Spurenelemente stellen hervorragende Marker für einen veränderten Stoffwechsel dar, da sie vielfältige Beziehungen zu Proteinen insbesondere zu den Enzymen haben. Dieses spiegelt sich im Ablauf von Differenzierungs-, Wachstums- und Regenerationsprozessen wider.

Im Zuge der Weiterentwicklung analytischer Multielementmethoden mit immer besserem Nachweisvermögen sollte es möglich sein über die Bestimmung von Elementgehalten in normalen und malignen Geweben des Gastrointestinaltraktes und dessen Zellkompartimenten und über die Elementspeziesanalytik einen Beitrag zu dem veränderten Zellstoffwechsel nach maligner Transformation zu leisten.

Im ersten Teil dieser Studie wurden die Gehalte der Elemente P, S, Cl, K, Ca, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br und Rb in 68 Tumorgewebeproben und ihren korrespondierenden Normalgewebeproben mit Hilfe der Totalreflexionsröntgen-fluoreszenzspektrometrie (TXRF) bestimmt. Zu diesem Zweck sind zwei verschiedene Probenvorbereitungsmethoden erarbeitet und optimiert worden, der oxidative Hochdruckaufschluss und die Anfertigung von Gefrierschnitten. Zusätzlich wurden in 20 oxidativ aufgeschlossenen Gewebeproben die Na- und Mg-Gehalte mittels induktiv gekoppeltem Plasma in Verbindung mit einem Atomemissionsspektrometer (ICP-AES) ermittelt. In Abhängigkeit von dem untersuchten Organabschnitt (Magen, Kolon, Rektum) ergab sich ein Fingerprint bezüglich der signifikant erhöhten bzw. erniedrigten Elementgehalten in neoplastischen Geweben im Vergleich mit den Elementgehalten in den gesunden Geweben. P, K und Rb zeigten unabhängig von dem untersuchten Organ signifikant erhöhte Gehalte in den malignen Geweben. Zusätzlich waren Mg und Se in den malignen Gewebeproben des Kolons und Rektums an-

gereichert, während für Na und Ca verminderte Gehalte in den Tumorproben gefunden wurden. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich auch in den S- und Cu-Gehalten der Kolonproben, wobei beide Elemente im malignen Gewebe akkumuliert waren.

Mit Hilfe chemometrischer Methoden, wie der hierarchischen Clusteranalyse, der Hauptkomponentenanalyse (PCA) und der linearen Diskriminanzanalyse (LDA), konnte eine exakte Gewebetypklassifizierung (malignes oder gesundes Gewebe) über die ermittelten Elementgehalte in den Gewebeproben erreicht werden. Zur weiteren Differenzierung der Ergebnisse der Elementgehaltsbestimmungen im Zusammenhang mit den histopathologischen Patientendaten wurde die multiple lineare Regression angewendet. Es zeigte sich eine Abhängigkeit der Elementgehalte von der Tumorklassifikation und der Malignität. Die Bestimmung der Elementgehalte in den Gefrierschnitten bei geringem Probenvorbereitungsaufwand kann einen Beitrag zur diagnostischen und prognostischen Unterstützung gastrointestinaler Krebserkrankungen leisten.

Unter dem Einsatz chemometrischer Methoden wurden auch die Wechselwirkungen der Mineral- und Spurenelemente untereinander innerhalb der malignen und normalen Gewebe ermittelt. Es konnten Elementkorrelationen in Abhängigkeit von dem Organ des Gastrointestinaltraktes aufgezeigt werden, wobei die Korrelation von Kalium, Phosphor und Rubidium sowie Chrom und Nickel besonders hervorzuheben ist. Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte die Hypothese der Essentialität von Rb untermauert werden und gezeigt werden, dass sowohl Chrom als auch Nickel eine biologische Rolle spielen, auch wenn sie nur indirekt in metabolische Prozesse involviert sind. Weiterhin liegt die Vermutung nahe, dass weder Nickel noch Chrom an der Kanzerogenese von Neoplasien des gastrointestinalen Traktes beteiligt sind. Auf Grundlage der immunologischen Wirkung von Ni und Cr und ihrer Cytotoxizität in hohen Konzentrationen könnte ein neues Therapiekonzept entwickelt werden.

Im weiteren Verlauf der Studie wurden die Elementgehalte in den Cytosolen von malignen und normalen Geweben des Darmtraktes bestimmt. Eine Quantifizierung der Spurenelemente erwies sich über den cytosolischen Proteingehalt als sinnvoll. Es zeigte sich ein verändertes Elementverteilungsmusters in den maligne transformierten Zellen, was als Konsequenz eines übersteigerten oder auch reduzierten Stoffwechsels maligner Zellen zu beurteilen ist. Die proteingebundenen Elementkonzentrationen in Cytosolen von Gewebeproben des gleichen histopathologischen Typs



(Gewebe ohne malignen Anhaltspunkt) unterschieden sich nicht, was zur Bestätigung der Grundidee der vorgestellten Studien beiträgt.

Bei Betrachtung des cytosolischen Calciumgehaltes zeigte sich eine Abhängigkeit von dem Tumorstadium (Festlegung nach Dukes), der als Kenngröße für das Ausmaß der Störung zwischen Proliferationsrate und dem Zelltod angesehen werden kann. Es ist bekannt, dass hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zum Zelltod führen, niedrige  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen den Zelltod verhindern, wobei die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über den Anti-Apoptose Regulator BCL-2 reguliert wird, der wiederum in transformierten kolorektalen Zellen in Abhängigkeit von dem Tumorstadium über- bzw. unterexprimiert ist. Sollte sich die Korrelation zwischen dem cytosolischen Calciumgehalt (Gehalt von Calcium in ionischer und gebundener Form) und dem Tumorstadium über eine größere Anzahl von Proben verifizieren lassen, so könnte er als molekularer Marker zur Prognose von Überlebenschancen bei kolorektalen Krebserkrankungen eingesetzt werden.

Eine weitere interessante Korrelation konnte über die Bestimmung der Aktivitäten der am Redoxsystem beteiligten cytosolischen Enzyme ermittelt werden. Hintergrund der Enzymaktivitätsbestimmungen ist die Untersuchung des Antioxidantienstatus kolorektaler Zellen, die dem Angriff metabolisch erzeugter, hoch reaktiver Sauerstoffspezies im besonderen Maße ausgesetzt sind. Es stellte sich heraus, dass die Aktivität der Glutathionperoxidase als auch die Aktivität der Zn/Cu-Superoxiddismutase mit dem Malignitätsgrad korrelierten und somit auf die Tumorprogression Einfluss nehmen. Die Ergebnisse sollten jedoch durch eine größere Anzahl an Proben verifiziert werden.

In der abschließenden Studie wurden die im Cytosol enthaltenen Spezies der Elemente Mn, Cu, Zn, Cd, Pb, Zn, V, As, Se, Mo, Sn, J und Ni mit Hilfe einer online-Kopplung eines Größenausschlusschromatographen (SEC) mit einem induktiv gekoppelten Plasma-Massenspektrometer (ICP-MS) analysiert. Alle Parameteroptimierungen wurden auf die Analyse der Nickelspezies fokussiert. In einem Trennbereich von 4-35 kDa konnten mehrere unbekannte Spezies der Elemente V, J, As, Mo, Pb, Cd, Sn und Ni registriert werden, die zu weiteren Forschungsaktivitäten Anlass geben. Die Peakmaxima der 6 detektierten Nickelspezies lagen bei > 35 kDa, 30-33 kDa, 28 kDa, 9 kDa, 6-6,5 kDa und 4-5 kDa. Bei der Fraktion mit einem Peakmaximum > 35 kDa handelt es sich wahrscheinlich um höhermolekulare Nickelverbindungen, die bereits in der Literatur beschrieben sind. Bei der anschließenden Frak-

tion mit einem Peakmaximum zwischen 30 und 33 kDa könnte es sich um das nickelbindende Protein Lipovitellin 2 $\beta$  und oder um die in allen Geweben vorkommende Carboanhydrase handeln. Bei der Fraktion mit einem Peakmaximum von 28 kDa könnte es sich um das glykolisierte Protein TIMP1, einem Inhibitor der Matrixmetalloproteinasen (Molmasse 28,5 kDa), der im Zusammenhang mit der kolorektalen Krebserkrankung steht, handeln. Die Bindung von Nickel an TIMP1 sowie die Ni-Bindungspartner aller weiteren Spezies sind nicht in der Literatur beschrieben.

Bei einem Vergleich der erhaltenen Chromatogramme von Cytosolen der malignen Gewebe mit denen der normalen Gewebe konnte kein qualitativer Unterschied festgestellt werden. Über die Bestimmung des Peakflächenverhältnisses der 6 kDa-Fraktion / 9 kDa-Fraktion konnte ein quantitativer Unterschied nachgewiesen werden. In den Cytosolen der malignen Gewebeproben war das Flächenverhältnis signifikant kleiner als in den korrespondierenden Cytosolen der Normalgewebe ( $P < 0.01$ ). Parallel dazu wurden die Spezies kapillarelektrophoretisch (CE) getrennt und online mit Hilfe eines ICP-Massenspektrometers detektiert. Die Peakzuordnung erfolgte mit Hilfe des kupferbeladenen Metallothioneins (Molmasse ca. 6 kDa), das sowohl im Cytosol der neoplastischen als auch im Cytosol der gesunden Gewebe gefunden wurde. Die Ergebnisse der Peakflächenberechnungen der CE/ICP-MS-Analysen stimmten mit denen der SEC/ICP-MS-Analysen überein.

Weitere charakteristische Eigenschaften der Nickelspezies sind ihre positive Ladung, ihre Oxidationsunempfindlichkeit und ihre Stabilität gegenüber Komplexbildnern. Es ist bekannt, dass sich Nickel bevorzugt an histidinreiche Proteine bindet. Das legt die Vermutung nahe, dass es sich bei den Spezies um die Transkriptionsfaktoren c-jun, c-fos und c-myc (Protoonkogenprodukte mit molekularen Massen von 5-7 kDa) handelt. Weitere mögliche Bindungspartner könnten das humane Östrogenrezeptor-Protein, das Transskriptionsrepressorprotein hNot4 und das Rev-Erb( $\alpha$ )-Protein (orphan nuclear receptor protein) mit Molmassen von ca. 9-10 kDa sein. Zur Identifizierung der Bindungspartner müssten weitere analytische Methoden, wie die CE/ESI-MS-MS eingesetzt werden.

Durch die Analyse der Nickelspezies konnte ein neuer Prognosefaktor kolorektaler Karzinome auf molekularer Ebene aufgezeigt werden. In wieweit dieser Prognosefaktor über seine tumorbiologischen Informationen Optionen für neue Therapiestrategien bietet, müsste im Einzelnen noch geprüft werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] W. Graumann, J. Druker  
*Histo- and Cytochemistry as a Tool in Environmental Toxicology*  
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1991)
- [2] J.G.D. Birkmayer  
*Tumorbiologie – Eine Einführung in die Biologie von Krebszellen*  
Karger Verlag, Basel, München, Paris, London, New York, Tokyo, Sydney  
(1984)
- [3] G. Löffler, P.E. Petrides  
*Biochemie und Pathobiochemie*  
5. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1990)
- [4] J.J.R. da Silva, R.J.P. Williams  
*The biological chemistry of the elements - The inorganic chemistry of life*  
Clarendon, Oxford (1991)
- [5] D. Schmähl  
*Maligne Tumoren – Entstehung, Wachstum, Chemotherapie*  
4. Auflage, Editio Cantor, Aulendorf (1981)
- [6] Gastrointestinale Tumoren – Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und  
Nachsorge  
Hrsg. Tumorzentrum München, 5. Auflage, München (1997)
- [7] D.M. Parkin  
The global burden of cancer  
*Cancer Biology* **8** (1998) 219-235
- [8] IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. **61**  
*Schistosomes, Liver Flukes and Helicobacter pylori*  
International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (1994)
- [9] W.S. Robinson  
Molecular events in the pathogenesis of hepadna-virus-associated  
hepatocellular carcinoma  
*Ann. Rev. Med.* **45** (1994) 297-323
- [10] IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Vol. **64**  
*Human Papillomavirus*  
International Agency for Research on Cancer, Lyon, France (1995)

- [11] T. Sugimura  
Nutrition and dietary carcinogens  
*Carcinogenesis* **21** (2000) 387-395
- [12] *Magenkrebs*  
*Die blauen Ratgeber*,  
Bd. 7, Hrsg. Deutsche Krebshilfe e.V., Ausgabe 1/99, (1999)
- [13] D. Zaridze, E. Borisova, D. Maximovitch, V. Chkrikvadze  
Alcohol consumption, smoking and risk of gastric cancer: Case-control study  
from Moscow, Russia  
*Cancer Causes and Control* **11** (2000) 363-371
- [14] P. Laurén  
The two histological main types of gastric carcinoma: Diffuse and so-called  
intestinal type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification  
*Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **64** (1965) 31-43
- [15] National Cancer Institute  
*Cancer of the colon and rectum*  
[http://cancernet.nci.nih.gov/wyntk\\_pubs/colon.htm](http://cancernet.nci.nih.gov/wyntk_pubs/colon.htm), NCI Publication (1999)
- [16] M.L. Slattery, J.D. Potter, K.-N. Ma, B.J. Caan, M. Leppert, W. Samowitz  
Western diet, family history of colorectal cancer, NAT2, GSTM-1 and risk of  
colon cancer  
*Cancer Causes and Control* **11** (2000), 1-8
- [17] I. Ogimoto, A. Shibata, K. Fukuda  
World cancer research fund/American Institute of Cancer Research 1997  
recommendations: applicability to digestive tract cancer in Japan  
*Cancer Causes and Control* **11** (2000), 9-23
- [18] B. Armstrong, R. Doll  
Environmental factors and cancer incidence and mortality in different  
countries, with special reference to dietary practices  
*Int. J. Cancer* **15** (1975), 617-631
- [19] C. Lamberti, R. Caspari, W. Friedl, T. Sauerbruch, P. Propping  
Erbliches Kolonkarzinom: Symptomatik, Diagnostik und Krebsvorsorge  
*Deutsches Ärzteblatt* **93** (1996), B1094-1099

- [20] H.T. Lynch, T.C. Smyrk, P. Watson, S.J. Lanspa, J.F. Lynch, P.M. Lynch, R.J. Cavalieri, C.R. Boland  
Genetics, natural history, tumour spectrum and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer an updated review  
*Gastroenterology* **104** (1993), 1535-1549
- [21] P. Watson, H.T. Lynch  
Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer  
*Cancer* **71** (1993), 677-685
- [22] J. D. Scott, T. Pawson  
High-Fidelity in der Zelle  
*Spektrum der Wissenschaft* **10** (2000), 60-67
- [23] C. C. Harris  
Chemical and Physical Carcinogenesis: Advances and Perspectives for the 1990's  
*Cancer Research* **51** (1991), 50235-50445
- [24] E. Farber  
Cancer development and its natural history: A cancer prevention perspective  
*Cancer* **62** (1998), 1676-1679
- [25] M. Ilyas, J. Straub, I.P.M. Tomlinson, W.F. Bodmer  
Genetic pathways in colorectal and other cancers  
*Eur. J. Cancer* **35** (1999), 1986-2002
- [26] W. Dekant, S. Vamvakas  
*Toxikologie für Chemiker und Biologen*  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1994)
- [27] Hrsg. V. Schirrmacher  
*Krebs-Tumoren, Zellen, Gene*  
Spektrum der Wissenschaft, Heidelberg (1986)
- [28] P.E. Petrides  
Molekulare Grundlagen in der Onkologie  
In: *Internistische Onkologie*, W. Wilmanns, D. Huhn, K. Wilms (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart (1994), 60-82
- [29] T.G. Kontriris  
Oncogenes  
*New Engl. J. Med.* **333** (1995), 303-306

- [30] A.J. Levine  
The tumor suppressor genes  
Annu. Rev. Biochem. **62** (1993), 623-651
- [31] R.A. Weinberg  
Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis  
Cancer Res. **49** (1989), 3713-3721
- [32] K.W. Kinzler, B. Vogelstein  
Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers  
Nature **386** (1997), 761-763
- [33] L.F. Parado, H. Land, R.A. Weinberg, D. Wolf, V. Rotter  
Cooperation between gene encoding p53 tumor antigen and ras in cellular transformation  
Nature **312** (1984), 649-651
- [34] X. Lu, S.H. Park, T.C. Thompson, D.P. Lane  
Ras-induced hyperplasia occurs with mutation of p53, but activated ras and myc together can induce carcinoma without p53 mutation  
Cell **70** (1992), 53-61
- [35] J.L. Bos  
The ras gene family and human carcinogenesis  
Mutat. Res. **195** (1988), 255-271
- [36] J.J. Yang, J.S. Kang, R.S. Krauss  
Ras signals to the cell cycle machinery via multiple pathways to induce anchorage-independent growth  
Mol. & Cell Biol. **18** (1998), 2586-2595
- [37] M.F. Hansen, W.K. Cavenee  
Retinoblastoma and the progression of tumor genetics  
Trends in Genetics **4** (1988), 125
- [38] L.A. Donehower, A. Bradley  
The tumor suppressor p53  
Biochem. Biophys. Acta **1152** (1993), 181-205
- [39] D.P. Lane  
Cancer, p53, guardian of the genome  
Nature **358** (1992), 15-16

- [40] B. Vogelstein, K.W. Kinzler  
p53 function and dysfunction  
Cell **70** (1992), 523-526
- [41] M.S. Greenblatt, W.P. Bennett, M. Hollstein, C.C. Harris  
Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis  
Cancer Res. **54** (1994), 4855-4878
- [42] R.H. Huebner, K.C. Park, J.E. Shepherd, J. Schwimmer, J. Czernin, M.E. Phelps, S.S. Gambhir  
A meta-analysis of the literature for whole-body FDG PET detection of recurrent colorectal cancer  
J. Nucl. Med. **41** (2000), 1177-1189
- [43] Hrsg. J. Falbe, M. Regitz  
*Römp- Basislexikon Chemie*  
Bd. 1, Georg Thieme Verlag 1998, S. 307
- [44] B. Vogelstein, E.R. Fearon, S.R. Hamilton, S.E. Kern, A.C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A.M.M. Smits, J.L. Bos  
Genetic alterations during colorectal-tumor development  
N. Engl. J. Med. **319** (1988), 525-532
- [45] E. Tahara, H. Kuniyasu, W. Yasui, H. Yokozaki  
Gene alterations in intestinal metaplasia and gastric cancer  
Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. **30** (1994), 597-602
- [46] W. Müller, W. Borchard  
pS2 protein in gastric carcinoma and normal gastric mucosa: association with clinicopathological parameters and patient survival  
J. Pathol. **171** (1993), 263-269
- [47] J. Fujimoto, W. Yasui, H. Tahara, Eij. Tahara, Y. Kudo, H. Yokozaki, Eii. Tahara  
DNA hypermethylation at the pS2 promoter region is associated with early stage of stomach carcinogenesis  
Canc. Lett. **149** (2000), 125-134

- [48] A. Tokunaga, M. Onda, T. Okuda, T. Teramoto, I. Fujita, T. Mizutani, T. Kiyama, T. Yoshiyuki, K. Nishi, N. Matsukara  
Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erb B-2 in human gastric cancer  
*Cancer* **75** (1995), 1418-1425
- [49] J. Benhattar, L. Losi, P. Chaubert, J.C. Givel, J. Costa  
Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma  
*Gastroenterol.* **104** (1993), 1044-1048
- [50] S.D. Finkelstein, R. Sayegh, S. Christensen, P.A. Swalsky  
Biologic behaviour correlates with K-ras-2 mutation type  
*Cancer* **71** (1993), 3827-3838
- [51] H.E. Gabbert, W. Mueller, a. Schneiders, S. Meier, G. Hommel  
The relationship of p53 expression to the prognosis of 418 patients with gastric carcinoma  
*Cancer* **76** (1995), 720-726
- [52] R. Hamelin, P. Laurent-Puig, S. Olschwang, N. Jego, B. Asselaim, Y. Remvikos, J. Girodet, R.J. Salmon, G. Thomas  
Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer  
*Gastroenterol.* **106** (1994), 42-48
- [53] J.G.A. Houbiers, S.H. van der Burg, L.M.G. van de Watering, R.A.E.M. Tollenaar, A. Brand, C.J.H. van de Velde, C.J.M. Melief  
Antibodies against p53 are associated with poor prognosis of colorectal cancer  
*Br. J. Cancer* **72** (1995), 637-641
- [54] H.M. Martin, M.I. Filipe, R.W. Morris, D.P. Lane, F. Sivistre  
p53 expression and prognosis in gastric carcinoma  
*Int. J. Cancer* **50** (1992), 859-862
- [55] E. Campo, R. Miquel, P. Jares, F. Bosch, M. Juan, A. Leone, J. Vives, A. Cardesa, J. Yague  
Prognostic significance of loss of heterozygosity of nm-23 H1 and p53 genes in human colorectal carcinomas  
*Cancer* **73** (1994), 2913-2921



- [56] M.M. Heiss, A. Allgayer, K.U. Gruetzner, I. Funke, R. Babic, K.W. Jauch, F.W. Schildberg  
Individual development and uPA-R-expression of disseminated tumor cells in bone marrow: A reference to early systemic disease in solid cancer  
Nature Med. **1** (1995), 1035-1039
- [57] M.M. Heiss, R. Babic, A. Allgayer, K.U. Gruetzner, K.W. Jauch, U. Loehrs, F.W. Schildberg  
Tumor-associated proteolysis and prognosis: New functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system  
J. Clin. Oncol. **13** (1995), 2084-2093
- [58] H. Nkarda, M. Schmitt, K. Ulm, A. Wenninger, H. Vogelsang, K. Becker, J.D. Roder, U. Fink, J.R. Siewert  
Prognostic impact urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer  
Cancer Res. **54** (1994), 2900-2907
- [59] M. Miyasaka  
Cancer metastasis and adhesion molecules  
Clin. Orthopaedics Rel. Res. **312** (1995), 10-18
- [60] M. Schmitt, F. Jaenicke, H. Graeff  
Tumor-associated proteases  
Fibrinolysis **6** (1992), 3-26
- [61] D. Boyd  
Examination of the effects of epidermal growth factor on the production of urokinase and the expression of the plasminogen activator receptor in a human colon cancer cell line  
Cancer Res. **49** (1989), 2427-2432
- [62] C.F.M. Sier, H.J.M. Vloedgraven, G. Griffioen, S. Ganesh, F.M. Nagengast, C.B.H.W. Lamers, H.W. Verspaget  
Plasminogen activators and inhibitor type 1 in neoplastic colonic tissue from patients with familial adenomatous polyposis  
Br. J. Cancer **71** (1995), 393-396

- [63] C.F.M. Sier, F.J.G.M. Kubben, S. Ganesh, M.M. Heerding, G. Griffioen, R. R. Hanemaaijer, J.H.J.M. van Krieken, C.B.H.W. Camers, H.W. Verspaget  
Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma  
Br. J. Cancer **74** (1996), 413-417
- [64] R. Poulson, M. Pignatelli, W.G. Stetler-Stevenson, L.A. Liotta, P.A. Wright, R.E. Jeffery, J.M. Longcroft, L. Rogers, G.W.H. Stamp  
Stromal expression of 72 kDa Type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal neoplasias  
Am. J. Pathol. **141** (1992), 389-396
- [65] S. McDonnell, M. Navre, R.J. Coffey, L.M. Matrisian  
Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP-7) in human gastric and colon carcinomas  
Mol. Carcinogen. **4** (1991), 527-533
- [66] M.R. Emmert-Buck, M.J. Roth, Z. Zhuang, E. Campo, J. Rozhin, B.F. Sloane, L.A. Liotta, W.G. Stetler-Stevenson  
Increased gelatinase A (MMP-2) and cathepsin B activity in invasive tumor regions of human colon cancer cells  
Am. J. Pathol. **145** (1994), 1285-1290
- [67] K.F. Becker, M.J. Atkinson, U. Reich, I. Becker, H. Nekarda, J.R. Siewert, H. Hoeffler  
E-cadherin gene mutations provide clues to diffuse type gastric carcinomas  
Cancer Res. **54** (1994), 3845-3852
- [68] U.H. Frixen, J. Behrens, M. Sachs, G. Eberle, B. Voss, A. Warda, D. Loechner, W. Birchmeier  
E-cadherin mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells  
J. Cell. Biol. **113** (1991), 173-185
- [69] B. Mayer, J.P. Johnson, F. Leidl, K.W. Jauch, M.M. Heiss, F.W. Schildberg, W. Birchmeier, I. Funke  
E-cadherin expression in primary and metastatic gastric cancer: Downregulation correlates with cellular dedifferentiation and glandular disintegration  
Cancer Res. **53** (1993), 1690-1695

- [70] Y. Yonemura, N. Nojima, M. Kaji, T. Fujimura, H. Itoh, I. Ninomiya, I. Miyazaki, Y. Endo, T. Sasaki  
E-cadherin and urokinase-type plasminogen activator tissue status in gastric carcinoma  
*Cancer* **76** (1995), 941-953
- [71] B. Mayer, K.W. Jauch, U. Guenther, C.G. figdor, F.W. Schildberg, I. Funke, J.P. Johnson  
De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer  
*Lancet* **342** (1993), 1019-1022
- [72] K. Furuta, M. Zahurak, X.-L. Yang, C. Rosada, S.N. Goodman, J.T. August, S.R. Hamilton  
Relationship between CD44 expression and cell proliferation in epithelium and stroma of colorectal neoplasms  
*Am. J. Pathol.* **149** (1996), 1147-1155
- [73] K. Furuta, M. Zahurak, S.N. Goodman, S.R. Hamilton, J.T. August  
Cd44 expression in the stromal matrix of colorectal cancer: Association with prognosis  
*Clin. Cancer Res.* **4** (1998), 21-29
- [74] M.A. English, S.V. Hughes, K.F. Kane, M.J.S. Langman, P.M. Stewart, M. Hewison  
Oestrogen inactivation in the colon: analysis of the expression and regulation of 17<sup>β</sup>-hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in normal colon and colonic cancer  
*Br. J. Cancer* **83** (2000), 550-558
- [75] M.R. Schneider  
Hormonale Therapie maligner Tumoren  
In: *Onkologie, Grundlagen, Diagnostik, Therapie, Entwicklungen*  
Hrsg. W.J. Zeller, H. zur Hausen, Ecomed Verlagsgesellschaft, Landsberg/Lech. IV-5 (1995), 1-43
- [76] C. Doi, Y. Noguchi, D. Marat, A. Saito, K. Fukuzawa, T. Yoshikawa, A. Tsuburaya  
Expression of nitric oxide synthase in gastric cancer  
*Cancer Lett.* **144** (1999), 161-167

- [77] E. Koh, S.H. Noh, Y.D. Lee, H.Y. Lee, J.-W. Han, H.W. Lee, S. Hong  
Differential expression of nitric oxide synthase in human stomach cancer  
Cancer Lett. **146** (1999), 173-180
- [78] S. Ambs, W.G. Merriam, W.P. Bennett, E.F. Bosco, M.O. Ogunfusica,  
S.M. Oser, S. Klein, P.G. Shields, T.R. Billiar, C.C. Harris  
Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas:  
implications for tumor angiogenesis and colon cancer progression  
Cancer Res. **58** (1998), 334-341
- [79] P.H. Krammer  
Apoptose  
Dt. Ärzteblatt **97** (2000), B1481-B1488
- [80] WHO  
*International histological classification of tumours*  
2<sup>nd</sup> ed., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo (1989)
- [81] UICC  
*TNM-Klassifikation maligner Tumoren*  
5. Auflage, Hrsg. C. Wittekind, G. Wagner, Springer Verlag, Berlin,  
Heidelberg, New York (1997)
- [82] C. Spieker, W. Siegenthaler  
Kongressbericht: Die Bedeutung von Mineralstoffen und Spurenelementen in  
der Medizin  
Dt. Ärzteblatt **89** (1992), C-1247-1250
- [83] J.D. Kruse-Jarres  
Grenzen der derzeitigen Kenntnisse über die Bedeutung und Aufgaben der  
Spurenelemente im menschlichen Organismus  
Vita. Min. Spur. **2** (1987), 5-12
- [84] N. Drakos  
Computer based learning unit  
<http://bob.usuf2.usuhs.mil/biochem/nutrition/NOTES/>  
University of Leeds, Leeds (1997)
- [85] S.J. Lippard, J.M. Berg  
*Bioanorganische Chemie*  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1995)
- [86] Hrsg. J. Falbe, M. Regitz

- Römpp Kompakt – Basislexikon Chemie*  
Bd. 4, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York (1999)
- [87] J.D. Kruse-Jarres  
Clinical indications for trace element analyses  
J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. **1** (1987), 5-19
- [88] K.D. Bachmann  
*Pädiatrie in Praxis und Klinik*  
Bd. 4, 2. Aufl., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1989), 465-475
- [89] M.L. Kapsenberg, E.A. Wierenga, F.E. Stiekema, A.M. Tiggelman, J.D. Bos  
The lymphokine production profiles of nickel-specific CD4+T-lymphocyte clones from contact nickel contact allergic and non-allergic individuals  
J. Invest. Dermatol. **98** (1992), 59-63.
- [90] P. Boscolo, E. Sabbioni, P. Andreassi, F. di Giacomo, M. Giaccio, M. di Gioacchino  
Immune parameters and blood and urine trace elements in nonallergic and nickel-sensitised humans  
In: P. Collery, P. Brätter, V. Negretti de Brätter, L. Khassanova, J.-C. Etienne, (Hrsg.), *Metal Ions in Biology and Medicine*, Vol 5. John Libbey Eurotext, Paris (1998), 545-555.
- [91] M.P. Waalkes  
Medical implications of metallothionein  
In: *Metallothionein III*,  
K.T. Suzuki, N. Imura, M. Kimura, (Eds.), Birkhäuser Verlag, Basel (1993), 243-254
- [92] J.H.R. Kägi, A. Schäffer  
Biochemistry of Metallothionein  
Biochemistry **27** (1988), 8509-8515
- [93] M.G. Cherian, S.B. Howell, N. Imura, C.D. Klaassen, J. Koropatnick, J.S. Lazo, M.P. Waalkes  
Role of Metallothionein in carcinogenesis  
Toxicol. Appl. Pharmacol. **126** (1994), 1-5

- [94] E.I. Hamilton, E. Sabbioni, M.T. Van der Venne  
Element reference values in tissues from inhabitants of the European Community: VI. Review of elements in blood, plasma and urine and a critical evaluation of reference values for the United Kingdom population  
Scie. Total Environ. **158** (1994), 165-190
- [95] R. Cornelis, E. Sabbioni, M.T. Van der Venne  
Element reference values in tissues from inhabitants of the European Community: VII. Review of elements in blood, plasma and urine for the Belgian population and a critical evaluation of their possible use as reference values  
Scie. Total Environ. **158** (1994), 191-226
- [96] E. Coni, A. Alimonti, L. Fornarelli, E. Beccaloni, E. Sabbioni, R. Pietra, G.B. Bolis, E. Christallini, A. Stacchini, S. Caroli  
Reference values for elements in human organs : Criteria and methods  
Acta Chim. Hung. **128** (1991), 563-572
- [97] V. Iyengar, J. Woittiez  
Trace elements in human clinical specimens: Evaluation of literature data to identify reference values  
Clin. Chem. **34** (1988), 474-481
- [98] Hrsg. H.J. Fiedler, H.J. Rösler  
*Spurenelemente in der Umwelt*  
Ferdinand Enke-Verlag, Stuttgart (1988)
- [99] K. Baldauf  
Bedeutung der Spurenelemente in der Onkologie  
Zbl. Pharm. **117** (1978), 747-750
- [100] K. Baldauf, W. Wiesener, B. Schicke  
Zum Wert der Spurenelementbestimmung in der Früherkennung bösartiger Geschwülste  
Zbl. Pharm. **121** (1982), 417-421
- [101] M. Kujawa, R. Engst  
Spurenelemente und Humanernährung  
Zbl. Pharm. **117** (1978), 707-711
- [102] H.H. Sky-Peck  
Trace metals and neoplasia  
Clin. Physiol. Biochem. **4** (1986), 99-111

- [103] H. Sigel  
*Metal ions in biological systems: Carcinogenicity and metal ions*  
Vol. 10, Marcel Dekker Inc., New York, Basel (1980)
- [104] W. Yongxian, Q. Jinfa, W. Simin, Y. Linbao  
Study on the relation of Se, Mn, Fe, Sr, Pb, Zn, Cu, and Ca to liver cancer mortality from analysis of scalp hair  
Sci. Total Environ. **91** (1990), 191-198
- [105] L. Piccinini, P. Borella, A. Bargellini, C. Incerti Medici, A. Zoboli  
A case-control study on selenium, zinc, and copper in plasma and hair of subjects affected by breast and lung cancer  
Biol. Trace Elem. Res. **51** (1996), 23-30
- [106] H.E. Broxmeyer  
Iron-binding proteins and the regulation of haematopoietic cell proliferation/differentiation  
In: *Iron in immunity, cancer and inflammation*  
M. De Sousa, J.H. Brock (Eds.), John Wiley & Sons, Chichester (1989), 199-232
- [107] M.A. Foster, T. Pocklington, A.A. Dawson  
Ceruloplasmin and iron transferrin in human disease  
In: *Metal ions in biological systems: Carcinogenicity and metal ions*  
H. Sigel (Ed.), Vol. 10, Marcel Dekker Inc., New York, Basel (1980), 129-166
- [108] M. Hargovcic, C.F. Tessmer, F.B. Thomas, I.M. Fuller, J.F. Gamble, C.C. Schullenberger  
Significance of serum copper levels in adult patients with Hodgkin's disease  
Cancer (Phila.) **31** (1973), 1337-1345
- [109] I. L. Mulay, R. Roy, B.E. Knox, N.H. Suhr, W.E. Delaney  
Trace-metal analysis of cancerous and non-cancerous human tissues  
J. Nat. Cancer Inst. **47** (1971), 1-13
- [110] A. Feustel, R. Wennrich, B. Vorberg  
Trace elements in cellular fractions of normal and carcinogenic tissues from human urinary bladder  
In: *Investigative Urology 2*,  
C.H. Jacobi et al. (Eds.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg (1987), 42-46

- [111] A. Feustel, R. Wennrich, D. Steiniger, P. Klauss  
Zinc and Cadmium concentration in prostatic carcinoma of different histological grading in comparison to normal prostate tissue  
Urol. Res. **10** (1982), 301-303
- [112] A. Feustel, R. Wennrich, H. Dittrich  
Zinc, Cadmium and Selenium concentrations in separated epithelium and stroma from prostatic tissues of different histology  
Urol. Res. **15** (1987), 161-163
- [113] A. Feustel, R. Wennrich  
Zinc and Cadmium in cell fractions of prostatic cancer tissues of different histological grading in comparison to BPH and normal Prostate  
Urol. Res. **12** (1984), 147-150
- [114] A. Feustel, R. Wennrich, H. Dittrich  
Investigations of trace elements in metastases and primary carcinoma of the prostate  
Urol. Res. **17** (1989), 107-109
- [115] A. Feustel, R. Wennrich, H. Dittrich  
Studies of Cd, Zn and Cu levels in human kidney tumours and normal kidney  
Urol. Res. **14** (1986), 105-108
- [116] E. N. Drake II, H.H. Sky-Peck  
Discriminant analysis of trace element distribution in normal and malignant human tissues  
Cancer Res. **49** (1989), 4210-4215
- [117] A. Kubala-Kukus, J. Braziewicz, D. Banaś, U. Majewska, S. Gózdź, A. Urbaniak  
Trace element load in cancer and normal lung tissue  
Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. B **150** (1999), 193-199
- [118] P. Borella, A. Bargellini, E. Caselgrandi, L. Piccinini  
Observations on the use of plasma, hair and tissue to evaluate trace element status in cancer  
J. Trace Elements Med. Biol. **11** (1997), 162-165
- [119] K.-H. Ng, D.A. Bradley, L.-M. Looi  
Elevated trace element concentrations in malignant breast tissues  
Br. J. Radiol. **70** (1997), 375-382



- [120] M.M. Rajadhyaksha, Z.R. Turel  
Multielemental determination in normal, benign, and cancerous tissues of the human brain  
J. Radioanal. Nucl. Chem. **156** (1992), 341-347
- [121] V.Y. Zaichick, A.F. Tsyb, B.M. Vtyurin  
Trace elements and thyroid cancer  
Analyst **120** (1995), 817-821
- [122] P.M. Santoliquido, H.W. Southwick, J.H. Olwin  
Trace metal levels in cancer of the breast  
Surg. Gynecol. Obstet. **142** (1976), 65-70
- [123] S.L. Rizk, H.H. Sky-Peck  
Comparison between concentrations of trace elements in normal and neoplastic human breast tissue  
Cancer Res. **44** (1984), 5390-5394
- [124] A.E. Schwartz, G.W. Lddicotte, R.W. Fink, E.W. Friedman  
Trace elements in normal and malignant human breast tissue  
Surgery **76** (1974), 325-329
- [125] S.S. Ranade, V.K. Panday  
Transition metals in human cancer I. Oesophagus and bone marrow  
Sci. Total Environ. **40** (1984), 245-257
- [126] B. Rostkowska-Nadolska, L. Pośpiech, m. Bochnia  
Content of trace elements in the serum of patients with carcinoma of the Larynx  
Archivum Immunologiae et Therapie Experimentalis **46** (1999), 321-325
- [127] L. Gehring, P. Leonhardt H. Bigl, T. Löser, M. Poetzsch, T. Keller  
Serum trace elements in lung cancer  
In: *Metal Ions in Biology and Medicine*,  
Collery P, Brätter P, Negretti de Brätter V, Khassanova L, Etienne J-C,  
(Eds.), Vol 5, John Libbey Eurotext , Paris (1998), 583-587
- [128] M.A. Tariq, Q. Nisa, A. Fatima  
Concentrations of Cu, Cd, Ni, and Pb in the blood and tissues of cancerous persons in a Pakistani population  
Scie. Total Environ. **175** (1995), 43-48

- [129] Y. Schmitt, M. Haug, J.D. Kruse-Jarres  
Determination of the trace elements zinc, copper, nickel and chromium in bone marrow and plasma of patients with Non-Hodgkin-Lymphomas  
J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. **7** (1993), 223-228
- [130] A. Roguljić, A. Roth, K. Kolarić, Ž. Maričić  
Iron, copper, and Zinc liver tissue levels in patients with malignant lymphomas  
Cancer **46** (1980), 565-569
- [131] K. Byrjalsen, J. Kristiansen, J.M. Christensen  
Trends in quality assurance of metal determination in clinical chemistry  
Analyst **123** (1998), 7-12
- [132] R. Cornelis  
Quality Control in trace element analysis of clinical and biological samples:  
How good are your data ?  
J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis. **6** (1992), 129-135
- [133] Hrsg. Ciba-Geigy AG  
*Wissenschaftliche Tabellen Geigy*  
Teilband Einheiten im Messwesen, Körperflüssigkeiten, Organe, Energiehaushalt, Ernährung  
8. Aufl., Ciba-Geigy Ag, Basel (1977)
- [134] R. Klockenkämper  
*Total-Reflection X-Ray Fluorescence Analysis*, Chapter 5.3  
Volume 140 in Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and Its Applications, series Ed. J.D. Winefordner,  
John Wiley & Sons Inc., New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore, Weinheim, (1997), 191-195
- [135] L.M. Marcó, E.D. Greaves, J. Alvarado  
Analysis of human blood serum and human brain samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry applying Compton peak standardization  
Spectrochim. Acta, Part B **54** (1999), 1469-1480
- [136] A. Wittershagen, P. Rostam-Khani, O. Klimmek, R. Groß, V. Zickermann, I. Zickermann, S. Gemeinhardt, A. Kröger, B. Ludwig, B.O. Kolbesen  
Determination of metal-cofactors in enzyme complexes by total-reflection X-ray fluorescence spectrometry  
Spectrochim. Acta, Part B **52** (1997), 1033-1038

- [137] I. Savage, S.J. Haswell  
The development of analytical methodology for simultaneous trace elemental analysis of blood plasma samples using total reflection X-ray fluorescence spectrometry  
J. Anal. At. Spectrom. **13** (1998), 1119-1122
- [138] M. González, L. Tapia, M. Alvarado, J.D. Tornero, R. Fernández  
Intracellular determination of elements in mammalian cultured cells by total reflection X-ray fluorescence spectrometry  
J. Anal. At. Spectrom. **14** (1999), 885-888
- [139] A. Niemann, A. von Bohlen, R. Klockenkämper, E. Keck  
Quantification of biomineralization: An in-vitro tissue culture system and microanalysis of Calcium, Phosphorus and trace elements by total-reflection X-ray fluorescence  
Biochem. Biophys. Res. Commun. **3** (1990), 1216-1222
- [140] D.R. Brown, K. Qin, J.W. Herms, A. Madlung, J. Manson, R. Strome, P.E. Fraser, T. Kruck, A. von Bohlen, W. Schulz-Schaeffer, A. Giese, D. Westaway, H. Kretzschmar  
The cellular prion protein binds copper in vivo  
Nature **390** (1997), 684-687
- [141] A. Prange, H. Böddeker, W. Michaelis  
Multi-element determination of trace elements in whole blood and blood serum by TXRF  
Fresenius J. Anal. Chem. **335** (1989), 914-918
- [142] G. Bellisola, F. Pasti, M. Valdes, A. Torboli  
The use of total-reflection X-ray fluorescence to track the metabolism and excretion of selenium in humans  
Spectrochim. Acta, Part B **54** (1999), 1481-1485
- [143] A. von Bohlen, R. Klockenkämper, G. Tölg, B. Wiecken  
Microtome sections of biomaterials for trace analyses by TXRF  
Fresenius J. Anal. Chem. **331** (1988), 454-458
- [144] R. Klockenkämper, A. von Bohlen, B. Wiecken  
Quantification in total reflection X-ray fluorescence analysis of microtome sections  
Spectrochim. Acta, Part B **44** (1989), 511-517

- [145] A. von Bohlen, R. Eller, R. Klockenkämper, G. Tölg  
Microanalysis of Solid Samples by Total-Reflection X-ray Fluorescence Spectrometry  
Anal. Chem. **59** (1987), 2551-2555
- [146] A. Taylor, S. Branch, D.J. Halls, L.M.W. Owen, M. White  
Atomic Spectrometry Update: clinical and biological materials, foods and beverages  
J. Anal. At. Spectrom. **15** (2000), 451-487
- [147] A. Knoechel  
TXRF (Total reflection X-ray fluorescence), PIXE (Proton Induced X-ray Emission), SYXRF (Synchrotron-radiation X-ray fluorescence): Principles, critical comparison and applications  
Fresenius J. Anal. Chem. **337** (1990), 614-621
- [148] W. Michaelis  
Multielement analysis of environmental samples by total reflection X-ray fluorescence spectrometry, neutron activation analysis, and inductively coupled plasma optical emission spectroscopy  
Fresenius J. Anal. Chem. **324** (1986), 662-671
- [149] K. Günther, A. von Bohlen, G. Paprott, R. Klockenkämper  
Multielement analysis of biological reference materials by total-reflection X-ray fluorescence and inductively coupled plasma mass spectrometry in the semiquant mode  
Fresenius J. Anal. Chem. **342** (1992), 444-448
- [150] R. Pepelnik, A. Prange, R. Niedergesäß  
Comparative study of multi-element determination using inductively coupled plasma mass spectrometry, total reflection X-ray fluorescence spectrometry and neutron activation analysis  
J. Anal. At. Spectrom. **9** (1994), 1071-1074
- [151] J.A. Liendo, A.C. González, C. Castelli, J. Gómez, L. Marcó, L. Sajo-Bohus, E.D. Greaves, N.R. Fletcher, S. Bauman  
Comparison between Proton-Induced X-ray Emission (PIXE) and Total reflection X-ray Fluorescence (TXRF) spectrometry for the elemental analysis of human amniotic fluid  
X-Ray Spectrom. **28** (1999), 3-8

- [152] R. Cornelis  
The Importance of Speciation of Trace Elements in Health Issues  
*In : Trace Element Speciation for Environment, Food and Health*  
L. Ebdon, L. Pitts, R. Cornelis, H. Crews, O.F.X. Donard, Ph. Quevauviller  
(Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge (2001), 287-296
- [153] J. Szpunar, R. Łobiński  
Speciation in the environmental Field – trends in analytical chemistry  
Fresenius J. Anal. Chem. **363** (1999), 550-557
- [154] D.M. Templeton  
Biomedical aspects of trace element speciation  
Fresenius J. Anal. Chem. **363** (1999), 505-511
- [155] P. Apostoli  
The role of element speciation in environmental and occupational medicine  
Fresenius J. Anal. Chem. **363** (1999), 499-504
- [156] A.K. Das, R. Chakraborty, M.L. Cervera, M. de la Guardia  
Metal Speciation in Biological Fluids – a Review  
Mikrochim. Acta **122** (1996), 209-246
- [157] R. Cornelis, J. De Kimpe  
Elemental Speciation in Biological Fluids  
J. Anal. At. Spectrom. **9** (1994), 945-950
- [158] J.L. Gómez Ariza, E. Morales, D. Sánchez-Rodas, I. Giráldez  
Stability of chemical species in environmental matrices  
Trends Anal. Chem. **19** (2000), 200-209
- [159] D.M. Templeton, F. Ariese, R. Cornelis, L.G. Danielsson, H. Muntau,  
H.P. van Leeuwen, R. Łobiński  
Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of  
Elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches.  
IUPAC recommendations 2000  
Pure Appl. Chem. **72** (2000), 1453-1470
- [160] G.M. Rothe  
Extraction of Enzymes from Tissues, Cells and Cell-Organelles  
*In: Electrophoresis of Enzymes – Laboratory Methods*  
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1994), 19-67

- [161] K. Brand, B. Hess  
Cell and tissue disintegration  
*In: Methods of enzymatic analysis*,  
H.U. Bergmeyer (Ed.), 3<sup>rd</sup> edition, Vol II, Verlag Chemie, Weinheim,  
Deerfield Beach, Basel (1983), 26-49
- [162] A.R. Timerbaev  
Element speciation analysis by capillary electrophoresis; what are the hints on  
becoming a standard analytical methodology  
*Anal. Chim. Acta* **433** (2001), 165-180
- [163] A.R. Timerbaev  
Element speciation analysis by capillary electrophoresis  
*Talanta* **52** (2000), 573-606
- [164] C. Sarzanini  
Liquid chromatography: a tool for the analysis of metal species  
*J. Chromatogr. A* **850** (1999), 213-228
- [165] L. Dunemann, J. Begerow  
*Kopplungstechniken zur Elementspeziesanalytik*  
VCH Verlag, Weinheim (1995), 21-71
- [166] J. Szpunar  
Bio-inorganic speciation analysis by hyphenated techniques  
*Analyst* **125** (2000), 963-988
- [167] K.L. Sutton, R.M.C. Sutton, J.A. Caruso  
Inductively coupled plasma mass-spectrometric detection for chromatography  
and capillary electrophoresis  
*J. Chromatogr. A* **789** (1997), 85-126
- [168] S. McSheehy, P. Pohl, J. Szpunar, R. Łobiński  
Complementarity of multidimensional HPLC-ICP MS and electrospray MS-MS  
for speciation analysis of arsenic in algae  
*Anal. Chim. Acta* **440** (2001), 3-16

- [169] K. Polec, J. Szpunar, O. Palacios, P. González-Duarte S. Atrian, R. Łobiński  
Investigation of metal binding by recombinant and native metallothioneins by capillary zone electrophoresis (CZE) coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) via a self-aspirating total consumption micronebulizer  
J. Anal. At. Spectrom. **16** (2001), 567-574
- [170] S. McSheehy, P. Pohl, J. Szpunar, M. Potin-Gautier, R. Łobiński  
Analysis for selenium speciation in selenized yeast extracts by two-dimensional liquid chromatography with ICP MS and electrospray MS-MS detection  
J. Anal. At. Spectrom. **16** (2001), 68-73
- [171] K. Polec, O. Garcia-Arribas, M. Perez-Calvo, J. Szpunar, B. Ribas-Ozonas, R. Łobiński  
Identification of cadmium-bioinduced ligands in rat liver using parallel HPLC-ICP-MS and HPLC-electrospray MS  
J. Anal. At. Spectrom. **15** (2000), 1363-1368
- [172] S. Mounicou, K. Polec, H. Chassaigne, M. Potin-Gautier, R. Łobiński  
Characterization of metal complexes with metallothioneins by capillary zone electrophoresis (CZE) with ICP-MS and electrospray (ES)-MS detection  
J. Anal. At. Spectrom. **15** (2000), 653-642
- [173] V. Vacchina, R. Łobiński, M. Oven, M.H. Zenk  
Signal identification in size-exclusion HPLC-ICP MS chromatograms of plant extracts by electrospray tandem mass spectrometry (ES-MS/MS)  
J. Anal. At. Spectrom. **15** (2000), 529-534
- [174] J. Szpunar, H. Chassaigne, A. Makarov, R. Łobiński  
Limitations of high-performance liquid chromatography with inductively coupled plasma mass-spectrometric detection for speciation analysis of trace metals in biological samples  
Chem. Anal. **44** (1999), 351-362
- [175] J. Szpunar, A. Makarov, T. Pieper, B.K. Keppler, R. Łobiński  
Investigation of metallodrug-protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS)  
Anal. Chim. Acta **387** (1999), 135-144

- [176] H. Chassaigne, R. Łobiński  
Speciation of metal complexes with biomolecules by reversed-phase HPLC with ion-spray and inductively coupled plasma mass spectrometric detection  
*Fresenius J. Anal. Chem.* **361** (1998), 267-273
- [177] B. Michalke  
CE-ICP MS: advantages and improvements in selenium speciation  
*Spectroscopy* **15** (2000), 30, 32-34
- [178] B. Michalke, P. Schramel  
Iodine speciation in biological samples by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry  
*Electrophoresis* **20** (1999), 2547-2553
- [179] B. Michalke, P. Schramel, A. Kettrup  
Capillary electrophoresis coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (CE/ICP-MS) and to electrospray ionization mass spectrometry (CE/ESI-MS): an approach for maximum species information in speciation of selenium  
*Fresenius J. Anal. Chem.* **363** (1999), 456-459
- [180] E.B. Wickenheiser, B. Michalke, C. Drescher, A.V. Hirner, R. Hensel  
Development and application of liquid- and gas-chromatographic speciation techniques with element specific (ICP MS) detection to the study of anaerobic arsenic metabolism  
*Fresenius J. Anal. Chem.* **362** (1998), 498-501
- [181] J. Lintschinger, P. Schramel, A. Hatalak-Rauscher, I. Wendler, B. Michalke  
A new method for the analysis of arsenic species in urine by using HPLC-ICP MS  
*Fresenius J. Anal. Chem.* **362** (1998), 313-318
- [182] K.L. Sutton, J.A. Caruso  
Liquid Chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry  
*J. Chromatogr. A* **856** (1999), 243-258
- [183] M. Wind, H. Wesch, W.D. Lehmann  
Protein phosphorylation degree: determination by capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry  
*Anal. Chem.* **73** (2001), 117-126



- [184] C. Sariego-Muniz, J.M. Marchante-Gayon, J.I. Garcia-Alonso, A. Sanz-Medel  
Speciation of essential elements in human serum using anion-exchange  
chromatography coupled to post-column isotope dilution analysis with double  
focusing ICP MS  
J. Anal. At. Spectrom. **16** (2001), 587-592
- [185] A.F. Roig-Navarro, Y. Martinez-Bravo, F.J. Lopez, F. Hernandez  
Simultaneous determination of arsenic species and chromium(VI) by high-  
performance liquid chromatography-inductively coupled plasma-mass  
spectrometry  
J. Chromatogr. A **912** (2001), 319-327
- [186] M. Stadlober, M. Sager, K.J. Irgolic  
Effects of selenate supplemented fertilization on the selenium level of cereals  
– identification and quantification of selenium compounds by HPLC-ICP MS  
Food Chem. **73** (2001), 357-366
- [187] J.M. Marchante-Gayon, I. Feldmann, C. Thomas, N. Jakubowski  
Speciation of selenium in human urine by HPLC-ICP MS with a collision and a  
reaction cell  
J. Anal. At. Spectrom. **16** (2001), 457-463
- [188] J.K. Nicholson, J.C. Lindon, G.B. Scarfe, I.D. Wilson, F. Abou-Shakra,  
A.B. Sage, J. Castro-Perez  
High-performance liquid chromatography linked to inductively coupled plasma  
mass spectrometry and orthogonal acceleration time-of-flight mass  
spectrometry for the simultaneous detection and identification of metabolites  
of 2-bromo-4-trifluoromethyl-(<sup>13</sup>C)-acetanilide in rat urine  
Anal. Chem. **73** (2001), 1491-1494
- [189] M. Krachler, H. Emons  
Urinary antimony speciation by HPLC-ICP MS  
J. Anal. At. Spectrom. **16** (2001), 20-25
- [190] L. Bendahl, B. Gammelgaard, O. Joens, O. Farver, S.H. Hansen  
Interfacing capillary electrophoresis with inductively coupled plasma mass  
spectrometry by direct injection nebulization for selenium speciation  
J. Anal. At. Spectrom. **16** (2001), 38-42

- [191] J. Wang, D. Dreessen, D.R. Wiedering, R.S. Houk  
Measurement of trace elements in proteins extracted from liver by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry with a magnetic sector mass spectrometer  
*Anal. Biochem.* **288** (2001), 89-96
- [192] S.A. Baker, N.J. Miller-Ihli  
Determination of cobalamins using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry  
*Spectrochim. Acta Part B* **55B** (2000), 1823-1832
- [193] C.N. Ferrarello, M. Montes-Bayon, R. Fernandez-de-la-Campa, A. Sanz-Medel  
Multi-elemental speciation studies of trace elements associated with metallothionein-like proteins in mussels by liquid chromatography with inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometric detection  
*J. Anal. At. Spectrom.* **15** (2000), 1558-1563
- [194] T. Nakazato, T. Taniguchi, H. Tao, M. Tominaga, A. Miyazaki  
Ion-exclusion chromatography combined with ICP-MS and hydride generation-ICP-MS for the determination of arsenic species in biological matrices  
*J. Anal. At. Spectrom.* **15** (2000), 1546-1552
- [195] C.N. Ferrarello, R. Fernandez-de-la-Campa, C.S. Muniz, A. Sanz-Medel  
Metal distribution patterns in the mussel *Mytilus edulis* cytosols using size-exclusion chromatography and double focusing ICP MS detection  
*Analyst* **125** (2000), 2223-2229
- [196] M.H. Nagaoka, T. Maitani  
Binding patterns of co-existing aluminium and iron to human serum transferrin studied by HPLC-high resolution ICP-MS  
*Analyst* **125** (2000), 1962-1965
- [197] V. Majidi  
Capillary electrophoresis inductively coupled plasma mass spectrometry  
*Microchem. J.* **66** (2000), 3-16
- [198] T. Lindemann, A. Prange, B. Neidhart, W. Dannecker  
Stability studies of arsenic, selenium, antimony and tellurium species in water, urine, fish and soil extracts using HPLC-ICP MS  
*Fresenius J. Anal. Chem.* **368** (2000), 214-220

- [199] A. Tangen, W. Lund  
Capillary electrophoresis-inductively coupled plasma mass spectrometry interface with minimized dead volume for high separation  
J. Chromatogr. A **891** (2000), 129-138
- [200] K. Inagaki, T. Umemura, H. Matsura, H. Haraguchi  
Speciation of trace elements, binding and non-binding with proteins in human blood serum, by surfactant-mediated HPLC with element-selective detection by ICP-MS  
Anal. Sci. **16** (2000), 787-788
- [201] C.A. Ponce-de-Leon, K.L. Sutton, J.A. Caruso, P.C. Uden  
Chiral speciation of selenoamino-acids and selenium enriched samples using HPLC coupled to ICP MS  
J. Anal. At. Spectrom. **15** (2000), 1103-1107
- [202] M.A. Quijano, P. Moreno, A.M. Gutierrez, M.C. Perez-Conde, C. Camara  
Selenium speciation in animal tissues after enzymatic digestion by high-performance liquid chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry  
J. Mass Spectrom. **35** (2000), 878-884
- [203] A.D. Madsen, W. Goessler, S.N. Pedersen, K.A. Francesconi  
Characterization of an algal extract by HPLC-ICP-MS and LC electrospray MS for use in arsenosugar speciation studies  
J. Anal. At. Spectrom. **15** (2000), 657-662
- [204] W.H. Chen, S.Y. Lin, C.Y. Liu  
Capillary electrochromatographic separation of metal ion species with on-line detection by inductively coupled plasma mass spectrometry  
Anal. Chim. Acta **410** (2000), 25-35
- [205] S.J. Hill, L.J. Pitts, A.S. Fisher  
High-performance liquid chromatography-isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation studies: an overview  
Trends Anal. Chem. **19** (2000), 120-126
- [206] B. Pesch, U. Halekoh, U. Ranft, M. Richter, F. Pott  
*Atlas zur Krebssterblichkeit in Nordrhein-Westfalen*  
Hrsg. Ministerium für Arbeit, Gesundheit und Soziales des Landes NRW, Düsseldorf, (1994)

- [207] D.M. Templeton, F.W. Sunderman Jr., R.F.M. Herber  
Tentative reference values for nickel concentrations in human serum, plasma, blood, and urine: evaluation according to the TRACY protocol  
Sci. Total Environ. **148** (1994), 243-251
- [208] L. Benninghoff, D. von Czarnowski, E. Denkhaus, K. Lemke  
Analysis of human tissues by total reflection X-ray fluorescence. Application of chemometrics for diagnostic cancer recognition  
Spectrochim. Acta Part B **52** (1997), 1039-1046
- [209] D. von Czarnowski, E. Denkhaus, K. Lemke  
Determination of trace element distribution in cancerous and normal human tissues by total reflection X-ray fluorescence analysis  
Spectrochim. Acta Part B **52** (1997), 1047-1052
- [210] J. Blannchard  
Evaluation of the relative efficacy of various techniques for deproteinizing plasma prior to high-performance liquid chromatography  
J. Chromatogr. A **226** (1981), 455-560
- [211] Z.K. Shihabi  
Sample matrix effects in capillary electrophoresis, II. Acetonitrile deproteinization  
J. Chromatogr. A **652** (1993), 471-475  
Fresenius' J. Anal. Chem. **370** (2001), 735-743
- [212] E. Denkhaus, D. von Czarnowski, A. Golloch  
Vergleich der Ergebnisse bei der atomspektrometrischen Bestimmung der Elemente As, Sb und Se in biologischen Proben nach nasschemischer und elektrochemischer Hydridgenerierung  
In: *CANAS'95 Colloquium Analytische Atom-spektroskopie*,  
B. Welz (Ed.), Bodenseewerk Perkin-Elmer GmbH (1996), 275-280
- [213] E. Denkhaus, F. Beck, P. Büschler, R. Gerhard, A. Golloch  
determination of Antimony, Arsenic, Selenium, and Tin – Mechanistic Aspects and Figures of Merit  
Fresenius' J. Anal. Chem. **370** (2001), 735-743

- [214] B. Welz, M. Sperling  
*Atomabsorptionsspektrometrie*  
4. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, Berlin, New York,  
Chichester, Toronto, Brisbane, Singapore (1997), 613-700
- [215] H.T. Delves  
Atomic absorption spectroscopy in clinical analysis  
Ann. Clin. Biochem. **24** (1987), 529-551
- [216] F.W. Sunderman Jr., S.M. Hopfers, M.C. Crisostomos  
Nickel analysis by electrothermal atomic absorption spectrometry  
Methods Enzymol. **158** (1988), 382-391
- [217] F.W. Sunderman Jr., A. Marzouk, M.C. Crisostomos, D.R. Weatherby  
electrothermal atomic absorption spectrophotometry of nickel in tissue  
homogenates  
Ann. Clin. Lab. Sci. **15** (1985), 299-307
- [218] W.N. Rezuze, J.A. Knight, F.W. Sunderman Jr.  
Reference values for nickel concentrations in human tissues and bile  
Am. J. Ind. Med. **11** (1987), 419-426
- [219] H. Kuno, H.K. Kihara  
Simple microassay of protein with membrane filter  
Nature **215** (1967), 974-975
- [220] T.G. Cooper  
*Biochemische Arbeitsmethoden*  
Walter de Gruyter & Co., Berlin, New York (1981), 51-52
- [221] D.E. Paglia, W. N. Valentie  
Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte  
glutathione peroxidase  
J. Lab. Clin. Med. **70** (1967), 158-169
- [222] W.A. Günzler, H. Kremers, L. Flohé  
An improved coupled test procedure for glutathione peroxidase (EC 1.11.1.9.)  
in blood  
Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. **12** (1974), 444-448
- [223] M.R. L'Abbe, P.W. Fischer  
Automated assay of superoxide dismutase in blood  
Methods Enzymol. **186** (1990), 232-237

- [224] T. Lindemann, A. Prange, W. Dannecker, B. Neidhart  
Simultaneous determination of arsenic, selenium and antimony species using HPLC-ICP MS  
Fresenius' J. Anal. Chem. **364** (1999), 462-466
- [225] D. Schaumlöffel, A. Prange  
A new interface for combining electrophoresis with inductively coupled plasma mass spectrometry  
Fresenius' J. Anal. Chem. **364** (1999), 452-456
- [226] A. Prange  
Speziesanalyse mit gekoppelten Systemen: das Beispiel CE/ICP-MS  
Nachrichten aus der Chemie **50** (2002), 728-732
- [227] A. Prange, D. Schaumlöffel, P. Brätter, A.-N. Richarz, C. Wolf  
Species analysis of metallothioneine isoforms in human brain cytosols using CE/ICP-SFMS  
Fresenius' J. Anal. Chem. **371** (2001), 764-774
- [228] A. Prange, D. Schaumlöffel  
Determination of element species at trace levels using capillary electrophoresis-inductively coupled plasma sector field mass spectrometry  
J. Anal. At. Spectrom. **14** (1999), 1329-1332
- [229] K. Doerffel  
*Statistik in der analytischen Chemie*  
5. Auflage, Deutscher Verlag für Grundstoffchemie, Leipzig (1990)
- [230] J. Hartung, B. Elpelt, K.-H. Klösener  
*Statistik – Lehr- und Handbuch der angewandten Statistik*  
10. Auflage, Oldenburg Verlag, München, Wien (1995)
- [231] W. Gottwald  
*Statistik für Anwender. Die Praxis der instrumentellen Analytik*  
Wiley-VCH Verlag, Weinheim (2000)
- [232] M. Otto  
*Statistik und Computereinsatz in der Analytik*  
Wiley-VCH Verlag, Weinheim (1997)

- [233] R. Henrion, G. Henrion  
*Multivariate Datenanalyse – Methodik und Anwendung in der Chemie und verwandten Gebieten*  
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1995)
- [234] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte, L. Kaufmann  
*Chemometrics – a Textbook*  
Elsevier Verlag, Amsterdam (1988)
- [235] M.A. Sharaf, D.L. Illmann, B.R. Kowalski  
*Chemometrics*  
Chemical Analysis Series Vol. 82, J. Wiley Verlag, New York (1986)
- [236] S. World, H. Martens, H. World  
The multivariate calibration problem in chemistry solved by the PLS method  
*In: Matrix Pencils, Lecture Notes in Mathematics*  
Springer Verlag, Heidelberg (1983), 286-293
- [237] D.M. Bates  
*Nonlinear Regression Analysis and its Applications*  
J. Wiley Verlag, New York (1988)
- [238] C. Wolf, U. Rösick, P. Brätter  
Quantification of metal distribution in metallothioneins of the human liver by HPLC coupled with ICP-AES  
J. Anal. Chem. **368** (2000), 839-843
- [239] L. Benninghoff, E. Denkhaus  
Trace element distribution in human tissues of the digestive tract for malignant-normal and tissue type classification  
*In: Metal Ions in Biology and Medicine*  
Volume 5, P. Collery, P. Brätter, V. Negretti de Brätter, L. Khassanova, J.-C. Etienne (Eds.), John Libbey Eurotext (1998), 572-577
- [240] E. Denkhaus, A. Golloch, C. Lühr, U. Reus  
Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry (TXRF): Applications in direct solid sample analysis  
Proceedings of 4<sup>th</sup> European Furnace Symposium and XV<sup>th</sup> Slovak Spectroscopic Conference, High Tatras-Podbanske, Slovakia, 12.-16. Juni (2000), 289-293

- [241] S. Caroli, A. Alimenti, P. Delle Femmine, F. Petrucci, O. Senofonte,  
N. Violante, A. Menditto, G. Morisi, A. Menotti, P. Falconieri  
Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry in the assessment  
of reference values for trace elements in biological matrices  
J. Anal. At. Spectrom. **7** (1992), 859-864
- [242] A. Stacchini, E. Coni, E. Boccaloni, L. Fornarelli, A. Alimenti, G.B. Bolis, E.  
Cristallini, E. Sabbioni, R. Pietra, S. Caroli  
Criteria for reference value assessment of elements in human tissues  
Ann. Ist. Super. Sanità **25** (1989), 379-384
- [243] G. Nordberg, D. Brune, L. Gerhardsson, P. Grandjean, O. Vesterberg,  
P.O. Wester  
The ICOH and IUPAC programme for establishing reference values of metals  
Sci. Total Environ. **120** (1992), 17-21
- [244] C. Minoia, P. Apostoli  
Activity of the Italian Society of reference values  
Int. Arch. Occup. Environ. Health **72** (1999), 268-70
- [245] C. Shenberg, M. Mantel, J. Gilat, S. Chaitchik, J. Stadler, R. Alon  
Comparison between trace elements in normal and tumorous human colon  
tissue  
In: Israel Atomic Energy Commission Annual Report **IA-1448** (1989), 145-146
- [246] H.J. Issaq  
The role of metals in tumor development and inhibition  
In: *Metal ions in biological systems: Carcinogenicity and metal ions*  
Vol. 10, H. Sigel (Ed.), Marcel Dekker Inc., New York, Basel (1980), 55-93
- [247] S.S. Renade, V.K. Panday  
Transition metals in human cancer II  
Sci. Total Environ. **40** (1984), 245-257
- [248] J. Kvikala, J. Vavalka, J. Nemec, V. Zeman  
Selenium and rubidium changes in subjects with pathologically altered thyroid  
Biol. Trace Elem. Res. **32** (1992), 253-263
- [249] C. Shenberg, H. Feldstein, R. Cornelis, L. Mees, J. Versieck,  
L. Vanballenberghe, J. Cafmeyer, W. Maenhaut  
Br, Rb, Zn, Fe, Se and K in blood of colorectal patients by INAA and PIXE  
J. Trace Elements Med. Biol. **9** (1995), 193-199



- [250] J.A. Stratis, V. Simeonov, G. Zacharidis, T. Sawidis, P. Mandjukov, S. Tsakovski  
Chemometrical approaches to evaluate analytical data from aquatic macrophytes and marine algae  
Fresenius J. Anal. Chem. **355** (1996), 65-70
- [251] R. Henrion  
Body diagonalization of core matrices in three-way principal components analysis: Theoretical bounds and simulation  
J. Chemometrics **7** (1993), 477-494
- [252] R. Henrion  
N-way principal component analysis: Theory, algorithms and applications  
Chemometrics Intell. Lab. Sys. **25** (1994), 1-23
- [253] G. Henrion, R. Henrion, J. Bacsó, I. Uzonyi  
Ausgewählte Methoden der Korrelationsanalyse am Beispiel der Spurenelementrelationen im menschlichen Körper  
Z. Chem. **30** (1990), 204-211
- [254] G. Henrion, d. Nass, G. Michael, R. Henrion  
Multivariate 3-way data analysis of amino acid patterns of lakes  
Fresenius J. Anal. Chem. **352** (1995), 431-436
- [255] R. Henrion, G. Henrion, G.C. Onuoha  
Multi-way principal components analysis of a complex data array resulting from physiochemical characterization of natural waters  
Chemometrics Intell. Lab. Sys. **16** (1992), 87-94
- [256] QL. Ma, A. Yan, Z. Hu, Z. Li, B. Fan  
Principal component analysis and artificial neural networks applied to the classification of Chinese pottery of neolithic age  
Anal. Chim. Acta **406** (2000), 247-256
- [257] M.S. Astorga-España, E.M. Peña-Méndez, F.J. García-Montelongo  
Application of principal component analysis to the study of major cations and trace metals in fish from Tenerife (Canary Islands)  
Chemometrics. Intell. Lab. Sys. **49** (1999), 173-178

- [258] S.J. Haswell, A.D. Walmsley  
Multivariate data visualisation methods based on multi-elemental analysis of wines and coffees using total reflection X-ray fluorescence analysis  
J. Anal. At. Spectrom. **13** (1998), 131-134
- [259] R. Henrion  
Simultaneous simplification of loading and core matrices in N-way PCA: application to chemometric data arrays  
Fresenius J. Anal. Chem. **361** (1998), 15-22
- [260] A. Feustel, R. Wennrich  
Determination of the distribution of zinc and cadmium in cellular fractions of BPH, normal prostate and prostatic cancers of different histologies by atomic and laser absorption spectrometry in tissue slices  
Urol. Res. **12** (1984), 253-256
- [261] A.N. Garg, V. Singh, R.G. Weginwar, V.N. Sagdeo  
An elemental correlation study in cancerous and normal breast tissue with successive clinical stages by neutron activation analysis  
Biol. Trace Elem. Res. **46** (1994), 185-202
- [262] N.G. Kwan-Hoong, D.A. Bradley I. Lai-Meng Loo, C. Seman Mahmood, A. Khalik Wood  
Differentiation of elemental composition of normal and malignant breast tissue by instrumental neutron activation analysis  
App. Rad. Isotopes **44** (1993), 511-516
- [263] L. Gehring, P. Leonhardt, H. Bigl, T. Löser, M. Poetzsch, T. Keller  
Serum trace elements in lung cancer  
*In: Metal Ions in Biology and Medicine*  
Volume 5, P. Collery, P. Brätter, V. Negretti de Brätter, L. Khassanova, J.-C. Etienne (Eds.), John Libbey Eurotext (1998), 583-587
- [264] K. Danzer, R. Singer, F. Mäurer, K. Flórián, k. Zimmer  
Mehrdimensionale Varianz- und Diskriminanzanalyse spektrographischer Daten von Glasperlenfunden  
Fresenius Z. Anal. Chem. **318** (1984), 517-521
- [265] P. Klein  
Prediction of protein structural class by discriminant analysis  
Biochim. Biophys. Acta **874** (1986), 205-215

- [266] P. Geladi, L. Hadjiiski, P. Hopke  
Multiple regression for environmental data: nonlinearities and prediction bias  
*Chemometrics Intell. Lab. Sys.* **47** (1999), 165-173
- [267] A. Hichami, J.P. Anger, N. Allain, L. Vernhet, C.A. Martin, A.B. Legrand  
Stimulation of  $\text{Rb}^+$  influx by bradykinin through  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$  cotransport and  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  -ATPase in NIH-3T3 fibroblasts  
*Life Sci.* **59** (1996), 1829-1837
- [268] H. Matsuda  
 $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  ions and the inwardly rectifying  $\text{K}^+$  channels in guinea-pig ventricular cells  
*Pflügers Arch. – Eur. J. Physiol.* **432** (1996), 26-33
- [269] L. Liu, A. Ascari  
Evidence for the existence of two ATP-sensitive  $\text{Rb}^+$  occlusion pockets within the transmembrane domains of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase  
*J. Biol. Chem.* **22** (1997), 1380-1386
- [270] X. Yao, H.-Y. Kwan  
Activity of voltage-gated  $\text{K}^+$  channels is associated with cell proliferation and  $\text{Ca}^{2+}$  influx in carcinoma cells of colon cancer  
*Life Scie.* **65** (1999), 55-62
- [271] M. Anke, L. Angelow  
The biological importance of rubidium  
In: *Proc. 6. Internat. Trace Element Symposium*  
I. Pais (Ed.), Budapest, July (1994), 241-262
- [272] M. Anke, L. Angelow  
Rubidium in the food chain  
*Fresenius J. Anal. Chem.* **352** (1995), 236-239
- [273] M. Anke, L. Angelow, M. Gleis, M. Müller, H. Illing  
The biological importance of nickel in the food chain  
*Fresenius J. Anal. Chem.* **352** (1995), 92-96
- [274] M. Seifert, M. Anke  
Alimentary nickel intake of adults in Germany  
*Trace Elem. Electro.* **16** (1999), 17-21

- [275] E. Denkhaus, L. Benninghoff, S. Bonsack, A. Prange  
The Role of Nickel in Cancer of the Digestive Tract  
6<sup>th</sup> International Symposium on Metal Ions in Biology and Medicine, San Juan,  
Puerto Rico, USA, 7.-10. Mai 2000, Abstract No. PL-35 (2000), 102
- [276] C.R. Fleming  
Trace element metabolism in adult patients requiring total parenteral nutrition  
Am. J. Clin. Nutr. **49** (1989), 573-579
- [277] R.A. Anderson, A.S. Kozlovsky  
Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-  
selected diets  
Am. J. Clin. Nutr. **41** (1985), 1177-1183
- [278] R.A. Anderson  
Chromium as an essential nutrient for humans  
Regul. Toxicol. Pharmacol. **26** (1997), S35-S41
- [279] S. Langård  
Absorption, transport and excretion of chromium in man and animals  
In: *Biological and environmental aspects of chromium*  
S. Langård (Ed.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam (1982), 149-169
- [280] F.H. Nielson  
Nickel  
In: *Trace elements in human and animal nutrition*  
W. Mertz (Ed.), Vol. 1, 5<sup>th</sup> edition, Academic Press, San Diego (1987), 245-273
- [281] D. Ankel-Fuchs, R.K. Thauer  
Nickel in Biology: Nickel as an Essential Trace Element  
In: *The Bioinorganic Chemistry of Nickel*  
J.R. Lancaster (Ed.), VCH Publishers, Weinheim (1988), 93-110
- [282] F.H. Nielson, D.R. Myron, S.H. Givand, T.J. Zimmermann, D.A. Ollerich  
Nickel deficiency in rats  
J. Nutr. **105** (1975), 1620-1630
- [283] M. Anke, B. Groppel, H. Kronemann, M. Grün  
Nickel: An essential element  
In: *Nickel in the Human Environment*  
F.W. Jr. Sunderman (Ed.), Oxford University Press, Oxford (1984), 339-365

- [284] F.H. Nielson  
Ultratrace elements in nutrition: current knowledge and speculation  
J. Trace Elem. Exp. Med. **11** (1998), 251-274
- [285] S.W. Ragsdale  
Nickel biochemistry  
Curr. Opin. Chem. Biol. **2** (1998), 208-215
- [286] V. Ducros  
Chromium metabolism: A literature review  
Biol. Trace Elem. Res. **32** (1992), 65-77
- [287] J.B. Vincent  
Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium-binding substance  
J. Am. Coll. Nutr. **18** (1999), 6-12
- [288] R.A. Anderson  
Nutritional factors influencing the glucose/insulin system: Chromium  
J. Am. Coll. Nutr. **16** (1997), 404-410
- [289] F.H. Nielson, T.R. Shuler, T.G. McLeod, T.J. Zimmermann  
Nickel influences iron metabolism through physiologic, pharmacologic, and toxicologic mechanisms in the rat  
J. Nutr. **114** (1984), 1280-1288
- [290] M. Ani, A.A. Moshtaghi  
The effect of chromium on parameters related to iron metabolism  
Biol. Trace Elem. Res. **32** (1992), 57-64
- [291] F.H. Nielson, K. Yokoi, E.O. Uthus  
Marginal dietary pyridoxine and supplemental dietary homocysteine and methionine affect the response of the rat to nickel deprivation  
In: *Metal Ions in Biology and Medicine*  
J.A. Centeno, P. Collery, G. Fernet, R.B. Finkelmann, H. Gibb, J.C. Etienne (Eds.), Vol. 6, John Libbey Eurotext, Paris (2000), 525-527
- [292] G.I. Stangl, M. Kirchgessner  
Nickel deficiency alters liver lipid metabolism in rats  
J. Nutr. **126** (1996), 2466-2473

- [293] N.A. Lee, C.A. Reasner  
Beneficial effect of chromium supplementation on serum triglyceride levels in NIDDM  
*Diabetes Care* **17** (1994), 1449-1452
- [294] L. Polak  
Immunology of chromium  
In: *Chromium: Metabolism and toxicity*  
D. Burrows (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida (1983), 51-136
- [295] S. Lisby, L.H. Hansen, L. Skov, T. Menné, O. Baadsgaard  
Nickel-induced activation of T cells in individuals with negative patch test to nickel sulphate  
*Arch. Dermatol. Res.* **291** (1999), 247-252
- [296] C.J. Fleming, A.D. Burden, A. Forsyth  
The genetics of allergic contact hypersensitivity to nickel  
*Contact Dermatitis* **41** (1999), 251-253
- [297] S. Langard  
The carcinogenicity of chromium compounds in man and animals  
In: *Chromium: Metabolism and toxicity*  
D. Burrows (Ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida (1983), 13-50
- [298] M.D. Cohen, B. Kargacin, C.B. Klein, M. Costa  
Mechanisms of chromium carcinogenicity  
*Crit. Rev. Toxicol.* **23** (1993), 255-281
- [299] S. Langard  
Role of chemical species and exposure characteristics in cancer among persons occupationally exposed to chromium compounds  
*Scand. J. Work. Environ. Health* **19** (1993), 81-89
- [300] D.G. Barceloux  
Nickel  
*Clin. Toxicol.* **37** (1999), 239-258
- [301] A. Hartwig, I. Krüger, D. Beyersmann  
Mechanisms in nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair  
*Toxicol. Lett.* **72** (1994), 353-358

- [302] E. Denkhaus, K. Salnikow  
Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity  
Crit. Rev. Oncol. Hematol. **42** (2002), 35-56
- [303] M. Seifert, M. Jaritz, S. Holzinger, O. Seeber, M. Anke  
Alimentary strontium intake: first results in Germany  
Trace Elem. Electro. **17** (2000), 112-118
- [304] C.D. Thomson  
Selenium speciation in human body fluids  
Analyst **123** (1998), 827-831
- [305] D. Behne, C. Hammel, H. Pfeifer, D. Röthlein, H. Gessner, A. Kyriakopoulos  
Speciation of selenium in the mammalian organism  
Analyst **123** (1998), 871-873
- [306] J.R. Arthur  
Selenium biochemistry and function  
In: *Trace Elements in man and animals – 9: Proceedings of the Ninth International Symposium on Trace Elements in Man and Animals*  
P.W.F. Fischer, M.R. Lábbe, K.A. Cockell, R.S. Gibson (Eds.), NRC Research Press, Ottawa, Canada (1997), 1-5
- [307] I. Bjarnason, A. MacPherson, D. Hollander  
Special reports and reviews: Intestinal permeability: An overview  
Gastroenterology **108** (1995), 1566-1581
- [308] C.M. Slupsky, B.D. Sykes  
The structural basis of regulation by calcium-binding EF-hand proteins  
In: *Calcium as a cellular regulator*  
E. Carafoli, C. Klee (Eds.), Oxford University Press, New York, Oxford (1999), 73-99
- [309] A.R. Means, C.R. Kahl, D.G. Crenshaw, J.S. Dayton  
Traversing the cell cycle: The calcium/calmodulin connection  
In: *Calcium as a cellular regulator*  
E. Carafoli, C. Klee (Eds.), Oxford University Press, New York, Oxford (1999), 512-528

- [310] K.M. McGinnnis, Z. Shariat-Madar, M.E. Gnegy  
Cytosolic calmodulin is increased in SK-N-SH human neuroblastoma cells due to release of calcium from intracellular stores  
*J Neurochem.* **70** (1998), 139-146
- [311] D.J. McConkey, S. Orrenius  
Calcium in programmed cell death  
In: *Calcium as a cellular regulator*  
E. Carafoli, C. Klee (Eds.), Oxford University Press, New York, Oxford (1999), 596-609
- [312] L. Oliver, S. Cordel, I. Barbieux, M.T. LeCaballec, K. Meflah, M. Gregoire, F.M. Vallette  
Resistance to apoptosis is increased during metastatic dissemination of colon cancer  
*Clin. Exp. Metastasis* **19** (2002), 175-180
- [313] Y. Suzuki, T. Honma, S. Hayashi, Y. Ajioka, H. Asakura  
Bcl-2 expression and frequency of apoptosis correlate with morphogenesis of colorectal neoplasia  
*J. Clin. Pathol.* **55** (2002), 212-216
- [314] H.H. Backus, C.J. Van Groenigen, W. Vos, D.F. Dukers, E. Bloemena, D. Wouters, H.M. Pinedo, G.J. Peters  
Differential expression of cell cycle and apoptosis related proteins in colorectal mucosa, primary colon tumours, and liver metastasis  
*J. Clin. Pathol.* **55** (2002), 206-211
- [315] L. Li, L. Yan, Z. Wang, Z. Liu, Y. Wie, G. Huang  
Change of apoptotic status in the human colorectal adenoma-carcinoma sequences and its correlation with carcinogenesis and prognosis  
*Chin. Med. J. (Engl.)* **113** (2000), 886-888
- [316] M.A. Elkablawy, P. Maxwell, K. Williamson, N. Anderson, P.W. Hamilton  
Apoptosis and cell-cycle regulatory proteins in colorectal carcinoma: relationship to tumour stage and patient survival  
*J. Pathol.* **194** (2001), 436-443



- [317] M.Ilyas, P.M. Tomlinson, A. Hanby, I.C. Talbot, W.F. Bodmer  
Allele loss, replication errors and loss of expression of E-cadherin in colorectal cancers  
*Gut* **40** (1997), 654-659
- [318] J. Behrens  
Cadherin/catenin-mediated signal transduction  
In: *Extracellular matrix, anchor, and adhesion proteins*  
T. Kreis, R. Vale (Eds.), 2nd ed., Sambrook & Tooze Publishing  
(1999), 129-134
- [319] G.G. Fletcher, F.E. Rosetto, J.D. Turnbull, E. Nieboer  
Toxicity, uptake, and mutagenicity of particulate and soluble nickel compounds  
*Environ. Health Perspect* **102** (Supp. 3) (1994), 69-79
- [320] K. Salnikow, M. Costa  
Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis  
*J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **19** (2000), 1-12
- [321] A. Hartwig, I. Krüger, D. Beyersmann  
Mechanisms of nickel genotoxicity: the significance of interactions with DNA repair  
*Toxicol. Lett.* **72** (1994), 353-358
- [322] K.S. Kasprzak  
The role of oxidative damage in metal carcinogenicity  
*Chem. Res. Toxicol.* **4** (1991), 604-615
- [323] K. Salnikow, T. Kluz, M. Costa  
Role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the regulation of nickel-inducible *Cap43* gene expression  
*Toxicol. Appl. Pharmacol.* **160** (1999), 127-132
- [324] G.W. Zamponi, E. Bourinet, T.P. Snutch  
Nickel block of a family of neuronal calcium channels: Subtype- and subunit-dependent action at multiple sites  
*J. Membrane Biol.* **151** (1996), 77-90
- [325] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, C.E. Cross  
Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now?  
*J. Lab. Clin. Med.* **119** (1992), 598-620

- [326] H.C. Sutton, C.C. Winterbourn  
On the participation of higher oxidation states of iron and copper in Fenton reactions  
Free Rad. Biol. Med. **6** (1989), 53-60
- [327] J.M. Matés, F.M. Sánchez-Jiménez  
Role of reactive oxygen species in apoptosis : implications for cancer therapy  
Int. J. Biochem. Cell Biol. **32** (2000), 157-170
- [328] R.H. Burdon, V. Gill, D. Alliangana  
Hydrogen peroxide in relation to proliferation and apoptosis in BHK-21 hamster fibroblasts  
Free Radic. Res. **24** (1996), 81-93
- [329] R.H. Burdon, D. Alliangana, V. Gill  
Endogeneously generated active oxygen species and cellular glutathione levels in relation to BHK-21 cell proliferation  
Free Radic. Res. **211** (1994), 121-133
- [330] J.M. Matés, C. Pérez-Gómez, I. Núñez De Castro  
Antioxidant enzymes and human diseases  
Clin. Biochem. **32** (1999), 595-603
- [331] C.G. Cochrane  
Cellular injury by oxidants  
Am. J. Med. **91** (1991), 3C-24S
- [332] G.S. Buzard, K.S. Kasprzak  
Possible roles of nitric oxide and redox cell signalling in metal-induced toxicity and carcinogenesis: A review  
JEPTO **19** (2000), 179-199
- [333] D.Y. Yin, H.Z. Chae, S.G. Rhee, K.T. Jeang  
Regulatory role of a novel human thioredoxin peroxidase in NF- $\kappa$ B activation  
J. Biol. Chem. **272** (1997), 30952-30961
- [334] D. Perez-Sala, A. Rebollo  
Novel aspects of Ras proteins biology: Regulation and implications  
Cell Death Differ. **6** (1999), 722-728

- [335] H. Wiseman, B. Halliwell  
Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer  
*Biochem. J.* **313** (1996), 17-29
- [336] T. Otamiri, R. Sjö Dahl  
Increased lipid peroxidation in malignant tissues of patients with colorectal cancer  
*Cancer* **64** (1989), 422-425
- [337] L.E. Rikans, K.R. Hornbrook  
Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging  
*Biochim. Biophys. Acta* **1362** (1997), 116-127
- [338] C.F. Babbs  
Free radicals and the etiology of colon cancer  
*Free Radic. Biol. Med.* **8** (1990), 191-200
- [339] A. Keshavarzian, D. Zapeda, T. List, S. Mobarhan  
High levels of reactive oxygen metabolites in colon cancer tissue. Analysis by chemiluminescence probe  
*Nutr. Cancer* **17** (1992), 243-249
- [340] J.M.C. Gutteridge  
Does redox regulation of cell function explain why antioxidants perform so poorly as therapeutic agents?  
*Redox Rep.* **4** (1999), 129-131
- [341] A. Engin, Z. Ferahkose  
Liver glutathione contents in patients with gastric adenocarcinomas  
*Tumori.* **76** (1990), 8-50
- [342] R.N. Butler, W.J. Butler, Z. Moraby, M.J. Fettman, K.K. Khoo, I.C. Roberts-Thompson  
Glutathione concentrations and glutathione S-transferase activity in human colonic neoplasms  
*J. Gastroenterol. Hepatol.* **9** (1994), 60-63
- [343] S. Ozawa, K. Iwata, A. Kubodera, M. Inaba  
Intracellular glutathione levels in human colon cancer cells naturally resistant to cross-linking agents  
*J.Pharmacobiodyn.* **12** (1989), 378-383

- [344] A.L. Tappel  
Glutathione peroxidase and hydroperoxides  
Methode Enzymol. **52** (1978), 506-513
- [345] K. Nagata, H. Yu, M. Nishikawa  
Helicobacter pilori generates superoxide radicals and modulates nitric oxide metabolism  
J. Biol. Chem. **273** (1998), 14071-14073
- [346] E. Peterhans  
Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases  
Biol. Trace Elem. Res. **56** (1997), 107-116
- [347] S. Dandyshev  
Risk factors and the molecular cellular mechanisms of a protracted course in pneumonia  
Ter. Arkh. **70** (1998), 41-44
- [348] C. Taraza, M. Mohora, B. Vargolici, V. Dinu  
Importance of reactive oxygen species in rheumatoid arthritis  
Rom. J. Intern. Med. **35** (1997), 89-98
- [349] A. Maciag, E. Marchaluk, A. Nowicki, B.A. Zachara  
Stezenie selenu I glutationu oraz aktywnosc peroksydazy glutationowej we krwi I tkankach chorych z rakiem sutka  
In: *Arsen I selen w srodowisku - problemy ekologiczne I metodyczne*  
A. Kabata Pendidas, B. Szteke (Eds.), Polska Akademia Nauk,  
Warschau (1994), 184-189
- [350] B.A. Zachara, E. Marchaluk-Wiśniewska, A. Maciag, J. Pepliński,  
J. Skokowski, W. Lambrecht  
Decreased selenium concentration and glutathione peroxidase activity in blood and increase of these parameters in malignant tissue of lung cancer patients  
Lung **175** (1997), 321-332
- [351] G. Özdemirler, H. Pabuccuoğlu, T. Bulut, D. Buğra, M. Uysal, G. Toker  
Increased lipoperoxide levels and antioxidant system in colorectal cancer  
J. Cancer Res. Clin. Oncol **124** (1998), 555-559

- [352] T. Magálová, V. Bella, A. Brtková, M. Kudláčková, K. Volkovová  
Copper, zinc and superoxide dismutase in precancerous, benign diseases and gastric, colorectal and breast cancer  
*Neoplasma* **46** (1999), 100-104
- [353] K. De Cremer, J. De Kimpe, R. Cornelis  
Stability of vanadium(V)-protein complexes during chromatography  
*Fresenius J. Anal. Chem.* **363** (1999), 519-522
- [354] D.J. Lowe  
*ENDOR and EPR of metalloproteins*  
Springer Verlag, New York, Berlin, Heidelberg, London, Paris (1998), 75-79
- [355] M. Chatterjee, A. Bishayee  
Vanadium – A new tool for cancer prevention  
*In: Vanadium in the environment part two health effects*  
J.O. Nriagu (Ed.), John Wiley & Sons, (1998), 347-390
- [356] N. Sekar, Y. Shechter  
Vanadium salts as insulin substitutes: mechanisms of action, a scientific and therapeutic tool in diabetes mellitus research  
*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **31** (1996), 339-359
- [357] K. De Cremer, R. Cornelis  
Speciation of vanadium in serum, urine and tissues of Wistar rats  
*In: Metal ions in biology and medicine*  
J.A. Centeno, P. Collery, G. Fernet, R.B. Finkelmann, H. Gibb, J.C. Etienne (Eds.), Vol. 6, John Libbey Eurotext, Paris (2000), 425-429
- [358] J. De Kimpe, R. Cornelis, L. Mees, R. Vanholder  
Basal metabolism of intraperitoneally injected carrier-free <sup>74</sup>As-labeled arsenate in rabbits  
*Fundam. Appl. Toxicol.* **34** (1996), 240-248
- [359] M. Vahter  
Methylation of inorganic arsenic in different mammalian species and population groups  
*Sci. Prog.* **82** (1999), 69-88
- [360] L. Bernstam, J. Nriagu  
Molecular aspects of arsenic stress  
*J. Toxicol. Environ. Health B Crit. Rev.* **3** (2000), 293-322

- [361] J.H.R. Kägi, A. Schäffer  
Biochemistry of metallothionein  
Biochem. **27** (1988), 8509-8515
- [362] R. Łobiński , J. Szpunar  
Biochemical speciation analysis by hyphenated techniques  
Anal. Chim. Acta **400** (1999), 321-332
- [363] H.E. Heilmaier, P. Schramel, G.A. Drasch, E. Kretschmer, K.H. Summer  
Speciation of trace elements in human tissues: Role of metallothionein  
*In: Trace element – Analytical chemistry in medicine and biology*  
P. Brätter, P. Schramel (Eds.), Vol. 4, Walter de Gruyter & Co., Berlin,  
New York (1987), 495-500
- [364] C.O. Simpkins  
Metallothionein in human disease  
Cell. Mol. Biol. **46** (2000), 465-488
- [365] M.G. Cherian, S.B. Howell, N. Imura, C.D. Klaassen, J. Koropatnick,  
J.S. Lazo, M.P. Waalkes  
Role of metallothionein in carcinogenesis  
Toxicol. Appl. Pharmacol. **126** (1994), 1-5
- [366] W. Forth, D. Henschler, W. Rummel (Eds.)  
*Allgemeine und spezielle Pharamakologie und Toxikologie*  
4. Aufl., B.I.-Wissenschaftsverlag Mannheim, Wien, Zürich (1983)
- [367] C. Cox, T.N. Teknos, M. Barrios, G.J. Brewer, R.D. Dick, S.D. Merajver  
The role of copper suppression as an antiangiogenic strategy in head and  
neck squamous cell carcinoma  
Laryngoscope **111** (2001), 696-701
- [368] G.J. Brewer  
Copper control as an antiangiogenic anticancer therapy: lessons from treating  
Wilson´s disease  
Exp. Biol. Med. **226** (2001), 665-673
- [369] P.M. Gullino, M. Ziche, G. Alessandri  
Gangliosides, copper ions and angiogenic capacity of adult tissues  
Cancer Metastasis Rev **9** (1990), 239-251

- [370] M. Pascaly, I. Jolk, B. Krebs  
Kupfer – Die biochemische Bedeutung eines Metalls  
Chem. unserer Zeit **33** (1999), 334-341
- [371] M.C. Lindner, M. Hazegh-Azam  
Copper biochemistry and molecular biology  
Am. J. Clin. Nutr. **63** (1996), 797S-811S
- [372] M.D. Harrison, C.E. Jones, M. Solioz, C.T. Dameron  
Intracellular copper routing : the role of copper chaperones  
TIBS **25** (2000), 29-32
- [373] I. Hamza, M. Schaefer, L.W.J. Klomp, J.D. Gitlin  
Interaction of the copper chaperone HAH1 with the Wilson disease protein is essential for copper homeostasis  
PNAS **9** (1999), 13363-13368
- [374] A.K. Wernimont, D.L. Huffman, A.L. Lamb, T.V. O'Halloran, A.C. Rosenzweig  
Structural basis for copper transfer by the metallochaperone for the Menkes/Wilson disease proteins  
Nat. Struct. Biol. **7** (2000), 766-771
- [375] A.L. Lamb, A.S. Torres, T.V. O'Halloran, A.C. Rosenzweig  
Heterodimeric structure of superoxide dismutase in complex with its metallochaperone  
Nat. Struct. Biol. **8** (2001), 751-755
- [376] I.K. Jordan, D.A. Natale, E.V. Koonin, M.Y. Galperin  
Independent evolution of heavy metal-associated domains in copper chaperones and copper-transporting atpases  
J. Mol. Evol. **53** (2001), 622-633
- [377] T.D. Rae, A.S. Torres, R.A. Pufahl, T.V. O'Halloran  
Mechanism of CuZn-Superoxide dismutase – Activation by the human metallochaperone hCCS  
J. Biol. Chem. **276** (2001), 5166-51766
- [378] D.L. Huffman, T.V. O'Halloran  
Function, structure, and mechanism of intracellular copper trafficking proteins  
Annu. Rev. Biochem. **70** (2001), 677-701

- [379] L.A. Sturtz, K. Diekert, L.T. Jensen, R. Lill, V.C. Culotta  
A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage  
J. Biol. Chem. **276** (2001), 38084-38089
- [380] M.-C. Herlant-Peers, H.F. Hildebrand, J.-P. Kerckaert  
In vitro and in vivo incorporation of  $^{63}\text{Ni}[\text{II}]$  into lung and liver subcellular fractions of Balb/C mice  
Carcinogenesis **4** (1983), 387-392
- [381] F.W. Sunderman jr., E.R. Costa, C. Fraser, G. Hui, J.J. Levine, T.P.H. Tse  
 $^{63}\text{Ni}$ -constituents in renal cytosol of rats after injection of  $^{63}\text{Ni}$  chloride  
Ann. Clin. Lab. Sci. **11** (1981), 488-496
- [382] S.-M. Lin, S.M. Hopfer, S.M. Brennan, F.W. Sunderman jr.  
Protein blotting method for detection of nickel-binding proteins  
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. **65** (1989), 275-288
- [383] J.L. Nielson, O.M. Poulson, A. Abildtrup  
Studies of serum protein complexes with nickel using immunoelectrophoresis  
Electrophoresis **15** (1994), 666-671
- [384] S. Nomoto, F.W. Sunderman jr.  
Presence of Nickel in alpha-2 macroglobulin isolated from human serum by high performance liquid chromatography  
Ann. Clin. Lab. Sci. **18** (1988), 78-84
- [385] D.M. Templeton, B. Sarkar  
Peptide and carbohydrate complexes of nickel in human kidney  
Biochem. J. **230** (1985), 35-42
- [386] J.M. Berg  
Potential metal-binding domains in nucleic acid binding proteins  
Science **232** (1986), 485-487
- [387] R. Janknecht, C. Sander, O. Pongs  
(HX)<sub>n</sub> repeats: a pH-controlled protein-protein interaction motif of eukaryotic transcription factors?  
FEBS **295** (1991), 1-2



- [388] F.W. Sunderman jr., A.M. Barber  
Finger-loops, oncogenes, and metals  
Ann. Clin. Lab. Sci. **18** (1988), 267-288
- [389] A. Hoffmann, R.G. Roeder  
Purification of his-tagged proteins in non-denaturing conditions suggests a convenient method for protein interaction studies  
Nucl. Acids Res. **19** (1991), 6337-6338
- [390] C. Abate, D. Luk, R. Gentz, F.J. Rauscher III, T. Curran  
Expression and purification of the leucine zipper and DNA-binding domains of Fos and Jun: Both Fos and Jun contact DNA directly  
Proc. Natl. Acad. Sci. **87** (1990), 1032-1036
- [391] F.W. Sunderman, M.C. Plowman, O.S. Kroftova, S. Grbac-Ivankovic, L. Foglia, J.F. Crivello  
Effects of teratogenic exposures to Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Cu<sup>2+</sup> on metallothionein and metallothionein-mRNA contents of Xenopus embryos  
Pharmacol. Toxicol. **76** (1995), 178-184
- [392] R.A. Bradshaw, T. Peters  
The amino acid sequence of peptide (1-24) of rat and human serum albumin  
J. Biol. Chem. **243** (1969), 5582-5589
- [393] S. Grbac-Ivankovic, K. Antonijczuk, A.H. Varghese, M.C. Plowman, A. Antonijczuk, G. Korza, J. Ozols, F.W. Sunderman jr.  
Lipovitellin 2  $\beta$  is the 31 kD Ni(2+)-binding protein (pNiXb) in Xenopus oocytes and embryos  
Mol. Reprod. Dev. **38** (1994), 256-263
- [394] B.L. Beck, D.C. Henjum, K. Antonijczuk, O. Zaharia, G. Korza, J. Ozols, S.M. Hopfer, A.M. Barber, F.W. Sunderman jr.  
PNiXa, a Ni<sup>2+</sup>-binding protein in Xenopus oocytes and embryos, shows identity to Ep45, an estrogen-regulated hepatic serpin  
Mol. Reprod. Dev. **44** (1996), 507-524
- [395] K. Antonijczuk, O.S. Kroftova, A.H. Varghese, A. Antonijczuk, D.C. Henjum, G. Korza, J. Ozols, F.W. Sunderman jr.  
The 40 kDa <sup>63</sup>Ni<sup>2+</sup>-binding protein (pNiXc) on western blots of Xenopus laevis oocytes and embryos in the monomer of fructose-1,6-biphosphate aldolase A  
Biochim. Biophys. Acta **1247** (1995), 81-89

- [396] K. Kondo, T. Ozaki, Y. Nakamura, S. Sakiyama  
DAN gene product has an affinity for  $\text{Ni}^{2+}$   
Biochem. Biophys. Res. Commun. **216** (1995), 209-215
- [397] T. Ozaki, Y. Nakamura, H. Enomoto, M. Hirose, S. Sakiyama  
Overexpression of DAN gene product in normal rat fibroblasts causes a  
retardation of the entry into the S phase  
Cancer Res. **55** (1995), 895-900
- [398] K. Okuno, M. Yasutomi, T. Arakawa, M. Shiomi, J. Hida, K. Ueda, K. Minami  
Gene expression analysis in colorectal cancer using DNA array filter  
Dis. Colon Rectum 44 (2001), 295-299

## **8     Anhang**

Patientenfragebogen

Datum <u>13.4.95</u>	<b>Fragebogen zur Speicherung von Patientendaten</b>		Patienten-Nr. <u>3</u>								
Alter: <u>67</u> Geschlecht: <input checked="" type="checkbox"/> m <input type="checkbox"/> w											
<b>Wohnort:</b> jetziger Wohnort: <u>VIERSEN</u> Geburtsort: <u>WENDELBOR</u> frühere Wohnsitze:      Ort      von...      bis... 1. <u>VIERSEN</u> <u>30</u> <u>HEUTE</u> 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____ 7. _____											
<b>Beruf: SCHREINER</b> erlernter Beruf:      zur Zeit ausgeführte Tätigkeit als: <u>SCHREINER</u> <u>/</u> jetzige Arbeitsstätte: <u>/</u> frühere Arbeitsstätten:      Ort      von...      bis... 1. <u>VIERSEN</u> <u>1950</u> <u>1993</u> 2. _____ 3. _____ 4. _____ 5. _____ 6. _____ 7. _____ 8. _____ 9. _____ 10. _____											
<table style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 25%;">Nichtraucher</td> <td style="width: 25%;">Raucher</td> <td style="width: 25%;">wenn ja,</td> <td style="width: 25%;">seit wann (Jahr) .....</td> </tr> <tr> <td><input checked="" type="checkbox"/></td> <td><input type="checkbox"/></td> <td></td> <td>wieviele Zigaretten pro Tag .....</td> </tr> </table> bei Nichtrauchern: Liegt "Passivrauchen" durch Familienmitglieder oder Arbeitskollegen vor? <input checked="" type="checkbox"/> ja <input type="checkbox"/> nein				Nichtraucher	Raucher	wenn ja,	seit wann (Jahr) .....	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		wieviele Zigaretten pro Tag .....
Nichtraucher	Raucher	wenn ja,	seit wann (Jahr) .....								
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		wieviele Zigaretten pro Tag .....								

Ernährung:			
	viel	normal	wenig
tierische und pflanzliche Fette	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Kohlehydrate	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
tierisches Eiweiß	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
frisches Gemüse	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
frisches Obst	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Alkohol	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

**Anamnese:**

Seit 1/2 Jahr Schleimabgang, unregelmäßiger Stuhl,  
 Stuhlfrequenz 2x/die  
 Gewichtsabnahme ca 15kg

**Infektionen:**      nein      ja      wenn ja welche .....

☒      ☐

**Probenarten:**      Normalgewebe      Tumorgewebe      Urin      Blut      Haare

Entnahmedatum:      ☒ 30.03.95      ☒ 30.03.95      ☐      ☐      ☐

**Gewebeprobe(n):**      detaillierte Beschreibung des Entnahmeortes

Fettgewebe      Subcutan

Muskelgewebe

Organgewebe      ca. 10 cm ab ano (Rektum)

Funktionszustand des Organs: endoskopisch + histologisch stenosierendes CA

Größe des entnommenen Gewebes: ca. 2 cm

<b>Blutprobe(n):</b>	<b>Entnahmeort:</b> .....
<b>Hauptkrankheit:</b> ..... <i>histologisch gesichertes Adenocarcinom des</i> ..... ..... <i>Rektums</i> ..... ..... .....	
<b>Medikation:</b>  <b>Dauermedikation:</b> ..... ..... ..... ..... ..... <b>temporäre Medikation:</b> ..... ..... ..... ..... .....	