Universitätsklinikum Ulm
Abteilung Humangenetik
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. W. Vogel

Charakterisierung der genotoxischen Wirkung von Formaldehyd

Nachweis von Crosslinks im Comet Assay und ihre Bedeutung für die Mutagenese

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Oliver Merk
aus Biberach

Ulm, 2000

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. P. Gierschik
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Speit
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. H.-U. Wolf
Tag der Promotion:	22.12.2000

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 7

1.1 Genotoxizität und Kanzerogenität von Formaldehyd 7

1.2 Genotoxizität von anderen bekannten crosslinkenden Substanzen 13

1.3 Nachweis von Crosslinks im Comet Assay 15

1.4 Zusammenhang zwischen der Reparatur von Crosslinks und der Entstehung von Mutationen 17

1.5 Fragestellung 20

2 Material und Methoden 21

2.1 Material 21

2.1.1 Zelllinien 21

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Kits 22

2.1.3 Geräte und Materialien 24

2.1.4 Primer für die LOH-PCR 26

2.1.5 Lösungen, Medien und Puffer 26

2.2 Methoden 31

2.2.1 Mutagenbehandlung 31

2.2.2 Cytotoxizitätsbestimmung 31

2.2.3 Comet Assay 32

2.2.3.1 Der Comet Assay bei pH>13 33

2.2.3.2 Der Comet Assay bei pH 12,1 36

2.2.3.3 Der Comet Assay bei pH 12,7 37

2.2.3.4 Der Comet Assay bei pH 9 37

2.2.3.5 Protokoll zum Nachweis von Crosslinks 38

2.2.3.6 Proteinase K-Verdau 39

2.2.4 K-SDS Assay zum Nachweis von DNA-Protein Crosslinks 39

2.2.5 Chromosomenpräparation 41

2.2.6 Schwesterchromatidaustausch-Test 42

2.2.7 Mikronukleus-Test 42

2.2.8 V79-HPRT-Mutagenitätstest 43

2.2.9 Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay 45

2.2.10 Molekulare Analyse von TFT-resistenten Kolonien 47
2.2.10.1 Nachweis von LOH auf Chromosom 11 48
2.2.10.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung 50
2.2.11 Statistik 53

3 Ergebnisse 54

3.1 Einfluss von crosslinkenden Substanzen auf die DNA-Migration im Comet Assay 54
3.1.1 Formaldehyd 55
3.1.2 Mitomycin C 56
3.1.3 cis-Platin 57
3.1.4 Kaliumchromat 58
3.1.5 Natriumarsenit 59
3.2 Nachweis von DNA-Protein Crosslinks im K-SDS Assay 60
3.3 Nachweis von DNA-Protein Crosslinks im Comet Assay durch Proteinase K-Verdau 61
3.4 Einfluss von Kaliumchromat auf die DNA-Migration in unterschiedlichen Comet Assay Protokollen 62
3.4.1 Proteinase K-Verdau 62
3.4.2 Zusätzliche Inkubationszeit nach Behandlung 63
3.4.3 Comet Assay bei pH>13 in Abwesenheit von EDTA 64
3.4.4 Comet Assay bei pH 12,1 66
3.4.5 Comet Assay bei pH 12,7 66
3.4.6 Comet Assay bei pH 9 67
3.5 Einfluss von verschiedenen crosslinkenden Substanzen auf die DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9 71
3.6 Persistenz von Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks in V79-Zellen .. 73
3.6.1 Untersuchungen zur Induktion und Reparatur von DNA-Protein Crosslinks . 73
3.6.2 Einfluss verschiedener Behandlungsprotokolle auf die Menge der DNA-Protein Crosslinks 74
3.7 Eliminierung von Crosslinks in reparaturdefizienten Zelllinien 78
3.7.1 Formaldehyd-induzierte DNA-Protein Crosslinks 78
3.7.2 Mitomycin C-induzierte DNA-DNA Crosslinks 81

3.8 Induktion von SCE bzw. Mikronuklei durch crosslinkende Substanzen in V79-Zellen 85
3.8.1 Formaldehyd 85
3.8.2 Mitomycin C 86
3.8.3 cis-Platin 87
3.8.4 Kaliumchromat 88
3.8.5 Natriumarsenit 89
3.9 Zusammenhang zwischen Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks und cytogenetischen Effekten in V79-Zellen 91
3.9.1 Einfluss verschiedener Behandlungsprotokolle auf die Induktion von Mikronuklei durch Formaldehyd in V79-Zellen 91
3.9.2 Persistenz von DNA-Protein Crosslinks und deren Konsequenzen für die Induktion von SCE 93
3.10 Induktion von Mikronuklei durch crosslinkende Substanzen in reparatur-defizienten Zelllinien 96
3.10.1 Formaldehyd 96
3.10.2 Mitomycin C 98
3.11 Induktion von Genmutationen durch crosslinkende Substanzen 100
3.11.1 Nachweis von Genmutationen im V79-HPRT-Mutagenitätstest 100
3.11.1.1 Formaldehyd 100
3.11.1.2 Mitomycin C und cis-Platin 102
3.11.2 Induktion von Mutationen im Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay 104
3.11.2.1 Formaldehyd 104
3.11.2.2 Kaliumchromat 106
3.11.3 Molekulare Analyse von Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten Zellen . 108

4 Diskussion 116

4.1 Der Comet Assay zum Nachweis von Crosslinks 116
4.2 Die Bedeutung von DPC für die Formaldehyd-induzierte Mutagenese 129

5 Zusammenfassung 140

Abkürzungsverzeichnis

6-TG:	6-Thioguanin = 2-Amino-6-Mercaptopurin
4-NQO:	4-Nitroquinolin-1-oxid
AP-Stelle:	Apurinische-, Apyrimidinische Stelle
bp:	Basenpaare
BrdUrd:	Bromdesoxyuridin
BSA:	Bovine serum albumin = Rinderserum Albumin
CE:	Cloning efficiency = Klonierungseffizienz
Ci:	Curie
DAPI:	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DDP:	cis-Diamindichlorplatin
DDC:	DNA-DNA Crosslinks
DMSO:	Dimethylsulfoxid
dNTP:	Desoxy Nukleotidtriphosphate
DPC:	DNA-Protein Crosslinks
DSB:	Doppelstrangbruch
EDTA:	Ethylendiaminotetraacetat
EMS:	Ethylmethansulfonat
FA:	Formaldehyd
FITC:	Fluorescein-Isothiocyanat
FISH:	Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung
Gy:	Gray
HBSS:	Hanks balanced salt solution
HPRT:	Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase
k.D.:	keine Daten vorhanden
LMP:	Low melting point Agarose
LOH:	loss of heterozygosity = Verlust der Heterozygotie
MF:	Mutantenfrequenz
MLA:	Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay
MMC:	Mitomycin C
MMS:	Methylmethansulfonat
NER:	Nukleotid Exzisionsreparatur
PBS:	Phosphate buffer saline
PCR:	polymerase chain reaction = Polymerase-Kettenreaktion
PMSF:	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm:	rotations per minute = Umdrehungen pro Minute
SCE:	Schwesterchromatidaustausch
SDS:	Natriumdodecylsulfat
SEM:	standard error of the mean = Standardfehler
TFT:	Trifluorthymidin
TK:	Thymidin Kinase
XP:	Xeroderma pigmentosum

Die Wahrheit ist einfach, der Irrtum vielfältig:
aber wehe dem, der meint, mit dem Einfachen beginnen zu können.

Arntzen

1 Einleitung

Formaldehyd ist eines der wichtigsten Produkte der chemischen Industrie, die 1988 weltweit ca. $5x10^6$ Tonnen davon hergestellt und verarbeitet hat. Die häufigste Handelsform ist dabei eine 30-56%ige wässrige Lösung. Durch die Verwendung in Produkten des täglichen Bedarfs werden sehr viele Personen meist unwissentlich gegenüber Formaldehyd exponiert. Das brennbare, farblose und stechend riechende Gas wird hauptsächlich verwendet zur Herstellung von Harzen, Bindemitteln und pharmazeutischen Erzeugnissen. Aber auch Produkte, die direkt mit der Haut in Kontakt kommen, wie Textilien und Leder, werden mit Hilfe von Formaldehyd produziert. In Körperpflege- und Reinigungsmitteln wird Formaldehyd aufgrund seiner konservierenden bzw. desinfizierenden Wirkung eingesetzt. Eine Exposition über einen längeren Zeitraum kommt innerhalb von Gebäuden durch das Ausgasen von Formaldehyd aus Baustoffen wie Holzspanplatten und Isolierungsmaterialien zustande, aber auch im Tabakrauch findet sich Formaldehyd. Weitere Expositionsquellen entstehen durch die Bildung von Formaldehyd bei der Verbrennung von Kohle, Öl und Treibstoffen. Der Mensch ist nicht nur in seiner Umwelt dem Formaldehyd ausgesetzt, es wird auch endogen gebildet, z.B. durch oxidativen Abbau von Methanol und anderer Xenobiotika. Innerhalb des Körpers wird es rasch durch die in der Leber lokalisierte Formaldeyd-dehydrogenase / S-Formylglutathion-hydrolase oxidativ zu Ameisensäure metabolisiert (Uotila und Koivusalo, 1989).

1.1 Genotoxizität und Kanzerogenität von Formaldehyd

Die primäre genotoxische Wirkung von Formaldehyd ist die Bildung von DNA-Protein Crosslinks (Heck et al., 1990; Zhitkovich und Costa, 1992). Das sind kovalente Verknüpfungen zwischen den Bausteinen der DNA und Proteinen, wobei in Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks (DPC) als DNA-gebundene Proteine hauptsächlich Histone gefunden werden (O'Connor und Fox, 1989). Grundsätzlich werden alle fünf Histone kovalent mit der DNA verknüpft, es existiert jedoch eine geringfügige Bevorzugung der Histone H1 und H3. Die Bindung erfolgt über eine primäre Reaktion der ε-Amino-gruppen der Histon-Lysine mit Formaldehyd und einer anschließenden Umsetzung mit den exozyklischen Aminogruppen der Adenosin- bzw. Guanosinbasen (McGhee und von Hippel, 1975; Ohba et al., 1979). Somit lautet der generelle Aufbau Formaldehyd-induzierter DPC: Histon-NH-CH_2-NH-DNA. Darüber hinaus kann das Formaldehyd auch

mit anderen Makromolekülen wie RNA und Nicht-Kernproteinen reagieren. Nach einer Formaldehyd-Behandlung fanden manche Untersuchungen zusätzlich noch DNA-Strangbrüche, die aber wahrscheinlich durch DNA-Reparaturprozesse entstehen (Fornace, 1982; Grafstrom et al., 1983).

Der hauptsächliche Aufnahmeweg von Formaldehyd ist die Inhalation, gefolgt von der Hautresorption und dem Verschlucken. Formaldehyd besitzt eine kurze Halbwertszeit und reagiert sehr rasch mit anderen Molekülen, daher kann es nur lokal an der Stelle seiner Aufnahme wirken. Diese Aussage wird gestützt durch Inhalationsstudien mit Ratten und Affen, in denen eine deutliche Erhöhung der DPC-Rate im oberen respiratorischen Epithel gefunden wurde, während die Rate in den mittleren und unteren Epithelien deutlich darunter lag. In den Zellen der Lunge wurde dagegen keine Bildung von DPC nachgewiesen (Casanova et al., 1989; Casanova et al., 1994). Gegen eine systemische Wirkung spricht auch, dass es zu keinem signifikanten Anstieg des Formaldehyd-Spiegels im Blut durch Einatmung von Formaldehyd-Dämpfen kommt (Heck et al., 1985).

Verschiedene Langzeit-Inhalationsstudien zur Kanzerogenität von Formaldehyd in Ratten und Mäusen zeigten nur in den Hochdosisgruppen der Ratten, neben starken toxischen Effekten, eine Erhöhung der Rate an Nasentumoren (Übersicht bei Conaway et al., 1996). Die Daten sind jedoch schwer zu interpretieren, da sie sich zum Teil widersprechen. Es gibt deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Rattenstämmen, so findet sich in Fischer 344 Ratten nach 19 Monaten eine deutliche Induktion von Nasentumoren bei 5,6 und 14,3 ppm, während in Sprague-Dawley Ratten mit 14,2 ppm nur eine geringe Erhöhung der Tumorrate zu verzeichnen war. In Wistar-Ratten konnte nur eine Studie bei einer sehr hohen Dosis von 20 ppm eine geringfügige Erhöhung der Tumorrate zeigen. Langanhaltende Expositionen des Menschen mit den in den Tierversuchen verwendeten hohen Dosen kommen praktisch nicht vor, da es bereits ab 1-3 ppm zu Reizungen der Augen, ab 4-5 ppm relativ rasch zu Unwohlsein und ab 10 ppm sofort zu starkem Tränenfluss und Atemproblemen kommt (Paustenbach et al., 1997).

In epidemiologischen Studien am Menschen lassen sich keine eindeutigen Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen Formaldehyd-Exposition und Tumorentstehung finden (Übersicht bei IARC, 1995). Menschen können sowohl durch die Nase, als auch durch den Mund atmen, während Ratten obligate Nasenatmer sind. Bei schwer arbeitenden Menschen in der Industrie kann dabei die Mundatmung überwiegen (Blair et al., 1987).

Wenn Formaldehyd also Tumore induziert, dann könnten sie nicht nur im Nasenbereich, sondern auch im Bereich der Mundschleimhaut oder des Rachens auftreten. Bisher existiert jedoch keine Studie, die eindeutige Beweise für eine Beziehung zwischen Formaldehyd-Exposition und erhöhter Tumorrate in diesen Bereichen zeigen konnte. Die z.T. positiven Befunde von Formaldehyd in den Tierversuchen und die nur begrenzten Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung beim Menschen führte zu einer Einstufung von der IARC in die Gruppe 2A als „wahrscheinlich kanzerogen für den Menschen".

Die Menge an gebildeten DPC wird von einigen Autoren zur Abschätzung der im Gewebe wirksamen Formaldehyd-Konzentration und im weiteren zur Bewertung des Krebs-Risikos verwendet (Conolly und Andersen, 1993; Hubal et al., 1997). Zwar existiert eine Übereinstimmung zwischen den Orten, an denen Tumore auftreten und DPC gefunden werden (Casanova et al., 1994), jedoch ist bislang noch nicht geklärt, ob die DNA-Protein Crosslinks nur als Expositionsmarker oder als prämutagene Läsionen anzusehen sind. Bislang ist es noch umstritten, ob Formaldehyd als genotoxisches Kanzerogen anzusehen ist. Trotz der bekannten genotoxischen Wirkung gehen einige Wissenschaftler davon aus, dass die genotoxische Wirkung nicht im Vordergrund steht, sondern dass beispielsweise die erhöhte Zellproliferation bei der Tumorinduktion durch Formaldehyd die entscheidende Rolle spielt (Monticello und Morgan, 1997).

In vivo und *in vitro* lassen sich nach Formaldehyd-Behandlung eine Vielzahl von genotoxischen Effekten nachweisen (Übersicht bei Ma und Harris, 1988). Hinweise auf eine Induktion von DNA-Reparatur ergeben sich durch positive Ergebnisse in Tests mit HeLa-Zellen auf außerplanmäßige DNA-Synthese (Martin et al., 1978), in anderen Untersuchungen wurde jedoch eine Formaldehyd-induzierte Hemmung der außerplanmäßigen DNA-Synthese festgestellt (Grafstrom et al., 1983). Formaldehyd führt eindeutig zu cytogenetischen Effekten, wie der Erhöhung der Rate an Schwesterchromatidaustauschen (SCE) und der Häufigkeit von Chromosomenaberrationen und Mikronuklei (Natarajan et al., 1983; Schmid et al., 1986; Ying et al., 1997). Der SCE-Test gehört zu den Indikatortestsystemen, da prinzipiell reziproke Austausche der DNA-Moleküle der Schwesterchromatiden (Abb. 1) nicht als mutagene Ereignisse angesehen werden können. Dennoch ist eine Erhöhung der SCE-Rate ein Hinweis auf eine genotoxische Wirkung einer Substanz, die über andere Mechanismen dann zu Mutationen führen kann (Shafer, 1981). Auch Crosslinks können zu einer Induktion von SCE führen (Wolff und Afzal, 1996).

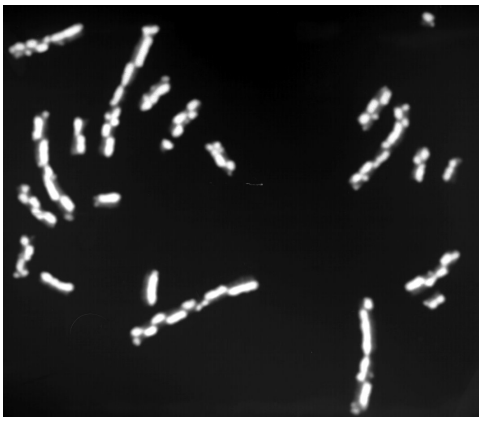


Abb. 1: Mit Acridinorange differentiell gefärbte Metaphasechromosomen von V79-Zellen mit Schwesterchromatid-austauschen.

Chromosomenaberration, d.h. Veränderungen in der Zahl und der Struktur von Chromosomen, sind dagegen genotoxische Effekte, die direkt mit der Tumorgenese im Zusammenhang stehen. Deletionen und Rearrangements können Tumorsuppressorgene inaktivieren bzw. Protoonkogene aktivieren und so die Bildung von Tumoren auslösen (Kinzler und Vogelstein, 1997). Diese Veränderungen lassen sich entweder direkt an den Metaphasechromosomen im Chromosomenaberrationstest (Galloway, 1994) oder durch den Mikronukleus-Test untersuchen (Fenech, 1993; von der Hude et al., 2000). Werden nach der Zellteilung Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen nicht in einen der beiden Tochterkerne integriert, bleiben diese im Cytoplasma liegen. In der folgenden Interphase lassen sich die von einer Kernmembran umschlossenen, chromatinhaltigen Körperchen durch DNA-bindende Farbstoffe nachweisen und werden aufgrund ihrer Größe Mikronuklei genannt (Abb. 2). Im Laufe weiterer Zellteilungen gehen die Mikronuklei verloren und der Verlust dieser genetischen Information kann zur Transformation von Zellen führen.

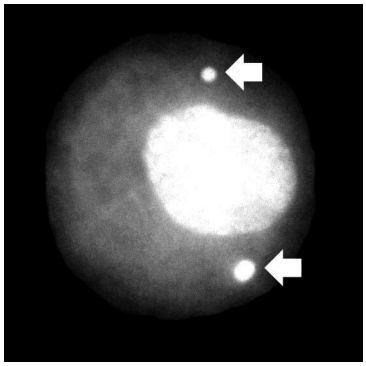


Abb. 2: Acridinorange gefärbte V79-Zelle nach Formaldehyd-Behandlung. Neben dem Hauptkern sind auch zwei Mikronuklei (Pfeile) erkennbar.

Die bisherigen Untersuchungen zur Induktion von Chromosomenmutationen in Formaldehyd-exponierten Zellen zeigten überwiegend positive Befunde. Die Datenlage zur Induktion von Genmutationen nach Formaldehyd-Behandlung ist jedoch nicht so

einheitlich. Der Ames-Test mit verschiedenen *Salmonella typhimurium* Stämmen weist nur sogenannte Rückwärtsmutationen nach, die zu einer Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps führen (Ames et al., 1975). Während erste Untersuchungen mit den Stämmen TA1535, TA100, TA1538, TA98 und TA1537 nur negative Ergebnisse brachten (de Flora, 1981; Gocke et al., 1981), konnten andere Labors in den Stämmen TA98, TA100 und TA102 mit modifizierten Behandlungsprotokollen positive Wirkungen beobachten (O'Donovan und Mee, 1993; Schmid et al., 1986).

Untersuchungen zur Induktion von Vorwärtsmutationen in Säugerzellen werden hauptsächlich am HPRT-Gen in V79-, CHO- und TK6- Zellen, sowie am TK-Gen in L5178Y-Zellen durchgeführt (Übersicht bei Glatt, 1994). Eine funktionsstörende Mutation im X-chromosomalen HPRT-Gen führt zu einem Ausfall der Hypoxanthin Guanin Phosphoribosyl Transferase, einem Enzym des „Purin Salvage Pathway" (Nyhan und Wong, 1996). Die betroffenen Zellen können jedoch durch die Neusynthese von Purinen diesen Defekt überleben. Zusätzlich zu den normalen Substraten Hypoxanthin und Guanin wird vom HPRT-Enzym auch das 6-Thioguanin in das Nukleosidmonophosphat umgesetzt (Krenitsky et al., 1969). Das 6-Thioguanosintriphosphat wird anstelle von Guanosintriphosphat in die DNA eingebaut und führt zum Absterben der Zelle. Somit können nur Zellen mit einer funktionsstörenden Mutation im HPRT-Gen in 6-Thioguanin-haltigem Medium überleben und Zellkolonien bilden. Die Zahl der Kolonien ist dabei ein Maß für die Zahl der induzierten HPRT-Mutationen. Im HPRT-Test sind nach Formaldehyd-Behandlung häufig nur schwache, nicht-konzentrationsabhängige Anstiege der Mutantenfrequenzen zu beobachten (Grafström et al., 1993; Graves und Green, 1996). Nach einer achtmaligen Behandlung von TK6-Zellen für jeweils 2 h über 32 Tage konnte ein zehnfacher Anstieg der HPRT-Mutantenfrequenz beobachtet werden (Crosby et al., 1988). Nur eine einzige Untersuchung an V79-Zellen zeigte nach einer einmaligen Behandlung mit Formaldehyd für 4 h einen deutlichen Anstieg der Mutantenfrequenz um den Faktor vier (Miltenburger et al., 1991). Wurden die Zellen einer wiederholten Behandlung an aufeinanderfolgenden Tagen ausgesetzt, so konnte bereits bei einer wesentlich geringeren Konzentration ein Anstieg der HPRT-Mutantenfrequenz um das neunfache beobachtet werden.

Im Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay (MLA) wird die Induktion von funktionsstörenden Mutationen im autosomalen Thymidin Kinase-Gen nachgewiesen. Da bei autosomalen Genen in der Regel zum vollständigen Ausfall der Funktion Mutationen in beiden Allelen notwendig sind, wird in diesem Test die Zelllinie L5178Y-3.7.2.C eingesetzt, die bereits

ein mutiertes TK-Allel besitzt (Clive, 1987). Auch im MLA führt ein Ausfall des Thymidin Kinase-Enzyms nicht zum Absterben der Zellen, da das Thymidin auch über Neusynthese hergestellt werden kann. Ein weiteres Substrat der Thymidin Kinase ist das Trifluorthymidin, dass in der Zelle weiter zu Trifluorthymidintriphosphat umgewandelt und die DNA eingebaut wird. Dieser Einbau führt jedoch zum Absterben der Zelle und wie schon beim HPRT-Test können nur Zellen mit einer funktionsstörenden Mutation in beiden TK-Allelen in TFT-haltigem Medium überleben und Kolonien bilden (Moore-Brown, 1981). Da die verwendete Zelllinie als Suspensionskultur wächst, haben sich zwei unterschiedliche Protokollvarianten des MLA etabliert. Beim ursprünglich entwickelten Protokoll werden die Zellen zur Koloniebildung in Softagar fixiert und in großen Petrischalen ausgesät (Clive et al., 1979), während das später etablierte Protokoll die Zellen in 96-well Platten aussät (Cole et al., 1983; Honma et al., 1999). Beide Protokolle werden jedoch hinsichtlich ihrer Ergebnisse als gleichwertig angesehen (Cole et al., 1999). Interessanterweise bilden die TFT-resistenten Zellen Kolonien, die sich bezüglich ihrer Größe deutlich voneinander unterscheiden (Abb. 3).

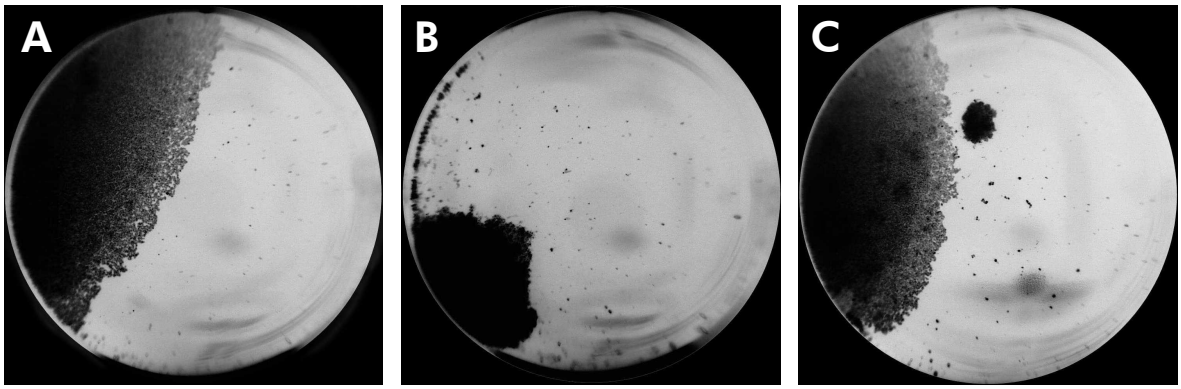


Abb. 3: Auswertung der Koloniegrößen in Schalen mit selektivem Medium im Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay: Schale mit großer Kolonie (A), Schale mit kleiner Kolonie (B) und Schale mit großer und kleiner Kolonie (C).

Cytogenetische Untersuchungen der TFT-resistenten Kolonien haben gezeigt, dass kleine Kolonien sehr häufig chromosomale Veränderungen besitzen, während große Kolonien diese nicht aufweisen (Moore und Doerr, 1990). Damit wird angenommen, dass große Kolonien überwiegend auf Genmutationen beruhen, während kleine Kolonien hauptsächlich durch Chromosomenmutationen induziert werden (Doerr et al., 1989). Es wurde inzwischen durch molekulare Analyse von TFT-resistenten Kolonien gezeigt, dass der MLA auch Rekombinationsereignisse detektieren kann (Liechty et al., 1998). Klar positive Ergebnisse für Formaldehyd finden sich in der Softagar Version des MLA, wobei

jedoch keine weiteren Angaben zu den induzierten Koloniegrößen zu finden sind (Blackburn et al., 1991; Wangenheim und Bolcsfoldi, 1988).

1.2 Genotoxizität von anderen bekannten crosslinkenden Substanzen

Neben dem Formaldehyd existiert noch eine Vielzahl an weiteren Substanzen, die DPC induzieren. Dazu gehören neben einer großen Zahl strukturell und funktionell verwandter Aldehyde (Kuchenmeister et al., 1998) auch Metallverbindungen, wie das sechswertige Chrom und das dreiwertige Arsen. Eine quervernetzende Wirkung kann nicht nur zwischen der DNA und Proteinen stattfinden, es ist auch möglich, dass die Bausteine der DNA selbst kovalent miteinander verbunden werden. Diese Art des DNA-Schadens wird DNA-DNA Crosslink genannt, wobei noch genauer zwischen DNA-DNA interstrand und DNA-DNA intrastrand Crosslinks unterschieden wird. Bei ersteren sind die beiden DNA-Stränge der Doppelhelix miteinander verbunden, während bei den letzteren meist nah benachbarte DNA-Basen kovalent verknüpft sind (Abb. 4). Ein Vertreter der Substanzen, die DNA-DNA interstrand Crosslinks induzieren, ist das Mitomycin C, während cis-Diamindichlorplatin, oder kurz „cis-Platin“, hauptsächlich DNA-DNA intrastrand Crosslinks verursacht.

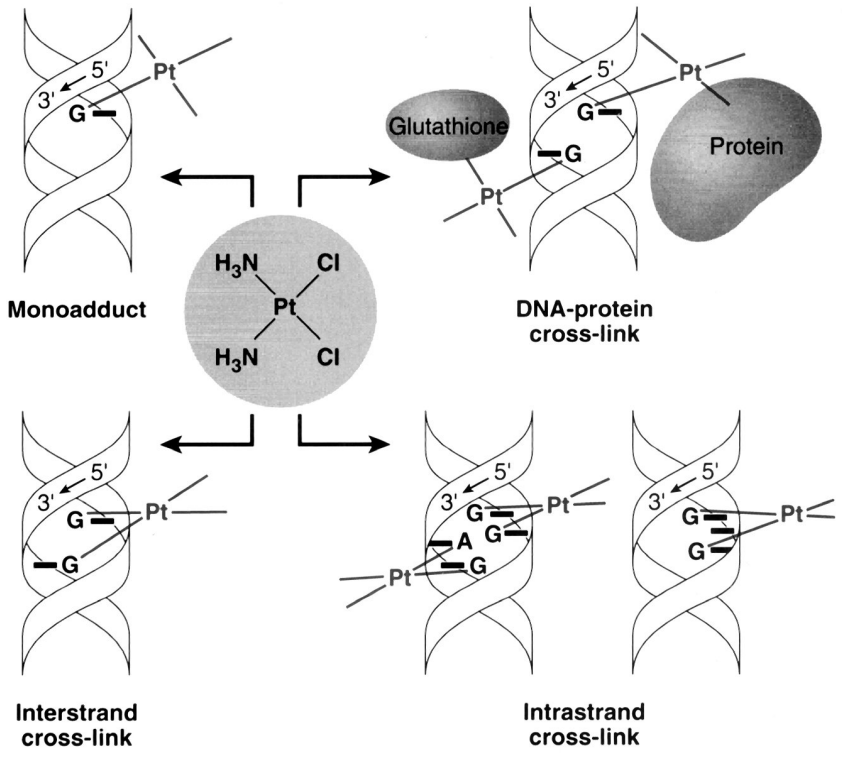


Abb. 4: Cis-Platin kann sowohl Monoaddukte, DPC, als auch DNA-DNA interstrand und DNA-DNA intrastrand Crosslinks verursachen. (Aus Friedberg et al., 1995)

Für das Chromat ist neben der Induktion von DPC (Costa et al., 1993; Costa et al., 1996) auch noch die Bildung von DNA-Strangbrüchen (Sugiyama et al., 1986) und sogenannten alkalilabilen Stellen nachgewiesen (Cantoni und Costa, 1984). Letztere sind DNA-Schäden, die bei Behandlung der DNA mit Puffern, deren pH-Wert größer als 13 ist, in DNA-Strangbrüche umgewandelt und dann gemessen werden können. Chromat bindet, im Gegensatz zu den von Formaldehyd gebundenen Histonen, vor allem Actin an die DNA (Costa, 1991). Eine Darstellung des Spektrums der Chromat-induzierten genotoxischen Effekte findet sich in verschiedenen Übersichtsartikeln (de Flora et al., 1990; Snow, 1992). Chromat wirkt klastogen, d.h. es verursacht Chromosomenaberrationen (Bianchi et al., 1983; Majone und Levis, 1979; Sugiyama et al., 1991) und Mikronuklei (Itoh und Shimada, 1997). Eine Erhöhung der SCE-Rate wurde ebenfalls beschrieben (Bianchi et al., 1983; Levis und Bianchi, 1982). Es finden sich nur schwach positive Effekte im V79-HPRT-Test (Bianchi et al., 1983; Rainaldi et al., 1982). Im MLA sind die Mutantenfrequenzen deutlicher erhöht, es finden sich jedoch keine Angaben zu den Koloniegrößen (Oberly et al., 1982). Aufgrund ausreichender Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung beim Menschen und in Tierversuchen wurde das sechswertige Chrom von der IARC in die Gruppe 1 als „kanzerogen für den Menschen“ eingestuft (IARC, 1990).

Auch für Verbindungen, die das dreiwertige Arsen beinhalten, ist die Induktion von DPC nachgewiesen (Costa et al., 1996; Ramirez et al., 2000; Tice et al., 1997). Wie beim Chromat wurden ebenfalls andere DNA-Schäden, wie DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen direkt nach der Behandlung gefunden (Dong und Luo, 1993). Es wird zusätzlich eine indirekte Wirkung auf die genotoxischen Effekte anderer Substanzen durch Hemmung der DNA-Reparatur diskutiert (Hartwig, 1995). Nach Arsen-Behandlung lässt sich ein deutlicher Einfluss auf die Induktion von Chromosomenaberrationen (Nakamuro und Sayato, 1981) und die SCE-Rate (Jha et al., 1992) feststellen, Genmutationen im HPRT-Gen wurden nicht gefunden (Rossman et al., 1980). Im MLA verursachte Arsen nur eine geringe Erhöhung der Mutantenfrequenz (Honma et al., 1999). Wie Formaldehyd ist auch Arsen eine Substanz, mit der Menschen häufig in Kontakt kommen können, da Oberflächengewässer und Böden, vor allem in Ländern der dritten Welt, damit belastet sind (Acharyya et al., 1999).

Das Mitomycin C (MMC) gehört zu einer Gruppe sehr wirksamer Antibiotika, die aus Kulturen von *Streptomyces caespitosus* gewonnen werden. Sie besitzen aber auch eine sehr starke antitumorigene Wirkung, weshalb gerade das MMC erfolgreich in der Chemo-

therapie von Brust- und Prostatatumoren eingesetzt wird. Mit Hilfe unterschiedlicher Testsysteme wurde die Bildung verschiedener Crosslinks nach MMC-Behandlung nachgewiesen (Kohn et al., 1980; Tomasz, 1994a; Tomasz, 1994b), wobei *in vivo* vor allem DNA-DNA interstrand Crosslinks gefunden wurden (Kato et al., 1988). Zusätzlich werden MMC-DNA Monoaddukte an der N^2-Position und Alkylierungen an der O^6-Position des Guanins induziert. Das Verhältnis von Monoaddukten zu DNA-Crosslinks wurde dabei auf 10:1 geschätzt (Tomasz et al., 1974). Untersuchungen an synthetischen Oligonukleotiden zeigten eine absolute Spezifität der Crosslink-Ausbildung zwischen den beiden Guaninen im Sequenzmotiv „CG:CG" (Teng et al., 1989). Als genotoxische Effekte induziert MMC unter anderem SCE (Linnainmaa und Wolff, 1982), sowie eine Erhöhung der Mutantenfrequenz im V79-HPRT-Test und im MLA (Honma et al., 1999; Oberly et al., 1993).

Mit dem cis-Platin wird eine weiterere crosslinkende Substanz erfolgreich in der Chemotherapie (z.B. von Hodentumoren) eingesetzt. Wie in Abb. 4 bereits gezeigt, induziert auch cis-Platin ein ganzes Spektrum an Crosslinks, wobei jedoch der überwiegende Teil DNA-DNA intrastrand Crosslinks sind (Takahara et al., 1995; Zamble und Lippard, 1995). Über 90 % der induzierten DNA-Addukte sind dabei 1,2-intrastrand Crosslinks, bei denen zwei benachbarte Purine über ihre N^7-Position jeweils mit dem Platin verknüpft sind. In Untersuchungen zur Genotoxizität verursachte cis-Platin eine Erhöhung der SCE-Rate (Preuss et al., 1996) und der Mutantenfrequenz am HPRT-Lokus in V79 Zellen (Zwelling et al., 1979).

1.3 Nachweis von Crosslinks im Comet Assay

Bis heute wurden eine Reihe unterschiedlicher Techniken zum Nachweis von Crosslinks entwickelt. In den *in vivo* Experimenten von Cassanova et al. (1989; 1991; 1994) wurden DNA-Protein Crosslinks indirekt über die Bindung von ^{14}C-Formaldehyd an die DNA mit Hilfe der HPLC-Analytik nachgewiesen. Eine Methode, die wesentlich mehr Zellmaterial benötigt und deshalb überwiegend für *in vitro* Untersuchungen eingesetzt wird, ist die alkalische Elution (Übersicht bei Kohn et al., 1980). Durch unterschiedliche Protokolle lassen sich damit sowohl DPC, als auch DNA-DNA Crosslinks und DNA-Strangbrüche nachweisen. Bei dieser Methode werden die Zellen auf einem Filter lysiert und die DNA durch Durchströmen des Filters mit einem alkalischen Puffer eluiert. Während DNA-Strangbrüche zu einer beschleunigten Elution der DNA aus dem Filter führen, bewirken Crosslinks eine Hemmung dieses Vorgangs. Crosslinks werden daher in

der alkalischen Elution durch den Nachweis eines hemmenden Effektes auf die Elutionsrate der DNA nach Bestrahlung detektiert. Nach Zusatz von Proteinase K im Elutionspuffer lassen sich DNA-DNA Crosslinks von DPC durch die Aufhebung des hemmenden Effektes bei letzteren unterscheiden. Eine Methode zum biochemischen Nachweis von DPC ist der K-SDS Assay. Dabei wird die DNA nach der Lyse der Zellen mechanisch in kleine Fragmente gespalten, und Proteine werden durch Zusatz von SDS und Kalium in der Kälte ausgefällt und abzentrifugiert. Durch DPC kovalent an die Proteine gebundene DNA fällt mit aus und findet sich im Pellet wieder, während die proteinfreie DNA im Überstand verbleibt. Die DNA-Menge im Pellet im Vergleich zur Gesamt-DNA ist dann ein Maß für die Menge an DPC.

Die Einzelzellgelelektrophorese, oder auch Comet Assay genannte Technik, wurde ursprünglich von Ostling und Johanson (1984) zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen entwickelt. Weite Anwendung findet der Comet Assay heutzutage in der von Singh et al., (1988) vorgestellten alkalischen Version zum sensitiven Nachweis der Induktion und der Reparatur von DNA-Strangbrüchen (Übersicht bei Tice, 1995). Zur Analyse werden nur wenige Zellen (ca. 10^4) in Agarose auf einem Objektträger eingebettet und im Gel lysiert. Anschließend werden die lysierten Zellen in der Regel einem alkalischen Puffer ausgesetzt, was zur Umwandlung von alkalisensitiven DNA-Schäden in DNA-Strangbrüche führt und dann einer horizontalen Elektrophorese unterzogen. Brüche in der DNA , entweder direkt induziert oder entstanden durch die Umwandlung von alkalilabilen Stellen, führen zu einer Lockerung der DNA-Struktur im Kern und zu kurzen DNA-Fragmenten. Beides ruft eine verstärkte Wanderung der negativ geladenen DNA aus dem Zellkern in Richtung Anode während der Elektrophorese hervor. Nach Anfärbung der DNA ergibt sich unter dem Mikroskop das Bild eines Kometen, das dem Comet Assay seinen Namen gab. Der „Kopf" entspricht dabei dem ursprünglichen Zellkern, während der „Schweif" aus der gewanderten DNA besteht. Durch Veränderung des pH-Wertes des Alkali- bzw. Elektrophoresepuffers lässt sich die Sensitivität des Assays bezüglich der Detektion von alkalilabilen DNA-Schäden und DNA-Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen verändern (Klaude et al., 1996; Miyamae et al., 1997).

Inzwischen sind sehr viele Substanzen im Comet Assay untersucht, als positives Ergebnis wird dabei immer die Induktion von DNA-Migration bewertet (Anderson et al., 1998). Crosslinkende Eigenschaften einer Substanz können aber im Comet Assay, analog zu den Effekten in der alkalischen Elution, zu einer Hemmung der DNA-Migration führen.

Bislang wurde der Einfluss von Crosslinks auf die Wanderung der DNA im Comet Assay nur selten untersucht, ein Vergleich der Sensitivität zu anderen genetischen Endpunkten fehlt völlig. Um die hemmende Wirkung von Crosslinks auf die DNA-Migration im Comet Assay nachweisen zu können, muss eine standardisierte Wanderung der DNA in allen Proben induziert werden. Dazu wurden entweder die Alkalizeiten erhöht (Tice et al., 1997) oder zusätzlich DNA-Strangbrüche induziert. Letzteres wurde entweder durch Ko-Inkubation mit einem strangbruchinduzierenden Agenz (z.B. Methylmethansulfonat) erreicht (Pfuhler und Wolf, 1996) oder die Zellen wurden nach der Behandlung mit der crosslinkenden Substanz bestrahlt (Hartley et al., 1999; Olive und Banáth, 1995). Mit dem alkalischen Comet Assay Protokoll in Kombination mit MMS wurde bereits von Pfuhler und Wolf (1996) erfolgreich eine Reduktion der DNA-Migration nach *in vitro* Behandlung mit den crosslinkenden Substanzen Formaldehyd, MMC und cis-Platin gezeigt.

1.4 Zusammenhang zwischen der Reparatur von Crosslinks und der Entstehung von Mutationen

Bislang ist nur sehr wenig darüber bekannt, welcher Zusammenhang zwischen den primären DNA-Schäden und der Entstehung von Mutationen durch crosslinkende Substanzen besteht. Auch über die Reparaturprozesse, mit deren Hilfe Crosslinks repariert werden, gibt es noch keine gesicherten Erkenntnisse. Die Bedeutung der Reparatur von Crosslinks für die Mutagenese ist ebenfalls noch nicht verstanden.

Für die cis-Platin verursachten DNA-DNA intrastrand Crosslinks wird angenommen, dass sie mit Hilfe der Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) repariert werden (Trimmer und Essigmann, 1999). *In vitro* Untersuchungen mit modifizierten Oligonukleotiden zeigten, dass NER die DNA-DNA intrastrand Crosslinks aus den DNA-Strängen entfernen kann (Zamble et al., 1996). Auch für die von MMC induzierten DNA-DNA interstrand Crosslinks wurde gezeigt, dass Proteine der NER an diesen DNA-Schaden binden und damit möglicherweise seine Reparatur einleiten (Warren et al., 1998).

Die NER ist ein inzwischen schon sehr gut untersuchtes Reparatursystem zur Entfernung von verschiedenen DNA-Schäden, wie z.B. UV-induzierte Pyrimidin-Dimere oder große Addukte. Dabei werden die beiden DNA-Stränge an der Schadensstelle entwunden und die Basenpaarung gelöst, dann wird der geschädigte Strang sowohl 3' als auch 5' von der Schadensstelle eingeschnitten und der Strang zusammen mit der geschädigten Base entfernt. Dabei entsteht ein 27-29 bp großer einzelsträngiger Bereich, der durch Proteinassoziation vor dem Verdau durch Endonukleasen geschützt wird. Der ausgeschnittene

Strang wird anschließend mit Hilfe einer Polymerase komplementär zum verbliebenen DNA-Strang neu synthetisiert und die Lücke durch Ligation geschlossen. Damit ist die ursprüngliche Information auf dem geschädigten Strang wiederhergestellt und der DNA-Schaden fehlerfrei repariert (Übersicht bei Yu et al., 1999; de Boer und Hoeijmakers, 2000). Möglich wurde die Aufklärung dieses Mechanismus durch Patienten mit Xeroderma Pigmentosum, einer autosomal rezessiven Erkrankung, die zu einer Hypersensitivität der Haut gegenüber UV-Strahlung und einer stark erhöhten Hautkrebsrate führt (Kraemer et al., 1987). Die Erkrankung teilt sich in acht Komplementationsgruppen auf, die durch einen Defekt in je einem der an der NER beteiligten Gene charakterisiert werden können. An der NER sind aber auch noch eine Vielzahl weiterer Proteine beteiligt, von denen heute bereits über 30 näher untersucht sind.

Es existiert auch eine Erkrankung des Menschen, die sich durch eine besondere Hypersensitivität gegenüber crosslinkenden Substanzen auszeichnet und die nach dem Entdecker und der auftretenden Blutarmut Fanconi Anaemie genannt wird. Lymphozyten dieser Patienten zeigen eine stark erhöhte Rate an Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit MMC, eine Eigenschaft, die auch diagnostisch verwendet wird (Digweed und Sperling, 1996). Auch bei dieser autosomal rezessiven Erkrankung werden inzwischen acht Komplementationsgruppen unterschieden (Joenje et al., 1997), bislang ist jedoch noch keine zusammenhängende Funktion der Proteine beschrieben. Es wird allgemein von einer Beteiligung der Gene an der Reparatur von Crosslinks (Sasaki und Tonomura, 1973) und/oder an der Zellzyklusregulation bzw. der Apoptose angenommen (Carreau und Buchwald, 1998). Neuere Untersuchungen zeigten, dass die defekten Gene der Fanconi Anaemie Zelllinien auch eine Beteiligung an der Reparatur von DNA-Schäden durch homologe Rekombination haben (Thyagarajan und Campbell, 1997). In Prokaryonten (Cole, 1973; Sladek et al., 1989) und in der Hefe (Jachymezyk et al., 1981; Saffran et al., 1994) ist gezeigt, dass sowohl die NER, als auch die Rekombinationsreparatur an der Reparatur von DNA-DNA interstrand Crosslinks beteiligt sind.

Crosslinks können während der Replikation der DNA in der S-Phase zu einem Stopp der Polymerase und somit zu einer Lücke im Tochterstrang führen (Bridgewater et al., 1998; Heck und Casanova, 1999; Ross und Shipley, 1980). Diese Lücke kann durch den Angriff von Endonukleasen zu einem Doppelstrangbruch (DSB) umgewandelt werden (Wang und Smith, 1986). Eine stark cytotoxische Wirkung von DSB wurde in der Hefe nachgewiesen. In Mutanten, die einen Defekt in der Reparatur von DSB aufweisen, korreliert bereits ein nicht-reparierter DSB mit einem letalen Treffer (Frankenberg-Schwager

und Frankenberg, 1990). Ein nicht-reparierter DSB kann sehr leicht zu einem Verlust von sehr viel genetischem Material führen, da zentromerfreie DNA-Bruchstücke während der Mitose nicht auf die Tochterzellen verteilt werden. Dieser Verlust kann entweder zum Absterben der Zelle oder zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen führen und so die Entstehung von Tumoren begünstigen. Die meisten der bisherigen Erkenntnisse über die Reparatur von DSB wurden mit Hilfe von Prokaryonten und der Hefe gewonnen. Die grundlegenden Mechanismen blieben jedoch während der Evolution erhalten, höhere Eukaryonten scheinen sich von niederen nur durch den relativen Anteil der unterschiedlichen Reparaturwege an der Reparatur von DSB zu unterscheiden (Pastink und Lohman, 1999).

Eine Möglichkeit von Zellen DSB zu reparieren, ist die homologe Rekombination (Übersicht bei Pfeiffer et al, 2000). Dabei wird der DSB durch Exonukleasen so prozessiert, dass lange 3'-Überhänge entstehen. Einer dieser Überhänge kann nun mit Hilfe weiterer Proteine in einen homologen Bereich eines anderen DNA-Doppelstranges eindringen, dabei die Stränge trennen und eine Paarung mit dem komplementären Strang eingehen. Das freie 3'-Ende dient dann einer Polymerase als Primer und es kommt zu einer Verlängerung des eingedrungenen Stranges. Der verdrängte Strang kann sich mit dem anderen freien 3'-Ende paaren und auf diese Weise werden beide 3'-Überhänge verlängert. Als Ergebnis erhält man eine Heteroduplex-Struktur, die von zwei Überkreuzungen, den sogenannten „Holliday-junctions", begrenzt wird. Durch Einschnitte von Endonukleasen kann diese Struktur aufgelöst werden, wobei je nach Schnittpunkt „crossover" oder „non-crossover" Produkte erhalten werden. Sehr häufig werden die genetisch identischen Bereiche der zweiten Chromatide innerhalb eines replizierten Chromosoms zur Stranginvasion verwendet. Dabei kommt es zu keinem Verlust von genetischer Information. Dieser Vorgang wird auch als intrachromosomale Rekombination bezeichnet. Treten die DSB jedoch präreplikativ auf, so kann nur eine Invasion in den DNA-Strang des homologen Chromosoms erfolgen. Da sich die Informationen auf den beiden homologen Chromosomen nicht 100%ig gleichen, kann es dadurch zu einem Verlust der Heterozygotie und zu Genkonversion kommen. Damit kann auch ein rezessives Allel von einem heterozygoten Zustand in einen homozygoten Zustand kommen und sich phänotypisch bemerkbar machen. So ist bereits für viele Tumore ein Verlust der Heterozygotie durch Rekombination nachgewiesen (Baird et al., 2000; Zhu et al., 1992).

1.5 Fragestellung

Formaldehyd induziert DNA-Protein Crosslinks (DPC) und führt zur Entstehung von Mutationen. In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob der Comet Assay zum allgemeinen Nachweis von Crosslinks geeignet ist und ob es einen ursächlichen Zusammenhang zwischen den Formaldehyd-induzierten DPC und der mutagenen Wirkung gibt.

- Es sollte zuerst untersucht werden, ob sich das alkalische Standardprotokoll des Comet Assays in Kombination mit γ-Strahlung zum Nachweis von Formaldehyd-induzierten DPC und anderen Arten von Crosslinks eignet. Dazu sollten neben dem Formaldehyd auch Substanzen, die DNA-DNA Crosslinks induzieren, wie Mitomycin C und cis-Platin, untersucht werden. Um die Sensitivität für DPC näher zu charakterisieren, sollten auch die Effekte von anderen DPC-induzierenden Substanzen, wie Kaliumchromat und Natriumarsenit überprüft werden.
- Vergleichende Untersuchungen zur cytotoxischen Wirkung und anderen genotoxischen Wirkungen dieser crosslinkenden Substanzen sollten dabei die biologische Relevanz der Comet Assay Effekte, sowie die Sensitivität des verwendeten Protokolls aufzeigen.
- Es sollte durch Protokollvariationen des Comet Assays auch versucht werden, ein möglichst optimales Protokoll zum allgemeinen Nachweis von Crosslinks zu finden.
- Da bisher noch nicht verstanden ist, welche Bedeutung die DPC für die Mutagenität von Formaldehyd haben, sollten vergleichende Untersuchungen zur Induktion von DPC und den mutagenen Effekten von Formaldehyd durchgeführt werden.
- Bislang sind auch die Wege, über die DPC repariert werden können, nicht genau bekannt. Durch vergleichende Untersuchungen an normalen und reparaturdefizienten menschlichen Zelllinien sollte deshalb die Bedeutung der DNA-Reparatur für die Formaldehyd-induzierte Mutagenese untersucht werden.
- Außerdem sollte das Spektrum der Formaldehyd-induzierten Mutationen im Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay molekulargenetisch analysiert werden, um Hinweise auf den Mechanismus der mutagenen Wirkung von DPC zu erhalten.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Der Großteil der Untersuchungen wurde mit der V79-Zelllinie des chinesischen Hamsters durchgeführt. Dies ist eine permanente Zelllinie, die von transformierten Lungenfibroblasten eines männlichen Hamsters abgeleitet wurde. Die in dieser Arbeit verwendete Linie besitzt eine modale Chromosomenzahl von 21 Chromosomen pro Metaphase und eine durchschnittliche Zellzyklusdauer von 12 h (Schempp und Vogel, 1979; Speit et al., 1994).

Für die Untersuchungen zur Persistenz von Crosslinks und den genotoxischen Effekten in reparaturdefizienten Zelllinien kamen SV40-transformierte menschliche Fibroblasten zum Einsatz. Als reparaturprofiziente Kontrollzellline wurde MRC5CV1 verwendet, die aus normalen männlichen Lungenfibroblasten etabliert wurde (Huschtscha und Holliday, 1983). XP12ROSV geht auf einen männlichen Patienten mit Xeroderma Pigmentosum der Komplementationsgruppe A zurück (Veldhuizen, nicht publiziert). Die Fanconi Anaemie Zelllinie GM06914 gehört der Komplementationsgruppe A an und stammt ebenfalls von einem männlichen Patienten (Duckworth-Rysiecki et al., 1986).

Die Induktion von Mutationen am TK-Lokus und die Analyse des Mutationsspektrums von Formaldehyd wurde an der Maus Lymphoma Zelllinie L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2.C durchgeführt. Die Zelllinie L5178Y stammt von weiblichen DBA/2 Mäusen in denen leukämische Tumore durch 3-Methylcholanthren induziert wurden (Clive et al., 1983). Durch Methylmethansulfonat-Behandlung wurden aus L5178Y $TK^{-/-}$-Mutanten isoliert und im weiteren spontane THMG-resistente $TK^{+/-}$-Revertanten gewonnen. Einer dieser $TK^{+/-}$-Revertanten (3.7.2.C) wurde für die Entwicklung des Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay eingesetzt (Übersicht bei Clive, 1987) Diese Zelllinie ist inzwischen cytogenetisch sehr gut charakterisiert (Sawjer et al., 1985). Der TK-Lokus liegt distal auf Chromosom 11, wobei die beiden Chromosomen 11 durch einen Zentromerdimorphismus unterschieden werden können. Das nichtfunktionelle TK^{-}-Allel ist dabei auf dem Chromosom 11 mit dem kleineren Zentromer (11a) lokalisiert, das Chromosom 11 mit dem größeren Zentromer (11b) trägt das funktionelle TK^{+}-Allel (Hozier et al., 1982).

2.1.2 Chemikalien, Reagenzien, Medien und Kits

[^{3}H]-Thymidin	NEN, Boston, MA, USA
4,6-Diamimidino-2-phenylindol	Serva, Heidelberg
4-Nitroquinolin-1-oxid	Sigma, München
6-Thioguanin (2-Amino-6-Mercaptopurin)	Sigma, München
Acridinorange	Merck, Darmstadt
Agarose LMA, Sea plaque, NuSieve GTG	Biozym, Hameln
Agarose MEEO	Roth, Karlsruhe
Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
Anti-Avidin-Antikörper, biotinyliert	Vector, Burlingame, USA
Aqua ad injectabilis	Braun, Melsungen
Borsäure	Serva, Heidelberg
Bovine serum albumin, Fraktion V	Sigma, München
Bromdesoxyuridin	Sigma, München
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Cis-Platin (cis-diaminedichloroplatinium)	Sigma, München
Colcemid (10 μg/ml)	Seromed, Berlin
Dimethylsulfoxid	Serva, Heidelberg
DNA-Standard 100 bp ladder (1μg/μl)	Pharmacia, Freiburg
DNAzol^{TM} Reagenz	Gibco BRL, Eggenstein
dNTP's (Nukleotid-Mix, 20mM)	Pharmacia, Freiburg
Essigsäure (≥99.7 %)	Roth, Karlsruhe
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Eukitt	Kindler, Freiburg
Fixogum	Marabuwerke, Tamm
Fluorescein-Avidin DCS	Vector, Burlingame, USA
Formaldehydlösung, min. 37 %, pro analysi	Merck, Darmstadt
Formamidlösung	Fluka, Neu-Ulm
Fötales Kälberserum	Biochrom, Berlin

Gentamycin	Biochrom, Berlin
Giemsa	Merck, Darmstadt
Glycerin	Merck, Darmstadt
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Biochrom, Berlin
HAT-Media Supplement (50x) Hybri-Max® (Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)	Sigma, München
HT-Supplement (50x) Hybri-Max® (Hypoxanthin, Thymidin)	Sigma, München
NaCl-Lösung, isoton (0,9 %)	Delta Pharma, Pfullingen
K_2CrO_4	Sigma, München
Kanamycin (10000 U/ml)	Gibco BRL, Eggenstein
Kationenaustauscher AG 501-X8(D); 20-50 mesh	Biorad, München
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MEM-Earle (Minimal Essential Medium)	Biochrom, Berlin
Methanol	Merck, Darmstadt
Metothrexat	Sigma, München
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt
Mitomycin C	Sigma, München
$Na_2HPO_4 \times 2H_2O$	Merck, Darmstadt
$NaAsO_2$	Sigma, München
NaCl	Fluka, Neu-Ulm
$NaHCO_3$	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Natrium-Ethylendiamintetraacetat	Fluka, Neu-Ulm
Natriumlaurylsarcosinat	Sigma, München
PBS (Phosphate buffer saline), Dulbecco; ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}	Biochrom, Berlin

Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml)	Gibco BRL, Eggenstein
Pepsin	Sigma, München
Pferdeserum, hitzeinaktiviert	Gibco BRL, Eggenstein
Phenylmethylsulfonylfluorid	Boehringer, Mannheim
Propidiumjodid	Sigma, München
Proteinase K, DNAse frei	Boehringer, Mannheim
RPMI-1640 Medium mit Glutamax-I	Gibco BRL, Eggenstein
Szintillator, Ultima Gold™	Packard Biosciences, Groeningen, NL
Taq-Polymerase (5 U/µl)	Pharmacia, Freiburg
Thymidin	Sigma, München
Trifluorthymidin	Sigma, München
Tris	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Sigma, München
Trypanblau	Sigma, München
Trypsin	Biochrom, Berlin
Tween 20	Sigma, München
Vectashield®	Vector, Burlingame, USA
Wasser, steril	Delta Pharma, Pfullingen

2.1.3 Geräte und Materialien

6-well Platten, Gewebekultur	Greiner, Nürtingen
96-well Platten, F-Form, Gewebekultur	Greiner, Nürtingen
Blutkulturröhrchen 10 ml	Greiner, Nürtingen
Brutschrank B 6200	Heraeus, Hanau
CCD-Kamera 4910	Cohu, San Diego, CA, USA
CO_2-Brutschrank B 6220 CU	Heraeus, Hanau
Comet-Assay II Meßsystem V1.01 bis V1.03	Perceptive Instruments, Haverhill, UK
Deckgläser (20x20, 24x50, 24x60)	Menzel, Braunschweig

Elektrophorese Power Supply	Fröbel, Ulm
Elektrophoresekammer DNA SubCell™	Biorad, München
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen
Geldokumentationssystem ImageStore 5000	Ultra Violet Products Ltd., Cambridge, UK
ISIS-Bildverarbeitung	Metasystems, Altlusheim
Laminar Air Flow TL2448	Heraeus, Hanau
Laminar Air Flow HB2448 K	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht Assistent KG, Sondheim/Rhön
Objektträger mit Mattrand	Menzel, Braunschweig
PCR-SoftStrips 0,2 ml, 8fach	Biozym, Hess. Oldendorf
Plastikpipetten 5, 10, 25, 50 ml	Falcon, Heidelberg
Reaktionsgefäße 1,5 ml	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße mit Schraubdeckel	Sorenson Bioscience Inc., Salt Lake City, UT, USA
Sterilfilter 0,2 μm	Millipore, Eschborn
Thermal Cycler 9600	Perkin Elmer, Überlingen
Thermomixer Model 5436	Eppendorf, Hamburg
Umkehrmikroskop	Zeiss, Oberkochen
UV-Schirm	Bachofer, Reutlingen
γ-Strahlenquelle Gammacell 2000 (Dosis: 4 Gy/min.)	Nuclear Data, Frankfurt
Zellkulturflaschen 25, 75, 185 cm^2	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen Ø 100 mm	Falcon, Heidelberg
Zellkulturschalen Ø 60 mm	Greiner, Nürtingen
Zellzähler Modell 871	AL Systeme, Karlsruhe
Zentrifuge Modell Minifuge	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Modell Labofuge 400	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Modell 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugenröhrchen 10 ml	Nunc, Wiesbaden

Zentrifugenröhrchen 30 ml	Greiner, Nürtingen
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Falcon, Heidelberg

2.1.4 Primer für die LOH-PCR

D11.Agl2.fwd	5'- AGG GAG GTG CCT GGC TAA CTG ACC GCA -3'
D11.Agl2.rev	5'- GCG GCA CAC GGA GTG ATA CTT GTC GGC -3'
D11.Mit67.fwd	5'- AAA AAA AAA AAG TTC AAG GCT GG -3'
D11.Mit67.rev	5'- GGA ACT CAA CTC CTA GAA CTT CTG -3'
D11.Mit21.fwd	5'- GAG AGC TCT TTC ACA CTT GAA GG -3'
D11.Mit21.rev	5'- CAG AAA GGC TCC TAC CTC AGG -3'
D11.Mit29.fwd	5'- TTG AGG CAT GAG GGG ATT AG -3'
D11.Mit29.rev	5'- TTT CCG TCA TTG CTA AAG GG -3'
D11.Mit63.fwd	5'- GCC CAC AAC TTT GTG TCC TT -3'
D11.Mit63.rev	5'- TTG ACC ATG CTC CTC ATC AG -3'

Alle verwendeten Primer stammen aus der Mouse Genome Database (MGD) der „Mouse Genome Informatics Web Site" des Jackson Laboratoriums, Bar Harbor, Maine (World Wide Web, URL: http://www.informatics.jax.org), Februar 1999.

2.1.5 Lösungen, Medien und Puffer

Allgemeine Verwendung:	
10x TBE, pH 8,0:	900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8,0
10x PBS:	95,5 g PBS in 1000 ml aqua dest., sterilfiltriert
20x SSC	3 M NaCl, 300 mM Natrium-Citrat-Dihydrat, pH 7,0
Acridinorange-Färbelösung:	125 µg/ml Acridinorange in 10 ml Sörensenpuffer Lsg. A, 10 ml Sörensenpuffer Lsg. B ad 100 ml aqua dest.
BrdUrd-Stammlösung:	1 mg/ml in HBSS

Chromosomenfixativ Methanol:Eisessig (3:1):	90 ml Methanol, 30 ml Essigsäure (≥99,7 %)
Giemsa-Färbelösung:	5 ml Giemsa-Lösung, 5 ml Sörensenpuffer Lsg. A, 5 ml Sörensenpuffer Lsg. B, ad 100 ml aqua dest., filtriert
Sörensenpuffer Lsg. A:	1/3 M Na_2HPO_4 x $2H_2O$
Sörensenpuffer Lsg. B:	1/3 M KH_2PO_4
Sörensenpuffer, pH 6,8:	5 ml Sörensenpuffer Lsg. A, 5 ml Sörensenpuffer Lsg. B, ad 100 ml aqua dest.

Fibroblasten-Zellkultur und V79-HPRT-Test:

Gewebemedium MEM:	MEM-Earle, 10 % [v/v] FKS, 2 nM L-Glutamin, 2,2 g/l $NaHCO_3$, 50 µg/ml Gentamycin
Trypsin-Lösung:	0,25 % Trypsin in 0,08 % EDTA, 0,86x PBS
serumfreies Medium:	MEM-Earle, 2 nM L-Glutamin, 2,2 g/l $NaHCO_3$, 50 µg/ml Gentamycin
HAT-Medium:	Gewebemedium MEM mit 5 mM Hypoxanthin, 20 µM Aminopterin, 800 µM Thymidin
HT-Medium:	Gewebemedium MEM mit 5 mM Hypoxanthin, 800 µM Thymidin
6-TG-Medium:	Gewebemedium MEM mit 10 µg/ml 6-Thioguanin

L5178Y-Zellkultur und Maus Lymphoma TK$^{+/-}$-Assay:	
RPMI-5:	500 ml RPMI-1640 mit Glutamax-I, 25 ml Pferdeserum, hitzeinaktiviert
RPMI-10:	500 ml RPMI-1640 mit Glutamax-I, 50 ml Pferdeserum, hitzeinaktiviert, 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), 5 ml Kanamycin (10000 U/ml)
RPMI-20:	500 ml RPMI-1640 mit Glutamax-I, 100 ml Pferdeserum, hitzeinaktiviert, 5 ml Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml), 5 ml Kanamycin (10000 U/ml)
THMG-Medium:	50 ml RPMI-10 mit 500 µl Thymidin (0,3 mg/ml), 5 ml Hypoxanthin (50 µg/ml), 50 µl Methothrexat (0,1 mg/ml), 500 µl Glycin (0,75 mg/ml)
THG-Medium:	50 ml RPMI-10 mit 500 µl Thymidin (0,3 mg/ml), 5 ml Hypoxanthin (50 µg/ml), 500 µl Glycin (0,75 mg/ml)
RPMI-20$_{Sel}$:	RPMI-20 mit 3 µg/ml Trifluorthymidin
TFT-Stammlösung:	0,3 mg/ml Trifluorthymidin in aqua dest.

Comet Assay:	
Lyselösung, pH 10:	Stammlösung : 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris und 10 % Natriumlaurylsarcosinat in aqua dest. 1 % Triton X-100 und 10 % DMSO frisch dazu geben.
Alkali-Elektrophoresepuffer bei pH >13:	300 mM NaOH, 1 mM EDTA in aqua dest.

Alkalipuffer bei pH 12,7:	30 mM NaOH, 1 mM EDTA, 1 M NaCl in aqua dest.
Elektrophoresepuffer bei pH 12,7:	30 mM NaOH, 1 mM EDTA in aqua dest.
Alkali-Elektrophoresepuffer bei pH 9:	100 mM Tris, 300 mM Natriumacetat, pH 9 mit Essigsäure eingestellt.
Neutralisationspuffer, pH 7,5:	0,4 M Tris in aqua dest., pH 7,5 mit 37%iger HCl eingestellt
Ethidiumbromidfärbelösung:	20 µg/ml in aqua dest., sterilfiltriert
Proteinase K-Puffer, pH 10:	10 mM Tris, 1 mM EDTA in aqua dest., pH 10 mit 37%iger HCl eingestellt, autoklaviert

K-SDS Assay :	
PMSF-Stammlösung:	100 mM in 100 % Ethanol absolut
K-SDS Lysepuffer:	0,5 % SDS, 20 mM tris-HCl (pH 7,5) in aqua dest., autoklaviert 1 mM PMSF, frisch zugesetzt
K-SDS Fällungspuffer:	100 mM KCl, 20 mM tris-HCl (pH 7,5) in aqua dest., autoklaviert

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung :	
RNAse-Stammlösung:	10 mg/ml in 1x PBS
RNAse-Lösung:	10 µl RNAse-Stammlösung, 1990 µl 2x SSC (pH 7)
2x SSC:	100 ml 20x SSC, 900 ml aqua dest, pH 7 mit 1 M HCl eingestellt
70 % Formamid/2x SSC:	49 ml Formamid, pH 7, 21 ml 2x SSC, pH 7 mit 1 M HCl eingestellt

Pepsin-Lösung:	20 µl Pepsin (100 mg/ml), 99 ml aqua dest., 1 ml 1 M HCl
PBS/$MgCl_2$-Lösung:	1x PBS, 50 mM $MgCl_2$
Postfixierungslösung:	68 ml PBS/$MgCl_2$-Lösung 2 ml Formaldehyd
50 % Formamid/2x SSC:	130 ml Formamid, 130 ml 4x SSC
4x SSC/0,1 % Tween 20:	200 ml 20xSSC, 800 ml aqua dest., 1 ml Tween 20
Blocking-Lösung:	5 g BSA, 100 ml 4x SSC/0,1 % Tween 20
4x SSC/0,1 % Tween 20/ 1 % BSA:	1 ml Blocking-Lösung, 4 ml 4x SSC/0,1 % Tween 20
DAPI-Färbelösung:	0,1 µg/ml DAPI in 2x SSC

PCR zum Nachweis von LOH auf Chromosom 11:

TrisHCl, 0,5 M, pH 8,3:	6 g Tris, 100 ml aqua dest., pH 8,3 mit HCl eingestellt
KCl, 1 M:	7,5 g KCl, 100 ml aqua dest., autoklaviert
$MgCl_2$, 0,1 M:	2 g $MgCl_2 x6H_2O$, 100 ml aqua dest., autoklaviert
dNTPs, 2,5 mM (jeweils):	10 µl dNTP Stammlösung (20 mM), 70 µl aqua dest.
Bromphenolblau-Ladepuffer:	3 g Sucrose, 25 mg Bromphenolblau, 2,5 ml EDTA (0,2 M, pH 7,6), ad 10 ml aqua dest.

2.2 Methoden

2.2.1 Mutagenbehandlung

In Tab. 1 sind die zur Substanzverdünnung verwendeten Lösemittel, sowie das zur Behandlung verwendete Medium aufgeführt. Bei der Behandlung wurde darauf geachtet, dass maximal 1 % Lösemittel zum Behandlungsansatz gegeben wurde. Die Negativkontrollen wurden immer mit 1 % des jeweiligen Lösemittels behandelt. Vor der Behandlung mit serumfreiem Medium wurde das Gewebemedium abgesaugt, die Zellen einmal mit HBSS gespült und anschließend die entsprechende Menge an serumfreiem Medium zugegeben.

Die verwendeten Mutagene wurden mit dem jeweiligen Lösemittel stets so verdünnt, dass zum Erreichen der Endkonzentration in der Zellkulturflasche noch eine 1:100 Verdünnung erfolgen musste. Das heißt in 5 ml Behandlungsmedium wurden 50 µl der Verdünnung des Mutagens pipettiert und durch kurzes Schwenken gemischt. Während der Behandlung mit dem Mutagen wurden die geschlossenen Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Behandlungszeiten waren unterschiedlich für die verwendeten Mutagene und sind daher bei den Ergebnissen angegeben.

Tab. 1: Zur Substanzverdünnung verwendete Lösemittel, sowie die zur Behandlung von V79, MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV verwendeten Medien.

Substanz	Lösemittel	Behandlungsmedium für die Fibroblastenkulturen
Formaldehyd	HBSS	serumfreies Medium
Mitomycin C	HBSS	Gewebemedium
cis-Platin	DMSO	Gewebemedium
K_2CrO_4	aqua ad injectabilis	serumfreies Medium
$NaAsO_2$	HBSS	Gewebemedium

2.2.2 Cytotoxizitätsbestimmung

Als Parameter für cytotoxische Effekte in V79-Zellen wurde die Fähigkeit der Zellen zum klonalen Wachstum herangezogen. Dazu wurden die Zellen nach der Behandlung abtrypsiniert, abzentrifugiert (1000 rpm, 10 min.), in frischem Gewebemedium aufge-

nommen und gezählt. Dann wurden je 200 Zellen in eine Zellkulturschale (∅ 60 mm) mit 5 ml Gewebemedium pipettiert. Pro Konzentration wurden vier Schalen angesetzt und 6 Tage bei 37°C im CO_2-Brutschrank (5 %) inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Gewebemedium entfernt, die Zellen für 10 min. mit 70 % Ethanol fixiert, getrocknet und 15 min. mit Kristallviolett (1 %) gefärbt.

Zur Berechnung des absoluten klonalen Wachstums wurde folgende Formel verwendet:

$$\textbf{abs. CE} = \frac{\textbf{Zellkolonien pro Schale}}{\textbf{eingesetzte Zellzahl}}$$

Das relative klonale Wachstum wurde folgendermaßen ermittelt:

$$\textbf{rel. CE} = \frac{\textbf{Zellkolonien pro Schale der behandelten Kultur}}{\textbf{Zellkolonien pro Schale der Kontrollkultur}}$$

Zur Auswertung wurden nur Versuche herangezogen, deren Kontrolle ein absolutes klonales Wachstum von mindestens 60 % aufwies.

Die transformierten menschlichen Fibroblastenkulturen besitzen nur eine geringe absolute Klonierungseffizienz von unter 40 %, daher wurden cytotoxische Effekte über die Reduktion des Zellwachstums bestimmt. Dazu wurden $1x10^6$ Zellen in T25-Flaschen mit 5 μl Gewebemedium ausgesät und 24 h im Brutschrank inkubiert (37°C, 5 % CO_2). Anschließend wurden die Zellen wie in Kap. 2.2.1 beschrieben behandelt, mit 5 ml Gewebemedium weiter inkubiert und die Zellzahl in parallel behandelten Flaschen zu verschiedenen Zeiten nach der Behandlung bestimmt.

2.2.3 Comet Assay

Mit der Einzelzellgelelektrophorese, die auch Comet Assay genannt wird, lassen sich sehr einfach, schnell und sensitiv DNA-Schäden wie z.B. DNA-Einzelstrang- und DNA-Doppelstrangbrüche und AP-Stellen direkt auf Einzelzellniveau untersuchen. Die hier verwendete Methode wurde 1988 erstmals von Singh et al. beschrieben, 1996 wurden von Klaude et al. vereinfachende Modifikationen im methodischen Ablauf bei der Objektträgerherstellung und bei der weiteren Aufarbeitung nach der Elektrophorese vorgestellt (Abb. 5).

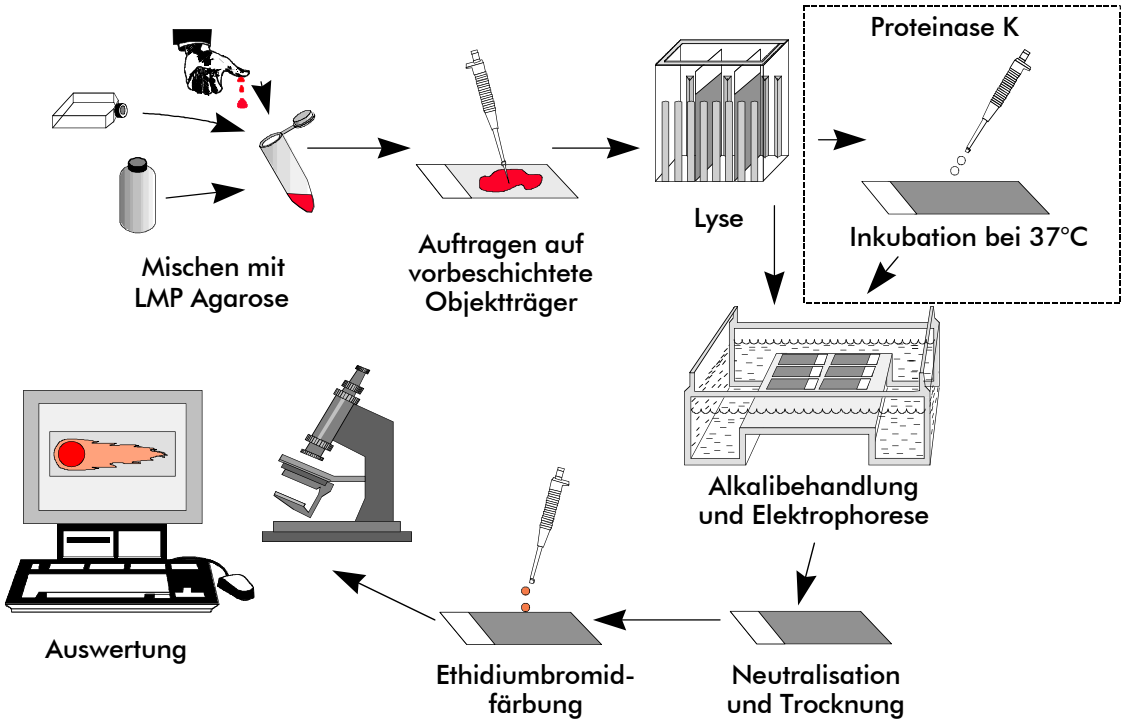


Abb. 5: Schematischer Ablauf des Comet Assays. Im gestrichelten Kasten ist die Modifikation zum indirekten Nachweis von DNA-Protein Crosslinks durch Proteinase K-Verdau (siehe Kapitel 2.2.3.6) zu sehen.

Neben der alkalischen Version (pH>13) gibt es auch Protokollvariationen, bei denen die Objektträger nach der Lyse in einem Puffer mit einem niedrigeren pH-Wert der Elektrophorese ausgesetzt werden. Bei einem pH von 12,1 werden so nur Einzel- und Doppelstrangbrüche nachgewiesen, bei pH 9 führen nur noch Doppelstrangbrüche zu einer Migration der DNA. Da in der vorliegenden Arbeit verschiedene Protokolle zur Anwendung kamen, wird im folgenden die alkalische Version des Comet Assays genau beschrieben und es werden für die anderen Protokolle nur noch die jeweiligen Modifikationen genannt.

2.2.3.1 Der Comet Assay bei pH>13

Beim alkalischen Comet Assay (pH>13) nach Singh et al. (1988) mit den methodischen Modifikationen von Klaude et al. (1996) wird eine Einzelzellsuspension (ca. 10^4 Zellen) in 37°C warmer Agarose mit einem niedrigen Schmelzpunkt (low melting point, LMP) aufgenommen und auf einen bereits mit Agarose beschichteten Objektträger gegeben. Die Zellen werden einer alkalischen Lyse unterzogen und anschließend für eine definierte Zeit einem alkalischen Puffer ausgesetzt. Während dieser Zeit trennen sich einerseits die DNA-Doppelstränge, andererseits werden alkalisensitive DNA-Veränderungen, wie z.B. AP-Stellen, in Strangbrüche umgewandelt. In der folgenden Elektrophorese beginnen die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode zu wandern, je mehr

DNA-Schäden in Form von Strangbrüchen oder alkalisensitiven Stellen eine Zelle hat, desto mehr DNA wird aus dem Zellkern austreten. Nach der Neutralisation, Trocknung und Färbung der Objektträger zeigt sich bei ungeschädigten Zellen nur der runde Zellkern, während Zellen mit Strangbrüchen eine Wanderung der DNA aus dem Zellkern in Richtung Anode zeigen (Abb. 6). Dieses Bild ähnelt dem eines Kometen, daher der Name Comet Assay.

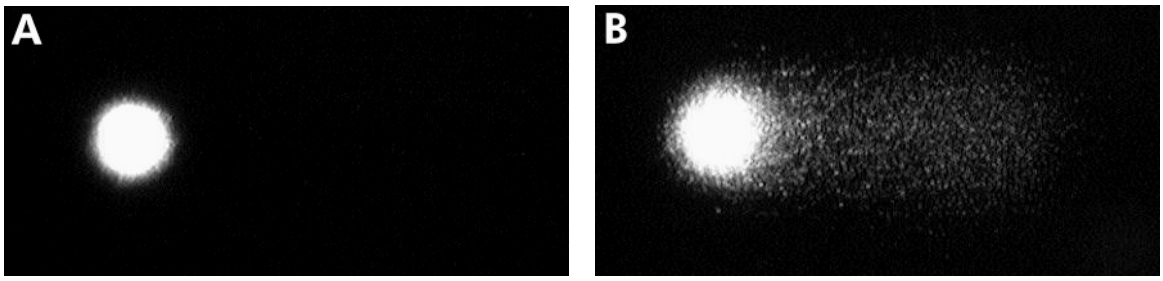


Abb. 6: Zellkerne nach der Durchführung des Comet Assays bei pH>13: ohne DNA-Migration in unbehandelten Zellen (A) und nach Einwirkung von 3 Gy γ-Strahlung (B).

2.2.3.1.1 Herstellung der Präparate

Objektträger mit Mattrand wurden auf der gegenüberliegenden Seite des Mattrandes mit einem Diamantstift eingeritzt und bis zur Hälfte des Mattrandes in 60°C warme Agarose (MEEO; 1,5 % in 1xPBS) eingetaucht. Die Unterseite wurde abgewischt und die Objektträger dann horizontal bei Raumtemperatur getrocknet. Danach lassen sich die Objektträger stapeln und bis zu ihrer Verwendung über Monate hinweg aufbewahren. Diese basale Agaroseschicht dient zur besseren Haftung und zur mechanischen Verstärkung der später aufgetragenen LMP-Agarose

Die abtrypsinierten Zellen für den Comet Assay wurden stets mit kaltem Gewebemedium verdünnt und auf Eis gehandhabt, um die DNA-Reparatur zu unterdrücken. Circa 10^4 Zellen in 10 µl Gewebemedium wurden mit 120 µl 37°C warmer LMP-Agarose gemischt, gleichmäßig auf die Basalschicht des Objektträgers pipettiert und mit einem Deckglas (24x60 mm) eingedeckt. Die Objektträger wurden für 5-10 min. in den Kühlschrank gelegt, um das Aushärten der Agarose zu beschleunigen. Danach konnte das Deckglas vorsichtig seitlich abgezogen werden und die Objektträger wurden für mindestens eine Stunde in einer lichtgeschützten Küvette mit 4°C kalter Lyselösung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.2.3.1.2 Alkalidenaturierung und Elektrophorese

Nach der Lyse wurden die Objektträger in eine horizontal ausgerichtete und mit einem Eiswasserbad gekühlte Elektrophoresekammer gelegt. Nicht benötigte Plätze wurden durch Objektträger aufgefüllt. Die Präparate wurden zur Alkalidenaturierung mit dem auf 4°C gekühlten Alkali-Elektrophoresepuffer (pH>13) überschichtet und für die in Tab. 2 angegebenen Zeiten unter Vermeidung direkter Lichtbestrahlung inkubiert. Anschließend erfolgte die Elektrophorese mit dem gleichen Puffer bei einer Spannung von 25 V (0,86 V/cm) und einer Stromstärke von 300 mA, die Zeiten sind wieder Tab. 2 zu entnehmen. Die richtige Stromstärke wurde durch Zugeben oder Abpipettieren des Puffers eingestellt. Auch während der Elektrophorese wurde direkter Lichteinfall durch Abdeckung der Elektrophoresekammer vermieden. Die in Tab. 2 angegeben Zeiten wurden so gewählt, dass unbehandelte Zellen eine geringe DNA-Migration zeigen.

Tab. 2: Empirisch ermittelte Alkali- bzw. Elektrophoresezeiten für den alkalischen Comet Assay bei pH>13.

Zelllinie	Alkalidenaturierung [min.]	Elektrophorese [min.]
V79	25	25
MRC5CV1	25	25
GM06914	25	25
XP12ROSV	25	25
L5178Y	20	20

2.2.3.1.3 Neutralisierung und Anfärbung der DNA

Nach der Elektrophorese wurden die Präparate aus der Kammer genommen, auf horizontale Färbebänke gelegt und dreimal für jeweils 5 min. mit Neutralisationspuffer überschichtet. Danach wurden die Objektträger kurz in eine Küvette mit aqua dest. getaucht, um Salzreste des Neutralisationspuffers zu entfernen und dann für 5 min. in 100 %igem Ethanol dehydriert. Anschließend wurden die Präparate auf der Rückseite abgewischt und vertikal bei Raumtemperatur getrocknet. Die Trocknung ermöglicht es die Präparate über einen längeren Zeitraum aufzubewahren. Direkt vor der Auswertung wurde 50 µl Ethidiumbromidfärbelösung auf die Objektträger pipettiert, mit einem Deckglas eingedeckt und diese in einer feuchten, dunklen Kammer aufbewahrt.

2.2.3.1.4 Mikroskopie und Auswertung

Zur Auswertung wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit einem Anregungsfilter bei 515-560 nm und einem Sperrfilter bei 590 nm eingesetzt. Mit Hilfe eines PC-gestützten Bildanalysesystems, das über eine CCD-Kamera und eine Digitalisierkarte an das Mikroskop angeschlossen war, konnten verschiedene Parameter der DNA-Migration bestimmt werden. In dieser Arbeit wurde das Tailmoment als Maß für die DNA-Wanderung bzw. DNA-Schädigung verwendet. Es berechnet sich aus dem Produkt der relativen Fluoreszenzintensität des Kometenschweifes gegenüber dem Kometenkopf und der auf den Schwerpunkt des Schweifes korrigierten Wanderungslänge. Durch die Wahl des Schwerpunkts wird auch eine unterschiedliche Verteilung der gewanderten DNA im Schweif berücksichtigt. Pro Objektträger wurden 50 zufällig ausgewählte Zellen gemessen, dabei wurden jedoch die Randbereiche des Objektträgers ausgespart, da sich hier erfahrungsgemäß Zellen mit unspezifischer DNA-Migration befinden. Von den 50 gemessenen Zellen wurde der Mittelwert des Tailmoments als Maß für die Schädigung der behandelten Kultur herangezogen.

Da die zuerst verwendete Softwareversion (V1.01) des Comet Assay II Systems Probleme mit der richtigen Detektion der Kometenkopfmittelpunktes hatte, wurden die Messungen für V79, MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV mit einem 20x Objektiv durchgeführt. Damit traten die beschriebenen Probleme nicht mehr auf, jedoch wurde der Kometenschweif nicht ganz so sensitiv erfasst. Die nachfolgende Version 1.02 ermöglichte eine manuelle Korrektur des Kopfmittelpunktes, die dann auch für jede gemessene Zelle genutzt wurde. Um die Ergebnisse jedoch direkt vergleichen zu können, wurde weiterhin mit dem 20x Objektiv gemessen. Die Versuche mit den veränderten pH-Werten und die Messungen der L5178Y-Zellen wurden dagegen immer mit dem 40x Objektiv durchgeführt, da zum Zeitpunkt der ersten Messungen bereits die Version 1.02 installiert war.

2.2.3.2 Der Comet Assay bei pH 12,1

Bei dem Protokoll nach Miyamae et al. (1997) beruht die DNA-Migration vor allem auf DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen. Durch den niedrigeren pH-Wert des Alkali- bzw. Elektrophoresepuffers werden alkalisensitive Stellen nicht in Strangbrüche umgewandelt und bewirken somit keine Zunahme der DNA-Migration. Die einzigen Modifikationen im Vergleich zum Comet Assay Protokoll bei pH>13 sind die Verwendung eines Alkali-Elektrophoresepuffers (pH>13), der mit 37 %iger HCl auf pH 12,1 titriert wurde,

und Alkali- bzw. Elektrophoresezeiten von 20 min. Die Elektrophorese (25 V, 300 mA) wurde ebenfalls bei 4°C im Eiswasserbad durchgeführt.

2.2.3.3 Der Comet Assay bei pH 12,7

Dieses Protokoll wurde von Klaude et al. (1996) zum alleinigen Nachweis von DNA-Strangbrüchen beschrieben. Die Zellen wurden in 120 µl 0,75%iger LMP-Agarose aufgenommen, auf vorbeschichtete Objektträger aufgetragen und wie oben beschrieben lysiert. Die Behandlung mit dem Alkalipuffer bei pH 12,7 erfolgte für 20 min. in einer lichtgeschützten Küvette bei 4°C im Eiswasserbad. Anschließend wurden die Objektträger in die Elektrophoresekammer gelegt und mit dem Elektrophoresepuffer bei pH 12,7 (4°C) überschichtet und die Elektrophorese im Eiswasserbad bei 24 V (0,8 V/cm) und 30 mA für 15 min. durchgeführt. Die anschließende Neutralisation und Trocknung der Objektträger erfolgte wie oben beschrieben. Bei diesem Protokoll kommt es für bestrahlte Zellen zu einer deutlicheren Trennung zwischen dem ursprünglichen Zellkern und der gewanderten DNA (Abb. 7).

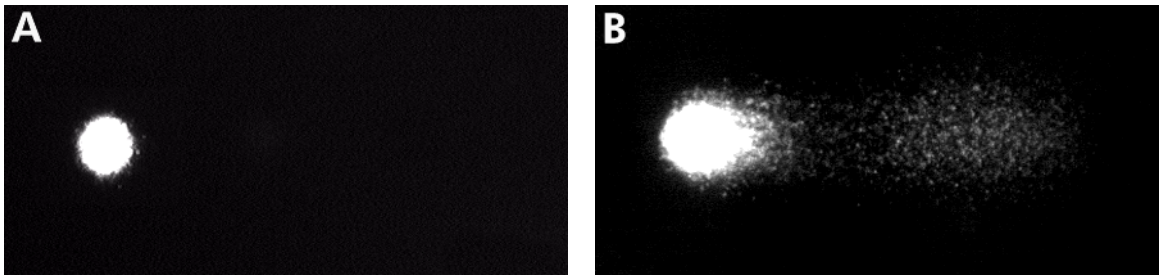


Abb. 7: Zellkerne nach der Durchführung des Comet Assays bei pH 12,7: ohne DNA-Migration in unbehandelten Zellen (A) und nach Einwirkung von 5 Gy γ-Strahlung (B).

2.2.3.4 Der Comet Assay bei pH 9

Dieses „neutrale" Comet Assay Protokoll wurde 1997 von Singh und Stephens vorgestellt. Sie erreichten damit eine sehr gut reproduzierbare Sensitivität beim Nachweis von Doppelstrangbrüchen. Der Unterschied im Vergleich zur Methode bei pH>13 ist die Verwendung eines Tris-Acetat-Puffers mit pH 9. Die Objektträger wurden nach der Lyse für 20 min. in diesem Puffer (4°C) äquilibriert und anschließend wurde im gleichen Puffer die Elektrophorese für 60 min. bei 12 V (0,41 V/cm) und 50 mA durchgeführt. Auch hier erfolgte die Elektrophorese im Eiswasserbad. Aufgrund des niedrigeren pH-Wertes und der unterschiedlichen Elektrophoresebedingungen zeigt sich nach Bestrahlung der Zellen eine kompaktere Form der Kometen (Abb. 8).

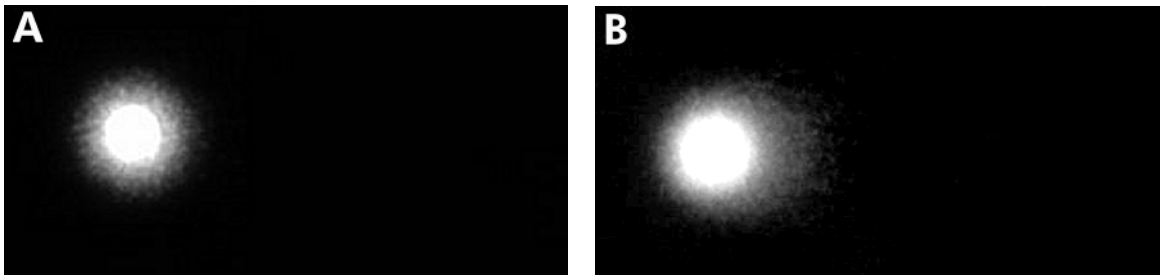


Abb. 8: Zellkerne nach der Durchführung des Comet Assays bei pH 9: ohne DNA-Migration in unbehandelten Zellen (A) und nach Einwirkung von 3 Gy γ-Strahlung (B).

2.2.3.5 Protokoll zum Nachweis von Crosslinks

Für einige crosslinkende Substanzen wurde bereits eine hemmende Wirkung auf die DNA-Migration im Comet Assay beschrieben (Miyamae et al., 1997; Olive und Banáth, 1995). Zum Nachweis der Verminderung von DNA-Migration im Comet Assay muss in allen untersuchten Zellen eine reproduzierbare DNA-Migration induziert werden. Dies kann entweder durch Erhöhung der Alkalizeiten (Tice et al., 1997), durch Ko-Inkubation mit einer Substanz (z.B. Methylmethansulfonat) die Strangbrüche induziert (Pfuhler und Wolf, 1996), oder durch Bestrahlung der Zellen (Vijayalaxmi et al., 1992) erfolgen.

Aufgrund der einfachen Durchführbarkeit, der fehlenden möglichen Interaktion der strangbruchinduzierenden Substanz mit der zu testenden Substanz und der Homogenität und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse wurde die DNA-Migration in der vorliegenden Arbeit durch γ-Strahlung induziert. Dazu wurden nach der Behandlung mit einer cross-linkenden Substanz pro Kultur ca. $5x10^5$ Zellen in 500 µl kaltem Gewebemedium mit γ-Strahlung bestrahlt, 10 µl davon mit 120 µl LMP-Agarose gemischt und auf einen vorbeschichteten Objektträger aufgetragen. Die weitere Durchführung erfolgte wie oben beschrieben. Die verwendeten Bestrahlungsdosen sind abhängig vom anschließend verwendeten Comet Assay Protokoll und sind daher bei den Ergebnissen erwähnt.

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde das relative Tailmoment verwendet. Dazu wurde das Tailmoment der behandelten und bestrahlten Kultur in Relation zum Tailmoment der bestrahlten Kontrolle gesetzt:

$$\textbf{Relatives Tailmoment} = \frac{\textbf{Tailmoment der behandelten Kultur}}{\textbf{Tailmoment der Kontrolle}}$$

2.2.3.6 Proteinase K-Verdau

Der migrationshemmende Effekt von DNA-Protein Crosslinks (DPC) kann indirekt durch Inkubation der Objektträger nach der Lyse mit Proteinase K nachgewiesen werden (Abb. 5, gestrichelter Kasten). Durch die Inkubation werden die kovalent gebundenen Proteine verdaut und behindern damit nicht mehr die DNA-Migration. Eine gesteigerte Migration im Vergleich zu einem Objektträger, der nur mit dem Proteinase K-Puffer behandelt wurde, gibt damit einen Hinweis auf DPC. Zusätzlich ermöglicht diese Behandlung auch eine qualitative Unterscheidung der migrationsreduzierenden Effekte: DNA-DNA Crosslinks werden durch Proteinase K nicht verdaut, somit bleibt der migrationsreduzierende Effekt nach der Behandlung erhalten.

Die Objektträger wurden nach der Lyse horizontal auf Färbebänke gelegt und dreimal je 5 min. mit Proteinase K-Puffer überschichtet. Danach wurde 100 µl Proteinase K (1 mg/ml in Proteinase K-Puffer) auf die Objektträger pipettiert und ein Deckglas (24x60 mm) mit Agarosefüßchen aufgelegt. Dazu wurde zuvor in die vier Ecken des Deckglases je 6 µl 0,75 %ige Agarose (MEEO) pipettiert. Die Objektträger wurden für 2 h horizontal auf den Färbebänken in einer feuchten, dunklen Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser vorsichtig seitlich abgezogen und die Präparate wie oben beschrieben weiterbehandelt. Als Kontrolle dienten Objektträger, die nur mit Proteinase K-Puffer behandelt wurden.

2.2.4 K-SDS Assay zum Nachweis von DNA-Protein Crosslinks

Dieser biochemische Nachweis von DPC wurde 1992 von Zhitkovich und Costa erstmals beschrieben. Bei diesem Assay werden Zellen in SDS lysiert und die vorhandene DNA durch mechanische Scherkräfte in kleinere Fragmente gespalten. SDS bindet an Zellproteine und damit auch an DNA-Protein Komplexe. Durch Zugabe von Kaliumionen fallen die Proteine beim Abkühlen des Ansatzes aus und lassen sich abzentrifugieren. Spontane bzw. durch Mutageneinwirkung induzierte DPC bewirken, dass die kovalent an die Proteine gebundenen DNA-Fragmente zusammen mit den Proteinen ausfallen und sich im Pellet wiederfinden. Die Menge der DNA im Pellet im Vergleich zur Menge der gesamten DNA ist dabei ein Maß für die Menge der in den Zellen vorhandenen DPC. Durch vorherige Inkorporation von [^{3}H]-Thymidin in die DNA lässt sich deren Menge einfach über die Radioaktivität im Pellet bzw. im Gesamtansatz ermitteln. Eine schematische Übersicht dieses Tests ist in Abb. 9 gezeigt.

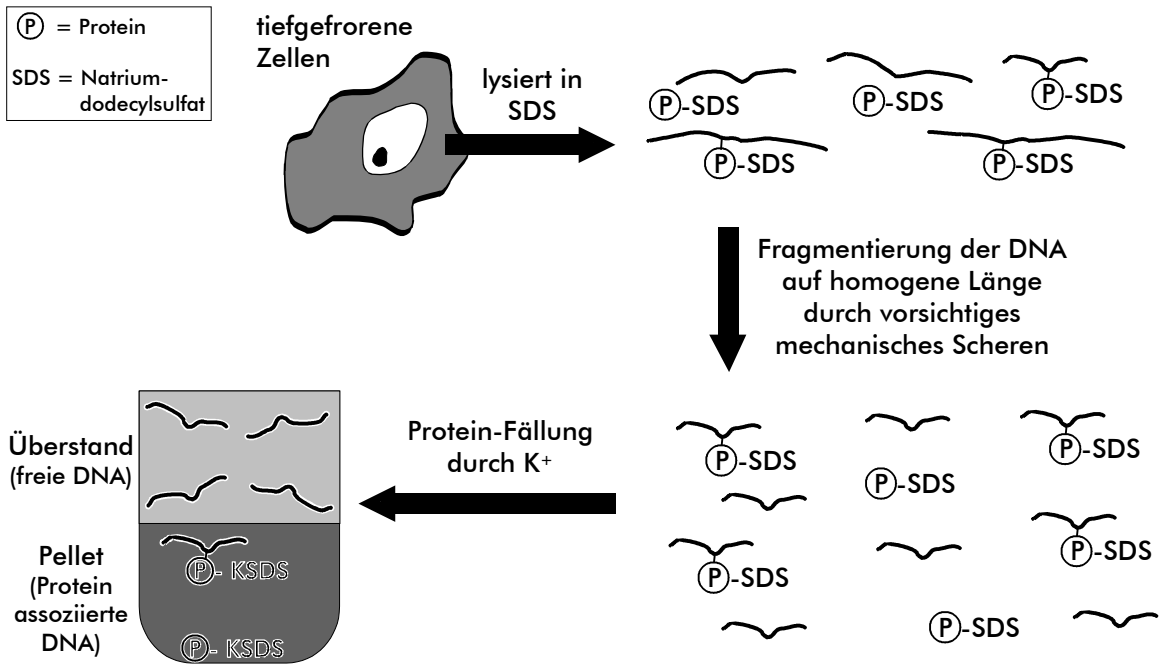


Abb. 9: Schematische Übersicht des K-SDS Assays zum biochemischen Nachweis von DPC. Übersetzt aus dem Englischen aus Costa et al. (1993).

Pro Konzentration wurden $1x10^6$ Zellen in T25-Flaschen mit 5 ml Gewebemedium ausgesät, 2,5 μCi [^{3}H]-Thymidin (spez. Aktivität: 6,7 Ci/mmol) zugegeben und 24 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und weitere 2 h in 5 ml Gewebemedium bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden danach wie in Kap. 2.2.1 angegeben behandelt. Die folgenden Schritte wurden alle unter Eiskühlung durchgeführt. Nach der Behandlung wurden die Zellen abtrypsiniert, zweimal mit kaltem 1x PBS gewaschen und in 500 μl 1x PBS resuspendiert. 100 μl dieser Zellsuspension (ca. $5x10^5$ Zellen) wurden mit 500 μl Lysepuffer versetzt, 5 s gevortext und über Nacht bei –70°C tiefgefroren. Weitere 100 μl der Zellsuspension wurden ebenfalls mit 500 μl Lysepuffer versetzt, 5 s gevortext und in 10 ml Szintillator gegeben und die Radioaktivität im Szintillation Counter (Messzeit 5 min.) gemessen (=Counts in der Gesamt-DNA [dpm]).

Die tiefgefrorenen Proben wurden bei 65°C 5 min. lang aufgetaut und zum Scheren der DNA achtmal mit hohem Druck durch eine Spritze mit einer 21G-Nadel gepresst, die Bildung von Schaum wurde jedoch vermieden. Nach Zugabe von 500 μl Fällungspuffer wurden die Proben 5 s gevortext und 10 min. auf 65°C erhitzt. Danach wurden sie „über Kopf" gemischt und 5 min. in einen Aluminiumblock auf Eis gestellt. Nach 2 min. wurden die Proben nochmals „über Kopf" gemischt. Das K-SDS-Protein Präzipitat wurde abzentrifugiert (5 min., 6000 g, 4°C) und auf Eis aufbewahrt, damit das Pellet stabil bleibt.

Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet in 1 ml Fällungspuffer aufgenommen und die Proben nach 1 min. Inkubation bei 65°C für 5 s gevortext. Anschließend wurden die Proben wieder für 10 min. bei 65°C inkubiert. Die Inkubationen bei 65°C und auf Eis, sowie das Abzentrifugieren, Abnehmen des Überstandes und Resuspendieren in Fällungspuffer wurden noch zweimal zum Auswaschen von unspezifisch mitgefällter DNA wiederholt. Danach wurde das Pellet in 500 µl H_2O bei 65°C für 5 min. gelöst, mit 10 ml Szintillator versetzt und im Szintillation Counter (Messzeit 5 min.) gemessen (=Counts im Pellet [dpm]).

Die Menge an DPC wird nun über den Prozentanteil der SDS-fällbaren DNA berechnet:

$$\%\ \text{SDS fällbare DNA} = \frac{\text{Counts im Pellet [dpm]}}{\text{Counts in der Gesamt - DNA [dpm]}}$$

Berechnung des DPC-Koeffizienten:

$$\text{DPC - Koeffizient} = \frac{\%\ \text{SDS fällbare DNA}_{\text{Behandlung}}}{\%\ \text{SDS fällbare DNA}_{\text{Kontrolle}}}$$

2.2.5 Chromosomenpräparation

Die Zellen wurden abtrypsiniert, abzentrifugiert (1000 rpm, 10 min.), der Überstand bis auf einen Rest von ca. 500 µl abgesaugt, das Pellet durch Schütteln resuspendiert und ca. 5 ml 37°C warme hypotone KCl-Lösung (0,4 %) unter ständigem Schütteln zugetropft. Nach 15 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben abzentrifugiert (1000 rpm, 10 min.) und der Überstand wurde wieder bis auf einen Rest von ca. 500 µl abgesaugt. Das Pellet wurde durch Schütteln resuspendiert und ca. 5 ml 4°C kalte Fixierungslösung (Methanol:Essigsäure = 3:1) unter Schütteln zugetropft. Nach 15 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Fixierungsschritt noch dreimal wiederholt. Die letzte Inkubation erfolgte über Nacht im Kühlschrank (4°C). Die Zellsuspension wurde auf gereinigte, kalte und nasse Glasobjektträger aufgetropft. Zur Reinigung wurden die Objektträger vorher für zwei Tage in 2 N HNO_3 aufbewahrt und 15-20 min. unter fließendem demin. Wasser gewaschen. Die Objektträger mit den Chromosomenpräparationen wurden über Nacht bei 37°C getrocknet.

Folgende Modifikationen wurden für die Präparation der Chromosomen bei L5178Y-Zellen angewendet: Die Zellen wurden für 30 min. in 0,4 % hypotoner KCl-Lösung bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierung erfolgte ebenfalls viermal für 15 min., jedoch mit einer anderen Zusammensetzung der Fixierungslösung (Methanol:Essigsäure = 2:1).

2.2.6 Schwesterchromatidaustausch-Test

Die reziproken Austausche zwischen den DNA-Molekülen eines replizierenden Chromosoms treten sowohl spontan, als auch mutagen-induziert auf. Sie sind ein empfindlicher Indikator für eine genotoxische Wirkung einer Substanz. Die Vorteile des SCE-Tests liegen vor allem in seiner Empfindlichkeit, Schnelligkeit und eindeutigen Auswertbarkeit. Er ist wenig störanfällig und gut reproduzierbar (Latt et al., 1981; Swierenga et al., 1991).

Es wurden pro Konzentration $1x10^6$ Zellen in T25-Flaschen mit 5 ml Gewebemedium ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Kap. 2.2.1 beschrieben behandelt, einmal mit HBSS gespült und mit 5 ml Gewebemedium versetzt. Es wurde 100 µl BrdUrd-Stammlösung zugegeben und die Zellen weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Zwei Stunden vor dem Ende der Inkubation wurde 100 µl Colcemid zur Anreicherung von Mitosen zugegeben. Die Zellen wurden abtrypsiniert und die Chromosomen wie in Kap. 2.2.5 beschrieben präpariert. Zur Unterscheidung der unifilar bzw. bifilar mit BrdUrd substituierten Chromatiden wurde die Acridinorange-Färbung angewandt. Dazu wurden die Objektträger für 1 min. in die Acridinorange-Färbelösung getaucht, anschließend für 2 min. in 1x PBS gewaschen und mit einem Deckglas (24x60 mm) eingedeckt. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung (Anregungsfilter: BP 450-490 nm; Sperrfilter: LP 520 nm). Pro Konzentration wurden 20 Metaphasen auf die Anzahl der SCE pro Metaphase untersucht und der Mittelwert berechnet. Dabei wurden nur Metaphasen ausgewertet, die eine für die untersuchte Zelllinie typische Chromosomenzahl aufwiesen.

2.2.7 Mikronukleus-Test

Der Mikronukleus-Test ist eine Methode zum Nachweis von klastogenen und aneugenen Effekten von Mutagenen. Mikronuklei stammen von Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen, die während der Kernteilung nicht auf die beiden Tochterkerne verteilt werden (Fenech et al., 1999; von der Hude et al., 2000).

Es wurden pro Konzentration $3x10^5$ Zellen in T25-Flaschen mit 5 ml Gewebemedium angesetzt und 24 h bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden wie in Kap. 2.2.1 angegeben

behandelt, anschließend mit HBSS gewaschen und mit 5 ml Gewebemedium bei 37°C inkubiert. Die Inkubationsdauer wurde so gewählt, dass die meisten Zellen eine Zellteilung durchlaufen hatten. Sie betrug für V79-Zellen 18 h, für MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV wurde 48 h gewählt. Die abtrypsinierten Zellen wurden abzentrifugiert (5 min., 1000 rpm), der Überstand bis ca. 5 mm über dem Zellpellet abgesaugt und die Zellen durch Schütteln resuspendiert. Unter leichtem Schütteln wurde ca. 5 ml 37°C warme hypotone KCl-Lösung (0,4 %) zugetropft und sofort abzentrifugiert (10 min., 800 rpm). Der Überstand wurde wieder bis 5 mm über dem Pellet abgesaugt und das Pellet durch Schütteln resuspendiert. Anschließend wurde ca. 5 ml 4°C kalte Fixierungslösung (Methanol:Essigsäure = 3:1) unter leichtem Schütteln zugetropft und bei Raumtemperatur 15 min. inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10 min., 800 rpm) und die Fixierung wie oben beschrieben noch zweimal wiederholt. Die Zellsuspension wurde dann auf trockene Objektträger aufgetragen und mit Hilfe einer Heizplatte so getrocknet, dass das Cytoplasma gut gespreitet war und immer noch einen deutlich erkennbaren, scharfen Rand aufwies. Zur vollständigen Trocknung wurden die Objektträger über Nacht bei 37°C inkubiert. Direkt vor der Auswertung wurden sie kurz (1-3 s) in Acridinorange-Färbelösung getaucht, für 10 s in H_2O gespült, mit einem Deckglas (24x60 mm) eingedeckt und unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung ausgewertet (Anregungsfilter: BP 450-490 nm; Sperrfilter: LP 520 nm). Das Cytoplasma erscheint dabei rot-orange, während die DNA im Zellkern und in den Mikronuklei gelblich gefärbt ist.

Pro Konzentration wurden mindestens 1000 Zellen ausgewertet und es wurde die Häufigkeit von Zellen mit Mikronuklei als Mikronukleusfrequenz bestimmt. Zusätzlich wurde auch die Anzahl der Mikronuklei pro Zelle protokolliert. Die verwendeten Kriterien stammen aus Fenech (1993):

- Mikronuklei sind morphologisch identisch zum Hauptkern,
- der Durchmesser ist kleiner als 1/3 des Hauptkerns,
- sie sind nicht lichtbrechend,
- es gibt keine nukleoplasmatischen Brücken zwischen Mikronukleus und Hauptkern.

2.2.8 V79-HPRT-Mutagenitätstest

Mit Hilfe dieses Testsystems werden vererbbare Mutationen im X-chromosomalen HPRT-Gen in V79-Zellen nachgewiesen, die zu einem Ausfall der Funktion führen. Das System ist sehr gut charakterisiert, das beobachtete Mutationsspektrum umfasst u.a.

Hunderte verschiedener Punktmutationen, aber auch vollständige Deletionen, die über das HPRT-Gen hinausreichen können (Glatt, 1994). Sehr große Deletionen, die weit über den Genbereich des HPRT-Gens hinausgehen, werden jedoch aufgrund ihrer möglichen cytotoxischen Wirkung nicht erfasst (Wu et al., 1998).

Es wurden pro Konzentration $2x10^6$ Zellen in T75-Flaschen mit 10 ml Gewebemedium angesetzt und 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie in Kap. 2.2.1 beschrieben behandelt, einmal mit HBSS gespült und abtrypsiniert. Nach der Zentrifugation (1000 rpm, 10 min.) wurden die Zellen in frischem Medium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die Bestimmung des klonalen Wachstums direkt nach der Behandlung (CE 1) erfolgte wie in Kap. 2.2.2 beschrieben. Die restlichen Zellen wurden zur Expression des HPRT-defizienten Phänotyps in einer T185-Flasche mit 20 ml Gewebemedium für 7 Tage inkubiert. Abweichungen von dieser Inkubationszeit sind bei den Ergebnissen angegeben. Wenn während dieser Zeit die Wachstumsfläche vollständig bedeckt war, wurden die Zellen in frische T185-Flaschen überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass eine Zellzahl von insgesamt $2x10^6$ Zellen nicht unterschritten wurde, um ein korrektes Verhältnis zwischen Mutanten und Nicht-Mutanten zu gewährleisten. Nach der Expressionszeit wurden zur Selektion von HPRT-Mutanten je $2x10^5$ Zellen in 5 Zellkulturschalen (∅ 100 mm) mit je 7 ml 6-TG-Medium ausgesät. Diese Schalen wurden im CO_2-Brutschrank (37°C, 5 %) für 7 Tage inkubiert und anschließend wie in Kap. 2.2.2 beschrieben fixiert und gefärbt. Die Bestimmung des klonalen Wachstums zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (CE 2) erfolgte ebenfalls wie in Kap. 2.2.2 beschrieben.

Die Mutantenfrequenz (MF) ist als Anzahl der gebildeten Kolonien unter selektiven Bedingungen pro 10^6 überlebende Zellen definiert und wurde nach folgender Formel berechnet:

$$MF = \frac{\text{Kolonien}_{Sel} \cdot 10^6}{2x10^5 \cdot \text{abs. CE 2}}$$

Kolonien_{Sel} = Anzahl der Kolonien pro Schale unter selektiven Bedingungen

$2x10^5$ = Anzahl der ausgesäten Zellen pro Schale

abs. CE 2 = absolute Klonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Selektion

Vor den Experimenten wurden die V79-Zellen von spontanen HPRT-Mutanten durch Inkubation mit HAT-Medium und anschließender eintägiger Inkubation mit HAT-Medium gereinigt (Nestmann et al., 1991). Als Positivkontrolle diente 5 mM EMS.

2.2.9 Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay

Der Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay (MLA) findet aufgrund seiner Möglichkeit neben Genmutationen auch Chromosomenmutationen nachzuweisen, eine immer weitere Verbreitung als Screeningtest (Cole et al., 1999). In diesem Testsystem werden Mutationen nachgewiesen, die zu einem Funktionsausfall im autosomalen TK-Gen in L5178Y-Zellen führen.

Pro Konzentration wurden $10x10^6$ Zellen in 20 ml RMPI-5 aufgenommen und in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen mit 200 µl der zu testenden Konzentration versetzt. Die Behandlung erfolgte mit geschlossenem Deckel bei 37°C im Brutschrank. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (1000 rpm, 10 min.), zweimal mit RPMI-5 gewaschen, in 10 ml RPMI-10 resuspendiert und gezählt. Es wurden $6x10^6$ Zellen in 30 ml RPMI-10 angesetzt. Zur Bestimmung des klonalen Wachstums direkt nach der Mutagenbehandlung (CE 1) wurden 100 µl aus diesem Ansatz in 9,9 ml RPMI-5 pipettiert, gevortext und daraus 200 µl in 50 ml RPMI-20 gegeben und ebenfalls gevortext. Pro Konzentration wurden zwei 96-well Platten mit 200 µl pro well (=1,6 Zellen pro well) angesetzt und für 8 Tage im CO_2-Brutschrank inkubiert und anschließend die Zahl der wells ohne Zellkolonien ermittelt. Die Zellsuspension mit den $6x10^6$ Zellen wurde in T75-Flaschen einen Tag im CO_2-Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Zellmorphologie auf toxische Effekte beurteilt, die Zellen abzentrifugiert und $6x10^6$ Zellen in 30 ml RPMI-10 in T75-Flaschen im CO_2-Brutschrank weiterkultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert und $1x10^6$ Zellen in 100 ml RPMI-20 aufgenommen und homogen gemischt. Zur Bestimmung des klonalen Wachstums zum Zeitpunkt der Mutantenselektion (CE 2) wurden 500 µl aus diesem Ansatz in 9,5 ml RPMI-5 pipettiert, gevortext und 800 µl in 50 ml RPMI-20 gegeben und gevortext. Daraus wurden je Konzentration zwei 96-well Platten mit 200 µl pro well angesetzt, für 8 Tage im CO_2-Brutschrank inkubiert und dann die Zahl der wells ohne Zellkolonie bestimmt. Zur Mutantenselektion wurden zu den 99,5 ml Zellsuspension noch 1 ml TFT-Stammlösung gegeben, gut durchmischt und pro Konzentration vier 96-well Platten mit 200 µl pro well (=2000 Zellen pro well) angesetzt. Diese wurden für 11 Tage im CO_2-Brutschrank inkubiert und anschließend folgende Parameter bestimmt:

- Anzahl der wells ohne Kolonien zur Bestimmung der Gesamt-Mutantenfrequenz,
- Anzahl der wells ohne große Kolonien (≥ 1/3 des well-Durchmessers) zur Bestimmung der Mutantenfrequenz für große Kolonien,
- Anzahl der wells ohne kleine Kolonien (< 1/3 des well-Durchmessers) zur Bestimmung der Mutantenfrequenz für kleine Kolonien.

Bilder mit Beispielen von wells mit großen bzw. kleinen Kolonien sind in Abb. 3 gezeigt. Zur Berechnung der Klonierungseffizienzen wurden folgende Formeln verwendet:

$$\text{abs. CE} = \frac{-\ln\left(\frac{EW}{TW}\right)}{1{,}6}$$

EW = Anzahl der leeren wells pro 96-well Platte

TW = Anzahl der wells pro Platte (=96)

1,6 = theoretisch ausgesäte Anzahl der Zellen pro well

$$\text{rel. CE} = \frac{\text{abs. CE}_{\text{Behandlung}}}{\text{abs. CE}_{\text{Kontrolle}}}$$

Die Mutantenfrequenz (MF) gibt die Anzahl der Zellen mit einem TFT-resistenten Phänotyp pro 10^6 überlebende Zellen wieder:

$$MF = \frac{\frac{-\ln\left(\frac{EW}{TW}\right)}{2000} \cdot 10^6}{\text{abs. CE 2}}$$

EW = Anzahl der wells ohne Kolonien pro 96-well Platte

TW = Anzahl der wells pro Platte (=96)

abs. CE 2 = absolute Klonierungseffizienz zum Zeitpunkt der Selektion

2000 = theoretisch ausgesäte Anzahl der Zellen pro well

Zur Berechnung der Mutantenfrequenz für kleine bzw. große Kolonien wurde die Anzahl der wells ohne kleine bzw. große Kolonien als EW in die Formel eingesetzt.

Zur Eliminierung von spontanen TK-Mutanten wurden die L5178Y-Zellen für 24 h in THMG-Medium und anschließend für 3 Tage in THG-Medium inkubiert (Honma et al., 1999). Danach wurden die Zellen in RPMI-10 für einige Tage kultiviert und abschließend

ca. 1,8x10^6 Zellen pro Ampulle in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Sechs Tage vor den jeweiligen Experimenten wurden die Zellen aufgetaut und im CO_2-Brutschrank (37°C, 5 %) in RPMI-10 kultiviert. Als Positivkontrolle für die Experimente mit Formaldehyd diente 0,2 µg/ml 4-NQO, für die Experimente mit Kaliumchromat wurde 10 µg/ml MMS verwendet.

2.2.10 Molekulare Analyse von TFT-resistenten Kolonien

Für die molekulare Analyse von spontan entstandenen TFT-resistenten Zellen wurden L5178Y-Kulturen aufgetaut und 6 Tage in RPMI-10 kultiviert. Anschließend wurden pro aufgetauter Kultur eine 96-well Platte mit je 2000 Zellen pro well in 200 µl RPMI-20_{Sel} angesetzt und für 10 Tage im CO_2-Brutschrank inkubiert. Die 96-well Platten wurden wie oben beschrieben ausgewertet und pro 96-well Platte wurde je eine kleine und eine große Kolonie isoliert. Dazu wurden wells ausgewählt, die jeweils nur eine kleine bzw. große Kolonie enthielten. Zur Isolierung wurden das Medium und die Zellen im well mit einer Pipette durchmischt, in eine 6-well Platte mit 5 ml RPMI-20_{Sel} überführt und im CO_2-Brutschrank für 2-3 Tage inkubiert. Die isolierten Zellkolonien wurden anschließend in T25- bzw. T75-Flaschen in selektivem Medium weiter kultiviert. Bei geeigneter Zellzahl wurde DNA isoliert und es wurden Chromosomenpräparate hergestellt. Die Kolonien wurden nach folgendem Schema benannt: „Spo“ steht für eine spontan entstandene TFT-resistente Kolonie, die anschließende Nummer bezeichnet die fortlaufende Nummer der für die Gewinnung spontaner TFT-resistenter Kolonien aufgetauten L5178Y-Kultur und das „S“ bzw. „L“ am Ende benennt die Größe der Kolonie („S“ = kleine Kolonie, „L“ = große Kolonie).

Für die Gewinnung von Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten Zellen wurden L5178Y-Kulturen aufgetaut und 6 Tage in RPMI-10 kultiviert. Pro aufgetauter Stammkultur wurden unabhängig voneinander vier Parallelkulturen für 2 h mit 125 µM Formaldehyd behandelt, zweimal mit RPMI-5 gewaschen und für 2 Tage, wie in Kap. 2.2.9 genauer beschrieben, kultiviert. Anschließend wurden pro behandelter Kultur zwei 96-well Platten mit je 2000 Zellen pro well in 200 µl RPMI20_{Sel} angesetzt und für 10 Tage im CO_2-Brutschrank inkubiert. Die Isolierung der Kolonien und die Expansion der Zellen erfolgte wie bei den spontan entstandenen Kolonien. Die Benennung der Kulturen erfolgte nach folgendem Schema: „FA“ steht für eine Formaldehyd-induzierte TFT-resistente Kolonie, die Nummer bezeichnet die fortlaufende Nummer der für die Formaldehyd-Behandlung

aufgetauten L5178Y-Kultur, die Buchstaben „A“ bis „D“ kennzeichnen die unabhängig behandelten Parallelkulturen. Das „S“ bzw. „L“ am Ende benennt die Größe der Kolonie („S“ = kleine Kolonie, „L“ = große Kolonie).

2.2.10.1 Nachweis von LOH auf Chromosom 11

2.2.10.1.1 DNA-Isolierung

Es wurden $2x10^6$ Zellen abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min.) und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde mit 1 ml DNAzol versetzt und mit einer Pipette gründlich gemischt. Es wurde 500 µl kalter (-20°C) 100 %iger Ethanol zugeben und durch Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Nach 1-3 min. Inkubation bei Raumtemperatur fiel die DNA als weißer Faden aus. Die DNA wurde mit einem Plastikspatel aufgenommen und zweimal in kaltem (-20°C) 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach kurzer Trocknung bei Raumtemperatur (3-5 min.) wurde die DNA in 50 µl aqua ad injectabilis gelöst und bei 4°C gelagert.

2.2.10.1.2 PCR zur Analyse der polymorphen Marker auf Chromosom 11

Zur Analyse der polymorphen Marker auf den Chromosomen 11 wurde eine sogenannte „touchdown“-PCR durchgeführt, bei deren Durchführung die Annealing-Temperatur verringert wird. Damit wurde eine unspezifische Bindung der Primer vermieden und somit in der PCR nur die gewünschten, polymorphen DNA-Bereiche amplifiziert (Liechty et al., 1998).

Tab. 3: Zuordnung der PCR-Produkte der untersuchten polymorphen Marker zu den Chromosomen 11a und 11b.

Marker	Position auf Chr. 11 (cM)	PCR-Produktgröße von Chr. 11a	PCR-Produktgröße von Chr. 11b
D11Agl1	78,0	440 bp	523 bp
D11Mit67	57,0	134 bp	150 bp
D11Mit29	40,0	140 bp	160 bp
D11Mit21	20,0	157 bp	174 bp
D11Mit63	2,0	151 bp	163 bp

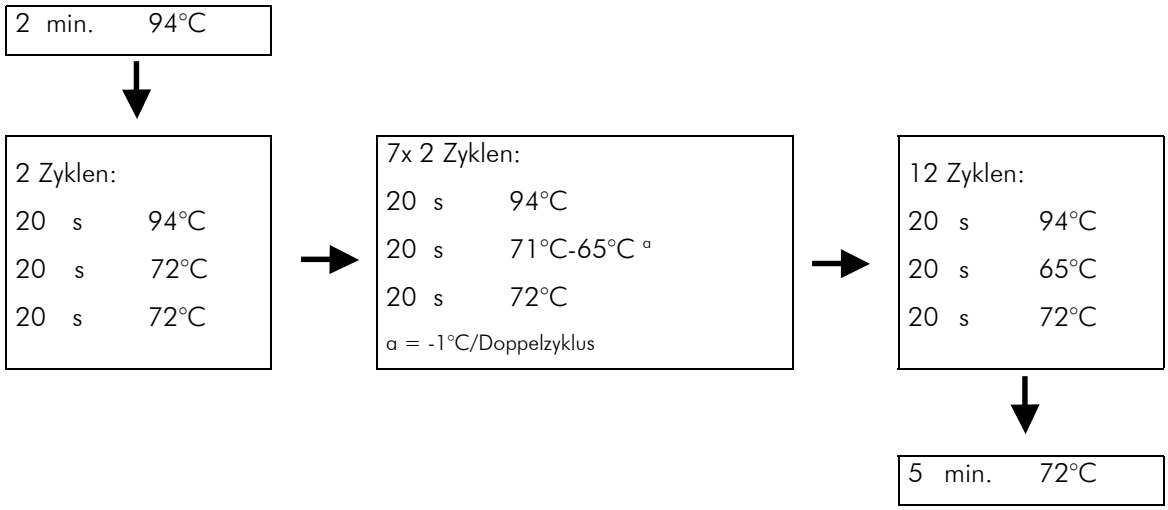
PCR-Master-Mix (Pro Reaktion 18 µl):

Konzentrationen:			Pipettierschema:		
10	mM	TrisHCl, pH 8,3	0,4	µl	0,5 M
50	mM	KCl	1,0	µl	1 M
1,5	mM	$MgCl_2$	0,3	µl	0,1 M
0,025	U/µl	Taq DNA Polymerase	0,1	µl	5000 U/ml (Pharmacia)
200	µM	dNTPs (jeweils)	1,6	µl	2,5 mM
			15,1	µl	aqua ad injectabilis

PCR-Reaktionsansatz zur Analyse von *D11Agl1*:

18,0	µl	PCR-Master-Mix
0,5	µl	Primer Agl2.fwd (10 pmol/µl)
0,5	µl	Primer Agl2.rev (10 pmol/µl)
0,5	µl	template-DNA

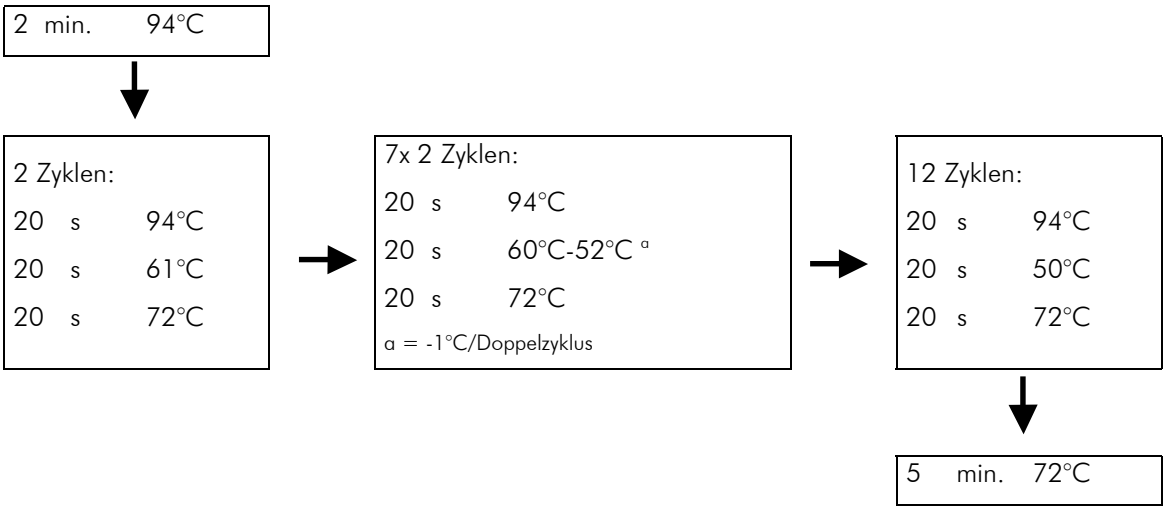
Zur Amplifikation des LOH-Markerbereiches *D11Agl1* wurde das folgende PCR-Programm verwendet:



PCR-Reaktionsansatz zur Analyse von *D11Mit67, D11Mit29, D11Mit21* bzw. *D11Mit63*:

18,0	µl	PCR-Master-Mix
0,5	µl	Primer D11MitXX.fwd (10 pmol/µl)
0,5	µl	Primer D11MitXX.rev (10 pmol/µl)
2,0	µl	template-DNA

Zur Amplifikation der LOH-Markerbereiche *D11Mit67, D11Mit29, D11Mit21* und *D11Mit63* wurde das folgende PCR-Programm verwendet:



Zur Analyse der Amplifikationsprodukte des Markers *D11Agl1* wurden nach der PCR 2 µl Bromphenolblau-Ladepuffer zu den Reaktionsansätzen gegeben, 10 µl auf ein kleines 1,5%iges Agarosegel (NEEO) aufgetragen und eine Elektrophorese (45 min., 80 V) durchgeführt. Die Amplifikationsprodukte der Marker *D11Mit67, D11Mit29, D11Mit21* und *D11Mit63* wurden nach der PCR ebenfalls mit 2 µl Bromphenolblau-Ladepuffer versetzt, 20 µl auf ein großes 2%iges Agarosegel (NEEO) aufgetragen und durch Elektrophorese (90 min., 200 V) getrennt.

2.2.10.2 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Zur Herstellung der Chromsomenpräparate wurden ca. $5x10^6$ L5178Y-Zellen in einer T25-Flasche mit 5 ml RPMI-20_{Sel} angesetzt und 24 h im CO_2-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde zur Anreicherung von Mitosen 200 µl Colcemid zugegeben und für weitere 2 h inkubiert. Die weitere Aufarbeitung ist in Kap. 2.2.5 beschrieben. Nach der Trocknung wurden die Präparate bis zur Hybridisierung bei –20°C tiefgefroren.

Vor der Hybridisierung wurden die Präparate aufgetaut und über Nacht bei 37°C getrocknet. Zur Verhinderung von unspezifischer Bindung der Sonde wurden die Präparate mit RNAse behandelt. Dazu wurde 150 µl RNAse-Lösung auf die Objektträger pipettiert, diese mit einem Deckglas (24x50 mm) eingedeckt und die Objektträger für 1 h bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Anschließend wurde das Deckglas entfernt, die Präparate erst einmal kurz und dann dreimal für je 5 min. in 2x SSC bei Raumtemperatur gespült. Es folgte eine Inkubation für 7,5 min. bei 37°C in Pepsin-Lösung. Darauf folgte ein Waschschritt, dazu wurden die Objektträger einmal kurz und zweimal für je 5 min. in 1x PBS inkubiert. Vor der Postfixierung wurden die Präparate für 5 min. in PBS/$MgCl_2$-Lösung inkubiert und dann für 15 min. in der Postfixierungslösung inkubiert. Anschließend wurde einmal kurz und dann für 5 min. in 1x PBS gespült. Die Objektträger wurden dann je 2 min. in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 70 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99 %) entwässert und bei Raumtemperatur für 1-2 h getrocknet.

Danach wurden die Präparate für 75 s in einer Küvette mit 70 % Formamid/2x SSC bei 72°C denaturiert, sofort kurz in kaltem (4°C) 2x SSC gespült und in einer Küvette mit kaltem (4°C) 70 %igem Alkohol nochmals kräftig gespült. Anschließend erfolgte eine Entwässerung über eine aufsteigende Alkoholreihe (70 %, 90 %, 95 %, 99 %, 99 %). Die Objektträger wurden dann bei Raumtemperatur für 1-2 h getrocknet.

Die verwendete Sonde wurde vor der Verwendung für 12 min. bei 72°C denaturiert und, zur Absättigung der unspezifischen Sequenzen mit der bereits enthaltenen Cot1-DNA, für 2 h bei 37°C inkubiert. Zur Hybridisierung wurden die Objektträger auf einer Heizplatte auf 37°C vorgewärmt, 10 µl Hybridisierungslösung auf die Objektträger pipettiert und unter einem Deckglas (20x20 mm) luftblasenfrei eingedeckt. Das Deckglas wurde mit Fixogum umrandet und die Präparate über Nacht auf dem Boden einer Metallkassette im 37°C Wasserbad inkubiert.

Am nächsten Tag wurde die Wasserbadtemperatur für 30 min. auf 45°C erhöht, das Fixogum mit einer Pinzette vorsichtig von den Objektträgern entfernt und die Deckgläser durch Inkubation in 45°C warmem 2x SSC entfernt. Die Präparate wurden dreimal unter Schütteln für 10 min. in 50 % Formamid/2x SSC (45°C) und anschließend dreimal unter Schütteln für 5 min. in 2x SSC (45°C) gespült. Die Objektträger wurden dann für 5 min. in 2x SSC (72°C) inkubiert und in einer Küvette mit 4x SSC/0,1 % Tween 20 gesammelt.

Zur Unterdrückung von unspezifischer Bindung der Antikörper wurden die Objektträger für 20 min. in Blocking-Lösung bei 37°C inkubiert und anschließend kurz in 4x SSC/0,1 % Tween 20 gespült.

Zum Nachweis der biotinylierten DNA-Sonde mit dem Fluorescein-Avidin-Antikörper wurde der Antikörper 1:200 mit 4x SSC/0,1 % Tween 20/1 % BSA auf eine Konzentration von 10 µg/ml verdünnt. Der Antikörper wurde „über Kopf" geschüttelt, 2 min. bei 10000 rpm zentrifugiert und bei 4°C dunkel gelagert. Auf einer Heizplatte (38°C) wurden Deckgläser (24x50 mm) vorbereitet und 150 µl Antikörper pro Deckglas aufgetragen. Das Deckglas wurde mit dem Objektträger so aufgenommen, dass sich die zu hybrisierende Seite mit dem Deckglas auf der Unterseite befindet („hängender Tropfen"). Die Präparate wurden in dieser Stellung für 30 min. in einer feuchten, dunklen Kammer bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate erst dreimal kurz und dann dreimal für je 5 min. in 4x SSC/0,1 % Tween 20 (45°C) unter ständigem Schütteln gespült.

Zur Verstärkung des Signals wurden die Präparate mit einem biotinylierten Anti-Avidin-Antikörper inkubiert. Dazu wurde der Antikörper 1:100 mit 4x SSC/0,1 % Tween 20/1 % BSA auf eine Konzentration von 5 µg/ml verdünnt. Der Antikörper wurde „über Kopf" geschüttelt, 2 min. bei 10000 rpm zentrifugiert und bei 4°C dunkel gelagert. Auf einer Heizplatte (38°C) wurden Deckgläser (24x50 mm) vorbereitet und 150 µl Antikörper pro Deckglas aufgetragen. Das Deckglas wurde wie schon oben beschrieben in der Stellung „hängender Tropfen" unter den Objektträger gesetzt. Die Präparate wurden für 45 min. in einer feuchten, dunklen Kammer bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Präparate erst dreimal kurz und dann dreimal für je 5 min. in 4x SSC/0,1 % Tween 20 (45°C) unter ständigem Schütteln gespült.

Der Nachweis des biotinylierten Anti-Avidin-Antikörpers mit dem Fluorescein-Avidin-Antikörper erfolgte wie in obigem Abschnitt beschrieben.

Anschließend wurden die Präparate für 5 min. in DAPI-Färbelösung gefärbt und kurz in zwei Küvetten mit aqua dest. gespült. Die Objektträger wurden über Nacht unter Lichtabschluss bei Raumtemperatur getrocknet und dann mit 30 µl Vectashield unter einem Deckglas (24x50 mm) eingedeckt.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software ISIS unter einem Fluoreszenz-Mikroskop mit einer DAPI- bzw. FITC-Filterkombination. Die Länge der Chromosomen wurde in der DAPI-Darstellung mit Softwareunterstützung gemessen. Als Referenz diente die Gesamtlänge der leicht zu identifizierenden zentrischen Chromosomenfusion 12/13

(Liechty et al., 1998). Um Unterschiede im Kondensationsgrad der Chromosomen auszugleichen, wurde die Länge der beiden Chromsomen 11 relativ zur Länge der Referenz berechnet. Es wurden insgesamt 20 Metaphasen pro Kolonie ausgewertet und der Mittelwert der Chromosomenlängen berechnet.

2.2.11 Statistik

Alle Versuche wurden mindestens einmal wiederholt. Bei drei oder mehr Wiederholungsversuchen wurden die Unterschiede der Mittelwerte zwischen Behandlung und Kontrollen mit Hilfe des zweiseitigen Student *t*-Tests für zwei Stichproben mit ungleicher Varianz geprüft. Die Nullhypothese wurde bei einem Signifikanzniveau von kleiner 5 % angenommen ($P < 0{,}05$). Da die Mutantenfrequenzen im Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay erst nach logarithmischer Transformierung einer Normalverteilung folgen (Irr und Snee, 1982), wurden die Mutantenfrequenzen vor der Berechnung des *t*-Tests entsprechend transformiert.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss von crosslinkenden Substanzen auf die DNA-Migration im Comet Assay

Der Comet Assay bei pH>13 ist ein sensitiver Test zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen. Um die Sensitivität des in dieser Arbeit verwendeten Protokolls zu testen, wurde die Induktion von DNA-Migration nach Bestrahlung mit γ-Strahlen untersucht. Zusätzlich wurde für die späteren Untersuchungen zum Einfluss von crosslinkenden Substanzen auf die strahleninduzierte Wanderung der DNA eine Bestrahlungsdosis festgelegt, bei der eine deutliche DNA-Migration auftritt. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 10 gezeigt. Die unbehandelte Kontrolle zeigt eine geringe DNA-Migration, die sich im Tailmoment von 0,33 wiederspiegelt. Insgesamt ist ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Tailmoments zu beobachten. Bei einer Dosis von 1 Gy tritt bereits eine deutliche Zunahme auf 1,24 auf. Als Dosis für die Untersuchungen zum Einfluss von crosslinkenden Substanzen auf die DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 wurde 3 Gy gewählt. Im Mikroskop ist bei dieser Dosis eine ausgeprägte Wanderung der DNA zu beobachten, die Struktur des Zellkerns wird, im Gegensatz zu höheren Dosen, von der Auswerte-Software noch gut erkannt. Das Tailmoment liegt hier bei 5,42.

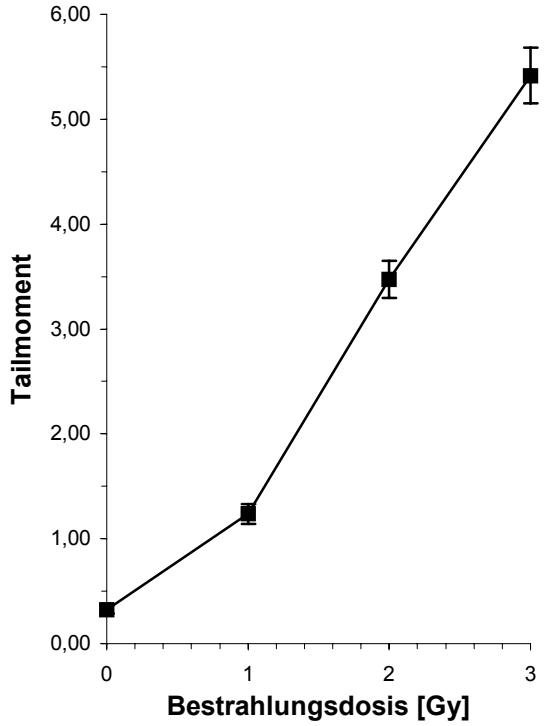


Abb. 10: Induktion von DNA-Migration im Comet Assay nach Bestrahlung von V79-Zellen mit γ-Strahlung.

3.1.1 Formaldehyd

Eine vierstündige Behandlung von V79-Zellen mit Formaldehyd, das hauptsächlich DNA-Protein Crosslinks induziert, führt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des klonalen Wachstums (Abb. 11A:▲). Ab einer Konzentration von 125 μM ist ein statistisch signifikanter ($P<0,05$) Rückgang festzustellen, bei 500 μM ist das klonale Wachstum fast vollständig unterdrückt. Im Comet Assay findet sich unter Standardtestbedingungen in diesem Konzentrationsbereich kein messbarer Einfluss auf die DNA-Migration im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 11A:■). Werden die Zellen jedoch nach der Behandlung mit 3 Gy bestrahlt und anschließend im Comet Assay analysiert, so ist ein deutlicher Einfluss der Formaldehyd-Behandlung auf die strahlungsinduzierte DNA-Migration festzustellen (Abb. 11B). Während bestrahlte Kontrollzellen eine deutliche DNA-Migration zeigen, kommt es durch die Formaldehyd-Behandlung zu einer konzentrations-abhängigen Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration. Dieser Rückgang ist ab 62,5 μM statistisch signifikant ($P<0,01$), bei 500 μM ist trotz Bestrahlung keine DNA-Migration mehr festzustellen. Der Einfluss auf die strahlungsinduzierte DNA-Migration im Comet Assay tritt bei Formaldehyd bereits bei Konzentrationen auf, die nur eine geringe cytotoxische Wirkung zeigen.

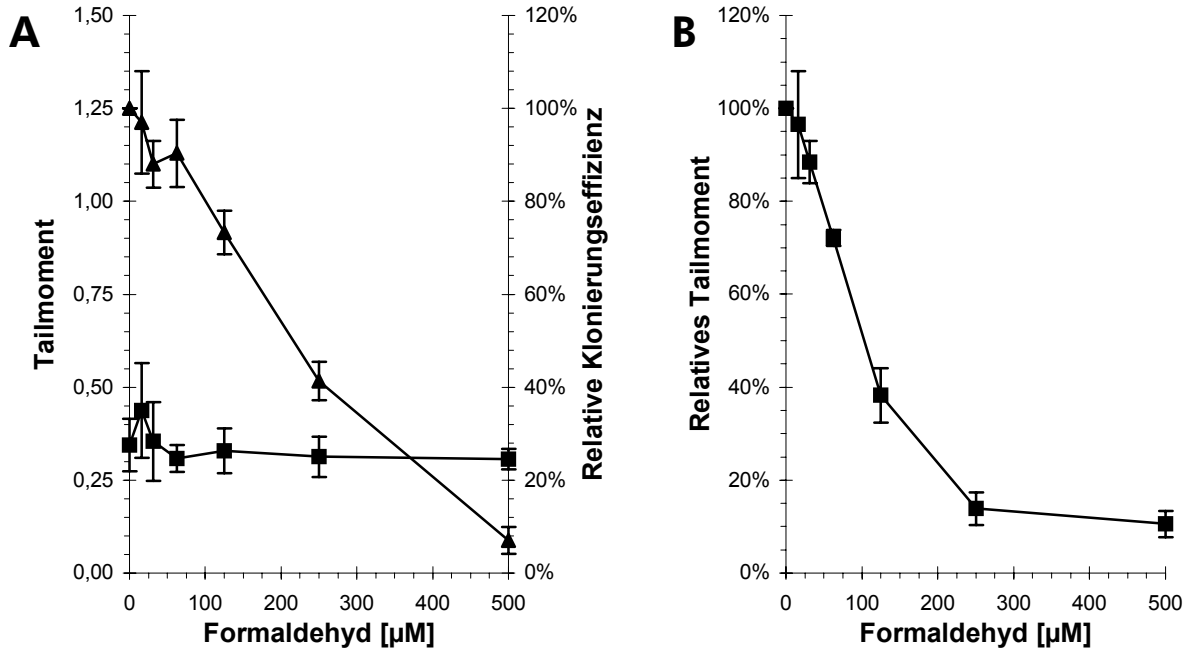


Abb. 11: DNA-Migration im Comet Assay (■) und relative Klonierungseffizienzen (▲) nach Behandlung von V79-Zellen mit Formaldehyd für 4 h (A). Der Einfluss der Formaldehyd-Behandlung auf die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay (B). (Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.1.2 Mitomycin C

Nach einer zweistündigen Behandlung von V79-Zellen mit Mitomycin C (MMC), das überwiegend DNA-DNA interstrand Crosslinks induziert, kommt es ab 5 μM zu einer statistisch signifikanten ($P<0,05$) und konzentrationsabhängigen Reduktion der relativen Klonierungseffizienz (Abb. 12A:▲). Bei 10 μM ist bereits kein klonales Wachstum mehr zu sehen. Im Standardprotokoll des Comet Assays ist bis zu einer Konzentration von 10 μM kein Einfluss der MMC-Behandlung auf die DNA-Migration feststellbar (Abb. 12A:■). Die stark cytotoxischen Konzentrationen 200 μM und 500 μM zeigen einen geringen Anstieg des Tailmoments auf 1,05 bzw. 0,84. Auch MMC zeigt eine hemmende Wirkung auf die strahlungsinduzierte DNA-Migration im Comet Assay (Abb. 12B). Im Vergleich zur Kontrolle tritt ein konzentrationsabhängiger Rückgang der Wanderung von DNA aus dem Zellkern auf. Ab einer Konzentration von 1 μM ist der Rückgang des relativen Tailmoments statistisch signifikant ($P<0,05$). Eine vollständige Aufhebung der DNA-Wanderung ist bei 500 μM zu beobachten. Im Vergleich zu Formaldehyd führt eine MMC-Behandlung erst bei höheren, stärker cytotoxischen Konzentrationen zu einer deutlichen Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration.

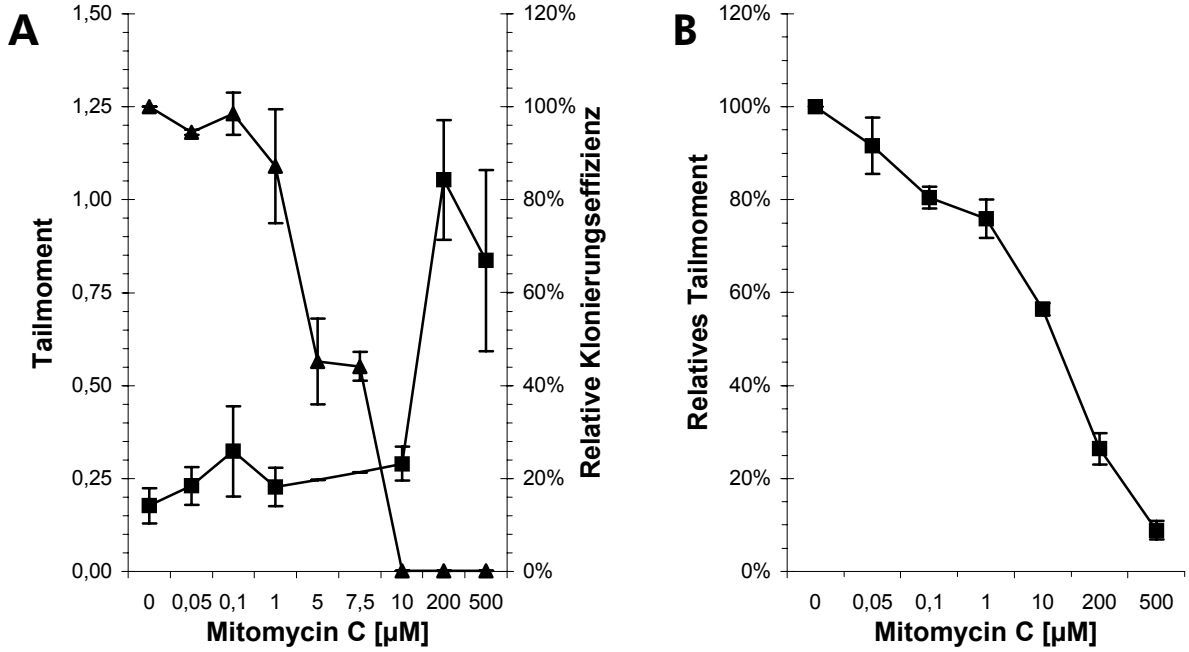


Abb. 12: DNA-Migration im Comet Assay (■) und relative Klonierungseffizienzen (▲) nach Behandlung von V79-Zellen mit Mitomycin C für 2 h (A). Der Einfluss der Mitomycin C-Behandlung auf die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay (B). (Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.1.3 cis-Platin

Eine zweistündige Behandlung von V79-Zellen mit cis-Platin, das hauptsächlich DNA-DNA intrastrand Crosslinks induziert, hat ab 20 μM eine statistisch signifikante ($P<0,05$) und konzentrationsabhängige Reduktion des klonalen Wachstums zur Folge (Abb. 13A:▲). Die relative Klonierungseffizienz liegt ab 50 μM deutlich unter 10%. Im Standardprotokoll des Comet Assays ist bei den verwendeten Konzentrationen kein Einfluss der cis-Platin-Behandlung auf die DNA-Migration feststellbar (Abb. 13A:■). Werden die Zellen nach der Behandlung mit 3 Gy bestrahlt, ist eine konzentrationsabhängige Reduktion des relativen Tailmoments feststellbar (Abb. 13B). Eine statistisch signifikante ($P<0,05$) Reduktion tritt jedoch erst bei 100 μM auf, eine Konzentration, die eine vollständige Aufhebung des klonalen Wachstums zur Folge hat. Eine komplette Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration ist bei 500 μM zu sehen. Vergleicht man die Ergebnisse für cis-Platin mit den Ergebnissen für Formaldehyd, so fällt auf, dass cis-Platin erst bei letalen Konzentrationen zu einer deutlichen Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay führt.

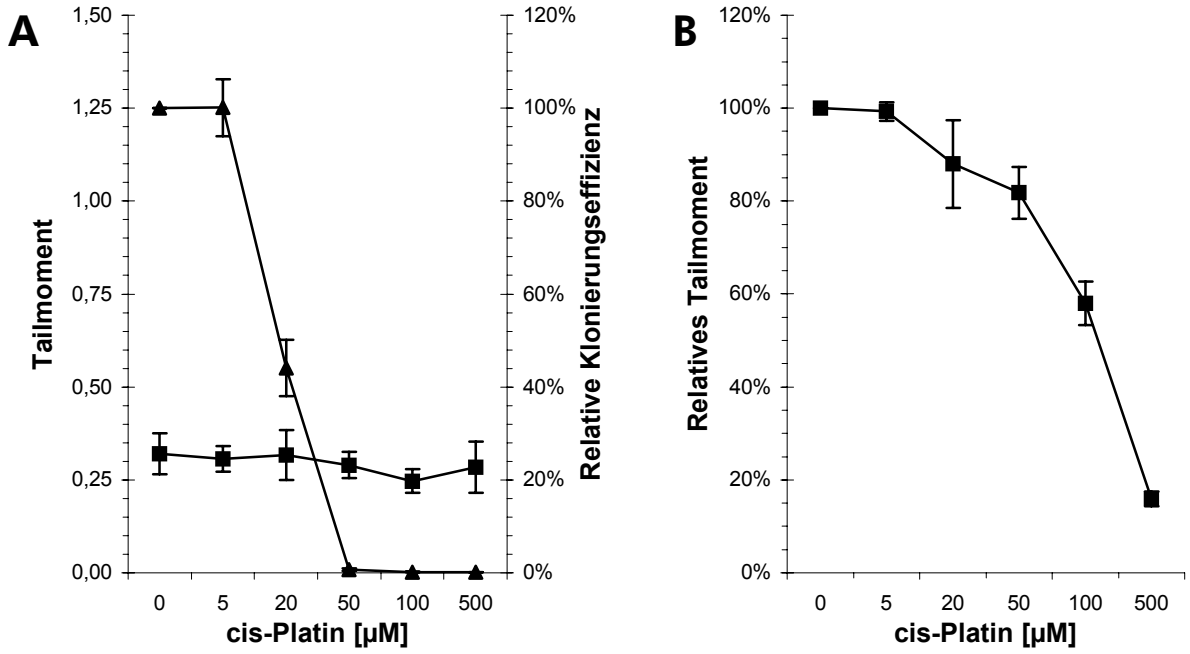


Abb. 13: DNA-Migration im Comet Assay (■) und relative Klonierungseffizienzen (▲) nach Behandlung von V79-Zellen mit cis-Platin für 2 h (A). Der Einfluss einer cis-Platin-Behandlung auf die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay (B). (Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.1.4 Kaliumchromat

Mit Kaliumchromat wurde eine weiterere Substanz untersucht, die DNA-Protein Crosslinks induziert, um festzustellen, ob der für Formaldehyd gefundene stark hemmende Effekt auf die strahlungsinduzierte DNA-Migration typisch für DNA-Protein Crosslinks ist. Eine zweistündige Behandlung von V79-Zellen mit Kaliumchromat führt ab 100 μM zu einer statistisch signifikanten ($P<0,05$) und konzentrationsabhängigen Reduktion des klonales Wachstums (Abb. 14A:▲). Ab 200 μM ist das klonale Wachstum vollständig unterdrückt. Im Standardprotokoll des Comet Assays führt Kaliumchromat zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg des Tailmoments (Abb. 14A:■), der ab 100 μM im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant ist ($P<0,01$). Auch nach Bestrahlung der Zellen ist im Vergleich zur Kontrolle ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Tailmoments zu beobachten (Abb. 14B). Bei 200 μM tritt eine statistisch signifikante ($P<0,01$) Verdopplung des Tailmoments auf. Im Unterschied zu Formaldehyd führt Kaliumchromat im Comet Assay in Kombination mit Bestrahlung zu keiner Reduktion des Tailmoments, was ein Hinweis auf Crosslinks sein würde, sondern zu einer weiteren Induktion der DNA-Migration.

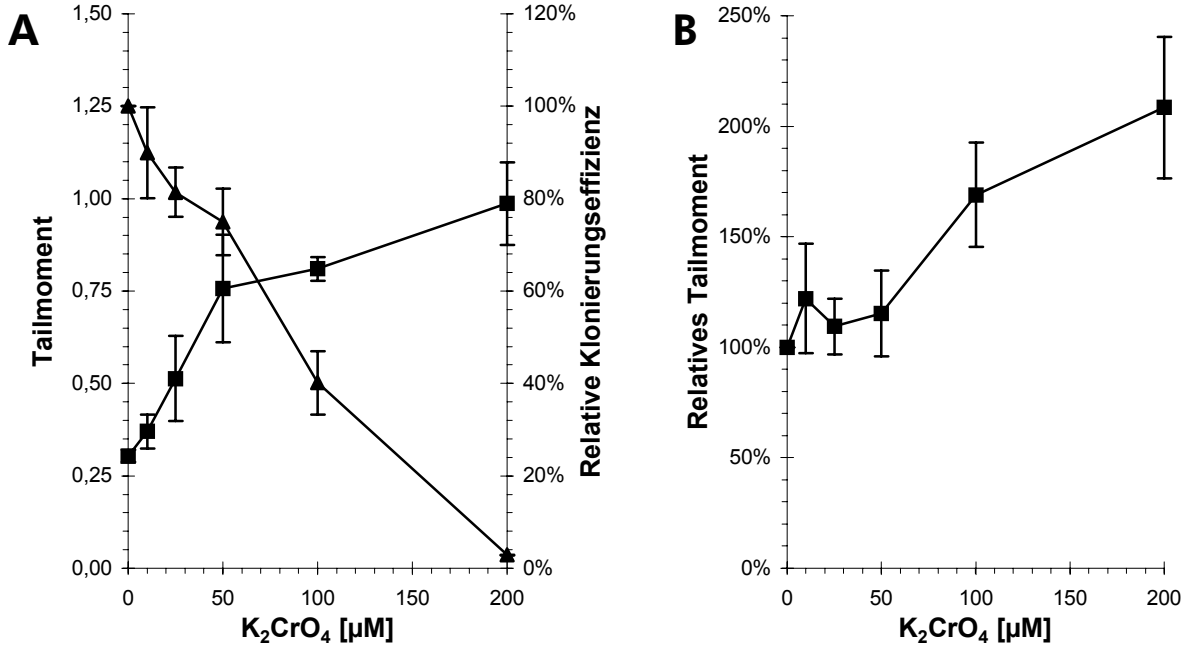


Abb. 14: DNA-Migration im Comet Assay (■) und relative Klonierungseffizienzen (▲) nach Behandlung von V79-Zellen mit Kaliumchromat für 2 h (A). Der Einfluss der Kaliumchromat-Behandlung auf die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay (B).
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.1.5 Natriumarsenit

Auch Natriumarsenit ist eine Substanz, die bekanntermaßen DNA-Protein Crosslinks induziert. Nach einer zweistündigen Behandlung von V79-Zellen mit Natriumarsenit kommt es ab 50 μM zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Reduktion des klonalen Wachstums (Abb. 15A:▲). Die relative Klonierungseffizienz liegt bei 100 μM bereits unter 10 %. Natriumarsenit führt im Standardprotokoll des Comet Assays ab 10 μM konzentrationsabhängig zu einem deutlichen Anstieg des Tailmoments (Abb. 15A:■). Bei 50 μM ist eine ausgeprägte DNA-Migration mit einem Tailmoment von 2,38 festzustellen, die letzte getestete Konzentration von 100 μM ergab nur in einem Versuch noch einen weiteren Anstieg des Tailmoments. Wurden die Zellen direkt nach der Behandlung mit 3 Gy bestrahlt und anschließend im Comet Assay analysiert, so konnte wieder eine konzentrationsabhängige zusätzliche Induktion der DNA-Migration beobachtet werden (Abb. 15B). Diese erreicht bei 50 μM mit 155 % des Kontrollwertes ihr Maximum. Auch Natriumarsenit führt als DNA-Protein Crosslink-induzierende Substanz im Gegensatz zu Formaldehyd nach Bestrahlung der Zellen zu keiner Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay.

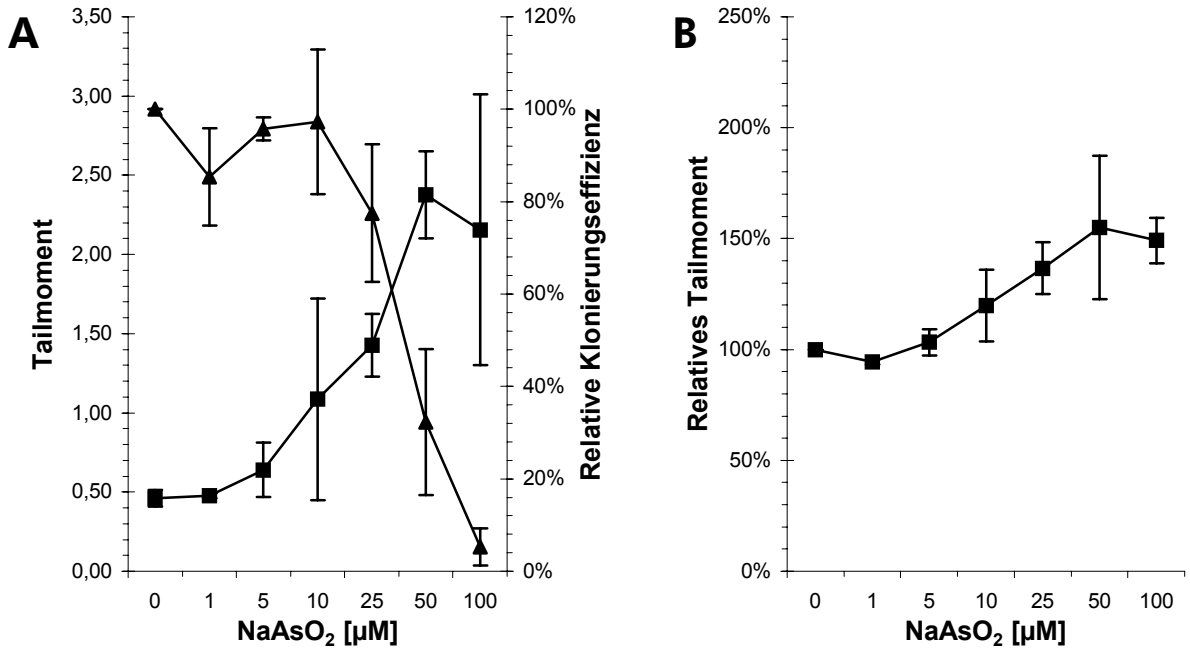


Abb. 15: DNA-Migration im Comet Assay (■) und relative Klonierungseffizienzen (▲) nach Behandlung von V79-Zellen mit Natriumarsenit für 2 h (A). Der Einfluss der Natriumarsenit-Behandlung auf die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay (B).
(Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

3.2 Nachweis von DNA-Protein Crosslinks im K-SDS Assay

Mit dem K-SDS Assay steht ein bereits etabliertes, sensitives und spezifisches Testsystem zum Nachweis von DNA-Protein Crosslinks zur Verfügung. In der Abb. 16 sind die Ergebnisse in diesem Test nach vierstündiger Formaldehyd-Behandlung von V79-Zellen gezeigt. Unbehandelte Kontrollzellen zeigen einen geringen DNA-Anteil im Pellet von 0,59 %. Ab 125 μM kommt es zu einem statistisch signifikanten ($P<0,05$), konzentrationsabhängigen und linearen Anstieg der Protein-gebundenen DNA. Bei 500 μM sind 11,03 % der DNA-Fragmente kovalent an Proteine gebunden.

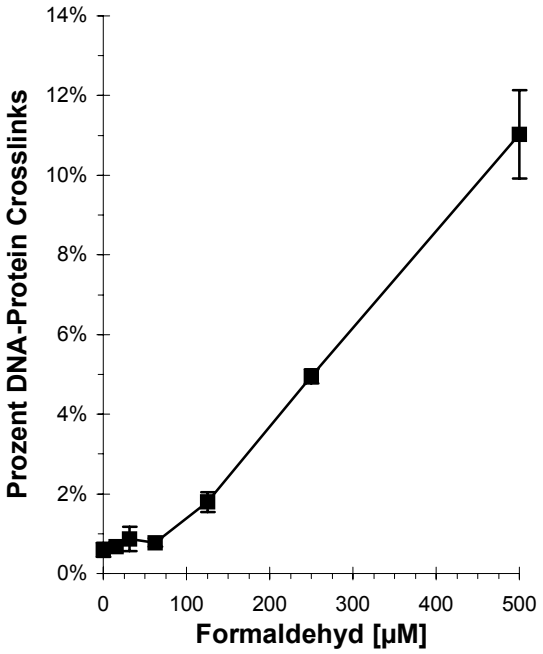


Abb. 16: Nachweis von Formaldehyd-induzierten DPC im K-SDS Assay nach vierstündiger Behandlung von V79-Zellen. (Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

Mit Hilfe dieses Tests wurde auch versucht die Menge an Kaliumchromat-induzierten DNA-Protein Crosslinks zu bestimmen (Tab. 4). Dazu wurden V79-Zellen zwei Stunden lang mit den Kaliumchromatkonzentrationen 50, 100 und 200 μM behandelt und anschließend im K-SDS Assay analysiert. Alle drei getesteten Konzentrationen zeigen jedoch keinen Unterschied im Vergleich zur Kontrolle, die mit 0,16 % in diesem Versuch niedriger lag als in den Versuchen mit Formaldehyd.

Tab. 4: Nachweis von Kaliumchromat-induzierten DPC im K-SDS Assay nach zweistündiger Behandlung von V79-Zellen.
(Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

Kaliumchromat [μM]	0	50	100	200
DNA-Protein Crosslinks	0,16 %	0,13 %	0,16 %	0,16 %
±SEM	±0,01 %	±0,01 %	±0,05 %	±0,02 %

3.3 Nachweis von DNA-Protein Crosslinks im Comet Assay durch Proteinase K-Verdau

Wenn DNA-Protein Crosslinks an der Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay beteiligt sind, so sollte eine Behandlung der Objektträger mit Proteinase K direkt nach der Lyse diese Hemmung wieder aufheben. Beruht die Hemmung bei MMC und cis-Platin auf den gebildeten DNA-DNA Crosslinks, so sollte sich dieser Effekt nicht durch Proteinase K beeinflussen lassen. Die Ergebnisse der Überprüfung dieser Hypothesen sind in Abb. 17 gezeigt. Ein zweistündige Behandlung der Objektträger direkt nach der Lyse mit Proteinase K zeigt für unbehandelte Kontrollzellen nur eine geringe Steigerung der strahlungsinduzierten (3 Gy) DNA-Migration. Die Hemmung dieser Migration, die durch eine zweistündige Formaldehyd-Behandlung mit 250 μM verursacht wird, kann durch die Proteinase K-Behandlung fast vollständig aufgehoben werden, während die Hemmung, die durch zweistündige Behandlung der Zellen mit 200 μM MMC bzw. 500 μM cis-Platin hervorgerufen wird, durch die Proteinase K-Behandlung nicht beeinflusst wird.

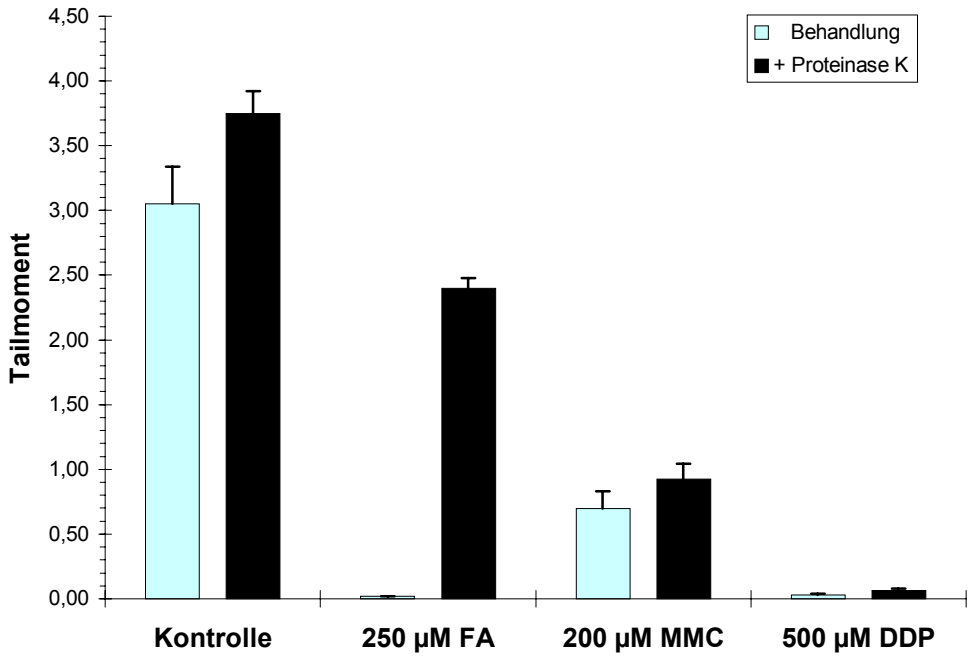


Abb. 17: Einfluss eines zweistündigen Proteinase K-Verdaus auf die Hemmung strahlungsinduzierter (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay nach Behandlung von V79-Zellen mit Formaldehyd (FA), Mitomycin C (MMC) und cis-Platin (DDP).
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.4 Einfluss von Kaliumchromat auf die DNA-Migration in unterschiedlichen Comet Assay Protokollen

Im folgenden werden verschiedene Ansätze zum spezifischen Nachweis von Kaliumchromat-induzierten DNA-Protein Crosslinks im Comet Assay vorgestellt. Zuerst wurde versucht, den Comet Assay bei pH>13 zu modifizieren, anschließend wurden weitere Comet Assay Protokolle mit unterschiedlichen pH-Werten getestet.

3.4.1 Proteinase K-Verdau

Da Kaliumchromat im Comet Assay bei pH>13 keine Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration verursachte, wurde versucht die reduzierenden Effekte von Chromat-induzierten DNA-Protein Crosslinks indirekt durch Proteinase K-Verdau nachzuweisen. Dazu wurden die Objektträger nach der Lyse für 2 h entweder mit dem Proteinase K-Puffer oder mit Proteinase K behandelt. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 gezeigt. Die Behandlung von V79-Zellen mit Kaliumchromat führt zu der bereits gezeigten konzentrationsabhängigen Steigerung der DNA-Migration. Die zusätzliche Behandlung mit dem Proteinase K-Puffer zeigt eine weitere, jedoch für alle getesteten Konzentrationen konstante, Steigerung des Tailmoments um 0,3. Werden die Objektträger mit Proteinase K inkubiert, so erkennt man eine konzentrationsabhängige Zunahme des Tailmoments, verglichen mit den Werten bei Inkubation nur mit dem Proteinase K-Puffer. Damit wurde durch den Proteinase K-Verdau indirekt eine konzentrationsabhängige Hemmung der DNA-Migration nach Kaliumchromat-Behandlung nachgewiesen. Diese Hemmung wird jedoch im Comet Assay bei pH>13 durch andere, migrationsinduzierende DNA-Schäden überdeckt, sodass es insgesamt zu einem Anstieg der DNA-Migration kommt.

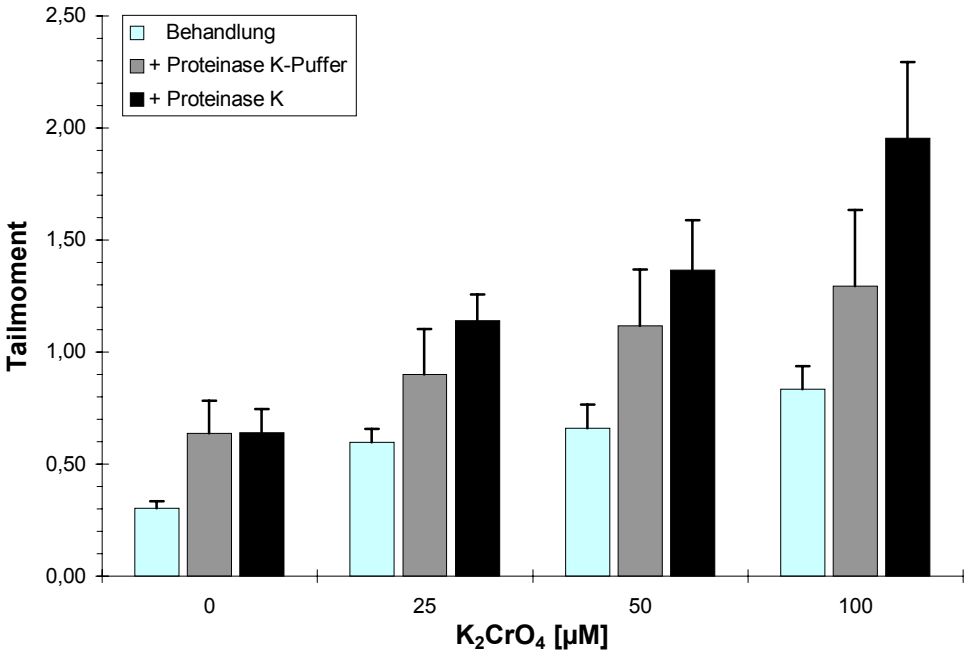


Abb. 18: Einfluss einer zweistündigen Behandlung der Objektträger mit Proteinase K-Puffer bzw. mit Proteinase K auf die Kaliumchromat-induzierte DNA-Migration in V79-Zellen (2 h Behandlung) im Comet Assay.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.4.2 Zusätzliche Inkubationszeit nach Behandlung

Kaliumchromat induziert neben DNA-Protein Crosslinks auch alkalilabile Stellen und DNA-Strangbrüche, deren Reparatur schneller verläuft, als die Reparatur der Crosslinks (Sugiyama et al., 1986). Diese DNA-Schäden führen im Comet Assay zu einem Anstieg der Migration und können so die migrationsreduzierenden Effekte von Crosslinks überdecken. Deshalb wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Behandlung von V79-Zellen mit 100 μM Kaliumchromat die DNA-Migration ohne und mit Bestrahlung (2 Gy) im Comet Assay überprüft. Sind die migrationsinduzierenden DNA-Schäden zu einem bestimmten Zeitpunkt nach der Behandlung repariert, während die DNA-Protein Crosslinks noch vorhanden sind, so sollte dies zu einer Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration führen. Eine zusätzliche Postinkubation von 3 h wurde bereits zum Nachweis von Ifosfamid-induzierten Crosslinks im Comet Assay verwendet (Hartley et al., 1999).

Die Abb. 19A zeigt die Comet Assay Ergebnisse unbestrahlter Zellen. Direkt nach der Behandlung mit 100 μM Kaliumchromat ist im Vergleich zur Kontrolle ein deutlicher Anstieg des Tailmoments von 0,3 auf 0,8 zu erkennen. Mit zunehmender Inkubationsdauer nimmt das Tailmoment wieder ab und hat nach 4 h fast wieder den

Kontrollwert erreicht. Damit sind also nach dieser Zeit fast alle migrationsinduzierenden DNA-Schäden repariert. Betrachtet man die Effekte nach Bestrahlung der Zellen mit 2 Gy (Abb. 19B), so ist auch hier direkt nach der Behandlung ein deutlicher Anstieg des Tailmoments festzustellen. Bereits 1 h nach der Behandlung ist das Tailmoment wieder auf dem Niveau der bestrahlten Kontrolle, es ist jedoch zu keinem Zeitpunkt nach der Behandlung eine Reduktion der DNA-Migration festzustellen, die auf parallel induzierte DNA-Protein Crosslinks hinweisen würde. Damit ist es durch eine zusätzliche Postinkubation nach der Behandlung nicht möglich, die Kaliumchromat-induzierten DNA-Protein Crosslinks im Comet Assay nachzuweisen.

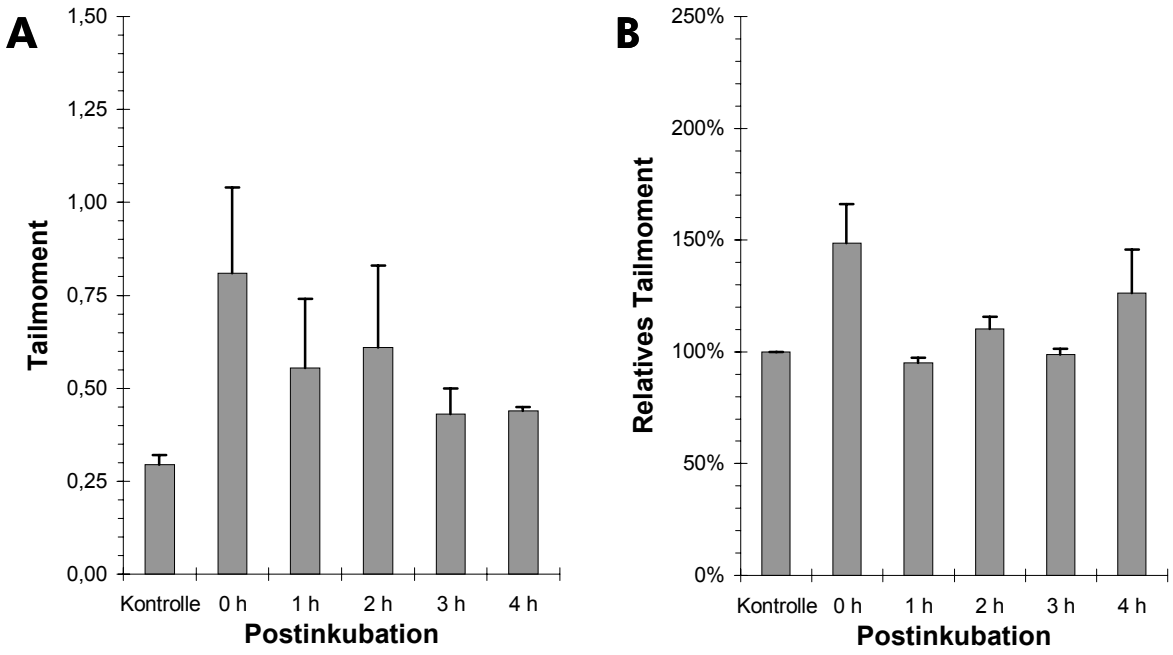


Abb. 19: Induktion von DNA-Migration im Comet Assay nach zweistündiger Behandlung von V79-Zellen mit 100 μM Kaliumchromat ohne (A) und mit 2 Gy Bestrahlung (B) und die Aufhebung dieser Migration zu verschiedenen Postinkubationszeiten.
(Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

3.4.3 Comet Assay bei pH>13 in Abwesenheit von EDTA

Untersuchungen zur Stabilität von Chromat-induzierten DNA-Protein Komplexen zeigten, dass diese durch Anwesenheit von EDTA wieder aufgelöst werden können (Miller und Costa, 1988). Da die Lösungen zum Abtrypsinieren der Zellen, die Lyselösung und der Alkali- und Elektrophoresepuffer des Comet Assays jeweils EDTA enthalten, könnten die DNA-Protein Crosslinks während der Aufarbeitung durch das EDTA gelöst werden und sich somit der Detektion entziehen. Aus diesem Grund wurden die Zellen in den folgenden

Versuchen mit EDTA-freiem Trypsin abtrypsiniert und der Comet Assay mit Lösungen durchgeführt, die kein EDTA enthielten.

In der Abb. 20A sind die Ergebnisse im EDTA-freien Comet Assay nach zweistündiger Behandlung von V79-Zellen mit Kaliumchromat gezeigt. Die Zellen zeigen immer noch eine konzentrationsabhängige Zunahme des Tailmoments von 0,42 in der Kontrolle auf 0,64 in Zellen, die mit 200 μM Kaliumchromat behandelt wurden. Dieser Wert ist aber bereits geringer als das Tailmoment bei 200 μM im Comet Assay mit EDTA, das bei 0,99 liegt.

Betrachtet man die Ergebnisse für Zellen, die nach der Behandlung mit 3 Gy bestrahlt wurden (Abb. 20B), so ist kein zusätzlicher Anstieg der DNA-Migration mehr zu erkennen. Die Werte der Chromat-behandelten Zellen unterscheiden sich nicht mehr signifikant von der bestrahlten Kontrolle. Es ist jedoch auch keine Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration, die auf Crosslinks hinweisen würde, zu erkennen. Damit ist auch mit einem EDTA-freien Comet Assay kein direkter Nachweis von Kaliumchromat-induzierten DNA-Protein Crosslinks möglich.

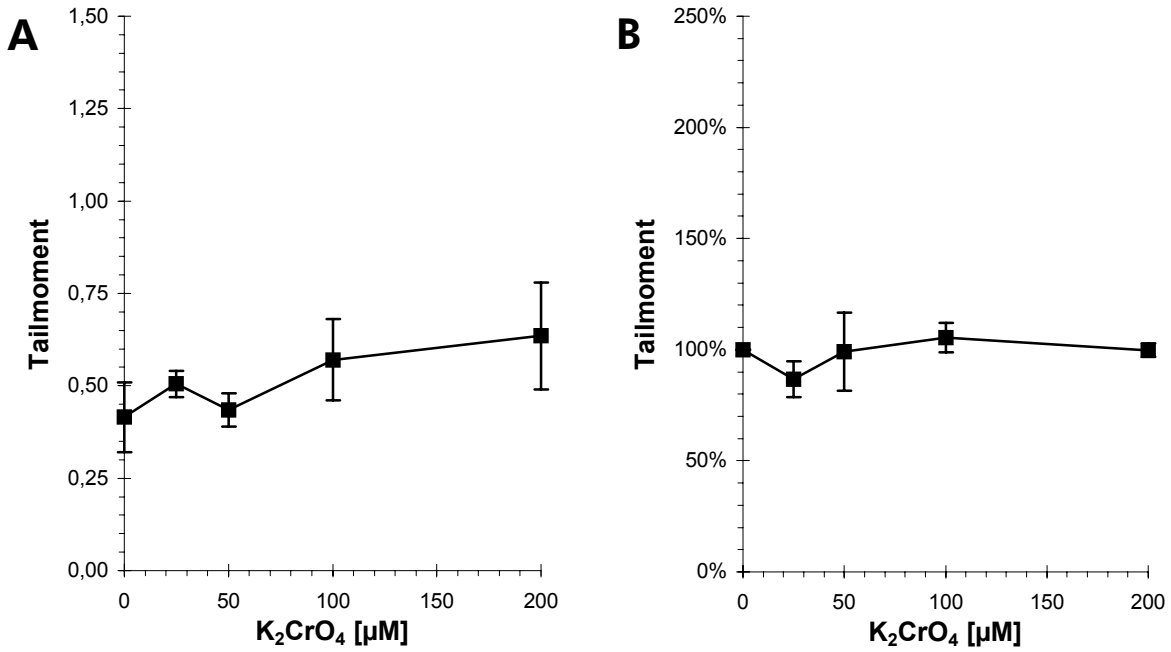


Abb. 20: DNA-Migration im EDTA-freien Comet Assay nach zweistündiger Kaliumchromat-Behandlung von V79-Zellen ohne (A) und mit 3 Gy Bestrahlung (B).
(Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

3.4.4 Comet Assay bei pH 12,1

Wie bereits erwähnt induziert Kaliumchromat neben den DNA-Protein Crosslinks auch alkalilabile Stellen (Cantoni und Costa, 1984), die zu einer Zunahme der DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 führen. Durch die Reduktion des pH-Wertes auf 12,1 werden alkalilabile Stellen nicht mehr in Strangbrüche umgewandelt und haben somit keinen Einfluss mehr auf die DNA-Migration. Unter diesen Bedingungen bewirken hauptsächlich Einzel- und Doppelstrangbrüche eine Zunahme der Wanderung der DNA (Miyamae et al., 1997). Bei der Etablierung der Alkali- bzw. Elektrophoresezeiten zeigte sich jedoch, dass der auf pH 12,1 titrierte Alkali-Elektrophoresepuffer nicht stabil ist. Es kam während der Elektrophorese zur Bildung von Chlorgas, und es konnte anschließend ein deutlicher pH-Gradient zwischen Kathode und Anode gemessen werden. Daher wurden keine weiteren Versuche mit diesem Protokoll unternommen.

3.4.5 Comet Assay bei pH 12,7

Mit dem Comet Assay bei pH 12,7 steht ein weiteres Protokoll zur Verfügung, das hauptsächlich Einzel- und Doppelstrangbrüche in der DNA nachweist (Klaude et al., 1996). Zuerst wurde die Sensitivität des Protokolls getestet und eine Bestrahlungsdosis festgelegt, die eine deutliche Wanderung der DNA zur Folge hat. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 21A zu sehen. Unbehandelte Zellen zeigen nur eine geringe DNA-Migration und ein Tailmoment von 0,26. Nach Bestrahlung ist ab 1 Gy ein konzentrationsabhängiger Anstieg des Tailmoments festzustellen. Bei 5 Gy ist mit einem Tailmoment von 3,58 eine deutliche Kometenbildung im Mikroskop zu sehen. Diese Dosis wurde für die folgenden Untersuchungen zum Nachweis Chromat-induzierter DNA-Protein Crosslinks eingesetzt.

Die Ergebnisse nach zweistündiger Behandlung von V79-Zellen und anschließender Bestrahlung mit 5 Gy im Comet Assay bei pH 12,7 sind in der Abb. 21B dargestellt. Bis zu einer Konzentration von 200 μM ist ein leichter Anstieg des relativen Tailmoments erkennbar, höhere Konzentrationen zeigen jedoch eine starke Schwankung der Ergebnisse. Diese liegen immer im Bereich der unbehandelten Kontrolle und damit kann auch mit diesem Comet Assay Protokoll kein Hinweis auf Kaliumchromat-induzierte DNA-Protein Crosslinks gefunden werden.

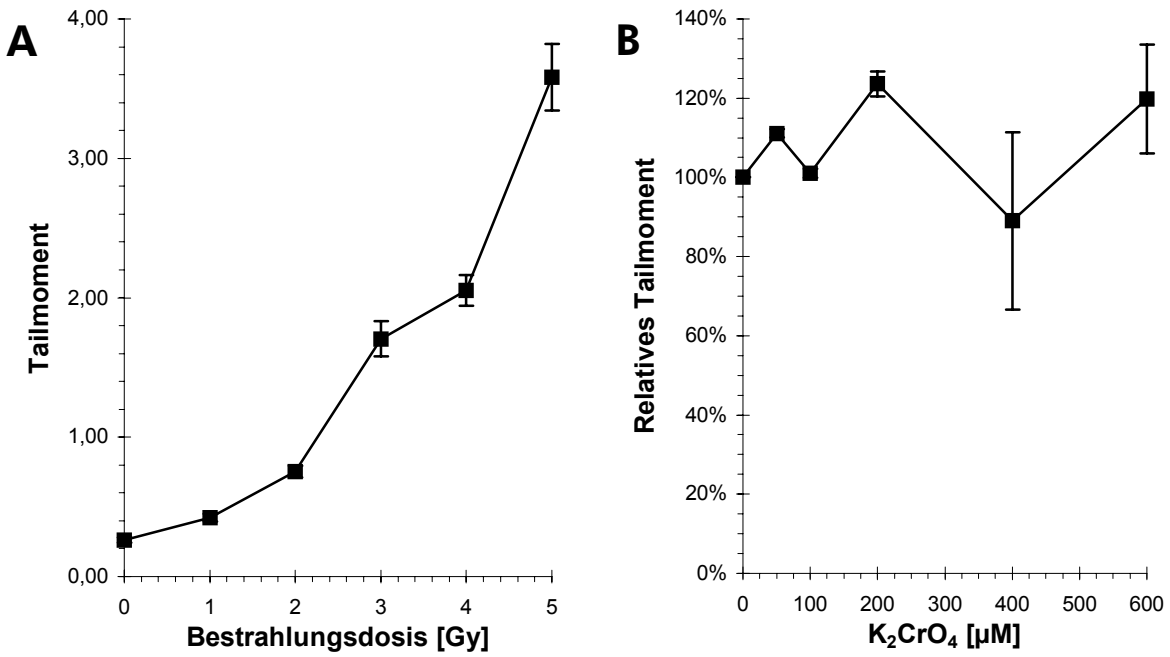


Abb. 21: Induktion von DNA-Migration im Comet Assay bei pH 12,7 durch Bestrahlung von V79-Zellen mit γ-Strahlung (A). Einfluss einer zweistündigen Kaliumchromat-behandlung auf die strahlungsinduzierte (5 Gy) DNA-Migration in diesem Comet Assay Protokoll (B).
(Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

3.4.6 Comet Assay bei pH 9

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl alkalilabile Stellen, als auch DNA-Einzelstrangbrüche die Detektion von Kaliumchromat-induzierten DNA-Protein Crosslinks stören. Das 1997 von Singh und Stephens vorgestellte Comet Assay Protokoll bei pH 9 weist nur DNA-Doppelstrangbrüche nach und eignet sich damit möglicherweise zum spezifischeren Nachweis von Crosslinks. Auch bei diesem Protokoll wurde zuerst eine Bestrahlungsdosis gesucht, bei der es zu einer deutlichen DNA-Migration kommt. In Abb. 22A sind die Ergebnisse nach Bestrahlung von V79-Zellen mit γ-Strahlen gezeigt. Kontrollzellen zeigen nur eine geringe Wanderung der DNA und ein Tailmoment von 0,33. Bereits nach Bestrahlung mit 1 Gy steigt das Tailmoment signifikant ($P<0,05$) auf 1,33 und erreicht bei 10 Gy den Wert 4,42. Für die weiteren Versuche zum Einfluss von crosslinkenden Substanzen auf die strahlungsinduzierte DNA-Migration im Comet Assay wurde als Bestrahlungsdosis 5 Gy ausgewählt. Hierbei liegt das Tailmoment bei 3,00. Eine höhere Dosen wurde nicht gewählt, da dabei die richtige Detektion des Kometenkopfes durch die Auswerte-Software nicht immer gegeben war.

Nach zweistündiger Behandlung von V79-Zellen mit Kaliumchromat und anschließender Bestrahlung mit 5 Gy konnte mit dem Comet Assay Protokoll bei pH 9 erstmals eine Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration beobachtet werden (Abb. 22B). Ab einer Konzentration von 50 μM ist ein konzentrationsabhängiger, statistisch signifikanter Rückgang ($P<0,05$) des relativen Tailmoments zu sehen. Es kommt jedoch selbst bei den sehr toxischen Konzentrationen von über 200 μM zu keiner vollständigen Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration. Dieses Comet Assay Protokoll ist damit aber dennoch geeignet, Kaliumchromat-induzierte DNA-Protein Crosslinks nachzuweisen.

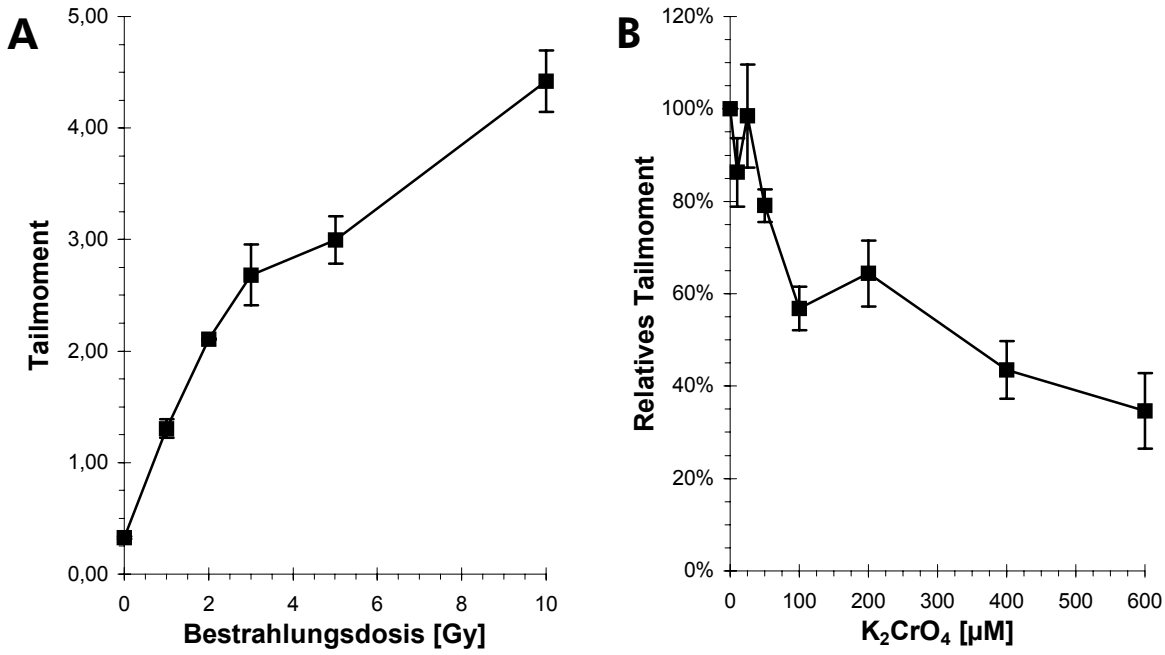


Abb. 22: Induktion von DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9 durch Bestrahlung von V79-Zellen mit γ-Strahlung (A). Einfluss einer zweistündigen Kaliumchromatbehandlung auf die strahlungsinduzierte (5 Gy) DNA-Migration in diesem Comet Assay Protokoll (B). (Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

Auch Formaldehyd-induzierte DNA-Protein Crosslinks lassen sich mit diesem Protokoll nachweisen. Die Ergebnisse sind mit den Ergebnissen im Comet Assay bei pH>13 (Abb. 11B, Seite 55) praktisch identisch und werden daher nicht gezeigt.

Da sich eine zusätzliche, dreistündige Postinkubation der Zellen im Anschluss an die Behandlung in einem anderen Comet Assay Protokoll als günstig erwiesen hat (Hartley et al., 1999), wurde dieser Ansatz auch für den Comet Assay bei pH 9 geprüft. Die Ergebnisse in Abb. 23 zeigen jedoch keinen Unterschied zu den Ergebnissen direkt nach der Behandlung. Damit bewirkt eine zusätzliche Postinkubationen der Zellen keine weitere

Verbesserung in der Detektion von Kaliumchromat-induzierten DNA-Protein Crosslinks im Comet Assay.

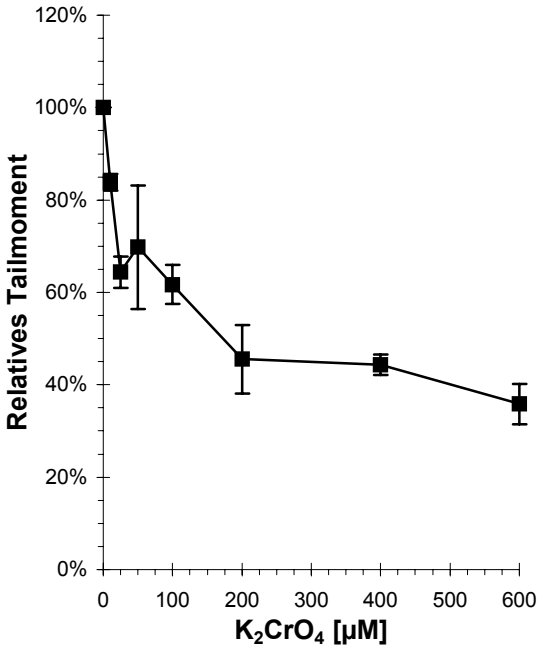


Abb. 23: Migrationshemmende Wirkung von Kaliumchromat-induzierten DPC nach zweistündiger Behandlung und anschliessender dreistündiger Postinkubation im Comet Assay bei pH 9 (+ 5 Gy). (Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

Um nachzuweisen, ob die Hemmung der DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9 nach Kaliumchromat-Behandlung von V79-Zellen auf DNA-Protein Crosslinks beruht, wurden die Objektträger nach der Lyse für zwei Stunden mit Proteinase K behandelt. Als Kontrolle dienten Objektträger, die nur mit dem Proteinase K-Puffer inkubiert wurden. In Abb. 24 sieht man, dass die Objektträger, die nur mit dem Proteinase K-Puffer behandelt wurden, immer noch die konzentrationsabhängige Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration zeigen. Dagegen ist bei den Proteinase K-behandelten Präparaten bei allen Konzentrationen eine vollständige Aufhebung der Migrationshemmung zu sehen, die Tailmomente unterscheiden sich nicht mehr vom Tailmoment der Proteinase K-behandelten Kontrolle. Damit ist gezeigt, dass die Hemmung der DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9 nach Kaliumchromat-Behandlung durch DNA-Protein Crosslinks verursacht wird.

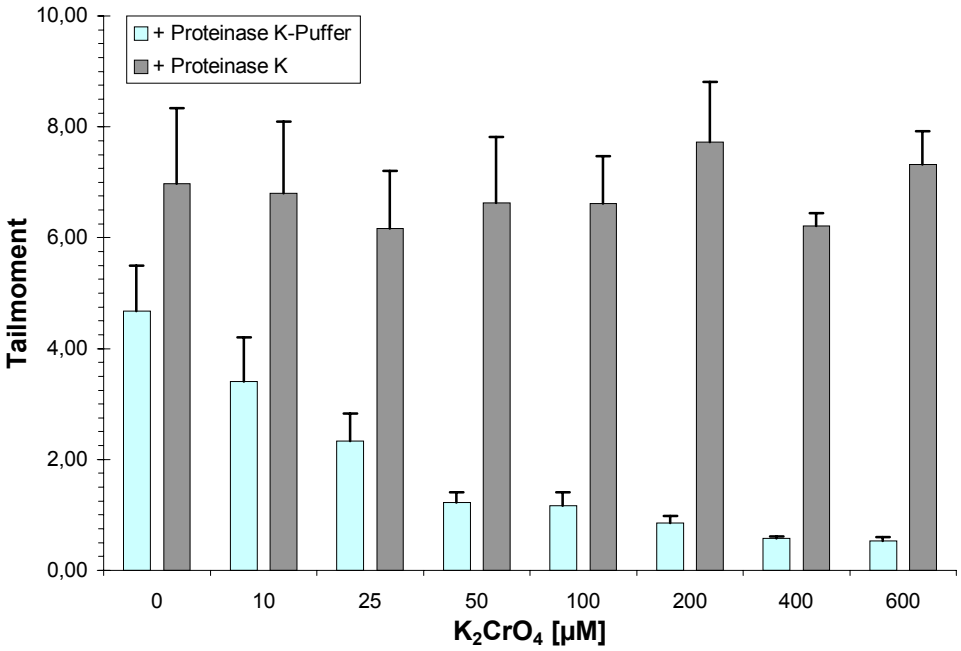


Abb. 24: Aufhebung des migrationshemmenden Effektes einer zweistündigen Behandlung von V79-Zellen mit Kaliumchromat im Comet Assay bei pH 9 (+ 5 Gy) durch eine zweistündige Proteinase K-Behandlung der Objektträger.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.5 Einfluss von verschiedenen crosslinkenden Substanzen auf die DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9

Die Verwendung des Comet Assay Protokolls bei pH 9 bringt eine deutliche Verbesserung des Nachweises Kaliumchromat-induzierter DNA-Protein Crosslinks. Natriumarsenit wurde ebenfalls mit diesem Ansatz untersucht, da es bekanntermaßen DNA-Protein Crosslinks induziert und im Comet Assay bei pH>13 keine Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration bewirkte. In der Abb. 25 sind die Ergebnisse im Comet Assay bei pH 9 nach zweistündiger Natriumarsenit-Behandlung von V79-Zellen dargestellt. In diesem Protokoll kommt es bei unbestrahlten Zellen (Abb. 25A) immer noch zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der DNA-Migration. Werden die Zellen nach der Behandlung mit 5 Gy bestrahlt, so ist nur noch ein geringer weiterer Anstieg des Tailmoments zu beobachten (Abb. 25B). Bei keiner der getesteten Konzentrationen ist jedoch eine Hemmung der DNA-Migration nachzuweisen, die auf Crosslinks hinweisen würde.

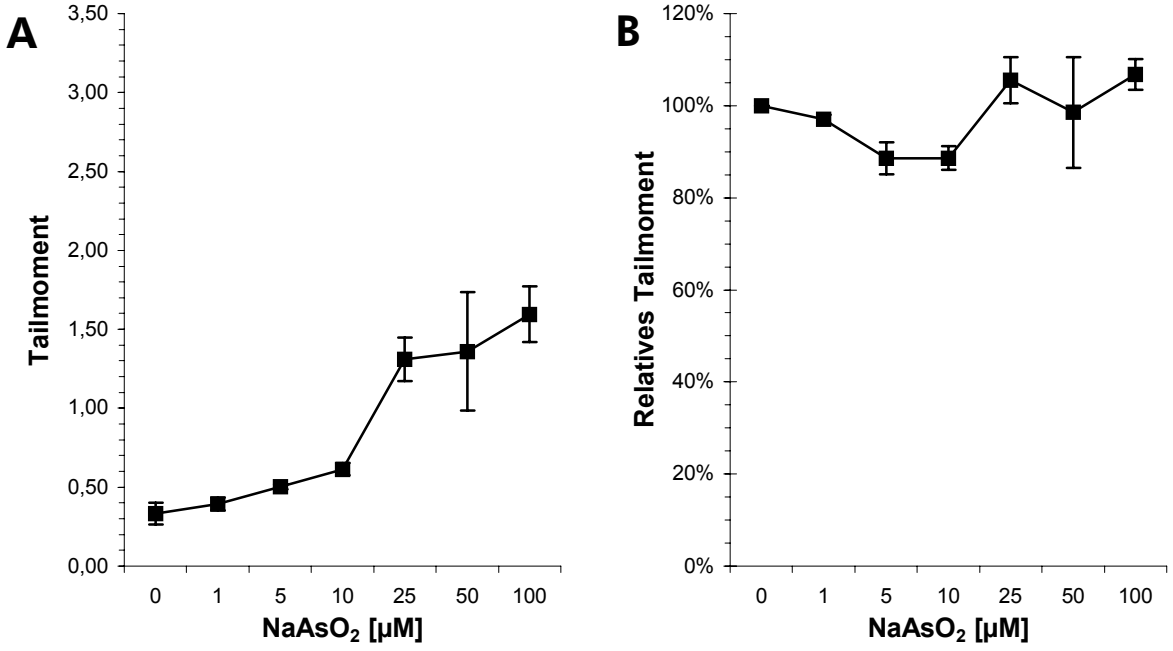


Abb. 25: DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9 nach zweistündiger Natriumarsenit-Behandlung von V79-Zellen: unbestrahlt (A) und nach Bestrahlung mit 5 Gy (B). (Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

Mit den folgenden Untersuchungen sollte geklärt werden, ob der Comet Assay bei pH 9 auch eine Verbesserung der Sensitivität beim Nachweis von Substanzen bringt, die DNA-DNA Crosslinks induzieren.

Die Abb. 26A zeigt die Ergebnisse nach zweistündiger Behandlung von V79-Zellen mit dem MMC und anschließender Bestrahlung mit 5 Gy. Im hier verwendeten Comet Assay Protokoll kommt es erst ab einer Konzentration von 200 µM zu einer deutlichen Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration, die jedoch bei 500 µM nicht weiter zunimmt. Im Vergleich zum Comet Assay bei pH>13 ist in diesem Protokoll erst bei höheren Konzentrationen eine deutliche Hemmung der DNA-Migration nachweisbar.

Für cis-Platin sind die Ergebnisse in Abb. 26B zu sehen. Auch hier kommt es erst bei 100 µM zu einer deutlichen, konzentrationsabhängigen Reduktion der DNA-Migration, die bei 500 µM fast vollständig unterdrückt ist. Die Ergebnisse für cis-Platin im Comet Assay bei pH 9 sind fast deckungsgleich mit den Ergebnissen im Comet Assay bei pH>13.

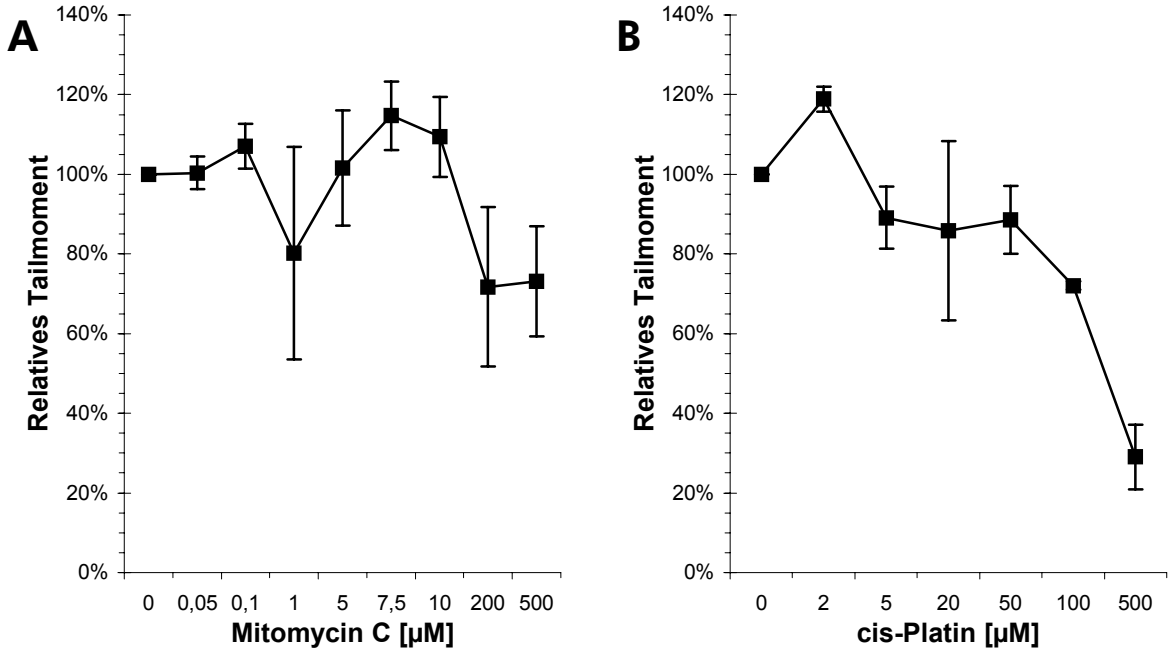


Abb. 26: Einfluss einer zweistündigen Behandlung von V79-Zellen mit Mitomycin C (A) und cis-Platin (B) auf die strahlungsinduzierte (5 Gy) DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9.
(Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

3.6 Persistenz von Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks in V79-Zellen

Da über die Kinetik der Induktion und der Reparatur von DNA-Protein Crosslinks nur sehr wenig bekannt ist, wurden Versuche mit Formaldehyd zur Klärung dieser Fragen unternommen. Da die Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks eine deutlich hemmende Wirkung auf die strahlungsinduzierte DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 haben, wurde die Menge an DNA-Protein Crosslinks über dieses Protokoll bestimmt.

3.6.1 Untersuchungen zur Induktion und Reparatur von DNA-Protein Crosslinks

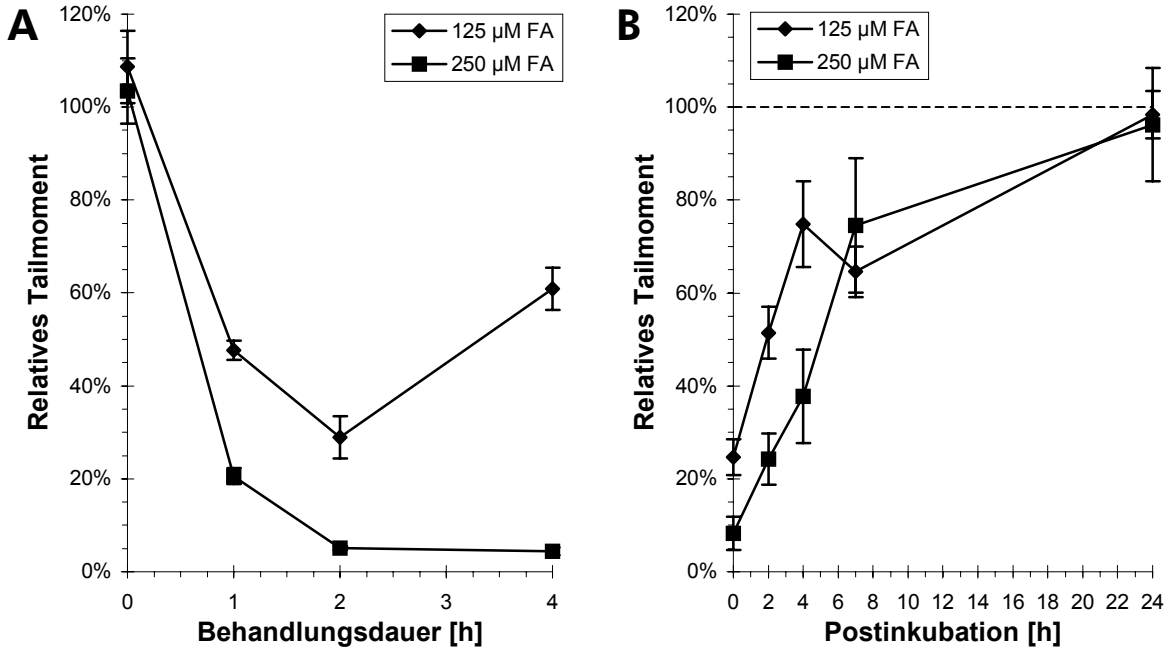


Abb. 27: Hemmung der strahlungsinduzierten (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay nach unterschiedlichen Behandlungszeiten von V79-Zellen mit Formaldehyd (A). Aufhebung der migrationsreduzierenden Wirkung einer zweistündigen Formaldehyd-Behandlung zu verschiedenen Zeiten nach der Behandlung (B).
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

Die Ergebnisse der Untersuchungen zur Kinetik der Induktion von Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks sind in Abb. 27A gezeigt. Hierzu wurden V79-Zellen für die angegebenen Zeiten mit 125 oder 250 μM Formaldehyd behandelt, danach mit 3 Gy bestrahlt und anschließend im Comet Assay analysiert. Man erkennt, dass bei beiden Konzentrationen bereits nach einer Stunde Behandlung eine deutliche Hemmung der

strahlungsinduzierten DNA-Migration auftritt. Die Hemmung erreicht für 125 µM nach zwei Stunden Behandlung ihr Maximum, nach vier Stunden schwächt sie sich bereits wieder ab. Für 250 µM Formaldehyd ist nach zwei Stunden eine vollständige Hemmung der DNA-Migration erreicht, die auch nach vier Stunden Behandlung noch anhält. Die Hemmung nach Behandlung mit 250 µM Formaldehyd ist zu allen untersuchten Zeitpunkten stärker ausgeprägt als nach 125 µM.

Da sich das Maximum der Hemmung strahlungsinduzierter DNA-Migration im Comet Assay bereits nach zwei Stunden Behandlung einstellt, wurde zur Untersuchung der Reparaturkinetik dieses Behandlungsprotokoll gewählt. Nach der Behandlung wurden die Zellen für die angegebenen Postinkubationszeiten in Gewebemedium inkubiert und vor der Aufarbeitung im Comet Assay mit 3 Gy bestrahlt. Die Ergebnisse in Abb. 27B zeigen direkt nach der Behandlung die erwartete deutliche und konzentrationsabhängige Reduktion der DNA-Migration. Bei beiden untersuchten Konzentrationen kommt es innerhalb von 8 h nach Behandlung zu einer deutlichen Wiederherstellung der strahlungsinduzierten DNA-Migration. 24 h nach der Behandlung ist bei beiden getesteten Konzentrationen kein Unterschied mehr in der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle zu sehen.

3.6.2 Einfluss verschiedener Behandlungsprotokolle auf die Menge der DNA-Protein Crosslinks

Die Ergebnisse in Abb. 27 zeigen, dass Formaldehyd sehr schnell in der Zelle mit den dort vorhandenen Makromolekülen reagiert und sich damit die effektive Konzentration innerhalb der Zelle sehr schnell verringert. Auch die Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks werden nach den Comet Assay Ergebnissen innerhalb von 24 h wieder von der DNA entfernt. Es stellt sich nun die Frage, welchen Einfluss eine wiederholte Behandlung der Zellen mit Formaldehyd direkt nach der ersten Behandlung bzw. 24 h danach auf das Überleben der Zellen und die Menge der induzierten DNA-Protein Crosslinks hat. Der Nachweis erfolgt über die Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13. Mit Hilfe dieser Versuche sollten Behandlungsprotokolle gefunden werden, bei denen sich die Menge an induzierten Crosslinks deutlich unterscheidet. Durch Vergleich mit der Crosslink-Induktion mit anderen genotoxischen Effekten, sollte so ein Hinweis auf die Bedeutung von DNA-Protein Crosslinks für die Mutagenese gefunden werden.

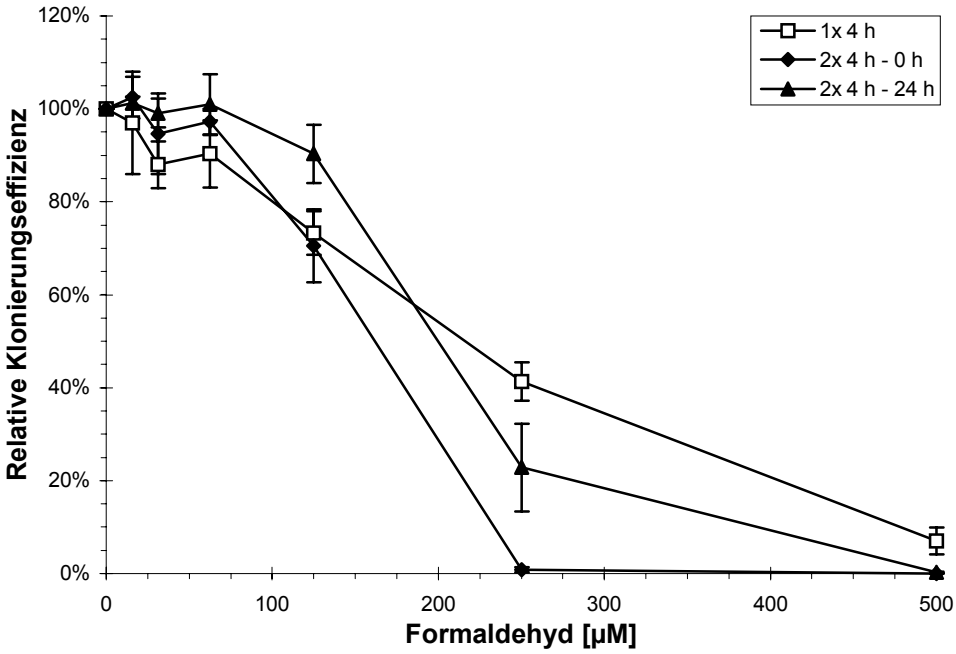


Abb. 28: Einfluss auf das Überleben von V79-Zellen nach Behandlung mit Formaldehyd für 4 h (1x 4 h), nach Behandlung für 4 h mit sofortiger Wiederholung (2x 4 h – 0 h) und nach Behandlung für 4 h und Wiederholung nach 24 h (2x 4 h – 24 h).
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

In der Abb. 28 sind die Ergebnisse der Cytotoxizitätstests von drei verschiedenen Behandlungsprotokollen zusammengefasst. Als erstes sind die bereits gezeigten Ergebnisse für eine einmalige vierstündige Exposition (1x 4 h) von V79-Zellen gegenüber Formaldehyd dargestellt. Ab 125 µM tritt hier eine statistisch signifikante ($P<0,05$) konzentrationsabhängige Reduktion des klonalen Wachstums auf, das bei 500 µM bereits unter 10 % liegt. Werden die Zellen direkt nach der ersten Behandlung und einem Wechsel des serumfreien Mediums für weitere 4 h mit Formaldehyd behandelt (2x 4 h - 0 h), so kann man ebenfalls erst ab 125 µM eine statistisch signifikante ($P<0,05$) Reduktion in der Fähigkeit Zellkolonien zu bilden beobachten. Mit diesem Behandlungsprotokoll ist das klonale Wachstum jedoch bereits ab 250 µM vollständig unterdrückt. Werden die Zellen nach der ersten vierstündigen Behandlung für 20 h in Gewebemedium ohne Formaldehyd inkubiert und anschließend erneut für 4 h mit Formaldehyd behandelt (2x 4 h – 24 h), so findet sich eine signifikante Reduktion der relativen Klonierungseffizienz ($P<0,05$) erst ab 250 µM. Bei 500 µM können die Zellen keine Kolonien mehr bilden. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in allen drei Behandlungsprotokollen cytotoxische Effekte erst bei Konzentrationen auftreten, die über 125 µM liegen. Bei wiederholter Behandlung sind Konzentrationen ab 250 µM stärker cytotoxisch als bei einmaliger Behandlung. Vergleicht

man die Behandlungsprotokolle mit einer Wiederholung der Behandlung, so führt die sofortige Wiederholung der Behandlung zu einer stärkeren Cytotoxizität als die erneute Behandlung am nächsten Tag.

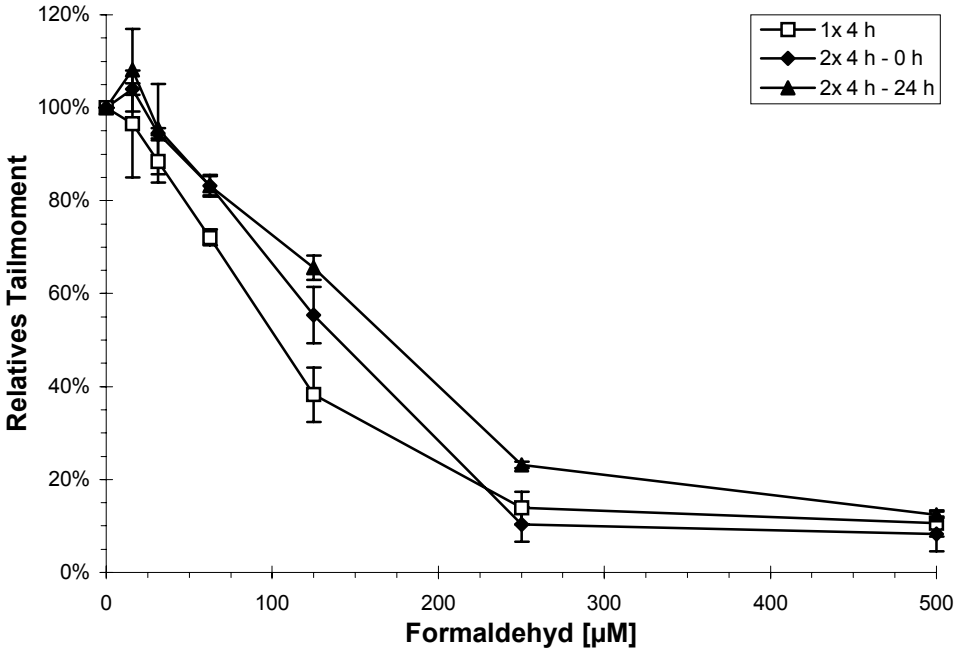


Abb. 29: Einfluss auf die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay nach Behandlung von V79-Zellen mit Formaldehyd für 4 h (1x 4 h), nach Behandlung für 4 h mit sofortiger Wiederholung (2x 4 h – 0 h) und nach Behandlung für 4 h und Wiederholung nach 24 h (2x 4 h – 24 h).
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

Der Einfluss der verschiedenen Behandlungsprotokolle auf die Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 ist in der Abb. 29 zu sehen. Die einmalige Behandlung für 4 h führt, wie bereits gezeigt, ab einer Konzentration von 62,5 µM zu einer signifikanten ($P<0,01$) und konzentrationsabhängigen Reduktion der DNA-Wanderung. Bei 500 µM ist die Wanderung vollständig gehemmt. Werden die Zellen direkt nach der Behandlung erneut für 4 h in frischem serumfreien Medium behandelt (2x 4 h – 0 h), so tritt ebenfalls ab 62,5 µM eine konzentrationsabhängige Reduktion der DNA-Migration auf. Hier ist bereits ab 250 µM die strahlungsinduzierte Wanderung vollständig gehemmt. Erfolgt die erneute Behandlung der Zellen für 4 h erst 20 h nach der ersten Behandlung (2x 4 h – 24 h), so kommt es ebenfalls erst ab 62,5 µM zu einer signifikanten ($P<0,05$) und konzentrationsabhängigen Reduktion der DNA-Migration. Eine vollständige Hemmung der Migration ist bei diesem Behandlungsprotokoll wieder erst bei 500 µM zu sehen. Zusammenfassend lässt sich damit sagen, dass in allen

drei Behandlungsprotokollen ab 62,5 µM reduzierende Effekte im Comet Assay auftreten. Bei den wiederholten Behandlungen sind diese Effekte bis 250 µM geringfügig schwächer ausgeprägt, als nach der einmaligen Behandlung. Eine sofortige Wiederholung der Behandlung zeigt geringfügig stärkere Effekte als eine Wiederholung am nächsten Tag.

3.7 Eliminierung von Crosslinks in reparaturdefizienten Zelllinien

Zur Klärung der Frage, welche Reparatursysteme an der Eliminierung von Crosslinks beteiligt sind, wurde die Reparaturkinetik von Crosslinks im Comet Assay in reparatur-defizienten, menschlichen Zelllinien untersucht. Zusätzlich können durch einen Vergleich zwischen der Persistenz von Crosslinks und dem Auftreten anderer genotoxischer Effekte Hinweise auf die Bedeutung von Crosslinks für die Mutagenese gefunden werden. Als Kontrolle wurde die reparaturprofiziente Zelllinie MRC5CV1 verwendet, GM06914 ist eine Fanconi Anaemie Zelllinie, die sich durch einen Defekt in der Crosslink-Reparatur auszeichnet. XP12ROSV ist eine Xeroderma Pigmentosum Zelllinie, die einen Defekt in der Nukleotid-Exzisionsreparatur besitzt. Da die permanenten menschlichen Zelllinien eine schlechte absolute Klonierungseffizienz von unter 40 % aufweisen, wurde die Zunahme der Zellzahl nach Behandlung als Maß für einen cytotoxischen Effekt herangezogen.

3.7.1 Formaldehyd-induzierte DNA-Protein Crosslinks

Die cytotoxischen Effekte einer zweistündigen Formaldehyd-Behandlung von $1x10^6$ Zellen der reparaturprofizienten Zelllinie MRC5CV1 sind in der Abb. 30A zu sehen. Unbehandelte Zellen zeigen eine lineare Zunahme der Zellzahl über 48 h auf $2,8x10^6$ Zellen, während bei den behandelten Zellen eine konzentrationsabhängige Hemmung des Zellwachstums festzustellen ist. Bei 500 μM steigt die Zellzahl erst wieder 48 h nach der Behandlung, im Vergleich zur Zellzahl der Kontrolle nach 48 h beträgt sie 34 %.

Die Fanconi Anaemie Zelllinie GM06914 zeigt in der unbehandelten Kontrolle verglichen mit MRC5CV1 bereits ein reduziertes Wachstum (Abb. 30B), so sind es nach 48 h nur $2x10^6$ Zellen. Auch für diese Zelllinie tritt eine konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahlen nach Behandlung mit Formaldehyd auf. Die Behandlung mit 500 μM führt zu einem Abfall der Zellzahlen auf $0,4x10^6$ Zellen, die bis 48 h nach der Behandlung konstant bleiben und somit nur 25 % der Zellzahl der Kontrolle nach 48 h erreichen.

Das geringste Wachstum unbehandelter Zellen zeigt die Xeroderma Pigmentosum Zelllinie XP12ROSV (Abb. 30C), die direkt nach der zweistündigen Inkubation in serumfreiem Medium nur noch eine Zellzahl von $0,7x10^6$ Zellen aufweist und nach 48 h Wachstum gerade wieder $1x10^6$ Zellen besitzt. Formaldehyd-behandelte Zellen zeigen, wie die beiden anderen Zelllinien, ebenfalls eine konzentrationsabhängige Reduktion der

Zellzahlen, wobei bereits bei 250 μM eine vollständige Hemmung der Zellteilung auftritt. Bei 500 μM beträgt die Zellzahl nach 48 h im Vergleich zur Zellzahl der Kontrolle nur noch 16 %. Es kann bei dieser Zelllinie nicht ausgeschlossen werden, das diese höhere Empfindlichkeit nur auf dem allgemein geringeren Zellwachstum beruht.

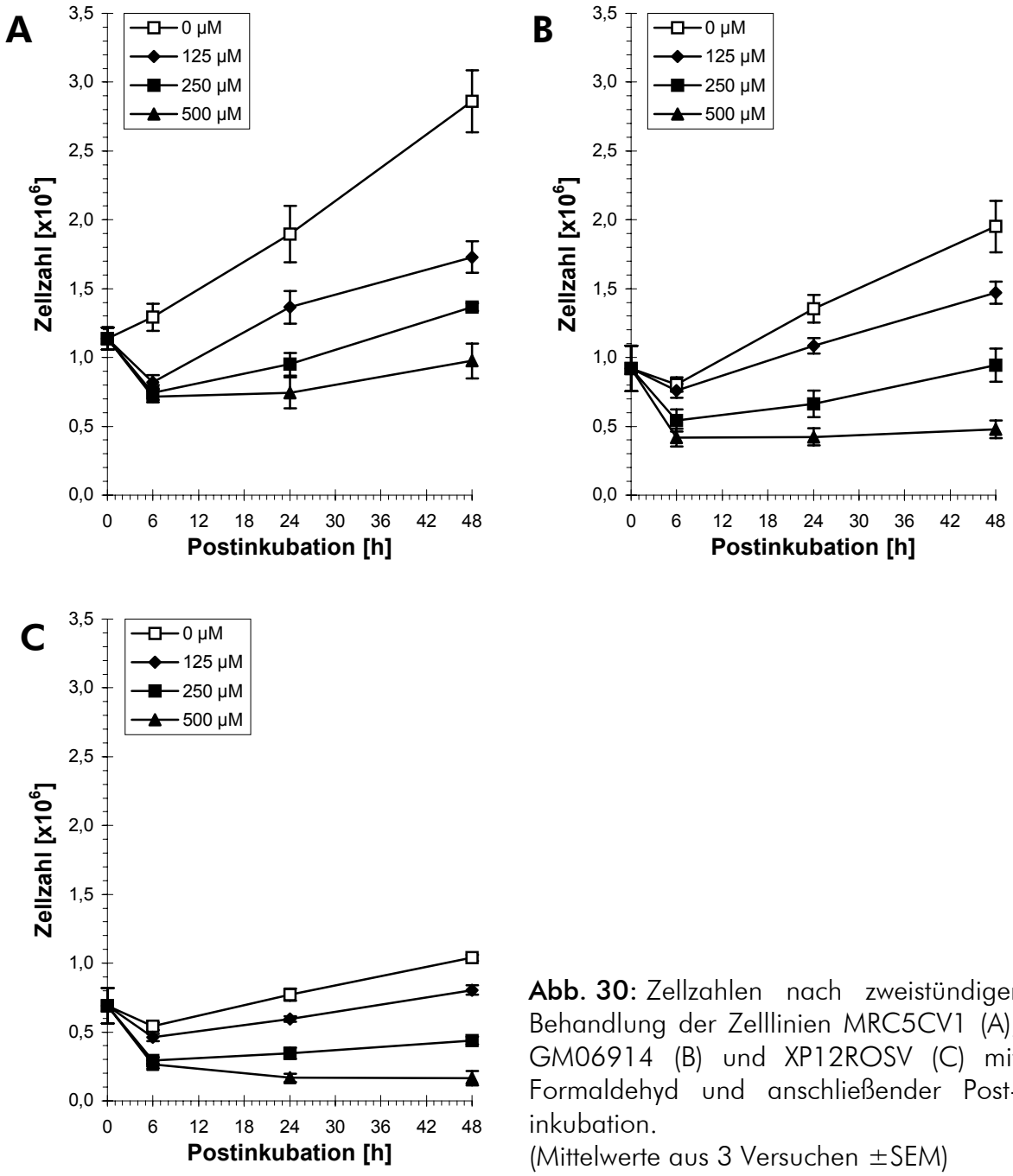


Abb. 30: Zellzahlen nach zweistündiger Behandlung der Zelllinien MRC5CV1 (A), GM06914 (B) und XP12ROSV (C) mit Formaldehyd und anschließender Post-inkubation.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM)

In der Abb. 31 ist der hemmende Effekt einer zweistündigen Formaldehyd-Behandlung der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV auf die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 gezeigt. Alle drei Zelllinien zeigen eine vergleichbare konzentrationsabhängige Reduktion der DNA-Wanderung. Der etwas schwächere Effekt bei XP12ROSV gegenüber den anderen Zelllinien ist statistisch nicht

belegbar. Es existieren auch keine signifikanten Unterschiede zu den Ergebnissen mit V79-Zellen. Damit zeigen die verwendeten Zelllinien keinen Unterschied hinsichtlich der Induktion von DNA-Protein Crosslinks durch Formaldehyd.

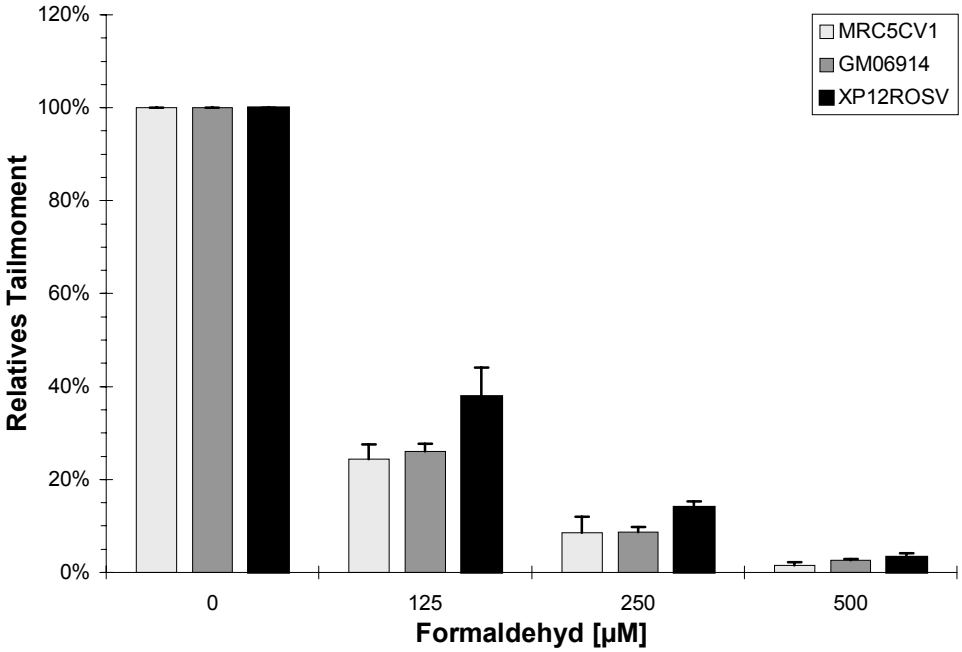


Abb. 31: Reduktion der strahlungsinduzierten (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay nach Behandlung der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV für 2 h mit Formaldehyd.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

Die Kinetik der Wiederherstellung der strahlungsinduzierten (3 Gy) DNA-Migration als Maß für die Reparatur von Crosslinks nach einer zweistündigen Behandlung der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV mit 125 µM Formaldehyd ist in Abb. 32 gezeigt. Diese Konzentration wurde aufgrund der geringen Cytotoxizität und der deutlichen Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay ausgewählt. Direkt nach der Formaldehyd-Behandlung ist ein deutlicher migrationsreduzierender Effekt zu erkennen, der sowohl in der reparaturprofizienten Zelllinie, als auch in den reparatur-defizienten Zelllinien innerhalb von 8 h zeitabhängig aufgehoben wird. Hinsichtlich der Geschwindigkeit der Wiederherstellung der DNA-Wanderung besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den verwendeten Zelllinien. Nach 24 h ist in allen untersuchten Zelllinien kein Unterschied mehr zur bestrahlten Kontrolle zu erkennen, alle haben damit die induzierten DNA-Protein Crosslinks von der DNA entfernt. Diese Ergebnisse stimmen auch völlig mit den Ergebnissen überein, die für V79-Zellen erhoben wurden.

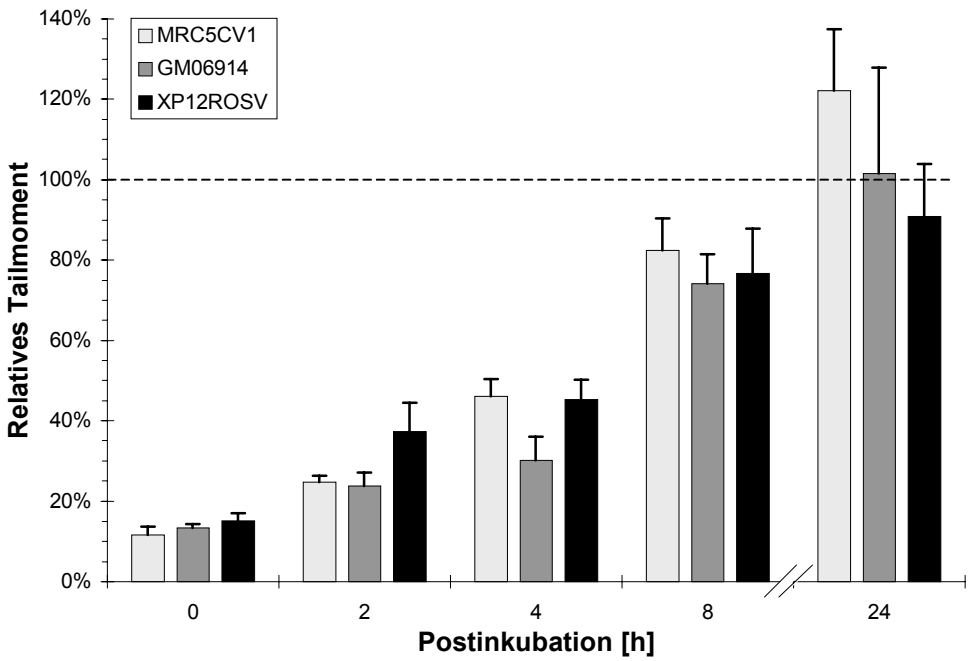


Abb. 32: Aufhebung des migrationsreduzierenden Effektes (+ 3 Gy) im Comet Assay einer zweistündigen Behandlung mit 125 μM Formaldehyd der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV zu verschiedenen Zeiten nach der Behandlung.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.7.2 Mitomycin C-induzierte DNA-DNA Crosslinks

Da sich für Formaldehyd-induzierte DNA-Protein Crosslinks hinsichtlich der Reparaturkinetik keine Unterschiede in den reparaturdefizienten Zelllinien fanden, wurden weitere Versuche mit dem MMC unternommen. Diese sollten einerseits zeigen, ob es Unterschiede in der Reparatur von DNA-Protein Crosslinks gegenüber der Reparatur von DNA-DNA interstrand Crosslinks gibt. Andererseits sollte mit diesen Untersuchungen die bekannte Hypersensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Fanconi Anaemie Zelllinie GM06914 gegenüber MMC bestätigt werden (Duckworth-Rysiecki et al., 1986).

Für die Hemmung des Zellwachstums nach einer zweistündigen Behandlung von $1x10^6$ Zellen mit MMC finden sich deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Zelllinien. Während in MRC5CV1-Zellen eine deutliche Reduktion des Wachstums erst durch 10 μM MMC induziert wird (Abb. 33A), ist dies bei der Fanconi Anaemie Zelllinie GM06914 bereits bei 1 μM der Fall (Abb. 33B). Die Xeroderma Pigmentosum Zelllinie XP12ROSV zeigt eine Hemmung des Zellwachstums schon bei 0,05 μM (Abb. 33C). Die reparaturdefizienten Zelllinien sind damit klar sensitiver gegenüber der toxischen Wirkung von MMC als die Kontrollzelllinie.

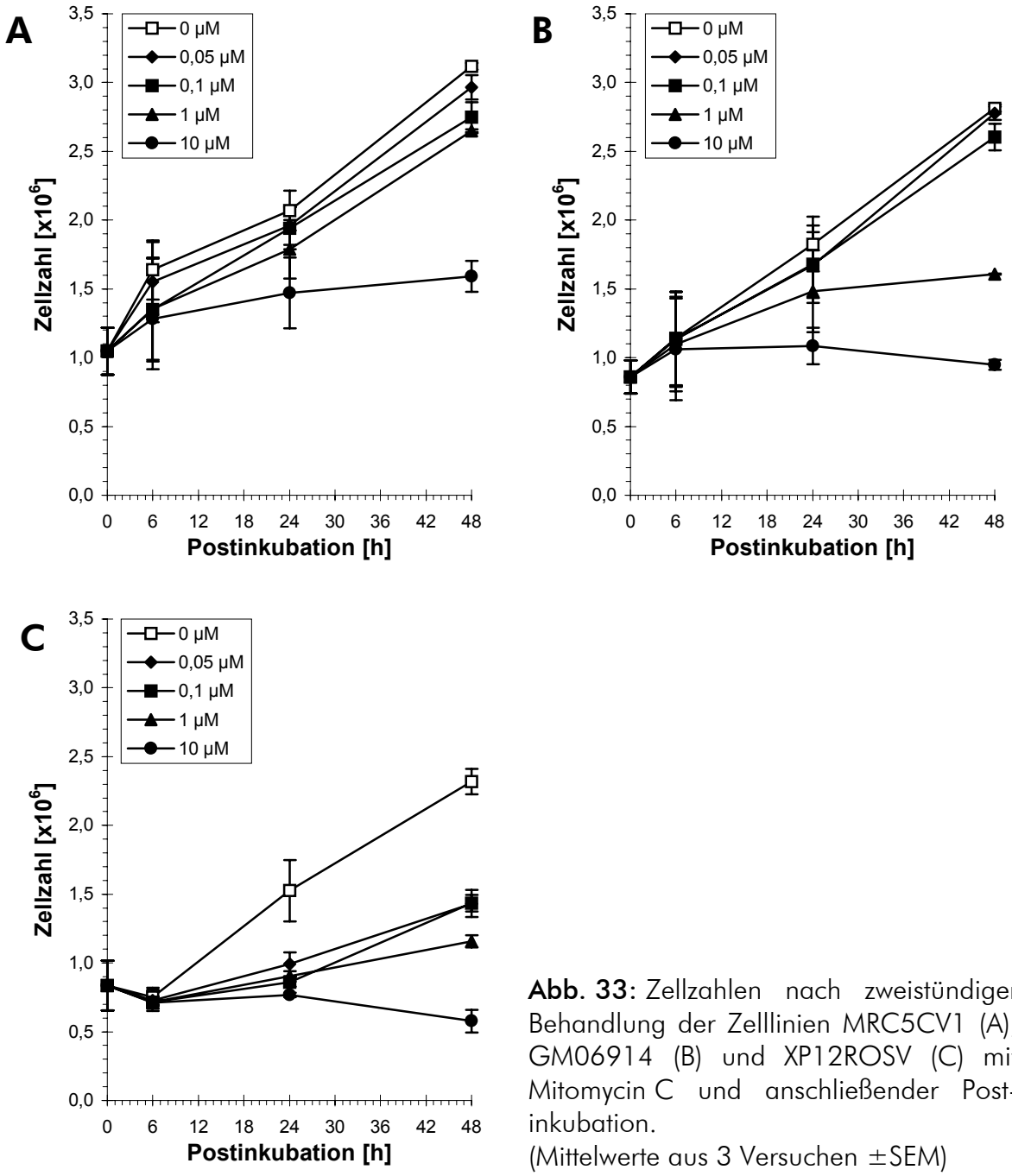


Abb. 33: Zellzahlen nach zweistündiger Behandlung der Zelllinien MRC5CV1 (A), GM06914 (B) und XP12ROSV (C) mit Mitomycin C und anschließender Postinkubation.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM)

Die Abb. 34 zeigt die Reduktion der strahlungsinduzierten (3 Gy) DNA-Migration in den Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV nach einer zweistündigen Behandlung mit 10 µM MMC. Diese Konzentration wurde trotz ihrer starken Cytotoxizität gewählt, da niedrigere Konzentrationen nur eine schwache Hemmung der DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 zur Folge haben und sich somit nicht für Reparaturstudien eignen. In allen untersuchten Zelllinien führt die Behandlung mit MMC zu einem konzentrationsabhängigen Rückgang der strahlungsinduzierten DNA-Migration. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien feststellbar. Die Ergebnisse entsprechen auch den Resultaten, die für V79-Zellen erhoben wurden.

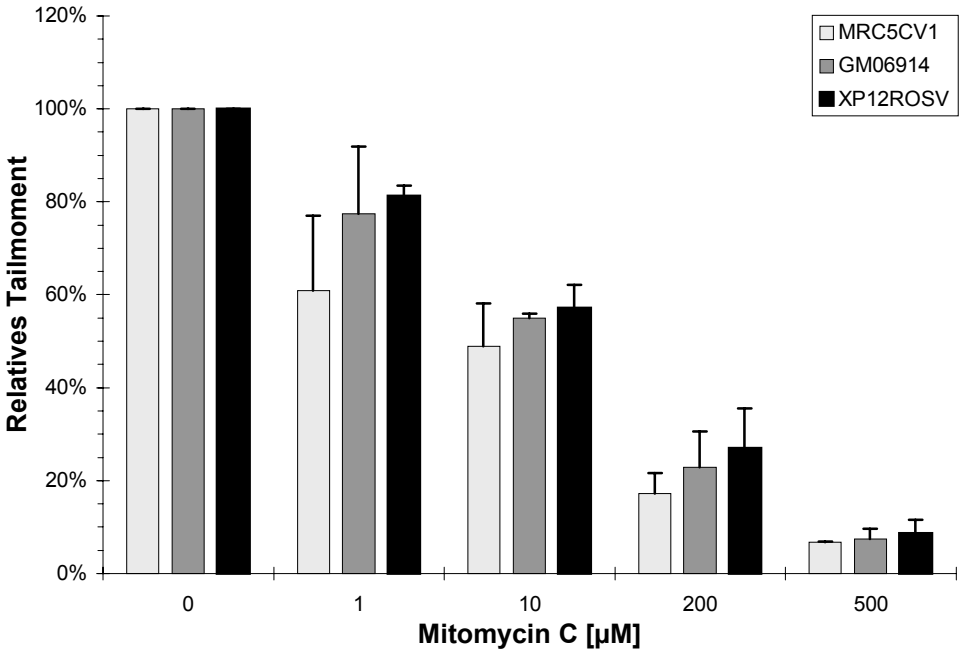


Abb. 34: Reduktion der strahlungsinduzierten (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay nach Behandlung der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV für 2 h mit Mitomycin C.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

Die Aufhebung des migrationsreduzierenden Effektes, als Maß für die Reparatur von Crosslinks, zu verschiedenen Zeiten nach einer zweistündigen Behandlung der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV mit 10 μM MMC, ist in Abb. 35 dargestellt. Die Kontrollzelllinie MRC5CV1 zeigt innerhalb der ersten 8 h nach der Behandlung eine stetige Wiederherstellung der DNA-Migration, während die reparaturdefizienten Zelllinien GM06914 und XP12ROSV keine Unterschiede im Vergleich zur Wanderung der DNA direkt nach der Behandlung zeigen. Nach 24 h ist sowohl bei MRC5CV1, als auch bei GM06914 eine vollständige Aufhebung des hemmenden Effektes der MMC-Behandlung zu sehen. Nur in der Xeroderma Pigmentosum Zelllinie XP12ROSV konnte noch 24 h nach der Behandlung eine deutliche Reduktion der DNA-Migration festgestellt werden, die aber nicht mehr so stark ausgeprägt war, wie direkt nach der Behandlung. Damit besitzen die reparaturdefizienten Zelllinien eindeutig eine verminderte Reparaturkapazität bezüglich MMC-induzierter DNA-DNA Crosslinks. Diese ist in XP12ROSV noch deutlicher ausgeprägt als in GM06914.

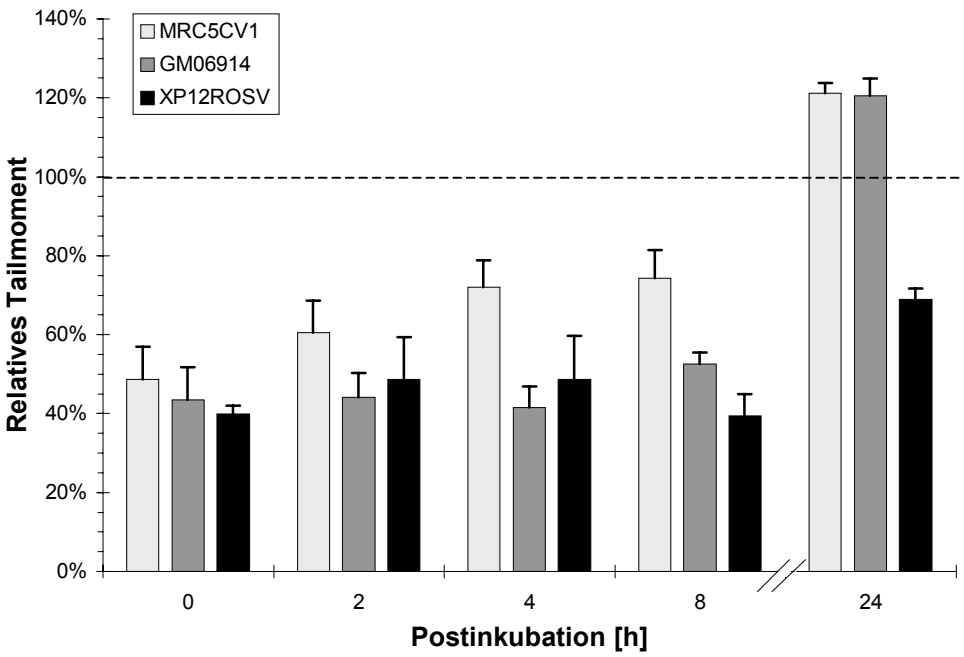


Abb. 35: Aufhebung des migrationsreduzierenden Effektes (+ 3 Gy) im Comet Assay einer zweistündigen Behandlung mit 10 μM Mitomycin C der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV zu verschiedenen Zeiten nach der Behandlung.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.8 Induktion von SCE bzw. Mikronuklei durch crosslinkende Substanzen in V79-Zellen

Um die Bedeutung von Crosslinks für die Mutagenese zu ermitteln, wurden cytogenetische Effekte, wie die Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) oder Mikronuklei, nach Behandlung von V79-Zellen mit verschiedenen crosslinkenden Substanzen untersucht. Diese werden in den folgenden Abbildungen im Vergleich zur Cytotoxizität und den Effekten im Comet Assay mit bestrahlten Zellen dargestellt.

3.8.1 Formaldehyd

Die Ergebnisse des SCE-Tests nach einer vierstündigen Formaldehyd-Behandlung sind in Abb. 36A dargestellt. Unbehandelte Kontrollzellen besitzen eine spontane SCE-Frequenz von 5,11 pro Metaphase, bei 125 μM Formaldehyd steigt diese signifikant ($P<0,05$) auf 17,33 SCE pro Metaphase an. In den höheren Konzentrationen fiel neben den SCE auch ein vermehrtes Auftreten von strukturellen Chromosomenaberrationen auf. Höhere Konzentrationen als 125 μM zeigten eine proliferationshemmende Wirkung und konnten deshalb nicht ausgewertet werden. Keine der untersuchten Metaphasen hatte nach 24 h zwei Zellzyklen durchlaufen und zeigte damit auch keine differentielle Färbung der Chromatiden. Ein Anstieg der SCE-Frequenz kann bei einer Konzentration von 125 μM beobachtet werden. Diese Konzentration hat nur eine geringe cytotoxische Wirkung (Abb. 36C), aber bereits eine deutliche Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 (Abb. 36D) zur Folge.

Auch die Häufigkeit von Mikronuklei ist durch die Behandlung mit Formaldehyd deutlich und konzentrationsabhängig erhöht (Abb. 36B). Die Mikronukleusfrequenz steigt von der Kontrolle mit 0,69 % statistisch signifikant ($P<0,05$) auf 2,69 % in Zellen, die mit 125 μM Formaldehyd behandelt wurden. Eine weitere Steigerung ist mit 9,11 % nach Behandlung mit 250 μM zu beobachten. Eine signifikante Erhöhung der Mikronukleus-Frequenz erfolgt bei der gleichen Konzentration, die auch eine signifikante Erhöhung der SCE-Frequenz zur Folge hat. Damit ist auch ein Anstieg der Mikronukleus-Frequenzen bei Konzentrationen zu beobachten, die nur eine geringe cytotoxische Wirkung zeigen und die bereits eine signifikante Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 verursachen.

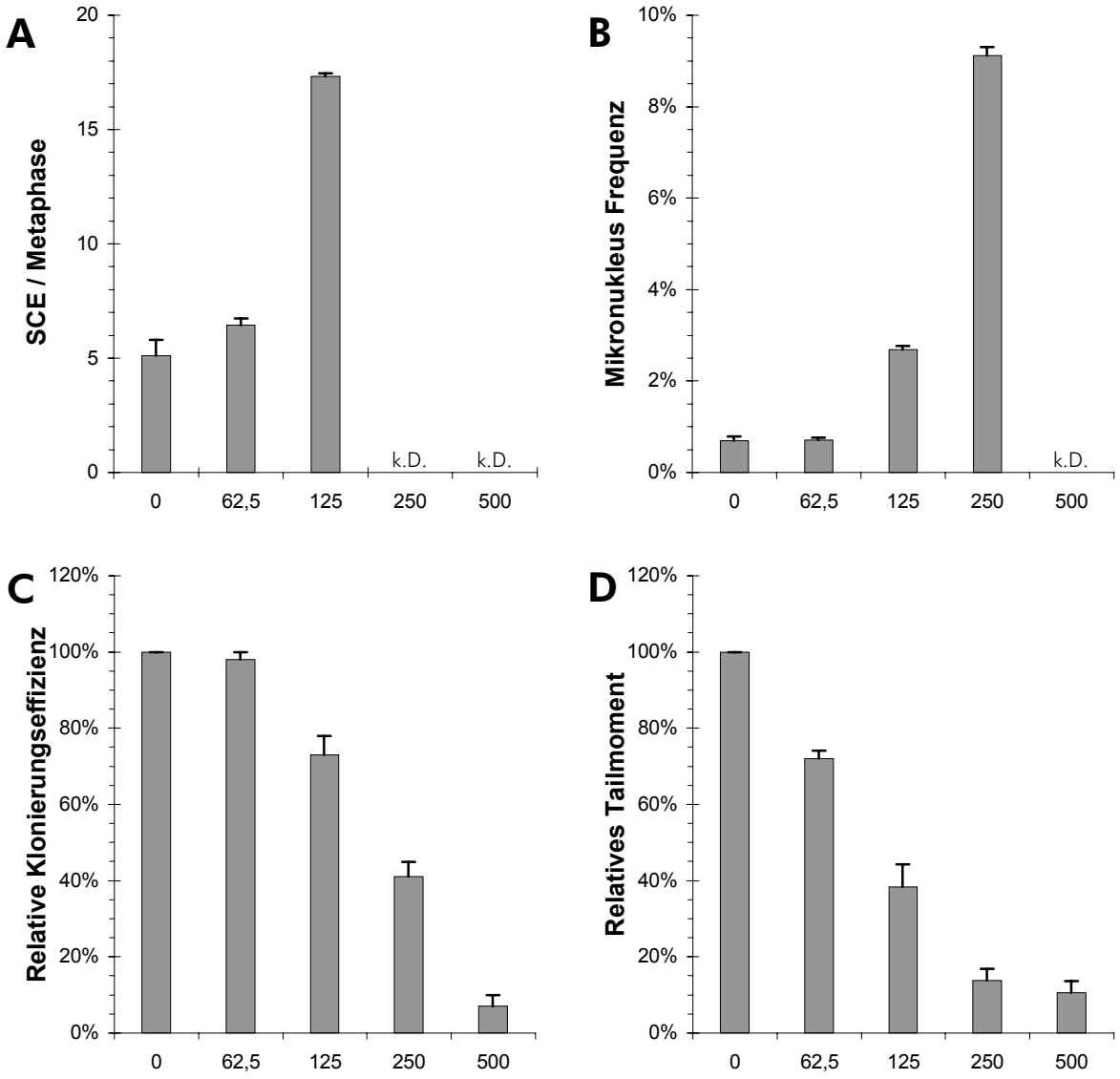


Abb. 36: Einfluss einer vierstündigen Formaldehyd-Behandlung [μM] von V79-Zellen auf das Auftreten von SCE (A), die Induktion von Mikronuklei (B), die Klonierungseffizienz (C) und die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 (D). (Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.8.2 Mitomycin C

Die Abb. 37A zeigt die Häufigkeit von SCE nach einer zweistündigen Behandlung von V79-Zellen mit MMC. Die spontane SCE-Frequenz der Kontrolle liegt bei 4,03 pro Metaphase, nach Behandlung mit MMC findet sich bereits ab 0,05 μM eine statistisch signifikante ($P<0,05$) Erhöhung der SCE-Häufigkeit auf 11,75 pro Metaphase. Bei 0,1 μM ist die SCE-Häufigkeit noch weiter auf 16,63 pro Metaphase erhöht, höhere Konzentrationen konnten aufgrund der proliferationshemmenden bzw. der später einsetzenden cytotoxischen Wirkung nicht ausgewertet werden. Die sehr deutliche

Erhöhung der SCE-Frequenz tritt bereits bei sehr geringen Konzentrationen auf, die keine cytotoxische Wirkung zeigen (Abb. 37B), bzw. die nur eine sehr geringe, statistisch nicht signifikante Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Wanderung im Comet Assay bei pH>13 zur Folge haben (Abb. 37C).

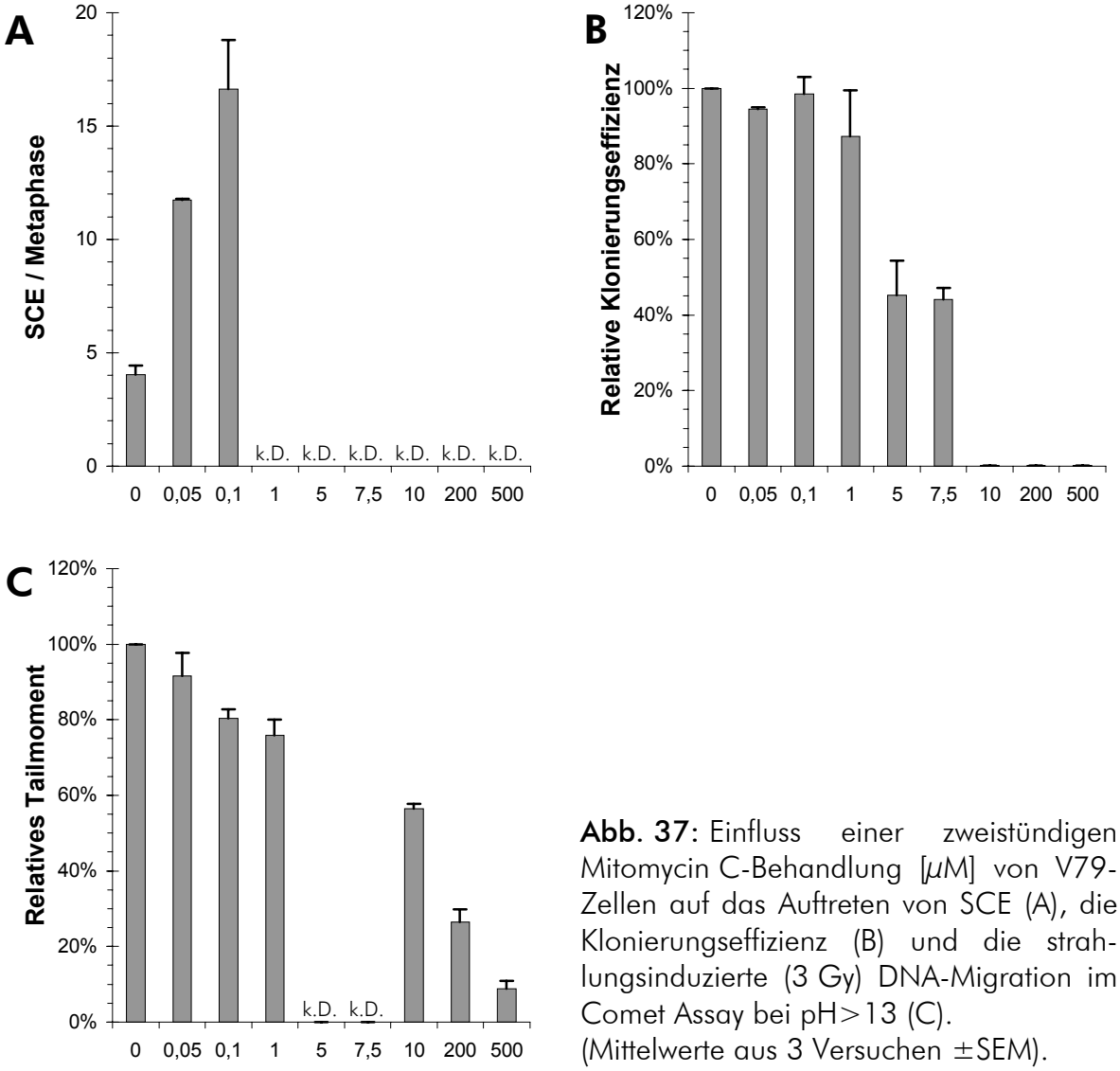


Abb. 37: Einfluss einer zweistündigen Mitomycin C-Behandlung [μM] von V79-Zellen auf das Auftreten von SCE (A), die Klonierungseffizienz (B) und die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 (C).
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.8.3 cis-Platin

Der Einfluss einer zweistündigen Behandlung von V79-Zellen mit cis-Platin auf die Induktion von SCE ist in Abb. 38A zu sehen. Kontrollzellen weisen eine SCE-Frequenz von 4,78 pro Metaphase auf, während eine statistisch signifikante ($P<0,05$) und konzentrationsabhängige Induktion der SCE-Frequenz ab 2 μM auftritt. Bei 2 μM steigt die SCE-Frequenz bereits auf 22,18 pro Metaphase und bei 5 μM sind es sogar 40,28 SCE pro Metaphase. Bei 5 μM ist weder eine cytotoxische Wirkung (Abb. 38B), noch eine sichtbare

Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 (Abb. 38C) zu sehen.

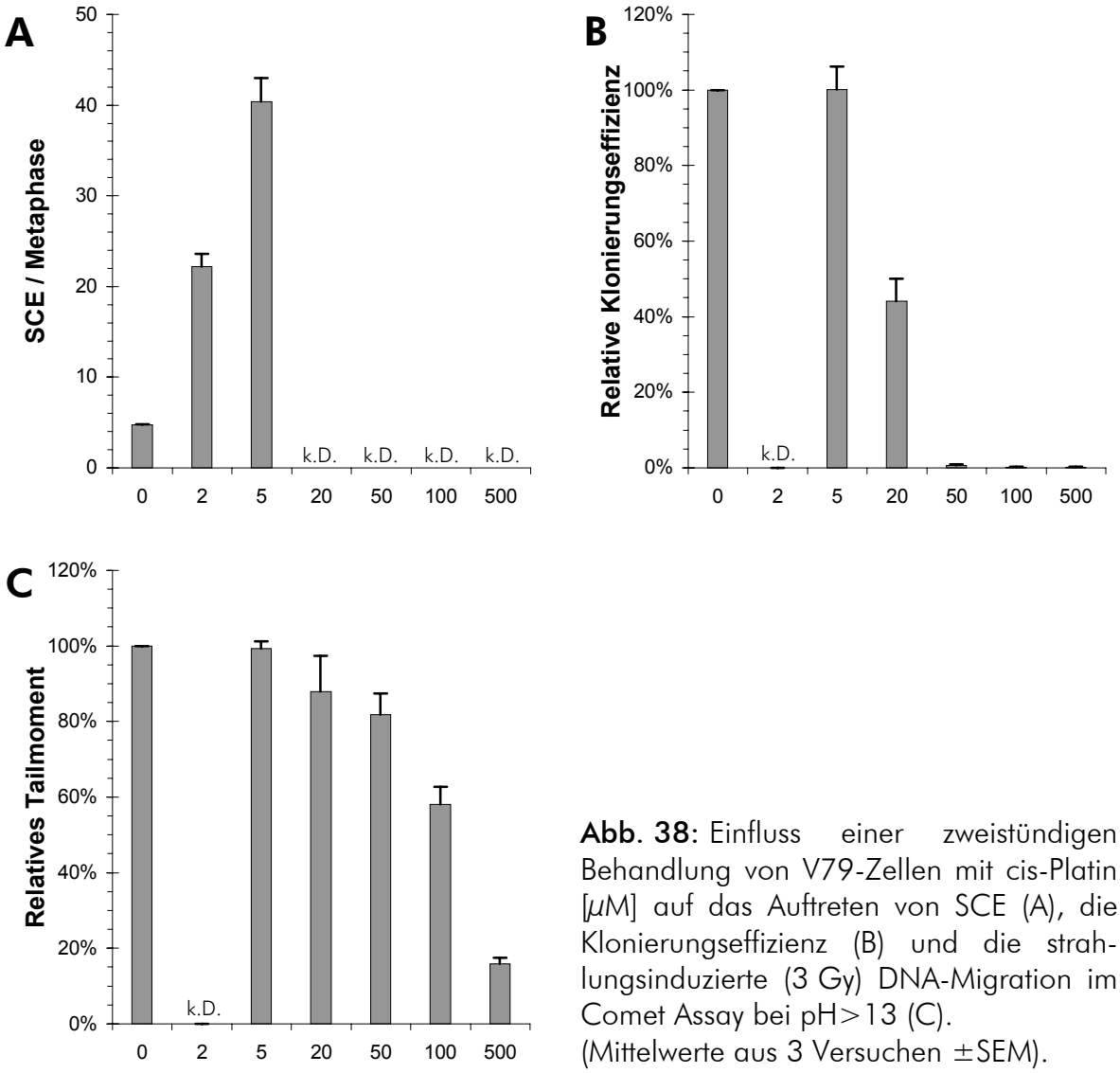


Abb. 38: Einfluss einer zweistündigen Behandlung von V79-Zellen mit cis-Platin [μM] auf das Auftreten von SCE (A), die Klonierungseffizienz (B) und die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 (C).
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.8.4 Kaliumchromat

Eine zweistündige Behandlung von V79-Zellen mit Kaliumchromat hat ebenfalls eine konzentrationsabhängige Zunahme der SCE-Frequenz zur Folge (Abb. 39A). Die unbehandelte Kontrolle zeigt eine SCE-Frequenz von 4,60 pro Metaphase: Ab 10 μM ist ein statistisch signifikanter Anstieg (P<0,05) auf 8,60 SCE pro Metaphase zu sehen, der bei 50 μM sein Maximum bei 15,45 SCE pro Metaphase erreicht. Höhere Konzentrationen konnten aufgrund der proliferationshemmenden Wirkung nicht mehr ausgewertet werden. Dieser deutliche Anstieg der SCE-Frequenz tritt bereits bei gering cytotoxischen

Konzentrationen auf (Abb. 39B), im Comet Assay bei pH>13 ist in diesem Bereich bereits ein geringer Anstieg des Tailmoments zu verzeichnen (Abb. 39C), der allerdings erst ab 50 μM statistisch signifikant ist. Eine signifikante reduzierende Wirkung der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9 ist ebenfalls erst ab 50 μM festzustellen (Abb. 39D).

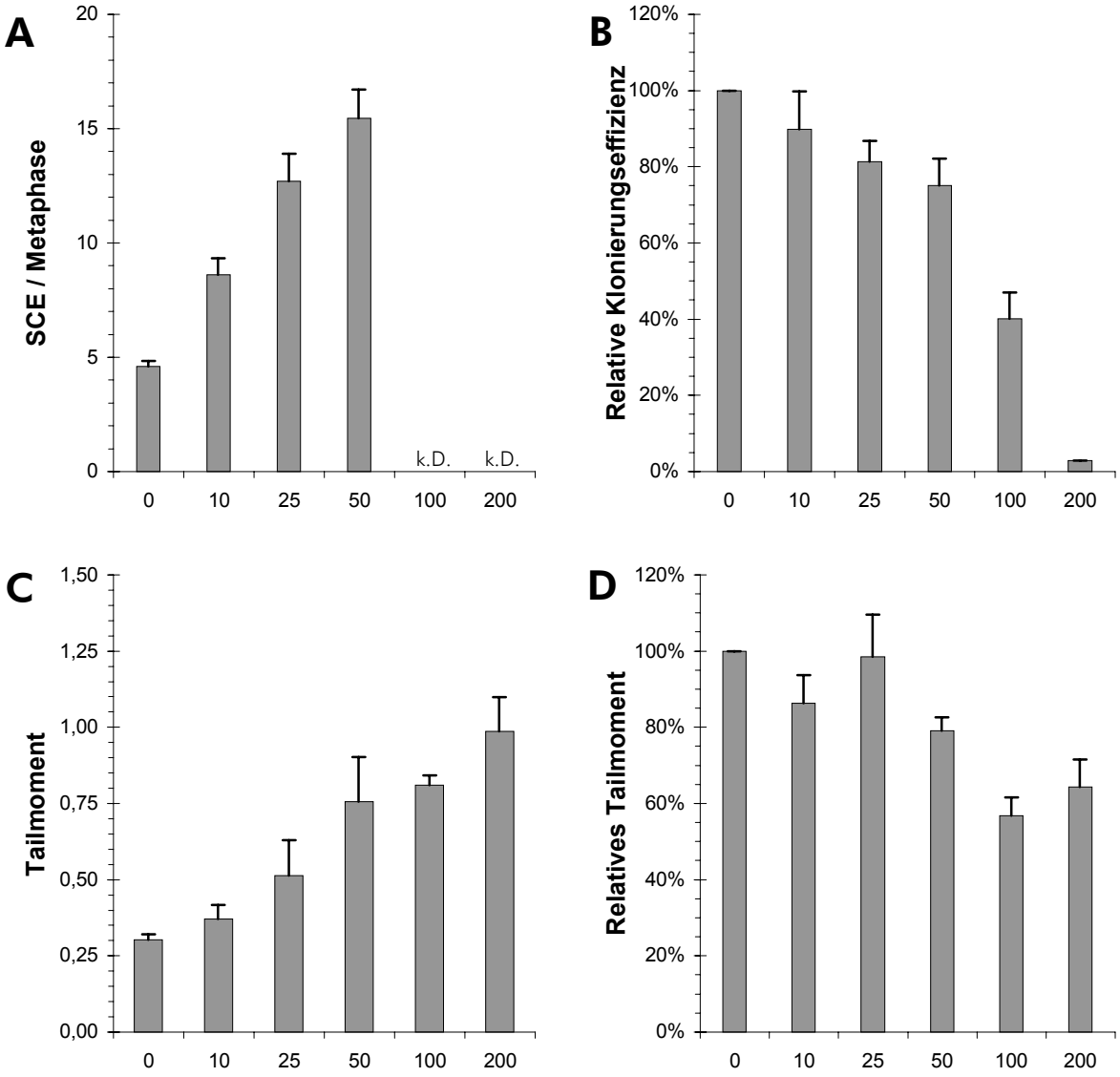


Abb. 39: Einfluss einer zweistündigen Behandlung von V79-Zellen mit Kaliumchromat [μM] auf das Auftreten von SCE (A), die Klonierungseffizienz (B), die DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 (C) und die strahlungsinduzierte (5 Gy) DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9 (D).
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.8.5 Natriumarsenit

Das Auftreten von Mikronuklei nach einer zweistündigen Behandlung von V79-Zellen mit Natriumarsenit ist in Abb. 40A gezeigt. Die Kontrolle besitzt eine Mikronukleus-Frequenz

von 1,3 %, die bis zu einer Konzentration von 10 μM nicht erhöht ist. Ab 25 μM ist ein deutlicher, konzentrationsabhängiger Anstieg von 5,5% bis zu 13,5 % bei 50 μM festzustellen. Die Präparate bei 100 μM konnten aufgrund des stark cytotoxischen Effektes nicht ausgewertet werden. Der Anstieg der Mikronukleus-Frequenz erfolgt parallel zu der Induktion cytotoxischer Effekte (Abb. 40B), während eine Zunahme des Tailmoments im Comet Assay bei pH>13 bereits ab 10 μM zu verzeichnen ist (Abb. 40C). Im Comet Assay bei pH 9 ist kein Hinweis auf Crosslinks zu finden, in unbestrahlten Zellen ist immer noch ein Anstieg des Tailmoments ab 25 μM zu sehen (Abb. 40D).

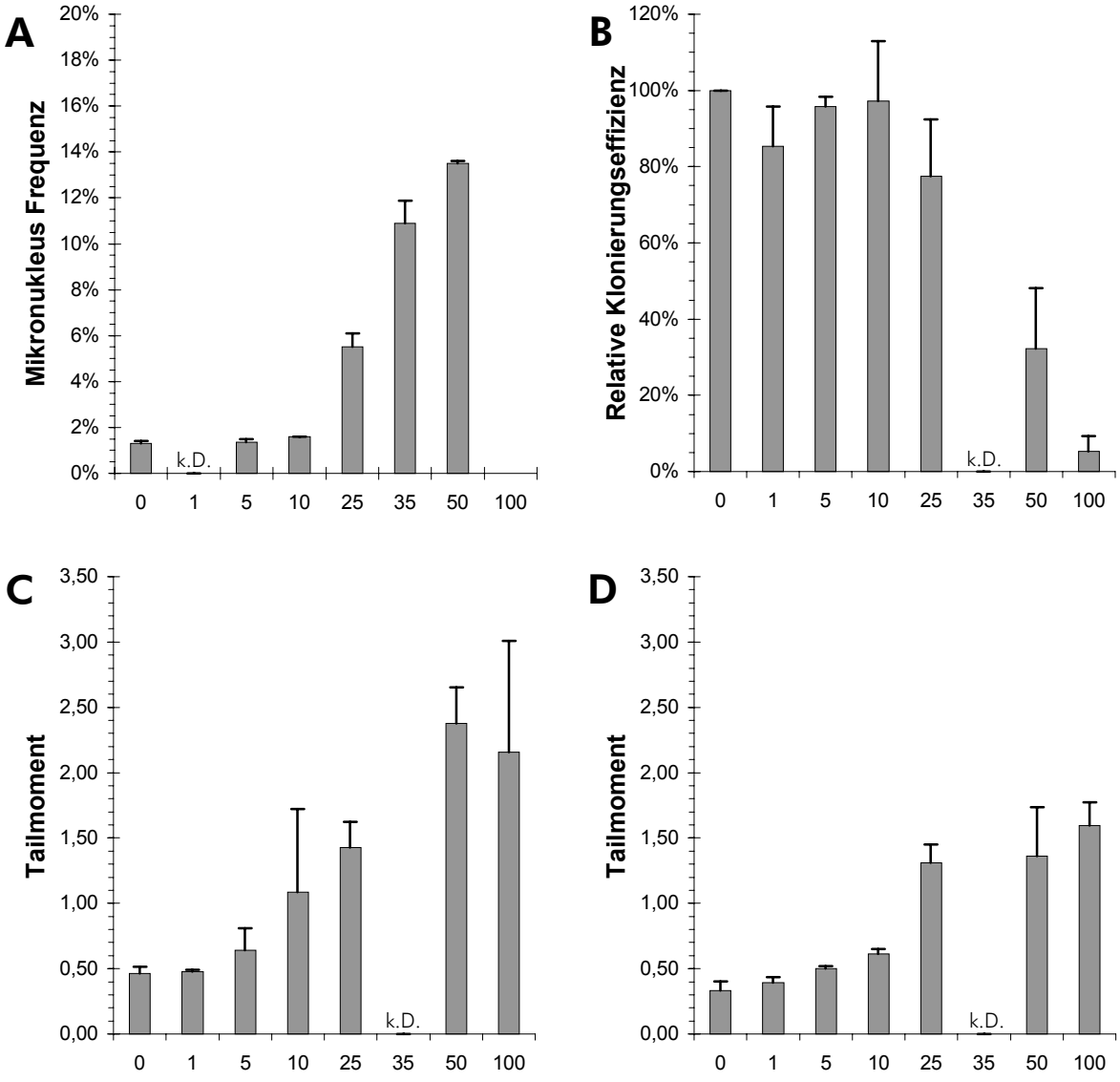


Abb. 40: Einfluss einer zweistündigen Natriumarsenit-Behandlung [μM] von V79-Zellen auf das Auftreten von Mikronuklei (A), die Klonierungseffizienz (B), die DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 (C) und die DNA-Migration im Comet Assay bei pH 9 (D). (Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

3.9 Zusammenhang zwischen Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks und cytogenetischen Effekten in V79-Zellen

3.9.1 Einfluss verschiedener Behandlungsprotokolle auf die Induktion von Mikronuklei durch Formaldehyd in V79-Zellen

Es wurde bereits im Comet Assay untersucht, welchen Einfluss eine mehrmalige Behandlung von V79-Zellen mit Formaldehyd auf die Induktion von DNA-Protein Crosslinks und auf cytotoxische Effekte hat. Da Formaldehyd nach einmaliger Behandlung eine klar klastogene Potenz zeigt, stellte sich nun die Frage nach den cytogenetischen Konsequenzen einer mehrmaligen Behandlung mit Formaldehyd. Durch Vergleich der Menge der induzierten DNA-Protein Crosslinks mit den cytogenetischen Konsequenzen, lassen sich mit diesen Versuchen auch Rückschlüsse auf die Beteiligung von DNA-Protein Crosslinks an den Formaldehyd-induzierten mutagenen Effekten ziehen.

Die Abb. 41A zeigt den Einfluss einer einmaligen Behandlung von V79-Zellen mit Formaldehyd für 4 h (1x 4 h), einer Behandlung für 4 h mit sofortiger Wiederholung (2x 4 h - 0 h) und einer Behandlung für 4 h mit Wiederholung nach 24 h (2x 4 h - 24 h) auf die Induktion von Mikronuklei. In allen drei Behandlungsprotokollen finden sich in der Kontrolle Mikronukleus-Frequenzen von 0,6 %.

Sowohl die einmalige Behandlung, als auch eine Behandlung mit sofortiger Wiederholung führt bis 62,5 μM zu keinem Anstieg der Mikronukleus-Frequenz, ab 125 μM ist in beiden Protokollen eine signifikante Erhöhung der Häufigkeit von Mikronuklei zu erkennen. Nach dem 2x 4 h – 0 h Behandlungsprotokoll ist bei 187,5 μM im Vergleich zu 125 μM nur noch eine geringe Erhöhung zu erkennen, jedoch bewirkt diese Konzentration bereits eine vollständige Hemmung des klonalen Wachstums (Abb. 41B). Im Comet Assay findet sich bis 250 μM für das Protokoll mit sofortiger Wiederholung im Vergleich zu einer einmaligen Behandlung eine etwas geringere Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration (Abb. 41C), diese ist allerdings in beiden Protokollen ab 62,5 μM signifikant erniedrigt.

Nach zweimaliger Behandlung für 4 h mit Wiederholung nach 24 h findet sich, genauso wie nach einmaliger Behandlung, eine Erhöhung der Mikronukleus-Frequenz erst ab 125 μM (Abb. 41A). Bei 187,5 μM führt dieses Protokoll, im Vergleich zur einmaligen Behandlung, zu einer deutlichen Steigerung der Mikronukleus-Frequenz. Bis 125 μM zeigt

dieses Behandlungsprotokoll geringere cytotoxische Effekte, als eine einmalige Behandlung, ab 250 μM ist das klonale Wachstum jedoch stärker erniedrigt (Abb. 41B). Im Comet Assay ist die strahlungsinduzierte DNA-Migration mit diesem Protokoll durchwegs geringer erniedrigt, als nach einmaliger Behandlung (Abb. 41C).

Eine mehrmalige Behandlung verändert damit nicht die Schwelle, ab der cytogenetische Effekte auftreten. Eine sofortige Wiederholung führt zu einer stärkeren cytotoxischen Wirkung, die Mikronukleus-Frequenzen sind in der höchsten getesteten Konzentration jedoch erniedrigt. Wird die Behandlung nach 24 h wiederholt, so ist ebenfalls eine geringfügig erhöhte cytotoxische Wirkung zu sehen, hierbei kommt es jedoch zu einer deutlichen Steigerung der Mikronukleus-Frequenzen.

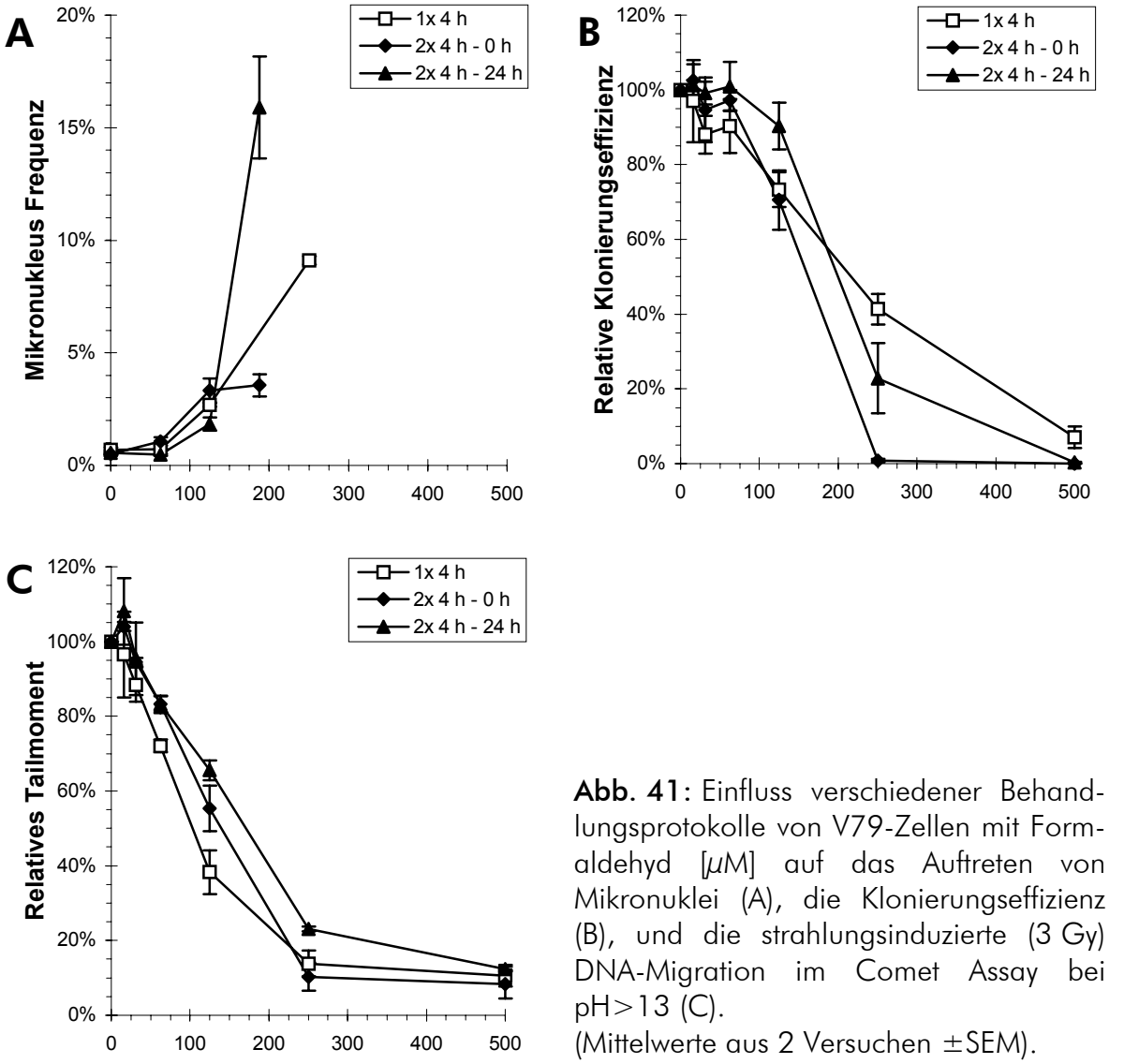


Abb. 41: Einfluss verschiedener Behandlungsprotokolle von V79-Zellen mit Formaldehyd [μM] auf das Auftreten von Mikronuklei (A), die Klonierungseffizienz (B), und die strahlungsinduzierte (3 Gy) DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 (C).
(Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

3.9.2 Persistenz von DNA-Protein Crosslinks und deren Konsequenzen für die Induktion von SCE

Mit dem SCE-Test steht ein Testsystem zur Verfügung, mit dem die Induktion von genotoxischen Effekten nach unterschiedlichen Reparaturzeiten von DNA-Protein Crosslinks untersucht werden kann. Dazu wurden die Zellen für 2 h mit Formaldehyd behandelt und das BrdUrd erst nach verschiedenen Postinkubationszeiten zugegeben. Die differentielle Markierung der Chromatiden erfolgt erst ab BrdUrd-Zugabe, und SCE werden in der zweiten Mitose nur dann sichtbar, wenn sie nach der BrdUrd-Markierung auftreten. Damit sind die am Versuchsende nachgewiesenen SCE durch die bei der BrdUrd-Zugabe noch vorhandenen DNA-Schäden entstanden. Vergleicht man nun die SCE-Induktion nach verschiedenen Postinkubationszeiten mit den noch vorhandenen DNA-Protein Crosslinks, so lässt sich daraus schließen, ob möglicherweise ein ursächlicher Zusammenhang zwischen den Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks und den cytogenetischen Effekten besteht. Die Menge an noch vorhandenen DNA-Protein Crosslinks wurde über die Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay bei pH>13 bestimmt.

In der Abb. 42 sind die Ergebnisse zur Reparatur von DNA-Protein Crosslinks im Comet Assay gezeigt. Eine zweistündige Behandlung mit 125 μM Formaldehyd führt zu einer deutlichen Reduktion der strahlungsinduzierten DNA-Migration, die zeitabhängig wieder abnimmt und nach 4 h bereits 80 % der Wanderung der bestrahlten Kontrolle erreicht. Bei 200 μM ist der hemmende Effekt stärker ausgeprägt, auch hier kommt es innerhalb der ersten vier Stunden zu einer deutlichen Aufhebung der Hemmung, die aber im Vergleich zu 125 μM zu allen Zeitpunkten immer stärker ausgeprägt ist.

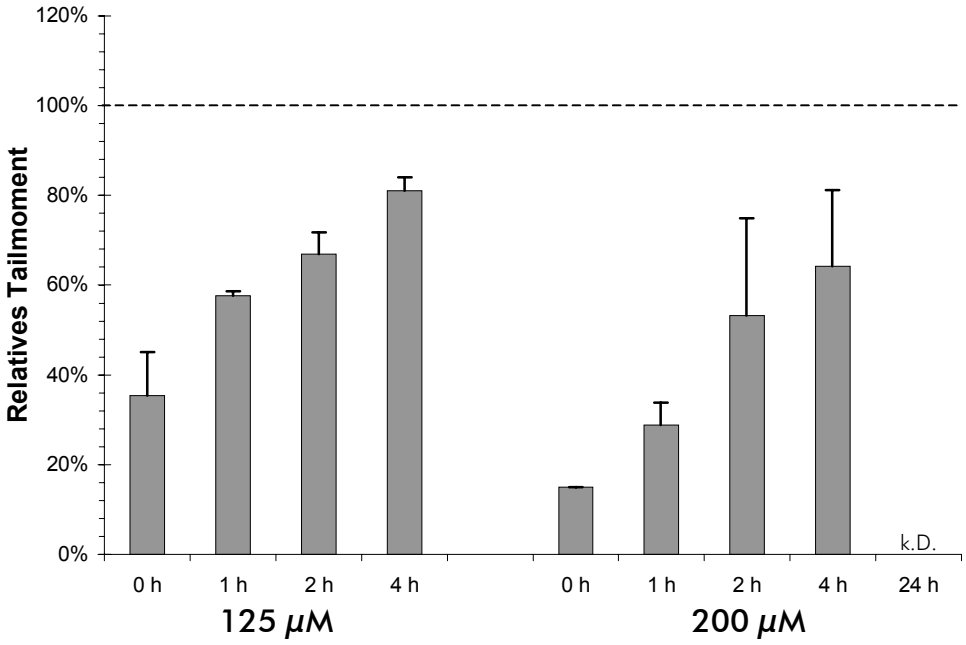


Abb. 42: Aufhebung der Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration (3 Gy) im Comet Assay bei pH>13 zu verschiedenen Postinkubationszeiten nach zweistündiger Behandlung von V79-Zellen mit 125 bzw. 200 µM Formaldehyd.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

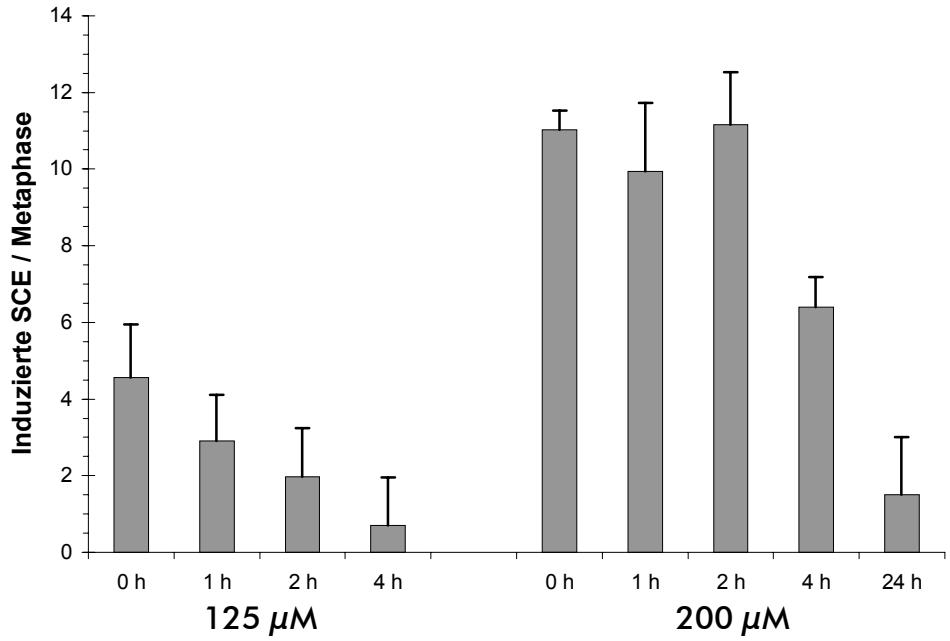


Abb. 43: Induktion von SCE (Kontrollwerte wurden subtrahiert) nach Zugabe von BrdUrd zu verschiedenen Postinkubationszeiten nach zweistündiger Behandlung von V79-Zellen mit 125 bzw. 200 µM Formaldehyd.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

Die Induktion von SCE zu verschiedenen Zeiten nach der zweistündigen Formaldehyd-Behandlung ist in Abb. 43 dargestellt. Gezeigt sind die induzierten Werte, d.h. der Kontrollwert von 6,17 wurde von allen Werten subtrahiert. Direkt nach der Behandlung mit 125 μM findet sich eine deutlich erhöhte SCE-Rate, die mit steigenden Postinkubationszeiten immer weiter abnimmt und nach 4 h fast auf dem Niveau der Kontrolle ist. Nach der Behandlung mit 200 μM ist eine sehr deutliche Erhöhung der SCE-Rate zu sehen, die bis 2 h nach der Behandlung auf gleichen Niveau bleibt und erst nach 4 h abnimmt. Erst nach 24 h ist die SCE-Rate fast wieder auf dem Kontrollniveau.

Vergleicht man die beiden Abbildungen, so erkennt man, dass bei 125 μM eine Reparatur der DNA-Protein Crosslinks parallel zu der verminderten Induktion von SCE verläuft, während bei 200 μM bereits nach 2 h eine deutliche Reparatur festzustellen ist, sich die SCE-Rate in dieser Zeit jedoch nicht ändert. Auch führt eine vergleichbare Menge an DNA-Protein Crosslinks, z.B. 60 % relatives Tailmoment nach 1 h Postinkubation bei 125 μM und 2 h Postinkubation bei 200 μM zu einer unterschiedlichen Induktion von SCE mit 2,9 bzw. 11,6 pro Metaphase.

3.10 Induktion von Mikronuklei durch crosslinkende Substanzen in reparatur-defizienten Zelllinien

Bisher ist die Bedeutung der DNA-Reparatur für die Entstehung der Crosslink-induzierten Mutagenese nicht genau verstanden. Durch vergleichende Experimente in reparaturdefizienten menschlichen Zelllinien sollte untersucht werden, ob eine gestörte Reparatur die Mutagenität von Formaldehyd bzw. MMC verstärkt. Diese Experimente sollten einen Hinweis auf den Zusammenhang zwischen der Induktion von Crosslinks und deren genetische Konsequenzen geben. Als Parameter für mutagene Effekte wurde die Induktion von Mikronuklei gewählt.

3.10.1 Formaldehyd

Die Untersuchungen zur Reparatur von Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks im Comet Assay legen den Schluss nahe, dass es in den verwendeten reparatur-defizienten Zelllinien keine Unterschiede in der Entfernung der Protein-Addukte von der DNA gibt. Betrachtet man dagegen einen cytogenetischen Endpunkt, so finden sich deutliche Unterschiede. In Abb. 44A sind die durch eine zweistündige Behandlung der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV induzierten Mikronukleus-Frequenzen gezeigt. Die Werte von unbehandelten Zellen der Kontrollzelllinie MRC5CV1 und der Fanconi Anaemie Zelllinie GM06914 liegen jeweils bei 3 %, während die Xeroderma Pigmentosum Zelllinie XP12ROSV bereits eine spontane Mikronukleus-Frequenz von 10 % aufweist. In allen drei untersuchten Zelllinien zeigt sich eine konzentrationsabhängige Induktion von Mikronuklei ab 125 μM, wobei die Induktion in den reparaturdefizienten Zelllinien höher liegt, als in der Kontrollzelllinie. Die Xeroderma Pigmentosum Zelllinie zeigt von allen drei untersuchten Zelllinien die größten Mikronukleus-Frequenzen. Neben der Häufigkeit von Zellen mit Mikronuklei ist auch die Anzahl der Zellen mit einer höheren Zahl an Mikronuklei pro Zelle in den reparaturdefizienten Zelllinien deutlich erhöht (Abb. 44B-D).

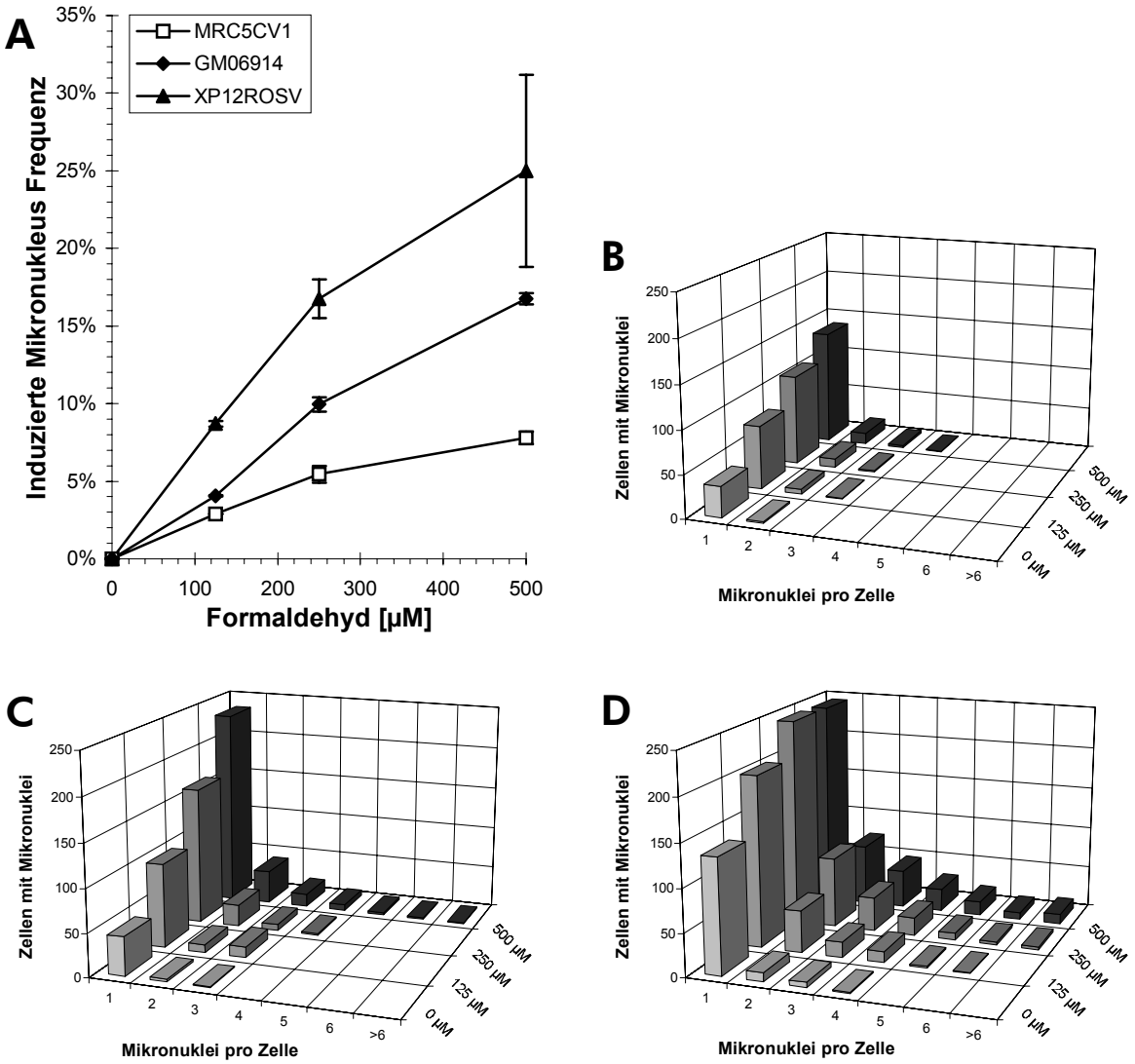


Abb. 44: Induktion von Mikronuklei nach einer zweistündigen Behandlung der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV mit Formaldehyd (A), die Mikronukleus-Frequenz der Kontrollen wurde von den Werten subtrahiert. Die Häufigkeitsverteilung der Anzahl der Mikronuklei pro Zelle nach Formaldehydbehandlung von MRC5CV1 (B), GM06914 (C) und XP12ROSV (D).
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.10.2 Mitomycin C

Bereits im Comet Assay zeigen sich deutliche Unterschiede in der Reparatur von MMC-induzierten DNA-DNA Crosslinks. Während die reparaturdefizienten Zelllinien bis 8 h nach der Behandlung kein Anzeichen einer Reparatur zeigen, kann in MRC5CV1 eine stetige Aufhebung des migrationshemmenden Effektes gemessen werden. 24 h nach der Behandlung zeigen MRC5CV1 und GM06914 keine Reduktion der DNA-Migration mehr, während diese in XP12ROSV immer noch vorhanden ist. Die durch eine zweistündige Behandlung mit MMC induzierten Mikronukleus-Frequenzen sind in Abb. 45A zu sehen. Alle drei untersuchten Zelllinien zeigen bereits bei 0,05 μM eine deutliche Induktion von Mikronuklei, wobei die reparaturdefizienten Zelllinien deutlich höhere Mikronukleus-Häufigkeiten aufweisen. Die stärkste Induktion von Mikronuklei findet sich dabei in der Fanconi Anaemie Zelllinie GM06914. Dieser Befund bestätigt damit die bereits bekannte Hypersensitivität von Fanconi Anaemie Zellen gegenüber MMC (Carreau und Buchwald, 1998). Konzentrationen über 0,1 μM führen zu einer Hemmung des Zellwachstums und konnten daher nicht ausgewertet werden. Die Induktion von Mikronuklei in XP12ROSV ist vergleichbar mit der Induktion nach Formaldehyd-Behandlung. Zusätzlich zur Häufigkeit von Zellen mit Mikronuklei ist auch die Anzahl der Zellen mit einer höheren Zahl an Mikronuklei pro Zelle in den reparaturdefizienten Zelllinien deutlich erhöht (Abb. 45B-D).

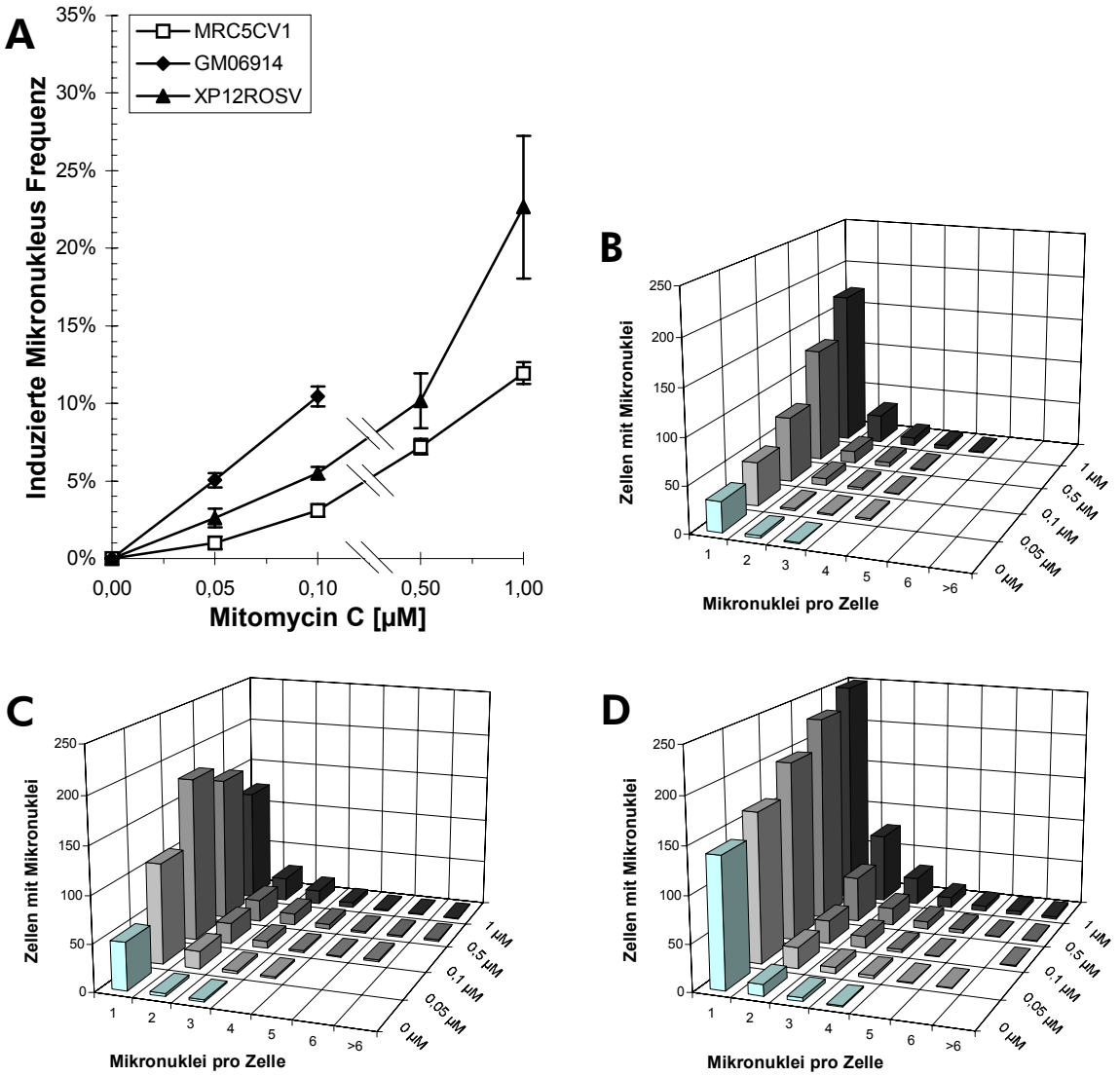


Abb. 45: Induktion von Mikronuklei nach einer zweistündigen Behandlung der Zelllinien MRC5CV1, GM06914 und XP12ROSV mit Mitomycin C (A)), die Mikronukleus-Frequenz der Kontrollen wurde von den Werten subtrahiert. Die Häufigkeitsverteilung der Anzahl der Mikronuklei pro Zelle nach Behandlung von MRC5CV1 (B), GM06914 (C) und XP12ROSV (D) mit Mitomycin C.
(Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.11 Induktion von Genmutationen durch crosslinkende Substanzen

Die bisherigen Ergebnisse zeigen klar, dass Formaldehyd DNA-Protein Crosslinks induziert und sowohl cytotoxische Effekte, als auch Chromosomenmutationen verursacht. Die folgenden Untersuchungen dienten zur weiteren Charakterisierung der mutagenen Wirkung von Formaldehyd. Darüber hinaus wurden mit MMC und cis-Platin Substanzen untersucht, die DNA-DNA Crosslinks induzieren. Mit Kaliumchromat wurde auch eine weitere Substanz getestet, die DNA-Protein Crosslinks induziert. Diese Experimente wurden durchgeführt um das mutagene Potenzial von Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks im Vergleich zu anderen Crosslinks besser charakterisieren zu können.

3.11.1 Nachweis von Genmutationen im V79-HPRT-Mutagenitätstest

3.11.1.1 Formaldehyd

Üblicherweise erfolgt im V79-HPRT-Mutagenitätstest nach der Behandlung eine Expressionszeit von 7 Tagen. Da Formaldehyd in Vorversuchen unter diesen Standardbedingungen jedoch keine Genmutationen induzierte, wurden mit 5 und 9 Tagen noch weitere Expressionszeiten geprüft. Die Ergebnisse nach einer vierstündigen Behandlung mit Formaldehyd sind in Tab. 5 zusammengefasst. Es ist der bereits gezeigte konzentrationsabhängige Anstieg der cytotoxischen Wirkung ab 125 μM festzustellen, bei 500 μM fällt die relative Klonierungseffizienz (rel. CE) unter 10 %. Weder nach 5, noch nach 7 oder 9 Tagen Expressionszeit ist ein signifikanter Anstieg der Mutantenfrequenzen in Formaldehyd-behandelten Zellen zu beobachten. Dagegen führt eine Behandlung mit der Positivkontrolle Ethylmethansulfonat nach allen Expressionszeiten zu einer signifikanten Erhöhung der Mutantenfrequenz, der höchste Wert konnte dabei nach 7 Tagen gemessen werden.

Tab. 5: Einfluss verschiedener Expressionszeiten auf die Mutantenfrequenz im V79-HPRT-Mutagenitätstest nach Behandlung mit Formaldehyd für 4 h. Als Positivkontrolle wurde Ethylmethansulfonat (EMS) verwendet.
(Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

	Formaldehyd				EMS
	0 µM	125 µM	250 µM	500 µM	5 mM
rel. CE	100%	73%	41%	7%	64%
5 Tage	12,5 ±3,7	9,8 ±0,4	11,6 ±3,5	12,6 ±2,0	325,6 ±94,0
7 Tage	16,1 ±2,7	5,6 ±5,6	16,1 ±5,0	17,3 ±3,0	611,9 ± 2,7
9 Tage	14,7 ±3,7	3,3 ±3,3	21,4 ±2,0	14,4 ±3,1	549,3 ±32,2

Auch Variationen des Behandlungsprotokolls führen zu keiner signifikanten Erhöhung der Mutantenfrequenz im V79-HPRT-Mutagenitätstest mit 7 Tagen Expressionszeit. Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse nach einmaliger Behandlung für 4 h (Abb. 46A), nach Behandlung für 4 h mit sofortiger Wiederholung (Abb. 46B) und nach Behandlung für 4 h mit Wiederholung nach 24 h (Abb. 46C). In allen untersuchten Protokollen unterscheidet sich die Mutantenfrequenz nach Formaldehyd-Behandlung nicht von der Mutantenfrequenz der Kontrollen. In Abb. 46C ist zwar ein konzentrationsabhängiger Anstieg im Vergleich zur Kontrolle zu sehen, der absolute Wert bei 500 µM unterscheidet sich jedoch nicht von den Kontrollwerten, die in den anderen Tests erhalten wurden.

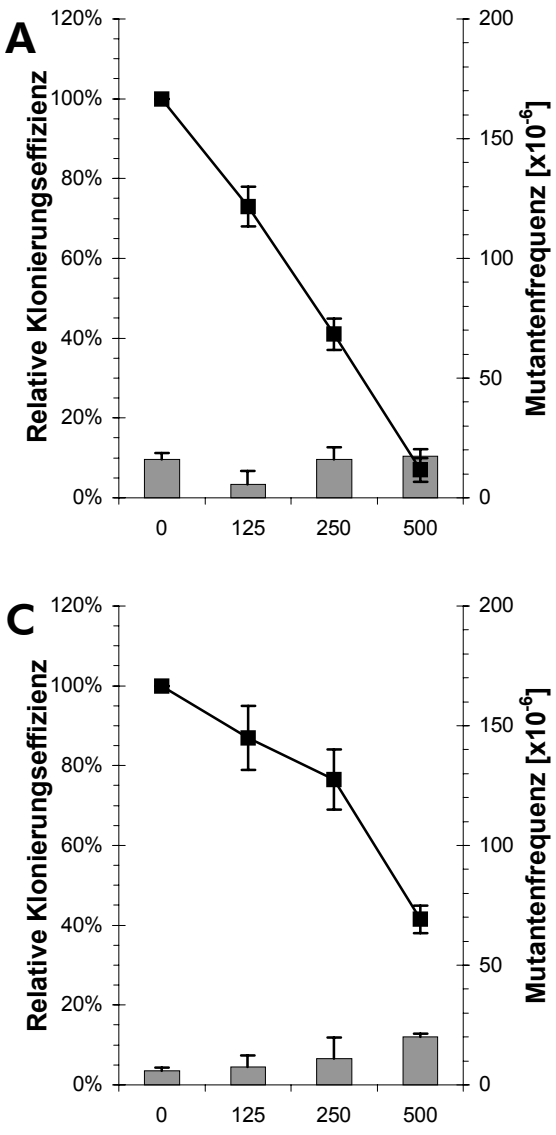


Abb. 46: Induktion von Mutationen im V79-HPRT-Mutagenitätstest nach einer Behandlung mit Formaldehyd [μM] für 4 h (A), für 4 h mit sofortiger Wiederholung (B) und für 4 h mit Wiederholung nach 24 h (C).
(A+C: Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM,
B: Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

3.11.1.2 Mitomycin C und cis-Platin

Die Resultate von MMC und cis-Platin, zwei Substanzen, die überwiegend DNA-DNA Crosslinks induzieren, sind in Abb. 47 dargestellt. Eine zweistündige Behandlung von V79-Zellen mit MMC führt zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des klonalen Wachstums ab 1 μM (Abb. 47A), bei 10 μM ist es vollkommen unterdrückt. Im gleichen Konzentrationsbereich kommt es zu einer deutlichen Induktion von Mutationen am HPRT-Lokus, bei 7,5 μM beträgt die Mutantenfrequenz 73,6 pro 10^6 überlebende Zellen. Bei 10 μM konnte die Mutantenfrequenz aufgrund des Absterbens der Zellen während der Expressionsphase nicht bestimmt werden.

Nach einer zweistündigen Behandlung der Zellen mit cis-Platin kommt es ab 20 μM zu einer deutlichen cytotoxischen Wirkung (Abb. 47B), bei 50 μM ist kein Überleben mehr

möglich. Die Mutantenfrequenz ist ebenfalls ab 20 μM signifikant erhöht und erreicht bei 40 μM mit 159,2 pro 10^6 überlebende Zellen ihr Maximum. Eine Behandlung mit 50 μM ermöglicht kein Wachstum der Zellen während der Expressionsphase.

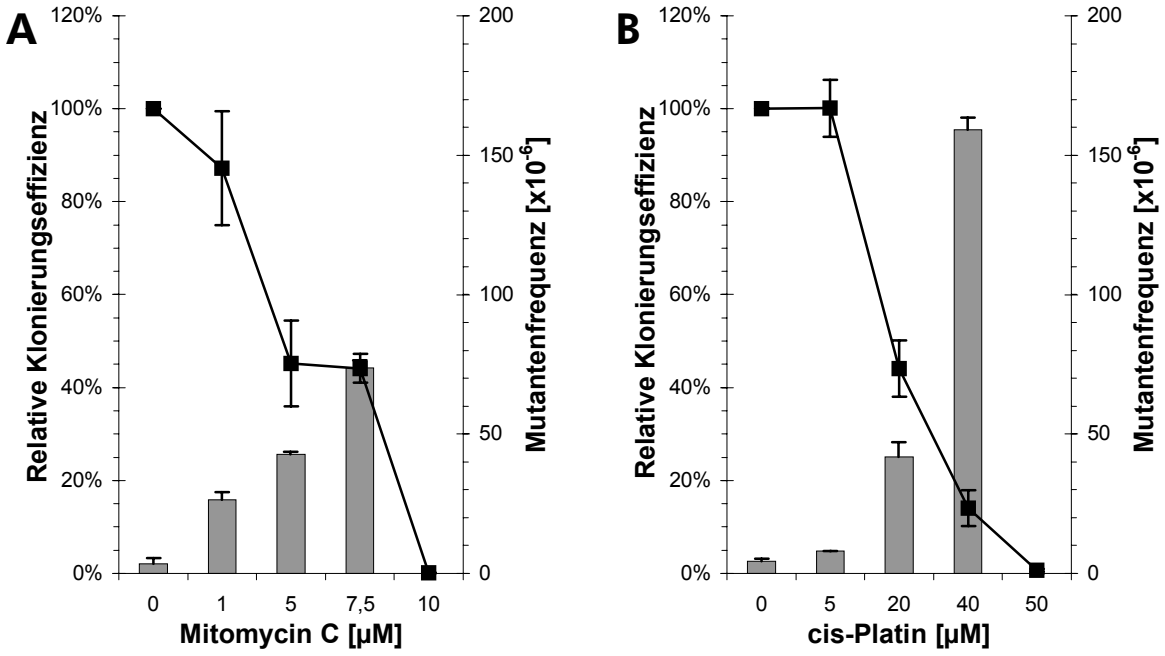


Abb. 47: Induktion von Mutationen im V79-HPRT-Mutagenitätstest nach einer zweistündigen Behandlung mit Mitomycin C (A) und cis-Platin (B).
(Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

3.11.2 Induktion von Mutationen im Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay

Im Gegensatz zum V79-HPRT-Genmutationstest werden im Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay (MLA) neben Genmutationen auch Chromosomenmutationen erfasst. Dieser Test findet deshalb auch Anwendung zum Nachweis mutagener Wirkungen von neuen Substanzen in der chemischen und pharmazeutischen Industrie (Mitchell et al., 1997). Im MLA führt eine mutagene Wirkung nicht nur zur Induktion von TFT-resistenten Kolonien, diese Kolonien unterscheiden sich auch deutlich hinsichtlich ihrer Größe. Dabei werden kleine Kolonien im Zusammenhang mit Chromosomenmutationen gesehen, während für große Kolonien Genmutationen als Mutationsereignis angenommen werden (Moore und Doerr, 1990).

3.11.2.1 Formaldehyd

In L5178Y-Zellen lassen sich im Comet Assay bei pH>13 nach Formaldehyd-Behandlung die gleichen reduzierenden Effekte auf die strahlungsinduzierte DNA-Migration nachweisen wie in V79-Zellen. Da die Ergebnisse praktisch identisch zu den Ergebnissen in Abb. 11B, Seite 55 sind, wurde auf eine Darstellung verzichtet. Damit ist gezeigt, dass Formaldehyd auch in L5178Y-Zellen im gleichen Konzentrationsbereich wie in V79-Zellen DNA-Protein Crosslinks induziert und die Ergebnisse im MLA mit den Ergebnissen in V79-Zellen verglichen werden können.

Die Ergebnisse einer zweistündigen Behandlung von L5178Y-Zellen mit Formaldehyd im MLA sind in Abb. 48 gezeigt. Ein deutlicher konzentrationsabhängiger cytotoxischer Effekt tritt ab 62,5 μM auf. Bei 250 μM ist die relative Klonierungseffizienz auf 30 % erniedrigt. Höhere Konzentrationen hemmen das Wachstum der Zellen vollständig und konnten daher nicht untersucht werden. Im MLA tritt im Vergleich zum V79-HPRT-Mutagenitätstest eine höhere spontane Mutantenfrequenz von 133 pro 10^6 überlebende Zellen auf. Eine statistisch signifikante (P<0,01) Erhöhung der Mutantenfrequenz ist ab 125 μM zu sehen. Bei 250 μM ist die Mutantenfrequenz gegenüber der Kontrolle um das siebenfache erhöht und übersteigt sogar die Mutantenfrequenz der Positivkontrolle 4-Nitroquinolin-1-oxid, die bei 918 pro 10^6 überlebende Zellen liegt.

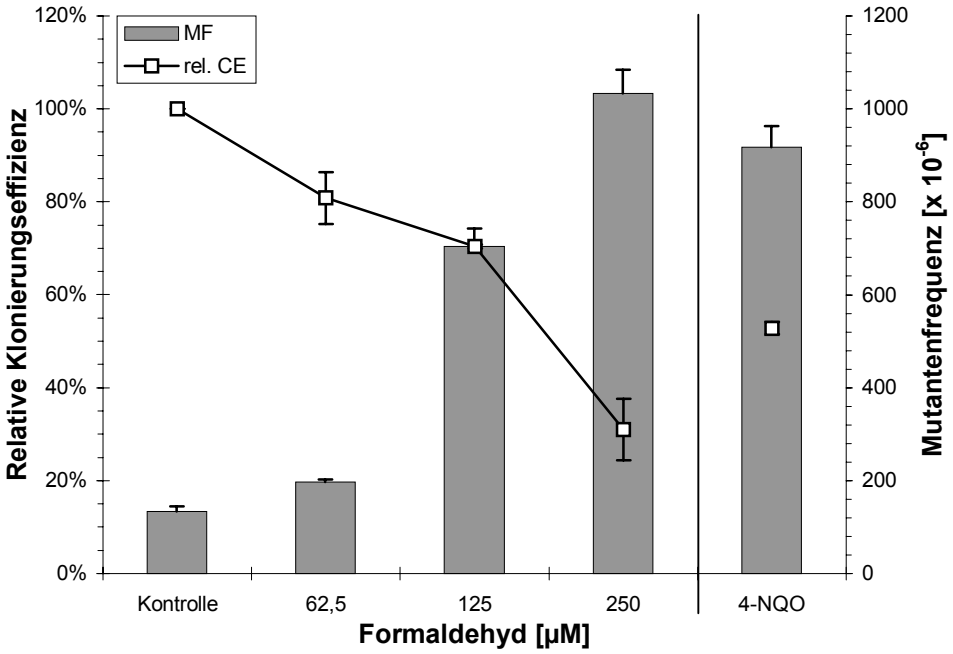


Abb. 48: Induktion von TFT-resistenten Zellen im MLA nach einer zweistündigen Behandlung mit Formaldehyd bzw. mit der Positivkontrolle 4-Nitroquinolin-1-oxid (4-NQO). (Mittelwerte aus 2 Versuchen ±SEM).

Die Anzahl der durch eine zweistündige Formaldehyd-Behandlung induzierten kleinen und großen TFT-resistenten Kolonien ist in Abb. 49 zu sehen. In der unbehandelten Kontrolle finden sich weniger kleine als große Kolonien. Nach einer Behandlung mit 125 µM bzw. 250 µM kommt es zu einer sehr deutlichen Erhöhung der Anzahl kleiner Kolonien, während die Anzahl der großen Kolonien nur geringfügig ansteigt. Bei 250 µM beträgt das Verhältnis zwischen großen und kleinen Kolonien ca. 1:6. Die Behandlung mit der Positivkontrolle 4-Nitroquinolin-1-oxid führt ebenfalls zu einem deutlichen Anstieg der kleinen Kolonien, allerdings kommt es hierbei auch zu einer Erhöhung der Anzahl großer Kolonien.

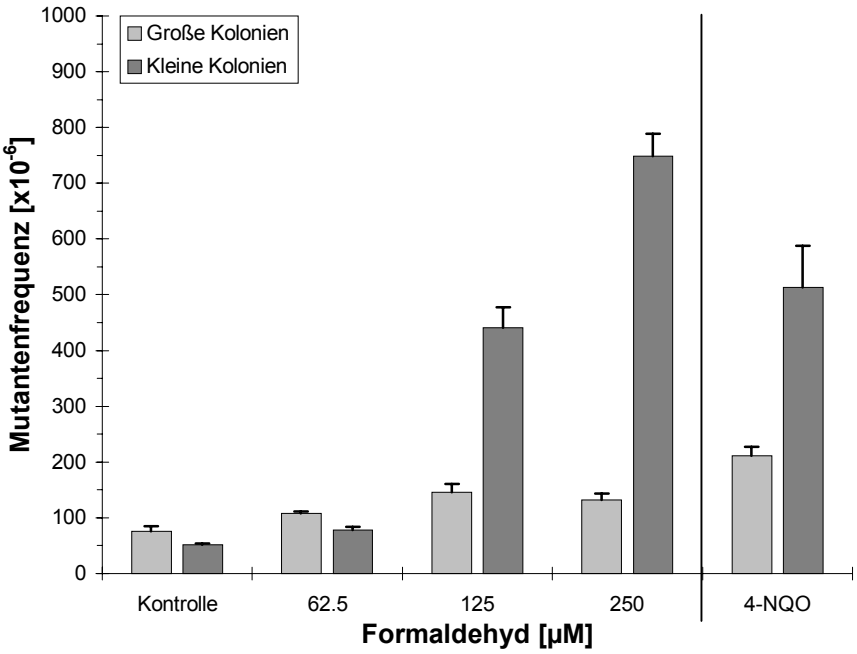


Abb. 49: Induktion von kleinen und großen Kolonien im MLA nach einer zweistündigen Behandlung mit Formaldehyd bzw. mit der Positivkontrolle 4-Nitroquinolin-1-oxid (4-NQO).

3.11.2.2 Kaliumchromat

Zur weiteren Charakterisierung der mutagenen Effekte von Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks wurden auch Versuche mit Kaliumchromat durchgeführt. Es sollte damit geklärt werden, ob auch Chromat-induzierte DNA-Protein Crosslinks zu einer überwiegenden Induktion von kleinen Kolonien und damit zu Chromosomenmutationen führen. Der Einfluss einer dreistündigen Behandlung von L5178Y-Zellen auf die Mutantenfrequenz ist in Abb. 50 dargestellt. Ein statistisch signifikanter ($P<0,05$) Rückgang der relativen Klonierungseffizienz ist ab 25 μM zu beobachten, bei 50 μM liegt sie bereits unter 10 %. Die Mutantenfrequenz der Kontrolle liegt bei 90 pro 10^6 überlebende Zellen und nach Behandlung mit 5 μM ist diese statistisch signifikant ($P<0,01$) erhöht. Bis 50 μM steigt die Mutantenfrequenz konzentrationsabhängig auf 1474 pro 10^6 überlebende Zellen, höhere Konzentrationen konnten aufgrund der starken Toxizität nicht untersucht werden. Die Positivkontrolle Methylmethansulfonat zeigt eine statistisch signifikante ($P<0,01$) Erhöhung der Mutantenfrequenz auf 449 pro 10^6 überlebende Zellen.

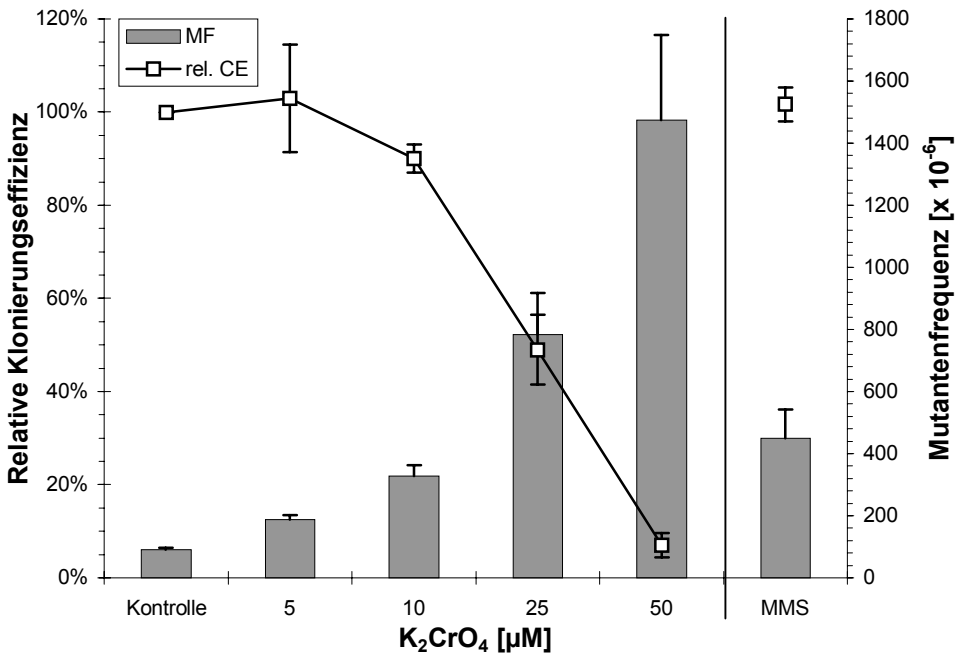


Abb. 50: Induktion von TFT-resistenten Zellen im MLA nach einer dreistündigen Behandlung mit Kaliumchromat bzw. mit der Positivkontrolle Methylmethansulfonat (MMS). (Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

Die Induktion von kleinen und großen Kolonien durch eine dreistündige Kaliumchromat-Behandlung ist in Abb. 51 zu sehen. Die Kontrolle zeigt wieder eine höhere Anzahl großer Kolonien, bei 5 μM ist das Verhältnis beider Koloniegrößen gleich, wobei allerdings im Vergleich zur Kontrolle bereits ein statistisch signifikanter ($P<0,01$) Anstieg der kleinen Kolonien zu sehen ist. Dieser Anstieg setzt sich sehr deutlich bei höheren Konzentrationen fort. Die Menge an großen Kolonien nimmt ab 25 μM statistisch signifikant zu ($P<0,05$), sie steigt jedoch nicht so stark an, wie die Anzahl kleiner Kolonien und bei 50 μM beträgt das Verhältnis zwischen großen und kleinen Kolonien ca. 1:5. Für die Positivkontrolle Methylmethansulfonat ergibt sich eine statistisch signifikante ($P<0,05$) Erhöhung der Anzahl großer und kleiner Kolonien, wobei auch hier mehr kleine Kolonien induziert werden.

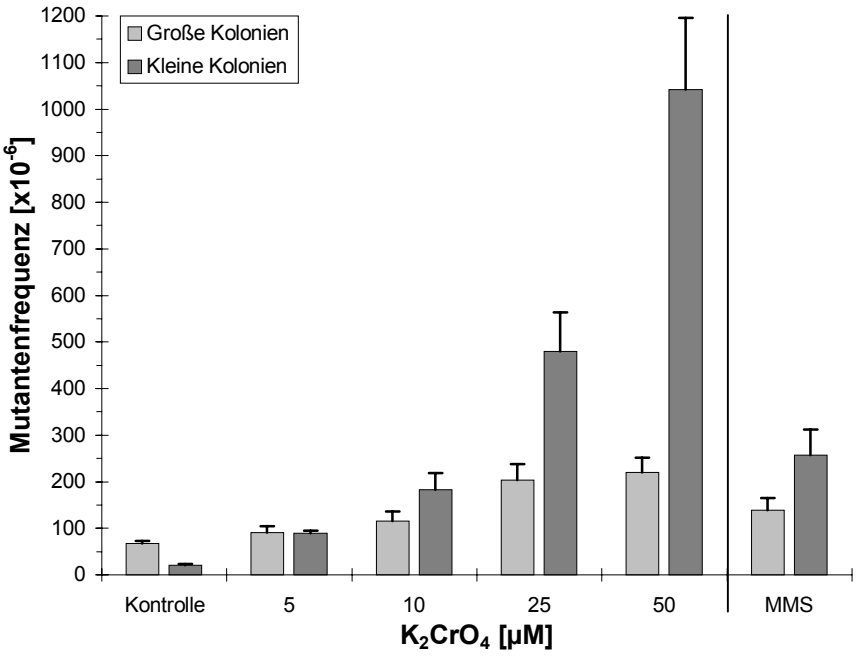


Abb. 51: Induktion von kleinen und großen Kolonien im MLA nach einer dreistündigen Behandlung mit Kaliumchromat bzw. mit der Positivkontrolle Methylmethansulfonat (MMS). (Mittelwerte aus 3 Versuchen ±SEM).

3.11.3 Molekulare Analyse von Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten Zellen

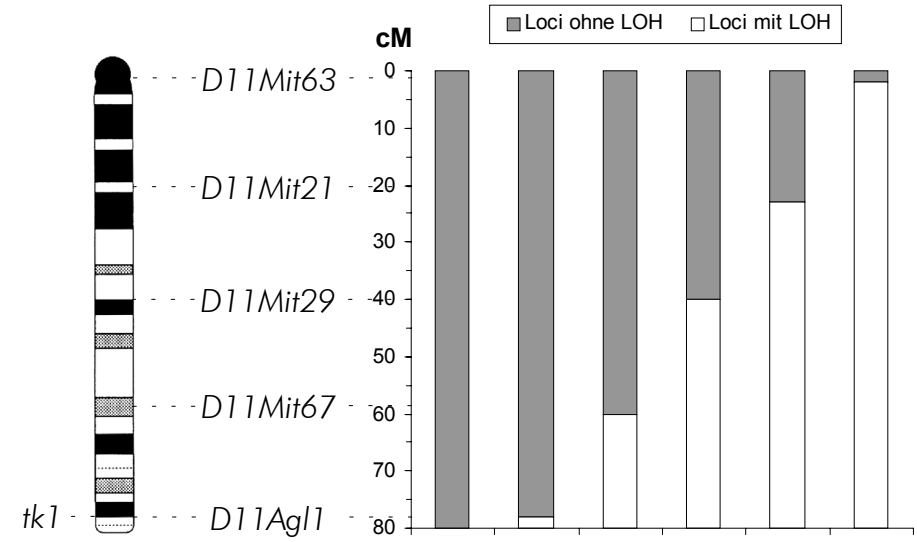
Durch die Entwicklung molekularer Analysetechniken ist es möglich, die Mechanismen, die zum Ausfall der Enzymaktivität der Thymidin Kinase geführt haben, näher zu charakterisieren. Werden diese Untersuchungen an spontanen und mutagen-induzierten Kolonien durchgeführt, lassen sich durch Vergleich des Spektrums der Mutationen Rückschlüsse auf die mutagenen Mechanismen der Substanz ziehen. Die Kombination aus der Analyse von Verlusten der Heterozygotie (LOH) auf Chromosom 11 und der Messung der Länge dieser Chromosomen macht es möglich, Deletionsmutationen von Rekombinationsmutationen zu unterscheiden (Liechty et al., 1998; Preisler et al., 2000). Ein LOH über einen größeren Bereich in Kombination mit einer deutlichen Verkürzung des Chromosoms 11b deutet auf eine Deletion als mutationsauslösendes Ereignis, während ein LOH ohne Verkürzung auf eine Rekombination hinweist. Aufgrund der schlechten Auflösung der Längenmessung kann ein alleiniger LOH am Marker *D11Agl1* nicht als Deletion oder Rekombination unterschieden werden, erst ab dem Marker *D11Mit67* ist dies sicher möglich (Liechty et al., 1998).

Insgesamt wurden 47 spontan entstandene Kolonien molekular untersucht, wobei nach der Isolierung manche Kolonien abstarben und so zwar 25 kleine Kolonien jedoch

nur 22 große Kolonien analysiert werden konnten. Die Abb. 52 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen zum Verlust der Heterozygotie an fünf polymorphen Markern des Chromosoms 11. Keine der untersuchten kleinen Kolonien zeigt Heterozygotie für alle untersuchten Marker, 19 der 25 untersuchten Kolonien haben nur einen LOH des Markers *D11Agl1*. Nur sechs Kolonien zeigen einen LOH über einen größeren Bereich, wobei vier davon alle Marker des Chromosoms 11b verloren haben. Zwölf der 22 untersuchten großen Kolonien zeigen keinen LOH, in fünf kommt es nur zu einem Verlust des Markers *D11Agl1*. Ein LOH über einen größeren Bereich zeigen nur fünf Kolonien, wobei in drei davon ein Verlust aller untersuchten Marker aufgetreten ist.

Von den Formaldehyd-induzierten Kolonien wurden insgesamt 37 auf einen LOH auf dem Chromosom 11 untersucht, 18 kleine Kolonien und 19 große Kolonien. Die Ergebnisse sind in Abb. 52 dargestellt. In jeder der kleinen Kolonien konnte ein LOH in nachgewiesen werden. Der größte Teil (17 von 18) der untersuchten Kolonien hat dabei nur einen Verlust des Markers *D11Agl1* auf Chromosom 11b, nur in einer Kolonie trat ein LOH über einen größeren Bereich auf, dieser reicht jedoch nur bis zum Marker *D11Mit67*. In den 19 untersuchten großen Kolonien finden sich sechs ohne einen LOH und sechs die nur einen LOH im Marker *D11Agl1* zeigen. Es können insgesamt sieben Kolonien identifiziert werden, die einen LOH über einen größeren Bereich aufweisen, wobei nur eine einen Verlust aller untersuchten Marker besitzt.

Kolonien mit einem LOH ab dem Marker *D11Mit67* wurden zur Unterscheidung zwischen Deletion und Rekombination als mutagenes Ereignis weiter mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung untersucht. Diese ermöglicht eine einfache Identifizierung der Chromosomen 11 und weist zusätzlich noch chromosomale Rearrangements nach. Die beiden Chromosomen 11 lassen sich anhand der Größe ihrer Zentromere leicht unterscheiden (Hozier et al., 1982), wobei das funktionelle TK^+-Allel auf dem Chromosom 11b lokalisiert ist, das sich durch den größeren Zentromerbereich auszeichnet. Die Ergebnisse für die Zelllinie L5178Y und die spontan entstandenen Kolonien sind in Tab. 6 gezeigt. Da die absolute Länge der Chromosomen vom Kondensationsgrad abhängt, wurde die Länge der Chromosomen 11 auf die Länge des leicht zu identifizierenden Translokationschromosoms 12/13 bezogen (Liechty et al., 1998; Sawjer et al., 1985). Als Referenz für die TFT-resistenten Kolonien dienten die Werte der Zelllinie L5178Y. Die relative Länge des Chromosoms 11a beträgt 41 %, während das Chromosom 11b aufgrund seines größeren Zentromers eine relative Länge von 42 % besitzt.



								Summe
Spontan	kleine Kolonien	0	19	0	2	0	4	25
	große Kolonien	12	5	2	0	0	3	22
FA-induziert	kleine Kolonien	0	17	1	0	0	0	18
	große Kolonien	6	6	2	4	0	1	19

Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Abb. 52: Anzahl der spontanen und Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten L5178Y-Kolonien mit einem Verlust der Heterozygotie auf Chromosom 11. Nachweis durch PCR-Amplifikation der polymorphen Marker *D11Agl1*, *D11Mit67*, *D11Mit29*, *D11Mit21* und *D11Mit63*. In Kolonien mit einem LOH ab Marker *D11Mit67* wurde zur weiteren Charakterisierung die Länge des Chromosoms 11b mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung untersucht.

Insgesamt elf der 47 untersuchten spontanen Kolonien zeigen einen LOH ab dem Marker *D11Mit67* und konnten mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung näher charakterisiert werden. Nur eine dieser Kolonien (Spo25S) zeigt eine deutliche Verkürzung des Chromosoms 11b und ist damit sicher aufgrund einer Deletion entstanden. Zusätzlich findet sich noch ein zweites Chromosom 11a, da dies jedoch nicht zu einem Verlust der TK-Enzymaktivität führen kann, ist dieser Befund für die Analyse des Mutationsspektrums nicht von Bedeutung. In fünf der elf Kolonien konnte trotz eines deutlichen LOH über einen größeren Bereich keine Verkürzung des Chromosoms 11b und damit ein Verlust von Chromosom 11-Material festgestellt werden. Diese Befunde können nur durch homologe Rekombination zwischen den beiden Chromosomen 11 entstanden sein. Eine weitere Kolonie (Spo12S) besaß ein Chromosom 11b, das nur in seiner proximalen Hälfte ein Fluoreszenzsignal aufweist. Auch hier hat eine Rekombination stattgefunden, diesmal

jedoch mit einem anderen Chromosom. In vier der elf spontanen Kolonien treten zwei vollständig markierte Chromosomen 11 mit einem kleinen Zentromerbereich auf und können somit als Chromosom 11a identifiziert werden. Es wurde kein Chromosom 11b gefunden. Diese vier Kolonien sind damit über ein aneugenes Ereignis entstanden, das zu einem Totalverlust des Chromosoms 11b geführt hat. Eine dieser vier Kolonien (Spo2L) zeigte in 65 % der untersuchten Metaphasen eine reziproke Translokation zwischen einem Chromosom 11a und einem anderen Chromosom. Da das Chromosom 11a aber wie schon erwähnt nicht am Ausfall der TK-Enzymaktivität beteiligt ist, hat dieser Befund keine weitere Bedeutung für das Mutationsspektrum.

Die Ergebnisse der acht Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten Kolonien mit einem LOH über einen größeren Bereich sind in Tab. 7 gezeigt. Auch hier wurde nur eine Kolonie (FA9AS) gefunden, bei der die TFT-Resistenz durch eine Deletion ausgelöst wurde. In sechs Kolonien wurde keine Verkürzung des Chromosoms 11b gefunden, damit sind diese durch eine homologe Rekombination zwischen den beiden Chromosomen 11 entstanden. Eine Kolonie (FA8CL) besitzt ein verlängertes Chromosom 11b, das aber vollständig markiert war. Damit ist diese Kolonie ebenfalls über homologe Rekombination entstanden, der Austausch erfolgte jedoch an zwei unterschiedlichen Stellen auf den beiden Chromosomen 11.

Eine Zusammenfassung der Mutationen, die zur Bildung von spontanen und Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten Kolonien geführt haben, ist in Tab. 8 gezeigt. Man erkennt, dass es in den Formaldehyd-induzierten Kolonien im Vergleich zu den spontanen Kolonien insgesamt seltener zu einem LOH am Marker *D11Agl1* (16 % gegenüber 26 %) gekommen ist. Da der Marker innerhalb des TK-Gens liegt kann man annehmen, dass die TFT-Resistenz in diesen Kolonien durch eine Genmutation entstanden ist. Mehr als die Hälfte aller untersuchten Kolonien besitzt nur einen LOH am Marker *D11Agl1*, die damit entweder durch eine kleine Deletion oder eine Rekombination entstanden sind. Eine weitere Klassifizierung war mit Hilfe der in dieser Arbeit verwendeten Methoden nicht möglich. Der Anteil dieser Kolonien war nach Formaldehyd-Behandlung mit 62 % im Vergleich zu den spontanen Kolonien erhöht, deren Anteil 51 % betrug. Vergleicht man den Anteil der homologen Rekombinationen, so ist dieser Mechanismus mit einem Anteil von 19 % in den Formaldehyd-induzierten Kolonien häufiger zu finden, als in den spontanen Kolonien, die einen Anteil von 13 % zeigten. Dagegen ist der Anteil an Kolonien, die durch größere Deletionen entstanden sind, in spontanen und

Formaldehyd-induzierten Kolonien mit 2 % bzw. 3 % fast gleich. Ein Totalverlust des Chromosoms 11b findet sich in den spontanen Kolonien zu 8 %, während dieses Mutationsereignis in den Formaldehyd-induzierten Kolonien überhaupt nicht gefunden wurde.

Tab. 6: Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der Zelllinie L5178Y und den spontanen TFT-resistenten Kolonien mit einer Chromosom 11 spezifischen Painting-Probe.

	Anzahl Chr.11	Relative Länge 11a	11b	Zentromerbereiche	LOH	Interpretation	Bemerkung
L5178Y	2	41 %	42 %	1x groß, 1x klein	—		Ausgangswerte der Stammzelllinie
Spo7S	2	45 %	47 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit63	Rekombination	
Spo17S	2	44 %	45 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit63	Rekombination	
Spo25L	2	44 %	46 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit63	Rekombination	
Spo15L	2	45 %	47 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit67	Rekombination	Nur 17 Metaphasen untersucht
Spo18L	2	46 %	47 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit67	Rekombination	
Spo12S	2	47 %	24 %[a]	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit29	Rekombination mit Nicht-Chr.11-Material	Translokation auf Chr.11b
Spo25S	3	45 %	35 %	1x groß, 2x klein	Agl1→Mit29	Deletion 11b und Verdopplung 11a	
Spo6S	2	46 %[b]	—	2x klein	Agl1→Mit63	Verlust 11b und Verdopplung 11a	
Spo9S	2	46 %[b]	—	2x klein	Agl1→Mit63	Verlust 11b und Verdopplung 11a	
Spo21L	2	45 %[b]	—	2x klein	Agl1→Mit63	Verlust 11b und Verdopplung 11a	
Spo2L	2	48 %[b]	—	2x klein	Agl1→Mit63	Verlust 11b und Verdopplung 11a	65 % der Metaphasen mit reziproker Translokation auf einem Chr.11a

[a] = bestimmt über die relative Länge des Painting-Signals,
[b] = kein Unterschied zwischen den beiden Chr.11a

Tab. 7: Ergebnisse der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung der Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten Kolonien mit einer Chromosom 11 spezifischen Painting-Probe.

	Anzahl	Relative Länge					
	Chr.11	11a	11b	Zentromerbereiche	LOH	Interpretation	Bemerkung
FA6AL	2	42 %	45 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit29	Rekombination	
FA7AL	2	44 %	45 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit67	Rekombination	
FA7DL	2	43 %	46 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit67	Rekombination	
FA9AL	2	43 %	45 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit63	Rekombination	
FA9BL	2	43 %	45 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit29	Rekombination	
FA9CL	2	43 %	45 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit29	Rekombination	
FA8CL	2	46 %	52 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit29	Rekombination (ungleicher reziproker Austausch)	
FA9AS	2	42 %	39 %	1x groß, 1x klein	Agl1→Mit67	Deletion 11b	

Tab. 8: Zusammenfassung der Mechanismen, die zu spontan entstandenen und Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten Kolonien geführt haben. Die Anzahl der jeweils untersuchten Kolonien ist in Klammern angegeben.

	Spontane Kolonien			FA-induzierte Kolonien		
	Klein (25)	Groß (22)	Gesamt (47)	Klein (18)	Groß (19)	Gesamt (37)
Genmutation (kein LOH)	0 %	54 %	**26 %**	0 %	32 %	**16 %**
Kleine Deletion bzw. Rekombination (LOH nur *D11Agl1*)	76 %	23 %	**51 %**	94 %	32 %	**62 %**
Rekombination	12 %	14 %	**13 %**	0 %	36 %	**19 %**
Deletion	4 %	0 %	**2 %**	6 %	0 %	**3 %**
Totalverlust Chr.11b	8 %	9 %	**8 %**	0 %	0 %	**0 %**

4 Diskussion

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben zu zwei Fragestellungen neue Erkenntnisse erbracht. Zum einen haben sie einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis des Nachweises von Crosslinks im Comet Assay geleistet. So konnte die Sensitivität von unterschiedlichen Protokollen im Hinblick auf die biologische Relevanz der Comet Assay Effekte bewertet werden. Zum anderen konnte mit ihrer Hilfe der bisher nicht geklärte Zusammenhang zwischen Formaldehyd-induzierten DPC und der mutagenen Wirkung von Formaldehyd näher beleuchtet werden. Letztendlich war es durch diese Ergebnisse auch möglich, eine Hypothese zur Entstehung von Formaldehyd-induzierten Mutationen und zur Reparatur von Formaldehyd-induzierten DPC aufzustellen.

4.1 Der Comet Assay zum Nachweis von Crosslinks

Das alkalische Comet Assay Protokoll bei pH>13 nach Singh et al. (1998) wird international als das optimale Protokoll zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen und alkalilabilen Stellen bewertet. Diese Art von DNA-Schäden führt im Comet Assay zu einer Induktion der DNA-Migration. Crosslinks werden, im Unterschied dazu, als die einzig bisher bekannten DNA-Schäden angesehen, die zu einer Reduktion der Wanderung der DNA führen können (Tice et al., 2000). Diese Eigenschaft wurde bereits durch Untersuchungen mit Hilfe verschiedener Comet Assay Protokolle in einigen Publikationen belegt (Hartley et al., 1999; Miyamae et al., 1997; Olive et al., 1992; Pfuhler und Wolf, 1996; Tice et al., 1997). Eine weitere Arbeit berichtet von einer stärkeren Kondensation der Zellkerne im alkalischen Comet Assay nach Behandlung mit crosslinkenden Substanzen (Kuchenmeister et al., 1998).

Zur Bestimmung des hemmenden Effektes von Crosslinks auf die DNA-Migration im Comet Assay muss in allen untersuchten Zellen zuerst eine deutliche und reproduzierbare DNA-Migration induziert werden. Bislang wurde dazu entweder die Behandlungsdauer während der Alkalidenaturierung erhöht (Tice et al., 1997), die Zellen gleichzeitig mit dem crosslinkenden Substanzen und einer Substanz behandelt (z.B. Bleomycin oder MMS), die Strangbrüche induziert (Miyamae et al., 1997; Pfuhler und Wolf, 1996), oder es wurden Strangbrüche durch Bestrahlung der Zellen nach der Behandlung induziert (Hartley et al., 1999; Olive et al., 1992). Vorversuche zeigten, dass eine Erhöhung der Alkali-Behandlungszeiten zwar zu einer deutlichen Induktion der DNA-Migration führen kann,

diese jedoch großen Schwankungen unterliegt und sich deshalb nicht für die sichere Bestimmung einer crosslinkenden Potenz von unbekannten Substanzen eignet. Auch eine Behandlung der Zellen mit einer weiteren chemischen Substanz zur Induktion von DNA-Migration kann problematisch sein, da nicht auszuschließen ist, dass die beiden Substanzen miteinander reagieren. Eine geringere Wanderung der DNA im Vergleich zur Kontrolle kann dann überwiegend auf der abgeschwächten Wirkung des strangbruch-induzierenden Agens beruhen und weniger auf der hemmenden Wirkung von Crosslinks. Daher muss zur sicheren Interpretation der Ergebnisse eine Interaktion der beiden Substanzen durch zusätzliche Versuche ausgeschlossen werden. Aufgrund dieser Überlegungen und den sehr gut reproduzierbaren Ergebnissen, wurden in der vorliegenden Arbeit die Zellen zur Induktion von DNA-Migration im Comet Assay mit γ-Strahlung bestrahlt. Die Bestrahlung führt direkt zu Strangbrüchen und damit zur Wanderung der DNA, eine Interaktion mit der crosslinkenden Substanz kann somit ausgeschlossen werden. Es zeigte sich auch, dass die Bestrahlung im Vergleich zu MMS (Pfuhler und Wolf, 1996) zu einer homogeneren Verteilung der Effekte in den Zellen führt. Auch im sehr weit verbreiteten Protokoll zum Nachweis von Crosslinks in der alkalischen Elution wird Bestrahlung eingesetzt, um die hemmenden Effekte von Crosslinks auf die Elution der DNA aus dem Filter nachzuweisen (Kohn et al., 1980).

Formaldehyd, Mitomycin C (MMC) und cis-Platin führten in der vorliegenden Arbeit im alkalischen Standardprotokoll in Kombination mit γ-Strahlung zu einer Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration. Eine hemmende Wirkung dieser drei crosslinkenden Substanzen wurde auch schon von Pfuhler und Wolf (1996) im alkalischen Comet Assay in Kombination mit MMS-Behandlung an Vollblut gezeigt. Für jeden der untersuchten cross-linkenden Substanzen lag die Stärke der Migrationshemmung, ausgedrückt als relatives Tailmoment, im gleichen Bereich, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit im Comet Assay mit Bestrahlung auftrat. In der Arbeit von Pfuhler und Wolf (1996) führten bereits die geringsten getesteten Konzentrationen zu einer deutlichen Hemmung der DNA-Migration, so dass aus den publizierten Ergebnissen die Nachweisgrenze des verwendeten Comet Assay Protokolls nicht ermittelt werden kann. Da die dort ermittelten Effekte jedoch den Effekten in der vorliegenden Arbeit fast vollständig gleichen, kann angenommen werden, dass beide Protokolle eine ähnliche Nachweisgrenze besitzen. Damit gibt es keine messbaren Unterschiede zwischen dem Comet Assay in Kombination mit MMS und dem hier verwendeten Comet Assay in Kombination mit γ-Strahlung. Auch die Verwendung von

V79-Zellen in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu Vollblut bei Pfuhler und Wolf (1996), zeigt, dass die Verwendung einer Zelllinie keinen Unterschied bei der Bestimmung der crosslinkenden Eigenschaften von unbekannten Substanzen macht, zumindest nicht bei chemischen Agenzien, die ohne metabolische Aktivierung wirken.

Im Gegensatz zu der sehr deutlichen Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay durch Formaldehyd-induzierte DPC, konnte dieser Effekt für Kaliumchromat und Natriumarsenit nicht gefunden werden. Es trat im Gegenteil sogar noch eine zusätzliche Induktion von DNA-Migration auf. Dieser Einfluss von Kaliumchromat auf die Wanderung der DNA im alkalischen Comet Assay wurde auch bereits von anderen Autoren beschrieben. So fand er sich in Magenschleimhautzellen (Blasiak et al., 1999) und in den Wurzelspitzenzellen von *Allium cepa* (Poli et al., 1999). Bisher konnte die Induktion von DPC durch Kaliumchromat im Comet Assay nicht nachgewiesen werden. Dagegen konnten Gebel et al. (1998) und Tice et al. (1997) für Natriumarsenit im alkalischen Comet Assay eine Hemmung der DNA-Migration durch DPC zeigen. Die Ergebnisse im Comet Assay für Natriumarsenit sind jedoch nicht so eindeutig wie für Kaliumchromat, da es auch Arbeiten gibt, die zeigen, dass Natriumarsenit nach einer *in vitro* Behandlung von Blut auch zu einer Zunahme der DNA-Migration führen kann (Hartmann und Speit, 1994). Wie in der vorliegenden Arbeit wurden auch in der Arbeit von Gebel et al. (1998) V79-Zellen verwendet. Da von diesen Zellen jedoch schon sehr viele Sublinien existieren, die zum Teil sogar resistent gegenüber Arsen sein können (Wang und Rossman, 1993), könnte die fehlende Induktion von DPC auf einer Resistenz der verwendeten V79-Sublinie beruhen.

Die Ergebnisse zum Einfluss verschiedener crosslinkenden Substanzen auf die strahlungsinduzierte DNA-Migration im alkalischen Comet Assay zeigen, dass durch dieses Protokoll die crosslinkende Wirkung von Formaldehyd, MMC und cis-Platin nachgewiesen werden kann. Im Vergleich zu einem bereits publizierten alkalischen Comet Assay Protokoll mit MMS-Behandlung, konnten keine Unterschiede in der Stärke der hemmenden Effekte festgestellt werden. Obwohl in der vorliegenden Arbeit Formaldehyd-induzierte DPC eine sehr deutliche Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration auslösten, konnte die crosslinkende Wirkung von anderen DPC-induzierenden Substanzen, wie Kaliumchromat und Natriumarsenit, von diesem Protokoll nicht erfasst werden. Damit scheint dieses Protokoll crosslinkende Wirkungen nur mit Einschränkungen erfassen zu können. Zum

allgemeinen Nachweis einer crosslinkenden Wirkung von unbekannten Substanzen kann es aufgrund dieser Ergebnisse nicht verwendet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der Nachweis von Crosslinks durch den alkalischen Comet Assay prinzipiell möglich ist. Bislang wurden Crosslinks vor allem mit Hilfe der alkalischen Elution nachgewiesen. Für dieses Testsystem existieren bereits anerkannte Protokolle, die von sehr vielen Arbeitsgruppen zur spezifischen Detektion von verschiedenen Arten von Crosslinks verwendet werden (Kohn et al., 1980). Einer der ersten Hinweise, dass Formaldehyd DPC induziert, wurde durch die alkalische Elution erbracht (Ross und Shipley, 1980). Um die Sensitivität des in der vorliegenden Arbeit verwendeten alkalischen Comet Assay Protokolls beim Nachweis von unterschiedlichen Crosslinks bewerten zu können, werden im Folgenden die Konzentrationen, ab der eine crosslinkende Wirkung auftrat, mit denen der alkalischen Elution verglichen. Für Formaldehyd trat im Comet Assay eine Hemmung der DNA-Migration ab einer Konzentration von 62,5 µM auf. Aus verschiedenen Publikationen, in denen die primäre genotoxische Wirkung von Formaldehyd mittels alkalischer Elution bestimmt wurde, kann eine Grenze von 50 µM zum Nachweis von Formaldehyd-induzierten DPC ermittelt werden (Cosma et al., 1988). Für MMC und cis-Platin, die überwiegend DNA-DNA Crosslinks induzieren, liegen die Nachweisgrenzen des Comet Assays für eine crosslinkende Wirkung bei 1 µM bzw. 100 µM. In der alkalischen Elution kann für diese crosslinkenden Substanzen aus bisher publizierten Daten eine Grenze von 20 µM für MMC und 10 µM für cis-Platin abgeleitet werden (Hincks und Coulombe, 1989). Im Gegensatz zum Comet Assay konnte mit der alkalischen Elution die Induktion von DPC durch Kaliumchromat ab 10 µM nachgewiesen werden (Sugiyama et al., 1986). Vergleicht man die Nachweisgrenze der alkalischen Elution für Formaldehyd-induzierte DPC mit der des in der vorliegenden Arbeit verwendeten alkalischen Comet Assays, so kann für beide Testsysteme eine ähnliche Sensitivität festgestellt werden. Für MMC-induzierte Crosslinks scheint das Comet Assay Protokoll sogar etwas sensitiver zu sein. Dagegen konnten cis-Platin-induzierte Crosslinks im alkalischen Comet Assay erst bei einer 10fach höheren Konzentration detektiert werden. Möglicherweise wird die festgestellte geringere Sensitivität des Comet Assays im Vergleich zur alkalischen Elution durch den unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkt verursacht. So konnten Zwelling et al. (1978) die größten Crosslink-Effekte erst 12 h nach der Behandlung beobachten, während die Effekte im Comet Assay bereits direkt nach der zweistündigen Behandlung untersucht wurden. Eine Analyse der

Zellen zu einem späteren Zeitpunkt könnte daher zu einer ähnlichen Nachweisgrenze im Comet Assay bei der Detektion von cis-Platin-induzierten Crosslinks führen, wie in der alkalischen Elution.

Zum spezifischen biochemischen Nachweis von DPC wurde in den letzten Jahren der K-SDS Assay entwickelt (Zhitkovich und Costa, 1992). Im Vergleich zu den Ergebnissen im alkalischen Comet Assay konnten in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des K-SDS Assays Formaldehyd-induzierte DPC jedoch erst ab 125 μM nachgewiesen werden. Aus publizierten Daten zum Nachweis von Formaldehyd-induzierten DPC im K-SDS Assay kann sogar nur eine Grenze von 250 μM entnommen werden (Zhitkovich und Costa, 1992). Die vergleichsweise höhere Sensitivität des Comet Assays könnte darauf beruhen, dass im K-SDS Assay spezifisch nur DPC erfasst werden, während im Comet Assay alle Arten von Crosslinks zu einer Hemmung der DNA-Migration führen können. Die Untersuchungen im Comet Assay mit zusätzlichem Proteinase K-Verdau zeigten jedoch, dass der überwiegende Teil der Hemmung durch Formaldehyd auf den DPC beruht. Bei MMC und cis-Platin konnte dagegen die Hemmung der DNA-Migration durch Proteinase K-Verdau nicht aufgehoben werden. Dies zeigt, dass die beobachtete Hemmung bei diesen Substanzen mehrheitlich auf DNA-DNA Crosslinks beruht. Nach dem Proteinase K-Verdau konnte im Vergleich zur Kontrolle bei den Formaldehyd-behandelten Zellen noch immer eine Hemmung der DNA-Migration beobachtet werden. Neben der Interpretation, dass dies DNA-DNA Crosslinks sind, kann auch vermutet werden, dass es DPC gibt, die einem Verdau durch die Proteinase K nicht zugänglich waren. Möglicherweise war der Verdau der Proteine nach den 2 h Inkubation auch noch nicht vollständig abgeschlossen. Da es bislang in der Literatur keine Hinweise auf eine Bildung von DNA-DNA Crosslinks durch Formaldehyd gibt, kann zunächst davon ausgegangen werden, dass dieser Effekt durch unverdaute DPC ausgelöst wurde. Der Proteinase K-Verdau der Präparate bestätigte, dass die von Formaldehyd im Comet Assay ausgelösten hemmenden Effekte ausschließlich auf DPC beruhen. Daraus folgt, dass Formaldehyd-induzierte DPC mit dem alkalischen Comet Assay sensitiver nachgewiesen werden, als mit dem K-SDS Assay.

Für Kaliumchromat und Natriumarsenit konnte die Induktion von Crosslinks mit dem alkalischen Comet Assay Protokoll nicht gezeigt werden. Die Induktion von DPC durch Kaliumchromat wurde daher in der vorliegenden Arbeit auch mit dem K-SDS Assay überprüft. Dabei konnten ebenfalls keine Hinweise auf eine Bildung von DPC gefunden werden. Der Nachweis von Kaliumchromat-induzierten DPC im K-SDS Assay ist bereits

beschrieben, im Vergleich zu Formaldehyd wurde jedoch eine wesentlich geringere Menge an DPC induziert (Zhitkovich und Costa, 1992). Betrachtet man die Ergebnisse einer Validierungsstudie des K-SDS Assays genauer, so erkennt man, dass auch hier nicht alle teilnehmenden Arbeitsgruppen eine DPC-Induktion durch Kaliumchromat nachweisen konnten (Costa et al., 1996). Damit werden die negativen Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit bestätigt, und es zeigt sich, dass auch der K-SDS Assay problematisch beim Nachweis von Kaliumchromat als crosslinkende Substanz zu sein scheint. Nach Proteinase K-Verdau von Kaliumchromat-behandelten Zellen trat im Comet Assay eine zusätzliche, konzentrationsabhängige Induktion der DNA-Migration auf. Aus diesem Grund kann vermutet werden, dass von Kaliumchromat durch das verwendete Behandlungsprotokoll DPC induziert wurden, die jedoch weder direkt mit dem verwendeten alkalischen Comet Assay Protokoll, noch mit dem K-SDS Assay erfasst wurden.

Der Vergleich des in der vorliegenden Arbeit etablierten alkalischen Comet Assay Protokolls bei pH>13 in Kombination mit γ-Strahlung mit anderen Testsystemen zum Nachweis von Crosslinks zeigt, dass das verwendete Comet Assay Protokoll das Potenzial besitzt, Crosslinks mit der gleichen Sensitivität nachzuweisen. Es hat gegenüber der alkalischen Elution den Vorteil, dass nur wenige Zellen benötigt werden und dass Schäden auf dem Einzelzellniveau nachgewiesen werden können.

Zur Beurteilung der biologischen Bedeutung des crosslinkenden Effektes im alkalischen Comet Assay ist es notwendig, den Einfluss von crosslinkenden Substanzen auf das Überleben der Zellen zu kennen. Die Ergebnisse für Formaldehyd zeigen, dass die Hemmung der DNA-Migration im Comet Assay fast parallel zur cytotoxischen Wirkung verläuft. Eine geringe Migrationshemmung konnte bereits bei einer Konzentration gefunden werden, die noch keinen Einfluss auf das Überleben der Zellen hatte. Im Gegensatz dazu traten Hemmungen der DNA-Migration für MMC und cis-Platin erst bei Konzentrationen auf, die kein Überleben der Zellen mehr zuließen. Die meisten anderen publizierten Untersuchungen zum Nachweis von Crosslinks mit Hilfe des Comet Assays haben die cytotoxischen Wirkungen von crosslinkenden Substanzen nicht, oder nur unzureichend, untersucht. In der Publikation von Pfuhler und Wolf (1996) wurden die cytotoxischen Effekte von Formaldehyd, MMC und cis-Platin mit Hilfe der Vitalitätsfärbung untersucht. Sie fanden damit keine cytotoxische Wirkung von Formaldehyd, selbst nicht bei sehr viel höheren Konzentrationen, als in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Aus

dem Vergleich der Daten zur Cytotoxizität von Formaldehyd von Pfuhler und Wolf (1996) mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Ergebnissen zum klonalen Wachstum ergibt sich eine geringere Sensitivität der Vitalitätsfärbung. Dieser Unterschied im Nachweis von cytotoxischen Effekten zwischen den beiden Tests wurde bereits von Hartmann und Speit (1997) beschrieben. Es kann davon ausgegangen werden, dass die cytotoxischen Effekte von MMC und cis-Platin auch auf den DNA-DNA Crosslinks beruhen. Diese Effekte traten bereits bei Konzentrationen auf, die im Comet Assay noch zu keiner Hemmung der DNA-Migration führten. Daher ist es sehr wahrscheinlich, dass der alkalische Comet Assay DNA-DNA Crosslinks nur sehr insensitiv detektieren kann.

Zur weiteren Charakterisierung des Nachweises von Crosslinks im alkalischen Comet Assay wurden auch vergleichend die Effekte der crosslinkenden Substanzen in anderen Genotoxizitätstests untersucht. Für Formaldehyd traten diese Effekte parallel zu den hemmenden Effekten im Comet Assay auf. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Formaldehyd, trat eine Induktion von SCE bei MMC und cis-Platin bereits bei wesentlich geringeren Konzentrationen auf, als der Nachweis von Crosslinks im Comet Assay möglich war. Für Kaliumchromat und Natriumarsenit, deren crosslinkende Wirkung im alkalischen Comet Assay nicht nachweisbar war, traten ebenfalls genotoxische Effekte, wie SCE bzw. Mikronuklei, auf.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die SCE von den Crosslinks induziert wurden (Wolff und Afzal, 1996). Daher zeigt das parallele Auftreten der Effekte beim Formaldehyd, dass Formaldehyd-induzierte DPC von dem alkalischen Comet Assay Protokoll sehr sensitiv nachgewiesen werden. Für MMC und cis-Platin ist bekannt, dass sie neben den DNA-DNA Crosslinks auch noch andere DNA-Schäden induzieren. Diese können, ohne zu einer Hemmung der DNA-Migration im Comet Assay zu führen, auch SCE induzieren (Linnainmaa und Wolff, 1982; Wolff und Afzal, 1996). Es ist jedoch sehr unwahrscheinlich, dass die Induktion von SCE bei den niedrigen Konzentrationen auf der alleinigen Induktion von anderen DNA-Schäden durch MMC und cis-Platin beruhen. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die SCE bei diesen Konzentrationen auch von DNA-DNA Crosslinks verursacht wurden, die jedoch von dem verwendeten Comet Assay Protokoll nicht detektiert werden konnten. Die migrationssteigernde Wirkung von Kaliumchromat und Natriumarsenit zeigt, dass neben den DPC auch andere DNA-Schäden induziert wurden. Diese können, wie bereits erwähnt, ebenfalls zur genotoxischen

Wirkung beitragen. Für das Kaliumchromat konnte mit Hilfe des Proteinase K-Verdaus gezeigt werden, dass auch DPC induziert wurden. Somit beruhen die beobachteten SCE vermutlich auf DPC, eine Beteiligung von anderen DNA-Schäden an der genotoxischen Wirkung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (Ortiz et al., 1996).

Neben dem alkalischen Protokoll werden auch andere Protokolle zum Nachweis von Crosslinks im Comet Assay eingesetzt. So wurde von Miyamae et al. (1997) der Nachweis von DNA-DNA Crosslinks nach Behandlung von CHO-Zellen mit MMC und cis-Platin mit Hilfe eines Comet Assay Protokolls bei pH 12,1 in Kombination mit Bleomycin-Behandlung untersucht. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des alkalischen Comet Assay Protokolls mit Bestrahlung in der vorliegenden Arbeit, konnten sie bereits einen hemmenden Effekt auf die DNA-Migration ab 0,083 μM bei MMC bzw. ab 5,6 μM bei cis-Platin zeigen. Diese Nachweisgrenze liegt beinahe 12fach niedriger, als die in der vorliegenden Arbeit ermittelte Nachweisgrenze des alkalischen Comet Assay Protokolls. Ob diese niedrigere Nachweisgrenze an dem veränderten pH-Wert des Elektrophorese-puffers liegt, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht überprüft werden, da der in der Publikation angegebene Puffer während der Elektrophorese nicht stabil war. Es kam zur Ausbildung eines pH-Gradienten und damit zu unterschiedlichen DNA-Migrationen, die aber hauptsächlich von der Lage des Objektträgers in der Elektrophoresekammer abhängig waren. Eine Reduktion der Migration im Vergleich zur Kontrolle kann unter diesen Bedingungen nicht sicher auf das Vorhandensein von Crosslinks zurückgeführt werden. Außerdem kann, wie eingangs bereits erwähnt, eine Ko-Inkubation mit Bleomycin zu einer niedrigeren DNA-Migration führen, ohne dass Crosslinks daran beteiligt sind. So kann es durchaus sein, dass die strangbruchinduzierende Wirkung durch Interaktion der beiden Substanzen konzentrationsabhängig herabgesetzt wurde. In der Arbeit von Miyamae et al. (1997) sind jedoch keine weiteren Untersuchungen gezeigt, aufgrund derer man eine Interaktion der beiden Substanzen ausschließen kann. Da sich der Elektrophoresepuffer als sehr instabil erwies, und der Nachweis fehlt, dass die verwendeten Substanzen nicht miteinander reagieren, kann bezweifelt werden, ob der bei niedrigen Konzentrationen gefundene hemmende Effekt in diesem Comet Assay Protokoll tatsächlich auf den Crosslinks beruht.

Der Nachweis einer crosslinkenden Wirkung von Chlorambucil und Ifosfamid gelang Hartley et al. (1999) mit dem Comet Assay bei pH 12-12,5 in Kombination mit 10 Gy

γ-Strahlung. Hierbei konnte nach *in vitro* Behandlung von Lymphozyten mit Chlorambucil eine konzentrationsabhängige Hemmung der DNA-Migration festgestellt werden. Die stärkste Hemmung trat dabei erst 3 h nach der Behandlung auf. Dieses Comet Assay Protokoll konnte auch Crosslinks nach *in vivo* Behandlung von Patienten mit Ifosfamid nachweisen. Eine Etablierung des beschriebenen Comet Assay Protokolls war jedoch in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht möglich, da es bereits in der Kontrolle zu einer sehr starken und variablen Wanderung der DNA aus dem Zellkern kam.

Die Arbeit von Kuchenmeister et al. (1998) zeigt, dass das alkalische Comet Assay Protokoll bei pH>13 auch ohne weitere Modifikationen dazu geeignet ist, eine mögliche crosslinkende Potenz von unbekannten Substanzen nachzuweisen. Ihrer Beobachtung nach führen Crosslinks zu stark kondensierten Zellkernen, die sich im Mikroskop deutlich von den anderen Zellkernen ohne und mit Schweif unterscheiden lassen. Neben verschiedenen anderen bifunktionellen Aldehyden, wurde an isolierten Rattenhepatozyten auch die Wirkung von Formaldehyd auf das Aussehen der Zellkerne im Comet Assay untersucht. Bei der kleinsten getesteten Konzentration von 1200 μM konnten die Autoren jedoch noch keine kondensierten Zellkerne feststellen, während das in der vorliegenden Arbeit verwendete Comet Assay Protokoll die Bildung von DPC nach Formaldehyd-Behandlung bereits ab 62,5 μM klar zeigen konnte. Dagegen konnten die Autoren einen crosslinkenden Effekt erst ab 6100 μM beobachten. Damit scheint der verwendete Endpunkt wesentlich insensitiver zu sein, als die Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration. Zu einem gewissen Teil kann die niedrigere Nachweisgrenze durch die Verwendung von metabolisch kompetenten Rattenhepatozyten erklärt werden. Das Formaldehyd kann in der Zelle an Glutathion binden und dann durch die Formaldehyd-Dehydrogenase metabolisiert werden (Uotila und Koivusalo, 1989). Durch diesen Prozess wird Formaldehyd im Cytoplasma abgefangen und somit die effektiv wirksame Konzentration im Zellkern verringert. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten V79-Zellen besitzen dagegen relativ wenig Glutathion (Köberle und Speit, 1990), daher können bereits geringe Konzentrationen die Bildung von DPC verursachen. Diese Möglichkeit kann aber nicht allein den fast 100fachen Unterschied in der Nachweisgrenze ausmachen, so dass über die Kondensation der Zellkerne Crosslinks sehr wahrscheinlich nicht so sensitiv nachgewiesen werden können, wie über das in der vorliegenden Arbeit verwendete Comet Assay Protokoll.

Um nun ein Protokoll des Comet Assays zu etablieren, das einen spezifischen direkten Nachweis von crosslinkenden Eigenschaften unbekannter Substanzen zulässt, wurden am Beispiel des Kaliumchromats verschiedene Protokollvariationen untersucht. Die im Mikroskop sichtbare DNA-Migration im alkalischen Comet Assay beruht einerseits auf den induzierenden Effekten durch DNA-Schäden wie Strangbrüche und alkalilabile Stellen, andererseits aber auch auf den hemmenden Effekten durch DNA-Schäden wie Crosslinks. Somit können die migrationsinduzierenden Effekte den Nachweis von Crosslinks stören, da der hemmende Effekt von Crosslinks durch eine entsprechende Menge an parallel induzierten DNA-Strangbrüchen bzw. alkalilabilen Stellen aufgehoben werden kann. Da für Kaliumchromat bereits gezeigt ist, dass es neben den Crosslinks auch DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen induzieren kann (Cantoni und Costa, 1984; Sugiyama et al., 1986), können diese für den fehlenden direkten Nachweis der DPC im alkalischen Comet Assay verantwortlich sein. Außerdem zeigen die publizierten Befunde im K-SDS Assay, dass Kaliumchromat weniger DPC als Formaldehyd verursacht (Zhitkovich und Costa, 1992). An diesen DPC ist im Gegensatz zu den Formaldehyd-induzierten DPC hauptsächlich Actin beteiligt (Costa, 1991). Die geringere Menge an DPC und die Möglichkeit, dass das Actin eine geringere Potenz besitzt, die DNA-Migration im Comet Assay zu hemmen als die Formaldehyd-induzierten DNA-Histon Crosslinks, können ebenfalls zur fehlenden Detektion der Kaliumchromat-induzierten DPC in diesem Comet Assay Protokoll beitragen.

Die von Kaliumchromat verursachten DNA-Strangbrüche und alkalilabilen Stellen werden innerhalb weniger Stunden repariert, während die Reparatur der DPC länger dauert (Sugiyama et al., 1986). Damit sollte es einen Zeitpunkt nach der Behandlung geben, an dem die meisten der migrationsinduzierenden DNA-Schäden repariert, die DPC jedoch noch vorhanden sind und dann eine Hemmung der DNA-Migration im Comet Assay bewirken können. Auch für die maximale Ausbildung der hemmenden Effekte im Comet Assay durch Chlorambucil in Lymphozyten war eine zusätzliche dreistündige Inkubation nach der Behandlung nötig (Hartley et al., 1999). Eine zusätzliche Postinkubation zeigte zwar, dass die migrationsinduzierenden DNA-Schäden innerhalb von 4 h repariert werden, jedoch konnte zu keinem Zeitpunkt ein Hinweis auf Crosslinks gefunden werden. Möglicherweise ist die Menge an DPC, die dann noch vorhanden ist, zu gering, um im Comet Assay erfasst zu werden.

Da die von Kaliumchromat induzierten DPC durch EDTA aufgelöst werden können (Mattagajasingh und Misra, 1999; Miller und Costa, 1988) und die Puffer des Comet Assays EDTA beinhalten, ist es auch möglich, dass während der Durchführung des Comet Assays die induzierten DPC gelöst werden und somit zu keiner Hemmung der DNA-Migration führen. Die Ergebnisse in einem EDTA-freien Protokoll des Comet Assays zeigten zwar im Vergleich zum Standardprotokoll geringere induzierende Effekte und damit möglicherweise einen Hinweis auf hemmende Effekte durch Crosslinks. Im Vergleich zur Kontrolle trat jedoch keine Reduktion der DNA-Migration auf, somit wurden die Crosslinks nicht direkt nachgewiesen. Damit verbessert auch dieses Protokoll nicht den direkten Nachweis von Kaliumchromat-induzierten DPC.

Durch Veränderung des pH-Wertes während der Alkalibehandlung und der Elektrophorese lässt sich direkt die Sensitivität des Comet Assays bezüglich verschiedener Arten von DNA-Schäden beeinflussen. Liegt der pH-Wert unter 13, erfolgt keine Umwandlung der alkalilabilen Stellen in Strangbrüche und somit haben diese keinen Einfluss mehr auf die DNA-Migration. Unter pH 12,5 bleibt die DNA doppelsträngig und damit führen nur noch DNA-Doppelstrangbrüche zu einer Relaxation der DNA bzw. zu freien Fragmenten, die dann aus dem Zellkern wandern können. Aus diesem Grund wurden verschiedene Comet Assay Protokolle mit veränderten pH-Werten untersucht.

Keinen Vorteil beim Nachweis von Kaliumchromat-induzierten DPC erbrachte ein Protokoll von Klaude et al. (1996) bei pH 12,7. Bei diesem pH-Wert führen alkalilabile Stellen nicht mehr zu einer Induktion von DNA-Migration und können so die Bestimmung von Crosslinks nicht mehr stören. Im Vergleich zur bestrahlten Kontrolle trat jedoch keine Hemmung der DNA-Migration auf, selbst nicht bei letalen Konzentrationen.

Die Probleme, die bei der Etablierung des Comet Assay Protokolls bei pH 12,1 nach Miyamae et al. (1997) auftraten, und die daraus folgende kritische Einschätzung dieses Protokolls zum Nachweis von Crosslinks, wurde bereits diskutiert.

In einem „neutralen" Protokoll des Comet Assays bei pH 9 (Singh und Stephens, 1997) führen nur noch DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) zu einer Wanderung der DNA aus dem Zellkern. Mit Hilfe dieses Protokolls konnte erstmals direkt die hemmende Wirkung von Kaliumchromat-induzierten DPC auf die strahlungsinduzierte DNA-Migration im Comet Assay nachgewiesen werden. Dass die hemmende Wirkung durch die Kaliumchromat-Behandlung tatsächlich auf DPC beruhte, konnte durch Inkubation der Präparate mit Proteinase K gezeigt werden. Eine weitere Verbesserung im Nachweis von Kalium-

chromat-induzierten DPC konnte durch eine zusätzliche Postinkubation der Zellen nicht erreicht werden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass die Sensitivität dieses Comet Assay Protokolls noch durch andere DNA-Schäden wie DSB beeinträchtigt wird. Das etablierte „neutrale" Protokoll scheint aber dennoch die Kaliumchromat-induzierten DPC nicht so sensitiv nachweisen zu können, wie Formaldehyd-induzierte DPC. Einerseits tritt eine Induktion von SCE bereits bei geringeren Konzentrationen auf, andererseits konnte in der alkalischen Elution bei diesen Konzentrationen bereits die Bildung von DPC durch Kaliumchromat nachgewiesen werden (Sugiyama et al., 1986). Möglicherweise besitzen die Kaliumchromat-induzierten DPC eine andere Struktur als die Formaldehyd-induzierten DPC und können vermutlich deshalb im „neutralen" Comet Assay weniger sensitiv detektiert werden.

Für Natriumarsenit konnte dagegen im „neutralen" Comet Assay Protokoll keine Induktion von Crosslinks nachgewiesen werden. Da selbst in diesem Protokoll noch eine Induktion der DNA-Migration zu sehen ist, kann angenommen werden, dass durch Natriumarsenit DSB induziert werden, die auch die Bestimmung von DPC im Comet Assay stören können. Der einzige bisher gezeigte Nachweis von Natriumarsenit-induzierten DPC im Comet Assay erfolgte jedoch mit einem alkalischen Protokoll (Gebel et al., 1998), in dem DSB eigentlich auch störend hervortreten sollten. Aus diesem Grund ist zu vermuten, dass in der vorliegenden Arbeit unter den verwendeten Behandlungsbedingungen in den V79-Zellen keine DPC, sondern vor allem DSB induziert wurden.

Im Gegensatz zur Verbesserung des Nachweises von Kaliumchromat-induzierten DPC konnte mit dem „neutralen" Comet Assay Protokoll keine Verbesserung in der Detektion von DNA-DNA Crosslinks erreicht werden. Zwar führen die cis-Platin-induzierten DNA-DNA intrastrand Crosslinks zu vergleichbaren Effekten wie im alkalischen Protokoll, jedoch lassen sich die von MMC verursachten DNA-DNA interstrand Crosslinks erst bei höheren Konzentrationen nachweisen.

Damit kann zusammenfassend zur Verwendung des Comet Assays zum Nachweis von Crosslinks gesagt werden, dass das alkalische Protokoll bei pH>13 in Kombination mit γ-Strahlung Formaldehyd-induzierte DPC sensitiv nachweisen kann. Zwar kann damit die crosslinkende Wirkung von MMC und cis-Platin auch festgestellt werden, jedoch nur bei Konzentrationen, die eine sehr deutliche cytotoxische Wirkung auf die Zellen ausüben. Aufgrund der Induktion von SCE bei wesentlich geringeren Konzentrationen kann angenommen werden, dass bei diesen Konzentrationen DNA-Schäden und damit auch Cross-

links entstehen. Ein sensitiver Nachweis von DNA-DNA Crosslinks scheint daher mit diesem Protokoll nicht möglich zu sein. Die sensitive Detektion von Formaldehyd-induzierten DPC mit diesem Protokoll lässt sich jedoch nicht verallgemeinern, da die Identifikation von Kaliumchromat und Natriumarsenit als crosslinkende Substanzen mit diesem Protokoll überhaupt nicht möglich war. Der Nachweis im alkalischen Comet Assay wurde durch die parallele Induktion von anderen DNA-Schäden gestört. Erst mit einem „neutralen" Protokoll bei pH 9 in Kombination mit γ-Strahlung konnte Kaliumchromat als crosslinkende Substanz identifiziert werden. Mit diesem Protokoll konnte aber die crosslinkende Wirkung von Natriumarsenit nicht nachgewiesen werden, und es gab damit auch keine Verbesserung in der Detektion von DNA-DNA Crosslinks. Insgesamt kann, aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, zu diesem Zeitpunkt kein Comet Assay Protokoll zum sicheren Nachweis einer crosslinkenden Wirkung von unbekannten Substanzen empfohlen werden. Die Gründe dafür liegen einerseits in der Verschiedenartigkeit von Crosslinks, die aufgrund ihrer jeweiligen Struktur eine durchaus unterschiedliche Potenz zur Hemmung der DNA-Migration im Comet Assay besitzen können. Andererseits kann die Induktion von zusätzlichen DNA-Schäden den Nachweis von Crosslinks verhindern. Deshalb kann das Ausbleiben eines hemmenden Effektes im Comet Assay nicht mit Sicherheit dahingehend interpretiert werden, dass von der betreffenden Substanz keine Crosslinks induziert wurden.

4.2 Die Bedeutung von DPC für die Formaldehyd-induzierte Mutagenese

DNA-Schäden können, wenn sie bis zur Replikation der DNA nicht repariert sind, aufgrund ihrer fehlpaarenden oder replikationshemmenden Eigenschaften zu Mutationen führen. Ein bekanntes Beispiel für eine DNA-Veränderung, die Fehlpaarungseigenschaften hat, ist das O^6-Methylguanin, das während der Replikation nicht nur mit Cytosin, sondern auch mit Thymin eine Basenpaarung eingehen kann. Dies hat letztendlich zur Folge, dass GC nach AT Transitionen entstehen können (Murray, 1987). Für Crosslinks, vor allem für Formaldehyd-induzierte DPC, ist dieser direkte Zusammenhang zwischen dem primären DNA-Schaden und der Mutationsentstehung jedoch noch nicht geklärt. Im Allgemeinen werden Crosslinks als sogenannte „nicht-instruktive Läsionen" angesehen, das heißt sie verursachen keine Fehlpaarungen, sondern sie können zu einem Stopp der Replikation führen (Bridgewater et al., 1998; Heck und Casanova, 1999). Diese Läsionen können dann über Zwischenschritte zur Bildung von DSB führen, die letztendlich Mutationen durch Rekombinationsvorgänge verursachen können (Pastink und Lohman, 1999).

Nach der Behandlung von V79-Zellen mit Formaldehyd trat in der vorliegenden Arbeit eine Erhöhung der Mikronukleus-Frequenz und der SCE-Rate parallel zur Induktion von DPC auf. Die Bildung von Mikronuklei kann sowohl durch klastogene, als auch durch aneugene Mechanismen verursacht werden (Fenech, 1993). Hinweise, dass die Formaldehyd-induzierten Mikronuklei überwiegend durch klastogene Effekte induziert wurden, kommen einerseits durch die in der vorliegenden Arbeit gemachte Beobachtung zustande, dass in den Präparaten des SCE-Tests bei höheren Konzentrationen vermehrt strukturelle Chromosomenaberrationen beobachtet wurden. Andererseits wurde in verschiedenen Publikationen bereits gezeigt, dass Formaldehyd Mutationen über klastogene Wirkungen auslösen kann (Ma und Harris, 1988; Schmid et al., 1986). Außerdem konnte eine Studie an Schleimhautzellen von Formaldehyd-exponierten Personen zeigen, dass die induzierten Mikronuklei überwiegend durch klastogene Mechanismen entstanden sind (Titenko-Holland et al., 1996).

Im V79-HPRT-Mutagenitätstest kam es nach Behandlung mit Formaldehyd zu keiner Erhöhung der Mutantenfrequenz, auch nicht nach Variation der Testbedingungen. Selbst Wiederholungen der Behandlung, die bei Miltenburger et al. (1991) deutliche Effekte auslösten, führten zu keiner messbaren Erhöhung der Mutantenfrequenz. Dagegen konnte im Maus Lymphoma $TK^{+/-}$-Assay (MLA) eine sehr deutliche Mutagenität durch Formaldehyd

festgestellt werden. Da eine überwiegende Induktion von kleinen Kolonien festzustellen war, bestätigt auch dieses Ergebnis die klastogene Wirkung von Formaldehyd (Doerr et al., 1989).

Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit gefundenen negativen Ergebnissen für Formaldehyd im HPRT-Test, beschreiben einige Publikationen eine Induktion von Mutationen am HPRT-Lokus durch Formaldehyd (Grafström et al., 1993; Graves und Green, 1996; Miltenburger et al., 1991). In der Arbeit von Graves und Green (1996) konnten die Autoren jedoch nur bei einer untersuchten Formaldehyd-Konzentration ein schwach positives Ergebnis zeigen. Diese schwache Induktion von Mutanten wurde in einer weiteren Arbeit dieser Autoren bestätigt (Graves et al., 1996). Die Ergebnisse von Grafström et al. (1993) zeigen für Formaldehyd ebenfalls nur einen schwachen konzentrationsabhängigen Anstieg der Mutantenfrequenz. Eine genauere Betrachtung der Ergebnisse zeigt, dass dieser Anstieg überwiegend auf toxischen Effekten und weniger auf der Induktion von 6-TG-resistenten Kolonien beruht. Eine sehr deutliche Induktion von Mutanten im HPRT-Test konnten Miltenburger et al. (1991) nach mehrmaliger Behandlung der Zellen mit Formaldehyd zeigen. Da aber die gleichen Behandlungsprotokolle in der vorliegenden Arbeit zu keiner Erhöhung der Mutantenfrequenz im HPRT-Test führten, konnte dieser positive Befund nicht bestätigt werden. Die Datenlage zur Induktion von Genmutationen durch Formaldehyd lässt den Schluss zu, dass dieser Mutationstyp nicht charakteristisch für die mutagene Wirkung von Formaldehyd ist und möglicherweise nur unter bestimmten Bedingungen auftritt. Auch die Ergebnisse des in der vorliegenden Arbeit durchgeführten MLA zeigen, dass Genmutationen im engeren Sinn nur eine untergeordnete Rolle bei der Formaldehyd-induzierten Mutagenese spielen. So trat nach Formaldehyd-Behandlung nur eine sehr geringe Induktion von großen Kolonien auf.

Die fehlende Induktion von Genmutationen im V79-HPRT-Mutagenitätstest, die überwiegende Bildung von kleinen Kolonien im MLA, sowie die deutliche Induktion von Mikronuklei lassen die Schlussfolgerung zu, dass Formaldehyd überwiegend Chromosomenmutationen durch einen klastogenen Mechanismus induziert. Es wurde bereits gezeigt, dass DPC die primären DNA-Schäden von Formaldehyd sind. Die Bedeutung von DPC für die Formaldehyd-induzierte Mutagenese und damit für das Auftreten von Chromosomenmutationen wurde bislang jedoch noch nicht hinreichend untersucht.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten parallelen Untersuchungen zur Induktion von DPC und Mikronuklei bzw. SCE zeigen, dass es möglicherweise einen kausalen Zusammenhang zwischen den DPC und der mutagenen Wirkung von Formaldehyd gibt. So traten Mikronuklei nach Formaldehyd-Behandlung nur dann auf, wenn auch DPC induziert waren. An diesem Zusammenhang änderte sich nichts, wenn unterschiedliche Behandlungsprotokolle angewendet wurden. Da DPC einen Stopp der Replikation auslösen können (Heck und Casanova, 1999) und die Unterbrechung der replikativen DNA-Synthese zu Strangbrüchen und letztendlich auch zu Mikronuklei führen kann, unterstützt die parallele Induktion von Mikronuklei und DPC die Hypothese, dass DPC an der Formaldehyd-induzierten Mutagenese beteiligt sind. Eine Erhöhung der SCE-Rate trat ebenfalls nur dann auf, wenn Formaldehyd-induzierte DPC detektiert werden konnten. Es ist bereits nachgewiesen, dass Crosslinks SCE induzieren können (Wolff und Afzal, 1996), aber auch eine Vielzahl anderer DNA-Schäden können eine Induktion von SCE bewirken (Linnainmaa und Wolff, 1982; Ortiz et al., 1996). Eine Beteiligung von anderen DNA-Schäden als DPC an den Formaldehyd-induzierten Chromosomenmutationen ist jedoch sehr unwahrscheinlich, da bislang noch keine anderen von Formaldehyd verursachten DNA-Schäden identifiziert wurden. Zwar wurde nach Formaldehyd-Behandlung ein verstärktes Auftreten von DNA-Strangbrüchen beobachtet (Ross und Shipley, 1980), diese können jedoch als Zwischenprodukte der Reparatur von DPC angesehen werden (Fornace, 1982). Eine verstärkte replikative Reparatursynthese, bei deren Ablauf auch Strangbrüche entstehen, wurde für Formaldehyd bereits beschrieben (Martin et al., 1978).

Ein weiterer Punkt, der für eine Beteiligung der DPC an der Entstehung von Mutationen durch Formaldehyd spricht, ist das parallele Auftreten von DPC und mutagenen Effekten am TK-Lokus in L5178Y-Zellen. Auch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen an menschlichen Zelllinien lassen den Schluss zu, dass DPC an der Mutagenität von Formaldehyd beteiligt sind. Eine Induktion von Mikronuklei trat in diesen Zellen ebenfalls nur dann auf, wenn DPC vorhanden waren. Somit konnte in der vorliegenden Arbeit bei verschiedenen Zelllinien nur dann eine mutagene Wirkung von Formaldehyd beobachtet werden, wenn auch DPC induziert wurden.

Die Ergebnisse der reparaturdefizienten menschlichen Zelllinien mit dem Comet Assay und dem Mikronukleus-Test deuten darauf hin, dass eine Zunahme des klastogenen Effektes nicht mit einer verzögerten Eliminierung der DPC einhergeht. So konnten

bezüglich der Entfernung der DPC keine Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien festgestellt werden. Dagegen führte die Formaldehyd-Behandlung bei den reparatur-defizienten Zellen zu deutlich stärker ausgeprägten klastogenen Effekten. Daraus lässt sich ableiten, dass die Häufigkeit der Mikronuklei nicht von der Geschwindigkeit der Eliminierung der DPC abhängt, sondern von der Genauigkeit der Reparatur. Die höheren Mikronukleus-Frequenzen in den beiden reparaturdefizienten Zellen zeigen, dass sowohl die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER), als auch die „Crosslink-Reparatur an der fehlerfreien Reparatur von DPC beteiligt sind. Für Xeroderma Pigmentosum-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass sie sich bezüglich der Geschwindigkeit der Entfernung von DPC nicht von reparaturprofizienten Zellen unterscheiden (Grafstrom et al., 1984).

Die Ergebnisse zur Eliminierung von DPC in V79-Zellen und der Induktion von SCE zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Formaldehyd-Exposition führten zu keiner eindeutigen Aussage im Hinblick auf die Beteiligung von DPC an der Formaldehyd-induzierten Mutagenese. SCE können mittels differentieller Chromatidenfärbung erst in der zweiten Mitose nach BrdUrd-Zugabe sichtbar gemacht werden. Erfolgt die BrdUrd-Zugabe erst zu einem späteren Zeitpunkt nach der Behandlung, so beruhen die in der zweiten Mitose sichtbaren SCE auf den zum Zeitpunkt der Zugabe noch vorhandenen DNA-Schäden. An der Induktion von SCE können, wie bereits erwähnt, auch Crosslinks beteiligt sein (Wolff und Afzal, 1996). Nimmt man nun an, dass die beobachteten SCE direkt durch die Formaldehyd-induzierten DPC ausgelöst werden, so sollte eine strenge Korrelation zwischen der verbleibenden DPC-Menge nach der Eliminierung und der Induktion von SCE auftreten. Bei einer niedrigen, nur gering toxischen Konzentration konnte dieser Zusammenhang in der vorliegenden Arbeit beobachtet werden. Eine zeitabhängige Abnahme in der DPC-Menge führte auch zu einer Abnahme der SCE-Rate. Bei einer höheren, stärker toxischen Formaldehyd-Konzentration trat dagegen eine gleichbleibende Frequenz von SCE in den ersten Stunden nach der Behandlung auf, obwohl die Menge an DPC während dieser Zeit deutlich abnahm. Damit existiert bei dieser Konzentration kein Zusammenhang zwischen den Formaldehyd-induzierten DPC und mutagenen Effekten. Diese Ergebnisse können einerseits dadurch erklärt werden, dass die DPC nicht an der mutagenen Wirkung von Formaldehyd beteiligt sind. Andererseits ist es auch möglich, dass das verwendete Testprotokoll bei toxischen Konzentrationen, die zu einer Hemmung der Zellproliferation führen können, nicht optimal geeignet war.

Die genotoxische Wirkung von Formaldehyd kann durch die Induktion von DPC und klastogenen Effekten charakterisiert werden. Für Kaliumchromat, das ebenfalls DPC induziert, konnte auch eine vornehmliche klastogene Wirkung beobachtet werden. So beruhte die mutagene Wirkung im MLA ebenfalls auf einer überwiegenden Induktion von kleinen Kolonien. Aus diesem Grund kann angenommen werden, dass die für Formaldehyd-induzierte DPC beschriebene klastogene Wirkung auch für andere Arten von DPC gilt. Zusätzlich kam es nach Behandlung der Zellen mit Kaliumchromat jedoch auch zu einer deutlichen Bildung von großen Kolonien und damit zur Induktion von Genmutationen. Dieser Mutationstyp wurde aber vermutlich nicht durch die DPC, sondern durch die von Kaliumchromat parallel induzierten DNA-Strangbrüche und alkalilabile Stellen verursacht.

Dagegen zeigen die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen mit anderen crosslinkenden Substanzen, dass verschiedene Arten von Crosslinks durchaus unterschiedliche mutagene Potenziale besitzen können. So führten MMC und cis-Platin, im Gegensatz zum Formaldehyd, auch zur Induktion von Genmutationen im HPRT-Test. Dies kann einerseits an der unterschiedlichen mutagenen Wirkung von DNA-DNA Crosslinks und DPC liegen. Andererseits werden, wie bereits in der Einleitung beschrieben, von MMC und cis-Platin auch noch andere DNA-Schäden induziert, wie z.B. Monoaddukte. Diese anderen Arten von DNA-Schäden können durchaus auch an der mutagenen Wirkung im HPRT-Test beteiligt sein.

Auch in der Bedeutung der Reparatur von DNA-DNA Crosslinks für die Mutagenese scheint es Unterschiede im Vergleich zu den Formaldehyd-induzierten DPC zu geben. Im Gegensatz zu den DPC, werden die von MMC induzierten DNA-DNA interstrand Crosslinks direkt von der NER bzw. der „Crosslink-Reparatur“ entfernt. Sowohl die Fanconi Anaemie Zelllinie, als auch die XP-Zelllinie, zeigten im Vergleich zu einer reparaturprofizienten Zelllinie eine langsamere Eliminierung der Crosslinks von der DNA. Dabei trat vor allem bei der XP-Zelllinie eine stark verlangsamte Auflösung der Crosslinks auf. Dieser Defekt in der Reparatur von DNA-DNA interstrand Crosslinks wurde für diese Zelllinie bereits mit 8-Methoxypsoralen plus UV gezeigt (Gruenert und Cleaver, 1985). Für das Protein, das in der verwendeten XP-Zelllinie defekt ist, wurde bereits gezeigt, dass es MMC-induzierte DNA-DNA interstrand Crosslinks erkennen kann, und somit die Reparatur dieser DNA-Schäden mittels NER einleiten kann (Warren et al., 1998). Somit werden die MMC-induzierten DNA-DNA interstrand Crosslinks, im Gegensatz zu den Formaldehyd-

induzierten DPC, wahrscheinlich direkt von der NER repariert. Hinsichtlich der cytogenetischen Konsequenzen nach MMC-Behandlung gab es ebenfalls deutliche Unterschiede zwischen den verwendeten Zelllinien. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Formaldehyd trat in der Fanconi Anaemie Zelllinie nach MMC-Behandlung die größte Induktion von Mikronuklei auf. Diese Hypersensitivität bezüglich der klastogenen Wirkung von MMC ist charakteristisch für Zellen von Patienten mit Fanconi Anaemie (Duckworth-Rysiecki et al., 1986; Sasaki und Tonomura, 1973). Die Ergebnisse zeigen, dass zur fehlerfreien Reparatur von DNA-DNA interstrand Crosslinks sowohl die NER, als auch die „Crosslink-Reparatur" benötigt werden. Die im Vergleich zu den DPC unterschiedlichen mutagenen Effekte in den untersuchten Zelllinien zeigen jedoch auch, dass diese beiden Reparatursysteme einen unterschiedlichen Anteil an der fehlerfreien Reparatur von verschiedenen Arten von Crosslinks haben.

Die Ergebnisse zur Eliminierung von Formaldehyd-induzierten DPC in reparaturdefizienten Zelllinien haben gezeigt, dass die NER bzw. die „Crosslink-Reparatur" keinen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Entfernung haben. Neuere Untersuchungen an Formaldehyd-induzierten DPC konnten jetzt zeigen, dass das Entfernen der Proteine von der DNA einerseits durch spontane Hydrolyse der kovalenten Bindung erfolgen kann. Andererseits werden die gebundenen Proteine aber auch durch einen aktiven Reparaturmechanismus von der DNA entfernt (Quievryn und Zhitkovich, 2000). Die Ergebnisse dieser Publikation zeigen auch, dass dieser Prozess vermutlich durch die ubiquitär vorhandenen Proteosomenkomplexe, die am Abbau von nicht mehr benötigten bzw. geschädigten Proteinen beteiligt sind, erfolgt (Ciechanover, 1998). Da dieser Komplex die kovalent an die DNA gebundenen Proteine jedoch nicht vollständig abbauen kann, bleiben als Endprodukte Peptid-DNA- bzw. Aminosäure-DNA-Addukte. Diese Addukte verursachen im Gegensatz zu den DPC keine Hemmung der DNA-Migration im Comet Assay, können aber aufgrund ihrer möglichen replikationshemmenden Wirkung zur Induktion von Chromosomenmutationen beitragen.

Die Untersuchungen mit Formaldehyd an den reparaturdefizienten Zelllinien haben auch gezeigt, dass die NER und die „Crosslink-Reparatur" für eine fehlerfreie Reparatur der DPC notwendig sind, da bei einem Ausfall einer der beiden Systeme vermehrt klastogene Effekte auftreten. Für die Entstehung eines Mikronukleus durch eine klastogene Wirkung ist ein DNA-Doppelstrangbruch (DSB) notwendig. Daher kann davon

ausgegangen werden, dass DSB auch ursächlich an der Induktion von Mikronuklei durch Formaldehyd beteiligt sind. Die erhöhten Mikronukleus-Frequenzen in den reparatur-defizienten Zelllinien nach Formaldehyd-Behandlung beruhen demnach auf einem gehäuften Auftreten von DSB. Die größte Induktion von Mikronuklei durch Formaldehyd wurde in den XP-Zellen beobachtet. Aus dieser Beobachtung kann geschlossen werden, dass in diesen Zellen auch die größte Menge an DSB nach Formaldehyd-Behandlung auftrat. Gestützt wird diese Annahme durch die Beobachtung, dass die hemmenden Effekte im Comet Assay durch Formaldehyd-induzierte DPC in den XP-Zellen etwas geringer ausfielen. Die verminderte Migrationshemmung kann durch ein vermehrtes Auftreten von DSB erklärt werden, da DSB zu einer Induktion der Migration im Comet Assay führen. Die größere Menge an DSB in den XP-Zellen kann sowohl durch eine verstärkte Bildung dieser DNA-Schäden, als auch durch eine geringere Reparatur verursacht werden. Da die in den XP-Zellen defekte NER jedoch aufgrund der bisherigen Kenntnisse keinen Einfluss auf die Eliminierung von DSB hat, muss eine verstärkte Bildung von DSB als Ursache für die hohen Mikronukleus-Frequenzen in den XP-Zellen angenommen werden. Wie bereits diskutiert, existiert keine direkte Korrelation zwischen den DPC und der Induktion von Mikronuklei, sondern vermutlich erfolgt die Induktion durch die klastogene Wirkung der, durch die Proteosomentätigkeit entstehenden, DNA-Addukte. Da in den verwendeten menschlichen Zelllinien keine Unterschiede in der Eliminierung der an den DPC beteiligten Proteine gefunden wurden, ist anzunehmen, dass in allen Zelllinien dieser erste Schritt bei der Reparatur von DPC intakt ist. Damit entstehen in allen untersuchten Zelllinien auch gleiche Mengen an Peptid-DNA- bzw. Aminosäure-DNA-Addukten. Die vermehrte Bildung von DSB in den XP-Zellen kann nun dadurch erklärt werden, dass die in diesen Zellen defekte NER an der fehlerfreien Reparatur dieser Addukte beteiligt ist. Zusätzlich kann auch aufgrund der Struktur der, durch die Proteosomentätigkeit entstandenen, Addukte vermutet werden, dass sie durch die NER repariert werden. Sehr wahrscheinlich stören sie die helikale Struktur der DNA, und für diese Art von DNA-Schäden ist bereits gezeigt, dass sie Substrate der NER sind (de Boer und Hoeijmakers, 2000).

In den Fanconi Anaemie Zellen funktioniert die NER, somit wird die Zahl an Addukten deutlich verringert und müsste im Bereich der Zahl an Addukten der reparaturprofizienten Zellen liegen. Wie bereits diskutiert, können diese Addukte zur Bildung von DSB führen. Aufgrund der anzunehmenden gleichen Anzahl an Addukten müsste auch die Menge an

DSB in den Fanconi Anaemie Zellen und in den Kontrollzellen gleich sein. Dennoch konnte eine verstärkte Bildung von Mikronuklei in den Fanconi Anaemie Zellen beobachtet werden. Dies kann durch Unterschiede in der Reparatur von DSB erklärt werden. In den Kontrollzellen werden die DSB zum großen Teil repariert und führen somit nur zu geringen klastogenen Effekten. Der Reparaturdefekt in Zellen von Patienten mit Fanconi Anaemie ist noch nicht in dem Maße aufgeklärt, wie es für die NER der Fall ist. Möglicherweise führt dieser Defekt zu einer schlechteren Reparatur von DSB und damit zu einer vermehrten Bildung von Mikronuklei. Die Reparatur von DSB erfolgt in eukaryotischen Zellen in der Regel durch Rekombinationsprozesse (Pfeiffer et al., 2000). Eine Beteiligung der in den Fanconi Anaemie Zellen defekten Proteine an Rekombinationsprozessen, und damit an der Reparatur von DSB, kann angenommen werden, da in diesen Zellen eine erhöhte Rekombinationsrate beobachtet wurde (Thyagarajan und Campbell, 1997). Darüber hinaus findet sich in Fanconi Anaemie Zellen auch eine verminderte Genauigkeit bei der Reparatur von DSB (Escarceller et al., 1998). Aus diesen Gründen beruhen die erhöhten Mikronukleusfrequenzen in den Fanconi Anaemie Zellen mit ziemlicher Sicherheit auf einer fehlerhaften Reparatur von DSB.

Weitere Unterstützung bekommt diese Hypothese zur Entstehung von Mutationen durch Formaldehyd-induzierte DPC durch die Ergebnisse der molekularen Analyse von Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten Kolonien im MLA. Hierbei traten vor allem homologe Rekombinationen und möglicherweise auch kleine Deletionen nach Formaldehyd-Behandlung auf. Die beobachteten Mutationstypen stehen ebenfalls im Zusammenhang mit dem Auftreten von DSB und deren Reparatur durch Rekombinationsprozesse. Die im MLA nach Formaldehyd-Behandlung vermehrt gefundenen homologen Rekombinationen, bei denen ein LOH über einen großen Bereich auftritt, es jedoch zu keiner Verkürzung der Chromosomen 11 gekommen ist, können dabei durch die Reparatur von DSB durch das „Breakage-induced Repair"-Modell (Abb. 53) erklärt werden (Pfeiffer et al., 2000).

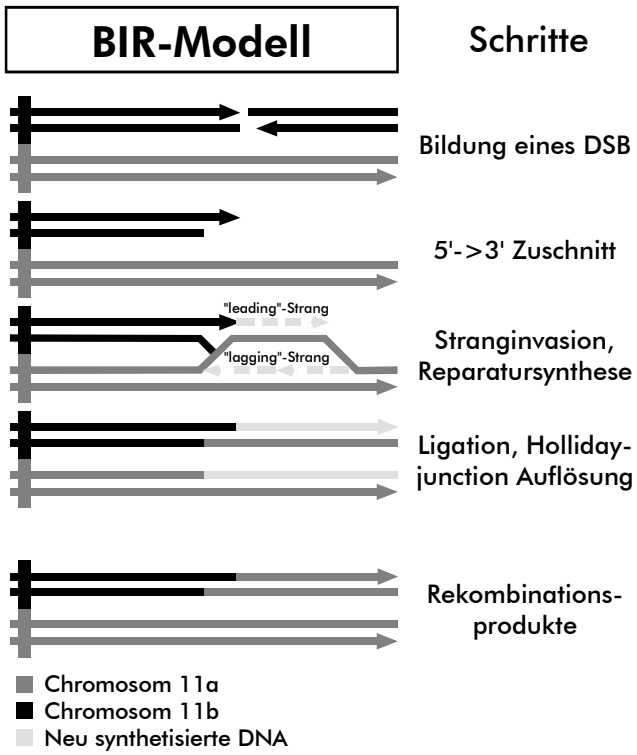


Abb. 53: Schematische Darstellung der Hypothese zur Entstehung von Rekombinationen nach Formaldehyd-Behandlung durch das „Breakage-induced Repair" Modell. (Nach einer Abbildung aus Pfeiffer et al., 2000).

Nach diesem Modell wird ein DSB auf Chromosom 11b durch Endonukleasen so prozessiert, dass lange 3'-Überhänge entstehen. Der 3'-Überhang des DNA-Stranges mit dem Zentromer kann nun mit Hilfe von Proteinen in einen homologen Bereich des DNA-Doppelstranges von Chromosom 11a eindringen und dort eine homologe Paarung eingehen. Das freie 3'-Ende dient dabei einer Polymerase als Primer und es kommt schließlich zu einer Verlängerung des eingedrungenen Stranges durch semi-konservative Reparatursynthese. Der verdrängte Strang kann mit dem anderen Strang des zweiten Chromosoms, der ein freies 5'-Ende besitzt, ebenfalls eine homologe Paarung eingehen. Auch hier wird der verkürzte DNA-Strang durch semi-konservative Reparatursynthese verlängert. Der „leading" Strang wird dabei kontinuierlich synthetisiert, während der „lagging" Strang durch die bekannte diskontinuierliche DNA-Synthese über Okazaki-Fragmente vervollständigt wird. Die Reparatursynthese verläuft nach diesem Modell bis zum Ende des Chromosoms und erklärt damit den Verlust der Heterozygotie über einen sehr großen Bereich, ohne dass es zu einer Verkürzung der Chromosomen kommt. Die verbleibende Überkreuzung („Holliday junction") der DNA-Stränge der beiden Chromosomen 11 wird durch Endonukleasen aufgelöst und die verbleibenden Lücken durch Ligaseaktivität geschlossen. Als Endprodukte dieses Reparaturwegs entstehen zwei

identisch aussehende Chromosomen 11, deren Informationsgehalt ab der Stelle des Doppelstrangbruchs identisch ist und somit zu einem weitreichenden LOH führt.

Abschließend lässt sich damit auch eine Hypothese zur Reparatur von Formaldehyd-induzierten DPC aufstellen (Abb. 54). Der überwiegende Teil der DPC wird durch spontane Hydrolyse entfernt, nur ein geringer Teil wird aktiv durch Proteosomen eliminiert. Dabei entstehen Peptid-DNA- bzw. Aminosäure-DNA-Addukte, die von der NER repariert werden können. Unreparierte Addukte können zu einem Stopp der Replikation führen, und die dadurch entstehende Lücke im Tochterstrang kann durch den Angriff von Endonukleasen in einen DSB umgewandelt werden (Wang und Smith, 1986). DSB sind letale DNA-Schäden und können somit die beobachtete Cytotoxizität von Formaldehyd begründen. Eine Möglichkeit zur Reparatur von DSB bietet die homologe Rekombination, die jedoch nicht fehlerfrei abläuft und zu Genkonversionen führen kann. Ein anderer Reparaturweg von DSB kann über nicht-konservative Rekombinationsprozesse, wie dem „Single Strand Annealing“ und dem „Non-homologous DNA End Joining“, erfolgen (Pfeiffer et al., 2000). Hierbei entstehen kleine Deletionen, die, wenn sie am TK-Lokus auftreten, auch zu TFT-resistenten Kolonien führen können. Liegt die Deletion dabei im Bereich des Markers *D11Agl1,* so führt dies auch zu einem LOH an diesem Marker. Dieser LOH-Typ wurde zwar ebenfalls vermehrt in den Kolonien nach Formaldehyd-Behandlung gefunden, es konnte jedoch aufgrund der verwendeten Methoden nicht zwischen Deletion und Rekombination unterschieden werden. Nach dem in dieser Arbeit aufgestellten Modell zur Reparatur von Formaldehyd-induzierten DPC kann jedoch vermutet werden, dass es in den Formaldehyd-induzierten TFT-resistenten Kolonien auch zur Induktion von kleinen Deletionen durch nicht-konservative Rekombinationsprozesse gekommen ist. Damit kann vermutet werden, dass die Kolonien mit einem ausschließlichen LOH am Marker *D11Agl1* auch durch kleine Deletionen entstanden sind. Somit können nach Formaldehyd-Behandlung sowohl homologe Rekombinationen, als auch kleine Deletionen erwartet werden.

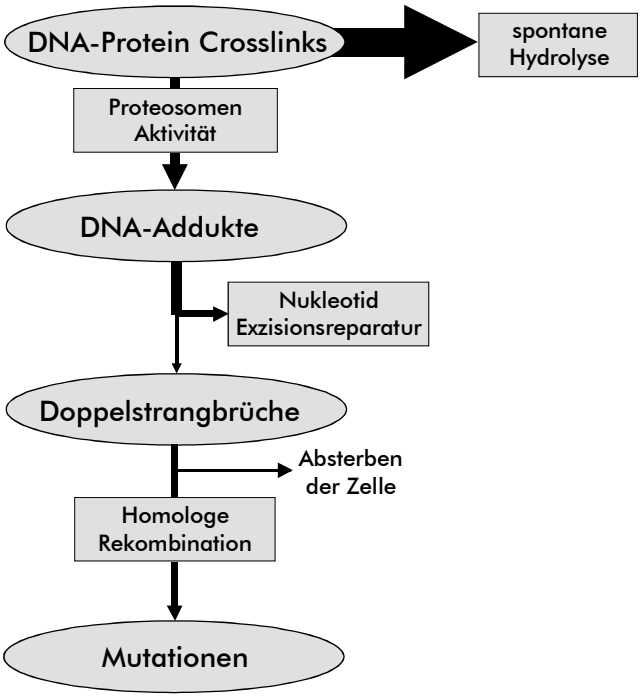


Abb. 54: Hypothese zum Ablauf der Reparatur von Formaldehyd-induzierten DNA-Protein Crosslinks.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen in Übereinstimmung mit neueren publizierten Daten, dass man einen direkten Zusammenhang zwischen den DPC und den mutagenen Effekten durch Formaldehyd annehmen kann. Einerseits legen die durchgeführten vergleichenden Untersuchungen zur Induktion von DPC und klastogenen Wirkungen diesen Schluß nahe. Andererseits können die in der vorliegenden Arbeit nach Formaldehyd-Behandlung gefundenen Mutationstypen durch ein Modell erklärt werden, das die Entstehung von chromosomalen Aberrationen über die Reparatur von DPC beschreibt.

5 Zusammenfassung

Formaldehyd ist eine bedeutende Industriechemikalie, die ein mutagenes und kanzerogenes Potenzial besitzt. Als primären genotoxischen Schaden induziert es DNA-Protein Crosslinks (DPC), deren Bedeutung für die Mutagenese und Kanzerogenese jedoch noch unklar ist. Der Comet Assay ist ein Indikatortest zum Nachweis von verschiedenen Arten von DNA-Schäden. Crosslinks werden dabei als die einzigen DNA-Schäden angesehen, die zu einer Hemmung der DNA-Migration führen können. In der vorliegenden Arbeit wurde daher untersucht, ob sich der Comet Assay zum Nachweis von Formaldehyd-induzierten DPC und anderen Arten von Crosslinks eignet und welche Bedeutung DPC für die Mutagenese haben.

Das Standardprotokoll des Comet Assays konnte zwar Formaldehyd-induzierte DPC sehr sensitiv nachweisen, jedoch hat es für Mitomycin C- und cis-Platin-induzierte DNA-DNA Crosslinks unter Berücksichtigung der cytotoxischen Wirkung und den Effekten in anderen Genotoxizitätstests nur eine geringe Sensitivität. Kaliumchromat und Natriumarsenit, zwei Substanzen, die ebenfalls DPC induzieren, konnten mit diesem Comet Assay Protokoll nicht als crosslinkende Substanzen identifiziert werden. Ein „neutrales“ Comet Assay Protokoll bei pH 9 verbesserte zwar den Nachweis von Kaliumchromat-induzierten Crosslinks, es zeigten sich aber immer noch Probleme beim sensitiven Nachweis von DNA-DNA Crosslinks. Die Induktion von Crosslinks durch Natriumarsenit konnte auch mit diesem Protokoll nicht nachgewiesen werden. Die durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der Nachweis einer crosslinkenden Potenz von Substanzen mit dem Comet Assay nur mit Einschränkungen möglich ist. Der Comet Assay eignet sich hervorragend zur Detektion Formaldehyd-induzierter DPC und dadurch auch zum Nachweis von Formaldehyd-Expositionen. Im Moment kann jedoch kein Comet Assay Protokoll zum allgemeinen Nachweis einer Crosslink-induzierenden Wirkung unbekannter Substanzen empfohlen werden.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten vergleichenden Untersuchungen zur Induktion von DPC durch Formaldehyd und Effekten in anderen Genotoxizitätstests weisen darauf hin, dass es einen Zusammenhang zwischen den DPC und der mutagenen Wirkung von Formaldehyd gibt. Das Spektrum der gefundenen Mutationen besteht dabei fast ausschließlich aus Chromosomenmutationen, wie Rekombinationen und Deletionen. Die Untersuchungen zum Einfluss der DNA-Reparatur auf die Mutagenität von Formaldehyd und die molekulare Analyse von Mutanten führten zu einem Modell der Reparatur von

DPC, das auch die Entstehung der für Formaldehyd typischen Mutationen erklärt. Danach werden die an den DPC beteiligten Proteine von Proteosomenkomplexen verdaut und der verbleibende Restschaden wird von der Nukleotid-Exzisionsreparatur fehlerfrei repariert. Bleibt der Restschaden jedoch bis zur Replikation bestehen, so können DNA-Doppelstrangbrüche entstehen, die entweder direkt zu Deletionen führen, oder mit Hilfe von Rekombinationsprozessen repariert werden können. Dabei können kleine Deletionen bzw. Genkonversionen entstehen, die für die Formaldehyd-induzierte Tumorigenese von Bedeutung sein könnten. Ein nicht-genotoxischer Mechanismus der Formaldehyd-induzierten Tumorentstehung wird dadurch nicht ausgeschlossen.

6 Literaturverzeichnis

Acharyya, S. K., Chakraborty, P., Lahiri, S., Raymahashay, B. C., Guha, S. und Bhowmik, A. (1999): Arsenic poisoning in the Ganges delta. *Nature,* 401: 545-545.

Ames, B. N., McCann, J. und Yamasaki, E. (1975): Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res,* 31: 347-364.

Anderson, D., Yu, T. W. und McGregor, D. B. (1998): Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis,* 13: 539-555.

Baird, P. N., Pritchard, J. und Colwell, J. K. (2000): Molecular genetic analysis of chromosome 11p in familial Wilms tumor. *Br J Cancer,* 69: 1072-1077.

Bianchi, V., Celotti, L., Lanfranchi, G., Majone, F., Marin, G., Montaldi, A., Sponza, G., Tamino, G., Venier, P., Zantedeschi, A. und Levis, A. G. (1983): Genetic effects of chromium compounds. *Mutat Res,* 117: 279-300.

Blackburn, G. R., Dooley III, J. F., Schreiner, C. A. und Mackerer, C. R. (1991): Specific Idenfication of Formaldehyde-Mediated Mutagenicity Using the Mouse Lymphoma L5178Y TK +/- Assay Supplemented with Formaldehyde Dehydrogenase. *In Vitro Toxicol,* 4: 121-132.

Blair, A., Steward, P. A., Hoover, R. N. und Fraumeni, J. F. Jr. (1987): Cancers of the nasopharynx and oropharynx and formaldehyde exposure. *J Natl Cancer Inst,* 78: 191-192.

Blasiak, J., Trzeciak, A., Malecka-Panas, E., Drzewoski, J., Iwanienko, T., Szumiel, I. und Wojewódzka, M. (1999): DNA Damage and Repair in Human Lymphocytes ans Gastric Mucosa Cells Exposed to Chromium and Curcumin. *Teratog Carcinog Mutagen,* 19: 19-31.

Bridgewater, L. C., Manning, F. C. R. und Patierno, S. R. (1998): Arrest of replication by mammalian DNA polymerase alpha and beta caused by chromium-DNA lesions. *Molec Carcinog,* 23: 201-206.

Cantoni, O. und Costa, M. (1984): Analysis of the induction of alkali sensitive sites in the DNA by chromate and other agents that induce single strand breaks. *Carcinogenesis,* 5: 1207-1209.

Carreau, M. und Buchwald, M. (1998): Fanconi's anemia: what have we learned from the genes so far? *Mol Med Today,* 4: 201-206.

Casanova, M., Deyo, D. F. und Heck, H. d. (1989): Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in nasal mucosa of Fischer 344 rats: analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation. *Fundam Appl Toxicol,* 17: 409-428.

Casanova, M., Morgan, K. T., Gross, E. A., Moss, O. R. und Heck, H. d. (1994): DNA-Protein Cross-links and Cell Replication at Specific Sites in the Nose of F344 Rats Exposed Subchronically to Formaldehyde. *Fundam Appl Toxicol,* 23: 525-536.

Casanova, M., Morgan, K. T., Steinhagen, W. H., Everitt, J. I., Popp, J. A. und Heck, H. d. (1991): Covalent Binding of Inhaled Formaldehyde to DNA in the Respiratory Tract of Rhesus Monkeys: Pharmacokinetics, Rat-to-Monkey Interspecies Scaling, and Extrapolation to Man. *Fundam Appl Toxicol,* 17: 409-428.

Ciechanover, A. (1998): The ubiquitin-proteasome pathway: on protein detah and cell life. *EMBO J,* 17: 7151-7160.

Clive,D. (1987): Historical Overview of the Mouse Lymphoma $TK^{+/-}$ Mutagenicity Assay. In: Moore,M.M., Demarini,D.M., de Serres,F.J., und Tindall,K.R. (Hrsg.) *Mammalian cell mutagenesis*. Banbury Report 28, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor: 25-36.

Clive, D., Johnson, K. O., Spector, J. F. S., Batson, A. G. und Brown, M. M. M. (1979): Validation and characterization of the L5178Y/$TK^{+/-}$ mouse lymphoma mutagen assay system. *Mutat Res,* 59: 61-108.

Clive, D., McCuen, R., Spector, J. F. S., Piper, C. und Mavournin, K. H. (1983): Specific gene mutations in L5178Y cells in culture. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res,* 115: 225-251.

Cole, J., Arlett, C. F., Green, M. H. L., Lowe, J. E. und Muriel, W. (1983): A comparison of the agar cloning and microtitration techniques for assaying cell survival and mutation frequencies in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat Res,* 111: 371-386.

Cole, J., Harrington-Brock, K. und Moore, M. M. (1999): The mouse lymphoma assay in the wake of ICH4-where are we now? *Mutagenesis,* 14: 265-270.

Cole, R. S. (1973): Repair of DNA containing interstrand crosslinks in *Escherichia coli*: sequential excision and recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 70: 1064-1068.

Conaway, C. C., Whysner, J., Verna, L. K. und Williams, G. M. (1996): Formaldehyde Mechanistic Data and Risk Assessment: Endogenous Protection From DNA Adduct Formation. *Pharmacol Ther,* 71: 29-55.

Conolly, R. B. und Andersen, M. E. (1993): An Approach to Mechanism-based Cancer Risk Assessment for Formaldehyde. *Env Health Persp,* 101: 169-176.

Cosma, G. N., Jamasbi, R. und Marchok, A. C. (1988): Growth inhibition and DNA damage induced by benzo[a]pyrene and formaldehyde in primary cultures of rat tracheal epithelial cells. *Mutat Res,* 201: 161-168.

Costa, M. (1991): DNA-Protein Complexes Induced by Chromate and Other Carcinogens. *Env Health Persp,* 92: 45-52.

Costa, M., Zhitkovich, A., Gargas, M., Paustenbach, D., Finley, B., Kuykendall, J., Billings, R., Carlson, T. J., Wetterhahn, K., Xu, J., Patierno, S. und Bogdanffy, M. (1996): Interlaboratory validation of a new assay for DNA-protein crosslinks. *Mutat Res Genet Toxicol,* 369: 13-21.

Costa, M., Zhitkovich, A., Taioli, E. und Toniolo, P. (1993): Preliminary report on a simple new assay for DNA-protein cross-links as a biomarker of exposures experiences by welders. *J Toxicol Environ Health,* 40: 217-222.

Costa, M., Zhitkovich, A. und Toniolo, P. (1993): DNA-Protein Cross-Links in Welders: Molecular Implications. *Cancer Res,* 53: 460-463.

Crosby, R. M., Richardson, K. K., Craft, T. R., Benforado, K. B., Liber, H. L. und Skopek, T. R. (1988): Molecular Analysis of Formaldehyde-Induced Muations in Human Lymphoblasts and *E. coli. Environ Mol Mutagen,* 12: 155-166.

de Boer, J. und Hoeijmakers, J. H. (2000): Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis,* 21: 453-460.

de Flora, S. (1981): Study of 106 organic and inorganic compunds in the *Salmonella*/microsome test. *Carcinogenesis,* 2: 283-298.

de Flora, S., Bagnasco, M., Serra, D. und Zanacchi, P. (1990): Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res,* 238: 99-172.

Digweed, M. und Sperling, K. (1996): Molecular analysis of Fanconi anaemia. *BioEssays,* 18: 579-585.

Doerr, C. L., Harrington-Brock, K. und Moore, M. M. (1989): Micronucleus, chromosome aberration, and small-colony TK mutant analysis to quantitate chromosomal damage in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat Res,* 222: 191-203.

Dong, J. T. und Luo, X. M. (1993): Arsenic-induced DNA-strand breaks associated with DNA-protein crosslinks in human fetal lung fibroblasts. *Mutat Res,* 302: 97-102.

Duckworth-Rysiecki, G., Toji, L., Ng, J., Clarke, C. und Buchwald, M. (1986): Characterization of a Simian virus 40-transformed Fanconi anemia fibroblast cell line. *Mutat Res,* 166: 207-214.

Escarceller, M., Buchwald, M., Singleton, B. K., Jeggo, P. A., Jackson, S. P., Moustacchi, E. und Papadopoulo, D. (1998): Fanconi anemia C gene product plays a role in the fidelity of blunt DNA end-joining. *J Mol Biol,* 279: 375-385.

Fenech, M. (1993): The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res,* 285: 35-44.

Fenech, M., Holland, N., Chang, W. P., Zeiger, E. und Bonassi, S. (1999): The HUman MicroNucleus Project - An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutat Res,* 428: 271-283.

Fornace, A. J. Jr. (1982): Detection of DNA single-strand breaks produced during the repair of damage by DNA-protein cross-linking agents. *Cancer Res,* 42: 145-149.

Frankenberg-Schwager, M. und Frankenberg, D. (1990): DNA-double-strand breaks: their repair and relationship in cell killing in yeast. *Int J Radiat Biol,* 58: 569-575.

Friedberg, E. C., Walker, G. C. und Siede, W. (1995): DNA repair and mutagenesis. ASM Press, Washington, DC.

Galloway, S. M. (1994): Chromosome aberrations induced in vitro: mechanisms, delayed expression, and intriguing questions. *Environ Mol Mutagen,* 23 Suppl 24: 44-53.

Gebel, T., Birkenkamp, P., Luthin, S. und Dunkelberg, H. (1998): Arsenic(III), but not Antimony(III), Induces DNA-Protein Crosslinks. *Anticancer Res,* 18: 4253-4258.

Glatt, H. (1994): Comparison of common gene mutation tests in mammalian cells in culture: a position paper of the GUM Commision for the Development of Guidelines for Genotoxicity Testing. *Mutat Res,* 313: 7-20.

Gocke, E., King, M. T., Eckhardt, K. und Wild, D. (1981): Mutagenicity of cosmetic ingredients licensed by the European cumminities. *Mutat Res,* 90: 91-109.

Grafstrom, R. C., Fornace, A., Jr. und Harris, C. C. (1984): Repair of DNA damage caused by formaldehyde in human cells. *Cancer Res,* 44: 4323-4327.

Grafstrom, R. C., Fornace, A. J., Jr., Autrup, H., Lechner, J. F. und Harris, C. C. (1983): Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells. *Science,* 220: 216-218.

Grafström, R. C., Hsu, I. C. und Harris, C. C. (1993): Mutagenicity of formaldehyde in chinese hamster lungs fibroblasts: synergy with ionizing radiation and *N*-nitroso- *N*-methylurea. *Chem Biol Interact,* 86: 41-49.

Graves, R. J. und Green, T. (1996): Mouse liver glutathione S-transferase mediated metabolism of methylene chloride to a mutagen in the CHO/HPRT assay. *Mutat Res,* 367: 143-150.

Graves, R. J., Trueman, P. und Green, T. (1996): DNA sequence analysis of methylene chloride-induced HPRT mutations in Chinese hamster ovary cells: comparison with the mutation spectrum obtained for 1,2-dibromoethane and formaldehyde. *Mutagenesis,* 11: 229-233.

Gruenert, D. C. und Cleaver, J. E. (1985): Repair of psoralen-induced cross-links and monoadducts in normal and repair-deficient human fibroblasts. *Cancer Res,* 45: 5399-5404.

Hartley, J. M., Spanswick, V. J., Gander, M., Giacomini, G., Whelan, J., Souhami, R. L. und Hartley, J. A. (1999): Measurement of DNA Cross-linking in Patients on Ifosfamide Therapy Using the Single Cell Gel Electrophoresis (Comet) Assay. *Clin Cancer Res,* 5: 507-512.

Hartmann, A. und Speit, G. (1994): Comparative Investigations of the Genotoxic Effects of Metals in the Single Cell Gel (SCG) Assay and the Sister Chromatid Exchange (SCE) Test. *Environ Mol Mutagen,* 23: 299-305.

Hartmann, A. und Speit, G. (1997): The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett,* 90: 183-188.

Hartwig, A. (1995): Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals,* 8: 3-11.

Heck, H. d., Casanova-Schmitz, M., Dodd, P. B., Schachter, E. N., Witek, T. J. und Tosun, T. (1985): Formaldehyde (CH_2O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH_2O under controlled conditions. *Am Indust Hyg Assoc J,* 46: 1-3.

Heck, H. d. und Casanova, M. (1999): Pharmacodynamics of Formaldehyd: Applications of a Model for the Arrest of DNA Replication by DNA-Protein Cross-Links. *Toxicol Appl Pharmacol,* 160: 86-100.

Heck, H. d., Casanova, M. und Starr, T. B. (1990): Formaldehyde toxicity - new understanding. *Crit Rev Tox,* 20: 397-426.

Hincks, J. R. und Coulombe, R. A. J. (1989): Rapid detection of DNA-interstrand and DNA-protein cross-links in mammalian cells by gravity-flow alkaline elution. *Environ Mol Mutagen,* 13: 211-217.

Honma, M., Hayashi, M., Shimada, H., Tanaka, N., Wakuri, S., Awogi, T., Yamamoto, K. I., Kodani, N. U., Nishi, Y., Nakadate, M. und Sofuni, T. (1999): Evaluation of the mouse lymphoma tk assay (microwell method) as an alternative to the *in vitro* chromosomal aberration test. *Mutagenesis,* 14: 5-22.

Hozier, J. C., Sawjer, J., Clive, D. und Moore, M. (1982): Cytogenetic distinction between the TK^+ and TK^- chromosomes in the L5178Y $TK^{+/-}$ 3.7.2C mouse-lymphoma cell line. *Mutat Res,* 105: 451-456.

Hubal, E. A. C., Schlosser, P. M., Conolly, R. B. und Kimbell, J. S. (1997): Comparison of inhaled formaldehyde dosimetry predictions with DNA-protein cross-link measurements in the rat nasal passages. *Toxicol Appl Pharmacol,* 143: 47-55.

Huschtscha, L. und Holliday, R. (1983): Limited and unlimited growth of SV40-transformed cells from human diploid MRC-5 fibroblasts. *J Cell Sci,* 63: 77-99.

IARC (1990): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol.49, Chromium and Chromium Compounds, Lyon.

IARC (1995): IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol.62, Wood dust and formaldehyde, Lyon.

Irr, J. D. und Snee, R. D. (1982): A statistical method for analysis of mouse lymphoma L5178Y cell TK locus forward mutation assay. *Mutat Res,* 97: 371-392.

Itoh, S. und Shimada, H. (1997): Clastogenicity and mutagenicity of hexavalent chromium in lacZ transgenic mice. *Toxicol Lett,* 91: 229-233.

Jachymezyk, W. J., von Borstel, R. C., Mowat, M. R. A. und Hastings, P. J. (1981): Repair of interstrand cross-links in DNA of *Saccharomyces cerevisae* requires two systems for DNA repair: the RAD3 system and the RAD51 system. *Mol Gen Genet,* 182: 196-205.

Jha, A. N., Noditi, M., Nilsson, R. und Natarajan, A. T. (1992): Genotoxic effects of sodium arsenite on human cells. *Mutat Res,* 284: 215-221.

Joenje, H., Oostra, A. B., Wijker, M., di Summa, F. M., van Berkel, C. G., Rooimans, M. A., Ebell, W., van Weel, M., Pronk, J. C., Buchwald, M. und Arwert, F. (1997): Evidence for at least eight Fanconi anemia genes. *Am J Hum Genet,* 61: 940-944.

Kato, S., Yamashita, K., Kim, T., Tajiri, T., Onda, M. und Sato, S. (1988): Modifikation of DNA by mitomycin C in cancer patients detected by ^{32}P-post-labeling analysis. *Mutat Res,* 202: 85-91.

Kinzler, K. W. und Vogelstein, B. (1997): Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature,* 386: 761-763.

Klaude, M., Eriksson, S., Nygren, J. und Ahnström, G. (1996): The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res,* 363: 89-96.

Kohn,K.W., Ewig,R.A.G., Erickson,L.C. und Zwelling,L.A. (1980): Measurement of strand breaks and cross-links by alkaline elution. In: Hanawalt,P.C. und Friedberg,E.C. (Hrsg.) *DNA Repair: A Laboratory Manual of Research Procedures*. Marcel Dekker, 379-401.

Köberle, B. und Speit, G. (1990): The effect of glutathione depletion on sister-chromatid exchange induction by cytostatic drugs. *Mutat Res,* 243: 225-231.

Kraemer, K., Lee, M. und Scotto, J. (1987): Xeroderma pigmentosum: cutaneous, ocular and neurologic abnormalities in 830 published cases. *Arch Derm,* 123: 241-250.

Krenitsky, T., Papaionannou, R. und Elion, G. (1969): Human hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *J Biol Chem,* 244: 1263-1270.

Kuchenmeister, F., Schmezer, P. und Engelhardt, G. (1998): Genotoxic bifunctional aldehydes produce specific images in the comet assay. *Mutat Res,* 419: 69-78.

Latt, S. A., Allen, J., Bloom, S. E., Carrano, A., Falke, E., Kram, D., Schneider, E., Schreck, R., Tice, R., Whitfield, B. und Wolff, S. (1981): Sister-chromatid exchanges: a report of the GENE-TOX program. *Mutat Res,* 87: 17-62.

Levis,A.G. und Bianchi,V. (1982): Mutagenic and cytogentic effects of chromium compunds. In: Langard,S. (Hrsg.) *Biological and environmental aspects of chromium*. Elsevier, Amsterdam: 171-208.

Liechty, M. C., Scalzi, J. M., Sims, K. R., Crosby, H., Jr., Spencer, D. L., Davis, L. M., Caspary, W. J. und Hozier, J. C. (1998): Analysis of large and small colony L5178Y *tk*$^{-/-}$ mouse lymphoma mutants by loss of heterozygosity (LOH) and by whole chromosome 11 painting: detection of recombination. *Mutagenesis,* 13: 461-474.

Linnainmaa, K. und Wolff, S. (1982): Sister Chromatid Exchange Induced by Short-Lived Monoadducts Produced by the Bifunctional Agents Mitomycin C and 8-Methoxypsoralen. *Environ Mutagen,* 4: 239-247.

Ma, T. H. und Harris, M. M. (1988): Review of the genotoxicity of formaldehyde. *Mutat Res,* 196: 37-59.

Majone, F. und Levis, A. G. (1979): Chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells treated in vitro with hexavalent chromium compounds. *Mutat Res,* 67: 231-238.

Martin, C. N., McDermid, A. C. und Garner, C. (1978): Testing of known carcinogens and noncarcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis. *Cancer Res,* 38: 2621-2627.

Mattagajasingh, S. N. und Misra, H. P. (1999): Analysis of EDTA-chelatable proteins from DNA-protein crosslinks induced by a carcinogenic chromium(VI) in cultured intact human cells. *Mol Cell Biol,* 199: 149-162.

McGhee, J. D. und von Hippel, P. H. (1975): Formaldehyde as a Probe of DNA Structure. I. Reaction with Exocyclic Amino Groups of DNA Bases. *Biochemistry,* 14: 1281-1296.

Miller, C. A. und Costa, M. (1988): Characterization of DNA-Protein Complexes Induced in Intact Cells by the Carcinogen Chromate. *Molec Carcinog,* 1: 125-133.

Miltenburger, H. G., Timm, A. und Poth, A. (1991): Lokale Genotoxizität des Formaldehyd. Wirtschaftsverlag NW, Bremerhaven.

Mitchell, A. D., Auletta, A. E., Clive, D., Kirby, P. E., Moore, M. M. und Myhr, B. C. (1997): The L5178Y/tk$^{+/-}$ mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay. A phase III report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res,* 394: 177-303.

Miyamae, Y., Iwasakai, K., Kinae, N., Tsuda, S., Murakami, M., Tanaka, M. und Sasaki, Y. F. (1997): Detection of DNA lesions induced by chemical mutagens by the single cell electrophoresis (Comet) assay. 2. Relationship between DNA migration and alkaline condition. *Mutat Res,* 393: 107-113.

Monticello, T. M. und Morgan, K. T. (1997): Chemically-induced nasal carcinogenesis and epithelial cell proliferation: a brief review. *Mutat Res,* 380: 33-41.

Moore-Brown, M. (1981): The utilization of trifluorothymidin (TFT) to select for thmidine kinase-deficient (Tk-\-) mutants from L1578Y/Tk+\- mouse lymphoma cells. *Mutat Res,* 85: 363-378.

Moore, M. M. und Doerr, C. L. (1990): Comparison of chromosome aberration frequency and small-colony TK- deficient mutant frequency in L5178Y/TK(+/-)-3.7.2C mouse lymphoma cells. *Mutagenesis,* 5: 609-614.

Murray, V. (1987): O^6-methylguanine specifically induces AT->GC transition mutations. *Mutat Res,* 190: 267-270.

Nakamuro, K. und Sayato, Y. (1981): Comparative studies of chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent arsenic. *Mutat Res,* 88: 73-80.

Natarajan, A. T., Darroudi, F., Bussmann, C. J. M. und van Kesteren-van Leeuwen, A. C. (1983): Evaluation of the mutagenicity of formaldehyde in mammalian cytogentic assays in vivo and vitro. *Mutat Res,* 122: 355-360.

Nestmann, E. R., Brillinger, R. L., Gilman, J. P., Rudd, C. J. und Swierenga, S. H. (1991): Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories: II. Mutation in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutat Res,* 246: 255-284.

Nyhan, W. und Wong, D. (1996): New approaches to understanding Lesch-Nyhan-Disease. *N Engl J Med,* 334: 1602-1604.

O'Connor, P. M. und Fox, B. W. (1989): Isolation and characterization of proteins cross-linked to DNA by the antitumor agent methylene dimethanesulfate and its hydrolytic product formaldehyde. *J Biol Chem,* 264: 6391-6397.

O'Donovan, M. R. und Mee, C. D. (1993): Formaldehyde is a bacterial mutagen in a range of Salmonella and Escherichia indicator strains. *Mutagenesis,* 8: 577-581.

Oberly, T., Piper, C. und McDonald, D. S. (1982): Mutagenicity of metal salts in the L5178Y mouse lymphoma assay. *J Toxicol Environ Health,* 9: 367-376.

Oberly, T. J., Michaelis, K. C., Rexroat, M. A., Bewsey, B. J. und Garriott, M. L. (1993): A comparison of the CHO/HGPRT+ and L5178Y/TK+/- mutation assays using suspension treatment and soft agar cloning: results for 10 chemicals. *Cell Biol Toxicol,* 9: 243-257.

Ohba, Y., Morimitsu, Y. und Watarai, A. (1979): Reaction of Formaldehyde with Calf-Thymus Nucleohistone. *Eur J Biochem,* 100: 285-293.

Olive, P. L. und Banáth, J. P. (1995): Sizing Highly Fragmented DNA in Individual Apoptotic Cells Using the Comet Assay and a DNA Crosslinking Agent. *Exp Cell Res,* 221: 19-26.

Olive, P. L., Wlodek, D., Durand, R. E. und Banáth, J. P. (1992): Factors Influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. *Exp Cell Res,* 198: 259-267.

Ortiz, T., Pinero, J. und Cortes, F. (1996): On the importance of DNA strand breaks as the first event to initiate sister chromatid exchange (SCE): experiments with restriction endonuclease *Bgl*I. *Chrom Res,* 4: 540-544.

Pastink, A. und Lohman, P. H. M. (1999): Repair and consequences of double-strand breaks in DNA. *Mutat Res,* 428: 141-156.

Paustenbach, D., Alarie, Y., Kulle, T., Schachter, N., Smith, R., Swenberg, J., Witschi, H. und Horowitz, S. B. (1997): A recommended occupational exposure limit for formaldehyde based on irritation. *J Toxicol Environ Health,* 50: 217-263.

Pfeiffer, P., Goedecke, W. und Obe, G. (2000): Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. *Mutagenesis,* 15: 289-302.

Pfuhler, S. und Wolf, H. U. (1996): Detection of DNA-Crosslinking Agents With the Alkaline Comet Assay. *Environ Mol Mutagen,* 27: 196-201.

Poli, P., Buschini, A., Restivo, F. M., Cassoni, F., Ferrero, I. und Rossi, C. (1999): Comet assay application in environmental monitoring: DNA damage in human leukocytes and plant cells in comparison with bacterial and yeast tests. *Mutagenesis,* 14: 547-555.

Preisler, V., Caspary, W. J., Hoppe, F., Hagen, R. und Stopper, H. (2000): Aflatoxin B1-induced mitotic recombination in L5178Y mouse lymphoma cells. *Mutagenesis,* 15: 91-97.

Preuss, I., Thust, R. und Kaina, B. (1996): Protective effects of O^6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) on the cytotoxic and recombinogenic activity of different antineoplastic drugs. *Int J Cancer,* 65: 506-512.

Quievryn, G. und Zhitkovich, A. (2000): Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteosome function. *Carcinogenesis,* 21: 1573-1580.

Rainaldi, G., Colella, C. M., Piras, A. und Mariani, T. (1982): Thioguanine resistance, ouabain resistance and sister chromatid exchanges in V79/AP4 Chinese hamster cells treated with potassium dichromate. *Chem Biol Interact,* 42: 45-51.

Ramirez, P., Del Razo, L. M., Gutierrez-Ruiz, M. C. und Gonsebatt, M. E. (2000): Arsenite induces DNA-protein crosslinks and cytokeratin expression in the WRL-68 human hepatic cell line. *Carcinogenesis,* 21: 701-706.

Ross, W. E. und Shipley, N. (1980): Relationship between DNA damage and survival on formaldehyde-treated mouse cells. *Mutat Res,* 79: 277-283.

Rossman, T. G., Stone, D., Molina, M. und Troll, W. (1980): Absence of arsenite mutagenicity in E coli and Chinese hamster cells. *Environ Mutagen,* 2: 371-379.

Saffran, W. A., Greenberg, R. B., Thaler-Scheer, M. S. und Jones, M. M. (1994): Single strand and double strand DNA damage-induced reciprocal recombination in yeast. Dependence on nucleotide excision repair and RAD1 recombination. *Nucleic Acids Res,* 22: 2823-2829.

Sasaki, M. S. und Tonomura, A. (1973): A high susceptibility of Fanconi's anemia to chromosome breakage by DNA cross-linking agents. *Cancer Res,* 33: 1829-1836.

Sawjer, J., Moore, M. M., Clive, D. und Hozier, J. C. (1985): Cytogenetic characterization of the L5178Y TK+/- 3.7.2C mouse lymphoma cell line. *Mutat Res,* 147: 243-253.

Schempp, W. und Vogel, W. (1979): Difference between diploid and aneuploid Chinese hamster cells in replication at mid-S-phase. *Chromosoma,* 73: 109-115.

Schmid, E., Göggelmann, W. und Bauchinger, M. (1986): Formaldehyde-induced cytotoxic, genotoxic and mutagenic response in human lymphocytes and *Salmonella typhimurium*. *Mutagenesis,* 1: 427-431.

Shafer,D.A. (1981): Replication bypass SCE mechanisms and the induction of SCE by single-strand adducts or lesion of DNA. In: Tice,R.R. und Hollaender,A. (Hrsg.) *Sister Chromatid Exchanges*. Plenum Press, New York: 245-265.

Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R. und Schneider, E. L. (1988): A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res,* 175: 184-191.

Singh, N. P. und Stephens, R. E. (1997): Microgel electrophoresis: Sensitivity, mechanisms, and DNA electrostretching. *Mutat Res,* 383: 167-175.

Sladek, F. M., Munn, M. M., Rupp, W. D. und Howard-Flanders, P. (1989): In vitro repair of psoralen cross-links by RecA, UvrABC, and the 5'-exonuclease of DNA polymerase I. *J Biol Chem,* 264: 8410-8414.

Snow, E. T. (1992): Metal carcinogenesis: mechanistic implications. *Pharmacol Ther,* 53: 31-65.

Speit, G., Habermeier, B. und Helbig, R. (1994): Differences in the response to mutagens between two V79 sublines. *Mutat Res,* 325: 105-111.

Sugiyama, M., Lin, X. H. und Costa, M. (1991): Protective effect of vitamin E against chromosomal aberrations and mutation induced by sodium chromate in Chinese hamster V79 cells. *Mutat Res,* 260: 19-23.

Sugiyama, M., Patierno, S. R., Cantoni, O. und Costa, M. (1986): Characterization of DNA Lesions Induced by $CaCrO_4$ in Synchronous and Asynchronous Cultured Mammalian Cells. *Molec Pharmacology,* 29: 606-613.

Swierenga, S. H., Heddle, J. A., Sigal, E. A., Gilman, J. P., Brillinger, R. L., Douglas, G. R. und Nestmann, E. R. (1991): Recommended protocols based on a survey of current practice in genotoxicity testing laboratories, IV. Chromosome aberration and sister-chromatid exchange in Chinese hamster ovary, V79 Chinese hamster lung and human lymphocyte cultures. *Mutat Res,* 246: 301-322.

Takahara, P. M., Rosenzweig, A. C., Frederick, C. A. und Lippard, S. J. (1995): Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. *Nature,* 377: 649-652.

Teng, S. P., Woodson, S. A. und Crothers, D. M. (1989): DNA sequence specifity of mitomycin cross-linking. *Biochemistry,* 28: 3901-3907.

Thyagarajan, B. und Campbell, C. (1997): Elevated Homologous Recombination Activity in Fanconi Anemia Fibroblasts. *J Biol Chem,* 272: 23328-23333.

Tice,R.R. (1995): The single cell gel/comet assay: a microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips,D.H. und Venitt,S. (Hrsg.) *Environmental Mutagenesis*. βIOS Scientific Publishers, Oxford: 315-339.

Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C. und Sasaki, Y. F. (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen,* 35: 206-221.

Tice, R. R., Yager, J. W., Andrews, P. und Crecelius, E. (1997): Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treated with soduim arsenite. *Mutat Res,* 386: 315-334.

Titenko-Holland, N., Levine, A. J., Smith, M. T., Quintana, P. J. E., Boeniger, M., Hayes, R., Suruda, A. und Schulte, P. (1996): Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde. *Mutat Res Genet Toxicol,* 371: 237-248.

Tomasz, M. (1994a): DNA adducts of the mitomycins. *IARC Sci Publ,* 125: 349-357.

Tomasz,M. (1994b): The Mitomycins: Natural Cross-linkers of DNA. In: Neidle,S. (Hrsg.) *Molecular aspects of anticancer drug-DNA interactions*. MacMillan, Basingstoke: 312-349.

Tomasz, M., Mercado, C. M., Olson, J. und Chatterjie, N. (1974): The mode of interaction of mitomycin C with deoxyribonucleic acid and other polynucleotides in vitro. *Biochemistry,* 13: 4878-4887.

Trimmer, E. E. und Essigmann, J. M. (1999): Cisplatin. *Essays Biochem,* 34: 191-211.

Uotila,L. und Koivusalo,M. (1989): Glutathione-dependent oxidoreductases: formaldehyde dehydrogenase. In: Dolphin,D., Poulsen,R., und Avramovic,O. (Hrsg.) *Coenzymes and Cofactors, Glutathione. Chemical, Biological and Medical Aspects*. Vol. 3, part A, John Wiley & Sons, New York: 517-551.

Vijayalaxmi, Tice, R. R. und Strauss, G. H. S. (1992): Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single-cell gel electrophoresis technique. *Mutat Res,* 271: 243-252.

von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H. G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. und Madle, S. (2000): In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat Res,* 468: 137-163.

Wang, T.-C. V. und Smith, K. C. (1986): Postreplicational formation and repair of DNA double-strand breaks in UV-irradiated *Escherichia coli* K-12. *Mutat Res,* 165: 39-44.

Wang, Z. und Rossman, T. G. (1993): Stable and inducible arsenite resistance in Chinese hamster cells. *Toxicol Appl Pharmacol,* 118: 80-86.

Wangenheim, J. und Bolcsfoldi, G. (1988): Mouse lymphoma L5178Y thymidine kinase locus assay of 50 compounds. *Mutagenesis,* 3: 193-205.

Warren, A. J., Ihnat, M. A., Ogdon, S. E., Rowel, E. E. und Hamilton, J. W. (1998): Binding of Nuclear Proteins Associated With Mammalian DNA Repair to the Mitomycin C-DNA Interstrand Crosslink. *Environ Mol Mutagen,* 31: 70-81.

Wolff, S. und Afzal, V. (1996): Segregation of DNA polynucleotide strands into sister chromatids and the use of endoreduplicated cells to track sister chromatid exchanges induced by crosslinks, alkylations, or x-ray damage. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 93: 5765-5769.

Wu, H., Sachs, R. K. und Yang, T. C. (1998): Radiation-induced total-deletion mutations in the human hprt gene: a biophysical model based on random walk interphase chromatin geometry. *Int J Radiat Biol,* 73: 149-156.

Ying, C. J., Yan, W. S., Zhao, M. Y., Ye, X. L., Xie, H., Yin, S. Y. und Zhu, X. S. (1997): Micronuclei in nasal mucosa, oral mucosa and lymphocytes in students exposed to formaldehyde vapor in anatomy class. *Biomed Environ Sci,* 10: 451-455.

Yu, Z., Chen, J., Ford, B. N., Brackley, M. E. und Glickman, B. W. (1999): Human DNA Repair Systems: An Overview. *Environ Mol Mutagen,* 33: 3-20.

Zamble, D. B. und Lippard, S. J. (1995): Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. *Trends Biochem Sci,* 20: 435-439.

Zamble, D. B., Mu, D., Reardon, J. T., Sancar, A. und Lippard, S. J. (1996): Repair of Cisplatin-DNA Adducts by the Mammalian Excision Nuclease. *Biochemistry,* 35: 10004-10013.

Zhitkovich, A. und Costa, M. (1992): A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells *in vivo*. *Carcinogenesis,* 13: 1485-1489.

Zhu, X., Dunn, J. M., Goddard, A. D., Squire, J. A., Becker, A. und Phillips, R. A. (1992): Mechanisms of loss of heterozygosity in retinoblastoma. *Cytogenet Cell Genet,* 59: 248-252.

Zwelling, L. A., Bradley, M. O., Sharkey, N. A., Anderson, T. und Kohn, K. W. (1979): Mutagenicity, cytotoxicity and DNA crosslinking in V79 Chinese hamster cells treated with cis- and trans-Pt(II) diamminedichloride. *Mutat Res,* 67: 271-280.

Zwelling, L. A., Kohn, K. W., Ross, W. E., Ewig, R. A. und Anderson, T. (1978): Kinetics of formation and disappearance of a DNA cross-linking effect in mouse leukemia L1210 cells treated with cis- and trans-diamminedichlorplatinium(II). *Cancer Res,* 38: 1762-1768.

Die Tragödie der Wissenschaft – das Erschlagen einer schönen Hypothese durch eine hässliche Tatsache.

Thomas Henry Huxley

Danksagung:

Ich möchte mich bei allen ganz herzlich bedanken, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. W. Vogel danke ich für die Aufnahme in die Abteilung Humangenetik, für seine stete Diskussionsbereitschaft und dafür, dass er den Besuch von Tagungen und Fortbildungen gefördert hat.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. G. Speit für die Vergabe des Themas, für seine kompetente Betreuung und gewinnbringenden Diskussionen. Ich danke ihm auch für den mir gewährten Freiraum bei der Durchführung der Experimente und dafür, dass er den Überblick bewahrte und mir auch rechtzeitig wieder mein eigentliches Thema bewusst machte, wenn meine eigenen Ideen zu weit geführt hätten. Durch seine Bemühungen war es mir auch möglich eine Vielzahl von Tagungen, Workshops und Fortbildungen zu besuchen und er hat dadurch wesentlich zu meiner wissenschaftlichen Ausbildung beigetragen.

Herrn Prof. H.U. Wolf danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Frau Petra Schütz bedanken, die mir vor allem am Beginn meiner Doktorarbeit sehr hilfreich zur Seite stand und die mir half, so manchen kompliziert ausgedachten Versuchsansatz neu zu gestalten: „*Wär's denn so nicht viel einfacher?*" Ihre fröhliche und unkomplizierte Art trug wesentlich zum guten Arbeitsklima bei, so verstand sie es z.B. stets, mich charmant auf meine (noch) nicht aufgeräumten Versuchsreste hinzuweisen.

Ein ganz großer Dank geht auch an Frau Kristin Reiser, deren Bemühungen während ihrer Diplomarbeit einen wesentlichen Schritt dazu beigetragen haben, die Probleme bei der Detektion von Crosslinks im Comet Assay zu erkennen und zu lösen. Die Betreuung während dieser Zeit hat mir wegen ihrer fröhlichen und humorvollen Art stets Spaß gemacht.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Frau Dr. Claudia Dennog, Herrn Andreas Rothfuß und Frau Kristina Trenz bedanken, die mir während meiner Doktorarbeit immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mit denen man immer ergiebige Diskussionen führen konnte. Auch konnte man mit ihnen bei Tagungen und Fortbildungen immer sehr unterhaltsame Abende verbringen.

Ein besonderer Danke geht auch an Frau Antje Kollak, die mir die Technik der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung beibrachte und bei der Durchführung dieser Analysen stets mit wertvollen Tipps und einer helfenden Hand beiseite stand.

Natürlich möchte ich mich auch noch bei den anderen Personen bedanken, die mir bei der Etablierung neuer Techniken geholfen haben: Herrn Dr. A. Zhitkovic für sein Protokoll des K-SDS Assays, Herrn Dr. W. Muster für die Einführung in den MLA und Herrn Dr. M. Baumeister für die dafür notwendigen L5178Y-Zellen, sowie Frau Dr. M. Liechty für die Unterstützung bei der molekularen Analyse der MLA-Mutanten.

Den restlichen Mitgliedern der Abteilung Humangenetik gilt ebenfalls mein Dank für das gute Arbeitsklima. Sie haben durch viele kleine und große Ratschläge auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und so ganz nebenbei meine Informatik-Kenntnisse durch ihre nie endenden Fragen und Probleme perfektioniert ;-).

Nicht zuletzt danke ich ganz besonders herzlich meiner Freundin Carmen, die mich während dieser Zeit stets unterstützt hat und mich auch nicht hat vergessen lassen, dass es noch was anderes außer den „Dr." gibt. Danke natürlich auch fürs Korrekturlesen. Ein Dank geht auch an meine Eltern, ohne deren Unterstützung ich den langen Weg bis hierher nie hätte beschreiten können.

Diese Arbeit wurde im Rahmen der Projekte „Umwelt und Gesundheit" und „BW-PLUS" mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert.

Publikationen, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit entstanden sind:

Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis.
Merk, O. und Speit, G. *Env Mol Mutagen. 1998; 32(3):260-268*

Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity.
Merk, O. und Speit, G. *Env Mol Mutagen. 1999; 33(2):167-172*

The influence of temperature during alkaline treatment and electrophoresis on results obtained with the comet assay.
Speit,G., Trenz, K., Schütz, P., Rothfuß, A. und Merk, O. Toxicol Lett. 1999; 110(1-2):73-78

Detection of crosslinks with the comet assay.
Speit, G. und Merk, O. *Neoplasma. 1999, Vol.46, Supplementum*

Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines.
Speit, G., Schütz, P. und Merk, O. *Mutagenesis. 2000; 15(1):85-90*

Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay.
Merk, O., Reiser, K. und Speit, G. *Mutat Res. 2000; in press*

Weitere Publikationen:

Characterization of SV40-transformed xeroderma pigmentosum cell lines for their usability in HPRT mutation studies.
Merk, O. und Speit, G. *Mutagenesis. 1997 Sep; 12(5):391-395*

Differential characteristics of two new tumorigenic cell lines of human breast carcinoma origin.
Möbus, V.J., Moll, R., Gerharz, C.D., Kieback, D.G., Merk, O., Runnebaum, I.B., Linner, S., Dreher, L., Grill, H.-J. und Kreienberg, R. *Int J Cancer. 1998 Jul 29; 77(3):415-423*

Prenatally detected true double trisomy mosaic 12 and 13 not confirmed in fetal and placental tissues by conventional cytogenetic methods, but suggested by FISH analysis.
Djalali, M., Merk, O., Storli, K., Wolf, M., und Vogel, W. *Prenatal Diagnosis. 2000; in press*

Evaluation of mutagenic effects of hyperbaric oxygen (HBO) *in vitro* II. Induction of oxidative DNA damage and mutations in the mouse lymphoma assay.
Rothfuß, A., Merk, O., Radermacher, P. und Speit, G., *Mutat. Res. 2000; in press*

Tagungsbeiträge

Reparatur von Crosslinks in Säugerzellen und mögliche Konsequenzen für die Mutagenese und Kanzerogenese.
Speit, G. und Merk, O.; DNA Repair Workshop 1998 in Mainz.

Detection of crosslinking agents with the comet assay.
Merk, O. and Speit, G.; EEMS-Tagung 1998 in Salzburg

Mögliche Probleme bei der softwareunterstützen Analyse von Comet-Assay Präparaten: Bewertung von unterschiedlichen Migrationsparametern und Fluorochromen.
Merk, O. und Speit, G.; 3. GUM-Comet-Assay Workshop 1999 in Basel.

Detection of Crosslinks with the Comet Assay.
Speit, G. and Merk, O., Comet-Assay Workshop 1999 in Smolenice. Extended abstract in Neoplasma. 1999, Vol.46, Supplementum

Repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines.
Merk, O., Schütz, P. and Speit, G.; EEMS-Tagung 1999 in Kopenhagen. Abstract in Pharmacology and Toxicology. 1999; 85 Suppl.1:26

Detection of K_2CrO_4-induced DNA lesions with the comet assay in relation to other genotoxic effects.
Reiser, K., Merk, O. und Speit, G.; GUM-Tagung 2000 in Ulm

Probleme mit dem Comet Assay beim Nachweis von Crosslinkern.
Merk, O., Reiser, K. und Speit,G.; GUM-Tagung 2000 in Ulm

Verbesserungen des Comet Assay Protokolls zum Nachweis von Crosslinkern.
Merk, O., Reiser K. und Speit, G.; Tagung des DNA-Reparatur Netzwerks 2000 in Essen