

Universitätsklinikum Ulm
Institut für Humangenetik
Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. W. Vogel

Untersuchungen zur Genotoxizität von Formaldehyd *in vitro* und *in vivo*

DISSERTATION

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

vorgelegt von
Oliver Thorsten Schmid
aus Geislingen an der Steige

2008

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter: Prof. Dr. Günter Speit
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Holger Barth
Tag der Promotion: 23.01.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iii
1 Einleitung	1
1.1 Der Schutz der Zellen vor FA	4
1.2 Die Genotoxizität und Kanzerogenität von FA	6
1.3 Der Mechanismus der FA-induzierten Kanzerogenese	13
1.4 Beurteilung von FA durch wissenschaftliche Institutionen und Behörden	15
1.5 Fragestellung	17
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.2 Methoden	30
3 Ergebnisse	63
3.1 Die Genotoxizität von FA in V79 Zellen und Untersuchungen zur Konzentrations-Effekt-Beziehung	64
3.2 Untersuchung zur Zytotoxizität und Genotoxizität von FA <i>in vitro</i> in der humanen Lungenzelllinie A549	77
3.3 Untersuchung zur Genotoxizität von FA <i>in vitro</i> in humanen primären Nasenepithelzellen (HNEC)	81
3.4 Untersuchungen zur Persistenz von FA-induzierten DPX unter verschiedenen Expositionsbedingungen	85
3.5 Genotoxizität von FA in kultiviertem humanem Blut	97
3.6 Lokale Genotoxizität von FA <i>in vivo</i> in humanen Mundschleim- hautzellen gemessen mit dem MNT	106
4 Diskussion	111
4.1 Das genotoxische Potential von FA <i>in vitro</i>	111
4.2 Induktion und Reparatur von FA-induzierten DPX in kultivierten menschlichen Zellen	115
4.3 Die Zytotoxizität von FA im Verhältnis zur Genotoxizität	119
4.4 Auswirkung wiederholter FA-Exposition auf die Induktion genotoxischer Effekte	121

Inhaltsverzeichnis

4.5	Der Einfluss von FA auf die Expression der FA-abbauenden Enzyme FDH, ALDH1A1 und ALDH2	124
4.6	Induktion von genotoxischen Effekten durch FA in kultiviertem humanem Blut.....	126
4.7	Einschätzung lokaler genotoxischer Effekte von FA im Menschen	131
5	Zusammenfassung.....	137
6	Literaturverzeichnis	139

Abkürzungsverzeichnis

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
AIC	Akaike Information Criterion
ALDH	Aldehyd Dehydrogenase
APS	Ammoniumpersulfat
BfR	Bundesinstitut für Risikobewertung
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	Bovine serum albumine; Rinderserum Albumin
cDNA	complementary DNA
CP	Crossing Point
Cyt B	Cytochalasin B
Da	Dalton
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase I	Deoxyribonuclease I
DPX	DNA-Protein-Crosslinks
EA	Ethylacetat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPA	Environmental Protection Agency, USA
FA	Formaldehyd
FDH	Formaldehyd Dehydrogenase
FKS	Fötales Kälberserum
FPG	Fluoreszenz plus Giemsa (-Färbung)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSH	Glutathion
Gy	Gray
h	Stunden
HBSS	Hanks balanced salt solution
HMBS	Hydroxymethylbilan-Synthase
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase

Abkürzungsverzeichnis

HR	homologe Rekombination
HRP	Horseradish-Peroxidase (Meerrettichperoxidase)
IARC	International Agency for Research on Cancer
IVDF	Polyvinylidifluorid
LMP	Low Melting Point (Agarose)
MAK	maximale Arbeitsplatzkonzentration
MEM	Minimal Essential Medium Earle
min	Minuten
MN	Mikronukleus
MNT	Mikronukleus-Test
mRNA	messenger RNA
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD reduzierte Form)
NCI	National Cancer Institute, USA
NER	Nukleotid-Exzisionsreparatur
p	Wahrscheinlichkeit
PBS	Phosphate buffer saline
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PEK	Plattenepithelkarzinome
PHA	Phytohaemagglutinin
PI	Proliferationsindex
PK	Proteinase K
ppm (h)	parts per million / Teile pro Millionen; (kumulative Dosis pro Stunde)
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minuten)
RSS	Residual Sum of Squares
RT-PCR	Real Time PCR
SCE	Schwesterchromatidaustausch
SD	Standardabweichung / Standard Deviation
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TPBS	Tween (20) Phosphate buffer saline
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

1 Einleitung

Formaldehyd (FA) ist der Trivialname von Methanal, dem Aldehyd der Ameisensäure. Seine Summenformel und chemische Struktur sind in Abbildung 1 dargestellt.

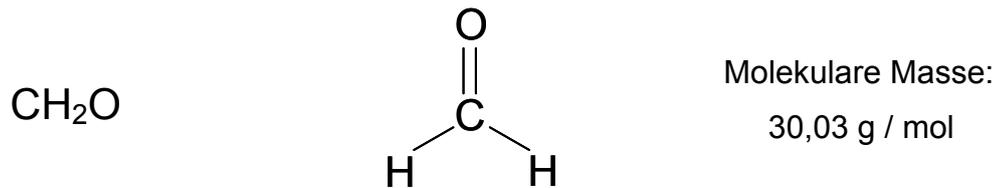


Abbildung 1: Die Summenformel und Strukturformel von Formaldehyd.

FA wird kommerziell vor allem als Formalin angeboten. Dies ist eine 30-50%ige wässrige Lösung von FA meist mit Antipolymerisationszusätzen (z.B. Methanol). In verdünnten wässrigen Lösungen liegt er als Monomer vor und bildet mit Wasser ein Aldehydhydrat. In höher konzentrierten Lösungen bilden sich dann FA-Oligomere bzw. -Polymere, die eine Länge von 8-100 Einheiten besitzen können. Das Polymer ist in seiner dehydrierten Form ein weißes Pulver und wird als Paraformaldehyd bezeichnet. FA ist ein wichtiges Produkt der chemischen Industrie. Allein die weltweite Produktion von 37%igem FA im Jahr 2000 wird mit über 21 Millionen Tonnen angegeben (IARC, 2006). FA wird hauptsächlich für die Herstellung von Kunstharzen verwendet, die dann in vielen anderen Produkten wie z.B. Sperrholzplatten und Isoliermaterial weiterverarbeitet werden. FA wird auch in der Textil-, Leder-, Gummi- und Pharmaindustrie und vielen anderen Industriezweigen verwendet. Außerdem wird FA als Desinfektionsmittel, in der Biologie zur Fixierung von Zellen und Geweben und von Bestattungsinstituten zum Einbalsamieren benutzt. Ferner ist es vielen kosmetischen Produkten als Antimikrobiotikum hinzugefügt. Darüber hinaus entsteht FA bei nahezu allen unvollständigen Verbrennungsprozessen von organischem Material. So ist es u.a. im Zigarettenrauch und in Autoabgasen enthalten. Der Mensch ist exogen vor allem durch atmosphärischen FA exponiert, der durch Verbrennungsprozesse, durch Ausgasen von FA-enhaltenden Produkten und in der Troposphäre durch

Oxidation von Kohlenwasserstoffen entsteht. Durch Inhalation sind dann vor allem die Schleimhäute des Nasen- und Rachenraums die am höchsten exponierten Körperteile („sites of first contact“). Aber auch die Haut ist durch atmosphärischen FA und FA-enthaltende Produkte (Kleidung, Kosmetika) ein relevant exponiertes Organ (IARC, 2006).

Die Konzentration von gasförmigem FA wird meist in Milligramm FA pro Kubikmeter Luft (mg/m^3) oder „FA-Moleküle pro Millionen Moleküle“ (ppm = parts per million) angegeben, wobei für FA gilt: $1 \text{ ppm} = 1,2 \text{ mg}/\text{m}^3$. Die FA-Luftkonzentration in ländlichen Gebieten liegt meist unter $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Preuss et al, 1985) und in urbanen Gebieten zwischen 1 und $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$, kann aber an Straßen bis zu $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$ erreichen. Die FA-Luftkonzentration in Gebäuden ist abhängig von den verwendeten Baumaterialien und der Durchlüftung und bewegt sich im Bereich von etwa $0,02 - 0,06 \text{ mg}/\text{m}^3$. Die maximal zulässige Arbeitsplatzkonzentration, vorgeschlagen von der MAK-Kommission der DFG, liegt zurzeit bei $0,37 \text{ mg}/\text{m}^3$ (MAK, 2000). FA in der Luft führt zu Reizungen der Augen und Schleimhäute beim Menschen. Unter $0,5 \text{ ppm}$ FA-Luftkonzentration ist er vom Menschen nicht wahrnehmbar, bei einer Konzentration von 1 ppm dagegen treten in einer Studie bei 21% der Probanden Reizungen der Augen auf, bei 2 ppm bei 35%. Die Reizung der Schleimhäute der Nase und des Rachens beginnt bei ca. 1 ppm (Kulle, 1993). FA ist ein endogenes, natürlich vorkommendes Produkt des humanen Metabolismus und wird in Zellen vor allem durch N-, O- und S-Demethylierungsreaktionen von Serin, Glycin, Methionin und Cholin gebildet. Außerdem ist er ein wichtiges Zwischenprodukt der Biosynthese von Purinen, Thymidin und bestimmten Aminosäuren (Neuberger, 1981). Im Organismus liegt FA nur in geringem Maße in seiner freien Form vor. So bindet er zum einen schnell an Glutathion, welches in Zellen in hohen Konzentrationen vorkommt, und kann dann von der FA-Dehydrogenase (FDH) und weiteren Enzymen schließlich zu CO_2 und H_2O abgebaut werden. Weitere wichtige Enzyme zum Abbau von FA sind die Aldehyddehydrogenasen ALDH1A1 und ALDH2, die direkt freien FA umsetzen können. Daneben kann freier FA an Tertahydrofolsäure binden und ist so ein Bestandteil des Kohlenstoffpools (one carbon pool) der Zelle, der dann für den Aufbau weiterer Makromoleküle wichtig ist. FA vernetzt außerdem Proteine und wirkt so als Fixierungsmittel. Die Verknüpfung von Proteinen mit der DNA, die sogenannten DNA-Protein-Crosslinks oder DPX, stellen den FA-induzierten DNA-

Schaden dar. Schließlich kann FA Bindungen mit Harnstoff und Cystein eingehen (Abbildung 2).

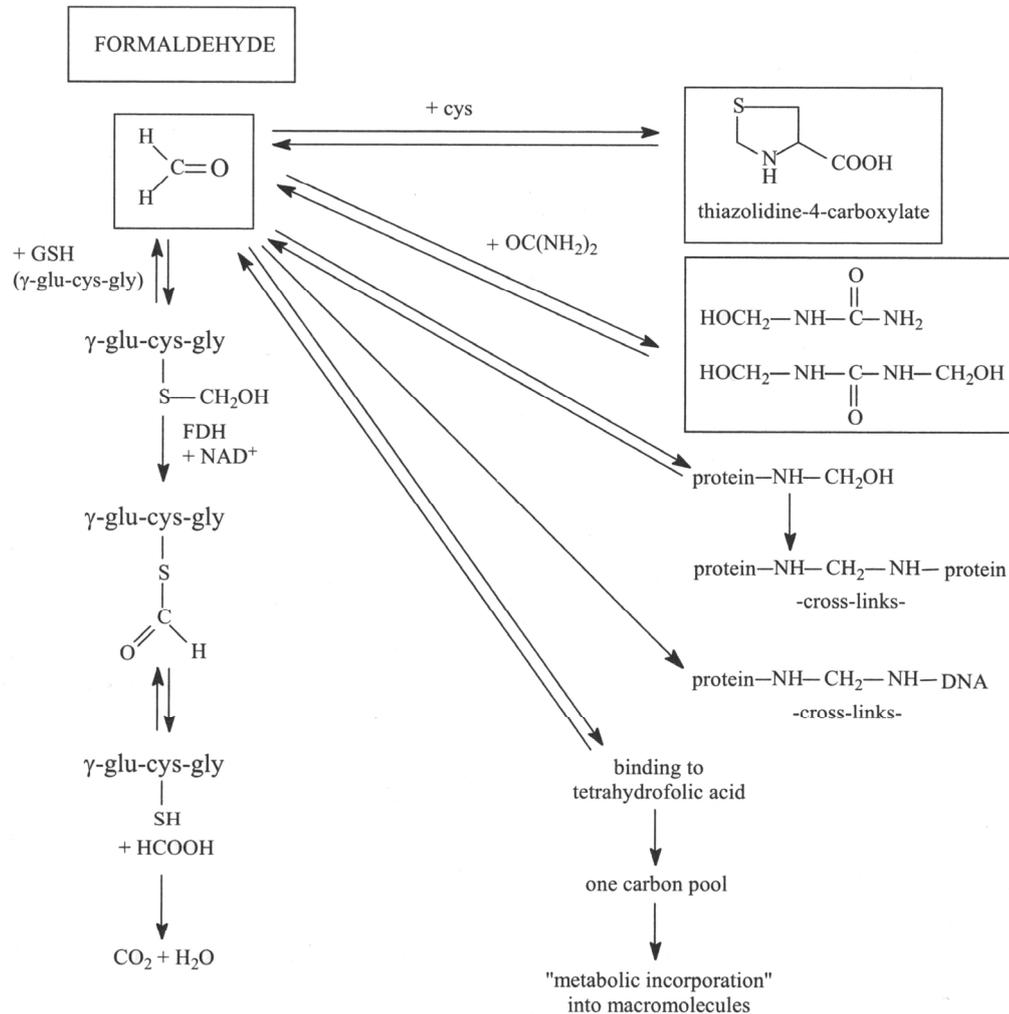


Abbildung 2: Biologische Reaktionen von Formaldehyd (GSH = Glutathion; glu = Glutaminsäure; cys = Cystein; gly = Glycin; FDH = Formaldehyde-Dehydrogenase; NAD^+ = Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid; HCOOH = Methansäure; $\text{OC}(\text{HN}_2)_2$ = Harnstoff) (IARC, 2006; S. 188).

FA ist nicht nur in Zellen, sondern auch in Körperflüssigkeiten wie Blut, vorhanden. Die FA-Konzentration in humanem Blut beträgt etwa 2,6 $\mu\text{g/g}$, andere Spezies besitzen vergleichbare FA-Konzentrationen (Casanova et al., 1988; Heck et al., 1982; Heck et al., 1985).

1.1 Der Schutz der Zellen vor FA

In Zellen ist FA als natürliches Produkt des Metabolismus in einer Konzentration von etwa 100 μM vorhanden und liegt meist gebunden an die funktionelle Gruppe der Thiole (-SH) vor. Das häufigste Thiol in Zellen ist Glutathion (GSH), welches in Konzentrationen im Milimolarbereich vorhanden ist. Andere vorkommende Thiole sind Cystein und freie Thiole von Proteinen. Da die Thiole in Zellen in hohen Konzentrationen vorhanden sind und FA leicht an sie bindet, werden sie unter anderem als Schutzsystem angesehen. So wurde in Experimenten gezeigt, dass die Erhöhung der GSH-Menge durch Vorbehandlung der Zellen mit GSH selbst, oder einem Vorläufermolekül, die Genotoxizität und Toxizität von FA senken kann, wohingegen eine Vorbehandlung mit Buthioninsulfoximin, welches GSH depletiert, die FA-Toxizität verstärkt (Grafström, 1996; Nilsson et al., 1998). Die Art der chemischen Bindung von FA an GSH unter physiologischem pH-Wert und ihre dreidimensionale Struktur wurden von Bateman und Kollegen untersucht. Die Bildung einer bityklischen Ringstruktur nach GSH-Bindung maskiert dabei die Reaktivität von FA besonders effektiv (Bateman et al., 2007). Zellen können sich vor toxischen FA-Konzentrationen schützen, indem Sie FA mit Hilfe von Enzymen abbauen. FA kann von verschiedenen Enzymen umgesetzt werden (siehe auch Abbildung 3). Dies sind vor allem:

- Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH)
- Aldehyd-Dehydrogenase 1 (ALDH1A1)
- Aldehyd-Dehydrogenase 2 (ALDH2)
- Katalase

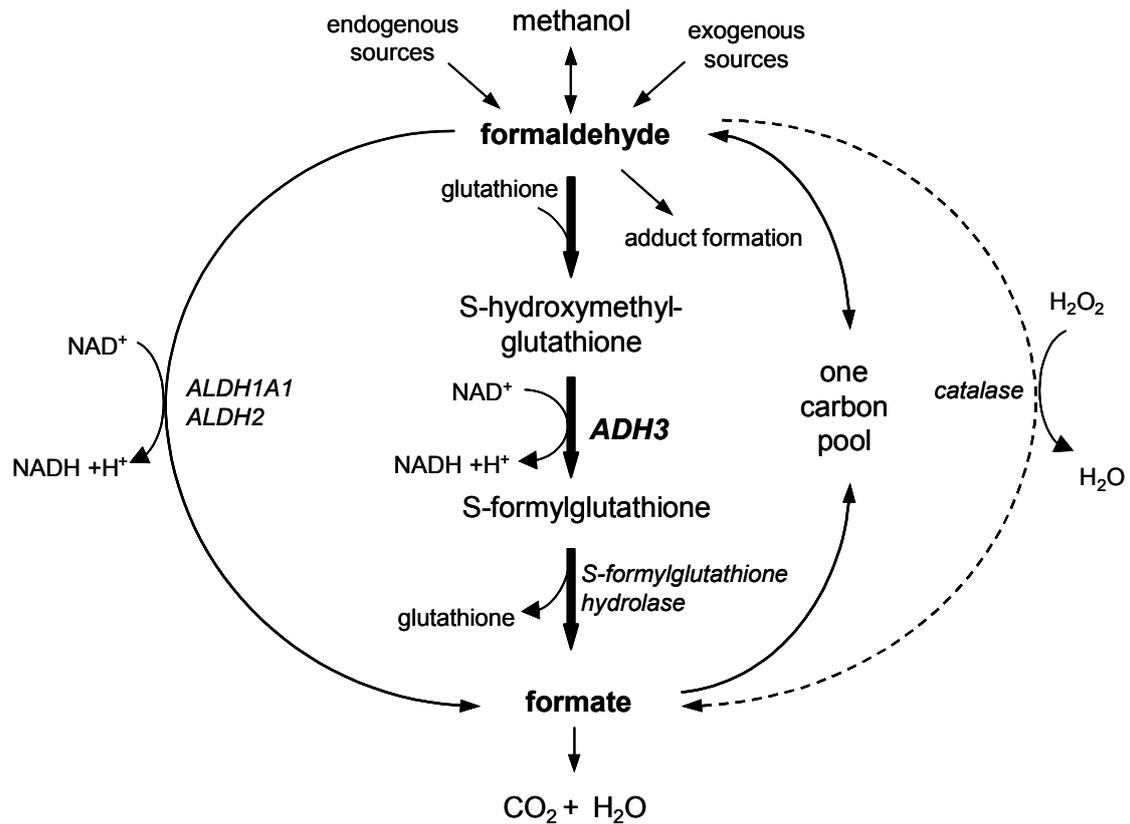


Abbildung 3: Der Metabolismus von Formaldehyd (NAD⁺: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid; NADH: Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form; ADH3: Formaldehyde-Dehydrogenase; ALDH1A1 bzw. 2: Aldehyd-Dehydrogenase1A1 bzw.2) (IARC, 2006; S. 193)

Als wichtigstes FA-abbauendes Enzym gilt die Glutathion (GSH) -abhängige Formaldehyd Dehydrogenase (FDH), manchmal auch als ADH5 „chi polypeptide“ oder ADH3 bezeichnet. Das Enzym oxidiert S-Hydroxymethylglutathion (FA gebunden an GSH) zu S-Formylglutathion unter Verbrauch von NAD⁺. Dieses Zwischenprodukt wird dann durch die S-Formylglutathion Hydrolase zu Formiat und reduziertem GSH metabolisiert (Uotila und Koivusalo, 1974). Der FDH-katalysierte Schritt ist dabei der limitierende Schritt der Umsatzgeschwindigkeit, da die FDH-Umsatzgeschwindigkeit etwa zwei bis drei Größenordnungen langsamer ist, als die der S-Formylglutathion Hydrolase (Uotila und Koivusalo, 1997). Untersuchungen in unterschiedlichen Spezies und verschiedenen Geweben und Zelltypen legen nahe, dass die FDH ein ubiquitär vorkommendes Enzym ist und die ancestrale Form der ADH darstellt, aus der sich andere ADHs gebildet haben (IARC, 2006). So wurde sie in der Ratte in bisher allen untersuchten Geweben

gefunden. Die Expression zwischen verschiedenen Geweben variiert um das 12 bis 30-fache, wobei Lunge-, Haut- und Oesophagusgewebe eher zu den Geweben mit weniger starker Expression zählen (Uotila und Koivusalo, 1997).

Weitere Enzyme, die FA detoxifizieren können, sind die Aldehyd-Dehydrogenasen 1A1 und 2 (ALDH1A1 und ALDH2). ALDH1A1 ist im Zytoplasma lokalisiert, ALDH2 dagegen in Mitochondrien. Sie zeigen beide Aktivität gegenüber freiem FA und setzen es unter NAD(P)⁺ Verbrauch zu Formiat um. Die beiden Enzyme wurden schon in einer Vielzahl von Geweben im Menschen und im Tier nachgewiesen, u.a auch in der respiratorischen und olfaktorischen Mukosa von Ratten (Bogdanffy et al., 1986; Casanova-Schmitz et al., 1984; Uotila und Koivusalo, 1997). Die humane Mukosa des respiratorischen Trakts wurde noch nicht untersucht. Die K_m -Werte der ALDHs bewegen sich im Bereich von 0,5 mM FA. Dies ist viel höher als der K_m -Wert der FDH, der bei etwa 3-4 μ M liegt. Es wird daher spekuliert, dass die FDH das primäre FA-abbauende Enzym unter physiologischen Bedingungen darstellt, wohingegen die ALDHs bei erhöhten FA-Konzentrationen eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung spielen könnten. (Casanova-Schmitz, 1984; Dicker und Cederbaum, 1986; Mukerjee und Pietruszko, 1992).

FA kann auch vom Enzym Katalase oxidiert werden. Über die Bedeutung dieses Abbauwegs für die FA-Detoxifikation ist aber wenig bekannt. Es wird spekuliert, dass er nach GSH-Depletion wichtig sein könnte (BfR 2006).

Sind die zellulären Mechanismen zur FA-Detoxifikation überlastet, induziert FA Genotoxizität und Zytotoxizität, die sich letztlich in Kanzerogenität auswirken kann.

1.2 Die Genotoxizität und Kanzerogenität von FA

1.2.1 DNA-Protein-Crosslinks

Der primäre DNA-Schaden, den FA verursacht, sind DNA-Protein-Crosslinks (DPX). Dies sind kovalente chemische Verknüpfungen des DNA-Doppelstrangs bevorzugt mit DNA-assoziierten Proteinen wie etwa Histonen. Ein DPX entsteht, indem FA zuerst mit einer Amino- oder Iminogruppe eines Proteins (z.B. Lysin- oder Arginin-Seitenketten) reagiert und eine Schiff'sche Base bildet. Diese reagiert

dann mit einer anderen Aminogruppe einer DNA-Base und vervollständigt so den DPX (Abbildung 4).

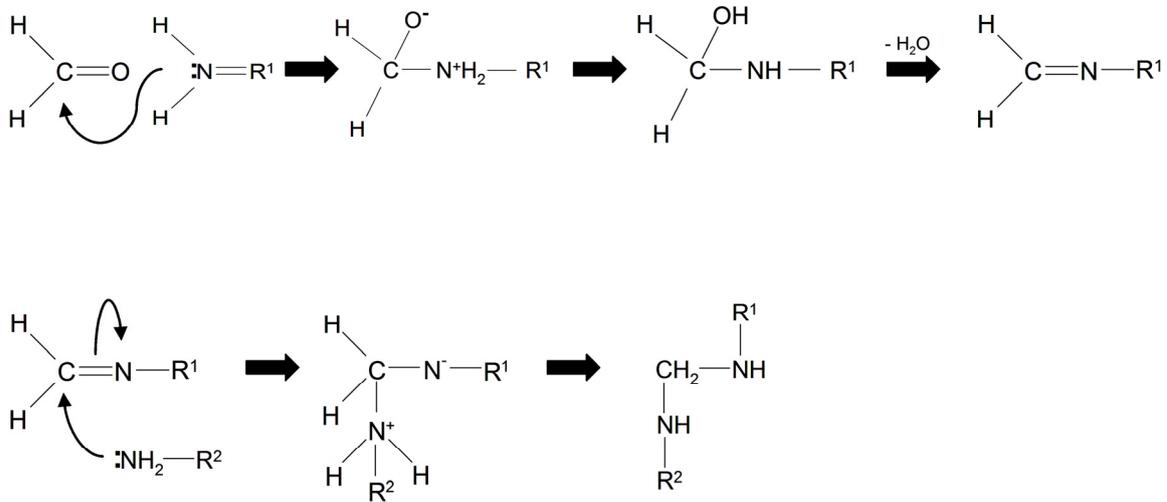


Abbildung 4: Der Mechanismus der DNA-Protein-Crosslink (DPX)-Entstehung durch Formaldehyd (FA). Diese Abbildung zeigt die Reaktionsschritte von FA mit einer Seitenkette eines Proteins zur Bildung einer Schiff'schen Basen, die dann mit der DNA reagiert und so den DPX vervollständigt (Barker et al., 2005; S. 114)

Aldehyd-induzierte DPX sind reversibel und können passiv durch spontane Hydrolyse und Inkubation bei hohen Temperaturen aufgelöst werden. Zellen entfernen DPX über aktive Reparaturmechanismen, es ist aber bisher unbekannt, welche Reparaturwege genau involviert sind. Mehrere Hinweise sehen die Nukleotid-Exzisionsreparatur (NER) in Kombination mit homologer Rekombination (HR) als mögliche beteiligte Reparaturmechanismen (Barker et al., 2005). Experimente mit verschiedenen DT40 Zelllinien, die jeweils eine Mutation in einem Reparaturgen haben, weisen ebenfalls darauf hin, dass die HR eine wichtige Rolle spielt, da Zellen mit Mutationen in Genen der HR hypersensitiv gegenüber FA sind (Ridpath et al., 2007). Auch ein proteolytischer Abbau der in den DPX gebundenen Proteine ist in der Diskussion (Quievryn und Zhitkovich, 2000). Eine neuere Arbeit von Nakano und Kollegen an einem bakteriellen System enthält Hinweise darauf, dass DPX, die ein Protein kleiner als 12-14 kDA beinhalten, mit Hilfe der NER repariert werden, DPX mit großen Proteinen hingegen durch die RecB-abhängige HR (Nakano et al., 2007). Die biologischen Konsequenzen der DPX sind gestörte zelluläre Prozesse, die mit dem DNA-Metabolismus

zusammenhängen, wie etwa die Replikation, die Transkription und das „chromatin remodeling“.

1.2.2 Genotoxizität von FA *in vitro*

Eine Vielzahl von genotoxischen Endpunkten wurde mittels *in vitro* Experimenten untersucht, um das genotoxische Potential von FA einzuschätzen. Die überwiegende Mehrheit der erhaltenen Befunde belegen, dass FA genotoxisch in Bakterien und Säugerzellen ist. Ein positiver genotoxischer Endpunkt in Säugerzellen ist die Induktion von DNA-Protein-Crosslinks (DPX), welches der primäre FA-induzierte DNA-Schaden darstellt. Weitere Endpunkte sind die Induktion von Schwesterchromatid-Austauschen (SCE), Mikronuklei (MN) und strukturellen Chromosomenaberrationen, die, verursacht durch nicht reparierte DPX, während der Zellteilung entstehen. Genmutationen wurden ebenfalls gefunden, die erwähnten Chromosomenmutationen stehen aber bezüglich der genotoxischen Wirkung von FA im Vordergrund (IARC 2006, BfR 2006).

1.2.3 Lokale genotoxische Effekte von FA *in vivo*

Beim Einatmen von FA sind bei Nagern, als obligate Nasenatmer, der obere respiratorische Trakt und bei Affen, als oronasale Atmer, die nasalen Atemwege, die orale Mukosa, die Trachea und die Bronchien die Gewebe, mit denen eingeatmetes FA zuerst in Kontakt kommt. Die unterschiedliche Anatomie der Spezies bedingt bestimmte, speziesspezifische anatomische Bereiche, die besonders stark durch inhaliertes FA exponiert sind. Bei Ratten beispielsweise haben Computersimulationen der Strömungen der Atemluft ergeben, dass besonders viel Luftvolumen den mittleren und lateralen Nasengang passiert (Kimbell et al., 1993; Morgan et al., 1991). Diese Bereiche mit respiratorischem Epithelium zeigen in FA-Inhalationsstudien auch die gravierensten histopathologischen Schäden und die meisten DPX. In einer Inhalationsstudie mit Ratten konnte gezeigt werden, dass die DPX-Menge nach einer einzelnen FA-Exposition im lateralen Nasengang um das sechsfache höher lag, als im medialen und hinteren Nasengang (Casanova et al., 1994).

Mehrere Studien haben die lokale Induktion von DPX nach FA-Inhalation an Ratten und Affen untersucht. Alle Studien haben einen positiven lokalen Effekt gefunden (Casanova et al., 1989, 1991, 1994; Casanova und Heck, 1987). In

einer weiteren Studie wurde Ratten mit einer Schlundsonde oral 200 mg FA pro Kilogramm Körpergewicht verabreicht und der Effekt auf die Mikronukleusrate von Zellen des gastrointestinalen Trakts untersucht. Es wurde eine Zunahme der Mikronukleusrate in allen untersuchten Geweben gefunden (Migliore et al., 1989). Eine andere Studie untersuchte Makrophagen in Lungen von Ratten auf strukturelle Chromosomenabberationen nach FA-Inhalation. Eine Erhöhung wurde nur bei der höchsten Dosisgruppe (15 ppm für 1 Woche und 8 Wochen) beobachtet (Dallas et al., 1992).

Untersuchungen zur lokalen Genotoxizität von FA am Menschen wurden vor allem an Mund- und Nasenschleimhautzellen durch Bestimmung der Mikronukleusrate durchgeführt. Die untersuchten Probanden waren dabei meist aufgrund ihres Berufes mit FA exponiert. Die Arbeiten lieferten sowohl positive, als auch negative Ergebnisse im Bezug auf die Induktion von Mikronuklei, wobei die Mehrheit eine Erhöhung der Mikronukleusrate durch FA feststellt. Eine kritische Begutachtung dieser Publikationen legt aber nahe, dass die gefundenen positiven Effekte nicht konsistent und die Ergebnisse mit Vorsicht zu bewerten sind. Probleme bereitet das Fehlen von Standardisierungsrichtlinien für die Durchführung des Mikronukleus-Tests an Mund- und Nasenschleimhautzellen und die dadurch entstehende Variabilität (z.B. der Mikronukleusraten der Kontrollen). Außerdem enthalten viele Studien nur ungenaue Angaben über die Expositionsbedingungen und das Studiendesign (Speit und Schmid, 2006).

1.2.4 Systemische genotoxische Effekte von FA *in vivo*

Die Möglichkeit der systemischen („distant-site“) Toxizität von FA, also toxischen Effekten fernab der Zellen oder Gewebe, die Erstkontakt mit FA haben, wird in der Literatur diskutiert. Es wird aber allgemein davon ausgegangen, dass FA keine systemischen Effekte verursacht. Die Mehrzahl der Untersuchungen am Tier bestätigt dies, aber es gibt auch vereinzelte positive Befunde. Beispielsweise wurden chromosomale Abberationen im Knochenmark von Ratten nach einmaliger FA-Inhalation gefunden (Kitaeva et al., 1990, Kitaeva et al., 1996). Die Aussagekraft der positiven Studien ist aber aufgrund methodischer Unzulänglichkeiten nur sehr gering (BfR 2006).

Aufgeworfen wurde die Frage der systemischen Genotoxizität vor allem durch epidemiologische Studien, die auf eine Erhöhung des Risikos der myeloiden Leukämie durch FA-Inhalation am Arbeitsplatz hindeuten (Coggon et al., 2003; Hauptmann et al., 2003). Laut Einschätzung der IARC liefern diese Studien starke Hinweise dafür, dass ein kausaler Zusammenhang zwischen erhöhtem Leukämierisiko und berufsbedingter FA-Exposition bestehen könnte. Die Aussagekraft der Studien ist aber nicht stark genug, um es als wissenschaftlich gesichert anzusehen (IARC, 2006). Von vielen Wissenschaftlern wird die Möglichkeit der Entstehung von Leukämie durch FA-Exposition als unplausibel angesehen, da in vielen anderen FA-Inhalationsexperimenten mit verschiedenen FA-Konzentrationen und untersuchten Spezies weder eine FA-Konzentrationserhöhung im Blut, noch genotoxische Effekte im Knochenmark festgestellt werden konnten (Heck und Casanova, 2004). Der schnelle Abbau von FA im respiratorischen Trakt (bis zu 93% des inhalierten FA), die Bildung von Addukten mit Mukusproteinen und schließlich FA-metabolisierende Aktivität im Blut und Geweben macht es sehr unwahrscheinlich, dass bis zum Knochenmark eine genügend große Menge an FA gelangen kann, um Krebs auszulösen (Uotila und Koivusalo, 1987, 1997; Heck und Casanova, 2004). Die Möglichkeit der Leukämogenität von FA wird von Arbeiten unterstützt, die DPX und zytogenetische Effekte in Lymphozyten von FA-exponierten Arbeitern finden (Shaham et al., 1996, 1997, 2003). Weitere Studien untersuchten am Menschen andere Endpunkte, wie Chromosomenabberationen, MN und SCE, zumeist an Lymphozyten. Die Arbeiten liefern zur Frage der systemischen Genotoxizität von FA widersprüchliche Ergebnisse. Die Probleme vieler Studien sind unter anderem unzureichende Angaben über die FA-Exposition und möglicher Ko-Exposition mit anderen Chemikalien. Das BfR sieht daher aufgrund der verfügbaren Daten einen assoziativen, aber keinen kausalen Zusammenhang zwischen FA-Exposition und systemischen Effekten, da bisher kein biologisch plausibler Mechanismus diese Effekte erklären kann (BfR 2006). Es lässt sich darum bisher keine eindeutige Aussage über die Frage der systemischen genotoxischen Effekte von FA beim Menschen treffen.

1.2.5 Die Kanzerogenität von FA in experimentellen Studien

Experimentelle Studien belegen, dass FA ein Kanzerogen des Nasenraums in Ratten und Mäusen ist. FA vermittelt nach der aktuellen Modellvorstellung seine karzinogene Wirkung an diesen ersten Kontaktstellen zum Organismus, indem FA hier lokal zytotoxisch wirkt, die Zellteilung anregt und schließlich durch seine genotoxische Wirkung prä-tumorigene Läsionen hervorruft. FA-induzierte, lokale histopathologische Schäden sind Hyperplasien, Metaplasien und Dysplasien von Epithelien. Außerdem wird die Zellproliferation erhöht und Entzündungsreaktionen ausgelöst. Man geht davon aus, dass diese Läsionen der Tumorentwicklung vorausgehen (BfR 2006).

Tierversuche mit Ratten zeigen eine Entstehung von nasalen Tumoren ab einer FA-Konzentration zwischen 5 und 10 ppm mit einem anschließenden steilen, nicht-linearen Anstieg. Bei 15 ppm liegt die Tumorzinzidenz bei 50%. Eine Erhöhung der Zellproliferation wurde ab einer FA-Konzentration von etwa 2 ppm beobachtet (Monticello et al., 1996). In Versuchen mit Mäusen wurde eine geringe Erhöhung der Tumorzinzidenz bei der höchsten Dosisgruppe (14,3 ppm FA) gefunden. Die Zellproliferation war bei einer FA-Konzentration von 5,6 ppm und mehr erhöht (Kerns et al., 1983; Gibson, 1984). In einer Studie mit Hamstern wurden nach einer lebenslangen Exposition mit 10 ppm FA (5 Stunden pro Tag; 5 Tage pro Woche) keine nasalen Tumoren gefunden. Auch in einer zweiten Studie mit einer lebenslangen Exposition von 30 ppm für 5 Stunden pro Woche waren keine Tumoren festzustellen (Dalbey, 1982). Beide Studien gelten aber aus verschiedenen Gründen als unzuverlässig (BfR 2006).

Die verschiedenen Studien an diesen drei untersuchten Tierarten weisen darauf hin, dass es möglicherweise Unterschiede in der FA-Sensitivität bezüglich der Induktion von nasalen Tumoren zwischen den untersuchten Spezies gibt.

1.2.6 Die Kanzerogenität von FA beim Menschen

Studien zur Kanzerogenität von FA beim Menschen beinhalten vor allem epidemiologische Untersuchungen von Arbeitern in der Industrie und anderen Berufszweigen (z.B. Einbalsamierer), die am Arbeitsplatz gegenüber FA exponiert waren.

Der Frage, ob FA Nasopharynxkarzinome verursachen kann, wurde in einigen Kohortenstudien und Fall-Kontroll-Studien nachgegangen. Die größte und informativste Kohortenstudie ist die „National Cancer Institute“ (NCI) Studie (Blair et al., 1986), die 25.000 Arbeiter an 10 verschiedenen Industriestandorten in den USA untersucht hat. Die Einstufung der IARC von FA in die Kategorie 1 (humanes Karzinogen) beruht zum Teil auf den Ergebnissen dieser Studie bzw. der Veröffentlichung der follow-up Studie von Hauptmann und Kollegen (Hauptmann et al., 2004; IARC 2006). Die Studie zeigte eine erhöhte Anzahl von Fällen von Nasopharynxkarzinomen der untersuchten Kohorte im Vergleich zur US-Bevölkerung mit einer statistisch signifikanten Dosis-Effekt-Beziehung für kumulative Dosis und Spitzendosis. Eine neue Analyse der NCI-Studie von Marsh und Kollegen zeigt allerdings gewisse Mängel (z.B. der Risikomodelle) in der Evaluierung von Hauptmann und Kollegen auf. Sie fordern darum, und aufgrund der Tatsache, dass andere große Kohortenstudien kein erhöhtes Risiko zeigen, eine Neubeurteilung der IARC-Einstufung von FA (Marsh et al., 2007).

Eine erhöhte Sterberate durch Leukämien ist konstant in sechs von sieben Studien, die FA-exponierte Arbeiter untersucht haben (Einbalsamierer, Pathologen, Anatomen), festgestellt worden. Die myeloide Leukämie scheint hier bevorzugt aufzutreten. Diese Befunde stehen im Kontrast zu Studien, die Industriearbeiter untersucht und keine erhöhte Sterberate durch Leukämien gefunden haben. Allerdings weisen Updates dieser Studien wieder auf ein erhöhtes Risiko hin. Die IARC bewertete 2006 den kausalen Zusammenhang zwischen beruflicher FA-Exposition und dem Auftreten von Leukämie als „stark, aber nicht ausreichend“ (strong, but not sufficient). Bosetti und Kollegen bewerteten in einer Übersichtsarbeit das Krebsrisiko durch FA durch Beurteilung aller Kohortenstudien, die bis 2006 veröffentlicht wurden, neu und kommen zu dem Schluss, dass für Leukämien und Hirntumoren ein leicht erhöhtes Risiko für Arbeiter besteht. Dies gilt nicht für die Studien an Industrie-Arbeitern (Bosetti et al., 2008).

Wissenschaftler von der Umweltschutzbehörde der USA (EPA) haben einen hypothetischen Mechanismus vorgeschlagen, der erklären soll, wie inhaliertes FA Leukämien und lymphohämatopoetische Tumore induzieren kann (DeVoney, 2006a, 2006b). Das Modell besagt, dass B-Lymphozyten und hämatopoetische Vorläuferzellen eine mutagene Änderung durch direkte FA-Einwirkung erfahren,

und zwar an den Eintrittstellen von FA in den Organismus bzw. in die Blutbahn (portal of entry). Die veränderten Zellen wandern dann zurück in das Knochenmark oder in primäre lymphatische Gewebe und entwickeln sich dort durch weitere Progression zu Tumorzellen. Pyatt und Kollegen bewerteten das Modell und kommen zu dem Schluss, dass weder existierende, noch empirische wissenschaftliche Daten diesen Wirkungsmechanismus der „peripheren Transformation“ unterstützen (Pyatt et al., 2008).

1.3 Der Mechanismus der FA-induzierten Kanzerogenese

Der Mechanismus der Krebsentstehung durch FA ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es wird davon ausgegangen, dass FA vor allem lokal am Ort des ersten Kontakts, wenn es in hohen Konzentrationen über einen längeren Zeitraum wirken kann, zu Krebs führt.

Durch seine hohe chemische Reaktivität wirkt FA am Ort des primären Kontakts, d.h. beim Einatmen auf Epithelien im Nasenbereich, beim Verschlucken auf die Speiseröhre, den Magen- und Darmtrakt und bei Kontakt mit der Haut. Der primäre genetische Schaden, der in Zellen an diesen Orten induziert wird, sind DPX. Bei Ratten kann man sie ab einer FA-Konzentration von 0,3 ppm, bei Affen ab 0,7 ppm in der Nasenschleimhaut nachweisen. Die Modellvorstellung besagt, dass diese DNA-Schäden zu mutagenen Effekten führen können. *In vitro* Untersuchungen weisen auf einen klastogenen Mechanismus hin (Induktion von Mikronuclei und kleine Kolonien im Mouse Lymphoma Assay). Diese Beobachtungen gehen auch einher mit der Annahme, dass DPX als DNA-Addukte die Replikation stören können und zu DNA-Strangbrüchen und chromosomalen Aberrationen führen. Ob nun FA-induzierte DPX wirklich für die Kanzerogenese relevante DNA-Schäden sind, muss aber noch weiter untersucht und bestätigt werden. FA wirkt reizend und zytotoxisch auf Gewebe und führt zu einer Erhöhung der Zellproliferation. Bei den Nasenepithelien der Ratten ist dies ab einer Konzentration von mehr als 2 ppm zu beobachten. Die anatomischen Orte der höchsten Zellproliferation sind dabei dieselben, wie die mit der größten Tumorzinzidenz (lateraler Nasengang).

Zusammenfassend besagt also das Modell, dass FA lokal bei hohen Konzentrationen prämutagene DNA-Schäden in Form von DPX in ausreichender

Menge produziert und zusammen mit stark erhöhter Zellproliferation Tumorstadiumerläuferzellen erzeugt. Diese gehen dann, wenn sie einen Wachstumsvorteil erlangen, nicht in die Apoptose und werden vom Immunsystem nicht beseitigt, so dass sie sich zu einem Tumor entwickeln können.

Die Grundannahme der Wirkungsweise genotoxischer Substanzen besagt, dass die genotoxische Wirkung keinen Schwellenwert besitzt, das heißt, es gibt keine Dosis ohne genotoxischen Effekt (Madle et al., 2008). Es können allerdings Effekte einen Schwellenwert besitzen, die mit der genotoxischen Wirkungsweise einhergehen, z.B. die Überlastung von DNA-Reparaturmechanismen oder Enzymen, die für den Abbau des Toxins nötig sind. Die Annahme eines Schwellenwerts in der Konzentrations-Effekt-Beziehung einer Substanz setzt also die Kenntnis des Wirkungsmechanismus voraus. Im Falle von FA ist dieser bekannt und macht die Existenz eines Schwellenwerts plausibel: Sobald die Systeme für die Detoxifikation von FA und die Reparatur der induzierten DNA-Schäden überlastet sind (= Schwellenwert), entstehen Genotoxizität und Zytotoxizität.

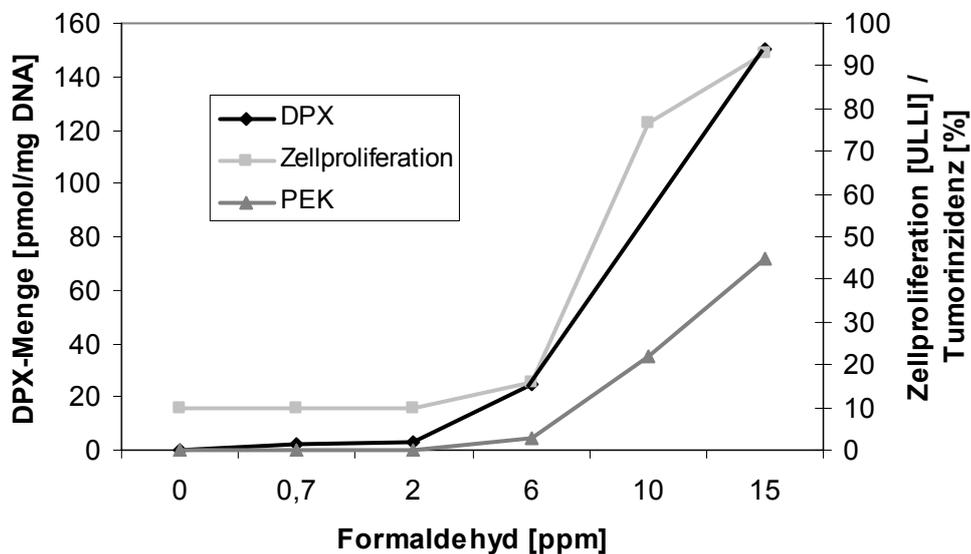


Abbildung 5: Die Induktion von DNA-Protein-Crosslinks (DPX) und der Zellproliferation (unit length labeling index ULLI) in Relation zur Tumorzinzidenz von Plattenepithelkarzinomen (PEK) in der Rattennase. Die Daten stammen aus Casanova et al., 1994 und Monticello et al., 1996. (ppm = Teile pro Millionen)

In Abbildung 5 ist der Verlauf der Dosis-Effekt-Beziehung der Parameter DPX-Induktion, Zellproliferation und Tumorinzidenz in der Nase von Ratten, die in Inhalationsexperimenten mit FA exponiert wurden, zusammengestellt (Casanova et al., 1994; Monticello et al., 1996). Es ist zu erkennen, dass die Kurven einen nicht-linearen Verlauf besitzen: Bis 2 ppm ist bei den Parametern Zellproliferation und Tumorinzidenz kein Effekt zu beobachten und bei der DPX-Induktion nur ein leichter Anstieg. Ab einer FA-Konzentration von 6 ppm und darüber steigen die Effekte aller drei Parameter stark an. Anhand dieser Daten könnte man also einen praktischen Schwellenwert von 2 ppm ableiten. Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) ermittelte eine FA-Konzentration, die für den Menschen als sicher angesehen wird. Hierfür wurden unter anderem auch die zuvor erwähnten Daten verwendet. Für die zytotoxische Wirkung waren allerdings für den Menschen keine geeigneten Daten vorhanden, deshalb hatte man als Surrogat die sensorische Reizung von Schleimhäuten (Auge, Nase, Rachen) herangezogen. Dies ist der sensitivste Effekt von FA, der im Bezug zur Tumorbildung steht. Es wurde davon ausgegangen, dass die niedrigste Konzentration, die sensorische Reizung auslöst (0,2 bis 0,3 ppm), immer noch deutlich unter derjenigen liegt, die Zellproliferation und Zytotoxizität verursacht. Da bei einer Konzentration von 0,1 ppm keine Reizung der Augen oder des oberen Atemtrakts vorhanden war, legte das BfR-Papier die für den Menschen sichere Konzentration mit 0,1 ppm fest. Den Autoren ist bewusst, dass diese Schätzung sehr konservativ ist und andere Autoren aufgrund von biologisch-basierten mathematischen Modellen FA-Konzentrationen ohne Krebsrisiko bis zu 1 ppm sehen (BfR 2006).

1.4 Beurteilung von FA durch wissenschaftliche Institutionen und Behörden

Die "International Agency for Research on Cancer" (IARC) kategorisiert FA als menschliches Karzinogen ein (Group 1). Laut ihrem Bericht sehen die Experten nach Beurteilung der Datenlage ausreichende Hinweise (u.a. *in vitro* Genotoxizität, Kanzerogen im Tierversuch, epidemiologische Hinweise auf Induktion von Nasenrachentumoren), um FA als krebserregend für Mensch und Tier einzustufen (IARC, 2006).

Das Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR) urteilt in ihrem „Bericht zur Bewertung der Kanzerogenität von Formaldehyd“ ähnlich wie die IARC. Das BfR sieht „insgesamt ausreichende Evidenz für einen kausalen Zusammenhang zwischen einer FA-Exposition und der Entstehung von Nasenrachentumoren beim Menschen“ und bewertet FA als Karzinogen für den Menschen (Kategorie 1) (BfR, 2006).

Die Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG) erarbeitet die Werte für die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) von Chemikalien und hat FA in die Kategorie 4 eingestuft. Diese Kategorie enthält Stoffe mit krebserzeugender Wirkung, bei denen ein nicht-genotoxischer Wirkungsmechanismus im Vordergrund steht und genotoxische Effekte bei Einhaltung des MAK-Werts (0,3 ppm) keine oder eine nur untergeordnete Rolle spielen. Die MAK-Kommission sieht das Auftreten von Tumoren in der Nasenschleimhaut als Folge von chronisch proliferativer Prozesse, verursacht durch die zytotoxische Wirkung von FA. Im niedrigen Dosisbereich, in dem es nicht zur Steigerung der Zellproliferation kommt, spiele der Beitrag der genotoxischen Wirkung von FA zum Krebsrisiko des Menschen eine nur untergeordnete Rolle (MAK, 2000).

1.5 Fragestellung

FA ist bekanntermaßen eine genotoxische und mutagene Substanz. Das mutagene Potenzial von FA wurde in zahlreichen *in vitro* Studien mit kultivierten Zellen nachgewiesen. Es sind jedoch noch Fragen in Bezug auf die Konzentrations-Effekt-Beziehung, das Vorhandensein eines Schwellenwerts für die mutagene Wirkung, die Möglichkeit der Akkumulation von DNA-Schäden nach wiederholter / chronischer Exposition, sowie einer möglichen Adaptation von Zellen an die genotoxische Wirkung von FA bisher ungeklärt. Hinsichtlich der mutagenen Wirkung von FA *in vivo* muss zwischen lokalen und systemischen Wirkungen unterschieden werden. Aufgrund seiner hohen Reaktivität und der Effizienz der metabolischen Inaktivierung kann nur mit genotoxischen / mutagenen Effekten in Zellen / Organen gerechnet werden, die direkt mit FA in Kontakt kommen (site of first contact). Untersuchungen an menschlichen Populationen, die gegenüber FA exponiert waren, haben Hinweise darauf gegeben, dass diese Exposition zur Induktion von Mikronuklei (chromosomalen Mutationen) in der Mund- und Nasenschleimhaut führen kann. Die Datenlage ist jedoch widersprüchlich. Obwohl systemische genotoxische Effekte nach FA-Exposition nicht zu erwarten sind, haben mehrere Studien im Rahmen des Biomonitoring FA-exponierter Personengruppen genotoxische Effekte im peripheren Blut gezeigt. Die Relevanz dieser Studien ist umstritten.

Die vorliegende Arbeit sollte zu einer besseren Charakterisierung der genotoxischen Wirkung von FA und der Klärung der offenen Fragen im Hinblick auf die Risikobeurteilung beitragen.

- Es sollte die Konzentrations-Effekt-Beziehung von FA-induzierten genotoxischen Effekten an verschiedenen Endpunkten charakterisiert werden. Dabei sollte mit statistischen Modellen analysiert werden, ob es Hinweise auf einen Wirkungsmechanismus mit Schwellenwert gibt.

- Die Induktion und Reparatur von FA-induzierten DPX sollte mit dem Comet Assay näher untersucht werden. Dabei sollte auch der Frage nachgegangen werden, ob es nach wiederholter Exposition zu einer Akkumulation von DPX kommen kann oder ob Zellen einen adaptiven Schutz vor der genotoxischen Wirkung von FA entwickeln können.
- Der Abbau von FA in Zellen mit verschiedenen Enzymsystemen stellt einen wichtigen Schutz vor toxischen FA-Expositionen dar. Es sollte mit Hilfe von molekularbiologischen Untersuchungen in A549 Lungenzellen untersucht werden, ob eine Exposition sich auf die Expression dieser Gene auswirkt.
- Verschiedene Biomonitoring Studien finden FA-induzierte genotoxische Effekte im Blut exponierter Personen. Diese Ergebnisse erscheinen vor dem Hintergrund toxikokinetischer Daten als unplausibel. Um diese Studien besser einschätzen zu können, sollte in einem *ex vivo* Ansatz die Induktion und Persistenz genotoxischer Effekte durch FA im Blut untersucht werden.
- Die lokale Genotoxizität von FA im Menschen wurde schon in mehreren Studien mit dem MNT an Mund- und Nasenschleimhautzellen untersucht. Diese Studien haben zu uneinheitlichen Ergebnissen geführt und sind aufgrund ungenauer Angaben zur Exposition und anderen methodischen Schwächen oft schwer zu interpretieren. Deshalb sollte in Kooperation mit dem Institut für Arbeitsmedizin der Universität Heidelberg die lokale Genotoxizität von FA im Menschen mit Hilfe des MNT mit Mundschleimhautzellen nach definierter Exposition und unter GLP-ähnlichen Bedingungen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Reagenzien und Medien

4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, München
Acridinorange	Merck, Darmstadt
Acryl/Bis™ 29:1, 40% (w/v) Solution (Polyacrylamid)	Amresco, Solon, USA
Agarose NEEO Ultra-Qualität	Roth, Karlsruhe
Airway epithelial cell growth medium	Provitro GmbH; Berlin
Ammoniumpersulfat (APS)	SysKem, Wuppertal
BenchMark™ Pre-Stained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
Borax	Sigma, München
Bovine serum albumine, Fraction V (BSA)	Sigma, München
5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chromosomenmedium	Invitrogen, Karlsruhe
Colcemid (10 µg/ml)	Biochrom AG, Berlin
Complete Mini Proteinase inhibitor cocktail tablets	Roche, Mannheim
Cytochalasin B	Sigma-Aldrich, Steinheim
DAPI Triton free Staining Solution 1:5 (für Durchflusszytometer)	Partec, Münster
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim

Material und Methoden

Dispase II (neutral protease) aus Bacillus polymyxa, Grade II (0,5 U/mg)	Roche, Mannheim
DNase I Amplification Grade (1 U/ μ l)	Invitrogen, Karlsruhe
E-Page MagicMark; Unstained Protein Standard	Invitrogen, Karlsruhe
Essigsäure ($\geq 99,8\%$)	Riedel deHaën, Seelze
Ethanol, absolut	Riedel deHaën, Seelze
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eukitt	Kindler, Freiburg
Fixogum	Marabuwerke, Tamm
Fluorescein-di-acetat	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (Methanol frei) 16% Ultrapure EM Grade [50-00-0]	Polysciences, Warrington, USA
Formamid	Fluka, Neu-Ulm
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Gentamycin 10 mg/ml	Biochrom, Berlin
Giemsa	Merck, Darmstadt
Glycerol (UltraPure)	Invitrogen, Karlsruhe
Hanks balanced salt solution HBSS (10x) ohne NaHCO_3	PANBiotech, Aidenbach
Heparin 10.000 Einheiten/ml	Braun, Melsungen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Merck, Darmstadt
L-Glutamin 200 mM	Biochrom, Berlin
(β)-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
Methanol	Riedel deHaën, Seelze
Milchpulver	Roth, Karlsruhe

Material und Methoden

Minimal essential medium-Earle (Zellkulturmedium)	Biochrom, Berlin
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem, Darmstadt
Natriumchlorid-Lösung (NaCl), isoton (0,9%)	Braun, Melsungen
Natrium-Citrat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Natrium-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Fluka, Neu-Ulm
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	J.T. Baker, Deventer, Holland
Natriumhydroxid (NaOH)	AppliChem, Darmstadt
Phosphate buffer saline (PBS), Dulbecco ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin
Phytohaemagglutinin (PHA), M-Form	Invitrogen, Karlsruhe
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Proteinase K (Tritirachium album)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Salzsäure (HCl) 37%	VWR, Darmstadt
Sea Plaque GTG Agarose (LMP)	Biozym, Hameln
Serva Blue - Coomassie Brilliant Blue R250 pure	Serva Feinbiochemie, Heidelberg
Sonde gegen humane Zentromere; Biotin-markiert;	Cambio, Cambridge, UK
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Fluka, Neu-Ulm
Trishydroxymethylaminomethan (TRIS)	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim

Trizma® base (Tris) 99,9% titration	Sigma-Aldrich, Seelze
Trypsin (1:250)	Biochrom, Berlin
Tween 20 (Polysorbate 20)	USB, Cleveland, USA
Vectashield® mounting medium for fluorescence	Vector laboratories, Burlingame, Kanada
Wasser, steril, (Ampuwa® Spüllösung)	Fresenius Kabi, Bad Homburg

2.1.2 Geräte und Materialien

AL Cellcounter, Modell 871	AI-Systeme, Karlsruhe
Blottingapparatur	Eigenbau Feinwerkstatt Universität Ulm
Brutschrank B 6200	Heraeus, Hanau
Cell Scraper 25 cm	Sarstedt, Newton, USA
Cellstar TC-Plate, 24 Well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CO ₂ -Brutschrank B 6220 CU	Heraeus, Hanau
Comet Assay II Messsystem Version 1.03	Perceptive Instruments Haverhill, UK
Deckgläser 24 mm x 60 mm	Menzel, Braunschweig
Durchflusszytometer CCA	Partec, Münster
Einmal-Injektions-Kanüle	Braun, Melsungen
Einmalspritze	Braun, Melsungen
Elektrophorese Power Supply consort E831	Fröbel, Ulm
Elektrophoresekammer für Polyacrylamidgele Multigel Long G47	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer Sub-Cell GT Basic	Biorad, München
Entwicklungsgerät für Röntgenfilme Curix 60	AGFA, Mortsel, Belgien

Entwicklungskassette für	DuPond, Wilmington USA
Röntgenfilme Cronex Quanta III	
Eppendorfgefäße (versch. Größen)	Roth, Karlsruhe
Faltenfilter	Whatman, Dassel
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Oberkochen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Zeiss, Oberkochen
Fusselfreies Tuch, Kimwipes®	Kimberly-Clark, Dallas, USA
Gießapparatur für	Eigenbau Feinwerkstatt Universität
Polyacrylamidgele	Ulm
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Heizplatte	Medax, Kiel
IKAROS-Bildverarbeitung	Metasystems, Altusheim
ISIS-Bildverarbeitung	Metasystems, Altusheim
Kamera (High Performance CCD)	Cohu, San Diego, USA
Kamera Axiocam MRm	Zeiss, Oberkochen
Laminar Air Flow HB 2448 K	Heraeus, Hanau
Laminar Air Flow TL 2448	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen
LightCycler	Roche, Mannheim
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Objektträger mit Mattrand	Menzel, Braunschweig
Perfusionsbesteck (Vasuflo®)	Dispomed Witt, Gelnhausen
Phasenkontrastmikroskop	Zeiss, Oberkochen
Plastikküvetten, ½ Micro	Ratiolab, Dreieich
Disposable Cuvettes	
Plastikpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml;	Costar, New York, USA
Plastikröhrchen, 50 ml, Falcon®	Becton Dickinson, Heidelberg
PVDF-Membran Immobilon-P; 0,45 µm	Millipore, Eschborn
Röntgenfilm Super RX Fuji medical x-ray film 100 NIF	Fuji, Kleve
Skalpelle, verschiedene Modelle	B. Braun, Melsungen

Spektrophotometer (UV / Visible)	Pharmacia, Freiburg
sterile 12 ml Röhrchen	Greiner-bio-one, Frickenhausen
Sterilfilter	Corning, New York, USA
Strahlenquelle Gammacell 2000	Nuclear Data, Frankfurt
Transferpipette (3,5 ml)	Sarstedt, Newton, USA
Wärmeschrank	Heraeus, Ulm
Wasserbad	Bender&Hobein, Ulm
Whatman Filterpapier Grade 3	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen 12,5 cm ² , Falcon®, ohne Filter	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen 25 cm ² Falcon®, ohne Filter	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen 75 cm ² , mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Zentrifuge Modell Biofuge pic	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Modell Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Modell Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Modell Megafuge 1.0 R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Modell Rotanta Hettich	Bender&Hobein, Ulm
Zentrifugenröhrchen	Nunc, Wiesbaden

2.1.3 Lösungen, Medien und Puffer

BSA-Lösung (5%)	5 g BSA 100 ml 4xSSC / 0,1% Tween 20
BSA-Lösung (1%)	1 ml BSA-Lösung (5%) 4 ml 4xSSC / 0,1% Tween 20
Acridinorange-Färbelösung	125 µg/ml Acridinorange in 10 ml Sörensenpuffer Lösung A 10 ml Sörensenpuffer Lösung B Ad 100 ml mit Aqua dest.

Material und Methoden

Alkalischer Elektrophoresepuffer (ph > 13) Leitfähigkeit 60 – 65 mS/cm	300 mM NaOH 1 mM EDTA
Blockinglösung	5 g Milchpulver in 100 ml Waschlösung
Blotpuffer	7,62 g Borax ad 2000 ml H ₂ O (bidest.)
BrdU-Lösung	500 µg BrdU pro ml HBSS
DAPI / Propidiumjodid- Färbelösung	1 µg DAPI / ml H ₂ O (bidest.) 0,042 µg Propidiumjodid / ml H ₂ O (bidest.)
Dispase II – Lösung (2,4 U/ml)	480 g Dispase II in 100 ml HBSS
Ethidiumbromid-Färbelösung	10 µg/ml Ethidiumbromid in Aqua dest.
Ethidiumbromid-Stammlösung für Fluorescein-Diacetat-Färbelösung	200 µg/ml Ethidiumbromid in Aqua dest.
Fixierungslösung (MNT)	Methanol / Eisessig (5 + 1)
Fixierungslösung (SCE-Test)	Methanol / Eisessig (3 + 1)
Fluorescein-Diacetat-Färbelösung	1,2 ml 1xPBS 200 µl Ethidiumbromid- Stammlösung 7,5 µl Fluorescein-Diacetat- Stammlösung
Fluorescein-Diacetat- Stammlösung	5 mg/ml in Aceton
Giemsa-Färbelösung	7 ml Giemsa 5 ml Sörensen-Puffer A 5 ml Sörensen-Puffer B ad 100 ml Aqua dest.
Hanks-Lösung	50 ml HBSS 2,35 ml 7,5 % NaHCO ₃ Ad 500 ml Aqua dest.
KCl (0,4%)	0,4 g KCl ad 100 ml Aqua dest.

Material und Methoden

KCl (0,56%)	0,56 g KCl ad 100 ml Aqua dest.
Kristallviolett-Färbelösung	1% (w/v) Kristallviolett in Aqua dest.
Laemmli-Auftragspuffer (5x)	312,5 mM Tris pH 6,8 10% SDS 50% Glycerol 0,005% Bromphenolblau 5% β -Mercaptoethanol
Laufpuffer SDS-PAGE (10x)	30 g Tris 144 g Glycin Ad 1000 ml H ₂ O
Laufpuffer SDS-PAGE (1x)	50 ml 10 x Laufpuffer ad 500 ml H ₂ O; 5 ml 20% SDS
LMP-Agarose	0,5% "low melting point" (LMP) Sea Plaque GTG Agarose in 1xPBS, in Eppendorfgefäße alliquotiert
Lyse-Lösung (pH 10)	2,5 M NaCl 100 mM NaEDTA 10 mM Tris 1% Triton X-100 (frisch zugegeben) und 10 % DMSO (ebenfalls frisch)
Lysepuffer für Proteinpräparation	RIPA und Proteinaseninhibitor (Verhältnis 7:1)
Neutralisationspuffer (pH 7,5)	0,4 M Tris pH auf 7,5 mit 37% HCl einstellen
PBS (10x)	95,5 g PBS ad 1000 ml H ₂ O (bidest.)
Proteinase-Inhibitor	1 Tablette Complete Mini in 1,5 ml H ₂ O (bidest.) gelöst

Material und Methoden

RIPA	150 mM NaCl 1% NP40 (=IGEPAL) 0,1% SDS 50 mM Tris pH 8,0
SDS 10%	10 g SDS ad Aqua dest.
Serva Blue – Entfärbelösung	Eisessig 50 ml Isopropanol 125 ml H ₂ O 325 ml
Serva Blue – Färbelösung	Eisessig 50 ml Isopropanol 125 ml H ₂ O 325 ml 0,5 g Serva Blue
Sörensenpuffer (pH 6,8)	5 ml Sörensen Puffer A 5 ml Sörensen Puffer B Ad 100 ml mit Aqua dest.
Sörensen-Puffer A	1/3 M NaHPO ₄ x 2 H ₂ O (in Aqua dest.)
Sörensen-Puffer B	1/3 M KH ₂ PO ₄ (in Aqua dest.)
SSC (20x)	3 M NaCl 300 mM Natrium-Citrat-Dihydrat, gelöst in Aqua dest., auf pH 7 eingestellt
SSC (2x)	100 ml 20x SSC 90 ml Aqua dest., auf pH 7 mit 1 M HCl eingestellt
TE-Puffer	100 µM Tris 5 µM EDTA gelöst in Aqua dest., eingestellt auf pH 10
Tris 1 M , pH 6,8	121,1 g Tris in 1 L Aqua dest., mit HCl auf pH 6,8 einstellen
Tris 1,5 M , pH 8,8	181,65 g Tris in 1 L Aqua dest., mit HCl auf pH 8,8 einstellen

Trypsin-EDTA, 0,15%	2,5% Trypsin in 1% EDTA, 10 x PBS ad 1000 ml mit Aqua dest. 15 ml 7,5% NaHCO ₃
Vorfixierungslösung (MNT; Blut)	Methanol / Eisessig (5 + 1) 1:1 mit 0,9% NaCl gemischt
Waschlösung (Western Blot)	0,2 % (v/v) Tween 20 in 1xPBS
Zellkulturmedium (V79 und A549)	1 x Minimal Essential Medium (ZELLKULTURMEDIUM) Earle 2 nM L-Glutamin 2,2 g/l NaHCO ₃ 10% FKS 50 µg/ml Gentamycin

2.1.4 Kits

DC Protein Assay	BioRad, USA
ECL PLUS Western Blotting Detection System	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect® Primer Assay:	Qiagen, Hilden
- Hs_ADH5_1_SG für FDH	
- Hs_ALDH1A1_1_SG: ALDH1	
- Hs_ALDH2_1_SG: ALDH2	
- Hs_HPRT1_1_SG: HPRT	
- Hs_HMBS_1_SG: HMBS	

2.1.5 Antikörper

Anti-FDH-Antikörper:	PTG Proteintech Group Inc,
Anti-ADH5-Antikörper (IgG), aus Kaninchen, Cat # 11051-1-AP	Chicago, USA
Anti-GAPDH-Antikörper: GAPDH (0411): sc-47724, aus Maus	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Goat anti-mouse IgG-HRP Antikörper: sc-2005	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA
Goat anti-rabbit IgG-HRP Antikörper: sc-2004	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellen

2.2.1.1 A549

A549 ist eine adhärent wachsende, immortalisierte Zelllinie, die von humanen, alveolaren Epithelzellen (Typ II) stammt, die aus einem Lungen-Adenokarzinom eines 58 Jahre alten Kaukasiers hervorgegangen sind. Die Zellen scheinen von einer einzigen Vorläuferzelle abzustammen. Sie besitzen einen hypotriploiden Karyotyp. Die Verdopplungszeit beträgt etwa 22 Stunden (Lieber et al., 1976).

2.2.1.2 V79

Die V79 Zelllinie ist eine permanente, adhärent wachsende Zelllinie, die aus transformierten Lungenfibroblasten eines männlichen chinesischen Hamsters hervorgegangen ist. Der modale Chromosomensatz ist 21, die Verdopplungszeit beträgt etwa 12 Stunden (Schempp und Vogel, 1979; Speit et al., 1994).

2.2.1.3 HNEC

Die primären humanen Nasenepithelzellen (HNEC) wurden von der Firma Provitro erworben. Die verwendete Charge 139G140303 stammt von einem 19 jährigen männlichen Kaukasier und besitzt eine Verdopplungszeit von etwa 43 Stunden. Die Zellen wurden im von Provitro mitgelieferten „Airway epithelial cell growth medium“ kultiviert.

2.2.1.4 Peripheres Blut

Blut von gesunden Spendern wurde mit dem VASUFLO® Perfusionsbesteck durch Venenpunktion in eine Natrium-Heparin-enthaltende Spritze aufgezogen und durch Invertieren gut durchmischt.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Blutkultur

Chromosomenmedium 1A (ein Fläschchen mit 100 ml) wurde aufgetaut und mit 1 ml PHA ergänzt, wodurch das Chromosomenmedium insgesamt 2% PHA enthielt. Drei Milliliter davon wurden in je ein steriles 12 ml Plastikröhrchen aliquotiert und bei -20°C bis zur Verwendung tief gefroren.

Zum Anlegen der Blutkultur wurde die benötigte Anzahl an Röhrchen mit Chromosomenmedium 1A aus dem Gefrierschrank genommen und im Wasserbad auf 37°C erwärmt. 300 μl des Blutes wurden dann in ein 3 ml Chromosomenmedium 1A enthaltendes Röhrchen pipettiert. Zur Kultivierung wurde das Blut im 37°C Brutschrank mit 5% CO_2 inkubiert. Der Deckel der Plastikröhrchen war nur leicht angeschraubt, um den Gasaustausch zu ermöglichen.

2.2.2.2 Kultur von A549 Zellen

A549 Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm^2 Bodenfläche und Filterdeckel in 10 ml Zellkulturmedium im 37°C Brutschrank mit 5% CO_2 kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin (0,15%) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, das Trypsin durch Zugabe von 6 ml Zellkulturmedium inaktiviert und die Zellen schließlich abzentrifugiert (900 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. In eine neue Zellkulturflasche wurde 10 ml frisches Zellkulturmedium gegeben und dann 1 ml der Zellsuspension hinzugefügt, wenn die nächste Subkultivierung 2 Tagen später stattfand. Sollte die nächste Passage erst in drei Tagen durchgeführt werden, wurden 800 μl Zellsuspension hinzugefügt. Zur Versuchsdurchführung wurden A549 Zellen in Zellkulturflaschen mit 25 bzw. $12,5\text{ cm}^2$ Bodenfläche kultiviert. Die ausgesäte Zellzahl war je nach Versuch unterschiedlich (siehe Methodenbeschreibung).

2.2.2.3 Kultur von V79 Zellen

V79 Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit 75 cm^2 Bodenfläche ohne Filter in 10 ml Zellkulturmedium im 37°C Brutschrank kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen mit 4 ml Trypsin (0,15%) vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, das

Trypsin durch Zugabe von 6 ml Zellkulturmedium inaktiviert und die Zellen schließlich abzentrifugiert (900 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. In eine neue Zellkulturflasche wurde 10 ml frisches Zellkulturmedium gegeben und dann 200 µl der Zellsuspension hinzugefügt, wenn die nächste Subkultivierung 2 Tagen später stattfand. Sollte die nächste Passage erst in drei Tagen durchgeführt werden, wurden 50 µl Zellsuspension hinzugefügt. Um den pH-Wert des Zellkulturmediums einzustellen, wurde CO₂ manuell in die Flaschen zugegeben. Zur Versuchsdurchführung wurden V79 Zellen in Zellkulturflaschen mit 25 bzw. 12,5 cm² Bodenfläche kultiviert. Die ausgesäte Zellzahl war je nach Versuch unterschiedlich (siehe Methodenbeschreibung).

2.2.2.4 Kultur von HNEC

HNEC wurden in Zellkulturflaschen mit 25 cm² Bodenfläche und Filter in 5 ml „Airway epithelial cell growth medium“ (HNEC-Zellkulturmedium) im 37°C Brutschrank mit 5% CO₂ kultiviert. Zur Subkultivierung wurden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Dispase II – Lösung (2,4 U/mg) und anschließender Inkubation für 5-10 min im 37°C Brutschrank mit 5% CO₂ vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Danach wurde 3 ml Zellkulturmedium hinzugefügt und die Zellen abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert und davon 500 µl in eine neue Zellkulturflasche, die 4,5 ml frisches Zellkulturmedium enthält, überführt.

2.2.3 FA-Behandlung

Für die Versuche wurde 16%iger, Methanol-freier FA der Firma Polysciences verwendet, welcher in 10 ml Fläschchen ausgeliefert wird. Für jeden Versuch wurde ein neues Fläschchen verwendet. Verdünnt wurde FA mit Hanks-Lösung. Wenn im Ergebnisteil nichts anderes erwähnt ist, wurde der FA im Zellkulturmedium belassen. Bei Inkubation im CO₂-Brutschrank wurde der Deckel (der Zellkulturflasche bzw. des Röhrchens) zunächst für eine Stunde fest zugeschraubt und danach, um Gasaustausch zu ermöglichen, wieder leicht aufgedreht.

2.2.4 Zytotoxizitätstests

2.2.4.1 Zytotoxizitätsbestimmung durch die Ermittlung der Klonierungseffizienz von A549 Zellen

In diesem Test wird die Fähigkeit der Zellen zum klonalen Wachstum als Parameter für die Zytotoxizität verwendet. Dazu wurden zunächst 200 A549 Zellen in 5 ml Zellkulturmedium in T25 Zellkulturflaschen ausgesät und für 24 Stunden im 37°C Brutschrank mit 5% CO₂ inkubiert. Es folgte die Zugabe von FA ins Zellkulturmedium. Die Kulturen wurden anschließend zunächst für eine Stunde bei geschlossenem Flaschendeckel im 37°C Brutschrank inkubiert, danach im 37°C Brutschrank mit 5% CO₂ für 13 Tage. Zur Herstellung der Präparate wurde das Zellkulturmedium abgegossen und zur Fixierung 3 ml 70% Ethanol zugegeben und für 15 min inkubiert. Dann wurde der Ethanol abgegossen und die Flaschen zum Trocknen in einen 60°C Schrank gestellt. Gefärbt wurden die Präparate durch Zugabe von 3 ml Kristallviolett-Färbelösung für 15 min. Danach wurde die Färbelösung abgeschüttet und mit Wasser gespült. Mit Hilfe eines Koloniezählers wurde dann die Anzahl an Kolonien pro Flasche bestimmt. Pro Experiment und Konzentration wurden 4 Kulturen angesetzt und ausgewertet. Die Experimente wurden insgesamt dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.2.4.2 Zytotoxizitätstestung durch Bestimmung des Zellwachstums von A549 Zellen

Dieser Test verwendet die Hemmung des Zellwachstums als Parameter für die Zytotoxizität. In T12,5 Zellkulturflaschen mit 3 ml Zellkulturmedium wurden zunächst 250.000 A549 Zellen ausgesät und für 24 Stunden im 37°C Brutschrank mit 5% CO₂ inkubiert. Dann erfolgten die Zugabe von FA und eine einstündige Inkubation im 37°C Brutschrank bei geschlossenem Deckel. Anschließend wurden die Kulturen im 37°C Brutschrank mit 5% CO₂ für weitere 47 Stunden inkubiert und dann die Zellzahl pro Zellkulturflasche mit dem Zellzählgerät bestimmt. Es wurden vier Flaschen pro Versuch und Konzentration angesetzt und die Experimente insgesamt dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

2.2.4.3 Fluorescein Diacetat / Ethidiumbromid Assay zur Unterscheidung toter von lebenden V79 Zellen

Die Toxizitätsbestimmung mittels Fluorescein-Diacetat-Färbung beruht darauf, dass lebende Zellen mit intakter Zellmembran den Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid nicht ins Zytoplasma aufnehmen und so im Fluoreszenzmikroskop grün erscheinen. Bei toten Zellen mit defekter Membran hingegen kann Ethidiumbromid eindringen und färbt die Zellen rot.

Zur Durchführung werden die Zellsuspension und die Färbelösung gemischt (Verhältnis 1+1), auf einen Objektträger gegeben, ein Deckglas aufgelegt und im Fluoreszenzmikroskop 200 Zellen ausgewertet. Die Angabe des Ergebnisses erfolgt als Prozentwert toter bzw. lebender Zellen (Hartmann und Speit, 1997).

2.2.4.4 Bestimmung des Proliferationsindex (PI) im SCE-Test

Zur Bestimmung der Zytotoxizität im SCE-Test wurde der Proliferationsindex (PI) ermittelt: 100 Mitosen wurden anhand ihres Färbemusters untersucht, ob sie erste (M1), zweite (M2) oder dritte Mitosen (M3) sind und der PI nach folgender Formel errechnet:

$$PI = [M1 + (2 * M2) + (3 * M3)] / 100$$

Der PI ist also ein Maß dafür, wie häufig sich die Zellen in einem bestimmten Zeitraum teilen.

2.2.4.5 Bestimmung des „Nuclear Division Index“ (NDI) im MNT

Die Zytotoxizität im MNT wurde mit Hilfe des „Nuclear Division Index“ (NDI) bestimmt. Der NDI errechnet sich aus der Formel:

$$NDI = (1 * M1 + 2 * M2 + 3 * M3 + 4 * M4) / N$$

Dabei ist M1 – M4 die Anzahl Zellen mit 1 – 4 Nuklei und N die Gesamtanzahl an ausgewerteten Zellen. Für die Bestimmung des NDI wurden immer 500 Zellen ausgewertet.

2.2.5 Präparation des Proteinextraktes aus A549 Zellen und HNEC

Zunächst wurde das Medium aus der T12,5 Zellkulturflasche abgesaugt und die Zellen danach mit Hanks-Lösung und 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde 5 ml 1xPBS in die Flaschen gefüllt und mit einem Cellscraper die Zellen vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann in ein Zentrifugenröhrchen überführt, in die Zellkulturflasche zum Spülen nochmals 5 ml 1xPBS gegeben und diese ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Nach einer Zentrifugation mit 200 g für 5 min wurde das Zellpellet in 100 µl Lysepuffer (RIPA und Proteinaseinhibitor; Verhältnis 7:1) resuspendiert, in ein Eppendorfgefäß überführt und danach mit einem Vortexer gut gemischt. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 30 min mit gelegentlichem Vortexen. Danach schloss sich eine Zentrifugation bei 14.000 rpm für 15 min an, wonach der Überstand (= Proteinextrakt) mit einer Pipette vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Abschließend wurde der Proteinextrakt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.6 Proteinkonzentrationsbestimmung mit dem Bio-Rad DC Protein Assay

Die Konzentrationsbestimmung beim DC Protein Assay der Firma Bio-Rad basiert auf einer von Lowry et al. 1951 beschriebenen photometrischen Methode. Zur Erstellung der Standardkurve wurde 20 mg BSA in 10 ml RIPA-Puffer gelöst (2 µg/µl) und von dieser Lösung aus neun Verdünnungen (bis 0,2 µg/µl) hergestellt und diese mit dem DC Protein Assay vermessen (Abbildung 6).

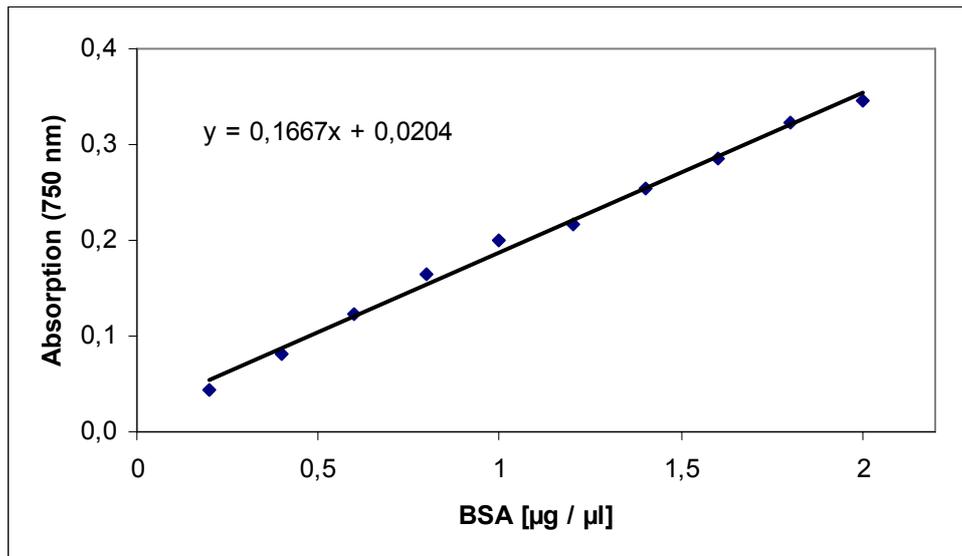


Abbildung 6: Standardgerade erstellt aus den Vermessungen von Verdünnungen einer Rinderserum-Albumin (BSA)-Lösung mit dem „Bio-Rad DC Protein Assay“. Die Formel gibt die Geradengleichung wieder.

Zur Vermessung einer Probe wurde zunächst 98 µl Reagenz A mit 2 µl Reagenz S gemischt. In eine Photometer-Plastikküvette wurden 20 µl der zu messenden Proteinlösung gegeben, dann 100 µl der Reagenz A / S Mischung hinzugefügt und gut gemischt. Anschließend fügte man 800 µl Reagenz B hinzu und mischte nochmals gut. Es folgte eine Inkubation für 15 min im Dunkeln, danach wurden die Proben mit dem Photometer bei 750 nm vermessen. Die Färbung ist bis zu einer Stunde stabil. Der Nullabgleich erfolgte mit reinem Lösemittel (RIPA-Lysepuffer), welches wie die Proben selber mit den Lösungen behandelt wurde.

Es ist darauf zu achten, dass die Messung innerhalb des linearen Bereichs erfolgt. Ist die Lösung zu konzentriert, müssen Verdünnungen der Proteinlösung vermessen werden.

2.2.7 Western Blot

2.2.7.1 Herstellung des Polyacrylamid-Gels

Zur Herstellung des Polyacrylamid-Gels wurden zunächst die beiden Glasplatten der Gießapparatur gründlich mit 70% Ethanol gereinigt und anschließend mit einem fusselfreiem Tuch trocken gewischt. Dann wurde das Dichtungsgummiband

auf die Glasplatte mit den Abstandsleisten (Spacer) gelegt, die zweite Glasplatte aufgelegt und mit Hilfe von 5 Klammern (zwei auf jeder Seite und eine unten) fixiert. Die Gießapparatur wurde danach aufrecht in die Haltevorrichtung gestellt. Zur Herstellung des 12%igen Trenngels wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben:

3 ml 1,5 M Tris pH 8.8

5,35 ml H₂O

120 µl 10% SDS

60 µl APS

12 µl TEMED

3,7 ml Polyacrylamid

Die Lösung wurde mit einer Plastikpipette sofort gut durchmischt und dann zwischen die Glasplatten gegossen. Ein kleiner Rest wurde zur Polymerisationskontrolle im Röhrchen gelassen. Anschließend wurde die Lösung mit 1 ml Isopropanol überschichtet. Die Polymerisation benötigt etwa 30 min.

Zur Herstellung des 4%igen Sammelgels wurde in ein 12 ml-Plastikröhrchen gegeben und dann gut gemischt:

500 µl 1 M Tris pH 6.8

3 ml H₂O

40 µl 10% SDS

30 µl APS

4 µl TEMED

400 µl Polyacrylamid

Das Isopropanol wurde abgegossen, mit einem fusselfreiem Tuch die restliche Flüssigkeit zwischen den Platten entfernt, dann das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und abschließend der Kamm eingesteckt. Die Polymerisation benötigt etwa 30 min. Wird das Gel nicht sofort benötigt, kann es im Kühlschrank, eingewickelt in Frischhaltefolie, gelagert werden.

2.2.7.2 Vorbereitung der Proben und Gellauf

Zunächst wurde der Laufpuffer hergestellt und, zusammen mit der Gelkammer, in den Kühlraum gestellt. Pro Probe wurde ein Volumen Proteinextrakt, welches 30 µg Protein entspricht, in ein Eppendorfgefäß pipettiert und das Volumen mit RIPA auf 20 µl aufgefüllt. Zu den Proteinproben wurde dann 5 µl 5x Laemmli-Puffer hinzugefügt. Zum Denaturieren wurden die Proben bei 95°C für 3 min inkubiert, danach 1 min auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert (14.000 rpm, 2 min, 4°C). Die Proben verblieben bis zum Laden auf Eis.

Kurz vor dem Laden der Proben bzw. dem Gellauf wurde das Dichtungsgummiband des Gels entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt, Laufpuffer eingefüllt und schließlich der Kamm gezogen. Mit Hilfe einer 10 ml Spritze mit Kanüle wurden dann die Luftblasen zwischen der Unterseite des Gels und dem Puffer entfernt und außerdem die Geltaschen gespült. Nun wurden die Proben und die Protein-Größenstandards (Prestained Protein Ladder und unstained Protein Standard) in die Taschen des Gels gefüllt und die Gelelektrophorese bei 20 mA gestartet. Sobald die Bromphenolblau-Banden die Grenze zum Trenngel erreicht hatten (nach etwa einer Stunde), wurde die Stromstärke der Elektrophorese auf 30 mA eingestellt. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die 37,1 kDa Bande des Prestained Proteinmarkers etwa die Mitte des Trenngels erreicht hatte.

2.2.7.3 Blotting

Zunächst wurde der Blotpuffer frisch hergestellt und auf 4°C gekühlt. Die beiden Glasplatten wurden voneinander getrennt, das Gel mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und in eine Schale mit Blotpuffer gelegt. Die Vorbehandlung der IVDF-Membran erfolgte durch Inkubation in Methanol für 10 sek und anschließender Inkubation im Blotpuffer für mindestens 5 min. Außerdem wurden vier Whatman-Papiere und die beiden „Support Pads“ in Blotpuffer gelegt, damit sie sich gut vollsaugen konnten.

- Kathode



+ Anode

Abbildung 7: Aufbau des „Blot-Sandwich“ für den Western Blot. Da die negativ geladenen Proteine zum +Pol (Anode) wandern, muss sich die IVDF-Membran zwischen Gel und Anode befinden (IVDF = Polyvinylidendifluorid).

Das „Blot-Sandwich“ wurde, wie in Abbildung 7 gezeigt, aufgebaut, in die Blotting-apparatur eingesteckt (Gel zur Kathode, IVDF-Membran zur Anode) und schließlich Blotpuffer eingefüllt. Das Blotting erfolgte bei 4°C und einer Stromstärke von 110 mA für 16 Stunden unter leichtem Rühren mit einem Magnetrührer. Nach dem Blotting wurde das „Blot-Sandwich“ auseinandergebaut und die Membran und das Gel in einer Plastischale, gefüllt mit Blotpuffer, bis zur weiteren Verwendung kurz zwischengelagert. Blot-Kontrolle: Der Prestained Proteinmarker sollte auf der Membran, vor allem im Größenbereich um 40 kDa, gut sichtbar vorhanden sein.

2.2.7.4 Coomassie-Färbung (Serva Blue) des Polyacrylamidgels

Zur Kontrolle des Gellaufs und zur Abschätzung, wie viele Proteine im Gel verblieben sind, wurde das Gel mit dem Farbstoff Serva Blue, einen Coomassie-Farbstoff, angefärbt. Dazu wurde das Gel in einer Plastischale etwa 0,5 cm mit der Serva Blue Färbelösung überschichtet und für 15 min auf einen Taumler gestellt. Anschließend ist die Färbelösung abgegossen und das Gel in der Entfärbelösung (etwa 1 cm) auf einem Taumler für 45 min inkubiert worden. Es

folgte eine Inkubation des Gels in (bidest.) H₂O für mindestens 2 Stunden auf einem Taumler.

2.2.7.5 Maskierung unspezifischer Bindungsstellen (Blocking) der IVDF-Membran

Um unspezifische Bindungsstellen zu maskieren, wurde die Membran in eine Plastikschaale gegeben (die Membranseite mit den Proteinen zeigt immer nach oben) und mit Blockinglösung etwa 2 cm überschichtet. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden auf einem Taumler.

2.2.7.6 Nachweis der Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH)

Die Membran wurde in eine Plastikschaale mit 10 ml Blockinglösung und 25 µl Anti-FDH-Antikörper (= 1:400 Verdünnung) gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit der Waschlösung für 5, 10 und 15 min gewaschen, indem sie mit etwa 2 cm Waschlösung überschichtet auf einen Taumler bei Raumtemperatur gestellt wurde. Dann wurde die Waschlösung vollständig abgegossen, durch 10 ml Blockinglösung mit 0,25 µl Anti-Kaninchen-Antikörper (HRP-konjugiert) ersetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmals wie oben beschrieben gewaschen. Der Proteinnachweis erfolgte mit dem ECL^{plus} Reagenz.

2.2.7.7 Proteinnachweis mit dem ECL^{plus} Reagenz

In einem Zentrifugenröhrchen mit einer Ummantelung aus Aluminiumfolie wurden 3 ml Reagenz 1 mit 75 µl Reagenz 2 gemischt. Die Membran wurde in eine Plastikschaale gegeben, die Reagenzienmischung hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurde die Membran mit einer Pinzette aus der Schale genommen, in die Entwicklungskassette gelegt und mit einer transparenten Folie abgedeckt. Überschüssige Reagenzmischung wurde mit Zellstoff entfernt, so dass später keine Feuchtigkeit zwischen Folie und Röntgenfilm verblieb. Anschließen wurde ein Röntgenfilm für 10 sek in die Entwicklungs-

kassette eingelegt und dann entwickelt. War das Signal zu stark, wurde einige Zeit später noch einmal ein Röntgenfilm exponiert, war es zu schwach, wurde der Röntgenfilm länger als 10 sek exponiert.

2.2.7.8 Entfernung der Antikörper von der IVDF-Membran (Stripping)

Nach dem Proteinnachweis mit dem ECL^{plus} Reagenz wurde die Membran zuerst 5 und dann 10 min mit TPBS 0,2% in einer Plastikschaale gewaschen. Anschließend wurde die Waschlösung vollständig abgekippt, 15 ml Stripping-Puffer auf die Membran gegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschrirte für 5 und 10 min mit TPBS 0,2%. Zur Kontrolle der tatsächlichen Entfernung der Antikörper wurde der Proteinnachweis (siehe 2.2.7.7) wiederholt: Waren keine Signale mehr vorhanden, war das Stripping erfolgreich.

2.2.7.9 Nachweis der GAPDH

Vor der Detektion der GAPDH wurden unspezifische Bindungsstellen nochmals maskiert, die Inkubation mit der Blockinglösung erfolgte hier aber nur 30 min (siehe 2.2.7.5). Die Membran wurde in eine Plastikschaale mit 10 ml Blockinglösung und 1 µl Anti-GAPDH-Antikörper (= 1:10.000 Verdünnung) gegeben und über Nacht bei 4°C auf einem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit der Waschlösung für 5, 10 und 15 min gewaschen, indem sie mit etwa 2 cm Waschlösung überschichtet auf einen Taumler gestellt wurde. Dann wurde die Waschlösung vollständig abgegossen, durch 10 ml Blockinglösung mit 0,125 µl Anti-Maus-Antikörper (HRP-konjugiert) ersetzt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Taumler inkubiert. Anschließend wurde die Membran nochmals wie oben beschrieben gewaschen. Der Proteinnachweis erfolgte mit dem ECL^{plus} Reagenz.

2.2.8 Expressionsanalyse mit dem LightCycler-System

Die Expressionsanalyse, d.h. die relative Bestimmung der mRNA-Transkriptmenge eines bestimmten Gens in Zellen, erfolgte mit der LightCycler-Technologie. Hierzu wurde zunächst Gesamt-RNA aus Zellen gewonnen und danach in cDNA umgeschrieben. Die Menge der zu bestimmenden cDNA wurde dann mit dem LightCycler-System relativ quantifiziert.

2.2.8.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde aus Zellen mit dem RNeasy Kit von Qiagen gewonnen. Dabei wurden genau die Angaben im Handbuch befolgt. Die Zell-Lyse erfolgte direkt in den Zellkulturflaschen (T12,5) durch die Zugabe von 350 µl RLT-Lysepuffer, die Elution von der RNeasy-Säule mit 2 x 30 µl RNase-freiem H₂O. Die Qualität der RNA wurde durch Auftrennen eines Aliquots im Agarosegel sichergestellt.

2.2.8.2 DNase I – Verdau der RNA

Eventuell noch vorhandene DNA in der RNA-Präparation wurde mit Hilfe der Deoxyribonuclease I (Amplification Grade) von Invitrogen verdaut. Dabei wurden genau die Angaben im Handbuch befolgt. Nach dem DNase I – Verdau wurde nochmals die Qualität der RNA durch Auftrennen eines Aliquots im Agarosegel überprüft.

2.2.8.3 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem „SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR“ von Invitrogen. Dabei wurden 2 µg RNA eingesetzt und als Primer der cDNA-Synthese wurden Hexamerprimer zufälliger Sequenz (random hexamer primer) verwendet.

2.2.8.4 Transkriptmengenbestimmung mit dem LightCycler-System

Das LightCycler-System ist ein RealTime-PCR-Gerät, mit welchem die Zunahme der PCR-Produktmenge nach jedem Zyklus in Echtzeit verfolgt und aufgezeichnet werden kann. Die Detektion des PCR-Produkts erfolgt über den DNA-Farbstoff SYBR Green, der in die kleine Furche der DNA interkaliert und dann mit einer Diode zur Fluoreszenz angeregt werden kann. Die Menge der Fluoreszenz gibt Auskunft über die DNA-Produktmenge im jeweiligen Reaktionsgefäß.

Das Ergebnis eines LightCycler-Laufs einer Probe ist der sogenannte Crossing Point (CP). Der CP ist bei der Methode des „second derivative maximum“ die PCR-Zyklenzahl, bei der so viel PCR-Produkt synthetisiert wurde, dass die Fluoreszenz das Hintergrundrauschen überschreitet. Dies ist bei etwa 10^{10} Kopien der Fall. Der CP ist auch die PCR-Zyklenzahl, bei welcher die log-Phase der PCR-Amplifikation beginnt.

Die Quantifizierung in den Expressionsanalysen erfolgte relativ zu einem Haushaltsgen, welches als Quantifizierungsstandard dient und dessen Expression idealerweise konstant bleibt. Eine relative Transkriptmenge eines Gens von beispielsweise vier bedeutet, dass die mRNA dieses Gens viermal so häufig vorhanden war, wie die des Haushaltsgens.

Um die relative Quantifizierung mit dem LightCycler-System durchführen zu können, muss man die Effektivitäten der PCR-Reaktionen kennen. Die Effektivität einer PCR-Reaktion sagt aus, wie viel DNA nach einer bestimmten Zyklenzahl und gleicher DNA-Ausgangsmenge erfolgreich vervielfältigt wird. Ist die Effektivität bei einer PCR-Reaktion vergleichsweise hoch, wird bei gleicher Template-Ausgangsmenge und gleicher Zyklenzahl mehr PCR-Produkt synthetisiert, als bei einer PCR mit niedrigerer Effektivität. Die Effektivität einer PCR-Reaktion wurde hier ermittelt, indem acht Template-Verdünnungen (10^{-2} bis 10^{-9}) mit dem jeweiligen Primerpaar des QuantiTect Kits vermessen wurden. Trägt man die erhaltenen CP zu einer logarithmischen Skala der Konzentration auf, erhält man eine Gerade, deren Steigung das negative Reziprok des Logarithmus der Effektivität darstellt (Abbildung 8).

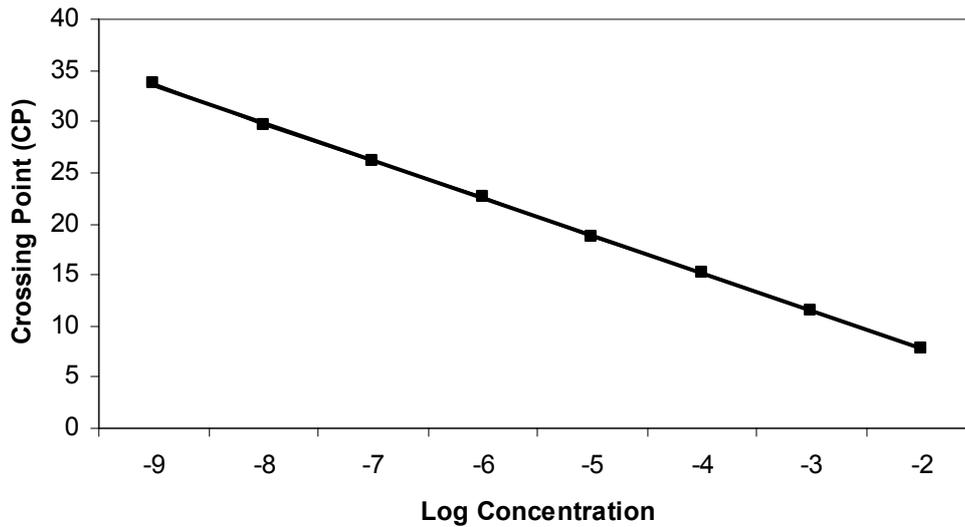


Abbildung 8: Erstellung einer Standardkurve (hier: Hydroxymethylbilan-Synthase), wobei acht verschiedene DNA-Konzentrationen vermessen wurden. Die Steigung der Geraden (-3,699) entspricht dem negativen Reziprok des Logarithmus der Effektivität der PCR-Reaktion (PCR: Polymerase Chain Reaction / Polymerase Kettenreaktion).

Die Standardkurven wurden für alle fünf verwendeten Primer Kits erstellt. Dabei wurde für jedes Primer Kit zweimal die Verdünnungsreihe pipettiert, zwei unabhängige LightCycler-Läufe durchgeführt und als Ergebnis der Mittelwert der Steigung der Standardgeraden erhalten. Das Template für die Standardkurven war ein über ein 3%iges Agarosegel aufgetrenntes und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit aufgereinigtes PCR-Produkt aus einem vorangegangenen LightCycler-Lauf mit dem entsprechenden Primer Kit.

Die Steigung der Standardkurven betrug:

FDH:	-3,703
ALDH1A1:	-3,969
ALDH2:	-3,871
HMBS:	-3,640
HPRT1:	-4,078

Konzentrationsberechnung:

Konzentration = $10^{(CP / \text{Steigung der Standardkurven})}$

Normalisierte Konzentration = Konzentration Zielgen / Konzentration Referenzgen

Relative Expression = $(1 / \text{normalisierte Konzentration Kontrollprobe}) * \text{normalisierte Konzentration behandelte Probe}$

PCR-Protokoll und -Ansatz

Für die Versuche wurde der LightCycler mit den Glaskapillaren von Roche verwendet. Außerdem wurde das „QuantiTect SYBR Green PCR Kit“, welches den SYBR-Green-Farbstoff und PCR-Komponenten enthält, zusammen mit dem „QuantiTect Primer Assay“ benutzt. Die LightCycler-Läufe, wurden wie im „QuantiTect Primer Assay Handbook“ (Ausgabe Februar 2006) beschrieben, durchgeführt.

PCR-Ansatz (20 µl):

- 10 µl SYBR Green PCR Mix
- 6 µl H₂O bidest.
- 2 µl QuantiTect Primer
- 2 µl cDNA (1:10 Verdünnung mit H₂O bidest.)

PCR-Protokoll

Präinkubation: 95°C / 15 min

Amplifikation: Denaturierung 94°C / 15 sek
(40 Zyklen) Annealing 55°C / 20 sek
Extension 72°C / 20 sek

Schmelzkurve: Temperaturerhöhung von 65 auf 98°C mit einer Geschwindigkeit von 0,05°C / sek. Nach dem Abkühlen auf 40°C Programmende.

Qualitätskontrollen:

- Schmelzkurvenanalyse zur Produktidentifizierung
- Primer überspannen Exon / Exon Grenzen und die RNA-Präparationen wurden DNase I - verdaut, um den Einfluss von DNA-Kontamination auszuschließen
- Zwei LightCycler-Läufe pro zu vermessender Probe
- Negativkontrollen (ohne cDNA) bei jedem LightCycler-Lauf
- cDNA-Synthese: Negativkontrollen ohne Reverse Transkriptase

2.2.9 Comet Assay (Einzelzellgelelektrophorese)

Der Comet Assay ist ein schneller und sensitiver Genotoxizitätstest, um DNA-Schäden auf Einzelzellniveau nachzuweisen. Die Methode wurde zuerst von Singh et al. 1988 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurde sie aber nach den von Speit und Hartmann 2006 beschriebenen Modifikationen durchgeführt. Die Art der DNA-Schäden, die der Comet Assay detektieren kann, ist abhängig von der gewählten Protokollvariante. Der Versuchsablauf des Comet Assay ist schematisch in Abbildung 9 wiedergegeben.

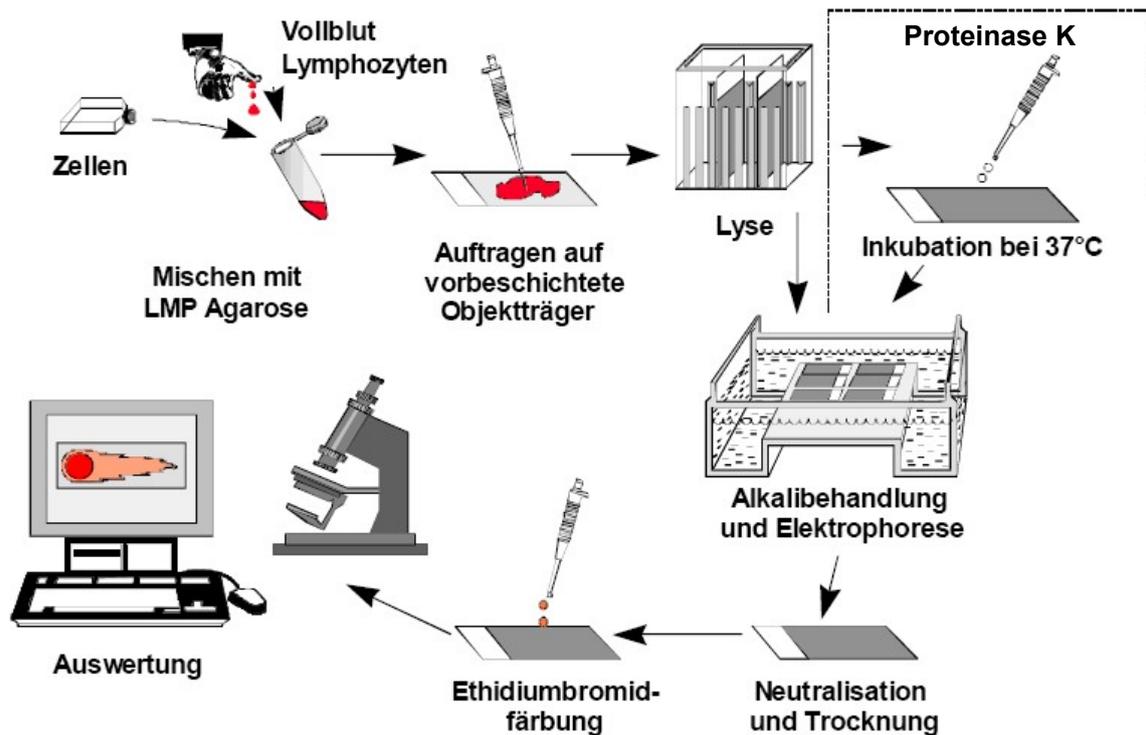


Abbildung 9: Schematischer Versuchsablauf des Comet Assay (LMP = low melting point; niedriger Schmelzpunkt).

2.2.9.1 Der Comet Assay bei pH>13

Mit dem Comet Assay bei pH>13 kann man DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Doppelstrangbrüche und alkalisensitive Stellen nachweisen.

Herstellung der Präparate

Auf Objektträger mit Mattrand wurden auf der dem Mattrand gegenüberliegenden Seite mit einem Diamantstift eine Rille eingeritzt. Anschließend wurde der Objektträger in 60°C warme 1,5%ige Agarose bis zur Hälfte des Mattrands eingetaucht, dann wieder herausgenommen und die Unterseite des Objektträgers mit Zellstoff abgewischt. Zum Trocknen wurden die Objektträger waagrecht auf eine saubere Fläche bei Raumtemperatur gelegt. Diese basale Agaroseschicht dient später dazu, dass die „low melting point“ (LMP)-Agarose besser auf dem Objektträger haftet und mechanisch stabilisiert wird. Die so vorbeschichteten Objektträger wurden bis zur Verwendung in einer Box bei Raumtemperatur gelagert.

10.000-15.000 Zellen, die sich in einem Volumen von 10 μl Zellkulturmedium befanden, wurden mit 120 μl 37°C warmer LMP-Agarose gemischt und gleichmäßig auf einen mit Agarose vorbeschichteten Objektträger aufgetragen. Die optimale Zellzahl wurde bei A549 und HNEC dadurch erreicht, indem das Zellpellet nach dem Ablösen mit Trypsin und dem Abzentrifugieren in einem geeigneten Volumen Zellkulturmedium resuspendiert wurde. Das genaue Volumen wurde empirisch durch Einschätzung der Trübung der Zellsuspension ermittelt. Beim Blut wurde nach dem Abzentrifugieren der Überstand bis auf 300 μl abgesaugt, dann das Zellpellet resuspendiert, davon 5 μl mit der LMP-Agarose gemischt und auf die Objektträger aufgetragen. Dann wurde ein Deckglas auf den Objektträger aufgelegt, damit sich die LMP-Agarose mit den Zellen gut verteilt. Damit die Agarose schnell auspolymerisieren kann, wurden die Präparate auf einen kalten Aluminiumblock gelegt. Nach ca. 2 min wurde das Deckglas vorsichtig entfernt, die Objektträger in eine lichtgeschützte Glasküvette mit 4°C kalter Lyselösung gesteckt und für mindestens eine Stunde im Kühlschrank aufbewahrt.

Alkalidenaturierung und Elektrophorese

Zur Alkalidenaturierung wurden die Objektträger in eine waagrecht ausgerichtete, in Eiswasser gestellte Elektrophoresekammer gelegt. Freie Plätze in der Kammer wurden durch leere Objektträger aufgefüllt. Nun wurde 4°C kalter Elektrophoresepuffer in die Kammer eingefüllt, bis die Objektträger etwa 3 mm überschichtet waren. Die Inkubationszeit betrug, wenn im Ergebnisteil nichts anderes angegeben, 25 min unter Ausschluss von Licht.

Zur Elektrophorese wurde anschließend eine Spannung von 25 Volt (0,86 V/cm) angelegt und durch Verändern der Menge des Elektrophoresepuffers in der Kammer eine Stromstärke von 300 mA eingestellt. Lichtexposition der Objektträger wurde vermieden, indem eine Abdeckung auf die Elektrophoresekammer gelegt wurde.

Neutralisierung und Anfärbung der DNA

Nach der Elektrophorese wurden die Präparate waagrecht auf ein Färbebänkchen gelegt und dreimal für je 5 min mit Neutralisationspuffer überschichtet.

Anschließend wurden die Objektträger für 5 min in eine Glasküvette mit absolutem Ethanol zum Dehydrieren gegeben. Schließlich wurden die Präparate senkrecht aufgestellt und so bei Raumtemperatur getrocknet.

Kurz vor der Auswertung wurde mit einer Pipette 50 µl Ethidiumbromid-Färbelösung (10 µg/ml) gleichmäßig auf die Präparate gegeben und ein Deckglas aufgelegt. Um zu verhindern, dass die Präparate austrocknen und um das Ethidiumbromid vor Licht zu schützen, wurden sie in einer dunklen, feuchten Kammer aufbewahrt.

Mikroskopie und Auswertung

Die Präparate wurden blind ausgewertet, d.h. es erfolgte eine Kodierung der Objektträger. Die Analyse der Präparate selbst erfolgte an einem Fluoreszenzmikroskop mit einem Anregungsfilter von 515-560 nm und einem Sperrfilter von 590 nm. Eine CCD Kamera übertrug die Bilder an einen Computer mit spezieller Comet Assay Auswertungssoftware (Comet Assay II von Perceptive Instruments), die eine halbautomatische Auswertung ermöglichte. Die Software lieferte verschiedene Parameter, wobei zur Darstellung der Daten das sogenannte Tail Moment verwendet wurde, da dieses sowohl die Schweiflänge als auch die Schweifintensität berücksichtigt. Das Tail Moment errechnet sich aus:

$$\text{Tail Moment} = (\text{Intensität des Cometenkopfes} / \text{Intensität des ganzen Kometen}) * \\ (\text{Entfernung Schwerezentrum des Schweifs} \Rightarrow \text{Kometenkopfmitte})$$

Pro Objektträger wurden 50 Zellen ausgewertet und der Mittelwert der Tail Moment Werte gebildet. Wenn im Ergebnisteil nichts anderes vermerkt ist, wurden die Comet Assay Versuche dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

2.2.9.2 Der Comet Assay zum Nachweis von DPX

Der Comet Assay kann zum Nachweis von DNA-Protein-Crosslinks (DPX) verwendet werden. Hierzu wurde zunächst eine reproduzierbare DNA-Migration induziert, indem die Zellen mit 2 Gy Gammastrahlung bestrahlt (Gammacell 2000 Bestrahlungsgerät), danach sofort auf die Objektträger aufgetragen und dann

lysiert wurden. Vorhandene DPX reduzieren dann die induzierte DNA-Migration, da die Verbindung zu den Proteinen die Wanderung der DNA im elektrischen Feld im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hemmt.

Eine zusätzliche Möglichkeit, DPX indirekt nachzuweisen, ist die Behandlung der Präparate nach der Lyse mit Proteinase K (PK). Dieses Enzym verdaut Proteine, wodurch der migrationshemmende Effekt der DPX aufgehoben wird. Zusätzlich kann quantitativ zwischen DPX und DNA-DNA-Crosslinks unterschieden werden, da die PK-Behandlung keinen Einfluss auf die migrationshemmende Wirkung von DNA-DNA-Crosslinks besitzt.

Zur PK-Behandlung wurden die Präparate nach der Lyse zunächst dreimal mit TE-Puffer gespült, danach 100 µl PK (1 mg/ml TE Puffer) auf die Objektträger gegeben, ein Deckglas aufgelegt und für 2 Stunden in einer feuchten Kammer bei 37°C inkubiert. Schließlich wurde das Deckglas wieder entfernt und die Präparate normal weiterbehandelt. Zur Kontrolle wurde ein Präparat nur mit TE-Puffer behandelt.

2.2.10 Mikronukleus-Test

Der Mikronukleus-Test (MNT) ist ein Genotoxizitätstest zum Nachweis von klastogenen und aneugenen Effekten von Mutagenen. Nach der Mitose werden fehlverteilte ganze Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke mit einer eigenen Kernmembran umgeben und erscheinen im Mikroskop neben dem Hauptkern als ein bzw. mehrere kleine Kerne (Mikronuklei) (Fenech et al., 1999).

2.2.10.1 MNT mit kultiviertem Blut

Der MNT mit kultiviertem Blut wurde wie bei Trenz et al., 2003 beschrieben durchgeführt. Da der Test es erfordert, dass sich die Zellen einmal teilen, wurden sie mit dem Mitogen Phytohaemagglutinin (PHA) stimuliert. Um ausschließlich Zellen auszuwerten, die eine Teilung durchlaufen haben, wurde außerdem Cytochalasin B (Cyt B) zugegeben. Cyt B verhindert die Zytokinese, aber nicht die Karyokinese, so dass also alle Zellen, die eine Mitose durchlaufen haben, zwei Hauptkerne besitzen. Durch das Auswerten dieser zweikernigen Zellen stellt man

sicher, dass die Mikronuklei tatsächlich von der Mutagenbehandlung stammen, und nicht etwa vorher schon vorhanden waren.

300 µl Vollblut wurde in sterile 12 ml Plastikröhrchen mit 3 ml Chromosomenmedium 1A (2% PHA) gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert (Deckel nur leicht angeschraubt). Für jedes Experiment wurden zwei Parallelkulturen angesetzt. Cyt B wurde 44 Stunden nach PHA Stimulation mit der Endkonzentration von 6 µg/ml zugegeben. Die Zellen wurden 24 Stunden später präpariert. Dies entspricht einer Gesamtkulturzeit von 68 Stunden.

Die Zugabe von FA war abhängig vom Protokoll:

- Protokoll I: FA-Behandlung zu Beginn der Blutkultur
- Protokoll II: FA-Behandlung 24 Stunden nach Beginn der Blutkultur
- Protokoll III: FA-Behandlung 44 Stunden nach Beginn der Blutkultur

Zur Präparation wurden die Zellen abzentrifugiert (800 rpm, 10 min) und danach der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde vorsichtig aufgeschüttelt und in eine Transferpipette aufgenommen. In das sterile Röhren wurden dann 5 ml einer hypotonen KCl-Lösung (4°C; 0,56%) gegeben und die Zellen darin resuspendiert. Nach einer Zentrifugation (800 rpm, 10 min) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet resuspendiert und wieder in die Transferpipette aufgenommen. In das sterile Röhren wurde 5 ml Vorfixierungslösung (-20°C) gegeben und die Zellen darin resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 10 min. Zum Fixieren wurden die Zellen abzentrifugiert (800 rpm, 10 min), der Überstand abgenommen, das Pellet resuspendiert und in die Transferpipette aufgenommen. In das Röhren wurde dann 5 ml Fixierungslösung (-20°C) gegeben und die Zellen darin resuspendiert und anschließend bei Raumtemperatur 10 min inkubiert. Der Fixierungsschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt.

Zur Herstellung der MNT-Präparate wurden einige Tropfen Zellsuspension auf einen sauberen Objektträger gegeben, die Flüssigkeit durch Kippen gut darauf verteilt und der Objektträger zum Trocknen auf eine Heizplatte gelegt. Das Zytoplasma der Zellen sollte möglichst groß, aber intakt sein. Zur vollständigen Trocknung wurden die Objektträger über Nacht in einen Wärmeschrank (37°C) gelegt.

Die Färbung der Präparate erfolgte durch Inkubation in einer Acridinorange-Färbelösung (125 µg/ml) für ca. 3 sek. Danach wurden die Präparate kurz in bidest. H₂O gespült und mit einem Deckglas versehen.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop (Anregungsfilter: BP 450-490 nm; Sperrfilter: LP 520 nm). Das Zytoplasma erscheint rot-orange, die Kerne gelb. Pro Parallelkultur wurden 1000 zweikernige Zellen ausgewertet. Es wurden immer drei unabhängige Experimente mit Blut von verschiedenen Spendern durchgeführt.

Es wurden nur Zellen ausgewertet, die folgenden Kriterien entsprachen:

- Zytoplasma intakt.
- Zelle besitzt zwei Hauptkerne, die etwa gleich groß und nicht miteinander verbunden sind.
- Mikronukleus liegt frei im Zytoplasma, Durchmesser ist kleiner als 1/3 der Hauptkerne, hat die gleiche Färbung wie die Hauptkerne, ist nicht lichtbrechend.

2.2.10.2 MNT mit V79 Zellen

Der MNT wurde wie in Merk und Speit, 1998 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden 500.000 V79 Zellen in T25 Flaschen mit 5 ml Zellkulturmedium ausgesät und für 24 Stunden im 37°C Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte die FA-Behandlung: Bei der Einfachbehandlung war die FA-Expositionszeit 2 Stunden. Bei den Experimenten mit Dreifachbehandlung wurden nach den jeweiligen Zeitintervallen neues FA in das Zellkulturmedium hinzugefügt. Bei den Experimenten mit Dreifachbehandlung im Abstand von 24 Stunden wurden die V79 Zellen 18 Stunden nach der zweiten Behandlung subkultiviert und 2×10^6 Zellen in eine neue Flasche ausgesät. 18 Stunden nach der letzten FA-Behandlung wurden die Zellen mit Trypsin vom Flaschenboden abgelöst, in ein Zentrifugenröhrchen überführt, abzentrifugiert (900 rpm, 10 min) und der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde vorsichtig aufgeschüttelt und in eine Transferpipette aufgenommen. In das sterile Röhrchen wurden dann 5 ml einer hypotonen KCl-Lösung (37°C; 0,56%) gegeben und die Zellen darin resuspendiert. Danach wurde

die Zellsuspension sofort abzentrifugiert (900 rpm, 10 min) und der Überstand abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde aufgeschüttelt und mit einer Transferpipette aufgenommen. Zum Fixieren wurde dann in das Zentrifugenröhrchen 5 ml Fixierungslösung (-20°C) zugegeben und die Zellen darin resuspendiert. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min. Die Zellen wurden dann erneut abzentrifugiert und die Fixierungsschritte zweimal wiederholt.

Die Herstellung, Färbung und Auswertung erfolgte analog zum Protokoll für Blut, außer, dass hier nur einkernige Zellen ausgewertet wurden (keine Cyt B Zugabe).

2.2.11 Schwesterchromatidaustausch-Test (SCE-Test)

Der SCE-Test ist ein Genotoxizitätstest, der reziproke Austausche von DNA von sich replizierenden Schwesterchromatiden detektiert. Eine Erhöhung dieser Austauschrate, verursacht durch die Exposition mit einer Chemikalie, ist ein Hinweis auf deren DNA-schädigendes Potential. Die Schwesterchromatid-austausche (SCE) werden durch den Einbau von 5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU, ein Thymidin-Analogon) im DNA-Doppelstrang sichtbar gemacht. Die Zellen müssen nach BrdU-Zugabe ins Medium zwei Zellzyklen durchlaufen, so dass dann der DNA-Doppelstrang einer Chromatide vollständig BrdU-substituiert ist, während die andere einen substituierten und einen nicht-substituierten DNA-Strang besitzt. Durch die Methode der FPG-Färbung erscheint die vollständig substituierte Schwesterchromatide im Lichtmikroskop hell, wohingegen die andere dunkel bleibt. Einen SCE erkennt man am Übergang hell ➡ dunkel bzw. dunkel ➡ hell auf den Chromatiden der Chromosomen.

2.2.11.1 SCE-Test mit kultiviertem Blut

Der SCE-Test mit kultiviertem Blut wurde wie bei Trenz et al., 2003 beschrieben durchgeführt. Dabei wurden 300 µl Blut und 60 µl BrdU-Lösung in ein steriles 12 ml Plastikröhrchen mit 3 ml Chromosomenmedium 1A (2% PHA) gegeben und im Brutschrank (37°C; 5% CO₂) für 72 Stunden inkubiert. FA wurde ebenfalls zu Beginn der Blutkultur zugegeben. Es wurden zwei Parallelkulturen für jedes Experiment angesetzt. Zwei Stunden vor Ende der Blutkultur wurde 60 µl Colcemid (20 ng/ml) zugegeben.

Zur Präparation der Zellen wurde die Blutkultur zunächst abzentrifugiert (800 rpm, 10 min), dann der Überstand abgenommen und das Zellpellet aufgeschüttelt. Anschließend wurde unter leichtem Schütteln etwa 5 ml hypotone KCl-Lösung (37°C; 0,4%) zugetropft und anschließend für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellsuspension wurde dann abzentrifugiert (800 rpm, 10 min), der Überstand abgenommen und das Zellpellet aufgeschüttelt. Zur Fixierung wurde tropfenweise unter leichtem Schütteln Fixierungslösung (-20°C) zugegeben und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierungsschritte wurden insgesamt dreimal durchgeführt.

Zur Herstellung der SCE-Präparate wurden Objektträger mit Mattrand verwendet, die vorher für mindestens zwei Tage in 70% Ethanol gereinigt, dann gut mit demineralisiertem Wasser gespült und im Kühlschrank in Küvetten mit H₂O (bidest.) gekühlt wurden. Die Zellsuspension wurde dann auf die feuchten, kalten Objektträger aufgetropft und die Präparate über Nacht bei 37°C getrocknet.

Die Präparate wurden schließlich mit der „Fluoreszenz plus Giemsa“ (FPG) – Methode gefärbt: Die Objektträger wurden in eine Glasschale gelegt, mit Sörensenpuffer überschichtet und für 30 min mit UV-Licht (254 nm) bestrahlt. Es folgte eine Inkubation in 2xSSC bei 60°C für 20 min, danach die Giemsa-Färbung in der Giemsa-Färbelösung für 20 min. Zum Schluss wurden die Präparate in Wasser gespült, getrocknet und mit Eukitt eingedeckt. Die Auswertung erfolgte mit dem Lichtmikroskop bei einer 200-fachen Vergrößerung. Pro Präparat wurden 25 vollständige, gut differenzierte zweite Mitosen ausgewertet, d.h. die Anzahl der SCEs pro Mitose wurde bestimmt.

2.2.11.2 SCE-Test mit V79 Zellen

In einer T25-Flasche mit 5 ml Zellkulturmedium wurden 500.000 V79 Zellen ausgesät und 24 Stunden im 37°C Brutschrank inkubiert. Es erfolgte die FA-Behandlung für zwei Stunden in Zellkulturmedium ohne FKS, danach wurde mit Hanks-Lösung gespült und frisches Zellkulturmedium (mit 10 µg/ml BrdU) in die Zellkulturflaschen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für weitere 24 Stunden (entspricht etwa zwei Zellzyklen) im 37°C Brutschrank inkubiert. Zwei

Stunden vor Präparationsbeginn wurden 60 µl Colcemid (20 ng/ml) zugegeben. Die weitere Vorgehensweise war analog zum SCE-Test mit kultiviertem Blut.

2.2.12 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) – Analyse von FA-induzierten MN

Um zwischen einem klastogenen oder aneugenem Ursprung der FA-induzierten MN zu unterscheiden, wurde eine FISH-Analyse mit einer Biotin-markierten Sonde durchgeführt, die an humanen Zentromeren hybridisieren kann (Trenz et al., 2003). Dazu wurden zunächst MNT-Präparate nach MNT Protokoll III und einer FA-Konzentration von 350 µM hergestellt (siehe 2.2.10.1).

Wenn nichts anderes erwähnt ist, wurden die Inkubationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt. Die getrockneten Präparate wurden zunächst in 2xSSC für 5 min rehydriert, dann für 3 min in 2xSSC mit 0,1% Triton X-100 inkubiert und schließlich für 2 min in 2xSSC gewaschen. Zur Fixierung erfolgte eine Inkubation in einer 4%igen FA-Lösung für 10 min, danach zwei Waschschriffe durch Inkubation in 2xSSC für je 5 min. Die Denaturierung wurde durch Inkubation der Präparate in 70% Formamid in 2xSSC mit pH 7 bei 72-74°C für 15 min durchgeführt. Anschließend wurden die Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 90, 100% Ethanol; -20°C) dehydriert und dann luftgetrocknet. Danach wurden die Präparate auf 37°C erwärmt, indem sie auf eine Heizplatte gelegt wurden. Die Denaturierung des Hybridisierungsmix der Zentromersonde erfolgte durch Inkubation bei 85°C für 15 min. Danach wurde er auf Eis gestellt. 25 µl des Hybridisierungsmix wurden dann auf die Präparate aufgebracht und ein Deckglas (24 x 50 mm) aufgelegt. Um ein Austrocknen zu verhindern wurde das Deckglas mit Fixogum-Klebstoff umrandet und die Präparate schließlich über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Hybridisierung wurde das Deckglas entfernt, die Präparate dreimal in 50% Formamid in 2xSSC mit pH 7 bei 45°C für 10 min gewaschen und schließlich dreimal in 2xSSC bei 45°C für 5 min gespült. Es folgte eine zweimalige Inkubation in 0,2xSSC bei 60°C wonach die Präparate in 4xSSC mit 0,1% Tween-20 gesammelt wurden. Es schloss sich eine Inkubation der Präparate in einer 5%igen BSA-Lösung für 30 min an, danach wurde zur Detektion der Zentromersonde 150 µl FITC-Avidin-Antikörperlösung (1:200 Verdünnung in

einer 1%igen BSA-Lösung) auf die Präparate pipettiert, ein Deckglas aufgelegt und bei 37°C für 40 min inkubiert. Anschließend wurden die Präparate dreimal für 5 min in 4xSSC mit 0,1% Tween-20 gewaschen. Die Signale wurden verstärkt, indem mit biotinyliertem Anti-Avidin-Antikörper hybridisiert wurde. Die Arbeitsschritte waren analog zur FITC-Avidin-Hybridisierung, die Verdünnung der Antikörper betrug hier aber 1:100. Danach folgte eine erneute Hybridisierung mit dem FITC-Avidin-Antikörper. Die Zellen wurden mit einer DAPI / Propidiumjodid-Lösung gegengefärbt und die Präparate mit Vectashield-Lösung eingedeckt. Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop mit Dreifachfiltersatz zur Detektion von DAPI, Propidiumjodid und FITC. Ein Mikronukleus wurde als Zentromer-positiv gewertet, wenn in ihm ein FITC-Signal eindeutig zu erkennen war.

2.2.13 Durchflusszytometrie von Blutzellen

Mit der Durchflusszytometrie ist es möglich zu bestimmen, in welcher Phase des Zellzykluses sich Blutzellen im Augenblick der Messung befinden. Dazu wurde die DNA der Zellen mit DAPI angefärbt und die DNA-Menge pro Zelle mit dem Durchflusszytometer bestimmt. Über die DNA-Menge pro Zelle kann man dann die Zellzyklusposition ableiten.

Zunächst wurde die Blutkultur abzentrifugiert (900 rpm, 10 min) und in 300 µl Chromosomenmedium 1A resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden dann 10 µl zu 1,6 ml DAPI-Färbelösung gegeben, gut gemischt und mit dem Partec CAA Durchflusszytometer vermessen. Die Geräteeinstellungen waren: L-L: 25; U-L: 999; Speed 3,0; Gain 400. Diese Vorgehensweise hatte eine Zellzählrate von 50-80 Zellen / Sekunde ermöglicht. Jede Probe wurde zweimal gemessen.

2.2.14 Humane FA-Inhalationsstudie

In dieser Inhalationsstudie wurden 21 Probanden an 10 aufeinanderfolgenden Arbeitstagen je 4 Stunden mit FA exponiert und die Auswirkung auf die Mikrokernfrequenz in Mundschleimhautzellen mit dem MNT ermittelt.

2.2.14.1 Probandenkollektiv

Geschlecht, Alter und Raucherstatus der 21 Probanden sind in der Tabelle 5 wiedergegeben. Ein Proband (FA11) wurde von der Auswertung ausgeschlossen, da nach dem Auftreten grippeähnlicher Symptome die Exposition nicht fortgesetzt werden konnte. Alle Probanden waren gesunde Nichtraucher, oder ehemalige Raucher, die vor mindestens 3 Jahren das Rauchen aufgegeben hatten. Ihr Nichtraucherstatus wurde durch eine Cotininmessung im Urin überprüft. Eine medizinische Untersuchung stellte außerdem sicher, dass die Probanden tatsächlich in guter gesundheitlicher Verfassung waren. Ausschlusskriterien bei der Probandenwahl waren: Schwere Allergien, Hautkrankheiten, Krankheiten der Atemwege, akute Infektionen, Rauchen, Nichtraucher seit weniger als 3 Jahren, Träger von Kontaktlinsen oder Brillen, Genuss von mehr als 50 g Alkohol am Tag, Einnahme von Psychopharmaka, Exposition von ionisierender Strahlung oder Einnahme von Zytostatika innerhalb der letzten 6 Monate.

Die Probanden wurden über den Inhalt und Zweck der Studie informiert und über mögliche Gesundheitsrisiken aufgeklärt. Sie bestätigten die Aufklärung und ihre Bereitschaft zur Teilnahme durch eine schriftliche Einverständniserklärung. Das Protokoll der Studie wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg genehmigt.

2.2.14.2 FA-Exposition

Die Probanden wurden an 10 aufeinanderfolgenden Arbeitstagen in fünf Gruppen zu je 3-6 Personen in einer Kammer (5 m x 3 m x 2,5 m) nach dem in Tabelle 6 dargestellten Schema mit FA exponiert. Dieser Teil der Studie wurde am Institut für Arbeits- und Sozialmedizin an der Universität Heidelberg durchgeführt. Temperatur und Luftfeuchtigkeit wurden kontrolliert und auf Normalwerte ein-

gestellt. Zum Herstellen der verschiedenen FA-Luftkonzentrationen wurden verschiedene Mengen Paraformaldehyd in einem Gefäß auf einer Heizplatte mit Magnetrührer bei 200°C erhitzt und verdampft. Drei Ventilatoren sorgten für eine gute Durchmischung der Raumluft und eine gleichmäßige Verteilung der FA-Dämpfe. Die FA-Konzentrationsbestimmung der Raumluft erfolgte in Echtzeit mit einem ANSYCO FA-Monitor und durch Entnahme von Luftproben mit anschließender HPLC-Analyse (DFG-DNPH-Methode). Jede Exposition dauerte vier Stunden. Um zwischen Geruchseffekten und sensorischen Effekten unterscheiden zu können, wurden bei einigen Expositionen der FA-Geruch durch Ethylacetat (EA; 10-20 ppm) maskiert. EA besitzt einen ausgeprägten, nicht unangenehmen Geruch ab einer Schwellenwertkonzentration von 10 ppm, wohingegen Reizungen der Schleimhäute ab einer Konzentration von 400 ppm auftreten. Die EA-Konzentration der Raumluft wurde in Echtzeit mit einem AUER PPM Instrument gemessen.

Um körperliche Anstrengung am Arbeitsplatz zu simulieren, mussten die Probanden während einer Expositionsphase dreimal 15 min auf einem Ergometer 80 Watt Leistung erbringen.

2.2.14.3 Der MNT mit Mundschleimhautzellen

Proben wurden eine Woche vor Studienstart, unmittelbar vor Studienstart, nach der letzten Exposition und 7, 14 und 21 Tage danach genommen. Dazu musste der Proband zunächst seinen Mund gründlich mit Wasser ausspülen um Verunreinigungen zu entfernen. Mundschleimhautzellen wurden dann mit einem Metallspatel von beiden Backentaschen genommen und auf einen sauberen Objektträger ausgestrichen (Mundschleimhautabstrich). Pro Backentaschenseite wurden zwei Präparate bzw. Objektträger hergestellt. Anschließend wurden die Präparate für 30 min in der Fixierungslösung inkubiert und dann luftgetrocknet. Nach dem Ende der Studie wurden alle Präparate von einer unabhängigen Qualitätssicherungseinrichtung (Dr. S. Müller, Dr. Knoell Consult GmbH, Mannheim) kodiert und nach Ulm geschickt. Dort wurden die Präparate mit einer DAPI / Propidiumjodid-Lösung gefärbt und am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet (1000 Zellen pro Backentaschenseite).

Protokolliert wurde die Anzahl an

- Zellen mit Mikronuklei
- Mikronuklei
- Kernausstülpungen
- zweikernigen Zellen
- Zellen mit Kernfragmentation
- Zellen mit winzigen Farbflecken (Ursprung unbekannt)

Fehlbeurteilungen durch bakterielle Kontamination konnten ausgeschlossen werden, da Bakterien mit der verwendeten Färbemethode leicht zu identifizieren sind. Da von den untersuchten Parametern nur sporadische, nicht expositionsbedingte Effekte festgestellt wurden, sind im Ergebnisteil nur die MN-Frequenzen in normalen Zellen (intakte Zellen mit gleichmäßig gefärbtem, ovalem oder rundem Nukleus) dargestellt. Ein MN musste morphologische Ähnlichkeit mit dem Hauptkern besitzen, aber einen kleineren Durchmesser (zwischen $1/3$ und $1/16$ des Hauptkerns) haben und außerdem nicht mit dem Hauptkern verbunden sein. Da es keinen relevanten Unterschied in der MNT-Frequenz zwischen den beiden Backentaschenseiten gab, wurde der Durchschnittswert angegeben (in MN pro 1000 Zellen). Alle Präparate wurden von einer Person ausgewertet, Unklarheiten wurden protokolliert und mit Kollegen diskutiert. Nach dem Ende der Auswertung wurden die kompletten Rohdaten an die Qualitätssicherungseinrichtung zum Dekodieren gesendet. Zur statistischen Auswertung wurden alle Daten nach Exposition mit den beiden Kontrollwerten vor Expositionsbeginn auf einen statistisch signifikanten Unterschied hin untersucht. Zu diesem Zweck wurde der Wilcoxon Rangsummentest verwendet.

2.2.15 Statistik

2.2.15.1 Beschreibende Statistik und statistische Tests

Die Experimente in dieser Arbeit wurden, wenn im Ergebnisteil nicht anders erwähnt, dreimal unabhängig voneinander durchgeführt. Ein einzelnes Experiment bzw. Wiederholungsexperiment beinhaltet, wenn die Wirkung von FA in der Zellkultur untersucht wurde, die Testung mehrere Konzentrationen und liefert pro

Konzentration einen Wert. Zur Präsentation der Ergebnisse wurden der Mittelwert und die Standardabweichung (SD) aus den Einzelwerten der Experimente berechnet und die Werte in Form eines Säulen- oder Liniendiagramms dargestellt. Für die Interpretation der Ergebnisse sind nicht ausschließlich die Implikationen der statistischen Tests zugrunde gelegt worden. Die Beurteilung beruht vor allem auf der Eindeutigkeit, Reproduzierbarkeit und biologischen Relevanz der Ergebnisse. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der parametrische t-Test für zwei Stichproben mit ungleicher Varianz verwendet, die Nullhypothese wurde bei einem p-Wert von kleiner 5% verworfen (Signifikanzniveau). In den Abbildungen werden Signifikanzen $p < 0,05$ mit einem Stern (*), $p < 0,01$ mit zwei Sternen (**) und $p < 0,001$ mit drei Sternen (***) gekennzeichnet.

2.2.15.2 Beschreibung der Dosis-Effekt-Beziehungen

Für die Charakterisierung der Dosis-Effekt-Beziehungen von FA in den in Kapitel 3.1 beschriebenen Experimenten wurden zunächst Vorversuche durchgeführt, um die relevanten Konzentrationsbereiche zu ermitteln. Zusätzlich wurde der Ausgang von Experimenten unter der Verwendung verschiedener Kurvenmodelle am Computer simuliert, um die für eine zuverlässige Aussage nötige Anzahl an unabhängigen Wiederholungsexperimenten und die Konzentrationsabstände zu bestimmen.

Um beurteilen zu können, ob eine lineare Funktion eine bestimmte Dosis-Effekt-Beziehung eines der Genotoxizitätstest angemessen beschreibt, wurde der F-Test angewendet (Neter et al., 1996). Die Null-Hypothese besagt hier, dass der untersuchte Effekt einen linearen Verlauf besitzt. Ein niedriger p-Wert sagt also aus, dass die Dosis-Effekt-Beziehung mit hoher Wahrscheinlichkeit keinen linearen Verlauf besitzt und ein komplexeres Modell zur Beschreibung nötig ist.

Der Test wurde in vier Versionen durchgeführt, um die Robustheit gegenüber den Modellannahmen zu wahren:

- (1) Einfache lineare Regression mit der Methode der kleinsten Quadrate
- (2) Einfache lineare Regression mit der Methode der kleinsten Quadrate, wobei hier Messungen bei der Konzentration 0 (μM FA) als Kovariate behandelt wurden
- (3) Gewichtete lineare Regression. Die Gewichtung wurde durch die Verwendung des Reziprokes der Varianz der Messwerte durchgeführt.
- (4) Gewichtete lineare Regression, wobei hier Messungen bei der Konzentration 0 (μM FA) als Kovariate behandelt wurde

In (2) und (4) wurde berücksichtigt, dass die Werte innerhalb eines Experimentes nicht unabhängig sind und dass sich darum die Wiederholungsexperimente im Nullniveau unterscheiden können. Hier wurde dann der Kontrollwert (also die Konzentration 0 μM FA) als Kovariate betrachtet, um so Messniveau-Unterschiede herauszurechnen.

Niedrige p-Werte im F-Test weisen also darauf hin, dass ein rein lineares Modell mit den Werten über den ganzen getesteten Konzentrationsbereich nicht zu vereinbaren ist. Es bedeutet aber nicht, dass die Konzentrations-Effekt-Beziehung keine linearen Konzentrationsanteile enthält. Darum wurde mit Hilfe eines weiteren F-Tests zusätzlich überprüft, ob die Konzentrations-Effekt-Beziehung lineare Komponenten enthält.

Für die Beschreibung der Dosis-Effekt-Beziehung wurden drei verschiedene Kurven an die Messwerte angepasst (Kurvenformel in Klammern; a, b, c und d sind Modell-Parameter):

- (1) Eine Gerade ($a + \text{Konzentration} * b$)
- (2) Eine quadratische Funktion ohne Schwellenwert
($a + b * \text{Konzentration} + c * \text{Konzentration}^2$)
- (3) Eine lineare Zweiphasen-Regressionskurve (stückweise Regression)
(für Konzentration $\leq d$: $a + b * d$)
(für Konzentration $> d$: $a + b * \text{Konzentration}$)

Die lineare Zweiphasen-Regressionskurve wurde mit Hilfe der Simplex Prozedur, welche in der Software „SAS IML“ implementiert ist, erstellt. Dabei verläuft der erste Teil der Kurve parallel zur Abszisse, was also keinem zunehmenden Effekt entspricht. Der zweite Teil ist eine steigende Gerade, die den zunehmenden Effekt darstellt. Die Konzentration d , welche den Übergang markiert, kann als Schwellenwert im Rahmen dieser Versuchsanordnung verstanden werden. Die Parameter wurden mit der Methode der kleinsten Quadrate geschätzt. Die Übereinstimmung der Modellkurven mit den Werten wurde mit RSS (Residual sum of squares) und AIC (Akaike information criterion) mit der Formel

$$AIC = 2k + n * \ln(RSS/n)$$

unter Annahme der Normalverteilung der Werte beurteilt (k = Anzahl der Parameter; n = Anzahl an Beobachtungen). AIC enthält also einen Strafterm für jeden zusätzlichen Parameter im Modell.

3 Ergebnisse

Der Ergebnisteil ist in sechs Teilbereiche untergliedert:

- (1) Kapitel 3.1 stellt die Ergebnisse der Untersuchungen zur Genotoxizität von FA in V79 Zellen dar. Dies beinhaltet die Charakterisierung der Dosis-Effekt-Beziehung der induzierten Effekte in den Genotoxizitätstests.
- (2) In Kapitel 3.2 werden Untersuchungen zur zytotoxischen Wirkung von FA in den humanen A549 Zellen präsentiert, außerdem Daten zur Induktion und Reparatur von DPX in diesen Zellen.
- (3) Ergebnisse zur Induktion und Reparatur von DPX in humanen Nasenepithelzellen (HNEC) sind in Kapitel 3.3 dargestellt. Darüber hinaus werden die Ergebnisse der vergleichenden Untersuchung der basalen Proteinmengen der Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH) in HNEC und A549 gezeigt.
- (4) In Kapitel 3.4 werden die Untersuchungen zur Persistenz von FA-induzierten DPX in kultivierten Zellen unter verschiedenen Expositionsbedingungen gezeigt. Außerdem sind die Ergebnisse der Expressionsanalyse von FA-abbauenden Enzymen in A549 Zellen nach FA-Exposition dargestellt.
- (5) Ergebnisse zur Untersuchung der Genotoxizität von FA in kultiviertem humanem Blut werden in Kapitel 3.5 präsentiert.
- (6) Die lokale Genotoxizität von FA beim Menschen wurde in einer FA-Inhalationsstudie untersucht, die Ergebnisse sind in Kapitel 3.6 dargestellt. Der untersuchte Endpunkt sind Mikronuklei in Mundschleimhautzellen.

3.1 Die Genotoxizität von FA in V79 Zellen und Untersuchungen zur Konzentrations-Effekt-Beziehung

3.1.1 Induktion von DNA-Effekten im Comet Assay

Der Effekt einer einstündigen Behandlung von V79 Zellen mit FA auf die DNA-Migration im Comet Assay ist in Abbildung 10 dargestellt. Unter den Standardbedingungen des Comet Assays, d.h. einer Alkalidenaturierung und Elektrophorese von jeweils 25 min, war kein signifikanter Effekt von FA im untersuchten Konzentrationsbereich (zwischen 0,001 und 200 μM) zu erkennen. Insbesondere war keine Verstärkung der DNA-Migration durch FA feststellbar, was auf eine DNA-strangbrechende Wirkung hindeuten würde.

In einer zweiten Versuchsserie wurde die DNA-Migration im Comet Assay durch eine Verlängerung der Elektrophoresezeit auf 35 min erhöht. Hier zeigte sich eine statistisch signifikante Hemmung der Migration durch die FA-Behandlung ab einer Konzentration von 10 μM , was ein Hinweis auf DPX darstellt.

Das Enzym Proteinase K (PK) kann im Comet Assay verwendet werden, um DPX zu entdecken bzw. um zwischen DPX und DNA-DNA-Crosslinks zu unterscheiden: Sind tatsächlich DPX für die Hemmung der DNA-Migration verantwortlich, werden diese bzw. die Proteine durch die PK-Behandlung abgebaut und die DNA kann frei während der Elektrophorese wandern und mit den Kontrollen vergleichbare Werte erreichen.

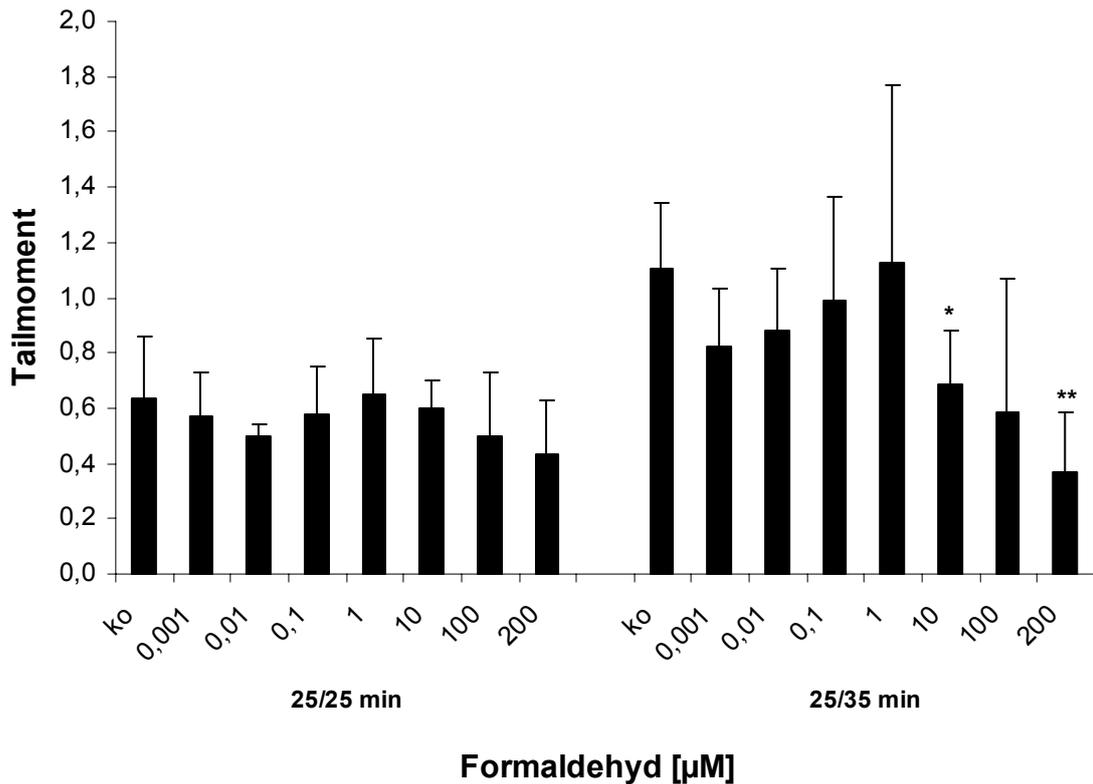


Abbildung 10: Der Effekt einer einstündigen Formaldehyd-Behandlung auf die DNA-Migration im Comet Assay unter Standardbedingungen (Alkalidenaturierung 25 min / Elektrophorese 25 min) und verlängerter Elektrophorese (35 min). Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; min: Minuten; ko: Kontrolle).

Der Effekt einer PK-Behandlung auf die DNA-Migration im Comet Assay von FA-behandelten V79 Zellen ist in Abbildung 11 dargestellt. Zunächst ist zu erkennen, dass die Zugabe des PK-Enzypuffers die DNA-Migration leicht erhöhte. Außerdem wird deutlich, dass die DNA-Migrationshemmende Wirkung von FA durch die PK-Behandlung reproduzierbar aufgehoben wurde, was ein starker Hinweis auf DPX darstellt. Da die PK-Behandlung die Versuchsvariabilität erhöhte, war bei den FA-behandelten Kulturen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Proben mit bzw. ohne PK-Behandlung festzustellen.

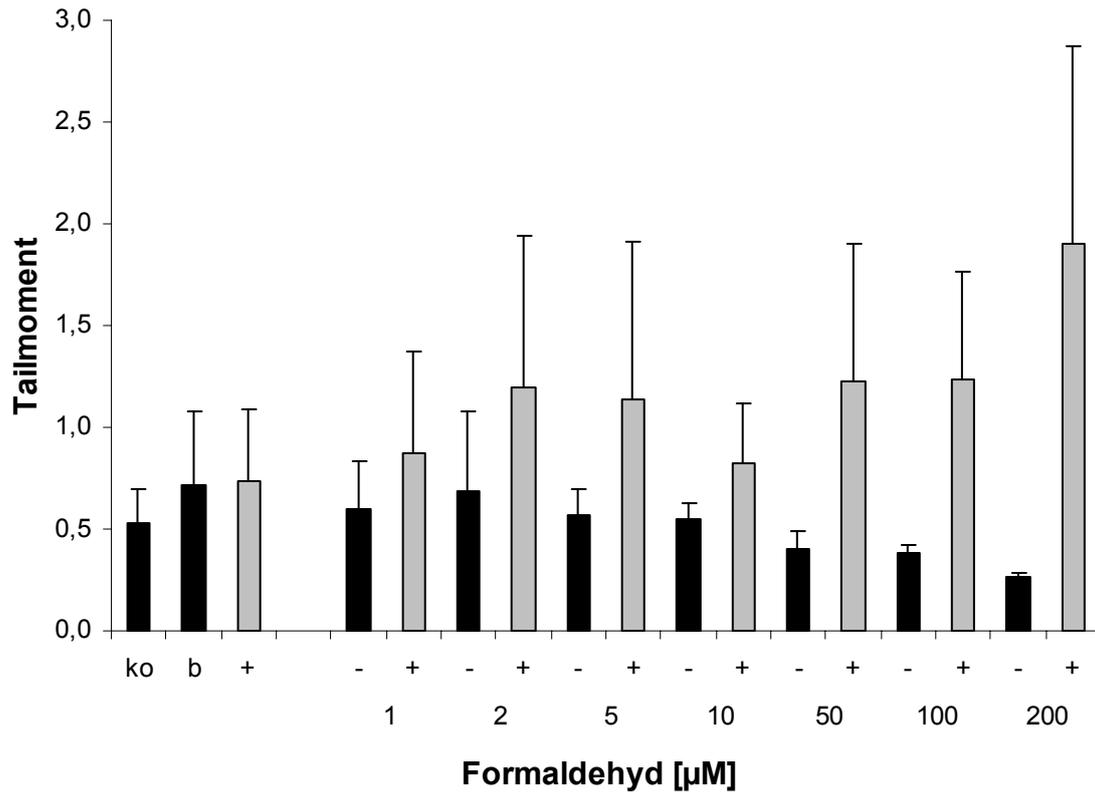


Abbildung 11: Der Effekt einer Proteinase K (PK)-Behandlung auf die DNA-Migration von Formaldehyd-behandelten V79 Zellen im Comet Assay unter Standardbedingungen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. (ko: Kontrolle; b: mit Enzypuffer; +: mit PK; - : ohne PK).

3.1.2 Die Konzentrations-Effekt-Beziehung von FA-induzierten DPX

FA-induzierte DPX in V79 Zellen wurden mit dem alkalischen Comet Assay bestimmt, indem die Hemmung von Gammastrahlung-induzierter DNA-Migration gemessen wurde.

Abbildung 12 zeigt, dass FA die DNA-Migration im Comet Assay konzentrationsabhängig hemmte. Ein deutlich statistisch signifikanter Effekt ($p < 0,01$) auf die DNA-Migration trat ab einer Konzentration von 25 μM FA auf, eine besonders ausgeprägte Migrationshemmung ab 200 μM . Um den Effekt von FA im Comet Assay im Niedrigdosisbereich (1-10 μM FA) näher zu charakterisieren, wurde eine zweite Serie von Experimenten durchgeführt. Hier zeigte sich kein genotoxischer Effekt von FA im Comet Assay. Als Positivkontrolle wurde die Konzentration von 100 μM ebenfalls getestet, die, wie in der ersten Versuchsserien auch, eine statistisch signifikante Reduktion der DNA-Migration zeigte. Es wurde in beiden Versuchsserien jeweils fünf unabhängige Experimente durchgeführt.

Die Toxizitätsbestimmung mit Hilfe des Fluorescein-Diacetat / Ethidiumbromid-Assay ergab eine Rate toter Zellen von 1-3%. Aufgrund des sehr kleinen Anteils toter Zellen kann davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse der Comet Assay Experimente nicht signifikant von diesen beeinflusst wurden.

Ergebnisse

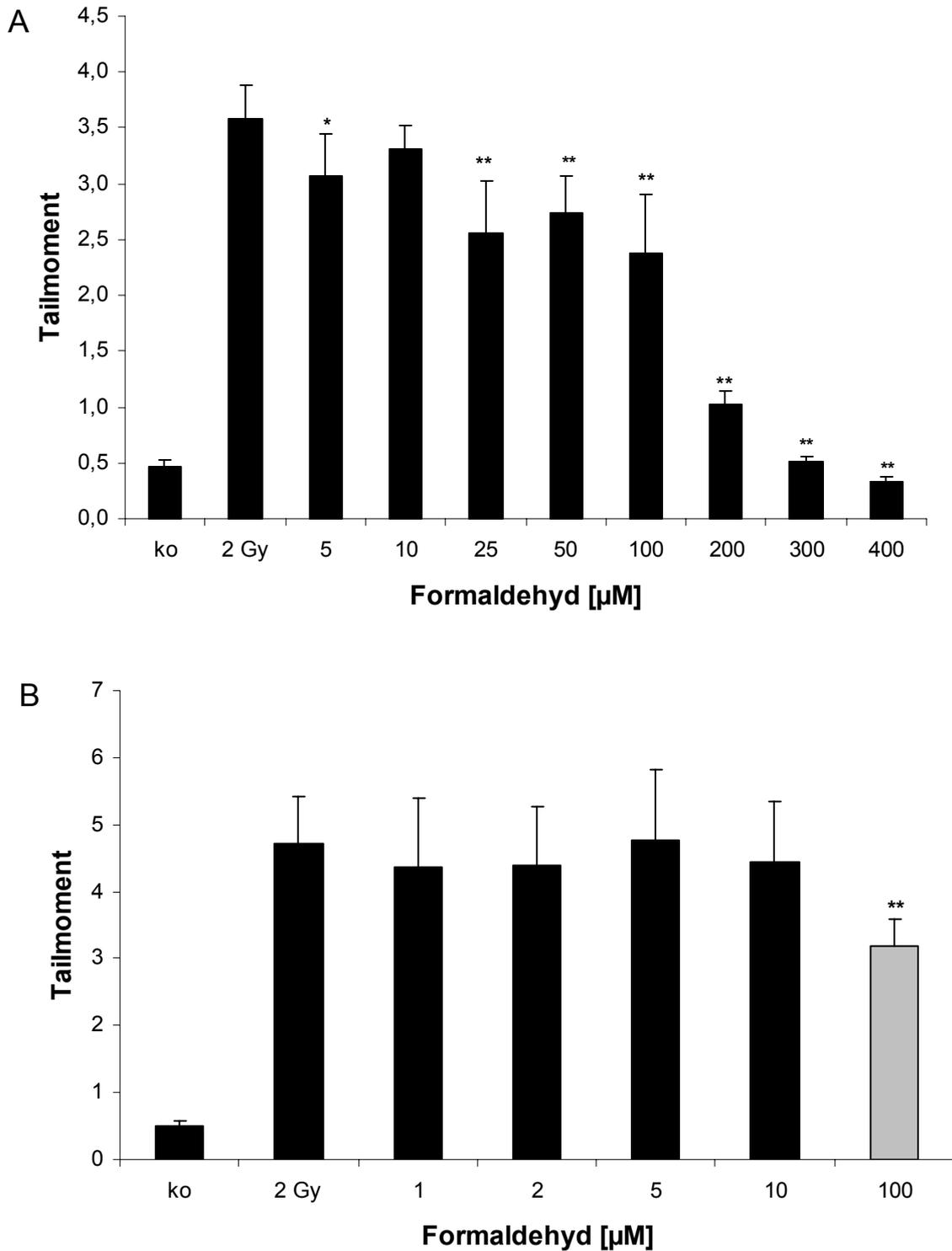


Abbildung 12: Die Induktion von DNA-Protein-Crosslinks durch Formaldehyd (FA) in V79 Zellen. Steigende FA-Konzentrationen führten zu einer Verringerung von Gammastrahlungs-induzierter (2 Gy) DNA-Migration. (A) Experimente im Konzentrationsbereich 5-400 μM FA, (B) Experimente im Konzentrationsbereich 1-10 μM FA plus Positivkontrolle für Effektinduktion (grau). Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten (*: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ko: Kontrolle; Gy: Gray).

Die Charakterisierung der Konzentrations-Effekt-Beziehung erfolgte durch zwei verschiedene statistische Tests, deren Ergebnisse (p-Werte) in der Tabelle 1 dargestellt sind. So wurde zunächst mit Hilfe einer Regressionsanalyse (linke Spalte) geprüft, ob die Konzentrations-Effekt-Beziehung eine lineare Komponente enthält, wobei niedrige p-Werte auf eben eine solche hindeuten. Außerdem wurde mit einem weiteren F-Test (rechte Spalte) bestimmt, inwiefern komplexere Modelle den Verlauf der Dosis-Effekt-Beziehung besser beschreiben, als eine einfache lineare Funktion, was sich dann in einem niedrigen p-Wert zeigt. Beide Tests wurden in vier verschiedenen Versionen durchgeführt; genauere Informationen hierüber siehe Kapitel 2.2.15.2.

Des Weiteren wurde mit Hilfe der statistischen Kriterien RSS und AIC überprüft, inwieweit sich Modellfunktionen mit den Messwerten der Genotoxizitätstests in Übereinstimmung bringen lassen. Die getesteten Modellfunktionen waren: (1) Eine lineare Funktion, (2) eine quadratische Funktion und (3) eine stückweise lineare Zweiphasen-Regressionsfunktion.

Tabelle 1: Zusammenfassung der p-Werte der Regressionsanalyse zum Testen auf eine lineare Komponente der Konzentrations-Effekt-Beziehung (linke Spalte) und für den F-Test auf Nichtübereinstimmung der Daten mit einer linearen Regressionsfunktion (rechte Spalte).

Comet Assay , Teil 1 (Abbildung 12 A, Abbildung 13)	Regressions-analyse	F-Test
(1) ungewichtete Regression, ohne Adjustierung	p < 0,0001	p < 0,0001
(2) ungewichtete Regression, null-adjustiert	p < 0,0001	p = 0,0002
(3) gewichtete Regression, ohne Adjustierung	p < 0,0001	p < 0,0001
(4) gewichtete Regression, null-adjustiert	p < 0,0001	p < 0,0001
SCE-Test (Abbildung 14, Abbildung 15)		
(1) ungewichtete Regression, ohne Adjustierung	p < 0,0001	p < 0,0001
(2) ungewichtete Regression, null-adjustiert	p < 0,0001	p = 0,0005
(3) gewichtete Regression, ohne Adjustierung	p < 0,0001	p < 0,0001
(4) gewichtete Regression, null-adjustiert	p < 0,0001	p = 0,0002
MNT (Abbildung 16, Abbildung 17)		
(1) ungewichtete Regression, ohne Adjustierung	p < 0,0001	p < 0,10
(2) ungewichtete Regression, null-adjustiert	p < 0,0001	p = 0,36
(3) gewichtete Regression, ohne Adjustierung	p < 0,0001	p < 0,0007
(4) gewichtete Regression, null-adjustiert	p < 0,0001	p = 0,018

Die Ergebnisse der statistischen Tests für den Comet Assay (Tabelle 1, Abbildung 12 A) zeigen klar, dass die Dosis-Effekt-Kurve eine lineare Komponente enthält, aber ein rein lineares Modell nicht ausreicht, um sie adäquat zu beschreiben. In Abbildung 13 sind die Kurven der linearen und quadratischen Regressionsfunktionen auf die Messpunkte der fünf Experimente gelegt. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass auch eine quadratische Funktion nicht das richtige Modell zur Beschreibung der Dosis-Effekt-Beziehung ist, da die Kurve in bestimmten Bereichen nur mäßig mit den Datenpunkten übereinstimmt. Eine sinnvolle Zweiphasen-Regressionsfunktion lässt sich nicht an die Tailmoment-Werte anpassen und ist darum auch nicht in Abbildung 13 dargestellt. Der Comet Assay zeigte im Niedrigdosisbereich (1-10 µM FA) keinen Effekt (Abbildung 12 B), woraus folgt, dass die Konzentrations-Effekt-Beziehung hier eindeutig linear verläuft. Auf die Darstellung der statistischen Analyse wurde daher verzichtet.

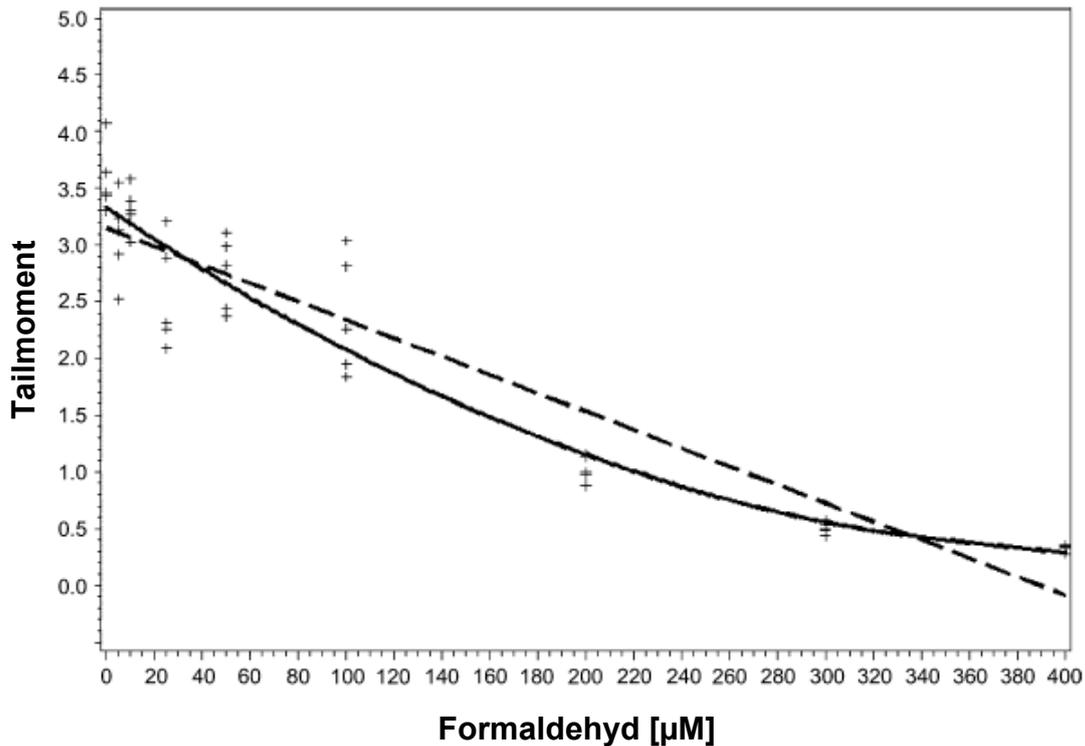


Abbildung 13: Die Konzentrations-Effekt-Beziehung für die Induktion von DNA-Protein-Crosslinks durch Formaldehyd in V79 Zellen. Eine lineare Funktion (gestrichelte Linie) und eine quadratische Funktion (durchgezogene Linie) sind den Daten aus Abbildung 12 A angepasst.

Auf der Basis dieser Experimente war es nicht möglich, einen Schwellenwert für die DPX-Induktion von FA zu bestimmen.

3.1.3 Die Konzentrations-Effekt-Beziehung von FA-induzierten SCE

SCE wurden in V79 Zellen durch FA ab einer Konzentration von 100 µM induziert. Dies ist übereinstimmend mit bereits veröffentlichten Ergebnissen (Merk und Speit, 1998). Die SCE-Induktion trat gleichzeitig mit der Zytotoxizität auf, die in diesem Test als Reduktion des relativen Proliferationsindex bestimmt wurde (Abbildung 14).

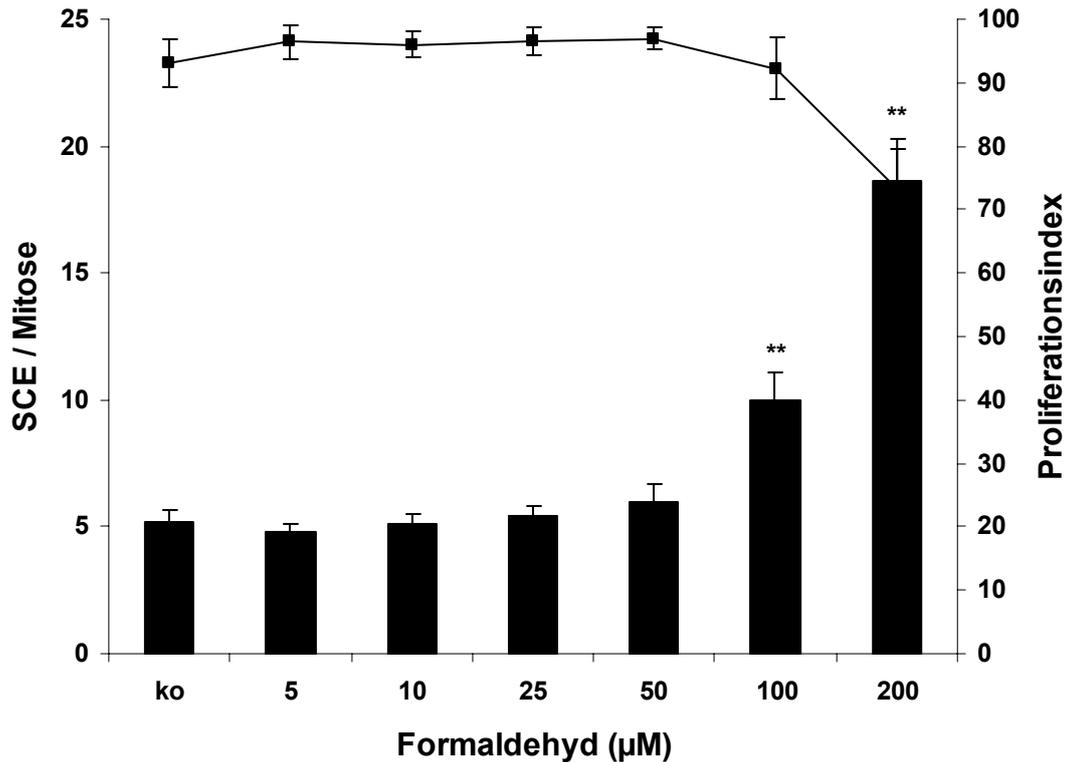


Abbildung 14: Die Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (SCE, Balken) und die Reduktion des Proliferationsindex (durchgezogene Linie) in Formaldehyd-behandelten V79 Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten (**: $p < 0,01$; ko: Kontrolle).

Die statistische Analyse der Daten zeigt, dass die Konzentrations-Effekt-Beziehung eine lineare Komponente enthält, aber ein ausschließlich lineares Modell nicht ausreicht, um den Verlauf hinreichend zu beschreiben (Tabelle 1).

Um den Verlauf der Dosis-Effekt-Beziehung zu beschreiben, wurden die Kurven einer linearen Funktion, einer quadratischen Funktion und einer stückweise linearen Zweiphasigen-Regressionsfunktion auf die Messdaten des SCE-Tests angepasst und den Grad der Übereinstimmung mit AIC und RSS berechnet. Die Ergebnisse zeigen, dass die stückweise lineare Zweiphasen-Regressionsfunktion die beste Übereinstimmung (niedrigster RSS- bzw. AIC-Wert) mit den Messdaten besitzt (Tabelle 2, Abbildung 15). Aus Gründen der Übersichtlichkeit ist die Kurve der quadratischen Funktion in der Abbildung nicht dargestellt.

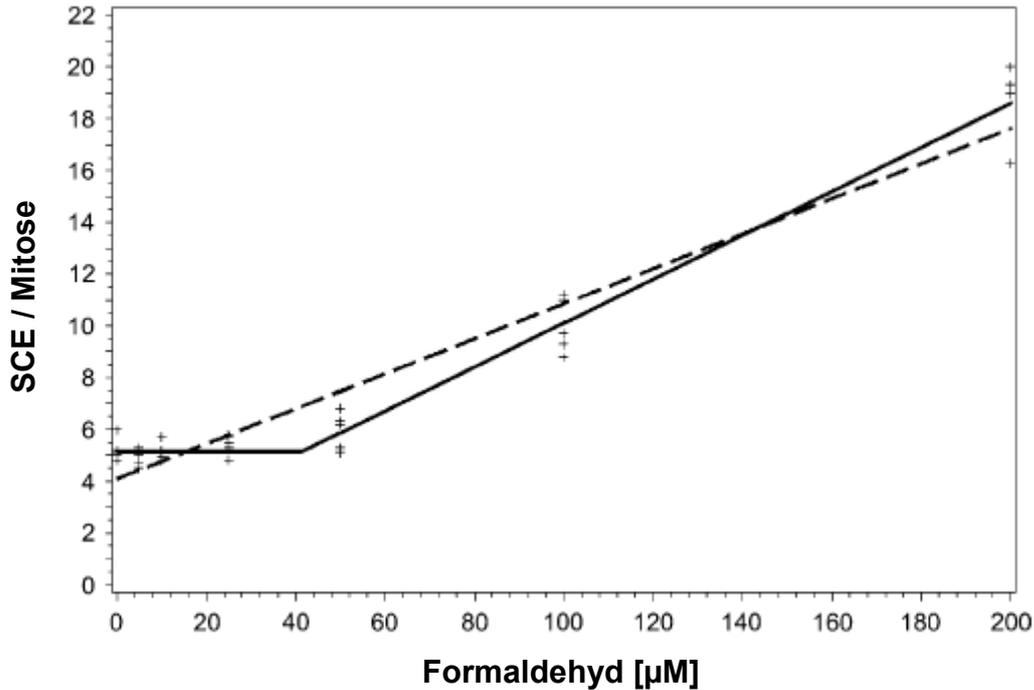


Abbildung 15: Die Konzentrations-Effekt-Beziehung der Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) durch Formaldehyd in V79 Zellen. Eine lineare Funktion (gestrichelte Linie) und eine stückweise lineare Zweiphasen-Regressionskurve (durchgezogene Linie) sind den Daten angepasst.

Ein praktischer Schwellenwert für die SCE-Induktion in V79 Zellen unter diesen Versuchsbedingungen kann auf der Basis dieser Daten zwischen 25 und 50 µM FA angenommen werden.

Tabelle 2: Die Anpassung dreier verschiedener Modelle an die Daten des Schwesterchromatidaustausch (SCE) -Tests mit den jeweiligen Formeln der Kurven und den „goodness of fit“-Werten aus der RSS-Analyse (Residual Sum of Squares / Summe der quadrierten Residuen) und der AIC-Analyse (Akaike Information Criterion / Akaike Informationskriterium) (c: Formaldehyd-Konzentration; SCE: SCE pro Mitose).

Modell	Formel	RSS	AIC
linear	$SCE = 4,07 + 0,0068 * c$	44,8	13,4
quadratisch	$SCE = 4,81 + (0,023 * c) + (0,00023 * c^2)$	21,3	-9,9
Zweiphasen-Regression	$c \leq 41: SCE = 5,11$	18	-15,6
	$c > 41: SCE = 1,62 + 0,0085 * c$		

3.1.4 Die Konzentrations-Effekt-Beziehung von FA-induzierten MN

Im Gegensatz zu früheren Ergebnissen (Merk und Speit, 1998) ist der MNT etwas sensitiver, als der SCE-Test. Eine leichte, aber statistisch signifikante Erhöhung der MN-Rate war bereits ab einer Konzentration von 75 μM feststellbar (Abbildung 16).

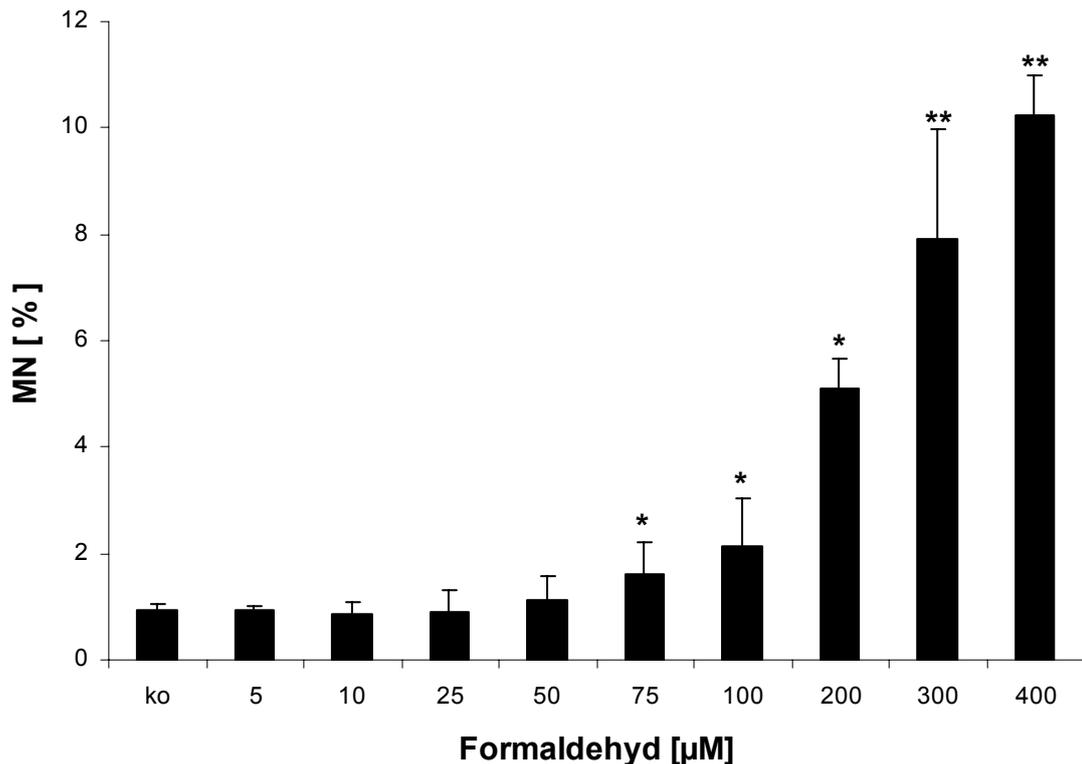


Abbildung 16: Die Induktion von Mikronuklei (MN) durch Formaldehyd in V79 Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ko: Kontrolle).

Wie im Comet Assay und im SCE-Test enthalten auch die Daten des MNT lineare Komponenten (Tabelle 1). Eine lineare Konzentrations-Effekt-Beziehung kann außerdem statistisch nur abgelehnt werden, wenn man die unterschiedliche Streuung der Messpunkte bei den verschiedenen Konzentrationen berücksichtigt (gewichtete Regression).

Wie beim SCE-Test stimmt das Modell einer linearen Zweiphasen-Regressionskurve am Besten mit den Daten des MNT überein. Abbildung 17 zeigt diese und

die lineare Kurve mit den Daten des MNT. Die Ergebnisse der statistischen Tests zur Übereinstimmung der Modellkurven mit den Messwerten ist der Tabelle 3 zu entnehmen.

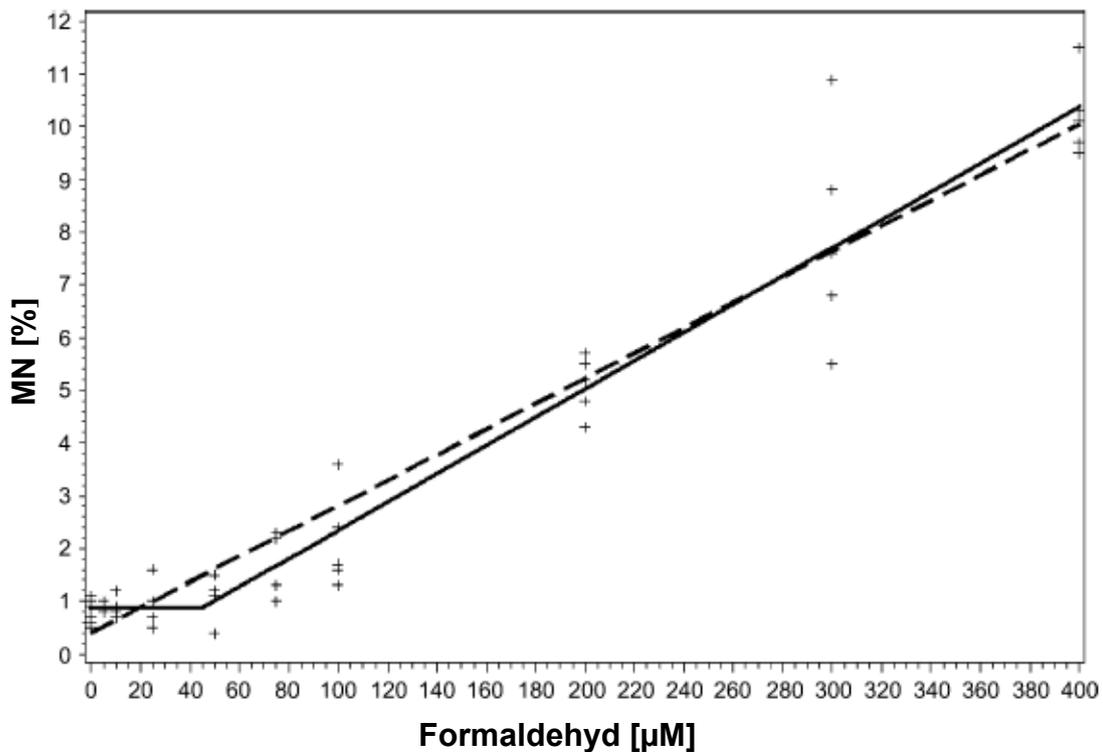


Abbildung 17: Die Konzentrations-Effekt-Beziehung der Induktion von Mikronuklei (MN) durch Formaldehyd in V79 Zellen. Eine lineare Funktion (gestrichelte Linie) und eine lineare Zweiphasen-Regressionskurve (durchgezogene Linie) sind den Daten des Mikronukleus-Tests angepasst.

Ein praktischer Schwellenwert für die Induktion von MN durch FA unter diesen experimentellen Bedingungen kann bei einer Konzentration zwischen 25 und 50 µM angenommen werden. Dies entspricht dem Effekt im SCE-Test.

Tabelle 3: Die Anpassung dreier verschiedener Modelle an die Daten des Mikrokern-Tests mit den jeweiligen Formeln der Kurven und den „goodness of fit“-Werten aus der RSS-Analyse (Residual Sum of Squares / Summe der quadrierten Residuen) und der AIC-Analyse (Akaike Information Criterion / Akaike Informationskriterium) (c: FA-Konzentration; MN: Mikrokern-Rate in %).

Modell	Formel	RSS	AIC
linear	$MN = 0,4 + 0,024 * c$	36,3	-18,4
quadratisch	$MN = 0,61 + (0,017 * c) + (0,00002 * c^2)$	32,4	-23,1
Zweiphasen-Regression	$c \leq 45: MN = 0,89$	28,2	-30,7
	$c > 45: MN = -0,33 + 0,027 * c$		

3.2 Untersuchung zur Zytotoxizität und Genotoxizität von FA *in vitro* in der humanen Lungenzelllinie A549

A549 ist eine permanente, adhärent wachsende Zelllinie, die aus dem Gewebe eines Lungenkarzinoms gewonnen wurde und in der genetische Toxikologie häufig als Modell für Lungenzellen eingesetzt wird.

3.2.1 Zytotoxizität von FA in A549 Zellen

Die Zytotoxizität von FA in A549 Zellen wurde mit zwei verschiedenen Zytotoxizitätstests untersucht. Der erste Zytotoxizitätstest bestimmt die Fähigkeit der Zellen zum klonalen Wachstum, der zweite Test die Reduktion des Zellwachstums aufgrund der FA-Exposition. Die Exposition der Zellen mit FA erfolgte durch FA-Zugabe ins Zellkulturmedium mit 10% FKS ohne Medienwechsel. Die Versuche wurden dreimal unabhängig voneinander durchgeführt.

Wie in Abbildung 18 zu sehen, verminderte FA das Wachstum von A549 Zellen im Vergleich zur Kontrolle ab einer Konzentration von 100 μM in geringem Maße, ab einer Konzentration von 200 μM dann deutlich und statistisch signifikant. Die Fähigkeit von A549 Zellen zum klonalen Wachstum war dagegen schon ab einer Konzentration von 20 μM FA statistisch signifikant gehemmt. Bei 50 μM FA wurden kaum noch Zellkolonien gebildet.

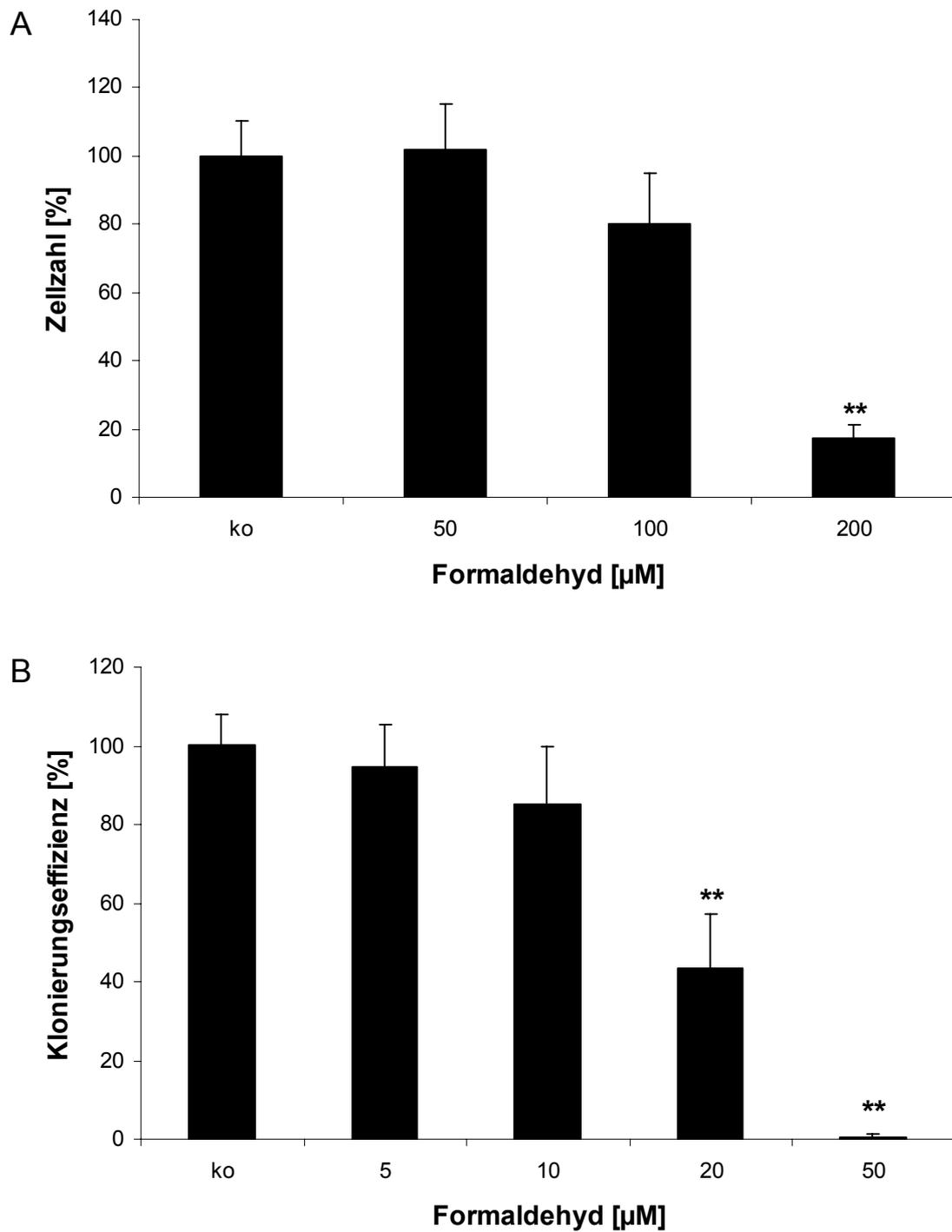


Abbildung 18: Die Zytotoxizität von Formaldehyd in A549 Zellen gemessen als Reduktion des Zellwachstums (A) und der Klonierungseffizienz (B). Die Daten sind relativ zur Kontrolle (=100%) angegeben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (**: $p < 0,01$; ko: Kontrolle).

3.2.2 Die Induktion und Reparatur von FA-induzierten DPX in A549

Die Induktion und Reparatur von FA-induzierten DPX in A549 Zellen wurde mit Hilfe des Comet Assay untersucht. DPX hemmen im Comet Assay die DNA-Migration, welche durch 2 Gy Gammastrahlung induziert wird. Werden DPX eliminiert, sei es aktiv durch DNA-Reparaturmechanismen oder passiv, etwa durch Hydrolyse, nimmt die DNA-Migrationshemmung ab und die Comet Assay-Parameter erreichen wieder den Wert, der durch die Bestrahlung induziert wird.

Die FA-vermittelte Induktion von DPX in A549 Zellen durch eine einstündige Behandlung ist in Abbildung 19 A dargestellt. FA hemmt konzentrationsabhängig die strahlungsinduzierte DNA-Migration. Dieser Effekt wird ab einer FA-Konzentration von 200 μM statistisch signifikant.

Die durch eine einstündige FA-Behandlung induzierten DPX wurden zeitabhängig eliminiert (Abbildung 19 B). Die Migrationshemmung war 4 Stunden nach Behandlungsende immer noch vorhanden, aber in abgeschwächter Form und nicht mehr statistisch signifikant. Weitere 4 Stunden später war kein Effekt der FA-Behandlung mehr zu erkennen. Dies weist darauf hin, dass DPX (induziert durch eine einstündige FA-Behandlung von bis zu 300 μM) in A549 Zellen nach etwa 8 Stunden vollständig entfernt wurden oder nur noch in so geringem Maße vorhanden waren, dass sie der Comet Assay in der hier durchgeführten Form nicht detektieren konnte.

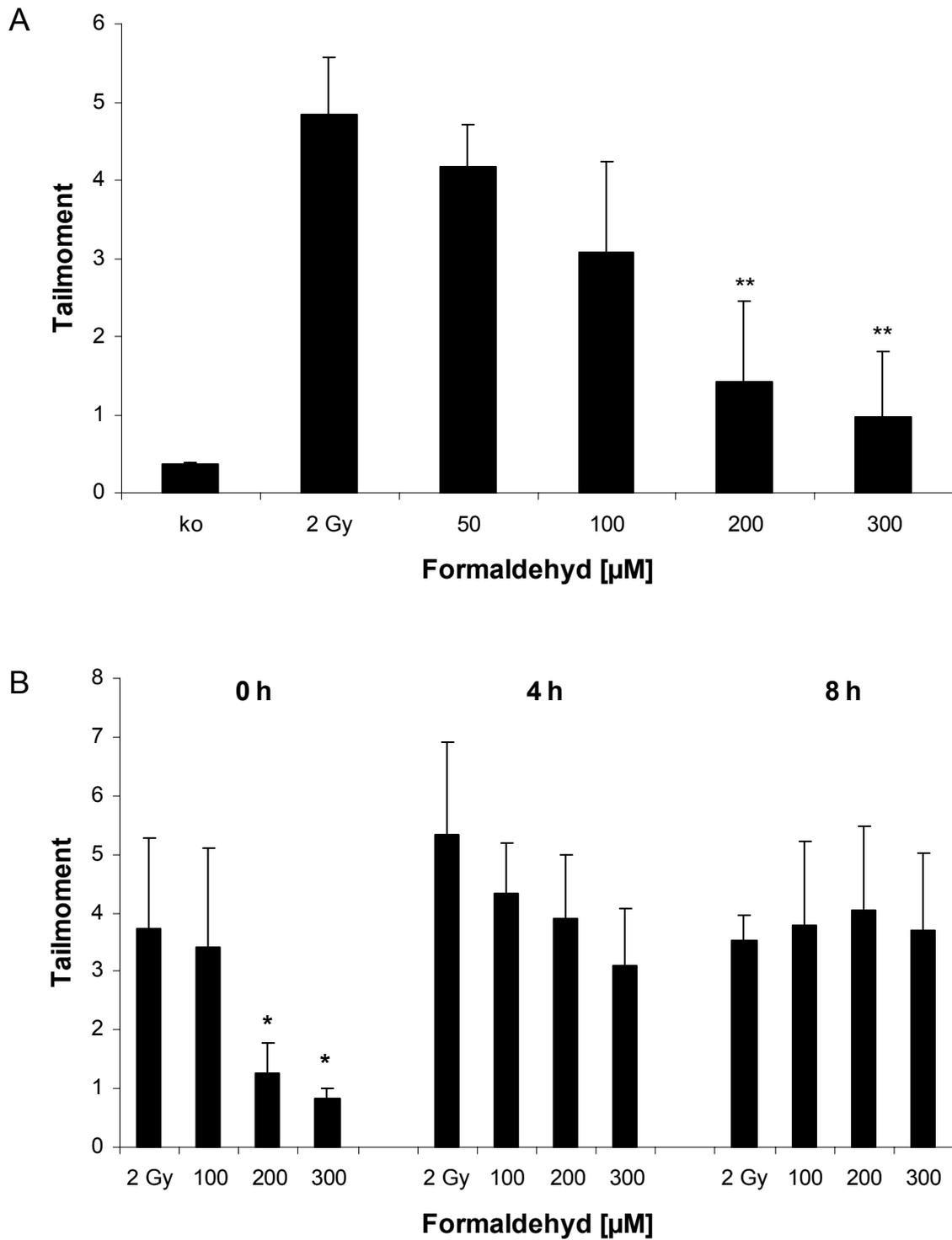


Abbildung 19: Die Induktion (A) und Reparatur (B) von FA-induzierten DNA-Protein-Crosslinks in A549 Zellen nach einstündiger Behandlung gemessen mit dem Comet Assay. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; Gy: Gray; h: Stunden; ko: Kontrolle).

3.3 Untersuchung zur Genotoxizität von FA *in vitro* in humanen primären Nasenepithelzellen (HNEC)

HNEC (human nasal epithelial cells) sind adhärent wachsende Nasenepithelzellen, die in standardisierter Qualität käuflich erworben werden können. Als primäre Zellen repräsentieren sie die *in vivo* Situation besser als die permanenten Zelllinien.

3.3.1 Die Induktion und Reparatur von FA-induzierten DPX in HNEC

In HNEC bewirkte eine einstündige FA-Behandlung eine konzentrationsabhängige Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration im Comet Assay, die ab einer Konzentration von 200 μM auch statistisch signifikant war (Abbildung 20 A). Der Grad der DPX-Induktion von FA ist damit vergleichbar mit der DPX-Induktion in A549 Zellen (Abbildung 20 A).

Die Reparatur von FA-induzierten DPX in HNEC nach einer einstündigen Behandlung ist in Abbildung 20 B dargestellt. Wie auch im vorhergehenden Versuch zur DPX-Induktion war eine reproduzierbare und konzentrationsabhängige Hemmung der DNA-Migration zu erkennen. Diese Hemmung war aber aufgrund einer größeren Versuchsvariabilität nicht statistisch signifikant. Die Eliminierung von DPX erfolgte zeitabhängig: 4 Stunden nach Ende der FA-Behandlung war immer noch eine ausgeprägte konzentrationsabhängige Hemmung der DNA-Migration zu erkennen, 8 Stunden nach Behandlung nur noch eine schwache bei einer FA-Konzentration von 200 μM . Kein Effekt der FA-Exposition war schließlich 24 Stunden nach Behandlungsende mehr zu erkennen: Die Hemmung der strahlungsvermittelten DNA-Migration, die auf DPX hindeutet, war vollständig entfernt.

Vergleicht man die Induktion und Reparatur von FA-induzierten DPX in A549 Zellen und HNEC, kann man eine vergleichbare Kinetik feststellen: Bei beiden Zelltypen wurde die Induktion bei 200 μM FA statistisch signifikant und die Reparatur der DPX war etwa 8 Stunden nach dem Ende der FA-Exposition beendet.

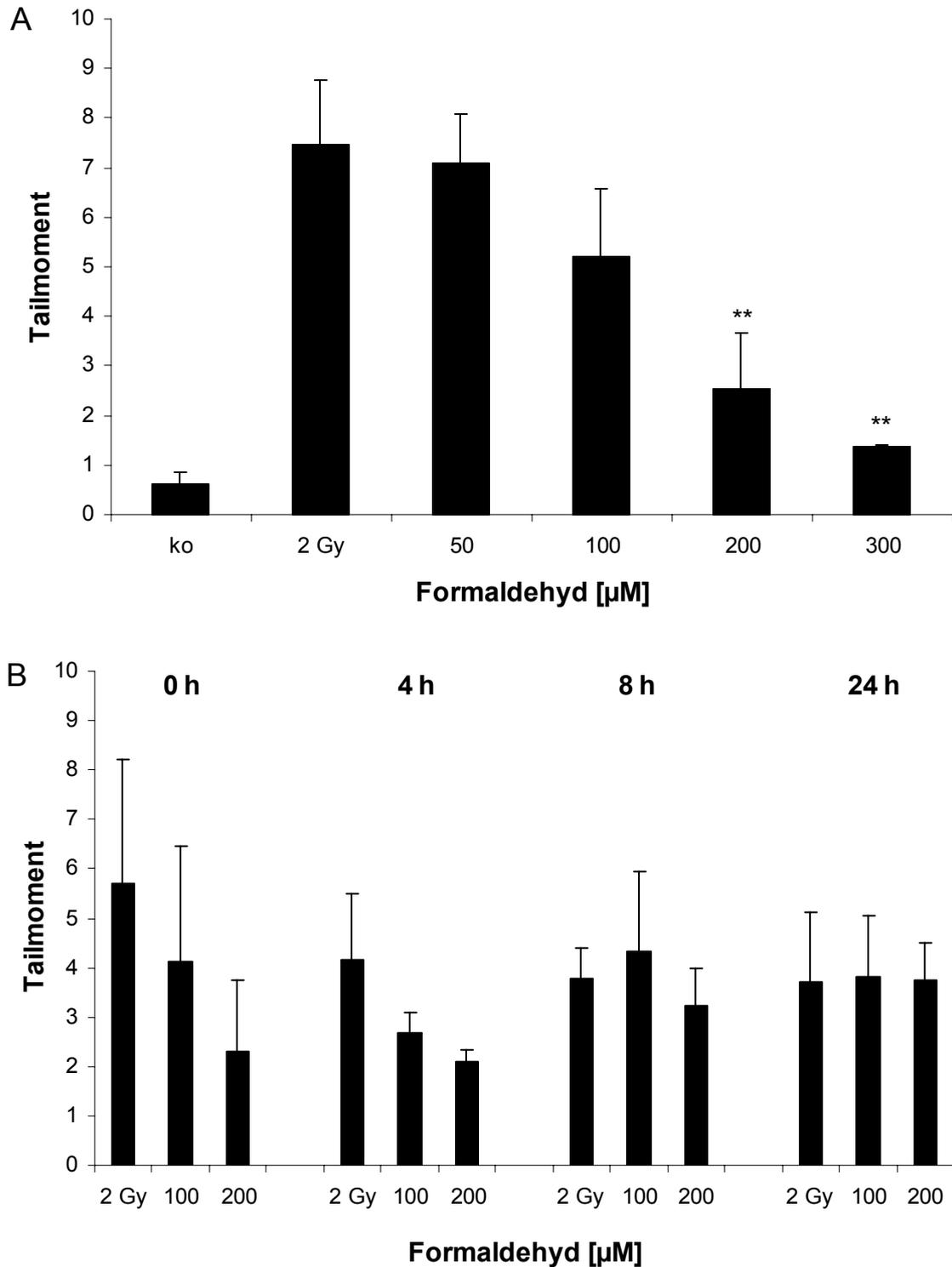


Abbildung 20: Die Induktion (A) und Eliminierung (B) von DNA-Protein-Crosslinks nach einer einstündigen Formaldehyd-Behandlung in humanen Nasenepithelzellen (HNEC). Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (**: $p < 0,01$; Gy: Gray; ko: Kontrolle).

3.3.2 Vergleich der basalen Proteinmenge der FDH in A549 und HNEC

Mithilfe der Western Blot Analyse wurde die basale Proteinmenge der Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH) in A549 Zellen und HNEC bestimmt. Hierzu wurde zunächst Gesamtprotein aus den beiden Zelltypen (nahezu konfluenten Kulturen) gewonnen, die Proteine in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF geblottet. Der Nachweis der FDH erfolgte zunächst mit einem primären anti-FDH-Antikörper und einem sekundären, HRP-konjugierten Antikörper zur Chemolumineszenz-Detektion mit dem ECL^{plus} Reagenz. Die Antikörper wurden dann mit einem speziellen Puffer von der Membran entfernt. Um sicherzustellen, dass gleiche Proteinmengen auf das Polyacrylamidgel geladen wurden, wurde anschließend ein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Nachweis, analog zum FDH-Nachweis, durchgeführt.

Die Western Blot Analyse wurde zweimal mit demselben Ergebnis durchgeführt, Abbildung 21 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Experiments.

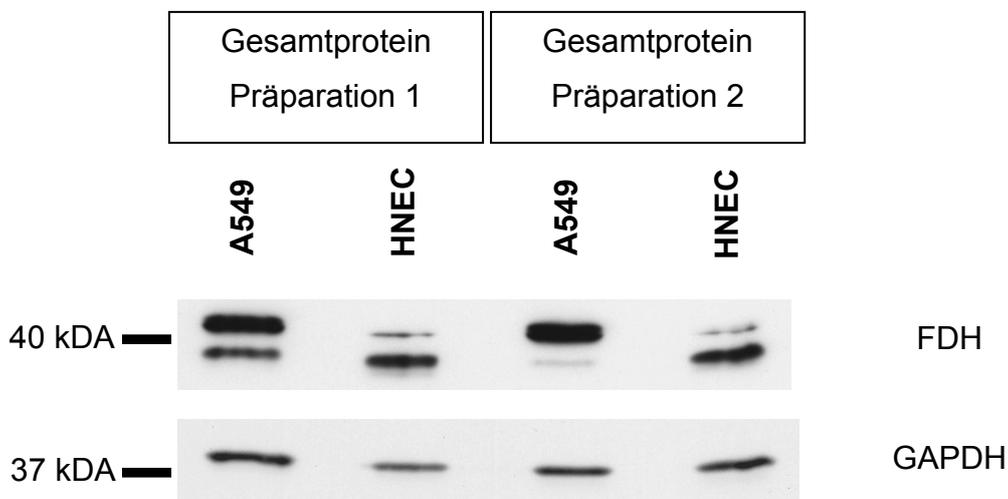


Abbildung 21: Vergleich der basalen Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH)-Proteinmenge in A549 Zellen und humanen Nasenepithelzellen (HNEC) mit der Western Blot Analyse. Gesamtprotein wurde je zweimal aus den beiden Zelltypen gewonnen und beide Präparationen untersucht. Dargestellt ist ebenfalls die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)-Ladekontrolle (kDa: Molekülmasse in Kilo-Dalton).

Im Western Blot waren drei verschiedene FDH-Proteinbanden zu erkennen: Die ersten beiden liefen bei etwas über 40 kDa und sind in der Abbildung 21 optisch kaum zu trennen, die dritte lief knapp unter 40 kDa. Auffallend war, dass die beiden Banden über 40 kDa in A549 Zellen deutlich ausgeprägter waren, als in HNEC, wohingegen die Bande mit dem niedrigsten Molekulargewicht in HNEC am stärksten zu erkennen war. Das Molekulargewicht der FDH liegt bei 40 kDa. Da es von der FDH-mRNA mehrere Spleißvarianten gibt, handelt es sich bei diesen drei verschiedenen Banden möglicherweise um Produkte dieser unterschiedlich prozessierten Transkripte.

3.4 Untersuchungen zur Persistenz von FA-induzierten DPX unter verschiedenen Expositionsbedingungen

Die Dynamik der Entstehung und Eliminierung von FA-induzierten DPX in V79 und A549 Zellen wurde durch verschiedene Behandlungsprotokolle untersucht. Der Frage einer möglichen Akkumulation von DPX in Zellen, sowie einer eventuellen Adaptation der Zellen auf die durch FA induzierte Genotoxizität wird hier nachgegangen.

3.4.1 Der Effekt wiederholter FA-Exposition auf DPX und die MN-Rate in V79 Zellen

V79 Zellen wurden dreimal mit FA im Abstand von 3 bzw. 24 Stunden behandelt, ohne dass das Zellkulturmedium erneuert wurde. Zur Kontrolle wurden parallel weitere V79 Zellen kultiviert, die eine einmalige FA-Behandlung erhalten haben, und zwar zu dem Zeitpunkt, an dem die mehrfach behandelten V79 Zellen ihre dritte FA-Behandlung erhielten. Diese finale FA-Exposition dauerte eine Stunde, wonach die Zellen präpariert und die DPX im Comet Assay untersucht wurden.

Wie in Abbildung 22 dargestellt, reduzierte eine Dreifachbehandlung von V79 Zellen mit FA im Abstand von 3 Stunden die strahlungsinduzierte DNA-Migration stärker, als die entsprechende Einfachbehandlung, was auf eine erhöhte Anzahl von DPX nach Dreifachbehandlung schließen lässt. Erhöhte man hingegen das Zeitintervall der FA-Behandlungen auf 24 Stunden, war keine Hemmung der induzierten DNA-Migration feststellbar: Die finale FA-Behandlung schien keine DPX zu induzieren. Dieser Effekt ist möglicherweise das Ergebnis einer adaptiven Antwort der V79 Zellen auf die beiden Vorbehandlungen durch FA.

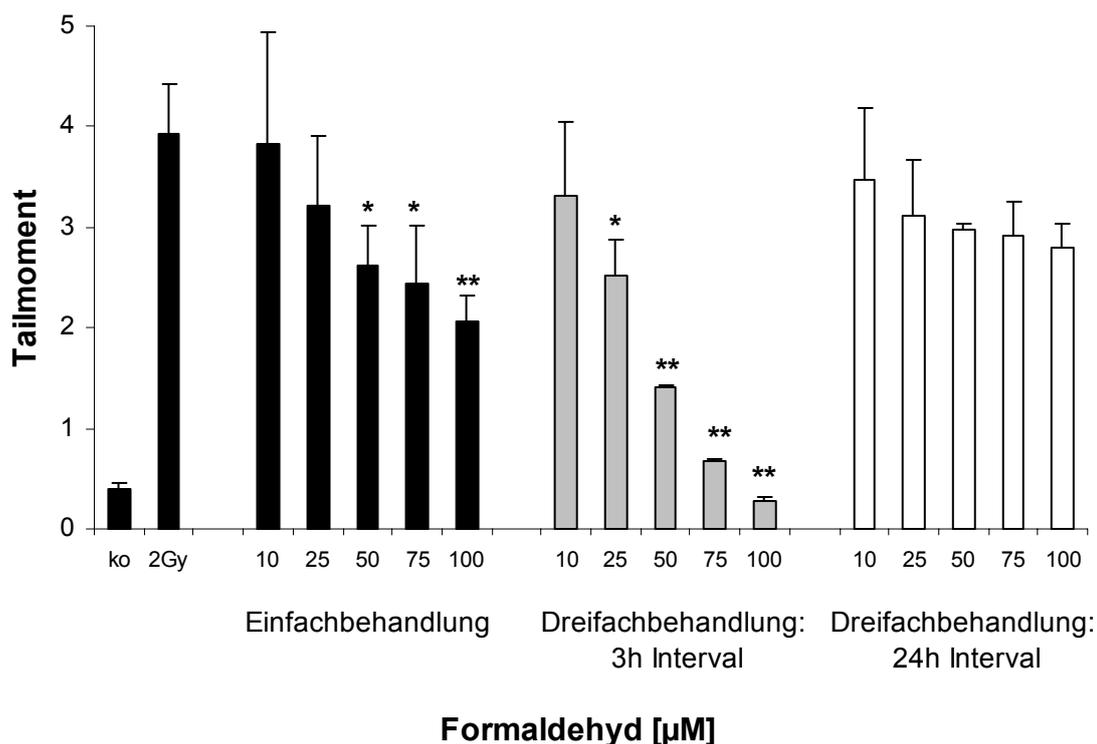


Abbildung 22: Die Auswirkung wiederholter Formaldehyd (FA)-Behandlung von V79 Zellen auf die Induktion von DNA-Effekten im Comet Assay. Der Comet Assay wurde immer nach der letzten FA-Behandlung direkt nach Bestrahlung mit 2 Gy Gammastrahlen durchgeführt. DNA-Protein-Crosslinks wurden als Reduktion von Gammastrahlungs-induzierter DNA-Migration gemessen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ko: Kontrolle; Gy: Gray; h: Stunden).

Angelehnt an den zuvor beschriebenen Comet Assay Versuch, wurde ein MNT durchgeführt, ebenfalls mit einer FA-Dreifachbehandlung der V79 Zellen im Abstand von 3 und 24 Stunden. Die Präparation der Zellen erfolgte 18 Stunden nach der letzten Behandlung, was genügend Zeit darstellt, um die V79 Zellen eineinhalb Zellzyklen durchlaufen zu lassen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 23 dargestellt. Drei FA-Behandlungen im Abstand von 3 Stunden verstärkten leicht die Induktion von MN im Vergleich zu einer einzelnen Behandlung. Die zytotoxischen Effekte von FA waren ebenfalls ausgeprägter, so dass die mit dreimal 75 und 100 μM FA exponierten Kulturen nicht ausgewertet werden konnten. Eine FA-Dreifachbehandlung im Abstand von 24 Stunden führte hingegen zu keiner Erhöhung der MN-Rate im Vergleich zur Einfachbehandlung.

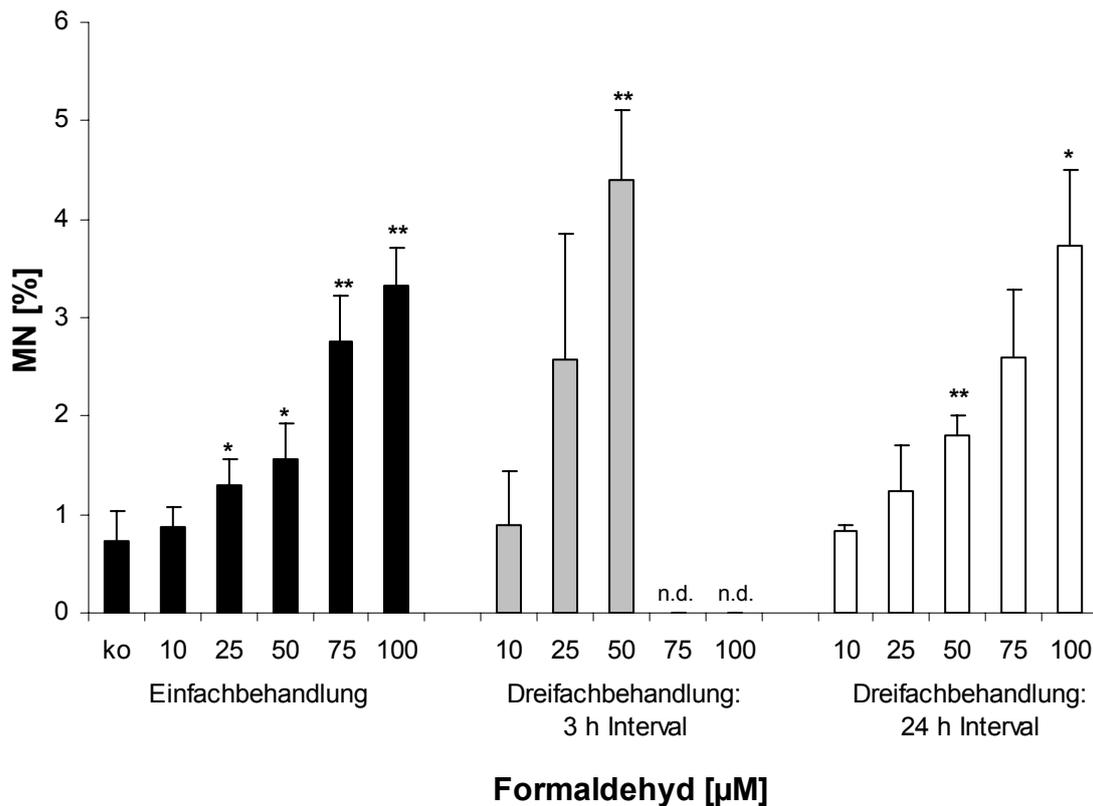


Abbildung 23: Der Effekt wiederholter Formaldehyd (FA)-Behandlung auf die Induktion von Mikronuklei (MN). Die V79 Zellen wurden dreimal mit FA im Abstand von 3 bzw. 24 Stunden behandelt. 18 Stunden nach der letzten Behandlung wurde der Mikronukleustest (MNT) durchgeführt. Ein MNT mit einfacher FA-Behandlung wurde zum Vergleich ebenfalls durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; n.d.: nicht auswertbar; ko: Kontrolle; h: Stunden).

Häufig genügen geringe, keinen sichtbar adversen Effekt verursachende Dosen eines Toxins, um Zellen zu adaptieren, so dass dann eine spätere Gabe desselben Toxins in eigentlich schädlicher Konzentration keinen oder einen stark abgeschwächten Effekt zeigt (Stecca und Gerber, 1998). Um festzustellen, ob dies auch bei FA-induzierten DPX in V79 Zellen gilt, wurden V79 Zellen zweimal mit 50 µM FA im Abstand von 24 Stunden vorbehandelt und danach, weitere 24 Stunden später, mit einer finalen FA-Konzentration von 50, 100 und 200 µM für eine Stunde exponiert und schließlich die DPX im Comet Assay bestimmt. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, wurden parallel dazu V79 Zellen nur mit den finalen FA-Konzentrationen behandelt.

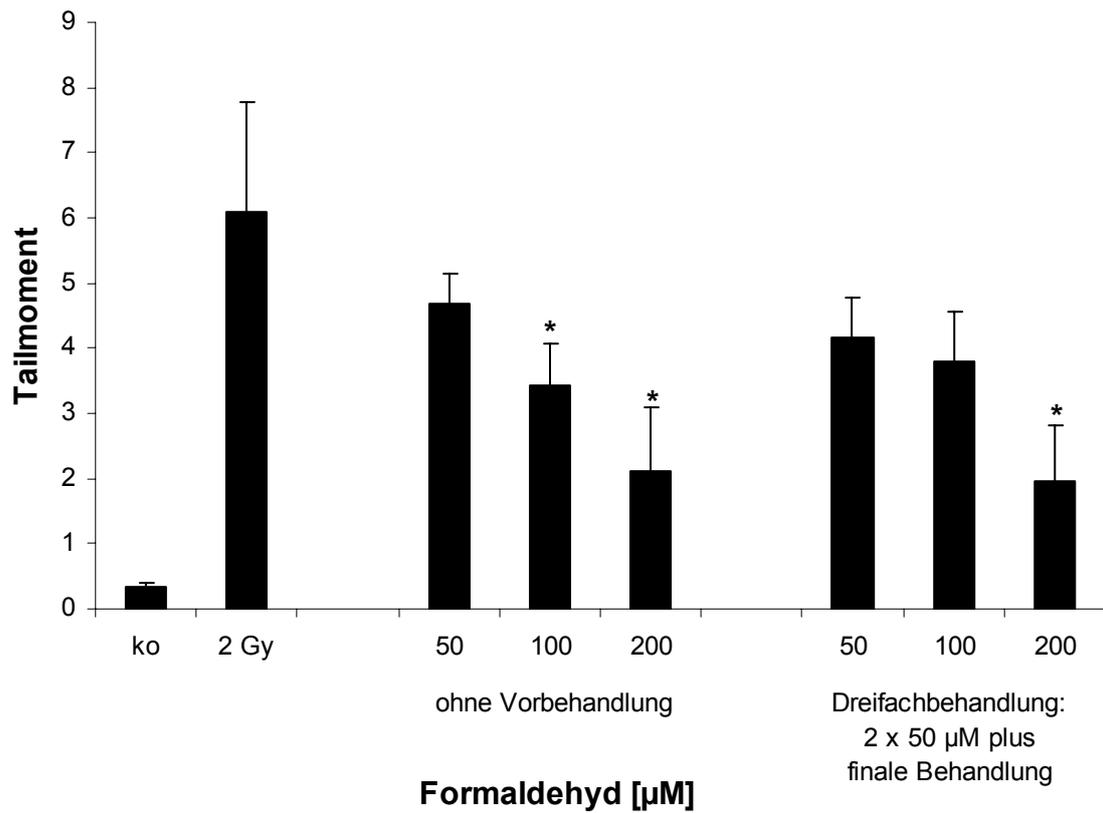


Abbildung 24: Die Induktion von DNA-Protein-Crosslinks durch Formaldehyde (FA) in V79 Zellen nach einer zweimaligen Vorbehandlung mit 50 µM FA und einer finalen Behandlung mit 50, 100 und 200 µM FA jeweils im Abstand von 24 Stunden. Zum Vergleich wurden parallel dazu V79 ohne Vorbehandlung mit den gleichen FA-Konzentrationen exponiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (*: $p < 0,05$; ko: Kontrolle; Gy: Gray).

Die FA-Einfachbehandlung zeigte in diesem Versuch eine statistisch signifikante Hemmung der DNA-Migration ab einer Konzentration von 100 µM, die FA-Dreifachbehandlung hingegen erst ab 200 µM (Abbildung 24).

3.4.2 Der Effekt wiederholter FA-Exposition auf DPX in A549 Zellen

Um den Effekt wiederholter FA-Exposition an der humanen A549 Zelllinie zu untersuchen und mit den Ergebnissen der Experimente mit V79 Zellen zu vergleichen (siehe Kapitel 3.4.1), wurden A549 Zellen dreimal im Abstand von 24 Stunden mit derselben FA-Konzentration behandelt und eine Stunde nach der finalen FA-Behandlung mit dem Comet Assay untersucht. Dabei wurden DPX als Reduktion von 2 Gy strahlungsinduzierter DNA-Migration gemessen.

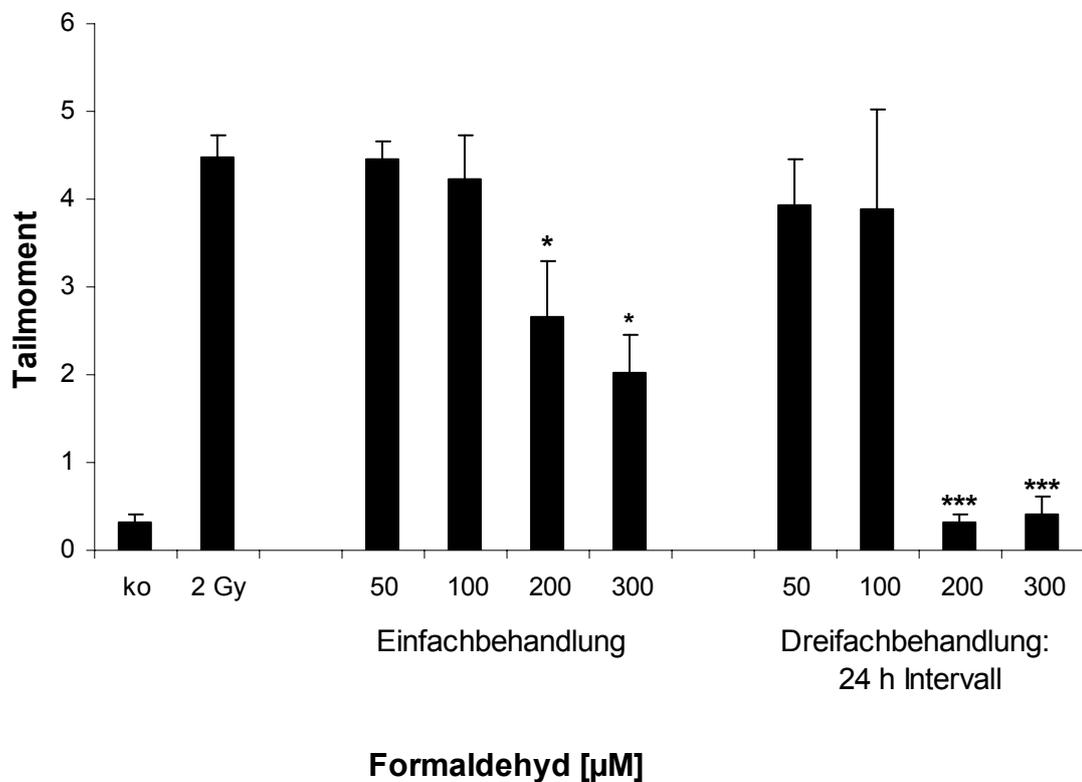


Abbildung 25: Die Induktion von DNA-Protein-Crosslinks in A549 Zellen durch Formaldehyd nach Einfachbehandlung und Dreifachbehandlung im Abstand von 24 Stunden gemessen mit dem Comet Assay. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ko: Kontrolle; Gy: Gray; h: Stunden).

Die FA-Einfachbehandlung führte ab einer FA-Konzentration von 200 μM zu einer statistisch signifikanten Reduktion der DNA-Migration (Abbildung 25). Die Dreifachbehandlung bewirkte hingegen eine verstärkte Hemmung der DNA-Migration im Vergleich zur Einfachfachbehandlung (Abbildung 25), anders als im vergleichbaren Experiment mit V79 Zellen, in dem kein Effekt der FA-Behandlung zu erkennen war (Abbildung 22).

V79 Zellen wachsen bedeutend schneller als A549 Zellen, haben also eine geringere Verdopplungszeit. Um dies zu berücksichtigen, wurde das Experiment mit A549 Zellen wiederholt, aber mit einem Zeitabstand von 48 Stunden zwischen den FA-Behandlungen. Aufgrund der längeren Kulturzeit der Zellen wurde eine Subkultivierung durchgeführt, und zwar 24 Stunden nach der ersten Behandlung.

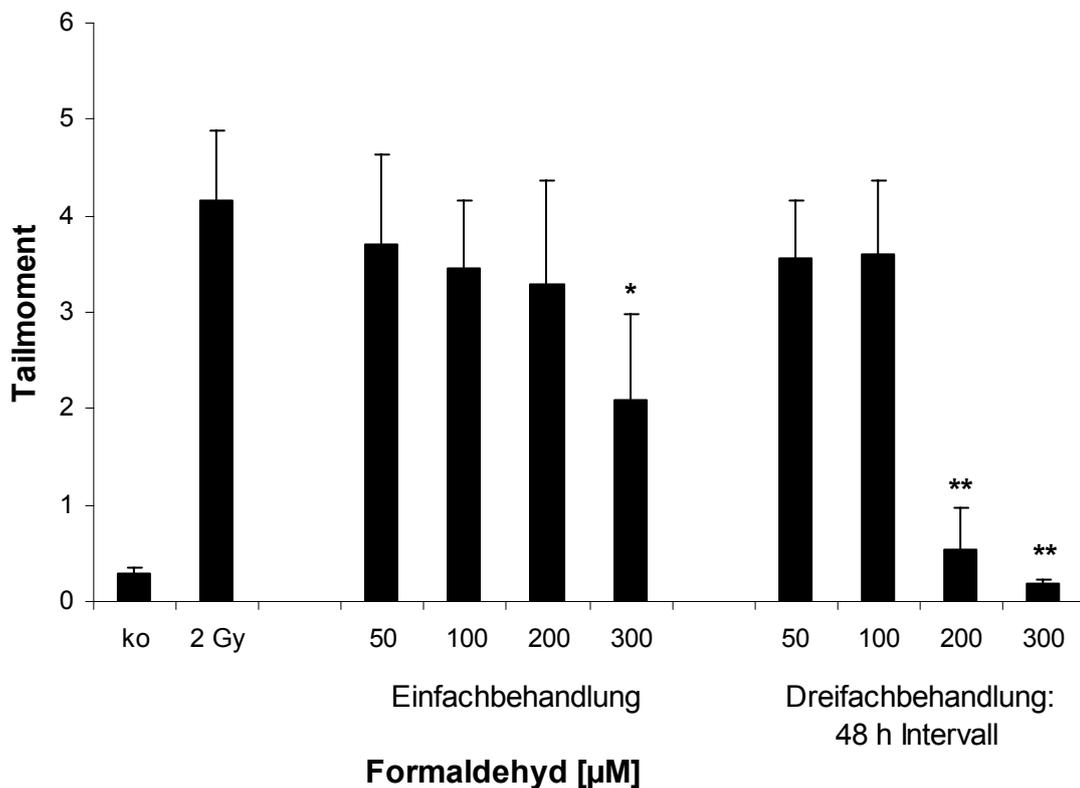


Abbildung 26: Die Induktion von DNA-Protein-Crosslinks in A549 Zellen durch Formaldehyd nach Einfachbehandlung und Dreifachbehandlung im Abstand von 48 Stunden gemessen mit dem Comet Assay. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (*: p < 0,05; **: p < 0,01; ko: Kontrolle; Gy: Gray; h: Stunden).

Die Dreifachbehandlung mit FA im Abstand von 48 Stunden (Abbildung 26) zeigte ein vergleichbares Bild wie die Dreifachbehandlung mit FA im Abstand von 24 Stunden (Abbildung 25): Im Vergleich zur Einfachbehandlung, die in diesem Experiment erst ab 300 μM FA eine statistisch signifikante Reduktion des DNA-Migration zeigte, war durch eine Dreifachbehandlung mit FA bereits ab 200 μM ein ausgeprägter Effekt zu erkennen. Es konnte in A549 also auch nicht durch Erhöhung des Zeitintervalls auf 48 Stunden der in V79 Zellen beobachtete adaptive Effekt (Abbildung 22) reproduziert werden.

Es wurde, angelehnt an das Experiment mit V79 Zellen (Abbildung 24), auch untersucht, ob zwei FA-Vorbehandlungen von 50 μM im Abstand von 24 Stunden einen Einfluss auf die DPX-Induktion einer finalen FA-Behandlung mit 25 bis 200 μM FA besitzen. Zum Vergleich wurden parallel angesetzte Kulturen ausschließlich der finalen FA-Behandlung unterzogen. Wie in Abbildung 27 zu sehen, hatte die FA-Vorbehandlung keinen Einfluss auf die durch die finale FA-Behandlung induzierten DPX im Comet Assay, da sowohl die vorbehandelten als auch die nicht vorbehandelten A549 Kulturen eine ähnliche Hemmung der strahlungsinduzierten DNA-Migration zeigten. Diese war ab einer FA-Konzentration von 100 μM statistisch signifikant. Dieses Ergebnis zeigt, dass der verstärkende Effekt auf die DNA-Migrationshemmung, der bei Vorbehandlung mit hohen FA-Konzentrationen gemessen wurde, bei einer niedrigeren Konzentration nicht auftritt.

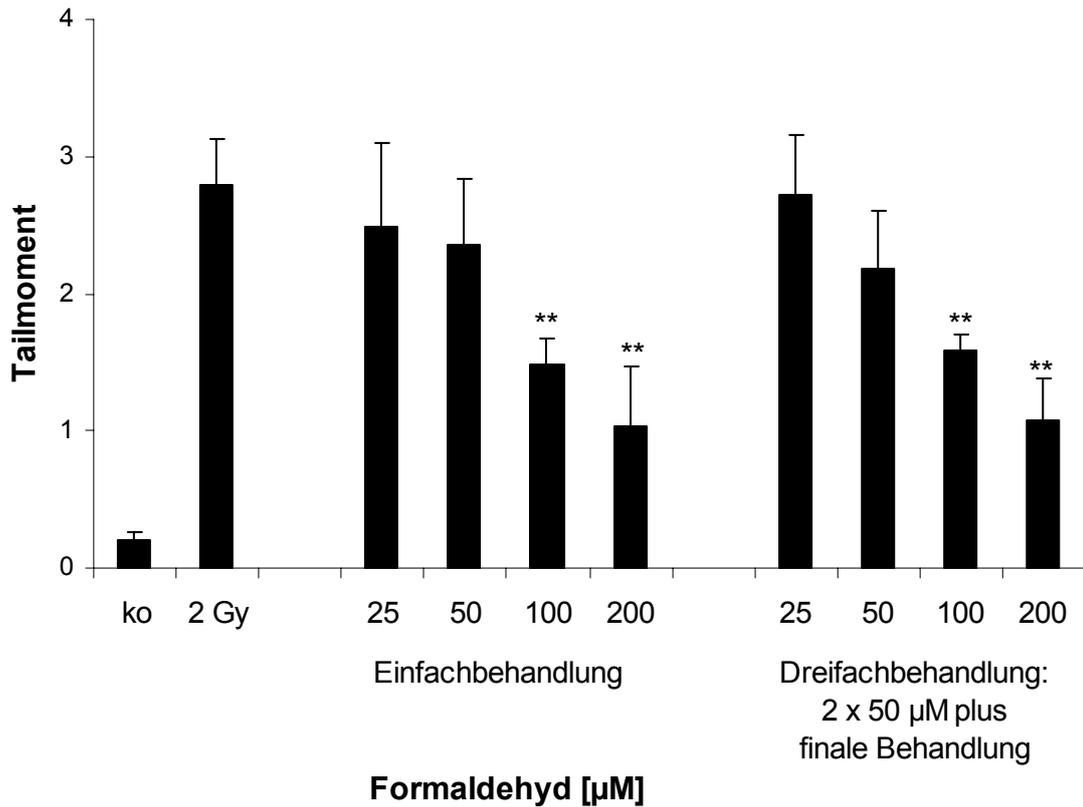


Abbildung 27: Die Induktion von DNA-Protein-Crosslinks durch Formaldehyd (FA) in A549 Zellen nach einer zweimaligen Vorbehandlung mit 50 µM FA und einer finalen Behandlung mit 25, 50, 100 und 200 µM FA jeweils im Abstand von 24 Stunden. Zum Vergleich wurden parallel dazu A549 ohne Vorbehandlung mit den gleichen FA-Konzentrationen exponiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (**: $p < 0,01$; ko: Kontrolle; Gy: Gray).

3.4.3 Die Persistenz von DPX in A549 Zellen in der Gegenwart von FA

Da FA eine hoch reaktive Substanz ist, wird allgemein davon ausgegangen, dass seine Halbwertszeit in biologischen Systemen sehr kurz ist. Um einen Hinweis auf die Stabilität von FA im Zellkulturmedium zu erhalten, wurden DPX mit dem Comet Assay 1, 4, 8 und 24 Stunden nach einmaliger FA-Zugabe ins Zellkulturmedium gemessen. Wie in Abbildung 28 dargestellt, waren die DPX nicht nach 8 Stunden eliminiert, wie im vergleichbaren Experiment mit Medienwechsel nach einer Stunde (Abbildung 19). Die DPX waren unter diesen Bedingungen selbst 24 Stunden nach FA-Zugabe noch nachweisbar.

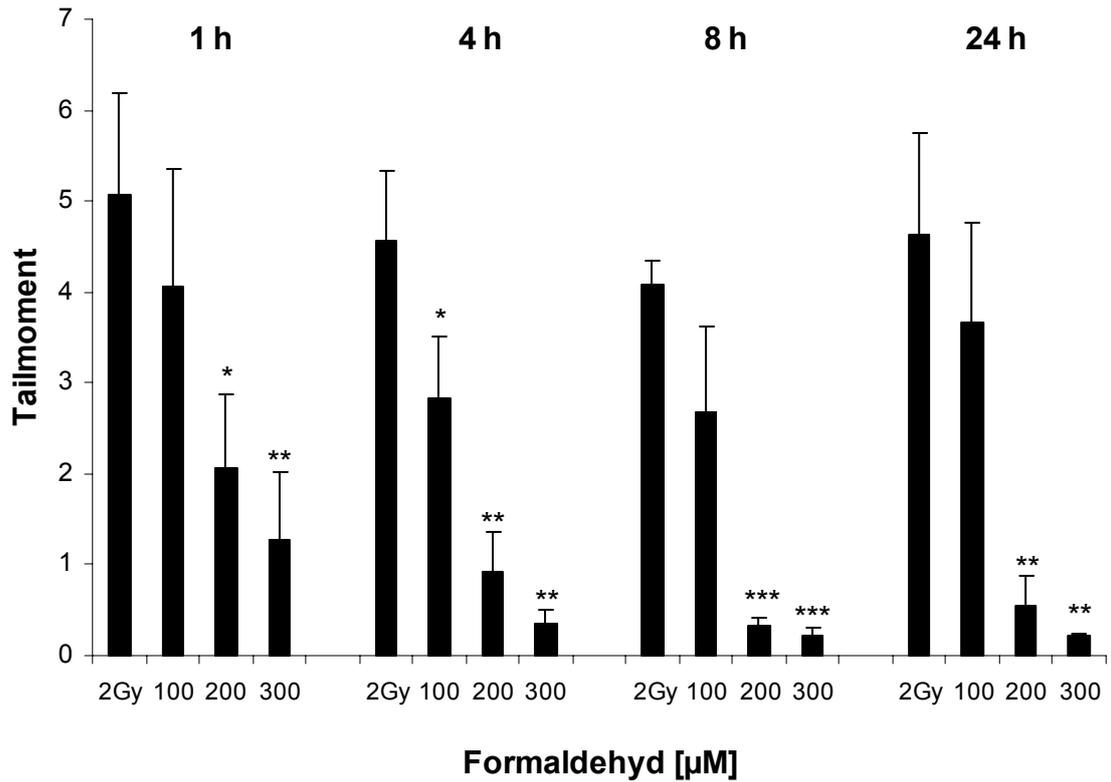


Abbildung 28: Formaldehyd (FA)-induzierte DNA-Protein-Crosslinks gemessen in A549 Zellen mit dem Comet Assay 1, 4, 8 und 24 Stunden nach FA-Zugabe ins Zellkulturmedium. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; Gy: Gray; h: Stunden).

3.4.4 Die Expression der Enzyme FDH, ALDH1A1 und ALDH2 in A549 Zellen nach FA-Zugabe

Im menschlichen Organismus kann FA über mehrere Stoffwechselwege bzw. von verschiedenen Enzymen abgebaut werden. Als wichtigste Enzyme gelten:

1. Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH)
2. Aldehyd-Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1)
3. Aldehyd-Dehydrogenase 2 (ALDH2)

Es sollte im *in vitro* Modell an der menschlichen Lungenzelllinie A549 untersucht werden, wie FA die Expression dieser Enzyme beeinflusst. Es wurde die Expression der FA-abbauenden Enzyme FDH, ALDH1A1 und ALDH2 in A549 Zellen 1, 4 und 24 Stunden nach einmaliger Zugabe von FA in das Zellkulturmedium mit der Realtime-PCR gemessen. Verwendet wurde das LightCycler System der Firma Roche zusammen mit dem QuantiTect Primer Assay Kit (das ein Primerpaar enthält) in Kombination mit dem QuantiTect SYBR Green Kit, beides Produkte der Firma Qiagen.

Die Expression wurde in diesen Versuchen relativ zum Haushaltsgen Hydroxymethylbilan Synthase (HMBS), früher bekannt als Porphobilinogen Deaminase (PBGD), bestimmt. Eine relative Expression der FDH von 3 bedeutet also, dass die FDH-Transkriptmenge dreimal so hoch war, wie die der HMBS. Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen sind derart dargestellt, dass der Kontrollwert auf 100% gesetzt wurde und die Werte der FA-behandelten Proben relativ zum Kontrollwert. Angenommen die (relative) FDH-Transkriptmenge steigt um das doppelte relativ zur Kontrolle nach einer FA-Behandlung mit 50 μ M an, würde sie einen Wert von 200% annehmen.

Neben der HMBS wurde auch noch das Haushaltsgen Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1) untersucht. Ihre Expressionswerte sind, wie die Daten der FDH, ALDH1A1 und ALDH2 auch, relativ zur HMBS angegeben.

Die Experimente wurden dreimal unabhängig durchgeführt, die erhaltene cDNA jeweils zweimal mit dem LightCycler vermessen und als Ergebnis der Mittelwert der Messungen genommen.

Die Ergebnisse der Expressionsuntersuchungen der drei FA-abbauenden Enzyme und des Haushaltsgens HPRT1 in A549 Zellen nach einmaliger FA-Behandlung sind in Abbildung 29 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass sich die Expression aller drei FA-abbauenden Enzyme und der HPRT1 1, 4 und 24 Stunden nach den FA-Behandlungen mit verschiedenen Konzentrationen nur in sehr geringem Maße änderte. Die ausgeprägteste Verminderung der Transkriptmenge war bei der ALDH1A1 24 Stunden nach einer FA-Behandlung mit 200 μ M zu erkennen. Die ALDH1A1-Transkriptmenge fiel dabei auf 66% des Kontrollwerts. Die größte Erhöhung war die Expression der ALDH2 24 Stunden nach der Behandlung mit 300 μ M FA. Hier stieg die ALDH2-Transkriptmenge auf 145% des Kontrollwerts. Diese beiden Werte liegen aber immer noch außerhalb der Auflösungsgrenze des LightCycler Systems, so dass also der Versuch insgesamt keine signifikante Änderung der Transkription der untersuchten Gene unter den gewählten Versuchsbedingungen gezeigt hat.

Ergebnisse

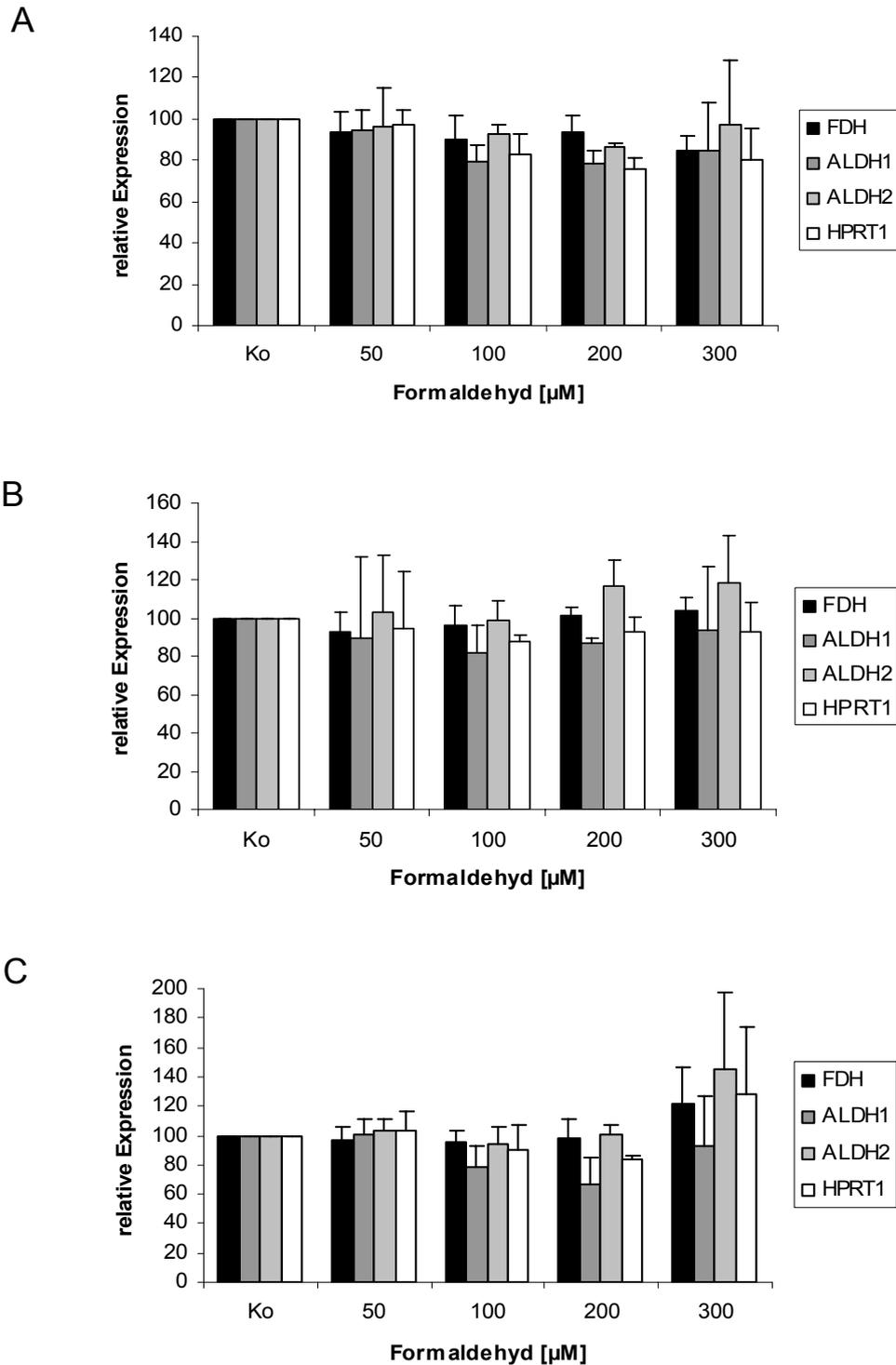


Abbildung 29: Die Expression der Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH), der Aldehyd-Dehydrogenase 1A1 (ALDH1A1), der Aldehyd-Dehydrogenase 2 (ALDH2) und Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT1) in A549 Zellen relativ zum Haushaltsgen Hydroxymethylbilan-Synthase (HMBS) 1 Stunde (A), 4 Stunden (B) und 24 Stunden (C) nach Formaldehyd-Zugabe in das Zellkulturmedium. Dargestellt ist der relative Mittelwert (Kontrollwert = 100%) \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten (ko: Kontrolle).

3.5 Genotoxizität von FA in kultiviertem humanem Blut

In verschiedenen Biomonitoring-Studien wurde gezeigt, dass Personen, die FA-exponiert waren, eine erhöhte Rate an DPX, SCE, Chromosomenaberrationen und Mikronuclei besitzen. Damit diese Genotoxizitätstests in kultiviertem Blut eine Induktion des jeweiligen Parameters zeigen, muss das Blut bzw. die Blutzellen zum Entnahmezeitpunkt entweder eine erhöhte Anzahl an DPX, oder eine erhöhte FA-Konzentration aufweisen. Es wurde deshalb untersucht, welche Bedingungen und Konzentrationen nötig sind, um in verschiedenen Genotoxizitätstests eine Induktion durch FA in humanem Blut zu erzeugen. Dazu wurden Blutproben *ex vivo* gegenüber FA exponiert und dann unter Standardbedingungen für die verschiedenen Genotoxizitätstests kultiviert.

3.5.1 Induktion und Reparatur von DPX durch FA in humanem Blut

Mit Hilfe des Comet Assays wurde die Induktion von DPX in kultiviertem humanem Blut untersucht. Dazu wurden Blutkulturen angesetzt und für eine Stunde verschiedenen FA-Konzentrationen ausgesetzt. Wie in Abbildung 30 zu sehen, reduzierte FA konzentrationsabhängig die durch 2 Gy Gammastrahlung induzierte DNA-Migration. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde ab einer FA-Konzentration von 25 μM gefunden.

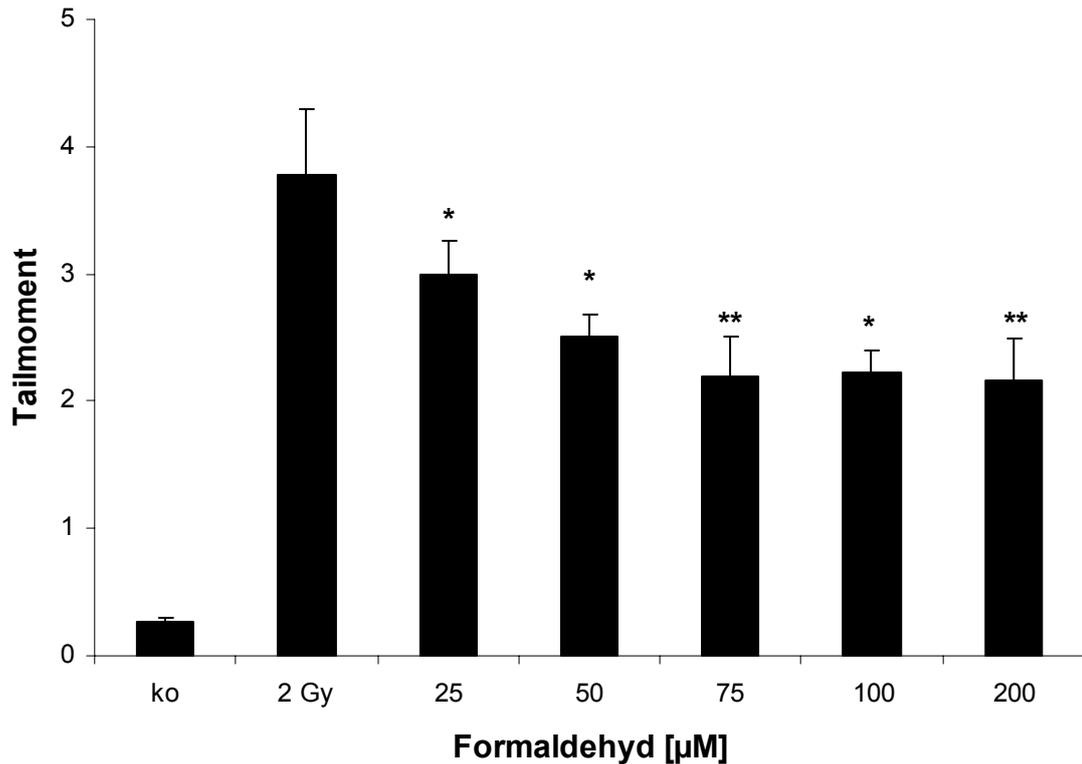


Abbildung 30: Die Induktion von DNA-Protein-Crosslinks durch Formaldehyd (FA) in kultiviertem humanem Blut. Dargestellt ist die Reduktion von Gammastrahlungs-induzierter DNA-Migration durch steigende FA-Konzentrationen. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten mit Blut von verschiedenen Spendern (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ko: Kontrolle; Gy: Gray).

Die FA-induzierten DPX wurden in der Blutkultur zeitabhängig repariert. Durch eine einstündige Behandlung der Zellen zu Beginn der Kultur wurden DPX, die durch 100 μM FA induziert wurden, innerhalb von 8 Stunden repariert, wohingegen DPX, welche durch höhere FA-Konzentrationen induziert wurden (200 und 300 μM), selbst nach 24 Stunden noch einen schwachen Effekt im Comet Assay zeigten (Abbildung 31).

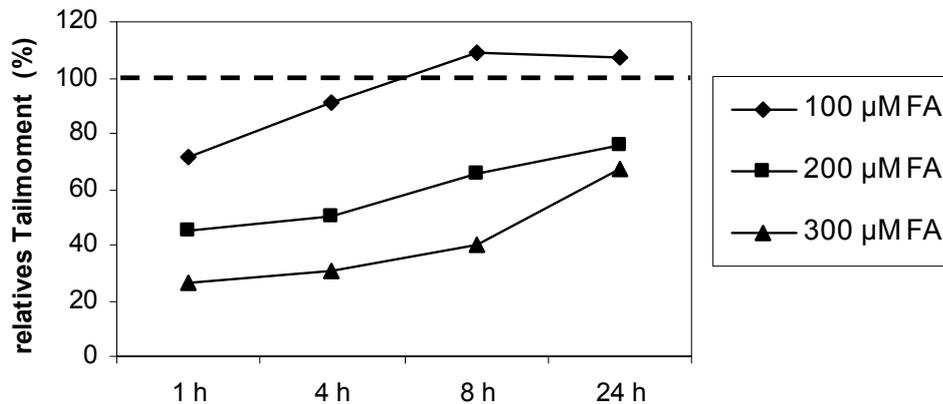


Abbildung 31: Zeitabhängige Entfernung von Formaldehyd-induzierten DNA-Protein-Crosslinks in kultiviertem humanem Blut. Dargestellt ist die Aufhebung der Hemmung der DNA-Migration als relatives Tailmoment, wobei 100% dem Tailmoment der 2 Gy-induzierten DNA-Migration entspricht. Es sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit Blut von verschiedenen Spendern angegeben.

3.5.2 Untersuchung zum Eintritt von PHA-stimulierten Lymphozyten in die S-Phase mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurden fünf Blutkulturen (von verschiedenen Blutspendern) daraufhin untersucht, nach welcher Zeit die stimulierten Lymphozyten in die S-Phase eintraten. Wie in Abbildung 32 zu sehen, erreichten die ersten Zellen etwa 24 Stunden nach PHA-Stimulation die S-Phase, die Anzahl an Zellen in der S-Phase stieg danach kontinuierlich an.

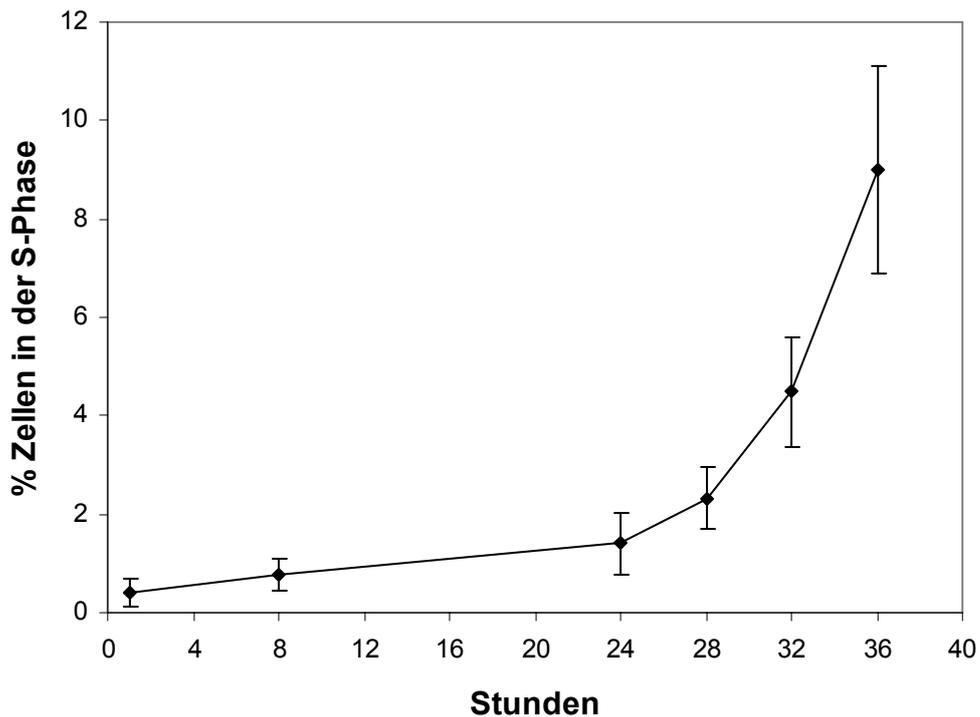


Abbildung 32: Bestimmung der Zeitdauer von der Phytohaemagglutinin (PHA)-Stimulation bis zum Eintritt in die S-Phase von kultiviertem humanem Blut mittels Durchflusszytometrie. Angegeben ist der Prozentsatz an Lymphozyten in der S-Phase und der Messzeitpunkt nach PHA-Stimulation in Stunden. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus fünf unabhängigen Experimenten mit Blut von verschiedenen Spendern.

3.5.3 Induktion von SCE durch FA in kultiviertem humanem Blut

Im SCE-Test zeigte die Blutkultur eine Induktion der SCE-Rate ab einer Konzentration von 200 μ M FA (Abbildung 33 A). Der Proliferationsindex war bereits ab einer FA-Konzentration von 100 μ M vermindert (Abbildung 33 B), statistisch signifikant dann ab 200 μ M, was einen starken Hinweis für Zytotoxizität darstellt. Von diesen Experimenten kann also geschlossen werden, dass die Induktion von SCE mit dem Auftreten von Zytotoxizität einhergeht. Die FA-Behandlung erfolgte auch hier zu Beginn der Blutkultur.

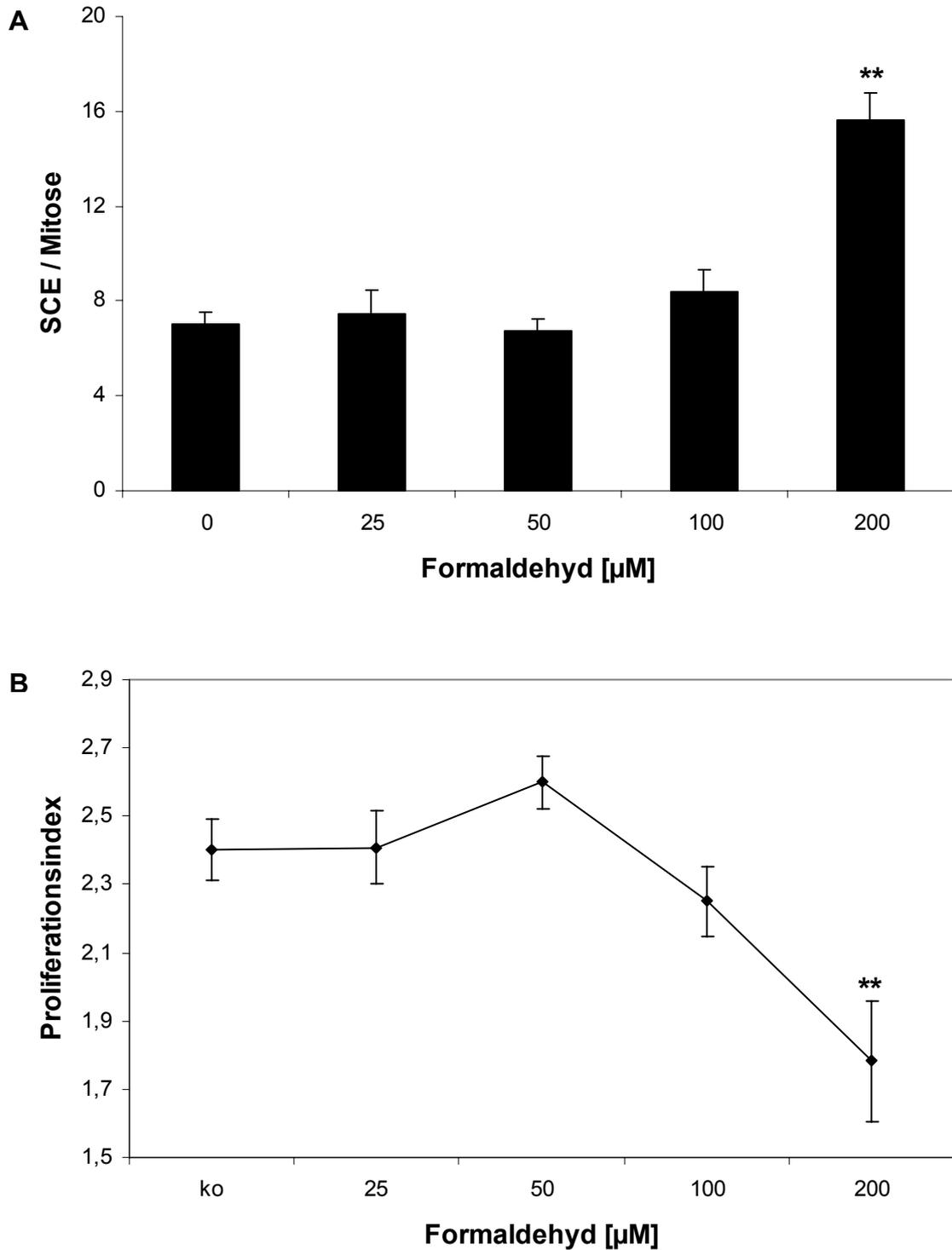


Abbildung 33: Die Induktion von Schwesterchromatidaustauschen (SCE) (A) und die Reduktion des Proliferationsindex (B) durch Formaldehyd (FA) in kultiviertem humanem Blut. FA wurde zu Beginn der Blutkultur zugegeben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten mit Blut von verschiedenen Spendern (** $p < 0,01$; ko: Kontrolle).

3.5.4 Induktion von MN durch FA in kultiviertem humanem Blut

Die Abbildung 34 fasst die Ergebnisse der Mikronukleus-Tests (MNT) zusammen. Der MNT wurde an kultiviertem Blut nach drei verschiedenen Protokollen durchgeführt, die sich durch den Zeitpunkt der FA-Behandlung unterschieden. Nach Protokoll I wurde FA zunächst, wie bei den anderen Genotoxizitätstests auch, beim Start der Blutkultur zugegeben. Hierbei konnten Konzentrationen bis 250 μM getestet werden, eine Erhöhung der Mikronukleus (MN) – Frequenz war allerdings nicht feststellbar (Abbildung 34 A). Höhere Konzentrationen waren aufgrund sehr starker Zytotoxizität, die durch Bestimmung des NDI (nuclear division index) ermittelt wurde, nicht auszuwerten (Abbildung 34 B).

Um genauer zu untersuchen, unter welchen Bedingungen es zur Induktion von MN in der Blutkultur kommt, wurden Experimente mit zwei weiteren Expositionsprotokollen durchgeführt. Nach Protokoll II wurde FA 24 Stunden nach dem Start der Blutkultur bzw. PHA-Stimulation, und nach Protokoll III 44 Stunden danach zugegeben. Diese Zeitpunkte richten sich nach den Empfehlungen der OECD Draft Guideline 487 für den MNT.

Gab man FA erst 24 Stunden nach Start der Blutkultur zu, also kurz bevor die Blutzellen die S-Phase erreichen, konnten Konzentrationen bis 400 μM getestet werden. Aber selbst bei dieser stark zytotoxischen Dosis wurde keine statistisch signifikante Erhöhung der MN-Rate gefunden (Abbildung 34 C und D).

Eine konzentrationsabhängige Zunahme der MN-Rate war hingegen bei den Experimenten, die nach Protokoll III durchgeführt wurden, zu beobachten. Ab einer Konzentration von 300 μM FA war die MN-Rate dabei statistisch signifikant erhöht (Abbildung 34 E). Diese Erhöhung trat im gleichen Konzentrationsbereich auf wie die Zytotoxizität, die am verminderten NDI zu erkennen ist (Abbildung 34 F).

Ergebnisse

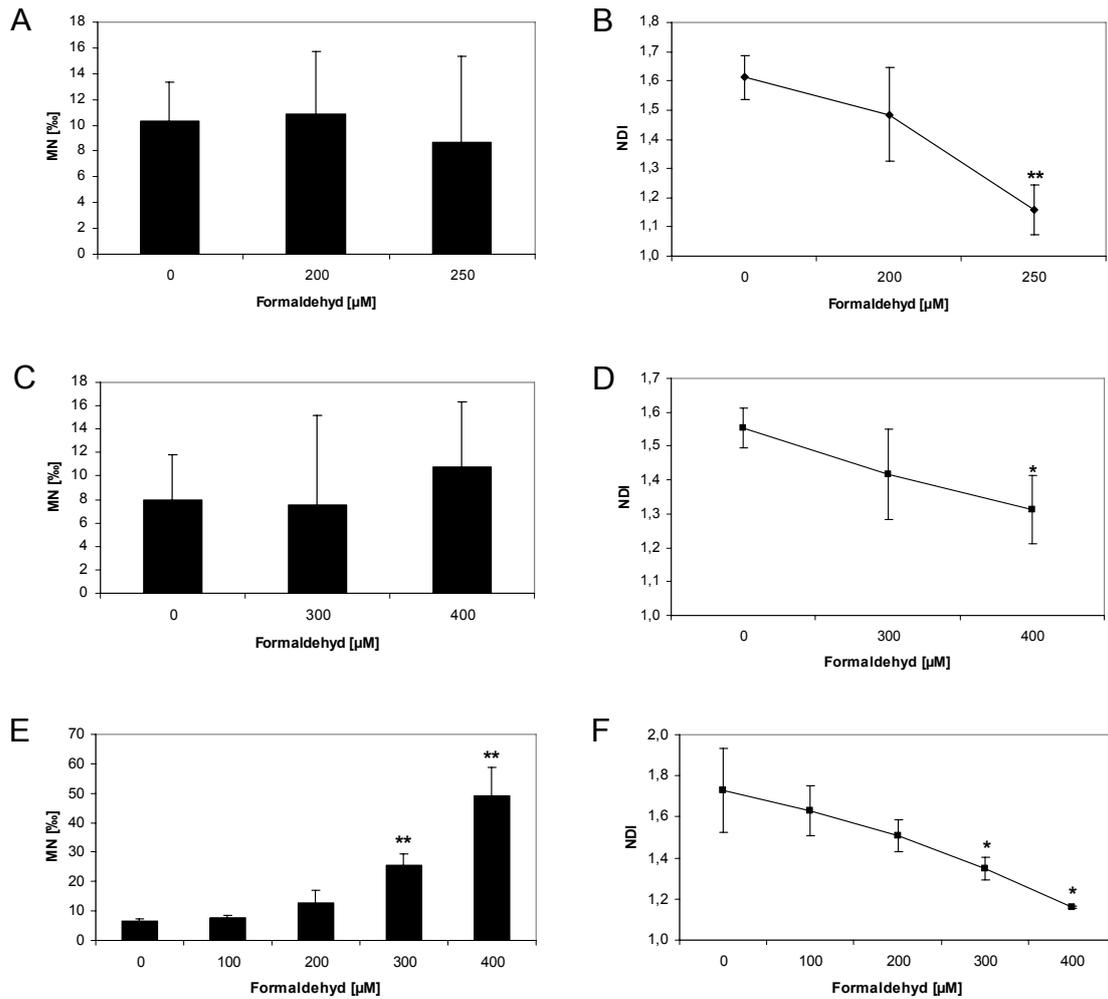


Abbildung 34: Die Induktion von Mikronuklei (MN) durch Formaldehyd in kultiviertem humanem Blut. Dargestellt ist die MN-Rate in ‰ (A, C, E) und der Kernteilungsindex (NDI / nuclear division index) (B, D, F). Der Mikronukleus-Test (MNT) nach Protokoll I ist in A / B, der nach Protokoll II in C / D und der MNT nach Protokoll III in E / F dargestellt. Gezeigt ist der Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten mit Blut von verschiedenen Spendern (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$).

Bei allen Versuchen unter allen drei Protokoll-Varianten wirkte FA in den höchsten getesteten Konzentrationen stark zytotoxisch. Daher konnten hier nicht immer die im Methodenteil erwähnten 1000 Zellen pro Blutkultur (d.h. 6000 pro Konzentration) ausgewertet werden. Tabelle 4 gibt die tatsächliche Anzahl an ausgewerteten Zellen wieder.

Tabelle 4: Übersicht über die Protokollvarianten der Mikronukleus-Tests mit Angaben des Formaldehyd-Zugabezeitpunktes nach Blutkulturstart und die Anzahl der ausgewerteten Zellen pro Versuch und Kultur (Kultur 1 / Kultur 2) bei der jeweiligen ausgewerteten Formaldehyd (FA)-Höchstkonzentration (Wert in Klammern).

	FA-Zugabe	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Summe
Protokoll I (250 µM)	0 h	1000 / 1000	1000 / 1000	419 / 930	5139
Protokoll II (400 µM)	24 h	1000 / 1000	489 / 563	380 / 380	3812
Protokoll III (400 µM)	44 h	590 / 648	963 / 516	765 / 1000	4482

3.5.5 Charakterisierung von FA-induzierten MN mit FISH

Um zwischen einem klastogenen und aneugenem Effekt der MN-Entstehung durch FA unterscheiden zu können, wurden zunächst MNT-Präparate nach Protokoll III und einer Konzentration von 350 µM FA hergestellt. Die Präparate wurden dann mit Hilfe der FISH-Technik, welche eine Zentromersonde verwendet, analysiert. Enthielt ein Mikronukleus ein ganzes Chromosom, dann war im Fluoreszenzmikroskop ein grünes FITC-Fluoreszenzsignal zu erkennen. Abbildung 35 zeigt exemplarisch durch diese Technik erhaltene Ergebnisse. 81% der untersuchten Mikronuklei (119 von 147) in Kulturen mit FA-Exposition waren Zentromer-negativ, 19% Zentromer-positiv. Bei den unbehandelten Blutkulturen (Negativkontrolle) waren 55% (36 von 65) Zentromer-negativ und in Kulturen, die mit 2 Gy Gammastrahlung bestrahlt wurden (Positivkontrolle), waren 92% Zentromer-negativ. Da die Mehrzahl der Mikronuklei, welche durch FA erzeugt wurden, Zentromer-negativ war, ist ein klastogener Mechanismus der Mikronukleus-Entstehung wahrscheinlich.

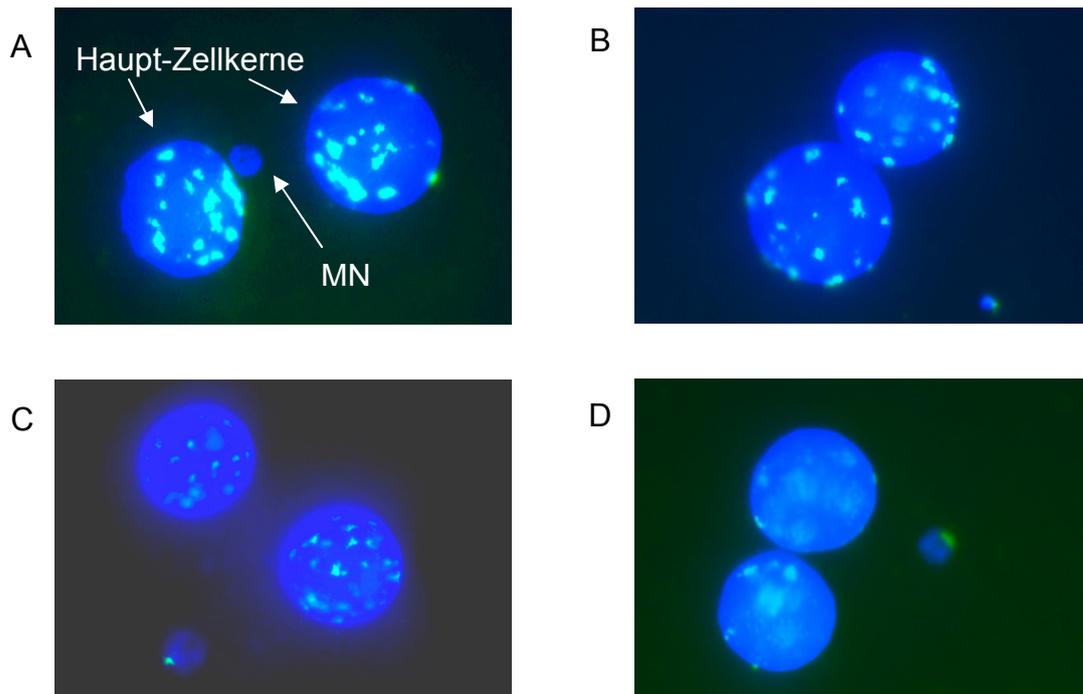


Abbildung 35: Untersuchung von FA-induzierten Mikronuklei (MN) mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) unter Verwendung einer Zentromersonde. (A) MN ohne Zentromersignal, (B-C) MN mit Zentromersignal (grün).

3.6 Lokale Genotoxizität von FA *in vivo* in humanen Mundschleimhautzellen gemessen mit dem MNT

Lokale genotoxische Effekte von FA sind in Tierstudien schon mehrfach gezeigt worden. Auch am Menschen wurden schon etliche Studien im Bereich des Biomonitoring zur lokalen Genotoxizität von FA durchgeführt, die meisten dieser Studien sind aber schwierig zu interpretieren, da sie potenzielle Unzulänglichkeit aufweisen, vor allem was die Methodik, die Angaben zum Studiendesign, die Bestimmung der tatsächlichen Exposition, geeignete Kontrollgruppe und Probleme mit Störfaktoren (z.B. Koexposition mit anderen Substanzen) angeht. Darum erschien es sinnvoll, eine FA Inhalationsstudie am Menschen unter streng geregelten und kontrollierten Bedingungen durchzuführen, die sich an den Richtlinien der guten Laborpraxis orientiert. Die Studie wurde in Zusammenarbeit mit der Arbeitsmedizin der Universität Heidelberg unter Leitung von Prof. Dr. Gerhard Triebig gefertigt.

Das Probandenkollektiv ist in Tabelle 1 wiedergegeben. Ein Proband wurde nicht in die Ergebnisse miteinbezogen, da er wegen Grippe-ähnlicher Symptome die Teilnahme abbrechen musste. Alle Probanden waren entweder Nichtraucher oder Exraucher, die vor mindestens drei Jahren das Rauchen aufgegeben haben. Weitere Informationen zum Probandenkollektiv siehe Kapitel 2.2.14.1.

Tabelle 5: Das Probandenkollektiv mit Angabe des Geschlechts, des Alters und der Rauchgewohnheiten (m: männlich; w: weiblich).

Proband	Geschlecht	Alter (Jahre)	Raucherstatus
FA01	w	21	vor 4 Jahren aufgehört
FA02	m	25	Nichtraucher
FA03	w	22	Nichtraucher
FA04	m	39	Nichtraucher
FA05	m	19	Nichtraucher
FA06	m	21	vor 3 Jahren aufgehört
FA07	m	30	Nichtraucher
FA08	m	36	Nichtraucher
FA09	m	23	Nichtraucher
FA10	w	22	Nichtraucher
FA12	w	31	Nichtraucher
FA13	w	27	Nichtraucher
FA14	m	21	vor 3 Jahren aufgehört
FA15	w	20	Nichtraucher
FA16	m	27	vor 4 Jahren aufgehört
FA17	w	29	vor 3 Jahren aufgehört
FA18	w	33	Nichtraucher
FA19	m	26	Nichtraucher
FA20	w	25	vor 3 Jahren aufgehört
FA21	m	32	Nichtraucher
FA22	w	23	vor 5 Jahren aufgehört

Die Exposition der Probanden mit FA erfolgte an 10 aufeinanderfolgenden Arbeitstagen für 4 Stunden in einer speziellen Expositionskammer in Heidelberg, welche die Probanden in Gruppen von je 3-6 Personen betraten. Die FA-Exposition variierte zufällig jeden Tag von konstanten 0,15 ppm bis zu 0,5 ppm mit vier Spitzenwerten von 1,0 ppm für 15 min. Die kumulative FA-Exposition betrug 13,5 ppm h über 10 Arbeitstage. Außerdem wurde an vier Tagen FA durch Ko-Exposition mit Ethylacetat (EA) maskiert. Die Probanden mussten außerdem pro Expositionstag dreimal für 15 min auf einem Ergometer körperliche Arbeit von 80 Watt erbringen. Detaillierte Informationen zum Ablauf der Exposition sind der Tabelle 6 zu entnehmen.

Ergebnisse

Tabelle 6: Zeitschema der Formaldehyd-Exposition der fünf Probandengruppen mit Angaben über die Formaldehyd-Luftkonzentration in ppm (a: Koexposition mit Ethylacetat [EA]; c: vier Expositionsspitzen mit 1,0 ppm für jeweils 15 Minuten; c: Vier Expositionsspitzen mit 0,6 ppm für jeweils 15 Minuten; ppm: Teile pro Millionen).

	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4	Gruppe 5
Tag 1	0,5	0,15	0	0,3	0,15
Tag 2	0,3	0	0,3 + 4 x 0,6	0 + EA	0,3 + EA
Tag 3	0,15	0,3 + 4 x 0,6	0,3	0,15	0,3 + 4 x 0,6
Tag 4	0,3 + EA ^a	0,5	0,5 + 4 x 1,0	0,5 + 4 x 1,0	0 + EA
Tag 5	0,5 + 4 x 1,0 ^b + EA	0 + EA	0,5	0,5 + EA	0,3
Tag 6	0	0,5 + 4 x 1,0 + EA	0,3 + EA	0,5 + 4 x 1,0 + EA	0
Tag 7	0,5 + EA	0,3	0,5 + 4 x 1,0	0,5	0,5 + EA
Tag 8	0 + EA	0,5 + 4 x 1,0	0 + EA	0,3 + 4 x 0,6	0,5 + 4 x 1,0 + EA
Tag 9	0,5 + 4 x 1,0	0,5 + EA	0,5 + EA	0	0,5 + 4 x 1,0
Tag 10	0,3 + 4 x 0,6 ^c	0,3 + EA	0,15	0,3 + EA	0,5

Die Mundschleimhautzellen wurden mit Hilfe eines Metallspatels aus beiden Wangentaschen gewonnen und MNT-Präparate hergestellt. Die Probennahmen waren eine Woche vor Studienstart (Kontrolle 1), bei Start der Studie direkt vor der ersten Exposition (Kontrolle 2), nach der letzten Exposition (Tag 0) und außerdem 7, 14 und 21 Tage später. Nach dem Ende der Studie wurden die Präparate kodiert nach Ulm gesendet und dort ausgewertet (1000 Mikronuklei pro Wangentaschenseite, also 2000 pro Proband und Messzeitpunkt).

Die Ergebnisse des MNT sind in Tabelle 7 dargestellt. Von einigen Probanden konnten aufgrund technischer Probleme keine Präparate hergestellt bzw. ausgewertet werden. So wurden pro Messzeitpunkt zwischen 16 und 21 Probanden ausgewertet. In zwei Fällen (FA21, Tag 0 und FA07, Tag 0) wurden alle Zellen von Präparaten ausgewertet, die von nur einer Wangenseite stammten, da die anderen Präparate qualitativ zu schlecht waren. In einem Fall (FA16, Tag 14) konnten nur 1795 Zellen ausgewertet werden. Die Durchschnittswerte der MN-Raten sind in Abbildung 36 dargestellt. Die beiden Kontrollwerte und die Durchschnittswerte von den Tagen 7 und 14 sind sich sehr ähnlich und liegen zwischen 0,85 und 0,95 MN pro 1000 Zellen. Die durchschnittliche MN-Rate von Tag 0 (Ende der Expositionsperiode) war leicht, aber nicht statistisch signifikant, erhöht (1,33 MN / 1000 Zellen). Die durchschnittliche MN-Rate an Tag 21 dagegen war sichtbar erniedrigt im Vergleich zu den Kontrollen (0,44 MN / 1000 Zellen) und zwar statistisch signifikant im Vergleich zur Kontrolle 1 ($p = 0,022$).

Ergebnisse

Tabelle 7: Die MN-Rate (MN / 1000 Zellen) in Mundschleimhautzellen von Formaldehyd-exponierten Probanden (n.d.: nicht bestimmt; n: Anzahl ausgewerteter Probanden; SD: Standardabweichung; SE: Standardfehler; p: p-Wert des Wilcoxon Rangsummentests).

Proband / Gruppe	Kontrolle 1	Kontrolle 2	Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 21
FA01 / 1	1,5	0	0	0,5	0,5	0,5
FA02 / 1	0	0	0	n.d.	n.d.	n.d.
FA03 / 1	1,5	0,5	0,5	n.d.	n.d.	n.d.
FA04 / 1	0,5	1	0,5	n.d.	0	1
FA05 / 2	1,5	1	1	0,5	1	0
FA06 / 2	1,5	0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
FA07 / 2	1,5	0	1	0,5	0	1
FA08 / 2	1	1	0,5	2	1,5	1
FA09 / 2	0	1,5	0,5	1	1	0,5
FA10 / 2	1	1	2	0,5	0	0
FA12 / 3	2,5	2	2	0	3,5	0
FA14 / 3	1	0	1	1	0,5	1
FA15 / 3	2	1	n.d.	n.d.	0,5	0
FA13 / 4	1	0,5	n.d.	0,5	0,5	0
FA16 / 4	1	0,5	2	1	1,5	0
FA18 / 4	0,5	1	2	2	n.d.	0,5
FA19 / 4	0,5	1	1,5	0	0,5	0,5
FA17 / 5	0,5	0,5	0	2,5	0	0,5
FA20 / 5	0	0	0	0,5	1	0,5
FA21 / 5	0,5	2,5	5	1	1,5	0,5
FA22 / 5	0,5	3	4,5	1,5	1	0,5
n	21	21	18	16	17	18
Mittelwert	0,95	0,86	1,33	0,94	0,85	0,44
SD	0,67	0,84	1,45	0,73	0,86	0,38
SE	0,15	0,18	0,34	0,18	0,21	0,09
p (Kontrolle 1)			0,341	0,799	0,654	0,022
p (Kontrolle 2)			0,052	0,954	0,631	0,05

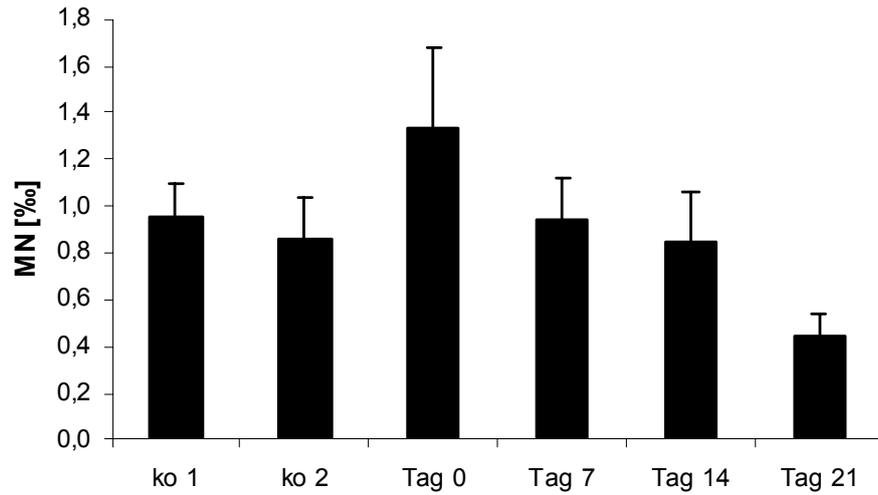


Abbildung 36: Die Durchschnittswerte (\pm Standardabweichung) der Mikronukleus (MN)-Rate (‰) von Mundschleimhautzellen von Probanden vor und nach der Exposition mit FA an 10 aufeinanderfolgenden Arbeitstagen. (ko1: eine Woche vor Exposition; ko2: direkt vor der ersten Exposition; Tag 0: direkt nach der letzten Exposition; Tag 7: eine Woche nach der letzten Exposition; Tag 14: zwei Wochen nach der letzten Exposition; Tag 21: drei Wochen nach der letzten Exposition)

4 Diskussion

4.1 Das genotoxische Potential von FA *in vitro*

Das genotoxische Potential von FA in kultivierten Säugerzellen wurde bereits in zahlreichen Studien belegt und von verschiedenen Expertengruppen begutachtet (IARC 2006; BfR 2006). Es scheint unumstritten, dass FA in proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen DPX induziert. Persistierende DPX führen zu anderen genotoxischen Effekten in proliferierenden Zellen wie SCE und ebenfalls zu Gen- und Chromosomenmutationen. Publierte Daten legen nahe, dass chromosomale Effekte (Chromosomenaberrationen und MN) bevorzugt induziert werden, wohingegen echte Genmutationen eine untergeordnete Rolle spielen (Merk und Speit, 1998; Merk und Speit, 2002). Trotz der großen Menge an publizierten Daten über die Genotoxizität von FA gibt es immer noch offene Fragen, was das Gefahrenpotential und die Risikoeinschätzung von FA angeht. Durch die Verwendung dreier sensitiver und relevanter Genotoxizitätstests, nämlich des Comet Assay, des SCE-Tests und des MNT, wurden hier zwei wichtige Aspekte der FA-Genotoxizität näher untersucht: Der Beitrag von DNA-Strangbrüchen zur Genotoxizität von FA und die Konzentrations-Effekt-Beziehung für die drei genetischen Endpunkte.

4.1.1 Induktion von DNA-Strangbrüchen durch FA

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass FA DNA-Strangbrüche in keinem signifikanten Umfang induziert und das DPX der relevante DNA-Schaden nach FA-Exposition zu sein scheint. Der alkalische Comet Assay ist ein sehr sensitives Werkzeug zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen. Im Falle von FA könnte allerdings ein DNA-strangbrechender Effekt im Comet Assay und die dadurch induzierte DNA-Migration, durch die gleichzeitige Bildung von DPX und die dadurch entstehende Hemmung der Migration, maskiert werden. Proteinase K (PK) löst DPX auf und sollte daher die DNA-Migration aufgrund von DNA-Strangbrüchen ermöglichen (Hu et al., 2006; Merk und Speit, 1999). Die Verwendung dieser Comet Assay Modifikation hob tatsächlich den hemmenden Effekt von FA auf die DNA-Migration auf, die DNA-Migration ging jedoch nicht über

die der Kontrollwerte hinaus. Vor allem konnte ein DNA-strangbrechender Effekt bei niedrigen FA-Konzentrationen nicht bestätigt werden (Liu et al., 2006). Die Gründe, warum andere Autoren eine Induktion von DNA-Strangbrüchen durch FA gefunden haben, sind unklar. Möglicherweise beruht der Effekt auf eine erhöhte Aktivität der DNA-Exzisionsreparatur nach FA-Exposition. Zurzeit gibt es also keine befriedigende Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse, aber die gründlichen Untersuchungen in dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die Induktion von DNA-Strangbrüchen keine wichtige Rolle für die Einschätzung des Gefährdungspotentials von FA spielt.

4.1.2 Konzentrations-Effekt-Beziehung von FA-induzierten genotoxischen Effekten *in vitro*

Bei der konservativen Risikobewertung genotoxischer Substanzen geht man davon aus, dass Mutagene bzw. genotoxische Kanzerogene DNA-Schäden in jeder Konzentration induzieren können (lineare Konzentrations-Effekt-Beziehung) und daher auch potentiell in jeder Konzentration Krebs auslösen können. Eine Ausnahme bilden die Aneugene. Das Vorhandensein eines Schwellenwertmechanismus als Erklärung für ihre nicht-lineare Dosis-Wirkungs-Beziehung gilt als akzeptiert. Die Möglichkeit, dass auch direkt wirkende DNA-reaktive Substanzen einer Konzentrations-Effekt-Beziehung mit einem Schwellenwert folgen, findet durch experimentelle Daten immer mehr Unterstützung (Jenkins et al., 2005). Daher wird in der genetischen Toxikologie zunehmend die Existenz von Schwellenwerten diskutiert, wobei zwischen zwei Arten von Schwellenwerten unterschieden wird: Von einem absoluten Schwellenwert spricht man, wenn bei Exposition unter dessen Konzentrationswert die Zelle das Vorhandensein der Substanz „nicht bemerkt“, da sie nicht mit ihrem zellulären Ziel interagiert. Solch ein Schwellenwert ist, wenn er tatsächlich existiert, nur sehr schwer zu bestimmen. Daher wird in der genetischen Toxikologie mit dem sogenannten pragmatischen Schwellenwerten gearbeitet. Bei einer Exposition unter diesen besitzt die Substanz möglicherweise einen (messbaren) Effekt auf die Zellen, dieser wird aber als biologisch irrelevant betrachtet, z.B. eine leichte Erhöhung eines Effekts, die sich aber noch immer in Bereich der Negativ-Kontrolle bewegt. Ein prag-

matischer Schwellenwert kann nicht vollständig, aber zum Teil, mithilfe von Statistik definiert werden (Lovell, 2000). In der Risikobewertung von genotoxischen Substanzen nach aktuellen Standards kann dann von einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung mit Schwellenwert ausgegangen werden, wenn der Wirkungsmechanismus bekannt ist und einen Schwellenwert nahe legt (Madle et al., 2008). Für FA sind diese Voraussetzungen gegeben, der Wirkungsmechanismus macht einen solchen Schwellenwert wahrscheinlich.

Es existieren viele mathematische Modelle, die zur Beschreibung von Konzentrations-Effekt-Beziehungen und zur Bestimmung von Schwellenwerten geeignet sind (Lovell, 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit, die die Konzentrations-Effekt-Beziehungen FA-induzierter Genotoxizität und Mutagenität beschreiben, lassen einige wichtige Schlussfolgerungen zu. Obwohl es einen klaren Hinweis auf lineare Komponenten der Konzentrations-Effekt-Beziehung gibt und Linearität als erste Annäherung angenommen werden kann, konnte keiner der untersuchten genotoxischen Effekte vollständig durch eine lineare Konzentrations-Effekt-Kurve beschrieben werden. Für SCE und MN ergab das Zweiphasen-Regressionsmodell, in welchem in der ersten Phase kein Effekt (Gerade parallel zur x-Achse) und in der zweiten Phase ein linearer Anstieg des Effekts beschrieben wird, die beste Übereinstimmung mit den Daten. Die Natur des Zweiphasen-Regressionsmodells legt einen Schwellenwert am Übergangspunkt der beiden Geraden nahe. Sowohl beim SCE-Test, also auch beim MNT kann dieser zwischen 25 und 50 μM FA angenommen werden. In Gegensatz hierzu konnte die Induktion von DPX, welche indirekt mit dem Comet Assay gemessen wurde, nicht in Übereinstimmung mit diesem einfach zu interpretierenden Regressionsmodell gebracht werden. Er wäre natürlich möglich, komplexere Funktionen an die Daten anzupassen, diese hätten dann aber keinen theoretischen Hintergrund. Die Schwierigkeit, ein geeignetes Modell für die Interpretation der Konzentrations-Effekt-Beziehung der DPX-Induktion zu finden, liegt höchstwahrscheinlich nicht an der Natur des Effekts, sondern wird eher durch die hohe Versuchsvariabilität des Comet Assay erklärt. Im Gegensatz zum SCE-Test und MNT hängt ein positives Ergebnis im Comet Assay sehr stark von den spezifisch angewendeten Testbedingungen ab und kann von einer Vielzahl von Versuchsvariablen beeinflusst werden (Speit und Hartmann, 2006). Mithilfe der Experimente und mathematischen Berechnungen war

es nicht möglich, einen Schwellenwert für die DPX-Induktion zu bestimmen. Die Daten geben aber einen Hinweis auf einen Schwellenwert zwischen 10 und 100 μM , da im niedrigen Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10 μM kein Effekt zu erkennen war, dann aber ab 100 μM FA eine starke Zunahme der Migrationshemmung auftrat, die auch statistisch signifikant war. Die Existenz eines Schwellenwerts für FA-vermittelte Genotoxizität könnte durch die hohe Reaktivität von FA erklärt werden, oder durch die Möglichkeit, dass geringe Mengen an FA durch Reaktionen mit zellulären Komponenten inaktiviert werden (z.B. Abbau durch Enzyme), bevor sie die DNA im Zellkern erreichen können. Selbst wenn FA den Zellkern erreicht, könnten DNA-Schäden, wenn nur in geringem Maße induziert und wenn die Reparaturmechanismen nicht gestört oder überlastet sind, effektiv entfernt werden. FA-induzierte DPX wurden in einer *in vivo* Studie von Casanova und Kollegen in der Nasenschleimhaut von Ratten gemessen, die 6 Stunden mit verschiedenen FA-Konzentrationen (0,3 bis 10 ppm) exponiert waren (Casanova et al., 1989). Die Charakterisierung der Konzentrations-Effekt-Kurve deutete auf einen nicht-linearen Verlauf der DPX-Induktion hin. Ein Schwellenwert konnte allerdings nicht abgeleitet werden, da DPX bei allen getesteten Konzentrationen gemessen wurden. Die in dieser Arbeit unternommenen Untersuchungen zur Konzentrations-Effekt-Beziehung für verschiedene Endpunkte liefern Hinweise darauf, dass ein Schwellenwert für die genotoxische und mutagene Wirkung von FA existiert. Allerdings sind die Ergebnisse nicht geeignet, einen genauen Schwellenwert für die genotoxische und mutagene Wirkung von FA *in vivo* abzuleiten, da die in dieser Arbeit erhaltenen Werte ganz eindeutig vom verwendeten Versuchsprotokoll abhängen und nicht verallgemeinert werden können.

4.2 Induktion und Reparatur von FA-induzierten DPX in kultivierten menschlichen Zellen

Die Ergebnisse der Experimente zur Induktion und Reparatur von DPX in A549 Zellen und HNEC (Kapitel 3.2.2 und 3.3.2) zeigen deutlich, dass FA konzentrationsabhängig DPX induziert. Die Modifikation des alkalischen Comet Assay zum Nachweis von Crosslinks, nämlich die Messung der Reduktion von induzierter DNA-Migration durch ein DNA-strangbrechendes Agens, scheint gut geeignet zu sein, um indirekt FA-induzierte DPX nachzuweisen. Mehrere Studien haben schon die Induktion von DPX durch FA in Säugerzellen berichtet (Pfuler und Wolf, 1996; Merk und Speit 1998; Speit et al., 2000; Hu et al., 2006). Es scheint keine großen Unterschiede im Hinblick der Sensitivität für die Detektion von FA-induzierten DPX zwischen verschiedenen Zellen zu geben. Es ist jedoch nicht so einfach, die Sensitivitäten verschiedener Studien zu bestimmen und zu vergleichen, da sie nicht nur vom Zelltyp, sondern auch stark vom verwendeten Comet Assay Protokoll abhängen. Außerdem kann die normale Versuchsvariabilität des Comet Assay in unabhängigen Versuchen zu verschiedenen Ergebnissen bei der Verwendung gleicher Zellen und eines gleichen Protokolls führen. So konnte in dieser Arbeit und in einem weiteren Versuch (Speit et al., 2008) mit A549 Zellen bei unabhängigen Experimenten ein statistisch signifikanter Effekt bei 100, 200 oder 300 μM FA beobachtet werden. Daher sollten die Ergebnisse des Comet Assay, wenn die niedrigste FA-Konzentration bestimmt werden soll, die *in vitro* DPX induziert, nicht überinterpretiert werden. Wenn man dies berücksichtigt, kann man zu dem Schluss kommen, dass die primären HNEC nicht besser vor der DNA-schädigenden Wirkung von FA geschützt sind, als die permanente Lungenzelllinie A549. Unter vergleichbaren Versuchsbedingungen können mit dem Comet Assay FA-induzierte DPX in den beiden Zelltypen ab einer Konzentration von 100 μM detektiert werden. In einer früheren Studie wurden HNEC verwendet, um die Induktion von Hydroxymethylnukleosiden durch FA zu bestimmen. Es waren allerdings sehr hohe FA-Konzentrationen (300–3000 μM) nötig, um mit diesem Assay einen Effekt zu induzieren. Während die biologische Relevanz der Hydroxymethylnukleoside unklar ist, stellen FA-induzierte DPX nach dem heutigen

Kenntnisstand einen relevanten prä-mutagenen DNA-Schaden dar (Barker et al., 2005).

Es wurden nur sehr geringe Unterschiede nach einer einstündigen FA-Behandlung zwischen den beiden Zelltypen bezüglich der Entfernung von FA-induzierten DPX beobachtet. Vier Stunden nach der Behandlung mit 200 μM FA war immer noch ein kleiner crosslinkender Effekt in beiden Zelltypen zu erkennen, statistisch signifikant war er aber nur bei den HNEC. Ein marginaler, aber nicht statistisch signifikanter Effekt war noch acht Stunden nach FA-Exposition in HNEC zu erkennen, dieser war dann nach 24 Stunden vollständig entfernt. In A549 Zellen war die Entfernung der FA-induzierten DPX nach acht Stunden vollständig. In Kapitel 3.5.1 ist die Reparatur von FA-induzierten DPX in der Kultur von humanem Blut beschrieben. DPX, welche durch Zugabe von 100 μM FA in das Blutkulturmedium induziert wurden, sind nach etwa 8 Stunden entfernt worden. DPX, induziert durch höhere FA-Konzentrationen (200 und 300 μM FA), sind selbst nach 24 Stunden noch nicht vollständig repariert. In Tabelle 8 sind die Ergebnisse von Untersuchungen zur Reparatur von FA-induzierten DPX zusammengefasst. Aus der Tabelle kann man erkennen, dass je höher die verwendete FA-Konzentration zur DPX-Induktion war, desto länger dauerte ihre Reparatur. Die DPX-Reparaturzeit bei den Untersuchungen mit dem Comet Assay beträgt zwischen 8 und 24 Stunden, wohingegen die Reparaturzeit bei den mit dem K-SDS Assay untersuchten Zellen länger war. Es entspricht dabei die angegebene Halbwertszeit der mit dem K-SDS Assay durchgeführten Versuchen in etwa der Reparaturzeit der mit dem Comet Assay durchgeführten Untersuchungen. Es ist nicht bekannt, ob die Ursache für die Unterschiede in den verwendeten Zellen, den Expositionsbedingungen oder der verwendeten Methode begründet ist.

Tabelle 8: Übersicht über Experimente, welche die Reparatur von Formaldehyd-induzierten DNA-Protein-Crosslinks zum Thema haben. Die Konzentrationsangabe in der Spalte „Exposition“ bezieht sich, wenn mehrere Konzentrationen getestet wurden, auf die höchste untersuchte Konzentration. Die SV-40 transformierten humanen Zelllinien sind: MRC5CV1, XP12ROSV und GM06914. (HWZ: Halbwertszeit; h: Stunden; K-SDS: Kalium-Natriumdodecylsulfat; HNEC: humane Nasenepithelzellen)

Zelltyp	Exposition (Konzentration / Dauer)	Methode	Reparaturzeit	Referenz
A549	300 µM / 1 h	Comet Assay	8 h	Diese Arbeit
Humane Zelllinien (SV40)	125 µM / 2 h	Comet Assay	24 h	Speit et al., 2000
Humane Leukozyten	bis 300 µM / belassen im Medium	Comet Assay	100 µM: ~ 8 h	Diese Arbeit
			200 µM: >24 h	
			300 µM: >24 h	
HNEC	300 µM / 1 h	Comet Assay	Zwischen 8 und 24 h	Diese Arbeit
V79	250 µM / 2 h	Comet Assay	24 h	Merk und Speit, 2000
A549	200 µM / 3 h	K-SDS Assay	HWZ: 11,7 h	Quievryn und Zhitkovich, 2000
HF / SV40	200 µM / 3 h	K-SDS Assay	HWZ: 13 h	Quievryn und Zhitkovich, 2000
Humane Lymphozyten	200 µM / 3 h	K-SDS Assay	HWZ: 18,1 h	Quievryn und Zhitkovich, 2000

Die A549 Zellen und die HNEC unterscheiden sich kaum hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber der DPX-induzierenden Wirkung von FA und ihrer Fähigkeit, diesen DNA-Schaden zu reparieren. Wenn die Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH) tatsächlich das wichtigste Enzym zum Abbau von bzw. zum Schutz vor FA darstellt, müsste sie in beiden Zelltypen etwa gleich stark exprimiert sein. Um dies zu testen wurde die FDH-Enzymmenge in A549 Zellen und HNEC mit Hilfe der Western Blot Technik bestimmt und miteinander verglichen. Um auszuschließen, dass keine versuchsbedingten Artefakte (falsche Signale) die Interpretation verfälschen, wurde der Versuch einmal wiederholt. Um einen Einfluss der Präparation des Proteinextraktes zu vermeiden, wurde pro Zelltyp die Präparation zweimal vorgenommen und beide Proteinpräparate im Versuch verwendet. Da kaum ein Unterschied in den Signalen der Präparationen zu erkennen ist, kann ein in der Präparation des Proteinextraktes verursachter

Effekt ausgeschlossen werden. In allen untersuchten Proteinpräparationen waren drei verschiedene Signale zu erkennen. Laut der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) existiert von der FDH ein repräsentatives Transkript, welches für ein 40 kDA großes Protein kodiert. Neben diesem größten Transkript sind bisher 12 weitere, verschieden gespleißte Varianten gefunden worden, von denen viele Proteine hervorbringen könnten. Die NCBI-Datenbank bewertet die meisten dieser Transkripte hinsichtlich ihrer potentiellen Möglichkeit, ein Protein hervorzubringen, als „sehr gut“ („good protein“, oder „very good coding score“). Es ist daher möglich, dass die oberste Bande dem repräsentativen FDH-Protein entspricht und die beiden anderen Banden FDH-Varianten mit niedrigerem Molekulargewicht, die aus einem der anderen Transkripte hervorgegangen sind. Dies wäre konsistent mit den Ergebnissen von Uotila und Koivusalo, die drei FDH-Isoformen in Zelllysaten von Erythrozyten und Hepatozyten gefunden haben (Uotila und Koivusalo, 1987). Um dies endgültig zu beweisen, müsste man die Transkripte in den Zellen näher charakterisieren, etwa durch die Bestimmung der 5' und 3' Enden mit dem RACE-Verfahren (rapid amplification of cDNA ends). Ein weiterer Erklärungsansatz für das Vorhandensein dreier Banden in der Western Blot Analyse ist, dass eine oder mehrere Banden durch Kreuzreaktionen des primären Antikörpers mit einem anderen Protein entstanden sind. Dem widerspricht aber die Beobachtung, dass alle Banden in den Proteinpräparationen zweier verschiedener Zelltypen detektiert wurden. Für eine endgültige Gewissheit müsste man die Antikörper in einer Western Blot Analyse mit einer Proteinpräparation aus Zellen testen, die nachweislich keine FDH enthalten (z.B. knock-out Linie). In A549 Zellen und HNEC sind die FDH-Signale unterschiedlich stark ausgeprägt. Dies deutet möglicherweise auf eine unterschiedliche quantitative Ausstattung der Zellen mit den FDH-Splicevarianten hin. Ob dies eine Bedeutung hinsichtlich der Fähigkeit der beiden Zelltypen hat, FA zu entgiften, ist unbekannt. Die Tatsache, dass die Untersuchungen zur Induktion von DPX keine Unterschiede zwischen A549 Zellen und HNEC gefunden haben, spricht eher dagegen. Diese Frage müsste durch eine Proteinaktivitätsbestimmung geklärt werden.

4.3 Die Zytotoxizität von FA im Verhältnis zur Genotoxizität

Die Zytotoxizität steht, bezüglich der kanzerogenen Wirkung von FA, im Vordergrund, darum ist es von Interesse, wie sich die Zytotoxizität im Verhältnis zur Genotoxizität ausdrückt. Dies kann dazu beitragen, die Relevanz der genotoxischen Wirkung von FA besser einzuschätzen.

FA-vermittelte Zytotoxizität in A549 Zellen konnte durch die Ermittlung der Koloniebildungseffizienz ab einer FA-Konzentration von 20 μM und durch die Bestimmung des Rückgangs des Zellwachstums ab einer Konzentration von 200 μM nachgewiesen werden. FA wurde in diesen Tests im Zellkulturmedium belassen. In den Comet Assay Experimenten zur Induktion von FA-induzierten DNA-Effekten in A549 Zellen wurden DPX ab einer FA-Konzentration von 200 μM festgestellt. Da die experimentellen Bedingungen mit dem Zytotoxizitätstest durch Bestimmung des Rückgangs des Zellwachstums vergleichbar war (Zellzahl, Exposition), und beide Effekte ab einer FA-Konzentration von 200 μM zeigen, lässt dieser Vergleich den möglichen Schluss zu, dass Genotoxizität und Zytotoxizität gleichzeitig auftreten. Der Unterschied in der Sensitivität der beiden Zytotoxizitätstests um den Faktor 10 ist eventuell dadurch zu erklären, dass im ersteren eine bedeutend geringere Zellanzahl eingesetzt wurde, als im zuletzt genannten. Die tatsächliche Menge an FA-Molekülen, die mit je einer Zelle interagieren, war im Test zur Ermittlung der Koloniebildungseffizienz viel höher, so dass sich hier die Zytotoxizität von FA möglicherweise stärker ausprägen konnte. Wurden dagegen die A549 Zellen nur für eine Stunde mit FA exponiert, zeigten selbst FA-Konzentrationen von 500 μM keinen Effekt auf die Zellzahl bzw. Wachstumsrate (Speit et al., 2008). In einer 1996 veröffentlichten Arbeit von Grafström und Kollegen wurden kultivierte humane Bronchienepithelzellen für eine Stunde mit FA exponiert. Es wurde eine um 50% reduzierte Koloniebildungseffizienz bei einer Konzentration von 600 μM festgestellt (Grafström et al., 1996).

Der SCE-Test zeigte in der Blutkultur einen genotoxischen Effekt von FA ab einer Konzentration von 200 μM , dasselbe gilt für zytotoxische Effekte ermittelt durch die Bestimmung des Proliferationsindex. Im SCE-Test mit V79 Zellen dagegen wurden genotoxische Effekte statistisch signifikant schon ab einer FA-Konzentration von 100 μM detektiert, Zytotoxizität erst ab 200 μM . Trotzdem ist auch schon bei 100 μM FA ein leichter Rückgang des Proliferationsindex und damit

Zytotoxizität erkennbar. Die Versuche weisen darauf hin, dass genotoxische Effekte von FA in Konzentrationsbereiche auftreten, in denen ebenfalls zumindest eine schwache zytotoxische Wirkung von FA vorhanden ist. Im MNT mit kultiviertem Blut wurde sowohl Zytotoxizität (durch Bestimmung des NDI), also auch Genotoxizität ab einer Konzentration von 300 µM FA festgestellt. Hier gehen also auch genotoxische und zytotoxische Effekte einher.

Die Experimente weisen darauf hin, dass die genotoxische Wirkung von FA sich in Konzentrationsbereichen ausdrückt, die auch zytotoxisch sind. Die allgemeine Frage, ab welcher Konzentration FA zytotoxisch wirkt, ist nicht einfach zu beantworten, da das Ergebnis eines Zytotoxizitätstests von mehreren Faktoren abhängen kann. Die wichtigsten Faktoren sind die Expositionsdauer, der verwendete Typ des Zytotoxizitätstest, die konkreten Versuchsbedingungen, der Zelltyp und die Anzahl der exponierten Zellen. Daraus ergibt sich, dass die Frage, ob Zytotoxizität abhängig von der Konzentration, vor, zusammen mit, oder nach der Genotoxizität auftritt, ebenfalls nur schwer beantwortet werden kann. Am zuverlässigsten sind die Ergebnisse, wenn der Zelltyp und Expositionsbedingungen gleich sind, oder wenn sogar beide Parameter in einem Versuch bestimmt werden können, wie geschehen im SCE-Test und MNT. Diese Untersuchungen lassen den Schluss zu, dass unter *in vitro* Zellkulturbedingungen in direkt exponierten Zellen genotoxische Effekte in der Regel erst dann gemessen werden, wenn auch zytotoxische Effekte auftreten.

4.4 Auswirkung wiederholter FA-Exposition auf die Induktion genotoxischer Effekte.

Personen, die aufgrund ihres Berufs mit FA in Kontakt kommen, sind meist gegenüber niedrigen FA-Konzentrationen exponiert, dafür aber häufiger und für längere Zeitperioden. Dies könnte zu einer Akkumulation von DNA-Schäden und einem steigenden Risiko für die Bildung von Mutationen führen. Eine Akkumulation von DPX wurde jedoch nicht einmal in der Nasenschleimhaut von Ratten nach FA-Inhalation von 12 Wochen gegenüber 6 und 10 ppm gefunden (Casanova et al., 1994). In den für diese Arbeit durchgeführten Experimenten an proliferierenden V79 Zellen hängt der genotoxische Effekt bei wiederholter FA-

Exposition klar vom verwendeten Zeitschema ab. Kurze Intervalle zwischen den FA-Behandlungen (3 Stunden) verstärken klar den zytotoxischen und genotoxischen Effekt von FA, wohingegen dieser Effekt bei längeren Intervallen (24 Stunden) nicht beobachtet wurde. Dieses Ergebnis stimmt mit älteren Experimenten überein, bei denen die Entfernung von FA-induzierten DPX untersucht wurde (Merk und Speit, 1998). Drei Stunden nach dem Ende der FA-Behandlung wurden beträchtliche Mengen an DPX gemessen, wohingegen diese 24 Stunden nach dem Behandlungsende vollständig entfernt waren. Dies bedeutet, dass die Akkumulation von DPX und verstärkte Genotoxizität auftreten können, wenn mehrere Expositionen mit kurzen Zeitintervallen bei einer FA-Dosis stattfinden, die genügend persistierende DPX induziert. FA-Exposition gegenüber geringeren Konzentrationen (10 μM) und / oder längeren Zeitintervallen zwischen den Behandlungen führte zu keiner Verstärkung der FA-Genotoxizität. Die Ergebnisse des MNT bestätigen die des Comet Assay. Genotoxizität und Zytotoxizität werden nur nach wiederholter Exposition bei kurzen Zeitintervallen verstärkt. Es ist unklar, ob die Effekte im MNT nach wiederholter Behandlung mit Zeitintervallen von 24 Stunden aufgrund von DPX auftreten, die in der letzten Behandlung induziert wurden, oder aufgrund eines verspäteten Effekts der ersten Behandlungen zusammen mit einer Art von adaptivem Schutz gegen die Induktion von DPX. Die Ergebnisse des Comet Assays weisen möglicherweise auf eine solche adaptive Reaktion hin. Diese Interpretation wird auch von einer früheren *in vitro* Mutationsstudie mit TK6 Zellen unterstützt (Craft et al., 1987). Mehrfache FA-Behandlungen führten hier zu einer Zunahme der Mutationsraten am Thymidin Kinase Locus, der kombinierte Effekt der Mehrfachbehandlungen war allerdings schwächer, als der einzelner einfacher FA-Behandlungen mit äquivalenter Konzentration mal Zeit. Ein biologischer Mechanismus, der diesem adaptiven Schutz zugrunde liegt, ist bisher unbekannt. Man könnte spekulieren, dass Enzyme, die für die Detoxifikation von FA verantwortlich sind, induziert werden, aber eine solche Regulation ist in Säugerzellen bisher unbekannt. Adaptive Antworten von Zellen aufgrund von DNA-schädigenden Agenzien sind in der Literatur häufig beschrieben worden (Stecca und Gerber, 1998). Oft wird hier allgemein von der verbesserten Fähigkeit von Zellen, Geweben oder ganzen Organismen gesprochen, auf einen bestimmten Stresstimulus zu reagieren,

wenn sie zuvor kleineren Stressestimuli von gleicher oder ähnlicher Qualität ausgesetzt wurden. Verschiedene Stressoren wurden schon untersucht (ionisierende Strahlung, Radiomimetika, oxidative Agenzien, Alkylanzien). Um zu testen, ob geringe Mengen FA, die im Comet Assay gerade eben keinen Effekt zeigen (50 μM), eine adaptive Antwort auslösen können, wurden V79 Zellen zweimal im Abstand von 24 Stunden mit 50 μM FA vorbehandelt und dann weitere 24 Stunden später mit FA-Konzentrationen behandelt, die bei einmaliger Exposition bekanntermaßen einen Effekt zeigen. Das Ergebnis (Abbildung 24) lässt auf keinen solchen adaptiven Effekt schließen. Der Effekt einer FA-Behandlung mit 100 μM war im Comet Assay bei den vorbehandelten V79 Zellen, im Vergleich zu den nicht vorbehandelten Zellen, zwar weniger ausgeprägt und nicht statistisch signifikant, der Unterschied war aber dennoch zu gering, um ihm eine Bedeutung zuzuschreiben (siehe auch Kapitel 4.2 zum Thema Versuchsvariabilität).

Um die in V79 Zellen beobachtete adaptive Antwort auf mehrfache FA-Exposition in einem für den Menschen relevanteren Zellmodell nachzuvollziehen, wurden die menschlichen A549 Zellen nach demselben Protokoll behandelt (Kapitel 3.4.2.). Das Ergebnis in A549 Zellen war aber konträr: Anstatt einer adaptiven Antwort, d.h. also keinem Effekt durch die FA-Behandlung im Comet Assay, zeigt die FA-Mehrfachbehandlung eine verstärkte Hemmung der DNA-Migration im Vergleich zur Einfachbehandlung. Um den Einfluss der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeit der beiden Zelltypen zu berücksichtigen (die Verdopplungszeit von V79 beträgt etwa die Hälfte der von A549), wurde das Experiment wiederholt, diesmal mit einem Abstand von 48 Stunden zwischen den FA-Behandlungen. Das Ergebnis war aber annähernd dasselbe: Die FA-Dreifachbehandlung zeigte eine Verstärkung des hemmenden Effekts auf die DNA-Migration im Comet Assay. Der Grund, warum eine FA-Dreifachbehandlung in V79 Zellen zu einem Ausbleiben des crosslinkenden Effekts im Comet Assay, in A549 Zellen aber zu einer Verstärkung führt, ist unbekannt. Möglicherweise besitzen A549 Zellen nicht die molekularen Voraussetzungen für eine adaptive Antwort, oder die Mechanismen (DNA-Reparatur / FA-Detoxifikation), die sie umsetzen, sind weniger leistungsfähig bzw. schneller überlastet. Da die Vorbehandlung mit hohen FA-Konzentrationen keinen adaptiven Effekt zeigte, wurden A549 Zellen analog zum

Versuch mit V79 Zellen mit 50 μM FA im Abstand von 24 Stunden vorbehandelt und mit dem Comet Assay untersucht. Das Ergebnis zeigt aber keinen Unterschied zwischen vorbehandelten und nicht-vorbehandelten A549 Zellen. Die adaptive Antwort von V79 Zellen auf FA-Mehrfachbehandlungen konnte also in A549 Zellen auch mit veränderten Behandlungsprotokollen nicht reproduziert werden. Die Frage, ob FA-induzierte DPX akkumulieren oder ob die Zellen sich auf eine erhöhte FA-Exposition durch Adaption einstellen können, konnte mit diesem Ansatz nicht vollständig geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

FA ist eine hoch reaktive Substanz und bindet leicht an Glutathion (GSH) und Proteine. Er wird außerdem schnell von Dehydrogenasen abgebaut (IARC, 2006). Die Halbwertszeit von FA in zellulären Systemen wird allgemein als sehr kurz angenommen, in Blut beträgt sie etwa eine Minute (Patterson et al., 1986). Die Versuche in dieser Arbeit weisen aber darauf hin, dass es einen klaren Unterschied in der Entfernung von DPX gibt, wenn FA im Zellkulturmedium belassen wird oder nicht (Abbildung 19 und Abbildung 28). Dies weist darauf hin, dass FA in Zellkulturen für mehrere Stunden aktiv bleiben kann. In den Experimenten, in denen FA nicht durch einen Medienwechsel entfernt wurde, bleibt der crosslinkende Effekt selbst nach 24 Stunden noch unverändert, wohingegen nach dem Entfernen des FA-enthaltenden Mediums die FA-induzierten DPX schnell und effektiv repariert werden. Dies bedeutet, dass in Kulturen von Säugerzellen DPX durch FA über eine längere Zeit induziert werden und FA nicht so schnell inaktiviert wird, wie bisher angenommen. Dieser Befund wurde inzwischen durch neuere Zellkulturexperimente unterstützt. In diesen wurden A549 Zellen zunächst eine Stunde mit FA exponiert und danach mit V79 Zellen ko-kultiviert. Ein SCE-Test in diesen V79 Zellen zeigte die Induktion von SCE an, und zwar in der Intensität vergleichbar mit einem zweiten Experiment, in welchem V79 Zellen direkt mit FA exponiert wurden. Auch dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass FA in der Zellkultur nicht innerhalb von einer Stunde inaktiviert wird, sein genotoxisches Potential also behält und in vorher nicht exponierten Zellen genetische Effekte induzieren kann (Neuss und Speit, 2008).

4.5 Der Einfluss von FA auf die Expression der FA-abbauenden Enzyme FDH, ALDH1A1 und ALDH2

Die Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase (FDH), die Aldehyd-Dehydrogenase 1 und die Aldehyd-Dehydrogenase 2 gelten als die wichtigsten FA-abbauenden Enzyme (IARC 2006; BfR 2006). Daher ist es denkbar, dass erhöhte FA-Konzentrationen, die zytotoxische und/oder genotoxische Effekte verursachen, zu einer Erhöhung der Expression der FA-abbauenden Enzyme führen, um die FA-Detoxifikation zu beschleunigen. Dass eine erhöhte FDH-Proteinmenge Zellen vor FA besser schützen kann, ist im Pflanzenmodell (*Arabidopsis thaliana*) und in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) gezeigt worden (Achkor et al., 2003; Weher und Brendel, 1992). Über die Regulation von FA-abbauenden Genen ist bisher nur wenig bekannt. Im Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* ist eine Erhöhung der FDH-Promotoraktivität durch FA und dessen GSH-Addukt (S-Hydroxymethylglutathion) gefunden worden (Barber und Donohue, 1998). Die Herunterregulation des FDH-Promotors durch verschiedene Transkriptionsfaktoren ist ebenfalls bekannt (Kwon et al., 1999; Lee et al., 2002). Die Expression der FDH ist im Gewebe und in kultivierten Zellen der humanen oralen Mukosa untersucht worden (Hedberg et al., 2000). In der Mukosa konnte die FDH-mRNA vor allem in den basalen und parabasalen Zellen des Epitheliums nachgewiesen werden, aber nicht in den Zellen, welche nahe der Oberfläche der Mukosa liegen. Die mRNA-Stabilität der FDH wurde auf eine Halbwertszeit von 7 Stunden bestimmt, das Protein selber ist sehr stabil: In kultivierten Keratinozyten ist es selbst 96 Stunden nach Inhibition der Transkription in unveränderter Menge vorhanden. Das FDH-Protein ist mit Hilfe von immunohistochemischen Untersuchungen in allen Zellen der humanen oralen Mukosa detektiert worden, mit Ausnahme der äußersten, keratinisierten Zellschicht. In Jahr 2007 ist von Lee und Kollegen der Versuch unternommen worden, FA-regulierte Gene mit Hilfe einer auf cDNA-Chip-Technologie basierenden Methode (der „Suppression Subtractive Hybridization“) in humanen Tracheazellen zu identifizieren. Die Expositionsbedingungen waren hier 10 und 100 μM FA für 1, 4 und 24 Stunden. Es sind zwar 27 Gene gefunden worden, aber es war keines darunter, welches für FA-abbauende Enzyme kodiert (Lee et al., 2007). Zwei weitere Experimente zur

Detektion von FA-regulierten Genen mit cDNA-Chips wurden am respiratorischen Epithel von Ratten durchgeführt (Hester et al., 2003; Hester et al., 2005). In beiden Versuchen wurde ein FA-induzierter Effekt mittels Eintröpfelung von 400 μM FA-Lösung in die Nase erreicht. Die Unterschiede in den Experimenten bestehen im verwendeten Chip-Modell und im Zeitpunkt der Präparation der Nasenzellen: Die Arbeit von 2003 verwendete den Clontech™ Rat Atlas 1.2 Chip, die Präparation war 24 Stunden nach FA-Exposition; die Arbeit von 2005 verwendete den Clontech™ Atlas Toxicology II Chip, die Präparationszeitpunkte waren 1, 5 und 28 Tage nach Exposition. Es wurden einige hoch- sowie herunterregulierte Gene gefunden, die ALDH1A1 und ALDH2 waren aber nicht dabei. Die FDH war auf den Chips nicht repräsentiert.

Um die Frage zu klären, ob eine FA-Exposition einen Einfluss auf die Expression der drei wichtigen FA-detoxifizierenden Enzyme FDH, ALDH1A1 und ALDH2 besitzt, wurden A549 Zellen mit 50, 100, 200 und 300 μM FA behandelt und nach 1, 4 und 24 Stunden die Transkriptmenge der Gene mit der LightCycler-Technologie bestimmt. Weil davon ausgegangen wurde, dass die Zellen möglicherweise schnell auf die FA-Exposition reagieren würden, wurden die Messzeitpunkte 1, 4 und 24 Stunden nach der FA-Zugabe ins Medium gewählt. Die Dosiswahl sollte FA-Konzentration enthalten, die in den Zyto- und Genotoxizitätstests gerade noch keinen bzw. einen schwachen Effekt (50 μM), einen moderaten Effekt (100 und 200 μM) und einen starken Effekt (300 μM) auslösen. Es wurde hier also zum ersten Mal systematisch (d.h. mit verschiedenen FA-Konzentrationen und Messzeitpunkten) der Versuch unternommen, die Transkription von FA-abbauenden Enzymen zu charakterisieren. Als Referenzstandard wurde die Expression der Haushaltsgene HBMS und HPRT1 gewählt. Diese beiden Gene wurden ausgewählt, weil sie in der Literatur als zuverlässige endogene Referenzgene gelten (de Kok et al., 2005; Vandesompele et al., 2002; Radonić et al., 2004). Das Ergebnis der Versuche ist, dass unter den gewählten Bedingungen sich die Expression der drei FA-abbauenden Gene nicht signifikant ändert (siehe Kapitel 3.4.4). Die beobachteten Expressionsschwankungen liegen alle innerhalb der normalen Versuchsvariabilität. Damit stimmt dieses Resultat mit den Ergebnissen der zitierten Literatur überein, dass nämlich FA in Säugerzellen keine Änderung der Expression der Enzyme FDH, ALDH1A1

und ALDH2 verursacht (Hester et al., 2003; Hester et al., 2005; Lee 2007). In einem Review-Artikel, der die Regulation der Gene der Alkohol Dehydrogenasen (ADH) von Säugern zum Thema hat (die FDH gehört zu den Klasse III ADH), wird erläutert, dass der FDH-Promotor einige Elemente von Haushaltsgen-Promotoren aufweist. So fehlt ihm beispielsweise die TATA- und die CCAAT-Box. Darum ist die FDH-Expression *in vivo* möglicherweise kaum reguliert (Edenberg, 2000). Man könnte argumentieren, dass der erste Messzeitpunkt (eine Stunde nach FA-Zugabe) bereits zu spät sein könnte, weil die Erhöhung der Transkription bereits nach wenigen Minuten erfolgte und nach einer Stunde wieder der Normalzustand erreicht wurde. Dies kann aber ausgeschlossen werden, da in Vorversuchen frühere Zeitpunkte ebenfalls vermessen wurden, wenn auch in kleinerem Umfang (nur ein Housekeeping-Gen, keine Wiederholungsexperimente). Eine adaptive Antwort von A549 Zellen durch eine Erhöhung der Transkription der drei Gene, die für FA-abbauende Proteine kodieren, konnte also nicht gefunden werden. Diese Ergebnisse unterstützen die Comet Assay Experimente, bei denen nach wiederholter Exposition keinen Hinweis auf einen adaptiven Schutz gefunden wurde.

4.6 Induktion von genotoxischen Effekten durch FA in kultiviertem humanem Blut

Die Ergebnisse, welche in Kapitel 3.5.1 dargestellt sind, weisen klar darauf hin, dass FA-induzierte DPX zu der Entstehung von SCE und MN unter bestimmten Bedingungen führen können. DPX wurden mit dem Comet Assay ab einer FA-Konzentration von 25 μM detektiert. Eine ähnliche Sensitivität des Comet Assay für den Nachweis von FA-induzierten DPX ist auch schon für andere Säugerzellen berichtet worden (Liu et al., 2006; Merk und Speit, 1998; Speit und Merk 2002). Man kann aber davon ausgehen, dass die tatsächliche FA-Konzentration im Zellkern viel geringer ist, da FA zum einen eine flüchtige Substanz ist und zum anderen hochreaktiv, so dass FA vor allem mit dem Zellkulturmedium, den Zellmembranen und dem Zytoplasma reagiert. Das bedeutet, die DNA im Zellkern ist einer effektiv geringeren FA-Konzentration ausgesetzt. Shaham und Kollegen haben nach eigenen Angaben mit Hilfe des Kalium-Natriumdodecylsulfat Assay (K-SDS Assay) FA-induzierte DPX mit einer Nachweisgrenze von etwa 1 μM

detektiert. Die Messung von DPX mit dem K-SDS Assay geschieht indirekt, indem die Menge an DNA bestimmt wird, die nach einer Proteinfällung mit K-SDS zusammen mit den Proteinen mitgefällt wurde. Mit Hilfe dieser Methode kamen sie in einer Studie zu dem Ergebnis, dass im Blut von berufsbedingt FA-exponierten Personen im Vergleich zu nicht exponierten die Menge an DPX erhöht war (Shaham et al., 1996; Shaham et al., 1997; Shaham et al., 2003). Andere Studien haben jedoch gezeigt, dass der K-SDS Assay eine mit dem Comet Assay vergleichbare Sensitivität (etwa 25-50 μM) besitzt (Liu et al., 2006; Merk und Speit, 1998). Die Zuverlässigkeit der zuvor erwähnten Ergebnisse von Shaham und Kollegen wurde deshalb schon in Frage gestellt (BfR, 2006; Heck und Casanova, 2004; Casanova et al., 1996).

Neben Shaham und Kollegen haben auch verschiedene andere Arbeitsgruppen zytogenetische Effekte (SCE, Chromosomenaberrationen und MN) in kultiviertem Blut von humanen Probanden gefunden, die durch FA-Inhalation exponiert waren (Bauchinger und Schmid, 1985; He et al., 1998; Jin und Zhu, 1992; Neri et al., 2006; Orsière et al., 2006; Suruda et al., 1993; Yager et al., 1986; Ye et al., 2005). Obwohl sich die Ergebnisse der Arbeiten teilweise widersprechen und eine kritische Einschätzung der Studien dadurch erschwert wird, dass in den Veröffentlichungen oft nur ungenügende Informationen über die Exposition, das Studiendesign und die verwendeten Methoden vorhanden sind, geben die positiven Befunde einen Anlass zu Besorgnis, was die Evaluierung von FA hinsichtlich seiner Genotoxizität betrifft.

Nach der Exposition von humanen Probanden gegenüber FA *in vivo* entstehen SCE und MN (CytB-Methode) nur während der Kultivierung des entnommenen Blutes als Folge von FA-induzierten DPX. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit ein *ex vivo* Versuchsdesign gewählt, um Informationen über die erforderliche Menge an DPX zu Beginn der Blutkultur zu bekommen, die nötig ist, um genetische Effekte in kultiviertem Blut zu erzeugen. Die FA-Zugabe zu Beginn der Blutkultur entspricht daher dem Augenblick der Blutentnahme bei Biomonitoring Studien. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass FA-induzierte DPX in kultiviertem Blut wieder entfernt werden, was mit bereits publizierten Daten übereinstimmt (Quievryn und Zhitkovich, 2000). Damit SCE in der Blutkultur induziert werden können, müssen DPX bis zur S-Phase in den stimulierten

Lymphozyten persistieren. Und tatsächlich verblieben 24 Stunden nach einer Zugabe von 200 μM FA immer noch eine wesentliche Menge an DPX in den Zellen, um SCE zu induzieren. Diese SCE-Induktion ging einher mit starken zytotoxischen Effekten, die auch schon bei niedrigeren, nicht genotoxischen Dosen, festzustellen war. Obwohl die DPX als Ursache der zytotoxischen Effekte naheliegend sind, könnte die FA-vermittelte Zytotoxizität auch über andere Mechanismen stattfinden, wie etwa durch Reaktionen mit Zellproteinen. Zusammenfassend weisen diese Experimente darauf hin, dass die Induktion von SCE durch FA in Kulturen mit humanem Blut hohe, zytotoxische FA-Konzentrationen benötigt (200 μM), die genügend DPX hervorbringen müssen, damit wenigstens ein Teil dieser DPX bis zum Replikationsbeginn persistieren. Eine solche große Menge an DPX kann im Blut von berufsbedingt FA-exponierten Menschen nicht erwartet werden. Daher sind die berichteten Effekte in den SCE-Tests (Bauchinger und Schmid, 1985; He et al., 1998; Jin und Zhu, 1992; Neri et al., 2006; Orsière et al., 2006; Suruda et al., 1993; Yager et al., 1986; Ye et al., 2005) höchstwahrscheinlich nicht aufgrund der FA-Exposition entstanden. In Versuchstieren (Ratten und Rhesusaffen) wurde keine Erhöhung der FA-Blutkonzentration nach Exposition mit sehr hohen FA-Konzentrationen gefunden. Außerdem wurde auch keine Erhöhung der DPX im Knochenmark von normalen und GSH-depletierten Ratten gefunden (Heck und Casanova, 2004). Man könnte argumentieren, dass bei berufsbedingt FA-exponierten Personen die DPX in peripheren Blutzellen über die Zeit akkumulieren und dann nach Jahren eine große Menge ohne begleitende zytotoxische Effekte erreichen könnte. Dagegen spricht aber, dass die Lebensdauer von peripheren Lymphozyten begrenzt ist und dass DPX in Zellen ständig durch Hydrolyse und DNA-Reparatur entfernt werden (Quievryn und Zhitkovich, 2000). Auch Inhalationsexperimente mit Ratten haben keinen Hinweis auf Akkumulation von DPX nach einer FA-Exposition von 6 und 10 ppm für 12 Wochen in der Nasenschleimhaut ergeben (Casanova et al., 1994). Momentan gibt es also keine Hinweise auf DPX-Akkumulation *in vivo* in peripheren Lymphozyten. Aber selbst wenn FA DNA-Schäden in einigen langlebigen Lymphozyten oder Stammzellen *in vivo* verursachen sollte, würden solche Effekte in einzelnen Zellen nicht zu einem positiven Resultat in einem der Standard-Genotoxizitätstest führen, da die Stichprobe hierfür zu klein wäre.

FA hat keine MN in Kulturen mit humanem Blut induziert, wenn es zu Beginn der Kultivierung gegeben wurde (Protokoll I). Es ist anzunehmen, dass geringe FA-Konzentrationen unter diesen Versuchsbedingungen nicht genügend DPX hervorbringen, um MN zu induzieren, wohingegen hohe Dosen die Zellen so sehr schädigen, dass sie trotz PHA-Stimulation nicht in die Mitose eintreten. Da FA bekanntermaßen ein potenter Induktor von MN ist, wurde das Potential von FA zur Induktion von MN in Kulturen von humanem Blut weiter untersucht. Im Entwurf der Organisation für wissenschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) für eine MNT Guideline (Draft OECD guideline 487 *in vitro* MNT) wird vorgeschlagen, die Testsubstanz 24 Stunden nach dem Start der Blutkultur zuzugeben, Cyt B dann 20 Stunden später und die Präparation der Zellen dann nach insgesamt 72 Stunden vorzunehmen. Mit Hilfe dieses Protokolls (Protokoll II) war es möglich, FA-Konzentrationen bis 400 µM zu testen, die MN-Rate stieg allerdings nicht an. Außerdem wurde auch in diesem Versuchsaufbau eine hohe Zytotoxizität festgestellt. Die erwähnte OECD Guideline schlägt bei einem negativen oder unklaren Ergebnis vor, das Protokoll dahingehend zu modifizieren, die Testsubstanz zusammen mit Cyt B 48 Stunden nach dem Kulturstart zuzugeben. Dieses Protokoll gilt als das sensitivste, da hier proliferierende Lymphozyten vor der letzten Zellteilung vor der Präparation behandelt werden. Durch Anwendung dieses Protokolls war es möglich, MN in der Kultur von humanem Blut durch FA zu induzieren (Protokoll III). Aber auch hier waren zytotoxische Effekte deutlich zu erkennen. Insgesamt weisen die Experimente darauf hin, dass FA ein schwacher Induktor von MN in humanen Blutkulturen ist und dass die Induktion von MN bestimmte Versuchsbedingungen benötigt. Positive Effekte sind nur zu erwarten, wenn eine große Anzahl DPX direkt in proliferierende Zellen induziert und die MN dann eine Mitose später analysiert werden. Dies ist in Übereinstimmung mit MNT-Ergebnissen in proliferierenden, permanenten Zelllinien (Merk und Speit, 1998; Speit et al., 2000). Blutzellen mit erhöhten Mengen DPX zu Beginn der Blutkultur sind entweder in der Lage, diese DPX zu entfernen bzw. zu reparieren, oder sind so sehr beschädigt, dass sie nicht mehr als zweikernige Zellen mit induzierten MN im Standard-MNT mit Cytokalsin B detektiert werden können. Die Ursache erhöhter MN-Raten in Kulturen von Blut von FA-exponierten Personen (Neri et al., 2006; Orsiere et al., 2006) ist daher nicht im Zusammenhang mit der FA-

Exposition selbst zu suchen. Diese Schlussfolgerung wird unterstützt durch eine experimentelle Studie, in welcher Lymphozyten aus Ratten nach FA-Exposition untersucht wurden. Eine FA-Exposition gegenüber bis zu 15 ppm FA für 6 Stunden pro Tag für insgesamt 5 Tage hat nicht zu einer Erhöhung der SCE-Rate oder der Anzahl an Metaphasen mit Chromosomenaberrationen in kultivierten Lymphozyten geführt (Kligerman et al., 1984).

Weil eine zu diesem Zeitpunkt der Experimente neu erschienene Arbeit von einer erhöhten Rate an Zentromer-positiven MN im Blut von FA-exponierten Arbeitern (was auf eine Induktion von Aneuploidie hindeutet) berichtete hatte (Orsiere et al., 2006), wurden hier ebenfalls die FA-induzierten MN in binukleären Lymphozyten mit Hilfe der FISH-Technik untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Mehrheit der MN nach FA-Exposition Zentromer-negativ ist, was für einen klastogenen Wirkungsmechanismus spricht. Der Anteil an Zentromer-negativen MN ist hier vergleichbar mit dem Anteil, der in MN zu detektieren ist, die durch Gammastrahlung induziert werden. Die Ergebnisse der Positivkontrolle (Gammastrahlungs-induzierte MN) und der Negativkontrolle (MN einer unbehandelten Blutkultur) sind in Übereinstimmung mit historischen Daten (Trenz et al., 2003). Ein klastogener Effekt von FA in humanen Blutkulturen ist auch in Übereinstimmung mit der bekannten klastogenen Wirkung von FA in anderen *in vitro* Studien (Schmid et al., 1986; Natarajan et al., 1983). Aneugene Effekte sind meist durch einen Schwellenwert charakterisiert und benötigen eine hohe Substanzkonzentration in der Zielzelle. Der beschriebene aneugene Effekt im MNT der Biomonitoring Studie (Orsiere et al., 2006) ist sogar noch unwahrscheinlicher als ein klastogener Effekte und steht höchstwahrscheinlich in keinem kausalen Zusammenhang mit der FA-Exposition.

Eine weitere Schlussfolgerung für die Einschätzung von Biomonitoring Studien nach FA-Exposition kann ebenfalls durch diese Ergebnisse gezogen werden. FA-Exposition von Blutzellen und erhöhte DPX-Mengen zu Beginn der Blutkultur führen effizienter zu einer Induktion von SCE, als zu einer Induktion von MN. Daher ist eine erhöhte MN-Rate bei gleichzeitig unveränderter SCE-Rate in Kulturen von Blut von FA-exponierten Individuen (Suruda et al., 1993) ein Effekt, der nicht auf die FA-Exposition zurückzuführen ist. Dasselbe gilt für Fälle, in denen eine Erhöhung der Rate von Chromosomenaberrationen, aber keine erhöhte Rate

an SCE in den gleichen Blutproben festgestellt wurde (Bauchinger et al., 1985; Jin, et al., 1992).

Die Frage, ob FA systemisch Genotoxizität vermitteln kann, ist immer noch ungeklärt. Den positiven Biomonitoring-Studien stehen viele wissenschaftliche Argumente gegenüber, die gegen eine systemische Wirkung von FA sprechen (Heck und Casanova, 2004). Auch die Ergebnisse in meinen Untersuchungen sprechen ebenfalls dagegen, da in einem *ex vivo* Modell gezeigt wurde, dass hohe FA-Konzentrationen (200-300 μ M) im humanem Blut nötig sind, um genetische Effekte auszulösen, die *in vivo* kaum vorstellbar sind. In verschiedenen Inhalationsstudien wurden Versuchstiere mit hohen FA-Konzentrationen exponiert und in keinem der Fälle konnte eine Erhöhung der FA-Konzentration im Blut festgestellt werden (Heck et al., 1985; Casanova et al., 1988). Insgesamt muss man auf dem momentanen Stand des Wissens davon ausgehen, dass systemische genotoxische Effekte von FA eher unwahrscheinlich sind.

4.7 Einschätzung lokaler genotoxischer Effekte von FA im Menschen

Lokale Genotoxizität von FA ist im Tiermodell eindeutig gefunden worden. Bei hohen FA-Konzentrationen zeigen sich an den Orten des ersten Kontakts die toxischen und genotoxischen Auswirkungen, wie etwa erhöhte Zellproliferation, Induktion von DPX und schließlich Tumorentstehung. Im Menschen wurde die lokale Genotoxizität von inhaliertem FA in mehreren Studien untersucht, wobei zur Messung genotoxischer Effekte ausschließlich der MNT mit Zellen der Mundschleimhaut und Nasenschleimhaut verwendet wurde. Dieser Ansatz ist auch relevant, da zum einen durch FA-Inhalation direkt exponierte Zielzellen untersucht werden, und zum anderen der MNT als Genotoxizitätstest einen für FA-Genotoxizität sensitiven Endpunkt (nämlich die Induktion von MN) misst, der echte mutagene Ereignisse repräsentiert. Obwohl die meisten der veröffentlichten Studien einen positiven Effekt von FA auf die MN-Frequenz finden, müssen die Ergebnisse mit Vorsicht betrachtet werden. Eine kritische Bewertung der Studien deckte viele Mängel auf (Speit und Schmid, 2006). Ein großes Problem stellt vor allem das Nichtvorhandensein der Standardisierung des MNT mit diesen Zellen

dar. Weitere Probleme ergeben sich aus der hohen Versuchsvariabilität (z.B. der Kontrollwerte). Die Qualität der Studien leidet aber vor allem an der unvollständigen Beschreibung des Studiendesigns, der Exposition und möglicher Ko-Exposition mit anderen Chemikalien. Daher ist die nähere Charakterisierung der lokale Genotoxizität von FA im Menschen durch Beurteilung dieser Ergebnisse kaum möglich. Ziel war es darum, eine FA-Inhalationsstudie am Menschen durchzuführen, welche die erwähnten Mängel nicht aufweist. Dies bedeutete konkret: Klares Versuchsdesign, Durchführung unter GLP-ähnlichen Bedingungen, klar definierte und kontrollierte FA-Exposition und der Ausschluss von Störfaktoren.

Wenn FA inhaliert wird, sind die nasalen und oralen Schleimhäute diejenigen Gewebe, die zuerst Kontakt mit FA bekommen und relevant exponiert werden. Die Schleimhäute besitzen eine mitotisch aktive Basalschicht, weiter außen schließen sich mehrere intermediäre Schichten von differenzierten Zellen an, die aus den Zellteilungen der Basalschicht gebildet werden. Durch diese andauernde mitotische Aktivität der Basalschicht gelangen die Zellen schließlich auf die Oberfläche des Schleimhautepitheliums und lösen sich hier dann ab. Das Epithelium der Mundschleimhaut ist etwa 40-50 Zellen dick und erneuert sich ungefähr alle 5 bis 6 Tage, d.h. also, die von der Basalschicht gebildeten Epithelzellen benötigen diese Zeit, um von dort bis zur Oberfläche zu gelangen, wo sie schließlich abfallen. Die Schleimhaut stellt aufgrund ihrer glatten Oberflächenzellschicht und dem aufliegenden interzellulären Material eine Permeabilitätsbarriere für Xenobiotika dar. Die Zellen von Epithelien sind mit einer Schleimschicht bedeckt, die aus Komplexen von Proteinen und Kohlenhydraten bestehen. Daher sind diese weichen Gewebe gut vor Abrieb bzw. mechanischen Schäden geschützt (Harris und Robinson, 1992; Shojaei 1998). Aus den Eigenschaften der Schleimhäute ergibt sich nun, dass eine Substanz, welche eine erhöhte Rate an MN in Mundschleimhautzellen induziert, zunächst die Permeabilitätsbarriere überwindet und die Basalschicht via parazellularen und/oder transzellularen Wegen erreichen muss, um dort DNA-Schäden zu induzieren. Diese DNA-Schäden müssen sich dann durch die Teilung der Zellen der Basalschicht in MN fixieren und die MN-enhaltende Zellen müssen dann zur Oberfläche wandern, wo sie dann für den MNT abgenommen werden.

Die Inhalation von FA induzierte unter dem hier verwendeten Versuchsdesign keine MN in Mundschleimhautzellen. Obwohl der sensitivste bzw. der relevante Zeitpunkt für die Detektion von MN nach einer zeitlich begrenzten FA-Exposition noch nicht bestimmt wurde, wird allgemein davon ausgegangen, dass die Mehrheit der Zellen mit MN 8 bis 21 Tage nach Exposition die Oberfläche des Epithels erreicht (Fenech et al., 1999). Die Studie in dieser Arbeit enthält mehrere Zeitpunkte zur MN-Detektion, nämlich direkt am Ende der letzten Exposition und 7, 14 und 21 Tage später. Es ist daher höchst unwahrscheinlich, dass ein MN-induzierender Effekt aufgrund eines falschen Zeitpunktes der Probennahme verpasst wurde, da auch ein möglicher Einfluss auf die Teilungsrate der Zellen der Basalschicht mit berücksichtigt wurde. Die Auswertung der MN wurde in Übereinstimmung mit Empfehlungen von Expertengruppen durchgeführt (Fenech et al., 1999). Gefärbt wurden die Präparate mit DAPI / Propidiumjodid, da diese Färbemethode eine klare Identifikation der MN zulässt und außerdem Bakterien (-Kontamination) klar von MN unterschieden werden können. Es wurden nur Schleimhautzellen aus den Wangentaschen und nicht auch Nasenschleimhautzellen untersucht, da der MNT an letzteren nicht ausreichend etabliert ist. Die MN-Rate in den Kontrollen war etwa 1 MN pro 1000 untersuchte Zellen, was in Übereinstimmung mit früheren Studien anderer Labore ist (Fenech et al., 1999). Die MN-Raten waren am Ende des zehntägigen Expositionszeitraums leicht, aber nicht statistisch signifikant, erhöht. Dieser Effekt stammt von der Erhöhung der MN-Rate zweier Probanden der Gruppe 5 (FA 21 und FA 22). Die MN-Raten sowohl der anderen beiden Probanden der Gruppe, als auch die der anderen Gruppe zu diesem Messzeitpunkt sind jedoch nicht erhöht, so dass diesem Effekt keine biologische Bedeutung beigemessen werden kann. Die MN-Rate 21 Tage nach Ende der Exposition war signifikant erniedrigt. Dies könnte man als „protektiven Effekt“ interpretieren, es könnte allerdings auch Versuchsvariabilität sein. Unglücklicherweise wurde für diese Art von Studien bisher keine Positivkontrolle etabliert: Sogar Krebspatienten zeigen nach der Behandlung mit klar mutagenen bzw. klastogenen Agenzien sehr variable und inkonsistente Ergebnisse im MNT (Schmid und Speit, 2006). Deshalb ist es bisher nicht möglich, die Sensitivität des MNT mit Mundschleimhautzellen näher zu definieren.

Anders als die in dieser Arbeit beschriebene Studie mit negativem Ergebnis gibt es in der Literatur einige Studien mit Hinweisen darauf, dass MN in Mundschleimhautzellen nach FA-Exposition induziert werden können (Suruda et al., 1993; Titenko-Holland et al., 1996; Burgaz et al. 2002). Suruda und Kollegen untersuchten den Effekt von FA-Expositionen im Niedrigdosisbereich auf eine Gruppe von 29 Studenten (22 Männer, 7 Frauen) des Bestattungs-Gewerbes während eines Einbalsamierungskurses über 9 Wochen (Suruda et al., 1993). Die Studenten verrichteten im Durchschnitt 6,9 Einbalsamierungen und waren einer durchschnittlichen kumulativen FA-Dosis von 14,8 ppm h exponiert. Die durchschnittliche FA-Luftkonzentration war 1,4 ppm während den Einbalsamierungsarbeiten. Weil die durchschnittliche Dauer einer Einbalsamierung 125 min betrug, errechneten die Autoren eine auf 8 Stunden bezogene, durchschnittliche FA-Exposition von 0,33 ppm an Tagen, an denen einbalsamiert wurden. Präparate wurden am Ende des Einbalsamierungskurses hergestellt, indem die Proben mit einer Bürste aus den Wangentaschen entnommen wurden. Gefärbt wurden die Präparate mit der Feulgen Reaktion (gegengefärbt mit Fast Green) und pro Probe 1500 Zellen ausgewertet. Die Mundschleimhautzellen zeigten eine MN-Rate von $0,046 \pm 0,17$ pro 1000 Zellen vor Exposition und $0,60 \pm 1,27$ pro 1000 Zellen am Ende des Kurses ($p < 0,05$; Wilcoxon Rangsummentest). Die MN-Rate der Kontrollen bzw. vor Exposition waren in dieser Studie extrem niedrig, außerdem wurden erhöhte MN-Raten nur in Männer und nicht in Frauen gefunden. Der positive Effekt war auch bedingt durch einen Nullwert (0,0) in den Kontrollen. Die MN-Raten in Nasenschleimhautzellen waren nicht signifikant erhöht. Präparate aus dieser Studie wurden auch später von Titenko-Holland und Kollegen ausgewertet (Titenko-Holland et al., 1996). Sie verwendeten zusätzlich die FISH-Technik mit einer Zentromersonde, um zwischen klastogenen (Zentromer-negative MN) und aneugenen (Zentromer-positiven MN) Effekten unterscheiden zu können. Obwohl eine vollständige Auswertung der Mundschleimhautpräparate nur von 19 Probanden möglich war und bei den Nasenschleimhautpräparaten nur von 13 Probanden und außerdem verschieden viele Zellen ausgewertet wurden (von 500 bis 5000 Zellen), sind die Ergebnisse von Suruda und Kollegen (Suruda et al., 1993) grundsätzlich bestätigt worden. Die MN-Raten in Mundschleimhautzellen waren nach Exposition statistisch signifikant höher ($0,6 \pm 0,5$ gegenüber $2,0 \pm 2,0$;

Zellen mit MN pro 1000 ausgewertete Zellen; $p=0,007$; Wilcoxon Ranksummentest) und es gab ebenfalls keinen statistisch signifikanten Unterschied in Nasenschleimhautzellen. In einer weiteren Arbeit von Burgaz und Kollegen (Burgaz et al. 2002) wurde die MN-Raten in Mundschleimhautzellen von 28 Personen (12 Raucher; 16 Nichtraucher), die an ihrem Arbeitsplatz in der Anatomie und Pathologie mit FA (2-4 ppm) exponiert waren, bestimmt. Die durchschnittliche Expositionsdauer war zwischen 1 und 13 Jahren (Mittelwert $4,7 \pm 3,33$ Jahre) zum Zeitpunkt der Untersuchung. Die Effekte wurden mit einer aus 18 Personen bestehenden, nicht FA-exponierten Kontrollgruppe (7 Raucher; 11 Nichtraucher) verglichen. Mundschleimhautzellen wurden mit einem befeuchteten Holzspatel aus den Wangentaschen entnommen und die Ausstriche mit Feulgen/Fast Green gefärbt. Pro Proband wurden 300 Zellen ausgewertet: Die MN-Raten von den Arbeitern waren statistisch signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe ($7,1 \pm 0,56$ gegenüber $3,3 \pm 0,30$ pro 1000 Zellen; $p<0,05$; Mann-Whitney Test).

Die Expositionsbedingungen in der Studie dieser Arbeit waren klar definiert und genauestens kontrolliert. Die Spitzenkonzentration betrug 1 ppm bzw. 0,6 ppm an zwei Tagen und die kumulative Dosis über 10 aufeinanderfolgende Arbeitstage war $13,5 \text{ ppm h}$ ($6,75 \text{ ppm h}$ Durchschnittskonzentration pro Woche). Dies ist möglicherweise etwas niedriger, als in den beiden bereits veröffentlichten Studien (Suruda et al., 1993; Burgaz et al. 2002), aber die Exposition bewegt sich in derselben Größenordnung. Es ist allerdings unbekannt, ob für die Induktion von MN die Exposition der Basalschicht mit Konzentrationsspitzen maßgeblich ist oder ob es die Expositionsdauer und möglicherweise kumulative Effekte sind. Die Frage, ob FA-induzierte DNA-Schäden (DPX) in den Zellen der Basalschicht während der Expositionsperiode akkumulieren können oder ob FA in diesen Zellen schnell abgebaut wird bzw. die DPX repariert werden und so eine MN-Induktion verhindern, ist ebenfalls unbekannt. Zusammenfassend kann man sagen, dass FA im untersuchten Konzentrationsbereich und unter den Bedingungen des Experiments keine MN in Mundschleimhautzellen induziert, für höhere Konzentrationen kann man keine Aussagen treffen.

Die Arbeitsgruppe von Professor Triebig (Heidelberg) untersuchte parallel in diesem Versuch die lokale Reizwirkung von FA beim Menschen. Sie fand als

empfindlichsten Parameter die Reizung der Augen ab einer FA-Konzentration von 0,5 ppm mit Expositionsspitzen von 1 ppm. Ein „no-observed-effect level“ (NOEL), also eine Konzentration, bei der kein Effekt von FA festgestellt werden konnte, wurde bei 0,5 ppm im Fall von FA-Dauerexposition gefunden. Beim Vorhandensein von kurzzeitigen FA-Expositionsspitzen von 0,6 ppm wurde der NOEL auf 0,3 ppm festgelegt (Lang et al., 2008). Die Reizung der Augen, als empfindlichster bisher gefundener Parameter der FA-Wirkung, ist vom Gefährdungspotential sehr weit weg von der Induktion von Zytotoxizität oder Genotoxizität. Daher kann, vom wissenschaftlichen Standpunkt her, nach den hier gewonnenen Erkenntnissen die FA-Konzentration von 0,5 ppm als sicher für den Menschen angesehen werden. Die MAK-Kommission argumentierte gleich, da sie aber auf ältere Ergebnisse eines Expertengremiums (Paustenbach et al., 1997) zur Beurteilung der Reizwirkung von FA zurückgriff, legte sie den Wert auf 0,3 ppm (=NOEL bei täglicher FA-Exposition von 8 Stunden) fest (MAK, 2000). Die Ergebnisse von Lang und Kollegen lässt die mögliche Schlussfolgerung zu, dass der NOEL für die FA-Reizwirkung auf die Augen tatsächlich höher als 0,3 ppm liegt. Nicht berücksichtigt wurde allerdings in der Arbeit von Lang und Kollegen eine denkbare Variabilität der Sensitivität der FA-Reizwirkung zwischen Individuen, d.h. dass möglicherweise besonders empfindliche Personen schon bei niedrigeren FA-Konzentrationen eine Reizwirkung spüren. Dies müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Formaldehyd (FA) ist eine in der Industrie im großen Umfang hergestellte und verwendete Chemikalie, die aber auch natürlicherweise in Zellen vorkommt. FA kann zytotoxische und genotoxische Effekte hervorrufen, der hauptsächlich induzierte primäre DNA-Schaden sind die DNA-Protein-Crosslinks (DPX). FA wird offiziell als krebserregend für den Menschen eingestuft. Während die in epidemiologischen Studien am Menschen erhobenen Daten unterschiedlich interpretiert werden, ist die Kanzerogenität von FA im Tierversuch eindeutig belegt. Zum Mechanismus der kanzerogenen Wirkung und zur Bedeutung der Genotoxizität / Mutagenität für die Kanzerogenese gibt es unterschiedliche Vorstellungen.

Da FA eine kurze Halbwertszeit hat und in Zellen schnell und effektiv metabolisch inaktiviert wird, könnte es für die genotoxische Wirkung einen Schwellenwert geben. Untersuchungen zur Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von FA in verschiedenen Genotoxizitätstests (Comet Assay, Mikronukleus-Test [MNT], Schwesterchromatidaustausch-Test [SCE-Test]) wiesen auf einen Mechanismus mit Schwellenwert hin. Das Anpassen verschiedener Modell-Kurven an die Daten legte für den SCE-Test und den MNT eine Konzentrations-Effekt-Beziehung mit Schwellenwert nahe. Ein Vergleich der FA-Konzentrationen, die in diesen Tests genotoxische Effekte auslösen, mit denen, die in Zytotoxizitätstests Effekte zeigen, legt den Schluss nahe, dass genotoxische Effekte erst dann auftreten, wenn auch zytotoxische Effekte gemessen werden.

FA-induzierte DPX werden in A549 Zellen schnell (innerhalb von 8 bis 24 Stunden) repariert und zu einer Akkumulation kommt es nur nach wiederholter Exposition gegenüber hohen FA-Konzentrationen, die die zelluläre Reparaturkapazität überfordern. Kultivierte primäre humane Nasenepithelzellen zeigen eine vergleichbare Reparaturkapazität für FA-induzierte DPX, wie die A549 Zelllinie.

Die Expression von drei Genen, die für die wichtigsten FA-abbauenden Enzyme kodieren (Glutathion-abhängige Formaldehyd-Dehydrogenase, Aldehyd-Dehydrogenase 1A1, Aldehyd-Dehydrogenase 2) wurden 1, 4 und 24 Stunden nach Zugabe verschiedener FA-Konzentrationen in das Zellkulturmedium mit Real

Time PCR untersucht. Eine Änderung der Transkription als Folge der FA-Exposition war nicht nachweisbar.

Obwohl eine systemische Genotoxizität von FA aufgrund der bisher bekannten Wirkungsmechanismen als unwahrscheinlich gilt, wurden Biomonitoring Studien publiziert, die genotoxische Effekte in Zellen des peripheren Blutes gemessen haben. In einem *ex vivo* Ansatz konnte jetzt gezeigt werden, dass zu Beginn der Blutkultur hohe FA-Konzentrationen im Serum bzw. in den Zellen, oder Zellen mit einer großen Menge an FA-induzierten DPX vorhanden sein müssen, damit eine Zunahme zytogenetischer Effekte (SCE, Mikronuklei) gemessen werden kann. Da es unter *in vivo* Bedingungen nicht zu einer entsprechenden Exposition der Lymphozyten kommt und ggf. vorhandene DPX während der Kultur durch Reparatur und Hydrolyse entfernt werden, sind zytogenetische Effekte nach *in vivo* Exposition nicht zu erwarten.

Eine FA-Inhalationsstudie an freiwilligen Probanden (FA-Exposition bis zu 1 ppm; kumulative Dosis 13,5 ppm h über zwei Wochen), die unter streng kontrollierten Bedingungen entsprechend „good laboratory practice“ (GLP) durchgeführt wurde, ergab keinen Hinweis auf die Induktion von MN in Mundschleimhautzellen. Damit konnte gezeigt werden, dass FA unter Expositionsbedingungen, die am Arbeitsplatz vorkommen können, nicht zu mutagenen Effekten in Zellen der Mundschleimhaut führt. Da die Induktion von Mikronuklei ein sensitiver Indikator für die mutagene Wirkung von FA ist, kann eine lokale mutagene Wirkung für den Menschen unter diesen Bedingungen ausgeschlossen werden.

6 Literaturverzeichnis

- [1] Achkor,H., Diaz,M., Fernandez,M.R., Biosca,J.A., Pares,X., Martinez,M.C. Enhanced formaldehyde detoxification by overexpression of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from Arabidopsis, *Plant Physiol.* 132: 2248-2255 (2003)
- [2] Barber,R.D., Donohue,T.J. Pathways for transcriptional activation of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase gene, *J.Mol.Biol.* 280: 775-784 (1998)
- [3] Barker,S., Weinfeld,M., Murray,D. DNA-protein crosslinks: their induction, repair, and biological consequences, *Mutat.Res.* 589: 111-135 (2005)
- [4] Bateman,R., Rauh,D., Shokat,K.M. Glutathione traps formaldehyde by formation of a bicyclo[4.4.1]undecane adduct, *Org.Biomol.Chem.* 5: 3363-3367 (2007)
- [5] Bauchinger,M., Schmid,E. Cytogenetic effects in lymphocytes of formaldehyde workers of a paper factory, *Mutat.Res.* 158: 195-199 (1985)
- [6] Blair,A., Stewart,P., O'Berg,M., Gaffey,W., Walrath,J., Ward,J., Bales,R., Kaplan,S., Cubit,D. Mortality among industrial workers exposed to formaldehyde, *J.Natl.Cancer Inst.* 76: 1071-1084 (1986)
- [7] Bogdanffy,M.S., Randall,H.W., Morgan,K.T. Histochemical localization of aldehyde dehydrogenase in the respiratory tract of the Fischer-344 rat, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 82: 560-567 (1986)
- [8] Bosetti,C., McLaughlin,J.K., Tarone,R.E., Pira,E., La Vecchia,C. Formaldehyde and cancer risk: a quantitative review of cohort studies through 2006, *Ann.Oncol.* 19: 29-43 (2008)

- [9] Bundesinstitut für Risikobewertung (BfR): Assessment of the Carcinogenicity of Formaldehyde [CAS No. 50-00-0]. BfR - Hausdruckerei Dahlem, Berlin, S. 1-150 (2006)
- [10] Burgaz,S., Erdem,O., Cakmak,G., Erdem,N., Karakaya,A., Karakaya,A.E. Cytogenetic analysis of buccal cells from shoe-workers and pathology and anatomy laboratory workers exposed to n-hexane, toluene, methyl ethyl ketone and formaldehyde, *Biomarkers* 7: 151-161 (2002)
- [11] Casanova-Schmitz,M., David,R.M., Heck,H.D. Oxidation of formaldehyde and acetaldehyde by NAD⁺-dependent dehydrogenases in rat nasal mucosal homogenates, *Biochem.Pharmacol.* 33: 1137-1142 (1984)
- [12] Casanova,M., Heck,H. Further studies of the metabolic incorporation and covalent binding of inhaled [3H]- and [14C]formaldehyde in Fischer-344 rats: effects of glutathione depletion, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 89: 105-121 (1987)
- [13] Casanova,M., Heck,H.D., Everitt,J.I., Harrington,W.W., Jr., Popp,J.A. Formaldehyde concentrations in the blood of rhesus monkeys after inhalation exposure, *Food Chem.Toxicol.* 26: 715-716 (1988)
- [14] Casanova,M., Deyo,D.F., Heck,H.D. Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the nasal mucosa of Fischer 344 rats: analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation, *Fundam.Appl.Toxicol.* 12: 397-417 (1989)
- [15] Casanova,M., Morgan,K.T., Steinhagen,W.H., Everitt,J.I., Popp,J.A., Heck,H.D. 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 (1991)

- [16] Casanova,M., Morgan,K.T., Gross,E.A., Moss,O.R., Heck,H.A. 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 (1994)
- [17] Coggon,D., Harris,E.C., Poole,J., Palmer,K.T. Extended follow-up of a cohort of british chemical workers exposed to formaldehyde, *J.Natl.Cancer Inst.* 95: 1608-1615 (2003)
- [18] Craft,T.R., Bermudez,E., Skopek,T.R. Formaldehyde mutagenesis and formation of DNA-protein crosslinks in human lymphoblasts in vitro, *Mutat.Res.* 176: 147-155 (1987)
- [19] Dalbey,W.E. Formaldehyde and tumors in hamster respiratory tract, *Toxicology* 24: 9-14 (1982)
- [20] Dallas,C.E., Scott,M.J., Ward,J.B., Jr., Theiss,J.C. Cytogenetic analysis of pulmonary lavage and bone marrow cells of rats after repeated formaldehyde inhalation, *J.Appl.Toxicol.* 12: 199-203 (1992)
- [21] de Kok,J.B., Roelofs,R.W., Giesendorf,B.A., Pennings,J.L., Waas,E.T., Feuth,T., Swinkels,D.W., Span,P.N. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes, *Lab Invest* 85: 154-159 (2005)
- [22] DeVoney,D., Jinot,J., Keshava, C., Hsu, C., Whalen,J., Vandenberg, J. A hypothesized mode in support of the biological plausibility of formaldehyde-induced lymphohematopoietic malignancies. 2006. Society for Risk Analysis, Baltimore, MD.
- [23] DeVoney,D., Vandenberg, J., Whalen, W. Hypothesized mode of action for formaldehyde-induced lymphoid malignancies. 2006. Society of Toxicology Annual Meeting, San Diego, CA.

- [24] Dicker,E., Cederbaum,A.I. Inhibition of the low-Km mitochondrial aldehyde dehydrogenase by diethyl maleate and phorone in vivo and in vitro. Implications for formaldehyde metabolism, *Biochem.J.* 240: 821-827 (1986)
- [25] Edenberg,H.J. Regulation of the mammalian alcohol dehydrogenase genes, *Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.* 64: 295-341 (2000)
- [26] Fenech,M., Holland,N., Chang,W.P., Zeiger,E., Bonassi,S. 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 (1999)
- [27] Gibson,J.E. Coordinated toxicology: An example study with formaldehyde, *Concepts Toxicol.* 1: 276-282 (1984)
- [28] Grafström,R.C., Jernelöv,M.I.D.J.M., Sundqvist,K., Atzori,L., Zheng,X.: Aldehyde toxicity and thiol redox state in cell cultures from human aerodigestive tract, in: U.Mohr, K.B.Adler, D.I.Dungworth, C.C.Harris, C.G.Plopper, R.Saracci (Hrsg), *Correlations Between In Vitro and In Vivo Investigations in Inhalation Toxicology*, ILSI Press, Washington DC, S. 319-336 (1996)
- [29] Harris,D., Robinson,J.R. Drug delivery via the mucous membranes of the oral cavity, *J.Pharm.Sci.* 81: 1-10 (1992)
- [30] Hartmann,A., Speit,G. The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay), *Toxicol.Lett.* 90: 183-188 (1997)
- [31] Hauptmann,M., Lubin,J.H., Stewart,P.A., Hayes,R.B., Blair,A. Mortality from lymphohematopoietic malignancies among workers in formaldehyde industries, *J.Natl.Cancer Inst.* 95: 1615-1623 (2003)
- [32] Hauptmann,M., Lubin,J.H., Stewart,P.A., Hayes,R.B., Blair,A. Mortality from solid cancers among workers in formaldehyde industries, *Am.J.Epidemiol.* 159: 1117-1130 (2004)

- [33] He,J.L., Jin,L.F., Jin,H.Y. Detection of cytogenetic effects in peripheral lymphocytes of students exposed to formaldehyde with cytokinesis-blocked micronucleus assay, *Biomed. Environ. Sci.* 11: 87-92 (1998)
- [34] Heck,H., Casanova,M. The implausibility of leukemia induction by formaldehyde: a critical review of the biological evidence on distant-site toxicity, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 40: 92-106 (2004)
- [35] Heck,H.D., White,E.L., Casanova-Schmitz,M. Determination of formaldehyde in biological tissues by gas chromatography/mass spectrometry, *Biomed. Mass Spectrom.* 9: 347-353 (1982)
- [36] Heck,H.D., Casanova-Schmitz,M., Dodd,P.B., Schachter,E.N., Witek,T.J., Tosun,T. Formaldehyde (CH₂O) concentrations in the blood of humans and Fischer-344 rats exposed to CH₂O under controlled conditions, *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 46: 1-3 (1985)
- [37] Hedberg,J.J., Hoog,J.O., Nilsson,J.A., Xi,Z., Elfving,A., Grafstrom,R.C. Expression of alcohol dehydrogenase 3 in tissue and cultured cells from human oral mucosa, *Am. J. Pathol.* 157: 1745-1755 (2000)
- [38] Hedberg,J.J., Höög,J.O., Grafström,R.C.: Assessment of formaldehyde metabolizing enzymes in human oral mucosa and cultured oral keratinocytes indicate high capacity for detoxification of formaldehyde, in: U.Heinrich, U.Mohr (Hrsg), *Crucial Issues in Inhalation Research - Mechanistic, Clinical and Epidemiologic*, Fraunhofer IRB Verlag, Stuttgart, S. 103-115 (2002)
- [39] Hester,S.D., Benavides,G.B., Yoon,L., Morgan,K.T., Zou,F., Barry,W., Wolf,D.C. Formaldehyde-induced gene expression in F344 rat nasal respiratory epithelium, *Toxicology* 187: 13-24 (2003)
- [40] Hester,S.D., Barry,W.T., Zou,F., Wolf,D.C. Transcriptomic analysis of F344 rat nasal epithelium suggests that the lack of carcinogenic response to glutaraldehyde is due to its greater toxicity compared to formaldehyde, *Toxicol. Pathol.* 33: 415-424 (2005)

- [41] Hu,Y., Kabler,S.L., Tennant,A.H., Townsend,A.J., Kligerman,A.D. Induction of DNA-protein crosslinks by dichloromethane in a V79 cell line transfected with the murine glutathione-S-transferase theta 1 gene, *Mutat.Res.* 607: 231-239 (2006)
- [42] IARC (International Agency for Research on Cancer): Formaldehyde, 2-Butoxyethanol and 1-tert-Butoxypropan-2-ol, in: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Band 88*, IARC Press, Lyon, S. 39-325 (2006)
- [43] Jenkins,G.J., Doak,S.H., Johnson,G.E., Quick,E., Waters,E.M., Parry,J.M. Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents?, *Mutagenesis* 20: 389-398 (2005)
- [44] Jin,F., Zhu,R. Cytogenetic effects of formaldehyde on the peripheral blood lymphocytes among industrial workers, *Chin.J.Indust.Hygiene.Occ.Disease* 10: 277-281 (1992)
- [45] Kerns,W.D., Pavkov,K.L., Donofrio,D.J., Gralla,E.J., Swenberg,J.A. Carcinogenicity of formaldehyde in rats and mice after long-term inhalation exposure, *Cancer Res.* 43: 4382-4392 (1983)
- [46] Kimbell,J.S., Gross,E.A., Joyner,D.R., Godo,M.N., Morgan,K.T. Application of computational fluid dynamics to regional dosimetry of inhaled chemicals in the upper respiratory tract of the rat, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 121: 253-263 (1993)
- [47] Kitaeva,L.V., Kitaev,E.M., Pimenova,M.N. [The cytopathic and cytogenetic sequelae of chronic inhalational exposure to formaldehyde on female germ cells and bone marrow cells in rats], *Tsitologiya* 32: 1212-1216 (1990)
- [48] Kitaeva,L.V., Mikheeva,E.A., Shelomova,L.F., Shvartsman,P.I. [Genotoxic effect of formaldehyde in somatic human cells in vivo], *Genetika* 32: 1287-1290 (1996)

- [49] Kligerman,A.D., Phelps,M.C., Erexson,G.L. Cytogenetic analysis of lymphocytes from rats following formaldehyde inhalation, *Toxicol.Lett.* 21: 241-246 (1984)
- [50] Kulle,T.J. Acute odor and irritation response in healthy nonsmokers with formaldehyde exposure., *Inhal.Toxicol.* 5: 323-332 (1993)
- [51] Kwon,H.S., Kim,M.S., Edenberg,H.J., Hur,M.W. Sp3 and Sp4 can repress transcription by competing with Sp1 for the core cis-elements on the human ADH5/FDH minimal promoter, *J.Biol.Chem.* 274: 20-28 (1999)
- [52] Lang,I., Bruckner,T., Triebig,G. Formaldehyde and chemosensory irritation in humans: a controlled human exposure study, *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 50: 23-36 (2008)
- [53] Lee,D.K., Suh,D., Edenberg,H.J., Hur,M.W. POZ domain transcription factor, FBI-1, represses transcription of ADH5/FDH by interacting with the zinc finger and interfering with DNA binding activity of Sp1, *J.Biol.Chem.* 277: 26761-26768 (2002)
- [54] Lee,M.H., Kim,Y.A., Na,T.Y., Kim,S.H., Shin,Y.K., Lee,B.H., Shin,H.S., Lee,M.O. Identification of formaldehyde-responsive genes by suppression subtractive hybridization, *Toxicology* 243: 224-235 (2008)
- [55] Lieber,M., Smith,B., Szakal,A., Nelson-Rees,W., Todaro,G. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells, *Int.J.Cancer* 17: 62-70 (1976)
- [56] Liu,Y., Li,C.M., Lu,Z., Ding,S., Yang,X., Mo,J. Studies on formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks, *Front Biosci.* 11: 991-997 (2006)
- [57] Lovell,D.P. Dose-response and threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: statistical models and study design, *Mutat.Res.* 464: 87-95 (2000)

- [58] Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Randall,H.W., Randall,H.W. Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J.Biol.Chem.* 193: 265-275 (1951)
- [59] Madle,S., Kasper,P., Pabel,U., Speit,G.: Strategies for the Evaluation of Genotoxicity, in: H.Greimer, R.Snyder (Hrsg), *Toxicology and Risk Assessment, A comprehensive Introduction*, Wiley Verlag, S. 406-417 (2008)
- [60] MAK (Kommission für die maximale Arbeitsplatzkonzentration): *Formaldehyd*. Wiley-VCH Verlag, Weinheim, S. 1-40 (2000)
- [61] Marsh,G.M., Youk,A.O., Morfeld,P. Mis-specified and non-robust mortality risk models for nasopharyngeal cancer in the National Cancer Institute formaldehyde worker cohort study, *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 47: 59-67 (2007)
- [62] Merk,O., Speit,G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis, *Environ.Mol.Mutagen.* 32: 260-268 (1998)
- [63] Merk,O., Speit,G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity, *Environ.Mol.Mutagen.* 33: 167-172 (1999)
- [64] Migliore,L., Ventura,L., Barale,R., Loprieno,N., Castellino,S., Pulci,R. Micronuclei and nuclear anomalies induced in the gastro-intestinal epithelium of rats treated with formaldehyde, *Mutagenesis* 4: 327-334 (1989)
- [65] Monticello,T.M., Swenberg,J.A., Gross,E.A., Leininger,J.R., Kimbell,J.S., Seilkop,S., Starr,T.B., Gibson,J.E., Morgan,K.T. Correlation of regional and nonlinear formaldehyde-induced nasal cancer with proliferating populations of cells, *Cancer Res.* 56: 1012-1022 (1996)

- [66] Morgan,K.T., Kimbell,J.S., Monticello,T.M., Patra,A.L., Fleishman,A. Studies of inspiratory airflow patterns in the nasal passages of the F344 rat and rhesus monkey using nasal molds: relevance to formaldehyde toxicity, *Toxicol.Appl.Pharmacol.* 110: 223-240 (1991)
- [67] Mukerjee,N., Pietruszko,R. Human mitochondrial aldehyde dehydrogenase substrate specificity: comparison of esterase with dehydrogenase reaction, *Arch.Biochem.Biophys.* 299: 23-29 (1992)
- [68] Nakano,T., Morishita,S., Katafuchi,A., Matsubara,M., Horikawa,Y., Terato,H., Salem,A.M., Izumi,S., Pack,S.P., Makino,K., Ide,H. Nucleotide excision repair and homologous recombination systems commit differentially to the repair of DNA-protein crosslinks, *Mol.Cell* 28: 147-158 (2007)
- [69] Natarajan,A.T., Darroudi,F., Bussman,C.J., van Kesteren-van Leeuwen AC. Evaluation of the mutagenicity of formaldehyde in mammalian cytogenetic assays in vivo and vitro, *Mutat.Res.* 122: 355-360 (1983)
- [70] Neri,M., Bonassi,S., Knudsen,L.E., Sram,R.J., Holland,N., Ugolini,D., Merlo,D.F. Children's exposure to environmental pollutants and biomarkers of genetic damage. I. Overview and critical issues, *Mutat.Res.* 612: 1-13 (2006)
- [71] Neter,J., Kutner,M.H., Nachtsheim,C.J., Wassermann,W.: Diagnostic and Remedial Measures, in: *Applied Linear Statistical Models*, McGraw-Hill/Irwin, S. 115-124 (1996)
- [72] Neuberger,A.: The metabolism of glycin and serin, in: A.Neuberger, L.L.M.van Deenen (Hrsg), *Comprehensive Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam, S. 257-303 (1981)
- [73] Neuss,S., Speit,G. Further characterization of the genotoxicity of formaldehyde in vitro by the sister chromatid exchange test and co-cultivation experiments, *Mutagenesis* 23: 355-357 (2008)

- [74] Nilsson,J.A., Zheng,X., Sundqvist,K., Liu,Y., Atzori,L., Elfving,A., Arvidson,K., Grafström,R.C. Toxicity of formaldehyde to human oral fibroblasts and epithelial cells: Influences of culture conditions and role of thiol status, *J.dent.Res.* 77: 1896-1903 (1998)
- [75] Orsiere,T., Sari-Minodier,I., Iarmarcovai,G., Botta,A. Genotoxic risk assessment of pathology and anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde by use of personal air sampling and analysis of DNA damage in peripheral lymphocytes, *Mutat.Res.* 605: 30-41 (2006)
- [76] Patterson,D.L., Gross,E.A., Bogdanffy,M.S. Retention of formaldehyde gas by the nasal passages of F-344 rats, *Toxicologist* 6: 55 (1986)
- [77] Paustenbach,D., Alarie,Y., Kulle,T., Schachter,N., Smith,R., Swenberg,J., Witschi,H., Horowitz,S.B. A recommended occupational exposure limit for formaldehyde based on irritation, *J.Toxicol.Environ.Health* 50: 217-263 (1997)
- [78] Pfuhler,S., Wolf,H.U. Detection of DNA-crosslinking agents with the alkaline comet assay, *Environ.Mol.Mutagen.* 27: 196-201 (1996)
- [79] Preuss,P.W., Dailey,R.L., Lehman,E.S.: Exposure to formaldehyde, in: V.Turoski (Hrsg), *Formaldehyde: analytical chemistry and toxicology*, American Chemical Society, Washington DC, S. 247-259 (1985)
- [80] Pyatt,D., Natelson,E., Golden,R. Is inhalation exposure to formaldehyde a biologically plausible cause of lymphohematopoietic malignancies?, *Regul.Toxicol.Pharmacol.* 51: 119-133 (2008)
- [81] Quievryn,G., Zhitkovich,A. Loss of DNA-protein crosslinks from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function, *Carcinogenesis* 21: 1573-1580 (2000)

- [82] Radonic,A., Thulke,S., Mackay,I.M., Landt,O., Siegert,W., Nitsche,A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR, *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 313: 856-862 (2004)
- [83] Ridpath,J.R., Nakamura,A., Tano,K., Luke,A.M., Sonoda,E., Arakawa,H., Buerstedde,J.M., Gillespie,D.A., Sale,J.E., Yamazoe,M., Bishop,D.K., Takata,M., Takeda,S., Watanabe,M., Swenberg,J.A., Nakamura,J. Cells deficient in the FANC/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde, *Cancer Res.* 67: 11117-11122 (2007)
- [84] Schempp,W., Vogel,W. Difference between diploid and aneuploid Chinese hamster cells in replication at mid-S-phase, *Chromosoma* 73: 109-115 (1976)
- [85] Schmid,E., Goggelmann,W., Bauchinger,M. Formaldehyde-induced cytotoxic, genotoxic and mutagenic response in human lymphocytes and *Salmonella typhimurium*, *Mutagenesis* 1: 427-431 (1986)
- [86] Schmid,O., Speit,G. Genotoxic effects induced by formaldehyde in human blood and implications for the interpretation of biomonitoring studies, *Mutagenesis* 22: 69-74 (2007)
- [87] Shaham,J., Bomstein,Y., Meltzer,A., Kaufman,Z., Palma,E., Ribak,J. DNA--protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde--in vitro and in vivo studies, *Carcinogenesis* 17: 121-125 (1996)
- [88] Shaham,J., Bomstein,Y., Melzer,A., Ribak,J. DNA-Protein Crosslinks and Sister Chromatid Exchanges as Biomarkers of Exposure to Formaldehyde, *Int.J.Occup.Environ.Health* 3: 95-104 (1997)
- [89] Shaham,J., Bomstein,Y., Gurvich,R., Rashkovsky,M., Kaufman,Z. DNA-protein crosslinks and p53 protein expression in relation to occupational exposure to formaldehyde, *Occup.Environ.Med.* 60: 403-409 (2003)
- [90] Shojaei,A.H. Buccal mucosa as a route for systemic drug delivery: a review, *J.Pharm.Pharm.Sci.* 1: 15-30 (1998)

- [91] Singh,N.P., McCoy,M.T., Tice,R.R., Schneider,E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Exp.Cell Res.* 175: 184-191 (1988)
- [92] Speit,G., Habermeier,B., Helbig,R. Differences in the response to mutagens between two V79 sublines, *Mutat.Res.* 325: 105-111 (1994)
- [93] Speit,G., Schutz,P., Merk,O. Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair-deficient human cell lines, *Mutagenesis* 15: 85-90 (2000)
- [94] Speit,G., Merk,O. Evaluation of mutagenic effects of formaldehyde in vitro: detection of crosslinks and mutations in mouse lymphoma cells, *Mutagenesis* 17: 183-187 (2002)
- [95] Speit,G., Schmid,O. Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells, *Mutat.Res.* 613: 1-9 (2006)
- [96] Speit,G., Hartmann,A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair, *Methods Mol.Biol.* 314: 275-286 (2006)
- [97] Speit,G., Schmid,O., Neuss,S., Schutz,P. Genotoxic effects of formaldehyde in the human lung cell line A549 and in primary human nasal epithelial cells, *Environ.Mol.Mutagen.* 49: 300-307 (2008)
- [98] Stecca,C., Gerber,G.B. Adaptive response to DNA-damaging agents: a review of potential mechanisms, *Biochem.Pharmacol.* 55: 941-951 (1998)
- [99] Suruda,A., Schulte,P., Boeniger,M., Hayes,R.B., Livingston,G.K., Steenland,K., Stewart,P., Herrick,R., Douthit,D., Fingerhut,M.A. Cytogenetic effects of formaldehyde exposure in students of mortuary science, *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* 2: 453-460 (1993)

- [100] Titenko-Holland,N., Levine,A.J., Smith,M.T., Quintana,P.J., Boeniger,M., Hayes,R., Suruda,A., Schulte,P. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde, *Mutat.Res.* 371: 237-248 (1996)
- [101] Trenz,K., Lugowski,S., Jahrsdorfer,U., Jainta,S., Vogel,W., Speit,G. Enhanced sensitivity of peripheral blood lymphocytes from women carrying a BRCA1 mutation towards the mutagenic effects of various cytostatics, *Mutat.Res.* 544: 279-288 (2003)
- [102] Uotila,L., Koivusalo,M. Formaldehyde dehydrogenase from human liver. Purification, properties, and evidence for the formation of glutathione thiol esters by the enzyme, *J.Biol.Chem.* 249: 7653-7663 (1974)
- [103] Uotila,L., Koivusalo,M. Multiple forms of formaldehyde dehydrogenase from human red blood cells, *Hum.Hered.* 37: 102-106 (1987)
- [104] Uotila,L., Koivusalo,M. Expression of formaldehyde dehydrogenase and S-formylglutathione hydrolase activities in different rat tissues, *Adv.Exp.Med.Biol.* 414: 365-371 (1997)
- [105] Vandesompele,J., De Preter,K., Pattyn,F., Poppe,B., Van Roy,N., De Paepe,A., Speleman,F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes, *Genome Biol.* 3: RESEARCH0034 (2002)
- [106] Wehner,E., Brendel,M. Formaldehyde lacks genotoxicity in formaldehyde-hyperresistant strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mutat.Res.* 289: 91-96 (1993)
- [107] Yager,J.W., Cohn,K.L., Spear,R.C., Fisher,J.M., Morse,L. Sister-chromatid exchanges in lymphocytes of anatomy students exposed to formaldehyde-embalming solution, *Mutat.Res.* 174: 135-139 (1986)

- [108] Ye,X., Yan,W., Xie,H., Zhao,M., Ying,C. Cytogenetic analysis of nasal mucosa cells and lymphocytes from high-level long-term formaldehyde exposed workers and low-level short-term exposed waiters, *Mutat.Res.* 588: 22-27 (2005)

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Zeit im Institut für Humangenetik unterstützt haben.

Zuallererst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Günter Speit für die Aufnahme in seine tolle Arbeitsgruppe, für die Vergabe der interessanten Aufgabenstellung und besonders für die professionelle Betreuung herzlich bedanken. Bei Problemen und Fragen hast Du Dir immer Zeit für mich genommen. Ebenfalls möchte ich Dir für die Möglichkeit der Teilnahme an unterschiedlichen Fortbildungen und Tagungen danken. Ich habe in den letzten drei Jahren mit sehr viel Freude bei Dir gelernt.

Herrn Prof. Dr. Walter Vogel möchte ich für die Aufnahme in das Institut für Humangenetik danken, sowie für die finanzielle Förderung, welche mir die Teilnahme an Fortbildungen und Tagungen ermöglichte.

Mein Dank gilt außerdem Herrn Prof. Dr. Holger Barth für seine Bereitschaft, das Zweitgutachten zu übernehmen.

Ganz herzlich möchte ich mich für Ihre vielseitige Unterstützung in einer Vielzahl von Dingen bei meinen lieben Kolleginnen aus der Arbeitsgruppe bedanken, die da waren: Monika Dodrimont-Lattke, Manuela Fröhler-Keller, Heike Hoffmann, Evelyn Jäger, Simone Neuss, Petra Schütz und Jasmin Zeller. Besonders dankbar bin ich Ihnen, neben Ihrer Unterstützung im Labor und im wissenschaftlichen Bereich, auch für die Tipps in Sachen Gesundheit, Mode, Joggen, Essen und Technischem. Danke auch für die Einweisung in die Geheimnisse der positiven Energie.

Herrn PD Dr. Josef Högel danke ich sehr für seine Unterstützung bei den mathematischen Aspekten meiner Arbeit. Mein Dank gilt auch unserem Systemadministrator Herrn Herbert Heinz, der mir bei Computerproblemen eine große Hilfe war.

Ebenfalls vielen Dank an alle anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeiter des Instituts für Humangenetik für Ihre Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit.

Joachim Forner möchte ich für die vielen interessanten Diskussionen und für unsere gemeinsamen Expeditionen der kulinarischen Art danken.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meinen Brüdern Martin und Tobias, die mich in diesen Jahren besonders unterstützt haben.

Publikationen

Speit G, Schmid O: Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells. *Mutat Res.* 613: 1-9 (2006)

Schmid O, Speit G: Genotoxic effects induced by formaldehyde in human blood and implications for the interpretation of biomonitoring studies. *Mutagenesis.* 22: 69-74 (2007)

Speit G, Schmid O, Fröhler-Keller M, Lang I, Triebig G: Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. *Mutat Res.* 627: 129-135 (2007)

Speit G, Schütz P, Högel J, Schmid O: Characterization of the genotoxic potential of formaldehyde in V79 cells. *Mutagenesis.* 22: 387-394 (2007)

Speit G, Neuss S, Schütz P, Fröhler-Keller M, Schmid, O: The genotoxic potential of glutaraldehyde in mammalian cells in vitro in comparison with formaldehyde. *Mutat Res.* 649: 146-154 (2008)

Speit G, Schmid O, Neuss S, Schütz P: Genotoxic effects of formaldehyde in the human lung cell line A549 and in primary human nasal epithelial cells. *Environ Mol Mutagen.* 49: 300-307 (2008)

Posterbeiträge

7. International Comet Assay Workshop, Colerain, Nordirland, 2007:

“Characterization of DNA-Protein Crosslinks induced by Formaldehyde in A549 cells”

37. Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (EEMS), Basel, Schweiz, 2007:

“Genotoxic Effekts of Formaldehyde in cultured human lung (A549) cells”