DIE PRÄMATURE CHROMOSOMENKONDENSATION (PCC)

UNTERSUCHUNGEN ZUM EINSATZ IN DER MUTAGENITÄTSTESTUNG

Vom Fachbereich Biologie der Universität Kaiserslautern
zur Erlangung des akademischen Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"
genehmigte Dissertation
(D 386)

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Eva Ritter

Kaiserslautern 1999

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 02. Juli 1999

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr.H.J. Schmidt
Erster Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. H. Zankl
Zweiter Berichterstatter: Prof. Dr. J. A. Cullum

Diese Dissertation wurde in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik an der Universität Kaiserslautern angefertigt

An dieser Stelle möchte ich all denen danken, die diese Arbeit ermöglicht und durch ihre Hilfe unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Zankl für die Überlassung des interessanten Themas, die Betreuung und stete Bereitschaft durch lehrreiche Diskussionen die Arbeit zu unterstützen,

Herrn Prof. Dr. O. Haas (St. Anna Kinderspital, Wien) und Herrn PD Dr. K. Miller (Medizinische Hochschule, Hannover) für die freundliche Aufnahme im Labor;
Herrn Dr. A. Hekele, Frau Dr. V. Metze, Frau U. Stüger, Frau Dr. H. Tittelbach für die fruchtbaren Diskussionen rund um das Thema „PCC“,

Frau Dr. E. Fauth für die anregenden Diskussionen über „unsere“ Mutagene DES, MMC und NDELA,

Herrn PD Dr. H. Scherthan für seine wertvollen Tips bei der Durchführung der FISH,

meinem Mann Herrn H.-D. Ritter für seinen unermüdlichen Einsatz, mich in allen Fragen zum Thema Computer hilfreich zu unterstützen,

bei allen Kollegen der Abteilung Humanbiologie und Humangenetik für das angenehme Arbeitsklima.

ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AB/AM	Antibiotic-Antimykotic
a. dest.	destilliertes Wasser
Ara C	Arabinofuranosylcytosin
BLM	Bleomycin
BrdU	5-Brom-2-desoxyuridin
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
BT-Puffer	Bikarbonat-Puffer
CA	Crotonaldehyd
cdc	cell division cycle
cdk	cell dependent kinase
CHO	Chinese hamster ovary
°C	Grad Celsius
chtb	Chromatidbruch
chte	Chromatidaustausch
chtg	Chromatidgap
CREST	Calcinose, Raynaud-Phänomen, ösophageale Hypermotilität, Sklerodaktylie, Teleangiectasien
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid
DES	Diethylstilbestrol
DG	Deckglas
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ETOH	Ethanol
Etbr	Ethidiumbromid
FISH	Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FPG	Fluoreszenz plus Giemsa
g	Erdbeschleunigung
G_0	Ruhephase
G_1	präsynthetischer oder postmitotischer Gap
G_2	postsynthetischer oder prämitotischer Gap
h	Stunden
HeLa	Zellinie eines Cervix-Karzinoms
HU	Hydroxyharnstoff
HX	*trans*-2-Hexenal
K	Kontrolle
K+DMSO	Kontrolle mit DMSO
KCl	Kaliumchlorid
µ	mikro
M	Molarität
M-Phase	Mitose-Phase
ml	Milliliter
MMC	Mitomycin C
MPF	mitosis promoting factor
µM	mikromolar
mM	millimolar
min	Minute
NDELA	N-Nitrosodiethanolamin
NB	Novobiocin
OT	Objektträger
P/S	Penicillin/Streptomycin
PEG	Polyethylenglycol
PHA	Phytohämagglutinin

PCC	premature chromosome condensation Prozeß oder Technik der vorzeitigen Chromosomen-kondensation - prematurely condensed chromosomes - vorzeitig kondensierte Chromosomen
RI	Reparaturhemmstoff
PPI	Proliferationspotentialindex
ppm	parts per million
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SCD	sister chromatid differentiation
S	Synthese-Phase
SSC	standard saline citrat (Natriumchlorid-Citrat-Puffer)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/acetic-acid/EDTA
TE	Tris/EDTA
U	unit
ü.N.	über Nacht
% w/v	Gewichtsvolumenprozent
UV	ultraviolett
Vol	Volumen

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung und Aufgabenstellung 1
2 Theorie 3
2.1 Prämature Chromosomenkondensation 3
2.1.1 Historischer Hintergrund 3
2.1.2 Morphologie von vorzeitig kondensierten Chromosomen 4
2.1.2.1 $G_{0/1}$-PCCs 4
2.1.2.2 S-PCCs 5
2.1.2.3 G_2-PCCs 5
2.1.3 Mitotische Faktoren 5
2.1.4 Fusionsmethoden 7
2.1.4.1 Allgemein 7
2.1.4.2 Die Zellfusion mit Polyethylenglykol (PEG) 8
2.1.4.3 PCC-Induktion durch Phosphatase-Hemmstoffe 9
2.2 Der Einsatz der PCC-Technik 10
2.3 PCC-Technik und Mutagenitätstestung 10
2.3.1 Chemische Mutagene 10
2.3.2 Physikalische Mutagene 11
2.3.3 Reparaturkinetikstudien bei vorzeitig kondensierten Chromosomen 12
2.4 Methodische Aspekte der PCC-Analyse 12
2.4.1 Identifizierung von Fusionsprodukten 12
2.4.2 Strukturelle Aberrationen von vorzeitig kondensierten Chromosomen 12
2.4.3 Zellkinetik-Studien 13
2.4.3.1 Zellzyklusphasen 13
2.4.3.2 Teilungszyklen 14
2.4.4 Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung 15
2.4.4.1 Methodik 15
2.4.4.2 Das Chromosome Painting 15
2.5 Analyse von Metaphasechromosomen 16
2.6 Verwendete Zellen 16
2.6.1 Humane periphere Blutlymphozyten 16
2.6.2 CHO-Zellen 17
2.7 Testsubstanzen 17
2.7.1 α,β-ungesättigte Aldehyde 17
2.7.1.1 Allgemeine Struktur 17
2.7.1.2 Vorkommen 18
2.7.1.3 Chemische Reaktivität 18
2.7.1.4 Biologische Wirkung 20
2.7.2 N-Nitrosodiethanolamin (NDELA) 22
2.7.2.1 Allgemeine Struktur 22
2.7.2.2 Vorkommen 22
2.7.2.3 Biologische Wirkung 23
2.7.3 Mitomycin C (MMC) 24
2.7.3.1 Allgemeine Struktur 24
2.7.3.2 Vorkommen 24
2.7.3.3 Chemische Reaktivität 24
2.7.3.4 Biologische Wirkung 25
2.7.4 Diethylstilbestrol (DES) 26
2.7.4.1 Allgemeine Struktur und Vorkommen 26
2.7.4.2 Chemische Reaktivität 27
2.7.4.3 Biologische Wirkung 28
2.7.5 Bleomycin (BLM) 28
2.8 Die Excisionsreparatur 30
2.8.1 Arabinofuranosylcytosin (Ara C) und Hydroxyharnstoff (HU) 30
2.8.2 Novobiocin (NB) 31
3 Material und Methoden 33
3.1 Materialien und Geräte 33
3.1.1 Testsubstanzen und Reparaturhemmstoffe 33
3.1.2 Geräte 33
3.1.3 Materialien und Reagenzien 33

3.1.4 CHO-Zellinie 35
3.2 PCC-Technik 35
3.2.1 CHO-Zellen 35
3.2.1.1 Kultivierung und Subkultivierung 35
3.2.1.2 Cho-Zellen als PCC-Induktorzellen (Mitosefraktion) 36
3.2.1.3 Gefrierkonservierung 36
3.2.1.4 DAPI-Test auf Mykoplasmen 37
3.2.2 Mononukleäre Zielzellen 38
3.2.2.1 Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung von mononukleären Zellen 38
3.2.2.2 Kultivierung von isolierten PHA-stimulierten Lymphozyten 39
3.2.3 Mischen der Mitose- und Interphasefraktion 40
3.2.4 Zellfusion und PCC-Induktion 40
3.2.5 Ernte und Präparation von PCCs 41
3.3 Die konventionelle Chromosomenanalyse aus Metaphasen 43
3.3.1 48 Stunden-Vollblutkulturen 43
3.3.2 73 Stunden-Vollblutkulturen 43
3.3.3 Aberntung und Präparation mitotischer Zellen 44
3.4 Mutagenitätstestung 44
3.4.1 Inkubation mit den Testsubstanzen 45
3.4.2 Mutagenapplikation in Vollblut bzw. isolierten Lymphoyzten in der G_0-Phase 47
3.4.2.1 Inkubation von Vollblut 47
3.4.2.2 Inkubation von isolierten Lymphozyten in der G_0-Phase 47
3.4.3 Mutagenapplikation an PHA-stimulierten Kulturen von Vollblut bzw von isolierten Lymphozyten 47
3.4.3.1 Inkubation in Vollblutkulturen 48
3.4.3.2 Inkubation in Kulturen isolierter Lymphozyten 48
3.5 Reparaturkinetik-Studien an vorzeitig kondensierten Chromosomen 48
3.6 Färbungen 50
3.6.1 Fluoreszenz-plus-Giemsa (FPG) -Methode 50
3.6.2 Die FPG-Methode zur Identifizierung von G_0-PCCs bei Lymphozyten 51
3.6.3 Die FPG-Methode zur Bestimmung der Zellproliferationskinetik 51
3.6.4 C-Bänderung 53
3.7 Auswertung der Präparate 53
3.7.1 Analyse von G_0-PCCs 53
3.7.2 PCC-Analyse PHA-stimulierter Lymphozyten 54
3.7.3 Auswertung der Metaphasenpräparate 55
3.7.3.1 Analyse struktureller Aberrationen aus 48 Stunden-Vollblutkulturen 56
3.7.3.2 Analyse struktureller Aberrationen aus 73 Stunden-Vollblutkulturen 56
3.8 Methoden zur i*n situ* -Hydridisierung 57
3.8.1 DNA-Isolation aus CHO-Zellen 57
3.8.2 DNA-Sonde und Markierung 58
3.8.2.1 Plasmidisolation 58
3.8.2.2 Flachbett-Agarose-Gelelektrophorese 59
3.8.2.3 Nick-Translation 60
3.8.3 Denaturierung und Hybridisierung 60
3.8.4 Waschschritte und Detektion 61
3.8.5 Auswertung der FISH-Präpatate 61
3.9 Statistische Methoden 62
3.9.1 Vorbemerkungen zur Statistik 62
3.9.2 Testverfahren der beurteilenden Statistik 63
3.9.3 Der χ^2-Test wird verwendet 64
4 Ergebnisse 67
4.1 Bestimmung der Zellviabilität (Trypanblau-Färbung) 67
4.2 Untersuchungen α, β- ungesättigter Aldehyde 67
4.2.1 Analyse der Metaphase-Chromosomen 67
4.2.1.1 Bestimmung des Mitose-Index nach Inkubation mit Crotonaldehyd bzw. Bleomycin 67
4.2.1.2 Strukturelle Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit Crotonaldehyd 67
4.2.1.3 Bestimmung des Mitose-Index nach Inkubation mit *trans*-2-Hexenal 72
4.2.1.4 Strukturelle Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit *trans*-2-Hexenal 72
4.2.2 PCC-Analysen 74
4.2.2.1 Chromatinfragmente in G_0-PCCs 74

4.2.2.1.1 Crotonaldehyd-Versuche ... 74
4.2.2.1.2 *Trans*-2-Hexenal-Versuche ... 76
4.2.2.2 Kondensationsstadien der G_0-PCCs ... 78
4.2.2.2.1 Crotonaldehyd-Versuche ... 78
4.2.2.2.2 Trans-2-Hexenal-Versuche ... 82
4.2.2.3 Zellkinetik ... 83
4.2.2.4 Quantifizierung von PCC-Ereignissen ... 86
4.2.2.5 Aberrationsanalysen ... 86
4.2.3 Reparaturkinetikstudien vorzeitig in der G_0–Phase kondensierter Chromosomen ... 87
4.2.3.1 Chromatinfragmente in G_0-PCCs ... 87
4.2.3.2 Kondensationsstadien der G_0-PCCs ... 88
4.2.4 Fluoreszenz in situ-Hybridisierung ... 92
4.3 Untersuchungen von NDELA ... 94
4.3.1 Analyse der Metaphase-Chromosomen ... 94
4.3.2 PCC-Analysen ... 97
4.3.2.1 Chromatinfragmente in G_0-PCCs ... 98
4.3.2.2 Kondensationstadien Der G_0-PCCs ... 101
4.3.2.3 Zellkinetik ... 102
4.3.2.4 Vergleich der Aberrationshäufigkeiten bei Metaphasen und G_2-PCCs ... 102
4.4 Untersuchungen von Mitomycin C und Diethylstilbestrol ... 103
4.4.1 Analyse der Metaphase-Chromosomen ... 103
4.4.1.1 Mitomycin C-Versuche ... 103
4.4.1.2 Diethylstilbestrol-Versuche ... 105
4.4.2 PCC-Analysen ... 108
4.4.2.1 Chromatinfragmente in G_0-PCCs ... 108
4.4.2.1.1 Mitomycin C-Versuche ... 108
4.4.2.1.2 Diethylstilbestrol-Versuche ... 109
4.4.2.2 Kondensationsstadien in G_0-PCCs ... 111
4.4.2.2.1 Mitomycin C-Versuche ... 111
4.4.2.2.2 Diethylstilbestrol-Versuche ... 111
4.5 Vergleichende Darstellung der Schädigung in G_0-PCCs und in Metaphasechromosomen ... 112
5 Diskussion ... 115
5.1 Vorteile der PCC-Technik ... 115
5.2 Wahl des Zellsystems ... 115
5.3 Strukturelle Aberrationen mitotischer Chromosomen ... 116
5.3.1 Unbehandelte Zellen ... 117
5.3.2 Untersuchungen mit α,β-ungesättigten Aldehyden ... 118
5.3.2.1 Crotonaldehyd ... 118
5.3.2.2 *trans*-2-Hexenal ... 118
5.3.2.3 Vergleich der Wirkungen von Crotonaldehyd und *trans*-2-Hexenal ... 119
5.3.3 N-Nitrosodiethanolamin (NDELA) ... 119
5.3.4 Bleomycin (BLM) ... 120
5.3.5 Mitomycin C (MMC) ... 120
5.3.6 Untersuchungen mit Diethylstilbestrol (DES) ... 121
5.4 Aberrationen vorzeitig kondensierter Chromosomen ... 121
5.4.1 Anzahl vorzeitig kondensierter Chromatinelemente als Mass der Schädigung ... 121
5.4.1.1 Allgemeine Vorbemerkungen ... 121
5.4.1.2 DNA-Strangbrüche und PCC-Fragmente ... 122
5.4.1.3 Chromatinstruktur und PCC-Fragmente ... 123
5.4.1.4 Reparaturvorgänge und PCCs ... 124
5.4.1.5 PCCs in unbehandelten Lymphozyten ... 124
5.4.1.6 PCCs in behandelten Zellen ... 124
5.4.1.6.1 α,β-Ungesättigte Aldehyde ... 124
5.4.1.6.2 N-Nitrosodiethanolamin (NDELA) ... 126
5.4.1.6.3 Bleomycin (BLM) ... 127
5.4.1.6.4 Mitomycin C (MMC) ... 128
5.4.1.6.5 Diethylstilbestrol (DES) ... 129
5.4.2 Kondensation des Interphasechromatins ... 129
5.4.2.1 Chromatinkondensation in unbehandelten Zellen ... 129
5.4.2.2 Chromatinkondensation nach Behandlung mit α,β-ungesättigten Aldehyden ... 131
5.4.2.2.1 Allgemein ... 131

5.4.2.2.2 Wirkung auf Histone ... 131
5.4.2.2.3 Wirkung auf mitotische Faktoren ... 132
5.4.2.2.4 Wirkung auf die Topoisomerase II-Aktivität ... 133
5.4.2.3 N-Nitrosodiethanolamin (NDELA) ... 133
5.4.2.4 Bleomycin (BLM) ... 133
5.4.2.5 Mitomycin C (MMC) ... 134
5.4.2.6 Diethylstilbestrol (DES) ... 134
5.4.2.7 Weitere Beispiele verminderter Kondensation bei PCCs ... 135
5.4.3 Apoptose und Kondensationsveränderung bei PCCs ... 136
5.5 Einfluss von Reparaturvorgängen ... 136
5.5.1 Reparaturhemmstoffe ... 137
5.5.1.1 Arabinofuranosylcytosin (Ara C) ... 137
5.5.1.2 Hydroxyharnstoff (HU) bzw. Ara C und HU ... 138
5.5.1.3 Novobiocin (NB) ... 138
5.5.1.4 Reparatur von Schäden nach Behandlung mit α,β-ungesättigten Aldehyden ... 139
5.5.2 Mitomycin C und Reparatur ... 140
5.6 PCC und FISH ... 141
5.7 Zellkinetik-Studien an vorzeitig kondensiertern Chromosomen ... 142
5.7.1 Zellzyklusphasen und Teilungszyklen ... 142
5.7.2 Zellzyklusarrest und Aberrationsanalyse ... 144
5.8 Vergleich der Aberrationsrate mitotischer und vorzeitig kondensierter Chromosomen ... 144
5.8.1 Methodische Aspekte bei der Analyse von PCCs ... 145
5.8.2 Ist die Prämature Chromosomenkondensation die sensitivere Methode ? ... 147
5.9 Ausblick ... 148
6 Zusammenfassung ... 150
7 Literaturverzeichnis ... 152
8 Tabellenteil ... 178

1 EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG

Seit der Beobachtung, daß eine Schädigung des genetischen Materials mit einer Vielzahl von Krankheiten verbunden ist, wird der Entdeckung potentieller Mutagene in der Umwelt erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet. Bei klassischen cytogenetischen Methoden der Mutagenitätstestung werden mitotische Zellen während der Metaphase untersucht. In der Metaphase wird das Chromatin in Form einzeln kondensierter Chromosomen analysierbar. Diese Phase dauert aber nur sehr kurze Zeit, sodaß konventionelle Methoden nur in einem begrenzten Zeitabschnitt des Zellzyklus möglich sind. Die übrigen Stadien des Zellzyklus bleiben der mikroskopischen Analyse verschlossen. Die cytogenetischen Testsysteme werden zusätzlich dadurch eingeschränkt, daß vor dem Eintritt der Zellen in das Mitosestadium Reparatur- und Selektionsmechanismen wirksam werden. Deshalb wird bei klassischen Metaphasenana-

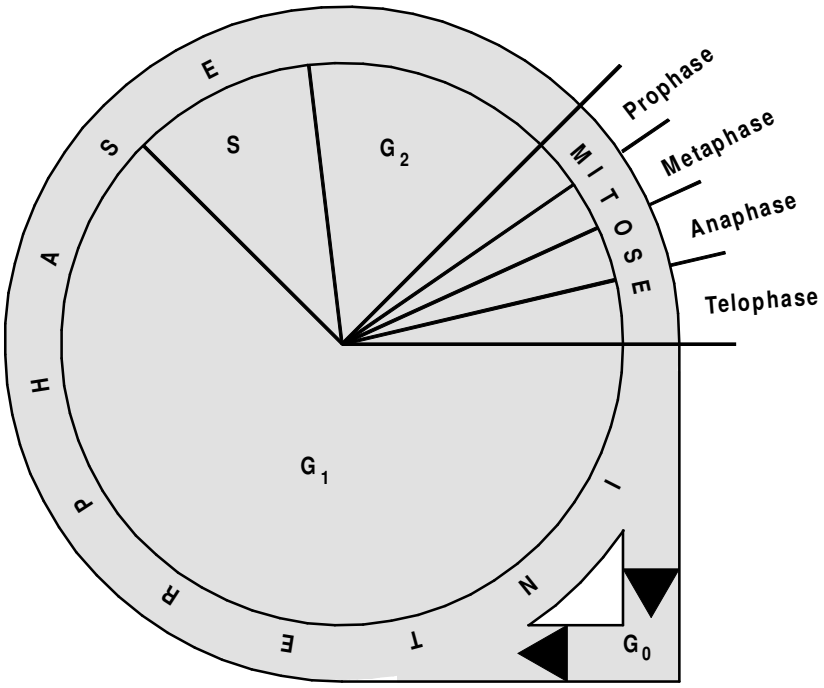


Abb. 1. Schematische Darstellung des Zellzyklus. Nach Abschluß der Zellteilung (Mitose) treten die Zellen in die Interphase; sie durchlaufen entweder die G_1-Phase (G_1; G = gap; engl. = Lücke), die Synthese-Phase (S) und die G_2-Phase (G_2) und teilen sich danach wieder oder sie verharren in einer Ruhephase (G_0), wie z.B. die Lymphozyten.

lysen das tatsächliche Ausmaß einer mutagenen Zellschädigung oft unterschätzt. Zellen können außerdem soweit geschädigt sein, daß sie das Mitosestadium gar nicht mehr erreichen. Deshalb wird durch die Chromosomenanalyse nur ein Teil der zu untersuchenden Zellpopulation erfaßt. Durch den Einsatz der Methode der "prämaturen“, also der vorzeitigen „Chromosomenkondensation" wird der Zeitrahmen für cytogenetische Analysen erheblich erweitert. Die PCC-Technik ermöglicht die Kondensation des diffusen Interphasechromatins in chromosomenähnliche Strukturen zu jedem Zeitpunkt des Zellzyklus und damit auch außerhalb der Zellteilung. Dadurch kann eine

chromosomale Schädigung schon sichtbar gemacht werden, bevor die Zellen das Mitosestadium erreichen. Der Zeitraum zwischen Mutagenbehandlung und cytogenetischer Auswertung wird dabei erheblich verkürzt. Eine Erfassung der potentiellen Schädigung wird möglich bevor Reparaturvorgänge eintreten können. Durch den Einsatz der PCC-Technik können auch Zellen in Ruhephase und differenzierte Zellen untersucht werden. Die vorzeitige Kondensation des Interphasechromatins wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Fusion mit mitotischen Induktorzellen erreicht. Die Morphologie der vorzeitig kondensierten Chromosomen spiegelt das Zellzyklusstadium wider, das die Zelle zum Zeitpunkt ihrer Fusion durchlief. Daher ist die PCC-Methode nicht nur für Aberrationsanalysen außerhalb der Mitose, sondern auch für Zellkinetikstudien nützlich. Im Rahmen dieser Dissertation sollten mit der PCC-Technik Crotonaldehyd und 2-*trans*-Hexenal als Vertreter für α,β-ungesättigte Aldehyde und das Nitrosamin N-Nitrosodiethanolamin (NDELA) untersucht werden. Diese Daten sollten mit Ergebnissen aus Untersuchungen an Metaphasechromosomen im ersten Teilungszyklus nach Mutagenapplikation verglichen werden. α,β-ungesättigte Aldehyde sind als Inhaltsstoffe zahlreicher Obst- und Gemüsepflanzen sind weit verbreitet. Eine mutagene Wirkung von α,β-ungesättigten Aldehyden wurde bereits nachgewiesen. N-Nitrosamine kommen unter anderem in bestimmten Lebensmitteln, in Körperpflegemitteln, aber auch in Tabak und bei der Metallverarbeitung vor. Eine mutagene und auch cancerogene Wirkung von NDELA wurde bereits gezeigt.Der Einsatz möglichst sensitiver Methoden - wie die der PCC-Technik - ist zur Beurteilung von mutagenen Risikofaktoren durch Umwelt und Ernährung sehr wichtig, denn es ist anzunehmen, daß selbst kleinste Dosen sich in ihrer Wirkung. summieren können. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob sich Chromosomenschädigungen mit der PCC-Technik bereits bei Konzentrationen zeigen, die sich mit konventionellen cytogenetischen Methoden noch nicht nachweisen lassen. Als Kontrollsubstanzen wurden Diethylstilbestrol, Mitomycin C und Bleomycin eingesetzt. Diethylstilbestrol ist wegen seines aneugenen und Mitomycin wegen seines hauptsächlich clastogenen Wirkungsmechanismus bedeutsam. Bleomycin zeigt unabhängig von der S-Phase eine direkte clastogene Wirkung. Aus PCC-Studien anderer Autoren ist bekannt, daß nach Inkubation mit Mutagenen die Morphologie vorzeitig kondensierter Chromosomen u.a. infolge von Reparaturprozessen verändert wird. Ergänzend sollte daher die Wirkung von Reparaturhemmstoffen auf G_0-Lymphozyten, die mit α,β–ungesättigten Aldehyden (Crotonaldehyd) inkubiert worden waren, untersucht werden

2 THEORIE

2.1 PRÄMATURE CHROMOSOMENKONDENSATION

2.1.1 HISTORISCHER HINTERGRUND

Im Jahre 1970 berichteten Johnson und Rao von Fusionsexperimenten, die sie im Rahmen von Zellzyklusuntersuchungen durchführten: Wurden Tritium-markierte (^{3}H-Thymidin) HeLa-Zellen mit unmarkierten HeLa-Zellen in der G_2-Phase fusioniert, so beobachteten die Autoren in einigen dieser zweikernigen Zellen, daß neben unmarkierten Metaphasechromosomen "pulverisierte" markierte Chromosomen lagen. Das Auftreten von "pulverisierten" Chromosomen deuteten sie als beschleunigten Eintritt der G_2-Zellen in die Mitose, der zu einer ungleichmäßigen Kondensation innerhalb des S-Phase-Kerns geführt hatte (Rao und Johnson, 1970). Die Beobachtung dieser Pulverisierung in S/G_2-fusionierten Zellen führte zu einem weiteren Experiment, bei dem mitotische - Colcemid-blockierte HeLa-Zellen - mit in G_1-, S- oder G_2-Phase synchronisierten Zellpopulationen fusioniert wurden (Johnson und Rao, 1970). Die Fusion nach Behandlung mit UV-inaktiviertem Sendai Virus zwischen mitotischen Zellen und Interphasekernen resultierte in einer schnellen Kondensation des Interphasechromatins mit Auflösen der Kernmembran innerhalb von 30 Minuten. Diese vorzeitige Induktion der Bildung chromosomenähnlicher Strukturen eines Interphasekerns wurde Prämature Chromosomenkondensation -PCC- genannt (Johnson und Rao, 1970). Damit war es möglich geworden, chromosomale Strukturen auch außerhalb der Mitose sichtbar zu machen. In einer folgenden Studie berichteten Johnson *et al.* (1970) über die Induktion von vorzeitig kondensierten Chromosomen in differenzierten Zellen unterschiedlicher Herkunft wie Pferdelymphozyten, Hühnererythrozyten und Rinderspermatozoen.

Obwohl die Möglichkeit, eine vorzeitige Kondensation des Interphasechromatins experimentell zu induzieren, erst 1970 von Johnson und Rao beschrieben worden war, war das PCC-Phänomen bereits früher beobachtet worden (Übersicht in: Rao, 1982). In doppelkernigen Zellen von *Triticum* x *Secale*-Hybriden wies ein Zellkern normale Chromosomen auf, während der andere lange, schmale Chromosomen zeigte (Bleier, 1930). Ähnliche Beobachtungen wurden an *Triticum* x *Aegilops* Hybriden (Kihara und Lilienfeld, 1934) und an *Avena barbata* x *Avena strigosa* Hybriden (Holden und Mota, 1956 in: Rao, 1982) gemacht. Im *Haemanthus* Endosperm, einem Syncytium, entdeckten Ostergren und Bajer (1961) das Auftreten normaler doppelsträngiger Metaphasechromosomen gemeinsam mit einzelsträngigen Chromosomen und deuteten letztere als Chromosomen in der G_1-Phase.

Auch über das spontane Auftreten von Chromosomenpulverisation bei mehrkernigen Zellen nach viraler Infektion war bereits früher berichtet worden (Nichols *et al.*, 1964). Daß das Auftreten von pulverisierten Chromosomen nicht auf die Infektiosität des Virus zurückzuführen war, konnte durch den Einsatz von inaktivierten Sendai Viren gezeigt werden (Takagi *et al.*, 1969). Diese Beobachtungen sind vielmehr das Resultat von mitotischer Asynchronie in zwei- oder vielkernigen Zellen, die in S-Phase Zellen eine vorzeitige

Kondensation induzierte und damit die pulverisierte Morphologie bewirkte (Johnson und Rao, 1970).

2.1.2 MORPHOLOGIE VON VORZEITIG KONDENSIERTEN CHROMOSOMEN

Mazia (1963) vermutete, daß Zellen innerhalb des Zellzyklus einen Chromosomen-Kondensationszyklus durchlaufen. Entsprechend diesem Modell passieren die Chromosomen ein Kontinuum von Konformationszuständen, die mit der Mitose den höchsten und der S-Phase den geringsten Kondensationsgrad darstellen. Mit der Entdeckung des Phänomens der vorzeitigen Chromosomenkondensation wurde die direkte Sichtbarmachung des Chromosomen-Kondensationszyklus möglich. Die Morphologie der vorzeitig kondensierten Chromosomen spiegelt das Zellzyklusstadium wider, das die Zelle zum Zeitpunkt ihrer Fusion durchlief (Johnson und Rao, 1970; Rao *et al.*, 1977) (siehe Abbildung 2.1).

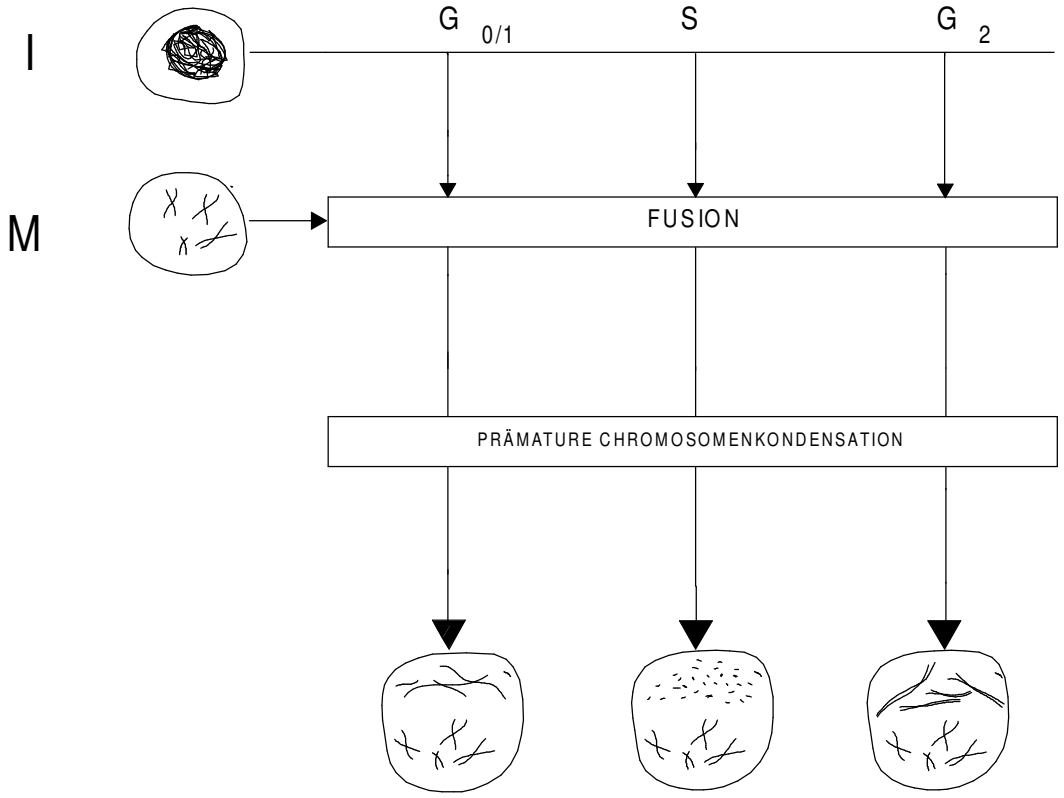


Abb. 2.1 Schematische Darstellung der PCC-Induktion durch Fusion einer mitotischen Zelle (M) mit einer Zelle in Interphase (I). Vorzeitig in der $G_{0/1}$-Phase kondensierte Chromosomen sind einzelsträngig, in der S-Phase erscheinen sie pulverisiert und in der G_2-Phase treten sie doppelsträngig auf (nach Sperling, 1980).

2.1.2.1 $G_{0/1}$-PCCs

Vorzeitig in der $G_{0/1}$-Phase kondensierte Chromosomen bestehen aufgrund des unreplizierten Zustands aus einzelnen Chromatiden und sind anfangs stark kondensiert. So unterscheiden sich in der G_0-Phase vorzeitig kondensierte Chromosomen in ihrer Länge nicht von mitotischen Chromosomen humaner Lymphozyten (Schmiady und Sperling, 1981). Die Morphologie von

PCCs ändert sich im Laufe des G_1-Stadiums (Schor *et al.,* 1975; Hittelman und Rao, 1978). Beim Durchlaufen der G_1-Phase wird das Chromatin zunehmend dekondensiert. Folglich wurde eine fortschreitende Längenzunahme der vorzeitig kondensierten Chromosomen beobachtet (Waldren und Johnson, 1974; Hittelman und Rao, 1976; Rao *et al.*, 1977). Entsprechend ihrem Kondensationsgrad wurden vorzeitig in der G_1-Phase kondensierte Chromosomen in sechs Kategorien mit Kategorie 1 für den am stärksten kondensierten und mit Kategorie 6 für den am wenigsten kondensierten Zustand eingeteilt (Hittelman und Rao, 1976). Untersuchungen an synchronisierten HEp-Zellen zeigten, daß die durchschnittliche Länge der PCCs mit dem Verlauf der G_1-Phase mehr als das dreifache der mitotischen Länge betragen kann, in Einzelfällen sogar das fünffache (Schmiady, 1979). Die Änderung in der Länge der PCCs während der G_1-Phase korreliert mit einer Zunahme der Transkriptionsaktivität (Pfeiffer und Tolmach, 1968).

2.1.2.2 S-PCCs

Die geringste Kondensationsstufe der vorzeitig kondensierten Chromosomen wird im Laufe der Synthese-Phase mit der DNA-Replikation erreicht. Beim Eintritt der Zellen in die S-Phase sind vorzeitig kondensierte Chromosomen individuell nicht mehr unterscheidbar. S-PCCs erscheinen "pulverisiert". Kondensierte unreplizierte einzelsträngige und bereits replizierte doppelsträngige Abschnitte wechseln mit dekondensierten Bereichen ab. Viele Abschnitte sind so stark dekondensiert, daß sie lichtmikroskopisch als Farblücken erscheinen. Tatsächlich ist ihre Kontinuität jedoch nicht unterbrochen. Durch autoradiographische Untersuchungen wurde gezeigt, daß die ungefärbten Abschnitte die Bereiche der DNA-Synthese darstellen (Sperling und Rao, 1974; Sperling, 1980). Das Kondensationsmuster hängt von der Dauer der Replikation ab, die der PCC-Induktion vorausgegangen ist. In der frühen S-Phase liegen einzelsträngige Abschnitte neben ungefärbten Bereichen vor, in der mittleren S-Phase finden sich bereits replizierte, doppelsträngige Segmente, die in der späten S-Phase die einzelsträngigen nahezu vollständig ersetzt haben. S-PCC setzen die DNA-Synthese bis 75 Minuten nach Beendigung der Fusion fort (Johnson und Rao, 1970).

2.1.2.3 G_2-PCCs

G_2-PCCs ähneln mitotischen Chromosomen, denn sie bestehen wie diese aus zwei Chromatiden; sie sind allerdings länger als mitotische Chromosomen. PCCs der G_2-Phase erreichen jedoch niemals die Länge von G_1-PCCs. So haben Längenmessungen ergeben, daß Muntjak-PCCs der späten G_1-Phase fünfmal länger, G_2-PCCs allerdings nur 3,5 mal länger sind als Metaphasechromosomen (Sperling, 1982). Im Laufe der G_2-Phase schreitet die Chromosomenkondensation fort und erreicht in der Metaphase ihr Maximum (Sperling und Rao, 1974).

2.1.3 MITOTISCHE FAKTOREN

Da die Induktion der vorzeitigen Chromosomenkondensation nicht speziesspezifisch ist, können alle Zellen als Mitosefraktion eingesetzt werden, die gut proliferieren. Besonders eignen sich Zellen, die am Kulturgefäßboden anwachsen und sich während der Mitose abrunden. Die mitotischen Zellen können leicht durch selektives Abklopfen gewonnen werden (Hittelman *et*

al., 1989). Als mitotische Zellen werden hauptsächlich CHO- und HeLa-Zellen eingesetzt, da sie besonders schnell wachsen.
Mitotische Zellen enthalten bestimmte Faktoren, die in Interphasekernen eine Auflösung der Kernmembran und Kondensation des Chromatins bewirken. Diese Faktoren sind universell: Mitotische Zellen humaner Herkunft wie HeLa-Zellen können in einer Vielzahl tierischer Zellen, wie in denen von Vögeln, Amphibien und Insekten PCCs induzieren. Umgekehrt können Zellen der genannten Spezies PCCs in HeLa-Zellen induzieren (Johnson *et al.*, 1970). Die Aktivitätsfaktoren der mitotischen Zellen werden "mitosis promoting factors (MPF)" oder „mitotische Faktoren" genannt (Adlakha und Rao, 1986). Allerdings sind die Aktivitäten mitotischer Zellen unterschiedlicher Herkunft verschieden. In HeLa-Zellen wurde eine 2,5 fache höhere MPF-Aktivität als in CHO-Zellen nachgewiesen (Cheng *et al.*, 1993). MPF besteht aus mindestens zwei Komponenten, der $p34^{cdc2}$ Serin/Threonin-Kinase mit einem Molekular-gewicht von 34 kD, die in *Schizosaccharomyces pombe* als Produkt des cdc2-Gens identifiziert wurde und dem Cyclin B. In humanen Zellen ist $p34^{cdc2}$ sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert (Bailly *et al.*, 1989). Die Aktivität von $p34^{cdc2}$ wird durch Bindung mit Cyclin B und durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung reguliert. In höheren Eukaryonten geschieht dies bei $p34^{cdc2}$ an verschiedenen Aminosäureresten (Threonin 14, Tyrosin 15 und Threonin 161). Die Dephosphorylierung von Threonin 14 und Tyrosin 15 und die Phosphorylierung von Threonin 161 erfolgen gleichzeitig mit der Aktivierung der Kinase in der G_2-/M-Phase des Zellzyklus (Krek und Nigg, 1991; Guo *et al.*, 1993). Die durch die Assoziation mit Cyclinen aktivierten mitotischen Faktoren phosphorylieren Proteine, die an strukturellen Verände-rungen (Abbau der Kernmembran, Chromosomenkondensation) während der vorzeitigen Chromosomenkondensation beteiligt sind. Die kovalente Modifikation von Proteinen via reversibler Phosphorylierung/Dephosphorylierung stellt einen wichtigen Mechanismus für intrazelluläre Vorgänge, einschließlich der Mitose dar (Übersicht in: Adlakha und Rao, 1986). Ähnlich einem mitotischen Vorgang ist auch die Induktion von vorzeitiger Chromosomenkondensation das Ergebnis einer verstärkten Phosphorylierung der Histone H1 und H3 (Johnson und Rao, 1970; Hanks *et al.*, 1983). Histon H1 wird durch die $p34^{cdc2}$/Cyclin-Kinase an Serin- oder Threonin-Resten phosphoryliert (Suzuki, 1989). Die Dephosphorylierung erfolgt durch die Proteinphosphatasen PP1 oder PP2A. Bei der prämaturen Chromosomenkondensation wird das Histon H3 in hohem Ausmaß am Aminosäurerest Serin 10 phosphoryliert (Übersicht in: Ajiro *et al.*, 1996). Die Fusion mit Zellen in Interphase führt in mitotischen Zellen zur Dephosphorylierung der Histone H1 und H3, jedoch nicht zu einem Verlust der Chromosomenkondensation (Hanks *et al.*, 1983). Dies deutet darauf hin, daß die Phosphorylierung von H3 für den Beginn des Kondensationsprozesses, nicht aber für dessen Aufrechterhaltung eine Rolle spielt. Es wird daher vermutet, daß sich die Phosphorylierung von H3 auf Mechanismen auswirkt, die für dynamische Veränderungen in der Chromatinstruktur bedeutsam sind. So könnte die Histon-Phosphorylierung des N-Terminus die Affinität zur DNA reduzieren und die Bewegung der Nukleosomen und den Zugang für kondensierende Faktoren erleichtern (Van Hooser *et al.*, 1998). Homologe Proteine zu $p34^{cdc2}$ konnten in verschiedenen Spezies wie dem Frosch (Gautier *et al.*, 1988), dem Seestern (Arion *et al.*,

1988) und dem Menschen (Draetta *et al.*, 1987) nachgewiesen werden. Ein Vergleich zwischen menschlichen und *Schizosaccharomyces pombe* $p34^{cdc2}$-Proteinen zeigt eine 63 %-ige Aminosäure-Homologie. Dies bedeutet, daß im Laufe der Evolution die cdc2-Genprodukte als wichtige Proteine stark konserviert wurden (Lee und Nurse, 1987). Es gibt Hinweise darauf, daß außer $p34^{cdc2}$ ein weiterer mitotischer Faktor für den Eintritt der Zellen in die Mitose verantwortlich ist. In *Aspergillus nidulans* wurde zusätzlich zur cdc2-Kinase eine weitere Kinase, die NIMA-Kinase, gefunden, die für den Eintritt von Zellen in die Mitose verantwortlich ist. In humanen Zellen wurde ein dem NIMA-Gen homologes Gen, Nek2, identifiziert (Fry *et al.*, 1995)

2.1.4 FUSIONSMETHODEN

2.1.4.1 ALLGEMEIN

Eine der gebräuchlichsten Methoden zur PCC-Induktion stellt die Zellfusion von Interphasezellen mit mitotischen Zellen dar. Die Zellfusion kann auf chemischem Wege durch Polyethylenglykol, auf biologische Weise durch Viren oder auf elektrophysikalischem Wege erfolgen. Im Jahre 1957 wurde von Okada und Mitarbeitern die Zellfusionsaktivität von Sendai Virus Partikeln zum erstenmal beschrieben (Okada, 1993). Die Entdeckung, daß Säugerzellen durch den Einsatz von Sendai Viren fusioniert werden können, eröffnete neue Möglichkeiten in der Zellbiologie. Mit der Verwendung des Sendai Virus als fusionierendem Agens wurde erstmals die Sichtbarmachung des Interphasechromatins in Form vorzeitig kondensierter Chromosomen möglich (Johnson und Rao, 1970). In Fusionsexperimenten mit Viren wird bevorzugt das Sendai Virus eingesetzt, weil es nach UV-Bestrahlung seine Infektiosität, nicht aber seine Fusionskapazität verliert. Der Einsatz von Sendai Viren zur Zellfusion wird allerdings dadurch eingeschränkt, daß nur solche Zellen fusionieren, die Virusrezeptoren auf ihrer Oberfläche besitzen. Dies trifft für die meisten aller kultivierten Zellen zu, wie die von Säugern und Vögeln. Dabei fusionieren Zellen etablierter Linien und transformierte Zellen besser als differenzierte Zellen (Übersicht in: Okada, 1993). Lymphozyten und lymphoide Zellen können allerdings durch Sendai Viren nicht ausreichend fusioniert werden (Vaughan *et al.,* 1976). An der Sendai Virus-vermittelten Fusion sind hauptsächlich zwei Proteine beteiligt. Die Bindung von Sendai Virionen erfolgt über das virale Hämagglutinin/Neuraminidase (HN) - Glykoprotein an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche. Das virale Fusions (F) - Glykoprotein fördert die Fusion der viralen Hüllmembran mit der Wirtszellmembran (Hoekstra *et al.,* 1985; Zschörnig *et al.,* 1993).
Eine vorzeitige Kondensation von Chromatin in der Interphase wurde auch durch den Einsatz der Elektrofusion erreicht (Cervenka und Camargo, 1987; Bertsche und Zimmermann, 1988). Die Elektrofusion wird erreicht, indem man die Zellen einem nichtgleichförmigen elektrischen Wechselfeld aussetzt, dem ein kurzer elektrischer Impuls hoher Intensität folgt (Zimmermann und Vienken, 1982).
Ein Vorteil dieser Methode ist, daß der Fusionsprozeß direkt mikroskopisch betrachtet werden kann. Die Fusionsparameter sind leicht und genau zu kontrollieren (Hui und Stenger, 1993). Es zeigte sich allerdings, daß mit der Elektrofusion in proliferationsaktiven Zellen eine prämature Chromosomenkondensation hauptsächlich dann induziert werden konnte, wenn die Zellen

zum Zeitpunkt ihrer Fusion die G_2-Phase durchliefen (Cervenka und Camargo, 1987; Bertsche und Zimmermann, 1988; Raabe-Meyer, 1990).

2.1.4.2 DIE ZELLFUSION MIT POLYETHYLENGLYKOL (PEG)

Die PEG-vermittelte Zellfusion wurde an Säugerzellen zum erstenmal von Pontecorvo (1975) eingesetzt. Polyethylenglykol besitzt ein hohes Dipolmoment. Diese Eigenschaft führt dazu, daß um PEG-Moleküle eine große Hydrationshülle gebildet wird. So bewirkt der Einsatz von 50 - 60 % - igem PEG, daß das gesamte Wasser einer Lösung mit PEG assoziiert wird.

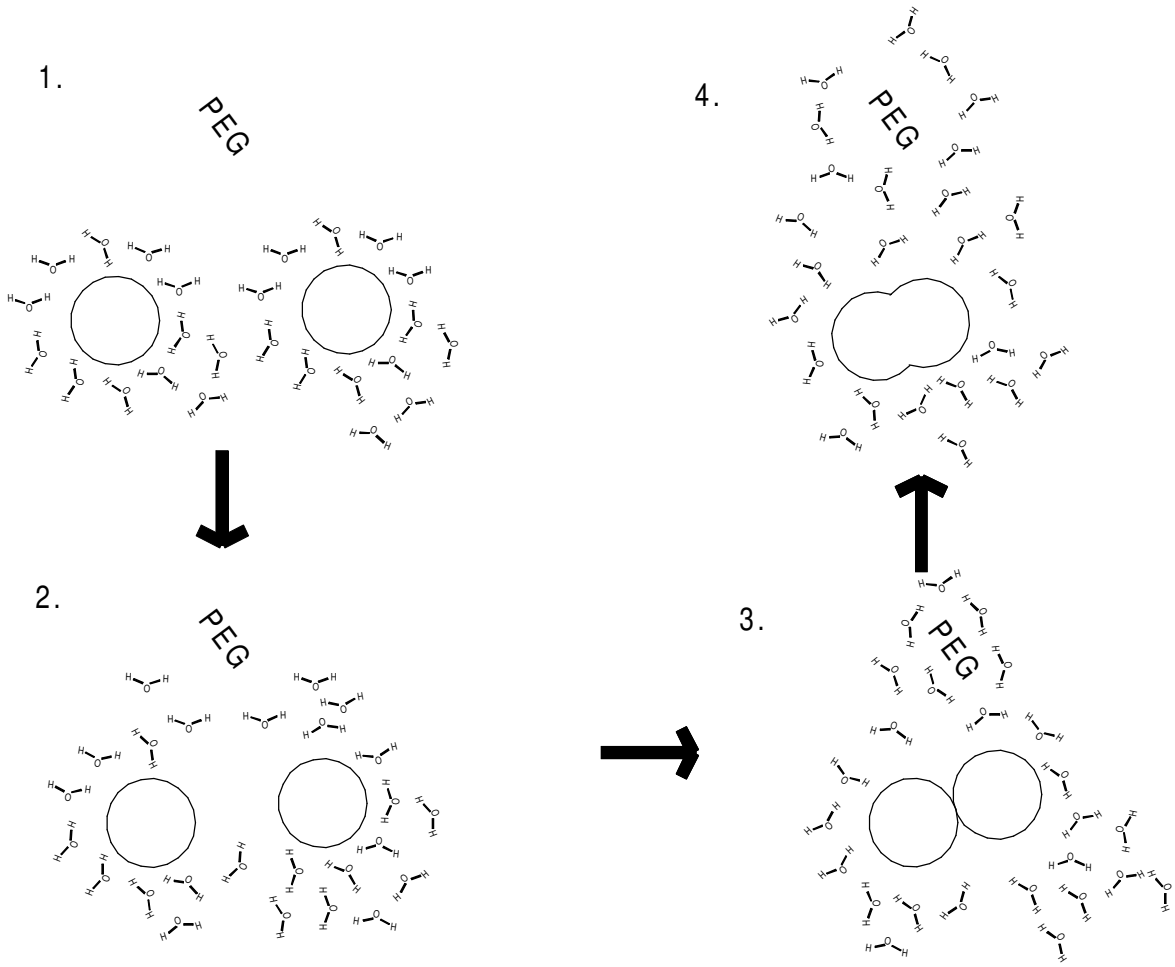


Abb. 2.2 Hypothetischer Mechanismus der PEG-vermittelten Zellfusion. PEG entfernt die Hydrationshülle von der Zelloberfläche (1,2). Der Verlust der Hydrationshülle begünstigt die Wechselwirkungen zwischen Membranlipiden (3) und führt zur Zellfusion zwischen benachbarten Zellen (4) (nach: Klebe und Bentley, 1987).

Dadurch kommt es zur Entfernung der Hydrationshülle von der Oberfläche der zu fusionierenden Zellen und damit zur hydrophoben Wechselwirkung zwischen den Membranlipiden. Die Verdünnung des PEG mit Medium führt dann zur eigentlichen Fusion (Huang *et al.*, 1990). Der Einsatz von PEG muß unter kontrollierten Bedingungen erfolgen, da PEG toxisch wirkt. Wichtige Versuchsvariablen sind u.a. die PEG-Konzentration und das Molekulargewicht (Davidson *et al.*, 1976), die Dauer der PEG-Behandlung, das Beenden

der PEG-Aktivität durch Zugabe von Medium und die Entfernung des PEG (Bartal und Hirshaut, 1987). Die unsachgemäße Lagerung, aber auch das Autoklavieren von PEG können zur Bildung von Aldehyden führen (Kadish und Wenc, 1983). Durch Photooxidation können sich in PEG-Lösungen Peroxide ansammeln, die zur Toxizität von PEG beitragen können. Im Jahre 1977 wurde gezeigt, daß eine vorzeitige Kondensation des Interphasechromatins auch durch eine PEG-vermitteltete Zellfusion möglich ist (Lau *et al.,* 1977). Die Vorteile des PEG-Einsatzes gegenüber viraler Induktion sind evident. Da PEG keine spezifischen Bindungsstellen benötigt, können auch Zellen ohne Membranrezeptoren für Viruspartikel fusioniert werden. Bei Maus-Testiszellen konnte die PCC-Induktion erhöht werden, wenn PEG statt Sendai Viren als Fusogen eingesetzt wurde (Drwinga *et al.,* 1979). Auch die Anzahl von Myelom-Hybridzellen wurde nach PEG-Behandlung gesteigert (Gefter *et al.*, 1977). Pantelias und Maillie (1983) untersuchten die PCC-Induktion in Lymphozyten unter verschiedenen Zellfusionsbedingungen. Das höchste Ausmaß der PCC-Induktion wurde mit dem Einsatz einer PEG-Konzentration von 55 % und einer PEG-Expositionszeit von 1 Minute erreicht. Um die Wirkung von PEG zu beenden, wurde das PEG-Zell-Gemisch jeweils innerhalb von 3 Minuten verdünnt und das PEG-Medium-Gemisch durch Zentrifugation entfernt (Pantelias und Maillie, 1983). Okayasu *et al.* (1993) untersuchten mit Hilfe der PCC-Technik den Einfluß viral- bzw. PEG-vermittelteter Zellfusion auf das ursprüngliche Ausmaß und die Reparaturkinetik von Interphasechromosomen bestrahlter CHO-Zellen. Ein Vergleich beider Fusionsmethoden zeigte, daß die Ergebnisse durch die Wahl des Fusogens nicht beeinflußt wurden.

2.1.4.3 PCC-INDUKTION DURCH PHOSPHATASE-HEMMSTOFFE

Neuerdings lassen sich PCCs auch durch den Einsatz von Phosphatase-Hemmstoffen, wie Okadasäure und Calyculin A, induzieren. (Gotoh *et al.,* 1995). Bei dieser Methode der PCC-Induktion entfällt die aufwendige Zellfusion, die mit der Synchronisierung und Bereitstellung einer hohen Anzahl mitotischer Zellen verbunden ist.

Zunächst war beobachtet worden, daß durch den Einsatz von Okadasäure die vorzeitige Chromosomenkondensation in Zellen humanen Ursprungs und in Zellen von Nagern induziert werden konnte (Yamashita *et al.,* 1990; Steinmann *et al.,* 1991; Ghosh *et al.,* 1992). Diese Studien wurden allerdings nach Synchronisation an in der S-Phase blockierten Zellen durchgeführt. In Lymphozyten in der G_0-Phase ist die Menge der mitotischen Faktoren extrem gering. Wie durch den Einsatz von Calyculin A gezeigt werden konnte, ist eine PCC-Induktion nur nach vorheriger *in vitro*-Aktivierung möglich (Durante *et al.*, 1998). Okadasäure und Calyculin A sind spezifische Hemmstoffe der Typ 1 und Typ 2 Serin/Threonin-Phosphatase (PP1, PP2A). Serin/ Threonin-Phosphatasen blockieren die MPF-Aktivität während der Interphase. Okadasäure induziert selektiv die Phosphorylierung verschiedener Proteine, die mit der Zellzyklus-Regulation und -Progression verbunden sind, einschließlich der Lamine, Histone H3 und der $p34^{cdc2}$ (Übersicht in: You und Bird, 1995). Über eine Zunahme der H1-Kinase-Aktivität in Okadasäure-behandelten Zellen wurde berichtet. Auf der anderen Seite wurde ein von der cdc2-Kinase-Aktivität unabhängiger Weg vorgeschlagen (Guo *et al.,* 1995). In Experimenten, in welchen eine vorzeitige meiotische Chromosomenkon-

densation durch Okadasäure induziert wurde, beobachtete man das zusätzliche Auftreten der Nek2-Kinase (Fry et al., 1995). Ob es sich um die Koordination zweier Kinasen handelt oder ob ein von der cdc2-Kinase unabhängiger Weg existiert, ist noch ungeklärt (Ye *et al.,* 1995; Ghosh *et al.,* 1998).

2.2 DER EINSATZ DER PCC-TECHNIK

Die PCC-Technik wird in der Diagnostik von Leukämien und soliden Tumoren, in der pränatalen Diagnostik und in der Mutagenitätstestung eingesetzt. Nach PCC-Induktion wird auch die Untersuchung des Karyotyps einer Interphasezelle im G_1 und G_2-Stadium möglich. Für die Tumorzytogenetik hat die PCC-Technik diagnostische und prognostische Bedeutung. Besonders bei Erkrankungen des hämatopoetischen Systems wie Leukämien, Myelomen und Myelodisplasien wurde die PCC-Technik eingesetzt. Die Verteilungsmuster der Interphasestadien von normalen Zellen und leukämischen Zellen unterschieden sich signifikant zum Zeitpunkt der Diagnose, bei Vollremission und bei bevorstehendem Rezidiv (Hittelman 1986 a). Mit der PCC-Technik konnte gezeigt werden, daß normale Zellen in der frühen G_1-Phase arretiert und maligne Zellen in der späten G_1-Phase akkumuliert wurden. Hittelman und Rao (1976) definierten den Proliferationsindex (PPI). Der PPI gibt den Anteil später G_1-PCCs an der Gesamtzahl der G_1-PCCs an. Über den PPI konnten Aussagen über den Zustand und den weiteren Verlauf einer Leukämieerkrankung gemacht werden. Normale Knochenmarkszellen und Leukämien in Vollremission wiesen PPI-Werte unter 20% auf, während PPI-Werte über 30% auf ein bevorstehendes Rezidiv hindeuteten (Hittelman, 1986 a; Morse *et al.*, 1987; MacLeod *et al.*, 1989; Gebhart, 1989; Tittelbach, 1992). Bei Zellen humaner solider Tumoren erwies sich die PCC-Technik auch als zusätzliche Quelle für cytogenetische Informationen. Die bei Tumorpatienten mit der PCC-Technik ermittelteten hoch individuellen Verteilungsmuster der verschiedenen Interphasestadien in Tumorzellen boten einen einfachen Hinweis auf die Heterogenität der Tumorzellpopulationen (Brüderlein *et al.,* 1986). Die Kombination der PCC-Technik mit der Immunophänotypysierung ermöglichte in der Fallstudie eines multiplen Myeloms die Identifizierung und Karyotypisierung von Plasmazellen (Petkovic *et al.,* 1989). In der pränatalen Diagnostik wurde die PCC-Technik zur Analyse der Zellzykluskinetik von nativen Chorionzellen des ersten Schwangerschaftstrimenons eingesetzt (Raabe und Miller, 1990; Metze und Miller, 1994; Miller *et al.*, 1996).

2.3 PCC-TECHNIK UND MUTAGENITÄTSTESTUNG

Bei konventionellen cytogenetischen Methoden werden Zellen im Metaphasestadium der Mitose analysiert. Die Sichtbarmachung chromosomaler Schädigung auch außerhalb der Mitose eröffnete neue Möglichkeiten zum Studium klastogener Wirkung chemischer und physikalischer Mutagene. Über erste Anwendungen der PCC-Technik in der Mutagenitätstestung berichteten Hittelman und Rao bereits 1974.

2.3.1 CHEMISCHE MUTAGENE

Die PCC-Methode erwies sich in zahlreichen Untersuchungen als die im Vergleich zur Metaphasenanalyse sensitivere Methode (Cornforth und Bedford, 1983 b; Abkaì *et al.,* 1987; Tittelbach *et al.,* 1989). Bei PCCs konnten nach Inkubation mit wesentlich geringeren Mutagenkonzentrationen

eine Schädigung festgestellt werden, die in ihrem Ausmaß der Schädigung bei Metaphasen entsprach; im Falle von Bleomycin genügte bereits eine 100-fach niedrigere Konzentration, damit ähnliche Effekte wie in Metaphasen sichtbar wurden (Abkaì *et al.,* 1987; Tittelbach *et al.,* 1989). Asakawa und Gotoh (1997) stellten eine sehr sensitive Methode zur Detektion von MMC-induzierten Schwesterchromatidaustauschen (SCE) bei vorzeitig kondensierten Chromosomen vor. Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierte humane periphere Lymphozyten wurden in Brom-desoxyuridid (BrdU)-haltigem Medium kultiviert und mit MMC behandelt. Die PCC-Induktion erfolgte mit Calyculin A. Die BrdU-substituierten Chromatiden wurden mit der Immunogold-Silber-Färbung (IGSS) sichtbar gemacht. Diese Methode ermöglichte die Sichtbarmachung von SCEs bei geringerer BrdU-Konzentration und bei kürzerer BrdU-Markierungsdauer; dies führte zu einer Minimierung der SCE-Grundrate im Vergleich zur FPG-Methode.

2.3.2 PHYSIKALISCHE MUTAGENE

Von einer Dosis-Wirkung-Beziehung bei einer strahlungsinduzierten Schädigung in G_1-PCCs von Säugerzellen wurde erstmals von Waldren und Johnson (1974) berichtet. Die Tatsache, daß PCCs in Zellen innerhalb von Minuten nach der Strahlung induziert werden können, macht die PCC-Technik zu einer interessanten Methode, um frühe Effekte der Strahlung auf Chromatin zu untersuchen (Übersicht in: Cornforth und Bedford, 1993). War der Zeitraum zwischen Bestrahlung und Analyse kurz gewählt, um signifikante Reparatureinflüsse auszuschließen, erwies sich die Auswertung von PCCs besonders für niedrigere Strahlungsdosierung sensitiver als die von Metaphasen. Die Dosis-Effekt-Kurven zeigten für Brüche in vorzeitig kondensierten Chromosomen einen linearen Verlauf (Übersicht in: Durante *et al.*, 1996 b) und für Austausche in Metaphasechromosomen einen linear-quadratischen Verlauf (Lucas *et al.,* 1992). Vorzeitig kondensierte Chromosomen von CHO-K1-Zellen wiesen in der G_2-Phase nach Röntgenstrahlung signifikant höhere Aberrationsraten als Metaphasechromosomen auf (Darroudi und Natarajan, 1989). G_2-PCCs wiesen nach Bestrahlung eine erhöhte Häufigkeit von Chromatidbrüchen (2-fach) und von Gaps und Austauschen (1,25-fach) auf (Hittelman und Rao, 1974 b). Vorzeitig in der G_1-Phase kondensierte Chromosomen von HeLa-Zellen zeigten ein 3- bis 10-fach höheres Ausmaß an Schädigung als Metaphasechromosomen (Waldren und Johnson, 1974). Im Vergleich zur Metaphasenanalyse bzw. zur Bestimmung der Mikronuklei-Rate erwies sich die PCC-Technik als die präzisere Methode, um den Anteil ungeschädigter Zellen nach Teilkörperbestrahlung mit Röntgenstrahlung im Knochenmark von Rhesusaffen abzuschätzen (Darroudi *et al.*, 1998).

Das Ausmaß einer strahlungsinduzierten Schädigung läßt sich bei PCCs durch das Auszählen von Chromatinfragmenten in Giemsa-gefärbten Präparaten (Prasanna *et al.*, 1997) oder durch Sichtbarmachung von dizentrischen Chromosomen nach C-Bänderung (Vyas *et al.*, 1991; Pantelias *et al.*, 1993) ermitteln. Auch in Kombination mit der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) läßt sich die PCC-Technik gut für die biologische Dosimetrie von absorbierter Strahlung einsetzen. Der Einsatz von chromosomenspezifischen Sonden ermöglichte leicht und verläßlich die Identifizierung von chromosomalen Umbauten in PCCs (Durante *et al.*, 1996 b).

2.3.3 REPARATURKINETIKSTUDIEN BEI VORZEITIG KONDENSIERTEN CHROMOSOMEN

Die vergleichende Untersuchung von PCCs und mitotischen Metaphasechromosomen kann das Ergebnis möglicher Reparaturprozesse von Chromosomenschädigungen sichtbar machen. Im Gegensatz zur Analyse von Metaphasen, die eine eher indirekte Aussage über das anfängliche Ausmaß einer Schädigung erlaubt, wird durch die Untersuchung von PCCs eine Chromosomenschädigung direkt in engem zeitlichen Zusammenhang mit ihrer Entstehung erfaßt (Abka´i *et al.,* 1987). Die PCC-Technik bietet damit einen qualitativen und quantitativen Einblick in primäre Aberrationsprozesse. Indem eine vorzeitige Kondensation des Chromatins zu verschiedenen Zeitpunkten nach Mutagenbehandlung induziert werden kann, ist die Geschwindigkeit der Chromosomenreparatur direkt meßbar (Sen und Hittelman, 1984).

2.4 METHODISCHE ASPEKTE DER PCC-ANALYSE

2.4.1 IDENTIFIZIERUNG VON FUSIONSPRODUKTEN

Bei der Anreicherung von mitotischen Zellen sind reine Mitosefraktionen kaum zu erhalten. Daher wurde von Cornforth und Bedford (1983 a) eine Methode etabliert, die eine Identifizierung der Fusionsprodukte erlaubte. Um auszuschließen, daß es sich bei den PCCs um Fusionsprodukte von Induktorzellen mit sich selbst handelt, werden die Induktorzellen für mindestens zwei Replikationszyklen in Bromdesoxyuridin-haltigem Medium kultiviert. Nach der Fluoreszenz-plus-Giemsa-Färbung der Präparate erscheinen die Induktorzellen aufgrund ihres BrdU-Einbaus in die DNA hell, die vorzeitig kondensierten Chromosomen der Zielzellen jedoch dunkel. Bei der Anwendung molekularcytogenetischer Methoden, wie der *in situ*-Hybridisierung kann eine Identifizierung der Zielchromosomen dadurch gewährleistet werden, daß die Zielzellen humanen, die mitotischen Induktorzellen nichthumanen Ursprungs sind (Evans *et al.,* 1991).

2.4.2 STRUKTURELLE ABERRATIONEN VON VORZEITIG KONDENSIERTEN CHROMOSOMEN

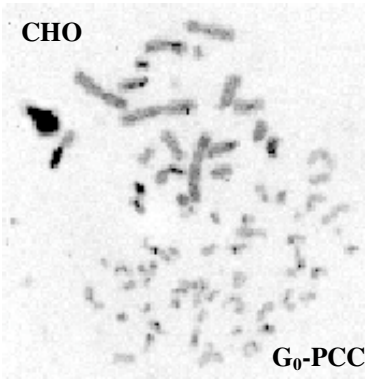


Abb. 2.3
G_0-PCC peripherer Blutlymphozyten nach C-Bänderung

Cytogenetische Färbemethoden, die an mitotischen Chromosomen durchgeführt werden, sind auch für G_1- und G_2-PCCs möglich. An PCCs der G_1- bzw. G_2-Phase wurde eine erfolgreiche G-Bänderung durchgeführt, wenngleich deren mäßige Qualität die Auswertung erschwerte (Hittelman *et al.,* 1988).

Vorzeitig in der G_2-Phase kondensierte Chromosomen sind wie mitotische Chromosomen doppelsträngig, sodaß Aberrationen als Chromatidgaps, Brüche und Austausche erscheinen (Hittelman und Rao, 1974 b). Mit der konventionellen Giemsa-Färbung ist die Centromerregion von G_1-PCCs nicht sichtbar; folglich können dizentrische Chromosomen, zentrische Ringchro-

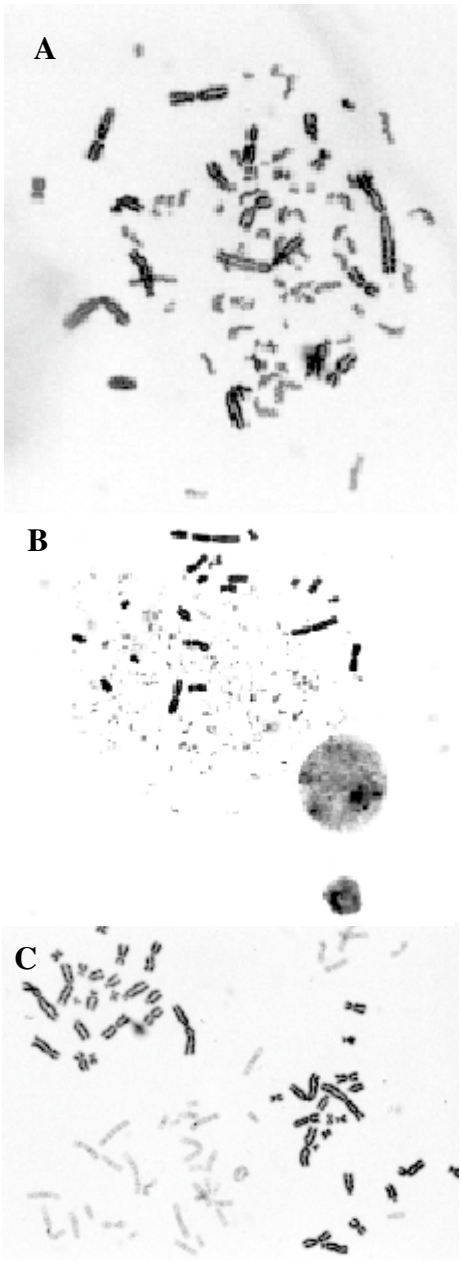
mosomen und azentrische Fragmente nicht identifiziert werden. Durch den Einsatz der C-Bänderung wurde es möglich, diese Aberrationen auch in unstimulierten Lymphozyten zu ermitteln (Pantelias *et al.,* 1993). Da vorzeitig in der G_1- und G_2-Phase des Zellzyklus kondensierte Chromosomen als distinkte Strukturen erscheinen, kann mit der PCC-Technik auch die Chromosomenanzahl einer Zelle ermittelt werden. Die vorzeitig kondensierten Chromosomen reflektieren den Karyotyp einer Zelle. In ungeschädigten Zellen entspricht die Chromosomenzahl, die in Interphasezellen ermittelt wird, derjenigen in mitotischen Zellen. Ein Chromosomenbruch resultiert in der Bildung eines zusätzlichen chromosomalen Elements. Vorzeitig in der S-Phase kondensierte Chromosomen sind aufgrund ihrer pulverisierten Morphologie für Aberrationsanalysen jedoch nicht geeignet.

2.4.3 ZELLKINETIK-STUDIEN

2.4.3.1 ZELLZYKLUSPHASEN

Mit der Einführung der PCC-Technik wurden Zellkinetikstudien um einen zusätzlichen Aspekt erweitert: mit dieser cytogenetischen Methode konnte das Verteilungsmuster der verschiedenenen Zellzyklusphasen innerhalb einer Zellpopulation ermittelt werden. Anhand der unterschiedlichen Morphologie ihres vorzeitig kondensierten Chromatins konnten Zellen demjenigen Zellstadium zugeordnet werden, das sie zum Zeitpunkt ihrer Fusion durchlaufen hatten. Die Applikation bestimmter Mutagene kann eine Veränderung der Zellzyklusphasen im Vergleich zu den Kontrollkulturen bewirken. So wurde die signifikante Erhöhung der G_2-Fraktion von CHO- und HeLa-Zellen nach Behandlung mit verschiedenen in der Krebstherapie eingesetzten Medikamenten darauf zurückgeführt, daß die Zellen so stark geschädigt wurden das sie den Zellzyklus nicht mehr beenden konnten (Rao und Rao, 1976). Die Wirkung von verschiedenen Cytostatika auf den Zellzyklus wurde mit der PCC-Technik auch an PHA-stimulierten menschlichen Lymphozyten ausgetestet (Herrera *et al.*, 1991). Die Ergebnisse zeigten Veränderungen in der Verteilung der Zellzyklusphasen nach einer 72-stündigen Kultivierung. 4-Hydroxy-Cyclophosphamid bewirkte eine Akkumulation der Zellpopulation in der G_2-Phase, d.h. Cyclophosphamid erhöhte die Häufigkeit von G_2-PCCs und reduzierte die Anzahl von Zellen in der S-Phase. Mitomycin C erhöhte den Anteil von PCCs in der S- und späten G_1-Phase und reduzierte den Anteil von Zellen in der frühen G_1-Phase. Melphalan dagegen erhöhte das Auftreten von späten G_1-PCCs (Herrera *et al.*, 1991).

2.4.3.2 TEILUNGSZYKLEN



Mit dem Einsatz der Fluoreszenz-plus-Giemsa (FPG)-Technik kann die Kinetik von Zellen untersucht werden. Voraussetzung ist jedoch, daß die Zellen teilungsaktiv sind und in BrdU-haltigem Medium kultiviert wurden. Der BrdU-Einbau folgt dabei dem Mechanismus der semikonservativen DNA-Replikation. Die Methode beruht auf dem Einbau des Thymidin-analogen 5´-Bromdesoxyuridin in die DNA während der Synthesephase des Zellzyklus und der differentiellen Anfärbbarkeit der Schwesterchromatiden mit einem Fluoreszenzfarbstoff und anschließender Giemsa-Färbung. Mit der PCC-Technik und anschließender FPG-Färbung wurde gezeigt, daß es neben dem Studium der Zellphasen-Verteilung innerhalb einer Gesamtzellpopulation möglich war, auch das Färbemuster der Schwesterchromatiden und damit die Anzahl der Teilungen zu bestimmen Eine differentielle Färbung der Chromatiden ist zu jeder Phase des Zellzyklus, also in der G_1-, S- und G_2-Phase und in der Mitose möglich (Lau und Arrighi, 1980). Die PCC-Technik wurde in Kombination mit der differentiellen Färbung von Chromatiden mittels Bromdesoxyuridin auch zum Studium der Zellzyklusstadien und Zellkinetik von humanen Knochenmarkszellen eingesetzt (Zhang *et al.*, 1988).

Abb. 2.4 Vorzeitig kondensierte Chromosomen humaner Lymphozyten nach Fusion mit mitotischen CHO-Zellen (große dunkle Chromosomen)

A	G1-PCCs	mit einzelsträngigen Chromatiden
B	S-PCCs	pulverisierteMorphologie
C	G_2-PCCs	mit zwei Chromatiden zeigen nach Durchlaufen des 1. Replikationszyklus in BrdU-haltigem Medium eine Bänderung

2.4.4 FLUORESZENZ *IN SITU*-HYBRIDISIERUNG

2.4.4.1 METHODIK

Die Technik der *in situ*-Hybridisierung ermöglicht den Nachweis spezifischer DNA-Sequenzen mit fluoreszenzmarkierten DNA-Sonden direkt in cytologischen Präparaten ("*in situ*"). Ziel-DNA und Sonden-DNA werden durch Denaturierung einzelsträngig gemacht und bilden im Verlauf der sog. Renaturierung an ihren homologen Sequenzen wieder komplementäre Stränge ("Hybridisierung"). Eine häufig eingesetzte Methode zur Markierung der Sonden-DNA ist die Nicktranslation (Rigby *et al.,* 1977). Biotin und Digoxygenin sind dabei die häufigsten Markermoleküle, die in die Sonden-DNA eingebaut werden (Langer *et al.,* 1981). Bei dem Nachweis der Biotin-Markierung mit dem Biotin-Avidin-System wird die hohe Bindungsaffinität zwischen Biotin und Avidin bzw. Avidin-Derivaten ausgenutzt. Die Detektion der biotinylierten DNA-Sonde erfolgt in einem ersten Schritt über Avidin, das mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt ist. Durch Zugabe biotinylierter anti-Avidin-Antikörper und einer weiteren Lage von Fluorochrom-gekoppeltem Avidin wird das Signal verstärkt (Scherthan *et al.,* 1989; Leitch, 1994).

2.4.4.2 DAS CHROMOSOME PAINTING

Der Einsatz der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) mit chromosomenspezifischen Sonden erlaubte die selektive Sichtbarmachung einzelner Chromosomen (Lichter *et al.*, 1988; Pinkel *et al.*, 1988). Diese Technik, die auch "*chromosome painting*" genannt wird, hat den Vorteil, daß numerische und strukturelle Aberrationen einzelner Chromosomen leicht und schnell entdeckt werden können. Zugewinn oder Verlust spezifischer Chromosomen und strukturelle Umbauten innerhalb der Chromosomen wie Austausche können leichter und schneller bestimmt werden. Die Auswertung besonders komplexer chromosomaler Umbauten wird im Vergleich zur G-Bänderungstechnik erleichtert. In der Mutagenitätsforschung wurde das "*chromosome painting*" in Kombination mit der PCC-Technik zur Quantifizierung strahlungsinduzierter Schädigung eingesetzt. Dies ermöglicht die Identifizierung von Brüchen und Austauschen, bevor die Zellen das Metaphasestadium erreichen (Evans *et al.,* 1991; Brown *et al.*, 1993; Mühlmann-Diaz und Bedford, 1994). Die exakte Auswertung von PCCs wird besonders dann erschwert, wenn durch Mutageneinwirkung, wie z.B. durch Strahlung, besonders viele Fragmente entstehen. Durch den Einsatz der FISH wird die Quantifizierung der Schädigung wesentlich erleichtert. Eine ungeschädigte diploide Zelle enthält zwei markierte Chromosomen. Ein Bruch in einem dieser Chromosomen resultiert in einem zusätzlichen markierten chromosomalen Stück. Ein Bruch im Zielchromosom wird mit FISH somit in 3 markierten chromosomalen Abschnitten sichtbar, mit der Giemsa-Technik müssen dagegen 47 Chromosomen in einer diploiden menschlichen Zelle gezählt werden. Die Zentromerregionen von vorzeitig kondensierten Chromosomen sind strukturell nicht sichtbar und folglich sind dizentrische Chromosomen mit der Giemsa-Färbung nicht nachweisbar (Evans *et al.,* 1991). Durch den Einsatz einer centromerspezifischen Sonde wurde es möglich, die Bildung von strahlungsinduzierten dizentrischen Chromosomen in menschlichen Fibroblasten in der Ruhephase zu entdecken (Cornforth *et al.,* 1992). Bei einer Studie wurde durch den Einsatz der Painting-Sonden für die humanen Chromo-

somen 1 und 4 gezeigt, daß bei röntgenbestrahlten humanen Lymphozyten die Häufigkeit der beobachteten Austauschaberrationen von denen, die aufgrund des DNA-Gehalts erwartet wurden, abwich (Natarajan *et al.*, 1996). Dabei war Chromosom 4 besonders häufig in Austauschprozesse involviert. Während Chromosom 1 bei dizentrischen Chromosomen und reziproken Translokationen etwa gleich häufig betroffen wurde, waren bei Chromosom 4 reziproke Translokationen etwa doppelt so häufig wie dizentrische Chromosomen (Boei et al., unveröffentlichte Ergebnisse in: Natarajan *et al.*, 1996). Ein möglicher Faktor für die höhere Sensitivität von Chromosom 4 ist die geringe Konzentration transkribierender Gene im Vergleich zu Chromosom 1 (Craig und Bickmore, 1994).

2.5 ANALYSE VON METAPHASECHROMOSOMEN

Das Erscheinungsbild einer induzierten Chromosomenaberration im Metaphasestadium hängt im wesentlichen davon ab, ob ein S-Phase-abhängiges oder ein S-Phase-unabhängiges Mutagen eingesetzt wird und in welchem Zellzyklusstadium die Behandlung erfolgt (Madle *et al.,* 1992). Werden Zellen mit einem S-Phase-unabhängigen Mutagen, wie z. B. mit Röntgenstrahlung, in der G_1-Phase behandelt, so werden Aberrationen beider Chromatiden (sog. chromosomaler Typ), nach Behandlung in der G_2-Phase Einzel-Chromatid-Aberrationen (Chromatidtyp) induziert. Je nach Replikationsgrad werden nach Inkubation in der S-Phase Aberrationen des chromosomalen oder chromatidalen Typs oder auch beide Aberrationstypen nebeneinander induziert. Im Falle der S-Phase-wirksamen Mutagene, wie z.B. UV-Strahlung, beobachtet man in der auf die Behandlung folgenden Mitose Chromatid-Aberrationen, nach Behandlung in der G_2-Phase werden in der folgenden Mitose keine Aberrationen sichtbar. Erst beim Durchlaufen eines weiteren Zellzyklus können chromatidale Aberrationen auftreten (Bostock und Sumner, 1978; Madle *et al.,* 1992). Einige Formen von Chromosomenaberrationen wie dizentrische oder azentrische Chromosomen sind instabil und eine geordnete Verteilung dieser Chromosomen ist bei der nachfolgenden Zellteilung nicht gewährleistet (Mutchinick *et al.,* 1980). Daher ist es wichtig, ausschließlich Zellen zu untersuchen, die das Mitosestadium zum erstenmal nach Mutagenbehandlung erreichen (Savage, 1975; Carrano und Natarajan, 1988; Bender und Moore, 1991). Um hauptsächlich Metaphasen zu erhalten, die exakt *einen* Replikationszyklus durchlaufen haben, werden meist 48-Stunden-Kulturen angelegt (Buckton und Evans, 1973; Dresp und Bauchinger, 1988). Diese Metaphasen können mit der Fluoreszenz-plus-Giemsa (FPG)-Technik identifiziert und von den mitotischen Zellen unterschieden werden, welche die Replikationszyklen zwei-, drei- oder mehrmal durchlaufen haben (Tice *et al.,* 1976).

2.6 VERWENDETE ZELLEN

2.6.1 HUMANE PERIPHERE BLUTLYMPHOZYTEN

Peripheres Blut ist das am häufigsten eingesetzte Material für postnatale Chromosomenuntersuchungen, da es leicht gewonnen und kultiviert werden kann (Verma und Babu, 1989). Unstimulierte periphere Blutlymphozyten sind Zellen in Ruhephase. Im Grunde genommen stellen alle peripheren Blutlymphozyten eine in der G_0-Phase des Zellzyklus synchronisierte Zell-

population dar. Ruhende normale Zellpopulationen sind ideal für Mutagenitätsstudien, da sie nach der Fusion kurze und leicht auswertbare PCCs aufweisen (Hittelman *et al.,* 1980). Um eine Teilung der Lymphozyten zu erreichen, müssen die Zellen erst mit Mitogenen stimuliert werden. Durch Bindung von mitogenen Agentien an Lymphozyten-Oberflächenrezeptoren verlassen die Zellen das G_0-Ruhestadium und durchlaufen die G_1- und S-Phase (Coffey, 1988). Im Gegensatz zu Antigenen stimulieren Mitogene als polyklonale Aktivatoren 10-50% aller Lymphozyten in vitro. Mitogene binden demnach nicht an die antigen-spezifischen Rezeptoren der Lymphozyten, sondern an bestimmte Kohlenhydratstrukturen, die auf sämtlichen Lymphozyten zu finden sind. Trotzdem sind die meisten Mitogene nicht völlig unspezifisch, sondern aktivieren vorzugsweise B- oder T-Zellen (Langner *et al.,* 1995). Das Mitogen Phytohämagglutinin (PHA) ist ein Glykoprotein von *Phaseolus vulgaris*, das die polyklonale Blastentransformation von Lymphozyten triggert (Nowell, 1960 in: Coffey, 1988). Phytohämagglutinin stimuliert vorzugsweise T-Zellen menschlicher Lymphozyten (Ax, 1982; Thomou *et al*., 1988; Langner *et al.,* 1995). Die Synthese-Phase beginnt etwa 24 Stunden nach der PHA-Stimulierung; die Dauer der S-Phase ist bei stimulierten Lymphozyten recht variabel (Darzynkiewicz *et al.,* 1979).

2.6.2 CHO-ZELLEN

1958 gelang es, Fibroblasten des Chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus* zu kultivieren. Eine dieser Fibroblastenkulturen stammte von einer Ovarialbiopsie (Tijo und Puck, 1958). Die Zellen dieses Klons - auch CHO (chinese hamster ovary) genannt - besaßen einen normalen, diploiden Chromosomensatz mit 20 Autosomen und 2 Gonosomen. CHO-Zellen sind leicht zu kultivieren. Mitotische CHO-Zellen können leicht durch selektives Abklopfen gewonnen werden. Sie erreichen nach Colcemid-Block hohe Mitose-Indices. Pantelias und Maillie (1983) ermittelteten bei CHO-Zellen einen Mitose-Index von über 95%. Mitotische CHO-Zellen werden daher häufig als PCC-Induktorzellen –so auch in der vorliegenden Arbeit- eingesetzt.

2.7 TESTSUBSTANZEN

2.7.1 α,β-UNGESÄTTIGTE ALDEHYDE

2.7.1.1 ALLGEMEINE STRUKTUR

Charakteristisch für α,β-ungesättigte Aldehyde (2-Alkenale) ist die Doppelbindung in Konjugation zur Carbonylfunktion. Für die Mutagenitätstestungen von α,β-ungesättigten Aldehy-den wurden in dieser Arbeit zwei Vertreter mit unter-schiedlicher Länge der Kohlenstoffkette gewählt: 2-Butenal *cis*+*trans* (Crotonaldehyd) und *trans*-2-Hexenal (Blätteraldehyd).

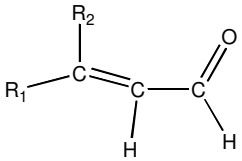
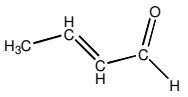
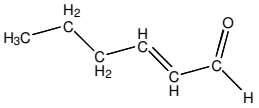


Abb.2.5 Allg. Struktur von α,β-ungesättigten Aldehyden (2-Alkenalen) (R_1, R_2 = z.B. H, Alkyl, Allyl ...)



Crotonaldehyd



***trans*-2-Hexenal**

Abb.2.6 Struktur von Crotonaldehyd und *trans*-2-Hexenal

2.7.1.2 VORKOMMEN

α,β-Ungesättigte Aldehyde kommen in der Natur als Inhaltsstoffe in vielen Obst- und Gemüsepflanzen vor. Aroma und Geschmack zahlreicher Früchte werden durch diese Verbindungen bestimmt oder zumindest maßgeblich beeinflußt (Schauenstein *et al.,* 1977). *Trans*-2-Hexenal ist das am häufigsten natürlich vorkommende 2-Alkenal. Nachgewiesen wurde *trans*-2-Hexenal u.a. in Äpfeln, Birnen, Weintrauben, Erdbeeren, Tomaten und in Bananen (Übersicht Schauenstein *et al.*, 1977) mit der höchsten Konzentration von 76 ppm (Feron *et al.*, 1991). *Trans*-2-Hexenal besitzt eine ausgeprägt "fruchtig-grüne" Note und wird in beachtlichem Umfang zur Aromatisierung von Lebensmitteln eingesetzt (Firmenich *et al.,* 1980). *Trans*-2-Hexenal ist auch wegen seiner fungiziden Wirkung bekannt. So wurde die Resistenz von *Gingko biloba* gegenüber Pilzen, z.B. in mazerisierten Blättern, auf die Produktion von *trans*-2-Hexenal zurückgeführt (Major *et al.*, 1963). Crotonaldeyd findet man in vielen Früchten in Konzentrationen < 0,01 ppm, in Gemüsen bis 0,1 ppm und in Milch, Käse, Fleisch oder Fisch bis 0,04 ppm und in Rotwein mit der höchsten Konzentration von 0,7 ppm (Feron *et al.,* 1991). Crotonaldehyd wird außerdem bei der Verbrennung von fossilen Brennstoffen (einschließlich Autoabgasen), in Holz, Tabak und in erhitzten Speiseölen gebildet (IARC, 1995).

2.7.1.3 CHEMISCHE REAKTIVITÄT

2-Alkenale sind direktwirkende, alkylierende Substanzen, an die ohne Metabolisierung kovalent nukleophile Gruppen wie Thiol-, Amino- oder Hydroxygruppen binden können (Witz, 1989). Wegen des konjugierten Doppelbindungssystems existieren verschiedene Mesomeriegrenzstrukturen. Der Elektronenzug des Sauerstoffs bewirkt die Polarisierbar-

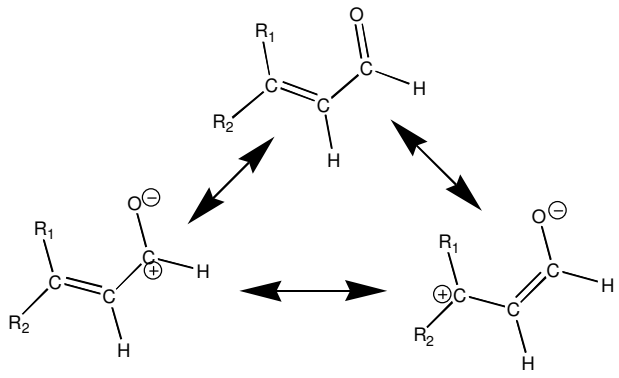


Abb.2.7 Mesomere Grenzstrukturen von 2-Alkenalen

keit der Carbonylgruppe. Durch die benachbarte Doppelbindung und Mesomerieverschiebung können das C1- und das C3-Atom positiviert werden. Nukleophile reagieren entweder am C1-Atom in einer 1,2-Addition oder am C3-Atom in einer 1,4-Addition oder sowohl am C1- als auch am C3-Atom. Unter physiologischen Bedingungen scheint die 1,4-Addition die Hauptre-

aktion zu sein (Schauenstein *et al.,* 1977; Esterbauer, 1982). In den Zellen reagieren vor allem SH- und NH_2- Gruppen von Aminosäuren, Enzymen oder Proteinen (Eder *et al*. 1982). Die Reaktionsprodukte α,β-ungesättigter Aldehyde mit Thiolgruppen sind gesättigte Aldehyde, die die SH-Gruppe über eine Thioetherbrücke am C3-Atom gebunden haben.

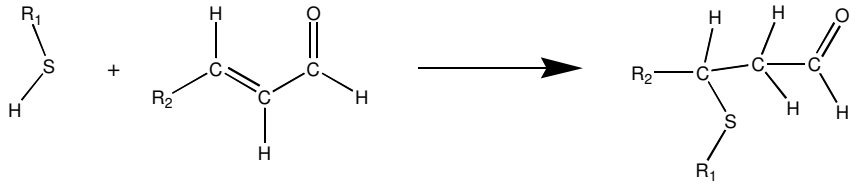
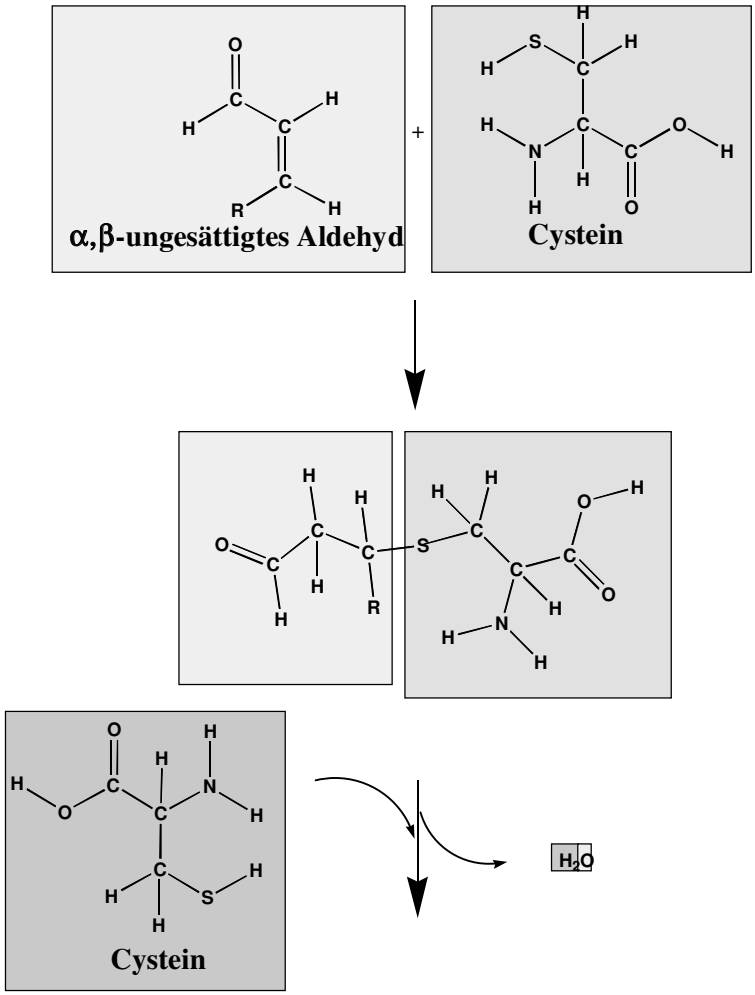


Abb.2.8. Reaktion von SH-Gruppen mit α. β- ungesättigten Aldehyden



Im Falle des Cysteins reagiert mit diesem Primäraddukt ein weiteres Cysteinmolekül unter Bildung eines Thiozilidin-Derivats (Esterbauer *et al.*, 1976). Die Reaktionsgeschwindigkeit von 2-Alkenalen mit Aminogruppen ist etwa dreihundertfach langsamer als mit SH-Gruppen. Bei der Reaktion mit Aminogruppen sind sowohl eine 1,4-Addition als auch die Bildung Schiff´scher Basen möglich (Schauenstein *et al.,* 1977; Esterbauer, 1982).

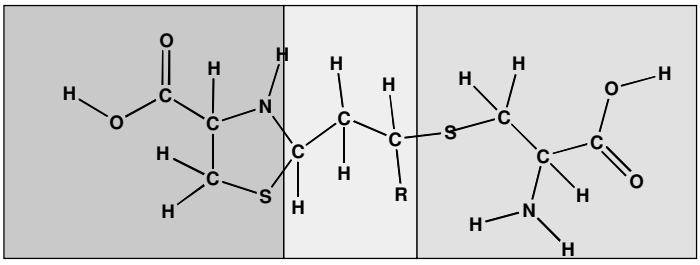


Abb.2.9
Reaktion von Cystein mit 2-Alkenalen; Erklärung s. Text

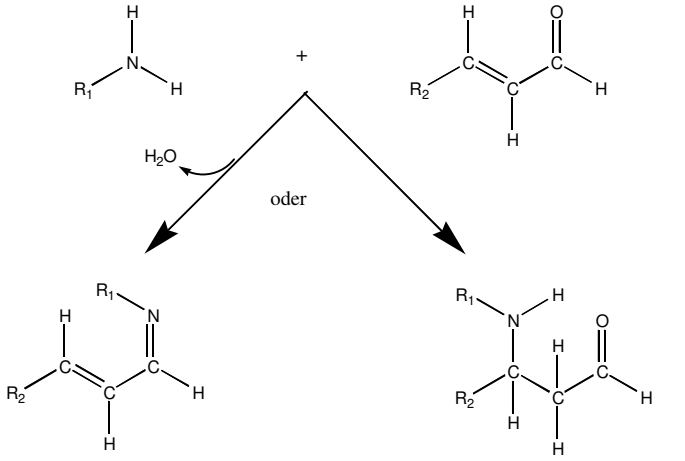
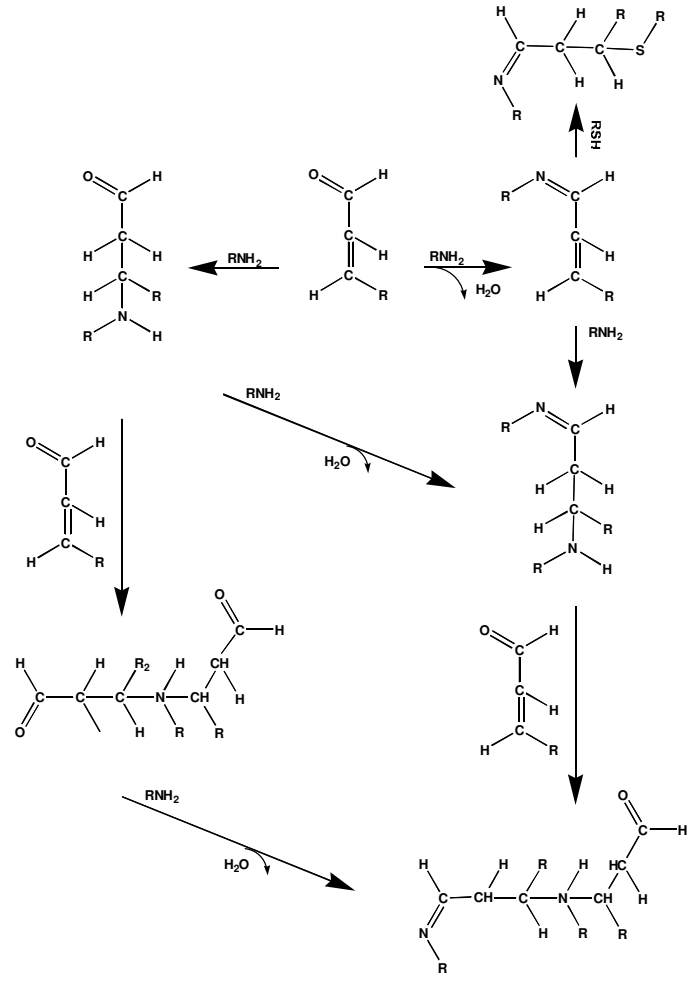


Abb. 2.10.
Reaktionen von Aminogruppen mit α, β- ungesättigten Aldehyden



Nachfolgende Reaktionen können dann zu Quervernetzungen von Proteinen und Aminosäuren führen.

Abb. 2.11.
Quervernetzung von Proteinen und Aminosäuren (R = Alkyl, RNH_2, RSH = Nucleophile, Aminosäuren oder Proteine) (nach Schauenstein *et al.*, 1977)

2.7.1.4 BIOLOGISCHE WIRKUNG

Eine carcinogene Wirkung wurde für Crotonaldehyd bei F344-Ratten nachgewiesen, die nach oraler Gabe durch Trinkwasser Lebertumore entwickelten (Chung *et al.,* 1986). Eine cytotoxische Wirkung von α,β-ungesättigten Aldehyden wurde in verschiedenen Zellinien und Geweben nachgewiesen (Krokan

et al. 1985; Schuhmacher, 1990). Die Cytotoxizität α,β-ungesättigter Aldehyde kann auf die Deaktivierung von essentiellen SH-Gruppen von Proteinen, Enzymen und Thiolverbindungen, z.B. Cystein, Glutathion (GSH) und Coenzym A zurückgeführt werden. Dies führt zur Hemmung von Zellwachstum und Zellteilung (Schauenstein *et al.,* 1977; Schauenstein und Esterbauer, 1979). Die Cytotoxizität nimmt mit steigender Länge der Kohlenstoffkette zu (Canonero *et al.,* 1990). Dieser Effekt ist dabei höchstwahrscheinlich auf eine Zunahme der Lipophilie α,β-ungesättigter Aldehyde zurückzuführen (Eder *et al.,* 1993). Die Wechselwirkungen von α,β-ungesättigten Aldehyden mit Proteinen und Enzymen können auch indirekt zu einer genotoxischen Wirkung beitragen (Eder *et al.,* 1993). Das Reparaturenzym 0^6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase, das einen Cysteinrest im aktiven Zentrum enthält, wird durch α,β-ungesättigte Aldehyde gehemmt (Krokan *et al.,* 1985; Grafström *et al*., 1988). Die Inaktivierung der Glukose-6-Phosphatase (Jorgensen *et al.,* 1992) und der Glutathion-Reduktase (Vander Jagt *et al.,* 1997) wird auf die Reaktion mit α,β-ungesättigten Aldehyden zurückgeführt. Crotonaldehyd induzierte Mutationen im *SupF*-Gen des Plasmidvektors pMY189. Dabei waren 85% der Mutationen Basenmutationen und der Rest von 15% Frameshifts (Kawanishi *et al.,* 1998). α,β-Ungesättigte Aldehyde zeigten im Ames-Test im Salmonella typhimurium TA104-Stamm und im TA 100-Stamm mutagene Effekte (Marnett *et al.*, 1985; Eder *et al*., 1992). Bei diesen Bakterienstämmen wurde allerdings der Nachweis einer mutagenen Wirkung mit zunehmender Kettenlänge der α,β-ungesättigten Aldehyde erschwert. Eine mutagene Wirkung wurde auch in Säugerzellen nachgewiesen, die mit steigender Kettenlänge zunahm. Säugerzellen erwiesen sich für die Untersuchung der Mutagenität als das geeignetere Testsystem, da bei Bakterienzellen eine mögliche mutagene Wirkung durch die Cytotoxizität der längerkettigen 2-Alkenale nicht erkannt wird (Canonero *et al.*, 1990; Eder *et al.*, 1992). 2-Alkenale können mit der DNA Addukte bilden. Die Bildung von DNA-Addukten gilt als Indikator für Mutagenität, Cytotoxizität und wahrscheinlich auch Carcinogenität

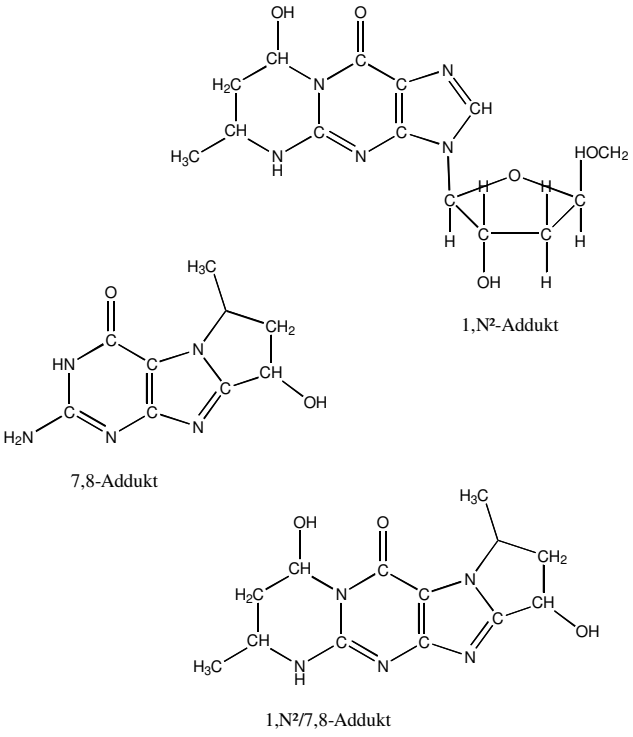


Abb. 2.12.
DNA-Addukte von Crotonaldehyd mit Desoxyguanosin

(Eder *et al.*, 1990). Die Bildung von DNA-Basen-Addukten mit Desoxyguanosin konnte unter *in vivo* und *in vitro* Bedingungen für Acrolein und Crotonaldehyd gezeigt werden (Chung und Hecht, 1983; Chung *et al.*, 1984,

1989; Foiles *et al.*, 1990; Wilson *et al.*, 1991; Eder und Hoffman, 1992). Dabei kann die N^2-Aminogruppe der Base in einer Michael-Addition mit α,β-ungesättigten Aldehyden reagieren. Es entsteht ein 1,N^2-Addukt mit einem gesättigten Sechsring (Chung und Hecht, 1983). Durch die Adduktbildung werden die N-1 und N^2-Atome blockiert, die für die Basenpaarung bedeutsam sind. Eine Addition α,β-ungesättigter Aldehyde an die N-7- und C-8-Positionen des Desoxyguanosins wurde ebenfalls beschrieben (Eder *et al.,* 1990, 1992). Die 7,8-Adduktbildung kann als Folge der Abspaltung der Desoxyribose zur Depurinierung und zu Strangbrüchen führen. Für Crotonaldehyd wurde außerdem die Bildung eines 1,N^2/7,8-bis-Adduktes nachgewiesen (Eder und Hoffman, 1992). Die Bildung von DNA-Addukten wurde auch für Hexenal und Nonadienal beschrieben (Schuhmacher, 1990; Gölzer *et al.*, 1996). Mit der Technik der alkalischen Filterelution wurde gezeigt, daß α,β-ungesättigte Aldehyde Einzelstrangbrüche und DNA-Proteinquervernetzungen induzieren (Grafström *et al.,* 1988; Kuykendall und Bogdanffy, 1992, Eder *et al.,* 1993). Im Comet Assay zeigte die Behandlung von Hepatozyten mit bifunktionellen Aldehyden spezifische Bilder. Die Behandlung mit Acrolein, Crotonaldehyd, Formaldehyd und Glutardialdehyd resultierte in 86-95% der Zellen in charakteristischen Veränderungen des Zellkerns samt DNA-Schweif (Kuchenmeister *et al.*, 1998). In cytogenetischen Studien wurde nach Behandlung mit Crotonaldehyd, 2-*trans*-Hexenal und 2-*trans*,6-cis-Nonadienal die Induktion von Mikronuklei und eine Steigerung der SCE-Rate beobachtet, während Crotonaldehyd hauptsächlich eine Zunahme chromosomaler Aberrationen induzierte (Dittberner *et al.,* 1995). Genotoxische Effekte konnten für 2-*trans*-Hexenal auch *in vivo* an Mundschleimhautzellen gezeigt werden (Dittberner *et al.*, 1997).

2.7.2 N-NITROSODIETHANOLAMIN (NDELA)

2.7.2.1 ALLGEMEINE STRUKTUR

Nitrosamine sind die Nitrosoderivate sekundärer Amine. Charakteristisch für Nitrosamine ist die mit einem sekundären Stickstoffatom verknüpfte N- Nitrosogruppe -N=O.

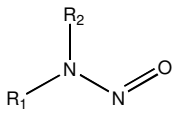
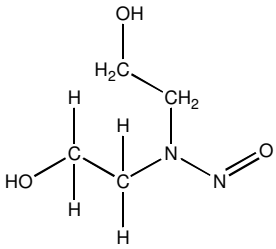


Abb.2.13.
Allgemeine Struktur von Nitrosaminen. (R_1, R_2 = Alkyl- oder Arylreste)



Ein Vertreter der Nitrosamine stellt das NDELA (N-Nitrosodiethanolamin) dar. Bei NDELA bilden die beiden Reste R_1 und R_2 Hydroxyethyl-Gruppen

Abb. 2.14.
Struktur von N-Nitrosodiethanolamin (NDELA)

2.7.2.2 VORKOMMEN

NDELA zählt zu den am weitest verbreiteten N-Nitrosoverbindungen in der Umwelt des Menschen (Eisenbrand *et al.,* 1984, Dittberner *et al.,* 1988). NDELA wurde in einem großen Konzentrationsbereich in Körperpflegemitteln und Kosmetika nachgewiesen (Spiegelhalder und Preussmann, 1984; Eisenbrand und Sommer, 1988). Dies ist besonders bedeutsam, seit man

weiß, daß NDELA schnell über die Haut aufgenommen wird (Sansone *et al.*, 1980). Ein besonders hohes Risiko stellt NDELA für Beschäftigte der metallverarbeitenden Industrie dar (Fuchs *et al.,* 1995). NDELA wurde in Schneidölen in Konzentrationen bis zu 3% entdeckt (Fan *et al.,* 1977; Spiegelhalder *et al.,* 1982). Außerdem wurde NDELA in Pestiziden, Tabak und Tabakrauch nachgewiesen (Brunnemann und Hoffmann, 1981).

2.7.2.3 BIOLOGISCHE WIRKUNG

Nitrosamine sind chemisch stabile Substanzen. Durch Alkylierung der Nukleobasen kann die glykosidische Bindung so stark geschwächt werden, daß dies zu einer Depurinisierung oder Depyrimidinisierung führt (Singer und Grunberger, 1983). Bei N-7-substituierten Guaninen kann eine Öffnung des Imidazolrings erfolgen (Lawley und Brookes, 1963). Damit kann die Alkylierung von Nukleobasen zu Fehlkodierungen führen. Die N-7-Position des Guanins wird bevorzugt alkyliert. Der Alkylierung an der O-6-Position des Guanins kommt jedoch besondere Bedeutung zu, da diese Position im Gegensatz zur N-7-Position direkt an der Basenpaarung beteiligt ist (Denkel, 1986). Nitrosamine wirken systemisch. Sie entwickeln ihre karzinogene Wirkung im Organismus erst nach enzymatischer Aktivierung. Die vollständige Aktivierung von NDELA zum endgültigen Karzinogen ist nicht geklärt. Der erste Schritt erfolgt über eine Alkoholdehydrogenase (ADH)/NAD-vermittelte β-Oxidation. Das entstandene Reaktionsprodukt ist N-Nitroso-2-hydroxymorphilin. Dieses wurde als direktes Mutagen ausgewiesen (Hecht, 1984; Denkel *et al.,* 1986). Verschiedene weitere Aktivierungsmechanismen wurden diskutiert (Sterzel und Eisenbrand, 1986; Eisenbrand *et al.,* 1986; Loeppky *et al*, 1994). Eine karzinogene Aktivität von NDELA wurde erstmals von Druckrey *et al.* 1967 beschrieben, die das Auftreten von Leberzellkarzinomen nach oraler Applikation von NDELA beobachteten. Da die verabreichten Dosen (1g/kg Körpergewicht/Tag) hoch waren, stuften sie NDELA als schwaches Karzinogen ein. Spätere Untersuchungen an Hamstern (Hilfrich *et al.,* 1977) und an Ratten (Lijinski und Reuber, 1984) wiesen NDELA jedoch als starkes Karzinogen aus. Trotz karzinogener Aktivität im Tierversuch erwies sich NDELA in Standardmutagenitätstests als nicht mutagen. Im Ames Test zeigte NDELA keine Mutagenität - unabhängig davon, ob die Tests mit oder ohne Zusatz eines aktivierenden Systems wie S 9-Mix durchgeführt wurden (Rao *et al.,* 1979; Gilbert *et al.,* 1981; Andrews und Lijinski, 1980; Lee und Guttenplan, 1981). Andere Autoren beobachteten jedoch eine mutagene Aktivität von NDELA nach Zugabe von S 9-Mix (Hesbert *et al.,* 1979; Mori *et al.,* 1987). Eine alternative Aktivierungsmöglichkeit bietet die Inkubation von NDELA mit NAD/ADH (Eisenbrand *et al.,* 1984). Die Resultate cytogenetischer Untersuchungen sind unterschiedlich: Im Knochenmark von Mäusen induzierte NDELA weder chromosomale Aberrationen noch Mikronuklei (Gilbert *et al.,* 1981). In Metaphasen humaner Lymphozyten wurde im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen nach Alkoholdehydrogenase-Aktivierung eine starke Erhöhung der SCE-Rate festgestellt (Henn *et al.,* 1989). In einer anderen Untersuchung konnte selbst ohne Aktivierungssystem nach NDELA-Behandlung eine dosisabhängige Erhöhung der Chromosomenaberrations-, der Mikrokern- und der SCE-Rate bei humanen Lymphozyten festgestellt werden (Dittberner *et al.,* 1988).

2.7.3 MITOMYCIN C (MMC)

2.7.3.1 ALLGEMEINE STRUKTUR

Mitomycin C besitzt drei potentiell aktive Gruppen – Chinon, Carbamat und Aziridin – am gleichen Pyrrolring des Indols (Crooke, 1981; Beretta *et al.,* 1990).

2.7.3.2 VORKOMMEN

Mitomycin C gehört zu einer Gruppe von Antibiotika, die in Japan in den späten fünfziger Jahren als Produkte des Schimmelpilzes *Streptomyces caespitosus* entdeckt wurden (Hata *et al.,* 1956, in: Tomasz, 1994).

2.7.3.3 CHEMISCHE REAKTIVITÄT

Mitomycin C wird als Prototyp des bioreduktiven alkylierenden Agens bezeichnet (Sartorelli, 1988). MMC ist in seiner natürlichen Konfiguration **1** (Abb. 2.15) relativ inaktiv. Die Umwandlung zur biologisch aktiven Form

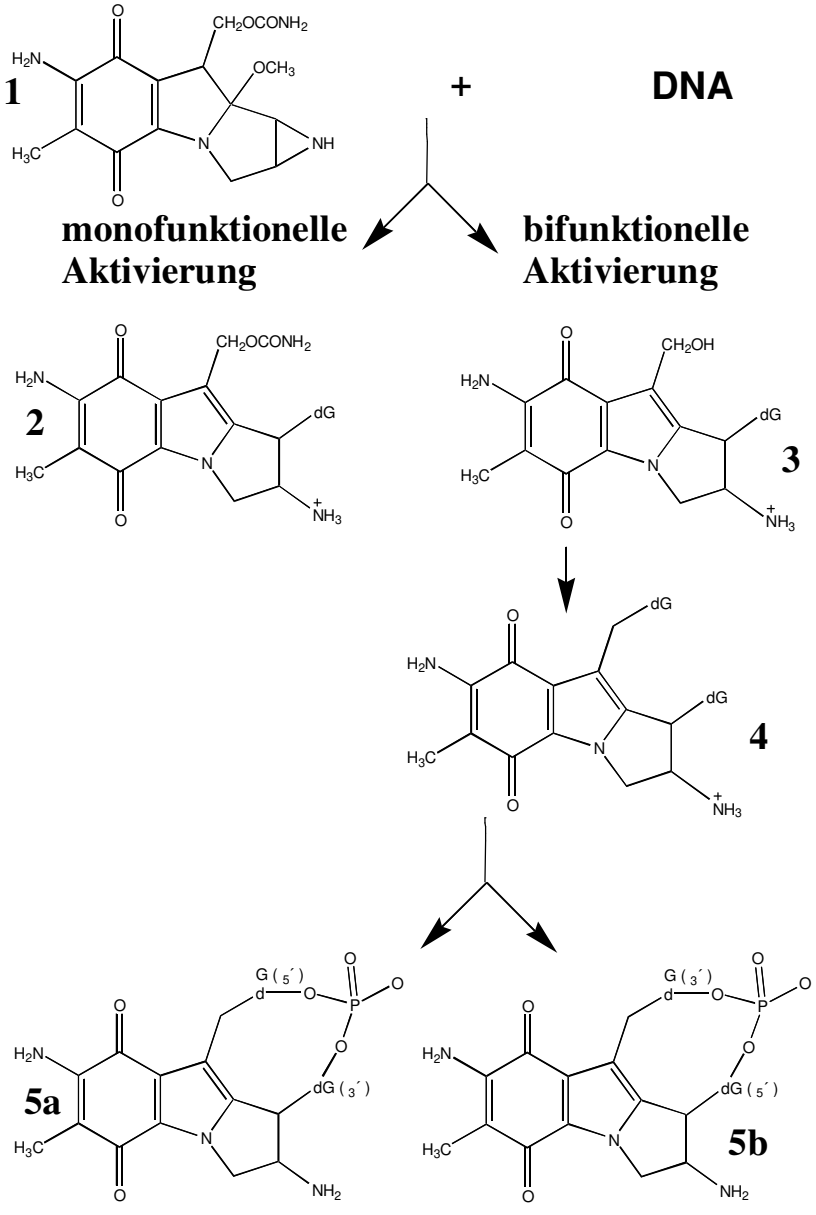


Abb. 2.15 Reaktion von Mitomycin C mit der DNA, Beschreibung s. Text (nach Tomasz, 1994)

muß zunächst durch enzymatische oder chemische Reduktion (Iyer und Szybalski, 1964) oder durch eine milde Säurebehandlung (Tomasz und Lipman, 1979) des Chinons zum Hydrochinon erfolgen. In der lebenden Zelle wird die Aktivierung durch Flavoenzyme vermittelt (Keyes *et al.,* 1984). Dadurch wird der Stickstoff des Indols elektronenreicher und kann an verschiedenen Interaktionen teilhaben, wodurch das Aziridin und das Carbamat aktiviert werden. Die Reduktion induziert eine Öffnung des Aziridinrings, wodurch die C1-Position aktiviert wird (monofunktionelle Aktivierung). Als zweite Alkylierungsposition wurde die C10-Position des Carbamats entdeckt, was zu Quervernetzungen innerhalb und zwischen den DNA-Strängen führt (bifunktionelle Aktivierung). Abbildung 2.15 zeigt die Bildung von DNA-Addukten. Beide alkylierenden Funktionen reagieren ausschließlich mit den 2-Aminogruppen des Guanins. Dabei ist diese Reaktion DNA-sequenzspezifisch. MMC alkyliert Guanine in der CpG•CpG Sequenz nahezu zehnmal schneller als in anderen Sequenzen (Li und Kohn, 1991; Kumar *et al.,* 1992). So entsteht über den monofunktionellen Aktivierungsprozeß das Monoaddukt **2** (Abb. 2.15). Die reduktive Aktivierung von MMC sowohl an der C1- als auch an der C10-Position - also die bifunktionelle Aktivierung - führt zur Adduktbildung **3,** wenn das C10 anstatt mit Guanin mit Wasser reagiert. Die Monoaddukte führen nicht zu Quervernetzungen. Desweiteren entsteht das Bisaddukt **4,** wenn zwei Guanine aufgrund ihrer Nähe in der DNA als gemeinsame Substrate für die beiden aktivierten Positionen in einem MMC-Molekül fungieren können. Dieses Addukt wird für die quervernetzenden Eigenschaften zwischen DNA-Strängen verantwortlich gemacht, vorausgesetzt, daß sich die beiden dG-Reste in den DNA-Strängen gegenüberliegen. Bei den Bisaddukten **5a** und **5b** werden die beiden dG-Reste über eine Phosphodiester-Gruppe verbunden. Dies erzeugt eine Vernetzung innerhalb des DNA-Stranges.

2.7.3.4 BIOLOGISCHE WIRKUNG

MMC hat in der Chemotherapie von Krebserkrankungen große Bedeutung (Spanswick *et al.,* 1996), denn es ist wirksam gegen eine Vielzahl solider Tumoren der Brust, der Lunge und des Gastrointestinaltraktes (Crooke, 1981). Obwohl monofunktionelle Alkylierungen 10-20 mal häufiger auftreten als bifunktionelle Alkylierungen (Iyer und Szybalski, 1964), wird die toxische Wirkung auf Zellen und die Wirksamkeit gegenüber Tumoren hauptsächlich der Bildung von Quervernetzungen zwischen DNA-Strängen zugeschrieben (Tomasz *et al.,* 1987; Rink *et al.,* 1996). Die MMC-induzierte Schädigung resultiert in einer Reduktion der DNA-Replikations-Rate und einer dosisabhängigen Verzögerung der Zellzyklusprogression (Barlogie und Drewinka, 1980 in: Sognier und Hittelman, 1986). Die Behandlung mit MMC bewirkt in Ovarialkarzinomzellen einen S-G_2/M Block (Petru *et al.,* 1995). Nowell beobachtete bereits in den sechziger Jahren die chromosomenschädigende Wirkung von MMC (Nowell, 1964). MMC induziert eine Chromosomenschädigung in einem S-Phase-abhängigen Mechanismus. Beim Erreichen der Mitose werden vornehmlich Chromatidbrüche und Austausche beobachtet (Doi *et al.*, 1967). Die Lücken zwischen den Chromatidbrüchen erreichten oft eine beträchtliche Länge (Sognier und Hittelman, 1986). Hochgeschädigte Metaphasen erinneren an das Pulverisierungsphänomen in S-Phase Zellen nach Induktion einer prämaturen Chromosomenkondensation. Durchfluß-

zytometrische Untersuchungen ergaben, daß mitotische Zellen MMC-behandelter Zellpopulationen 10-20% weniger DNA als Zellen aus unbehandelten Kontrollkulturen enthielten. Die Ergebnisse zeigten, daß diese MMC-induzierten Brüche bei Zellen auftraten, die das Mitosestadium erreicht hatten, ohne jedoch die DNA-Synthese vollständig beendet zu haben (Sognier und Hittelman, 1986). Die von MMC-induzierten Brüche und Rearrangements sind präferentiell in den heterochromatischen Regionen von 1q, 9q und 16q lokalisiert (Savage und Cao, 1985). MMC übt seinen Effekt indirekt aus, denn es wird im Cytoplasma metabolisiert und die Metabolite induzieren Chromosomenaberrationen. In humanen Spermatozoen wurden durch MMC-Behandlung keine Aberrationen induziert. Dies ist teilweise darauf zurückzuführen, daß Spermatozoen der intrazelluläre Metabolismus fehlt, um MMC zu aktivieren (Übersicht in: Kamiguchi *et al.*, 1995). Die Behandlung mit MMC führte dosisabhängig zu einer Erhöhung der Mikronuklei-Rate (Krishna *et al*., 1989). Über die Entstehungsmechanismen der MMC-induzierten Mikronuklei differieren die Angaben. Surrallés *et al.* (1995) schrieben die Bildung von Mikrokernen der klastogenen Wirkung von MMC zu. Die Anwendung der FISH-Technik mit einer alphoiden Zentromer-Sonde in Kombination mit der CREST-Immunfärbung mit anti-Kinetochor-Antikörpern zeigte, daß alle Mikrokerne ausschließlich zentromer- und kinetochornegativ waren (Surrallés *et al.,* 1995). Diese anti-Kinetochor-Antikörper werden aus dem Serum von Patienten mit dem CREST-Syndrom gewonnen (Moroi *et. al*., 1980). Das CREST-Syndrom stellt eine spezielle Form der progressiven systemischen Sklerose dar, deren klinisches Bild sich durch subkutane Kalzinose, dem Raynaud-Syndrom, einer ösophagealen Hypermotilität, Sklerodaktylie und Teleangiectasien äußert (Berg, 1992). Kallio und Lähdetie (1993) untersuchten ebenfalls MMC-induzierte Mikronuklei durch den Einsatz der FISH-Technik und bestätigten den hauptsächlich klastogenen Mechanismus. Elhajouji *et al.* (1995) zeigten dagegen neben einem clastogenen auch einen aneugenen Wirkungsmechanismus von MMC. Renzi *et al.* (1996) wiesen mit der Zweifarben FISH mit minor (alpha) und major (gamma) Satelliten-DNA und der CREST-Färbung ebenfalls neben der klastogenen auch deutlich eine aneugene Wirkung von MMC nach. MMC erhöhte die SCE-Rate (Perry und Evans 1975; Mark *et al.,* 1994). Die Behandlung mit dem Reparaturhemmstoff Arabinofuranosylcytosin (AraC) steigerte synergistisch die SCE-Rate in MMC-behandelten humanen Lymphozyten (Kishi, 1987). Die Reparatur der SCE-induzierenden MMC-Läsionen erwies sich als sehr langsam (Kano und Fujiwara 1981). Die MMC-induzierten Läsionen, die SCEs hervorriefen persistierten für mindestens drei Zellzyklen (Daza *et al.,* 1992). Die mutagene Wirkung von MMC wurde bei E.coli (Iijima und Hagiwara 1960), bei Drosophila (Mukherjee, 1965 in: Dubinina und Kurashova, 1987) und in Säugerzellen (Davies *et al.,* 1995) nachgewiesen.

2.7.4 DIETHYLSTILBESTROL (DES)

2.7.4.1 ALLGEMEINE STRUKTUR UND VORKOMMEN

Diethylstilbestrol ist ein nichtsteroidales Östrogen mit einem Stilben als Grundgerüst; das Stilbenderivat enthält zwei Hydroxylgruppen. Im Jahre 1934 wurde gezeigt, daß auch Substanzen, die in ihrer molekularen Struktur

den endogenen Hormonen unähnlich waren, die Wirksamkeit von Östrogen zeigten. DES erwies sich fünfmal wirksamer als Östradiol. In den 40er Jahren wurde DES bei Komplikationen während der Schwangerschaft zur Regulation bzw. Substitution von Hormonen eingesetzt (Übersicht in: Marselos und Tomatis, 1992).

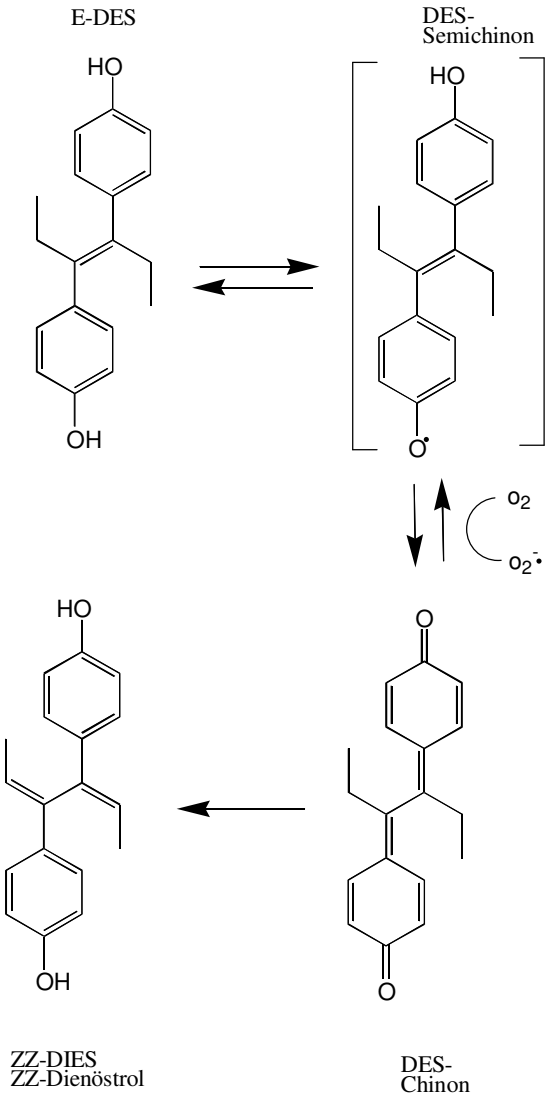


Abb.2.16
DES-Metabolismus. Die Oxidation von DES zu DES-Chinon wird hauptsächlich durch die Cytochrom P450-Oxidase bewirkt, die Reduktion des DES-Chinon hauptsächlich durch die NADPH-abhängige P450-Reduktase katalysiert (nach Liehr und Roy, 1990)

2.7.4.2 CHEMISCHE REAKTIVITÄT

DES ist als krebsverursachende Substanz sowohl beim Menschen als auch beim Nager bekannt (IARC, 1987 in: Cunningham *et al.*, 1996). Der Mechanismus, der zur Krebsentstehung führt, ist noch nicht geklärt (Roy *et al.,* 1995). Die krebsauslösenden Eigenschaften von DES sind nicht nur auf eine rezeptorvermittelte Steigerung der Proliferation zurückzuführen. Die Behandlung mit DES führt bei SHE- Zellen, die keine Östrogen-Rezeptoren besitzen, zur morphologischen und neoplastischen Transformation (Mc Lachlan *et al.,* 1982). Daher wurde ein anderer Mechanismus der DES-induzierten Carcinogenese postuliert. Für die genotoxischen Effekte sind weniger die Ausgangssubstanz als deren oxidative Metabolite verantwortlich. Chinon ist eines der reaktiven Intermediate, dem eine Rolle in der DES-vermittelten Tumorgenese zugesprochen wird. Der Hauptweg des peroxidativen Metabolismus führt vom DES über das instabile Semichinon zum Chinon. Dieses lagert sich spontan um zum ZZ-Dienestrol. Diese Reaktionen werden hauptsächlich katalysiert durch die Cytochrom P450 – Oxidase (Metzler, 1984; Liehr und Roy,1990; Martelli *et. al.*, 1994; Yager und Liehr,1996).

2.7.4.3 BIOLOGISCHE WIRKUNG

1971 wurde berichtet, daß DES auch auf transplazentarem Weg zur Krebsentstehung führen kann. Das Auftreten von Tumoren im Genitaltrakt wurde bei jungen Frauen beobachtet, deren Müttern während der Schwangerschaft DES verabreicht worden war (Herbst *et al.* 1971). DES ist nicht mutagen im Ames-Test in Salmonella typhimurium (Glatt *et al.* 1979), in Anwesenheit oxidierender Agentien wurden allerdings Mutationen in der Hefe nachgewiesen (Mehta und von Borstel, 1982). DES kann bei sehr hoher Dosierung DNA-Addukte bilden. Das höchste Auftreten von DES-DNA-Addukten wurde in der Leber gefunden und nicht in der Niere, dem Zielorgan der Estrogen-induzierten Tumorentstehung. Die DNA-Addukte ließen sich allerdings nur unter oxidativem Streß induzieren und waren instabil (Bhat *et al.,* 1994). DES zeigt ähnliche Wirkungen wie Colchicin (Sawada und Ishidate, 1978). DES führt zum Metaphase-Arrest (Hartley-Asp *et al.,* 1983), hemmt die Polymerisation von Mikrotubuli (Sato *et al.,* 1984; Pfeiffer und Metzler, 1992) und führt zur Zerstörung der mitotischen Spindel (Tucker und Barrett, 1986). Für die Östrogen-induzierte neoplastische Zelltransformation werden vor allem numerische Chromosomenveränderungen verantwortlich gemacht (Tsutsui *et al.,* 1983). DES induzierte eine signifikante Erhöhung von Mikronuklei (Banduhn und Obe, 1985; Schuler *et al.*, 1991). Durch Einsatz der CREST- Färbung bzw. der FISH konnte der Inhalt der Mikrokerne näher charakterisiert und die aneuploide Wirkung von DES gezeigt werden. Es zeigte sich nämlich, daß diese Mikrokerne hauptsächlich ganze Chromosomen enthielten (Becker *et al.,* 1990; Farooqi *et al.,* 1993; Migliore *et al.,* 1996).

2.7.5 BLEOMYCIN (BLM)

Bleomycine sind eine Gruppe basischer, wasserlöslicher Antibiotika (siehe Abb. 2.17). Diese Substanzklasse wurde zum erstenmal im Jahr 1966 von Umezawa und Mitarbeitern in Kulturfiltraten von *Streptomyces verticillus* identifiziert. Die Bedeutung von Bleomycin liegt in der antineoplasischen Wirkungsweise (Hecht, 1986; Stubbe und Kozarich, 1987). Bleomycinsulfat (Blenoxan), das klinisch eingesetzt wird, ist ein Gemisch der Bleomycine A_2 und B_2, wobei das Bleomycin A_2 die Hauptkomponente darstellt (Hay *et al.,* 1991; Porvik und Austin, 1991; Hoffmann *et al.*, 1994). Die Aktivität gegen Tumoren wird auf die DNA-schädigende Wirkung zurückgeführt (Stubbe und Kozarich, 1987). Das Bleomycin-Molekül besitzt zwei Hauptfunktions-Komponenten: eine Bithiazol-Komponente und eine Komponente, die aus Pyrimidin- und Imidazol-Strukturen besteht. Die Bithiazol-Komponente interkaliert in die DNA-Helix und trennt dabei deren Stränge. Die Pyrimidin- und Imidazol-Strukturen binden unter Bildung eines aktivierten Komplexes Eisen und Sauerstoff; dies führt zur Bildung schädigender Oxidantien in der Nähe der DNA-Polynukleotidkette und könnte damit die Bildung freier Basen oder ihrer Propenal-Derivate bewirken (Hay *et al.,* 1991). Die Mutagenität von Bleomycin wurde in verschiedenen Testsystemen nachgewiesen (Porvik und Austin, 1991), so auch in Untersuchungen von Chromosomenaberrationen (Dresp *et al.,* 1978) und von Mikronuklei in humanen G_0-Lymphozyten (Hoffmann *et al.,* 1993). Bleomycin wirkt klastogen in allen Stadien des Zellzyklus; die Induktion chromosomaler Schädigung ist nicht an die S-Phase

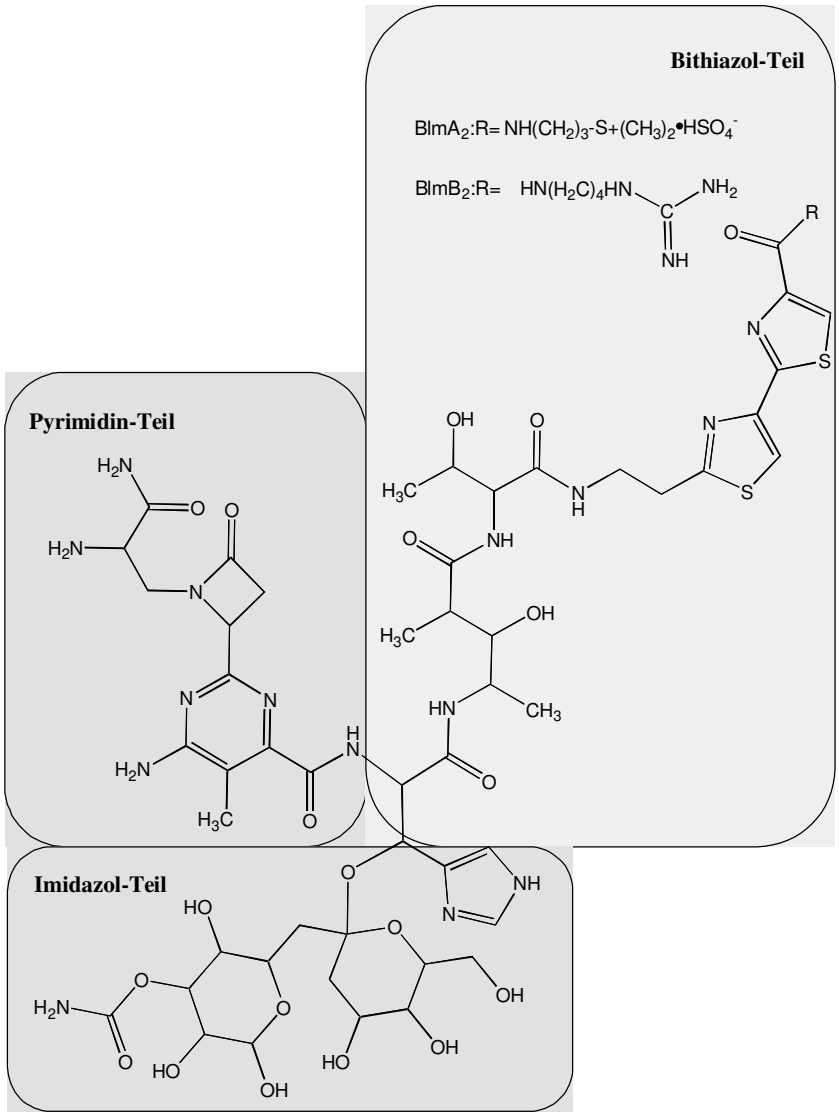


Abb.2.17. Chemische Struktur von Bleomycinsulfat, einem Gemisch der Bleomycine A2 und B2 (nach Römpp, 1996)

gebunden (Porvik und Austin, 1991). Chromosomentyp-Aberrationen wurden hauptsächlich bei Zellen gefunden, denen vor der DNA-Replikation (G_0- oder G_1-Phase) Bleomycin zugeführt worden war, während Chromatidaberrationen bei Zellen auftauchten, die erst nach der DNA-Replikation (G_2-Phase) mit Bleomycin behandelt wurden (Dresp *et al.,* 1978). In dieser Hinsicht ähnelt Bleomycin in seiner Wirkungsweise ionisierender Strahlung und wird daher als radiomimetische Substanz betrachtet (Hoffmann *et al.,* 1994). Neben strukturellen Aberrationen wurde nach Bleomcyin-Applikation eine Verzögerung der Zellen beim Durchlaufen der G_2-Phase beschrieben (Tobey, 1971; Watanabe *et al.,* 1974). Mit der PCC-Technik wurde die Auswirkung von Bleomycin auf die Zellzyklusprogression von CHO-Zellen untersucht (Hittelmann und Rao, 1974 a). Vorzeitig in der G_2-Phase kondensierte Chromosomen zeigten direkt nach Bleomycin-Behandlung ein 5-9 fach höheres Auftreten von Chromosomenaberrationen als mitotische Chromoso-men. Offenbar waren die Zellen zu stark geschädigt, um in die Mitose eintreten zu können und wurden in der G_2-Phase arretiert (Hittelman und Rao, 1974 a).

2.8 DIE EXCISIONSREPARATUR

Zellen besitzen Mechanismen, um Schäden zu reparieren. Eine genetische Prädisposition für Neoplasien steht häufig in engem Zusammenhang mit ungenügender Reparaturkapazität (Bohr *et al.*, 1989). Daher gilt dem Studium von Reparaturprozessen von Zellen großes Interesse. Anfängliche Studien identifizierten zwei Arten von Ausschneidereparatur-Mechanismen, die "short-patch" und die "long-patch" Reparatur (Regan und Setlow, 1974): Diese beiden Reparaturformen unterscheiden sich in der Länge der DNA-Abschnitte, die repariert werden sollen und den daran beteiligten Polymerasen (DiGuiseppe und Dresler, 1989). So vermittelt die DNA-Polymerase β die Synthese von kurzen DNA-Abschnitten, die DNA-Polymerase α bzw. δ die Synthese von langen DNA-Abschnitten (DiGuiseppe *et al.*, 1990). DiGuiseppe und Mitarbeiter (1990) schlugen die Existenz von drei unterschiedlichen Mechanismen der Ausschneidereparatur bei menschlichen Zellen vor: der "short patch"-Mechanismus repariert Einzelstrangbrüche, die durch ionisierende oder einfache alkylierende Agenzien induziert wurden. Es gibt zwei verschiedene "long-patch"-Mechanismen, die das Herausschneiden einer einzelnen Base ("base excision repair") und von Nukleotiden ("nucleotide excision repair") bewirken. Diese Mechanismen werden bei umfangreichen DNA-Läsionen, wie z.B. nach UV-Strahlung aktiviert. Die Reparaturkapazität der Zellen kann durch spezifische Hemmstoffe, wie z.B. Arabinofuranosylcytosin (Ara C), Hydroxyharnstoff (HU) und Novobiocin (NB) reduziert werden.

2.8.1 ARABINOFURANOSYLCYTOSIN (ARA C) UND HYDROXYHARNSTOFF (HU)

Ara C gelangt durch ein aktives Transportsystem in die Zellen und wird dort zu Arabinofuranosylcytosintriphosphat (Ara-CTP) phosphoryliert (Coleman *et al.,* 1975; Hande und Chabner, 1978). Ara-CTP wirkt entweder, indem es anstelle von dCTP (Desoxycytosintriphosphat) in die DNA eingebaut wird (Snyder *et al.,* 1984) oder mit der DNA-Ligase, einem weiteren Enzym des Excisionsreparatur-Komplexes reagiert (Mikita und Beardsley, 1988) oder die Aktivität von Polymerasen hemmt (Yoshida *et al.,* 1977; Gedik und Collins, 1991). Ara C wird als Hemmstoff hauptsächlich der Reparatur von DNA-Schäden größerer Abschnitte betrachtet (Collins *et al.*, 1984). Allerdings gibt es Himweise darauf, daß Ara C auch mit der Aktivität der Polymerase β interferiert (Yoshida *et al.*, 1977; Ohno *et al.*, 1988). Durch Nachbehandlung mit Ara C wurde die Häufigkeit von Chromosomentyp-Aberrationen, die durch Röntgenstrahlung vor der Mitogen-Stimulierung oder während der G_1-Phase induziert wurden, erhöht. Dabei war die Sensitivität der Lymphozyten gegenüber einer Schädigung während der G1-Phase höher als vor der Stimulierung (Anderson und Kihlman, 1989). In Hautfibroblasten gesunder Probanden wurde die Häufigkeit von Chromatidbrüchen und/oder -gaps nach Röntgenbestrahlung signifikant erhöht (Parshad *et al.,* 1993). Wur-den humane Lymphozyten in der G_0-Phase nach UV-Bestrahlung bzw. Behandlung mit Methylnitrosoharnstoff – mit Agentien also, welche Schädigungen induzieren, die durch Excisionsreparatur behoben werden können – und anschließender Mitogen-Stimulierung in der G_1-Phase mit Ara C behandelt, wurde die Mikronuclei-Rate um das etwa zehnfache erhöht (Fenech und Neville, 1992). Mit anti-Kinetochor-Antikörpern wurde festgestellt, daß diese Mikrokerne zwischen 77-86% kinetochor-negativ waren (Fenech *et al.,*

1994). Kishi und Sekizawa (1993) verglichen das Auftreten von Chromosomenaberrationen, die Häufigkeit von Schwesterchromatidaustauschen und die Zellproliferationskinetik nach Behandlung mit AraC bzw. Aphidicolin in Lymphozyten gesunder Probanden und Lymphozyten von Xeroderma pigmentosum (XP) Patienten. Zellen von XP-Patienten zeigten eine veränderte Kapazität bei der Excisionsreparatur (Sasaki, 1973). Dabei zeigte sich, daß Ara C im Gegensatz zu Aphidicolin sowohl in normalen als auch in Lymphozyten von XP-Patienten das Auftreten dizentri-scher Chromosomen und zentrischer Ringchromosomen induzierte. Es konnte eine altersabhängige Abnahme der Chromosomenaberrationen nachgewiesen werden. Sowohl Ara C als auch Aphidicolin führte zu vergleichbarer Abnah-me der Teilungszyklen zwischen normalen und Lymphozyten von XP-Patien-ten, allerdings proliferierten XP-Lymphozyten bereits in Kontrollkulturen langsamer als normale Lymphozyten. Die Schwesterchromatidaustausch-Rate wurde bei normalen Lymphozyten durch Ara C-Behandlung nicht signifikant erhöht. Bei XP-Zellen war nach Ara C-Behandlung die Zellzyklusverzögerung so stark, daß keine Mitosen im zweiten Teilungszyklen auftraten und damit keine SCE-Rate bestimmt werden konnte (Kishi und Sekizawa, 1993). Die Kombination von Reparaturhemmstoffen, wie z.B. von Hydroxyharnstoff und Arabinofuranosylcytosin zeigt oft eine synergistische Wirkung bezüglich des Auftretens chromosomaler Schädigung. Hydroxyharnstoff hemmt die Enzymaktivität der Ribonukleotid-Reduktase. Dieses Enzym hat eine Schlüsselfunktion in der Reduktion der Ribonukleotide zu den Desoxyribonukleotiden (Thelander und Reichard, 1979). Dieser Schritt ist entscheidend für die Bildung der entsprechenden Triphosphate, die für die DNA-Reparatursynthese benötigt werden (Borchers *et al.,* 1990). Kihlman und Andersson (1985) beobachteten eine Verstärkung der Chromosomenschädigung falls menschliche Lymphozyten nach ihrer Behandlung mit dem Mutagen Thiotepa in der G_0-Phase mit Ara C und HU behandelt wurden. Fenech *et al.* (1994) berichteten über eine Erhöhung der Mikrokern-Rate nach gleichzeitiger Gabe von Ara C und HU. Es zeigte sich, daß Ara C und HU die Ausschneidereparatur verschiedener DNA-Läsionen, wie z.B. die Bildung von Dimeren durch UV-Strahlung, hemmte (Collins und Squires, 1986). Durch Kombination von Ara C und HU konnte die cytotoxische Wirkung alkylierender Substanzen in Mammakarzinomzellen von Ratten erhöht werden (Alaoui-Jamali *et al.,* 1994). Da durch Hydroxyharnstoff der Vorrat an Desoxyribonukleotiden und damit auch von Desoxycytidin in der Zelle erschöpft wird, erhöht sich die Chance für einen Einbau von Ara C in die DNA (Snyder *et al.*, 1984).

2.8.2 NOVOBIOCIN (NB)

Eine wichtige Funktion für die DNA-Replikation, die Reparatur oder die Spiralisierung von DNA besitzen Topoisomerasen. Sie modifizieren die superhelikal aufgewundene DNA durch Brechen und Verknüpfen der DNA-Stränge und erleichtern damit den Zugang für Ausschneidereparatur-Enzyme. Novobiocin (NB) hemmt die Aktivität der Topoisomerase II durch Interferieren mit der ATPase-Untereinheit des Enzyms (das Graças Medeiros und Takahashi, 1994). Die Bildung von Einzelstrangbrüchen, die durch Einschnitt von Endonukleasen an geschädigten Stellen der DNA entstehen, wird unterbunden. Es wurde vermutet, daß NB den präincisiven Einschnitt in der Exci-

sionsreparatur hemmt (Liu *et al.,* 1980). Erste Hinweise darauf brachte die Beobachtung, daß NB in UV-bestrahlten Zellen die Anhäufung der durch HU oder Ara C infolge von DNA-Reparatur entstandenen DNA-Einzelstrangbrüche verhinderte (Collins und Johnson, 1979). Die Topoisomerase II spielt vermutlich eine Rolle bei der Bildung von SCEs (Dillehay *et al.,* 1989). Die Erhöhung der SCE-Rate in menschlichen Lymphozyten, die mit dem Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) behandelt wurden, wird vermutlich zumindest teilweise durch Topoisomerase II vermittelt (Lazutka und Rudaitienė, 1992). Untersuchungen zeigten, daß NB allein die SCE-Rate nicht beeinflußte (Morgan *et al.,* 1986), aber in Kombination mit TNF den Anstieg der SCE-Rate unterdrückte (Lazutka und Rudaitienė, 1992). Die Behandlung menschlicher Lymphozyten mit Novobiocin führte zur Abnahme von Chromosomenaberrationen, die durch Mitoxanthron in der G_2-Phase induziert wurden. Clarkson und Mitchell (1983) dagegen fanden eine normale Incisionsrate in den DNA-Strängen in UV-bestrahlten Zellen, wenn anstelle von Ara C als Reparaturhemmstoff Aphidicolin eingesetzt wurde. Dadurch wurde die Hypothese in Frage gestellt, ob eine durch Topoisomerase II vermittelte Veränderung im DNA-Supercoiling ein essentieller früher Schritt bei der Reparatur von UV-induzierter Schädigung ist (Keyse und Tyrrell, 1985). NB wird nicht als spezifischer Hemmstoff der Topoisomerase II betrachtet, da es eine Vielzahl von Enzymaktivitäten hemmt, wie z.B. die α-Polymerase bei Eukaryonten (Edenberg., 1980) und die DNA-Ligase (Killpack und Cleaver, unveröffentlichte Beobachtungen in: Cleaver, 1984). NB hemmt ebenso die außerplanmäßige DNA-Synthese (Mattern und Scudiero, 1981 in: Johnson *et al.*, 1982). Desweiteren blockiert die Behandlung mit Novobiocin in serumstimulierten Fibroblasten die Aktivierung der meisten mitogen-induzierbaren Gene (Ruis *et al.*, 1991).

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 MATERIALIEN UND GERÄTE

3.1.1 TESTSUBSTANZEN UND REPARATURHEMMSTOFFE

Testsubstanzen:
Crotonaldehyd [Fluka]
2-*trans*-Hexenal [Sigma-Aldrich]
Bleomycinsulfat [Serva]
Diethylstilbestrol [Sigma]
Mitomycin C [Sigma]
N-Nitrosodiethanolamin [freundlicherweise von der Abteilung Lebensmittelchmie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern zur Verfügung gestellt]

Reparaturhemmstoffe:
1-(β-D-Arabinofuranosyl)cytosin [Sigma]
Hydroxyharnstoff [Sigma]
Novobiocin [Sigma]

3.1.2 GERÄTE

Mikroskope
Orthoplan [Leitz]
Axioskop [Zeiss]
Umkehrmikroskop [Olympus]

Zentrifugen:
Biofuge 17RS [Sepatech, Heraeus],
Minifuge RF [Sepatech, Heraeus],
Z 230 [Hermle],
Zytozentrifuge [Cytospin 3, Shandon]

Sonstige Geräte:
Analysenwaage [Sartorius]
Auslaufpipetten [Sarstedt]
Autoklav [Certoklav, Juergens]
Brutschrank: CO_2-Inkubator 3028 [Labotect]
Heizblock Thermoleader 1102 [Uniequip]
Laminar Flow [Gelaire, Flow Laboratories]
pH-Meter CG 818 [Schott-Geräte]
UV-Transilluminator (302 nm, Filter 200x350) [Bachhofer]
Wärmeplatte: Typ 145000 Medax [Bachhofer]
Vortex [Bender und Hobein]

3.1.3 MATERIALIEN UND REAGENZIEN

Agarose [Qualex Gold Agarose]
Ampicillin [Sigma]
Ampuwa [Fresenius]
Antibiotic/Antimykotic 100x [Gibco]
Bacto-Trypsin (Difco)
Barium-hydroxid ($Ba(OH)_2$)
Bicarbonatpuffer
Bisbenzimid Hoechst 33258 [Serva]
Bio-Anti-Avidin [Vector Laboratories]
Bio Nick™ Labeling System [Gibco BRL]
Bovine serum albumin (BSA) [Sigma]
5-Brom-2´-desoxy-uridin [Sigma]
Chloroform (Trichlormethan) [Riedel-de Haën]

Colcemid-Lösung: 10µg/ml, sterilfiltriert in PBS [Serva]
Deckgläser [AL]
4´6-Diamidino-2-phenylindol [DAPI]
Dextransulfat [Pharmacia]
Dimethylsulfoxid, reinst., mind. 99% (DMSO) [Serva]
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) [Riedel-de Haën]
EDTA [Roth]
Einmal-Filterhalter 0,2µM [Schleicher und Schuell]
Eppendorf-Reaktionsgefäße
Essigsäure p.a. 99-100% [6052, J.T. Baker B.V.]
Ethanol absolut [Merck]
Ethanol 99%, vergällt [Riedel de Haën]
Ethidiumbromid [Sigma]
ExtrAvidin-FITC [Sigma]
Fetales Kälberserum [BioWhittaker; Gibco]
Filter [Schleicher und Schuell]
Filter, Trichter, Objektträgerhalter [Shandon]
Fixogum [Marabu]
Formamid p.a. [Merck]
Giemsa-Lösung [Merck]
Glucose [Sigma]
Hefeextrakt [Serva]
Heringssperma DNA [Gibco, BRL]
Histopaque®-1077 [Sigma]
Humane Cot 1-DNA (1µg/ml) [Gibco, BRL]
Immersionsöl [Serva]
Isopropanol (2-Propanol) [Riedel-de-Haën]
Kaliumchlorid (KCL) [Merck]
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4) [Merck]
Kaliumhydroxid (KOH) [Merck]
Kryo-Röhrchen [Nunc]
Lambda-DNA, Hind III verdaut [Sigma]
2xLoading Puffer [MBI-Fermentas]
Liquemin ® N 2500: Wirkstoff Heparin-Natrium [Hoffmann-La Roche]
Lysozym [Serva]
Magnesiumchlorid $MgCl_2$ [Merck]
Methanol p.a. [Riedel-de-Haën]
L(+)-Milchsäure (L(+)-2-Hydroxypropionsäure) [Sigma]
Mixed bed resin [Biorad]
Natriumchlorid (NaCl) [Merck]
Neubauer-Zählkammer [Brand]
Nick Translations Kit [Boehringer]
Objektträger [AL]
Penicillin -Streptomycin (Pen/ 10000 mcg Strep/ml [BioWhittaker]
Pepton [Serva]
Phenol [Roth]
Phenolrot [Gibco]
Phytohämmagglutinin HA 15 [Murex Diagnostics Ltd]
Pipetten [Gilson, Abimed, Eppendorf]
Polyethylenglycol 1500 (50% w/v) [Boehringer]
Proteinase K [Boehringer]
Pyruvat (α-Ketopropionsäure) [Sigma]
Quadripermschalen [Heraeus]
RNase [Serva]
RPMI 1640-Medium [BioWhittaker]
Salzsäure
Sorbitol [Sigma]
Sucrose [Sigma]
Thymidin [Fluka]
Transferpipetten, 3,5 ml [Sarstedt]
Triton-X-100 [Serva]
Trizma base [Sigma]

Trypanblau-Lösung, 0,4% [Sigma]
Tween 20: Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat [Sigma]
Vectashield [Vector Laboratories]
Zellkulturflaschen [Falcon, Greiner, Sarstedt]
ntrifugenröhrchen: 15 ml, steril [Sarstedt]
Zentrifugenröhrchen: 50 ml, steril [Falcon]

3.1.4 CHO-ZELLINIE

(freundlicherweise von der Abteilung für Humangenetik der Medizinischen Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt).

3.2 PCC-TECHNIK

In dieser Arbeit wurde die Methode zur vorzeitigen Chromosomenkondensation (PCC) an unstimulierten Zellen in der G_0-Phase und an kultivierten Lymphozyten 73 Stunden nach PHA-Stimulierung durchgeführt. Als PCC-Induktorzellen wurden mitotische CHO-Zellen eingesetzt. Die Fusion der Induktor- und Zielzellen erfolgte durch Polyethylenglycol 1500 (50%w/v). Die PCC-Methode wurde nach einer von Pantelias und Maillie (1983) konzipierten Methode durchgeführt.

3.2.1 CHO-ZELLEN

3.2.1.1 KULTIVIERUNG UND SUBKULTIVIERUNG

Die Kultivierung der CHO-Zellen erfolgte stationär im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einer Umgebungsatmosphäre von 5% CO_2 und 95% Luftfeuchtigkeit. Die Zellen wurden als Monolayer in 10 ml RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10% FKS (Fetales Kälberserum) und 0,2 % AB/AM (Antibiotic/Antimykotic)-Gemisch, in 250 ml Gewebekulturflaschen (Fläche 75 cm^2) kultiviert. Das Wachstum der CHO-Monolayerkulturen wurde im Umkehrmikrosokop kontrolliert. Nach Bildung eines nahezu konfluenten Zellrasens wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen subkultiviert.

Material und Reagenzien:

Versene-Stammlösung: 0,1g EDTA; 4,0g NaCl; 0,1g KCl; 0,575g Na_2HPO_4; 0,1g KH_2P0_4 in sterilen 500 ml A. bidest. lösen

Versene/Trypsin-Lösung: Bacto-Trypsin in 10 ml A. bidest. (steril) lösen und in 500 ml Versene-Stammlösung geben; 1,5 ml Phenolrot, 17,5 ml Bicarbonatpuffer und 10 ml Antibiotic-Antimycotic-Gemisch zugeben

RPMI 1640-Medium (+10% FKS, +0,2% AB/AM)

75 cm^2-Gewebekulturflaschen

Durchführung:

Zunächst wurden das Zellkulturmedium und die Versene/Trypsin-Lösung auf Raumtemperatur vorgewärmt, das verbrauchte RPMI 1640-Medium an der sterilen Werkbank abpipettiert, der Zellrasen mit 3 ml sterilem Versene/Trypsin-Gemisch (Raabe-Mayer, 1990) bedeckt und für etwa 5 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde im Umkehrmikroskop beobachtet und durch leichtes Schütteln der Kulturflasche unterstützt. Zur Unterbrechung der Trypsinwirkung wurde die Versene/Trypsin-Lösung mit 1,0 ml 10% FKS-haltigem RPMI 1640-Medium (+0,2%AB/AM) verdünnt. Anschliessend wurden 3 - 5 Tropfen dieser Zellsuspension in neue sterile Zellkulturflaschen mit frischem Medium pipettiert und weiterkultiviert. Die Subkultivierung erfolgte alle 4 - 5 Tage.

3.2.1.2 CHO-ZELLEN ALS PCC-INDUKTORZELLEN (MITOSEFRAKTION)

Zur PCC-Induktion wurden mitotische CHO-Zellen verwendet. Sie wurden je nach Versuchsprotokoll sowohl mit als auch ohne BrdU-Markierung eingesetzt.

Materialien und Reagenzien:

75 cm^2 -Gewebekulturflaschen
Bromdesoxyuridin (BrdU)
RPMI 1640-Medium (+10% FKS, +0,2% AB/AM)
Colcemid-Lösung (10µg/ml)

Durchführung:

Zur Kultivierung in **BrdU-freiem** Medium wurden am Tage vor der Fusion ca. $3x10^6$ CHO-Zellen pro 75 cm^2-Kulturflasche ausgesät. Nach einer Kultivierungszeit von etwa 16 Stunden wurde ein Mediumwechsel vorgenommen, das verbrauchte Medium wurde abpipettiert und durch 10 ml frisches RPMI 1640-Medium (+10% FKS; +0,2%AB,AM) ersetzt. Anschließend wurde 0,2 ml Colcemid-Lösung (10 µg/ml) zugegeben. Nach weiteren 3,5 - 4 Stunden lösten sich die abgerundeten, leicht haftenden mitotischen Zellen durch leichtes Klopfen gegen den Kulturflaschenboden (selektives Abschütteln) und konnten so mit dem Medium abpipettiert werden. Zur Kultivierung in **BrdU-haltigem** Medium wurden 2 Tage vor der Zellfusion ca. $0,5x10^6$ Zellen pro 75 cm^2 Gewebekulturflasche in 10 ml RPMI 1640-Medium (+10% FKS; +0,2% AB,AM) ausgesät. Dem Medium wurde BrdU zugegeben, sodaß eine BrdU-Endkonzentration von 2 µM resultierte. Am Tage der Fusion wurde das verbrauchte Medium durch frisches BrdU-haltiges Medium ersetzt und Colcemid-Lösung in einer Konzentration von 0,2 µg/ml für 3,5 – 4 Stunden zugegeben. Die mitotischen Zellen wurden durch leichtes Abklopfen gegen den Kulturflaschenboden gewonnen und mit dem Medium abpipettiert.

Pro 75 cm^2-Gewebekulturflasche konnten etwa $1x10^6$ mitotische CHO-Zellen gewonnen werden. Diese Zellen standen dann als Mitose-Fraktion zur PCC-Induktion zur Verfügung. Es wurden ca. 12 Kulturflaschen mit CHO-Zellen pro Versuch angesetzt.

3.2.1.3 GEFRIERKONSERVIERUNG

Um über eine genügend hohe Reserve an CHO-Zellen verfügen zu können, wurden CHO-Zellen eingefroren.

Materialien und Reagenzien:

RPMI 1640-Medium (+10% FKS, +0,2% AB/AM)
Einfriermedium (90% RPMI1640-Medium, supplementiert mit 10 % FKS und 0,2 % AB/AM und 10 % DMSO)
Versene/Trypsin-Lösung (s. Kapitel 3.2.1.1)
Kryo-Röhrchen

Durchführung:

Dazu wurde nach Erreichen eines konfluenten Zellrasens wie bei der Subkultivierung das verbrauchte Medium abpipettiert und der Zellrasen mit ca. 2,5 ml Versene/Trypsin-Lösung bedeckt. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Umkehrmikroskop beobachtet; die Zellsuspension, die pro Flasche gewonnen werden konnte, wurde in 5 ml frischem Medium (+10% FKS, +0,2 % AB/AM) aufgenommen und bei 250g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium resuspendiert und auf 2 Kryoröhrchen verteilt. Die Zellen konnten so bei –70°C für einige Monate, bei Lagerung in flüssigem Stickstoff für mehrere Jahre, aufbewahrt werden. Sollten die Zellen wieder kultiviert werden, so wurden die Zellen bei 37°C schnell aufgetaut und in Zentrifugenröhrchen

mit 5 ml frischem FKS-haltigem Medium (+0,2 % AB/AM) pipettiert. Die Zellen wurden bei 250g zentrifugiert, der Überstand abpipettiert, das Zellpellet in ca. 1 ml frischem Medium resuspendiert und in eine Kulturflasche mit 10 ml frischem RPMI 1640-Medium (+10%FKS; +0,2%AB/AM) überführt.

Mitotische CHO-Zellen wurden modifiziert nach einer von Borelli *et al.* (1987) beschriebenen Methode eingefroren. Dazu wurden mitotische Zellen zunächst wie schon beschrieben gewonnen. Zum Einfrieren wurden zwei Lösungen bereitgestellt:

Materialien und Reagenzien:

Einfrierlösung:

5mM KH_2PO_4, 25 mM KOH, 30 mM NaCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 20 mM l-Milchsäure, 5 mM Glucose, 0,2 mM Sorbitol in sterilem 80 ml A. dest sterilfiltrieren (Sterilfilter: Porengröße 0,2µm) und diese 80 ml zu je 40 ml auf 2 sterile Flaschen verteilen.

Einfrierlösung I:

In einer Flasche (steril) das Volumen mit 10 ml A.dest. auffüllen

Einfrierlösung II:

In der anderen Flasche (steril) das Volumen mit 10 ml DMSO auffüllen

Colcemid-Lösung (10µg/ml)

Trypanblau

Kryo-Röhrchen

Durchführung:

Die Suspensionen mit den mitotischen Zellen wurden abzentrifugiert (250g, 10 min), die Zellpellets vereint und die Zellzahl auf 1 x 10^7 eingestellt. Die Zellsupension zentrifugierte man erneut und entfernte den Überstand vollständig, indem man das Zentrifugenröhrchen mit der Öffnung nach unten über einem Papiertuch ablaufen ließ. Das Röhrchen wurde dann in ein Gefäß mit Eiswasser gestellt und das Pellet (1 x 10^7 Zellen) in 1 ml Einfrierlösung I gut resuspendiert. Die Zellen wurden 5 – 15 Minuten in der Einfrierlösung I auf Eiswasser belassen, um sie in einen inaktiven Zustand zu bringen. Anschliessend erfolgte die Zugabe von 1 ml Einfrierlösung II. Danach wurden die Zellen in 0,5 ml-Portionen (2,5 x 10^6 Zellen) auf 4 Kryotubes verteilt und sofort bei –70°C eingefroren. Das Auftauen der mitotischen Zellen mußte recht schnell erfolgen. Dazu wurden die Kryotubes bei 37°C in den Brutschrank gestellt und sofort nach Auftauen in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml 10%-FKS-haltigem Medium, das zusätzlich 1% Colcemid (10µg/ml) enthielt transferiert. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (250g, 10 min) und erneut in 5 ml Colcemid- und 10%FKS-haltigem RPMI 1640-Medium, resuspendiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 5 ml Colcemid-haltigem Medium resuspendiert. Nach Trypanblau-Färbung wurde der Anteil toter Zellen an der Gesamtzellsuspension durch Zellzählung mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.1.4 DAPI-TEST AUF MYKOPLASMEN

Um eine Kontamination der CHO-Zellen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurde regelmäßig der DAPI-Test leicht modifiziert nach Lindl und Bauer (1987) durchgeführt. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) bindet an DNA. Die Mykoplasmen erscheinen dann als kleine, hell leuchtende Punkte.

Geräte:

Brutschrank

Deckgläser

Fluoreszenzmikroskop

Objektträger

Quadripermschalen

Materialien und Reagenzien:

Zytozentrifuge
Filter, Trichter, Objektträgerhalter (Shandon)
DAPI-Methanol-Lösung:
DAPI-Stammlösung (1 mg/ml A. bidest; aliqotiert in 0,1 ml-Portionen, -20^0 C) verdünnt 1:1000 mit Methanol.

Durchführung:

Die CHO-Zellen wurden zunächst auf Objektträger gebracht. Dies konnte durch Zentrifugieren der Zellsuspension auf Objektträger mittels der Cytozentrifuge (Cytospin 3, Shandon) oder durch Kultivierung der Zellen auf Objektträgern in Quadripermschalen erfolgen. Zur Herstellung der Cytozentrifugenpräparate wurde eine Zellsuspension von 100 µl (Zelldichte etwa 0,8 x 10^5 Zellen/ml) durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 1200 rpm aufgebracht. Die CHO-Zellen wurden auf Objektträgern in Quadripermschalen in 3 ml RPMI 1640-Medium (+10% FKS, + 0,2 % AB/AM) in einer Dichte von etwa 1 x 10^5 Zellen pro Kompartiment ausgesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag sollte der Zellrasen subkonfluent sein. Am Tag vor der Aussaat der Zellen wurden die Quadripermschalen und die Objektträger zum Sterilisieren über Nacht unter UV-Licht gestellt. Die Objektträger wurden der Cytozentrifuge bzw. der Quadripermschale entnommen und einmal mit der DAPI-Methanol-Lösung gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger mit DAPI-Methanol bedeckt und für 15 Minuten bei 37°C in den Brutschrank gelegt. Die Färbelösung wurde abpipettiert, der Objektträger mit etwas A. bidest. und einem Deckglas (24x60mm) bedeckt. Die mikroskopische Kontrolle erfolgte mit dem 100x Ölimmersionsobjektiv unter dem Fluoreszenzmikroskop.

3.2.2 MONONUKLEÄRE ZIELZELLEN

Als Zielzellen für die PCC-Induktion dienten mononukleäre Zellen (insbesondere Lymphozyten), die aus dem Vollblut einer weiblichen, zum Zeitpunkt der Blutentnahme gesunden Person Mitte 30, gewonnen wurden. Pro Versuchsreihe wurden mit einer Venenpunktionskanüle nach Strauss ca. 20 ml Vollblut der Armvene entnommen und möglichst steril in zwei jeweils 0,3 ml Heparin-Lösung (1ml Liquemin / 4ml 0,9 %-ige NaCl) enthaltende Harre-Röhrchen überführt. Die Röhrchen wurden durchschnittlich 2 - 3 Stunden nach der Blutentnahme bis zur Versuchsdurchführung bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Ergänzend wurden für Studien an G_0-PCC die Lymphozyten von zwei weiteren Probanden VP-1 (weiblich, 25 Jahre) und VP-2 (männlich, 29 Jahre) eingesetzt.

3.2.2.1 DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION ZUR ISOLIERUNG VON MONONUKLEÄREN ZELLEN

Da Erythrozyten das Fusionsereignis stören, mußten vor der PCC-Induktion zunächst die mononukleären Zellen durch Dichtegradientenzentrifugation aus Vollblut gewonnen werden. Die Isolierung der mononukleären Zellen erfolgte nach einer Modifikation der von Boyum (1968) beschriebenen Methode. Bei der Dichtegradientenzentrifugation werden Erythrozyten und Granulozyten durch Ficoll aggregiert und sedimentiert, während sich Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen in der Interphase zwischen Plasma und Ficoll anreichern.

Materialien und Reagenzien:

Histopaque®-1077

15 ml-Zentrifugenröhrchen
RPMI 1640-Medium (+1% P/S)
Transferpipetten

Durchführung:

Zunächst gab man jeweils 4,0 ml Histopaque®-1077 in sterile 15ml-Zentrifugenröhrchen und ließ es auf Raumtemperatur erwärmen. Danach wurden in weiteren 15 ml-Zentrifugenröhrchen jeweils 1ml Vollblut in 3,0 ml serumfreien RPMI 1640-Medium (+1% P/S) in einem Gesamtflüssigkeitsvolumen von 4,0ml resuspendiert. Bei einer Blutentnahme von 20 ml konnten somit 20 x 15ml-Zentrifugenröhrchen beschickt werden. Dieses Vollblut-Medium-Gemisch wurde jeweils vorsichtig mit den 4,0ml Lymphozytentrennmedium Histopaque®-1077 überschichtet. Anschließend wurde bei 530 g für 20 Minuten ohne Bremse bei 20-24°C zentrifugiert. Die Bande mit den mononukleären Zellen wurde mit einer Transferpipette abgezogen, in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt, in 5,0ml RPMI 1640-Medium (+1% P/S) resuspendiert und bei 500g mit Bremse zentrifugiert. Das Pellet wurde danach wiederum in 5,0ml RPMI 1640-Medium (+1%P/S) aufgenommen und anschließend bei 320g zentrifugiert.

3.2.2.2 KULTIVIERUNG VON ISOLIERTEN PHA-STIMULIERTEN LYMPHOZYTEN

Die Kulturansätze isolierter Lymphozyten erfolgten modifiziert nach einer Methode von Pascoe und Stemp (1990).

Materialien und Reagenzien:

15ml-Zentrifugenröhrchen
RPMI 1640-Medium (+1% P/S)
Histopaque®-1077
RPMI 1640-Medium (+15% FKS, +1% P/S)
Phytohämagglutinin HA 15

Durchführung:

Dazu wurden die beiden Harre-Röhrchen mit dem Vollblut zunächst bei 300g für 5 min zentrifugiert. Die Serumschicht wurde unter sterilen Bedingungen abpipettiert, in ein steriles 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für den Kulturansatz gelagert. Aus 20 ml Vollblut konnten 7 - 8 ml Serum gewonnen werden. Das verbliebene Blut wurde mit serumfreien RPMI 1640-Medium (+1% P/S) auf das ursprüngliche Volumen aufgefüllt und zusätzlich 1:1 verdünnt. Anschließend wurden jeweils 4,0ml Lymphozytentrennmedium Histopaque®-1077 in sterile 15 ml-Zentrifugenröhrchen pipettiert und mit 4,0ml des verdünnten Blutes vorsichtig überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung der mononukleären Zellen erfolgte ohne Bremse bei 530g für 25 min. Die Schicht mit den mononukleären Zellen wurde abpipettiert und jeweils in neue Zentrifugenröhrchen überführt. Die so gewonnenen mononukleären Zellen wurden zweimal mit RPMI 1640-Medium (1% P/S) serumfrei bei 200g für 8 min gewaschen. Das Medium wurde nach der letzten Zentrifugation bis auf 0,5 ml Restflüssigkeit abpipettiert. Für die 73h-Kulturansätze wurden diese 0,5 ml-Zellsuspensionen jeweils in 9,0 ml RPMI 1640-Medium, das mit 15% FKS und 1%P/S supplementiert war, in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Es wurden 0,2 ml Phytohämagglutinin (PHA) und schließlich die zuvor bei der Zentrifugation des Vollblutes gewonnenen 0,5 ml Serum zugegeben. Da mononukleäre Zellen hauptsächlich aus Lymphozyten bestehen, soll im folgenden zur Vereinfachung von Lymphozyten gesprochen werden.

3.2.3 MISCHEN DER MITOSE- UND INTERPHASEFRAKTION

Materialien und Reagenzien:

15ml-Zentrifugenröhrchen
Neubauer-Zählkammer
RPMI 1640-Medium (+1% P/S)

Durchführung:

Das Medium mit den durch Abklopfen gewonnenen mitotischen CHO-Induktorzellen wurde auf 15ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. Die Zentrifugation erfolgte bei 200g für 5 min. Der Überstand wurde bis auf ca. 0,5 ml Restflüssigkeit abpipettiert und das Zellpellet darin resuspendiert. Anschließend wurden die Zellpellets vereint und mit RPMI 1640-Medium (serumfrei; +0,2%AB/AM) in einem Gesamtflüssigkeitsvolumen von etwa 10 ml resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (200g, 10 min) wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in RPMI 1640-Medium (serumfrei, +0,2% AB/AM) aufgenommen und in einem Gesamtflüssigkeitsvolumen von 5 ml resuspendiert. Die Anzahl der Induktorzellen wurde mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zielzellen -Lymphozyten- wurden nach ihrer Isolierung aus Vollblut in einem Gesamtvolumen von 5,0 ml RPMI 1640-Medium (serumfrei, +1%P/S) resupendiert. Anschließend wurde deren Zahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es wurden 3-5x10^6 Interphasezellen eingesetzt. Die Zielzellen in Interphase und die mitotischen Induktorzellen wurden im Verhältnis 6 : 1 gemischt, d.h. es wurde die Menge an Medium den Interphasen hinzugefügt, in dem sich etwa ein Sechstel an CHO-Zellen im Vergleich zu den Interphasezellen befanden.

3.2.4 ZELLFUSION UND PCC-INDUKTION

Reagenzien:

55% -iges (w/v) Polyethylenglycol 1500 *

*PEG 1500 (55% w/v), das von Boehringer Mannheim produziert wird, enthält keine Aldehyde und Peroxide, wird lichtgeschützt in dunklen Flaschen gelagert und in einer sauerstofffreien Umgebung abgefüllt und ist auf Fusionseffizienz getestet (Shay, 1987).

$MgCl_2$
RPMI 1640-Medium (+10% FKS; +1% P/S)
Colcemid-Lösung (10µg/ml)

Durchführung:

Das Mitose-Interphasezell-Gemisch wurde für 5 min bei 200g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in nur 2 ml serumfreiem RPMI 1640-Medium resuspendiert. Serum stört bei Fusionen (Maroudas, 1975). Nach einer weiteren Zentrifugation von 5 min bei 200g wurde der Überstand dekantiert und dabei die Restflüssigkeit möglichst vollständig entfernt, indem man das Zentrifugenröhrchen für 1 Minute mit der Öffnung nach unten über einem Papiertuch unter vorsichtigem Abklopfen ablaufen ließ. Danach wurde mit einer 1 ml-Spritze 0,25 ml 55 %-iges (w/v) PEG 1500 zugegeben. Dieses ließ man 1 min einwirken, wobei alle 15 Sekunden das Röhrchen kurz vorsichtig geschüttelt wurde, um erste Zellkontakte nicht auseinanderzureißen. Innerhalb der folgenden 3 min wurde das PEG durch tropfenweise Zugabe von 2,5 ml RPMI 1640-Medium (serumfrei, +1% P/S) verdünnt, wobei das Röhrchen nach jedem Tropfen vorsichtig geschüttelt wurde. Anschließend wurde bei 200 g 3 min zentrifugiert, und die Überstände wiederum vollständig nach Dekantieren unter Abklopfen über einem Papiertuch entfernt. Die Pellets wurden durch leichtes Klopfen gegen das Zentrifugenröhrchen in je 0,5 ml RPMI 1640-Medium, supplementiert mit 10% FKS und 1% P/S resuspendiert und

0,05 ml Colcemid (10µg/ml) und 0,05 ml $MgCl_2$ (2 mM) zugegeben. Durch die Zugabe von $MgCl_2$ wird die PCC-Rate erhöht (Rao und Johnson, 1971; Rao *et al.*, 1977). Zur PCC-Induktion wurden die Zellsuspensionen in den Zentrifugenröhrchen mit leicht geschlossenem Deckel für 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.2.5 ERNTE UND PRÄPARATION VON PCCS

Materialien und Reagenzien:

0,075 M Kaliumchlorid (KCl)
Methanol-Eisessig (3+1)-Gemisch
Heizplatte (55 °C)

Durchführung:

Nach der einstündigen Inkubation des Fusionsgemisches erfolgte eine 10-minütige Hypotoniebehandlung mit 13,0 ml 0,075 M KCl (Kaliumchlorid) bei Raumtemperatur. Die KCl-Lösung wurde unter leichtem Schütteln des Röhrchens zuerst langsamer, dann zügiger hinzupipettiert. Nach Zentrifugation von 5 min bei 100g wurde die hypotone Lösung bis auf 0,5 ml abgezogen, um eine Verklumpung der Zellen bei Zugabe des Methanol-Eisessig zu vermeiden und die Zellen darin resuspendiert. Danach wurden 10 ml Methanol-Eisessig-Gemisch (3+1) zuerst tropfenweise, dann schneller unter leichtem Schütteln zugefügt. Nach erneuter Zentrifugation bei 200g für 5 min wurden die Zellen noch einmal in 5 ml Fixans gewaschen. Zunächst wurde jeweils nur 1 Objektträger präpariert. Dazu wurden 3-4 Tropfen der Zellsuspension auf fett- und staubfreie Objektträger (gereinigt in 70% Ethanol) getropft und kurz auf die Heizplatte zum Trocknen gelegt. Die Qualität der Objektträger wurde im Phasenkontrastmikroskop auf Spreitung, Zelldichte und Fixierung überprüft. Durch Variation der Auftropfbedingungen (Auftropfhöhe, Verdünnung der Zellsuspension, trockene oder feuchte Objektträger) wurde die Qualität bei Bedarf optimiert. Anschließend wurden weitere Objektträger präpariert. Das restliche Zellpellet wurde bei -20°C aufbewahrt.

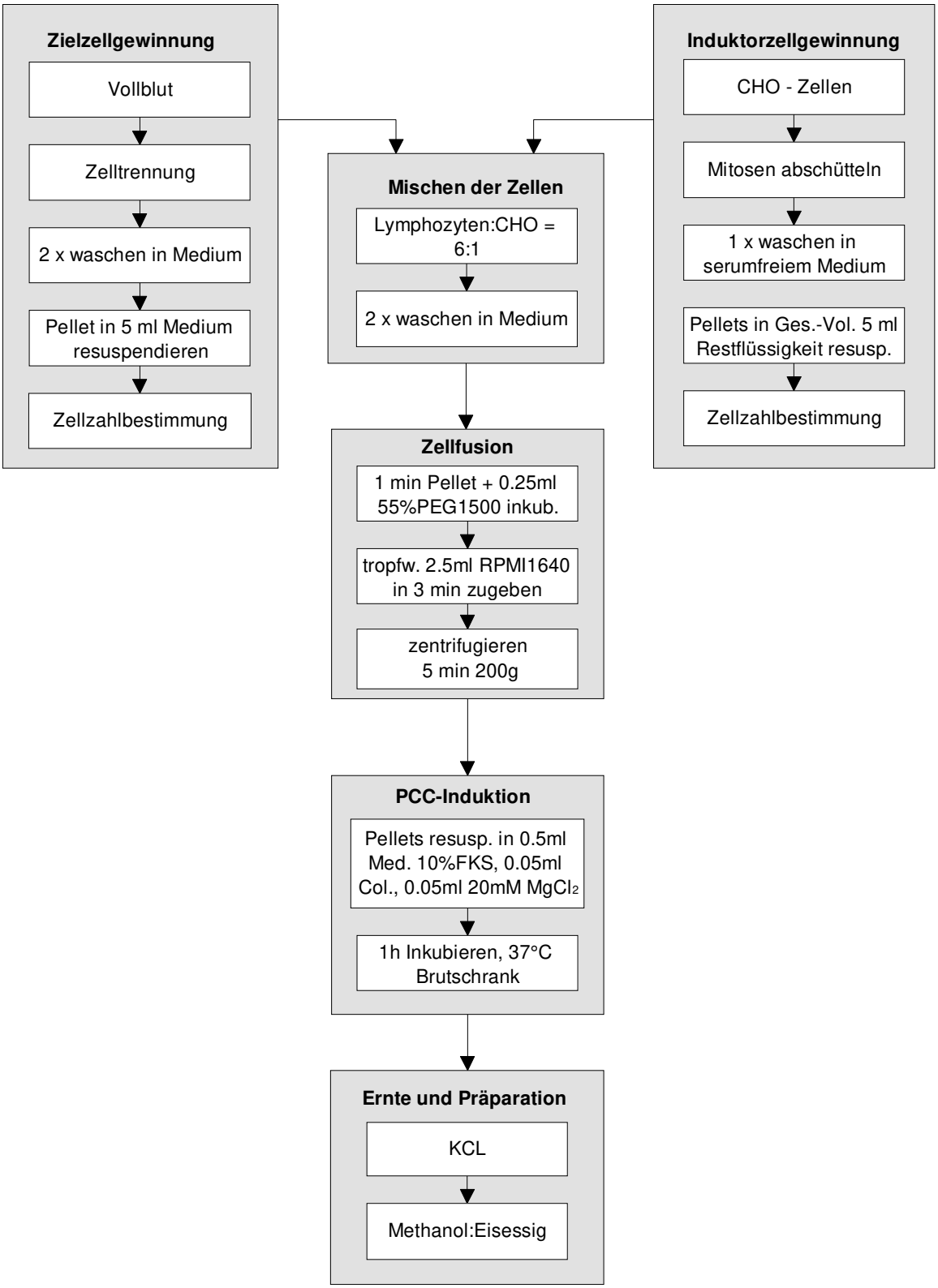


Abb. 3.1. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs zur PCC-Induktion (nach Tittelbach, 1992)

3.3 DIE KONVENTIONELLE CHROMOSOMENANALYSE AUS METAPHASEN

Vergleichend zu den PCC-Studien sollten Untersuchungen struktureller Aberrationen nach konventioneller Methode an Metaphasechromosomen humaner Lymphozyten erfolgen. Dazu mußten zunächst die Lymphozyten, die sich in einem Ruhestadium, der G_0-Phase des Zellzyklus, befanden, mit Phytohämagglutinin (PHA) zur Teilung angeregt werden. Es wurden 48 Stunden- und 73 Stunden-Vollblutkulturen angelegt.

3.3.1 48 STUNDEN-VOLLBLUTKULTUREN

Die 48 Stunden-Kulturen wurden angelegt, um möglichst viele Zellen zu erhalten, die das Mitosestadium zum erstenmal nach Mutagenapplikation erreicht hatten. Diese Zellen wurden anhand ihrer einheitlich dunklen Färbung nach BrdU-Einbau und anschließender FPG-Färbung identifiziert. Der Ansatz der 48-Stunden-Vollblutkulturen erfolgte modifiziert nach einer Methode von Dresp und Bauchinger (1988). Der Kulturansatz erfolgte hier nach einer einstündigen Inkubation des Vollbluts mit der Testsubstanz. Die Durchführung der Inkubation von Vollblut wird in Kapitel 3.4.2.1 beschrieben.

Reagenzien:

RPMI 1640-Medium (+1% P/S)
RPMI 1640-Medium (+10% FKS, +1% P/S)
Phytohämagglutinin HA 15
Bromdesoxyuridin

Durchführung:

Um die Testsubstanz nach der Inkubation zu entfernen, wurden die Zentrifugenröhrchen mit dem Vollblut-Medium-Substanz-Gemisch bei 200 g für 8 min abzentrifugiert und zweimal mit serumfreien RPMI 1640-Medium (+1% P/S) gewaschen. Das Pellet wurde in 1 ml Restflüssigkeit resuspendiert und zu 8,0ml RPMI 1640-Medium (+10%FKS; +1%P/S) und 0,2 ml PHA gegeben. Es wurde BrdU zugefügt, so daß eine Endkonzentraion von 10µM resultierte.

3.3.2 73 STUNDEN-VOLLBLUTKULTUREN

Die 73 Stunden-Vollblutkulturen wurden nach einer leicht modifizierten Methode von Dittberner (1993) angesetzt. Die Kultivierung erfolgte in BrdU-haltigem Medium. Die Kriterien zur Bestimmung der Zellkinetik blieben jedoch unberücksichtigt, da die Auswertung an Normal-Giemsa-gefärbten Präparaten durchgeführt wurde. 48 Stunden nach dem Ansatz erfolgte die einstündige Inkubation mit der jeweiligen Testsubstanz.

Materialien und Reagenzien:

Phytohämagglutinin
RPMI 1640-Medium (+1% P/S)
RPMI 1640-Medium (+10% FKS; +1% P/S)
Bromdesoxyuridin
Colcemid-Lösung (10µg/ml)
15 ml-Zentrifugenröhrchen

Durchführung:

Zur Kultivierung wurden jeweils 0,8 ml Vollblut und 0,2 ml PHA zu 8,0 ml serumfreiem RPMI 1640-Medium (1%P/S) in ein steriles 15ml-Zentrifugenröhrchen gegeben. Nach einer Kultivierungsdauer von 24 Stunden im Brutschrank wurde den Röhrchen jeweils BrdU zugegeben, so daß sich in den Kulturen eine BrdU-Endkonzentration von 10µM ergab. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte die Inkubation mit den Testsubstanzen (siehe Kapitel 3.4.3.1).

Dabei wurde das Gesamtkulturvolumen mit RPMI 1640-Medium (serumfrei, +1%P/S) auf 10 ml ergänzt und die Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen hinzupipettiert. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Zellen zweimal in serumfreien RPMI 1640-Medium (+1%P/S) gewaschen und für weitere 24 Stunden, diesmal in RPMI 1640-Medium, das mit 10% FKS supplementiert war, unter BrdU-Zugabe inkubiert.

3.3.3 ABERNTUNG UND PRÄPARATION MITOTISCHER ZELLEN

Geräte und Reagenzien:

Colcemid-Lösung (10µg/ml)
0,0375 M Kaliumchlorid (KCl)
Methanol-Eisessig (3+1)-Gemisch
Wasserbad (37 °C)
Heizplatte (55 °C)

Durchführung:

Zwei Stunden vor der Aberntung wurden zur Arretierung der Metaphasen jeweils 0,2 ml Colcemid-Lösung (10µg/ml) zu den Kulturen gegeben. Die Kulturen wurden nach einer Gesamtinkubationsdauer von 48 bzw. 73 Stunden bei 250g für 8 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand mit der Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Hypotoniebehandlung erfolgte mit 0,0375 M KCl-Lösung für 20 min bei 37°C im Wasserbad. Danach wurden die Zellsuspensionen erneut zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Zum Fixieren der Zellen wurde unter Resuspendieren des Pellets langsam eiskaltes Methanol-Eisessig (3+1)-Gemisch zugegeben. Nach Aufbewahren bei 4°C wurde erneut zentrifugiert (250g, 10 min), der Überstand abgesaugt und das Pellet wieder in frischem Methanol-Eissig (3+1)-Gemisch resuspendiert. Diese Fixierungsschritte wurden etwa zwei- bis dreimal durchgeführt solange bis das Pellet weiß erschien. Anschließend wurde pro Röhrchen 3-4 Tropfen der Zellsuspension zunächst auf einen gereinigten, fettfreien Objektträger getropft, auf die Heizplatte gelegt und getrocknet. Danach wurde die Qualität der Objektträger im Phasenkontrast hinsichtlich Fixierung und Spreitung geprüft.

3.4 MUTAGENITÄTSTESTUNG

Abbildung 3.2. zeigt in einer Übersicht den Verlauf der in dieser Arbeit durchgeführten Versuche. Wie aus dieser Abbildung deutlich wird, erfolgte die Inkubation mit der Testsubstanz für jeweils eine Stunde in nicht-kultivierten Zellen (Vollblut und isolierte Lymphozyten in der G_0-Phase; siehe Kapitel 3.4.2) und an PHA-stimulierten Kulturen (Vollblutkulturen und Kulturen isolierter Lymphozyten; siehe Kapitel 3.4.3). Nach der Mutagenapplikation in Vollblut (ohne PHA) erfolgte in der einen Versuchsreihe die PHA-Zugabe und eine 48h-Kultivierung zur Chromosomenanlyse aus Metaphasen (siehe Kapitel 3.3.1). In der anderen Versuchsreihe wurde eine Lymphozytenisolierung und anschließend eine PCC-Induktion durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2.1 und 3.2.3– 3.2.5). Ergänzend wurden zu PCC-Studien isolierte Lymphozyten in der G_0-Phase in NDELA bzw. Bleomycin inkubiert (siehe Kapitel 3.4.2.2 ; in Abb. 3.2 nicht dargestellt).

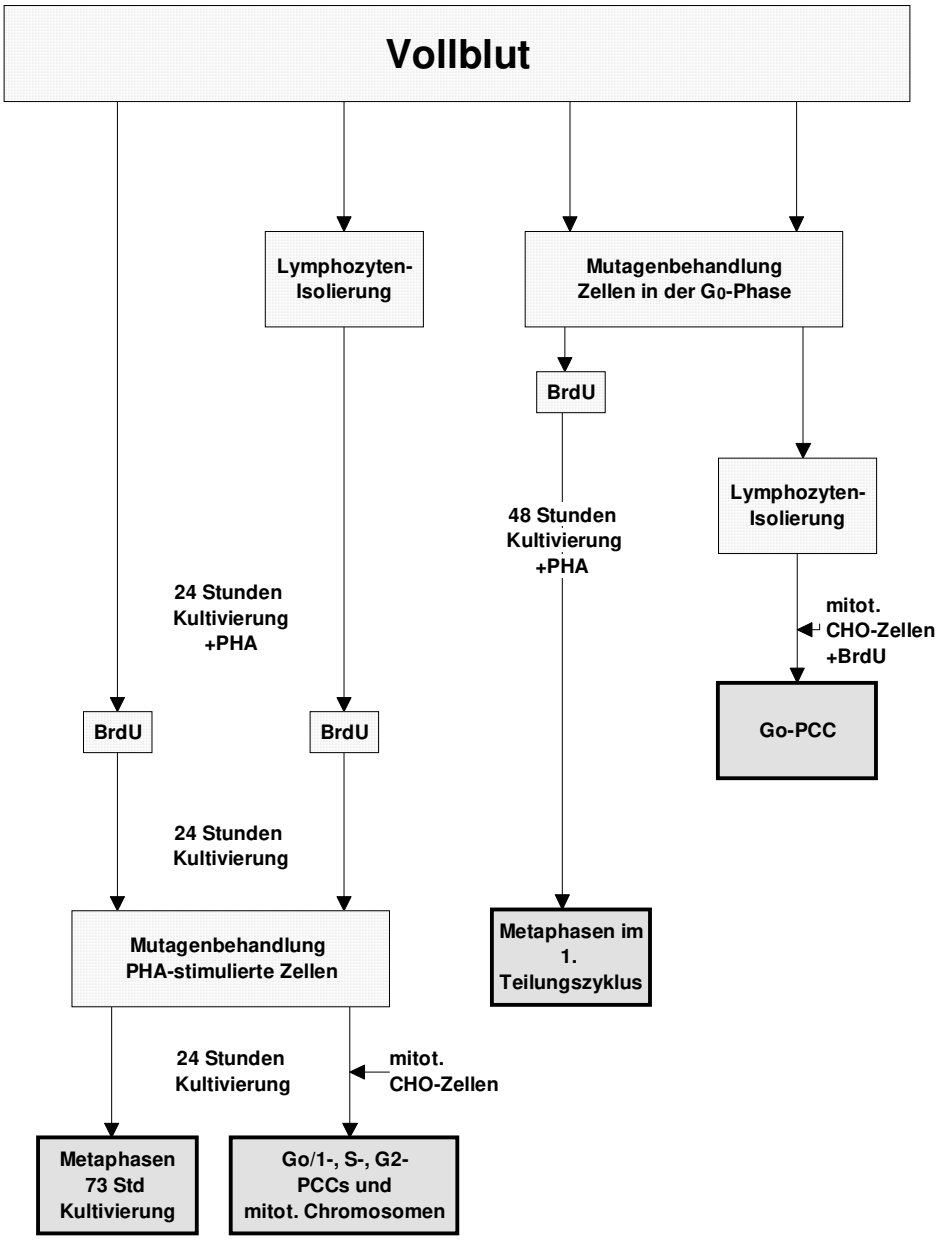


Abb. 3.2. Übersicht über die durchgeführten Versuche. Analyse von Metaphasen (nach 48 Stunden und 73 Stunden Kultivierung) und PCC-Analyse (in der G_0-Phase und 73 Stunden nach PHA-Stimulation)

Außerdem erfolgte die Inkubation mit den Testsubstanzen an PHA-stimulierten Vollblutkulturen (siehe Kapitel 3.4.3.1) bzw. PHA-stimulierten isolierten Lymphozyten (siehe Kapitel 3.4.3.2) 48 Stunden nach Kulturansatz. Die Vollblutkulturen wurden bis zur Präparation von Metaphasen 24 Stunden weiterkultiviert (siehe Kapitel 3.3.2); in den isolierten Lymphozyten wurde nach einer weiteren Kultivierungsdauer eine PCC-Induktion durchgeführt und PCCs in allen Zellzyklusphasen und mitotische Chromosomen geerntet (siehe Kapitel 3.2.3 – 3.2.5).

3.4.1 INKUBATION MIT DEN TESTSUBSTANZEN

Als zu untersuchende Substanzen wurden α,β-ungesättigte Aldehyde (Crotonaldehyd und *trans*-2-Hexenal) und das Nitrosamin N-Nitrosodiethanolamin

eingesetzt. Als weitere Substanzen wurden Bleomycin, Diethylstilbestrol und Mitomycin C untersucht. Bleomycin, dessen Wirkungsweise von zahlreichen Autoren bereits gut charakterisiert worden war, wurde als Positivkontrolle mitgeführt.

Crotonaldehyd wurde für PCC-Studien in den Konzentrationsbereichen von 30µM bis 480µM eingesetzt. Bei den Ansätzen zur Gewinnung von Metaphasen wurden die Konzentrationsbereichen von 60µM bis 480 µM gewählt. Die Substanz wurde in Ampuwa verdünnt; die Zugabemengen der Gebrauchslösung betrugen zwischen 3µl und 48µl pro 10 ml Gesamtflüssigkeitsvolumen.

Hexenal wurde bei den PCC-Versuchen in einem Konzentrationsbereich von 50µM bis 300 µM und bei den Ansätzen der Vollblutkulturen in einem Bereich von 50µM – 150µM eingesetzt. Hexenal wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) so gelöst, daß die Endkonzentration von DMSO in den Kulturen einen Anteil von 0,3% (PCC-Versuche) bzw. 0,15% (Metaphasenversuche) nicht überschritt. Eine Kontrolle mit einem DMSO-Anteil (K+DMSO) von 0,3% (PCC-Versuche) bzw. von 0,15% (Metaphasenanalyse) wurde mitgeführt.

Bleomycin wurde in Form von Bleomycinsulfat als positive Kontrollsubstanz bei den PCC-Versuchen in einer Konzentration von 10µg/ml und bei den Ansätzen zur Metaphasengewinnung in einem Konzentrationsbereich von 5 – 20µg/ml mitgeführt. Bleomycinsulfat wurde in 0,9%-iger NaCl-Lösung gelöst. Die Zugabenvolumina in den 10 ml-Ansätzen betrugen zwischen 50 u. 200 µl.

NDELA wurde freundlicherweise als Stammlösung von der Abteilung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern zur Verfügung gestellt. Für PCC-Studien wurde NDELA in den Konzentrationen von 1000 µM bis 2000µM und in den Ansätzen zu Metaphasenuntersuchungen in den Bereichen von 500µM bis 2500µM eingesetzt.

Mitomycin C wurde zur Untersuchung von G_0-PCCs in einem Konzentrationsbereich von 4µM bis 20µM und für Metaphasenstudien in einem Bereich von 2µM bis 6µM eingesetzt. Die Zugabe zu den Kulturen erfolgte direkt aus einer Stammlösung von 1mg/ml NaCl.

Diethylstilbestrol wurde in einem Konzentrationsbereich von 50µM bis 200µM für die PCC-Studien bzw. von 20µM bis 100µM für die Metaphasen Analyse gewählt. DES wurde in DMSO gelöst, was zu einem Anteil von 0,1% in der Kultur führte. Eine DMSO-Lösungskontrolle wurde deshalb bei den Versuchen mitgeführt.

Die Inkubation erfolgte in serumfreien RPMI 1640-Medium, um die Bildung von Addukten (Hoffman *et al.,* 1993) und unerwünschte Reaktionen mit Serumkomponenten, wie z.B. Proteinen (Barnes und Sato, 1980) zu vermeiden. War die Substanz in Wasser bzw. in 0,9%-iger NaCl löslich, dienten als Kontrollen Ansätze, denen statt der zu testenden Substanz RPMI1640-Medium (+1%P/S) zugegeben worden war.

Geräte und Reagenzien:

Brutschrank
15ml-Zentrifugenröhrchen
RPMI 1640-Medium (+1% P/S)
Dimethylsulfoxid
Testsubstanzen

Durchführung:

Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte grundsätzlich für 1 Stunde bei 37°C im Brutschrank in geschlossenen 15 ml-Zentrifugenröhrchen in einem Gesamtflüssigkeitsvolumen von 10 ml. Die Röhrchen wurden dabei in einen Reagenzglasständer gestellt, der einen Winkel von 10-15° aus der Waagrechten

einnahm. Nach 30 Minuten wurden die Röhrchen in ihrer Längsachse um 180° gedreht, um ein Absetzen der Zellen zu verhindern. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Substanzen durch zweimaliges Waschen entfernt, d.h. es erfolgten 3 Zentrifugationsschritte (200g; 8 min.), wobei zwischen den Zentrifugationen der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem serumfreien RPMI 1640-Medium (+1% P/S) resuspendiert wurden. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurden die Zellen entweder in RPMI 1640-Medium mit den entsprechenden Zusätzen zur Kultivierung aufgenommen oder zur Induktion von G_0-PCCs eingesetzt.

3.4.2 MUTAGENAPPLIKATION IN VOLLBLUT BZW. ISOLIERTEN LYMPHOYZTEN IN DER G_0-PHASE

Dafür wurden jeweils 1 ml Vollblut bzw. G_0-Lymphozyten, die aus 1 ml Vollblut isoliert worden waren, in 9 ml RPMI 1640-Medium mit dem zu testenden Mutagen inkubiert. Die Ansätze erfolgten jeweils dreifach.

3.4.2.1 INKUBATION VON VOLLBLUT

Die Inkubation mit α,β-ungesättigten Aldehyden, NDELA, Bleomycin, Diethylstilbestrol und Mitomycin C erfolgte in Vollblut.

Durchführung:

Dazu wurde 1,0ml Vollblut mit 9,0ml serumfreiem RPMI 1640-Medium (+1% P/S) gemischt und das Agens in der jeweiligen Konzentration hinzugefügt. Nach der einstündigen Inkubation wurde das Vollblut-Medium-Substanz-Gemisch bei 200g für 8 Minuten abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit serumfreiem RPMI 1640-Medium (+1% P/S) zur Entfernung des Mutagens gewaschen. Nun wurden entweder PCC-Induktionen durchgeführt oder die Zellen zur Gewinnung von Metaphasen für 48 Stunden in PHA-haltigem Medium kultiviert. Vor der PCC-Induktion mußten die mononukleären Zellen jedoch isoliert werden.

3.4.2.2 INKUBATION VON ISOLIERTEN LYMPHOZYTEN IN DER G_0-PHASE

Die abgetrennten Lymphozyten wurden ausschließlich zur Mutagenitätstestung von NDELA bzw. Bleomycin eingesetzt. Dabei sollte untersucht werden, ob die Behandlung von Vollblut und die Behandlung isolierter Zellen zu vergleichbaren Ergebnissen führte.

Reagenzien:

RPMI 1640-Medium (+1% P/S)
Testsubstanzen
Neubauer-Zählkammer

Durchführung:

Die isolierten mononukleären Zellen wurden in 10,0 ml RPMI 1640-Medium (serumfrei, +1% P/S) resuspendiert und mit der jeweiligen Testsubstanz für 1 Stunde inkubiert. Danach wurden die Röhrchen bei 250g für 8 min zentrifugiert, das Pellet in 5,0ml RPMI 1640-Medium (serumfrei, +1% P/S) resuspendiert und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.4.3 MUTAGENAPPLIKATION AN PHA-STIMULIERTEN KULTUREN VON VOLLBLUT BZW VON ISOLIERTEN LYMPHOZYTEN

Durch die PHA-Stimulierung treten die Lymphozyten aus dem G_0-Stadium in den Zellzyklus ein. Die Inkubation mit den jeweiligen Testsubstanzen erfolgte an PHA-stimulierten Zellen sowohl in Vollblutkulturen als auch in Kulturen

abgetrennter Lymphozyten 48 Stunden nach Kulturansatz. Während der Mutagen-Behandlung enthält eine Kultur somit Zellen in allen Zyklusphasen und damit auch mitotische Zellen.

3.4.3.1 INKUBATION IN VOLLBLUTKULTUREN

Die Röhrchen mit den 9,0 ml Vollblutkulturen wurden dem Brutschrank entnommen und unter sterilen Bedingungen wurde 1,0 ml frisches serumfreies RPMI 1640-Medium (+1%P/S) hinzupipettiert, sodaß das Gesamtinkubationsvolumen 10,0 ml betrug. Danach wurden die Testsubstanzen in den jeweiligen Konzentrationen hinzupipettiert. Nach der einstündigen Inkubation wurden die Substanzen durch zweimaliges Waschen mit serumfreiem RPMI 1640-Medium (+1% P/S) entfernt und die Lymphozyten für weitere 24 Stunden kultiviert.

3.4.3.2 INKUBATION IN KULTUREN ISOLIERTER LYMPHOZYTEN

Da Serum die mutagene Wirkung von Substanzen beeinflussen kann, mußten die in serumhaltigen Medium kultivierten Zellen vor der Mutagen-Applikation zweimal in serumfreiem RPMI 1640-Medium (+1% P/S) gewaschen werden. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Mutagen. Nach der Mutagen-Behandlung wurde die Substanz durch zweimaliges Waschen entfernt und die Zellen für 24 Stunden weiterkultiviert.

3.5 REPARATURKINETIK-STUDIEN AN VORZEITIG KONDENSIERTEN CHROMOSOMEN

Der Einfluß von Reparaturvorgängen auf Interphasechromatin sollte sowohl an Crotonaldehyd-behandelten als auch an unbehandelten Lymphozyten in der G_0-Phase untersucht werden. Dazu wurden die Reparaturhemmstoffe 1-(β-D-Arabinofuranosyl)cytosin (AraC), Hydroxyharnstoff (HU) und Novobiocin (NB) eingesetzt. AraC wurde in A.bidest. gelöst, sodaß eine 0,1M (10^{-1}M) Stammlösung entstand. Die Endkonzentration von AraC betrug in der 10ml- Kultur 100µM (10^{-4}M) bei einem Zugabevolumen von 10µl der Stammlösung. Hydroxyharnstoff wurde in A.bidest. gelöst, sodaß eine 1M Stammlösung endstand. Die Endkonzentration von HU betrug bei einem Zugabevolumen von 100µl 10 mM (10^{-2}M). Novobiocin wurde in Ethanol zu einer 400 mM Stammlösung gelöst. Das Zugabevolumen betrug 25µl, sodaß eine Endkonzentration von 1mM (10^{-3}M) erreicht wurde.

In Abbildung 3.3 sind die verschiedenen Ansätze zur Untersuchung der Reparaturvorgänge schematisch dargestellt. Es wurden Inkubationen von jeweils 60 Minuten Dauer nur mit Crotonaldehyd (A,D,E), nur mit dem jeweiligen Hemmstoff (B) bzw. mit Crotonaldehyd und einem Reparaturinhibitor gleichzeitig (C) durchgeführt. Nach Ansatz D bzw. E erfolgte im Anschluß an die Crotonaldehyd-Behandlung eine 90-minütige (D) bzw. 180-minütige (E) Nachinkubation mit einem Reparaturhemmstoff oder in serumfreien RPMI 1640-Medium (+1%P/S). Die einstündige Behandlung wurde mit Vollblut durchgeführt; pro Ansatz wurden jeweils 1,0ml Vollblut in 9,0 ml serumfreies RPMI 1640-Medium (+P/S) gegeben. Danach wurde die Substanz durch zweimaliges Waschen (250g) entfernt. Je nach Protokoll wurde nun eine Dichtegradientenzentrifugation zur Isolierung mononukleärer Zellen mit anschließender PCC-Induktion durchgeführt (A,B,C) oder das Pellet (1,0ml Zellsuspension) zur Nachinkubation erneut in 9,0 ml serumfreiem RPMI 1640-Medium aufge-

nommen. Im Anschluß an die Postinkubation erfolgte die Isolierung der Lymphozyten und danach die PCC-Induktion (D,E).

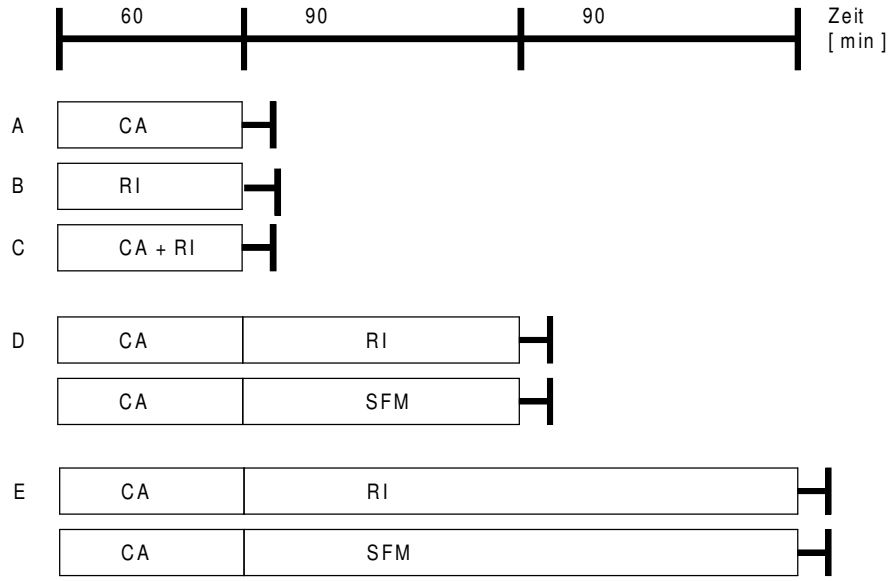


Abb. 3.3. Schematische Darstellung der Ansätze nach Behandlung mit Crotonaldehyd (CA) und/oder Reparaturhemmstoffen (RI) und/oder serumfreien Medium (SFM) in Kombination mit der PCC-Induktion, wobei RI=AraC, HU, AraC+HU oder NB

- A Inkubation mit Crotonaldehyd in den Konzentrationen 480 µM bzw. 300 µM für 60 Min, anschließend PCC-Induktion
- B Inkubation mit einem Reparaturhemmstoff für 60 Minuten, wobei RI: AraC, HU, AraC + HU und NB, anschließend PCC-Induktion
- C gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Crotonaldehyd und einem Reparaturhemmstoff für 60 Minuten, für CA: 480µM und RI: AraC + HU oder NB bzw. CA 300µM und RI: AraC + HU oder NB, anschließend PCC-Induktion
- D Inkubation mit CA: 480 µM für 60 Minuten, Nachinkubation mit RI für 90 Minuten, wobei RI: AraC + HU oder NB bzw. Nachinkubation in SFM, anschließend PCC-Induktion
- E Behandlung mit CA: 480 µM für 60 Minuten, Nachinkubation mit RI für 180 Minuten, wobei RI: AraC + HU, anschließend PCC-Induktion bzw. Nachinkubation in SFM für 180 Minuten, anschließend PCC-Induktion

3.6 FÄRBUNGEN

3.6.1 FLUORESZENZ-PLUS-GIEMSA (FPG) -METHODE

Zur differentiellen Färbung von Chromatiden wurde die von Perry und Wolff (1974) beschriebene Fluoreszenz-plus-Giemsa (FPG)-Methode eingesetzt.

Reagenzien:

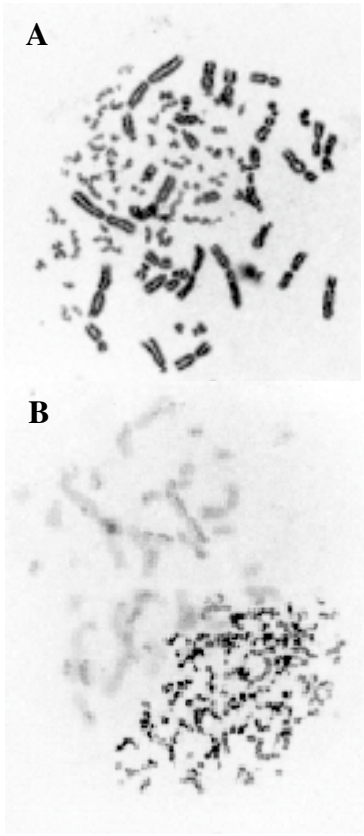
Hoechst-Stammlösung:	5 mg Bisbenzimid Hoechst 33258 in 100 ml Speziallösung (Lagerung bei 4^0C, abgedunkelt)
Speziallösung:	2,237 g KCl; 8,766 g NaCl in 1000 ml A. dest (Lagerung bei 4^0C)
Fluorochrom-Gebrauchslösung:	Hoechst-Stammlösung verdünnen mit Speziallösung 1:100
Phosphatpuffer:	100 ml Stammlösung A; 100 ml Stammlösung B; 800 ml A. dest. (pH 6,8)
Stammlösung A:	45,36 g KH_2PO_4 in 1000 ml A. dest. (Lagerung bei 4^0C)
Stammlösung B:	59, 33 g Na_2HPO_4 x H_2O in 1000 ml A. dest. (Lagerung bei 4^0C)
2xSSC:	17,53 g NaCl; 8,82 g Na-Citratx$2H_20$ in 1000 ml a. dest. (Lagerung bei 4^0C)
7%-ige Giemsa-Lösung:	7 ml Giemsa; 93 ml Phosphatpuffer, filtrieren

Die Fluorochrom-Gebrauchslösung, der Phosphatpuffer und die 7%-ige Giemsa-Lösung mußten vor Färbebeginn frisch angesetzt werden. Alle Färbelösungen sollten Raumtemperatur haben.

Durchführung:

Die Objektträger wurden nach ihrer Präparation für 1-3 Tage bei 37°C im Trockenschrank gelagert. Zunächst stellte man die Präparate für 10 min in eine mit Alufolie abgedunkelte und mit Fluorochrom-Gebrauchslösung gefüllte Hochküvette. Anschließend wurden die Objektträger zweimal in Phosphatpuffer gespült, in eine Plastikschale gelegt, mit Phosphatpuffer (etwa 1 cm hoch) bedeckt und für 25 min einer UV-Bestrahlung der Wellenlänge 254 nm ausgesetzt. Danach wurden die Objektträger für 90 min in einer Hochküvette mit 2xSSC-Lösung bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Die Objektträger wurden kurz in a.dest. geschwenkt und auf der Rückseite mit einem Tuch abgewischt, um Salzrückstände zu entfernen. Nach Lufttrocknen wurden die Objektträger in einer 7%-igen Giemsa-Lösung 7-9 min gefärbt und zweimal in a. dest. kurz gespült.

3.6.2 Die FPG-Methode zur Identifizierung von G_0-PCCs bei Lymphozyten



Da der Mitose-Index der Induktorzellen niemals 100% erreicht, können PCCs auch in Interphasekernen von Induktorzellen induziert werden. Um die CHO-Lymphozyten-Fusionen leichter identifizieren zu können, wurde daher nach der von Cornforth und Bedford (1983 a) entwickelten Methode die CHO-Induktorzellen für mindestens zwei Replikationszyklen in BrdU-haltigem Medium kultiviert. Nach FPG-Färbung der PCC-Präparate erschienen die vorzeitig kondensierten Chromosomen der Lymphozyten einheitlich dunkel und die CHO-Zellen hell. Besonders bei geschädigten G_0-PCCs mit einer im Vergleich zu ungeschädigten G_0-PCCs stark erhöhten Anzahl an Chromatinelementen erleichtert der Einsatz der FPG-Methode das Auszählen der PCC-Fragmente (siehe Abbildung 3.4). Bei Lymphozyten in der G_0-Phase erfolgte die PCC-Induktion mit BrdU-markierten CHO-Zellen. Nicht-markierte CHO-Zellen wurden dagegen zur PCC-Induktion PHA- stimulierter Lymphozyten eingesetzt.

Abb. 3.4. PCC-Induktion bei Lymphozyten in der G_0-Phase nach Fusion mit mitotischen CHO-Zellen
A nicht markierte CHO-Zelle, CHO-Chromosomen und G_0-PCCs erscheinen einheitlich dunkel gefärbt
B Brdu-markierte CHO Induktorzelle; mitotische CHO-Chromosomen lassen sich nach FPG-Färbung an ihren differentiell gefärbten Chromatiden gut von den G_0-PCC unterscheiden

3.6.3 Die FPG-Methode zur Bestimmung der Zellproliferationskinetik

48 Stunden Vollblutkulturen. Mit der FPG-Methode konnten die PHA-stimulierten Lymphozyten aus 48 Stunden-Vollblutkulturen identifiziert werden, die zum erstenmal nach Mutagenapplikation das Metaphasestadium der Mitose erreicht hatten. Diese Metaphasen konnten anhand der einheitlich dunkel gefärbten Chromosomen identifiziert werden. Die FPG-Technik beruht auf der unterschiedlichen Färbung der Schwesterchromatiden eines Chromosoms nach BrdU-Einbau. Bietet man Zellen während der Synthese-Phase des Zellzyklus das Thymidin-Analogon BrdU im Überschuß an, so wird dieses anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut. Nach Durchlaufen von einem Replikationszyklus in BrdU-haltigem Medium sind die Chromatiden unifilar substituiert und erscheinen einheitlich dunkel gefärbt. Nach zwei Replikationszyklen sind 50% der Chromatiden unifilar und die anderen 50% bifilar BrdU-substituiert; dies bedeutet in gleichem Anteil hell wie auch dunkel gefärbte Chromatiden. Beim Durchlaufen der Synthese-Phase des dritten Replikationszyklus erscheinen dann mehr bifilar substituierte und damit hell gefärbte als unifilar substituierte Chromatiden (Perry und Wolff, 1974).

PCCs bei PHA-stimulierten Zellen. Die PCC-Induktion erfolgte bei PHA-stimulierten Lymphozyten nach einer Kultivierung in BrdU-haltigem Medium. Die PCC konnten gemäß ihrem Färbemuster der Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen zugeordnet werden. Eine schematische Darstellung des differentiellen Färbemusters nach BrdU-Einbau zeigt Abbildung 3.5. Alle Chromatiden der Zellen, die ihren ersten Replikationszyklus in BrdU-haltigem Medium durchlaufen, werden unifilar BrdU-substituiert. Damit erscheinen die S-PCCs beim Durchlaufen ihrer ersten S-Phase [S(1)], die G_2-PCCs im ersten Teilungszyklus [G_2(1)] und damit die auch die G_1-PCCs im zweiten Teilungszyklus [G_1(1)] – da sie ja noch keine weitere Synthesephase durchlaufen haben- auch mikroskopisch einheitlich dunkel. Die Zahl in Klammer gibt die Anzahl der durchlaufenen Replikationszyklen in BrdU-haltigem Medium an. Die Zellen, die den Replikationszyklus zum zweitenmal in BrdU-haltigem Medium durchlaufen haben und in der S-Phase vorzeitig kondensiert wurden, lassen bereits helle Abschnitte mit gegenüberliegenden dunklen Abschnitten erkennen. Die Chromatiden der G_2 (2)-PCCs und der M (2)-Zellen lassen helle Chromatiden bzw. Bereiche mit gegenüberliegenden dunklen Chromatiden bzw. Bereichen ekennen. Die Zellen zeigen nach Durchlaufen von zwei S-Phasen [G_1(2)] und anschließender PCC-Induktion in der G_1-Phase ebenso viele helle wie dunkle Chromatiden bzw. Bereiche derselbigen, falls Schwesterchromatidaustausche stattgefunden haben. Erst beim Passieren der dritten Synthese-Phase und nachfolgenden Phasen in BrdU-haltigem Medium sind helle Chromatiden bzw. bei S-PCCs hell gefärbte kondensierte Bereiche in der Überzahl.

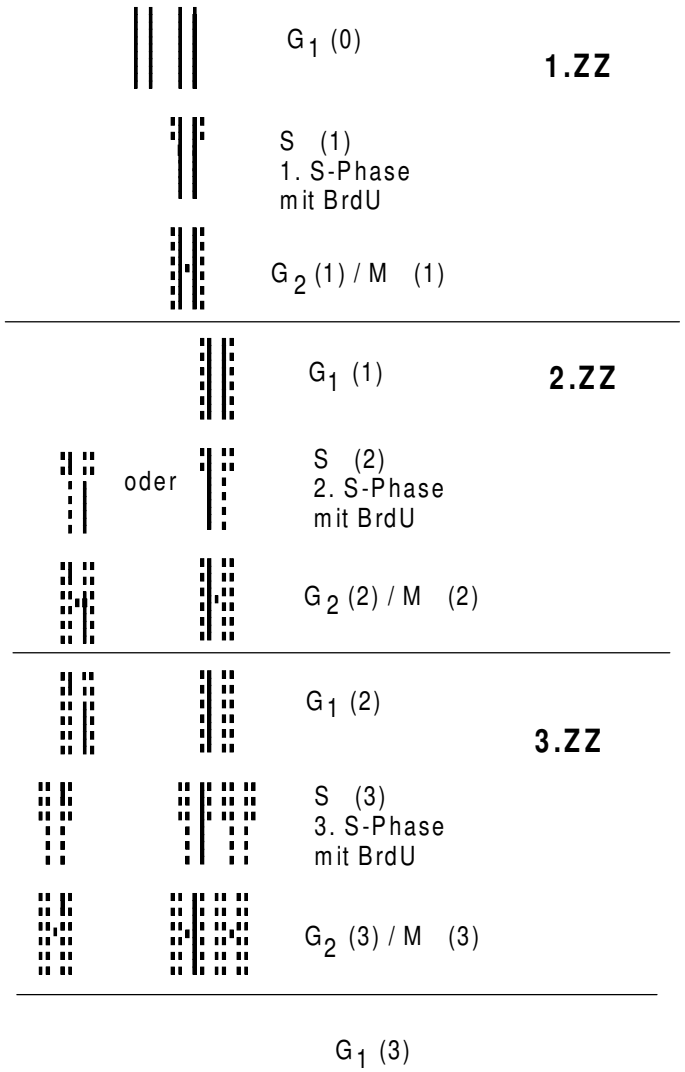


Abb. 3.5 Differentielles Färbemuster nach BrdU-Einbau in die DNA während der einzelenen Zellzyklen (mikroskopische Darstellung); die durchgezogenen Linien repräsentieren den Thymidin enthaltenden, die gestrichelten Linien den BrdU enthaltenden DNA-Strang (schematische Darstellung).

3.6.4 C-BÄNDERUNG

Die C-Bänderung von vorzeitig kondensierten Chromosomen erfolgte modifiziert nach von Vyas und Mitarbeitern (1991) und von Pantelias und Mitarbeitern (1993) konzipierten Methode. Die C-Bänderung wurde im Rahmen einer Testung von cytogenetischen Färbemethoden eingesetzt. Eine damit mögliche Einteilung in centromerposive und centromernegative PCCs wurde nicht durchgeführt.

Reagenzien:

0,2 N Salzsäure
5% Bariumhydroxid-Lösung
2xSSC
6% ige-Giemsa-Lösung

Durchführung:

Die Objektträger wurden nach dem Auftropfen der Zellsuspension und Lufttrocknen für 30 Minuten in 0,2 N HCl in eine Hochküvette bei Raumtemperatur gestellt. Nach Lufttrocknen wurden die Präparate bei Raumtemperatur 5 Minuten in eine 5 %-ige $Ba(OH)_2$-Lösung (filtriert) gestellt. Zur Entfernung der $Ba(OH)_2$-Rückstände wurden die Objektträger kurz in 0,2 N HCl gespült. Anschließend wurde eine 30-minütige Inkubation in 2xSSC bei 60°C durchgeführt. Um die Bariumhydroxid-Rückstände zu entfernen, wurden die Präparate kurz in a. dest. geschwenkt und auf der Rückseite mit einem Tuch abgerieben. Die Präparate wurden nach einer einstündigen Färbung in 6 %-iger Giemsa-Lösung in a. dest. gespült und lichtmikroskopisch ausgewertet.

3.7 AUSWERTUNG DER PRÄPARATE

3.7.1 ANALYSE VON G_0-PCCS

Abbildung 3.6 zeigt schematisch den Versuchsablauf von der Blutentnahme bis zur Analyse der G_0-PCCs. Die Anzahl von vorzeitig kondensierten Chromosomen entspricht der Anzahl von Metaphasechromosomen. PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen wurden als geschädigte Zellen eingestuft; die Einteilung der Fragmentanzahl in verschiedene Häufigkeitsbereiche wurde nach Pantelias und Maillie (1985) vorgenommen. Zusätzlich wurde in der Auswertung eine Differenzierung zwischen der Anzahl der Fragmente pro ungeschädigte + geschädigte Zelle und der Anzahl der Fragmente pro geschädigte Zelle getroffen. Parallel zum Auszählen der Fragmente wurde der Kondensationsgrad der PCCs bestimmt. Dabei wurden die PCCs - allerdings im Unterschied zu der von Hittelman und Rao 1976 publizierten Methode, statt in sechs Kategorien - semiquantitativ in vier Kondensationsstufen (Kategorie 1 – 4) eingeteilt. Um diese eher subjektive Form der Einteilung in Kondensationsgrade zu objektivieren und damit besser quantifizieren zu können, wurde die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung eingesetzt (siehe Kapitel 3.8).

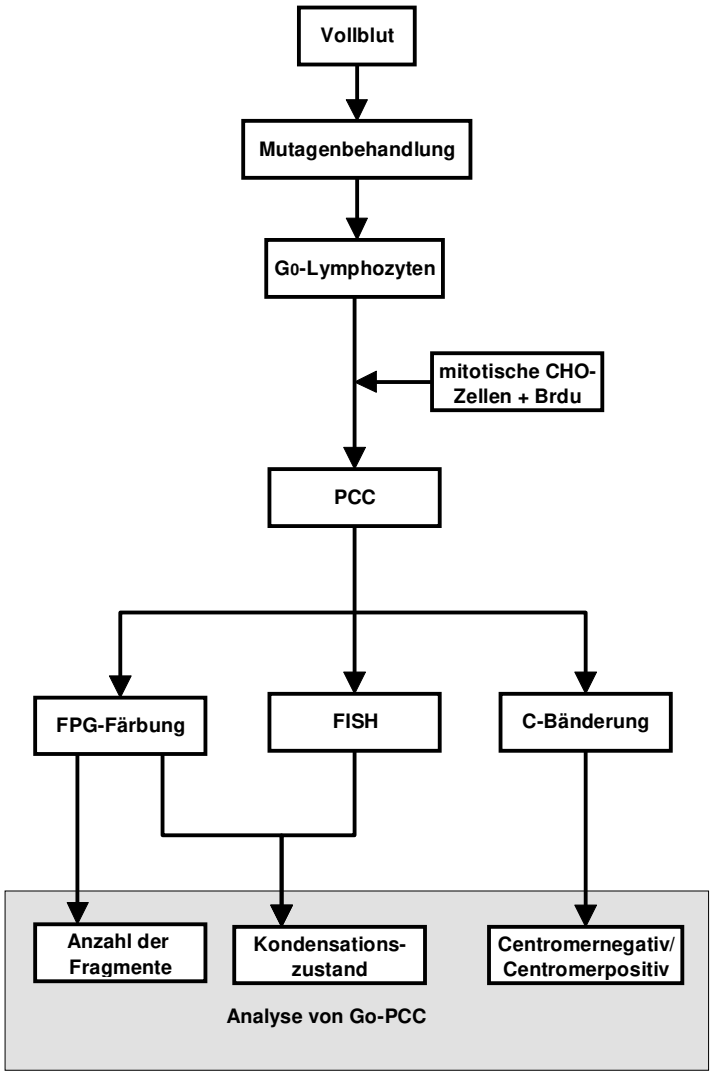


Abb. 3.6. Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von der Blutentnahme bis zur Analyse der G_0-PCCs. Durchgeführt wurden die FPG-Färbung, FISH und C-Bänderung

3.7.2 PCC-ANALYSE PHA-STIMULIERTER LYMPHOZYTEN

Abbildung 3.7. zeigt schematisch den Versuchsablauf, der die gleichzeitige Analyse von $G_{0/1}$-, S-, G_2- PCCs und mitotischen Chromosomen auf denselben Präparaten ermöglichte. Dazu wurde bei Vollblut zunächst eine Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2.2) und anschließend die Zielzellen – die Lymphozyten – 24 Stunden in PHA-haltigem RPMI 1640-Medium kultiviert. Nach der BrdU-Zugabe und weiterer Kultivierung von 24 Stunden wurde die PCC- Induktion durchgeführt. Diesmal wurden mitotische CHO-Zellen eingesetzt, die nicht BrdU-markiert waren. Die FPG-Färbung erlaubte dann eine Zuordnung der Zellen zu den Zellzyklusphasen und gleichzeitig eine Zuordnung der Zellen zu den Zellzyklen. Die Einteilung in die Zellzyklusphasen erfolgte gemäß der Morphologie der PCCs: Einzelsträngige PCCs wurden der G_1-Phase, „pulverisiert“ aussehende PCCs der S-Phase und doppelsträngige PCCs der G_2-Phase zugeordnet. Mitotische Chromosomen waren im Vergleich zu G_2-PCCs stärker kondensiert und meist nicht mit CHO-Mitosen assoziiert. Außerdem wurde das Auftreten von Aberrationen bei G_2-PCCs und bei Metaphasen untersucht. Es wurden die Zellen gewertet, die die G_2-Phase bzw. die Metaphase zum erstenmal nach Mutagenapplikation erreichten. Als Aberrationen wurden Bruchereignisse und Austauschereignisse,

nicht aber Gaps gewertet. Aberrationen wurden dann als Brüche gewertet, wenn eine Dislokation der Bruchenden vorlag.

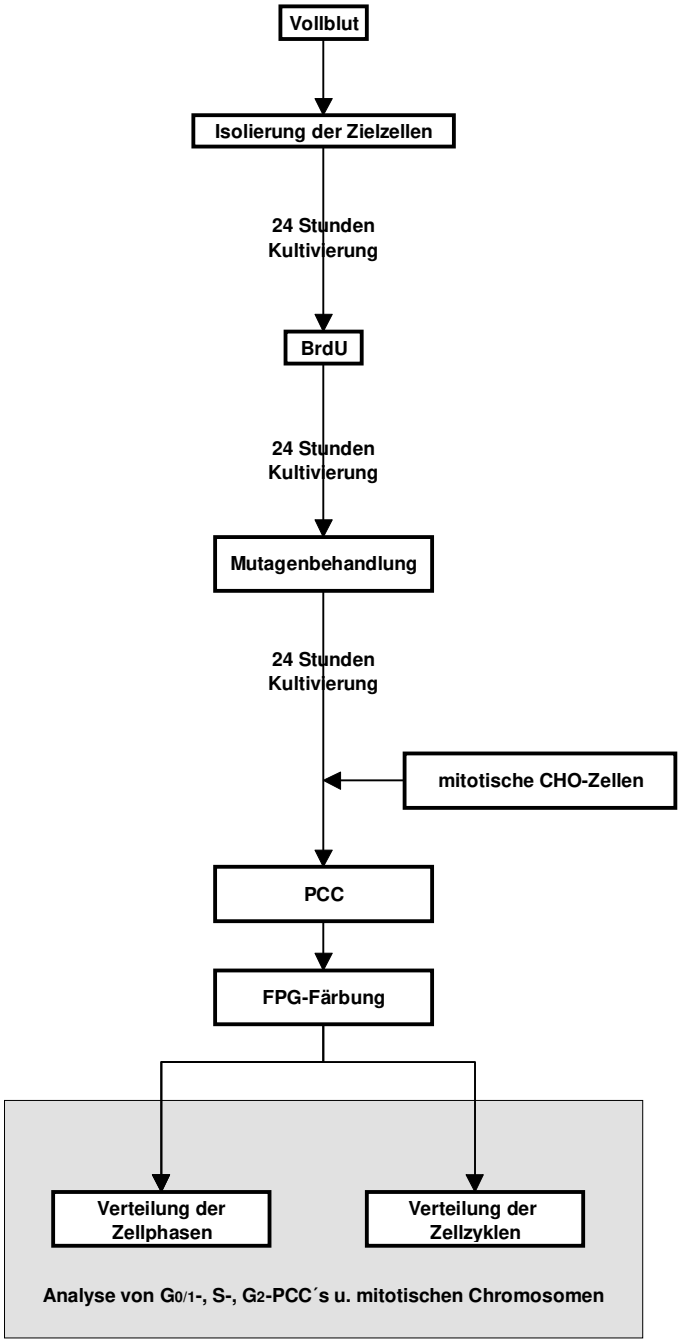


Abb. 3.7
73 Stunden-Kulturen isolierter Lymphozyten und anschließender PCC-Induktion, Verteilungsmuster der Zellen auf die Zellzyklusphasen (G_1-, S-, G_2-Phase und Mitose) und Zellzyklen (I, II,III^+).

3.7.3 AUSWERTUNG DER METAPHASENPRÄPARATE

Die mikroskopische Analyse wurde im Hellfeld bei 1000-facher Vergrößerung unter Ölimmersion mit einem Grünfilter (546nm) vorgenommen. Es wurden folgende strukturellen Aberrationstypen unterschieden:

Chromatidtyp-Aberrationen: Chromatidgap (chtg)
Chromatidbruch (chtb)
Chromatidaustausch (chte)
Chromosomentyp-Aberrationen: Chromosomengap (chrg)
Chromosomenbruch (chrb)
Chromosomenaustausch (chre)

Die Einteilung der Aberrationen erfolgte nach ISCN (1995).

3.7.3.1 Analyse struktureller Aberrationen aus 48 Stunden-Vollblutkulturen

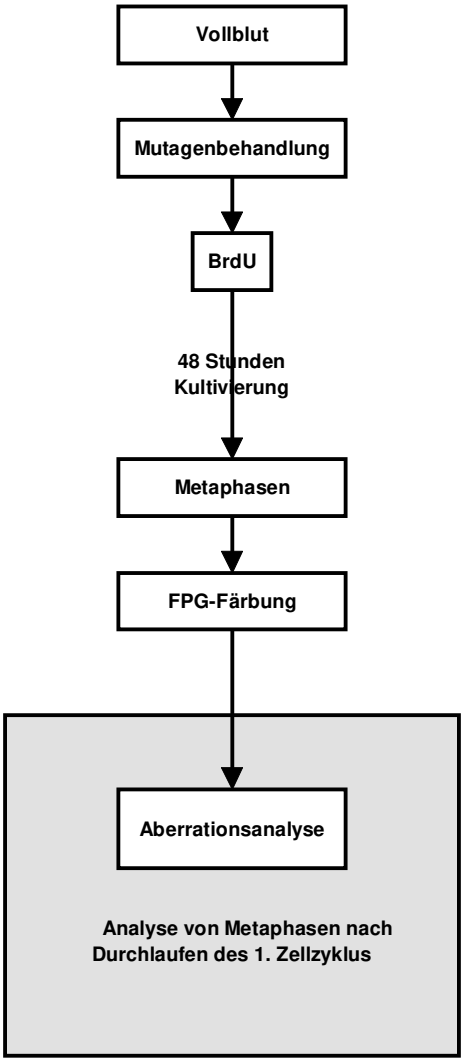


Abbildung 3.8 gibt einen schematischen Überblick der Schritte von der Blutentnahme bis zur Aberrationsanalyse wieder. Nach den einstündigen Inkubationen mit den Testsubstanzen (siehe Kapitel 3.4.2.1) wurde das Vollblut für 48 Stunden in BrdU-haltigem Medium kultiviert (siehe Kapitel 3.3.1). Auf FPG-gefärbten Objektträgern wurden ausschließlich die Metaphasen ausgewertet, die den Teilungszyklus zum erstenmal nach Mutagenbehandlung durchlaufen hatten. Diese Metaphasen sind an ihren einheitlich dunkel gefärbten Chromosomen zu erkennen.

Abb. 3.8
Schematische Darstellung des Versuchsablaufs von der Blutentnahme bis zur Aberrationsanalyse von Metaphasen nach Durchlaufen des 1. Zellzyklus nach Mutagenapplikation.

3.7.3.2 Analyse struktureller Aberrationen aus 73 Stunden-Vollblutkulturen

Ergänzend zur Aberrationsanalyse von Präparaten aus 48 Stunden-Kulturen wurden zur Mutagenitätstestung von Crotonaldehyd bzw. NDELA 73 Stundenkulturen angesetzt. Abbildung 3.9 gibt schematisch den Versuchsablauf von der Blutentnahme bis zur Aberrationsanalyse der Präparate wieder. Vollblut wurde zunächst für 24 Stunden kultiviert, anschließend wurde BrdU zugegeben. Nach einer weiteren 24-stündigen Kultivierung erfolgte die einstündige Mutagenbehandlung. Die Ernte wurde nach einer weiteren Kultivierungszeit von 24 Stunden durchgeführt (siehe Kapitel 3.3.2 und 3.3.3). Die strukturelle Auswertung erfolgte anhand Normal-Giemsa-gefärbter Präparate. Die Teilungskinetik der Zellen wurde damit nicht berücksichtigt.

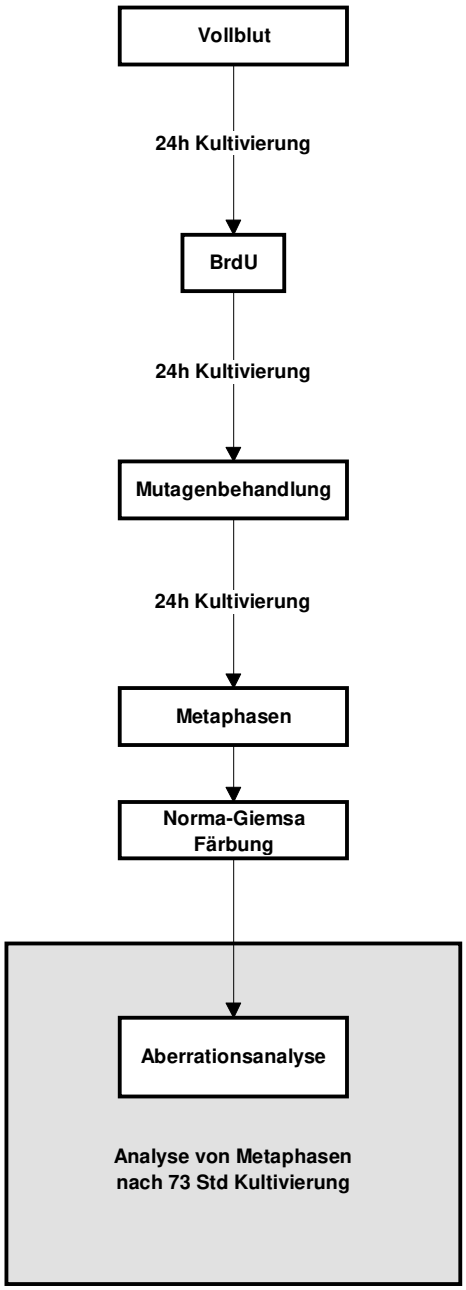


Abb. 3.9
Schematische Übersicht über den Versuchsablauf von der Blutentnahme, über die Mutagenbehandlung bis zur Aberrationsanalyse von Metaphasen nach 73 Stunden-Kultivierung

3.8 METHODEN ZUR *IN SITU* -HYDRIDISIERUNG

3.8.1 DNA-ISOLATION AUS CHO-ZELLEN

Die Beobachtungen, inwieweit chromosomenspezifische Painting-Sonden mit CHO-Chromosomen kreuzhybridisieren, divergieren (Evans *et al.*, 1991; Pandita *et al.*, 1994). Durch die Zugabe von competitiver, unmarkierter CHO-DNA zu dem Hybridisierungsansatz können mögliche Kreuzhybridisierungen supprimiert werden (Pandita *et al.*, 1994). Daher erfolgte zunächst eine DNA-Isolation aus CHO-Zellen. Dazu wurde die Salz-Chloroform-Extraktion modifiziert nach einer Methode von Müllenbach *et al.*, 1989 eingesetzt. Die CHO-DNA wurde anschließend mit einem Ultraschalldesintegrator (Sonoplus HD70, Bandelin Electronic) zur Fragmentierung beschallt.

Geräte, Materialien und Reagenzien:
Biofuge RS
Heizblock
50ml-Zentrifugenröhrchen
Eppendorf-Gefäße
SE-Puffer (75mM NaCl, 25mM EDTA, pH 8.0)
Proteinase K (Stammlösung: 10mg/ml A.dest)
Chloroform
Isopropanol
70% ETOH
TE-Puffer (1xTE: 10mM Trizma Base, 1mM EDTA¸ pH 7,0)

Durchführung:
Die Zellen wurden in 5ml SE-Puffer aufgenommen und resuspendiert; es wurde 200µg/ml Proteinase K zugegeben. Der Ansatz wurde bei 55°C ü.N. inkubiert (Lyse der Zellen und Proteinverdau). Danach wurde 1,8ml vorgewämte 6M NaCl zugegeben (Endkonzentration 1,5M) und vorsichtig gemischt. Nach der Zugabe von 1 Vol. Chloroform, wurde 60min vorsichtig gemischt. Zur Phasentrennung wurde 10 min bei 1800 rpm (Biofuge 17RS, Sepatech Heraeus) zentrifugiert, der Überstand vorsichtig mit einer 5ml-Pipettenspitze in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Zur DNA-Präzipation wurde 1 Vol. Isopropanol zugesetzt und das Röhrchen bei Raumtemperatur leicht geschwenkt. Anschließend wurde der DNA-Faden mit einem sterilem Glashaken (abgeflammte Pasteurpipette) entnommen und in ein mit 70% EtOH gefülltes Eppendorff-Gefäß überführt. Das Ethanol wurde anschließend abpipettiert und das Pellet im Heizblock bei 65°C getrocknet. Anschließend wurde die DNA in ca. 30 µl TE-Puffer aufgenommen und bei 37°C gelöst. Die Konzentration der isolierten DNA wurde durch Gelelektrophorese bestimmt (siehe Kapitel 3.8.2.2). Die DNA wurde bei –20°C aufbewahrt.

3.8.2 DNA-SONDE UND MARKIERUNG

3.8.2.1 PLASMIDISOLATION

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde eine pBS-Plasmidgenbank von J. Gray, San Francisco der Universität Kaiserslautern zur Verfügung gestellt. Eingesetzt wurde die Genbank des humanen Chromosoms 4. Die Isolation der Plasmid-DNA aus E. coli DH5α erfolgte im Midiprep-Maßstab nach Kaul und Scherthan, 1990. Die Plasmidisolation wurde in einem L2-Sicherheits-Labor durchgeführt.

Geräte, Materialien und Reagenzien:
LB-Medium (10g Pepton, 5g Hefeextrakt, 10g NaCl/ 1000ml a. dest.; pH 7,5),
Ampicillin (Stammlösung: 0,025mg/ml)
Puffer 1 (60mM Trizma Base, 60mM EDTA, 10% Sucrose
Puffer 2 (20% Triton-X-100, 10mg/ml Lysozym)
RNase-Stammlösung (10mg/ml TE-Puffer)
Phenol
Chloroform
5M NaCl
Isopropanol
70% Ethanol
TE-Puffer (1xTE: 10mM Trizma Base, 1mM EDTA¸ pH 7,0)
50ml-Zentrifugenröhrchen
Eppendorf-Reaktionsgefäße
Heizblock

Durchführung:

Zunächst wurden 100 ml LB-Medium autoklaviert; nach Abkühlen wurde das Medium mit Ampicillin (Endkonzentration 50 µg/ ml) supplementiert. Anschließend wurden 100 ml LB-Medium mit 50 µl einer Bakterien-Glycerinkultur inokuliert und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde danach auf zwei 50 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt; es wurde 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen (autoklaviert!) und das Pellet in je 2 ml Puffer 1 gelöst. Danach wurde je 1 ml davon in ein Eppendorf-Tube überführt, 200 µl frisch angesetzter Puffer 2 zugesetzt, kurz und vorsichtig gemischt und das Eppendorf-Gefäß 5 Minuten auf den Eisblock gestellt (-20°C). Anschließend wurde 45 sek bei 98°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Das Zelldebris wurde durch 30-minütiges Zentrifugieren bei 12000 rpm (Biofuge 17 RS, Heraeus Sepatech) sedimentiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Danach wurde RNase zugesetzt (Endkonzentration 100µg/ml) und 15 min bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Die Lösung wurde mit 1 Vol Phenol versetzt, 3 min gemischt und 3 min in einer Eppendorfzentrifuge (HERMLE Z230 M, speed high) zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein Eppendorfgefäß überführt. Danach wurden 1 Vol Chloroform und 1/20 Vol 5M NaCl zugesetzt, 3 min gemischt und 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und in neues Eppendorf-Tube überführt. Anschließend wurde 1 Vol Isopropanol zugegeben und mindestens 30 min bei –20°C gefällt. Es wurde erneut für 30 min bei 12000 rpm (Biofuge 17 RS, Heraeus Sepatech) und 4°C zentrifugiert, der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 70% igem Ethanol überschichtet. Danach wurde das Ethanol vorsichtig abpipettiert und das Pellet bei 65°C im Heizblock getrocknet. Das Pellet wurde in 20 µl 10x TE-Puffer aufgenommen und für etwa 30 min bei 37°C gelöst. Danach erfolgte die gelelektrophoretische Konzentrationsbestimmung. Das Pellet wurde bei -20°C aufbewahrt.

3.8.2.2 FLACHBETT-AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Die DNA-Sonde wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (nach Maniatis *et al.*, 1982), um die DNA-Konzentration und die ungefähre Fragmentlänge zu bestimmen.

Geräte, Reagenzien:

Agarose
TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat; pH 8,0; 10 mM EDTA)
Ethidiumbromid
Lambda-DNA, Hind III verdaut
2xLoading Puffer
Gelektrophoresekammer und Spannungsgeber
UV-Transilluminator

Durchführung:

Dazu wurde ein 1% Agarose-Minigel eingesetzt (Elektrophoresepuffer: 1x TAE). Es wurden 1µl Plasmid-DNA mit 1µl Lade-Puffer gemischt und in die Geltaschen eingebracht. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80V und einer Laufzeit von 30 min. Die DNA-Konzentrationen und Fragmentlängen wurden nach einer 15-minütigen Färbung in einer Ethidiumbromid-Lösung (2 µg/ml TAE) anhand eines mitgeführten Standards (Lambda Hind III, Konzentration 0,5 µg/ml) auf dem UV-Transilluminator bestimmt.

3.8.2.3 NICK-TRANSLATION

Die Methode der Nick-Translation beruht auf der Aktivität von zwei Enzymen: Durch die DNase I werden Einzelstrangschnitte in der DNA („nicks“) erzeugt. Durch die gleichzeitige Exonuklease- und Polymerase-Aktivität der Polymerase I werden Nukleotide abgebaut und gleichzeitig wird ein, unter Einbau des Biotin-markierten Nukleotids, neuer DNA-Strang synthetisiert (Rigby *et al.,* 1977).

Geräte und Reagenzien:

Heizblock
Biofuge RS
Nick Translations Kit
humane Cot1-DNA (1µg/µl)
Heringsperma-DNA (10µg/ml)

Zusammensetzung des Nick-Translationsansatzes:

5µl Bio dNTPs
1µg/ µl DNA
y µl a. dest.
5,5 µl Enzym-Gemisch (DNase I, Polymerase I)
ad 50 µl Gesamtvolumen
Stoppuffer (300mM EDTA, pH 8.0)
ETOH

Herstellung des Hybridisierungsgemisches:

Pellet wird in 10 µl Formamid (50% v/v) und 10 µl Mastermix gelöst
Mastermix: 200 µl Dextransulfat (0,2 g Dextransulfat + 0,2 ml Ampuwa = 50% w/v) + 200 µl 20xSSC + 800 µl Ampuwa

Durchführung:

Der Nick Translationsansatz wurde wie beschrieben zusammenpipettiert und für 90 min bei 16°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5µl Stoppuffer abstoppt. Anschließend erfolgte die Fällung des Ansatzes durch Zugabe von 3 Vol EtOH abs. Es wurden 1µl gescherte Heringssperma-DNA (10µg/µl) und 10µl humane Cot-1-DNA (1µg/µl) zugegeben. Neben chromosomenspezifischen single copy Sequenzen enthält eine Genbank einen großen Anteil hochrepetitiver Sequenzen. Für ein erfolgreiches *Chromosome painting* ist die Suppression repetitiver Sequenzen wichtig. Dies kann durch den Einsatz von Cot-1-DNA erreicht werden.. Zu Vergleichszwecken wurden Hybridisierungsansätze mit und ohne Zusatz von CHO-DNA hergestellt. Die Ansätze wurden bei –20°C für mindestens 30 min inkubiert. Anschließend wurde für 30 min bei 12000 rpm und 4°C (Biofuge 17 RS, Heraeus Sepatech) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 70% EtOH gewaschen. Nach Entfernung des EtOH wurde das Pellet bei 65°C im Heizblock getrocknet und anschließend in 20µl Mastermix gelöst.

3.8.3 DENATURIERUNG UND HYBRIDISIERUNG

Die durch Plasmidisolation (siehe Kapitel 3.8.2.1) gewonnene und mit Nick-Translation (siehe Kapitel 3.8.2.3) markierte DNA-Sonde für Chromosom 4 wurde zunächst vor ihrem Einsatz auf Spezifität getestet. Dazu wurden die Sonde auf Metaphasechromosomen einer weiblichen Person mit unauffälligem Karyotyp hybridisiert. Die Präparation der Objektträger für FISH-Experimente erfolgte jeweils am Tag des Hybridisierungsansatzes. Die Denaturierung und Hybridisierung erfolgte dabei nach folgenden Schritten: Unter der Phasenkontrasteinrichtung des Lichtmikroskops wurden zunächst Stellen auf dem Objektträger gesucht, wo gehäuft PCCs auftraten. Es war darauf geachtet worden, daß

die PCCs möglichst gut gespreitet und frei von Cytoplasmaresten waren und dunkel aussahen.

Geräte, Materialien und Reagenzien:

Deckgläser
Fixogum
Objektträger
Heizblock
Lichtmikroskop
Brutschrank
Trockene Kammer

Durchführung:

Je nach Größe der ausgewählten Stellen wurde 1 bis 2,5µl Hybridisierungsmix aufgetragen, mit einem zurechtgeschnittenen Deckglas luftblasenfrei verschlossen und mit Fixogum versiegelt. Nach dem Trocknen des Fixogums wurden die Objektträger auf den Heizblock gelegt (simultane Denaturierung bei 78°C für 3,5 min). Anschließend erfolgte die Hybridisierung für 5 bis 7 Tage in einer trockenen Kammer bei 37°C im Brutschrank.

3.8.4 WASCHSCHRITTE UND DETEKTION

Geräte, Materialien und Reagenzien:

0,05xSSC (Stammlösung 20x: 3M NaCl, 0.3M Na_3Citrat pH 7.0)
Rinderserumalbumin (BSA)
BT-Puffer (0,15M $NaHCO_3$, 0,6mM Natriumcitrat, 0,1%(v/v) Tween20
ExtrAvidin-FITC
Bio-Anti-Avidin
Vectashield
DAPI-Lösung (1mg/ml)
Fluoreszenzmikroskop
Deckgläser (24mm x 60mm)

Durchführung:

Das Fixogum wurde von den Objektträgern mit einer Pinzette entfernt, anschließend wurde das Präparat in 0,05X SSC (42°C) eingestellt und das Deckglas durch Abschwimmenlassen entfernt und die Objektträger 3x 5min bei 42°C in 0,05x SSC gewaschen. Anschließend wurden die Objektträger (OT) in Rinderserumalbumin (BSA, etwa 1g in 50 ml BT-Puffer gelöst) für 10 min bei 37°C inkubiert. Die OTs überschichtete man nach kurzem Abtropfen mit 100 µl ExtrAvidin-FITC (1:250 in BT-Puffer). Sodann wurde jeweils ein Deckglas (DG; 24x60mm) luftblasenfrei aufgelegt und die Präparate für 90 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach ließ man das jeweilige DG abrutschen und die OTs wurden 3 x 5 min bei 37°C in BT-Puffer gewaschen. Die OTs wurden mit 100 µl einer biotinylierten Anti-Avidin (1:500 in BT-Puffer) bedeckt und auf jeden OT ein DG (24x60mm) luftblasenfrei aufgelegt. Danach erfolgte eine Inkubation für 45 min bei 37°C im Brutschrank. Es wurde erneut 3 x 5 min bei 37°C in BT-Puffer gewaschen. Die OTs wurden mit 100µl einer ExtrAvidin-FITC (1:250 in BT-Puffer) überschichtet, DGs (24x60mm) luftblasenfrei aufgelegt und bei 37°C für 45 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die OTs noch einmal 3x5min bei 37°C in BT-Puffer gewaschen. Anschließend ließ man die OTs abtropfen und trug 20µl Vectashield (+1µl DAPI-Lösung/ml Vectashield) pro OT auf.

3.8.5 AUSWERTUNG DER FISH-PRÄPATATE

Die FISH-Präparate wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Fa. Zeiss) ausgewertet, das mit Single Band Pass Filtern (Chroma Technologies) für die Anregung von FITC und DAPI ausgerüstet war. Die Signale der beiden

Farbstoffe wurden nacheinander mit einer gekühlten CCD (charged coupled device) Kamera (Hamamatsu) aufgenommen. Die Längenmessungen des Hybridisierungssignals des vorzeitig kondensierten Chromosoms 4 bzw. Metaphase-Chromosom 4 erfolgte computerunterstützt mit dem Programm ISIS (MetaSystems). Es wurden pro G_0-PCC-Spreitung jeweils beide Homologen ausgemessen. Pro Konzentration wurden zwischen 12 und 55 G_0-PCC-Längen ausgemessen. Für die Längenmessungen wurden die Crotonaldehyd-Konzentrationen 240µM und 480µM ausgewählt. Zu Kontrollzwecken wurden Längenmessungen bei G_0-PCCs (und Metaphasen) unbehandelter Zellen durchgeführt. Danach wurden die Bilder von ISIS ins TIF-Format exportiert und anschließend als Photoshop Dateien angelegt.

3.9 STATISTISCHE METHODEN

3.9.1 VORBEMERKUNGEN ZUR STATISTIK

Bei der Beantwortung der Frage, ob nachgewiesene Unterschiede zwischen den Ergebnissen zufällig sind oder nicht, kann die statistische Auswertung hilfreich sein. Sie läßt von Stichproben auf allgemeine Gesetzmäßigkeiten schließen, die über den beobachteten Rahmen hinausgehen und basiert auf mathematischen Modellen zur Beschreibung zufallsbedingter Ereignisse. Ein wesentlicher Grundpfeiler dieser Methoden ist die Normalverteilung F(x). Hierbei ergeben sich die Werte von F(x) als Fläche unter der Kurve:

$$f(x \mid \mu,\sigma) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}, (-\infty < x < \infty, -\infty < \mu < \infty, \sigma > 0),$$

Da es unendlich viele Mittelwerte µ und Standardabweichungen σ gibt erhält man unendlich viele Normalverteilungen. Man definiert daher eine Standardnormalverteilung mit dem Mittelwert µ=0 und der Standardabweichung σ=1. Man erhält sodann die Kurve der Standardnormalverteilung:

$$f(z) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{z^2}{2}}, (-\infty < z < \infty),$$

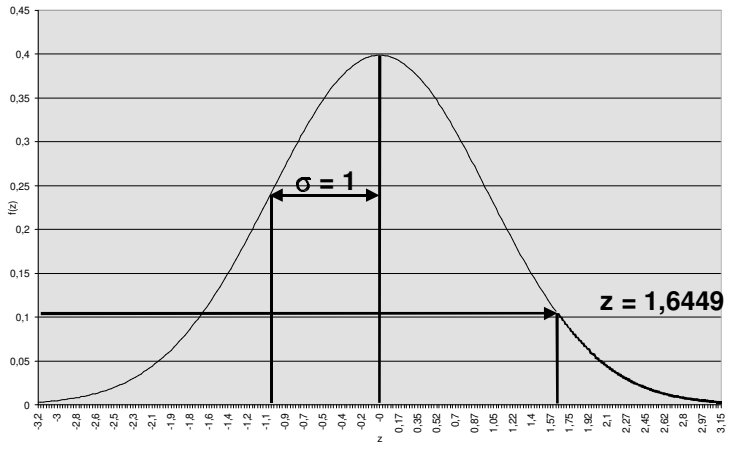


Abb. 3.10 Kurve der Standardnormalverteilung mit σ = 1 und µ = 0

Die gesamte Fläche F(z) unter der Kurve f(z) im Bereich von - ∞ bis + ∞ erhält dadurch den Wert 1. Ordnet man nun jeder Teilfläche in % der gesamten Fläche die dazugehörigen z zu, so erhält man eine Tabelle für P (P = die Wahrscheinlichkeit für das Eintreffen eines Ereignisses X innerhalb eines Wertebereiches von -∞ bis z). Da die gesamte Fläche im Bereich von - ∞ bis + ∞

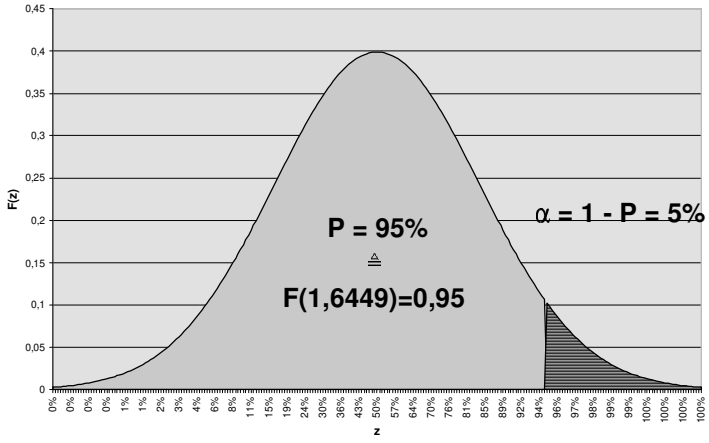


Abb. 3.11 Wahrscheinlichkeit P und Irrtumswahrscheinlichkeit α

gleich 1 ist ergibt sich die Wahrscheinlichkeit α, für das Nicht-Eintreffen eines Ereignisses X innerhalb eines Wertebereiches von -∞ bis z durch die Beziehung α = 1 – P. So ergibt sich für z = 1,6449 P mit 95% und α mit 5%, für z = 2,3263 erhält man P = 99% und α = 1% und für z = 3,0902 weist die Tabelle die Wahrscheinlichkeit P mit 99,9% und α mit 0,1% aus. Man bezeichnet α auch als Irrtumswahrscheinlichkeit. Aussagen über Sachverhalte werden daher meistens zusätzlich qualifiziert, indem man mit angibt, auf welche Irrtumswahrscheinlichkeit man die Aussage getestet hat.

3.9.2 TESTVERFAHREN DER BEURTEILENDEN STATISTIK

Alle Testverfahren beruhen darauf, daß man eine Alternativhypothese H_A – z.B. die Aussage „zwischen den Stichproben bestehen nicht nur zufallsbedingte Unterschiede“ – durch Widerlegen der dazugehörigen Gegenhypothese H_0 – „es bestehen nur zufallsbedingte Unterschiede zwischen den Stichproben“, indirekt zu beweisen sucht. Man nennt H_0 daher auch Nullhypothese. Dabei werden testspezifische Prüfgrößen errechnet und mit einem Wert aus einer ebenfalls testspezifischen Tabelle verglichen. Der abzulesende Tabellenwert hängt davon ab, mit welcher Irrtumswahrscheinlichkeit eine Nullhypothese abgelehnt werden soll. Dabei werden häufig für die Irrtumswahrscheinlichkeiten α = 5% der Begriff „schwach signifikant“ verwendet, für α = 1% die Bezeichnung „signifikant“ gewählt und der Begriff „hoch signifikant“ für α = 0,1% benutzt. Man spricht daher auch von Signifikanzschranken.

Da P = 1 - α gilt, folgt:

0,05	≥ p >	0,01	als	„schwach signifikant“	[*]
0,01	≥ p >	0,001	als	„signifikant“	[**]
0,001	≥ p >	0	als	„hoch signifikant“	[***]

War die errechnete Prüfzahl größer als der dazugehörige Tabellenwert, dann wurde die Nullhypothese abgelehnt. Hierbei ist der p-Wert die

Wahrscheinlichkeit, mit der man sich irrt, wenn man die Nullhypothese H_0 fälschlicherweise ablehnt. Die verwendeten Tabellen beruhen auf bestimmten Prüfverteilungen. Die wichtigsten sind die F-Verteilung, die Student t-Verteilung und die χ^2-Verteilung.

3.9.3 DER χ^2-TEST WIRD VERWENDET

Die Mittelwerte zweier Stichproben lassen sich mit dem T-Test vergleichen, direkte Häufigkeitsdaten jedoch mit dem χ^2-Test beurteilen (Stevens, 1946 in: Sachs, 1996). Notwendige Vorraussetzung für die Anwendung des T-Test ist die Gleicheit der Varianzen der vorliegenden Stichprobenumfänge. Da diese Gleicheit nach Prüfung mit Hilfe des F-Test i.d.R. nicht vorlag, wurde zur Beurteilung der gewonnen Daten der χ^2-Test verwendet, da hier eine Varianzengleichheit nicht verlangt wird. Darüber hinaus sind bei kleinen Stichprobenumfängen parametrische Prüfverfahren wie der T-Test oft schwächer, als verteilungsunabhängige Methoden wie z.B. der χ^2-Test (Sachs, 1996). Wenn s^2 die Varianz einer Stichprobe ist mit dem Umfang n und diese Stichprobe einer Grundgesamtheit mit der Varianz σ^2 entstammt, dann ergibt sich χ^2 als Quotient des Produktes aus der Varianz S^2 mit dem Freiheitsgrad $\nu = n-1$ geteilt durch die Varianz σ^2 der Grundgesamtheit. Die χ^2 Verteilung ist eine stetige unsymmetrische Verteilung, die sich von 0 bis ∞ erstreckt. Ihre Form hängt nur vom Freiheitsgrad ν ab. Sie dient dazu zu prüfen, ob zwischen beobachteten und theoretischen Varianzen bzw. Verteilungen Übereinstimmung besteht oder nicht. Der χ^2-Test wird für qualitative Daten angewandt. Ordnet man die Meßergebnisse nach den 2 Merkmalen M1 (r Stichproben) bzw. M2 (c Ereignisse) so ergibt sich eine r·c-Tafel, anhand derer man überprüfen kann, ob die r Stichproben nur zufällig von einander abweichen, also zu einer gemeinsamen Grundgesamtheit gehören. Um dies feststellen zu können

$$\chi^2 = \frac{(n-1)S^2}{\sigma^2}$$

r·c-Tafel		2. Merkmal M2 (j = 1 bis c Spalten)						Zeilen-summe
		1	2	-	j	-	c	
1. Merkmal M1 (i = 1 bis r Zeilen)	1	n_{11}	n_{12}	-	n_{1j}	-	n_{1c}	$\sum n_{11 \blacktriangleright 1c}$
	2	n_{21}	n_{22}	-	n_{2j}	-	n_{2c}	$\sum n_{21 \blacktriangleright 2c}$
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	i	n_{i1}	n_{i2}	-	n_{ij}	-	n_{ic}	$\sum n_{i1 \blacktriangleright ic}$
	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-
	r	n_{r1}	n_{r2}	-	n_{rj}	-	n_{rc}	$\sum n_{r1 \blacktriangleright rc}$
Spalten-summe		$\sum n_{11 \blacktriangleright r1}$	$\sum n_{12 \blacktriangleright r2}$	-	$\sum n_{1j \blacktriangleright rj}$	-	$\sum n_{1c \blacktriangleright rc}$	$n=\sum n_{11 \blacktriangleright rc}$

bildet man für jedes Element n_{ij} eine sogenannte Erwartungshäufigkeit E_{ij}. Danach quadriert man für jedes Element n_{ij} die Differenz zwischen dem Element n_{ij} und der Erwartungshäufigkeit E_{ij} und teilt das Ergebnis nochmals durch die Erwartungshäufigkeit E_{ij}. Addiert

$$E_{ij} = \frac{\sum_{i=1}^{r} n_{i,j} \sum_{j=1}^{c} n_{i,j}}{\sum_{i=1}^{r} \sum_{j=1}^{c} n_{i,j}}$$

man alle so für jedes Element gebildeten Zwischengrößen, so erhält man eine Prüfgröße χ^2. Diese Prüfgröße vergleicht man mit dem χ^2-Tabellenwert, der zu der jeweiligen Signifikanzzschranke α und dem Freiheitsgrad $\nu=(r-1)(c-1)$ gehört. Ist die errechnete Prüfgröße größer als der Tabellenwert, dann ist die Nullhypothese abzulehnen, d.h. die Arbeitshypothese anzunehmen. Beispiel zum 4-Felder-χ^2-Test:

$$\hat{\chi}^2 = \sum_{i=1}^{r}\sum_{j=1}^{c}\left[\frac{\left(n_{i,j} - E_{i,j}\right)^2}{E_{i,j}}\right]$$

Zunächst wird die χ^2-Tabelle für den Freiheitgrad $\nu=1$ benötigt.

Irrtumswahrscheinlichkeit α	5%	1%	0,1%
Einseitiger Test	2,706	5,412	9,550
Zweiseitiger Test	3,841	6,635	10,828

Man gliedert die Meßdaten zweier Stichproben (Kontrolle, Mutagen) nach dem aufgetretenen Ereignis (z.B. Aberration) bzw. dem Komplementärereignis (keine Aberration), dann läßt sich die Nullhypothese H_o – die Aberrationshäufigkeit der mit einem Mutagen behandelten

Behandlung	Ereignisse z.B. Aberrationen	Komplementär Ereignisse	insgesamt
Kontrolle	3(a)	101(b)	104(n_1=a+b)
Mutagen	11(c)	87(d)	98(n_2=c+d)
insgesamt	14(a+c)	188(b+d)	202(n=n_1+n_2)

Zellen weicht nur zufällig ab von derjenigen der nicht behandelten Zellen - anhand des 4-Felder-χ^2-Test prüfen. Die Frage ist also, ob die Abweichung zwischen den Verhältnissen von

$$\frac{a}{n1} = \frac{3}{104} = 0{,}029 \text{ zu } \frac{c}{n2} = \frac{11}{98} = 0{,}112 \text{ zu } \frac{a+c}{n} = \frac{3+11}{202} = 0{,}069 \text{ bzw.}$$
$$\frac{b}{n1} = \frac{101}{104} = 0{,}971 \text{ zu } \frac{d}{n2} = \frac{87}{98} = 0{,}888 \text{ zu } \frac{b+d}{n} = \frac{101+87}{202} = 0{,}930$$

nur zufällig ist, d.h. daß beide Stichproben nur Repräsentant der gleichen gemeinsamen Grundgesamtheit mit der gleichen Anzahl an Aberrationsereignissen sind, d.h. die Nullhypothese also anzunehmen ist. Um dies testen zu können ist zuvor festzustellen, ob die Häufig-keiten der

$$E_a = \frac{(a+c)(a+b)}{n} = \frac{(3+11)(3+101)}{202} = \frac{14x104}{202} = 7{,}208$$
$$E_b = \frac{(b+d)(b+a)}{n} = \frac{(101+87)(101+3)}{202} = \frac{188x104}{202} = 96{,}792$$
$$E_c = \frac{(c+a)(c+d)}{n} = \frac{(11+3)(11+87)}{202} = \frac{14x98}{202} = 6{,}792; E$$
$$= \frac{(d+c)(d+b)}{n} = \frac{(87+11)(87+101)}{202} = \frac{98x188}{202} = 91{,}208$$
$$\hat{\chi}^2 = \frac{(a-E_a)^2}{E_a} + \frac{(b-E_b)^2}{E_b} + \frac{(c-E_c)^2}{E_c} + \frac{(d-E_d)^2}{E_d}$$
$$\hat{\chi}^2 = \frac{(3-7{,}208)^2}{7{,}208} + \frac{(101-96{,}792)^2}{96{,}792} + \frac{(11-6{,}792)^2}{6{,}792} + \frac{(87-91{,}208)^2}{91{,}208}$$
$$\hat{\chi}^2 = \frac{(-4{,}208)^2}{7{,}208} + \frac{(4{,}208)^2}{96{,}792} + \frac{(4{,}208)^2}{6{,}792} + \frac{(-4{,}208)^2}{91{,}208}$$
$$\hat{\chi}^2 = 2{,}457 + 0{,}183 + 2{,}607 + 0{,}194 = 5{,}441;$$

Felder a,b,c,d sich proportional zu den Randsummen a+c, b+d, a+b und c+d verhalten. Dies wird beurteilt durch Bildung der Erwartungshäufigkeiten E_a, E_b, E_c und E_d mit deren Hilfe die benötigte Prüfgröße errechnet wird. Da die Prüfgröße mit 5,441 nicht nur größer ist als $\chi^2_{5\%\ (einseitig)}$ mit 2,706, sondern auch größer als $\chi^2_{1\%\ (einseitig)}$ mit 5,412, wird die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 1% abgelehnt, d.h. es wird angenommen, daß die Erhöhung der Aberrationsereignisse das Ergebnis der Mutagenbehandlung ist.

Beispiel zum 3·2-Felder-χ^2-Test:

Man ordnet die Meßdaten wie folgt:

Stichprobe	+	-	gesamt
Kontrolle	58	35	93
Mutagen 1	11	25	36
Mutagen 2	10	23	33
gesamt	79	83	162

Die Erwartungshäufigkeiten sind zu bilden:

$$E_{1,1} = \frac{79*93}{162} = \frac{7347}{162} = 45;352; E_{1,2} = \frac{83*93}{162} = \frac{7719}{162} = 47,648$$
$$E_{2,1} = \frac{79*36}{162} = \frac{2844}{162} = 17,556; E_{2,2} = \frac{83*36}{162} = \frac{2988}{162} = 18,444$$
$$E_{3,1} = \frac{79*33}{162} = \frac{2607}{162} = 16,093; E_{3,2} = \frac{83*33}{162} = \frac{2739}{162} = 16,907$$

Die Prüfgröße ist zu berechnen:

$$\hat{\chi}^2 = \frac{(58-45,352)^2}{45,352} + \frac{(11-17,556)^2}{17,556} + \frac{(10-16,093)^2}{16,093}$$
$$+ \frac{(35-47,648)^2}{47,648} + \frac{(25-18,444)^2}{18,444} + \frac{(23-16,907)^2}{16,907}$$
$$= \frac{159,971}{45,352} + \frac{42,981}{17,556} + \frac{37,125}{16,093} + \frac{159,971}{47,648} + \frac{42,981}{18,444} + \frac{37,125}{16,907}$$
$$= 3,527 + 2,448 + 2,307 + 3,357 + 2,330 + 2,196 = 16,165$$

Der Vergleich der errechneten Prüfgröße mit der χ^2-Tabelle für den Freiheitgrad ν=2 ergibt, daß mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von

Irrtumswahrscheinlichkeit α	5%	1%	0,1%
Einseitiger Test	2,706	5,412	9,550

weniger als 0,1% die Nullhypothese widerlegt ist, d.h. die Stichproben differieren nicht nur zufällig (die Prüfgröße von 16,165 entspricht einer Signifikanzzschranke von 0,0308%).

4 ERGEBNISSE

4.1 BESTIMMUNG DER ZELLVIABILITÄT (TRYPANBLAU-FÄRBUNG)

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit der Trypanblau-Färbung und wurde gemäß einer Technischen Information der Firma Sigma durchgeführt. Die Untersuchungen ergaben, daß keine der eingesetzten Substanzkonzentrationen cytotoxisch wirkte. Eine Testsubstanz wurde dann als cytotoxisch eingestuft, falls sie die Viabilität der Zellen um 30% reduzierte (Elhajouji *et al.*, 1995; Renzi *et al.*, 1996).
In einer Versuchsreihe wurden zur PCC-Induktion CHO-Zellen eingesetzt, die zunächst eingefroren waren. Mit der Trypanblau-Färbung wurde festgestellt, daß das zweiwöchige Einfrieren der mitotischen Zellen den Anteil vitaler Zellen auf 93,1% reduzierte. Der Anteil lebender Zellen betrug vor dem Einfrieren 96,1%.

4.2 UNTERSUCHUNGEN α, β- UNGESÄTTIGTER ALDEHYDE

4.2.1 ANALYSE DER METAPHASE-CHROMOSOMEN

Für die beiden Vertreter der α,β-ungesättigten Aldehyde Crotonaldehyd und *trans*-2-Hexenal wurden Metaphasestudien aus 48h-Vollblutkulturen vorgenommen. Aus Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe lagen bereits Ergebnisse über die Auswirkung von α,β-ungesättigten Aldehyden auf cytogenetische Parameter (SCE-Rate, Mikrokern-Rate, Auftreten struktureller Aberrationen) bei Lymphozyten vor, die 48 Stunden nach Kulturbeginn mit α,β–ungesättigten Aldehyden behandelt worden waren. Zu Vergleichszwecken wurde daher ebenfalls eine Versuchsreihe angesetzt, bei der Vollblut 48 Stunden nach Kulturbeginn – zu einem Zeitpunkt also, wo erste Mitosen auftreten - mit Crotonaldehyd inkubiert und nach einer Gesamtkultivierungsdauer von 73 Stunden geerntet wurde.

4.2.1.1 BESTIMMUNG DES MITOSE-INDEX NACH INKUBATION MIT CROTONALDEHYD BZW. BLEOMYCIN

Die Bestimmung des Mitose-Index ist eine Methode, um die Proliferationsfähigkeit der untersuchten Zellen zu quantifizieren. Aus drei Zählungen pro Ansatz wurde jeweils der Mittelwert gebildet. Wie Abbildung 4.1 zeigt, ging nach Inkubation der Zellen in Crotonaldehyd sowohl in den 48h- als auch in den 73h-Vollblut-Kulturen der Mitose-Index deutlich zurück. In der Kontrolle der 48h-Kultur betrug der Mitose-Index 45 ‰ und nahm in der getesteten Höchstkonzentration (240µM) auf 8 ‰ ab. Bleomycin dagegen zeigte nur eine leichte Abnahme des Mitose-Index auf 42,3 ‰. In der 73h-Kultur sank der Mitose-Index von 81 ‰ in der Kontrolle bis auf 3 ‰ bei 480µM.

4.2.1.2 STRUKTURELLE CHROMOSOMENABERRATIONEN NACH BEHANDLUNG MIT CROTONALDEHYD

Die Untersuchungen von Crotonaldehyd sind in zwei Versuchsreihen gegliedert; in der ersten Versuchsreihe wurden die Metaphasen von Lymphozyten aus 48 h-Vollblutkulturen analysiert. Es wurden ausschließlich Metaphasen im ersten Teilungszyklus untersucht. Der Anteil an Metaphasen im ersten Teilungszyklus betrug in der Kontrolle K 80,6%, der Anteil an Metaphasen im

zweiten Teilungszyklus 19,4%; Mitosen im dritten Teilungszyklus wurden nicht beobachtet. Es wurden die Konzentrationsbereiche 60µM-240µM analysiert. Bei 240µM waren ausschließlich Mitosen im ersten Teilungzyklus zu finden. Bleomycin wurde als positive Kontrollsubstanz in den Konzentrationen 5µg/ml und 10µg/ml mitgeführt. Nach Mutagenapplikation von 5µg/ml Bleomycin waren 95% und von 10µg/ml Bleomycin 98% der untersuchten Metaphasen im ersten Teilungszyklus zu finden. Die übrigen Metaphasen durchliefen den zweiten Teilungszyklus.

In Abbildung 4.3 ist die Wirkung von Crotonaldehyd bzw. Bleomycin auf die Häufigkeit von strukturellen Chromosomenaberrationen bei Lymphozyten aus 48h-Vollblutkulturen dargestellt. Es trat eine konzentrationsabhängige Zunahme von aberranten Metaphasen auf, die ab der Crotonaldehyd-Konzentration von 60µM schwach signifikant, bei 240µM signifikant im Vergleich zur Kontrolle war. Bleomycin zeigte in einer Konzentration von 10µg/ml eine im Vergleich zur Kontrolle signifikante Erhöhung der Anzahl aberranter Metaphasen. Chromatidtyp-Aberrationen traten nach Inkubation mit Crotonaldehyd und Bleomycin deutlich häufiger auf als Chromosomentyp-Aberrationen. Bei den Metaphasen der Kontrollkultur ohne Mutagenbehandlung wurden nur Chromatidtyp-Aberrationen beobachtet. Zellen mit mehr als 1 Bruchereignis wurden allerdings nicht gefunden.

Abbildung 4.4 gibt die Wirkung von Crotonaldehyd und Bleomycin auf die Anzahl struktureller Chromosomenaberrationen bei Lymphozyten aus 73 h-Vollblutkulturen wieder. Die Metaphasen von Lymphozyten aus 73h-Kulturen wurden an Normal-Giemsa-gefärbten Präparaten ausgewertet, ohne daß eine Zykluszuordnung erfolgte. In den 73h-Kulturen induzierte Crotonaldehyd bei 300µM einen im Vergleich zur Kontrolle signifikanten Anstieg von aberranten Metaphasen. Bei einer Crotonaldehyd-Konzentration von 240 µM wurde zusätzlich in 2% der untersuchten Metaphasen das Auftreten von Pulverisierungsphänomenen beobachtet; diese Metaphasen wurden als aberrant gewertet. Chromatidtyp-Aberrationen wurden häufiger beobachtet als Aberrationen des Chromosomentyps. Bei einer Crotonaldehyd-Konzentration von 300µM traten Mitosen mit mehr als einem Bruchereignis pro Metaphase auf. Nach Behandlung mit dem als Positivkontrolle eingesetzten Bleomycin (20 µg/ml) wurde in 2% der untersuchten Metaphasen das Auftreten von 3 Brüchen pro Zelle, in 1% der Metaphasen das Auftreten von mehr als 3 Brüchen pro Zelle festgestellt. Bleomycin zeigte bei der 73h-Kultivierung eine hoch signifikante Zunahme der Anzahl aberranter Metaphasen. In der Kontrollkultur wurden keine Metaphasen mit Aberrationen beobachtet.

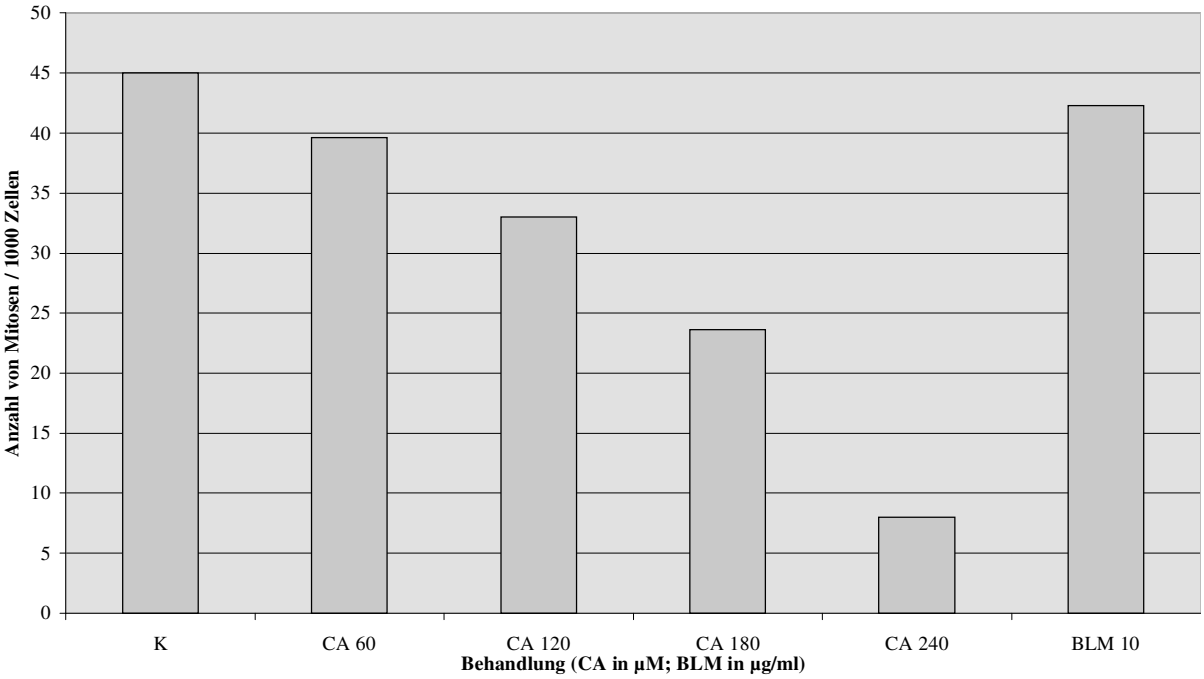


Abb. 4.1 Wirkung von Crotonaldehyd auf den Mitose-Index von Lymphozyten aus 48h-Vollblutkulturen, K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin.

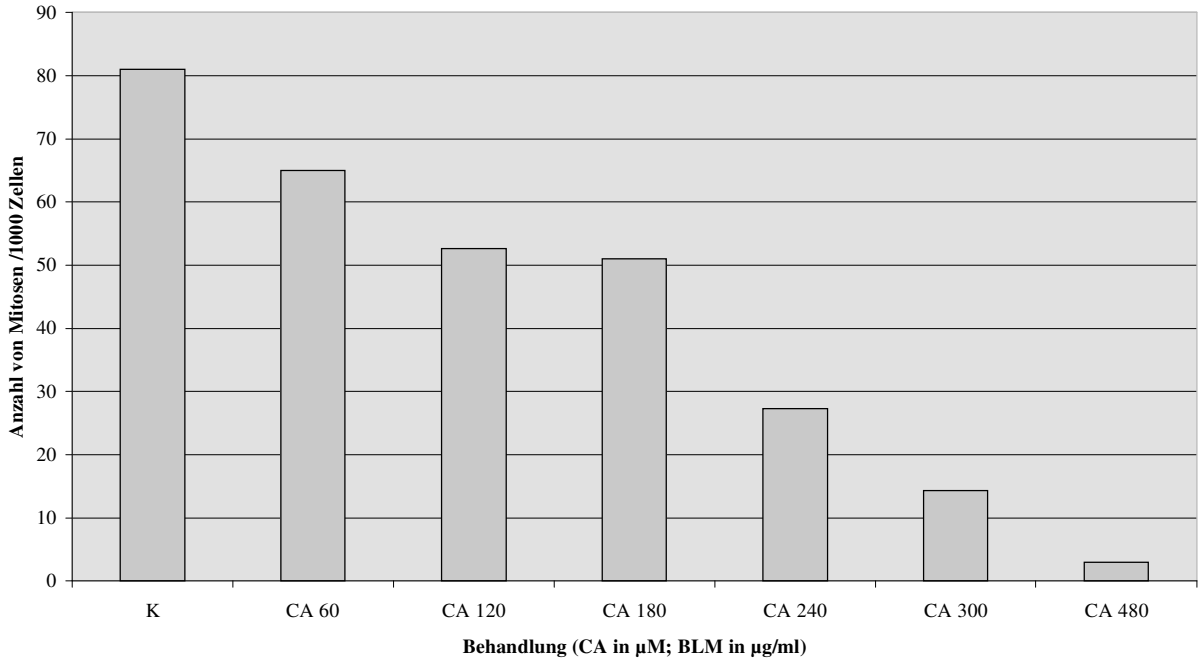


Abb. 4.2 Wirkung von Crotonaldehyd auf den Mitose-Index von Lymphozyten aus 73h-Vollblutkulturen, K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin.

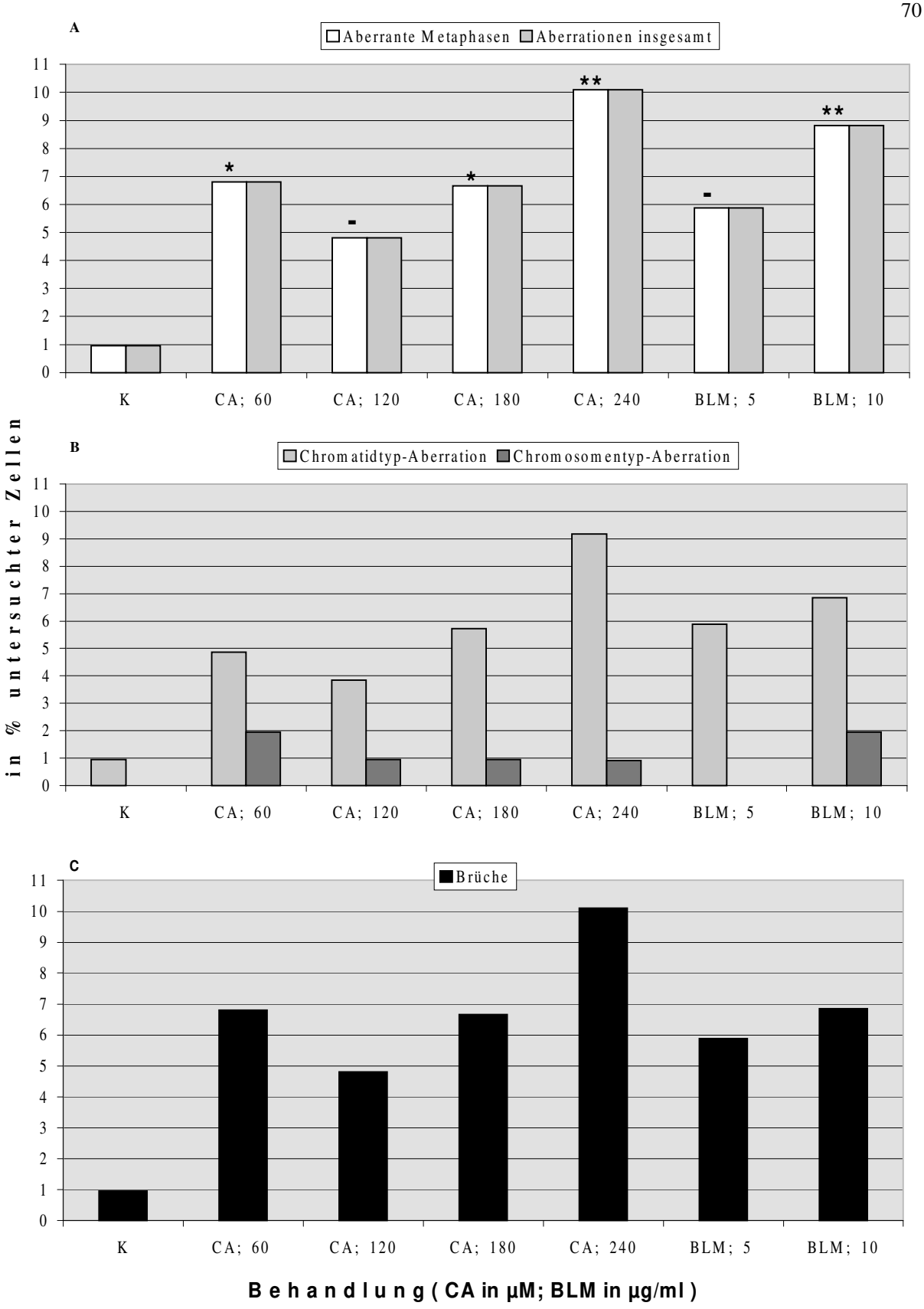


Abb. 4.3 A Vergleich der Häufigkeit aberranter Metaphasen und Aberrationen insgesamt

B Vergleich der Anzahl von Chromatidtyp- und Chromosomentyp-Aberrationen

C Anzahl von Bruchereignissen

nach Behandlung mit Crotonaldehyd und **48h–Vollblutkultivierung.** Positivkontrolle Bleomycin (5µg/ml und 10 µg/ml)

K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin

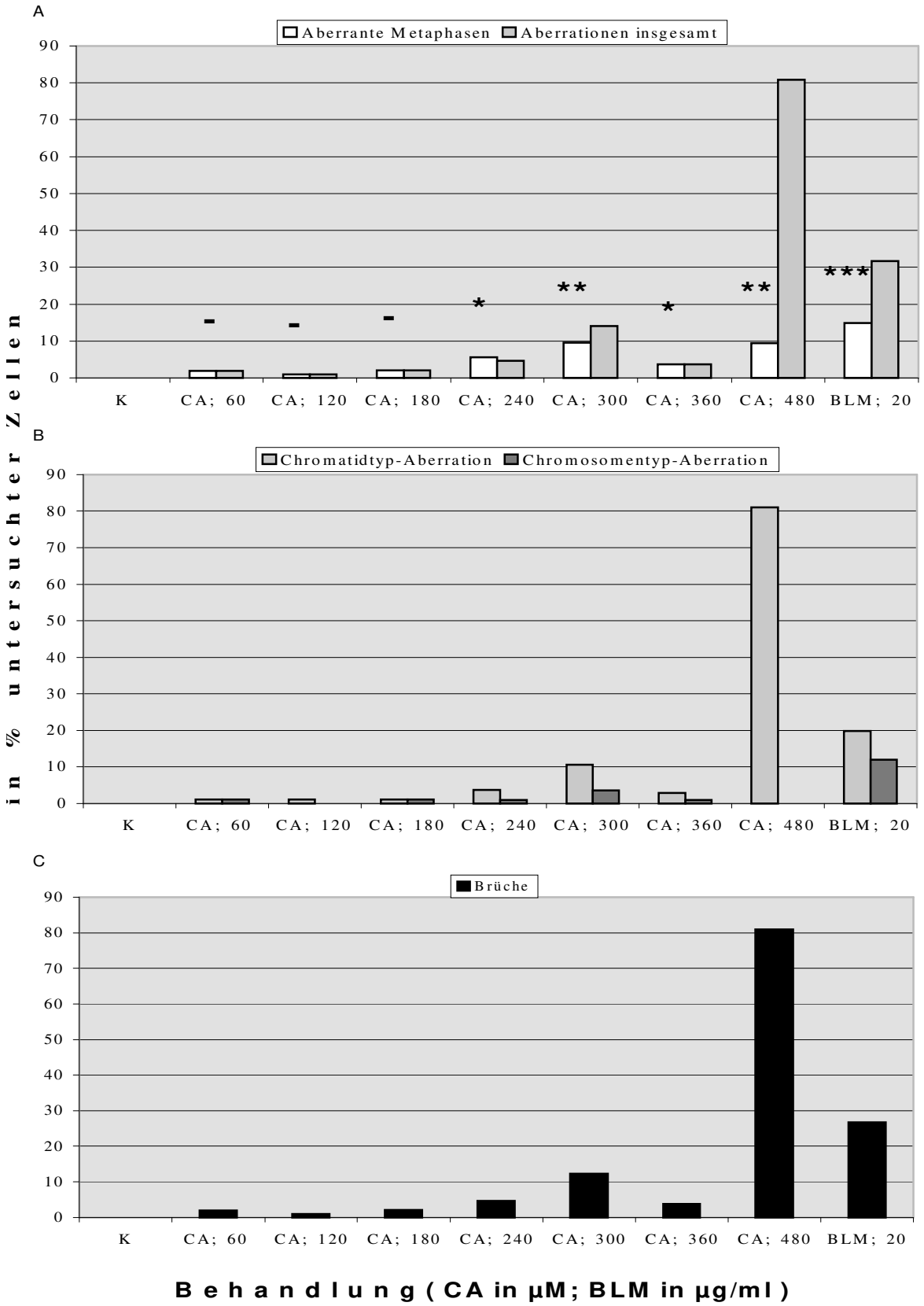


Abb. 4.4

A Vergleich der Häufigkeit aberranter Metaphasen und Aberrationen insgesamt

B Vergleich der Anzahl von Chromatidtyp- und Chromosomentyp-Aberrationen

C Anzahl von Bruchereignissen

nach Crotonaldehyd–Behandlung und **73h–Vollblutkultivierung.**

Positivkontrolle Bleomycin (20 µg/ml); K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin

4.2.1.3 BESTIMMUNG DES MITOSE-INDEX NACH INKUBATION MIT *TRANS*-2-HEXENAL

Die Inkubation mit *trans*-2-Hexenal bewirkte bei Lymphozyten einen dosisabhängigen deutlichen Rückgang der Anzahl von Mitosen pro 1000 Zellen von 43,3 ‰ in der DMSO-Kontrolle auf 5 ‰ bei 150µM (Abb. 4.5).

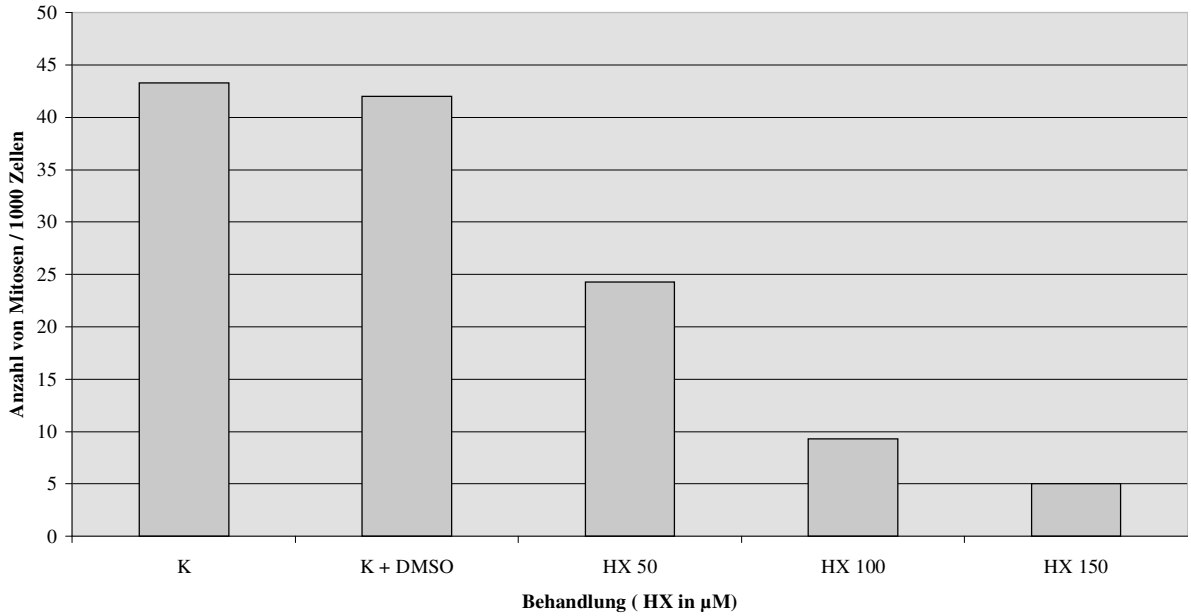


Abb. 4.5 Wirkung von *trans*-2-Hexenal auf den Mitose-Index bei Lymphozyten K=Kontrolle; K+DMSO = Kontrolle + Dimethylsulfoxid, HX = *trans*-2-Hexenal

4.2.1.4 STRUKTURELLE CHROMOSOMENABERRATIONEN NACH BEHANDLUNG MIT *TRANS*-2-HEXENAL

Nach *trans*-2-Hexenal-Behandlung war eine konzentrationsabhängige Zunahme der Metaphasen mit Aberrationen zu verzeichnen, die im Vergleich zur Kontrolle ab einer Konzentration von 100µM statistisch schwach signifikant war (Abb.4.6) Chromatidtyp-Aberrationen traten häufiger als Chromosomentyp-Aberrationen auf. Austauschereignisse waren nicht zu beobachten. Eine leichte Erhöhung an Metaphasen mit mehr als einem Bruchereignis war bei den höheren Konzentrationen festzustellen. Bei 100µM wurden in 0,9% der untersuchten Metaphasen 3 Bruchereignisse pro Metaphase gefunden.

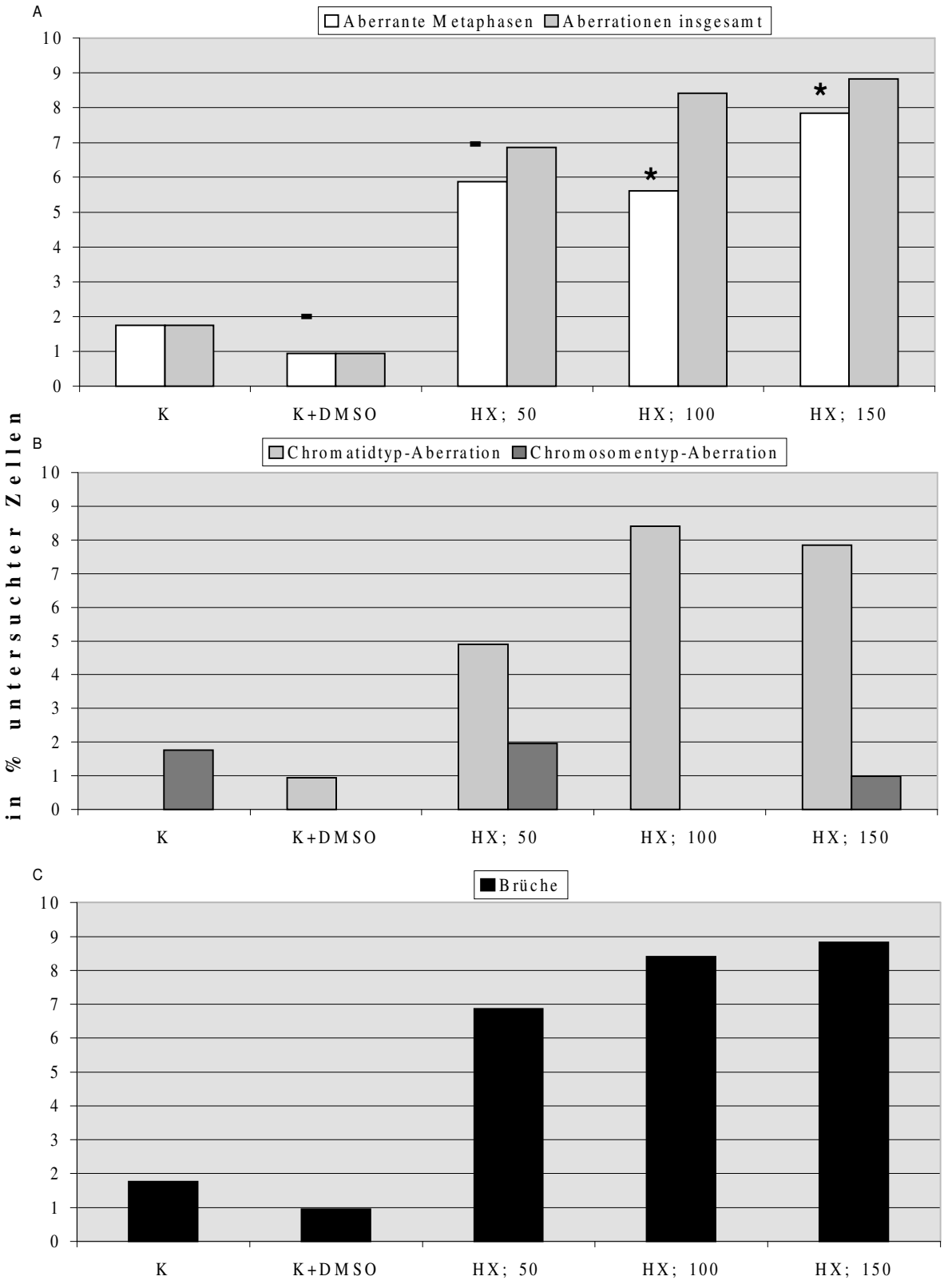


Abb. 4.6

A Vergleich der Häufigkeit aberranter Metaphasen und Aberrationen insgesamt

B Vergleich der Anzahl von Chromatidtyp- und Chromosomentyp-Aberrationen

C Anzahl von Bruchereignissen

nach Hexenal–Behandlung und anschließender 48h –Vollblutkultivierung.

Positivkontrolle Bleomycin, K = Kontrolle, K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, HX = *trans*-2- Hexenal

4.2.2 PCC-ANALYSEN

Die PCC-Analysen erfolgten an Lymphozyten in der G_0-Phase und exemplarisch für Crotonaldehyd bzw. NDELA auch an PHA-stimulierten Lymphozyten nach einer Kultivierung von 73 Stunden. Bei den G_0-PCCs wurde die Schädigung über das Auszählen der Chromatinelemente festgestellt. Alle G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen (PCC > 46) wurden als geschädigt bezeichnet. Parallel dazu wurden die G_0-PCCs gemäß ihrem Kondensationsgrad in 4 Kategorien eingeteilt. Nach einer 73h-Kultivierung und anschliessender PCC-Induktion wurde das Auftreten von PCCs in der $G_{0/1}$-, der S- und der G_2-Phase und von mitotischen Zellen beobachtet. Bei den 73h-Kulturen wurde untersucht, ob sich das Verteilungsmuster der PCCs auf die Zellzyklusphasen nach Behandlung mit α,β-ungesättigten Aldehyden änderte. Ergänzend dazu wurde das Auftreten von Aberrationen an mitotischen Chromosomen und an G_2-PCCs verglichen.

4.2.2.1 CHROMATINFRAGMENTE IN G_0-PCCS

4.2.2.1.1 CROTONALDEHYD-VERSUCHE

Die Behandlung mit Crotonaldehyd zeigte ab einer Konzentration von 180µM eine hoch signifikante Zunahme an geschädigten G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen. Die Konzentrationen von 60µM und 120µM wiesen im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Steigerung der Schädigungen auf (Abb. 4.7). Mit zunehmender Crotonaldehyd-Konzentration wurde eine Verschiebung der Anzahl von Zellen mit 1-4 Fragmenten zu Zellen mit 5-24 Fragmenten erkenn-bar (Abb.4.8). Bleomycin induzierte ebenfalls eine hoch signifikante Zunahme an geschädigten Zellen; hier wurde sogar in 5,6% der geschädigten Zellen das Auftreten von 25-54 zusätzlichen Fragmenten beobachtet. Während Bleomycin durchschnittlich 10,6 Fragmente pro geschädigte Zelle induzierte, wurden bei einer Crotonaldehyd-Konzentration von 240µM 3,4 Fragmente pro geschädigte Zelle beobachtet. Bei einer Crotonaldehyd-Konzentration von 240µM war im Vergleich zur Häufigkeit der geschädigten Zellen mit 15,8% in der Kontrolle ein Anstieg an geschädigten Zellen um das Dreifache (48,7%), durch Bleomycin sogar um etwa das Sechsfache (87,3%) zu verzeichnen. Ab einer Konzentration von 240µM wurden zunehmend Elongationen bei den PCCs festgestellt, die das Auszählen von Chromatinelementen erschwerten.

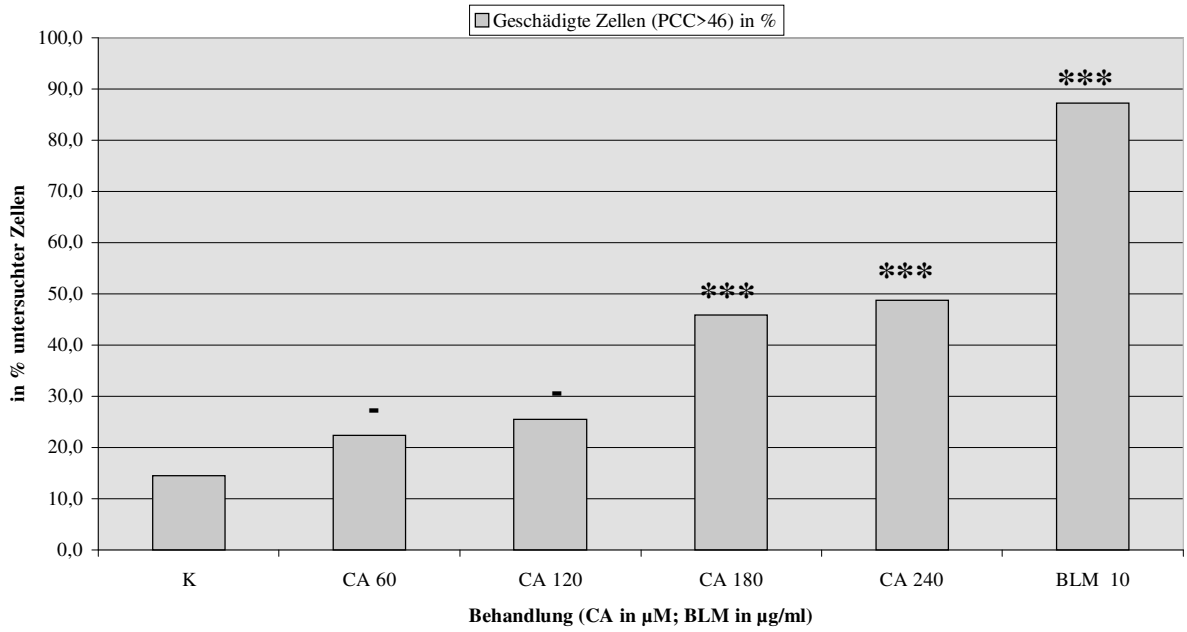


Abb.4.7 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen (PCC>46) nach Crotonaldehyd- bzw. Bleomycin-Einfluß
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0,05$),
** = signifikant ($p \leq 0,01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

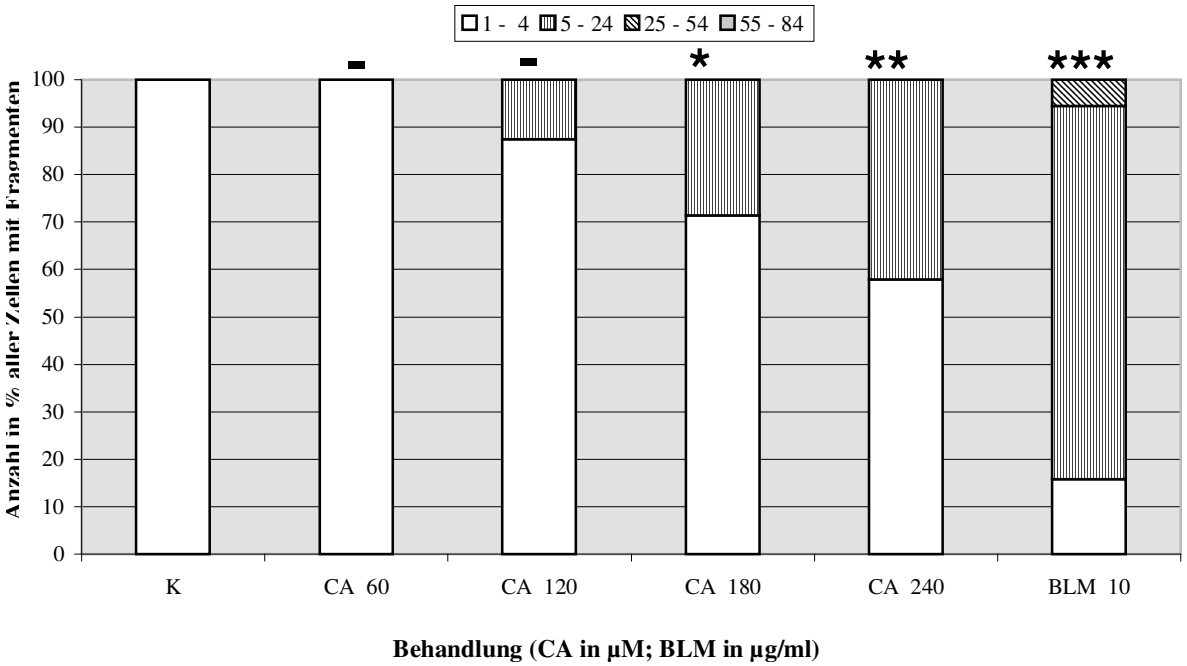


Abb. 4.8 Fragmentverteilung in geschädigten G_0-PCCs nach Crotonaldehyd- bzw. Bleomycin-Behandlung. K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0,05$),
** = signifikant ($p \leq 0,01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

Deshalb konnten bei einer Crotonaldehyd-Konzentration von 240 µM nur bei 39 PCCs die Anzahl der Chromatinelemente bestimmt werden. Abbildung 4.8 stellt die Verteilung der Fragmente in den geschädigten G_0-PCCs nach

Crotonaldehyd-Behandlung in den Konzentrationen von 60µM-240µM bzw. nach Bleomycin-Behandlung in der Konzentration von 10µg/ml dar. Ab einer Crotonaldehyd-Konzentration von 180µM war eine schwach signifikante Verschiebung der Fragmentzahl in den geschädigten Zellen zu höheren Häufigkeitsbereichen festzustellen.

4.2.2.1.2 *TRANS*-2-HEXENAL-VERSUCHE

Die Behandlung mit *trans*-2-Hexenal zeigte im Vergleich zur Kontrolle bei einer Konzentration von 50µM eine signikante, ab einer Konzentration von 100µM hoch signifikante Zunahme an G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, die 18,6% geschädigte Zellen aufwies, zeigten nach 100µM *trans*-2-Hexenal-Behandlung 60,4% der untersuchten Zellen eine Schädigung mit 6,7 Fragmenten pro geschädigter Zelle. Nach Bleomycin-Behandlung war in 84,9% der untersuchten Zellen eine Schädigung festzustellen; das Ausmaß der Schädigung erhöhte sich auf das circa sechsfache von 2 Fragmenten pro geschädigter Zelle in der Kontrolle auf 12,4 Fragmente pro geschädigter Zelle nach Bleomycin-Behandlung (Abb. 4.9). Abbildung 4.10 zeigt die Fragmentverteilung in G_0-PCCs nach Behandlung mit *trans*-2-Hexenal und Bleomycin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (K+DMSO). Ab einer *trans*-2-Hexenal Konzentration von 100µM ließ sich eine statistisch signifikante Verschiebung der Anzahl von Fragmenten in den geschädigten Zellen zu höheren Häufigkeitsbereichen beobachten.

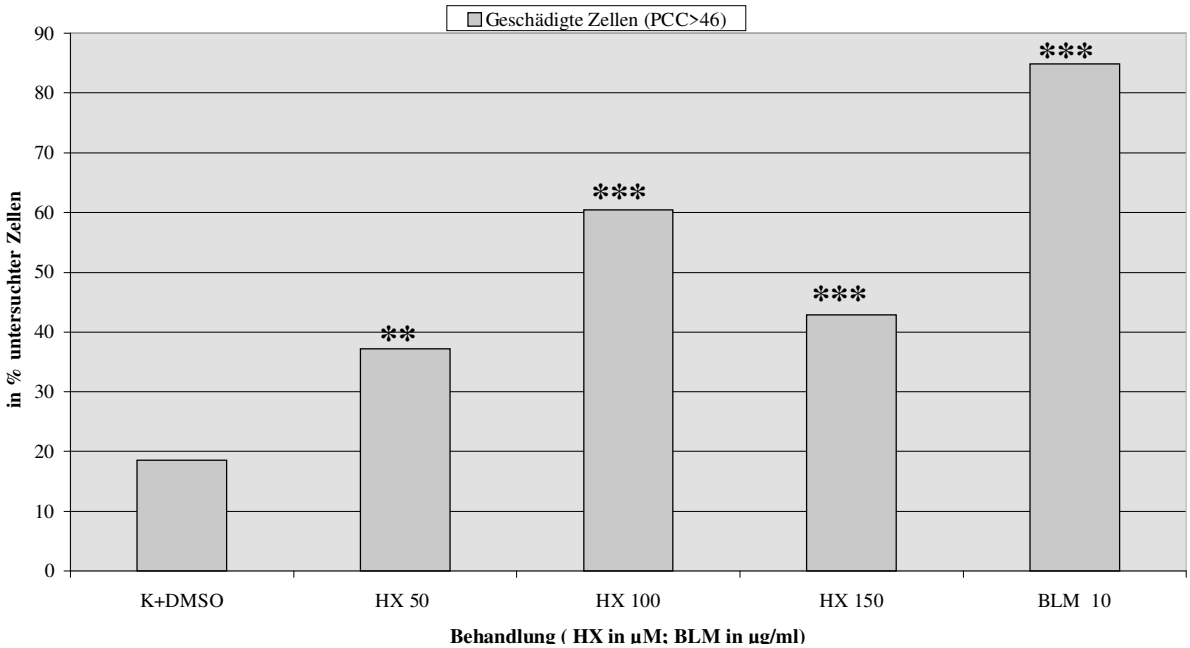


Abb. 4.9 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen (PCC>46) nach Hexenal-Behandlung. K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, HX = *trans*-2-Hexenal
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

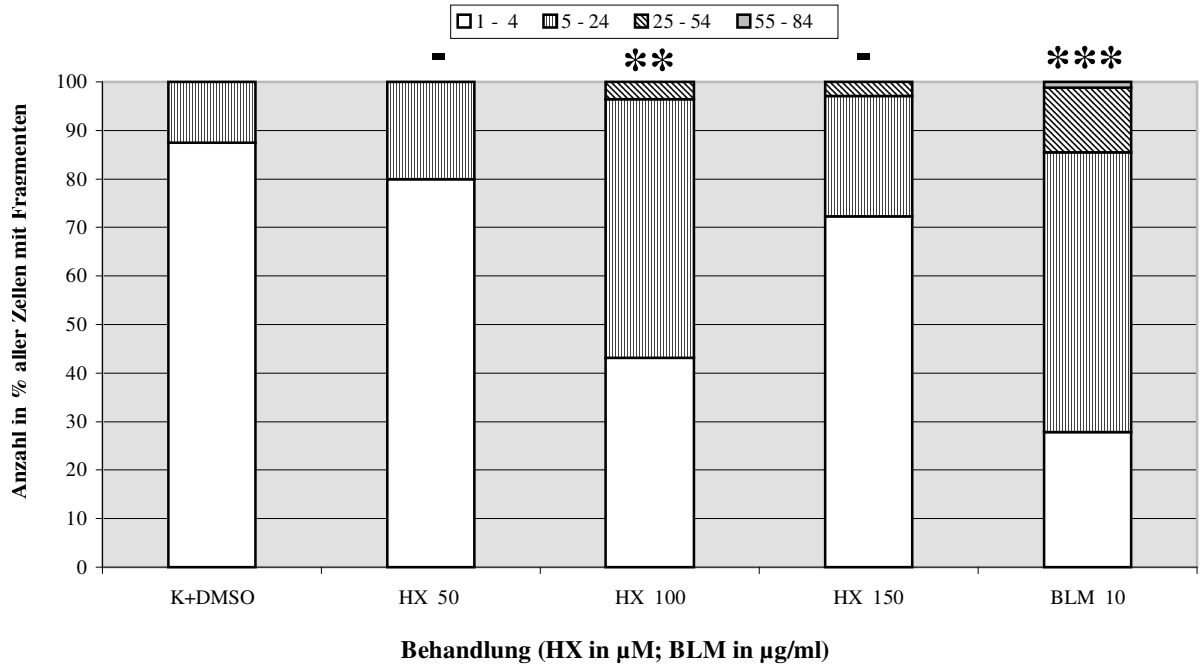


Abb. 4.10 Fragmentverteilung in geschädigten G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen. K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, HX = *trans*-2-Hexenal, BLM = Bleomycin
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.2.2.2 KONDENSATIONSSTADIEN DER G_0-PCCS

4.2.2.2.1 CROTONALDEHYD-VERSUCHE

Nach Behandlung mit α,β–ungesättigten Aldehyden ließ sich ein interessantes Phänomen beobachten. Die vorzeitig in der G_0-Phase kondensierten Chromosomen erschienen elongiert, d.h. im Vergleich zu den Kontrollen weniger kondensiert (Abb. 4.11).

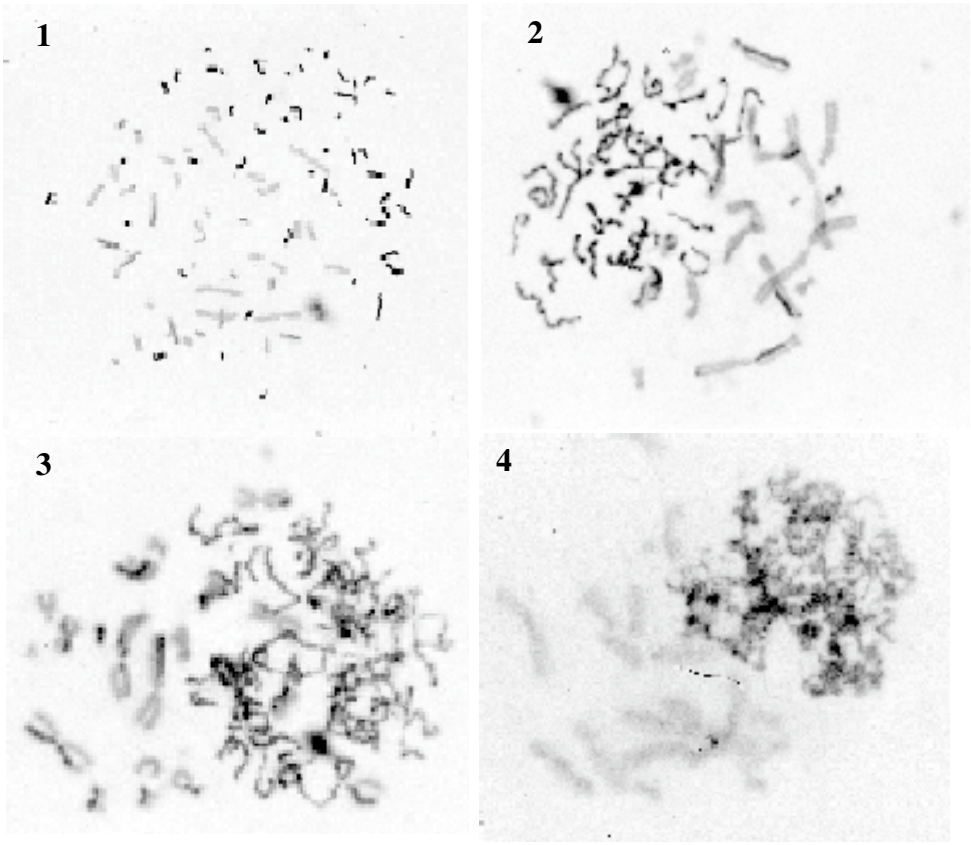


Abb. 4.11 Einteilung der G_0-PCCs in vier Kondensationsgrade (Kategorie 1-4) Nach der FPG-Färbung erscheinen die mitotischen CHO-Chromosomen aufgrund des BrdU-Einbaus während der DNA-Replikation hell, die G_0-PCC dunkel

Um das Phänomen zu quantifizieren, wurden alle G_0-PCCs in vier Längenstadien eingeteilt. Unbehandelte Zellen und Zellen nach Inkubation mit Bleomycin (10µg/ml) dagegen zeigten das Phänomen einer verminderten Kondensation nicht. Zunächst wurde eine Versuchsreihe angesetzt, welche die Crotonaldehyd-Konzentrationen von 60µM bis 300 µM umfaßte. Ab einer Crotonaldehyd-Konzentration von 240 µM konnte das Auftreten von G_0-PCCs in allen vier Kategorien mit einem mittleren Kondensationsgrad von 2,1 beobachtet werden (Abb. 4.12). Die beobachteten Effekte ließen das Ansetzen einer zweiten Versuchsreihe interessant erscheinen.

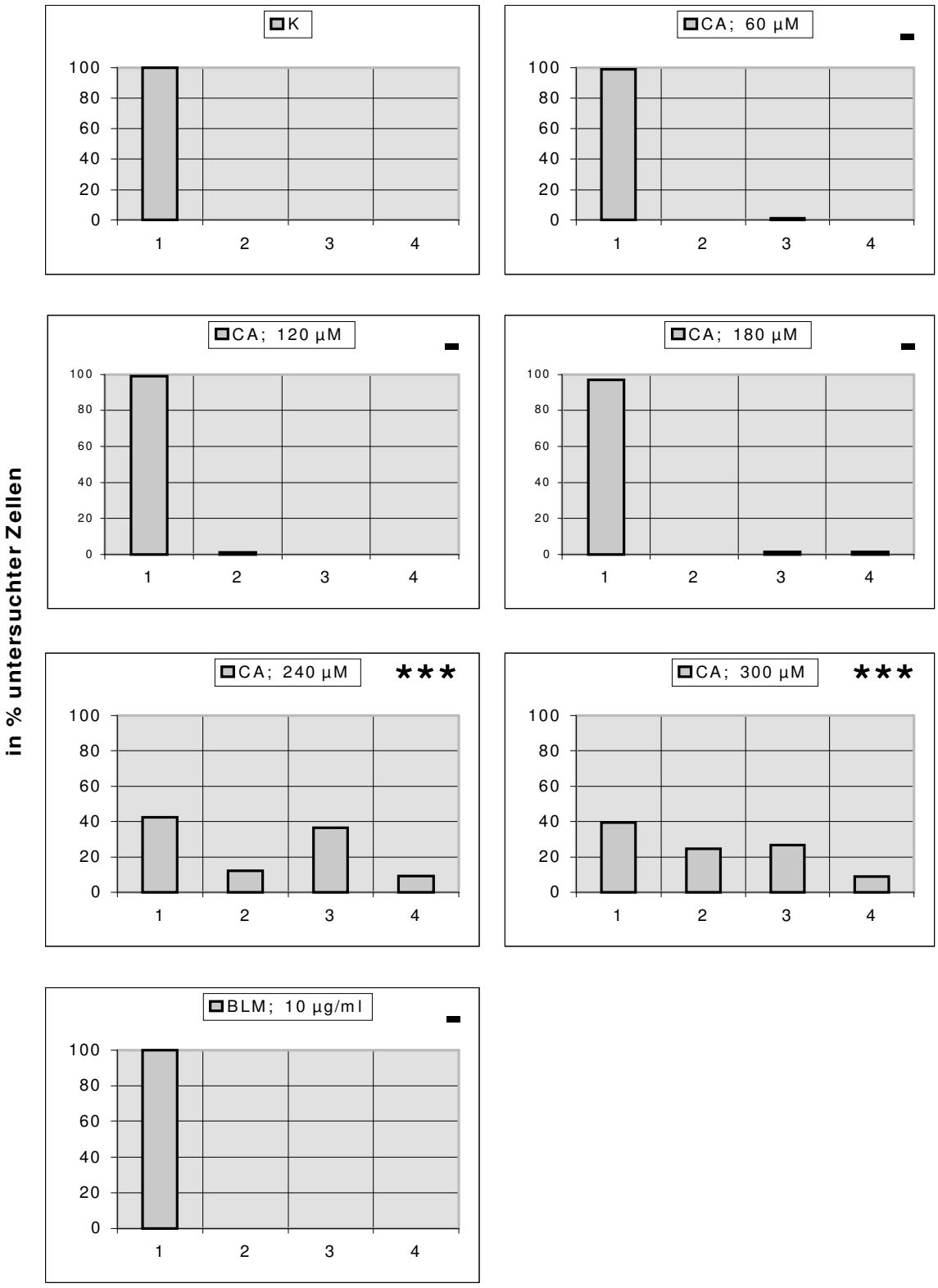


Abb. 4.12 Verteilung der G_0-PCCs auf vier Kondensationsgrade nach Crotonaldehyd- bzw. Bleomycin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (erste Versuchsreihe).

(statistische Auswertung im χ^2-Test)

- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),

** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

Hierbei wurde Crotonaldehyd in den Konzentrationen von 240µM-480µM eingesetzt. Mit zunehmender Crotonaldehyd-Konzentration nahm bei den G_0-PCCs die Fähigkeit zur Kondensation ab. Ab der Crotonaldehyd-Konzentration von 240µM änderte sich die Verteilung der G_0-PCCs auf die vier Kondensationsgrade im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant (Abb. 4.13). Bei 480µM beträgt der mittlere Kondensationsgrad der G_0-PCCs 3,4. Mehr als die Hälfte der untersuchten G_0-PCCs waren der Kategorie 4 zuzuordnen.

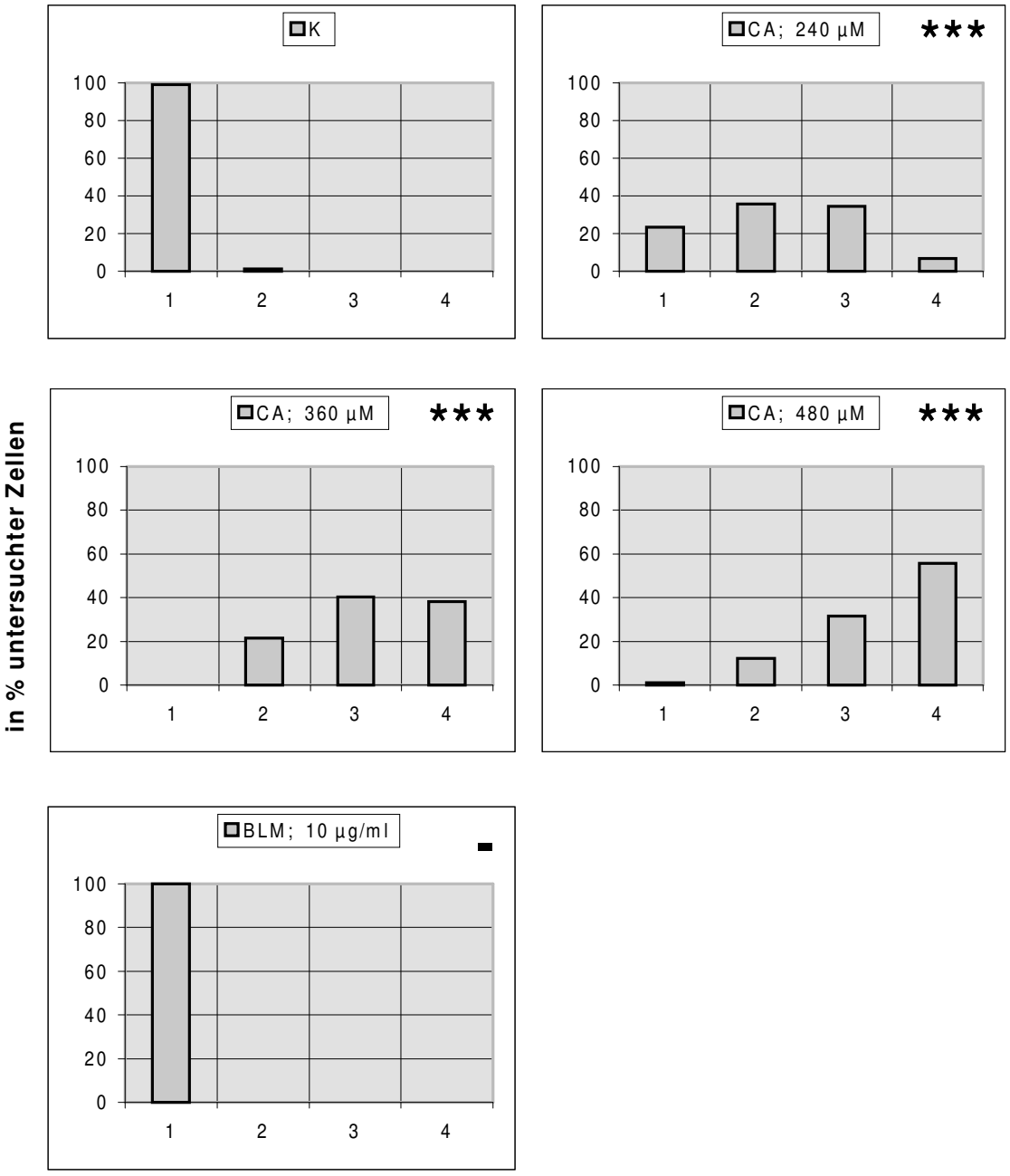


Abb. 4.13 Verteilung der G_0-PCCs auf vier Kondensationsgrade nach Crotonaldehyd- bzw. Bleomycin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (zweite Versuchsreihe). K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

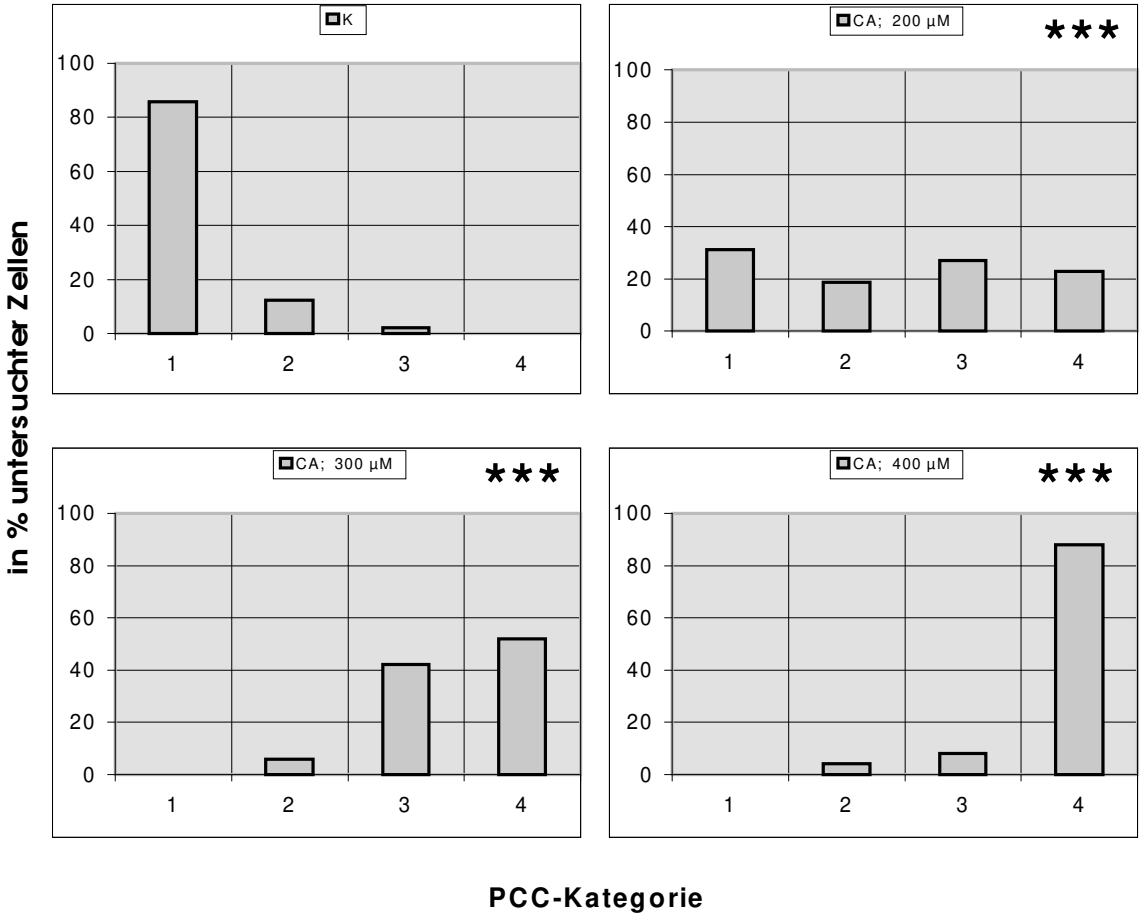


Abb. 4.14 Verteilung der G_0-PCCs auf vier Kondensationsgrade nach Crotonaldehyd-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsperson VP-1).
K = Kontrolle; CA = Crotonaldehyd
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

In einer zusätzlichen Versuchsreihe wurde Blut von zwei weiteren Personen eingesetzt, um die Wirkung von Crotonaldehyd auf den Kondensationsgrad der G_0-PCCs zu testen (Abb. 4.14 und 4.15). Bei den Versuchspersonen VP-1 (Abb. 4.13) und VP-2 (Abb. 4.14) zeigte sich mit steigender Crotonaldehyd-Konzentration eine Zunahme an elongierten G_0-PCCs. Nach einer Crotonaldehyd-Behandlung von 400µM ließen sich in beiden Fällen keine PCCs mehr der Kategorie 1 zuordnen. Bei Versuchsperson VP-1 waren 88%, bei der Testperson VP-2 87,9% der untersuchten PCCs Kategorie 4 zuzuordnen. In den Kontrollansätzen von VP-1 bzw. VP-2 traten allerdings schon leicht elongierte G_0-PCCs auf: Bei VP-1 wurden 2,0%, bei VP-2 sogar 9,1% der untersuchten PCCs der Kategorie 3 zugeordnet. Bei den unbehandelten Lymphozyten vonVP-1 betrug der mittlere Kondensationsgrad der G_0-PCCs 1,2 und 1,3 bei VP-2. Bei den G_0-PCCs beider Versuchspersonen VP-1 und VP-2 war bereits ab einer Crotonaldehyd-Konzentration von 200µM eine im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikante Veränderung der G_0-PCC-Verteilung auf den Kondensationsgrad zu beobachten.

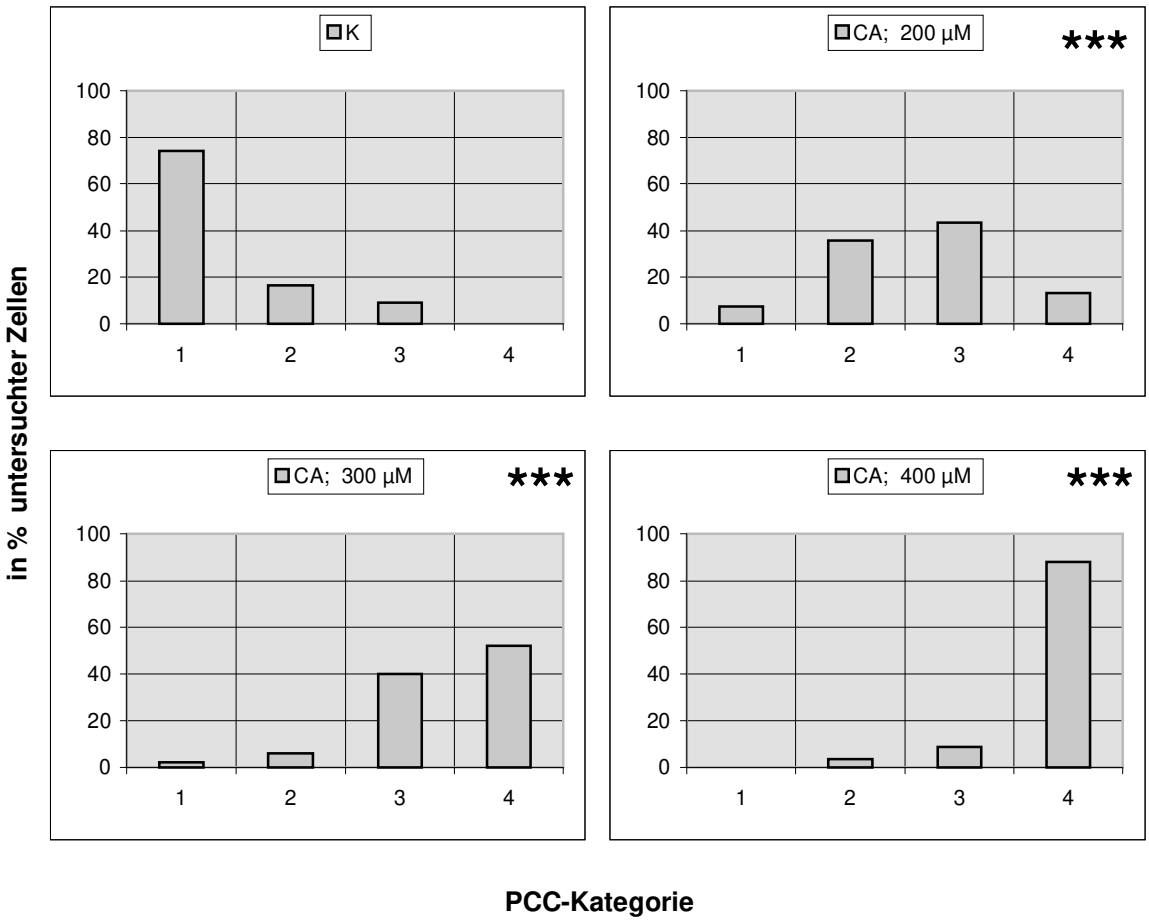


Abb. 4.15 Verteilung der G_0-PCCs auf vier Kondensationsgrade nach Crotonaldehyd-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsperson VP-2).
K=Kontrolle, CA=Crotonaldehyd
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.2.2.2.2 TRANS-2-HEXENAL-VERSUCHE

Abbildung 4.16 veranschaulicht die Verteilung der Kondensationsgrade der G_0-PCCs nach Inkubation mit 2- *trans*-2-Hexenal, Bleomycin und in der Kontrolle. In den mit *trans*-2-Hexenal behandelten Zellen zeigten die G_0-PCCs ebenfalls eine im Vergleich zur Kontrolle geringere Kondensation. Es trat eine Verschiebung der hoch kondensierten G_0-PCCs (Kategorie 1) zugunsten der G_0-PCCs von geringem Kondensationsgrad (Kategorie 4) auf. Ab einer Hexenal-Konzentration von 50µM waren bereits G_0-PCCs in allen vier Kondensationsstufen zu beobachten. Die Verteilung der G_0-PCCs auf die PCC-Kategorien änderte sich nach Inkubation mit *trans*-2-Hexenal ab einer Konzentration von 50µM schwach signifikant, ab 100 µM hoch signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle nahm bei 300µM der Anteil von G_0-PCC in Kategorie 1 von 88% auf 7,9% ab, während sich der Anteil der PCC in Kategorie 4 auf 57,4% erhöhte. Sowohl in der DMSO-Kontrolle als auch in der Bleomycin-Kontrolle waren etwa 90% stark kondensierte (Kategorie 1) und ca. 10% leicht kondensierte PCCs (Kategorie 2) zu beobachten.

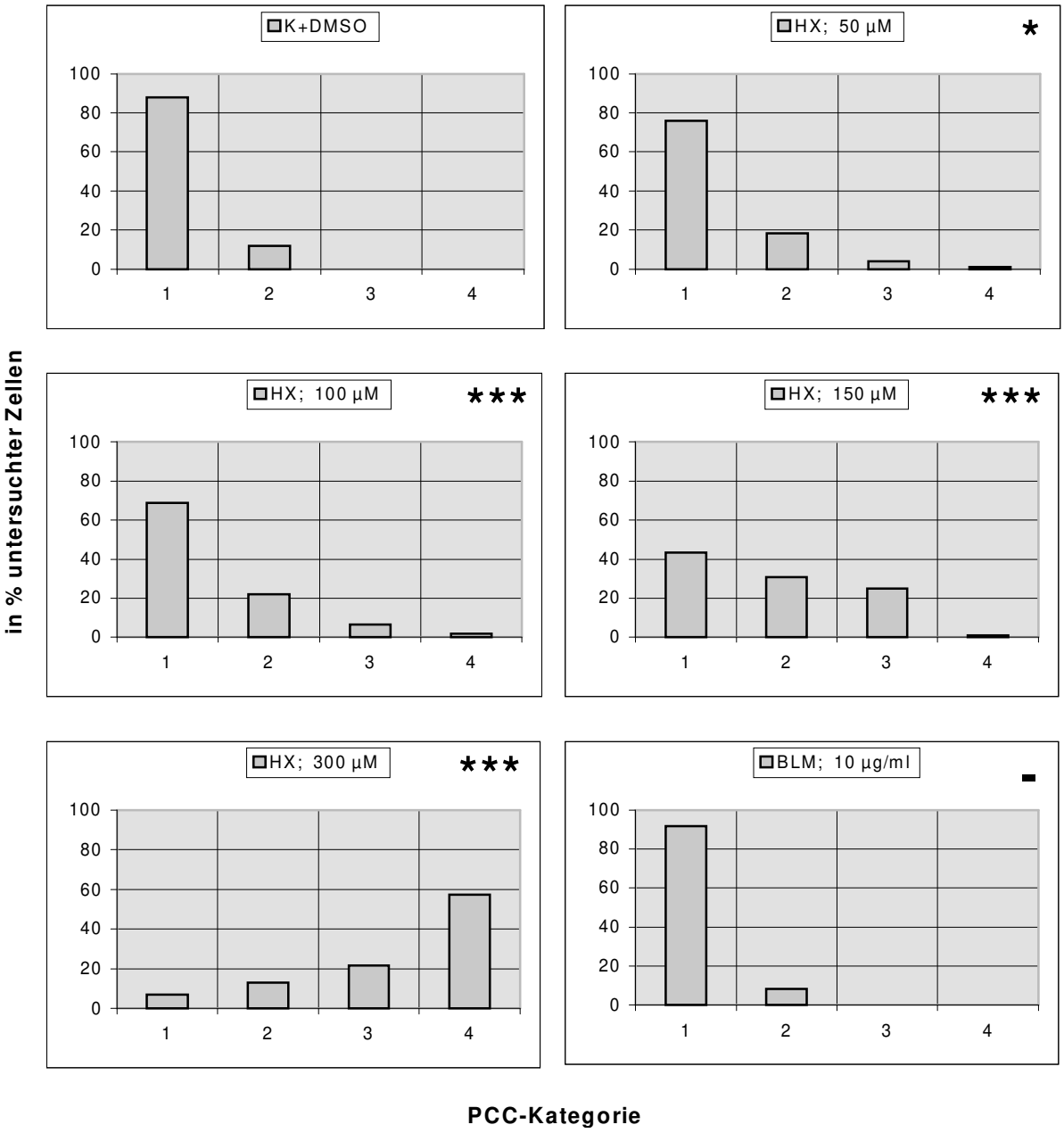


Abb. 4.16 Einteilung der G_0-PCCs in 4 Kondensationsgrade nach *trans*-2-Hexenal - bzw. Bleomycin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle
K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, HX = *trans*-2-Hexenal, BLM = Bleomycin
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.2.2.3 ZELLKINETIK

Zunächst wurde ein Vorversuch durchgeführt, bei dem die Verteilung PHA-stimulierter isolierter Lymphozyten aus 73h-Kulturen auf die Zellzyklusphasen untersucht wurde. Mit 44% der untersuchten Zellen befanden sich die meisten der untersuchten Zellen zum Zeitpunkt der Analyse in der $G_{0/1}$-Phase des Zellzyklus. In 68% der Zellen konnte eine vorzeitige Chromosomenkondensation induziert werden, während der Rest mitotische Zellen waren (Abb 4.17).

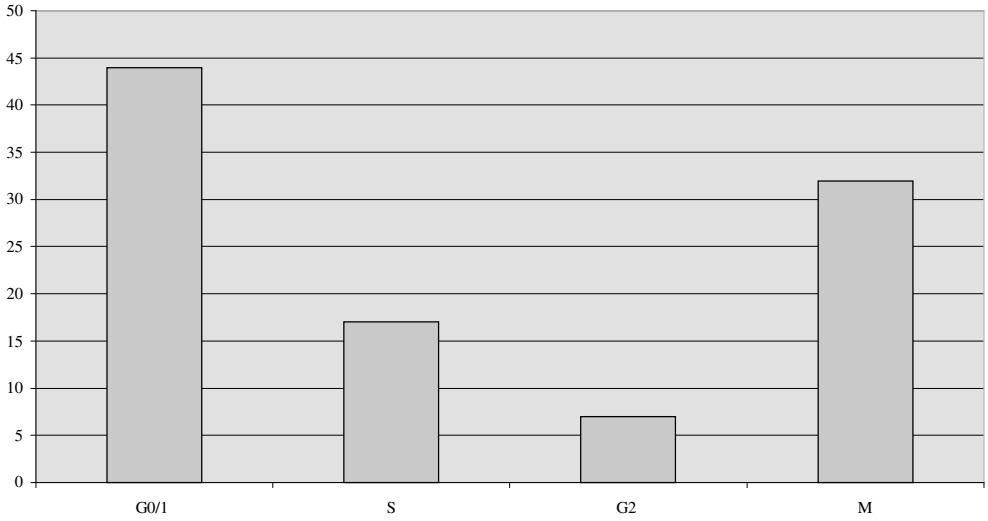


Abb. 4.17 Verteilung unbehandelter Zellen – PCCs ($G_{0/1}$, S, G_2) und Metaphasen (M) – auf die Zellzyklusphasen aus 73h-Kulturen (Vorversuch)

Abbildung 4.18 zeigt die Verteilung der Zellen auf die Zellphasen (G1-, S-, G2-Phase) und Mitose (M) und gleichzeitig die Anzahl der durchlaufenen Zellzyklen (ZZ I, ZZ II, ZZ III^+). Die Crotonaldehyd-Behandlung führte zu einer Veränderung der Zellzyklusphasen-Verteilung im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Während der Anteil der Zellen in der G_1-Phase nach Crotonaldehyd-Behandlung (300µM) auf das 1,7- fache erhöht wurde, war bei dem Anteil mitotischer Zellen eine ähnlich starke Abnahme zu verzeichnen. Die Verteilung der Zellen auf den ersten (I), zweiten (II) und dritten und weitere (III^+) Zellzyklus zeigte einen Rückgang der Zellproliferation. Ab einer Crotonaldehyd-Konzentration von 30µM bzw. bei einer Bleomycin-Konzentration von 10µg/ml änderte sich die Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen signifikant bis hoch signifikant. Die Inkubation mit Crotonaldehyd bewirkte konzentrationsabhängig eine Abnahme der mitotischen Zellen und eine Zunahme der Zellfraktionen in der G_1- und hauptsächlich in der G_2-Phase.

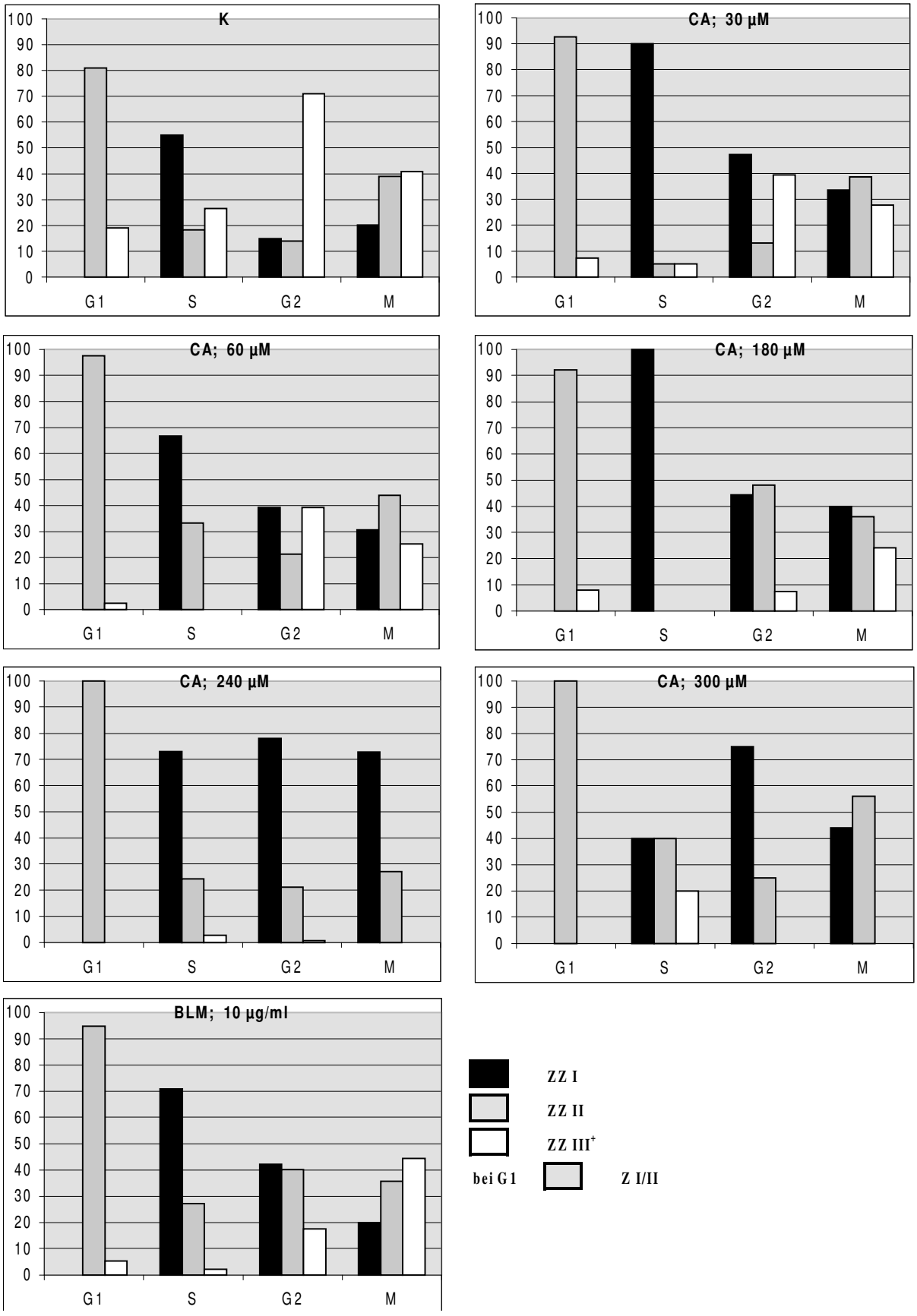


Abb. 4.18 Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen und Zellzyklen nach Behandlung mit Crotonaldehyd bzw. Bleomycin. K = Kontrolle; CA = Crotonaldehyd; BLM = Bleomycin

4.2.2.4 QUANTIFIZIERUNG VON PCC-EREIGNISSEN

Der M-PCC-Index ist eine Größe, mit der das Ausmaß der PCC-Induktion quantifiziert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde der M-PCC-Index an PCC-Präparaten ermittelt, die aus 73h-Kulturen isolierter Lymphozyten nach erfolgter PCC-Induktion gewonnen wurden (Kontrollversuch siehe Abb. 4.17). Der M-PCC-Index errechnet sich aus der Anzahl der mitotischen Induktorzellen (M) mit PCCs dividiert durch die Gesamtzahl der gezählten mitotischen Induktorzellen (M) multipliziert mit dem Faktor 100 (Pantelias und Maillie, 1983). Der M-PCC-Index ergab sich als Mittelwert aus drei Zählungen, und betrug 6,3%. Das bedeutete, daß pro 500 CHO-Metaphasen (mitotische Induktorzellen (M)) durchschnittlich 32 PCCs induziert werden konnten.

4.2.2.5 ABERRATIONSANALYSEN

Abbildung 4.19 zeigt im Vergleich die Aberrationen bei G_2-PCCs und mitotischen Chromosomen im ersten Zellzyklus nach Crotonaldehyd- bzw. Bleomycin-Behandlung. G_2-PCCs sind im Vergleich zu Metaphasen wesentlich stärker dekondensiert. Diese Dekondensationen führten auf den Präparaten häufig zu Überlagerungen der G_2-PCCs.

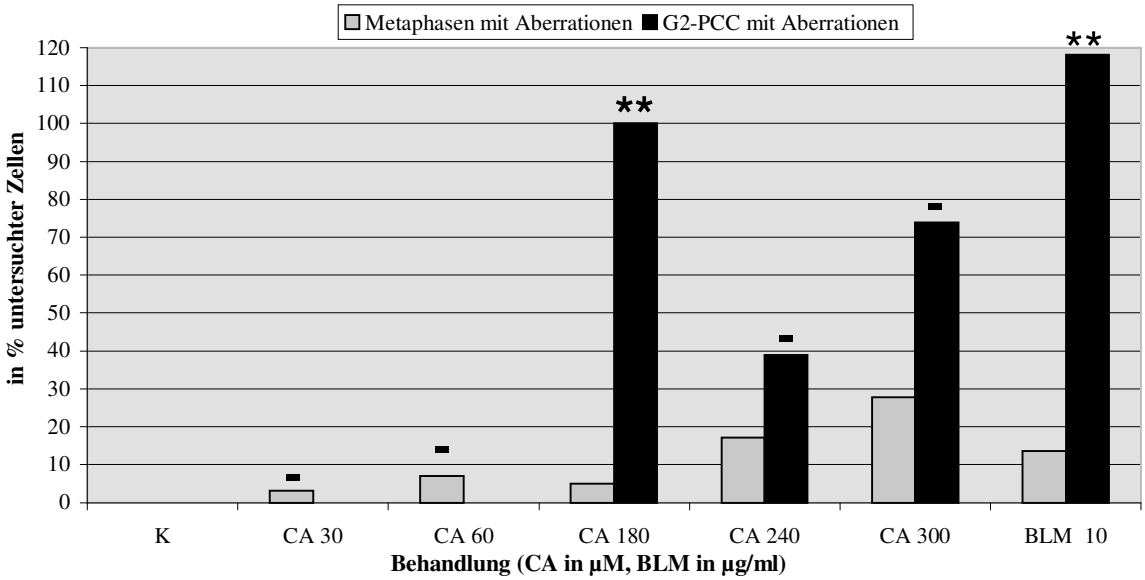


Abb. 4.19 Vergleich der Häufigkeit von Aberrationen bei Metaphasen im ersten Teilungszyklus und G_2-PCCs beim Durchlaufen des ersten Zellzyklus nach Inkubation der Zellen mit Crotonaldehyd bzw. Bleomycin. K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

Dadurch wurde die Auswertung von Aberrationen erschwert. Metaphasen dagegen erschienen auf den Objektträgern stark kondensiert und ließen strukturelle Aberrationen oft schwer erkennen. Daher wurden nur solche PCCs ausgewertet, die gut gespreitet waren bzw. nur die Metaphasen untersucht, bei denen die Chromosomenstruktur eine genaue Analyse ermöglichte. Dies führte allerdings zu einer stark schwankenden Anzahl auswertbarer Zellen. Es ergab sich eine konzentrationsabhängige Zunahme von Metaphasen mit Aberrationen, die bei 180 µM statistisch signifikant war.Bei 180µM wiesen die G_2-

PCCs signifikant mehr Aberrationen als mitotische Chromosomen auf. Es wurden Bruch- und Austauschereignisse beobachtet. Allerdings konnten bei dieser Konzentration nur 5 G_2-PCCs ausgewertet werden. Nach Bleomycinapplikation wurde bei PCCs in der G_2-Phase eine im Vergleich zu mitotischen Chromosomen statistisch signifikant höhere Aberrationsrate festgestellt.

4.2.3 REPARATURKINETIKSTUDIEN VORZEITIG IN DER G_0–PHASE KONDENSIERTER CHROMOSOMEN

4.2.3.1 CHROMATINFRAGMENTE IN G_0-PCCS

In Abbildung 4.20 ist die Anzahl geschädigter G_0-PCCs nach Behandlung mit den Reparaturhemmstoffen Arabinofuranoylcytosin (AraC), Hydroxyharnstoff (HU), AraC+HU und Novobiocin (NB) im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Die höchste Zahl an Fragmenten pro geschädigte Zelle zeigte sich mit 8,1 nach Behandlung mit AraC. Die kombinierte Behandlung der Lymphozyten mit AraC und HU ergab 7,3 Fragmente pro geschädigte Zelle. Diese kombinierte Behandlung erhöhte allerdings das Auftreten von Zellen mit 5-24 Fragmenten im Vergleich zur Behandlung nur mit AraC bzw. HU. Die Behandlung mit den Reparaturinhibitoren NB, AraC und HU, bzw. die Kombination von AraC mit HU bewirkte eine im Vergleich zu unbehandelten Zellen statistisch hoch signifikante Zunahme der Schädigung (Abb. 4.20).

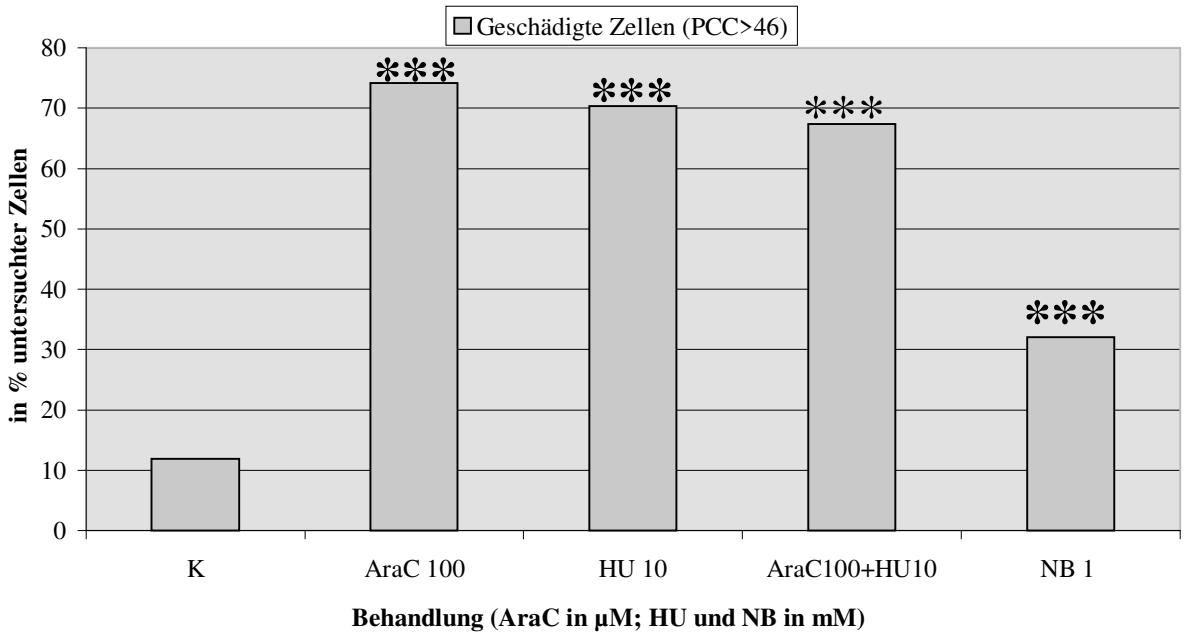


Abb. 4.20 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen (PCC>46) nach Einwirkung von Repapraturhemmstoffen. K = Kontrolle, AraC = Arabinofuranosylcytosin, HU = Hydroxyharnstoff, NB = Novobiocin (statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0,05$),
** = signifikant ($p \leq 0,01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

Abbildung 4.21 veranschaulicht die Verteilung der Fragmente in den mit Reparaturhemmstoffen behandelten Zellen.

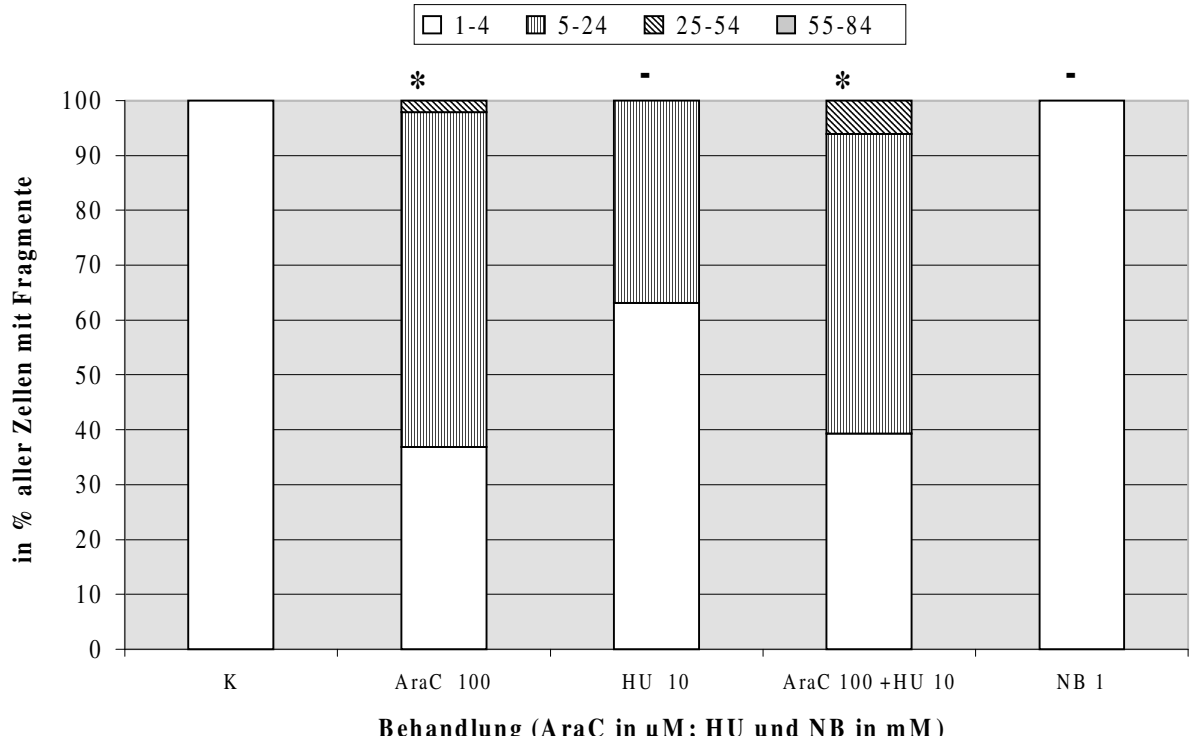


Abb. 4.21. Fragmentverteilung in G_0-PCCs nach Inkubation mit Reparaturhemmstoffen. K = Kontrolle, AraC = Arabinofuranosylcytosin, HU = Hydroxyharnstoff, NB = Novobiocin.
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.2.3.2 KONDENSATIONSSTADIEN DER G_0-PCCS

Abbildung 4.22 veranschaulicht die Wirkung von Reparaturhemmstoffen auf den Kondensationsgrad der G_0-PCCs unbehandelter und Crotonaldehyd-behandelter Zellen.

Abb.4.22 A: Von den G_0-PCCs unbehandelter Lymphozyten waren 76,9% Kategorie 1 und 23,1 % Kategorie 2 zuzuordnen. Die Inkubation mit Crotonaldehyd in den Konzentrationen von 300µM bzw. 480µM bewirkte eine hoch signifikante Verschiebung der G_0-PCCs (Kategorie 1) zugunsten der G_0-PCCs mit geringer Kondensation auf (Kategorie 4). Die Inkubationen mit den Reparaturhemmstoffen HU, NB und die kombinierte Behandlung von AraC+HU hatten keinen Einfluß auf den Kondensationgrad der G_0-PCCs. Nach der Inkubation in AraC waren 96,8 % der untersuchten G_0-PCCs stark kondensiert (Kategorie 1) und 3,2% weniger stark kondensiert (Kategorie 2). Damit zeigte dieses Ergebnis eine statistisch signifikante Veränderung der G_0-PCC-Verteilung zugunsten des Kondensationsgrads 1 im Vergleich zur Kontrolle.

A

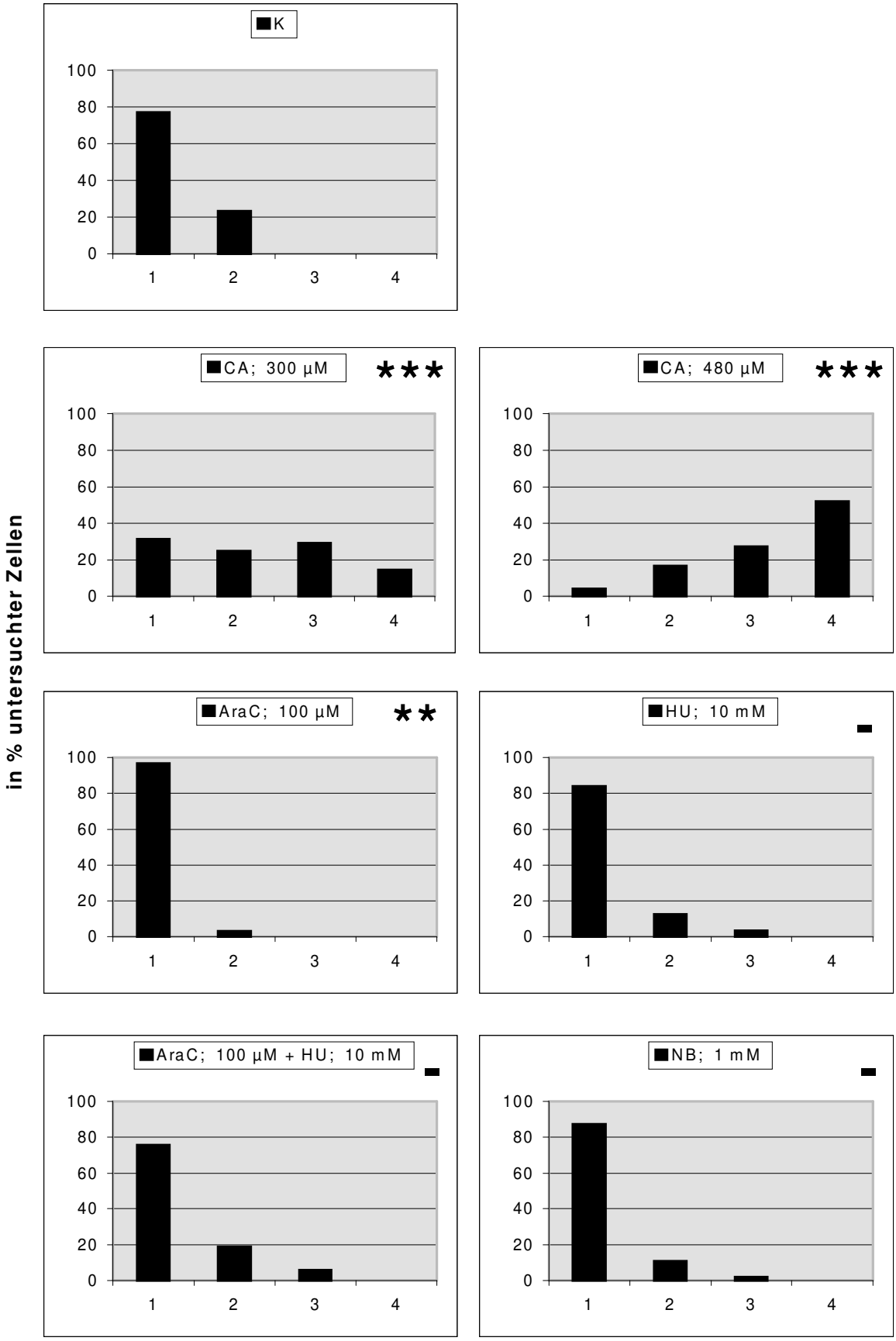

K
CA; 300 µM
***
CA; 480 µM
***
AraC; 100 µM
**
HU; 10 mM
AraC; 100 µM + HU; 10 mM
NB; 1 mM
100
80
60
40
20
0
1
2
3
4
in % untersuchter Zellen
PCC - Kategorie

Abb. 4.22 B: Die zusätzliche Nachinkubation in serumfreiem Medium für 90 Minuten bewirkte bei den Zellen, die mit Crotonaldehyd in einer Konzentration von 300µM behandelt worden waren, eine nur leichte Veränderung des Kondensationsgrades der G_0-PCC auf 2,5 im Vergleich zu den Zellen die ebenfalls mit 300µM Crotonaldehyd behandelt worden waren, aber keine zusätzliche Nachbehandlung erfuhren (Kondensationsgrad 2,3). Allerdings wurde eine hoch signifikante Verschiebung der Verteilung stark kondensierter G_0-PCCs (Kategorie 1) zu leichter kondensierten G_0-PCCs (Kategorie 2+3) beobachtet. Der Anteil von G_0-PCCs mit geringem Kondensationsgrad wurde kaum verändert. Die gleichzeitige Behandlung von Crotonaldehyd (300µM) mit AraC+HU hatte keinen Einfluß auf den Kondensationsgrad der G_0-PCCs. Diese Feststellung traf ebenso für NB zu.

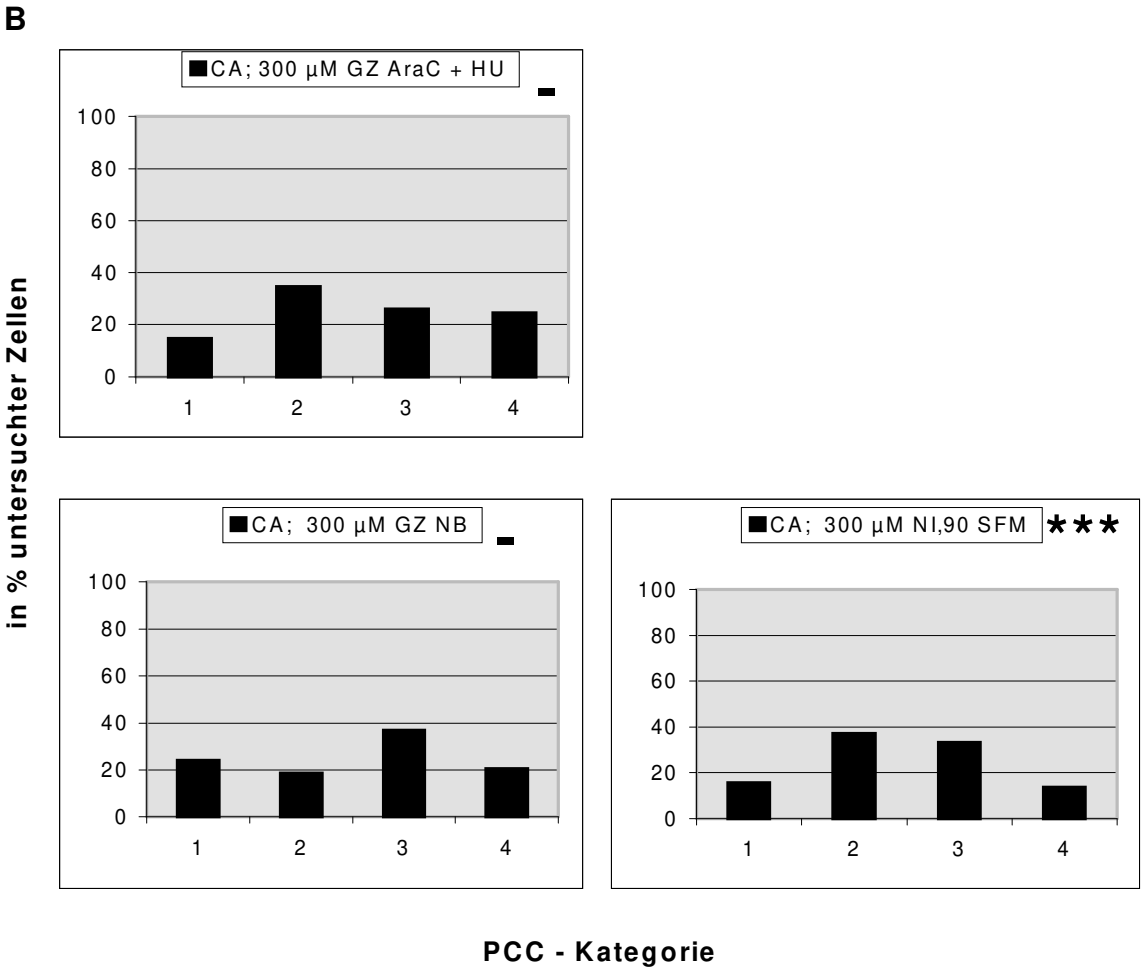


Abb.4.22 C: Nach Inkubation mit Crotonaldehyd (480µM) wurde eine im Vergleich zu G_0-PCCs unbehandelter Zellen hoch signifikante Verschiebung zu G_0-PCCs mit geringem Kondensationsgrad beobachtet. Es traten G_0-PCCs in allen Kategorien auf (Abb. 4.22A). Nach gleichzeitiger Inkubation mit AraC + HU bzw. NB oder bei 90-minütiger Nachinkubation mit NB trat eine statistisch schwach signifikante Verschiebung von G_0-PCCs der Kondensationsgrade 2+3 zugunsten von Kondensationsstufe 4 auf. Eine 90- bzw. 180-minütige Nachinkubation nach Crotonaldehyd-Behandlung (480µM) in serumfreiem Medium bewirkte keine Veränderung bei der Verteilung der G_0-PCCs. Auch nach 3-stündiger Nachinkubation mit AraC+HU wurde keine statistisch signifikante Änderung beobachtet (Abb.4.22 C).

C

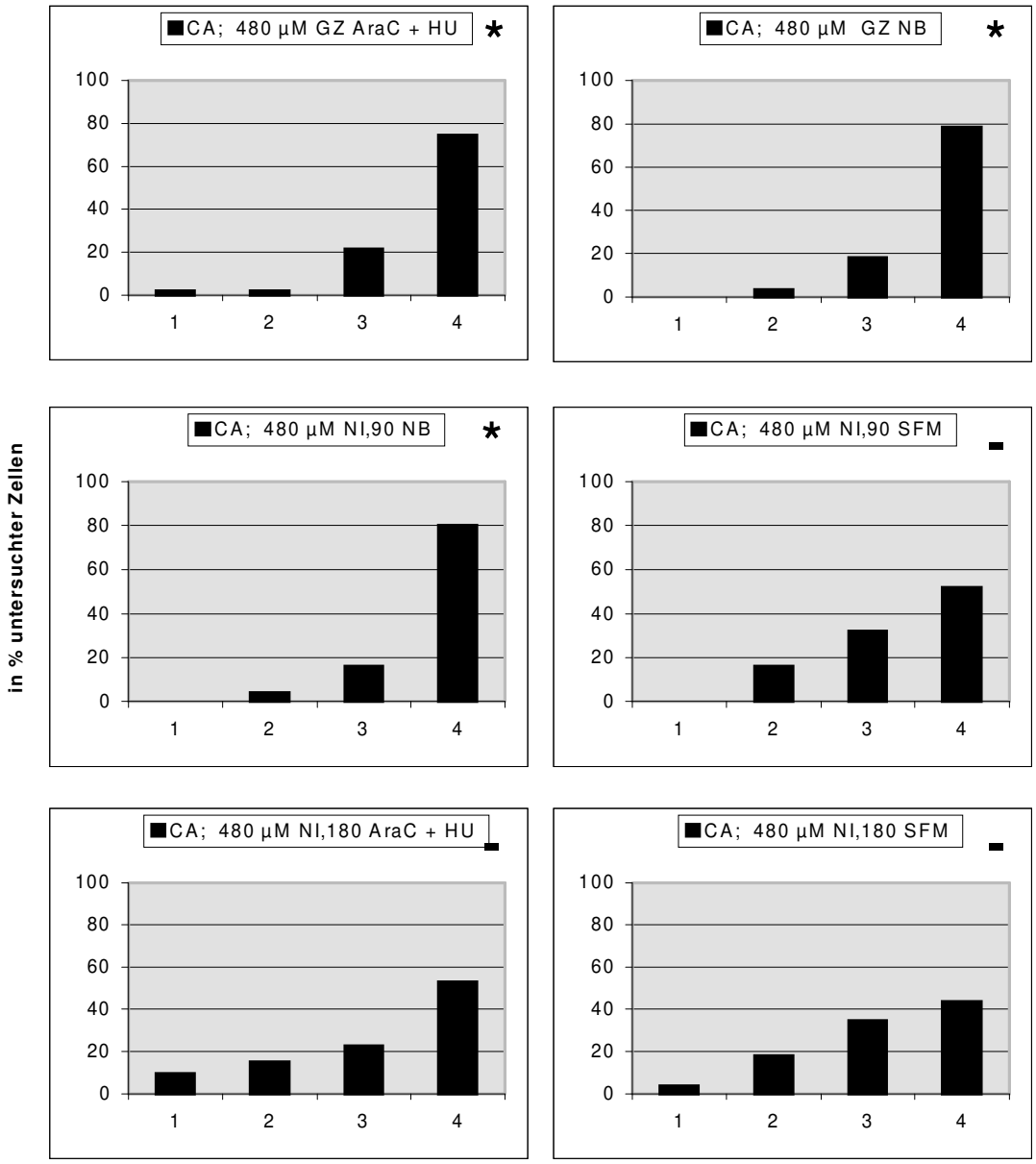


Abb. 4.22 Inkubationsprotokolle zu Reparaturkinetik-Studien. Vergleich der Verteilung der G_0-PCCs auf vier Kondensationsgrade (Kategorie 1-4):

A nach Inkubation mit Crotonaldehyd (300µM bzw. 480µM) bzw. nach Einwirkung von Reparaturhemmstoffen **mit der Kontrolle**

B nach gleichzeitiger Inkubation von Crotonaldehyd (300µM) und Reparaturhemmstoffen bzw. einer Nachinkubation in serumfreien Medium **mit Crotonaldehyd (300µM)**

C nach gleichzeitiger Inkubation von Crotonaldehyd (480µM) und Reparaturhemmstoffen bzw. Nachinkubation mit Reparaturinhibitoren oder in serumfreiem Medium **mit Crotonaldehyd (480µM)**

K = Kontrolle; CA = Crotonaldehyd, AraC = Arabinofuranosylcytosin, HU = Hydroxyharnstoff, NB = Novobiocin, SFM = serumfreies Medium, GZ = gleichzeitige Inkubation mit Crotonaldehyd und dem Reparaturhemmstoff, NI,90 = Nachinkubation von 90 Minuten, NI,180 = Nachinkubation von 180Minuten

(statistische Auswertung im χ^2-Test)

- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),

** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.2.4 FLUORESZENZ IN SITU-HYBRIDISIERUNG

Die Fluoreszenz *in-situ*-Hybridisierung wurde eingesetzt, um die Veränderung der Länge der G_0-PCC quantifizierbar zu machen. Dazu wurde eine Chromosom-4-spezifische biotin-markierte Sonde auf die PCC-Spreitungen hybridisiert und ausgemessen (Abb. 4.23).

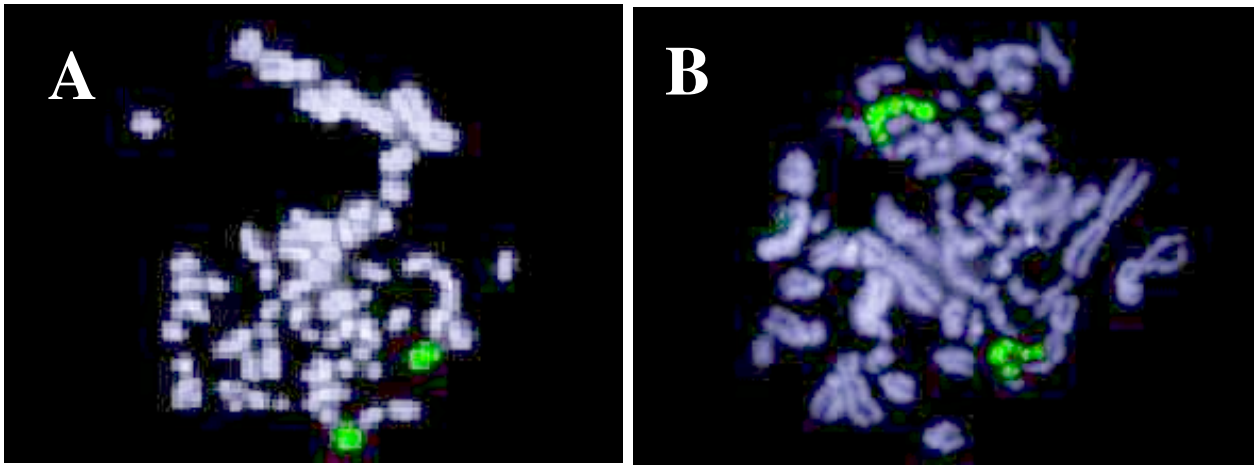


Abb. 4.23 FISH mit einer Chromosom 4-spezifischen Painting-Sonde (FITC, grün) auf PCC-Spreitungen. Gegenfärbung mit DAPI (blau).
A G_0-PCC unbehandelter Lymphozyten
B G_0-PCC Crotonaldehyd-behandelter (480µM) Lymphozyten

Eine Hybridisierungsdauer von fünf bis sieben Tagen erwies sich als geeignet, um deutliche Signale auf den PCC-Spreitungen zu erhalten. Kreuzhybridisierungen mit CHO-Chromosomen wurden nach einer 5 – bis 7 -tägigen Hybridisierungsdauer und Stringenzwaschungen mit 0,05xSSC nicht beobachtet; eine Zugabe von genomischer CHO-DNA (siehe Kapitel 3.7.1) zum Hybmix war daher nicht nötig. Man sieht anhand der Längenzunahme der G_0-PCCs, daß die Crotonaldehyd-Behandlung die Kondensation des Interphasechromatins konzentrationsabhängig um das 2 – 3-fache erniedrigte. Der Bereich vom Minimum bis zum Maximum aller gemessenen G_0-PCC-Längen von Chromosom 4 wurde in vier Kategorien gleicher Bandbreite unterteilt. Eine Übersicht darüber zeigt Abb. 4.24. Es zeigte sich für die Crotonaldehyd-Konzentrationen 240µM und 480µM eine statistsch hoch signifikante Verschiebung von stark konden-sierten G_0-PCCs zu Häufigkeitsbereichen von G_0-PCCs mit geringerem Kon-densationsgrad.

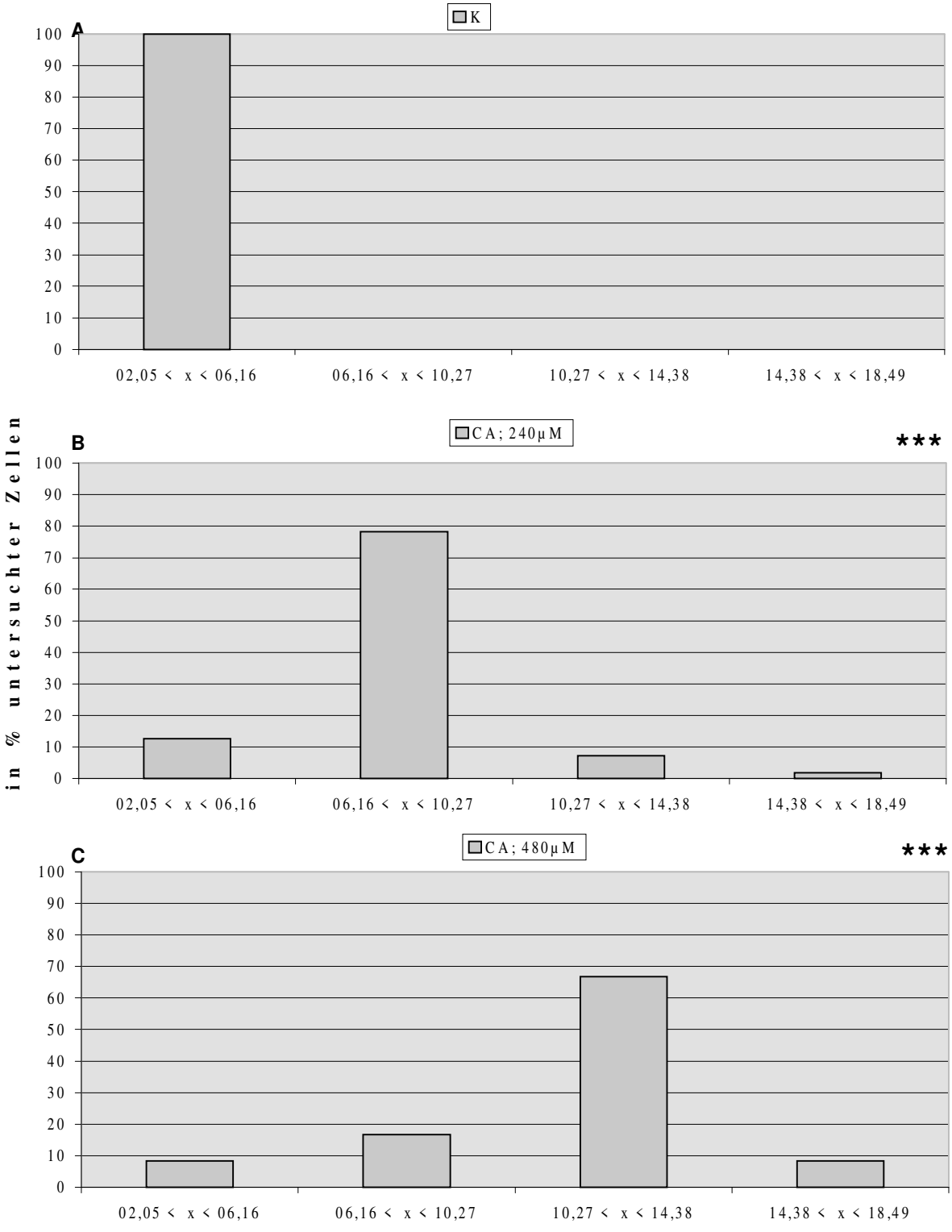


Abb. 4.24. Einteilung der G_0-PCCs in vier Bereiche nach Längenmessung mittels fluoreszenz-markierter Painting-Sonde für Chromosom 4

A G_0-PCCs unbehandelter Zellen

B G_0-PCCs von Zellen, die mit Crotonaldehyd (240µM) behandelt wurden

C G_0-PCCs von Zellen, die mit Crotonaldehyd (480µM) behandelt wurden

(statistische Auswertung im χ^2-Test)

- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),

** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.3 UNTERSUCHUNGEN VON NDELA

4.3.1 ANALYSE DER METAPHASE-CHROMOSOMEN

Strukturelle Chromosomenaberrationen wurden bei Metaphasen aus 48h- und 73h-Vollblutkulturen nach NDELA-Inkubation untersucht. Es wurden jeweils etwa 100 Metaphasen ausgewertet. Bei den 48h-Kulturen wurden ausschließlich Metaphasen beim ersten Passieren des Zellzyklus nach Mutagenapplikation analysiert. Als positive Kontrollsubstanz wurde Bleomycin (10µg/ml) mitgeführt. Bei der Auswertung der 73h-Kulturen blieb die Zellkinetik unberücksichtigt, denn es wurden Normal-Giemsa-gefärbte Präparate analysiert.

Die Abbildungen 4.25 A-C veranschaulichen die Wirkung von NDELA bzw. Bleomycin bei 48h Kulturen. Die Abbildungen 4.26 A-C zeigen das Auftreten von strukturellen Aberrationen bei 73h-Kulturen nach Inkubation mit NDELA.

Die Behandlung mit NDELA steigerte in beiden Versuchsreihen konzentrationsabhängig die Anzahl der Bruchereignisse in den analysierten Metaphasen, allerdings wurden in keiner der Zellen mehr als ein Bruchereignis beobachtet. Austauschfiguren wurden nicht gefunden. Der Erhöhung der Anzahl an Zellen mit Aberrationen war verglichen mit der Kontrolle bei einer NDELA-Konzentration von 1000µM schwach signifikant, bei einer Konzentration von 2000µM signifikant. Die Anzahl an Metaphasen mit Aberrationen wurde nach Bleomycin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant gesteigert. Dabei wurde das Auftreten von Bruchereignissen und eines Austauschereignisses beobachtet.

Bei den 73h-Kulturen wurde ein nicht signifikant erhöhtes Auftreten von aberranten Zellen festgestellt.

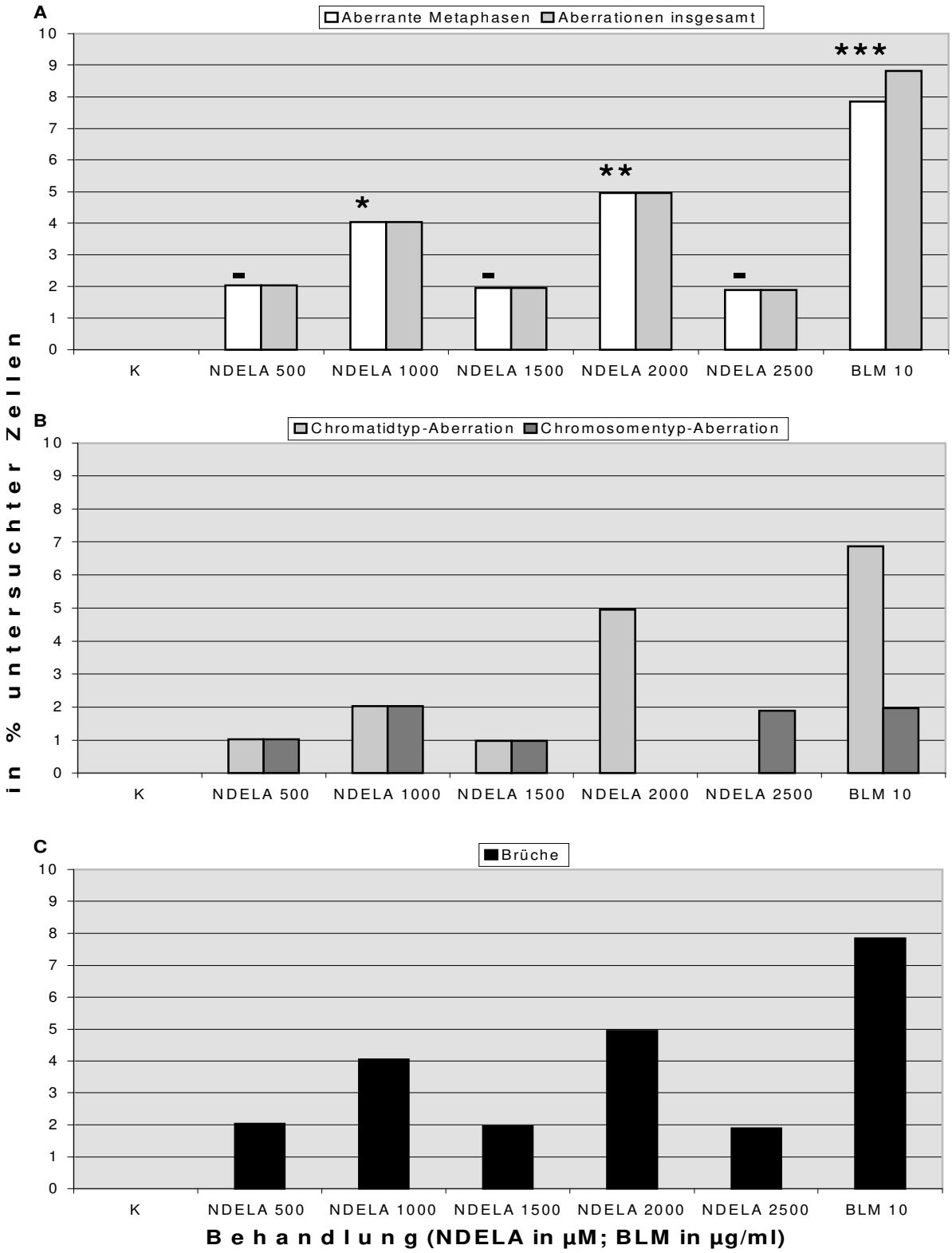


Abb. 4.25 A Vergleich der Häufigkeit aberranter Metaphasen und Aberrationen insgesamt
B Vergleich Chromatidtyp- und Chromosomentyp- Aberrationen
C Bruchereignisse
nach NDELA–bzw. Bleomycin-Behandlung u. anschließender 48h – Vollblutkultivierung.
K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

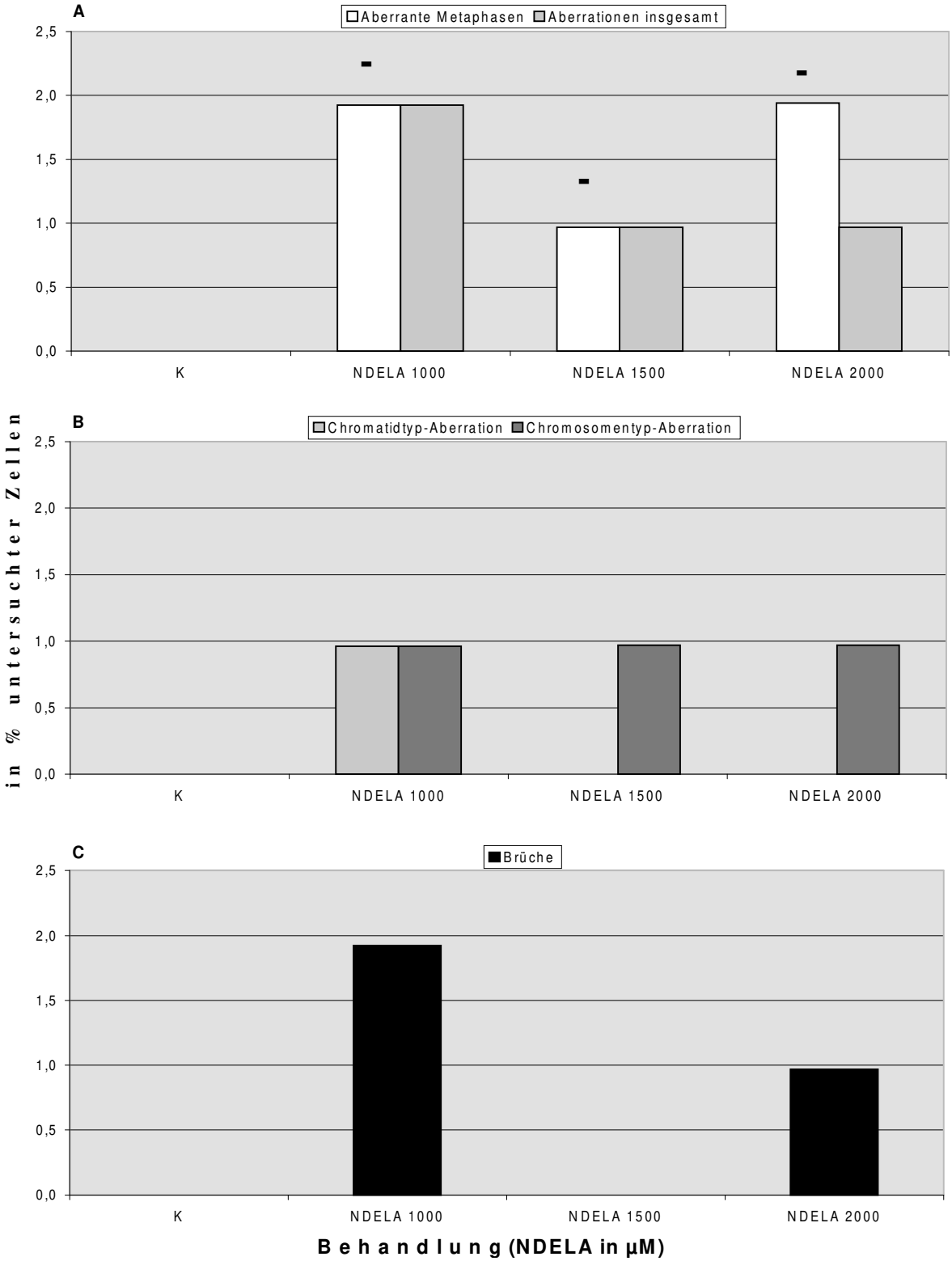


Abb. 4.26 A Vergleich der Häufigkeit aberranter Metaphasen und Aberrationen insgesamt
B Vergleich Chromatidtyp- und Chromosomentyp- Aberrationen
C Bruchereignisse
nach NDELA–Behandlung bei 73h – Vollblutkultivierung.
K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0,05$),
** = signifikant ($p \leq 0,01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

Wie die Abbildungen 4.27 und 4.28 zeigen, bewirkte die Inkubation der Lymphozyten mit NDELA sowohl in 48 Stunden-Kulturen als auch in 73h Kulturen dosisabhängig einen Rückgang der Mitose-Indices.

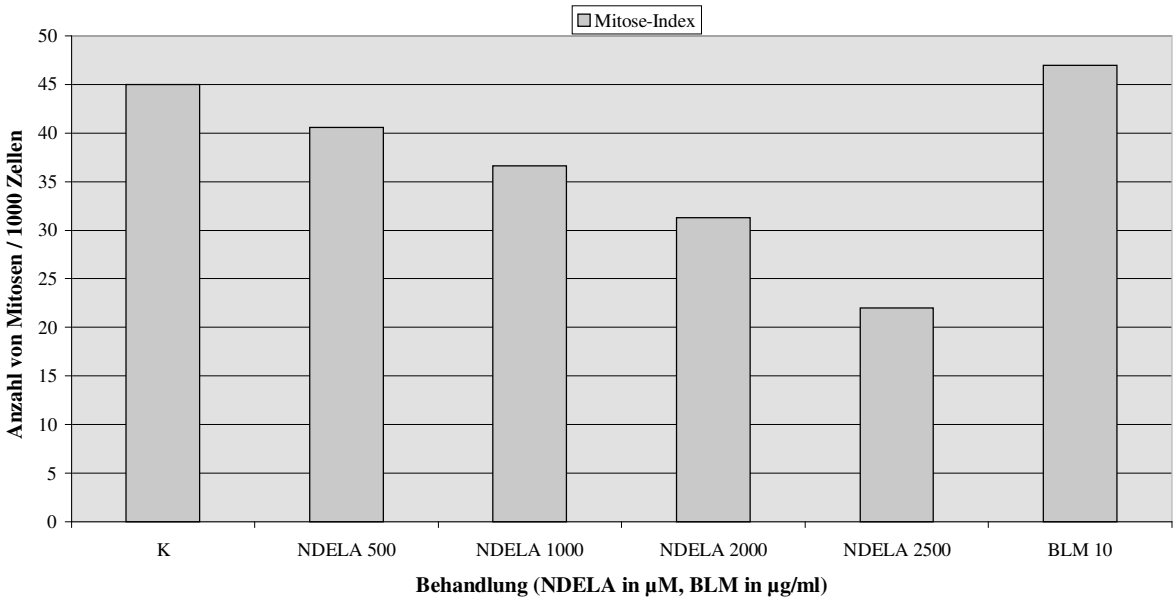


Abb. 4.27 Wirkung von NDELA bzw. Bleomycin auf den Mitose-Index von Lymphozyten aus 48h-Vollblutkulturen. K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin

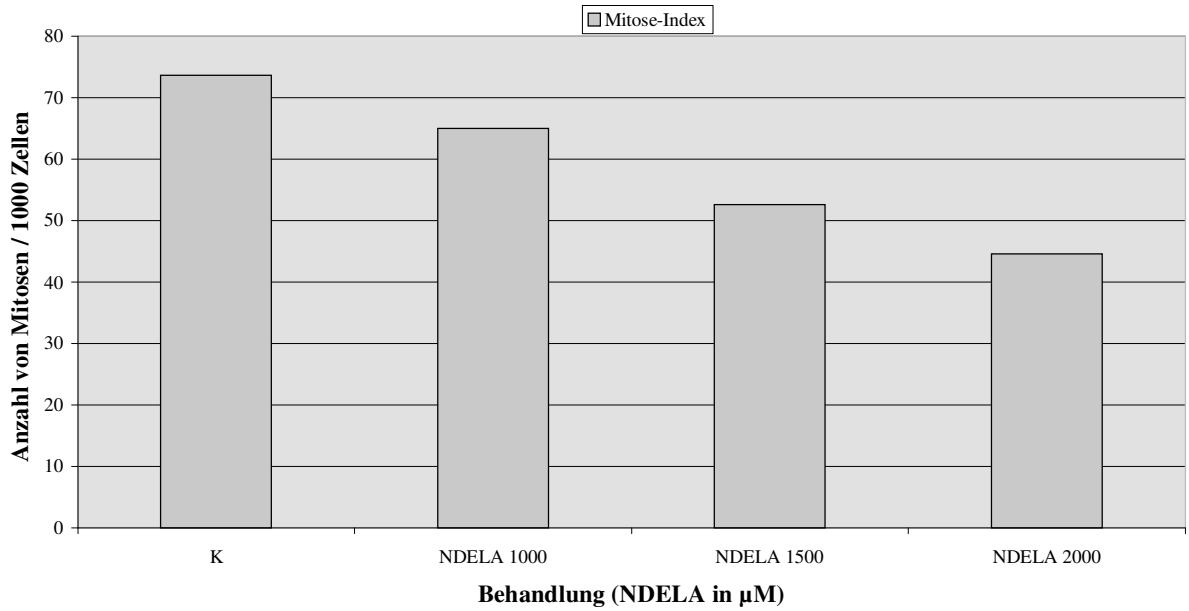


Abb. 4.28 Einfluß von NDELA bzw. Bleomycin auf den Mitose-Index von Lymphozyten aus 73h-Vollblutkulturen. K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin

4.3.2 PCC-ANALYSEN

In dem Kapitel werden die Ergebnisse aus Analysen von G_0-PCCs nach Inkubation von Vollblut und isolierten Lymphozyten mit NDELA bzw. Bleomycin dargestellt. Zusätzlich wurde die PCC-Induktion bei NDELA-behandelten Lymphozyten aus 73h-Kulturen durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden,

ob sich die Verteilung der Zellzyklusphasen durch die Inkubation mit NDELA im Vergleich zur Kontrolle änderte. Außerdem wurde das Auftreten von Aberrationen bei Metaphasen im 1. Teilungszyklus und G_2-PCCs beim Passieren des ersten Zellzyklus vergleichend dargestellt.

4.3.2.1 CHROMATINFRAGMENTE IN G_0-PCCS

Die Inkubation von Vollblut bzw. isolierten Lymphozyten steigerte die Anzahl von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen bereits ab einer NDELA-Konzentration von 1000µM hoch signifikant. Nach der Inkubation von Vollblut in der NDELA-Konzentration von 2000µM wiesen die geschädigten G_0-PCCs durchschnittlich eine Anzahl von 5,5 Fragmenten auf. Nach Inkubation von isolierten Lymphozyten wurde eine Zahl von 4,8 Fragmenten pro geschädigte Zelle bestimmt.Nach Bleomycin-Inkubation war die Häufigkeit geschädigter Zellen in beiden Testsystemen gleich. Die Inkubation mit Bleomycin induzierte in Vollblut 11,4 Fragmente pro geschädigte Zelle; nach Behandlung von isolierten Lymphozyten wurde sogar das Auftreten von 24,2 Fragmenten pro geschädigter Zelle festgestellt (Abb 4.29 A+B). Abbildung 4.30 vergleicht die Fragmentverteilung geschädigter G_0-PCC nach Behandlung von Vollblut (Abb. 4.30 A) und isolierten Lymphozyten (Abb. 4.30 B) mit NDELA bzw. Bleomycin. In beiden Versuchsansätzen erfolgte ab 1000µM eine signifikante Verschiebung (Vollblut) bzw. schwach signifikante Verschiebung (isolierte Lymphozyten) der geschädigten Zellen zu Bereichen mit höheren Fragmentzahlen.

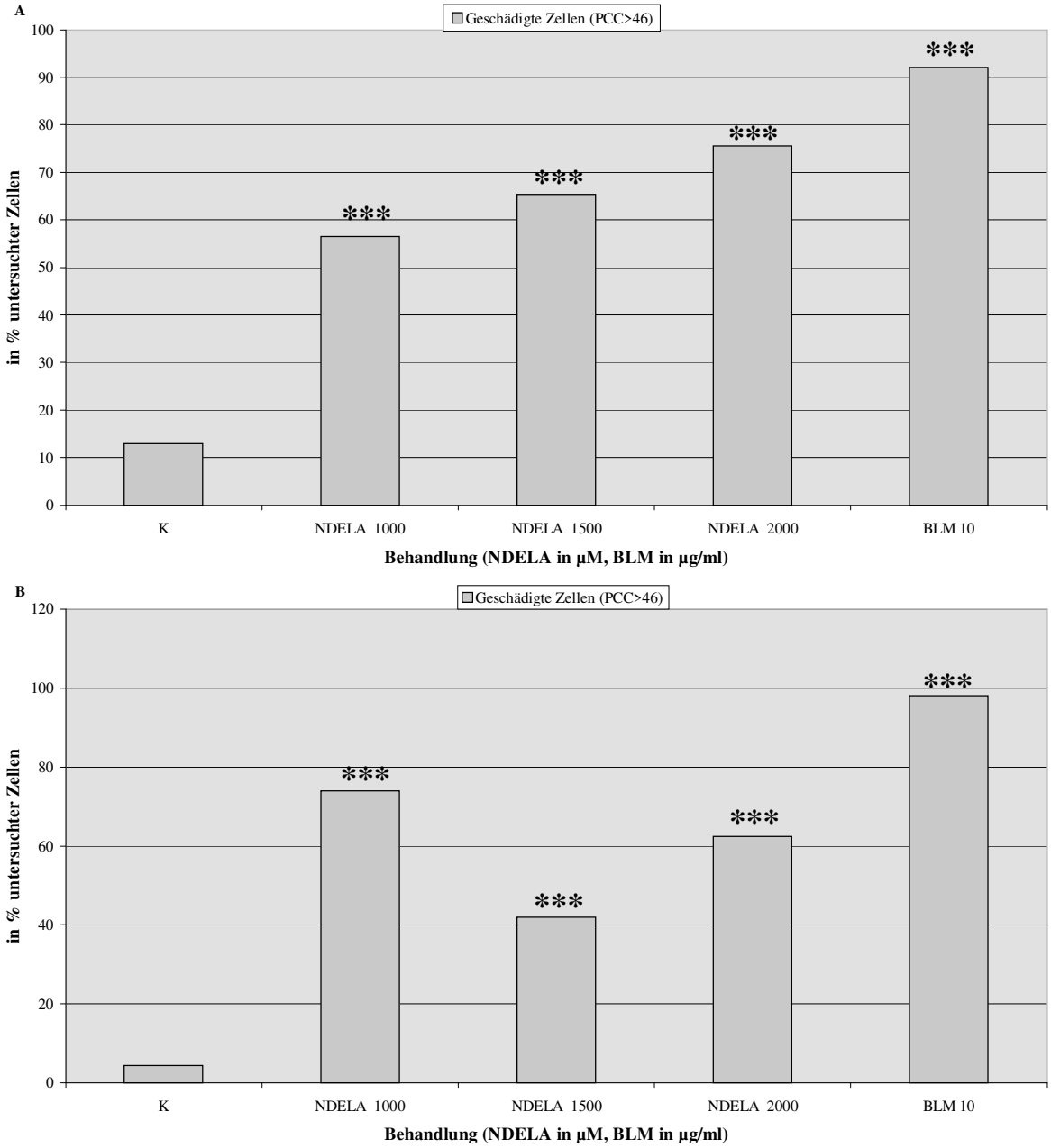


Abb. 4.29 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen (PCC>46)
A Behandlung von Vollblut
B Behandlung isolierter Lymphozyten
K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

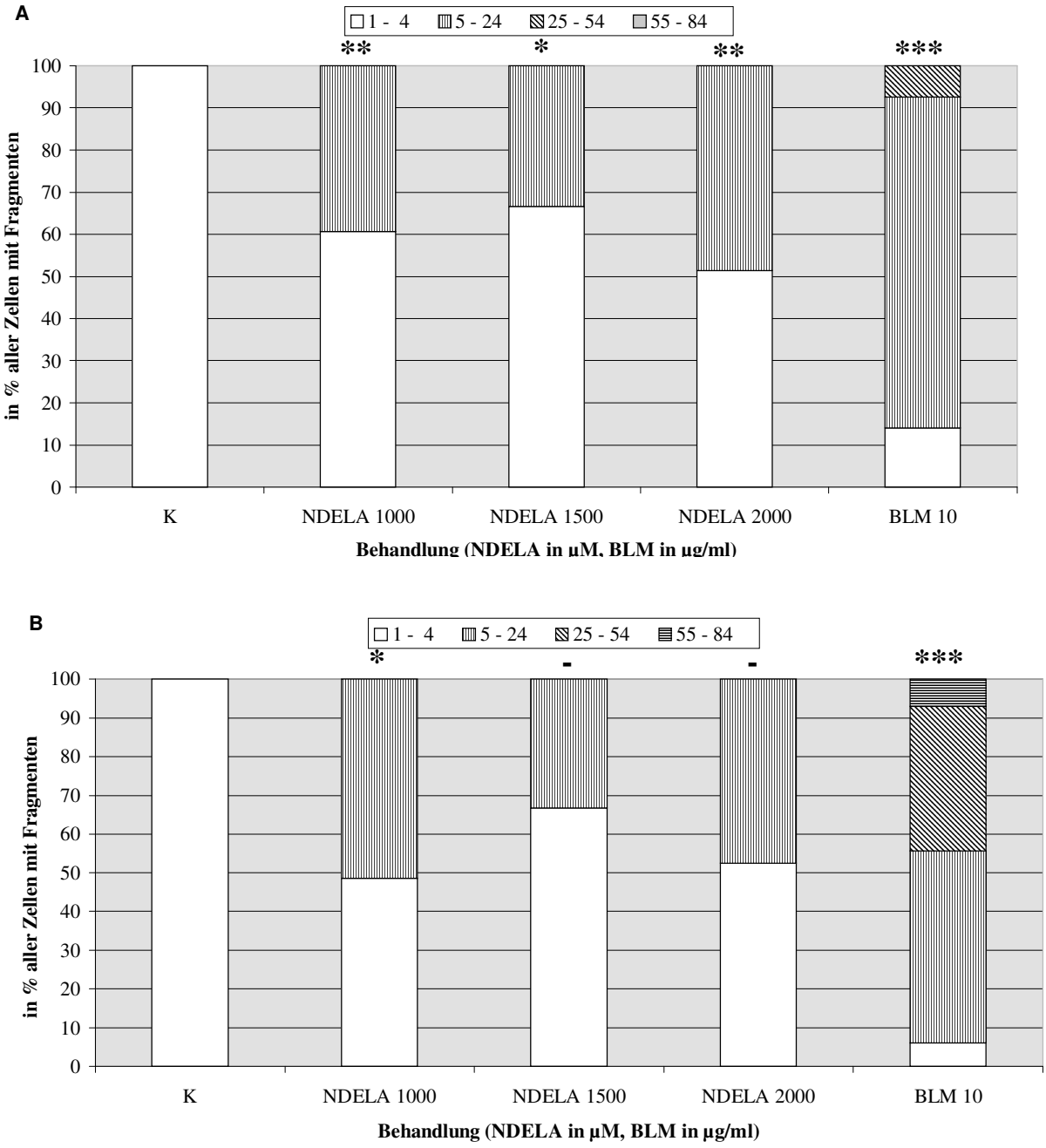


Abb. 4.30 Verteilung der Fragmente in geschädigten G_0-PCCs nach NDELA- bzw. BLM-Behandlung
A Behandlung von Vollblut
B Behandlung isolierter Lymphozyten
K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0,05$),
** = signifikant ($p \leq 0,01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

4.3.2.2 KONDENSATIONSTADIEN DER G_0-PCCS

Die Inkubation mit NDELA veränderte den Kondensationsgrad von G_0-PCCs im Vergleich zu G_0-PCCs unbehandelter Zellen bei keiner der getesteten NDELA-Konzentrationen. Die Inkubation von Vollblut und von isolierten Lymphozyten führte zu vergleichbaren Resultaten. Abbildung 4.31 zeigt die Verteilung der G_0-PCCs auf die vier Kondensationsgrade nach Inkubation von Vollblut mit NDELA bzw. Bleomycin.

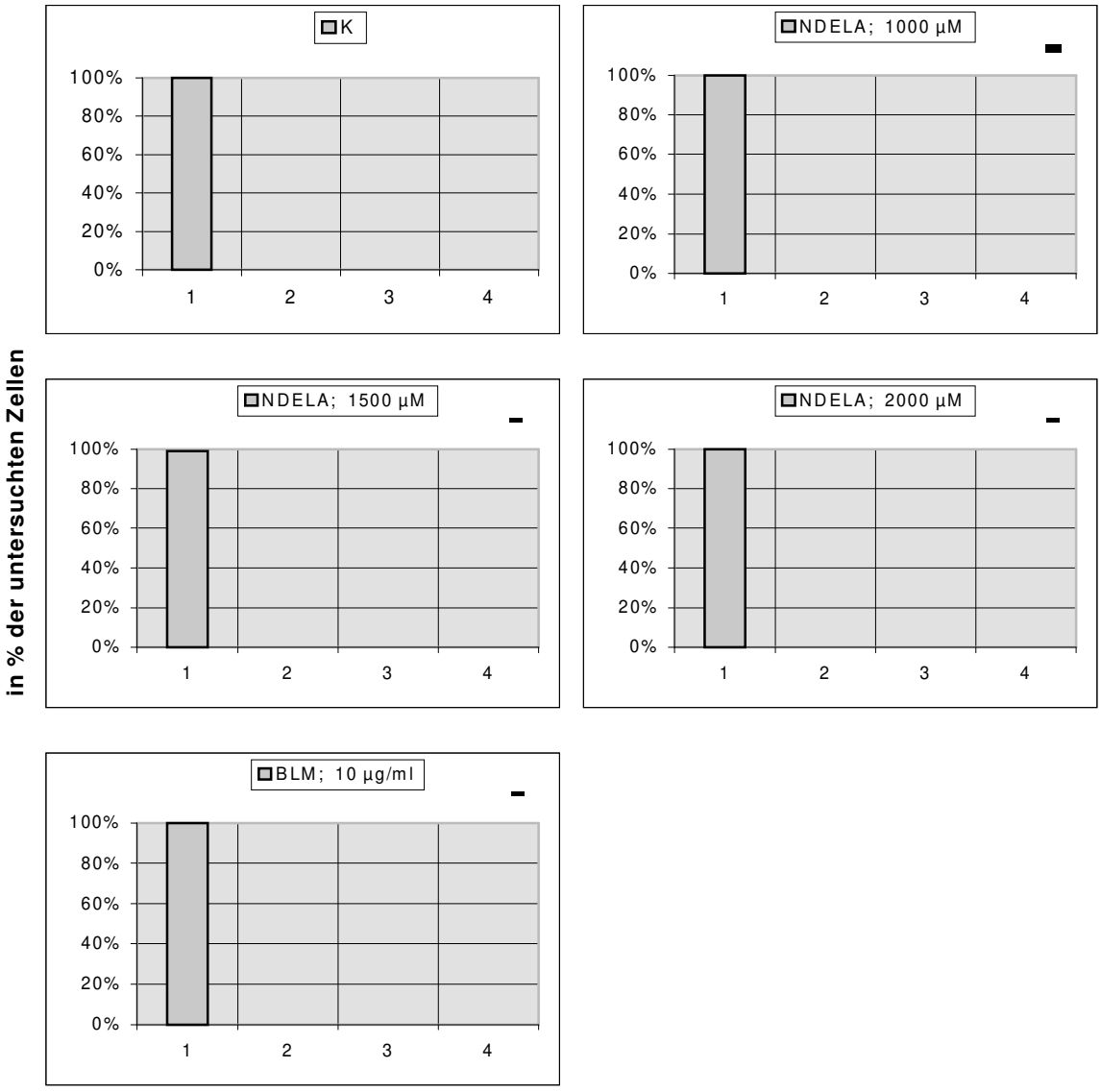


Abb. 4.31 Wirkung von NDELA bzw. Bleomycin auf die Verteilung von G_0-PCCs auf vier Kondensationsgrade. K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.3.2.3 ZELLKINETIK

NDELA bewirkt keine Proliferationshemmung gegenüber der Kontrolle. Der Anteil an Zellen im dritten Zellzyklus (ZZ III$^+$) überwog bei allen Konzentrationen deutlich den Anteil an Zellen im ersten (ZZ I) und zweiten Zellzyklus (ZZ II). Es trat nach Inkubation mit NDELA keine statistisch signifikante Verschiebung der Verteilung der PHA-stimulierten Lymphozyten innerhalb der Zellzyklusphasen ein.

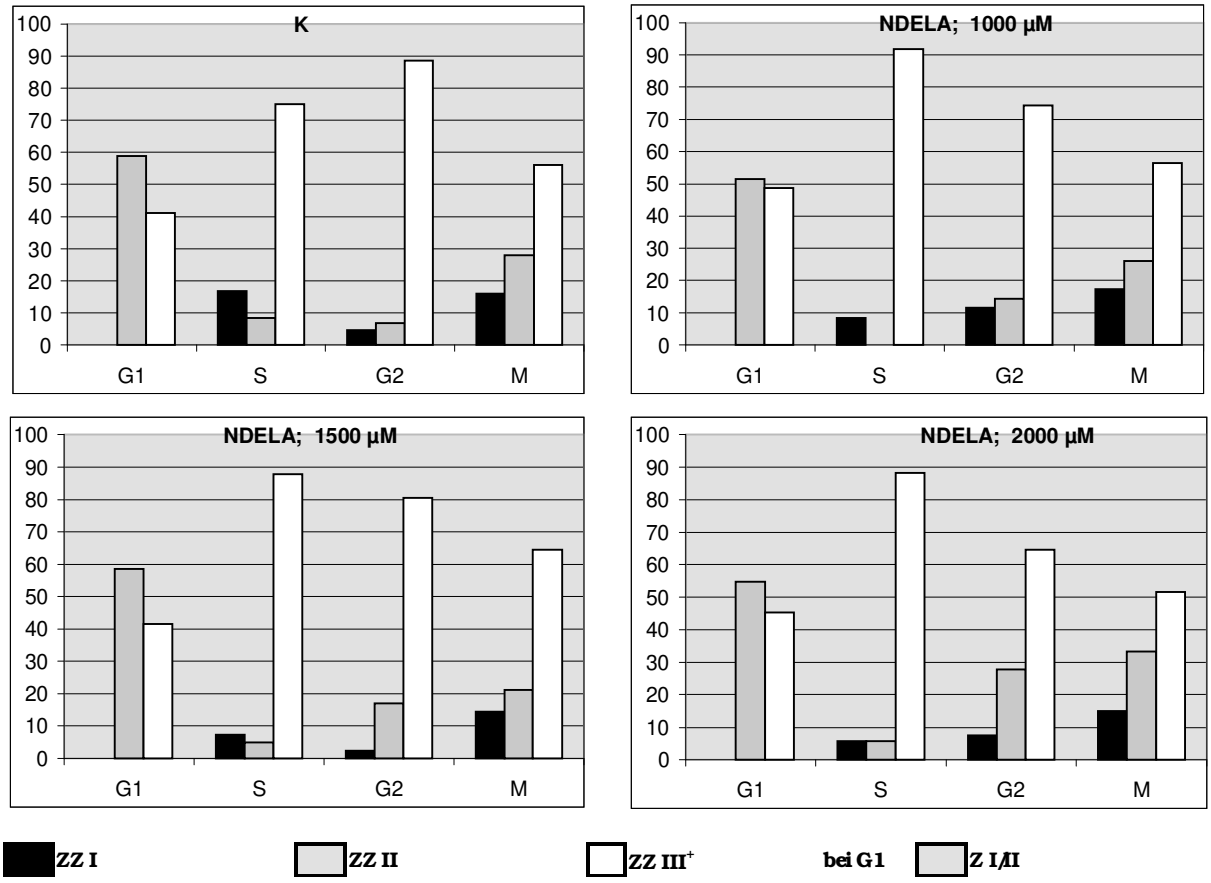


Abb. 4.32 Verteilung der PCCs bzw. Metaphasen auf die Zellzyklusphasen (G_1, S, G_2 und M) und Teilungszyklen (ZI, ZII, ZIII$^+$) nach Behandlung mit NDELA

4.3.2.4 VERGLEICH DER ABERRATIONSHÄUFIGKEITEN BEI METAPHASEN UND G_2-PCCS

Untersucht wurden die nach NDELA-Inkubation induzierten Aberrationen von G_2-PCCs und Metaphasechromosomen beim Passieren des ersten Zellzyklus. Auf die Schwierigkeit bei der Auswertung der Aberrationen von G_2-PCCs und mitotischen Chromosomen wurde bereits in Kapitel 4.2.2.5 hingewiesen. Durch den geringen Anteil von Zellen im ersten Zellzyklus war die Auswertung von nur wenigen Zellen möglich. Das Auftreten von 1 Bruchereignis wurde nur in einer G_2-PCCs der Kontrolle festgestellt. Bei allen übrigen Konzentrationen wurden weder Bruchereignisse noch das Auftreten von Austauschfiguren beobachtet. Abbildung 4.33 zeigt das Auftreten von Aberrationen bei G_2-PCCs in der Kontrolle.

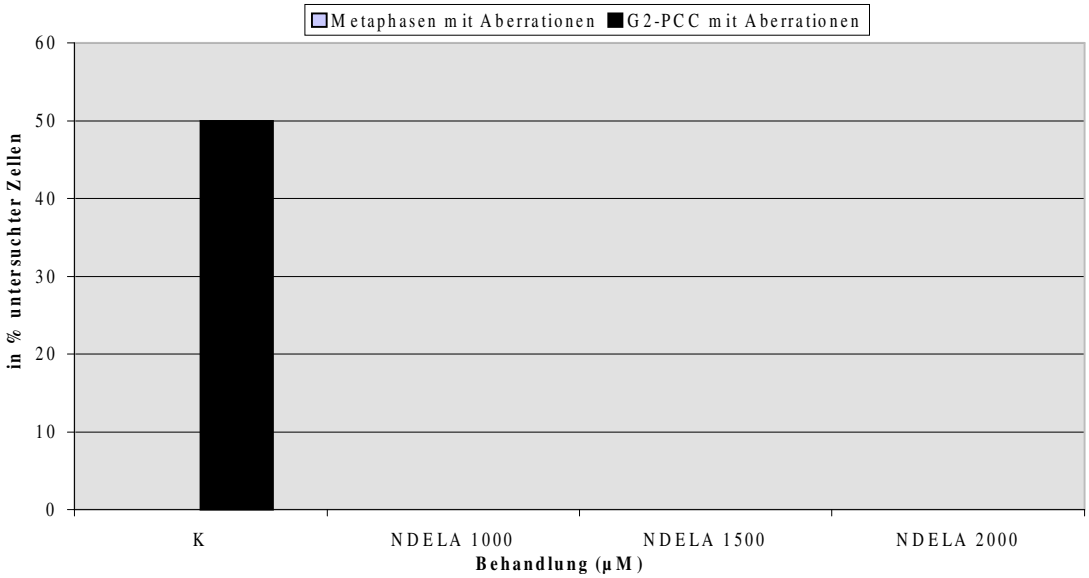


Abb. 4.33 Vergleich der Häufigkeit von Aberrationen bei Metaphasen im ersten Teilungszyklus und G_2-PCCs beim Durchlaufen des ersten Zellzyklus nach Inkubation der Zellen mit NDELA. K = Kontrolle,
NDELA = N-Nitrosodiethanolamin

4.4 UNTERSUCHUNGEN VON MITOMYCIN C UND DIETHYLSTILBESTROL

4.4.1 ANALYSE DER METAPHASE-CHROMOSOMEN

Die strukturelle Chromosomenanalyse wurde an Lymphozyten aus 48 Stunden-Vollblutkulturen durchgeführt, die im Ruhestadium des Zellzyklus mit Mitomycin C und Diethylstilbestrol behandelt worden waren. Gaps wurden getrennt aufgeführt und nicht als Aberrationen gewertet. Es wurden ausschließlich Metaphasen im ersten Teilungszyklus nach Mutagenapplikation analysiert.

4.4.1.1 MITOMYCIN C-VERSUCHE

Abbildung 4.34 A vergleicht den prozentualen Anteil an aberranten Zellen und Aberrationen insgesamt in den untersuchten Zellen. Mitomycin C induzierte konzentrationsabhängig eine Zunahme der Anzahl aberranter Metaphasen. Die Mitomycin C-Behandlung von Vollblut bewirkte bei 2µM in den Lymphozyten im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine signifikante Erhöhung der Anzahl aberranter Metaphasen. Ab 6µM wurde die Zahl an geschädigten Metaphasen hoch signifikant gesteigert. Bei der MitomycinC Konzentration von 6µM waren fast in einem Drittel der untersuchten Metaphasen Aberrationen zu finden. Bei höheren MMC-Konzentrationen ergab sich eine Zunahme mehrfach geschädigter Metaphasen. Ab 2µM wurden Aus-tauschereignisse und Bruchereignisse beobachtet. Wie Abbildung 4.34 B zeigt, wurden bis 6µM annähernd gleich viele Chromatidtyp- wie Chromosomentyp-Aberrationen induziert. Die Anzahl von Brüchen nahm mit steigender MMC-Konzentration zu (Abb 4.34). Ab 2µM wurde das Auftreten von Chromatid-brüchen und Chromosomenbrüchen beobachtet. Bei 6µM traten mehr Chromo-somen- als Chromatidbrüche auf; in 18,6% der untersuchten Metaphasen wurden Chromatidbrüche und in 26,5% der untersuchten Mitosen Chromosomenbrüche gefunden.

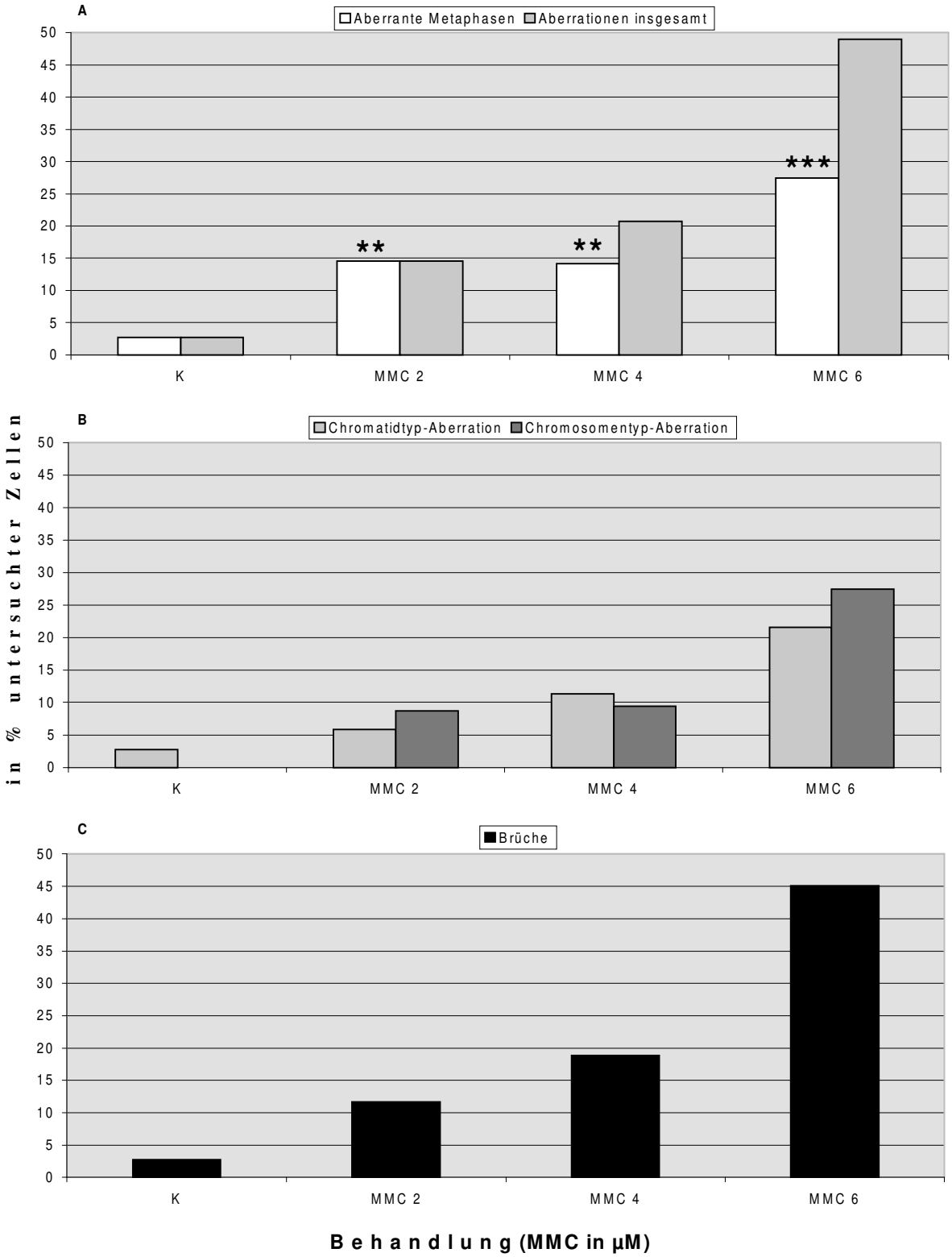


Abb. 4.34

A Vergleich der Anzahl aberrante Metaphasen und Aberrationen insgesamt
B Vergleich Chromatidtyp- und Chromosomentyp- Aberrationen
C Bruchereignisse

nach MMC–Behandlung u. anschließender 48h – Vollblutkultivierung. K = Kontrolle, MMC = Mitomycin C
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

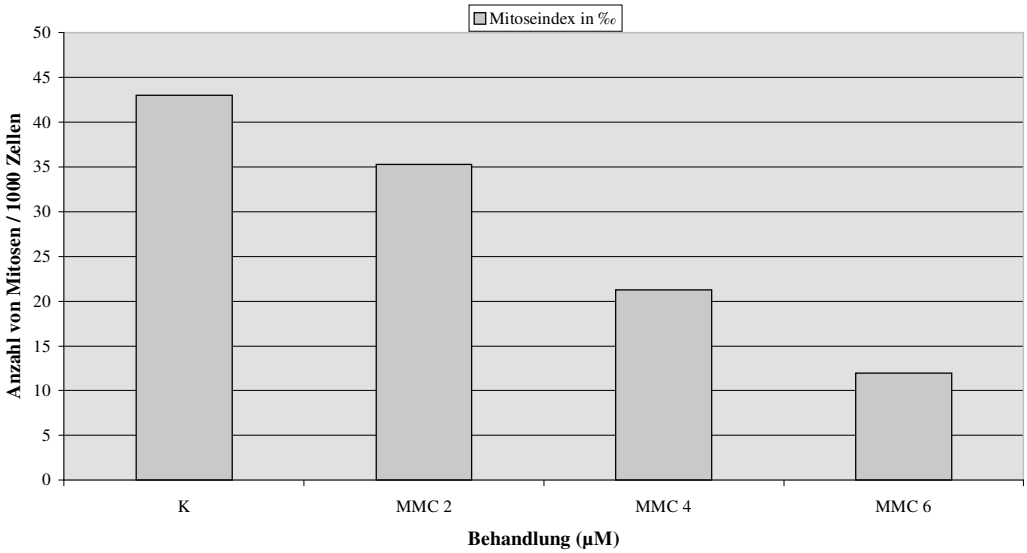


Abb. 4.35 Wirkung von Mitomycin C auf den Mitose-Index von Lymphozyten
K = Kontrolle, MMC = Mitomycin C

Abbildung 4.35 zeigt einen dosisabhängigen Rückgang der Mitose-Indices im Vergleich zur Kontrolle. In unbehandelten Lymphozyten betrug der Mitose-Index 43 ‰ und sank nach der Inkubation mit Mitomycin C in der getesteten Höchstkonzentration von 6µm auf 12 ‰.

4.4.1.2 DIETHYLSTILBESTROL-VERSUCHE

Wie Abbildung 4.36 zeigt, war nach DES-Inkubation eine leichte Zunahme des Mitose-Index im Vergleich zur Kontrolle festzustellen. Der Mitose-Index betrug in der DMSO-Kontrolle 44,7 ‰ und stieg bei einer DES-Konzentration von 100µM auf 54,3 ‰.

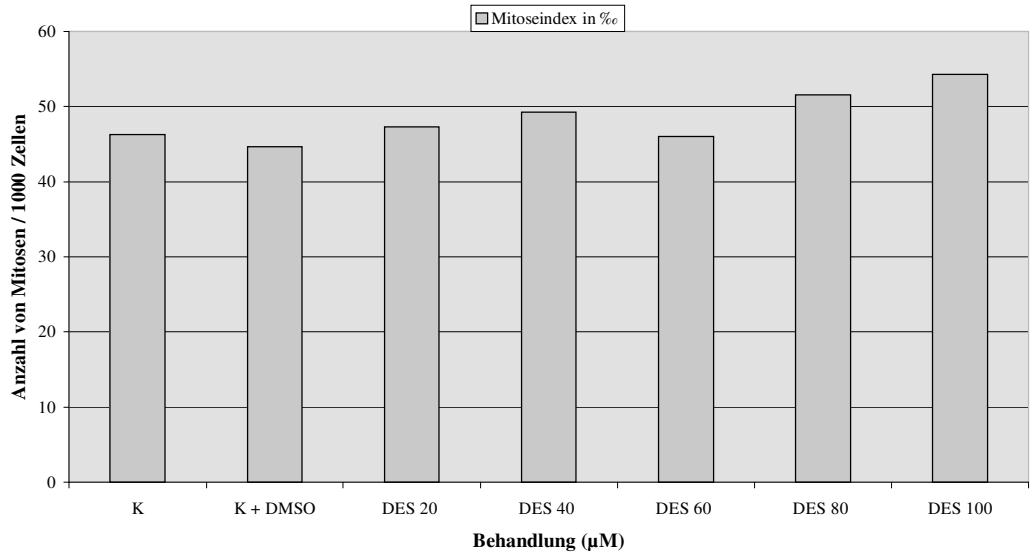


Abb. 4.36 Wirkung von Diethylstilbestrol auf den Mitose-Index von Lymphozyten.
K = Kontrolle, K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid,
DES = Diethylstilbestrol

Ein Vergleich zwischen der Anzahl aberranter Metaphasen und der Anzahl an Aberrationen nach Inkubation mit DES insgesamt zeigte, daß in den unter-

suchten Metaphasen keine Mehrfachschädigungen aufgetreten waren. Die Anzahl aberranter Metaphasen entsprach der Zahl an Aberrationen insgesamt. Die Aberrationsanalyse der Metaphasen zeigte eine leicht schwankende Anzahl an Aberrationen, die allerdings im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bei keiner der getesteten Konzentrationen signifikant war. In der Lösungsmittelkontrolle mit DMSO war die Anzahl aberranter Metaphasen im Vergleich zur Kontrolle ohne Lösungsmittel schwach signifikant erhöht (Abb. 4.37 A). Abbildung 4.37 B vergleicht die Häufigkeit von Chromatidtyp- mit Chromosomentyp-Aberrationen. Chromosomentyp-Aberrationen wurden seltener festgestellt als Chromatidtyp-Aberrationen. Ab einer DES-Konzentration von 40µM wurde das Auftreten von Chromosomentyp-Aberrationen beobachtet. Lediglich bei 60µM traten beide Aberrationsformen gleich häufig auf. Die Anzahl der beobachteten Brüche war leicht schwankend. Metaphasen mit mehr als einem Bruchereignis traten jedoch nicht auf. (Abb. 4.37 C).

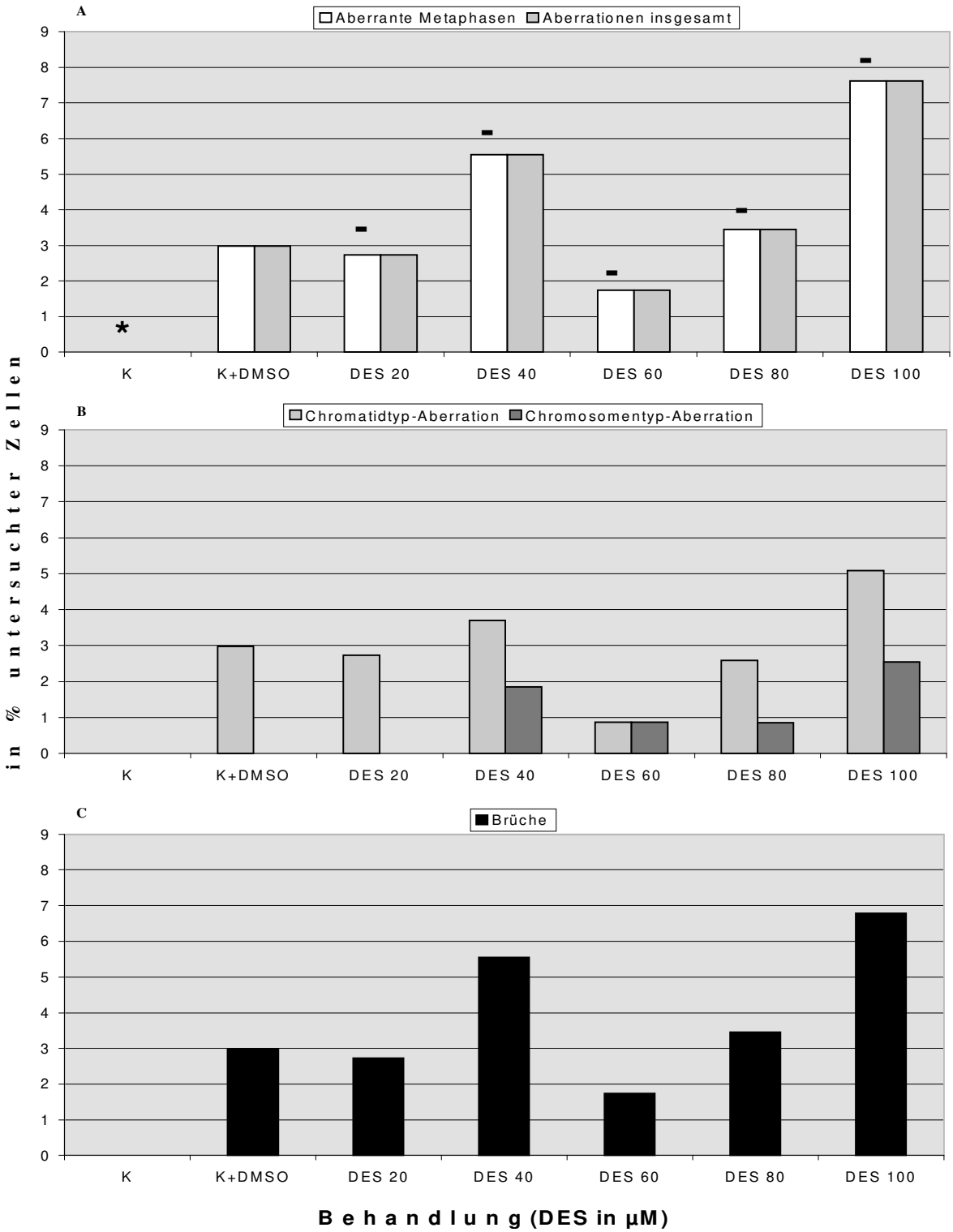


Abb. 4.37

A Vergleich der Häufigkeit von aberrantern Metaphasen und Aberrationen insgesamt
B Vergleich Chromatidtyp- und Chromosomentyp- Aberrationen
C Bruchereignisse
nach DES–Behandlung u. anschließender 48h – Vollblutkultivierung.

K = Kontrolle, K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid,
DES = Diethylstilbestrol
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.4.2 PCC-ANALYSEN

4.4.2.1 CHROMATINFRAGMENTE IN G_0-PCCS

4.4.2.1.1 MITOMYCIN C-VERSUCHE

Abbildung 4.38 zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme von geschädigten Zellen in der G_0-Phase nach Behandlung mit Mitomycin C. Ab einer MMC-Konzentration von 4µM ergab sich eine im Vergleich zur Kontrolle statistisch hoch signifikante Zunahme an PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen. Es wurde das Auftreten von 2,0 Fragmenten pro geschädigte Zelle beobachtet. Ab 4µM wurde eine leichte, allerdings statistisch nicht signifikante Verschiebung der Anzahl von Fragmenten in den geschädigten Zellen zu Häufigkeitsbereichen mit einer höheren Fragmentzahl festgestellt (Abb. 4.39).

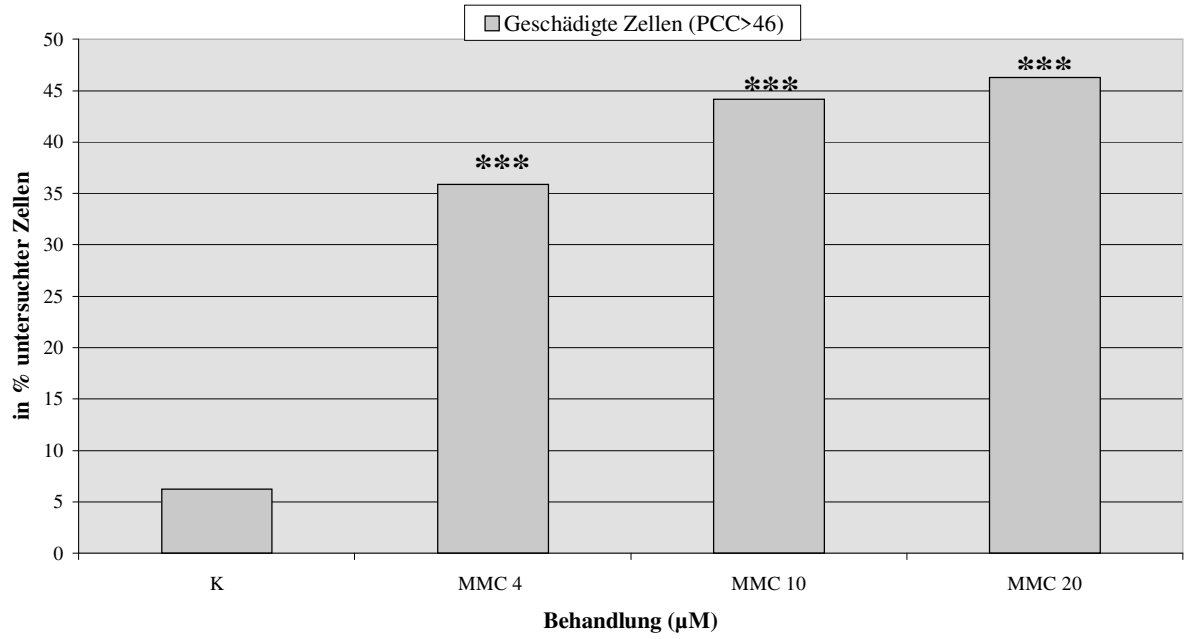


Abb. 4.38 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen (PCC>46) nach MMC-Inkubation. K = Kontrolle, MMC = Mitomycin C
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0,05$),
** = signifikant ($p \leq 0,01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0,001$)

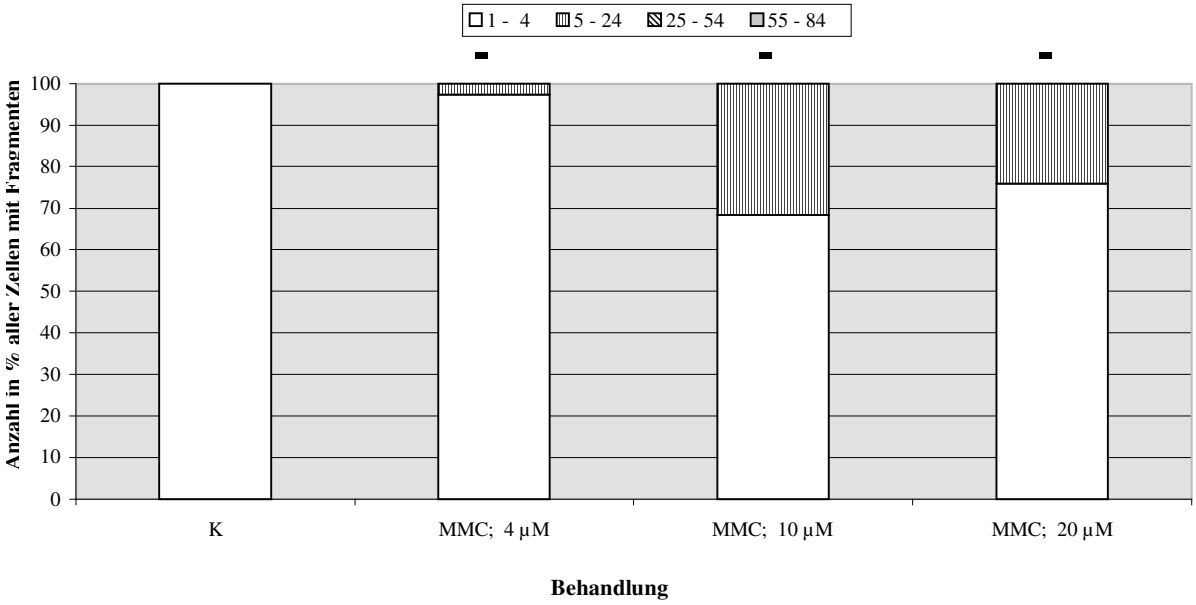


Abb. 4.39 Verteilung der Fragmente in geschädigten G_0-PCCs nach Behandlung mit Mitomycin C. K = Kontrolle, MMC = Mitomycin C
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.4.2.1.2 DIETHYLSTILBESTROL-VERSUCHE

Die Inkubation von Vollblut mit Diethylstilbestrol induzierte bei Lymphozyten in der G_0-Phase eine Zunahme an geschädigten Zellen. In der Kontrolle mit dem Lösungsmittel DMSO waren 12% der Zellen geschädigt, nach der Behandlung mit 200µM DES zeigten 26,3% der Zellen eine Schädigung. Der Unterschied zur DMSO-Kontrolle war damit schwach signifikant (Abb. 4.40). Ab einer DES-Konzentration von 50µM war eine leichte Verschiebung der Fragmentzahl der G_0-PCCs zu höheren Häufigkeitsbereichen zu erkennen (Abb. 4.41).

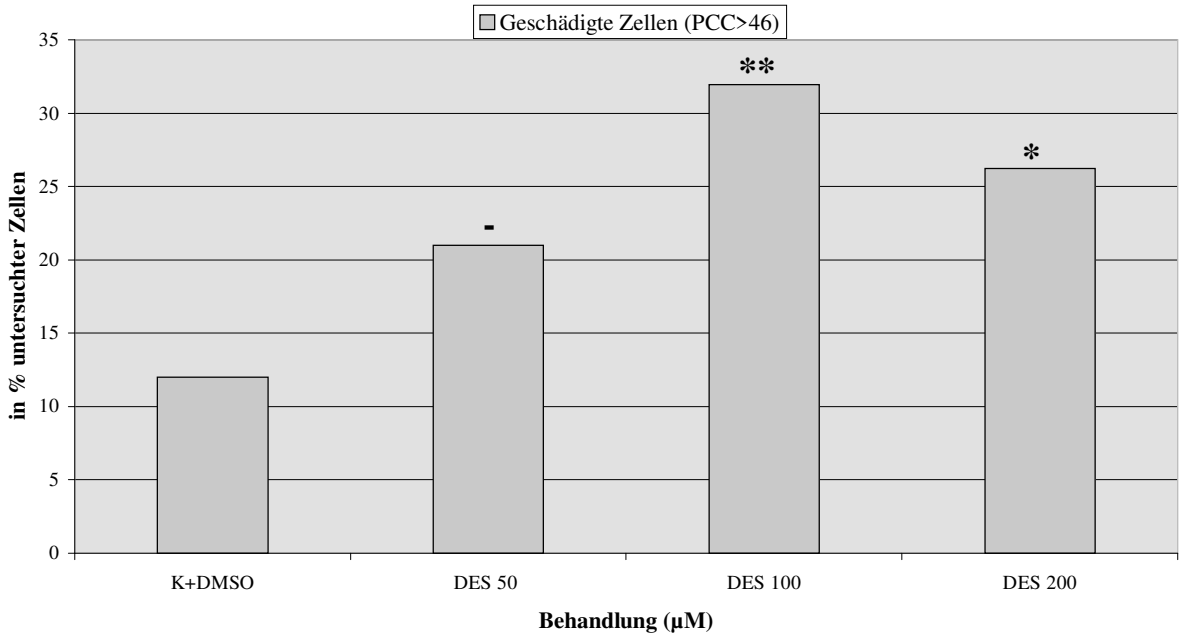


Abb. 4.40 Häufigkeit von G_0-PCC mit mehr als 46 Chromatinelementen (PCC>46) nach DES-Inkubation
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

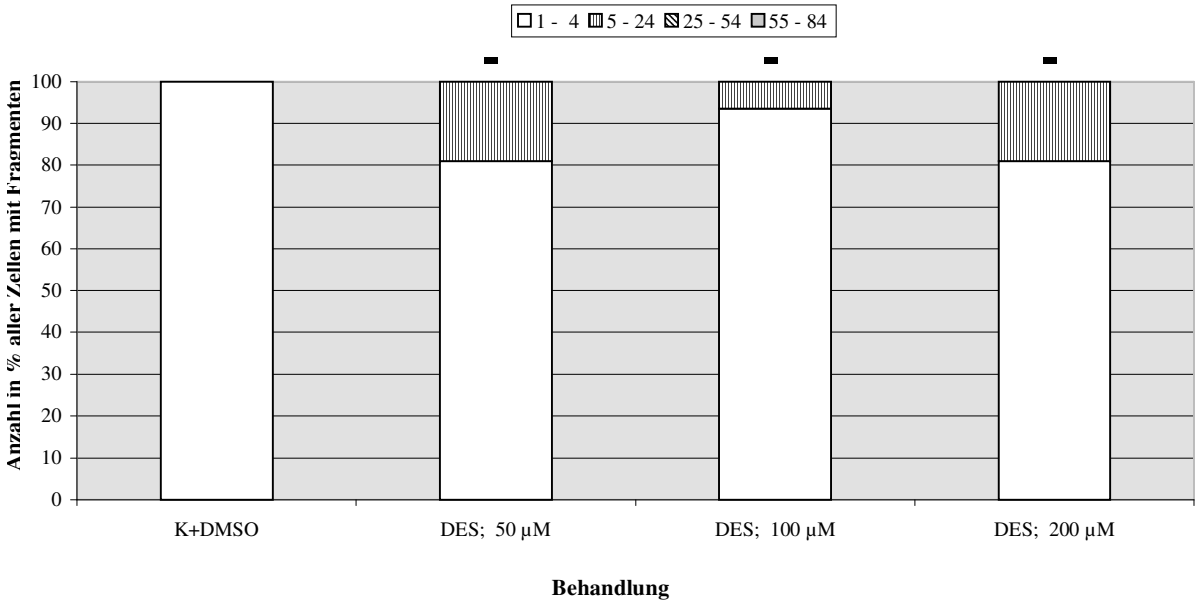


Abb. 4.41 Verteilung der Fragmente in geschädigten G_0-PCCs nach Behandlung mit Diethylstilbestrol, K+DMSO = Kontrolle + Dimethylsulfoxid,
DES = Diethylstilbestrol
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.4.2.2 KONDENSATIONSSTADIEN IN G_0-PCCS

4.4.2.2.1 MITOMYCIN C-VERSUCHE

Abbildung 4.42 stellt die Verteilung der G_0-PCCs unbehandelter Lymphozyten und von Lymphozyten nach Inkubation mit Mitomycin C auf die vier Kondensationsgrade dar. Nach der MMC-Behandlung wurde bei den G_0-PCCs eine leichte Abnahme des Kondensationsgrades beobachtet. Bei 10µM wurden G_0-PCCs in allen Kondensationsstadien gefunden. Der mittlere Kondensationsgrad der G_0-PCCs von 1,0 in der Kontrolle erhöhte sich nach Inkubation mit MMC in der Konzentration von 20µM auf 1,3. Die Verteilung der Kondensationsgrade der G_0-PCCs änderte sich bis zu 10µM nicht im Vergleich zur Kontrolle, bei 20µM wurde der Unterschied zur Kontrolle allerdings hoch signifikant.

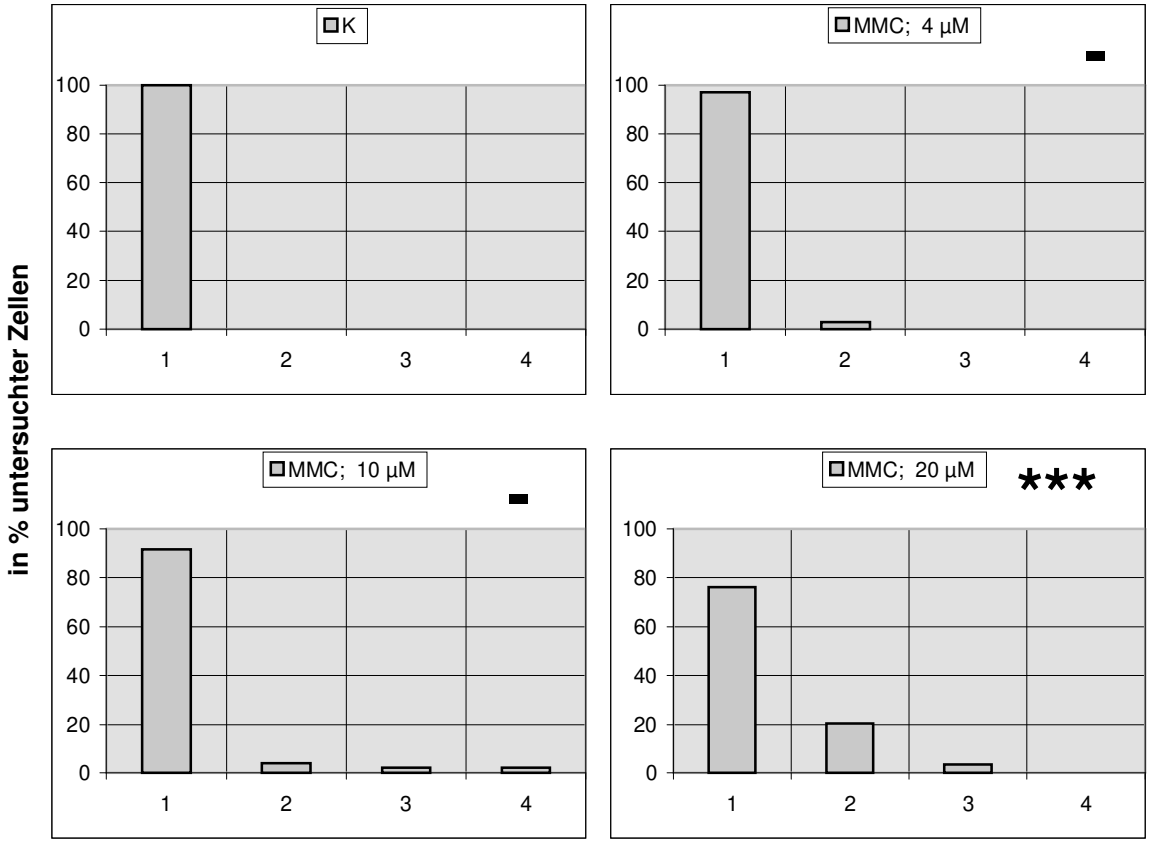


Abb. 4.42 Verteilung der G_0-PCCs auf vier Kondensationsgrade nach MMC-Behandlung im Vergleich zur Kontolle. K = Kontrolle, MMC = Mitomycin C
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.4.2.2.2 DIETHYLSTILBESTROL-VERSUCHE

In Abbildung 4.43 ist die Einteilung der G_0-PCCs in vier Kondensationsgrade nach Inkubation mit DES zu sehen. Erst bei 200µM traten G_0-PCCs in allen Kondensationsstadien auf. 58,6 der untersuchten G_0-PCCs waren stark kondensiert (Kategorie 1), 6,3% dagegen schwach kondensiert (Kategorie 4). Im

Vergleich zur DMSO-Kontrolle nahm der mittlere Kondensationsgrad von 1,1 auf 1,6 nach Inkubation mit DES (200µM) ab. Die Verteilung der G_0-PCCs auf die vier Kondensationsstadien änderte sich bei 200µM im Vergleich zur DMSO-Kontrolle hoch signifikant.

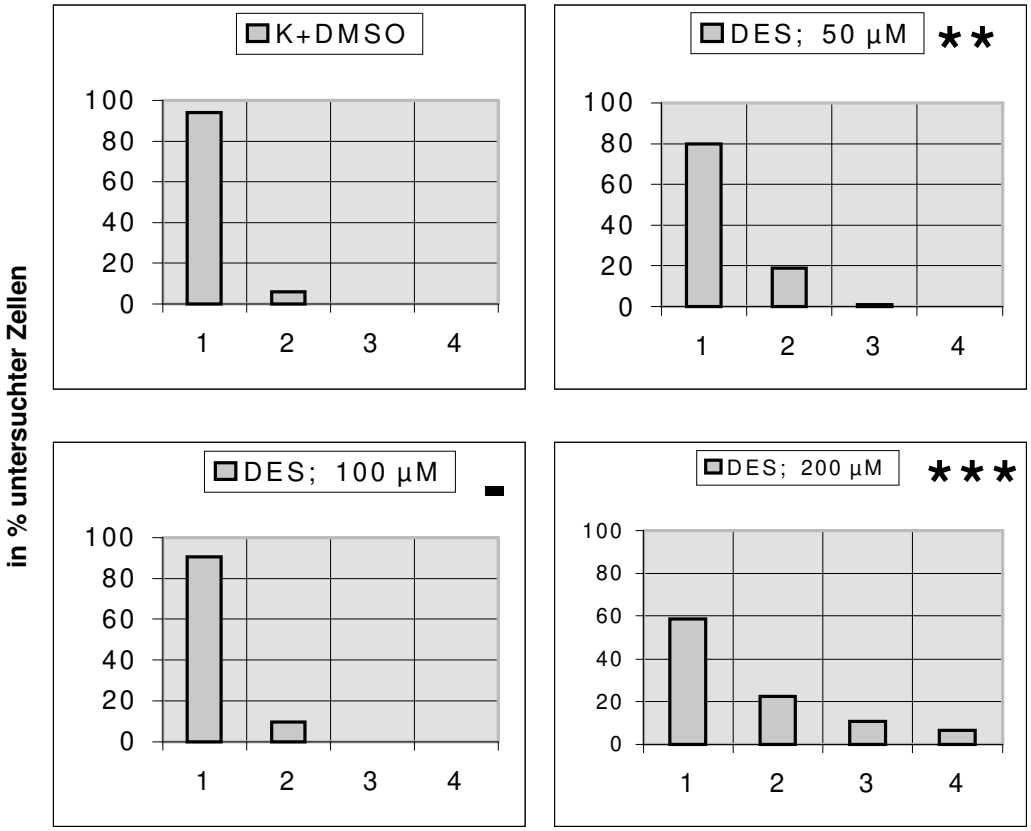


Abb. 4.43 Einteilung der G_0-PCCs nach DES-Behandlung in vier Kondensationsstadien im Vergleich zur Kontrolle. K + DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, DES = Diethylstilbestrol
(statistische Auswertung im χ^2-Test)
- = nicht signifikant, * = schwach signifikant ($p \leq 0{,}05$),
** = signifikant ($p \leq 0{,}01$), *** = hoch signifikant ($p \leq 0{,}001$)

4.5 VERGLEICHENDE DARSTELLUNG DER SCHÄDIGUNG IN G_0-PCCS UND IN METAPHASECHROMOSOMEN

Abbildung 4.44. vergleicht die Häufigkeit der Schädigung von G_0-PCCs und Metaphasen aus 48h-Vollblutkulturen nach Inkubation mit Crotonaldehyd, trans-2-Hexenal, N-Nitrosodiethanolamin, Diethylstilbestrol und Mitomycin C. Positive Kontrollsubstanz war Bleomycin (10µg/ml). Als geschädigt wurden alle die G_0-PCCs gewertet, die mehr als 46 Chromatinelemente aufwiesen. Metaphasen wurden dann als geschädigt bezeichnet, wenn Bruch- und/oder Austauschereignisse beobachtet wurden. Das Auftreten von Gaps wurde nicht als Aberration gewertet und blieb bei der vergleichenden Darstellung unberücksichtigt. **Bei der Analyse der G_0-PCCs wurden mehr Schädigungen erkannt, als bei der konventionellen Metaphase-Analyse:** Nach Inkubation mit Crotonaldehyd in der Konzentration von 240µM wurden bei der PCC-Analyse etwa fünfmal soviel geschädigte G_0-PCCs wie bei der Metaphasen-

Analyse beobachtet. Nach Inkubation mit *trans*-2-Hexenal (150µM) traten geschädigte PCCs etwa fünfmal häufiger auf als aberrante Metaphasen. Bei der Untersuchung der G_0-PCCs wurden nach Behandlung mit NDELA (2000µM) etwa fünfzehnmal soviel geschädigte Zellen wie aberrante Metaphasen beobachtet. Die Inkubation mit MMC (4µM) zeigte bei der PCC-Analyse mehr als doppelt soviele geschädigte Zellen wie bei der Analyse der Metaphasen. Zur Analyse struktureller Aberrationen von Metaphasechromosomen wurde MMC in den Konzentrationen von 2µM bis 6µM und DES von 20µM bis 100µM eingesetzt. Für die PCC-Studien wurden MMC und DES jedoch teilweise in höheren Konzentrationen eingesetzt. Daher ist eine vergleichende Darstellung der Schädigung in G_0-PCCs und Metaphase-Chromosmen nur für die Konzentrationen von 4µM bei MMC und 100µM bei DES möglich. Nach DES-Behandlung (100µM) traten etwa viermal so viele geschädigte G_0-PCCs wie geschädigte Metaphasen auf. Bei der Analyse der G_0-PCCs wurden nach Inkubation mit Bleomycin (10µg/ml) etwa achtmal soviel geschädigte Zellen gefunden wie bei der Untersuchung der Metaphasen. Das Ausmaß der Schädigung, die durch die jeweilige Mutagenbehandlung induziert wurde, wurde allerdings erst deutlich, wenn die Häufigkeit der Fragmente pro untersuchte Zelle betrachtet wurde. Abbildung 4.45 vergleicht die Anzahl von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen mit der Anzahl von Fragmenten pro unter-

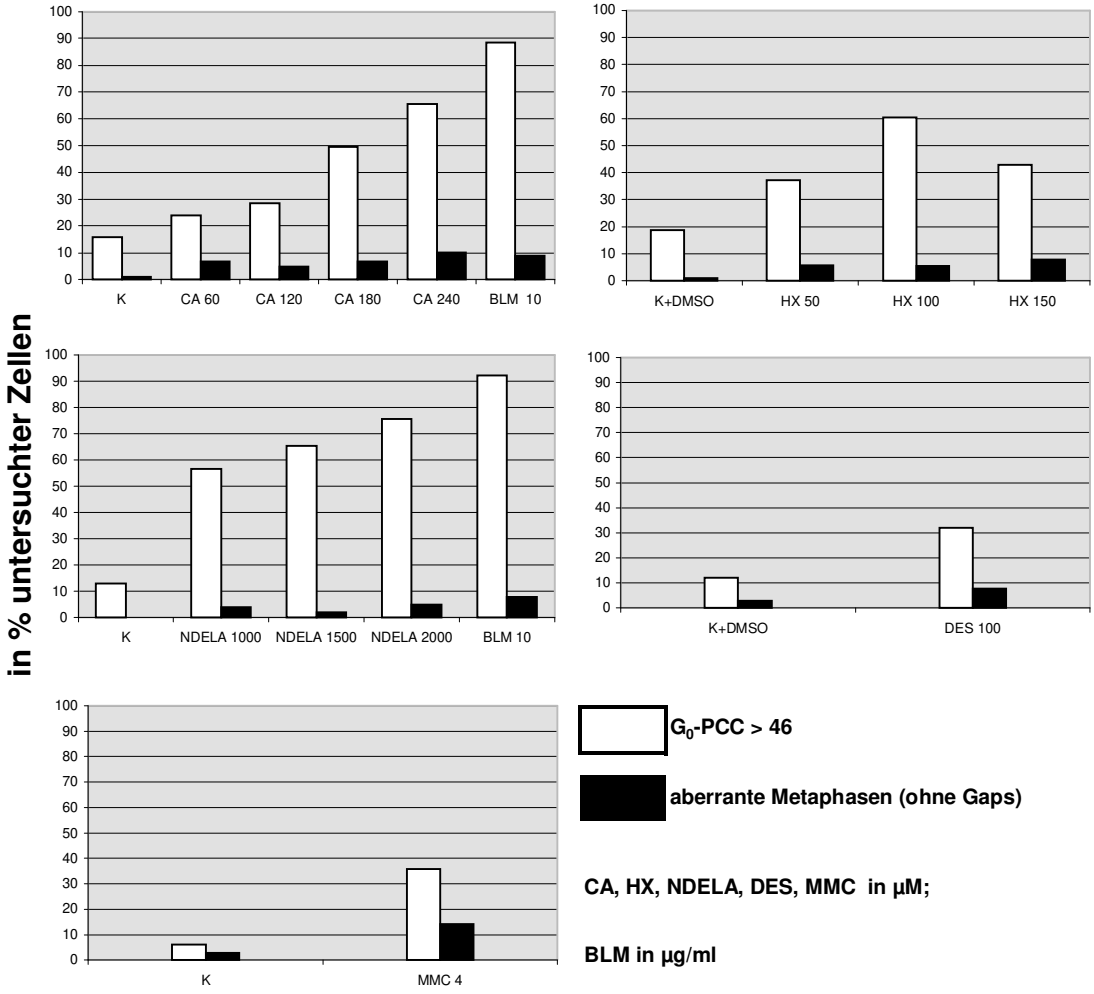


Abb.4.44 Häufigkeit geschädigter G_0-PCCs (PCC>46) und aberranter Metaphasen nach Inkubation mit CA, HX, BLM, NDELA, MMC und DES. K = Kontrolle, K+DMSO = Kontrolle + Dimethylsulfoxid, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin, HX = *trans*-2-Hexenal, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, MMC = Mitomycin C, DES = Diethylstilbestrol

suchte Zelle. Es zeigte sich, daß die Behandlung mit Bleomycin (10µg/ml) bei allen G_0-PCC-Analysen die höchste Fragmentzahl pro untersuchte Zelle (ungeschädigte + geschädigte) induzierte. In Vollblut war die Schädigung nach Behandlung mit Bleomycin (10µg/ml) etwa um die Hälfte geringer als in isolierten Lymphozyten. Im folgenden soll die Wirkung der Höchstkonzentration der jeweiligen Testsubstanz betrachtet werden. Crotonaldehyd (240µM) induzierte 1,7 Fragmente pro untersuchte Zelle (Abb. 4.45 A) und trans-2-Hexenal (150µM) bewirkte 2,0 Fragmente pro untersuchte Zelle (Abb 4.45 B). NDELA (2000µM) führte nach Inkubation in Vollblut zu 4,1 Fragmenten pro untersuchte Zelle (Abb. 4.45 C) und in isolierten Lymphzyten zu 3,0 Fragmenten pro untersuchte Zelle (Abb. 4.45 D). Die Behandlung mit Diethylstilbestrol (200µM) induzierte 0,7 Fragmente pro untersuchte Zelle (Abb. 4.45 E); nach Inkubation mit Mitomycin C (20µM) wurden 1,5 Fragmente pro untersuchte Zelle gezählt (Abb. 4.45 F). Die Kontrolle wies 0,1 bis 0,3 Fragmente pro untersuchte Zelle auf (Abb. 4.45 A, C, D, E) und die Zugabe von Dimethylsulfoxid erhöhte die Anzahl auf 0,2 bzw 0,4 Fragmente pro untersuchte Zelle (Abb. 4.45 B und F).

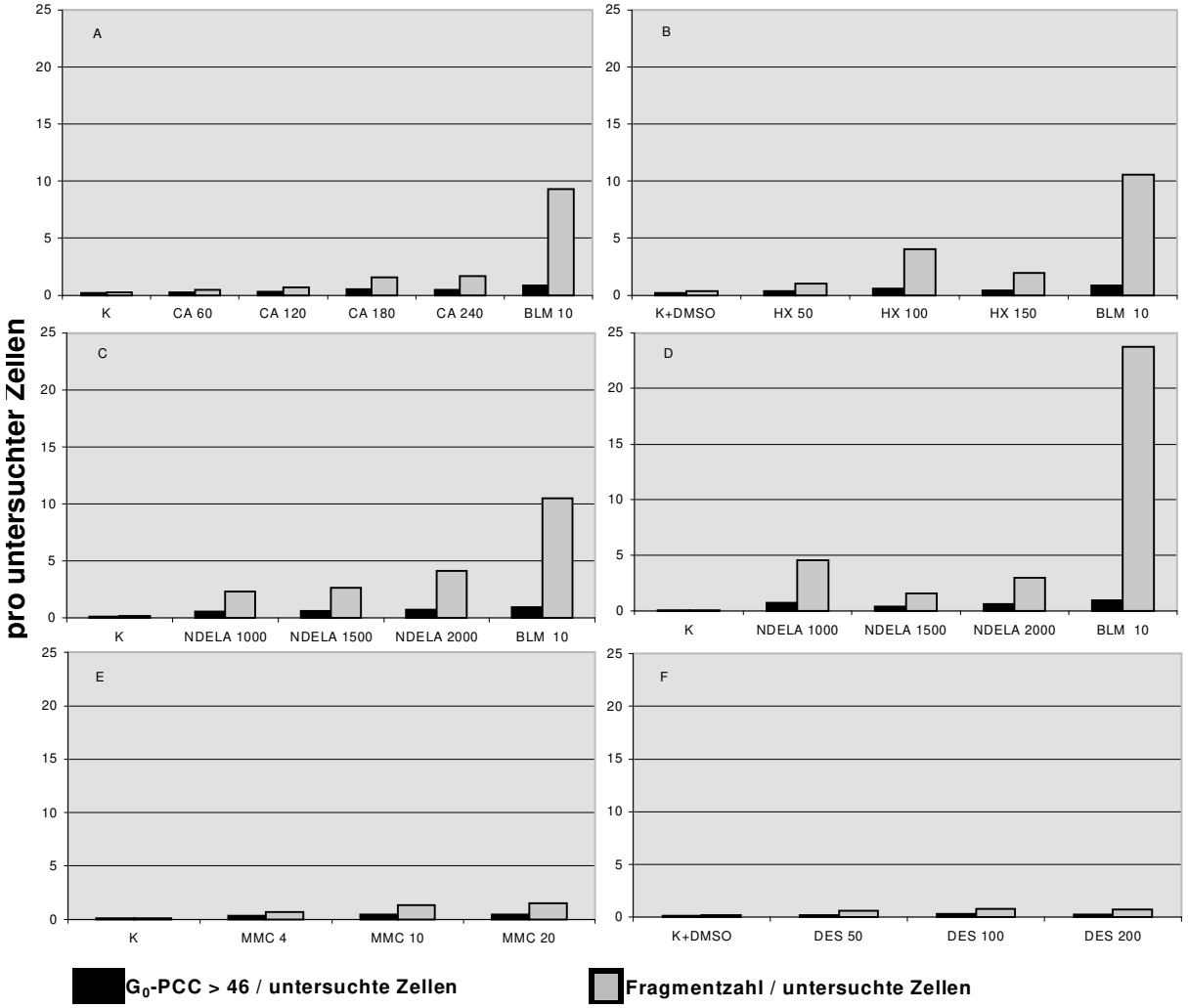


Abb.4.45 Vergleich zwischen der Anzahl von G_0-PCC mit mehr als 46 Chromatinelementen (PCC>46) pro untersuchter Zelle und der Anzahl von Fragmenten pro untersuchter Zelle nach Inkubation mit Crotonaldehyd, Bleomycin, trans-2-Hexenal, NDELA, Mitomycin C und Diethylstilbestrol. K = Kontrolle, K+DMSO = Kontrolle + Dimethylsulfoxid, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin, HX = *trans*-2-Hexenal, NDELA= N-Nitrosodiethanolamin, DES= Diethylstilbestrol, MMC= Mitomycin C

5 DISKUSSION

5.1 VORTEILE DER PCC-TECHNIK

Die Chromosomenaberrationen, die in der Metaphase beobachtet werden, sind das Resultat multipler Mechanismen. Verschiedene Parameter, wie die chemische Reaktivität eines Mutagens, seine Wechselwirkungen mit der DNA und DNA-assoziierten Proteinen und der Einfluß von Reparaturvorgängen bestimmen das Auftreten von chromosomalen Aberrationen (Nowak, 1983). Die Anzahl von Aberrationen, die während der Mitose sichtbar wird, ist eine Funktion des anfänglichen Ausmaßes induzierter Aberrationen, des Grades der Reparaturmechanismen, die während der Zeit bis zum Eintritt der Zellen in die Mitose wirksam werden können und der Kapazität dieser Zellen, bestimmte Kontrollpunkte des Zellzyklus zu passieren, um die Mitose zu erreichen (Hittelman und Pandita, 1994).

Der Einsatz der Technik der vorzeitigen Chromosomenkondensation hat das Spektrum cytogenetischer Untersuchungsmethoden erheblich erweitert. Gerade in der Mutagenitätstestung kommt dem Faktor Zeit eine bestimmende Rolle zu. Daher gilt es, den Zeitraum zwischen Mutagenexposition und Analyse möglichst kurz zu halten. Das Ausmaß einer chromosomalen Schädigung wird umso exakter erfaßbar, je kürzer der Zeitraum zwischen der DNA-Schädigung und der cytogenetischen Untersuchung und damit für mögliche Reparaturprozesse ist.

Ein großer Vorteil der PCC-Technik ist, daß die Untersuchungen auch auf nicht-proliferierende Zellen ausgedehnt werden können. Innerhalb von etwa einer Stunde kann mit der PCC-Methode eine vorzeitige Kondensation des Interphasechromatins in chromosomenähnliche Strukturen induziert werden. Damit können Aberrationen festgestellt werden, bevor die Zellen das Mitosestadium erreichen.

Durch Kombination der PCC-Technik mit weiteren Methoden (FPG-Methode, C-Bänderung, Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung) kann das Untersuchungsspektrum erweitert und die mikroskopische Analyse erleichtert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden Substanzen gewählt, denen der Mensch über Nahrung oder Umwelt exponiert ist. Die Wirkung von α,β-ungesättigten Aldehyden bzw. von NDELA auf Lymphozyten in der G_0-Phase ist kaum bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-schädigende Wirkung dieser Substanzen auf chromosomaler Ebene untersucht. Ergänzend dazu wurden Untersuchungen mit den Klastogenen Bleomycin und Mitomycin C und dem Aneugen Diethylstilbestrol durchgeführt. Die Ergebnisse der PCC-Induktion wurden mit den Resultaten der konventionellen Metaphasen-Analyse verglichen.

5.2 WAHL DES ZELLSYSTEMS

In Mutagenitätsstudien werden oft Zellinien wegen ihrer leichten Verfügbarkeit eingesetzt. Allerdings wird in Zellen, die über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, häufig das Auftreten genetischer Instabilitäten beobachtet. Die Zellen des männlichen Indischen Muntjaks weisen nur sieben Chromosomen auf und erscheinen aufgrund ihrer geringen Chromosomenzahl für Mutagenitätsstudien vorzeitig kondensierter Chromosomen besonders

geeignet. Es zeigte sich allerdings, daß diese Zellinie eine hohe spontane Aberrationsrate aufwies (Tittelbach *et al.,* 1989).
Die Effizienz der PCC-Induktion ist unabhängig vom Alter der Kultur (Yanishevsky und Carrano, 1975). Allerdings gibt es Hinweise darauf, daß bei humanen Zellen die Fähigkeit zu fusionieren abnimmt, wenn sie kultiviert werden (Röhme, 1981). Außerdem wird berichtet, daß die Reparaturkapazität von Zellen mit zunehmender Kultivierungsdauer sinkt (Sognier und Hittelman, 1983).
Für die PCC- und Metaphase-Studien der vorliegenden Arbeit wurde als Untersuchungsmaterial humanes peripheres Vollblut eingesetzt. Periphere Blutlymphozyten eignen sich sehr gut, um die genotoxische Wirkung von Umweltgiften (Mutagenen/Karzinogenen) und Arzneimitteln (antitumorale Substanzen) zu untersuchen (Barret *et al.*, 1995). Mononukleäre Zellen des Blutes gesunder Personen bilden eine synchrone Zellpopulation in der Ruhephase des Zellzyklus, dem G_0-Stadium. Bei einer Mutagenbehandlung können in vivo Verhältnisse am einfachsten dadurch simuliert werden, daß man die Zellen *vor* der Mitogenstimulation mit der Testsubstanz inkubiert (Luomahaara und Norppa, 1994).
Mononukleäre Zellen des Blutes sind besonders geeignet für Mutagenitätsstudien (Hittelman, 1984). Das Interphasechromatin ungeschädigter humaner Lymphozyten in der G_0-Phase kondensiert nach PCC-Induktion in 46 einzeln unterscheidbare chromosomale Strukturen. Der Einsatz von Vollblut stellt für Mutagenitätssudien im Vergleich zu isolierten Lymphozyten das geeignetere Testsystem dar, da *in vivo* Verhältnisse besser repräsentiert werden (Migliore *et al.*, 1989; Ellard und Parry, 1993).

5.3 STRUKTURELLE ABERRATIONEN MITOTISCHER CHROMOSOMEN

In der vorliegenden Arbeit wurden 48 Stunden-Kulturen und für Crotonaldehyd und N-Nitrosodiethanolamin (NDELA) zusätzlich 73 Stunden-Kulturen angelegt. Die 73 Stunden-Kulturen wurden für 48 Stunden zunächst in FKS-freiem RPMI 1640-Medium kultiviert. Da Serumproteine die Wirkung von Mutagenen beeinflussen können, wurden die 73 Stunden-Vollblutkulturen für 48 Stunden zunächst bis zur Mutagenapplikation in RPMI 1640-Medium ohne Zusatz von fetalem Kälberserum (FKS) inkubiert. Der Verzicht auf FKS wirkte sich nicht negativ auf verschiedene Parameter, wie z.B. die Mitose-Rate oder die Qualität der Metaphasen aus. Die Anwesenheit von FKS oder anderer Seren in Vollblutkulturen ist keine Voraussetzung, um gute Chromosomenpräparate zu erhalten (Mutchinick *et al.*, 1980).
Bei den 48 Stunden-Kulturen wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Metaphasen im ersten Teilungszyklus ausgewertet, da einige chromosomale Aberrationen instabil sind und bei der ersten Zellteilung verlorengehen können (Buckton und Evans, 1973).
In der Literatur differieren die Angaben über die Häufigkeit von Metaphasen im zweiten Teilungszyklus in 48 Stunden-Kulturen. Bei einigen Probanden war das Auftreten von Metaphasen im zweiten Teilungszyklus nicht zu beobachten, bei anderen Testpersonen erreichten sie 50% (Crossen und Morgan, 1978; Andersson, 1993). In der vorliegenden Arbeit durchliefen 80,6% bis 96,8% der untersuchten Metaphasen aus den Kontrollansätzen den ersten Teilungszyklus.
In dieser Arbeit wurde die chromosomale Schädigung in Chromatidtyp- und Chromosomentyp-Aberrationen unterschieden. Inwieweit Gaps als strukturelle Chromosomenaberrationen zu werten sind, wird kontrovers diskutiert. Gaps

können in zwei morphologisch nicht zu unterscheidende Typen eingeteilt werden – in den klastogenen Typ, welcher durch eine DNA- Schädigung induziert wird und in den turbagenen Typ, der nicht durch eine DNA-Schädigung hervorgerufen wird (Brøgger, 1982). Hittelman und Rao (1974 c) setzten die PCC-Methode und die Analyse mitotischer Chromosomen ein und verglichen die Häufigkeiten von Gaps bei CHO-Zellen nach UV-Bestrahlung und nach Behandlung mit alkylierenden Substanzen. Sie schlossen aus den Ergebnissen auf die Existenz von zwei Typen von Gaps. Der eine Typ ist auf eine Veränderung in der ersten Stufe der Chromatinkondensation zurückzuführen und beinhaltet eine Schädigung der DNA. Der zweite Typ resultiert aus einer Störung in einem späteren Stadium während der Faltung der Chromatinfiber. Dies interferiert mit der Chromosomenkondensation und könnte in Zusammenhang stehen mit Effekten auf den mitotischen Apparat und zu Fehlern bei der Segregation des genetischen Materials führen (Brøgger, 1982). Achromatische Läsionen oder Gaps wurden zum ersten Mal von Revell (1959) getrennt von echten Brüchen gezählt. Er hielt sie nicht für echte Diskontinuitäten, sondern für kurze ungefärbte Regionen innerhalb der Chromatiden (Revell, 1959, in: Brøgger, 1982). Hsu *et al.* (1996) vermuteten, daß die Dislokation eines Bruchstücks das Ergebnis eines Präparationsartefaktes aufgrund des eingesetzten Spindelgiftes Colcemid sein könnte. Rattner und Mitarbeiter (1988) wiesen nämlich ein Protein nach, das offensichtlich die Schwesterchromatiden bis zum Eintritt der Zellen in die Anaphase zusammenhält. In Colcemid-arretierten Zellen war dieses Protein zerstört.

Der Einbau von BrdU kann bereits fragile Stellen erzeugen, die morphologisch sehr ähnlich den Aberrationen sind, welche als achromatische Läsionen oder Gaps bezeichnet werden (Übersichtsartikel von Morris, 1991). In der vorliegenden Arbeit wurden daher Gaps nicht den chromosomalen Aberrationen zugerechnet, sondern getrennt aufgeführt.

Zwei bekannte Systeme zur Einteilung von Aberrationen bei Metaphasechromosomen sind das „Clatham Barrs Inn Conference (CBIC) System“ und das „International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN)“ (Hsu *et al.*, 1996). Das CBIC-System wertet alle diejenigen Aberrationen als Brüche, bei denen der ungefärbte Bereich zwischen den Enden der gebrochenen Chromatiden gleich oder länger ist als die Breite einer Chromatide, während nach dem ISCN-System Brüche erst als solche gezählt werden, wenn eine Dislokation der beiden Chromatidenden vorliegt. In allen übrigen Fällen werden die Lücken als Gaps bezeichnet. Um Bruchereignisse deutlich von dem Vorliegen von Gaps abzugrenzen, wurden Aberrationen in der vorliegenden Arbeit dann als Brüche bezeichnet, wenn sie den Kriterien der ISCN (1985 bzw. 1995) genügten.

5.3.1 UNBEHANDELTE ZELLEN

In unbehandelten Zellen sind echte Chromosomenaberrationen seltene Ereignisse (Gebhart, 1981). In der vorliegenden Studie wurde das Auftreten von spontanen Aberrationen in 0-2,8% der Metaphasen aus 48 Stunden-Kontrollversuchen beobachtet. Die Aberrationshäufigkeiten in der DMSO-Kontrolle und der Kontrolle ohne Lösungsmittel entsprachen einander (siehe Kapitel 4.2.1.4) oder es war eine schwach signifikante Zunahme aberranter Metaphasen in der DMSO-Kontrolle im Vergleich zur Kontrolle ohne Lösungsmittel festzustellen (siehe Kapitel 4.4.1.2). Anderson (1993)

untersuchte über einen Zeitraum von zwölf Jahren die spontane Aberrationshäufigkeit in Lymphozytenkulturen einer einzelnen Versuchsperson. Die Variationsbreite der Aberrationshäufigkeiten war gering und lag bei 0-4%.
Doppelstrangbrüche gelten als die kritischen Läsionen, die für die Induktion von Chromosomenaberrationen verantwortlich sind (Kishi, 1987; Kligerman *et al.,* 1992; Eastman und Barry, 1992), aber die Schritte bei der Umwandlung in sichtbare chromosomale Schädigung sind nicht bekannt (Bryant, 1997).

5.3.2 UNTERSUCHUNGEN MIT α,β-UNGESÄTTIGTEN ALDEHYDEN

5.3.2.1 CROTONALDEHYD

Um die Wirkung von Crotonaldehyd auf Metaphasechromosomen humaner Lymphozyten zu testen, wurden zwei Versuchsreihen angelegt. In den 48 Stunden-Vollblutkulturen erhöhte sich bei einer Crotonaldehyd-Konzentration von 240µM die Anzahl aberranter Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant (siehe Kapitel 4.2.1.2). Der Mitose-Index betrug in der Kontrollkultur 45‰ und fiel bei 240µM auf 8‰. Bei den 73 Stunden-Vollblutkulturen erfolgte die Mutagenbehandlung 48 Stunden nach PHA-Stimulation und erreichte damit Zellen in allen Zellzyklusphasen. Bei einer Konzentration von 480µM erschwerte der geringe Mitose-Index von nur 3‰ das Auffinden von Metaphasen und ermöglichte die Analyse von 21 Mitosen. Eine leichte Verschiebung zu Zellen mit mehr als einer Schädigung pro Zelle war festzustellen.

Metaphasen aus 73 Stunden-Kulturen wiesen verglichen mit Zellen aus 48 Stunden-Kulturen eine stärkere Schädigung auf. Die stärkere Schädigung könnte darauf zurückgeführt werden, daß die Zellen bei den 73 Stunden-Kulturen für mögliche Reparaturprozesse nur 24 Stunden Zeit hatten. Bei den 48 Stunden-Kulturen erfolgte die Inkubation mit den Testsubstanzen vor der PHA-Stimulierung. Während der sich anschließenden Kultivierung stand den Zellen ein Zeitraum von 48 Stunden zur Verfügung, um Schäden zu reparieren.
Dittberner (1993) stellte bei einer Crotonaldehyd-Konzentration von 250µM eine signifikante Erhöhung aberranter Metaphasen im Vergleich zu Metaphasen unbehandelter Zellen fest. Dittberner (1993) wertete allerdings im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit auch Gaps als Aberrationen.

5.3.2.2 *TRANS*-2-HEXENAL

Die Aberrationshäufigkeiten in der Kontrolle ohne Lösungsmittel und in der DMSO-Kontrolle unterschieden sich statistisch nicht signifikant. Bei der getesteten Höchstkonzentration von 150µM war die Erhöhung der Aberrationsrate schwach signifikant im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Dittberner (1993) wies nur einen geringen, aber statistisch nicht signifikanten Anstieg der Aberrationsrate nach Inkubation der Zellen mit Hexenal nach. Mit zunehmender Konzentration wurde -wie auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen-, eine leichte Verschiebung des Spektrums zu echten Brüchen deutlich.

5.3.2.3 VERGLEICH DER WIRKUNGEN VON CROTONALDEHYD UND *TRANS*-2-HEXENAL

Die Ergebnisse der Analyse von Metaphasechromosomen zeigen die DNA-schädigende Wirkung der α,β-ungesättigten Aldehyde und bestätigen damit die Beobachtungen von Dittberner. Crotonaldehyd und *trans*-2-Hexenal bewirkten einen starken Anstieg chromosomaler Aberrationen, wobei die Chromatidtyp-Aberrationen deutlich die Chromosomentyp-Aberrationen überwogen. Beide Substanzen bewirkten eine konzentrationsabhängige Zunahme der Bruchrate. Crotonaldehyd erhöhte die Aberrationsrate in Metaphasechromosomen von Lymphozyten bei 60µM und Hexenal ab 100µM schwach signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Möglicherweise bilden die beschriebenen cyclischen DNA-Addukte die Grundlage für die aldehyd-induzierten Chromosomenaberrationen.

5.3.3 N-NITROSODIETHANOLAMIN (NDELA)

Die Zielzellen der Untersuchung bildeten Metaphasen im ersten Teilungszyklus nach Mutagenbehandlung. In der Kontrollkultur betrug der Mitose-Index 45 ‰ und fiel bei 2500µM auf 22 ‰. Bei einer NDELA-Konzentration von 1000µM ergab sich ein schwach signifikanter, bei einer NDELA-Konzentration von 2000µM ein signifikanter Anstieg der Anzahl aberranter Metaphasen im Vergleich zur Kontrolle. Bei allen anderen getesteten Konzentrationen und damit auch der getesteten Höchstkonzentration von 2500µM war der Unterschied zur Kontrolle statistisch nicht signifikant (siehe Kapitel 4.3.1).

Zellen, die 73 Stunden kultiviert worden waren, waren im Vergleich zu den Zellen aus 48 Stunden-Kulturen weniger geschädigt. Weder bei den 48 Stunden- noch den 73 Stunden-Kulturen wurden Metaphasen mit mehr als einem Bruchereignis beobachtet. In der 73 Stunden-Kultur war nach einer NDELA-Inkubation von 1500µM ein Austauschereignis aufgetreten. Die im Vergleich zu den 48 Stunden-Kulturen insgesamt geringere Aberrationsrate bei den 73 Stunden-Kulturen in der vorliegenden Arbeit läßt auf einen effizienten Reparaturmechanismus gegenüber den durch NDELA gesetzten chromosomalen Schäden schließen.

Gilbert *et al.* (1981) erklärten das negative Ergebnis ihrer Mutagenitätsuntersuchungen an *Salmonella typhimurium*-Stämmen mit der hochpolaren Struktur von NDELA, die die Zellwand nicht passieren und die DNA erreichen ließe. Andere Autoren wiederum wiesen nach Aktivierung mit der Alkoholdehydrogenase (Eisenbrand *et al.*, 1984; Henn *et al.*, 1989) bzw. auch ohne Aktivierung für NDELA ein mutagenes Potential nach (Dittberner *et al.*, 1988). Der in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Ausschluß von Gaps bei der Betrachtung von chromosomalen Aberrationen muß bei dem Vergleich mit den Resultaten anderer Autoren stets berücksichtigt werden. Auch das streng gewählte Kriterium, nämlich Aberrationen nur dann als Brüche zu werten, falls eine Dislokation der beiden Chromatidenden vorliegt, gilt es ebenfalls mit einzubeziehen. In der Rattenleber wurden mit NDELA Einzelstrangbrüche induziert und damit für NDELA ein genotoxisches Potential nachgewiesen (Sterzel und Eisenbrand, 1986). Zwischen dem Auftreten von Chromosomenaberrationen und Einzelstrangbrüchen muß allerdings kein Zusammenhang bestehen, da Einzelstrangbrüche schnell repariert werden (Wolff, 1982).

5.3.4 BLEOMYCIN (BLM)

Bleomycin induziert chromosomale Aberrationen in allen Abschnitten der Interphase und sogar bei Zellen in Prophase (Vig und Lewis, 1978). Dresp *et al.* (1978) beobachteten nach Bleomycin-Behandlung von Lymphozyten in der G_0-Phase hauptsächlich Chromosomentyp-Aberrationen wie dizentrische Chromosomen und Deletionen. In der vorliegenden Arbeit wurde neben einer Erhöhung der Chromosomentyp-Aberrationen allerdings eine ebenso starke Erhöhung der Chromatidtyp-Aberrationen festgestellt. Diese sind das Ergebnis von Einzelstrangbrüchen, die nicht repariert wurden und nach der Replikation als Diskontinuitäten der Chromatiden erscheinen oder sie sind auf einen Effekt der Substanz zurückzuführen, die selbst nach Waschen der Zellen in der Zelle verbleiben kann (Vig und Lewis, 1978).

5.3.5 MITOMYCIN C (MMC)

Damit eine von einem S-Phasen-wirksamen Klastogen induzierte Schädigung als Aberration sichtbar wird, müssen die Zellen erst die DNA-Replikation passiert haben. Man erwartet daher nach Einwirkung von Mitomycin C in der $G_{0/1}$- Phase hauptsächlich Chromatidtyp-Aberrationen. Savage (1990) sieht die Einzigartigkeit der Chromatidtyp-Aberrationen für S-Phasen-abhängige Mutagene als Ergebnis eines postreplikativen Ereignisses. Savage (1990) formuliert für S-Phasen-abhängige Klastogene die Forderung, daß die Induktion und die Produktion von Chromosomenaberrationen zeitlich zu trennen seien. Die Tatsache, daß Chromosomentyp-Aberrationen bei S-Phase-wirksamen Substanzen gewöhnlich nicht beobachtet werden, ist auf die geringe Wahrscheinlichkeit zurückzuführen, daß Stellen, an denen Reparaturprozesse stattfinden, zeitlich und räumlich zusammenfallen, sodaß sie interagieren und Aberrationen erzeugen können, bevor die Zellen in die S-Phase eintreten (Preston und Gooch, 1981).
Allerdings betont Savage auch, daß Aberrationen, die in der Metaphase beobachtet werden, das Ergebnis eines vielfältigen Mechanismus sind. Nach Preston und Gooch (1981) stellt die Einteilung in S-Phasen-abhängige und S-Phasen-unabhängige Mutagene eine zu starke Vereinfachung dar. Es wurde gezeigt, daß Methansulfonat (MMS) und 4-Nitrochinolin-N-oxid (4NQO), die als S-Phasen-abhängige Substanzen gelten, Chromosomentyp-Aberrationen in menschlichen Leukozyten nach Behandlung in der G_1-Phase induzieren konnten. Daraus wurde geschlossen, daß die meisten, wenn nicht sogar alle Agentien Aberrationen in allen Zellzyklusphasen induzieren können. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von Chromosomentyp-Aberrationen nach G_1-Behandlung mit Agenzien, die als S-Phasen-abhängig klassifiziert werden, ist aber geringer als für S-Phasen-unabhängige Agenzien (Preston und Gooch, 1981). Tatsächlich wurden in der vorliegenden Arbeit bei der höchsten MMC-Konzentration (6µM) bei 27,5% der untersuchten Metaphasen Aberrationen beobachtet, wobei etwa gleich viele Chromatidtyp- wie Chromosomentyp-Aberrationen auftraten (siehe Kapitel 4.4.1.1). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß einige der DNA-Läsionen in Chromosomentyp-Aberrationen umgewandelt wurden. In der G_0-Phase gesetzte Schäden sind möglicherweise durch hohe Konzentrationen von Mitomycin C räumlich eng nebeneinander entstanden. Reparaturvorgänge von Schäden, die durch Mitomycin C gesetzt wurden, verlaufen langsam (Sognier und Hittelman, 1983). Obwohl zunächst eine Reparatur während der ersten 48 Stunden bei Fibroblasten beobachtet wurde, blieb eine meßbare Quervernetzung in den Zellen für mindestens 96

Stunden bestehen. Die räumliche Nähe zwischen den gesetzten Läsionen kann zur Interaktion zwischen möglichen Reparaturvorgängen führen. Die Folge können dann Aberrationen, eventuell Doppelstrangbrüche sein. Sognier und Hittelman (1986) beobachteten das Auftreten von Chromatidbrüchen in Hela-Zellen als Folge einer unvollständigen DNA-Replikation. Verläuft die DNA-Replikation an den Stellen mit Bruchereignissen unvollständig, kann das Auftreten von Chromosomentyp-Aberrationen beobachtet werden. Nach Mitomycin C-Behandlung (6µM) reduzierte sich der Mitose-Index von 43 ‰ in der Kontrolle auf 12 ‰ . Die Behandlung mit Mitomycin C resultiert in einer schnellen Phosphorylierung von $p34^{cdc2}$ und führt zu einem G_2-Arrest (Kharbanda *et al.*, 1994).

5.3.6 UNTERSUCHUNGEN MIT DIETHYLSTILBESTROL (DES)

Von DES ist bekannt, daß es hauptsächlich als Spindelgift wirkt. Der Einfluß von DES auf chromosomale Strukturen wird kontrovers diskutiert. Während vielerseits bestätigt wird, daß DES vornehmlich numerische Aberrationen induziert, divergieren die Beobachtungen über das Auftreten struktureller Aberrationen nach DES-Behandlung.
In Nierenrindenzellen des Syrischen Hamsters ließen sich mit Östrogenen, darunter auch mit DES, *in vivo* Chromosomenaberrationen auslösen (Banerjee *et al.*, 1994). In humanen peripheren Lymphozyten konnten mit DES keine chromosomalen Aberrationen induziert werden (Banduhn und Obe, 1985; Fauth, 1998). In der vorliegenden Arbeit wurden Metaphasen aus 48 Stunden-Vollblutkulturen im ersten Teilungszyklus nach DES-Behandlung untersucht.
In der DMSO-Kontrolle zeigten 3% der untersuchten Metaphasen Aberrationen. Bei 100µM DES stieg die Anzahl aberranter Metaphasen auf 7,6% (siehe Kapitel 4.4.1.2) und in 0,8% der Zellen wurden Austauschfiguren beobachtet. Damit war eine leichte Erhöhung an strukturellen Aberrationen festzuhalten, die allerdings statistisch nicht signifikant war. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß nach DES-Inkubation der Mitose-Index der Lymphozyten leicht anstieg; damit wurden die Beobachtungen anderer Autoren bestätigt, die ebenfalls eine Zunahme der Mitose-Rate nach Inkubation mit DES feststellten (Hartley-Asp *et al.*, 1985; Fauth, 1998).

5.4 ABERRATIONEN VORZEITIG KONDENSIERTER CHROMOSOMEN

Die Entwicklung der PCC-Methode ermöglichte die Herstellung eines direkten kausalen Zusammenhangs zwischen der Bildung von chromosomalen Aberrationen und Veränderungen in der Konformation von Interphasechromosomen (Johnson und Rao, 1970; Pantelias und Maillie, 1983).

5.4.1 ANZAHL VORZEITIG KONDENSIERTER CHROMATINELEMENTE ALS MASS DER SCHÄDIGUNG

5.4.1.1 ALLGEMEINE VORBEMERKUNGEN

Das Ausmaß einer Schädigung wird in $G_{0/1}$-PCCs durch das Auszählen von Fragmenten festgestellt, da jeder Chromosomenbruch in einem zusätzlichen Chromosomenstück resultiert (Sen und Hittelman, 1984).
In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen mit weniger als 46 PCCs tabellarisch erfaßt, jedoch bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Man kann davon ausgehen, daß die hypodiploiden Zellen in der G_0-Phase eher das

Resultat von technischen Artefakten als das eines Nondisjunctions sind. Die Hypotoniebehandlung und Fixierungsdauer und das Lufttrocknen sind Parameter, die diese Artefakte bedingen können (Danford, 1984). Auch das Auftropfen der Zellsuspension auf Objektträger kann zu einem Chromosomenverlust führen (Brown *et al.,* 1983).

5.4.1.2 DNA-STRANGBRÜCHE UND PCC-FRAGMENTE

Der Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangbrüchen und PCC-Fragmenten ist ungeklärt. Doppelstrangbrüche werden häufig als die molekularen Läsionen für die Bildung von Chromosomenaberrationen angesehen (Bryant, 1997). So ließen sich nach Behandlung von Zellen mit Restriktionsendonukleasen, die zur Induktion von Doppelstrangbrüchen führen, chromosomale Aberrationen induzieren (Natarajan und Obe, 1984). Sen und Hittelman (1984) behandelten humane Fibroblasten in der Ruhephase mit Stickstoff-Lost-Verbindungen; während der Inkubation in Arabinofuranosylcytosin und Hydroxyharnstoff reicherten die Zellen DNA-Einzelstrangbrüche an. In G_1-PCCs ließen sich dann bereits einige Bruchereignisse nachweisen, deren Ausmaß allerdings durch die zusätzliche Behandlung mit *Neurospora* Endonuklease während der Zellfusion erhöht wurde (Sen und Hittelman, 1984). Diese Erhöhung ist wahrscheinlich auf die Umwandlung von Einzelstrangbrüchen in Doppelstrangbrüche zurückzuführen (Cornforth und Bedford, 1993). Loucas (1990) zeigte ebenfalls, daß doppelstrangspezifische Restriktionsendonukleasen bei Zellen in der G_1-Phase auch Brüche in PCCs bewirken können. Der Einbau von BrdU anstelle von Thymidin erhöht die Bruchrate bei PCCs und kann als indirekter Beweis für die zentrale Rolle von DNA-Doppelstrangbrüchen in der Bildung von PCC-Brüchen gesehen werden (Iliakis *et al.*, 1989 in: Cornforth und Bedford, 1993). Durch einen Vergleich zwischen der Reparaturkinetik von PCC-Brüchen und der Verknüpfung von Doppelstrangbruchenden kann die Hypothese getestet werden, ob Doppelstrangbrüche dem Interphasechromosomenbruch zugrunde liegen. Iliakis *et al.* (1987) berichteten, daß Brüche in G_1-Zellen, die mit der PCC-Methode ermittelt wurden und DNA-Doppelstrangbrüche, die mit der neutralen Filterelution gemessen wurden, nach Schädigung durch den Einbau von Iod (^{125}I) bzw. durch Röntgenstrahlung mit ähnlicher Reparaturkinetik wieder zusammengefügt wurden. Wurden CHO-Zellen vor und nach einer Röntgenbestrahlung hypertonisch behandelt, konnte mit der PCC-Technik eine Erhöhung von Brüchen bei G_1-Zellen und mit der Pulse-field-Gelelektrophorese eine Zunahme von DNA-Doppelstrangbrüchen nachgewiesen werden (Iliakis *et al.,* 1993). Es wird postuliert, daß die Doppelstrangbrüche, die langsam repariert werden, die Vorläuferläsionen sind, die den Interphasechromosomenbrüchen zugrunde liegen und bei der Anwendung von PCC-Protokollen sichtbar werden (Iliakis *et al.*, 1993).

Die Mechanismen, die Doppelstrangbrüche in sichtbare Chromosomenschädigung umwandeln, sind ungeklärt. Oftmals wurden Diskrepanzen im Ausmaß zwischen „PCC-Brüchen“ und DNA-Doppelstrangbrüchen beobachtet. So repräsentieren PCC-Fragmente, die durch ionisierende Strahlung induziert wurden, nur etwa 10-15% der DNA Strangbrüche, die durch Sedimentationsanalyse in neutralem Saccharosegradienten gefunden wurden. Wurden z.B. CHO-Zellen in der Plateau-Phase Röntgenstrahlung ausgesetzt, wurden etwa 20 DNA-Doppelstrangbrüche pro Gray induziert, aber mit der PCC-Methode wurden nur zwei Chromatinbrüche pro Gray beobachtet (Iliakis *et al.*,

1988; Iliakis *et al.*, 1991 beide Zitate in: Wang und Iliakis, 1992). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß nur ein Bruchteil von etwa 10% der gesamten Doppelstrangbrüche zu Chromatinbrüchen führt (Wang und Iliakis, 1992). Falls Doppelstrangbrüche wirklich die anfängliche molekulare Läsion für PCC-Brüche darstellen, kann dann allerdings nur ein Teil der Doppelstrangbrüche wirksam sein (Cornforth und Bedford, 1993).
Cornforth und Bedford publizierten 1993 in einem Übersichtsartikel ihre Untersuchungsergebnisse und die anderer Arbeitsgruppen über die Wirkung von ionisierender Strahlung. Den Schwerpunkt legten sie dabei auf Resultate, die mit der PCC-Technik gewonnen wurden. Es wurde vermutet, daß z.B. Brüche innerhalb der Linker-Region der nukleosomalen Untereinheit die Chromatinkontinuität unterbrechen und zu einem PCC-Bruch führen könnten, während die DNA in Assoziation mit dem Nukleosom-Core des Chromatins durch die Interaktion mit Histonen stabilisiert wird und Doppelstrangbrüche in dieser Region kaum zu PCC-Brüchen führen (Chatterjee und Holley, 1991 in: Cornforth und Bedford, 1993). Andererseits wurde auch geäußert, daß Doppelstrangbrüche innerhalb von transkriptionsaktivem Chromatin zu PCC-Brüchen führen (Cornforth und Bedford, 1985).

5.4.1.3 CHROMATINSTRUKTUR UND PCC-FRAGMENTE

Obwohl Doppelstrangbrüche als die wichtigsten Vorläufer von chromosomalen Aberrationen gelten, werden weitere Möglichkeiten diskutiert, welche die Unterschiede zwischen PCC-Brüchen und DNA-Doppelstrangbrüchen erklären könnten (Cornforth und Bedford, 1993). Die Chromatinstruktur selbst kann die Umwandlung von DNA-Doppelstrangbrüchen in PCC-Fragmente bewirken. Chromosomale Aberrationen sind demnach nicht immer das Resultat irreparabler Doppelstrangbrüche, sondern sie können auch das eines aktiven Umwandlungsprozesses von DNA-Schädigung in Chromosomenschädigung sein (Pantelias *et al.*, 1993), welche genetisch determiniert und zellzyklusabhängig ist (Terzoudi und Pantelias, 1997). Einen Zusammenhang zwischen dem Chromatinzustand und dem Auftreten von PCC-Bruchereignissen zeigten Hittelman und Rao bereits im Jahre 1974. Wurden CHO-Zellen während des Kondensationsprozesses bestrahlt, so nahm das Ausmaß von PCC-Brüchen mit fortschreitender Kondensation ab. Der Prozeß der Kondensation bzw. der Dekondensation selbst kann zu einer Schädigung, die sich in einem PCC-Bruchereignis zeigt, führen (Pantelias, 1986). Bestrahlte G_0-Lymphozyten wurden mit CHO-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase fusioniert (Terzoudi und Pantelias, 1997). Die Lymphozyten konnten ihre DNA-Schädigung unter dem Einfluß biochemischer Prozesse, die die verschiedenen Phasen des Zellzyklus der CHO-Zellen charakterisieren, in Chromosomenschädigung umwandeln. Die Autoren untersuchten die Umwandlung von DNA-Schädigung in PCC-Fragmente unter dem Einfluß von Chromatinphosphorylierung und MPF-Aktivität der PCC-Induktorzellen. Dazu wurde eine PCC-Induktion in Lymphozyten sofort nach Fusion mit mitotischen CHO-Zellen durchgeführt oder aber es wurden bestrahlte G_0-Lymphozyten mit CHO-Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase fusioniert; jeweils in Abständen von zwei Stunden wurden dann durch selektives Abklopfen CHO-Zellen bei ihrem Eintritt in die Mitose (mit den Lymphozyten) gewonnen und PCCs induziert. Wurden PCCs in den bestrahlten Lymphozyten sofort nach Fusion mit mitotischen CHO-Zellen induziert, so konnten 1-5 Fragmente pro Zelle beobachtet werden. Eine starke Fragmentbildung wurde in den PCCs der

Lymphozyten beobachtet, wenn die Hamsterzellen 12-14 Stunden nach Bestrahlung der Lymphozyten in die Mitose eintraten. Die Umwandlung der DNA-Schädigung in chromosomale Schädigung erfolgte beim Übergang der G_1- zur S-Phase, wie mit tritium-markierten Thymidin gezeigt werden konnte (Terzoudi und Pantelias, 1997).

5.4.1.4 REPARATURVORGÄNGE UND PCCS

Die Anzahl der Brüche/Fragmente hängt auch von der Reparaturkapazität der Zellen ab, weil Zellen noch während der ersten 10-15 Minuten der Zellfusion Brüche reparieren können, danach wird die Reparatur durch den Kondensationsprozeß verhindert (Darroudi und Natarajan 1989; Cornforth und Bedford, 1993). Der Zeitraum zwischen Zellfusion und Chromosomenkondensation ist mit der Konkurrenz zwischen der Reparatur der Schädigung einerseits und der Fixierung der Brüche andererseits verbunden (Cornforth und Bedford, 1993). Zwischen der Anzahl von restlichen PCC-Fragmenten und dem Eintreten des Zelltodes konnte ein Zusammenhang nachgewiesen werden (Cornforth und Bedford, 1987; Sasai *et al.*, 1994; Borgmann und Dikomey, 1997).

5.4.1.5 PCCS IN UNBEHANDELTEN LYMPHOZYTEN

Humanblut enthält etwa $2x10^6$Lymphozyten pro ml, wobei 60-70% auf T-Zellen und 10-15% auf B-Zellen entfallen. Die individuellen Unterschiede in dem Anteil an B- und T-Lymphozyten können erheblich sein (Carrano und Natarajan, 1988). Bei der Analyse von chromosomaler Schädigung in PCCs von unbehandelten humanen G_0/G_1-Lymphozyten ergaben sich keine zellpopulationsspezifischen Unterschiede (Miller, 1991).
In den vorliegenden Untersuchungen war die Anzahl von vorzeitig kondensierten Chromatinelementen unbehandelter Lymphozyten leicht erhöht gegenüber den aufgrund ihres diploiden DNA-Gehalts humaner Lymphozyten erwarteten 46 PCCs. Andere Autoren machten diese Beobachtungen auch und führten die erhöhte Rate auf die Effekte von Makrophagen zurück, die als Quelle für mutagen wirksame Peroxide und freie Sauerstoffradikale bekannt sind (Prasanna *et al.,* 1997).
Wie bereits geschildert, können auch Einzelstrangbrüche zum Auftreten von PCC-Fragmenten führen (Sen und Hittelman, 1984). Ob Lymphozyten in der Ruhephase Einzelstrangbrüche besitzen, wird in der Literatur kontrovers beantwortet. Während einige Autoren keine Einzelstrangbrüche nachweisen konnten (Jostes *et al.*, 1989), stellten wiederum andere Autoren eine große Anzahl von spontanen Einzelstrangbrüchen fest (Johnstone und Williams, 1982 in: Cohen und Thompson, 1986; Greer und Kaplan, 1984). Die Verknüpfung der durch Brüche entstandenen DNA-Strangenden stellt ein frühes Ereignis während der Stimulation von ruhenden Lymphozyten dar (Johnstone, 1984).

5.4.1.6 PCCS IN BEHANDELTEN ZELLEN

5.4.1.6.1 α,β-UNGESÄTTIGTE ALDEHYDE

2-Alkenale induzieren in 100-200 μmolaren Konzentrationen dosisabhängig Einzelstrangbrüche (Schuhmacher, 1990). Diskontinuitäten in der Phosphodiester-Bindung von gegenüberliegenden DNA-Strängen erzeugen DNA-Doppelstrangbrüche, falls die DNA-Läsion innerhalb von etwa zehn Basen liegen (Cole *et al.*, 1974 in: Cornforth und Goodwin, 1991); es wurde

allerdings auch von größeren Abständen berichtet (Siddiqi und Bothe, 1987 in: Cornforth und Goodwin, 1991). Daß ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Doppelstrangbrüchen und chromosomalen Aberrationen in Metaphasen (siehe Kapitel 5.3.1) einerseits und zwischen Doppelstrangbruchereignissen und der Entstehung von PCC-Fragmenten andererseits (siehe Kapitel 5.3.2) besteht, wurde bereits erwähnt. Die Inkubation mit Crotonaldehyd, Hexenal und Nonadienal führte zu einer signifikanten Erhöhung der Mikrokern-Rate im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Dittberner, 1993). Klastogen-induzierte Mikrokerne reflektieren vor allem die strukturellen Chromosomenaberrationen, die aus Doppelstrangbrüchen und azentrischen Fragmenten entstehen (Countryman und Heddle, 1976). Strukturelle Chromosomenumbauten, wie Translokationen werden dabei jedoch nicht erfaßt. Mit Anwendung der Cytokinesis-Block-Methode werden nur die Zellen ausgewertet, die sich exakt einmal geteilt haben (Fenech und Morley, 1985). Die Häufigkeit der Mikrokerne repräsentiert nur einen Teil der gesamten Chromosomenaberrationen. Nur etwa 20% der Fragmente, die in Metaphasen beobachtet werden, bilden in der nächsten Interphase Mikrokerne (Carrano und Heddle, 1973). In Anbetracht der Tatsache, daß Reparaturmechanismen eintreten können und daß sich nicht alle Chromosomenaberrationen in einem Mikrokern manifestieren, läßt sich ein Zusammenhang zwischen den Resultaten der vorliegenden Arbeit und den Ergebnissen von Dittberner (1993) herleiten: Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Erhöhung der PCC-Fragmente nach Behandlung der Zellen mit α,β-ungesättigten Aldehyden einerseits und die von Dittberner (1993) festgestellte Zunahme der Mikrokern-Rate andererseits können als Ausdruck - zumindest teilweise- einer erhöhten chromosomalen Aberrationsrate gewertet werden. Beide cytogenetischen Endpunkte haben damit eine gemeinsame Grundlage für ihre Entstehung, nämlich das Auftreten von Doppelstrangbrüchen. Die Bildung von DNA-Addukten einerseits und/oder die große Reaktivität gegenüber essentiellen Sulphydrylgruppen von Proteinen und Enzymen andererseits könnte in einem Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen resultieren.

Die Charakterisierung der aldehyd-induzierten Mikronuklei erfolgte durch den Einsatz der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) mit der centromerspezifischen Sonde p82H (Dittberner, 1993). Für Crotonaldehyd zeigte sich nur ein geringfügig erhöhter Prozentsatz centromerpositiver Mikrokerne verglichen mit den Kontrollen. Hexenal und Nonadienal dagegen induzierten im Vergleich zu den Kontrollen signifikant bis hoch signifikant mehr centromerpositive Mikrokerne und zeigten damit auch deutlich ein aneugenes Potential.

Diese Resultate bestätigen die in Kapitel 5.3.1 getroffenen Anmerkungen zur Induktion von PCC-Fragmenten. Dabei wird die Komplexizität für die Bildung von PCC-Fragmenten deutlich. Es zeigt sich nämlich, daß die Induktion der PCC-Elemente mit der unterschiedlichen Reaktivität mit der DNA und Nukleophilen und den Möglichkeiten des Membrantransportes zusammenhängt. Die größte Michael-Reaktivität besitzt Crotonaldehyd, anschließend Nonadienal und dann Hexenal (Schuhmacher, 1990). Damit reagiert Crotonaldehyd am besten mit der DNA und mit zellulären Nukleophilen. Für die beiden α,β-ungesättigten Aldehyde Crotonaldehyd und *trans*-2-Hexenal konnte in der vorliegenden Arbeit eindeutig ein mutagenes Potential nachgewiesen werden. Für Crotonaldehyd ergab sich ab 180µM und

für *trans*-2-Hexenal bereits ab 100µM im Vergleich zur Kontrolle eine hoch signifikante Zunahme an geschädigten G_0-PCCs. Nach Inkubation mit 2-*trans*,6-*cis*-Nonadienal (20µM) waren die G_0-PCCs im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant geschädigt (Meilike, 1996). Die stärkeren Effekte von *trans*-2-Hexenal im Vergleich zu Crotonaldehyd könnten das Ergebnis der unterschiedlichen Membrangängigkeit für den polaren, hydrophilen Crotonaldehyd und das lipophile Hexenal sein, wodurch die Aldehyd-Konzentration im Cytosol der Zellen unterschiedlich schnell ansteigt. Lipophile Moleküle wie die längerkettigen Alkenale Hexenal (und Nonadienal) werden leichter und schneller aufgenommen. Außerdem kann die unterschiedliche Reaktionsfähigkeit gegenüber zellulären Nukleophilen die Ursache der differierenden Werte sein (Dittberner, 1993). Die vor der PCC-Induktion durchgeführte Fusion von Zellen mit PEG ist ein Membranphänomen. Von Crotonaldehyd ist z.B. bekannt, daß es die Membranfluidität von Zellen erniedrigt (Witz, 1989). Veränderte Membraneigenschaften von Zellen kämen damit auch als Ursache für divergierende Resultate der PCC-Studien in Frage.

5.4.1.6.2 N-NITROSODIETHANOLAMIN (NDELA)

Nach Inkubation von Vollblut und isolierten Lymphozyten mit NDELA wurde bei den G_0-PCCs eine im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikante Zunahme der Fragmentanzahl festgestellt (siehe Kapitel 4.3.2.1).

Die NDELA-Behandlung steigerte bei humanen Lymphozyten im Vergleich zur Kontrolle die Mikrokern-Rate und das Auftreten chromosomaler Aberrationen in der Konzentration von 1000µM hoch signifikant (Dittberner *et al.*, 1988).

Die Diskrepanz zwischen den Resultaten aus Metaphaseuntersuchungen und der PCC-Analyse bezüglich des Auftretens geschädigter Zellen könnten auf eine prämitotische Selektion der Zellen hindeuten, die eine extreme Schädigung erfuhren. Allerdings weist die geringe Abnahme des Mitose-Index von 45 ‰ in der Kontrolle auf 22 ‰ nach NDELA-Behandlung in der Konzentration von 2500µM möglicherweise auf weitere Ursachen hin (siehe Kapitel 4.3.1). Stoffwechselprodukte von Nitrosaminen können zur Bildung von DNA-Addukten führen (Scherer *et al.*, 1991; Loeppky *et al.*, 1994). Agenzien, von denen man zunächst dachte, daß sie Chromosomenaberrationen nur dann produzieren, wenn die Zellen die S-Phase passieren, können eine bedeutende Schädigung innerhalb einer 30-minütigen Behandlung erzeugen (Johnson *et al.*, 1982). Die Induktion von Einzelstrangbrüchen durch NDELA (Sterzel und Eisenbrand, 1986) wurde bereits erwähnt. Einzelstrangbrüche produzieren *per se* keine chromosomalen Aberrationen (Mosesso *et al.*, 1999). Eine proteinassoziierte Konformationsänderung durch NDELA könnte den Kondensationsprozeß des Interphasechromatins beeinflussen und DNA-Läsionen in PCC-Fragmente umwandeln. So ist für N-Nitroso-Verbindungen die Alkylierung von Proteinen bekannt (Übersicht in: Gronow, 1980). Die Diskussion der Resultate aus unserer PCC-Studie mit NDELA wird auch durch die Beobachtungen von Mosesso *et al.* (1999) gestützt. Camptothecin, ein Topoisomerase I-Hemmstoff, induziert „proteinverdeckte“ DNA-Einzelstrangbrüche (Mosesso *et al.*, 1999). Camptothecin schädigt humane Lymphozyten der G_0-Phase, wie mit der PCC-Technik gezeigt wurde. In mit Camptothecin (25 µM) behandelten Zellen wiesen 39% der untersuchten Zellen mehr als 46 Chromatinelemente auf. Die unerwartete klastogene

Wirkung von Camptothecin wurde dadurch erklärt, daß Kondensationsprozesse bei der Umwandlung von DNA-Läsionen in Chromosomenbrüche involviert sind. Bei der Chromosomenkondensation, die durch die Aktivität mitotischer Faktoren induziert wird, werden die durch Camptothecin–induzierten „protein-verdeckten" Einzelstrangbrüche in Chromosomenbrüche umgewandelt (Mosesso *et al.*, 1999).
Die absoluten Zahlen an geschädigten Zellen unterscheiden sich nach Behandlung von Vollblut und isolierten Lymphozyten. Möglicherweise ist die nach Vollblut-Behandlung beobachtete höhere Fragmentzahl in den PCCs das Ergebnis eines durch Erythrozyten vermittelten Aktivierungsprozesses (siehe Kapitel 4.3.2.1). Die Anwesenheit von Erythrozyten in Lymphozytenkulturen wird für die Aktivierung von Promutagenen verantwortlich gemacht. Eine Vollblutkultur repräsentiert eine experimentelle *in vitro* Bedingung, die eine *in vivo* Exposition besser nachahmt als die Kultivierung isolierter Lymphozyten (Migliore *et al.*, 1989). Untersuchungen haben die metabolische Aktivierung von heterocyclischen und aromatischen Aminen durch das Cytosol humaner roter Blutzellen nachgewiesen, was möglicherweise durch Sauerstoff vermittelt wird (Ellard und Parry, 1993).
Bei der Betrachtung der Schädigung von G_0-PCCs muß zusätzlich berücksichtigt werden, daß bei der Behandlung von Vollblut den Zellen mehr Zeit für Reparaturprozesse zur Verfügung stand als bei der Behandlung von isolierten Lymphozyten.

5.4.1.6.3 BLEOMYCIN (BLM)

Die Wirkungsweise von Bleomycin ist recht gut untersucht. Aus der Literatur sind einige Arbeiten verschiedener Autoren bekannt, die mit der PCC-Technik die Effekte von Bleomycin auf Interphasechromatin untersucht haben. Weil damit Daten aus Publikationen zur Verfügung standen, wurde Bleomycin in dieser Arbeit bei einigen Versuchen als positive Kontrollsubstanz mitgeführt. Die cytotoxischen und klastogenen Effekte von Bleomycin wurden auf die Bildung von Doppelstrangbrüchen in der DNA zurückgeführt (Porvik und Austin, 1991; Hoffmann *et al.*, 1993). Die direkte clastogene Wirkung auf Chromatin ließ den Einsatz von Bleomycin zusätzlich interessant erscheinen. Die PCC-Versuche der vorliegenden Arbeit zeigten, daß schon nach einer einstündigen Behandlung mit Bleomycin (10 µg/ml) 87,3 % der untersuchten Zellen mehr als 46 Chromatinelemente enthielten (siehe Kapitel 4.2.2.1.1 und 4.3.2.1). Bei vergleichenden Studien an Metaphasechromosomen waren nur 8,8 % (Kapitel 4.2.1.1) bzw. 7,8% (siehe Kapitel 4.3.1) der untersuchten Metaphasen geschädigt. Dresp und Bauchinger (1988) setzten im Rahmen ihrer PCC-Studien an Formaldehyd-behandelten Lymphozyten in der G_0-Phase Bleomycin als Positivkontrolle ein. Die einstündige Behandlung von unstimulierten Lymphozyten mit Bleomycin in der Konzentration von 175 µg/ml schädigte 92% der untersuchten Zellen und erzeugte 30,11 Fragmente pro geschädigte Zelle. Miller (1991) untersuchte mit der PCC-Technik die klastogenen Effekte von Bleomycin bei ruhenden und proliferierenden humanen B- und T-Lymphozyten und beobachtete ähnliche Effekte wie Dresp und Bauchinger (1988) nach zweistündiger Bleomycin-Behandlung bereits in Konzentrationen von 20-30 µg/ml. Dabei wurden keine qualitativen Unterschiede in der Reaktion humaner B- und T-Lymphozyten auf Bleomycin beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit fällt bei der Betrachtung der Fragmentverteilung der geschädigten PCCs nach Bleomycin-Behandlung das unterschiedliche Ausmaß der Schädigung unter den Zellen auf (siehe Kapitel 4.2.2.1.1 und 4.3.2.1). Neben einer Variabilität für die Zugänglichkeit von Bleomycin wird die zelluläre Konzentration von Enzymen diskutiert, die Bleomycin oder einige der Intermediate inaktivieren könnten (Kligerman *et al.*, 1992). In der vorliegenden Arbeit wurden Vollblut und vergleichend dazu isolierte Lymphozyten mit Bleomycin in der Konzentration von 10µg/ml für jeweils eine Stunde inkubiert. Bleomycin induzierte in G_0-Lymphozyten vor der Isolierung aus Vollblut 11,4 Fragmente pro geschädigte Zelle und in isolierten Lymphozyten sogar 24,2 Fragmente pro geschädigte Zelle. Wurden isolierte Lymphozyten mit Bleomycin behandelt, so erfolgte eine hoch signifikante Verschiebung der geschädigten Zellen zu Bereichen mit höherer Fragmentanzahl (siehe Kapitel 4.3.2.1). Sen und Hittelman (1984) untersuchten die durch Bleomycin-induzierte Schädigung und deren Reparatur. Ruhende mononukleäre humane Blutzellen und Fibroblasten wurden mit Bleomycin 30 Minuten inkubiert, anschließend wurde die Substanz durch Waschen entfernt und nach verschiedenen Reparaturzeiträumen eine prämature Chromosomenkondensation induziert. Neben einer langsamen wurde auch eine schnelle Reparatur-Komponente beobachtetet, die zu einer signifikanten Reduktion der chromosomalen Schädigung innerhalb von 30 Minuten führte. Nach zwei Stunden verlangsamte sich die Reparatur der Aberrationen (Sen und Hittelman, 1984). In der vorliegenden Arbeit differiert die Anzahl geschädigter Zellen mit 92,1% der untersuchten Zellen nach Vollblut-Behandlung und mit 98% der analysierten Lymphozyten, die nach ihrer Isolierung aus Vollblut mit Bleomycin behandelt wurden, nicht sehr voneinander (siehe Kapitel 4.3.2.1). Allerdings ist das Ausmaß der Schädigung fast doppelt so hoch, wenn isolierte Lymphozyten mit Bleomycin behandelt wurden. Bei der Behandlung von Vollblut steht den Zielzellen für Reparaturprozesse mehr Zeit zur Verfügung als bei der Behandlung von isolierten Lymphozyten nach der Dichtegradientenzentrifugation. Das Ausmaß der Schädigung der G_0-PCCs von Lymphozyten, die vor ihrer Isolierung aus Vollblut mit Bleomycin behandelt wurden, ist demzufolge geringer.

5.4.1.6.4 MITOMYCIN C (MMC)

Mitomycin C ist aufgrund seiner Wirkung als S-Phasen-abhängiges Klastogen bekannt. Durch den Einsatz der Anti-Kinetochor-Antikörperfärbung und FISH-Technik konnten nach Mitomycin C-Behandlung hauptsächlich kinetochor- und zentromernegative Mikrokerne nachgewiesen werden; es konnte gezeigt werden, daß MMC ein starkes klastogenes Potential besitzt (Surrallés *et al.*, 1995). Möglicherweise bilden die durch Mitomycin C-gebildeten DNA-Addukte die Grundlage für DNA-Doppelstrangbrüche. Mitomycin C kann lokale Verdrehungen der DNA an spezifischen DNA-Alkylierungsstellen induzieren (Jollès und Laigle, 1995) und erleichtert damit möglicherweise das Auftreten von Doppelstrangbrüchen. Nach Mitomycin C-Behandlung wurde das Auftreten von Dekondensationen des Chromatins beschrieben (Nowell, 1964). Es wurde das Auftreten von Unterkondensationen, besonders in der heterochromatischen Region von Chromosom 9, Chromosom 1 und Chromosom 16 beobachtet (Fauth, 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde bei einer Mitomycin C-Konzentration von 6µM das Auftreten von Dekondensationen im Zentromerbereich eines Chromosom der C-Gruppe

(vermutlich Chromosom 9) in 12,7% und eines Chromosomes der A-Gruppe in etwa 2% der untersuchten Metaphasen gefunden. Möglicherweise stellen diese Regionen nach Mitomycin C-Behandlung Bereiche mit besonderer Fragilität dar, die im Laufe der PCC-Präparation in einem erhöhten Auftreten von PCC-Fragmenten resultieren.

5.4.1.6.5 DIETHYLSTILBESTROL (DES)

Die Behandlung mit DES führte in den G_0-PCCs der Lymphozyten in der getesteten Höchstkonzentration von 200µM bei etwa einem Drittel der untersuchten Zellen zu einer Schädigung. Es wurden 0,7 Fragmente pro Zelle beobachtet. Damit war das Ausmaß der Schädigung verglichen mit der Schädigung in unbehandelten Zellen signifikant erhöht. Chinonmetabolite können kovalent an DNA binden. Die Semichinon-Intermediate des Redoxzyklus können mit molekularem Sauerstoff unter der Bildung von Superoxid-Radikalen reagieren. Die DNA-Schädigung ist wahrscheinlich auf Einzelstrangbrüche zurückzuführen, die eventuell durch freie Radikale induziert worden waren. Auch die Bildung von Lipidperoxiden kann an der Bildung von DNA-Addukten teilhaben. (Yager und Liehr, 1996). Inwieweit alle diese Mechanismen zur Bildung von Doppelstrangbrüchen führen können, ist ungeklärt. Werden die durch freie Radikale induzierten Einzelstrangbrüche eng gesetzt, so kann möglicherweise das Ergebnis die Bildung von Doppelstrangbrüchen sein.
Die Schädigung der G_0-PCCs nach DES-Behandlung kann zumindestens teilweise auch auf die Reaktion von DES mit zellulären Proteinen zurückzuführen sein.

5.4.2 KONDENSATION DES INTERPHASECHROMATINS

Die PCC-Induktion ist mit einer Zunahme der Phosphorylierung von H1 und H3 assoziiert: H1 wird hyperphosphoryliert und erhält bis zu sechs Phosphatgruppen pro Molekül, H3- Moleküle erhalten ein bis zwei Phosphatgruppen. Der Einfluß der Interphase-Komponente führt zur Dephosphorylierung der mitotischen Histone H1 und H3 in dem Fusionsprodukt aus mitotischen Zellen und Interphasezellen (Hanks *et al.*, 1983).

5.4.2.1 CHROMATINKONDENSATION IN UNBEHANDELTEN ZELLEN

Normale, vorzeitig in der G_0-Phase kondensierte Lymphozyten sind stark verkürzt. Die Kondensationsgrade von PCCs humaner unstimulierter peripherer Lymphozyten, die bei 37°C bzw. bei 4°C gelagert worden waren, unterschieden sich nicht voneinander (Hittelman und Rao, 1976).
Um das Ausmaß des Kondensationsprozesses zwischen behandelten und unbehandelten Zellen quantifizieren zu können, wurden in dieser Arbeit die G_0-PCCs gemäß ihrem Kondensationsgrad in vier Kategorien eingeteilt. Die G_0-PCCs mit dem stärksten Kondensationsgrad wurden der Kategorie 1, diejenigen, die am geringsten kondensiert waren, der Kategorie 4 zugeordnet. Im Gegensatz zu der von Hittelmann und Rao (1976) eingeführten Einteilung der G_0-PCCs in sechs Kondensationsgrade sollte die in der vorliegenden Arbeit vorgenommene Beschränkung auf nur vier Klassen die Zuordnung der G_0-PCCs erleichtern und objektivieren. Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen zeigen, daß die PCCs unbehandelter Lymphozyten in der G_0-Phase stark kondensiert waren. Bei Proband VP-1 wiesen die G_0-PCCs

unbehandelter Zellen einen mittleren Kondensationsgrad von 1,2 auf und bei Testperson VP-2 einen mittleren Kondensationsgrad von 1,3. Das Vollblut beider Testpersonen war vor der PCC-Induktion einen Tag auf dem Postweg unterwegs und damit möglicherweise auch Temperaturschwankungen ausgesetzt. Die PCC-Induktion wurde mit mitotischen CHO-Zellen durchgeführt, die zunächst eingefroren waren. Morse *et al.* (1987) beobachteten, daß der Proliferationspotential-Index (PPI) bei PCCs geringer war, wenn gefrorene Zellen anstatt native Zellen als Mitosefraktion eingesetzt worden waren. Das Ausmaß der Fusion wurde jedoch nicht dadurch beeinflußt, ob frisch präparierte oder eingefrorene mitotische Zellen eingesetzt wurden (Iliakis und Pantelias, 1990).

Die PCC-Studien von Hittelman und Rao (1976) zeigten, daß unstimulierte Lymphozyten gesunder Personen hauptsächlich den Kategorien 1-3 zuzuordnen waren. Nur 30% der unstimulierten Lymphozyten zeigten einen Kondensationsgrad von 4 oder mehr, sehr wenig Zellen waren in die Klassen 5 oder 6 einzuteilen. Hittelman und Rao (1976) beobachteten, daß die Häufigkeitsverteilung der verschiedenen PCC-Kondensationsgipfel um den Wert 3 lagen. Die Inkubationsdauer der CHO-Lymphozyten-Fusionen betrug allerdings nur 45 Minuten im Vergleich zu der in der vorliegenden Arbeit gewählten Inkubationszeit von 60 Minuten.

Es ist bekannt, daß die Dauer der Inkubation des Zellfusionsgemischs den Kondensationsgrad der PCCs beeinflußt. Pantelias und Maillie (1983) stellten fest, daß nach einer fünfzehnminütigen Inkubation die vorzeitige Kondensation des Interphasechromatins bereits induziert worden war, der Kondensationsprozeß aber über einen Untersuchungszeitraum von 90 Minuten kontinuierlich zunahm. Um daher methodische Einflüsse bei den PCC-Studien der vorliegenden Arbeit auszuschließen, erfolgte die Inkubation bei allen PCC-Versuchen für eine Stunde bei 37°C und 5%-CO_2-Gehalt.

Eine Beeinflussung des Kondensationsgrades kann auch über die Hypotoniebehandlung der Zellen erfolgen. Morse *et al.* (1987) beobachteten im Rahmen anfänglicher PCC-Studien bei Knochenmarkszellen von Leukämiepatienten einen sehr geringen Proliferationspotential-Index (PPI). Eine zehnminütige Hypotoniebehandlung mit KCl (0,075M) führte zur Lyse von Hybridzellen und einem Verlust von späten G_1-PCCs. Morse und Mitarbeiter (1987) deuteten dies als Ergebnis einer erhöhten Fragilität von G_1-PCCs. Eine Verkürzung der Dauer der Hypotoniebehandlung auf fünf Minuten führte zu höheren PPI-Werten; andere Autoren (Hittelman und Rao, 1976; 1978; Pantelias und Maillie, 1983; Brüderlein *et al.,* 1986; Metze, 1995) beobachteten jedoch auch bei einer zehnminütigen Hypotoniebehandlung hohe PPI-Werte. Auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit basieren auf G_0-PCCs, die nach einer zehnminütigen KCl-Behandlung (0,075M) bei Raumtemperatur präpariert wurden. Die Länge der PCCs scheint weitgehend unabhängig von der Anzahl der mitotischen Zellen zu sein, die mit den Interphasezellen fusionieren, obwohl sie deutlich die Häufigkeit (Pantelias und Maillie, 1983) und die Geschwindigkeit des Induktionsprozesses bestimmt (Johnson und Rao, 1970).

5.4.2.2 CHROMATINKONDENSATION NACH BEHANDLUNG MIT α,β-UNGESÄTTIGTEN ALDEHYDEN

5.4.2.2.1 ALLGEMEIN

Einen besonderen Effekt haben α,β-ungesättigte Aldehyde auf den Prozeß der vorzeitigen Kondensation des Interphasechromatins. Die einstündige Behandlung der Zellen mit den α,β-ungesättigten Aldehyden Crotonaldehyd und *trans*-2-Hexenal bewirkte, daß die vorzeitig kondensierten Chromosomen nach PCC-Induktion und Präparation einen im Vergleich zu unbehandelten Zellen erheblich geringeren Kondensationsgrad erreichten und elongiert erschienen. Das Ausmaß der Chromatinveränderungen nahm mit steigender Konzentration der getesteten α,β-ungesättigten Aldehyde zu und wurde sofort nach PCC-Induktion sichtbar. Wie die PCC-Studien dieser Arbeit zeigen, hemmen α,β–ungesättigte Aldehyde nicht die Induktion von PCCs *per se*. Es ändert sich lediglich die Morphologie der G_0-PCCs: mit steigender Konzentration treten zunehmend PCCs auf, die einen im Vergleich zu unbehandelten Zellen geringeren Kondensationsgrad aufweisen.
Ähnliche Beobachtungen wurden in unserer Arbeitsgruppe auch nach Behandlung von Lymphozyten in der G_0-Phase mit 2-*trans*,6-*cis*-Nonadienal gemacht. Im mikroskopischen Bild erschienen die PCCs nach Inkubation mit 2-*trans*,6-*cis*-Nonadienal im Vergleich zu den PCCs unbehandelter Zellen elongiert (Meilike, 1996). Die Inkubation mit Crotonaldehyd in einer Konzentration von 240µM veringerte den Kondensationszustand der G_0-PCCs im Vergleich zu den PCCs unbehandelter Zellen hoch signifikant (siehe Kapitel 4.2.2.2.1). Nach *trans*-2-Hexenal-Behandlung änderte sich die Verteilung der G_0-PCCs auf die Kondensationsgrade im Vergleich zu den PCCs unbehandelter Lymphozyten bei 100µM schwach signifikant, ab 150µM hoch signifikant (siehe Kapitel 4.2.2.2.2).
α,β-Ungesättigte Aldehyde sind chemisch hoch reaktive Substanzen, die bereits bei Raumtemperatur mit biochemisch wichtigen Gruppen reagieren (Schauenstein *et al.*, 1977). Die beobachteten Effekte können daher das Resultat von veränderten zellulären Strukturen in den Lymphozyten und/oder von biochemisch modifizierten PCC-induzierenden Faktoren der CHO-Zellen sein.

5.4.2.2.2 WIRKUNG AUF HISTONE

Die kovalente Modifikation von Histonen via reversibler Phosphorylierung und Dephosphorylierung gilt als wichtiger Mechanismus für die Regulation zahlreicher intrazellulärer Vorgänge (Adlakha und Rao, 1986) der PCC-Induktion. Die Fusion mit Interphasezellen führt zu einer Dephosphorylierung der Histone H1 und H3 in den mitotischen Zellen (Hanks *et al.,* 1983). Möglicherweise wird das Ausmaß der vorzeitigen Chromatinkondensation nach Behandlung mit α,β–ungesättigten Aldehyden dadurch vermindert, daß die Phosphorylierung der Histone H1 und H3 in den Interphasekernen verändert wird. So könnte die Inkubation mit α,β–ungesättigten Aldehyden eine Modifikation der an dem Kondensationsprozeß beteiligten Phosphatasen bzw. Proteinkinasen in den Interphasezellen bewirken.
Das Histon H3 gilt als exzellenter Marker für den Kondensationsprozeß von Chromatin (Ajiro *et al.,* 1996). Auf die Bedeutung der Phosphorylierung von H3 für die PCC-Induktion wurde bereits hingewiesen (Hanks *et al.*, 1983;

Ajiro und Nishimoto, 1985). Für Kondensationsprozesse allgemein ist die Phosphorylierung des Histons H3 interessant: Zellen arretieren in der späten G_2-Phase, wenn die Phosphorylierung von H3 gehemmt wird. Eine milde Hypotoniebehandlung von Zellen, die in der Mitose arretiert wurden, resultiert in einer Dephosphorylierung von H3 ohne jedoch zu einem Verlust der kompakten Chromosomenstruktur zu führen. Hypotonie-behandelte Zellen beenden die Mitose nur dann, wenn H3 phosphoryliert wird (Van Hooser *et al.*, 1998).

Das Histon H3 ist hoch konserviert (Isenberg, 1979). Bei den meisten Eukaryonten stellt H3 das einzige Sulphydryl-enthaltende Histon dar. Die H3 Varianten enthalten einen oder zwei Cystein-Reste, die beide in der konservierten globulären Domäne an den Positionen 96 und 110 liegen (Wu *et al.*, 1986). Histone sind auf der Oberfläche von PHA-aktivierten humanen peripheren Blutlymphozyten zu finden, nicht aber auf frisch isolierten Lymphozyten (Watson *et al.*, 1995). Lymphozyten in der Ruhephase haben eine andere Histon H3-Zusammensetzung als aktivierte Lymphozyten. Das Histon H3.3 enthält an Position 96 anstelle eines Cystein-Rests wie bei H3.1 einen Serin-Rest (Marzluff *et al.*, 1972 in: Wu *et al.*, 1986).

Die Doppelbindung der α,β–ungesättigten Aldehyde führt zu großer Reaktivtät gegenüber Verbindungen, die Sulphydryl-Gruppen enthalten (Witz, 1989). Durch die Bindung von α,β-ungesättigten Aldehyden an das Histon H3 (z.B. an Cystein oder anderen Aminosäuren) könnte das Ausmaß der Phosphorylierung gehemmt werden. Die spezifischen Stellen der H3 Phosphorylierung sind bekannt. Die Phosphorylierung von Histon H3 erfolgt durch eine spezifische Kinase (Shoemaker und Chalkley, 1978) sowohl *in vivo* and *in vitro* am 10. Serinrest betrachtet von der N-terminalen Region her (Taylor, 1982). Die N-terminale Region von H3 scheint besonders zugänglich innerhalb des Chromatins zu sein, wie die relative Empfindlichkeit gegenüber der Phosphoylierung durch eine Calcium-abhängige Kinase (Whitlock *et al.*, 1983 in: Ajiro und Nishimoto, 1985) zeigte.

Möglicherweise führt die Reaktion der α,β–ungesättigten Aldehyde mit diesem Cystein-Rest (oder anderen Aminosäuren) zu einer verminderten Kondensation des Interphasechromatins nach PCC-Induktion.

Kuykendall und Bogdanffy (1992) untersuchten die Wirksamkeit der durch gesättigte und ungesättigte Aldehyde induzierten Quervernetzung zwischen der DNA und Histonen. Crotonaldehyd induzierte ein Crosslink pro 2,7 kbp DNA in einer Konzentration von 8,5 mM und Formaldehyd, ein gesättigtes Aldehyd, bei 1,5 µM (Kuykendall und Bogdanffy, 1992). Die verminderte Kondensation der G_0-PCCs scheint nicht das Ergebnis einer quervernetzenden Wirkung zwischen der DNA und Histonen zu sein. Dresp und Bauchinger (1988) untersuchten nämlich das mutagene Potential von Formaldehyd auf unstimulierte Lymphozyten. Die Autoren beobachteten nach Formaldehyd-Behandlung das erhöhte Auftreten von PCC-Fragmenten, erwähnten jedoch keine verminderte Kondensation der PCCs.

5.4.2.2.3 WIRKUNG AUF MITOTISCHE FAKTOREN

Die Interaktion der α,β-ungesättigten Aldehyde mit den für den PCC-Prozeß relevanten zellbiologischen Mechanismen ist möglicherweise sehr komplex. Diese Substanzen könnten auch die MPF-Aktivität der mitotischen Zellen verändern. So wird das Ausmaß der $p34^{cdc2}$/H1-Kinase-Aktivität durch Phosphorylierung hauptsächlich an Tyrosin-15 unterdrückt (Ajiro *et al.*, 1996).

Andererseits ist bekannt, daß eine unterschiedliche MPF-Aktivität zwischen verschiedenen mitotischen Induktorzellen die Anzahl an PCC-Fragmenten verändert (Cheng *et al.*, 1993; Okayasu und Iliakis, 1994). Nicht auszuschließen ist auch, daß eine Bindung an MPF das Ausmaß der PCC-Induktion verringern würde. Dies wurde jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet.

5.4.2.2.4 WIRKUNG AUF DIE TOPOISOMERASE II-AKTIVITÄT

Ishida *et al.* (1994) untersuchten die Hemmung der DNA Topoisomerase II durch ICRF-193. Die Kondensation von PCCs in der G_2-Phase wurde verringert, die PCC-Induktion von Zellen in der G_2-Phase blieb jedoch unverändert. ICRF-193 hemmt den letzten Schritt bei der Chromosomenkondensation (Ishida *et al.,* 1994).
Die Menge an Topoisomerase II ist in proliferierenden Zellen höher als in Zellen in der Ruhephase und gilt als spezifischer und sensitiver Marker für die Zellproliferation (Heck *et al.*, 1988). Die beobachtete Wirkung der α,β-ungesättigten Aldehyde auf das Kondensationsverhalten von Interphasechromatin in der G_0-Phase ist daher nicht hauptsächlich das Resultat einer Hemmung der Topoisomerase II-Aktivität.

5.4.2.3 N-NITROSODIETHANOLAMIN (NDELA)

Nach Inkubation mit alkylierenden Agenzien wurde bei PCCs vor allem dann, wenn die Inkubation der Zellen mit AraC und HU erfolgt war, das Auftreten von Entspiralisierungen beobachtet (Johnson *et al.*, 1982). Für N-Nitroso-Verbindungen wurde die Alkylierung von Proteinen beschrieben, u.a. auch die von –SH-Gruppen von Cystein (Übersicht in: Gronow (1980). Eine geringere Kondensation der G_0-PCCs sowohl als Folge von Reparaturmechanismen oder aufgrund einer Veränderung der für die Kondensation relevanten Moleküle wäre demnach auch für NDELA denkbar. Wie die Resultate der vorliegenden Arbeit jedoch zeigen, sind die G_0-PCCs nach NDELA-Behandlung hoch kondensiert und unterscheiden sich morphologisch nicht von den G_0-PCCs unbehandelter Lymphozyten. Möglicherweise werden Reparaturmechanismen erst bei längerer Inkubation mit NDELA (als die der vorliegenden gewählten einstündigen Inkubation) induziert. Außerdem könnten die durch NDELA verursachten potentiellen Modifikationen der für den Kondensationsprozeß relevanten Proteine oder Aminosäuren zu gering sein, um den Kondensationsgrad zu beeinflussen.

5.4.2.4 BLEOMYCIN (BLM)

Die Wirkung von Bleomycin auf das Interphasechromatin wurde auch in PCC-Studien anderer Autoren untersucht. In diesen Publikationen wird jedoch nichts von einer veränderten Kondensation bei PCCs nach Inkubation mit Bleomycin berichtet (Dresp und Bauchinger, 1988; Miller, 1991; Sen und Hittelman, 1984). Auch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit bestätigen, daß die Inkubation mit Bleomycin keine Auswirkung auf den Kondensationsgrad bei G_0-PCCs hatte. Die schädigende Wirkung von Bleomycin wird hauptsächlich auf die Bildung von DNA-Doppelstrangbrüchen und die Induktion von apurinen bzw. apyrimidinen Stellen in der DNA durch Eliminierung von Basen zurückgeführt (Porvik und Austin, 1991). Diese durch Bleomycin gesetzten DNA-Schädigungen haben –wie auch die vorliegenden Resultate zeigen- kaum einen Einfluß auf den Kondensationsgrad bei den G_0-PCCs.

5.4.2.5 MITOMYCIN C (MMC)

In Metaphasechromosomen wird nach Mitomycin C–Behandlung häufig vor allem an Chromosom 9 eine Unterkondensation des Heterochromatins beobachtet. Diese Unterkondensation beruht jedoch wahrscheinlich auf anderen Mechanismen als die beobachtete (leicht!) verminderte Kondensation der PCCs nach Mitomycin C-Behandlung. Fauth (1998) beobachtete nach Mitomycin C-Inkubation in Chromosomen auch Unterschiede in der Häufigkeit von Unterkondensationen zwischen Probanden. Es gibt Hinweise darauf, daß die Zusammensetzung des Heterochromatins und die verschiedenen Satelliten-DNA-Familien für die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber dekondensierenden Verbindungen verantwortlich sind (Fauth, 1998). Das Auftreten von Unterkondensationen vor allem im heterochromatischen Bereich von Chromosom 9 ist auch für Zellen beschrieben worden, die mit Idoxuridin behandelt worden waren (Fauth *et al.*, 1999). Iliakis *et al.* (1987) untersuchten u.a. die Induktion chromosomaler Schädigung bei CHO-Zellen in der G_1-Phase nach Einbau von radioaktiv markiertem ^{125}Idoxuridin und beschrieben eine Zunahme von PCC-Fragmenten und das Auftreten von Ringchromosomen, eine Verminderung des Kondensationsgrades der PCCs erwähnten sie jedoch nicht.

Die Verteilung der G_0-PCCs auf die vier Kondensationsgrade änderte sich nach eine Inkubation mit Mitomycin C bis zu einer Konzentration von 10µM nicht, ab einer Konzentration von 20µM allerdings statistisch hoch signifikant im Vergleich zur Kontrolle (siehe Kapitel 4.4.2.4.1). Die verringerte Kondensation der PCCs nach Mitomycin C-Behandlung ist weniger ein Phänomen, das nur einzelne Chromosomen präferentiell betrifft.

So ist neben der bekannten starken klastogenen Wirkung für Mitomycin C auch dessen aneugenes Potential bekannt (Renzi *et al.*, 1996). Mitomycin C schädigt das Kinetochor. Das Kinetochorprotein CENP-A ähnelt dem Histon H3, vor allem in der carboxylterminalen Region CENP-A kann damit als eine centromerspezifische modifizierte Form des Histons H3 betrachtet werden (Übersicht in: Vig, 1994). Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen dem Kinetochorprotein CENP-A und Histon H3 läßt auch gegenüber dem Histon H3 eine schädigende Wirkung von MitomycinC vermuten. Die zentrale Stellung von Histon H3 für die vorzeitige Chromosomenkondensation wurde bereits in Kapitel 2.1.3 erörtert.

5.4.2.6 DIETHYLSTILBESTROL (DES)

Die Wirkung von DES als Spindelgift ist bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde DES eingesetzt, um seine Wirkung auf G_0-Lymphozyten zu testen. Die einstündige Behandlung mit DES (200µM) bewirkte eine Verringerung des mittleren Kondensationsgrades der G_0-PCCs von 1,1 in der DMSO-Kontrolle auf 1,6 (siehe Kapitel 4.4.2.4.2). Man erwartet von einem Spindelgift nicht notwendigerweise, daß es den Kondensationsgrad von Chromosomen verringert. So ist z.B. bekannt, daß das Spindelgift Colchicin bzw. Colcemid dosis- und zeitabhängig den Kondensationsgrad mitotischer Chromosomen erhöht.

DES reagiert in Anwesenheit von Cumenhydroperoxid oder NADPH durch Bindung an Histone. Die Aktivierung von DES zu histonbindenden Metaboliten ist Cytochrom P-450-abhängig. DES-Chinon könnte eines dieser Histon-bindenden DES-Metabolite sein. Ein Angriffspunkt für DES-Metabolite kann die Sulphydrylgruppe von Histon H3 sein (Roy und Pathak, 1995). DES

steigert die Rate kinetochorpositiver Mikrokerne (Eastmond und Tucker, 1989). Auf die Ähnlichkeit zwischen dem Kinetochorprotein CENP-A und Histon H3, wurde bereits hingewiesen (siehe Kapitel 5.4.1.9). Die Strukturbeziehung zwischen dem Kinetochorprotein CENP-A und dem Histon H3, die Reagibilität von DES bezüglich Kinetochorproteinen und Histonen, v.a. dem Histon H3, einerseits und die Bedeutung des Histons H3 für die vorzeitige Chromosomenkondensation andererseits können die beobachtete geringere Kondensation erklären. Für die Chromosomenkondensation hat der Zentromerbereich eine besondere Bedeutung. Am Zentromer beginnt hauptsächlich die Chromosomenkondensation in Säugerzellen (He und Brinkley, 1996). In der G_2-Phase wird gleichzeitig die Phosphorylierung von H3 im perizentrischen Heterochromatin erhöht (Hendzel *et al.*, 1997). Auch bei der Induktion der vorzeitigen Chromosomenkondensation wird zuerst das Histon H3 im perizentrischen Heterochromatin phosphoryliert (Van Hooser *et al.*, 1998).

5.4.2.7 WEITERE BEISPIELE VERMINDERTER KONDENSATION BEI PCCS

Verminderte Kondensationen bei PCCs wurden in der Literatur vereinzelt auch nach anderen Mutageneinwirkungen beschrieben.

Die Hyperthermie-Behandlung (10 Minuten; 45,5°C) führte bei CHO-Zellen in der Plateau-Phase dazu, daß PCCs nicht den Kondensationsgrad erreichten wie unbehandelte Zellen; eine Auflösung der Nucleoli trat nicht ein (Iliakis und Pantelias, 1989). Diese strukturellen Veränderungen sind möglicherweise auf eine Zunahme von nukleären und cytoplasmatischen Proteinen zurückzuführen. Damit wird die Zugänglichkeit von Chromatin und anderen Kernstrukturen für die Enzyme, die während der PCC-Induktion wirksam werden, zerstört.

Iliakis und Pantelias (1989) boten für ihre Beobachtung zwei alternative Hypothesen an: Erstens könnten die hitzebehandelten Interphasezellen die PCC-induzierenden Faktoren der mitotischen Zellen neutralisieren (zum Beispiel durch Dephosphorylierung). Zweitens könnte die Hitze aber auch Veränderungen in zellulären Strukturen und Organellen (Chromatin, Nucleolus, Kernmembran etc.) induzieren, auf welche diese Faktoren wirken und damit die Möglichkeit dieser Strukturen bzw. Organellen, reduzieren als Substrate für enzymatische Reaktionen zu dienen, die den PCC-Prozeß betreffen.

Der Verlust der Fähigkeit zur vollständigen Kondensation wurde bei PCCs auch nach Behandlung mit Wasserstoffperoxid beobachtet (Iliakis *et al.,* 1992). Wurden CHO-Zellen H_2O_2-Konzentrationen oberhalb von 20mM ausgesetzt, zeigte ein kleiner Teil der fusionierten Zellen (weniger als 10%) nach PCC-Induktion eine nur unvollständige Kondensation des Chromatins, während bei den übrigen Zellen eine extensive Degradation zu beobachten war. Die unterschiedliche Schädigung der Zellen könnten Unterschiede im metabolischen Zustand der Zellen oder in der Entgiftungsmaschinerie darstellen (Iliakis *et al.,* 1992).

Geschädigte Zellen können Faktoren enthalten, welche die MPF-Aktivität inaktivieren. So wurde nach ultravioletter Bestrahlung eine Inaktivierung der mitotischen Faktoren in HeLa-Zellen beobachtet (Adlakha *et al.,* 1984). Durch Röntgen-Bestrahlung (2 Gray) wurde die Chromosomenkondensation in HeLa-Zellen in der G_2-Phase gehemmt (Mikkelsen und Gentry, 1992). Vanadat führte zu einer Abnahme der $p34^{cdc2}$ /H1 Kinase-Aktivität ohne jedoch zu einer Degradation des $p34^{cdc2}$-Cyclin B-Komplexes und zur

Dephosphorylierung von H1 und H3 (Ajiro *et al.,* 1996) zu führen. Vanadat hemmt die Aktivität der cdc25-Phosphatase *in vitro* (Kumagai und Dunphy, 1991). Diese Phosphatase dephosphoryliert den Tyrosin 15-Rest und induziert die Aktivität der cdc2-Kinase (Gautier *et al.,* 1991; Strausfeld *et al.,* 1991). Lee *et al.* (1991) beschrieben die negative Regulation des MPF und charakterisierten sie als eine Form der Proteinphosphatase 2A, die zur Dephosphorylierung von Cyclin und von Threonin führt. Die Phosphorylierung von Threonin bleibt während der Aktivität des $p34^{cdc2}$-Cyclin-Komplexes bestehen (Solomon *et al.,* 1990). Die Dephosphorylierung von Threonin-161 unterdrückt die $p34^{cdc2}$-Kinase-Aktivität.
Es ist unwahrscheinlich, daß die unzureichende Chromatinkondensation einen frühen Schritt zum Zelltod repräsentiert, da hohe Dosen von Röntgenstrahlung dieses Phänomen nicht induzieren (Waldren und Johnson, 1974).

5.4.3 APOPTOSE UND KONDENSATIONSVERÄNDERUNG BEI PCCS

Die Behandlung mit *trans*-2-Hexenal, 2-*trans*,4-*trans*-Hexadien-1-al, *trans*-2-Octenal und 2-*trans*,6-*cis*-Nonadienal führte substanzabhängig mit steigender Kettenlänge bei den Zellinien U937 und HL-60 zu einem Anstieg der Apoptoseinduktion (Genzlinger, 1998).
Apoptose - der programmierte Zelltod – ist morphologisch charakterisiert durch eine spezifische Folge von Ereignissen wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation und Fragmentierung der Kern-DNA und des Chromatins (Wyllie, 1993).
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird beschrieben, daß die α,β–ungesättigten Aldehyde Crotonaldehyd und 2-*trans*-Hexenal den Kondensationsgrad nach PCC-Induktion von Lymphozyten in der G_0-Phase verringern.
Die Chromatinkondensation als Resultat von Apoptose einerseits und die Verringerung der Kondensation bei PCCs andererseits sind beides Phänomene, die nach Behandlung mit α,β-ungesättigten Aldehyden beschrieben wurden.
Eine vorzeitige Induktion des Interphasechromatins kann durch Mutationen (Uchida *et al.,* 1990), durch Koffein (Schlegel und Pardee, 1986) und durch Proteinkinasehemmstoffe (Tam und Schlegel, 1992) verursacht werden, die die außerplanmäßige Aktivierung der $p34^{cdc2}$-Kinase während des Zellzyklus veranlaßt. Da beide Phänomene (Apoptose und vorzeitige Kondensation des Interphasechromatins) mit einer Kondensation des Chromatins verbunden sind, wird die Beteiligung der $p34^{cdc2}$-Kinase an der Apoptose diskutiert. Es zeigte sich jedoch, daß in apoptotischen Zellen keine intrazelluläre Aktivierung von $p34^{cdc2}$ nachgewiesen werden konnte (Oberhammer *et al.*, 1994). Außerdem führte die Induktion von Apoptose nicht zu Phosphorylierungen der Histone H1 und H3 (Yoshida *et al.*, 1997).

5.5 EINFLUSS VON REPARATURVORGÄNGEN

Die DNA-Reparaturkapazität der Zellen zeigt hohe interindividuelle Unterschiede (Harris, 1989; Hongslo *et al.,* 1993).
Auch das Alter der Probanden scheint für das unterschiedliche Ausmaß der Chromosomenschädigung in Leukozyten eine Rolle zu spielen. Nach Röntgenbestrahlung und anschließender 24 Stunden-Inkubation waren in den Zellen jüngerer Spender weniger PCC-Fragmente als in Zellen von älteren Spendern nachzuweisen (Maillie *et al.*, 1992).

Zellen, die in der Ruhephase des Zellzyklus sind (wie z.B. Lymphozyten), eignen sich zum direkten Studium der Reparatur von Chromosomenaberrationen; die Untersuchungen können dabei über einen längeren Zeitraum ausgedehnt werden, ohne durch den Zellzyklus beeinflußt zu werden. Allerdings divergieren die Ergebnisse bezüglich der Reparaturkapazität von Zellen in der Ruhephase. Während einige Autoren berichten, daß unstimulierte periphere Lymphozyten reparaturdefizient sind (Scudiero *et al.*, 1976; Barret *et al.*, 1995), wird von anderen Autoren erwähnt, daß unstimulierte Lymphozyten Schäden reparieren können (Yew und Johnson, 1979; Kovacs und Langemann, 1990; Celotti *et al.*, 1992; Schrader, 1992). Stimulierte humane Lympozyten wiesen in der G_1-Phase ähnliche Reparaturzeiten wie in der G_0-Phase auf (Wolff, 1972). Lymphozyten zeigten eine spontane Aktivität zur Exzisionsreparatur (Schrader und Walker, 1988). Nitrilotriessigsäure (NTA) führte in hoher Dosierung bei unstimulierten Lymphozyten zur DNA-Schädigung, DNA-Excisionsreparatur und zur außerplanmäßigen DNA-Synthese (Cellotti *et al.*, 1988). Auch Holmberg und Mitarbeiter (1988) wiesen die außerplanmäßige DNA-Synthese in unstimulierten Lymphozyten nach. Fibroblasten in der Ruhephase können außerplanmäßig DNA synthetisieren und eine durch UV- und Röntgen-Strahlung induzierte Schädigung reparieren (Übersicht in: Sen und Hittelman, 1984).

In PCC-Experimenten wurde gezeigt, daß mononukleäre Zellen des Blutes und normale humane Fibroblasten in der Ruhephase eine Kapazität zur Chromosomenreparatur besitzen, ohne in den Zellzyklus eintreten zu müssen. Nach Bleomycin-Behandlung zeigten beide Zellsysteme ähnliche Reparaturkinetiken, wobei die Fibroblasten sensitiver waren als die mononukleären Zellen (Sen und Hittelman, 1984). Sognier und Hittelman (1983) zeigten, daß humane diploide Fibroblasten DNA-Quervernetzungen, die durch Stickstoff-Lost-Verbindungen and MitomycinC induziert wurden, reparieren konnten. Hittelman und Pollard (1982) beobachteten bei normalen humanen Fibroblasten die Reparatur von neocarzinostatin-induzierten Chromosomenbrüchen.

5.5.1 REPARATURHEMMSTOFFE

Als Reparaturhemmstoffe wurden in der vorliegenden Arbeit Arabino-furanosylcytosin (AraC), Hydroxyharnstoff (HU), Arabinofuranosylcytosin und Hydroxyharnstoff in Kombination (AraC+HU) und Novobiocin (NB) eingesetzt. In den Versuchen dieser Arbeit wurde die Inkubation bzw. die Nachinkubation der Zellen mit den Reparaturinhibitoren bzw. in serumfreiem Medium bei 37°C durchgeführt, um mögliche Reparaturvorgänge nicht bereits durch den Einfluß ungeeigneter Temperaturen zu hemmen. Die Konzentrationen der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Reparatur-hemmstoffe Arabinofuranosylcytosin, Hydroxyharnstoff und Novobiocin wurden einer Publikation von Collins *et al.* (1981) entnommen. Collins *et al.* (1981) untersuchten mit der PCC-Technik in HeLa-Zellen die durch Methylnitrosamide verursachte DNA-Schädigung und Reparatur.

5.5.1.1 ARABINOFURANOSYLCYTOSIN (ARA C)

Ara C wird in der Zelle zu Arabinofuranosylcytosintriphosphat (Ara-CTP) phosphoryliert. Dies führt zu einer kompetitiven Hemmung mit dem normalen Substrat Desoxycytosintriphosphat (dCTP) und damit zu einer Hemmung der

DNA-Polymerisation (Gedik und Collins, 1991). Außerdem wurde vermutet, daß Ara-CTP anstelle von dCTP in die DNA eingebaut wird (Snyder *et al.*, 1984) oder mit der DNA-Ligase reagiert (Mikita und Beardsley, 1988).
Ara C kann radiomimetisch wirken und bei Applikation in G_1- oder G_2-Zellen direkt Chromatidtyp- bzw. Chromosomentyp- Aberrationen erzeugen.
Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die einstündige Behandlung unstimulierter Lymphozyten mit AraC in einer Konzentration von 100µM zu einer Schädigung der G_0-PCCs in 74,2% der untersuchten Zellen führte.
Bei PCCs von HeLa-Zellen, die während der G_1-Phase mit 10^{-7}M AraC für eine Stunde behandelt worden waren, konnte für AraC keine klastogene Aktivität nachgewiesen werden (Schor *et al.,* 1975; Collins *et al.,* 1981). In einer anderen PCC-Studie wurde jedoch eine klastogene Wirkung für AraC in isolierten Lymphozyten nachgewiesen (Pantelias und Wolff,1985). Nach einer dreistündigen Inkubation mit AraC waren etwa 50% der untersuchten Lymphozyten geschädigt. Bei einer Erhöhung der Inkubationsdauer nahm die Fragmentzahl in den geschädigten Zellen zu, die Anzahl der geschädigten Zellen blieb jedoch gleich.
Die Resultate der vorliegenden Arbeit demonstrieren jedoch bereits nach einstündiger Inkubation mit Ara C dessen klastogene Wirkung. In peripheren Blutlymphozyten erfolgte die Ansammlung einer signifikanten Anzahl Ara C-assoziierter Einzelstrangbrüche nach Behandlung mit einem niedrig-dosierten alkylierenden Agens bereits während der fünfzehnminütigen DNA-Reparaturinkubation (Boerrigter und Vijg, 1992).

5.5.1.2 HYDROXYHARNSTOFF (HU) BZW. ARA C UND HU

Hydroxyharnstoff wirkt, indem es die Nukleotidreduktase hemmt, ein Enzym, das die Reduktion der Ribonukleotiddiphosphate zu den entsprechenden Desoxyribonukleotiddiphosphaten bewirkt. Dieser Schritt ist essentiell für die Bildung der entsprechenden Triphosphate, die in der DNA-Reparatursynthese eingesetzt werden (Thelander und Reichard, 1979; Borchers *et al*., 1990). Die Resultate der vorliegenden PCC-Studien zeigen, daß nach Behandlung mit Hydroxyharnstoff 4,4 Fragmente pro geschädigte Zelle auftraten. Damit war die bei der Kontrolle beobachtete Anzahl von 1,8 Chromatinfragmenten pro geschädigte Zelle erhöht. Möglicherweise ist die DNA-Reparatur aufgrund der geringen Menge an Desoxyribonukleotiden in sich nicht-teilenden humanen Lymphozyten besonders sensitiv gegenüber Schwankungen im Desoxyribonukleotid-Pool (Cohen und Thompson, 1986).
Die PCC-Studien der vorliegenden Arbeit zeigten keinen synergistischen Effekt für die kombinierte Behandlung von HU mit Ara C und damit keine Erhöhung der Anzahl von Fragmenten pro geschädigte Zelle (siehe Kapitel 4.2.3)

5.5.1.3 NOVOBIOCIN (NB)

NB hemmt die Topoisomerase II-Aktivität durch Interferieren mit der ATPase-Untereinheit des Enzyms (das Graças Medeiros und Takahashi, 1994). NB wird aber eher als unspezifischer Topoisomerase II-Hemmstoff angesehen, da es eine Vielzahl von weiteren Enzymaktivitäten hemmt (siehe Kapitel 2.8.2). Hemmstoffe der DNA Topoisomerase II induzieren Doppelstrangbrüche, die chromosomale Aberrationen in allen Phasen des Zellzyklus verursachen und ähnlich wie ionisierende Strahlung via eines S-Phase-unabhängigen

Mechanismus wirken (Mosesso *et al.*, 1999). In der vorliegenden Arbeit wurde nach Novobiocin-Behandlung die Anzahl der geschädigten PCCs in der G_0-Phase hoch signifikant gesteigert (von 11,9% geschädigten Zellen in der Kontrolle auf 32,1 % nach 1mM Novobiocin-Behandlung), allerdings traten nur 1,5 Fragmente pro geschädigte Zelle im Vergleich zur Kontrolle mit 1,8 Fragmenten pro geschädigter Zelle auf (siehe Kapitel 4.2.3). Das Ergebnis der vorliegenden Untersuchung bestätigt möglicherweise die eher unspezifische Wirkung von NB als Topoisomerase-Hemmstoff und läßt auf die Existenz anderer/weiterer Mechanismen in der Wirkung für Novobiocin schließen.
Ajiro und Nishimoto (1985) untersuchten den Zusammenhang zwischen der PCC-Induktion und der Phosphorylierung der Histone H1 bzw. H3 bei tsBN2-Zellen nach Novobiocin-Behandlung (0,4 mg/ml). Die Induktion von PCCs wurde durch die Novobiocin-Behandlung um 0,1% gesenkt, wobei nur die Phosphorylierung von H1, nicht aber von H3 festgestellt wurde (Ajiro und Nishimoto, 1985). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Reduktion der PCC-Rate allerdings nicht beobachtet.

5.5.1.4 REPARATUR VON SCHÄDEN NACH BEHANDLUNG MIT α,β-UNGESÄTTIGTEN ALDEHYDEN

Durch den Einsatz von Reparaturhemmstoffen sollte geklärt werden, ob die beobachtete Veränderung des Kondensationsgrades nach Behandlung mit 2-Alkenalen möglicherweise das Resultat zelleigener Ausschneidereparatur darstellt.
PCC-Studien ergaben, daß die Morphologie von Chromatin besonders nach der Behandlung mit Agenzien, die eine Reparatur größerer DNA-Abschnitte induzieren, verändert wurde. Nach UV-Bestrahlung und nach Inkubation mit alkylierenden Substanzen wurde in PCCs das Auftreten von Elongationen und Fragmentierungen beobachtet (Johnson *et al.* 1982; Hittelmann, 1984). Johnson *et al.* (1982) zeigten, daß eine enge Beziehung zwischen der Produktion und Anhäufung von Einzelstrangbrüchen in der DNA und der Entspiralisierung bei PCCs bestand (Johnson *et al.*, 1982). Normale Fibroblasten in der Ruhephase zeigten nach UV-Bestrahlung dosisabhängig eine generelle Elongation ihrer G_1-PCCs und Regionen lokaler Elongationen. Die Alterationen traten direkt nach Behandlung auf. Die lokale Dekondensation war assoziiert mit außerplanmäßiger DNA-Synthese. Durch Nachinkubation in AraC oder HU konnte die Wirkung von UV bzw. alkylierenden Substanzen auf das Chromatin verstärkt werden und führte in den PCCs zur Akkumulation von Gaps infolge von Excisionsreparatur (Hittelman, 1986 b). Die Postinkubation mit NB reduzierte die Ara C/HU induzierte Entspiralisierung von PCCs in HeLa-Zellen nach Inkubation mit N-Methyl-N-Nitrosourethan (Collins *et al.*, 1981) bzw. nach UV-Bestrahlung
2-Alkenale induzierten in 100-200µmolaren Konzentrationen dosisabhängig Einzelstrangbrüche. Nach einer einstündigen Inkubation von Namalvazellen mit Crotonaldehyd bzw. Hexenal ließen sich Einzelstrangbrüche nachweisen, die als Ergebnis zelleigener Ausschneidereparatur gedeutet wurden (Schuhmacher, 1990). Die durch Hexenal ausgelösten DNA-Schäden konnten innerhalb relativ kurzer Zeit repariert werden. Nach einer einstündigen Inkubation in 300µM Hexenal und Nachinkubation in hexenalfreiem Medium konnte mit der alkalischen Filterelution gezeigt werden, daß das Ausmaß der DNA-Schädigung mit zunehmender Inkubationsdauer in hexenalfreiem Medium zurückging. Die Einzelstrangbrüche waren nach 4 Stunden praktisch

vollständig repariert (Schuhmacher, 1990). Daraus wurde geschlossen, daß es sich dabei um Reparaturprozesse handelte, bei denen kovalent modifizierte Basen aus der DNA herausgeschnitten wurden, durch neue Basen ersetzt und die DNA-Bruchstücke wieder zusammengesetzt wurden.
Die Hemmung der Reparatur wird vor allem dann deutlich, falls größere DNA-Abschnitte involviert sind (Johnson *et al.*, 1987). Sollte die beobachtete Verringerung des Kondensationsgrades aufgrund von Ausschneidereparaturvorgängen - vor allem falls sie die Reparatur größerer DNA-Abschnitte betreffen - erfolgt sein, so wäre eine Beeinflussung durch die Reparaturhemmstoffe zu erwarten gewesen. Weder die gleichzeitige Behandlung der Lymphozyten mit Crotonaldehyd und Ara C+HU noch die Nachinkubation in AraC+HU-haltigem Medium nach Crotonaldehyd-Behandlung beeinflußten jedoch den Kondensationsgrad der G_0-PCCs (siehe Kapitel 4.2.3.2).
Auf versuchsbedingte Variable, wie die Konzentration der Reparaturhemmstoffe oder die Schritte des Versuchsprotokolls selbst, sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit offensichtlich nicht zurückzuführen. Die alleinige Inkubation der Lymphozyten mit den jeweiligen Reparaturhemmstoffen zeigte durchaus Effekte. Die Bildung von DNA-Addukten für Crotonaldehyd und Hexenal ist beschrieben. Über die Struktur-Wirkungsbeziehung zwischen der Bildung von DNA-Addukten und der Induktion der vorzeitig kondensierten Chromosomenkondensation ist wenig bekannt. Die Resultate der vorliegenden Arbeit können dahingehend gedeutet werden, daß der geringe Kondensationsgrad nach Behandlung mit α,β-ungesättigten Aldehyden nicht die Folge einer verstärkten Excisionsreparatur größerer DNA-Abschnitte zu sein scheint. Auch die Beobachtung Schuhmachers (1990), daß durch Hexenal gesetzte Einzelstrangbrüche innerhalb von vier Stunden bereits repariert sind, scheint diesen Schluß zuzulassen. Ein weiterer Versuchsansatz wäre durch die Zugabe von DNA Vorläufern gegeben: Die Entspiralisierung und die Ansammlung von Brüchen nach Hemmung der Reparatur durch DNA-Synthesehemmstoffe kann nämlich durch die Zugabe von Desoxyribonukleosiden rückgängig gemacht werden (Johnson *et al.*, 1982).

5.5.2 MITOMYCIN C UND REPARATUR

PCC-Studien von Hittelman (1984) ergaben, daß eine Inkubation mit Mitomycin C in einer Konzentration von 3 oder 30µg/ml und eine 24 stündige Nachinkubation mit Ara C und HU vor der Fusion eine nur leichte Entspiralisierung bei G_0-PCCs im Vergleich zur Kontrolle induzierte. Ein signifikantes Ausmaß in der Entspiralisierung wurde erst nach einer Inkubation der Zellen mit Mitomycin C in einer Konzentration von 100mM erreicht. Das deutet darauf hin, daß Mitomycin C nicht hauptsächlich die Läsionen induziert, deren Reparatur durch Ara C und HU gehemmt wurden (Hittelman, 1984). In der vorliegenden Arbeit änderte sich die Verteilung der G_0-PCCs auf die vier Kondensationsgrade nach einer einstündigen Mitomycin C-Behandlung in der Konzentration von 20µM im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle hoch signifikant. Bis zu einer Konzentration von 10µm war der Unterschied zur Kontrolle allerdings statistisch nicht signifikant (siehe Kapitel 4.4.2.2.1). Die durch MMC induzierten Läsionen werden durch einen Mechanismus repariert, der nicht über eine große Einzelstrang-Lücke als Teil der Excisionsreparatur arbeitet (Hittelman, 1984).

5.6 PCC UND FISH

Die Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (FISH) wird in Kombination mit der PCC-Technik eingesetzt, um eine Chromosomenschädigung im gesamten Genom genauer zu erfassen. Dabei werden meist nur einige Chromosomen mit FISH markiert. Die so beobachteten Umbauten werden auf das Gesamtgenom übertragen. Dabei geht man davon aus, daß Bruchpunkte zufällig innerhalb und zwischen den Chromosomen verteilt sind. Einige Autoren setzten die FISH zur Evalution von Strahlenschäden bei vorzeitig kondensierten Chromosomen ein. Sasai *et al.* (1994) untersuchten die Schädigung von γ–Strahlung auf verschiedene Zellinien. Sie setzten die FISH-Technik in Kombination mit der PCC-Methode ein und beobachteten, daß bei den untersuchten Zellinien die anfängliche Anzahl der Brüche in Chromosom 4 proportional zur Strahlendosis und in guter Übereinstimmung mit der Größe von Chromosom 4 war.
Die FISH mit spezifischen Sonden für die Chromosomen 1, 4, 8 und 13 zeigte, daß die Schädigung bei den Chromosomen zufällig verteilt war; die Resultate unterstützten daher die Hypothese, daß die gesamte Anzahl chromosomaler Aberrationen in den Zellen durch ein einzelnes Chromosomenpaar abgeschätzt werden kann (Kovacs *et al.*, 1994).
Die Möglichkeit, über die Extrapolation eines einzelnen Chromosoms das Ausmaß der Längenveränderung im gesamten Genom zu erfassen, wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Die lichtmikroskopische Einteilung der PCCs in einzelne Kategorien gibt kein exaktes Bild über das Ausmaß der Veränderung des Kondensationsverhaltens der PCC. Hierbei wird die Morphologie des Chromatins der gesamten Zelle nur grob in vier Kondensationsstufen eingeteilt. Um die Veränderung der Kondensation des Interphasechromatins nach PCC-Induktion vor und nach Behandlung mit den α,β-ungesättigten Aldehyden besser quantifizieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die FISH-Technik exemplarisch mit der Chromosomen 4-spezifischen Sonde eingesetzt. Dadurch wird die komplette Markierung des Chromosoms ermöglicht und kann längenmäßig erfaßt werden (siehe Kapitel 4.2.4)
Nicht zuletzt fiel die Wahl bei den FISH-Studien auf Chromosom 4, weil dieses ein relativ großes Chromosom ist, das deutliche Hybridisierungssignale und daher exakte Meßergebnisse erwarten ließ. Außerdem war aus der Literatur mehrfach der Einsatz der Chromosom 4-spezifischen Sonde auf PCCs beschrieben. Kovacs *et al.* (1994) bemerkten, daß die Intensität der Färbung im p-Arm von Chromosom 1 geringer war als im Rest des vorzeitig kondensierten Chromosoms. Für die Chromosomen 4 und 8 waren die Intensitäten jedoch einheitlich.
Der geringere Kondensationsgrad der PCCs nach Behandlung der Zellen mit α,β–ungesättigten Aldehyden kann die Intensität der Hybridisierungssignale schwächen. Die vorliegenden Resultate ergaben jedoch eine einheitlich deutliche Färbung der gesamte Länge von Chromosoms 4.
Da nach den Ergebnissen dieser Arbeit die beobachteten Elongationseffekte wohl kaum das Resultat von verstärkten Reparaturmechanismen zu sein scheinen, ist auch der Einsatz spezifischer Chromosomen unkritisch. Denkbar ist nämlich, daß die Gendichte das Kondensationsverhalten von PCCs beeinflussen könnte. Genreiche Abschnitte eines Chromosoms sind für Reparaturenzyme offener und zeigen möglicherweise eine geringere Kondensation als genarme Abschnitte. Es zeigte sich, daß die Chromosomen 4 nach Hybridisierung mit einer CpG-Island spezifischen Sonde kaum

Hybridisierungssignale aufwiesen und daher als genarme Chromosomen gelten (Surralles *et al.*, 1997). CpG-Islands sind CG-reiche Sequenzen am 5´-Ende der meisten Säugergene einschließlich aller „housekeeping"-Gene. Sie haben eine wichtige Rolle bei der Genregulation mittels eines auf Methylierung basierenden Mechanismus (Bird, 1986). Wären also die durch die α,β-ungesättigten Aldehyde verursachten Elongationen das Ergebnis von Reparaturmechanismen, wäre bei der Wahl der eingesetzten Painting-Sonde auch der Genanteil des Chromosoms von Bedeutung.
Bei einer Studie wurde durch den Einsatz der Paintingproben für die humanen Chromosomen 1 und 4 gezeigt, daß bei röntgenbestrahlten humanen Lymphozyten die Häufigkeit der beobachteten Austauschaberrationen von denen, die aufgrund des DNA-Gehalts erwartet wurden, abwich (Natarajan *et al.*, 1996). Dabei war Chromosom 4 besonders häufig in Austauschprozesse involviert. Während Chromosom 1 bei dizentrischen Chromosomen und reziproken Translokationen etwa gleich häufig betroffen wurde, traten bei Chromosom 4 reziproke Translokationen etwa doppelt so oft auf wie dizentrische Chromosomen (Boei *et al.*, unveröffentlichte Ergebnisse in: Natarajan *et al.*, 1996). Ein möglicher Faktor für die höhere Sensitivität von Chromosom 4 ist die geringe Konzentration transkribierender Gene im Vergleich zu Chromosom 1 (Craig und Bickmore, 1994)

5.7 ZELLKINETIK-STUDIEN AN VORZEITIG KONDENSIERTERN CHROMOSOMEN

5.7.1 ZELLZYKLUSPHASEN UND TEILUNGSZYKLEN

Die Morphologie vorzeitig kondensierter Chromosomen ändert sich entsprechend der Zellzyklusphase, in der sich die Zelle zum Zeitpunkt ihrer Fusion befand. Das Muster der quantitativen Verteilung der Interphasestadien läßt Rückschlüsse auf das Proliferationsverhalten einer gegebenen Zellpopulation zu (Sperling und Rao, 1974; Schlesinger und Gebhart, 1987).
Kontrovers wird die Frage diskutiert, ob Zellen einer bestimmten Zellzyklusphase bevorzugt fusionieren.
Schnedl *et al.* (1975) machten die Beobachtung, daß bei Zellen in der G_2-Phase häufiger eine vorzeitige Chromosomenkondensation induziert wurde als man aufgrund der Häufigkeit der Zellen in der Kultur vor der Fusion erwarten würde; sie führten dieses Phänomen auf einen bereits gebildeten kondensierenden Faktor in den G_2-Zellen zurück, welche die PCC-Induktion erleichterte. Andere Autoren stellten wiederum fest, daß die Effizienz der PCC-Induktion unabhängig von der Zellzyklusphase war (Yanishewsky und Carrano, 1975).
Rao *et al.* (1977) beschrieben die Bedingungen, die nötig sind, damit ähnlich hohe Anzahl von PCCs in Interphasezellen bei verschiedenen Positionen innerhalb des Zellzyklus erreicht werden. Sie zeigten, daß es wichtig ist, frische Colcemid-arretierte mitotische Zellen zu verwenden (Zellen, die nicht länger als 4-6 Stunden arretiert worden waren) und 2mM $MgCl_2$ zum Fusionsgemisch zu geben.
Bei der fusionsvermittelten PCC-Induktion muß bedacht werden, daß die Zellfusion ein Membranphänomen ist, und daß eine Veränderung der Membraneigenschaften mit dem Fusionsprozeß interferieren kann. Bei der Zellphasen-Analyse via PCC-Technik werden somit nur die Zellen erfaßt, die fusionieren und als PCCs erscheinen (Herrera *et al.*, 1991). Dies gilt jedoch

nicht für mitotische Zellen, die unabhängig von dem Fusionsprozeß auf den mikroskopischen Präparaten sichtbar werden. Durch eine zusätzliche Auswertung des M-PCC-Indexes kann ermittelt werden, ob die Mutagenbehandlung die Fusionskapazität der Zellen beeinflußt, jedoch nicht, ob Zellen in einer bestimmten Zellzyklusphase bevorzugt fusionieren. Der M-PCC-Index gibt den Anteil von CHO-Metaphasen an, die PCCs induziert haben (Pantelias und Maillie, 1983). In der vorliegenden Arbeit wurde der M-PCC-Index für unbehandelte Zellen exemplarisch bestimmt (siehe Kapitel 4.2.2.4).
In der vorliegenden Arbeit waren die Chromosomen der Metaphasen auf den Präparaten, die PCCs und Metaphasen enthielten, besonders kondensiert und ließen sich daher gut von den G_2-PCCs unterscheiden. Die PCCs in der G_2-Phase erschienen im Vergleich zu den mitotischen Chromosomen länger und waren erwartungsgemäß mit mitotischen CHO-Chromosomen assoziiert.
Verglichen mit Chromosomen aus Metaphasespreitungen erschienen PCCs nach Behandlung mit Phosphatase-Hemmstoffen unklar konturiert und die Spreitungen waren oft kompakt (Coco-Martin und Begg, 1997).
Herrera *et al.* (1991) beobachteten eine Variabilität in der Reaktion auf PHA zwischen Probanden. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Zellzyklusanalyse das Blut von nur einer Person eingesetzt. Eine Variabilität in der Reaktion auf PHA bei einer einzelnen Person ist allerdings ebenso möglich (Tavadia und Fleming, 1975: in Herrera *et al.*, 1991). Bei der Betrachtung der Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen in den unbehandelten Kontrollkulturen (Vorversuch) wird deutlich, daß der prozentuale Anteil der Zellen in der G_1-Phase zwischen 17,5% und 19%, in der S-Phase zwischen 10,3% und 12,4%, in der G_2-Phase zwischen 19,5% und 22,7% und in der Mitose zwischen 38,7% und 46,5% an der Gesamtzellpopulation betrug (siehe Kapitel 4.2.2.3). Damit war nur eine leichte Variabiliät zwischen den Versuchsreihen festzustellen.
Mit dem Einbau von BrdU während der S-Phase des Zellzyklus kann in proliferationsaktiven Zellen außerdem die Replikationskinetik bestimmt werden (Tice *et al.*, 1976). Durch Kombination der PCC-Technik mit der BrdU-Markierungstechnik können Zellen nicht nur den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden, sondern es kann auch die Geschwindigkeit dieser Zellen beim Durchlaufen der Replikationszyklen festgestellt werden. In dieser Arbeit wurde die FPG-Färbung ergänzend eingesetzt, um die Beeinflussung der Zellkinetik durch Crotonaldehyd und Bleomycin (siehe Kapitel 4.2.2.3) und durch NDELA (siehe Kapitel 4.3.2.3) zu testen. Die Resultate der vorliegenden Arbeit bestätigen frühere Ergebnisse Dittberners (1993), die ebenfalls feststellte, daß Crotonaldehyd die Teilungsgeschwindigkeit von Lymphozyten hemmte. Der verlangsamte Zellzyklus nach Crotonaldehyd-Behandlung wurde als das Ergebnis einer gestörten DNA-Replikation gedeutet, die auf eine Wechselwirkung von Crotonaldehyd mit Enzymen und/oder der DNA der Zellen zurückgeführt werden kann (Dittberner, 1993). Die Bleomycin-Behandlung hemmte ebenfalls die Teilungsgeschwindigkeit der Zellen, was möglicherweise mit der Bildung von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA zusammenhängt. Allerdings wird dieser Effekt in den Zellen, die das Mitosestadium erreichten, nicht festgestellt. Sen und Hittelman (1984) beobachteten nach Bleomycin-Behandlung eine langsame und eine schnelle Reparaturkomponente (siehe Kapitel 4.2.2.3 und 4.3.2.3). Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen deutet darauf hin, daß diese mitotischen Zellen die Zellfraktion repräsentieren,

bei der die schnelle Reparaturkomponente wirksam wurde. Durch die Behandlung mit NDELA dagegen kann keine Änderung der Teilungsgeschwindigkeit der Zellen festgestellt werden.

5.7.2 ZELLZYKLUSARREST UND ABERRATIONSANALYSE

Die PCC-Methode hat den Vorteil, daß man nicht nur die Zellzyklusphase bestimmen kann, in der die Zellen blockiert wurden, sondern daß auch die strukturelle Integrität ihrer Chromosomen sichtbar wird (Herrera *et al.*, 1991). Dadurch kann die Wirkung von Agentien auf Chromosomen zu jedem Zeitpunk des Zellzyklus untersucht werden; auch die Mutagenwirkung auf extrem geschädigte und damit nicht mehr teilungsfähige Zellen wird erfaßbar (Tittelbach, 1992).

Die klastogene Aktivität von Crotonaldehyd und Bleomycin wurde in der vorliegenden Arbeit vergleichend in vorzeitig in der G_2-Phase kondensierten Chromosomen und Metaphasechromosomen humaner Lymphozyten analysiert. Die Daten der vorliegenden Arbeit zeigen, daß die meisten der G_2-PCCs (ab einer Crotonaldehyd-Konzentration von 180µM und bei einer Bleomycin-Konzentration von 10µg/ml) geschädigt waren. Ab einer Crotonaldehyd-Konzentration von 180µM war die Aberrationsrate in G_2-PCCs –jedoch nicht immer statistisch signifikant- höher als in mitotischen Zellen. Die Anzahl von Aberrationen war bei einer Crotonaldehyd-Konzentration von 180µM in G_2-PCCs sogar signifikant höher als in Metaphasen. Der Mitose-Index sank in den 73 Stunden-Vollblutkulturen von 81‰ in der Kontrolle auf 51‰ nach Crotonaldehyd-Behandlung (180µM). Dieses Resultat bestätigt, daß viele geschädigte Zellen das Mitosestadium nicht erreichten. Durch die Crotonaldehyd-Behandlung wurden die Zellen in der G_1-Phase, aber auch in der G_2-Phase arretiert (siehe Kapitel 4.2.2.5).

Vorzeitig in der G_2-Phase kondensierte Chromosomen zeigten direkt nach Bleomycin-Behandlung ein fünf- bis neunfach höheres Auftreten von Chromosomenaberrationen als mitotische Chromosomen (Hittelman und Rao, 1974 a). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden nach der Bleomycin-Inkubation in G_2-PCCs viermal so häufig Aberrationen beobachtet als in Metaphasen (siehe Kapitel 4.2.2.5). Neben strukturellen Aberrationen wurde nach Bleomycin-Applikation eine Verzögerung der Zellen beim Durchlaufen der G_2-Phase beschrieben (Tobey, 1971; Watanabe *et al.*, 1974).

Nach der NDELA-Behandlung wurde jedoch kein Unterschied zwischen der Aberrationsrate bei Zellen in der G_2-Phase und Metaphasen erkennbar. Auf die Auswertungsschwierigkeit der Präparate mit PCC- bzw. Metaphasen-Spreitungen NDELA-behandelter Lymphozyten wurde bereits hingewiesen (siehe Kapitel 4.2.2.5 und 4.3.2.4).

In proliferierenden Zellen wird ein Großteil der DNA-Schädigung, die chromosomale Aberrationen induzieren kann, während der G_2-Phase repariert (Übersicht in: Pincheira *et al.*, 1993). Die Arretierung von Zellen in der G_2-Phase kann aber auch das Ergebnis einer so starken Zellschädigung sein, daß die Zellen die Mitose nicht mehr erreichen (Rao und Rao, 1976; Rao, 1980).

5.8 VERGLEICH DER ABERRATIONSRATE MITOTISCHER UND VORZEITIG KONDENSIERTER CHROMOSOMEN

Die PCC-Technik erlaubt die direkte Sichtbarmachung von Interphasechromosomen. Damit wird ein Vergleich zwischen dem Ausmaß der

Schädigung in Interphasekernen und in Zellen bei Erreichen der Mitose ermöglicht.
Die Aberrationen, die in der Metaphase beobachtet werden, sind das Ergebnis multipler Mechanismen und Reparaturvorgänge; in ihrer Komplexizität können Reparaturprozesse DNA-Läsionen entfernen, um eine Aberration auszuschließen, sie können aber auch selbst Aberrationen induzieren (Sirover, 1990; Lefterov und Koldamova, 1992). Reparaturvorgänge lassen sich allerdings bei der PCC-Technik auch während der Fusion und der Chromosomenkondensation nicht vermeiden. Deshalb wurde von einigen Autoren eine Inkubationsdauer von 20 Minuten für die Fusion der Zellen als ausreichend und für die Chromosomenkondensation als geeignet vorgeschlagen, damit ein weiteres Zusammenfügen von Brüchen vermieden werden konnte (Cornforth und Bedford, 1993; Loucas und Gerard 1994 in: Durante *et al.*, 1996 a).
Die Vorteile der PCC-Technik im Vergleich zur Metaphasenanalyse sind evident. Allerdings sollte man ebenso die Grenzen der PCC-Methode erwähnen. So muß zum Beispiel bei der Beurteilung der Schädigung berücksichtigt werden, daß der Prozeß der Zellfusion und die Kondensation des Interphasechromatins selbst Zeit in Anspruch nehmen. Außerdem laufen Reparaturprozesse auch zu Beginn der Fusions- und Kondensationvorgänge weiter (Okayasu und Iliakis, 1993).

5.8.1 METHODISCHE ASPEKTE BEI DER ANALYSE VON PCCS

Im Vergleich zur klassischen Cytogenetik bietet die PCC-Technik eine wesentlich schnellere Verfügbarkeit von Chromosomenpräparaten und damit auch von Resultaten, da Kultivierungszeiten für die zu untersuchenden Zellen entfallen. Die PCC-Technik erfordert Erfahrung und wird nur von wenigen Labors eingesetzt (Rubin, 1992). Die Fusionsmethode ist technisch recht schwierig (Durante, 1998).
Die Induktion und Präparation von PCCs ist im Vergleich zur Metaphasenernte und –präparation die methodisch aufwendigere Technik. PCCs sind im Vergleich zu Metaphasen fragilere Strukturen, deren Präparation besondere Sorgfalt erfordert. So hängt der Erfolg der PCC-Induktion von der Form und Größe des Zellpellets und der Intensität des Schwenkens des Röhrchen mit dem Zellgemisch ab (Karsten *et al.,* 1988). Die Behandlung mit PEG kann einen hypertonen Schock der Zellen bewirken. Zelluläre Reparaturprozesse wurden jedoch dadurch nicht beeinflußt bzw. das Ausmaß der Interphase-Chromosomenbrüche wurde nicht erhöht, wie vergleichende Untersuchungen mit Sendai-Viren als Fusogen zeigen konnten (Okayasu *et al.,* 1993).
Bei einem quantitativen Vergleich der Ergebnisse verschiedenener Arbeitsgruppen sollte berücksichtigt werden, welche Zellinie als Mitose-Fraktion eingesetzt wird, da das Ausmaß der Brüche von Interphasechromosomen durch den Typ der mitotischen Induktorzelle beeinflußt wird (Cheng et al., 1993; Okayasu und Iliakis, 1994). Röntgenstrahlung induzierte bei CHO-Zellen in der Plateau-Phase zwei Formen von Interphasechromosomenbrüchen, die α- und β-Form. Interphasechromosomenbrüche der α–Form wurden im Gegensatz zu denen der β–Form langsam repariert und werden bei dem Einsatz von PCC-Standardprotokollen sichtbar. Interphasechromosomenbrüche der β–Form wurden induziert, wenn die Inkubation der Zellen während der PCC-Induktion in hypertonem Medium erfolgte. Der Typ der eingesetzten mitotischen

Induktorzellen beeinflußt das Ausmaß von Interphasechromosomenbrüchen der α-Form. So wurde bei Einsatz von PCC-Induktorzellen mit einem höheren Maß an MPF-Aktivität, wie z. B. HeLa-Zellen, das Auftreten von mehr PCC-Brüchen beobachtet als bei Zellen mit geringerer MPF-Aktivität, wie z.B. bei CHO-Zellen (Okayasu und Iliakis, 1994).
Die Analyse von PCC-Präparaten ist schwieriger als die von Metaphase-Spreitungen (Cornforth und Bedford, 1993), da die Interphasechromosomen dünn sind und zu Verklumpungen neigen (Durante *et al.*, 1996 b). Der PCC-Index ist viel geringer als der Mitose-Index (Durante, 1998). Durch Einsatz eines automatisierten „Metaphasen-Finder-Systems“ konnten PCC-Spreitungen neben den mitotischen CHO-Metaphasen auf den Präparaten rascher lokalisiert und damit eine schnelle Auswertung der Proben ermöglicht werden (Blakeley *et al.*, 1994).
Obwohl die PCC-Analyse sicherlich nicht als Routinesystem für die Testung von Genotoxizität anzusehen ist, so stellt sie doch eine wirkungsvolle Möglichkeit dar, um die Zusammenhänge zwischen der DNA-Schädigung, der Reparatur und der Produktion von chromosomalen Veränderungen bei ihrer Entstehung aufzuzeigen (Abka´i *et al.*, 1987).
Aufgrund ihres geringeren Kondensationsgrades werden bei vorzeitig kondensierten Chromosomen Schädigungen möglicherweise deutlicher sichtbar als bei mitotischen Chromosomen. Bei einem Vergleich des Ausmaßes an Aberrationen von PCCs mit Metaphasechromosomen muß allerdings auch berücksichtigt werden, daß die Zellen bei der PCC-Methode einer Reihe von ziemlich aggressiven Manipulationen ausgesetzt sind (Johnson *et al.,* 1982).
Durch den Einsatz von $G_{0/1}$-Lymphozyten in PCC-Studien werden mögliche Einflüsse des Zellzyklus auf die Aberrationsrate ausgeschlossen (Miller, 1991). Bei Mutagenitätsstudien nach klassischer Methode ist die Proliferationskinetik der Zellen ein wichtiger Faktor für quantitative Unterschiede induzierter Aberrationshäufigkeiten. Die Induktion chromosomaler Aberrationen war mit S-Phase-abhängigen Klastogenen in proliferierenden T-Lymphozyten höher als in B-Lymphozyten. Das S-Phasen-unabhängige Klastogen Bleomycin induzierte bei beiden Zellpopulationen ähnliche Effekte (Miller, 1991). Nach PHA-Stimulierung wurde eine Zunahme der Reparaturkapazität festgestellt (Sanderson und Morley, 1986; Sirover, 1990; Boerrigter und Vijg 1992).
Die Zellfusion in Suspension ist die ursprünglich beschriebene Technik zur Induktion von vorzeitiger Chromosomenkondensation. Auch in der vorliegengen Arbeit wurde diese Methode zu Mutagenitätstestungen an peripheren Lymphozyten eingesetzt. Methodische Varianten der PCC-Induktion wurden durch die in situ Zelllfusionstechnik -die „Objektträgerkultur-Methode“- und durch die „Polylysin-Methode“ eingebracht (Tittelbach, 1992). Die Wahl der PCC-Methode kann das Ausmaß der Chromosomenschädigung beeinflussen. So zeigten PCCs, die mit der „Polylysin-Methode“ induziert worden waren, nach Bleomycin-Behandlung im Vergleich zu Metaphasen ein extrem hohes Ausmaß an chromosomaler Schädigung (Abka´i *et al.*, 1987; Tittelbach *et al.*, 1992). In Metaphasestudien wurde ein vergleichbares Ausmaß an Bruchereignissen bei einer hundertfach höheren Bleomycin-Konzentration induziert. Eine Erklärung für die große Differenz wird zumindest teilweise auf die unterschiedlichen experimentellen Bedingungen im Fusionsprotokoll zurückgeführt. Durch Einsatz der „Polylysin-Methode“ wurde das Zellgemisch unmittelbar nach der Fusion mit dem Mutagen behandelt. Daher wurden verglichen mit anderen Protokollen

Zeiten für das Ablösen von Zellen, Waschen und anderen Schritten bis zur Zellfusion eingespart. Offenbar reichte dieser Zeitraum für die Reparatur eines Teils der induzierten Chromosomenläsionen und für Selektionsprozesse aus (Tittelbach, 1992).
Interessanterweise beeinflußt auch die BrdU-Endkonzentration zur Markierung der mitotischen Induktorzellen das Ausmaß der PCC-Induktion. Für die Studien der vorliegenden Arbeit wurde eine BrdU-Endkonzentration von nur 2µM zur Markierung der CHO-Zellen eingesetzt. Diese Konzentration reichte zur Identifizierung der Fusionsprodukte aus. Bereits zuvor war beobachtet worden, daß eine BrdU-Konzentration von 10^{-6} M wichtig für eine gute Ausbeute an PCCs ist (Tittelbach, 1992).

5.8.2 IST DIE PRÄMATURE CHROMOSOMENKONDENSATION DIE SENSITIVERE METHODE ?

Die vorzeitige Chromosomenkondensation gilt oft als die im Vergleich zur Metaphasen-Analyse sensitivere Methode zum Nachweis von Mutagenen (Hittelman und Rao, 1974 a,b,c; Johnson *et al.*, 1982; Cornforth und Bedford, 1983 b; Maillie *et al.*, 1992; Abka ´i *et al.*, 1987; Dresp und Bauchinger, 1988; Tittelbach *et al.*, 1989; Durante *et al.*, 1996 b).
Das unterschiedliche Ausmaß an Aberrationen in Metaphasen und in PCCs wurde oft als das Resultat von Reparaturvorgängen gedeutet, die während der G_1- oder S-Phase (Clarkson und Humphrey, 1976 in: Abka´i *et al.*, 1987; Sen und Hittelman, 1984) bzw. in der G_2-Phase (Sognier *et al.*, 1979, Abka´i *et al.*, 1987) wirksam wurden.
Allerdings gibt es auch bestimmte Substanzen, die höhere Aberrationsfrequenzen in Metaphasechromosomen als bei PCCs erkennen lassen. Besonders für interkalierende Substanzen wurde dies beobachtet. Interkalierende Substanzen können chromosomale Aberrationen durch einen direkt wirkenden und einen indirekt wirkenden Mechanismus induzieren. Die direkten Effekte wurden sowohl in PCCs als auch in Mitosen beobachtet, die indirekten Effekte jedoch erst, wenn die Zellen in Form von Chromosomen beim Übergang der Zellen von der Prophase zur Metaphase kondensieren. Dies kann zu weiteren Chromatidbrüchen und unvollständigen Austauschen führen (Rosenberg und Hittelman, 1983; Hittelman, 1984).
Ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß von Aberrationen in PCCs und der Wirkung einer Substanz in der S-Phase wurde beobachtet (Abka´i et al., 1987; Miller, 1991). Andere Autoren wiederum beschrieben nach Behandlung mit S-Phase wirksamen Agentien wie Formaldehyd (Dresp und Bauchinger, 1988), Ara C (Pantelias und Wolff, 1985) oder Camptothecin (Mosesso *et al.*, 1999) in PCC-Präparaten eine Zunahme von chromosomalen Fragmenten.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit kann die PCC-Technik als die im Vergleich zur Metaphasen-Analyse sensitivere Methode beurteilt werden. Die vergleichende Darstellung der Schädigung in PCCs und Metaphasen (siehe Kapitel 4.5) veranschaulicht diese Feststellung. Die Sensitivität der PCC-Technik wird in dieser Arbeit durch ein Zusammenwirken verschiedener Faktoren erklärt: Für mögliche Reparaturprozesse läßt die PCC-Technik weniger Zeit; das Ausmaß der Aberrationen wird nicht nur durch direkte Veränderungen der DNA, sondern auch durch Modifikationen von Proteinen bestimmt, der Kondensationsprozeß selbst beeinflußt das Ausmaß der PCC-

Fragmente. Die diversen Schritte bei der Durchführung des Versuchsprotokolls sind auch für das Resultat entscheidend.

5.9 AUSBLICK

Ein mögliches Problem für eine exakte Auswertung ergibt sich, wenn die Bestimmung der Zellzyklusphasen-Verteilung mit der PCC-Methode durchgeführt wird. Eine Voraussetzung der PEG-vermittelten PCC-Induktion ist, daß die Zellen fusionieren. Eine Mutagen-Behandlung schließt aber potentielle Membranveränderungen nicht aus und führt eventuell dazu, daß einige Zellen bevorzugt fusioniert werden. Der Einsatz der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung könnte Abhilfe schaffen. Mukherjee *et al.* (1992) beobachteten bei Interphasekernen zellzyklus-spezifische Veränderungen in der Morphologie des FISH-Signals nach Einsatz einer α–Satelliten DNA-Sonde: Zellen in der G_1-Phase zeigten zwei kondensierte, ungeteilte FISH-Signale, Zellen in der S-Phase wiesen zerstreute FISH-Signale auf und in der G_2-Phase wurden zwei zweigeteilte FISH-Signale beobachtet (bei diploidem DNA-Gehalt der Zelle). Zu Kontrollzwecken der Hybridisierungseffizienz der Sonde könnten normale Zellen einer Suspension zunächst mittels eines FACS (fluorescence activated cell sorter) gemäß ihrem DNA-Gehalt getrennt und den einzelnen Zellzyklusphasen zugeordnet werden. Die abgetrennten Zellen sollten anschließend auf Objektträger aufgebracht und die FISH-Methode durchgeführt werden.

Eine PCC-Induktion ist neuerdings auch durch Phosphatasehemmstoffe möglich (Gotoh *et al.*, 1995; Asakawa und Gotoh, 1997). Allerdings ist diese Methode nur dann anwendbar, wenn in der Zelle die Menge der mitotischen Faktoren genügend hoch ist. So kann das Interphasechromatin von isolierten Lymphozyten in der Ruhephase bei dieser Methode nicht vorzeitig kondensiert werden. Nach PHA-Stimulation und der Zugabe von Colcemid und Calyculin A wurden PCCs in humanen peripheren Lymphozyten zu verschiedenen Zeiten des Zellzyklus induziert (Durante *et al.*, 1998). Die Anzahl der nach dieser Methode erhaltenen Metaphasen- bzw. PCC-Spreitungen war wesentlich höher als beim konventionellen Colcemid-Block (nur Mitosen) und als bei der PEG-vermittelten Fusion (nur G_0-PCCs).

Für Untersuchungen der Erkrankungen des hämatopoetischen Systems erscheint die PCC-Induktion mittels Phosphatase-Hemmstoffen auch interessant. Allerdings wurde bei Leukämiezellinien der myeloischen Reihe (HL-60 und U937 festgestellt, daß Okadasäure in Abhängigkeit von der eingesetzten Dosis einen Zellzyklus-Arrest in der G_1/S-Phase oder G_2/M-Phase induzierte (Ishida *et al.*, 1992). Der Einsatz der PCC-Induktion durch Phosphatase-Hemmstoffe erscheint auch für die cytogenetische Analyse solider Tumoren interessant, bei denen die cytogenetische Auswertung oft durch die Anzahl geringer Mitosen erschwert wird. Auch die PEG-vermitteltete Zellfusion ist oft verbunden mit einer geringen Fusionsfrequenz der mitotischen Induktorzellen mit den Tumorzellen (Coco-Martin und Begg, 1994).

Der Hauptvorteil der durch Phosphatase-Hemmstoffe vermittelten PCC-Induktion ist, daß die Zellfusion entfällt. Die Kombination mit immunotechnischen Methoden, wie z.B. der Immunogold-Silberfärbung (Asakawa und Gotoh, 1997) oder der Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (Coco-Martin und Begg, 1994) wird für die Cytogenetik sicherlich neue Wege eröffnen.

Allerdings gibt es Hinweise darauf, daß die Empfindsamkeit von Zellen gegenüber Calyculin A zellzyklusabhängig ist (Coco-Martin und Begg, 1994). Der eingesetzte Phosphatase-Hemmstoff selbst scheint die PCC-Rate zu beeinflussen (MacKintosh und MacKintosh, 1994).
Für bestimmte Fragestellungen in der Mutagenitätstestung ist die PEG-vermittelte Zellfusion die Methode der Wahl. Durch ihren Einsatz ist die Analyse von Zellen in der G_0-Phase direkt möglich und damit die potentiell mutagene Wirkung einer Substanz direkt erfaßbar.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Wirkung der α,β-ungesättigten Aldehyde Crotonaldehyd (CA), *trans*-2-Hexenal (HX), und des N-Nitrosodiethanolamin (NDELA) untersucht. Als Kontrollsubstanzen wurde das als Aneugen bekannte Diethylstilbestrol (DES) und die als Klastogene bekannten Mutagene Mitomycin C (MMC) und Bleomycin (BLM) eingesetzt. Es wurde die Technik der vorzeitigen Chromosomenkondensation (PCC) an unstimulierten Lymphozyten in der G_0-Phase eingesetzt, die für 1 Stunde mit dem jeweiligen Mutagen inkubiert worden waren. Das Ausmaß der mutagenen Schädigung bei den PCCs wurde lichtmikroskopisch durch Auszählen von Chromatinelementen analysiert. Zellen mit mehr als 46 Chromatinelementen wurden als geschädigt gewertet. Die Resultate der PCC-Studien wurden mit den Ergebnissen aus 48 Stunden-Metaphasenkulturen verglichen. Mit der Fluoreszenz plus Giemsa (FPG)-Technik wurden die Mitosen, die zum erstenmal nach Mutagenapplikation das Metaphasestadium erreicht hatten, identifiziert.

Die Metaphasenanalyse aus 48 Stunden-Kulturen zeigte für CA bei 60µM und für HX bei 100µM eine schwach signifikante Erhöhung der Anzahl aberranter Metaphasen. Die für CA zusätzlich durchgeführten 73 Stunden-Kulturen, bei denen die Mutagenbehandlung erst 48 Stunden nach Kulturansatz durchgeführt wurden, ergab ab 240µM eine schwach signifikante Erhöhung aberranter Metaphasen im Vergleich zu unbehandelten Lymphozyten. Die Analyse der Metaphasen aus 48 Stunden-Kulturen nach NDELA-Behandlung ergab, daß sich die Zahl der aberranten Metaphasen nur bei einer Konzentration von 2000µM signifikant im Vergleich zu den Zellen aus den Kontrollkulturen erhöhte. Die anderen getesteten NDELA-Konzentrationen – auch die in den 73 Stunden-Kulturen eingesetzten – erhöhten die Aberrrationsrate in den Metaphasechromosomen, allerdings statistisch nicht signifikant. Nach MMC-Behandlung (6µM) zeigten 27,5%, nach DES-Behandlung (100µM) 7,6% und nach Bleomycin-Behandlung (10µg/ml) 8,8% der Metaphasen Aberrationen. Damit war die Anzahl geschädigter Metaphasen im Vergleich zu den Zellen unbehandelter Kontrollkulturen nach MMC-Inkubation (6µM) und nach Bleomycin-Applikation (10µg/ml) statistisch hoch signikant, nach DES-Inkubation (100µM) allerdings nicht signifikant erhöht.

Die PCC-Technik erwies sich als die im Vergleich zur Metaphasenanalyse sensitivere Methode. Alle getesteten Substanzen erhöhten die Anzahl der Chromatinelemente/Zelle dosisabhängig. Unbehandelte Lymphozyten wiesen zwischen 1,0 und 1,8 Fragmente pro geschädigte Zelle auf. Dabei waren zwischen 6,1 und 15,8% der unbehandelten Zellen geschädigt. Nach CA-Inkubation (240µM) stieg die Zahl geschädigter PCCs auf 48,7% an, wobei 3,4 Fragmente pro geschädigte Zelle zu beobachten waren. Nach Behandlung der Zellen mit HX(150µM) waren 42,9% der Zellen geschädigt und wiesen 4,6 Fragmente pro geschädigte Zelle auf. Damit war die Zunahme der Schädigung im Vergleich zur Kontrolle hoch signifikant. Die Inkubation mit NDELA schädigte die Lymphozyten in der G_0-Phase bereits ab einer Konzentration von 1000µM hoch signifikant. Dabei waren 56,6% der Lymphozyten geschädigt und es traten 4,1 Fragmente pro geschädigte Zelle auf. Nach Inkubation mit MMC (20µM) waren 46,3% der Zellen geschädigt und wiesen 3,3 Fragmente pro geschädigte Zelle auf. Die Behandlung der Lymphozyten mit DES (200µM) induzierte in 26,3% der Zellen mehr als 46 Chromatinelemente pro

Zelle, wobei 2,8 Fragmente pro geschädigte Zelle auftraten. Nach Behandlung der Lymphozyten mit α,β-ungesättigten Aldehyden wurde in den PCCs zusätzlich ein interessantes Phänomen beobachtet: die vorzeitig kondensierten Chromosomen erschienen im Vergleich zu den PCCs unbehandelter Zellen weniger stark kondensiert. Um das Ausmaß der Entspiralisierung erfassen zu können, wurden die PCCs zunächst semiquantitativ gemäß ihrem Kondensationsgrad in 4 Kategorien eingeteilt, wobei der Kategorie 1 die am stärksten kondensierten PCCs, der Kategorie 4 die am wenigsten kondensierten PCCs zugeordnet wurden. Bei einer CA-Konzentration von 480µM waren 55,6% und einer HX-Konzentration von 300µM waren 57,4% der untersuchten Zellen Kategorie 4 zuzuordnen. Durch die Kombination der PCC-Technik mit der Fluoreszenz in situ-Hybridisierung und den Einsatz einer Painting Sonde (exemplarisch für Chromosom 4) wurde die Längenveränderung der PCCs genauer quantifiziert werden. Dazu wurde die Länge der Chromosom 4-PCC vor und nach Behandlung mit Crotonaldehyd (240µM und 480µM) mit einem computergestützten Programm ausgemessen. So ergab sich nach Crotonaldehyd-Behandlung (480µM) durchschnittlich eine Längenzunahme um das zwei- bis dreifache.
Elongierte PCCs wurden nach Inkubation der Lymphozyten mit NDELA und Bleomycin nicht beobachtet; nach Inkubation mit den Mutagenen MMC (20µM) und DES (200µM) trat dieses Phänomen nur leicht auf. Reparaturkinetikstudien mit den Hemmstoffen Arabinofuranosylcytosin, Hydroxyharnstoff und Novobiocin lassen eine verstärkte Excisionsreparatur als Ursache für die beobachtete verminderte Kondensation der PCCs nach Inkubation mit α,β-ungesättigten Aldehyden unwahrscheinlich erscheinen. Die nach Inkubation mit α,β-ungesättigten Aldehyden beobachtete verminderte Kondensation der PCCs ist eher das Resultat von Veränderungen der mitotischen Faktoren und/oder Chromatinstrukturen. Möglicherweise interferieren α,β-ungesättigte Aldehyde mit den Phosphorylierungsprozessen der Histone H1 und/oder H3, die für die PCC-Induktion bedeutsam sind und die durch die Aktivität der mitotischen Faktoren vermittelt werden.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abka'i F., Wachter E., Tittelbach H., Gebhart E. (1987); Induction by chemical clastogens of aberrations in prematurely condensed interphase chromatin of Chinese hamster ovary cells; Cell Biol. Toxicol. 3, 285-301

Adlakha R.C., Rao P.N. (1986); Molecular mechanisms of the chromosome condensation and decondensation cycle in mammalian cells; BioEssays 5, 100-105

Adlakha R.C., Wang Y.C., Wright D.A., Sahasrabuddhe G., Bigo H., Rao P.N. (1984); Inactivation of mitotic factors by ultraviolet irradiation of HeLa cells in mitosis; J. Cell Sci. 65, 279-295

Ajiro K., Nishimoto T. (1985); Specific site of histone H3 phosporylation related to the maintance of premature chromosome condensation; J. Biol. Chem. 260, 15379-15381

Ajiro K., Yasuda H., Tsuji H. (1996); Vanadate triggers the transition from chromosome condensation to decondensation in a mitotic mutant (tsTM13); Eur. J. Biochem. 241, 923-930

Alaoui-Jamali M., Loubaba B.-B., Robyn S., Tapiero H., Batist G. (1994); Effect of DNA-repair-enzyme modulators on cytotoxicity of L-phenylalanine mustard and cis-diamminedichloroplatinum (II) in mammary carcinoma cells resistant to alkylating drugs; Cancer Chemother. Pharmacol. 34, 153-158

Andersson H.C., Kihlman B.A. (1989); The production of chromosomal alterations in human lymphocytes by drugs known to interfere with the activity of DNA topoisomerase II. I. m-AMSA; Carcinogenesis 10, 123-130

Andersson H.C. (1993); The spontaneous frequency of chromosomal aberrations and sister-chromatid exchanges in cultured peripheral lymphocytes of a single blood donor sampled more than 200 times; Mutation Res. 286, 281-292

Andrews A.W., Lijinski W. (1980); The mutagenicity of 45 nitrosamines in Salmonella typhimurium; Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis 1, 295-303

Arion D., Meijer L., Brizuela L., Beach D. (1988); Cdc2 is a component of the M-phase specific histone H1 kinase: evidence for identity with MPF; Cell 55, 371-378

Asakawa Y., Gotoh E. (1997); A method for detecting sister chromatid exchanges using prematurely condensed chromosomes and immunogold-silver staining; Mutagenesis 12, 175-177

Ax W. (1982); Möglichkeiten der Lymphozytenstimulierung; Therapiewoche 32, 2163-2169

Bailly E., Dorée M., Nurse P., Bornens M. (1989); p34cdc2 is located in both nucleus and cytoplasm; part is centrosomally associated at G2/M and enters vesicles at anaphase; EMBO J. 8, 3985-3995

Banduhn N., Obe G. (1985); Mutagenicity of methyl 2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: Structural chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei; Mutation Res. 156, 199-218

Banerjee S.K., Banerjee S., Li S.A., Li J.J. (1994); Induction of chromosome aberrations in Syrian hamster renal cortical cells by various estrogens; Mutation Res. 131, 191-197

Barnes D., Sato G. (1980); Serum-free cell culture: a unifying approach; Cell 2, 649-655

Barret J.-M., Calsou P., Salles B. (1995); Deficient nucleotide excision repair activity in protein extracts from normal human lymphocytes; Carcinogenesis 16, 1611-1616

Bartal A.H., Hirshaut Y. (1987); Current methodologies in hybridoma formation; In: Methods of Hybridoma Formation, Bartal A.H., Hirshaut Y. (eds.), Humana Press, 1-40

Becker P., Scherthan H., Zankl H. (1990); Use of a centromere-specific DNA probe (p82H) in nonisotopic in situ hybridization for classification of micronuclei; Genes, Chromosomes & Cancer 2, 59-62

Bender M.A., Moore R.C. (1991); DNA polymerase δ mediates increase in exchange production by X-radiation in human lymphocytes moving from G0 to G1; Mutation Res. 250, 319-324

Beretta G., Cartei G., Giraldi T. (1990); MitomycinC Pharmacology and Clinical uses. Ed. Minerva Medica, Turin, 1990

Berg P.A. (1992); Kollagenerkrankungen und immunologisch bedingte Vaskulitiden; in: Lehrbuch der inneren Medizin; Siegenthaler W., Kaufmann W., Hornbostel H., Waller H.D. (Eds)

Bertsche U., Zimmermann U. (1988); Analysis of X-ray induced aberrations in mammalian chromosomes by electrofusion induced premature chromosome condensation; Radiat. Environ. Biophys. 27, 201-212

Bhat H.K., Han X., Gladek A., Liehr J.G. (1994); Regulation of the formation of the major diethylstilbestrol-DNA adduct and some evidence of its structure; Carcinogenesis 15, 2137-2142

Bird A. (1986), CpG-rich islands and the function of DNA methylation; Nature 321, 209-213

Blakeley W.F., Prasanna P.G.S., Kolanko C.J., Pyle M.D., Mosbrook D.M., Loats A.S., Rippeon T.L., Loats H. (1995); Application of the premature chromosome condensation assay in simulated partial-body radiation exposures: evaluation of the use of an automated metaphase-finder; Stem Cells 13 (suppl 1); 223-230

Bleier H. (1930); Verhalten der verschiedenen Kernkomponenten bei der Reduktionsteilung von Bastarden; Cellule 40, 85-111

Boerrigter M.E.T.I., Vijg J. (1992); Single-strand break disappearance in quiescent and phytohaemagglutinin-stimulated human peripheral lymphocytes exposed to a single low dose of γ-radiation; Int. J. Radiat. Biol. 61, 95-101

Bohr V.A., Evans M.K., Fornace Jr. A.J. (1989); Biology of disease DNA repair and its pathogenic implications; Lab. Invest. 61, 143-161

Borchers A.H., Kennedy K.A., Straw J.A. (1990); Inhibition of DNA excision repair by methotrexate in chinese hamster ovary cells following exposure to ultraviolet irradiation or ethylmethanesulfonate; Cancer Res. 50, 1786-1789

Borelli M.J., Mackey M.A., Dewey W.C. (1987); A method for freezing synchronous mitotic and G1 cells; Exp. Cell Res. 170, 363-368

Borgmann K., Dikomey E. (1997); Relationship between PCC fragments and cell killing studied in X-irradiated CHO, CHO-K1 cells and two radiosensitive mutants *xrs1* and *xrs5*; Int. J. Radiat. Biol. 72, 667-674

Bostock C.J., Sumner A.T. (1978); The Eukaryotic Chromosome; (Bostock C.J., Sumner A.T. Eds.); Elsevier/ North-Holland Biomedical Press

Boyum A. (1968); Separation of leukocytes from blood and bone marrow; Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Suppl 97), 77

Brøgger A. (1982); The chromatid gap – a useful parameter in genotoxicology?; Cytogenet. Cell Genet. 33, 14-19

Brown J.M., Evans J.W., Kovacs M.S. (1993); Mechanism of chromosome exchange formation in human fibroblasts: insights from "chromosome painting"; Environ. Mol. Mutagen. 22, 218-224

Brown T., Fox D.P., Robertson F.W., Bullock I. (1983); Non-random chromosome loss in PHA-stimulated lymphocytes from normal individuals. Mutation Res. 122, 403-406

Brüderlein S., Gebhart E.,Siebert E., Augustus M. (1986); Premature chromosome condensation - studies on human metastatic carcinoma cells; Hum. Genet. 73, 44-52

Brunnemann K.D., Hoffmann D. (1981); Assessment of the carcinogenic N-nitrosodiethanolamine in tobacco products and tobacco smoke; Carcinogenesis 2, 1123-1127

Bryant P.E. (1997); DNA damage, repair and chromosomal damage; Int. J. Radiat. Biol. 71, 675-680

Buckton K.E., Evans H.J. (Eds) (1973) Methods for the analysis of human chromosome aberrations. World Health Organization, Geneva

Canonero R., Marteki A., Marinar U.M., Brambilla G. (1990); Mutation induction in chinese hamster lung V79 cells by five alk-2-enals poduced by lipid peroxidation. Mutation Res. 244, 153-156

Carrano A.V., Natarajan A.T. (1988); Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques; Mutation Res. 204, 379-406

Carrano A.V., Heddle J.A. (1973); The fate of chromosome aberrations; J. Theoret. Biol. 38, 289-304

Celotti L., Ferraro P., Biasin M.R. (1992), Detection by fluorescence analysis of DNA unwinding and unscheduled DNA synthesis, of DNA damage and repair induced in vitro by direct-acting mutagens on human lymphocytes; Mutation Res. 281, 17-23

Celotti L., Furlan D., Ferraro P., Levis A.G. (1988); DNA damage and repair induced in vitro by nitrilotriacetic acid (NTA) in human lymphocytes; Mutation Res. 209, 149-154

Cervenka J., Camargo M. (1987); Premature chromosome condensation induced by electrofusion; Cytogenet. Cell Genet. 45, 169-173

Cheng X., Pantelias G.E., Okayasu R., Cheong N., Iliakis G. (1993); Mitosis-promoting factor activity of inducer mitotic cells may affect radiation yield of interphase chromosome breaks in the premature chromosome condensation assay; Cancer Res. 53, 5592-5596

Chung F.-L., Hecht S.S. (1983); Formation of cyclic 1,N2-adducts by reaction of deoxyguanosine with a-acetoxy-N-nitrosopyrrolidine, 4-(carbethoxynitrosamino)butanal, or crotonaldehyde; Cancer Res. 43, 1230-1235

Chung F.L., Young R., Hecht S.S. (1984); Formation of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA upon reaction with acrolein or crotonaldehyde. Cancer Res. 44,990-995

Chung F.L., Tanaka T., Hecht S.S. (1986); Induction of liver tumors in F344 rats by crotonaldehyde. Cancer Res 46, 1285-1289

Chung F.-L., Young R., Hecht S.S. (1989); Detection of cyclic 1,N2-propanodeoxyguanosine adducts in DNA of rats treated with N-nitrosopyrrolidine and mice treated with crotonaldehyde; Carcinogenesis 10, 1291-1297

Clarkson J.M., Mitchell D.L. (1983); The effects of various inhibitors of DNA synthesis on the repair of DNA photoproducts; Biochem. Biophys. Acta 740, 355-361

Cleaver J.E. (1984); Completion of excision repair patches in human cell preparations: identification of a probable mode of excision and resynthesis; Carcinogenesis 5, 325-330

Coco-Martin J.M., Begg A.C. (1997); Detection of radiation-induced chromosome aberrations using fluorescence in situ hybridization in drug-induced premature chromosome condensations of tumour cell lines with different radiosensitivities; Int. J. Radiat. Biol. 71, 265-273

Coffee R.G. (1988); Intracellular events during lymphocyte activation; in: The Pharmacology of Lymphocytes, Handbook of Experimental Pharmacology 85, Bray M.A., Morley J. (Eds), 83-138

Cohen A., Thompson E. (1986); DNA repair in nondividing human lymphocytes: inhibition by deoxyadenosine; Cancer Res. 46, 1585-1588

Cohen M.M., Shaw M.W. (1964); Effects of mitomycinC on human chromosomes; J. Cell Biol. 23, 386-395

Coleman C.N., Stoller R.G., Drake J.C., Chabner B.A. (1975); Desoxycytidine kinase: properties of the enzyme from human leukemic granulocytes; Blood 46, 791-803

Collins A.R.S., Downes C.S., Johnson R.T. (1984); Introduction: an interpreted view of inhibited repair; in: DNA Repair and Its Inhibition; Collins A., Downes C.S., Johnson R.T. (Eds.), Nucleic Acids Symposium Series No. 13, IRL Press

Collins A., Johnson R.T. (1979); Repair and survival after UV in quiescent and proliferating Microtus agrestis cells: different rates of incision and different dependence on DNA precursor supply; J. Cell Physiol. 99, 125-137

Collins A.R.S., Ord M.J., Johnson R.T. (1981); Correlations of DNA damage and repair with nuclear and chromosomal damage in HeLa cells caused by methylnitrosamides; Cancer Res. 41, 5176-5187

Collins A., Squires S. (1986); The time course of repair of ultraviolet-induced DNA-damage; implications for the structural organisation of repair; Mutation Res. 166, 113-119

Cornforth M.N., Bedford J.S. (1983 a) High-resolution measurement of breaks in prematurely condensed chromosomes by differential staining; Chromosoma 88, 315-318

Cornforth M.N., Bedford J.S. (1983 b); X-ray-induced breakage and rejoining of human interphase chromosomes; Science 222, 1141-1143

Cornforth M.N., Bedford J.S. (1985); On the nature of a defect in cells from individuals with Ataxia-Telangiectasia; Science 227, 1589-1591

Cornforth M.N., Bedford J.S. (1987); A quantitative comparison of potentially lethal damage repair and the rejoining of interphase chromosome breaks in low passage normal human fibroblasts; Radiation Res. 111, 385-405

Cornforth M.N., Bedford J.S. (1993); Ionizing readiation damage and its early development in chromosomes; Adv. Radiat. Biol. 17, 423-497

Cornforth M.N., Goodwin E.H. (1991); The dose-dependent fragmentation of chromatin in human fibroblasts by 3.5-MeV α particles from ^{238}Pu: experimental and theoretical considerations pertaining to single-track effects; Radiation Res. 127, 64-74

Cornforth M.N., Meyne J., Goodwin E.H. (1992); Kinetics of formation of radiation-induced exchange aberrations in human fibroblasts as studied by premature chromosome

condensation; Abstract of Papers for the Annual Meeting of the Radiation Research Society 40th, Salt Lake City P1-04-1

Countryman P.S., Heddle J.A. (1976); The prodution of micronuclei from chromosome aberrations in radiated cultures of human lymphocytes; Mutation Res. 41, 321-332

Craig J.M., Bickmore W.A. (1994); The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. Nature Genetics 7, 376-382

Crooke S.T. (1981); Mitomycin C – an overview; In: Crooke S.T., Prestayko A.W. (eds), Cancer and Chemotherapy 3, 49-60, New York, Academic Press

Crossen P.E., Morgan W.F. (1978); Occurence of 1st division metaphases in human lymphocyte cultures; Hum. Genet. 41, 97-100

Cunningham A., Klopman G., Rosenkranz H.S. (1996); The carcinogenicity of diethylstilbestrol: structural evidence for a non-genotoxic mechanism; Arch. Toxicol. 70, 356-361

Darroudi F., Natarajan A.T. (1989); Cytogenetical characterization of Chinese hamster ovary X-ray sensitive mutant cells xrs 5 and xrs 6. VII. Complementation analysis of X-irradiated wild-type CHO-K1 and xrs mutant cells using the premature chromosome condensation technique; Mutation Res. 213, 249-255

Darroudi F., Natarajan A.T., Bentvelzen P.A.J., Heidt P.J., Van Rotterdam A., Zoetelief J., Broerse J.J. (1998); Detection of total- and partial-body irradiation in a monkey model: a comparative study of chromosomal aberration, micronucleus and premature chromosome condensation assays; Int. J. Radiat. Biol. 74, 207-215

Darzynkiewicz Z., Evenson D., Staiano-Coico L., Sharpless T., Melamed M.R. (1979); Relationship between RNA content and progression of lymphocytes through S phase of cell cycle; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 358-362

Danford N. (1984); Measurement of levels of aneuploidy in mammalian cells using a modified hypotonic treatment; Mutation Res. 139, 127-132

Das Graças Medeiros M., Takahashi C.S. (1994); Effects of treatment with mitoxantrone in combination with novobiocin, caffeine and ara-C on human lymphocytes in culture; Mutation Res. 307, 285-292

Davidson R.L., O'Malley K.A., Wheeler T.B. (1976); Polyethylene glycol-induced mammalian cell hybridization: Effect of polyethylene glycol molecular weight and concentration; Somat. Cell Genet. 2, 271-280

Davies M.J., Phillips B.J., Rumsby P.C. (1995); Molecular analysis of chemically-induced mutations in mammalian cell assays; Toxic. In Vitro 9, 513-518

Daza P., Escalza P., Mateos S., Cortés F. (1992); Mitomycin C, 4-nitroquinoline-1-oxide and ethyl methanesulfonate induce long-lived lesions in DNA which result in SCEs during successive cell cycles in human lymphocytes; Mutation Res. 270, 177-183

Denkel E. (1986); Untersuchungen zur Aktivierung von hydroxylierten Nitrosaminen durch Alkoholdehydrogenase; Dissertation, Universität Kaiserslautern

Denkel E., Pool B.L., Schlehofer J.R., Eisenbrand G. (1986); Biological activity of N-nitrosodiethanolamine and of potential metabolites which may arise after activation by alcohol dehydrogenase in Salmonella typhimurium, in mammalian cells, and in vivo; J. Cancer Res. Clin. Oncol. 111, 149-153

DiGuiseppe J.A., Dresler S.L. (1989); Bleomycin-induced DNA repair synthesis in permeable human fibroblasts: mediation of long-patch and short-patch repair by distinct DNA polymerases; Biochemistry 28, 9515-9520

DiGiuseppe J.A., Hunting D.J., Dresler S.L. (1990); Aphidicolin-sensitive DNA repair synthesis in human fibroblasts damaged with bleomycin is distinct from UV-induced repair; Carcinogenesis 11, 1021-1026

Dillehay L.E., Jacobson-Kram D., Williams J.R. (1989); DNA topoisomerase and models of sister chromatid exchange; Mutation Res. 215, 15-23

Dittberner U. (1993); Mutagenitätsuntersuchungen aromawirksamer α,β–ungesättigter Aldehyde; Dissertation, Universität Kaiserslautern

Dittberner U., Eisenbrand G., Zankl H. (1988); Cytogenetic effects of N-nitrosodiethanolamine (NDELA) and NDELA-monoacetate in human lymphocytes; J. Cancer Res. Clin. Oncol. 114, 575-578

Dittberner U., Eisenbrand G., Zankl H. (1995); Genotoxic effects of the α,β-unsaturated aldehydes 2-trans-butenal, 2-trans-hexenal and 2-trans, 6-cis-nonadienal; Mutation Res. 335, 259-265

Dittberner U., Schmetzer B., Gölzer P., Eisenbrand G., Zankl H. (1997); Genotoxic effects of 2-trans-hexenal in human buccal mucosa cells in vivo; Mutation Res. 390, 161-165

Doi O., Takai S., Aoki Y., Higashi H., Kosaki G. (1967); Effects of mitomycin-C on Hela cells at the various stages of division cycle; GANN 58, 125-137

Draetta G., Brizenla L., Potashkin J., Beach D. (1987); Identification of p34 and p13, human homologs of the cell cycle regulators of fission yeast encoded by cdc2+ and suc 1+; Cell 50, 310-325

Dresp J., Bauchinger M. (1988); Direct analysis of the clastogenic effect of formaldehyde in unstimulated human lymphocytes by means of the premature chromosome condensation technique; Mutation Res. 204, 349-352

Dresp J., Schmid E., Bauchinger M. (1978); The cytogenetic effect of bleomycin on human peripheral lymphocytes in vitro and in vivo; Mutation Res. 56, 341-353

Druckrey H., Preussmann R., Ivankovic S., Schmähl D. (1967); Organotrope carcinogene Wirkungen bei 65 verschiedenen N-Nitroso-Verbindungen an BD-Ratten; Z. Krebsforsch. 69, 103-201

Drwinga H.L., Hsu T.C., Pathak S. (1979); Induction of prematurely condensed chromosomes from testicular cells of the mouse; Chromosoma 75, 45-50

Dubinina L.G., Kurashova Z.I. (1987); Mutagenesis induced by mitomycin C; Genetika 22, 2444-2451

Durante M., Furusawa Y., Gotoh E. (1998); Technical Report: A simple method for simultaneous interphase-metaphase chomosome analysis in biodosimetry; 74, 457-462

Durante M., George K., Wu H., Yang T.C. (1996 a); Rejoining and misrejoining of radiation-induced chromatin breaks. I. Experiments with human lymphocytes; Radiation Res. 145, 274-280

Durante M., George K., Yang T.C. (1996 b); Biological dosimetry by interphase chromosome painting; Radiation Res. 145, 53-60

Eastman A., Barry M.A. (1992); The origins of DNA breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis?; Cancer Invest. 10, 229-240

Eastmond D.A., Tucker J.D. (1989); Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody; Environ. Mol. Mutagenesis, 13, 34-43

Edenberg H.J. (1980); Novobiocin inhibition of simian virus 40 DNA replication; Nature 286, 529

Eder E., Deininger D., Neudecker T., Deininger D. (1992); Mutagenicity of β-alkyl-substituted acrolein congeners in the Salmonella typhimurium strain TA100 and genotoxicity testing in the SOS chromotest; Environ. Mol. Mutagen. 19, 338-345

Eder E., Henschler D., Neudecker T. (1982); Mutagenic properties of allylic and α,β-unsaturated compounds: consideration of alkylating mechanisms; Xenobiotica 12, 831-848

Eder E., Hoffman C. (1992); Identification and characterization of deoxyguanosine-crotonaldehyde adducts. Formation of 7,8 cyclic adducts and 1,N2,7,8 bis-cyclic adducts; Chem Res. Toxicol. 5, 802-808

Eder E., Hoffman C., Bastian H., Deininger C., Scheckenbach S. (1990); Molecular mechanisms of DNA damage initiated by α,β-unsaturated carbonyl compounds as criteria for genotoxicity and mutagenicity; Environ. Health Perspect. 88, 99-106

Eder E., Scheckenbach S., Deininger C., Hoffman C. (1993); The possible role of α,β-unsaturated carbonyl compounds in mutagenesis and carcinogenesis; Toxicol. Lett. 67, 87-103

Eisenbrand G., Denkel E., Pool B. (1984); Alcoholdehydrogenase as an activating enzyme for N-notrosodiethanolamine (NDELA): in vitro activation of NDELA to a potent mutagen in Salmonella typhimurium; J. Cancer Res. Clin. Oncol. 108, 76-80

Eisenbrand G., Muller N., Denkel E., Sterzel W. (1986); DNA adducts and DNA damage by antineoplastic and carcinogenic N-nitrosocompounds; J. Cancer Res. Clin. Oncol. 112, 196-204

Eisenbrand G., Sommer H. (1988), A method for determination of N-nitrosoalkanolamines in cosmetics; Z. Lebensm. Unters. Forsch. 186, 235-238

Elhajouji A., Van Hummelen P., Kirsch-Volders M. (1995); Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes; Environ. Mol. Mutagen. 26, 292-304

Ellard S., Parry E.M. (1993); A modified protocol for the cytochalasin B in vitro micronucleus assay using whole human blood or separated lymphocyte cultures; Mutagenesis 8, 317-320

Esterbauer H. (1982), Aldehydic products of lipid peroxidation; In: Free radicals lipid peroxidation and cancer, McBrien D.C.H., Slater T.F.(eds), Academic Press, London, 100-128

Esterbauer H., Ertl A., Scholz N. (1976); The reaction of cysteine with α,β-unsaturated aldehydes; Tetrahedron 32, 285-289

Evans J.W., Chang J.A., Giaccia A.J., Pinkel D., Brown J.M. (1991); The use of fluorescence in situ hybridisation combined with premature chromosome condensation; Br. J. Cancer 63, 517-521

Farooqi Z., Darroudi F., Natarajan A.T. (1993); The use of fluorescence in situ hybridization for the detection of aneugens in cytokinesis-blocked mouse splenocytes; Mutagenesis 8, 329-334

Fan T.Y. Morrison J., Rounbehler D.P., Ross R., Fine D.H., Miles W., Sen N.P. (1977); N-nitrosodiethanolamine in synthetic cutting fluids: a part-per-hundred impurity; Science 196, 70-71

Fauth E. (1998); Untersuchungen zur Mutagenität von 5-Azacytidin, Idoxuridin, Mitomycin C und Diethylstilbestrol; Dissertation, Universität Kaiserslautern

Fauth E. (1999); Comparison of spontaneous and idoxuridine-induced micronuclei by chromosome painting; Mutation Res. 440, 147-156

Fenech M., Morley A.A. (1985); Measurement of micronuclei in lymphocytes; Mutation Res. 147, 29-36

Fenech M., Neville S. (1992); Conversion of excision-repairable DNA lesions in micronuclei within one cell cycle in human lymphocytes; Environ. Mol. Mutagenesis 19, 27-36

Fenech M., Rinaldi J., Surralles J. (1994); The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and ist synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes; Mutagenesis 9, 273-277

Feron V.J., Til H.P., de Vrijer F., Woutersen R.A., Cassee F.R., van Bladeren P.J. (1991); Aldehydes: occurence, carcinogenic potential, mechanism of action and risk assessment; Mutat. Res. 259, 363-385

Firmenich S.A. (1980): α,β-ungesättigte Aldehyde und ihre Verwendung als aromamodifizierende Bestandteile; Offenlegungsschrift 2937287, Deutsches Patentamt

Foiles P.G., Akerkar S.A., Miglietta L.M., Chung F.L. (1990); Formation of cyclic deoxyguanosine adducts in chinese hamster ovary cells by acrolein and crotonaldehyde; Carcinogenesis 11, 2059-2061

Fry A:M., Schultz S.J., Bartek J., Nigg E.A. (1995); Substrate specificity and cell cycle regulation of the Nek protein kinase, a potential human homolog of the mitotic regulator NIMA of Aspergillus nidulans; J. Biol. Chem.270, 12899-12905

Fuchs J., Burg J., Hengstler J.G., Bolm-Audorff U., Oesch F. (1995); DNA damage in mononuclear blood cells of metal workers exposed to N-nitrosodiethanolamine in synthetic cutting fluids; Mutation Res. 342, 95-102

Gautier J., Norbury C., Lokha M., Nurse P., Maller J. (1988); Purified maturation factor contains the product of a Xenopus homolog of the fission yeast cell cycle control gene cdc2+; Cell 54, 433-439

Gautier J., Solomon M.J., Booker R.N., Bazan J.F., Kirschner M.W. (1991); Cdc25 is a specific tyrosine phosphatase that directly activates $p34^{cdc2}$; Cell 67, 197-211

Gebhart E. (1981); Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing; Hum. Genet. 58, 235-254

Gebhart E. (1989); Tumorzytogenetik, Schattauer Verlag, Stuttgart, New York

Gefter M.L., Margulies D.H., Scharff M.D. (1977); A simple method for polyethylene glycol-promoted hybridization of mouse myeloma cells; Somat. Cell Genet. 3, 231-236

Gedik C.M., Collins A.R. (1991) The mode of action of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine in inhibiting DNA repair; new evidence using a sensitive assay for repair DNA synthesis and ligation in permeable cells; Mutation Res. 254, 231-37

Genzlinger A. (1998); Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflußzytometrie, Agarose-Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch α,β-ungesättigte Aldehyde und Ketone; Dissertation, Kaiserslautern

Ghosh S., Paweletz N., Schroeter D. (1992); Effects of okadaic acid on mitotic HeLa cells; J. Cell Sci. 103, 117-124

Ghosh S., Paweletz N., Schroeter D. (1998); Cdc2-independent induction of premature mitosis by okadaic acid in HeLa cells; Exp. Cell Res. 242, 1-9

Gilbert P., Fabry L., Rollmann B., Lombart P., Rondelet J., Poncelet F., Leonard A., Mercier M. (1981); Mutagenicity of N-nitrosodiethanolamine and its acetyl derivatives; Mutation Res. 89, 217-228

Glatt H.R., Metzler M., Oesch F. (1979); Diethylstilbestrol and 11 derivatives. A mutagenicity study with Salmonella typhimurium. Mutation Res. 67, 113-121

Gölzer P., Janzowski C., Pool-Zobel B.L., Eisenbrand G. (1996); (E)-2-Hexenal-induced DNA damage and formation of 1,N^2-(1,3-propano)-2´-deoxyguanosine adducts in mammalian cells; Chem. Res. Toxicol. 9, 1207-1213

Gotoh E., Asakawa Y., Kosaka H. (1995); Inhibition of protein serine/threonine phosphatases directly induces premature chromosome condensation in mammalian somatic cells; Biomedical Res. 16, 63-68

Grafström R.C., Sundqvist K., Dypbukt J.M., Harris C.C. (1988); Pathobiological effects of aldehydes in cultured human bronchial cells; Cancer Res. 48, 1717-1721

Greer W.L., Kaplan J.G. (1984); Regulation of repair of naturally occurring DNA strand breaks in lymphocytes; Biochem. Biophys. Res. Commun. 122, 366-372

Gronow M. (1980); Nuclear proteins and chemical carcinogenesis; Chem.-Biol. Interactions 29, 1-30

Guo X.-W., Th´ng J.H.P., Swank R.A., Bradbury E.M. (1993); Effects of phosphatase inhibitors on mammalian $p34^{cdc2}$ kinase activities; in: The Cell Cycle: Regulators, Targets and Clinical Applications (Hu V.W., Ed.)

Guo X.W., Th´ng J.P.H., Swank R.A., Anderson H.J., Tudan C., Bradbury E.M., Roberge M. (1995); Chromosome condensation induced by fostriecin does not require p34cdc2 kinase activity and histone H1 hyperphosphorylation, but is associated with enhanced histone H2A and H3 phosphorylation; EMBO J. 14, 976-985

Hande K.R., Chabner B.A. (1978); Pyrimidine nucleoside monophosphate kinase from human leukemic blast cells; Cancer Res. 38, 579-585

Hanks S.K., Rodriguez L.V., Rao P.N. (1983); Relationship between histone phosphorylation and premature chromosome chromosome condensation; Exp. Cell Res. 148, 293-302

Harris C.C. (1989); Interindividual variation among humans in carcinogen metabolim, DNA adduct formation and DNA repair; Carcinogenesis 10, 1563-1566

Hartley-Asp B., Deinum J., Wallin M. (1985); Diethylstilbestrol induces metaphase arrest and inhibits microtubule assembly; Mutation Res. 143, 231-235

Hay J., Shahzeidi S., Laurent G. (1991); Mechanisms of bleomycin-induced lung damage; Arch. Toxicol. 65, 81-94

He D., Brinkley B.R. (1996); Structure and dynamic organization of centromeres/prekinetochores in the nucleus of mammalian cells; J. Cell Sci. 109, 2693-2704

Hecht S.S. (1984); N-nitroso-2-hydroxymorpholine, a mutagenic metabolit of N-nitrosodiethanolamine; Carcinogenesis 5, 1745-1747

Hecht S.M. (1986); DNA strand scission by activated bleomycin group antibiotics; Fed. Proc. 45, 2784-2791

Heck M.M., Hittelman W.N., Earnshaw W.C. (1988); Differential expression of DNA topoisomerases I and II during the eukarytic cell cycle; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1086-1090

Hendzel M.J., Wei Y., Mancini M.A., Hooser van A., Ranalli T., Brinkley B.R., Bazett-Jones D.P., Allis C.D. (1997); Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation; Chromosoma 106, 348-360

Henn I., Eisenbrand G., Zankl H. (1989); Increased mutagenicity of N-nitrosodiethanolamine in human lymphocyte cultures after activation by alcohol dehydrogenase; J. Cancer Res. Clin. Oncol. 115, 445-448

Herbst A.L., Ulfelder H., Poskanzer D.C. (1971); Adenocarcinoma of the vagina: association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. N. Eng. J. Med. 284, 878-881

Herrera L.A., Tittelbach H., Gebhart E., Ostrosky-Wegman P. (1991); Changes in the proliferation of human lymphocytes induced by several cytostatics and revealed by the premature chromosome condensation; Mutation Res. 263, 101-106

Hesbert A., Lemonnier M., Cavalier C. (1979); Mutagenicity of nitrosodiethanolamine on Salmonella typhimurium; Mutation Res. 68, 207-210

Hilfrich J., Schmeltz I., Hoffmann D. (1977); Effects of N-nitrosodiethanolamine and 1,1-diethanolhydrazine in Syrian golden hamsters; Cancer Letters 4, 55-60

Hittelman W.N. (1984); Prematurely condensed chromosomes: a model system for visualizing effects of DNA damage, repair and inhibition at the level of chromosome structure; In: DNA Repair, IRL Press

Hittelman W.N. (1986 a); The technique of premature chromosome condensation to study the leukemic process: review and speculations; CRC Crit. Rev. Onc. 6, 147-221

Hittelman W.N. (1986 b); Visualization of chromatin events during DNA excision repair in XP cells: deficiency in localized but not generalized chromatin events; Carcinogenesis 7, 1975-1980

Hittelman W.N., Agbor P., Petkovics I., Andersson B., Kantarjian H., Walters R., Koller C., Beran M (1988); Detection of leukemic clone maturation in vivo by premature chromosome condensation; Blood 72, 1950-1960

Hittelman W.N., Pandita (1994); Possible role of chromatin alteration in the radiosensitivity of ataxia-telangiectasia; Int. J. Radiat. Biol. 6, S109-S113

Hittelman W.N., Pollard M. (1982); A comparison of the DNA and chromosome repair kinetics after γ-irradiation; Radiation Res. 92, 497-509

Hittelman W.N., Pollard M. (1984); Visualization of chromatin events associated with repair of ultraviolet light-induced damage by premature chromosome condensation; Carcinogenesis 5, 1277-1285

Hittelman W.N., Rao P.N. (1974 a); Bleomycin-induced damage in prematurely condensed chromosomes and its relationship to cell cycle progression in CHO cells; Cancer Res. 34, 3433-3439

Hittelman W.N., Rao P.N. (1974 b); Premature chromosome condensation I. Visualization of X-ray-induced chromosome damage in interphase cells; Mutation Res. 23, 251-258

Hittelman W.N., Rao P.N. (1974 c); Premature chromosome condensation II. The nature of chromosome gaps produced by alkylating agents and ultraviolet light; Mutation Res. 23, 259-266

Hittelman W.N., Rao P.N. (1975); The nature of adriamycin-induced cytotoxicity in Chinese hamster cells as revealed by premature chromosome condensation; Cancer Res. 35, 3027-3035

Hittelman W.N., Rao P.N. (1976); Premature chromosome condensation. Conformational changes of chromatin associated with phytohemagglutinin stimulation of peripheral lymphocytes; Exp. Cell Res. 100, 219-222

Hittelman W.N., Rao P.N. (1978); Mapping G1 phase by the structural morphology of the prematurely condensed chromosomes; J. Cell Physiol. 95, 333-342

Hittelman W.N., Sognier M.A., Cole A. (1980); Direct measurement of chromosome damage and its repair by premature chromosome condensation; In: Radiation Biology in Cancer Research, Meyn R.E., Withers H.R. (eds), Raven Press, New York, 103-123

Hittelman W.N., Wang Z., Cheong N., Sohn H.Y., Lee J.S. (1989); Premature chromosome condensation and cytogenetics of human solid tumors; Cancer Bull. 41, 298-305

Hoekstra D., Klappe K., de Boer T., Wilschut J. (1985); Characterization of the fusogenic properties of Sendai virus: kinetics of fusion with erythrocytes membranes; Biochemistry 4, 4739-4745

Hoffmann G.R., Colyer S.P., Littlefield L.G. (1993); Induction of micronuclei by bleomycin in G0 human lymphocytes: I. Dose-response and distribution; Environ. Mol. Mutagen. 21, 130-135

Hoffmann G.R., Sayer A.M., Littlefield L.G. (1994); Potentiation of bleomycin by the aminothiol WR-1065 in assays for chromosomal damage in G0 human lymphocytes; Mutation Res. 307, 273-283

Holmberg M., Lagerberg M., Niejahr B., Rödin L. (1988); Simultaneous detection of DNA strand breaks and unscheduled DNA synthesis in mutagen-treated human lymphocytes in the absence of hydroxyurea; Mutation Res. 202, 111-118

Hongslo J.K., Brunborg G., Steffensen I.-L., Holme J.A. (1993); Paracetamol inhibits UV-induced DNA repair in resting human mononuclear blood cells in vitro; Mutagenesis 8, 423-429

Hsu T.C., Wu X., Trizna Z. (1996); Mutagen sensitivity in humans. A comparison between two nomenclature systems for recording chromatid breaks; Cancer Genet. Cytogenet. 87, 127-132

Huang S.K., Cheng M., Hui S.W. (1990); Effect of lateral mobility of fluorescent probes in lipid mixing assays of cell fusion; Biophys. J. 58, 1119-1126

Hui S.W., Isac T., Boni L.T., Sen A. (1985); Action of polyethylene glycol on the fusion of human erythrocyte membranes; J. Membr. Biol. 84, 137-146

Hui S.W., Stenger D.A. (1993); Electrofusion of cells: Hybridoma-production by electrofusion and polyethylene glycol; Methods in Enzymology 220, 212-227

IARC (1995); Crotonaldehyde; IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogeneric risks of chemicals to humans 63, 373-391

Jostes R., Reese J.A., Cleaver J.E., Molero M., Morgan W.F. (1989); Quiescent human lymphocytes do not contain DNA strand breaks detectable by alkaline elution; Exp. Cell Res. 182, 513-520

Iijima T., Hagiwara A. (1960); Mutagenic action of mitomycin C on Escherichia coli; Nature 185, 395-396

Iliakis G. (1991); The role of DNA double strand breaks in ionizing radiation-induced killing of eukaryotic cells; BioEssays 13, 641-648

Iliakis G., Blöcher D., Metzger L., Pantelias G. (1991); Comparison of DNA double-strand break rejoining as measured by pulsed field gel electrophoresis, neutral sucrose gradient centrifugation and non-unwinding filter elution in irradiated plateau-phase CHO cells; Int. J. Radiat. Biol. 59, 927-939

Iliakis G., Okayasu R., Varlotto J., Shernoff C., Wang Y. (1993); Hypertonic treatment during premature chromosome condensation allows visualization of interphase chromosome breaks repaired with fast kinetics in irradiated CHO cells; Radiation Res. 135, 160-170

Iliakis G., Pantelias G.E., Okayasu R.,Seaner R. (1987); ^{125}IdUrd-induced chromosome fragments, assayed by premature chromosome condensation, and DNA double-strand breaks have similar kinetics in G1-phase CHO-cells; Int. J. Radiat. Biol. 52, 705-722

Iliakis G., Wang Y., Pantelias G.E., Metzger L. (1992); Mechanism of radiosentization by halogenated pyrimidines: effect of BrdU on repair of DNA breaks,interphase chromatin breaks, and potentially lethal damage in plateau-phase CHO cells; Radiat. Res. 129, 202-211

Iliakis G.E., Pantelias G.E. (1989); Effects of hyperthermia on chromatin condensation and nucleoli disintegration as visualized by induction of premature chromosome condensation in interphase mammalian cells; Cancer Res. 49, 1254-1260

Iliakis G.E., Pantelias G.E. (1990); Production and repair of chromosome damage in an X-ray sensitive CHO mutant visualized and analysed in interphase using the technique of premature chromosome condensation; Int. J. Radiat. Biol. 57, 1213-1223

Iliakis G.E., Pantelias G.E., Okayasu R., Blakely W.F. (1992); Induction by H_2O_2 of DNA and interphase chromosome damage in plateau-phase Chinese hamster ovary cells; Radiation Res. 131, 192-203

ISCN (1985); An international system for human cytogenetic nomenclature. Harnden DG, Klinger HP (eds) Published in collaboration with Cytogenet Cell Genet. Karger, Basel

ISCN (1995); An international system for human cytogenetic nomenclature. Mittelman F. (Ed.) Published in collaboration with Cytogenet Cell Genet. Karger, Basel

Isenberg I. (1979); Histones; Ann. Rev. Biochem. 48, 159-191

Ishida R., Sato M., Narita T., Utsumi K.R., Nishimoto T., Morita T., Nagata H., Andoh T. (1994); Inhibition of DNA topoisomerase II by ICRF-193 induces polyploidization by uncoupling chromosome dynamics from other cell cycle events; J. Cell Biol. 126, 1341-1351

Ishida Y., Furukawa Y., Decaprio J.A., Saitoh M., Griffin J.D. (1992); Treatment of myeloid leukemic cells with the phosphatase inhibitor okadaic acid induces cell cycle arrest at either G1/S or G2/M depending on dose; J. Cell. Physiol. 150, 484-492

Iyer V.N., Szybalski W. (1964); Mitomycins and porfiromycin: chemical mechanisms of activation and cross-linking of DNA; Science 145, 55-58

Johnson R.T., Collins A.R.S., Waldren C.A. (1982); Prematurely condensed chromosomes and the analysis of DNA and chromosome lesions; in: Premature Chromosome Condensation, Application in Basic, Clinical, and Mutation Research, Rao P.N., Johnson R.T., Sperling K. (Eds.) Academic Press, Inc

Johnson R.T., Collins A.R.S., Squires S., Mullinger A.M., Elliott G.C., Downes C.S., Rasko I. (1987); DNA repair under stress; J. Cell Sci. Suppl. 6, 263-288

Johnson R.T., Rao P.N. (1970); Mammalian cell fusion: induction of premature chromosome condensation in interphase nuclei; Nature 226, 717-722

Johnson R.T., Rao P.N., Hughes H.D. (1970); Mammalian cell fusion III. A HeLa cell inducer of premature chromosome condensation active in cells from a variety of animal species; J. Cell Physiol. 76, 151-158

Johnstone A.P. (1984); Rejoining of DNA strand breaks is an early nuclear event during the stimulation of quiescent lymphocytes; Int. J. Biochem. 140, 401-406

Jollès B., Laigle A. (1995); Mitomycin C-induced distortions of DNA at minor alkylation sites; Chem.-Biol. Interact. 94, 215-224

Jorgensen B.M., Agerbo P., Jensen B., Borresen T., Holmer G. (1992); Inhibition of microsomal glucose 6-phosphatase by unsaturated aliphatic aldehydes and ketones; Chem.-Biol. Interactions 81, 209-218

Kadish J.L., Wenc K.M. (1983); Contamination of polythene glycol with aldehydes: implications for hybridoma fusion; Hybridoma 2, 87-89

Kallio M., Lähdetie J. (1993); Analysis of micronuclei induced in mouse early spermatids by mitomycin C, vinblastine sulfate or etoposide using fluorescence in situ hybridization; Mutagenesis 8, 561-567

Kamiguchi Y., Tateno H., Iizawa Y., Mikamo K. (1995); Chromosome analysis of human spermatozoa exposed to antineoplastic agents in vitro; Mutation Res. 326, 185-192

Kano Y., Fujiwara Y. (1981); Roles of DNA interstrand crosslinking and its repair in the induction of sister chromatid exchange and a higher induction in Fanconi`s anemia cells; Mutation Res. 81, 365-375

Karsten U., Stolley P., Walther I., Papsdorf G., Weber S., Conrad K., Pasternak L., Kopp J. (1988); Direct comparison of electric field-mediated and PEG-mediated cell fusion for the generation of antibody producing hybridomas; Hybridoma 7, 627-633

Kaul W.L.H., Scherthan H. (1990); Efficient and rapid method for midi-scale preparation of purified plasmid DNA; The Nucleus 33, 107-110

Kawanishi M., Matsuda T., Sasaki G., Yagi T., Matsui S., Takebe H. (1998); a spectrum of mutations induced by crotonaldehyde in shuttle vector plasmids propagated in human cells; Carcinogenesis 19, 69-72

Keyse S.M., Tyrrell R.M. (1985); Evidence that novobiocin and nalidixic acid do not inhibit excision repair in u.v.-irradiated human skin fibroblasts at a pre-incision step; Carcinogenesis 6, 1231-1233

Keyes S.R., Fracasso P.M., Heimbrooks D.C., Rockwell S., Sligar S.G., Sartorelli A.C. (1984); Role of NADPH-cytochrome c reductase and DT-diaphorase in the biotransformation of mitomycin C; Cancer Res. 44, 5638-5643

Kharbanda S., Yuan Z.M., Taneja N., Weichselbaum R., Kufe D. (1994); p56/p53lyn tyrosine kinase activation in mammalian cells treated with mitomycin C; Oncogene 9, 3005-3011

Kihara H., Lilienfeld F. (1934); Kerneinwanderung und Bildung syndiploider Pollenmutterzellen bei dem F_1-Bastard; Jpn. J. Genet. 10, 1-29

Kihlman B.A., Andersson H.C. (1985); Synergistic enhancement of the frequency of chromatid aberrations in cultured human lymphocytes by combinations of inhibitors of DNA repair; Mutation Res. 150, 313-325

Kishi K. (1987); Effects of repair inhibition in the G1 phase of clastogen-treated human lymphocytes on the frequencies of chromosome-type and chromatid-type aberrations and sister-chromatid exchanges; Mutation Res. 176, 105-116

Kishi K., Sekizawa K. (1993); Evidence for excision repair-dependent and –independent processes in ara C-induced chromosome rearrangements in G1 human lymphocytes; Environ. Mol. Mutagen. 22, 271-274

Klebe R.J., Bentley K.L. (1987); Chemically mediated cell fusion; In: Methods of Hybridoma Formation, Bartal A.H., Hirshaut Y. (eds.), Humana Press, 77-96

Kligerman A.D., Bryant M.F., Doerr C.L., Halperin E.C., Kwanyuen P., Sontag M.R., Erexson G.L. (1992); Interspecies cytogenetic comparisons: studies with X-radiation and bleomycin sulfate; Environ. Mol. Mutagen. 19, 235-243

Kovacs M.S., Evans J.W., Johnstone I.M., Brown J.M. (1994); Radiation-induced damage, repair and exchange formation in different chromosomes of human fibroblasts determined by fluorescence in situ hybridization; Radiation Res. 137, 34-43

Kovacs E., Langemann H. (1990); Investigation of the repair of single strand breaks in human DNA using alkaline gel electrophoresis; Radiat. Res. 124, 137-140

Krek W., Nigg E.A. (1991); Mutations of p34cdc2 phosphorylation sites induce premature mitotic events in HeLa cells: evidence for a double block to p34cdc2 kinase activation in vertebrates; EMBO J. 10, 3331-3341

Krishna G., Kropko M.L., Theiss J.C. (1989); Use of the cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei in V79 Chinese hamster lung cells: results with mitomycin C and cyclophosphamide; Mutation Res. 222, 63-69

Krokan H., Grafström R.C., Sundqvist K., Esterbauer H., Harris C.C. (1985); Cytotoxicity, thiol depletion and inhibition of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by various aldehydes in cultured human bronchial fibroblasts; Carcinogenesis 6, 1755-1759

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

Kumagai A., Dunphy W.G. (1991); The cdc25 protein controls tyrosine dephosphorylation of the cdc25 protein in a cell free system; Cell 64, 903-914

Kumar S., Lipman R., Tomasz M. (1992); Recognition of specific DNA sequences by mitomycin C for alkylation; Biochemistry 31, 1399-1407

Kuykendall J.R., Bogdanffy M.S. (1992); Efficiency of DNA-histone crosslinking induced by saturated and unsaturated aldehydes in vitro; Mutation Res. 283, 131-136

Langer P.R., Waldrop A.A., Ward D.C. (1981); Encymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: Novel nucleic acid affinity probes; Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70, 273-282

Langner A., Melzig M.F., Kempa S., Krause A. (1995); Die Verwendung von Lymphozytenkulturen für Untersuchungen zur Biotransformation von Arzneistoffen; Pharmazie 50, 130-138

Lau Y.-F., Arrighi F.E. (1980); Studies of mammalian chromosome replication I.BrdU-induced staining patterns in interphase and metaphase chromosomes; Cytogenet. Cell Genet. 27, 176-183

Lau Y.-F., Brown R.L., Arrighi F.E. (1977); Induction of premature chromosome condensation in CHO cells fused with polyethylene glycol; Exp. Cell Res. 110, 57-61

Lawley P.D., Brookes P. (1963); Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides; Biochem J. 89, 127-138

Lazutka J.R., Rudaitienė S. (1992); Modulation by novobiocin of sister-chromatid exchanges induced by tumor necrosis factor in human lymphocytes; Mutation Res. 268, 217-221

Lee M.G., Nurse P. (1987); Complementation used to clone a human homologue of the fission yeast cell cycle control gene cdc2; Nature 327, 31-35

Lee S.Y., Guttenplan J.B. (1981); A correlation between mutagenic and carcinogenic potencies in a diverse group of N-nitrosamines: determination of mutagenic activities of weakly mutagenic N-nitrosamines; Carcinogenesis 2, 1339-1344

Lee T.H., Solomon M.J., Mumby M.C. Kirschner M.W. (1991); INH, a negative regulator of MPF, is a form of protein phosphatase 2A; Cell 64, 415-423

Lefterov I.M., Koldamova R.P. (1992); Schedule dependent variation in human lymphocyte sensitivity to bleomycin and repair of chromosomal aberrations in G2; Mutation Res. 284, 195-204

Leitch A.R., Schwarzacher T., Jackson D., Leitch I.J. (1994); In situ-Hybridisierung; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg, Berlin, Oxford

Li V., Kohn H. (1991); Studies on the bonding specificity for mitomycinC-DNA monoalkylation processes; J. Am. Chem. Soc. 113, 275-283

Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., Ward D.C. (1988); Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA librairies; Hum. Genet. 80, 224-234

Liehr J.G., Roy D. (1990); Free radical generation by redox cycling of estrogens; Free Radical Biol. Med. 8, 415-423

Lijinski W., Reuber M.D. (1984); Dose-response study with N-nitrosodiethanolamine in F344 rats; Food Chem. Toxicol. 22, 23-26

Lindl T.,Bauer J. (1987); Zell- und Gewebekultur, (Lindl T., Bauer J. Hrsg.), Gustav Fischer Verlag

Liu L.F., Liu C.C., Alberts B.M. (1980); Type II DNA topoisomerases: enzymes that can unknot a topologically knotted DNA molecule via a reversible double-strand break; Cell 19, 697-707

Loeppky R.N., Lee M.P., Müller S. (1994); Modification of DNA by α-nitrosamino aldehydes; IARC Sci. Publ. 125, 429-432

Loucas B.D. (1990); The Development of Gamma-Ray Damage in Chromosomes in Relation to Cell Killing; Ph.D.Thesis, Colorado State University, Fort Collins, Coloroda

Lucas J.N., Awa A., Straume T., Poggensee M., Kodama Y., Nakano M., Ohtaki K., Weier H.U., Pinkel D., Gray J., Littlefield G. (1992); Rapid translocation frequency analysis in human decades exposure to ionizing radiation; Int. J. Radiat. Biol. 62, 53-63

Luomahaara S., Norppa H. (1994); Induction of micronuclei in cultured human lymphocytes treated with vinblastine before and after mitogen stimulation; Mutation Res. 324, 29-34

MacKintosh C., MacKintosh R.W. (1994); Inhibitors of protein kinases and phosphatases; TIBS 19, 444-448

MacLeod R.A.F., Hill F.G.H., Creasy M.R., Hulten M.A. (1989); Premature chromosome condensation in childhood acute leukaemia: correlation of proliferative potential index in blood and marrow 1, 135-138

Madle S., Beek B., Nowak C. (1992); Zum Verständnis von Chromosomenmutationstests an Somazellen; in: Fahrig R. (Ed.); Mutationsforschung und genetische Toxikologie, Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 224-242

Maillie H.D., Baker J.V., Simon W., Watts R.J., Quinn B.R. (1992); Age related rejoining of broken chromosomes in human leukocytes following X-irradiation; Mechanisms of Ageing and Development 65, 229-238

Major R.T., Marchini P., Boulton A.J. (1963); Observation on the production of the α–hexenal by leaves of certain plants; J. Biol. Chem. 238, 1813-1816

Maniatis T., Fritsch E.F., Sanbrook J. (1982); Molecular cloning: a laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York

Mark H.F.L., Naram R., Pham T., Shah K., Cousens L.P., Wiersch C., Airall E., Samy M., Zolnierz K., Mark R., Santoro K., Beauregard L., Lamarhe P.H. (1994); A practical cytogenetic protocol for in vitro cytotoxicity and genotoxicity testing; Ann. Clin. Lab. Sci. 24, 387-395

Marnett L.J., Hurd H.K., Hollstein M.C., Levin D.E., Esterbauer H., Ames B.N. (1985); Naturally occuring carbonyl compounds are mutagens in Salmonella tester strain TA104; Mutation Res. 148, 25-34

Maroudas N.G. (1975); polymer exclusion, cell adhesion and membrane fusion; Nature 254, 695-696

Marselos M., Tomatis L. (1992); Diethylstilboestrol: I, pharmacology, toxicology and carcinogenicity in humans; Eur. J. Cancer 28A, 1182-1189

Martelli A., Canonero R., Cavanna M., Ceradelli M., Marinari U.M. (1994); Cytotoxic and genotoxic effects of five n-alkanals in primary cultures of rat and human hepatocytes; Mutation Res. 323, 121-126

Mazia D. (1963); Synthetic activities leading to mitosis; J. Cell. Comp. Physiol. 62 Suppl. 1, 123-140

McLachlan J.A., Wong A., Degen G.H., Barrett J.C. (1982); Morphological and neoplastic transformation of Syrian hamster embryo fibroblasts by diethylstilbestrol and its analogs. Cancer Res. 42, 3040-3045

Mehta R.D., von Borstel R.C. (1982); Genetic activity of diethylstilbestrol in Saccharomyces cerevisiae. Enhancement of mutagenicity by oxidizing agents; Mutation Res. 92, 49-61

Meilike C. (1996); Untersuchungen zur genotoxischen Wirkung von 2-trans,6-cis-Nonadienal; Diplomarbeit Universität Kaiserslautern

Metze V. (1995); Proliferationskinetische und cytogenetische Untersuchung von Chorionzellen aus Spontanaborten des ersten Schwangerschaftstrimenons; Dissertation, Universität Hannover

Metze V., Miller K. (1994); Cell proliferation in chorionic villi of spontaneous abortions as analyzed by premature chromosome condensation; Med. Genetik 1, 113

Metzler M. (1984); Biochemical toxicology of diethylstilbestrol; Reviews in Biochemical Toxicology, (Hodgson E., Bend J.R., Philpot R.M. eds), Elsevier

Migliore L., Cocchi L., Scarpato R. (1996); Detection of the centromere in micronuclei by fluorescence in situ hybridization: its application to human lymphocyte micronucleus assay after treatment with four suspected aneugens; Mutagenesis 11, 285-290

Migliore L., Nieri M., Loprieno N. (1989); The human lymphocyte micronucleus assay: a comparison between whole blood and separated-lymphocyte cultures; Mutation Res. 227, 167-172

Mikita T., Beardsley G.P. (1988); Functional consequences of the arabinofuranosylcytosine structural lesion in DNA; Biochemistry 27, 4698-4705

Mikkelsen R.B., Gentry C. (1992); A radiation-induced inhibitor of chromosome condensation and nuclear envelope breakdown in HeLa cells; Radiation Res. 132, 158-161

Miller K. (1991); Clastogenic effects of bleomycin, cyclophosphamide, and ethyl methansulfonate on resting and proliferating human B- and T-lymphocytes; Mutation Res. 251, 241-251

Miller K., Metze V., Wang R., Lin X., Rehder H. (1996); Proliferation kinetics of chorionic villi in chromosomally normal and abnormal spontaneous abortions analyzed by premature chromosome condensation and nothern blot; Ann. Génét. 39, 159-167

Moore R.C., Randell C., Bender M.A. (1988); An investigation using inhibition of G2 repair of the molecular basis of lesions which result in chromosomal aberrations; Mutation Res. 199, 229-233

Morgan W.F., Doida Y., Fero M.L., Xi-Cang G., Shadley J.D.(1986); Potentiation of sister chromatid exchange by 3-aminobenzamide is not modulated by topoisomerases or proteases; Environ. Mutagen. 8, 487-493

Mori Y., Yamazaki H., Konishi Y. (1987); Mutagenicity of N-nitrosodiethanolamine in the Salmonella/microsome test; Mutation Res. 192, 91-94

Moroi Y., Peebles C., Fritzler M.J., Steigerwald J.,Tan E.M. (1980); Autoantibody to centromer (kinetochore) in scleroderma sera; Proc. Natl. Acad. Sci. 77, 1627-1631

Morris S.M. (1991); The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells; Mutation Res. 258, 161-188

Morse H.G., Odom L.F., Castro R., Hays T., Blake M., Vannais D., Robinson A. (1987); Methodology of premature chromosome condensation and its potential for relapse prediction in acute leukemia of children and adolescents; Cancer Genet. Cytogenet. 27, 51-61

Morselos und Tomatis (1992); Diethylstilbestrol: I, pharmacology, toxicology and carcinogenicity in humans, 28A, 1182-1189

Mosesso P., Fonti E., Bassi L, Lorenti Garcia C., Palitti F. (1999); The involvement of chromatin condensation in camptothecin-induced chromosome breaks in G0 human lymphocytes; Mutagenesis 14, 103-105

Mühlmann-Díaz M.C., Bedford J.S. (1994); Breakage of human chromosomes 4, 19 and Y in G0 cells immediatly after exposure to γ-rays; Int. J. Radiat. Biol. 65, 165-173

Müllenbach R., Jagoda P., Welter C. (1989); An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues; Trends in Genetics 5, 391

Mukherjee A.B., Murthy V.V.V.S., Chaganti R.S.K. (1992); Detection of cell-cycle stage by fluorescence in situ hybridization: its application in human interphase cytogenetics; Cytogenet. Cell Genet. 61, 91-94

Mutchinick O., Ruz L., Casas L. (1980); Time of first-generation metaphases. I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures; Mutation Res. 72, 127-134

Natarajan A.T., Balajee A.S., Boei J.J.W., Darroudi F., Dominguez I., Hande M.P., Meijers M., Slijepcevic, Vermeulen S., Xiao Y. (1996); Mechanisms of induction of chromosomal aberrations and their detection by fluorescence in situ hybridization; Mutation Res. 372, 247-258

Natarajan A.T., Obe G. (1984); Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations III. Restriction endonucleases; Chromosoma 90, 120-127

Nichols W.W., Levan A., Aula P., Norrby E. (1964); Extreme chromosome breakage induced by measles virus in different in vitro systems; Hereditas 51, 380-382

Nowak C. (1983); Entwicklung eines cytogenetischen Testsystems zum Nachweis mutagener Substanzen. Untersuchngen mit CHO-Zellen und menschlichen Lymphozyten; Inaugural-Dissertation, Freie Universität Berlin

Nowell P.C. (1964); Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures; Exp. Cell Res. 33, 445-449

Oberhammer F.A., Hochegger K., Fröschl G., Tiefenbacher R., Pavelka M. (1994); Chromatin condensation during apoptosis is accompagnied by degradation of lamin A+B, without enhanced activation of cdc2 kinase; J. Cell Biol. 126, 827-837

Ohno Y., Spriggs D., Matsukage A., Ohno T., Kufe D. (1988); Effects of 1-β-D-arabinofuranosylcytosine incorporation on elongation of specific DNA sequences by DNA polymerase β; Cancer Res. 48, 1494-1498

Okada Y. (1993); Sendai virus induced cell fusion; Methods in Enzymology 221, 18-41

Okayasu R., Cheong N., Iliakis G. (1993); Comparison of yields and repair kinetics of interphase chromosome breaks visualized by Sendai-virus or PEG-mediated cell fusion in irradiated CHO cells; Int. J. Radiat. Biol. 64, 689-694

Okayasu R., Iliakis G. (1993); Ionizing radiation induces two forms of interphase chromosome breaks in Chinese hamster ovary cells that rejoin with different kinetics and show different sensitivity to treatment in hypertonic medium or β-ara A; Radiation Res. 136, 262-270

Okayasu R., Iliakis G. (1994); Mitotic metaphase cells from different cell lines cause different levels of expression of the α-form of interphase chromosome breaks in irradiated CHO cells; Mutation Res. 310, 65-71

Östergren G., Bajer A. (1961); Mitosis with undivided chromosomes; I. A study on living material; Chromosoma 12, 72-79

Pandita T.K., Gregoire V., Dhingra K., Hittelman W.N. (1994); Effect of chromosome size on aberration levels caused by gamma radiation as detected by fluorescence in situ hybridization; Cytogenet. Cell Genet. 67, 94-101

Pantelias G.E. (1986); Radiation-induced cytogenetic damage in relation to changes in interphase chromosome conformation; Radiation Res. 105, 341-350

Pantelias G.E., Iliakis G.E., Sambani C.D., Politis G. (1993); Biological dosimetry of absorbed radiation by C-banding of interphase chromosomes in peripheral blood lymphocytes; Int. J. Radiat. Biol. 63, 349-354

Pantelias G.E., Maillie H.D. (1983); A simple method for premature chromosome condensation induction in primary human and rodent cells using polyethylene glycol; Somat. Cell Genet. 9, 533-547

Pantelias G.E., Maillie H.D. (1985); Direct analysis of radiation-induced chromosome fragments and rings in unstimulated human peripheral blood lymphocytes by means of the premature chromosome condensation technique; Mutation Res. 149, 67-72

Pantelias G.E., Wolff S. (1985); Cytosine arabinoside is a potent clastogen and does not affect the repair of X-ray-induced chromosome fragments in unstimulated human lymphocytes; Mutation Res. 151, 65-72

Parshad R., Tarone R.E., Price F.M., Sanford K.K. (1993); Cytogenetic evidence for differences in DNA incision activity in xeroderma pigmentosum group A,C and D cells after X-irradiation during G2 phase; Mutation Res. 294, 149-155

Pascoe S.A., Stemp G. (1990); A modified method and staining technique for the in vitro micronucleus test in human lymphocytes using cytochalasin B; Mutation Res. 234, 253-255

Perry P., Evans H.J. (1975); Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange; Nature 258, 121-125

Perry P., Wolff S. (1974); New Giemsa mehod for the differential staining of sister chromatids; Nature 251, 156-158

Petkovic I., Agbor P., Hittelman W.N. (1989); Simultaneous cell type identification and premature chromosome condensation analysis in a case of multiple myeloma; Cancer Genet. Cytogenet. 39, 203-217

Petru E., Sevin B.U., Haas J., Ramos R., Perras J. (1995); A correlation of cell cycle pertubations with chemosensitivity in human ovarian cancer cells exposed to cytotoxic drugs in vitro; Gynecologic Oncology 58, 48-57

Pfeiffer E., Metzler M (1992); Effects of steroidal and stilbene estrogens and their peroxidative metabolites on microtubular proteins; In: Li J., Nandl S., Li S.A.(eds), Hormonal Carcinogenesis, Cold Spring Harbor, New York

Pfeiffer S.E., Tolmach L.J. (1968); RNA synthesis in synchronously growing populations of HeLa S3 cells. I.Rate of total RNA synthesis and its relationship to DNA synthesis; J. Cell Physiol. 71, 77-94

Pincheira J., Gallo C., Bravo M., Navarrete M.H., Lopez-Saez J.F. (1993); G2 repair and aging: influence of donor age on chromosomal aberrations in human lymphocytes; Mutation Res. 295, 55-62

Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J., Gray J. (1988); Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific librairies: Detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4; Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 9138-9142

Pontecorvo G. (1975); Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment; Somat. Cell Genet. 1, 397-400

Porvik L.F., Austin M.J.F. (1991); Genotoxicity of bleomycin; Mutation Res. 257, 127-143

Prasanna P.G.S., Kolanko C.J., Gerstenberg H.M., Blakeley W.F. (1997); Premature chromosome condensation assay for biodosimetry: studies with fission-neutrons; Health Phys. 72, 594-600

Preston R.J., Gooch P.C. (1981); The induction of chromosome-type aberrations in G1 by methyl methanesulfonate and 4-nitroquinoline-N-oxide, and the non-requirement of an S-phase for their production; Mutation Res. 83, 395-402

Raabe-Meyer G. (1990); Zellzyklus-Studien an menschlichen Chorionzellen des ersten Schwangerschaftstrimenons; Dissertation, Universität Hannover

Raabe G., Miller K. (1990); Cell proliferation in chorionic villi at different gestational ages, as analyzed by premature chromosome condensation; Cytogenet. Cell Genet. 54, 127-131

Rao P.N. (1980); The molecular basis of drug-induced G2 arrest in mammalian cells; Mol. Cell. Biochem. 29, 47-57

Rao P.N. (1982); The phenomenon of premature chromosome condensation; in: Premature Chromosome Condensation, Application in Basic, Clinical, and Mutation Research; Rao P.N., Johnson R.T., Sperling K. (Eds.), Academic Press New York

Rao P.N., Johnson R.T. (1970); Mammalian cell fusion: studies on the regulation of DNA synthesis and mitosis; Nature 225, 159-164

Rao P.N., Johnson R.T. (1971); Mammalian cell fusion. IV. Regulation of chromosome formation from interphase nuclei by various chemical compounds; J. Cell Physiol. 78, 217-224

Rao A.P., Rao P.N. (1976); The cause of G2-arrest in Chinese hamster ovary cells treated with anticancer drugs; J. Natl. Cancer Inst. 1139-1143

Rao P.N., Wilson B., Puck T.T. (1977); Premature chromosome condensation and cell cycle analysis; J. Cell Physiol. 91, 131-142

Rao T.K., Young J.A., Lijinsky W., Epler J.L. (1979); Mutagenicity of aliphatic nitrosamines in Salmonella typhimurium; Mutation Res. 66, 1-7

Rattner J.B., Klingwell B.G., Fitzler M. (1988); Detection of distinct structural domains within the primary construction using antibodies; Chromosoma 96, 360-367

Regan J.D., Setlow R.B. (1974); Two forms of repair in the DNA of human cells damaged by chemical carcinogens and mutagens; Cancer Res. 34, 3318-3325

Renzi L., Pacchierotti F., Russo A. (1996); The centromere as a target for the induction of chromosome damage in resting and proliferating mammalian cells: assessment of mitomycin C-induced genetic damage at kinetochores and centromeres by a micronucleus test in mouse splenocytes; Mutagenesis 11, 133-138

Rigby P.W., Dieckman M., Rhodes C., Berg P. (1977); Labeling desoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick-translation with DNA polymerase I; J. Mol. Biol. 113, 237-251

Rink S.M., Lipman R., Alley S.C., Hopkins P.B., Tomasz M. (1996); Bending of DNA by the mitomycin C-induced, GpG intrastrand cross-link; Chem. Res. Toxicol. 9, 382-389

Röhme D. (1981); Ageing and the fusion sensitivity potential of human cells in culture: relation to tissue origin, donor age, and in vitro culture level and condition; Mechanisms of ageing and Development 16, 241-253

Römpp-Lexikon Chemie (1996); Falbe J., Regitz M. (Eds.); 10. Aufl., Georg Thieme Verlag

Rosenberg L.J., Hittelman W.N. (1983); Direct and indirect clastogenic activity of Anthracene dione in Chinese hamster ovary cells; Cancer Res. 43, 3270-3275

Roy D., Pathak D.N. (1995); Histone nuclear proteins are irreversibly modified by reactive metabolites of diethylstilbestrol; J. Toxicol. Environ. Health 44, 447-457

Roy D., Pathak D.N., Palangat M. (1995); In vivo binding of diethylstilbestrol to nuclear proteins of kidneys of Syrian hamsters; Cancer Letters 90, 215-224

Rubin C.M. (1992); Technical advances in the cytogenetic analysis of malignant tissues; Cancer 69, 1567-1571

Ruis C., Zorrilla A.R., Cabanas C., Mata F., Bernaben C., Aller P. (1990); Differentiation of human promonocytic leukemia U-937 cells with DNA topoisomerase II inhibitors: induction of vimentin gene expression; Mol. Pharmacol. 39, 442-448

Sachs L. (1996); Angewandte Statistik; 8. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

Sanderson B.J.S., Morley A.A. (1986); Mitogenic stimulation may induce an anti-mutagenic repair system in human lymphocytes; Mutagenesis 1, 131-133

Sansone E.B., Losikoff A.M., Lijijnski W. (1980); The penetration of rat skin by some nitrosamines of environmental importance; IARC Sci. Publ. 31, 705-716

Sartorelli A.C., Hodnick W.F., Belcourt M.F., Tomasz M., Haffty B., Fischer J.J., Rockwell S. (1994); Mitomycin C: a prototype bioreductive agent; Oncol. Res. 6, 501-508

Sasai K., Evans J.W., Kovacs M.S., Brown J.M. (1994); Prediction of human cell radiosensitivity: comparison of clonogenic assay with chromosome aberrations scored using premature chromosome condensation with fluorescence in situ hybridization; Int. J. Radiation Biol. Phys. 30, 1127-1132

Sasaki M.S. (1973); DNA repair capacity and susceptibility to chromosome breakage in xeroderma pigmentosum cells; Mutation Res. 20, 291-293

Sato Y., Murai T., Tsumuraya M., Saito H., Kodama M. (1984); Disruptive effect of diethylstilbestrol on microtubules; Gann 75, 1046-1048

Savage J.R.K. (1975); Classification and relationships of induced chromosomal structural changes; J. Med. Genet. 12, 103-122

Savage J.R.K. (1990); Mechanisms of chromosome aberrations; In: Mutation and the Environment, Part B, 385-396

Savage J.R.K., Cao S. (1985); Some observations on the localization of mitomycin C-induced aberrations in human lymphocytes; Mutation Res 150, 307-312

Sawada M., Ishidate M.Jr. (1978); Colchicine-like effect of diethylstilbestrol (DES) on mammalian cells in vitro; Mutation Res. 57, 175-182

Schauenstein E., Esterbauer H., Zollner H. (1977); Aldehydes in biological systems; Pion Limited, London

Schauenstein E., Esterbauer H. (1979); Formation and properties of reactive aldehydes. In: Submolecular Biology and Cancer. Ciba Foundation Series 67, 225-244; Excerpta Medica, Amsterdam

Scherer G., Ludeke B., Kleihues P., Loeppky R.N., Eisenbrand G. (1991); Mutagenicity, DNA damage and DNA-adduct formation by N-nitroso-2-hydroxyalkylamine and corresponding aldehydes; IARC Sci. Publ. 105, 339-342

Scherthan H., Zankl H., Kioschis P. (1989); Application of reflection contrast- and fluorescence microscopy to non-radioactive in-situ hybridization; Scientific and Technical Information 9, 171-174

Schlegel R., Pardee A.B. (1986); Caffeine-induced uncoupling of mitosis from the completion of DNA replication in mammalian cells; Science 232, 1264-1266

Schlesinger E., Gebhart E. (1987); Proliferationskontrolle in menschlichen Tumorzellinien und Fibroblastenkulturen mittels vorzeitiger Chromosomenkondensation (PCC); Ann. Univ. Sarav. Med. Suppl. 7, 267-270

Schmiady H. (1979); Die Länge vorzeitig kondensierter Chromosomen (PCC) und Chromosomenabschnitte menschlicher Zellen in Abhängigkeit vom Zellzyklus; Dissertation, Freie Universität Berlin

Schmiady H., Sperling K. (1981); Length of human prematurely condensed chromosomes during G0 and G1 phase; Exp. Cell Res. 134, 461-465

Schnedl W., Czaker R., Ammerer G., Schwarzacher H.G. (1975); Induction of premature chromosome condensation (PCC) depending on the cell cycle phase; Cytobiologie 12, 140-144

Schor S.L., Johnson R.T., Waldren C.A. (1975); Changes in the organization of chromosomes during the cell cycle: response to ultraviolet light; J. Cell Sci. 17, 539-565

Schrader T.J. (1992); Differences in nucleotide and base DNA excision repair observed during mitogenic stimulation of bovine lymphocytes; Mutation Res. 273, 29-42

Schrader T.J., Walker I.G. (1988); Low levels of DNA excision repair in undamaged bovine lymphocytes; Mutation Res. 194, 65-72

Schuhmacher J. (1990); Untersuchungen zur Genotoxizität und zum Metabolismus aromawirksamer α,β-ungesättigter Aldehyde; Dissertation, Universität Kaiserslautern

Schuler M., Schnitzler R., Zankl H., Metzler M. (1991); Induction of micronuclei by diethylstilbestrol: comparison of various mammalian primary cells in culture; J. Cancer Res. Clin. Oncol. Suppl. 117, M9

Scudiero D., Norin A., Karran P., Strauss B. (1976); DNA excision-repair deficiency of human peripheral blood lymphocytes treated with chemical carcinogens; Cancer Res. 36, 1397-1403

Sen P., Hittelman W.N. (1984); Kinetics and extent of repair of bleomycin-induced chromosome damage in quiescent normal human fibroblasts and human mononuclear blood cells; Cancer Res. 44, 591-596

Shay J.W. (1987); Mechanisms of cell fusion and selection in the generation of hybridomas; In: Methods of Hybridoma Formation; Bartal A.H., Hirshaut Y. (Eds.); Humana Press, 63-75

Shoemaker C.B., Chalkley R. (1978); An H3 histone-specific kinase isolated from bovine thymus chromatin; J. Biol. Chem. 253, 5802-5807

Singer B., Grunberger D (1983): Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens; Plenum Press, New York, 31-41

Sirover M.A. (1990); Cell cycle regulation of DNA repair enzymes and pathways; In: Transformation of human diploid fibroblasts, Lio (Ed.), Boca Raton, 29-54

Snyder R.D., Van Houten B., Regan J.D. (1984); The accumulation of DNA breaks due to incision; comparative studies with various inhibitors; In: DNA Repair and its Inhibition; Collins A., Downes C.S., Johnson R.T. (Eds); IRL Press, Oxford, Washington DC

Sognier M.A., Hittelman W.N. (1983); Loss of repairability of DNA interstrand crosslinks in Fanconi´s anemia cells with culture age; Mutation Res. 108, 383-393

Sognier M., Hittelman W.N. (1986); Mitomycin-induced chromatid breaks in HeLa cells: a consequence of incomplete DNA replication; Cancer Res. 46, 4032-4040

Sognier M.A., Hittelman W.N., Rao P.N. (1979); Effect of DNA repair inhibitors on the induction and repair of bleomycin-induced chromosome damage; Mutation Res. 60, 61-72

Solomon M.J., Glotzer M., Lee T.H., Philippe M., Kirschner M.W. (1990); Cyclin activation of $p34^{cdc2}$; Cell 63, 1013-1024

Spanswick V.J., Cummings J., Smyth J.F. (1996); Enzymology of Mitomycin C; Biochem Pharmacol 51, 1623-1630

Sperling K. (1980); Zellzyklus und Chromosomenzyklus; BIUZ 4, 111-116

Sperling K. (1982); Cell cycle and chromosome cycle: morphological and functional aspects. In: Premature Chromosome Condensation: Application in basic, clinical and mutation research, 43-78. Rao P.N., Johnson R.T., Sperling K. (Hrsg.), Academic Press, New York

Sperling K., Rao P.N. (1974); The phenomen of premature chromosome condensation: its relevance to basic and applied research; Humangenetik 23, 235-258

Spiegelhalder B., Eisenbrand G., Preussmann R. (1982); Urinary excretion of N-nitrosamines in rats and humans; IARC Sci. Publ. 41, 443-449

Spiegelhalder B., Preussmann R. (1984); Contamination of toiletries and cosmetic products with volatile and nonvolatile N-nitroso carcinogens; J. Cancer Res. Clin. Oncol. 108, 160-163

Steinmann K.E., Belinsky G.S., Lee D., Schlegel R. (1991); Chemically induced premature mitosis: differential response in rodent and human cells and the relationships to cyclin B synthesis and p34cdc2/cyclin B complex formation; Proc. Natl. Acad. Sci. 88, 6843-6847

Sterzel W., Eisenbrand G. (1986); N-nitrosodiethanolamine is activated in the rat to an ultimate genotoxic metabolit by sulfotransferase; J. Cancer Res. Clin. Oncol. 111, 20-24

Strausfeld U., Labbe J.C., Fesquet D., Cavadore J.C., Picard A., Sadhu K., Russell P., Doree M. (1991); Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein; Nature 351, 242-245

Stubbe J., Kozarich J.W. (1987); Mechanisms of bleomycin-induced DNA degradation; Chem. Rev. 87, 1107-1136

Surrallés J., Sebastian S., Natarajan A.T.(1997); Chromosomes with high gene density are preferentially repaired in human cells; Mutagenesis 12, 437-442

Surrallés J., Catalán J., Creus A., Norppa H., Xamena N., Marcos R. (1995); Micronuclei induced by alachlor, mitomycin-C and vinblastine in human lymphocytes: presence of centromeres and kinetochores and influence of staining technique; Mutagenesis 10, 417-423

Suzuki M (1989); SPKK, a new nucleic acid-binding unit of protein found in histone; EMBO J. 8, 797-804

Takagi N., Kato H., Sandberg A.A. (1969); Relation of virus-induced cell fusion and chromosome pulverization to mitotic events; J. Natl. Cancer Inst. 43, 335-347

Tam S.W., Schlegel R. (1992); Staurosporine overrides checkpoints for mitotic onset in BHK cells; Cell Growth & Differ. 3, 811-817

Taylor S.S. (1982); The in vitro phosphorylation of chromatin by the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase; J. Biol. Chem. 257, 6056-6063

Terzoudi G.I., Pantelias G.E. (1997); Conversion of DNA damage into chromosome damage in response to cell cycle regulation of chromatin condensation after irradiation; Mutagenesis 12, 271-276

Thelander L., Reichard P. (1979), Reduction of ribonucleotides; Annu. Rev. Biochem 48, 133-158

Thomou H., Sambani C., Kitsiou P., Politis G. (1988); Formation of multilayer rosettes in phytohemagglutinin-stimulated lymphocytes: correlation with chromatin condensation conformation in premature chromosome condensation; Cytotechnology 1, 243-249

Tice R., Schneider E.L., Rary J.M. (1976); The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics; Exp. Cell Res. 102, 232-236

Tijo J.H., Puck T.T. (1958); Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture; J. Exp. Med. 108, 259-271

Tittelbach H. (1992); Die vorzeitige Chromosomenkondensation in Forschung und Diagnostik; Inaugural-Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg

Tittelbach H., Brüderlein S., Gebhart E. (1989); The activity of bleomycin and modifiers of its clastogenic effect on the interphase chromatin of Indian muntjac fibroblasts; Cell Biol. Toxicol. 5, 39-50

Tobey R.A. (1971); Arrest of Chinese hamster cells in G2 following treatment with the anti-tumor drug bleomycin; J. Cell Physiol. 79, 259-266

Tomasz M. (1994); The mitomycins: natural cross-linkers of DNA; In: Neidle S., Waring M. (eds), Molecular Aspects of Anticancer drug-DNA interactions 2, 312-349

Tomasz M., Lipman R. (1979); Alkylation reactions of mitomycin C at acid pH; J. Am. Chem. Soc. 101, 6063-6067

Tomasz M., Lipman R., Chowdary D., Pawlak J., Verdine G.L., Nakanishi K. (1987); Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between Mitomycin C and DNA; Science 235, 1204-1208

Tsutsui T., Maizumi H., McLachlan J.A., Barrett J.C. (1983); Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: a possible chromosomal mechanism in carcinogenesis; Cancer Res. 43, 3814-3821

Tucker R.W., Barrett J.C. (1986); Decreased numbers of of spindle and cytoplasmatic microtubules in hamster embryo cells treated with a carcinogen, diethylstilbestrol; Cancer Res. 46, 2088-2095

Uchida S., Sekiguchi T., Nishitani H., Miyauchi K., Ohtsubo M., Nishimoto T. (1990); Premature chromosome condensation is induced by a point mutation in the hamster RCC1 gene; Mol. Cell. Biol. 10, 577-584

Van Hooser A., Goodrich D.W., Allis C.D., Brinkley B.R., Mancini M.A. (1998); Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintance, of mammalian chromosome condensationj; J. Cell Sci. 111, 3497-3506

Vander Jagt D.L., Hunsaker L.A., Vander Jagt T.J., Gomez M.S., Gonzales D.M., Deck L.M., Royer R.E. (1997); Inactivation of glutathione reductase by hydroxynonenal and other endogeous aldehydes; Biochem. Pharmacol. 53, 1133-1140

Vaughan V.L., Hansen D., Stadler J. (1976); Parameters of polyethylene glycol-induced cell fusion and hybridization in lymphoid cell lines; Somatic Cell Genetics 2, 537-544

Verma R.S., Babu A. (1989); Human Chromosomes – Manual of Basic Techniques; Pergamon Press, Inc.

Vig B.K. (1994); Do specific nucleotide bases constitute the centromere?; Mutation Res. 309, 1-10

Vig B.K., Lewis R. (1978); Genetic toxicology of bleomycin; Mutation Res. 55, 121-145

Vyas R.C., Darroudi F., Natarajan A.T. (1991); Radiation-induced chromosomal breakage and rejoining in interphase-metaphase chromosomes of human lymphocytes; Mutation Res. 249, 29-35

Waldren C.A., Johnson R.T. (1974); Analysis of interphase chromosome damage by means of premature chromosome condensation after X- and ultraviolet-irradiation; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 1137-1141

Wang Y., Iliakis G. (1992); Effects of 5´-iododeoxyuridine on the repair of radiation induced potentially lethal damage interphase chromatin breaks and DNA double strand breaks in Chinese hamster ovary cells; Int. J. Radiat. Oncology Biol. Phys. 23, 353-360

Watanabe M., Takabe Y., Katsumata T., Terasima T. (1974); Effects of bleomycin on progression through the cell cycle of mouse L-cells; Cancer Res. 34, 878-881

Watson K., Edwards R.J., Shaunak S., Parmelee D.C., Sarraf C., Gooderham N.J., Davies D.S. (1995); Extra-nuclear location of histones in activated human peripheral blood lymphocytes and cultured T-cells; Biochem. Pharmacol. 50, 299-309

Wilson V.L., Foiles P.G., Chung F.-L., Povey A.C., Frank A.A., Harris C.C. (1991); Detection of acrolein and crotonaldehyde DNA adducts in cultured human cells and canine peripheral blood lymphocytes by ^{32}P-postlabeling and nucleotide chromatography; Carcinogenesis 12, 1483-1490

Witz G. (1989); Biological interactions of α,β-unsaturated aldehydes; Free Radic. Biol. Med. 7, 333-349

Wolff S. (1972); The repair of x-ray-induced chromosome aberrations in stimulated and unstimulated human lymphocytes; Mutation Res. 15, 435-444

Wolff S. (1982); Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and lesions that produce them. In: Wolff S. (Ed.); Sister Chromatid Exchange; Wiley, New York, 41-57

Wu R.S., Panusz H.T., Hatch C.L., Bonner W.M. (1986); Histones and their modifications; CRC Crit. Rev. Biochem. 20, 201-263

Wyllie A.H. (1993); Apoptosis (The 1992 Frank Rose Memorial Lecture); B. J. Cancer 67, 05-208

Yager J.D., Liehr J.G. (1996); Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis; Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 36, 203-232

Yamashita K., Yasuda H., Pines J., Yasumoto K., Nishitani H., Ohtsubo M., Hunter T., Sugimura T., Nishimoto T. (1990); Okadaic acid, a potent inhibitor of type 1 and type 2A protein phosphatases, activates cdc2/H1 kinase and transiently induces a premature mitosis-like state in BHK21 cells; EMBO J. 9, 4331-4338

Yanishevsky R., Carrano A.V. (1975); Prematurely condensed chromosomes of dividing and non-dividing cells in aging human cell cultures; Exp. Cell Res. 90, 169-174

Ye X.S., Xu G., Pu R.T., Fincher R.R., McGuire S.L., Osmani A.H., Osmani S.A. (1995); The NIMA protein kinase is hyperphosphorylated and activated downstream of p34^{cdc}2/cyclin B: Coordination with two mitosis promoting kinases; EMBO J. 14, 986-994

Yew, Johnson R.T. (1979); Ultraviolet-induced DNA excision repair in human B and T lymphocytes; II. Effects of inhibitors and DNA precursors; Biocem. Biophys. Acta 562, 240-251

You J., Bird R.C. (1995); Selective induction of cell cycle regulatory genes cdk1 (p34cdc2), cyclins A/B, and the tumor suppressor gene Rb in transformed cells by okadaic acid; J. Cell. Physiol. 164: 424-433

Yoshida M., Usui T., Tsujimura K., Inagaki M., Beppu T., Horinouchi S. (1997); Biochemical differences between staurosporine-induced apopotosis and premature mitosis; Exp. Cell Res. 232, 225-239

Yoshida S., Yamada M., Masaki S. (1977); Inhibition of DNA polymerase-α and –β of calf thymus by 1-β-D-arabinofuranosylcytosine-5`-triphosphate; Biochim. Biophys. Acta 477, 144-150

Zimmermann U., Vienken J. (1982); Electric field-induced cell-to-cell fusion; J. Membrane Biol. 67, 165-182

Zhang S., Zhang S.Y. Wang Y.F., Ma X. (1988); Study of different phases in growth cycle of human bone marrow cells and their growth speed, using rat-human cell hybridization, premature chromosome condensation, and sister chromatid differentiation; Exp. Hematol. 16, 221-225

Zschörnig O., Arnold K., Ohki S. (1993); Effect of glycosaminoglycans and PEG on fusion of Sendai virus with phosphatidylserine vesicles; Biochim. Biophys. Acta 1148, 1-6

8 TABELLENTEIL

Behandlung	Anzahl untersuchter Metaphasen	Gaps		Aberrante Metaphasen	Aberrationen insgesamt	Chromatidtyp-Aberration		Chromosomentyp-Aberration		Metaphasen mit				Dauer (h)
		chtg	chrg	(ohne Gaps)	(ohne Gaps)	chtb	chte	chrb	chre	1 Bruch	2 Brüchen	3 Brüchen	>3 Brüchen	
	[N]	[% von N]		[% von N]	[% von N]	[% von N]		[% von N]		[% von N]				
K	104	4,8	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	48
CA; 60 µM	103	1,9	0,0	6,8	6,8	4,9	0,0	1,9	0,0	6,8	0,0	0,0	0,0	
CA; 120 µM	104	10,6	1,0	4,8	4,8	3,8	0,0	1,0	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	
CA; 180 µM	105	5,7	1,0	6,7	6,7	5,7	0,0	1,0	0,0	6,7	0,0	0,0	0,0	
CA; 240 µM	109	9,2	2,8	10,1	10,1	9,2	0,0	0,9	0,0	10,1	0,0	0,0	0,0	
BLM; 5 µg/ml	102	7,8	0,0	5,9	5,9	5,9	0,0	0,0	0,0	5,9	0,0	0,0	0,0	
BLM; 10 µg/ml	102	6,9	4,9	8,8	8,8	5,9	1,0	1,0	1,0	6,9	0,0	0,0	0,0	
K	105	2,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	73
CA; 60 µM	103	7,8	1,0	1,9	1,9	1,0	0,0	1,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	
CA; 120 µM	102	9,8	0,0	1,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	
CA; 180 µM	98	10,2	1,0	2,0	2,0	1,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	
CA; 240 µM	107	6,5	0,0	5,6 *)	4,7	3,7	0,0	0,9	0,0	4,7	0,0	0,0	0,0	
CA; 300 µM	114	7,0	0,0	9,6	14,0	8,8	1,8	3,5	0,0	6,1	0,9	0,0	0,9	
CA; 360 µM	107	12,1	0,0	3,7	3,7	2,8	0,0	0,9	0,0	3,7	0,0	0,0	0,0	
CA; 480 µM	21	23,8	0,0	9,5	81,0	81,0	0,0	0,0	0,0	4,8	0,0	0,0	0,0	
BLM; 20 µg/ml	101	13,9	0,0	14,9	31,7	15,8	4,0	10,9	1,0	8,9	0,0	2,0	1,0	

Tab. 4.1 Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen in Lymphozyten aus 48h- und 73h-Vollblutkulturen nach Behandlung mit Crotonaldehyd
chtg = Chromatidgap, chrg = Chromosomengap, chtb = Chromatidbruch, chte = Chromatidaustausch, chrb = Chromosomenbruch, chre = Chromosomenaustausch, K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin
* hier wurde zusätzlich das Auftreten von Pulverisierungen in 2% der untersuchten Metaphasen beobachtet

Behandlung	Anzahl untersuchter Metaphasen	Gaps		Aberrante Metaphasen	Aberrationen insgesamt	Chromatidtyp-Aberration		Chromosomentyp-Aberration		Metaphasen mit			
		chtg	chrg	(ohne Gaps)	(ohne Gaps)	chtb	chte	chrb	chre	1 Bruch	2 Brüchen	3 Brüchen	>3 Brüchen
	[N]	[% von N]		[% von N]	[% von N]	[% von N]		[% von N]		[% von N]			
K	114	9,6	0,0	1,8	1,8	0,0	0,0	1,8	0,0	1,8	0,0	0,0	0,0
K+DMSO	106	7,5	0,9	0,9	0,9	0,9	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0
HX; 50 µM	102	8,8	2,9	5,9	6,9	4,9	0,0	2,0	0,0	4,9	1,0	0,0	0,0
HX; 100 µM	107	8,4	2,8	5,6	8,4	8,4	0,0	0,0	0,0	3,7	0,9	0,9	0,0
HX; 150 µM	102	5,9	2,0	7,8	8,8	7,8	0,0	1,0	0,0	6,9	1,0	0,0	0,0

Tab. 4.2 Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen nach *trans*-2-Hexenal-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle; Lymphozyten aus 48h-Vollblutkulturen.
chtg = Chromatidgap, chrg = Chromosomengap,
chtb = Chromatidbruch, chte = Chromatidaustausch,
chrb = Chromosomenbruch, chre = Chromosomenaustausch
K = Kontrolle, K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, HX = *trans*-2-Hexenal

Behandlung	Anzahl unter-suchter Zellen	(PCC<46)		Ungeschädigte Zellen (PCC=46)		Geschädigte Zellen (PCC>46)		Fragmentverteilung der geschädigten Zellen				Fragmente / ungeschädigte + geschädigte Zelle	Fragmente / geschädigte Zelle
								1-4	5-24	25-54	55-84		
	[N1]	[N2]	[% von N1]	[N3]	[% von N1]	[N4]	[% von N3+N4]	[% von N4]					
K	104	9	8,7	80	76,9	15	15,8	100,0	0,0	0,0	0,0	0,3	1,6
CA; 60 µM	103	7	6,8	73	70,9	23	24,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,4	1,9
CA; 120 µM	94	10	10,6	60	63,8	24	28,6	87,5	12,5	0,0	0,0	0,7	2,4
CA; 180 µM	122	9	7,4	57	46,7	56	49,6	71,4	28,6	0,0	0,0	1,5	3,1
CA; 240 µM	39	0	0,0	20	51,3	19	48,7	57,9	42,1	0,0	0,0	1,7	3,4
BLM; 10 µg/ml	102	0	0,0	13	12,7	89	87,3	15,7	78,7	5,6	0,0	9,3	10,6

Tab. 4.3 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen und Fragmentverteilung nach Crotonaldehyd- bzw. Bleomycin-Behandlung.
K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin

Behandlung	Anzahl unter-suchter Zellen	(PCC<46)		Ungeschädigte Zellen (PCC=46)		Geschädigte Zellen (PCC>46)		Fragmentverteilung der geschädigten Zellen				Fragmente / ungeschädigte + geschädigte Zelle	Fragmente / geschädigte Zelle
								1-4	5-24	25-54	55-84		
	[N1]	[N2]	[% von N1]	[N3]	[% von N1]	[N4]	[% von N3+N4]	[% von N4]					
K+DMSO	99	13	13,1	70	70,7	16	18,6	87,5	12,5	0,0	0,0	0,4	2,0
HX; 50 µM	98	4	4,1	59	60,2	35	37,2	80,0	20,0	0,0	0,0	1,0	2,8
HX; 100 µM	100	4	4,0	38	38,0	58	60,4	43,1	53,4	3,4	0,0	4,0	6,7
HX; 150 µM	87	3	3,4	48	55,2	36	42,9	72,2	25,0	2,8	0,0	2,0	4,6
BLM; 10 µg/ml	106	0	0,0	16	15,1	90	84,9	27,8	57,8	13,3	1,1	10,5	12,4

Tab. 4.4 Häufigkeit von geschädigten G_0-PCCs (PCC>46) und Fragmentverteilung nach *trans*-2-Hexenal- bzw. Bleomycin-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle. K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, HX =*trans*-2-Hexenal, BLM = Bleomycin

Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	PCC-Kategorie (in % der untersuchten Zellen)				PCC-Kategorie gemittelt
		1	2	3	4	
K	111	100,0	0,0	0,0	0,0	1,0
CA; 60 µM	104	99,0	0,0	1,0	0,0	1,0
CA; 120 µM	99	99,0	1,0	0,0	0,0	1,0
CA; 180 µM	127	96,9	0,0	1,6	1,6	1,1
CA; 240 µM	66	42,4	12,1	36,4	9,1	2,1
CA; 300 µM	134	39,6	24,6	26,9	9,0	2,1
BLM; 10 µg/ml	115	100,0	0,0	0,0	0,0	1,0
K	107	99,1	0,9	0,0	0,0	1,0
CA; 240 µM	107	23,4	35,5	34,6	6,5	2,3
CA; 360 µM	102	0,0	21,6	40,2	38,2	3,2
CA; 480 µM	108	0,9	12,0	31,5	55,6	3,4
BLM; 10 µg/ml	102	100,0	0,0	0,0	0,0	1,0

Tab. 4.5 Einteilung der G_0-PCCs nach Crotonaldehyd- bzw. Bleomycin-Behandlung in vier Kondensationsgrade im Vergleich zur Kontrolle (zwei Versuchsreihen). K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin

Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	PCC-Kategorie (in % der untersuchten Zellen)				PCC-Kategorie gemittelt
		1	2	3	4	
K	49	85,7	12,2	2,0	0,0	1,2
CA; 200 µM	48	31,3	18,8	27,1	22,9	2,4
CA; 300 µM	50	0,0	6,0	42,0	52,0	3,5
CA; 400 µM	50	0,0	4,0	8,0	88,0	3,8

Tab. 4.6 Einteilung der G_0-PCCs in vier Kondensationsgrade nach Crotonaldehyd-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsperson VP-1).
K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd

Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	PCC-Kategorie (in % der untersuchten Zellen)				PCC-Kategorie gemittelt
		1	2	3	4	
K	66	74,2	16,7	9,1	0,0	1,3
CA; 200 µM	53	7,5	35,8	43,4	13,2	2,6
CA; 300 µM	50	2,0	6,0	40,0	52,0	3,4
CA; 400 µM	58	0,0	3,4	8,6	87,9	3,8

Tab. 4.7 Einteilung der G_0-PCCs in vier Kondensationsgrade nach Crotonaldehyd-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (Versuchsperson VP-2).
K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd

Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	PCC-Kategorie (in % der untersuchten Zellen)				PCC-Kategorie gemittelt
		1	2	3	4	
K+DMSO	100	88,0	12,0	0,0	0,0	1,1
HX; 50 µM	104	76,9	18,3	3,8	1,0	1,3
HX; 100 µM	109	69,7	22,0	6,4	1,8	1,4
HX; 150 µM	120	43,3	30,8	25,0	0,8	1,8
HX; 300 µM	101	7,9	12,9	21,8	57,4	3,3
BLM; 10 µg/ml	106	91,5	8,5	0,0	0,0	1,1

Tab. 4.8 Verteilung der G_0-PCCs auf vier Kondensationsgrade nach Behandlung mit *trans*-2-Hexenal bzw. Bleomycin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, HX = *trans*-2-Hexenal, BLM = Bleomycin

Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	Zellzyklusphasen																	
		G_1				S					G_2					M			
		gesamt		Zellzyklus		gesamt		Zellzyklus			gesamt		Zellzyklus			gesamt		Zellzyklus		
		N	%	I/II	III^+	N	%	I	II	III^+	N	%	I	II	III^+	N	%	I	II	III^+
K	585	116	19,8	81,0	19,0	60	10,3	55,0	18,3	26,7	114	19,5	14,9	14,0	71,1	272	46,5	20,2	39,0	40,8
CA; 30 µM	343	82	23,9	92,7	7,3	20	5,8	90,0	5,0	5,0	38	11,1	47,4	13,2	39,5	194	56,6	33,5	38,7	27,8
CA; 60 µM	168	40	23,8	97,5	2,5	3	1,8	66,7	33,3	0,0	28	16,7	39,3	21,4	39,3	91	54,2	30,8	44,0	25,3
CA; 180 µM	124	38	30,6	92,1	7,9	2	1,6	100,0	0,0	0,0	27	21,8	44,4	48,1	7,4	50	40,3	40,0	36,0	24,0
CA; 240 µM	295	67	22,7	100,0	0,0	37	12,5	73,0	24,3	2,7	128	43,4	78,1	21,1	0,8	48	16,3	72,9	27,1	0,0
CA; 300 µM	146	50	34,2	100,0	0,0	10	6,8	40,0	40,0	20,0	44	30,1	75,0	25,0	0,0	41	28,1	43,9	56,1	0,0
BLM; 10 µg/ml	292	38	13,0	94,7	5,3	48	16,4	70,8	27,1	2,1	102	34,9	42,2	40,2	17,6	115	39,4	20,0	35,7	44,3

Tab. 4.9 Verteilung der Zellen - PCCs und Metaphasen – auf die Zellzyklusphasen (G_1, S, G_2) und Zellzyklen (I, II, III^+) nach Crotonaldehyd-Einfluß. K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin.

Behandlung	Chromosomentyp	Anzahl untersuchter Zellen	Zellen mit Aberrationen (ohne Gaps)	Aberrationen insgesamt (ohne Gaps)	Gaps	Brüche	Austausche
		N	[% von N]				
K	Mitose / Metaphase (1)	55	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
K	PCC / G2 (1)	17	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CA; 30 µM	Mitose / Metaphase (1)	65	3,1	3,1	0,0	1,5	1,5
CA; 30 µM	PCC / G2 (1)	18	0,0	0,0	5,6	0,0	0,0
CA; 60 µM	Mitose / Metaphase (1)	28	7,1	7,1	0,0	7,1	0,0
CA; 60 µM	PCC / G2 (1)	11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
CA; 180 µM	Mitose / Metaphase (1)	20	5,0	5,0	0,0	5,0	0,0
CA; 180 µM	PCC / G2 (1)	5	100,0	100,0	60,0	80,0	20,0
CA; 240 µM	Mitose / Metaphase (1)	35	17,1	17,1	0,0	14,3	2,9
CA; 240 µM	PCC / G2 (1)	90	38,9	33,3	4,4	22,2	11,1
CA; 300 µM	Mitose / Metaphase (1)	18	27,8	27,8	5,6	27,8	0,0
CA; 300 µM	PCC / G2 (1)	23	73,9	60,9	30,4	34,8	26,1
BLM; 10 µg/ml	Mitose / Metaphase (1)	22	13,6	13,6	0,0	13,6	0,0
BLM; 10 µg/ml	PCC / G2 (1)	22	118,2	113,6	27,3	95,5	18,2

Tab. 4.10 Häufigkeit von Aberrationen bei G_2-PCCs und Metaphasen nach Crotonaldehyd- bzw. Bleomycin- Behandlung beim Passieren des ersten Zellzyklus nach BrdU-Einbau. K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin.

Behandlung	Anzahl unter-suchter Zellen	(PCC<46)		Ungeschädigte Zellen (PCC=46)		Geschädigte Zellen (PCC>46)		Fragmentverteilung der geschädigten Zellen				Fragmente / ungeschädigte + geschädigte Zelle	Fragmente / geschädigte Zelle
								1-4	5-24	25-54	55-84		
	[N1]	[N2]	[% von N1]	[N3]	[% von N1]	[N4]	[% von N3+N4]	[% von N4]					
K	43	1	2,3	37	86,0	5	11,9	100,0	0,0	0,0	0,0	0,2	1,8
AraC; 100 µM	62	0	0,0	16	25,8	46	74,2	37,0	60,9	2,2	0,0	6,0	8,1
HU; 10 mM	54	0	0,0	16	29,6	38	70,4	63,2	36,8	0,0	0,0	3,1	4,4
AraC 100 µM HU 10 mM	50	1	2,0	16	32,0	33	67,3	39,4	54,5	6,1	0,0	4,9	7,3
NB; 1 mM	53	0	0,0	36	67,9	17	32,1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,5	1,5

Tab. 4.11 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46Chromatinelementen und Fragmentverteilung nach Behandlung mit AraC, HU, ARAC+HU und NB. K= Kontrolle; AraC = Arabinofuranosylcytosin, HU = Hydroxyharnstoff, NB =Novobiocin

Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	PCC-Kategorie (in % der untersuchten Zellen)				PCC-Kategorie gemittelt
		1	2	3	4	
K	33	76,9	23,1	0,0	0,0	1,1
CA; 300 µM	48	31,3	25,0	29,2	14,6	2,3
CA; 480 µM	48	4,2	16,7	27,1	52,1	3,3
AraC; 100 µM	62	96,8	3,2	0,0	0,0	1,0
HU; 10 mM	56	83,9	12,5	3,6	0,0	1,2
AraC; 100 µM + HU 10 mM	53	75,5	18,9	5,7	0,0	1,3
NB; 1 mM	55	87,3	10,9	1,8	0,0	1,1
CA; 300 µM GZ AraC/HU;	81	14,8	34,6	25,9	24,7	2,6
CA; 300 µM GZ NB	54	24,1	18,5	37,0	20,4	2,5
CA; 480 µM GZ AraC/HU	51	2,0	2,0	21,6	74,5	3,7
CA; 480 µM GZ NB	60	0,0	3,3	18,3	78,3	3,8
CA; 300 µM NI,90 SFM	51	15,7	37,3	33,3	13,7	2,5
CA; 480 µM NI,90 AraC/HU	71	2,8	4,2	21,1	71,8	3,6
CA; 480 µM NI,90 NB	50	0,0	4,0	16,0	80,0	3,8
CA; 480 µM NI,90 SFM	50	0,0	16,0	32,0	52,0	3,4
CA; 480 µM NI,180 AraC/HU	53	9,4	15,1	22,6	52,8	3,2
CA; 480 µM NI,180 SFM	55	3,6	18,2	34,5	43,6	3,2

Tab. 4.12 Verteilung der G_0-PCCs auf vier Kondensationsgrade nach Behandlung mit Crotonaldehyd und/oder den Reparaturhemmstoffen AraC, HU und NB. K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd, AraC = Arabinofuranosylcytosin, HU = Hydroxyharnstoff, NB = Novobiocin, SFM = serumfreies Medium, GZ= gleichzeitige Behandlung mit Crotonaldehyd und dem Reparaturhemmstoff, NI,90 = Nachinkubation von 90 Minuten, NI,180 = Nachinkubation von 180 Minuten

Behandlung	Chromosomen typ	Anzahl ausgemessener Chr. 4	Mittelwert $\bar{x}$ (± s)		gemessene Länge [µm] Minimum	Maximum
K	Metaphase	45	9,01	2,51	5,91	18,49
	G_0-PCC	12	4,23	1,19	2,41	5,77
CA; 240µM	G_0-PCC	55	7,57	2,28	2,05	14,41
CA; 480µM	G_0-PCC	24	10,74	2,80	3,17	15,01

Tab. 4.13 Übersicht über die unterschiedlichen PCC-Längen (Chromosom 4) in µm (Mittelwert, Minimum und Maximum) vor und nach Inkubation der Zellen mit Crotonaldehyd. Die PCC-Längen wurden durch Ausmessen von Hybridisierungssignalen für Chr. 4 nach FISH ermittelt. K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd

Behandlung	Chromosomen typ	Anzahl ausgemessener Chr. 4	PCC-Kategorie 02,05 µm < x < 06,16 µm	06,16 µm < x < 10,27 µm	10,27 µm < x < 14,38 µm	14,38 µm < x < 18,49 µm
K	Metaphase	45	4	30	10	1
	G_0-PCC	12	12	0	0	0
CA; 240µM	G_0-PCC	55	7	43	4	1
CA; 480µM	G_0-PCC	24	2	4	16	2

Tab. 4.14 Übersicht über die vier Kategorien der G_0PCC-Längen (Chromosom 4) vor und nach Inkubation der Zellen mit Crotonaldehyd. Längenmessung erfolgte durch Einsatz einer Painting-Sonde für Chromosom 4. K = Kontrolle, CA = Crotonaldehyd

Behandlung	Anzahl untersuchter Metaphasen	Gaps		Aberrante Metaphasen	Aberrationen insgesamt	Chromatidtyp-Aberration		Chromosomentyp-Aberration		Metaphasen mit				Dauer (h)
		chtg	chrg	(ohne Gaps)	(ohne Gaps)	chtb	chte	chrb	chre	1 Bruch	2 Brüchen	3 Brüchen	>3 Brüchen	
	[N]	[% von N]		[% von N]	[% von N]	[% von N]		[% von N]		[% von N]				
K	144	3,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	48
NDELA; 500 µM	98	2,0	0,0	2,0	2,0	1,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	
NDELA; 1000 µM	99	5,1	2,0	4,0	4,0	2,0	0,0	2,0	0,0	4,0	0,0	0,0	0,0	
NDELA; 1500 µM	102	2,0	0,0	2,0	2,0	1,0	0,0	1,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	
NDELA; 2000 µM	101	5,0	0,0	5,0	5,0	5,0	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	
NDELA; 2500 µM	106	8,5	0,0	1,9	1,9	0,0	0,0	1,9	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	
BLM; 10 µg/ml	102	8,8	3,9	7,8	8,8	5,9	1,0	2,0	0,0	4,9	1,0	0,0	0,0	
K	100	3,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	73
NDELA; 1000 µM	104	6,7	1,0	1,9	1,9	1,0	0,0	1,0	0,0	1,9	0,0	0,0	0,0	
NDELA; 1500 µM	103	2,9	0,0	1,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
NDELA; 2000 µM	103	2,9	0,0	1,9	1,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	

Tab. 4.15 Häufigkeiten struktureller Chromosomenaberrationen in Lymphozyten aus 48h- u. 73h-Vollblutkulturen nach NDELA- bzw. BLM-Einfluß im Vergleich zur Kontrolle.
chtg = Chromatidgap, chrg = Chromosomengap,
chtb = Chromatidbruch, chte = Chromatidaustausch,
chrb = Chromosomenbruch, chre = Chromosomenaustausch
K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin

Material	Behandlung	Anzahl unter-suchter Zellen	(PCC<46)		Ungeschädigte Zellen (PCC=46)		Geschädigte Zellen (PCC>46)		Fragmentverteilung der geschädigten Zellen				Fragmente / ungeschädigte + geschädigte Zelle	Fragmente / geschädigte Zelle
									1-4	5-24	25-54	55-84		
		[N1]	[N2]	[% von N1]	[N3]	[% von N1]	[N4]	[% von N3+N4]	[% von N4]					
Vollblut	K	107	6	5,6	88	82,2	13	12,9	100,0	0,0	0,0	0,0	0,2	1,5
	NDELA; 1000 µM	100	1	1,0	43	43,0	56	56,6	60,7	39,3	0,0	0,0	2,3	4,1
	NDELA; 1500 µM	103	2	1,9	35	34,0	66	65,3	66,7	33,3	0,0	0,0	2,7	4,1
	NDELA; 2000 µM	100	2	2,0	24	24,0	74	75,5	51,4	48,6	0,0	0,0	4,1	5,5
	BLM; 10 µg/ml	101	0	0,0	8	7,9	93	92,1	14,0	78,5	7,5	0,0	10,5	11,4
Isolierte Lymphozyten	K	98	8	8,2	86	87,8	4	4,4	100,0	0,0	0,0	0,0	0,1	2,0
	NDELA; 1000 µM	101	1	1,0	26	25,7	74	74,0	48,6	51,4	0,0	0,0	4,6	6,2
	NDELA; 1500 µM	102	2	2,0	58	56,9	42	42,0	66,7	33,3	0,0	0,0	1,6	3,8
	NDELA; 2000 µM	101	0	0,0	38	37,6	63	62,4	52,4	47,6	0,0	0,0	3,0	4,8
	BLM; 10 µg/ml	101	0	0,0	2	2,0	99	98,0	6,1	49,5	37,4	7,1	23,8	24,2

Tab. 4.16 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen und Fragmentverteilung nach Behandlung mit NDELA bzw. Bleomycin. Inkubation von Vollblut bzw. isolierten Lymphozyten. K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin

Material	Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	PCC-Kategorie (in % der untersuchten Zellen)				PCC-Kategorie gemittelt
			1	2	3	4	
Vollblut	K	107	100	0	0	0	1,0
	NDELA; 1000 µM	100	100	0	0	0	1,0
	NDELA; 1500 µM	103	100	0	0	0	1,0
	NDELA; 2000 µM	100	100	0	0	0	1,0
	BLM; 10 µg/ml	101	100	0	0	0	1,0
isolierte Lymphozyten	K	98	100	0	0	0	1,0
	NDELA; 1000 µM	101	100	0	0	0	1,0
	NDELA; 1500 µM	102	100	0	0	0	1,0
	NDELA; 2000 µM	101	100	0	0	0	1,0
	BLM; 10 µg/ml	101	100	0	0	0	1,0

Tab. 4.17 Einteilung der G_0-PCCs in vier PCC-Kategorien nach NDELA- bzw. Bleomycin-Behandlung. K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, BLM = Bleomycin

Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	Zellzyklusphasen																	
		G1				S					G2				M				
		gesamt		Zellzyklus		gesamt		Zellzyklus			gesamt		Zellzyklus		gesamt		Zellzyklus		
		N	%	I/II	III	N	%	I	II	III	N	%	I	II	III	N	%	I	II	III
K	194	34	17,5	58,8	41,2	24	12,4	16,7	8,3	75,0	44	22,7	4,5	6,8	88,6	75	38,7	16,0	28,0	56,0
NDELA; 1000 µM	122	37	30,3	51,4	48,6	24	19,7	8,3	0,0	91,7	35	28,7	11,4	14,3	74,3	23	18,9	17,4	26,1	56,5
NDELA; 1500 µM	247	53	21,5	58,5	41,5	41	16,6	7,3	4,9	87,8	41	16,6	2,4	17,1	80,5	90	36,4	14,4	21,1	64,4
NDELA; 2000 µM	259	53	20,5	54,7	45,3	17	6,6	5,9	5,9	88,2	79	30,5	7,6	27,8	64,6	93	35,9	15,1	33,3	51,6

Tab. 4.18 Verteilung der Zellen -PCCs und. Metaphasen- auf die Zellzyklusphasen (G_1, S, G_2) und. Zellzyklen (I, II, III^+) nach Behandlung mit NDELA
K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin

Behandlung	Chromosomentyp	Anzahl untersuchter Zellen	Zellen mit Aberrationen (ohne Gaps)	Aberrationen insgesamt (ohne Gaps)	Gaps	Brüche	Austausche
		N	[% von N]				
K	Mitose / Metaphase (1)	11	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
K	PCC / G2 (1)	2	50,0	50,0	0,0	50,0	0,0
NDELA; 1000 µM	Mitose / Metaphase (1)	4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NDELA; 1000 µM	PCC / G2 (1)	4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NDELA; 1500 µM	Mitose / Metaphase (1)	13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NDELA; 1500 µM	PCC / G2 (1)	1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
NDELA; 2000 µM	Mitose / Metaphase (1)	13	0,0	0,0	15,4	0,0	0,0
NDELA; 2000 µM	PCC / G2 (1)	6	0,0	0,0	16,7	0,0	0,0

Tab. 4.19 Häufigkeit von Aberrationen in G_2-PCCs und Metaphasen im ersten Zellzyklus (unbehandelte Zellen und Zellen nach Inkubation mit N-Nitrosodiethanolamin). K = Kontrolle, NDELA = N-Nitrosodiethanolamin

Behandlung	Anzahl untersuchter Metaphasen	Gaps		Aberrante Metaphasen	Aberrationen insgesamt	Chromatidtyp-Aberration		Chromosomentyp-Aberration		Metaphasen mit			
		chtg	chrg	(ohne Gaps)	(ohne Gaps)	chtb	chte	chrb	chre	1 Bruch	2 Brüchen	3 Brüchen	>3 Brüchen
	[N]	[% von N]		[% von N]	[% von N]	[% von N]		[% von N]		[% von N]			
K	109	2,8	1,8	2,8	2,8	2,8	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0
MMC; 2 µM	103	2,9	0,0	14,6	14,6	4,9	1,0	6,8	1,9	11,7	0,0	0,0	0,0
MMC; 4 µM	106	6,6	0,0	14,2	20,8	9,4	1,9	9,4	0,0	10,4	1,9	0,9	0,0
MMC; 6 µM	102	17,6	12,7	27,5	49,0	18,6	2,9	26,5	1,0	5,9	7,8	1,0	0,0

Tab. 4.20 Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen unbehandelter Zellen und Mitomycin C-behandelter Zellen
chtg = Chromatidgap, chrg = Chromosomengap,
chtb = Chromatidbruch, chte = Chromatidaustausch
chrb = Chromosomenbruch, chre = Chromosomenaustausch
K = Kontrolle, MMC = Mitomycin C

Behandlung	Anzahl untersuchter Metaphasen	Gaps		Aberrante Metaphasen	Aberrationen insgesamt	Chromatidtyp-Aberration		Chromosomentyp-Aberration		Metaphasen mit			
		chtg	chrg			chtb	chte	chrb	chre	1 Bruch	2 Brüchen	3 Brüchen	>3 Brüchen
	[N]	[% von N]		[% von N]	[% von N]	[% von N]		[% von N]		[% von N]			
K	140	0,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
K+DMSO	67	4,5	0,0	3,0	3,0	3,0	0,0	0,0	0,0	3,0	0,0	0,0	0,0
DES; 20 µM	110	2,7	1,8	2,7	2,7	2,7	0,0	0,0	0,0	2,7	0,0	0,0	0,0
DES; 40 µM	108	3,7	0,0	5,6	5,6	3,7	0,0	1,9	0,0	5,6	0,0	0,0	0,0
DES; 60 µM	115	1,7	0,9	1,7	1,7	0,9	0,0	0,9	0,0	1,7	0,0	0,0	0,0
DES; 80 µM	116	0,9	0,0	3,4	3,4	2,6	0,0	0,9	0,0	3,4	0,0	0,0	0,0
DES; 100 µM	118	3,4	0,8	7,6	7,6	5,1	0,0	1,7	0,8	6,8	0,0	0,0	0,0

Tab. 4.21 Häufigkeit struktureller Chromosomenaberrationen nach Inkubation mit Diethylstilbestrol im Vergleich zur Kontrolle.
chtg = Chromatidgap, chrg = Chromosomengap,
chtb = Chromatidbruch, chte = Chromatidaustausch,
chrb = Chromosomenbruch, chre = Chromosomenaustausch
K = Kontrolle; K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, DES = Diethylstilbestrol

Behandlung	Anzahl unter-suchter Zellen	(PCC<46)		Ungeschädigte Zellen (PCC=46)		Geschädigte Zellen (PCC>46)		Fragmentverteilung der geschädigten Zellen				Fragmente / ungeschädigte + geschädigte Zelle	Fragmente / geschädigte Zelle
								1-4	5-24	25-54	55-84		
	[N1]	[N2]	[% von N1]	[N3]	[% von N1]	[N4]	[% von N3+N4]	[% von N4]					
K	49	0	0,0	46	93,9	3	6,1	100,0	0,0	0,0	0,0	0,1	1,0
MMC; 4 µM	104	1	1,0	66	63,5	37	35,9	97,3	2,7	0,0	0,0	0,7	2,0
MMC; 10 µM	87	1	1,1	48	55,2	38	44,2	68,4	31,6	0,0	0,0	1,4	3,1
MMC; 20 µM	108	0	0,0	58	53,7	50	46,3	76,0	24,0	0,0	0,0	1,5	3,3

Tab. 4.22 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen und Fragmentverteilung nach Behandlung mit Mitomycin C. K = Kontrolle, MMC = Mitomycin C

Behandlung	Anzahl unter-suchter Zellen	nicht gewertet (PCC<46)		ungeschädigte Zellen (PCC=46)		Geschädigte Zellen (PCC>46)		Fragmentverteilung der geschädigten Zellen				Fragmente / ungeschädigte + geschädigte Zelle	Fragmente / geschädigte Zelle
								1-4	5-24	25-54	55-84		
	[N1]	[N2]	[% von N1]	[N3]	[% von N1]	[N4]	[% von N3+N4]	[% von N4]					
K+DMSO	102	2	2,0	88	86,3	12	12,0	100,0	0,0	0,0	0,0	0,2	1,8
DES; 50 µM	103	3	2,9	79	76,7	21	21,0	81,0	19,0	0,0	0,0	0,6	2,9
DES; 100 µM	99	2	2,0	66	66,7	31	32,0	93,5	6,5	0,0	0,0	0,8	2,4
DES; 200 µM	80	0	0,0	59	73,8	21	26,3	81,0	19,0	0,0	0,0	0,7	2,8

Tab. 4.23 Häufigkeit von G_0-PCCs mit mehr als 46 Chromatinelementen und Fragmentverteilung nach Behandlung mit Diethylstilbestrol.
K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, DES = Diethylstilbestrol

Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	PCC-Kategorie (in % der untersuchten Zellen)				PCC-Kategorie gemittelt
		1	2	3	4	
K	49	100,0	0,0	0,0	0,0	1,0
MMC; 4 µM	104	97,1	2,9	0,0	0,0	1,0
MMC; 10 µM	95	91,6	4,2	2,1	2,1	1,1
MMC; 20 µM	113	76,1	20,4	3,5	0,0	1,3

Tab. 4.24 Wirkung der Mitomycin C-Behandlung auf den Kondensationsgrad von G_0-PCCs im Vergleich zur Kontrolle. K = Kontrolle, MMC = Mitomycin C

Behandlung	Anzahl der untersuchten Zellen	PCC-Kategorie (in % der untersuchten Zellen)				PCC-Kategorie gemittelt
		1	2	3	4	
K+DMSO	102	94,1	5,9	0,0	0,0	1,1
DES; 50 µM	105	80,0	19,0	1,0	0,0	1,2
DES; 100 µM	104	90,4	9,6	0,0	0,0	1,1
DES; 200 µM	111	58,6	22,5	10,8	6,3	1,6

Tab. 4.25 Einteilung der G_0 PCCs in vier Kondensationsgrade nach Inkubation mit Mitomycin C im Vergleich zur Kontrolle. K+DMSO= Kontrolle mit Dimethylsulfoxid; DES = Diethylstilbestrol

Behandlung	geschädigte Zellen (in % untersuchter Zellen)	
	PCC	Metaphase
K	15,8	1,0
CA; 60 µM	24,0	6,8
CA; 120 µM	28,6	4,8
CA; 180 µM	49,6	6,7
CA; 240 µM	48,7	10,1
BLM; 10 µg/ml	87,3	8,8
K+DMSO	18,6	0,9
HX; 50 µM	37,2	5,9
HX; 100 µM	60,4	5,6
HX; 150 µM	42,9	7,8
K	12,9	0,0
NDELA; 1000 µM	56,6	4,0
NDELA; 1500 µM	65,3	2,0
NDELA; 2000 µM	75,5	5,0
BLM; 10 µg/ml	92,1	7,8
K	6,1	2,8
MMC; 4 µM	35,9	14,2
K+DMSO	12,0	3,0
DES; 100 µM	32,0	7,6

Tab. 4.26 Vergleich der Anzahl geschädigter G_0-PCCs (PCC mit mehr als 46 Chromatinelementen) und aberranter Metaphasen. K = Kontrolle, K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid, CA=Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin, HX = *trans*-2-Hexenal, NDELA=N-Nitrosodiethanolamin, MMC = Mitomycin C, DES = Diethylstilbestrol

	Behandlung	Zellen mit PCC>46 / untersuchte Zellen	Fragmente / untersuchte Zelle
Vollblut	K	0,2	0,3
	CA; 60 µM	0,2	0,4
	CA; 120 µM	0,3	0,7
	CA; 180 µM	0,5	1,5
	CA; 240 µM	0,5	1,7
	BLM; 10 µg/ml	0,9	9,3
	K+DMSO	0,2	0,4
	HX; 50 µM	0,4	1,0
	HX; 100 µM	0,6	4,0
	HX; 150 µM	0,4	2,0
	BLM; 10 µg/ml	0,8	10,5
	K	0,1	0,2
	NDELA; 1000 µM	0,6	2,3
	NDELA; 1500 µM	0,7	2,7
	NDELA; 2000 µM	0,8	4,1
	BLM; 10 µg/ml	0,9	10,5
isolierte Lymphozyten	K	0,0	0,1
	NDELA; 1000 µM	0,7	4,6
	NDELA; 1500 µM	0,4	1,6
	NDELA; 2000 µM	0,6	3,0
	BLM; 10 µg/ml	1,0	23,8
Vollblut	K+DMSO	0,1	0,2
	DES; 50 µM	0,2	0,6
	DES; 100 µM	0,3	0,8
	DES; 200 µM	0,3	0,7
	K	0,1	0,1
	MMC; 4 µM	0,4	0,7
	MMC; 10 µM	0,4	1,4
	MMC; 20 µM	0,5	1,5

Tab. 4.27 Vergleich zwischen der Anzahl geschädigter G_0-PCCs (Zellen mit mehr als 46 Chromatinelementen pro Anzahl untersuchter Zellen) und dem Ausmaß der Schädigung (Anzahl von Fragmenten pro untersuchte Zelle).
K = Kontrolle; K+DMSO = Kontrolle mit Dimethylsulfoxid;
CA = Crotonaldehyd, BLM = Bleomycin, HX = *trans*-2-Hexenal,
NDELA = N-Nitrosodiethanolamin, DES = Diethylstilbestrol,
MMC = Mitomycin C

LEBENSLAUF

Name	Eva Ritter
Geburtsdatum	15. März 1958
Geburtsort	Kaiserslautern
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	verheiratet; 1 Tochter

Bildungsgang:

1964 – 1967	Max-Schule in Kaiserslautern
1967 – 1976	Staatl. Alt- und Neusprachl.Gymnasium in Kaiserslautern
1976 – 1977	Friseurausbildung in Mannheim
1983	Abitur für Nichtschüler in Schifferstadt
1984 – 1991	Studium der Biologie an der Universität Kaiserslautern
1989 – 1991	Diplomarbeit in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik an der Universität Kaiserslautern
	Titel der Diplomarbeit: Die Auswirkung von Cokultivation auf zytogenetische Parameter der Ausgangskulturen
Januar 1991	Diplom in Biologie
Seit April 1991	Promotion in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik an der Universität Kaiserslautern