

**Gentoxizität und Zytotoxizität von Substanzen, die das Zytoskelett
beeinflussen (Blei, Quecksilber, Nitrobenzol, Benzonitril)**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

**zur
Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

vorgelegt von

Daniela Bonacker

aus Dortmund

Dortmund 2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Wunderlich

2. Gutachter: Prof. Dr. H. Greven

3. Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt

Tag der mündlichen Prüfung: 28.06.04

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorgelegte Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch keiner anderen Institution eingereicht .

Daniela Bonacker

Danksagung

Herrn Prof. Dr. F. Wunderlich, der die Betreuung meiner Arbeit innerhalb der Fakultät für Biologie der Heinrich Heine Universität Düsseldorf übernahm, möchte ich hiermit meinen Dank aussprechen.

Herrn Prof. Dr. H. Greven danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Besonders herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. H. M. Bolt dafür, daß mir am Institut für Arbeitsphysiologie die Möglichkeit gegeben wurde, meine Dissertation anzufertigen. Herr Prof. Bolt gab mir im Verlaufe der Promotionszeit viele wertvolle Anregungen und stand mir für Fragen jederzeit hilfreich zur Seite.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. G. H. Degen für lehrreiche Diskussionen und rege Anteilnahme an der vorliegenden Arbeit in Form vieler guter Ratschläge.

Den Doktoranden und ehemaligen Doktoranden des IfADo bin ich für hilfreiche Diskussionen aber auch für nette Stunden außerhalb des Institutes dankbar. Insbesondere sei hier Christina Köhler mit ihrer fröhlichen, positiven Art erwähnt, mit der ich mir im Institut ein Zimmer teile.

Danken möchte ich auch allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Arbeitsphysiologie für die freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

In der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. G. Speit in Ulm, durfte ich seiner Zeit in sehr netter Atmosphäre den Mikronukleus-Test lernen.

Dem europäischen Verband der Chemie-Industrie (CEFIC) danke ich für die Bereitstellung finanzieller Mittel zur Durchführung experimenteller Arbeiten.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich zu jeder Zeit sehr wertvoll unterstützt, mit großer Ausdauer Korrektur gelesen und zusammen mit meiner Schwester Regine zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Nicht zuletzt möchte ich Ingo für sein stetes Verständnis und seinen Zuspruch zu dieser Arbeit danken.

Dortmund 2004

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Gentoxizität und Zytotoxizität ausgewählter Substanzen sowie deren Beeinflussung des Zytoskeletts zu gewinnen. Zytotoxische Effekte verschiedener Substanzen wurden zunächst im Rahmen des Neutralrottests an V79-Zellen abgeklärt, und im Anschluß daran wurden Wirkmechanismen der chromosomalen Gentoxizität mit Hilfe des Mikronukleus-Tests und der CREST-Analyse in nicht zytotoxischen Konzentrationen untersucht. Als Modellsubstanzen der vorliegenden Arbeit dienten anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen sowie die organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzonitril. Mikrokern-Untersuchungen in Anlehnung an eine Publikation von *Schultz und Önfelt 2000* sollten weiteren Einblick in den Wirkmechanismus der Mikronukleusinduktion durch organische Verbindungen geben. In der Publikation von *Schultz und Önfelt* wird für viele organische Verbindungen ein linearer Zusammenhang angenommen zwischen dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser und dem negativen Logarithmus der Konzentration, für die eine Verdopplung der Spontanrate binukleärer Zellen vorliegt. Es könne eine Aussage gemacht werden, ob ein spezifischer Wirkungsmechanismus einer Substanz vorläge, oder der Befund aufgrund unspezifischer, hydrophober Wechselwirkungen entstanden sei. Es war zu prüfen, wie sich die organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzonitril in diesen Zusammenhang einordnen ließen.

Bleichlorid und Bleiacetat induzieren in V79-Zellen in nicht zytotoxischen Konzentrationen konzentrationsabhängig Mikronuklei. Erhöhte Mikronukleus-Raten finden sich ab 1,1 μM Bleichlorid bzw. 0,05 μM Bleiacetat. Die Daten zur Induktion von Mikronuklei ähneln den Ergebnissen einer Studie über bleiexponierte Arbeiter, bei denen erhöhte Mikronukleus-Raten ab 1,2 μM Pb (II) gefunden wurden. Die CREST-Analysen sprechen für einen aneugenen Wirkungsmechanismus von Pb (II) und der Entstehung von durch Blei induzierten Mikrokernen scheint eine Beeinflussung des Zytoskeletts zugrunde zu liegen.

Quecksilberchlorid und Quecksilbernitrat induzieren ebenfalls konzentrationsabhängig Mikrokern, eine Erhöhung der Mikronukleus-Rate ist ab 0,03 μM Hg (II) zu verzeichnen. Die CREST-Analysen sprechen für einen gemischten Entstehungsmodus der durch HgCl_2 induzierten Mikronuklei. Die Mikronuklei entstehen teils durch klastogene und teils durch aneugene Wirkung, was nicht im Widerspruch zur Literatur steht. Auch an der Induktion von Mikrokernen durch Hg (II) scheint eine Interaktion mit Zytoskelettproteinen beteiligt zu sein.

Nitrobenzol und Benzonitril induzieren in V79-Zellen in Konzentrationen über 0,01 μM konzentrationsabhängig Mikronuklei. Im Rahmen der CREST-Analysen zeigen sich aneugene Wirkweisen für Nitrobenzol und Benzonitril. Aufgrund der vorliegenden Literaturdaten scheint allerdings das Zytoskelettprotein Tubulin nicht an der Entstehung der Mikronuklei durch Nitrobenzol und Benzonitril beteiligt zu sein.

Die Konzentrationen für die Verdopplungen der MN-Spontanraten für Nitrobenzol und Benzonitril liegen ebenso wie die Referenzsubstanzen MMS und VCR jeweils mindestens drei Zehnerpotenzen oberhalb der nach der Geraden aus *Schultz und Önfelt* zu erwartenden Werte für den Einfluß hydrophober Wechselwirkungen. Dies bestätigt die aus der Literatur bekannten spezifischen Wirkungsmechanismen von MMS und VCR und weist auf einen spezifischen Wirkmechanismus der Induktion von Mikronuklei durch Nitrobenzol und Benzonitril hin. Motorproteine wie beispielsweise das Dynein oder weitere proteinhaltige Strukturen könnten an der Mikrokerninduktion durch Nitrobenzol bzw. Benzonitril eine Rolle spielen.

Insgesamt gibt die vorliegende Arbeit näheren Einblick in die Wirkmechanismen chromosomaler Gentoxizität ausgewählter Substanzen sowie deren Beeinflussung des Zytoskeletts.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1. Einleitung	8
1.1. Das Zytoskelett	11
1.1.1. Mikrotubuli (MT)	11
1.1.1.1. Funktionen der Mikrotubuli	12
1.1.1.2. MT-Polymerisation	12
1.1.1.3. Stoffe, die auf das Tubulin eine Wirkung ausüben	14
1.1.1.3.1. Taxol	14
1.1.1.3.2. Vinkristin (VCR)	15
1.1.1.3.3. Methylmethansulfonat (MMS)	15
1.1.1.4. Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP's)	16
1.1.1.4.1. Kinesin	16
1.2. Zellzyklus	17
1.2.1. Ablauf der Mitose/Mikrotubuli während der Zellteilung	18
1.2.1.1. Zentromer/Kinetochor	19
1.2.1.2. Kontrollmechanismen des Zellzyklus	21
1.2.1.2.1. Restriktionspunkt (G ₁ -Phase-Kontrollpunkt)	21
1.2.1.2.2. S-Phase-Kontrollpunkt	21
1.2.1.2.3. G ₂ -Phase-Kontrollpunkt	22
1.2.1.2.4. Spindelkontrollpunkt (M-Phase-Kontrollpunkt)	22
1.3. Mikronuklei und Mikronukleus-Test	22
1.4. CREST-Analyse	25
1.5. V79-Zellen	25
1.6. Bleiverbindungen	26
1.6.1. Anorganische Bleiverbindungen in verschiedenen Testsystemen	27
1.7. Quecksilberverbindungen	29
1.7.1. Anorganische Quecksilberverbindungen in verschiedenen Testsystemen	29
1.8. Organische Verbindungen	31
1.8.1. Nitrobenzol	32
1.8.1.1. Gentoxische Wirkung von Nitrobenzol in verschiedenen Testsystemen	32
1.8.1.2. Krebs erzeugende Wirkung von Nitrobenzol	33
1.8.2. Benzonitril	34
1.8.2.1. Gentoxische Wirkung von Benzonitril in verschiedenen Testsystemen	34
1.9. Alkohole	35
1.9.1. Butanol	35
1.9.2. Hexanol	36
1.9.3. Die These von Schultz und Önfelt	36
1.10. Ziele der vorliegenden Arbeit	38
2. Material und Methoden	40
2.1. Reagenzien	40
2.2. Verwendete Antikörper	41
2.3. Geräte und Verbrauchsmaterial	41
2.3.1. Weitere Verbrauchsmaterialien	42
2.4. Lösungen, Puffer	42
2.4.1. Zellkultur	42

2.4.2. MN-Test	42
2.4.3. NR-Test	42
2.4.4. BCA-Test	43
2.4.5. CREST-Analyse	43
2.4.6. DAPI-Test	43
2.5. Zellkultur	44
2.5.1. Verwendete Zellen: V79-Zelllinie	44
2.5.2. Passagieren der Zellen	44
2.5.3. Bestimmung der Lebendzellzahl	44
2.5.4. Einfrieren der Zellen	45
2.6. Testmethoden	45
2.6.1. Zytotoxizitätstest mit Neutralrot	45
2.6.1.1. Einleitung und Prinzip	45
2.6.1.2. Durchführung	46
2.6.1.3. Auswertung	47
2.6.2. Proteinbestimmung mit Hilfe des BCA-Tests	48
2.6.2.1. Durchführung	48
2.6.2.2. Auswertung	48
2.6.3. Mikronukleus-Test an V79-Zellen	49
2.6.3.1. Durchführung	49
2.6.3.2. Verwendete Substanzen und zugehörige Endkonzentrationen	49
2.6.3.3. MN-Aufarbeitung	50
2.6.3.4. Auftragen der Zellen auf Objektträger und Anfärbung	50
2.6.3.5. Auswertung	50
2.6.4. CREST-Analyse	53
2.6.4.1. Durchführung	53
2.6.4.2. Auswertung	53
2.6.4.3. Verwendete Substanzen und zugehörige Endkonzentrationen	54
2.6.5. DAPI-Test auf Mycoplasmen	54
2.6.5.1. Testprinzip	54
2.6.5.2. Durchführung und Auswertung	55
3. Ergebnisse	56
3.1. Positivkontrollen	56
3.1.1. MMS	56
3.1.1.1. Mikrokerninduktion	56
3.1.1.2. CREST-Analysen	57
3.1.2. Vinkristin (VCR)	58
3.1.2.1. Mikrokerninduktion	58
3.1.2.2. CREST-Analysen	59
3.2. Lösemittelkontrolle	60
3.2.1. DMSO	60
3.2.1.1. Zytotoxizitätstest	60
3.2.1.2. BCA-Test	61
3.2.1.3. Mikrokerninduktion	62
3.2.1.4. CREST-Analysen	63
3.3. Schwermetalle:	64
3.3.1. Anorganische Bleiverbindungen	64
3.3.1.1. Bleichlorid	64
3.3.1.1.1. Zytotoxizitätstest	64
3.3.1.1.2. Proteinbestimmung (BCA-Test)	64
3.3.1.1.3. Mikrokerninduktion	65
3.3.1.1.4. CREST-Analysen	66
3.3.1.2. Bleiacetat	67
3.3.1.2.1. Zytotoxizitätstest	67
3.3.1.2.2. BCA-Test	67
3.3.1.2.3. Mikrokerninduktion	68

3.3.1.2.4. CREST-Analysen	69
3.3.1.3. Gegenüberstellung und Zusammenfassung aller Ergebnisse für Bleichlorid und Bleiacetat	69
3.3.2. Anorganische Quecksilberverbindungen	70
3.3.2.1. Quecksilberchlorid	70
3.3.2.1.1. Zytotoxizitätstest	70
3.3.2.1.2. BCA-Test	71
3.3.2.1.3. Mikrokerninduktion	72
3.3.2.1.4. CREST-Analysen	73
3.3.2.2. Quecksilbernitrat	73
3.3.2.2.1. Mikrokerninduktion	73
3.3.2.3. Gegenüberstellung der MN-Induktion für Quecksilberchlorid und Quecksilbernitrat	75
3.3.3. Zusammenfassung: Ergebnisse für anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen	76
3.3.3.1. Anorganische Bleiverbindungen	76
3.3.3.2. Anorganische Quecksilberverbindungen	76
3.4. Organische Verbindungen	76
3.4.1. Acetamid	77
3.4.1.1. Zytotoxizitätstest	77
3.4.1.2. BCA-Test	77
3.4.2. Acetonitril	78
3.4.2.1. Zytotoxizitätstest	78
3.4.2.2. BCA-Test	78
3.4.3. Acrylamid	79
3.4.3.1. Zytotoxizitätstest	79
3.4.3.2. BCA-Test	79
3.4.4. Acrylnitril	80
3.4.4.1. Zytotoxizitätstest	80
3.4.4.2. BCA-Test	80
3.4.5. Nitrobenzol	81
3.4.5.1. Zytotoxizitätstest	81
3.4.5.2. BCA-Test	81
3.4.5.3. Mikrokerninduktion durch Nitrobenzol	82
3.4.5.4. CREST-Analysen	83
3.4.6. Benzonitril	84
3.4.6.1. Zytotoxizitätstest	84
3.4.6.2. BCA-Test	85
3.4.6.3. Mikrokerninduktion	86
3.4.6.4. CREST-Analysen	87
3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse für Nitrobenzol und Benzonitril	87
3.6. Alkohole	88
3.6.1. Hexanol	88
3.6.1.1. Mikrokerninduktion	88
3.6.2. Butanol	88
3.6.2.1. Mikrokerninduktion	88
3.7. Vergleich: MN-Test/Induktion binukleärer Zellen	89
3.7.1. Hexanol	89
3.7.2. Butanol	90
3.7.3. Verdopplungen der MN-Spontanraten für MMS, VCR, NB und BN	91
3.7.3.1. MMS	91
3.7.3.2. VCR	91
3.7.3.3. Nitrobenzol	91
3.7.3.4. Benzonitril	91
3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse für Hexanol, Butanol, MMS, VCR, NB und BN	93
4. Diskussion	94
4.1. Anorganische Bleiverbindungen	95
4.2. Anorganische Quecksilberverbindungen	99

4.3. Nitrobenzol und Benzotrinitril	102
4.4. Untersuchungen in Anlehnung an die Publikation von Schultz und Önfelt (2000)	105
4.5. Schlußdiskussion	107
5. Literatur	109

Anhang

Abbildungsverzeichnis	4
------------------------------	----------

Abb. 1: Darstellung vom Mikrotubuli und Aktinfilamenten des Zytoskeletts einer humanen Lungenzelle	11
Abb. 2: Mikrotubulus-Aufbau	12
Abb. 3: Schematische Darstellung der Tubulinpolymerisation	13
Abb. 4: Tubulin -Assemblierung	14
Abb. 5: Die chemische Struktur von Taxol	14
Abb. 6: Die chemische Struktur von Vinkristin	15
Abb. 7: Die chemische Struktur von Methylmethansulfonat	15
Abb. 8: Schematische Darstellung des Kinesins	16
Abb. 9: Schematische Darstellung der Kinesin-Bewegung entlang eines MT	16
Abb. 10: Gliding Assay: Gleiten taxolstabilisierter MT über eine mit Kinesin überzogene Glasoberfläche	17
Abb. 11: Gliding Assay: Gleiten taxolstabilisierter MT (Videosequenz)	17
Abb. 12: Mikrotubulorganisation während der Zellteilung	19
Abb. 13: Mikrokern-Test mit Cytochalasin B	24
Abb. 14: V79-Zellen in Kulturmedium	26
Abb. 15: Schultz und Önfelt 2000	37
Abb. 16: Beispiel einer Plattenbelegung im Neutralrottest	47
Abb. 17: Induktion von Mikrokernen durch MMS (in V79-Zellen)	56
Abb. 18: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit 50 µg/ml MMS (V79-Zellen)	57
Abb. 19: CREST-Analyse: Durch MMS induzierte MN	68
Abb. 20: Typischer Mikronukleus nach Inkubation MMS	68
Abb. 21: Induktion von Mikrokernen in V79-Zellen durch VCR	59
Abb. 22: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit 5 nM VCR (V79-Zellen)	59
Abb. 23: MN-Induktion durch VCR	61
Abb. 24: Mikronukleus mit positivem Kinetochorbefund (Behandlung mit 10 nM VCR)	61
Abb. 25: Durch DMSO induzierte Neutralrottaufnahme in V79-Zellen	61
Abb. 26: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit DMSO	61
Abb. 27: Induktion von Mikrokernen durch DMSO (in V79-Zellen)	62
Abb. 28: Typische Mikronuklei nach Inkubation mit 0,04% DMSO (V79-Zellen)	63
Abb. 29: CREST-Analyse: Durch DMSO induzierte MN (V79-Zellen)	63
Abb. 30: NR-Test: Durch Bleichlorid induzierte Neutralrottaufnahme in V79-Zellen	64
Abb. 31: BCA-Test: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Bleichlorid	65
Abb. 32: MN-Test: Induktion von Mikrokernen durch Bleichlorid (in V79-Zellen)	65
Abb. 33: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit 0,1 µM Bleichlorid (V79-Zellen)	66
Abb. 34: CREST-Analyse: Durch Bleichlorid induzierte MN (V79-Zellen)	66
Abb. 35: Durch Bleiacetat induzierte Neutralrottaufnahme in V79-Zellen	67
Abb. 36: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Bleiacetat	67
Abb. 37: MN-Test: Induktion von Mikrokernen durch Bleiacetat (in V79-Zellen)	68
Abb. 38: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit 0,1 µM Bleiacetat (V79-Zellen)	68
Abb. 39: CREST-Analyse: Durch Bleiacetat induzierte MN (V79-Zellen)	69
Abb. 40: NR-Test: Durch Pb(II) induzierte Neutralrottaufnahme in V79-Zellen	70
Abb. 41: BCA-Test: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Pb(II)	70
Abb. 42: Gegenüberstellung: durch Bleichlorid und -acetat induzierte MN in V79-Zellen	71
Abb. 43: CREST-Analyse: Aneugene Wirkweise durch PbCl ₂ oder Pb(OAc) ₂	71
Abb. 44: Durch Quecksilberchlorid induzierte Neutralrottaufnahme in V79-Zellen	71
Abb. 45: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Quecksilberchlorid	71
Abb. 46: Induktion von Mikrokernen durch Quecksilberchlorid (in V79-Zellen)	72
Abb. 47 (a, b): Typische Mikronuklei nach Inkubation mit 0,05 µM Quecksilberchlorid (V79-Zellen)	72

Abb. 48: CREST-Analyse: Durch Quecksilberchlorid induzierte MN (V79-Zellen)	73
Abb. 49: Induktion von Mikrokernen durch Quecksibernitrat (V79-Zellen)	74
Abb. 50 (a, b): Typische Mikronuklei nach Inkubation mit Quecksilbernitrat (V79-Zellen)	74
Abb. 51: Induktion von Mikrokernen durch Quecksilberchlorid und Quecksibernitrat (V79-Zellen)	75
Abb. 52: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Acetamid	77
Abb. 53: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Acetamid	77
Abb. 54: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Acetonitril	78
Abb. 55: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Acetonitril	78
Abb. 56: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Acrylamid	79
Abb. 57: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Acrylamid	79
Abb. 58: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Acrylnitril	80
Abb. 59: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Acrylnitril	80
Abb. 60: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Nitrobenzol	81
Abb. 61: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Nitrobenzol	82
Abb. 62: MN-Induktion in V79-Zellen durch Nitrobenzol	83
Abb. 63: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit 0,1 μ M Nitrobenzol (V79-Zellen)	83
Abb. 64: CREST-Analyse: Nitrobenzol	84
Abb. 65: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Benzonitril	85
Abb. 66: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Benzonitril	85
Abb. 67: MN-Induktion in V79-Zellen durch Benzonitril (in V79-Zellen)	86
Abb. 68 a, b: Mikronuklei nach Inkubation mit 0,1 μ M Benzonitril (V79-Zellen)	86
Abb. 69: CREST-Analyse: Benzonitril	87
Abb. 70: Induktion von Mikronuklei durch Hexanol (in V79-Zellen)	88
Abb. 71: Induktion von Mikronuklei durch Butanol (in V79-Zellen)	89
Abb. 72: Zusammenhang log P und -log C	92

Tabellenverzeichnis 5

Tabelle 1: Zusammenfassung: Blei- und Quecksilberverbindungen in zellulären und zellfreien Tests	76
Tabelle 2: Zusammenfassung: Nitrobenzol und Benzonitril in zellulären und zellfreien Tests	87
Tabelle 3: MN-Induktion durch Hexanol	90
Tabelle 4: MN-Induktion durch Butanol	91
Tabelle 5: Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser und Konzentrationen, bei denen eine Verdopplung der MN-Spontanzrate vorliegt.	92

Abkürzungsverzeichnis

A.	Anhang
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata
AK	Antikörper
APC	Adenomatous polyposis coli
AS	Aminosäuren
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintri-phosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BIN	Binucleated cells
BN	Benzonitril
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Bsp.	Beispiel
C	s. log C
CA	Chromosomenaberration
ca.	circa
C-Anaphase	Colchizin-Anaphase
Ca ²⁺	Calcium
CdK	Cyclin dependent kinase, zyklusabhängige Kinase
cDNA	komplementäre DNA
CENP-C	Zentromer-Protein C
CENP-E	Zentromer-Protein E
CHL-Zellen	Lungen-Zellen eines chinesischen Hamsters
CHO-Zellen	Ovariale Zellen eines chinesischen Hamsters
CLIP-170	Cytoplasmic Linker Protein
cm	Zentimeter
C-Mitose	Colchizin-Mitose
CO ₂	Kohlendioxid
CREST	Calcinosis, Raynaud phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly and Telangiectasia
Cu ²⁺	Kupfer
Cyt B	Cytochalasin B
D	Deutschland
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EB1	End-binding Protein 1
EDTA	Ethylen Diamin Tetra Acetat
EU	Europäische Union
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (m/s ²)
G ₀ -Phase	Ruhephase, Zellen teilen sich nicht mehr
G ₁ -Phase	Wachstumsphase 1 (G=gap, Lücke)

G ₂ -Phase	Wachstumsphase 2 (G=gap, Lücke)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosin 5' triphosphat
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
Hela-Zellen	Hellen Lang-Zellen, humane Zellen
Hg	Quecksilber
HgCl ₂	Quecksilberchlorid
Hg(NO ₃) ₂	Quecksilbernitrat
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC ₅₀	Konzentration, bei der 50% der Zellen intakt sind
Ig	Immunglobulin
IMB	Institut für molekulare Biotechnologie
K0	Kontrolle
KG	Körpergewicht
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
Kin I	Kinesin I: Motorprotein des Kinetochors
k.w.A.	keine weitere/n Angabe/n
L	Liter
LIS1	Lissencephaly-1 Protein
log	Logarithmus
log C	Logarithmus der Konzentration, bei der eine Verdopplung der MN-Spontanrate vorliegt
log P	Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser
M	molar
m	Meter
MAK	Maximale Arbeitsplatz-Konzentration
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MCAK	Mitotic Centromere-associated Kinesin
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesium
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mg(NO ₃) ₂	Magnesiumnitrat
ml/mL	Milliliter
mM	millimolar
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
MMS	Methylmethansulfonat
MN	Mikrokern/Mikrokerne (Mikronuklei/Mikronukleus)
MN-Test	Mikrokerntest/Mikronukleustest
M-Phase	Mitosephase
MT	Mikrotubulus/Mikrotubuli
MTOC	Mikrotubuli-Organisationszentrum
MTP	Mikrotubuli-Protein
MW	Mittelwert
n.a.	nicht auswertbar
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O	Dinatriumhydrogenphosphat 2-Hydrat
NaN ₃	Sodiumazid

NB	Nitrobenzol
nm	Nanometer
NOAEL	no-observed-adverse-effect-level
NOEC	no-observed-effect-concentration
NR	Neutralrot
o. Abb.	ohne Abbildung
OT	Objekträger
o.w.A.	ohne weitere Angabe/n
P	Zell-Passage
PBS	phosphatgepufferte Lösung
Pb	Blei
PbCl ₂	Bleichlorid
Pb(NO ₃) ₂	Bleinitrat
Pb(OAc) ₂	Bleiacetat
PKC	Proteinkinase C
PSS	Progressive systemische Sklerodomie
R	Reihe
Rod	Rough Deal
RT	Raumtemperatur
S9-Mix	Proteinfraction aus der Leber
SCE	Schwesterchromatidaustausch
SH-Gruppe	Sulfhydrylgruppe
S-Phase	Synthesephase
s	Sekunde
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
Stdabw.	Standardabweichung
s.u.	siehe unten
TA	Tubulinassemblierung
TAA	Tubulin Assembly Assay
Tab.	Tabelle
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
UV	Ultraviolettes Licht
V79-Zellen	Zelllinie eines chinesischen Hamsters
VCR	Vinkristin
vgl.	vergleiche
vs	versus
XKCM	Xenopus Kinesin catastrophe modulator
z.B.	zum Beispiel
ZK	Zellkern
z.T.	zum Teil
ZW10	Zeste White 10

1. Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurden anorganische und organische Verbindungen im Hinblick auf deren Gentoxizität und Zytotoxizität auf dem Hintergrund ihrer möglichen Beeinflussung des Zytoskeletts untersucht.

Zytoskelettproteine sind in eukaryotischen Zellen in Bewegungsprozesse und Zellteilung involviert (*Howard et al. 2001*). Mögliche Folgen einer Beeinflussung des Zytoskeletts können gentoxische Schäden auf chromosomaler Ebene sein, die sich beispielsweise in einer erhöhten Mikronukleus-Rate oder in Aneuploidie beobachten lassen. Der Mechanismus, der auf chromosomaler Ebene zu Aneuploidie führt, ist von zentralem Interesse (*Decordier 2002, Kirsch-Volders et al. 2003, Thier et al. 2003*). Mikrokerne dienen als Maß der chromosomalen Schädigung durch eine chemischen Substanz. Es wird unterschieden zwischen Aneugenen und Klastogenen. Klastogene führen zu Bruchstücken von Chromosomen oder Chromatiden, während Aneugene (Spindelgifte) den Spindelapparat schädigen und zu Fehlverteilungen von Chromosomen führen können. Aneugene Wirkweisen stehen in Zusammenhang mit intrazellulären Schäden der mitotischen Spindel, des Kinetochors oder des Zentromers, die in die Mitose involviert sind (*Saunders et al. 2000, Fenech M 2000*). Mikrotubuli sind an der Bildung der Mitosespindel sowie der Bewegung der Chromosomen in der Kernspindel beteiligt. Schädigungen von Zytoskelettproteinen können zu fehlerhaftem Ablauf der Chromosomen-Organisation während der Zellteilung führen. Die mitotische Spindel zeigt deutliche Beeinflussung nach Behandlung mit aneugenen Substanzen (*Kochendörfer et al. 1996*) und scheint ein geeignetes System zur Detektion aneugener Chemikalien zu sein.

Zahlreiche Studien sehen einen direkten Zusammenhang zwischen Veränderungen an Chromosomen und der Entstehung von Krebs (*Richards 2001, Hanahan et al. 2000*). Genomische Instabilität auf chromosomalem Level ist ein Merkmal humaner Tumoren, erscheint früh in der Tumorgenese und führt zur Entstehung von Aneuploidie (*Lengauer et al. 1998*). Aneuploidie scheint bei der Entstehung humaner Tumoren bzw. der Entstehung verschiedener Krankheiten eine große Rolle zu spielen (*Duesberg und Rasnick 2000, Cavenee et al. 1991*). Chromosomale Aberrationen sind an verschiedenen menschlichen Tumoren und Erbkrankheiten beteiligt (*Würgeler et al. 1993*). Auch Studien an Nagern zeigen, daß die Exposition verschiedener Chemikalien zur Induktion von Aneuploidie beitragen kann (*Haesen. et al. 1993, Oshimura und Barret 1986*).

Genetische Veränderungen, die im Rahmen des Mikronukleus-Tests detektiert werden können, sind möglicherweise frühe Effekte der Karzinogenese. Ein Bezug zwischen der Mikronukleus-Frequenz und dem Risiko an Krebs zu erkranken, wurde in Studien über strukturelle Chromosomen Aberrationen und Aneuploidie hergestellt (*Bonassi et al. 2001*). In Tumorzellen wurden chromosomale Fehlverteilungen (z.B. detektiert als Mikrokerne) als Konsequenz genomischer Instabilität gesehen (*Tutt et al. 1999, Hagmar et al. 1998*) und bei vielen Krebsformen wird auf chromosomaler Ebene Instabilität beobachtet, die zum Verlust oder Zugewinn ganzer Chromosomen führt (*Lengauer et al. 1998*). Einige in Krebszellen

beobachtete chromosomale Instabilitäten könnten das Ergebnis von Zytoskelettschädigungen sein (Saunders *et al.* 2000). Multipolare Spindeln wurden in oralen Krebszellen gefunden, einige Spindelpole zeigten ein gesplittetes Zentrosom und somit ein erstes Anzeichen der Separation der Mikrotubuli-Organisationszentren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen sowie die aromatischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzotrinitril und die Alkohole Hexanol und Butanol untersucht. Die Auswahl dieser Chemikalien erfolgte, weil sie national oder international (EU) im Hinblick auf gentoxische Effekte diskutiert werden. Über die gentoxischen und möglicherweise krebserzeugenden Wirkungen anorganischer Bleiverbindungen wird seit Jahren diskutiert (Winder und Bonin 1993, Fu und Boffetta 1995, DFG 2000, Steenland und Boffetta 2000). Der Mechanismus der Gentoxizität anorganischer Bleiverbindungen ist jedoch beim Menschen nicht abschließend geklärt (Winder und Bonin 1993), und die Ergebnisse sind zum Teil uneinheitlich (DFG 2000).

Verschiedene Studien über anorganische Quecksilberverbindungen geben Hinweise auf klastogene Effekte, andere hingegen postulieren eine aneugene Wirkweise. Der Mechanismus der Gentoxizität von Quecksilber wird insgesamt als sehr komplex angesehen (Rao *et al.* 2001) und soll in dieser Arbeit näher untersucht werden.

Die Abschätzung der Gentoxizität von Nitrobenzol ist derzeit in Diskussion (Holder *et al.* 1999 *a, b*). Insgesamt ist die Datenlage zur Gentoxizität von Nitrobenzol und Benzotrinitril unzureichend, und speziell die Frage der chromosomalen Gentoxizität der beiden Verbindungen bleibt offen.

Zur Abklärung des gentoxischen Potentials der ausgewählten Substanzen dient in der vorgelegten Arbeit der Mikronukleus-Test, während die CREST-Analyse zusätzlich einen Einblick über den zugrunde liegenden Wirkmechanismus der Mikrokern-Entstehung liefert.

Die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Arbeiten wurden finanziell gefördert durch den europäischen Verband der Chemie-Industrie (LRI-Programm CEFIC, Fördernummer CC-1FOAR-0003). Am Institut für molekulare Biotechnologie (IMB, Jena) wurden komplementäre Untersuchungen an zellfreien Systemen durchgeführt. Der Arbeitsgruppe des IMB oblag die Untersuchung der Wirkung von Substanzen in zellfreien Systemen mit der Frage einer Beeinflussung des Tubulin-Kinesin-Motorprotein-Apparates. Die am Institut für molekulare Biotechnologie verwendeten Methoden zur Tubulin-Assemblierung und zum Mikrotubuli-Gliding sind unter 1.1.1.2. und 1.1.1.4.1. beschrieben.

1.1. Das Zytoskelett

Das Zytoskelett der eukaryotischen Zelle (Abb. 1) ist ein umfangreiches, aus Mikrotubuli (MT, s. 1.1.1.), Intermediärfilamenten sowie Aktinfilamenten bestehendes Fasergeflecht. Zu den Intermediärfilamenten zählen verschiedene Typen, wie Keratin-Filamente, Vimentin-Filamente und Neurofilamente, die hauptsächlich im Zytoplasma vorkommen und der Zelle mechanische Stabilität verleihen. Aktinfilamente befinden sich in der gesamten Zelle, die höchste Dichte findet sich jedoch unter der Plasmamembran. Aktinfilamente sind vor allem an Bewegungsprozessen beteiligt. Wesentliche Funktionen des Zytoskeletts sind die Beteiligung an der Zellteilung (Aufbau der Zellteilungsspindel und die Verteilung des Erbmateri als auf die Tochterzellen), die Formhaltung von Zellen, Zellmotilität sowie intrazelluläre Transportprozesse.

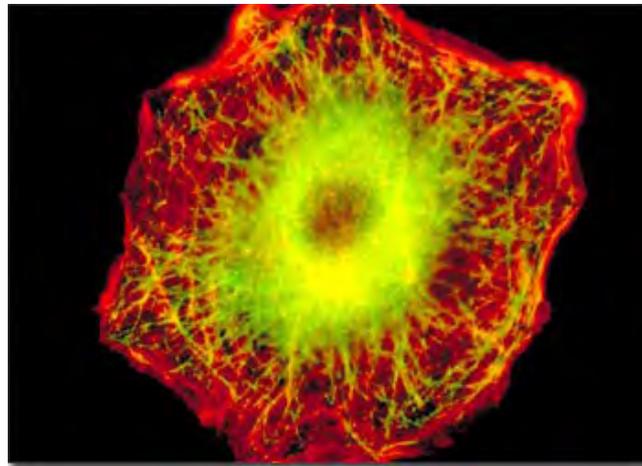


Abb. 1: Darstellung vom Mikrotubuli (grün) und Aktinfilamenten (rot) des Zytoskeletts einer humanen Lungenzelle (2002, www.olympusmicro.com)

1.1.1. Mikrotubuli (MT)

Mikrotubuli bilden einen wesentlichen Teil des Zytoskeletts. MT besitzen einen Durchmesser von etwa 24 nm und bestehen aus 13 aneinanderliegenden Protofilamenten, die einen Hohlzylinder bilden. Die Protofilamente bestehen aus aneinandergelagerten Dimeren (Heterodimeren), die durch die beiden globulären Proteine α - und β -Tubulin gebildet werden (Abb. 2). Ein Heterodimer bindet zwei GTP-Moleküle, wobei das α -Tubulin irreversibel ein GTP bindet, während das β -Tubulin GTP reversibel binden und zu GDP hydrolysieren kann.

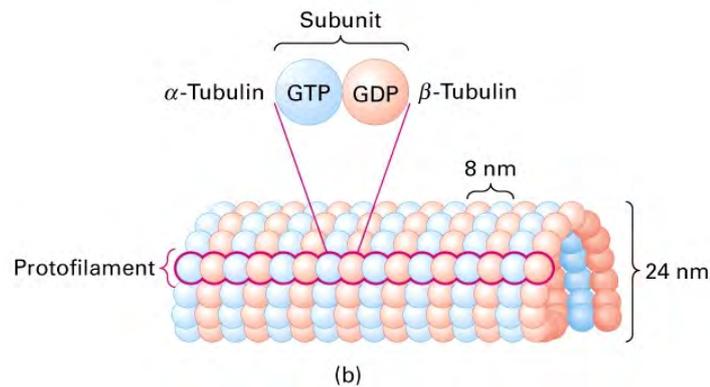


Abb. 2: Mikrotubulus-Aufbau (2003, <http://bioweb.wku.edu/courses/biol22000/29Microtubules/Fig.html>)

1.1.1.1. Funktionen der Mikrotubuli

Eine wichtige Funktion der Mikrotubuli ist die Bildung der Mitosespindel. Während der Zellteilung polymerisieren Tubulindimere und bauen dabei die Zellteilungsspindel auf, welche die duplizierten Chromosomen auseinanderzieht. Im Anschluß an die Zellteilung zerfallen die sogenannten Spindelmikrotubuli wieder. Weiterhin sind MT an Bewegungsprozessen der Zelle beteiligt, an der Bewegung der Chromosomen in der Kernspindel sowie an der Bewegung von Vesikeln und Organellen. Als Bestandteil des Zytoskeletts sind sie Teil der formgebenden Strukturen in der Zelle. Während der Zellteilung transportieren MT als sogenannte Spindelfasern die Chromosomen in die Tochterkerne. In Neuronen sind Mikrotubuli für die Ausbildung von Axonen und Dendriten unerlässlich, und ebenso sind sie am axoplasmatischen Transport beteiligt (Wittman 1992).

1.1.1.2. MT-Polymerisation

Mikrotubuli sind dynamische Polymere. In der Mitosephase des Zellzyklus werden die Mikrotubuli z.B. schnell auf- und abgebaut, um die Chromosomentrennung während der Mitose zu bewerkstelligen.

Mikrotubuli entstehen durch die Polymerisation von Tubulin-Dimeren. Dabei sind die MT stark temperaturabhängig (Binder et al. 1975). Aufgereinigte MT zerfallen *in vitro* bei Abkühlung auf 4°C in die stabilen α - β -Dimere, während eine Erwärmung auf 37°C in Anwesenheit von GTP wieder zur Polymerisation führt. Physiologische Temperaturen, GTP, Mg^{2+} , Reagentien wie Glutamat, Saccharose, DMSO und Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP's) sowie Taxol wirken fördernd auf die Polymerisation, während niedrige Temperaturen (0 °C – 10 °C), GDP, Ca^{2+} und antimitotische Stoffe wie z.B. Vinkristin oder Colchizin die Polymerisation inhibieren. Ein Mikrotubulus verlängert sich durch Anlagerung von GTP-tragenden Tubulin-Dimeren, die bevorzugt am Plus-Ende binden. Die Tubulinpolymerisation kann *in vitro* in Anwesenheit von Mg^{2+} und GTP turbidometrisch verfolgt werden (Abb. 3, Abb. 4) und erfolgt in drei Phasen: in der *Nukleationsphase* werden die Tubulin-Dimere zu kleinen Oligomeren polymerisiert. Diese Phase ist abhängig von der

Tubulinkonzentration und der Temperatur. In der folgenden *Elongationsphase* lagern sich die Dimere rasch an die Oligomere an, und in der sich anschließenden *stationären Phase* liegt ein Gleichgewicht zwischen freiem und gebundenem Tubulin vor. Freie Tubulin-Dimere werden an das wachsende Mikrotubuli-Ende angefügt, während andere Dimere freigesetzt werden. Es liegt ein Fließgleichgewicht der Polymerisation vor, dessen Dauer von der GTP-Konzentration abhängt.

Die Tubulinassemblierung kann *in vitro* über photometrische Trübungsmessungen untersucht werden. Dieser Prozeß ist durch Kühlung auf Temperaturen unter 10°C reversibel (Böhm *et al.* 1984, Unger *et al.* 1990). Interaktionen von Stoffen mit dem Tubulin führen zu Veränderungen, die im Absorptionsverlauf sichtbar werden. Substanzen können mit dem Tubulin Aggregate bilden, wodurch es zu einem veränderten Assemblierungsprozeß kommt. Dies ist in einer Veränderung des Kurvenverlaufs im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Die Aggregatbildung ist meist nicht vollständig reversibel. Dies läßt sich ebenfalls im Absorptionsverlauf, gekennzeichnet durch ein erhöhtes Plateau, nach Abkühlung auf 4°C beobachten (Abb. 4, rote Kurve). Trübungsmessungen dienen der Abklärung eines möglichen tubulin-schädigenden Potentials einer Substanz.

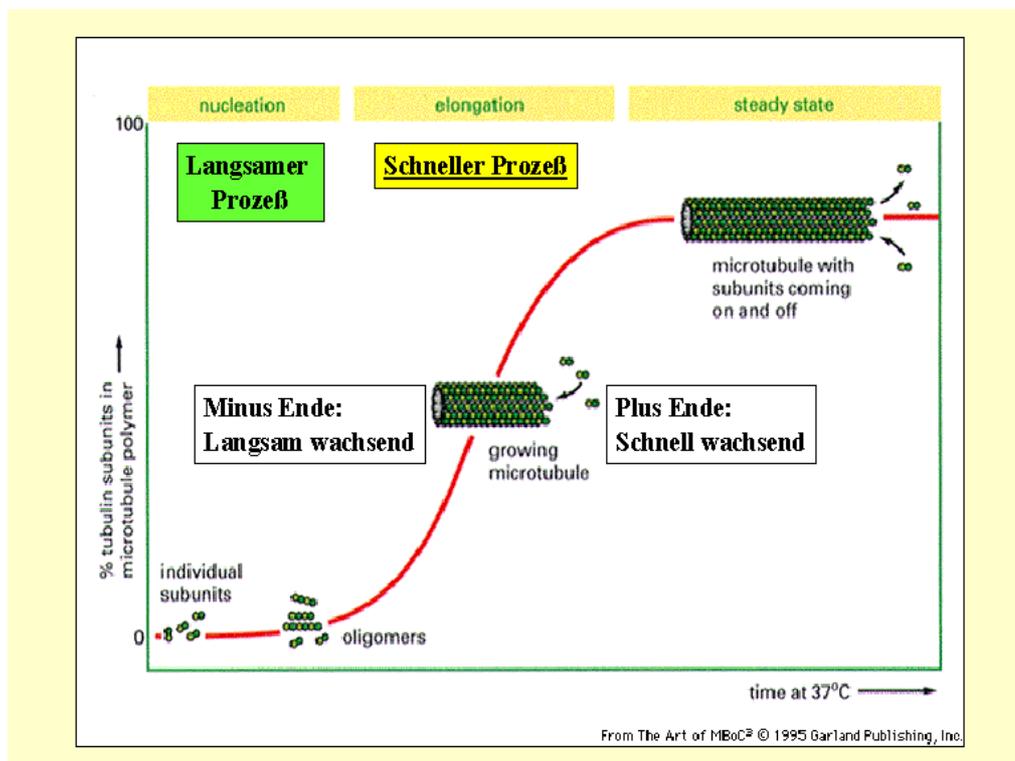


Abb. 3: Schematische Darstellung der Tubulinpolymerisation (1995, The Art of MBoC³. Garland Publishing, Inc.)

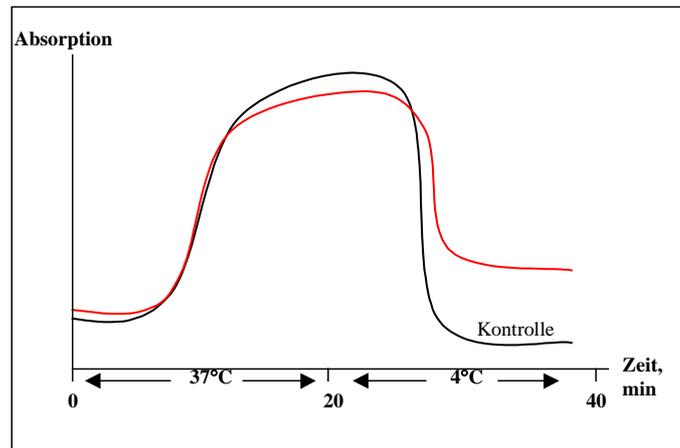


Abb. 4: Tubulin -Assemblierung: Die Assemblierung der Kontrollprobe (schwarze Kurve) ist vollständig reversibel im Gegensatz zur Aggregatbildung von Tubulin mit einer auf das Tubulin wirkenden Substanz (rote Kurve)

1.1.1.3. Stoffe, die auf das Tubulin eine Wirkung ausüben

1.1.1.3.1. Taxol

Taxol (Abb. 5) stabilisiert Mikrotubuli, wodurch eine Arretierung der Zellen in der Mitose erfolgen kann. Taxol bindet reversibel an Tubulin und beeinflusst das Tubulin-Mikrotubuli-Gleichgewicht (Schiff *et al.* 1979). Die Bindungsstelle von Taxol liegt auf der β -Untereinheit des Tubulins (Carboni *et al.* 1993). Die Bindung zwischen Taxol und Tubulin ist stärker als die Bindung der Mikrotubuli an freie Tubulin-Dimere. Taxol setzt die Tubulinkonzentration herab und verkürzt zusätzlich die Induktionszeit für die Polymerisation und wirkt somit polymerisations-induzierend. In Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen sind die durch Taxol induzierten Mikrotubuli stabil. Diese stabilisierende Wirkung des Taxols ist auch in der Lage, die destabilisierende Wirkung von z.B. Vinkristin auszuschalten (Howard und Timasheff 1988). In vivo wirkt Taxol zytostatisch: es verursacht die Aggregation eines großen Teils des freien Tubulins, stoppt die Mitose, löst Apoptose aus und führt zu sternförmigen Anordnungen der Mikrotubuli.

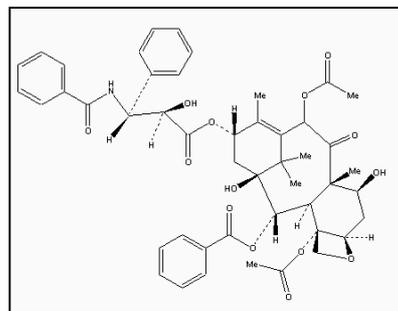


Abb. 5: Die chemische Struktur von Taxol (2003, <http://chemfinder.cambridgesoft.com/>)

1.1.1.3.2. Vinkristin (VCR)

Eine weitere antimitotische Wirkgruppe wird aus den Blättern von *Catharanthus roseus* (Madagaskar-Immergrün) gewonnen. Zu diesen Vinca-Alkaloiden zählen das Vinkristin (Abb. 6) und das Vinblastin. Beide Stoffe werden in der Chemotherapie eingesetzt; Vinkristin-Sulfat wird hauptsächlich gegen solide Tumoren verwendet. Der genaue Wirkungsmechanismus ist jedoch nicht vollständig geklärt. Die aneugen wirkende Substanz (Spindelgift) VCR bindet an das β -Tubulin und verhindert so die Polymerisation der Tubulin-Dimere zu Mikrotubuli, womit der kontinuierliche Auf- und Abbau der Mikrotubuli gestört wird. Die durch Depolymerisation bedingte tubuläre Dysfunktion verhindert den korrekten Aufbau der Mitosespindel und arretiert die Zellen in der Metaphase. Vinkristin diente in dieser Arbeit als Positivkontrolle im Mikronukleus-Test und in der CREST-Analyse.

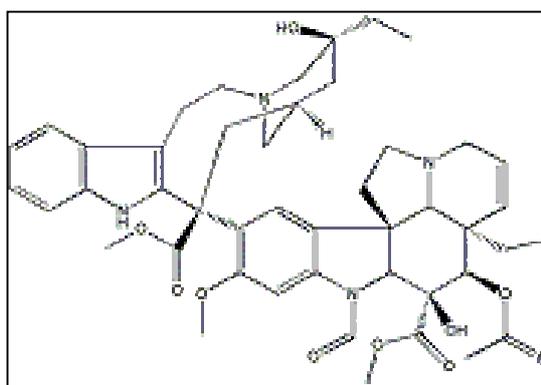


Abb. 6: Die chemische Struktur von Vinkristin (2003, <http://chemfinder.cambridgesoft.com/>)

1.1.1.3.3. Methylmethansulfonat (MMS)

Die alkylierende, zytotoxische Substanz Methylmethansulfonat (Abb. 7) induziert in Lungenfibroblasten *in vivo* eine Erhöhung der Mikronuklei-Rate (Tao *et al.* 1993). MMS wirkt in Konzentrationen unterhalb zytotoxischer Konzentrationen schädigend auf die DNA (klastogene Wirkung) in V79- und Blutzellen (Kreja und Seidel 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde MMS als Positivkontrolle im MN-Test und in der CREST-Analyse eingesetzt.

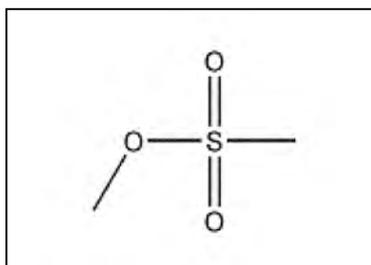


Abb. 7: Die chemische Struktur von Methylmethansulfonat (2003, <http://chemfinder.cambridgesoft.com/>)

1.1.1.4. Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP)

Mikrotubuli-assoziierte Proteine sind mit den Mikrotubuli eng verbunden, und die wichtigsten Funktionen dieser Proteine sind die Stabilisierung der Mikrotubulstruktur sowie die Vermittlung der Wechselwirkung zwischen den Mikrotubuli und anderen Bestandteilen der Zelle. Wichtige MAP sind das Motorprotein Kinesin, sowie das Dynein und die tau-Proteine.

1.1.1.4.1. Kinesin

Das Mikrotubuli-assoziierte Motorprotein Kinesin ist ein Dimer (*Hirose und Amos 1999*) und besteht aus einer Kopf- und einer Schwanzdomäne, aus zwei schweren und zwei leichten Ketten (Abb. 8). Die schwere Kette beinhaltet die Mikrotubuli-Bindestelle, wodurch Bewegungen entlang der MT möglich sind (*Block et al. 1990, Crevel et al. 1997*), sowie die ATP-Binde- und Hydrolysestelle zur Bereitstellung der für die Bewegungsprozesse notwendigen Energie (*Kull 2000*). Die Schwanzdomäne ist mit den leichten Ketten assoziiert und übernimmt Transportfunktionen. Die Bindung von Kinesin an Mikrotubuli ermöglicht die Bewegung entlang der Mikrotubuli (Abb. 9). Dazu wird Energie aus der ATP-Hydrolyse benutzt.

Intrazelluläre Bewegungsprozesse entlang der Mikrotubuli (MT) können im sogenannten Gliding Assay in vitro untersucht werden: Gleiten von taxolstabilisierten MT über eine mit Kinesin überzogene Glasoberfläche (Abb. 10/11, *Böhm et al. 1979 b, Böhm et al. 2000 a, b*). Die MT-Gleitgeschwindigkeit wird gemessen und dient als Maß für die Beeinträchtigung der Transportprozesse durch die Testsubstanz.

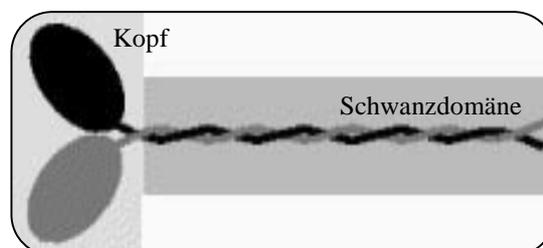


Abb. 8: Schematische Darstellung des Kinesins

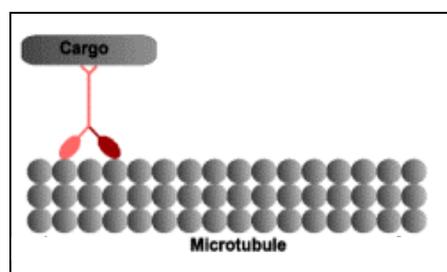


Abb. 9: Schematische Darstellung der Kinesin-Bewegung entlang eines Mikrotubuli. Die Schwanzdomäne des Kinesins übernimmt Transportfunktionen (2000, Böhm K J, www.imb-jena.de)

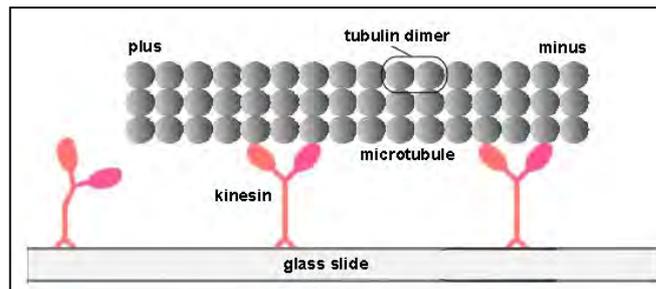


Abb. 10: Gliding Assay: Gleiten taxolstabilisierter Mikrotubuli über eine mit Kinesin überzogene Glasoberfläche

(Böhm KJ 2002, 2003, www.imb-jena.de)

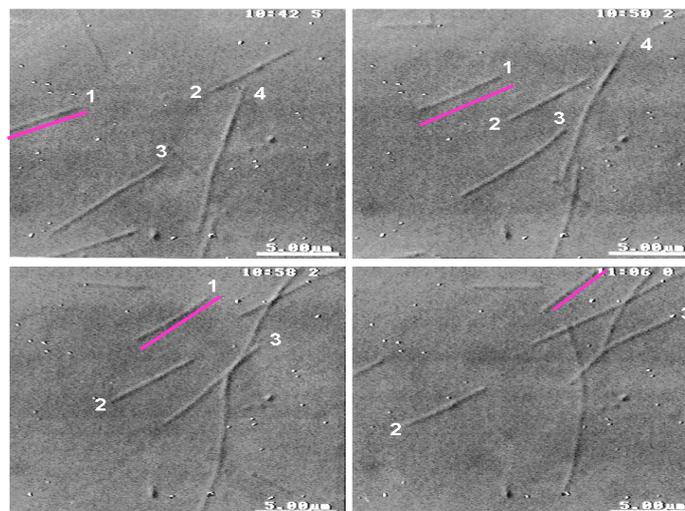


Abb. 11: Gliding Assay: Gleiten taxolstabilisierter Mikrotubuli über eine mit Kinesin überzogene Glasoberfläche (Videosequenz, www.imb-jena.de).

1.2. Zellzyklus

Der Zellzyklus wird in vier Hauptphasen unterteilt, die sog. G₁-Phase (G=gap, Lücke), S-Phase (Synthesephase), G₂-Phase und M-Phase (Mitosephase). In der G₁-Phase (Wachstumsphase) wächst die diploide Zelle und synthetisiert zelluläre Proteine, Lipide und Bausteine für die Nukleinsäurebiosynthese. Fehlen Wachstumsfaktoren oder besteht Substratmangel, können Zellen von der G₁-Phase in eine Ruhephase (G₀-Phase) übertreten, in der sie sich aufhalten, bis sie ein Signal zur Weiterführung des Zellzyklus erhalten. Die Synthese-Phase schließt sich an und somit die Replikation der DNA. Bei Säugern hat die Synthesephase eine Dauer von etwa 6 bis 8 h, beim Menschen dauert sie 8 h. Im Anschluß an die Synthesephase folgt die G₂-Phase, in der die Zellen ihren Stoffwechsel auf die Belange der bevorstehenden Mitose umstellen, und die Vollständigkeit der Replikation kontrolliert wird (G₂-Phase-Kontrollpunkt, s.1.2.1.2.3.). In der Mitosephase findet die Zellteilung statt, und es entstehen zwei identische Tochterzellen. Die Mitosephase wird in verschiedene

Stadien unterteilt: Prophase, Prometaphase, Metaphase, Anaphase, Telophase und Zytokinese (Abb. 12).

1.2.1. Ablauf der Mitose/Mikrotubuli während der Zellteilung

Schon am Übergang zwischen der G₂-Phase und der Mitosephase beginnt die Reorganisation des Zytoskeletts und der Zerfall der Kernlamina. Die Mitose beginnt mit der *Prophase*, in der es zur Kondensation der Chromosomen und zum Aufbau des Spindelapparates kommt. Aus dem unipolaren Zytoskelett der Zelle entsteht die bipolare Struktur der sich teilenden Zelle. Durch Umbau der Mikrotubuli entsteht der Spindelapparat (Mitosespindel), ausgehend vom Zentrosom. Ein Zentrosom besteht aus einem Paar Zentriolen und dient als Mikrotubuli-Organisationszentrum. Der Spindelapparat entwickelt sich aus Mikrotubuli, deren Bausteine Tubulin-Dimere sind (s. 1.1.1.). Die Hauptfunktion der Mitosespindel ist es, die beiden Pole mit je einem Satz von Tochterchromosomen zu verbinden und diese zu den Zellpolen zu transportieren. Die Mikrotubuli werden nicht gezielt ausgesandt, sondern orientieren sich zufällig von den Zentrosomen weg. In der *Prometaphase* depolymerisieren die Mikrotubuli, und aus dem freigesetzten Tubulin entstehen neue Mikrotubuli, die sich teilweise mit den Kinetochoren der Chromosomen verbinden. Ein anderer Teil der Mikrotubuli interagiert mit den ihnen entgegenwachsenden Mikrotubuli des gegenüberliegenden Spindelpols. Die beiden Zellpole werden mit je einem Satz von Tochterchromosomen verbunden, und diese werden dann zu den Zellpolen transportiert. Treffen die Mikrotubuli hierbei auf ein Kinetochor, werden sie dadurch stabilisiert, während die übrigen Mikrotubuli depolymerisieren und spontan verschwinden (*Stryer et al. 1991*). Die Wanderung der Chromosomen in die Äquatorialebene beginnt. Die Anordnung der Chromosomen in der *Metaphase* schließt sich an. Der Spindelapparat ist nun voll entwickelt, und die Schwesterchromatiden sind gut sichtbar. In der Metaphase sind drei Mikrotubuli-Typen erkennbar: Kinetochor-MT, die vom Spindelpol zum Kinetochor reichen; Pol-MT, vom Spindelpol zur Äquatorialebene und Astral-MT, die vom Pol nach außen ziehen. Am Übergang zwischen Meta- und Anaphase spielen zahlreiche Proteine eine wichtige Rolle (*Burke 2000, Gardner und Burke 2000*). Am sogenannten Anaphasekontrollpunkt wird die Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochoren überwacht. Die initiierte Bindung von Mikrotubuli an ein Kinetochor führt zunächst zu einem mono-orientierten Chromosom. Im Anschluß wird das Chromosom durch Bindung von Mikrotubuli des gegenüberliegenden Pols biorientiert. Es werden Bündel von annähernd 20 Mikrotubuli an eine Kinetochorfaser gebunden (*McDonald et al. 1992*). Nicht an Mikrotubuli gebundene Kinetochore senden vermutlich ein Signal in der Zelle aus, das zu einer Verzögerung zwischen Meta- und Anaphase führt, bis alle Chromosomen bipolar an Mikrotubuli gebunden sind. Sind die Mikrotubuli gebunden, und herrscht eine gewisse Zugspannung an den Kinetochoren vor, verschwindet das von den ungebundenen Kinetochoren ausgesendete „Haltesignal“, und die Anaphase beginnt (*Trielli et al. 1996*). Falls bei der Verbindung von Mikrotubuli und Kinetochoren Fehler auftreten, wird der mitotische Kontrollpunkt = Spindel-Kontrollpunkt (s. 1.2.1.2.4.) aktiviert (*Li et al. 1995, Rieder et al. 1995*). In der *Anaphase* trennen sich die Chromatiden. Die Bewegung der

Chromatiden zu den Zellpolen geschieht vermutlich durch Verkürzung der Kinetochor-Mikrotubuli. Mit Ankunft der Chromatiden an den Spindelpolen beginnt die *Telophase*, während der sich die Chromatiden entspiralisieren und in der Kernmatrix verteilen (Abb.12). Die Kinetochor-MT lösen sich auf, und mit der neu einsetzenden RNA-Synthese wird der Nukleolus wieder gebildet. Gleichzeitig vollzieht sich mit der Zellteilung die Zytokinese.

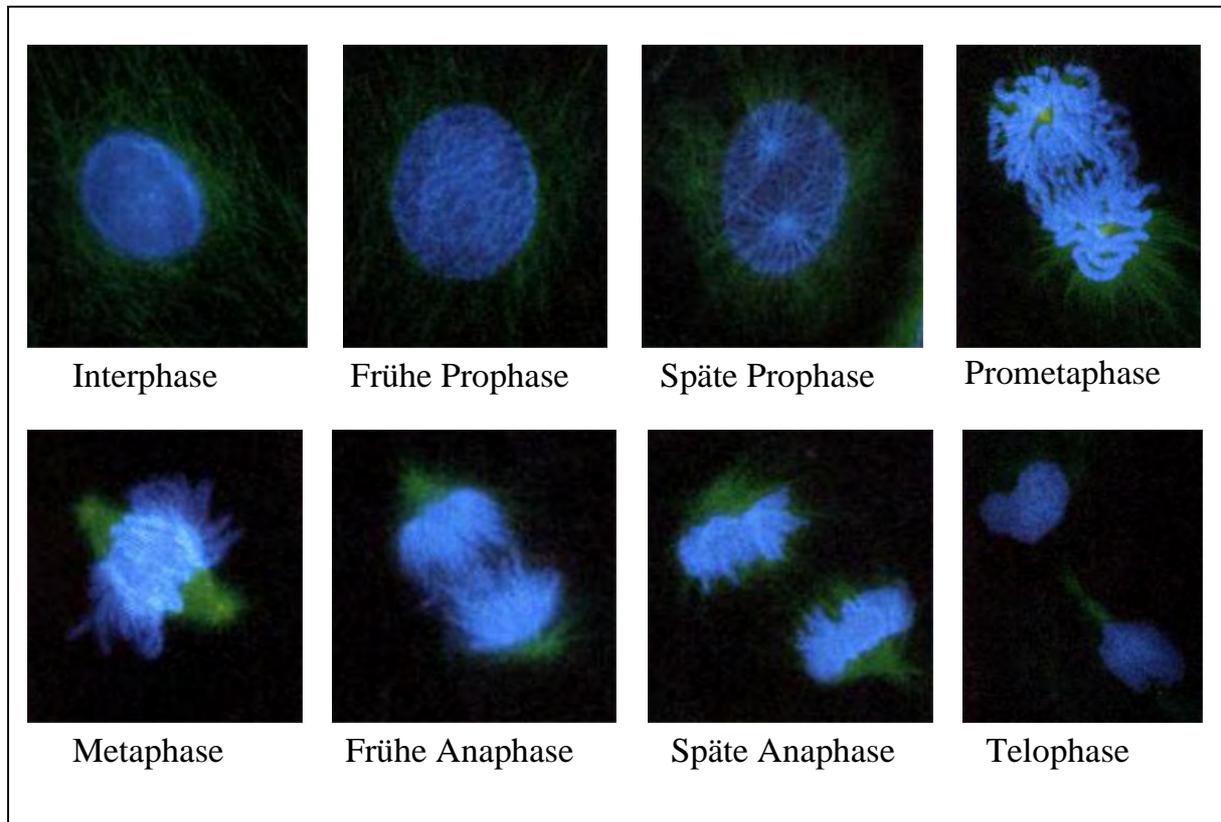


Abb. 12: Mikrotubuliorganisation während der Zellteilung
(<http://www.cu.lu/labext/rcms/cppe/division/dmeta.html>)

1.2.1.1. Zentromer/Kinetochor

Das Zentromer ist eine Einheit des Heterochromatins und während der Metaphase der Ort der Chromosomen, der als primäre Einschnürung sichtbar wird. In elektronenmikroskopischen Studien wurden drei Hauptdomänen des Zentromers charakterisiert: eine Zentralsdomäne, eine Paardomäne und das Kinetochor (*Earnshaw und Rattner 1989*). Das Kinetochor ist direkt am Zentromer-Chromatin lokalisiert. Beim Menschen kann das Kinetochor als trilaminare Struktur beschrieben werden, mit innerem, äußerem und mittlerem Bereich (*Rieder et al. 1982*). Die Verbindung der Chromatiden mit den Mikrotubuli des Spindelapparates (*Rieder et al. 1982*) führt dazu, daß ein Teil der Spindel-Mikrotubuli (sog. Kinetochor-MT) gebildet werden. Die übrigen Mikrotubuli der Mitosespindel werden als polare Mikrotubuli bezeichnet. Außerhalb der Mitosespindel sind die Astral-Mikrotubuli zu finden. Die Kinetochor-MT erstrecken sich von den beiden Schwesterchromatiden aus in entgegengesetzte Richtungen und üben einen Zug auf die Chromosomen aus, der diese in

Bewegung setzt. Das eukaryotische Kinetochor übernimmt während der Mitose verschiedene Funktionen, wobei die Hauptaufgabe des Kinetochors die korrekte Bindung von Mikrotubuli ist, um eine fehlerfreie Segregation zu gewährleisten. Weiterhin wird vermutet, daß das Kinetochor bei der Chromosomenbewegung und Chromatidtrennung eine Rolle spielt (*Choo 2000*). Das Kinetochor enthält molekulare Motorproteine, die bei der Bewegung der Chromosomen während der Mitose zusammenspielen. Nur kinetochorhaltige Chromosomen können bewegt werden, da die Kinetochoren das Motormolekül Dynein enthalten, wodurch eine aktive Bewegung der Mikrotubuli in Richtung der Zellpole möglich wird (*Sharp et al. 2000, Wittmann et al. 2001*).

Verschiedene Proteine spielen hierbei eine wichtige Rolle. Störungen des Dynein-bezogenen Proteins LIS1 führen zu fehlerhaften Anordnungen der Chromosomen in der Metaphaseplatte (*Tai et al. 2002, Faulkner et al. 2000*). ZW10 und Rod sind zwei weitere Proteine, die mit dem Dynein in Verbindung stehen. Ein Verlust des Proteins ZW10 führt bei *Drosophila* zu Chromosomen-Verlusten, während Defekte des Rod-Proteins die Chromosomenbewegung in der Anaphase einschränken (*Savoian et al. 2000*). Bei weiteren Proteinen, die an der Interaktion zwischen Kinetochor und Mikrotubuli bzw. der Mikrotubuli-Kinetochordynamik beteiligt sind, handelt es sich um die Proteine CLIP-170 und EB1. CLIP-170 spielt eine wesentliche Rolle bei der Initiierung der Bindung zwischen Mikrotubuli und Kinetochor (*Dujardin et al. 1998*). Das EB1-Protein interagiert mit dem Tumorsuppressor APC-Protein (adenomatous polyposis coli protein/*Askham et al. 2000, Nakamura et al. 2001*). Mutationen im APC-Protein führen zu Chromosomenverlusten oder Chromosomen-Instabilitäten (*Kaplan et al. 2001*).

Zum Kinetochor gehören spezialisierte Proteine, die am inneren Kinetochorbereich lokalisiert sind und über deren Regulation bisher noch relativ wenig bekannt ist. Es wurde u.a. das humane Zentromer-Protein C (CENP-C) charakterisiert, welches an der inneren Kinetochorplatte lokalisiert ist (*Saitoh et al. 1992*) und direkt mit dem Zentromerchromatin verbunden ist. Das Kinesin-bezogene Motormolekül CENP-E scheint bei der Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore eine Rolle zu spielen (*McEwen et al. 2001*). Eine Inhibierung des CENP-E führt zur fehlerhaften Anordnung der Chromosomen in der Metaphase (*Yao et al. 2000, Schaar et al. 1997*). Weiterhin sind die Kin I Kinesine (MCAK/XKCM) wichtig für die Interaktion der Kinetochore und der Mikrotubuli. Die Kin I Kinesine sind Motorproteine des Kinetochors. Ein Funktionsverlust von MCAK kann zum Verlust von Chromosomen während der Anaphase führen (*Maney et al. 1998*). Eine Inhibierung von XKCM1 oder MCAK des Kinetochors können fehlerhafte Anordnung der Chromosomen oder gar Chromosomen-Verluste zur Folge haben (*Walczak et al. 2002, Kline-Smith und Walczak 2002*).

Aneugene Substanzen können Spindel und Kinetochor schädigen, wodurch es zu einem Verlust oder Zugewinn von Chromosomen kommen kann.

1.2.1.2. Kontrollmechanismen des Zellzyklus

An der Kontrolle des Zellwachstums sowie der genomischen Stabilität der Zelle sind verschiedene regulatorische Faktoren beteiligt. Eine wichtige Proteinklasse sind z.B. die Cykline, die zu bestimmten Zeitpunkten des Zellzyklus gebildet und anschließend wieder abgebaut werden. Neben den Cyklinen sind noch zahlreiche andere Proteine für den Ablauf des Zellzyklus zuständig. Hierzu gehören cyklinabhängige Kinasen (CdK), Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktoren, die in der Zelle durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung aktiviert oder deaktiviert werden. Die Cyklinbildung bzw. Bindung an cyklinabhängige Kinasen gibt ein Signal den Zellzyklus fortzusetzen. Für jede Zellzyklusphase ist eine bestimmte Cyklingruppe zuständig (*Pines 1993, Sherr 1993*). In menschlichen Zellen gibt es mindestens vier solcher Kontrollpunkte, die zwischen den einzelnen Phasen aktiv werden. Die Kontrollpunkte heißen G₁-Phase-Kontrollpunkt oder auch Restriktionspunkt, S-Phase-Kontrollpunkt, G₂-Phase-Kontrollpunkt und M-Phase- bzw. Spindel-Kontrollpunkt. Gelegentlich wird jedoch ein Kontrollpunkt ohne Korrektur eines vorliegenden Defektes überschritten, und der Eintritt in die nächste Phase wird in diesem Fall nicht verhindert (*Shackelford et al. 1999*).

1.2.1.2.1. Restriktionspunkt (G₁-Phase-Kontrollpunkt)

Da die G₁-Phase meist die längste Phase des Zellzyklus ist, ist die Wahrscheinlichkeit einer DNA-Schädigung durch exogene oder endogene Faktoren hier besonders hoch. Der Restriktionspunkt verhindert normalerweise, daß geschädigte DNA in die Synthesephase übergeht und verhindert somit Replikationsfehler. Bestimmte Kontrollproteine werden im Falle einer Schädigung aktiviert und lösen einen Zellzyklusarrest aus. Diese Verzögerung des Zellzyklus ermöglicht es Reparatursystemen, die Fehler zu korrigieren. Ist die DNA zu sehr geschädigt, greift das Reparatursystem nicht, und Apoptose wird eingeleitet. Bei diesem sogenannten programmierten Zelltod wird die Zelle kontrolliert abgebaut, ohne daß umgebende Zellen geschädigt werden. Im Laufe dieses Prozesses kommt es zur DNA-Fragmentierung und anschließender Abschnürung von kleinen Zellteilen, den sogenannten „apoptotic bodies“.

1.2.1.2.2. S-Phase-Kontrollpunkt

Auch während der Synthesephase können im Falle eines Schadens Reparaturmechanismen greifen. Wird in der S-Phase ein Reparaturmechanismus aktiviert, wird die Replikation verlangsamt (*Rhind und Russel 2000*), und der Schaden kann repariert werden. Die Zeit auf eine Schädigung zu reagieren, ist allerdings in der S-Phase wegen der sofort beginnenden Replikation erheblich kürzer als in der G₁-Phase. Weiterhin ist der S-Phase-Kontrollpunkt empfindlicher als der G₁-Phase-Kontrollpunkt gegenüber DNA-Schäden (*Kaufmann und Paules 1996*). Über die molekularen Zusammenhänge des S-Phase-Kontrollpunktes ist bisher allerdings relativ wenig bekannt.

1.2.1.2.3. G_2 -Phase-Kontrollpunkt

Der G_2 -Phase-Kontrollpunkt verhindert die Weitergabe eines Schadens in die Mitosephase und somit die Übernahme eines Schadens in die Tochterzellen.

1.2.1.2.4. Spindelkontrollpunkt (M-Phase-Kontrollpunkt)

Die Aktivierung des Spindelkontrollpunktes setzt eine Signaltransduktionskaskade in Gang, die zum vorübergehenden Zellzyklusarrest führt (Musacchio et al. 2002). Der Spindelkontrollpunkt wird aktiviert, wenn Defekte der Spindelfunktion oder Fehler der Kinetochor-Mikrotubuli-Bindung vorliegen. Liegen solche Defekte vor, wird die Trennung der Chromatiden verzögert, bis der Schaden behoben ist. Es gibt allerdings auch Zellen, bei denen Defekte der Chromosomenanordnung nicht registriert werden, und somit der Kontrollpunkt nicht aktiviert wird. Dies führt zu Fehlern bei der Anordnung der Schwesterchromatiden in der Metaphaseplatte. Es ist jedoch noch nicht geklärt, wie der Kontrollpunkt Defekte korrigiert; möglicherweise existieren aktive Spindel-Reparaturmechanismen.

1.3. Mikrokerne und Mikronukleus-Test

Mikrokerne (Mikronuklei, MN) sind kleine aus Chromatin bestehende Kerne, die in der Zelle außerhalb des Hauptkerns liegen, von dem sie abstammen (Abb. 18). Mikrokerne bestehen aus Chromosomenbruchstücken oder ganzen Chromosomen und können während der Mitose entstehen (Von der Hude et al. 2000). Chromatin, das während der Telophase nicht auf die Zellpole verteilt wird, sondern in der Äquatorialebene zurückbleibt (Fenech und Morley 1989), kondensiert zu einem Mikrokern (Heddle et al. 1978 a und b). Mikronuklei stammen von Chromosomenfragmenten oder ganzen Chromosomen, die während der Kernteilung nicht auf die beiden Tochterkerne verteilt werden (Fenech et al. 1999; Von der Hude et al. 2000). Mikronuklei resultieren entweder aus Läsionen oder Addukten auf DNA- oder chromosomaler Ebene oder aber auf Proteinebene, wobei direkte oder indirekte Involvierung mit der Segregation der Chromosomen (z.B. über das Tubulin) vorliegen kann (Kirsch -Volders et al. 2003).

Folgende Mechanismen können zur Mikrokernbildung führen: Die Bildung azentrischer Fragmente durch Chromosomen- bzw. Chromatidbrüche führen zu Bruchstücken, die während der Zellteilung oftmals nicht in eine der beiden Tochterzellen integriert werden. Die Fragmente erscheinen nach Bildung einer Kernmembran als Mikrokerne im Zytoplasma. Falls eine Chromatide im Rahmen der Chromatidenwanderung zu den Teilungsspindelpolen zurückbleibt, gibt es zwei Möglichkeiten: entweder geht die Chromatide während der Teilung verloren oder kondensiert zu einem Mikronukleus. Weiterhin gibt es Kinetochorstörungen, wodurch sich ein Chromosom nicht in zwei Chromatiden aufteilen kann. Das Chromosom

verbleibt in der Äquatorialebene, und falls es in eine der beiden Tochterzellen integriert wird, entsteht ein Mikronukleus. Die falsche Einordnung einer Chromatide oder eines Chromosoms kann zur Entstehung einer chromosomalen Brücke zwischen den Tochterzellen führen, und ein Mikrokern entsteht dann meist infolge einer „Zerreißung“. Gelegentlich führen Verhakungen zweier Chromosomen oder Chromatiden in der Äquatorialebene zu einer Hinderung der ordnungsgemäßen Polwanderung, und es kommt ebenfalls zu Zerreißungen mit anschließender Mikrokern-Bildung.

Der **Mikronukleus-Test** spielt in der Toxikologie zur Abklärung des gentoxischen Potentials von Agentien *in vivo* und *in vitro* eine wichtige Rolle. Mikrokernne dienen als Maß der chromosomalen Schädigung. Der Test dient der indirekten Abklärung von numerischen und strukturellen Chromosomenaberrationen. Die in sich teilenden Zellen entstehenden Mikronuklei sind relevant zur Beurteilung von agentieninduzierten zytogenetischen Schäden. Hierbei wird unterschieden zwischen Aneugenen und Klastogenen. *Aneugene* (Spindelgifte) schädigen den Spindelapparat und/oder die Kinetochorregion, wodurch sie zu Chromosomenfehlverteilungen (Verlust oder Zugewinn ganzer Chromosomen) führen. Spindelgifte wie z.B. Vinkristin führen dazu, daß Chromosomen bzw. Chromatiden in der Äquatorialebene zurückbleiben („anaphase-lagging“). Die Zuordnung der Chromosomen oder Chromatiden zu einer der beiden Tochterzellen, in deren Zytoplasma sich dann ein Mikrokern ausbildet, erfolgt zufällig (*Heddle et al. 1978 a*). *Klastogene* (chromosomenbrechende Agenzien) führen zu Bruchstücken von Chromosomen oder einer Chromatide. Die durch Klastogene induzierten Mikrokernne enthalten hauptsächlich azentrische Chromosomenfragmente ohne Zentromer. Aufgrund des Zentromerverlustes besitzen diese Fragmente keine Ansatzstelle für die Spindelfasern, wodurch diese Chromosomenbruchstücke in der Äquatorialebene verbleiben und zu einem Mikronukleus kondensieren. Die Zuordnung der Fragmente in einen der beiden Tochterkerne erfolgt ebenfalls zufällig (*Yamamoto und Kikuchi 1980*). Der MN-Test ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* möglich. *In vivo* wird der Test meist an Mäuseknochenmark durchgeführt, während *in vitro* häufig humane Blutproben, V79-Zellen (s. 1.5) oder Rattenhepatozyten Verwendung finden. Wichtige demographische Variablen des MN-Tests an humanen Blutproben sind Alter und Geschlecht. Mit zunehmendem Alter kommt es zu einem Anstieg der MN-Frequenz und Frauen weisen höhere MN-Raten auf als Männer (*Fenech 1998*).

Methodisch wird im MN-Test häufig Cytochalasin B verwendet, da dieses nach erfolgter Kernteilung eine Teilung des Zytoplasmas verhindert, so daß nach der Mitose eine Zelle mit zwei Zellkernen vorliegt (Abb. 13). Somit ist eine Detektion von Zellen möglich, die sich nach der Cytochalasin-Zugabe exakt einmal geteilt haben. Nur zweikernige Zellen werden anschließend in die Auswertungen einbezogen.

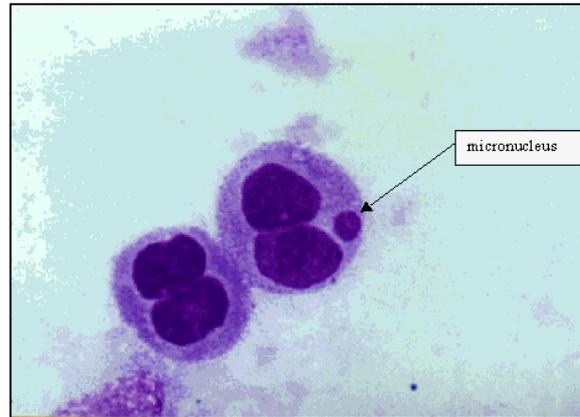


Abb. 13: Mikrokern-Test mit Cytochalasin B

(2000, http://cdfc.rug.ac.be/HealthRisk/genotoxicitytests/micronucleus_test.htm)

Werden Zelllinien für die Untersuchungen verwendet, ist die Verwendung von Cytochalasin B optional (*Kirkland et al. 2000*). Bisher wurden nur wenige Chemikalien vergleichend mit bzw. ohne die Verwendung von Cytochalasin B getestet. Vergleichende Studien mit und ohne Cytochalasin B wurden in CHL-Zellen für fünf Substanzen durchgeführt (*Matsushima et al. 1999*). Alle fünf Chemikalien führten sowohl mit als auch ohne Cytochalasin B zu signifikanten Erhöhungen der MN-Raten. Allerdings zeigten vier der gewählten Chemikalien eine höhere MN-Frequenz in Abwesenheit von Cytochalasin B gegenüber den Tests bei Einbeziehung von Cytochalasin B. Ähnliche MN-Raten in An- und Abwesenheit von Cytochalasin B wurden für zwei aneugen und zwei klastogen wirkende Agentien beschrieben (*Kalweit et al. 1999*). Weiterhin kann Cytochalasin B mit anderen Zytokinese-Inhibitoren interferieren, und die Zytotoxizität von Cytochalasin B kann von Zelllinie zu Zelllinie stark variieren (*Kirsch-Volders et al. 2000*). Bei aneugen wirkenden Substanzen kann Cytochalasin B störend auf die Mikrokernbildung oder die Mitose einwirken (*Antoccia et al. 1993*). Außerdem können Mitosestörungen und die Mikrokernformation durch Cytochalasin B selbst ausgelöst werden (*Lindholm et al. 1991*).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Mikronukleus-Testmethode gewählt, bei der kein Cytochalasin B verwendet wurde. Bei dieser Methode ist die Zellzykluszeit der verwendeten Zellen (hier V79-Zellen) von besonderer Bedeutung. Eine Behandlungszeit von 1,5 Zellzyklen (entspricht bei V79-Zellen 18 h) mit der zu untersuchenden Substanz bewirkt, daß sich der größte Teil der eingesetzten Zellen exakt einmal geteilt hat.

1.4. CREST-Analyse

Ob Mikronuklei ganze Chromosomen enthalten oder nicht, ist zum Teil an deren Größe erkennbar, wobei große Mikrokerne hauptsächlich durch aneugen wirkende und kleine durch klastogen wirkende Substanzen entstehen können (*Yamamoto und Kikuchi 1980*). Aufgrund starker Schwankungen der Größen der im Mikrokern eingeschlossenen Chromosomen, Chromatiden oder Chromosomenbruchstücken ist diese Art der Einstufung allerdings nicht immer zuverlässig. Große, mikrokernähnliche Strukturen können auch durch phagozytäre Aufnahme kleiner Partikel ins Zellinnere entstehen. Weiterhin ist eine Größenzunahme von MN durch nachträgliche DNA-Synthese möglich (*Kramer et al. 1990*). Somit enthalten große Mikronuklei nicht zwangsläufig ganze Chromosomen, und die Beurteilung der MN sollte nicht ausschließlich anhand der Größe erfolgen.

Die Abklärung, ob eine aneugene oder klastogene Substanz vorliegt, sollte zusätzlich zur Größenbeurteilung über den Nachweis von Zentromer- bzw. Kinetochorstrukturen geschehen. Hierfür eignen sich z.B. die Verwendung eines Antikinetochor-Antikörpers („CREST-Analyse“) oder die situ-Hybridisierung mit zentromerspezifischen DNA-Sequenzen („FISH-assay“). Ergebnisse der Detektion von aneugen oder klastogen wirkenden Substanzen sind für beide Methoden vergleichbar (*Kallio und Lahdetie 1996*). Für die vorliegenden Daten wurde die CREST-Analyse verwendet. Der sogenannte CREST-Antikörper wird aus dem Serum von CREST-Patienten gewonnen. Das CREST-Syndrom (Calcinosis, Raynaud phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly and Telangiectasia) ist eine leichte Form der progressiven, systemischen Sklerodermie (PSS). Durch Fluoreszenzfarbstoffe werden die Antikörper im Hauptkern und falls vorhanden in den Mikrokernen sichtbar gemacht. Ein positiver Kinetochorbefund bedeutet, daß der Mikronukleus aus einem Chromosom oder aus mehreren vollständigen Chromosomen besteht. Treten hauptsächlich Mikronuklei mit positivem Kinetochorbefund auf, zeigt die Testsubstanz primär aneugene Wirkung (*Miller und Adler 1990*).

1.5. V79-Zellen

Der Großteil der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde mit der V79-Zelllinie (Abb. 14) des chinesischen Hamsters durchgeführt. Dies ist eine permanente Zelllinie, die von transformierten Lungenfibroblasten eines männlichen Hamsters abgeleitet wurde. Die in dieser Arbeit verwendete Zelllinie besitzt eine modale Chromosomenzahl von 22 Chromosomen pro Metaphase und eine durchschnittliche Zellzyklusdauer von 12 h (*Schempp und Vogel 1979, Speit et al. 1994*).

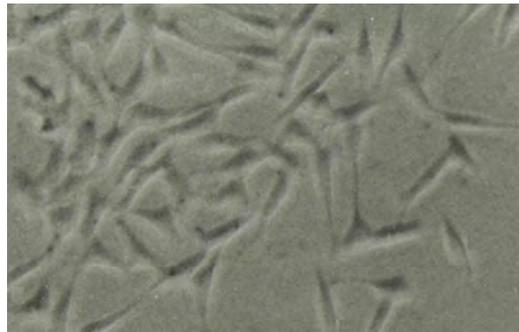


Abb. 14: V79-Zellen in Kulturmedium

1.6. Bleiverbindungen

Das Schwermetall Blei findet sich in der Erdkruste, wo es durch Erosion des Bodens oder vulkanische Aktivität auf natürliche Weise freigesetzt wird. Im Zuge der Industrialisierung kam es zusätzlich zu einer vermehrten Blei-Freisetzung durch den Menschen. Früher wurde Blei vor allem für den Bau von Rohrleitungen gebraucht, wodurch es auch heute zur Lösung des Bleis aus Trinkwasserrohren und somit zur Aufnahme durch den Menschen kommt. Weiterhin wurde Blei Kraftstoffen zugesetzt. Seit 1988 ist jedoch die Verwendung von Blei in Benzin in vielen Ländern verboten. Heute wird Blei hauptsächlich zur Herstellung von Batterien verwendet, aber auch für die Herstellung von Farben, Schießblei und Wägegewichten. Die Bleivergiftung zählt zu den ältesten bekannten Berufskrankheiten. Berufsgruppen, die häufig mit Blei in Kontakt kommen, sind Techniker, Batterie-Arbeiter, sowie Arbeiter in Bleiminen.

Die Giftigkeit von Blei ist stark abhängig von der Löslichkeit, wobei gut wasserlösliche Verbindungen wie Bleiacetat, -nitrat, -chlorid und -jodid besonders gefährlich sind.

Inhalativ oder oral aufgenommenes Blei gelangt direkt in den Blutkreislauf und wird zu ca. 95% an die Erythrozyten (hauptsächlich an das Hämoglobin) gebunden und so im gesamten Körper verteilt. Blei kann sich in verschiedenen Zellsystemen einlagern; es kann an Sulfhydrylgruppen von Enzymen binden oder andere Metallionen in diesen Enzymen verdrängen und diese somit inaktivieren. Blei kann im Organismus Kalzium ersetzen. Dies führt zu gestörten Kalziumsignalen, die zu chronischer Neurotoxizität oder kardiovaskulären Effekten führen können (*Bernard 1999*). Die Elimination des Bleis geschieht über die Nieren, den Dickdarm und in geringen Anteilen über Haare, Nägel und Schweiß.

Ist der Organismus nicht in der Lage zur fortlaufenden Bleiausscheidung, wird Blei im Knochen abgelagert. Die Hauptmenge (92-95% des im Körper gespeicherten Bleis) des aufgenommenen Bleis wird so als Bleidepot zum Teil jahrelang gespeichert. Die Halbwertszeit des Bleis beträgt bis zu 30 Jahre. Einflüsse, die zum Knochenabbau führen, mobilisieren das Bleidepot. Hierzu gehören Streß sowie Infektionskrankheiten. Bei Fieber oder gestörtem Kalzium-Phosphor-Stoffwechsel (Kalziummangel oder erhöhter Verbrauch) kann das Blei

auch nach Jahren aus den Knochendepots freigesetzt werden, wieder ins Blut gelangen und dort zu einem Rückfall führen. Im Retikuloendothel von Leber und Nieren sind lediglich 0,1 - 0,4% und im Kleinhirn weniger als 0,5% gespeichert.

Akute Bleivergiftungen führen zu Erbrechen, Darmkoliken, Leber- und Nierenschäden bis hin zum Koma. Wiederholte Blei-Exposition wirkt sich vor allem auf das hämatopoetische System aus (Schädigung der Erythropoese). Blei hemmt drei Enzyme der Hämsynthese; die δ -Aminolävulinsäure-Dehydratase, die Coproporphyrinogen-Decarboxylase und die Ferrochelatase, wodurch es zu einem Mangel an Hämoglobin kommt, und als Folge dessen sich eine Anämie einstellen kann. Neben dem hämatopoetischen System können aber auch das Nervensystem [Waller'sche Degeneration oder Schädigung der Myelinscheide (Krigman et al. 1980)], die Nieren, das kardiovaskuläre System und die Reproduktionsorgane betroffen sein. Beim Menschen gibt es Hinweise auf ein leicht erhöhtes Risiko für Lungen- und Magenkrebs durch Blei.

1.6.1. Anorganische Bleiverbindungen in verschiedenen Testsystemen

Für anorganische Bleiverbindungen liegen Untersuchungen in bakteriellen Testsystemen, zahlreiche tierexperimentelle Ergebnisse, in vitro Studien an Humanzellen sowie einige Studien an Blei-exponierten Arbeitern vor.

In *bakteriellen Testsystemen* führen anorganische Bleiverbindungen (0,32 mM-500 mM) meist zu negativen Testresultaten in Bezug auf Punktmutationen (Tabelle A.9, Beyersmann 2002). In einem Fall liegt jedoch für 0,32 mM Bleinitrat ein positives Ergebnis vor (Rossman et al. 1984).

Tierexperimentelle Befunde in vitro sowie in vivo Studien zur möglichen klastogenen Wirkweise von Blei führen zu widersprüchlichen Resultaten (Winder und Bonin 1993). In Säugerzellen führen Bleisulfid (bis 2 mM) und Bleinitrat (bis 3 mM) nicht zu Schwesterchromatid-Austauschen oder DNA-Strangbrüchen (Zelikoff et al. 1988, Hartwig et al. 1990). Anorganische Bleiverbindungen induzieren in zytotoxischen Konzentrationen Genmutationen und DNA-Brüche in Säugerzellen (Winder und Bonin 1993). Im Comet Assay wurden Nierenzellen von Mensch und Ratte in vitro mit Bleiacetat behandelt. Bleiacetat induziert hier erst in sehr hohen, millimolaren Konzentrationsbereichen DNA-Schäden (Robbiano et al. 1999).

Verschiedene in vitro Studien über Bleiacetat an *Humanzellen* (Tabelle A.11, Beyersmann 2002) bezüglich Chromosomenaberrationen (CA) und Schwesterchromatid-austauschen (SCE's) liegen vor. Auch hier sind die Ergebnisse nicht eindeutig, und es liegen positive und negative Ergebnisse bezüglich CA's und SCE's vor.

Studien über *Blei-exponierte Menschen* (Blei-Blut-Werte zwischen 225 und 1200 $\mu\text{g/l}$) ergaben teilweise positive und teilweise negative Ergebnisse in Bezug auf zytogenetische Veränderungen (Tabelle A.13, Beyersmann 2002). Die Gründe der unterschiedlichen

Resultate sind nicht eindeutig, bei einigen Studien liegen jedoch methodische Mängel vor (DFG 2000).

Der genaue Wirkungsmechanismus des Bleis ist nicht geklärt. Ein möglicher, indirekter Wirkungsmechanismus von Blei zur Interaktion mit Proteinen oder Enzymen, die an der Synthese oder Reparatur der DNA beteiligt sind, steht zur Diskussion. Auch der Mechanismus der Tumorentstehung ist unbekannt. Als mögliche Mechanismen der in Tierexperimenten gefundenen Nierentumoren werden u.a. Effekte auf Zellkernproteine, Zellproliferation, Gentoxizität sowie die Aktivierung der PKC (Proteinkinase C) diskutiert.

Das gentoxische Potential ist beim Menschen nicht eindeutig zu bewerten (Winder und Bonin 1993). Die gentoxische Wirkung von Blei wird zur Zeit als Folge indirekter Mechanismen diskutiert. Angenommen wird, daß die Bindung von Blei an Proteine zu einer gestörten Chromosomen-Segregation während der Zellteilung führen könnte. Da Bleiacetat nicht direkt mit der DNA interagiert (Valverde et al. 2001), werden andere, indirekte Wirkungsmechanismen, diskutiert. Möglicherweise könnte der Gentoxizität von Blei eine Interaktion mit Proteinen zugrunde liegen, die zu einer Störung der Chromosomenorganisation bei der Zellteilung führt (Leonard 1988).

Die kanzerogene Wirkung von Blei ist für den Menschen zur Zeit nicht abschließend beurteilbar. Probleme der Bewertung liegen u.a. darin begründet, daß Expositionshöhen nicht angegeben werden können, mangelnde Informationen zu Ernährungs- und Rauchgewohnheiten vorliegen, oder die Information fehlt, ob möglicherweise eine zusätzliche Exposition gegen andere Chemikalien bestand (Fu und Boffetta 1995).

Insgesamt liegen Anhaltspunkte einer krebserzeugenden Wirkung von Blei vor, und somit wird Blei zur Zeit seitens der DFG in die Kategorie 3B* für krebverdächtige Arbeitsstoffe eingestuft (DFG 2000). Zur Einordnung in eine andere Kategorie liegen derzeit nicht genügend Anhaltspunkte vor, und weitere Studien sind deshalb notwendig.

*3B) „Aus In-vitro- oder aus Tierversuchen liegen Anhaltspunkte für eine krebserzeugende Wirkung vor, die jedoch zur Einordnung in eine andere Kategorie nicht ausreichen. Zur endgültigen Entscheidung sind weitere Untersuchungen erforderlich. Sofern der Stoff oder seine Metaboliten keine genotoxischen Wirkungen aufweisen, kann ein MAK-Wert festgelegt werden.“

Quelle: DFG, MAK- und BAT-Werteliste 2000

1.7. Quecksilberverbindungen

Quecksilberverbindungen werden in der Elektroindustrie, als Katalysatoren und in Dentalamalgam verwendet. Außerhalb Deutschlands wird Quecksilber auch als Pflanzenschutzmittel eingesetzt.

Nach oraler Aufnahme anorganischer Quecksilberverbindungen beläuft sich die Resorption aus dem Gastrointestinaltrakt auf ca. 7% bis 15%, wobei die Resorptionsrate mit der Wasserlöslichkeit korreliert. Im Blut bindet zweiwertiges Quecksilber an Sulfhydrylgruppen erythrozytärer Proteine oder Plasmabestandteile. Die Bindung an proteinständige Thiole kann zu verschiedenen funktionellen Beeinträchtigungen führen. Hg (II) reichert sich hauptsächlich in der Niere, vor allem im proximalen Tubulus, aber auch in der Leber an. Somit führt orale Aufnahme anorganischer Quecksilberverbindungen zu renalen und gastrointestinalen Schädigungen. HgCl₂ führt bei männlichen Ratten zu Plattenepithelzellpapillomen des Vormagens; bei männlichen Mäusen zu tubulären Adenomen und Karzinomen der Niere. Die wiederholte orale Quecksilber-Aufnahme führe zu adversen Effekten der Niere, allerdings könne keine Dosis-Wirkungsbeziehung abgeleitet werden (*WHO 1991*). Bei Ratten und Mäusen kann zweiwertiges Quecksilber auch zu elementarem Quecksilber reduziert werden, Hinweise auf Methylierung in Säugerzellen liegen bislang allerdings nicht vor. Die Ausscheidung anorganischer Quecksilberverbindungen erfolgt über Nieren und Darm.

1.7.1. Anorganische Quecksilberverbindungen in verschiedenen Testsystemen

Für anorganische Quecksilberverbindungen liegen Untersuchungen in bakteriellen Testsystemen, tierexperimentelle Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* und einige Human-Daten zur Gentoxizität vor.

In *bakteriellen Tests* wirkte HgCl₂ bei ausgewählten *S. typhimurium*-Stämmen nicht mutagen (*De Flora et al. 1994*).

Tests auf mutagene Wirkung in transgenen *V79-Zellen* fielen für HgCl₂ negativ aus (*Klein et al. 1994*). In *CHO-Zellen* ist die Zellteilungsrate, die Überlebensrate und die DNA-Replikation konzentrationsabhängig durch HgCl₂ beeinträchtigt; die Sensitivität der Zellen ist in den verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich. Die Autoren vermuten, daß die Effekte aufgrund der Bindung an Proteine, DNA-Vorstufen oder an der DNA selbst auftreten (*Kasschau et al. 1977*).

Anorganisches Quecksilber wurde in verschiedenen Studien bezüglich Chromosomenaberrationen und DNA-Schäden in *Säugerzellen* untersucht. Das hierbei häufig eingesetzte Zellsystem war die CHO-Zelllinie eines chinesischen Hamsters. Erhöhte Chromosomenaberrationen nach Inkubation mit HgCl₂ wurden in CHO-Zellen in zwei Studien beobachtet (*k.w.A., NTP 1993*).

Ein Angriffspunkt des Hg (II) ist die *DNA* (Tsuzuki et al. 1994). DNA-Einzelstrangbrüche wurden in mehreren Studien und an verschiedenen Zellsystemen nach Inkubation mit HgCl₂ detektiert (Cantoni et al. 1984a, Christie et al. 1985, Robinson et al. 1982, Burkart und Ogorek 1986, Bucio et al. 1999).

In vivo wurde eine dosisabhängige Erhöhung der Chromosomenaberrationen (meist Chromatidbrüche) bei Swiss-Albino-Mäusen nach oraler Gabe von Hg (II) gefunden (Ghosh et al. 1991).

In vivo Studien zur Kanzerogenität anorganischer Quecksilberverbindungen geben Hinweise auf eine mögliche kanzerogene Wirkung von Hg (II). In einer Zweijahres-Studie an B6C3F1-Mäusen erwies sich HgCl₂ bei oraler Gabe als möglicherweise kanzerogen (NTP 1993). Eine weitere Studie über zwei Jahre an F344 Ratten führte nach oraler Gabe von HgCl₂ zu einer erniedrigten Überlebensrate der männlichen Tiere und gab Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung.

Blutuntersuchungen *exponierter Arbeiter* zur Beurteilung der möglichen Gentoxizität von Hg (II) am Menschen sowie Studien an *Humanzellen* führten zu folgenden Resultaten: In den Lymphozyten von 29 gegen Quecksilberfulminat exponierten Arbeitern ergab sich eine signifikante Erhöhung der Mikrokerne und der Chromosomenaberrationen (gaps, Brüche und Fragmente) gegenüber einer Kontrollgruppe. Allerdings korrelierten die gefundenen Effekte nicht mit der Hg-Konzentration im Urin und auch nicht mit der Dauer der Exposition (Anwar und Gabal 1991). Eine weitere Untersuchung an 18 beruflich mit HgCl₂ und organischen Hg-Verbindungen exponierten männliche Arbeiter gaben Hinweise auf Erhöhungen der Chromosomenaberrationen in den Lymphozyten gegenüber einer Kontrollgruppe, wobei die Kontrollgruppe sich lediglich aus 10 Personen, darunter auch Frauen zusammensetzte. Auch die Rauchgewohnheiten beider Gruppen stimmten nicht überein (Popescu et al. 1979).

HgCl₂ führt in humanem Vollblut zu einer signifikanten Erhöhung der Mikrokerne und der Chromosomenaberrationen (Ogura et al. 1996). In einer weiteren Studie wurden Chromosomenaberrationen erst in Konzentrationen, die zu Segregationsstörungen führen, gefunden. Die Autoren vermuten Spindelapparatstörungen (Vershaeve et al. 1985). Die Inkubation menschlichen Vollblutes mit HgCl₂ führte in den Lymphozyten zu einer Zunahme der SCE's, während in einer anderen Studie die Inkubation von Humanlymphozyten mit Quecksilbernitrat nicht zu einer Erhöhung der SCE's führte (Morimoto et al. 1982, Rao et al. 2001). Die höchste eingesetzte, schwach zytotoxische Quecksilbernitratkonzentration führte zu einer signifikanten Erhöhung an Endoreduplikationen, möglicherweise durch eine Störung des Spindelapparates (Lee et al. 1997). Quecksilberchlorid induziert signifikant anormale Mitosen (C-Anaphasen) im Blut und hat keinen Effekt auf den Zellzyklus (Rao et al. 2001). In einigen Studien zeigten sich Hinweise auf Störungen des Spindelapparates bzw. Fehlverteilungen von Chromosomen durch Hg (II) (Vershaeve et al. 1984, Vershaeve et al. 1985, Andersen 1983).

Die humanen Zelllinien WI38 und MRC5 zeigten keine klastogenen Effekte (*De Flora et al. 1994*). Im Gegensatz dazu wurden Einzelstrangbrüche einer humanen Zelllinie nachgewiesen (*Bucio et al. 1999*).

Untersuchungen zu möglichen kanzerogenen Effekten anorganischer Quecksilberverbindungen beim Menschen liegen bislang nicht vor.

Insgesamt wirken anorganische Quecksilber-Verbindungen in bakteriellen Testsystemen nicht mutagen und in Säugerzellen nur schwach mutagen. Dieses Wirkungsprofil ist typisch für viele anorganische Metallverbindungen (*Beyersmann und Hartwig 1993*). Anorganische Quecksilberverbindungen zeigen in vitro an verschiedenen Säugerzellen sowie in einer Studie an Humanzellen klastogene Wirkweise, während andere in vitro Studien an Säugerzellen bzw. humanen Zelllinien keine klastogenen Effekte detektieren. Verschiedene Studien geben Hinweise auf Störungen des Spindelapparates durch Hg (II).

Das kanzerogene Potential anorganischer Quecksilberverbindungen ist für den Menschen nicht abschließend geklärt, und eine Beurteilung ist aufgrund der fehlenden Daten zum kanzerogenen Wirkungsmechanismus schwierig. Aufgrund unzureichender Daten zur möglichen Wirkung wird Quecksilberchlorid seitens der EU in die Kanzerogenitätskategorie K3 eingestuft. Diese Einstufung gilt auch für andere anorganische Quecksilberverbindungen.

* K3) „Stoffe, die wegen erwiesener oder möglicher krebserzeugender Wirkung Anlaß zur Besorgnis geben, aber aufgrund unzureichender Informationen nicht endgültig beurteilt werden können. Die Einstufung ist vorläufig.“

Quelle: DFG, MAK-und BAT-Werteliste 2000

1.8. Organische Verbindungen

Zunächst wurden für verschiedene organische Substanzen (Acetamid, Acetonitril, Acrylamid, Acrylnitril und Nitrobenzol) Vortests (NR-Test und BCA-Test: s. 3.4.1.-3.4.5.) durchgeführt, um zusammen mit einer Literaturrecherche zur Gentoxizität der genannten Verbindungen eine Substanz für weitere Untersuchungen auszuwählen. Die Literaturrecherche zur Gentoxizität der organischen Verbindungen sowie die Vortests führten zur Auswahl von Nitrobenzol für weitere Untersuchungen. Zusätzlich zum Nitrobenzol wurde die strukturell ähnliche Verbindung Benzonitril als weitere zu untersuchende Substanz ausgewählt.

1.8.1. Nitrobenzol

Das zu den monozyklischen Nitroaromaten gehörende Nitrobenzol zeichnet sich durch einen bitteren Geruch aus und findet u.a. Verwendung bei der Herstellung von Sprengstoffen, Farbstoffen, Pflanzenschutzmitteln und Arzneimitteln.

Nitrobenzol wird relativ schnell über die Haut und die Atemwege resorbiert (ACGIH 1996), im Organismus verteilt und teilweise im Fettgewebe gespeichert. Eine Kombination mit Alkohol scheint die Resorption zu erhöhen.

Die Metabolisierung der monozyklischen Nitroaromaten geschieht überwiegend über die Nieren und im Anschluß folgt die Elimination.

Nitrobenzol wird über Nitrosobenzol und Phenylhydroxylamin metabolisiert. Diese Metaboliten sind für die starke Methämoglobinbildung verantwortlich. Die Reduktion der Nitrogruppe zur Amino- oder N-Hydroxylaminogruppe ist für die Giftwirkung von Nitroaromaten entscheidend. Nitrosobenzol führt auch zu Hämoglobinaddukten.

Die akute Toxizität beruht beim Nitrobenzol vor allem auf der Fähigkeit zur Bildung von Methämoglobin. Nitrobenzol kann nach akuter Einwirkung zu Übelkeit, Schwindel, Blutdruckabfall, Kollaps, Lähmungserscheinungen, Bewußtlosigkeit bis hin zum Koma führen. Die Methämoglobinbildung setzt schon nach ca. 1 h ein und kann mehrere Tage anhalten. Die Folgen sind u.a. hämolytische Anämie, Ikterus, hypoxische Schäden innerer Organe und zentralnervöse Störungen.

Die chronische Einwirkung von Nitrobenzol führt zu den gleichen Symptomen wie nach akuter Einwirkung (BUA 1991). Verstärkt treten Methämoglobinbildung und Zyanose auf (Hentschler und Lehnert 1989). Chronische Vergiftungen durch Nitroaromaten führen vor allem zu Leberschäden, aber auch zu Schädigungen der Augen und des Gehörsinnes.

Einnahmen von 5-15 ml Nitrobenzol können tödlich verlaufen, es wurden aber auch schon Einnahmen bis zu 50 ml überlebt (BUA 1991).

Nach zweijähriger Verabreichung von Nitrobenzol (1-50ml/m³ bzw. 250 mg/m³) bei Ratte und Maus zeigten sich Milz, Leber, Nieren, Hoden und Nase als Haupt-Zielorgane. Die inhalatorische Verabreichung von Nitrobenzol bei Ratten und Mäusen führte zu Tumoren der Lunge, Leber, Niere, Schilddrüse, Mamma und des Uterus. Die Mechanismen der Tumorentstehung durch Nitrobenzol sind bislang unklar.

1.8.1.1. Gentoxische Wirkung von Nitrobenzol in verschiedenen Testsystemen

Zur möglichen Gentoxizität von Nitrobenzol liegen einige Befunde aus bakteriellen Testsystemen, tierexperimentelle in vivo-Daten sowie Studien an Pflanzensamen vor.

In bakteriellen Testsystemen führte Nitrobenzol im Ames-Test an verschiedenen *Salmonella typhimurium*-Stämmen teils zu negativen Resultaten (U.S. EPA 1987, Fu et al. 1985) und teilweise zu positiven Ergebnissen (Suzuki et al. 1983). In *Salmonella-typhimurium* führte Nitrobenzol (bis 2500 mg/Platte) zu negativen Testergebnissen (u.a. Anderson und Styles

1978, Garner und Nutmann 1977, Purchase et al. 1978, Suzuki et al. 1983, Vance und Levin 1984, Nohmi et al. 1984, Chiu et al. 1978). In Anwesenheit des Komutagens Norharman und S9-Mix wirkte Nitrobenzol bei *Salmonella-typhimurium* TA98 mutagen (Suzuki et al. 1983, BUA 1991), während in *Actinomyces-Stämmen* keine mutagene Wirkung detektiert wurde.

Störungen der Mitose wurden in Samen von Weizen und Flachs (Simonet und Guinochet 1939) sowie in Gerstensamen (Favorsky 1939) gefunden. Die Befunde entsprachen den Wirkungen des Spindelgiftes Colchizin. Allerdings wurden vermutlich nur toxische Dosen getestet (BUA 1991).

In vitro-Daten an CHO-Zellen führten zu negativen Resultaten bezüglich der Chromosomenaberrationen und zu positiven Ergebnissen bezüglich der Schwesterchromatidaustausche nach Inkubation mit Nitrobenzol (NTP unpublished data).

Einige in vivo-Studien über Nitrobenzol liegen ebenfalls vor. In einer Inhalationsstudie beeinflusste Nitrobenzol (0-50 ml/m³) weder die Schwesterchromatidaustausch-Rate noch die DNA-Reparatur in Milzlymphozyten männlicher Fischer-Ratten (Kligermann et al. 1983, BUA 1991). In vivo-Studien an Mäusen führten nach Applikation von Nitrobenzol (62,5/125/250 mg/kg KG) nicht zu einer Erhöhung der Mikrokernrate. Die Versuche wurden an je fünf männlichen und weiblichen B6C3F1-Mäusen durchgeführt. Weder nach 24 h noch nach 48 h waren die Mikrokern-Raten erhöht, und es fand sich auch keine Hemmung der Erythropoese (BASF 1996). Auch im Hepatozyten-DNA-Repair-Test an Ratten zeigte Nitrobenzol nach 12 h (200 mg NB/kg KG, per Schlundsonde) keine gentoxischen Effekte (Mirsalis et al. 1982, BUA 1991).

1.8.1.2. Krebs erzeugende Wirkung von Nitrobenzol

In einer Inhalations-Studie zur möglichen Kanzerogenität von Nitrobenzol wurden Fischer 344- und CD-Ratten (0-25 ml NB/m³) bzw. B6C3F1-Mäuse (0-50 ml NB/m³) über 24 Monate exponiert, und Nitrobenzol erwies sich als eindeutig krebserzeugend, wobei die Mechanismen dieser Wirkung unklar blieben (Cattley et al. 1994). Nitrobenzol induzierte in dieser Studie signifikante Erhöhungen verschiedener Tumoren bei Mäusen und Ratten. In männlichen Fischer-Ratten wurden Tumoren der Leber und Nieren gefunden, in weiblichen Fischer-Ratten Tumoren des Uterus. Männliche CD-Ratten wiesen Lebertumoren auf. Männliche B6C3F1-Mäuse wiesen erhöhte Tumorraten in Lunge und Schilddrüse, die weiblichen in der Mamma auf. Allerdings gab es hohe Verlustraten sowie falsche Zuordnungen von Tieren (CIIT 1993), wodurch die Validität der Studie als eingeschränkt gilt. In den Langzeitstudien wurden allerdings in den Tumorgeweben meist auch chronisch-toxische Veränderungen, wie beispielsweise Entzündungen gefunden. Kanzerogenität für Nitroaromaten konnte bislang nur im Tierversuch eindeutig detektiert werden.

Die IARC kam 1996 zu dem Schluß, daß Nitrobenzol nicht-gentoxisch in Bakterien ist. Für Säugerzellen gäbe es nur limitierte Daten. Insgesamt spiele die Gentoxizität für das Nitrobenzol möglicherweise nur eine untergeordnete Rolle. Es wird eine nicht-lineare Dosis-Wirkungsbeziehung für Nitrobenzol vermutet. Für die Ableitung eines MAK-Wertes lägen

zur Zeit keine geeigneten Daten vor. Nitrobenzol könne möglicherweise ein Kandidat für die Kanzerogenitätskategorie 4* der DFG sein.

*4) „Stoffe mit krebserzeugender Wirkung, bei denen genotoxische Effekte keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Bei Einhaltung des MAK- und BAT-Wertes ist kein nennenswerter Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten. Die Einstufung wird insbesondere durch Befunde zum Wirkungsmechanismus gestützt, die darauf hinweisen, daß Steigerungen der Zellproliferation oder Änderungen der Differenzierung im Vordergrund stehen. Zur Charakterisierung eines Risikos werden die vielfältigen Mechanismen, die zur Kanzerogenese beitragen können, sowie ihre charakteristischen Dosis-Zeit-Wirkungsbeziehungen berücksichtigt.“

DFG, MAK- und BAT-Werteliste 2000

1.8.2. Benzonitril

Als

strukturell mit dem Nitrobenzol verwandte Substanz wurde auch Benzonitril (BN) in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit einbezogen. Benzonitril findet Verwendung als Lösungsmittel (*Maki und Suzuki 1985*) sowie für die Herstellung von Benzylamin und Benzoguanamin. Weiterhin ist Benzonitril ein Zwischenprodukt der Herstellung von Pharmazeutika, Pestiziden und Farbstoffen.

1.8.2.1. Gentoxische Wirkung von Benzonitril in verschiedenen Testsystemen

Für Benzonitril liegen Studien in bakteriellen Testsystemen, Untersuchungen an Säugerzellen, in vivo-Studien an Säugern sowie wenige Beobachtungen am Menschen vor.

In vier unterschiedlichen Studien in *bakteriellen Testsystemen* mit verschiedenen *Salmonella-typhimurium*-Stämmen (8-5000 µg BN/Platte) ergaben sich negative Testergebnisse (*Microtest Research 1988, NCI 1984, Zeiger et al. 1988, k.w.A.*).

Untersuchungen zur möglichen Fehlverteilung von Chromosomen durch Benzonitril wurden an *Saccharomyces cerevisiae* D61M durchgeführt (bis 2190 µg/ml), und es konnten keine Chromosomenverluste detektiert werden. Bei Veränderung der Inkubation durch eine Kältebehandlung bei 0 °C (sonst konstant 30 °C) wurde hingegen ein Anstieg an Chromosomenverlusten beobachtet. Die Autoren vermuten eine Interaktion mit dem Spindelapparat (*Whittaker et al. 1990, Albertini und Zimmermann 1991*).

Im Maus-Lymphoma-Test an der *Zelllinie* L5178YTK bewirkte Benzonitril keine Erhöhung der Mutationsrate (*Microbiological Associates 1982, NCI 1984*). In CHO-Zellen fanden sich auch in zytotoxischen Konzentrationen keine Erhöhung der Schwesterchromatidaustausche

(NTP 1988 a, 1995). In einer weiteren Studie an CHO-Zellen wurden Chromosomenaberrationen nach Behandlung mit Benzonitril (200-3000 µg/ml) mit und ohne metabolische Aktivierung untersucht. Ohne metabolische Aktivierung gab es keine Erhöhung der Chromosomenaberrationen, während es bei metabolischer Aktivierung in nicht zytotoxischen Konzentrationen (1500 µg/ml) zu einer Erhöhung der Chromosomenaberrationen (72% CA gegenüber 3% der DMSO-Kontrollen) kam. Allerdings konnte dieses Ergebnis in einem Wiederholungsversuch nicht bestätigt werden, und es fanden sich hier lediglich 11% Chromosomenaberrationen gegenüber 3% Chromosomenaberrationen der Kontrolle.

In einer weiteren Studie führte eine 30-minütige Inkubation mit 25 mM Benzonitril in Humanlungenfibroblasten im Vergleich zur Kontrolle zu Schädigungen der Zellmembran (Curvall et al. 1984).

In vivo führte ein 13-wöchiger Versuch an B6C3F1-Mäusen (täglich 0/37,5/75/150/300 bzw. 600 mg BN/kg KG per Schlundsonde) auch in der höchsten Dosis nicht zu einer erhöhten Mikronukleus-Rate in den Erythrozyten (o.w.A, NTP 1995).

Einige Beobachtungen an *Arbeitern*, die mit Benzonitril in Kontakt kamen, liegen vor. Es wurden vor allem Hautveränderungen nach Kontamination mit Benzonitril beobachtet (Zeller et al. 1969, BASF 1994, k.w.A.). Über einen Zeitraum von 13 Jahren und acht Monaten wurden bei Arbeitern, die häufig mit Benzonitril umgingen, keine Hautreizungen, Blutbildveränderungen, Allergien oder sonstige Krankheiten festgestellt, die mit dem Benzonitril in Zusammenhang stehen könnten (SKW 1994, k.w.A.).

Insgesamt ist auch für Benzonitril die Datenlage bezüglich der möglichen Gentoxizität unzureichend. Ein MAK-Wert für Benzonitril ist zur Zeit nicht festgelegt (1997).

1.9. Alkohole

Alkohole finden Verwendung als Lösungsmittel, Reinigungsmittel, als Ausgangsstoffe chemischer Synthesen sowie als Genußmittel. Die Alkohol-Aufnahme geschieht hauptsächlich oral, aber auch inhalativ und gelegentlich dermal. Im Vordergrund bei den durch Alkohole induzierten Effekten steht die Neurotoxizität vieler Alkohole, die hauptsächlich auf Membranfunktionsstörungen beruhen.

1.9.1. Butanol

1-Butanol wird aus Mineralöl isoliert. In einigen Lebensmitteln und Getränken kann Butanol in geringen Anteilen enthalten sein. Auch in Reinigungsmitteln, Lösemitteln, Extraktionsmitteln und in Parfums findet sich häufig Butanol. Die hauptsächliche Aufnahme

höherer Butanol-Konzentrationen geschieht an Arbeitsplätzen wie z. B. in der Textilverarbeitung oder der Glasersatzproduktion. Die Resorption über den Magen, die Lunge oder die Haut erfolgt sehr schnell.

Akute Vergiftungen durch Butanol führen zu Symptomen, die mit der Wirkung von Ethanol zu vergleichen sind, allerdings ist die Stärke der toxischen Wirkung für Butanol sechsmal höher als beim Ethanol. Die Aufnahme einer hohen Butanol-Dosis führt u.a. zu Kopfschmerzen, Tremor, Erschöpfung, Schwindel, Erbrechen und Dehydrierung. Vergiftungen mit Butanol können zu Hyperanämie in Leber und Niere sowie zu Veränderungen des Blutbildes (Abnahme der Erythrozyten und Zunahme der Lymphozyten) führen. Butanol in der Luft führt beim Menschen vor allem zu Augenreizungen, Kopfschmerzen, Benommenheit oder zur Narkose.

Die Datenlage bezüglich des mutagenen oder kanzerogenen Potentials von Butanol ist insgesamt unzureichend.

1.9.2. Hexanol

Hexanol ist klar, farblos und riecht charakteristisch. In der Natur kommt Hexylalkohol in den Samen und Früchten des Bärenklaus (*Heracleum sphondylium L.*) vor. 1-Hexanol ist synthetisch herstellbar und wird vor allem in der Parfümerie als Nuancierungsmittel verwendet. Weiterhin wird 1-Hexanol in der chemischen Industrie als Lösungsmittel für verschiedene Harze, Schellack und Leinöl verwendet und ist Zwischenstufe bei der Synthese von Weichmachern, Schmiermitteln, Tensiden, Antiseptika und Arzneimitteln.

1.9.3. Die These von Schultz und Önfelt

Schultz und Önfelt (2000) beschreiben, daß viele organische Verbindungen einen Einfluß auf die Segregation der Chromosomen hätten, und zwar hauptsächlich aufgrund hydrophober Wechselwirkung (WW) mit der Mitosespindel. Es wird ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser und dem negativen Logarithmus der Substanzkonzentration, für die eine Verdopplung der Spontanrate an binukleären Zellen (BIN) nach 24 h Inkubation mit unterschiedlichen organischen Verbindungen in V79-Zellen vorliegt, angenommen (Abb. 15). Spezifische Inhibitoren wie z.B. Colcemid seien schon in viel geringeren Konzentrationen als erwartet wirksam. Somit könne eine Aussage gemacht werden, ob ein spezifischer Wirkungsmechanismus einer Substanz vorliegt, oder der Befund aufgrund hydrophober Wechselwirkungen entstanden sein könnte. Alkohole und alipatische Verbindungen unterschiedlicher Lipophilie gingen in die zugrunde liegenden Untersuchungen von *Schultz und Önfelt* ein.

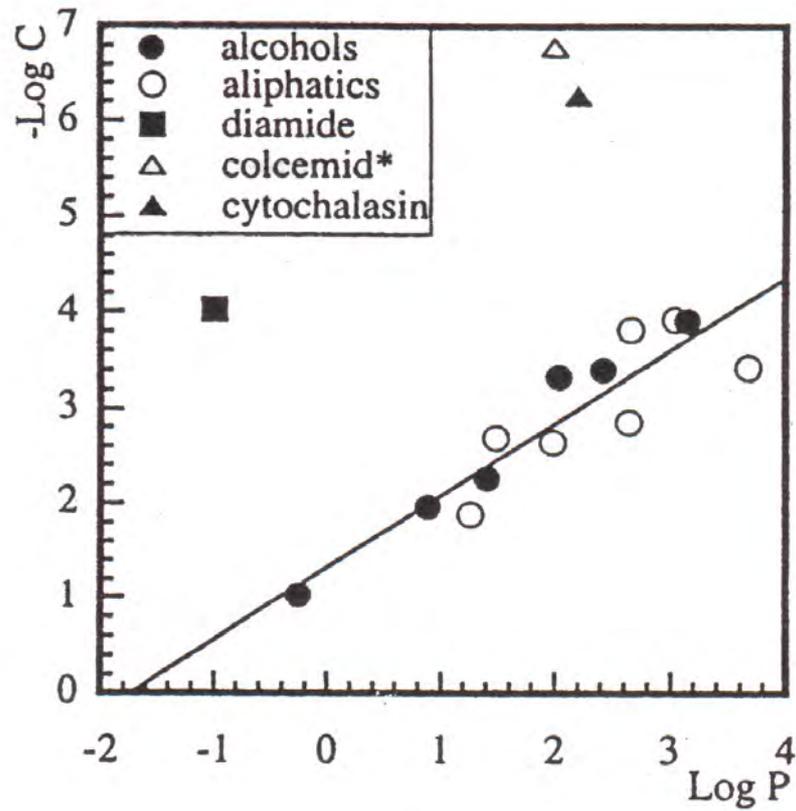


Abb. 15: Zusammenhang zwischen der Konzentration C , die eine Verdopplung der BIN-Spontanrate nach 24-stündiger Inkubation in V79-Zellen induziert, und dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten P der Testsubstanzen in Octanol/Wasser. Die verwendete Colcemid-Konzentration führte zu einer zehnfachen Erhöhung der binukleären Zellen (Schultz und Önfelt 2000).

1.10. Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Entstehung zweier genetisch identischer Tochterzellen sowie die vollständige Weitergabe eines gesunden Genoms sind für eine erfolgreiche Zellteilung essentiell. Zytoskelettproteine wie z.B. das Tubulin sind in eukaryotischen Zellen an Prozessen der Zellteilung beteiligt und Störungen oder Schädigungen von Zytoskelettproteinen können den korrekten Ablauf der Mitose und die Segregation der Chromosomen beeinträchtigen.

Anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen sowie die organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzotrinitril wurden für die hier vorliegenden Untersuchungen vor allem im aktuellen Bezug auf deren mögliche Gentoxizität und Zytotoxizität ausgewählt.

Mit Hilfe des Mikronukleus-Tests und der CREST-Analyse in V79-Zellkulturen können Daten zur Gentoxizität der ausgewählten Verbindungen gewonnen werden. Mit Hilfe der CREST-Analyse soll zusätzliche Information über den Entstehungsmechanismus der Mikronuklei durch die Testsubstanzen gewonnen werden. Der Neutralrottest dient der Abklärung der Zytotoxizität der gewählten Substanzen.

Die mögliche Beeinflussung des Zytoskeletts durch die hier ausgewählten anorganischen und organischen Verbindungen wurden parallel zu dieser Arbeit auch im Institut für molekulare Biotechnologie, Jena untersucht.

Da die Datenlage hinsichtlich der Gentoxizität für anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen nicht eindeutig ist, soll dieser Aspekt im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Die gentoxische Wirkung von Blei könnte die Konsequenz indirekter Mechanismen sein, z.B. durch die Interaktion mit Proteinen. Verschiedene Studien über Hg (II) geben Hinweise auf Störungen des Spindelapparates.

Für die ausgewählten organischen Stoffe Nitrobenzol und Benzotrinitril liegt insgesamt nur relativ wenig Literatur vor. Die Datenlage bezüglich der möglichen Gentoxizität von Nitrobenzol und Benzotrinitril ist unzureichend, und es liegen keine *in vitro* Studien bezüglich der Induktion von Mikrokernen durch Nitrobenzol oder Benzotrinitril vor. Die Frage der chromosomalen Gentoxizität der beiden organischen Verbindungen bleibt offen und soll in dieser Arbeit ebenfalls untersucht werden.

Weiterhin wurden Mikrokern-Untersuchungen in Anlehnung an die Publikation von *Schultz und Önfelt* (2000) durchgeführt. In dieser Publikation wird für viele organische Verbindungen ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser und dem negativen Logarithmus der Substanzkonzentration, für die eine Verdopplung der Spontanrate binukleärer Zellen in V79-Zellen vorliegt, angenommen. Substanzen mit spezifischer Wirkung seien schon in viel geringeren Konzentrationen wirksam. Es könne eine Aussage gemacht werden, ob ein spezifischer Wirkungsmechanismus einer Substanz vorliegt, oder der Befund aufgrund hydrophober Wechselwirkungen entstanden sein könnte.

Es war zu prüfen, wie sich die in der vorliegenden Arbeit untersuchten organischen Verbindungen Nitrobenzol, Benzonitril, Methylmethansulfonat und Vinkristin in den bei *Schultz und Önfelt* beschriebenen Zusammenhang einordnen lassen. Zusätzlich sollten zwei Alkohole (Butanol und Hexanol), die auch bei *Schultz und Önfelt* untersucht wurden, näher im Mikrokern-Test untersucht werden. Dies könnte Aufschluß über die Vergleichbarkeit der beiden unterschiedlichen Testmethoden (Induktion binukleärer Zellen bei *Schultz und Önfelt* bzw. Induktion von Mikronuklei in der vorliegenden Arbeit) geben.

Insgesamt soll die vorliegende Arbeit näheren Einblick in Wirkmechanismen der chromosomalen Gentoxizität verschiedener Substanzen liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Reagenzien

Acetamid	Fluka (über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Aceton	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acetonitril	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acrylamid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acrylnitril	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Acridinorange	Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
BCA-Reagenz A „Uptima“	Interchim (Mannheim, Deutschland)
BCA-Reagenz B „Uptima“	Interchim (Mannheim, Deutschland)
BCA-Standard 2 mg/ml	Interchim (Mannheim, Deutschland)
Benzonitril	Riedel-de-Haen (über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)
Bleiacetat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bleichlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Bleinitrat	Riedel-de-Haen (über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)
DAPI	Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dinatriumphosphat (Na_2HPO_4) + 2 H ₂ O	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Dulbecco's MEM	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Eisessig ($\geq 99,7\%$)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Ethanol, 70%	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Fötale Kälberserum	Biochrom (Darmstadt, Deutschland)
KH ₂ PO ₄	Merck (Darmstadt, Deutschland)
L15 Medium (Leibowitz)	Invitrogen (Karsruhe, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Methylmethansulfonat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumcitrat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Neutralrot	Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Nitrobenzol	Fluka (über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Phos. Buffered Saline (PBS), 10-fach	Gibco (Eggenstein, Deutschland)
Potassium Chloride	Fluka (über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Propidiumjodid	Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Quecksilberchlorid	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Quecksilbernitrat	Riedel de Haen (über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D)
Triton	Fluka (über Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Trypanblau, steril	Serva (Heidelberg, Deutschland)
Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin in PBS, 0,02% EDTA)	Invitrogen (Karsruhe, Deutschland)
Tween20	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Vinkristin	Sigma (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

2.2. Verwendete Antikörper

- „pos. control centromere serum“ („CREST-Serum“, DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland, Best. Nr.: 15-134)
- Anti-Human IgG F (ab)₂. FITC, sec. Antikörper (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

2.3. Geräte und Verbrauchsmaterial

Analysenwaage AE 240	Mettler (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Auswerteprogramm „Tecan“	Tecan Austria Gesellschaft MBH (Grödig, Salzburg, Austria)
Autoklav „Varioklav Typ 500“	H+P Labortechnik (Oberschleißheim, Deutschland)
CO ₂ -Brutschrank Typ BB16 „Function Line“	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Digitale Kamera DSC-S85	Sony (Köln, Deutschland)
Einmalspritzen, steril, pyrogenfrei, 10 ml/25 ml	Millipore (Eschborn, Deutschland)
Fluoreszenzmikroskop DMLB	Leitz (Wetzlar, Germany)
Fluoreszenzmikroskop DM RB	Leitz (Wetzlar, Germany)
Filter: I3, blau/N2.1, grün/A, UV	Leitz (Wetzlar, Germany)
Filter: FITC	Leitz (Wetzlar, Germany)
Gefrierschrank, -20 °C, „Öko Plus“	Siemens (München, Deutschland)
Gefrierschrank, -70 °C „Ult Freezer 994“	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Heizplatte	Karl Hecht Assistant KG (Sondheim/Röhn, Deutschland)
Kühlschränke	diverse Hersteller
Laminar Flow, Air ELB 2448	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Lichtmikroskop 403028	Zeiss (Jena, Germany)
Magnetrührer	Heidolph (Kelheim, Germany)
Megafuge 1,0 R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mikrotiterplatten, 96 well	Costar (über VWR International, Bruchsal, Deutschland)
Mikrotiterplatten, 96 well, low evaporation	Costar (über VWR International, Bruchsal, Deutschland)
Neubauer Zählkammer	Karl Hecht Assistant KG (Sondheim/Röhn, Deutschland)
Objektträger (76*26 mm) + Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig, Deutschland)
Objektträger: Chamber Slide System, 16 well	Merk (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter MR2000	Heidolph (Kelheim, Germany)
Plattenphotometer 340 ATC	SLT Labinstruments (Crailsheim, Deutschland)
Pipetten mit Spitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg, Germany)
Präzisionswaage PB 602	Mettler (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Quadripermschalen	Viva Science (Hannover, Deutschland)
Schüttler „Orbital Shaker S03“	Stuart Scientific, Dunn Labortechnik (Asbach, Deutschland)
Schüttler MTS2	IKA (Staufen, Deutschland)
Sterilfilter	Millipore (Eschborn, Deutschland)
Transferpipetten, steril	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Videokamera, digital, S/W, PE 2020P	Pulnix (Alzenau, Deutschland)
Videokamera, digital, Farbe „Donpisha“	Sony (Köln, Deutschland)
Vortex „Reamix 2789“	Hartenstein (Würzburg, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen, 12 ml, steril	Greiner GmbH (Frickenhausen, Deutschl.)
Zentrifugenröhrchen, 50 ml, steril	Greiner GmbH (Frickenhausen, Deutschl.)
Zellkulturflaschen, 25, 75, 185 ml	Greiner GmbH (Frickenhausen, Deutschl.)

2.3.1. Weitere Verbrauchsmaterialien

Aluminiumfolie, Bechergläser, Einmalhandschuhe, Einmaltransferpipetten, Eppendorfgefäße (1 ml), Falcon-Röhrchen, Glasgefäße, Kryogefäße (2 ml), Pasteurpipetten, Parafilm, Schraubdeckelgläser, Zentrifugenröhrchen

2.4. Lösungen, Puffer

2.4.1. Zellkultur

Trypanblau-Lösung

Trypanblau 1:10 in PBS

2.4.2. MN-Test

Acridinorange-Färbelösung

Stammlösung: 1 mg/ml A. dest.

Gebrauchslösung

- 7 ml 0,3 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 7 ml 0,3 M KH_2PO_4
- 5 ml Stammlösung (s.o)
- ad 80 ml A. dest.

Methanol-Eisessig-Fixativ

Das Fixativ wird am Nachmittag vor der Präparation unmittelbar zuvor im Verhältnis 3+1 (3 Teile Methanol + 1 Teil Eisessig) hergestellt und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

KCl

Ebenfalls am Nachmittag vor der Präparation wird eine sterile, 0,4%ige KCl-Lösung in A. dest. hergestellt und über Nacht bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.4.3. NR-Test

Neutralrot-Stammlösung

- 40 mg Neutralrot + 10 ml A. dest.
- ca. 1 h im Wasserbad schütteln. Anschließend lichtdicht im Kühlschrank aufbewahren
- ca. 4 Wochen haltbar

Neutralrot-Gebrauchslösung (für 6 Platten):

- 100 ml Medium + 1250 μl NR-Stammlösung durch Schwenken mischen
- im Erlenmeyer-Kolben mit leicht geöffneter Alufolie abdecken
- ca. 17-18 h im Brutschrank bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ vorinkubieren

Fixierlösung für den Neutralrottest:

- 50% Ethanol
- 1% Essigsäure
- A. dest.

2.4.4. BCA-Test

BCA-Reagenz:

- 50 Teile BCA-Reagenz A „Uptima“
- 1 Teil BCA-Reagenz B „Uptima“
- 24 h haltbar

2.4.5. CREST-Analyse

Lösung A: 1/3 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Lösung B: 1/3 M KH_2PO_4

Soerensen-Puffer (pH 6,8)

- 5 ml Lösung A
- 5 ml Lösung B
- ad 100 ml A. dest.

CREST-Färbelösung:

- 1 $\mu\text{g/ml}$ DAPI
- 0,1 mg/ml Propidiumiodid
- DAPI/Propidiumiodid 3:1 gemischt

2.4.6. DAPI-Test

DAPI-Stammlösung: 1 mg/ml (in A. bidest.)

- bei -20°C lagern, 12 Monate haltbar

Arbeitslösung: 1 $\mu\text{g/ml}$

- Stammlösung mit Methanol verdünnen
- bei $2-8^\circ\text{C}$ lagern, 6 Monate haltbar

2.5. Zellkultur

2.5.1. Verwendete Zellen: V79-Zelllinie

Die in dieser Arbeit verwendete permanente Zelllinie V79 ist von transformierten Fibroblasten eines männlichen, chinesischen Hamsters abgeleitet. Die verwendeten V79-Zellen besitzen eine hohe genomische Stabilität (22 Chromosomen pro Metaphase) und eine durchschnittliche Zellzyklusdauer von 12 Stunden (*Speit et al. 1994/Schempp und Vogel, 1979*).

Zur Kultivierung der V79-Zellen wird üblicherweise Dulbecos MEM (DMEM) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) verwendet. Dieses Zellkulturmedium enthält 3,7 g/l NaHCO₃, 1g/l D-Glucose sowie L-Glutamin. Diese Zusammensetzung erlaubt eine gute Proliferation der Zellen. FCS liefert Hormone, Aminosäuren und anorganische Salze. Die Zellen werden in speziellen Kulturflaschen aus Kunststoff im Brutschrank bei 37°C und 5%iger CO₂-Begasung kultiviert. Zusätzlich besteht interne Raumbefeuchtung. Die Deckel der Kulturflaschen werden im Brutschrank leicht geöffnet oder enthalten luftdurchlässige Silikonstopfen, um eine kontinuierliche Gaszufuhr zu erreichen. Alle Versuche mit leicht flüchtigen Substanzen (z.B. Nitrobenzol und Benzotrinitril) wurden mit L-15-Medium (Leibowitz) anstelle des DMEM durchgeführt. Das Leibowitz-Medium ermöglicht ein vollständiges Verschließen der Flaschen. Dem L-15-Medium werden für die Versuche ebenfalls 10% FCS zugesetzt.

2.5.2. Passagieren der Zellen

Zum Passagieren der Zellen wird zunächst das Kulturmedium abgesaugt und kurz mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (0,25% Trypsin und 0,02% EDTA) gespült. Der Flaschenboden sollte kurzzeitig vollständig mit Trypsin benetzt sein (2,5-5 ml Trypsin, je nach Flaschengröße), um das Medium auszuwaschen, da geringe Medienspuren die Trypsinwirkung beeinträchtigen können. Anschließend werden 2,5-5 ml Trypsin (je nach Flaschengröße) auf die Zellen gegeben und die Flaschen verschlossen. Der Trypsinierungsprozeß wird unter dem Phasenkontrastmikroskop verfolgt. Sobald sich die meisten Zellen vom Flaschenboden gelöst und eine kugelige Gestalt angenommen haben (nach ca. 3-5 Minuten), wird Medium mit 20% FCS zugegeben, wodurch der Trypsinierungsprozeß gestoppt wird. Die Zellen werden in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Minuten zentrifugiert (209 g). Anschließend wird das Pellet in 5 ml Medium aufgenommen und resuspendiert.

2.5.3. Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl werden 100 µl Zellsuspension in einem Eppendorfgefäß mit 900 µl Trypanblau vermischt (Vortex). Der Azofarbstoff Trypanblau dient der Abklärung der Lebensfähigkeit von Zellen (Vitalfärbung). Trypanblau färbt tote Zellen an (Trypanblau-positiv), die somit von den lebenden, ungefärbten Zellen unterscheidbar sind. Das Zell-Trypanblaugemisch wird in eine Neubauer-Zählkammer mit definiertem Volumen (10 µl) gegeben, und die Zellzahl kann mit Hilfe eines Lichtmikroskops ermittelt werden. Es werden vier Zählzellen mit jeweils 16 Quadraten ausgezählt. Zellklumpen sowie komplett blau gefärbte Zellen (tote Zellen) werden nicht gezählt. Anschließend wird der Mittelwert (MW)

der Zellzahl der vier Quadrate bestimmt, und daraus die Zellanzahl pro ml unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors errechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{MW} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4$$

2.5.4. Einfrieren der Zellen

V79-Zellen werden in sterilen Eppendorfgefäßen mit jeweils 10% DMSO zunächst für ca. eine Stunde bei -20°C und anschließend bei -70°C eingefroren. Die Zellpassage wird jeweils notiert. In dieser Arbeit wurde mit Zellpassagen Nr. 7 bis 16 gearbeitet. Werden die Zellen eine längere Zeit nicht benötigt, werden sie in flüssigem Stickstoff gelagert.

Für jede zu testende Substanz werden jeweils vor Versuchsbeginn ausreichend V79-Zellen derselben Passage eingefroren, um für die verschiedenen Testmethoden und Versuchsansätze möglichst gleiche Bedingungen zu schaffen. Die Zellpassagen waren: Bleichlorid (P7), Bleiacetat (P8), Quecksilberchlorid (P11), Quecksilbernitrat (P11), organische Verbindungen, Vortests (P9), Nitrobenzol (P12), Benzonitril (P13), Hexanol und Butanol (P16).

2.6. Testmethoden

Alle nicht gut wasserlöslichen Substanzen wie z.B. Nitrobenzol und Benzonitril werden für jeden Versuchsansatz in 100%igem DMSO gelöst und mit Medium aufgefüllt, so daß sich für die MN-Tests und die CREST-Analysen jeweils Endkonzentrationen von 0,04% DMSO ergaben, während im Neutralrottest Endkonzentrationen von 0,4% DMSO verwendet wurden, um auch bei schwer löslichen Substanzen etwas höhere Konzentrationen testen zu können. Die beiden gewählten DMSO-Endkonzentrationen wurden nach Vortests (Zytotoxizitätstest, s. 3.2.1.1. bzw. MN-Test, s. 3.2.1.3.) ausgewählt, da 0,4% DMSO nicht zytotoxisch wirkt und 0,04% DMSO keine höhere MN-Rate im Vergleich zur Mediumkontrolle hervorruft. Hexanol zeigte sich ebenfalls als nicht vollständig wasserlöslich und wurde deshalb in Ethanol gelöst und im Anschluß daran in Kulturmedium so weiterverdünnt, daß sich Endkonzentrationen von 0,04% Ethanol in den Versuchsansätzen ergaben.

2.6.1. Zytotoxizitätstest mit Neutralrot

2.6.1.1. Einleitung und Prinzip

Der Neutralrottest basiert auf der Fähigkeit lebender Zellen Neutralrot (NR) zu inkorporieren und zu binden. Neutralrot ist ein Farbstoff, der Zellmembranen durch Diffusion penetriert und intrazellulär in den Lysosomen akkumuliert. Veränderungen der Zelloberfläche oder der

Sensitivität lysosomaler Membranen führt zu irreversiblen Veränderungen. Schädigen toxische Substanzen die Zelle gering, kann es zunächst durch eine Stoffwechselaktivierung zu einer vermehrten Einlagerung von Neutralrot kommen. Ansteigende Konzentrationen führen zu Stoffwechselschädigungen, und die Neutralrotaufnahme und -einlagerung wird reduziert. Schließlich folgt der Zelltod. Der von den Lysosomen aufgenommene Farbstoff wird im Rahmen des NR-Tests aus den Zellen rückgelöst, und die Farbintensität im Photometer bei 540 nm bestimmt.

Jede zu testende Substanz wird zunächst im Neutralrottest auf Zytotoxizität überprüft, um die Versuche in den weiteren Tests immer unterhalb zytotoxischer Konzentrationen durchführen zu können.

2.6.1.2. Durchführung

Die Zellen werden wie gewohnt abtrypsiniert (s. 2.5.2.), zentrifugiert, resuspendiert und gezählt (s. 2.5.3.). Anschließend werden die Zellen auf 96-Well-Platten ausgepflanzt, wobei in jedes Well ca. 10.000 V79-Zellen in 200 µl Medium kommen. In die Reihen 1 und 2 (s. Abb. 16) werden keine Zellen gegeben, da diese Reihen für Leerwerte und Standards der sich anschließenden Proteinbestimmung frei bleiben. Die Zellen werden über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert.

Für flüchtige Substanzen, wie Acrylnitril, Acetonitril, Nitrobenzol oder Benzonitril werden 96-Well-Platten „low evaporation“ verwendet.

Die Inkubation der Testsubstanzen (in 200 µl Medium pro Well) sowie der Lösemittel- oder Mediumkontrolle (jeweils 200 µl/Well) schließt sich nach dem Anwachsen der Zellen über Nacht (24 h) an. Reihe 12 bleibt während der Substanzinkubation leer und dient als Wachstumskontrolle. In jedes Well der Reihe 3 kommen 200 µl Medium. In Reihe 6 kommt die Lösemittelkontrolle, z.B. 0,4% DMSO (in je 200 µl Medium). In die Reihen 4 und 5 sowie 7 bis 11 kommen die Testsubstanzen in aufsteigender Konzentration, wobei die niedrigste zu testende Konzentration in Reihe 4 gegeben wird. Die Zellen werden entsprechend dem MN-Test für 18 h bei 37°C mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Zellkulturbedingungen und die Substanzbehandlung entsprechen in dieser Arbeit denen der MN-Tests. Es wurden für die aufgeführten Substanzen folgende Endkonzentrationen eingesetzt, um den Konzentrationsbereich der Zytotoxizität abzuklären:

Substanz	Endkonzentrationen
Acetamid	0,1 / 1 / 10 / 100 / 250 / 500 / 1000 / 5000 mM
Acetonitril	0,1 / 1 / 10 / 50 / 100 / 500 mM
Acrylamid	0,01 / 0,1 / 1 / 10 / 100 / 1000 / 2000 mM
Acrylnitril	0,001 / 0,01 / 0,1 / 1 / 10 / 100 / 1000
Bleiacetat	1 / 10 / 100 / 200 / 250 / 500 / 1000 µM
Bleichlorid	1 / 10 / 100 / 200 / 250 / 500 / 1000 µM

Benzonitril	0,1 / 0,5 / 1 / 10 / 100 / 500 / 1000 μM
DMSO	0,01 / 0,04 / 0,1 / 0,4 / 0,8 / 1 / 10 / 20 / 40 %
Nitrobenzol	1 / 10 / 100 / 500 / 1000 μM
Quecksilberchlorid	0,1 / 1 / 5 / 10 / 15 / 16 / 17 / 18 / 18,5 / 19 / 29 / 25 / 30 / 50 μM

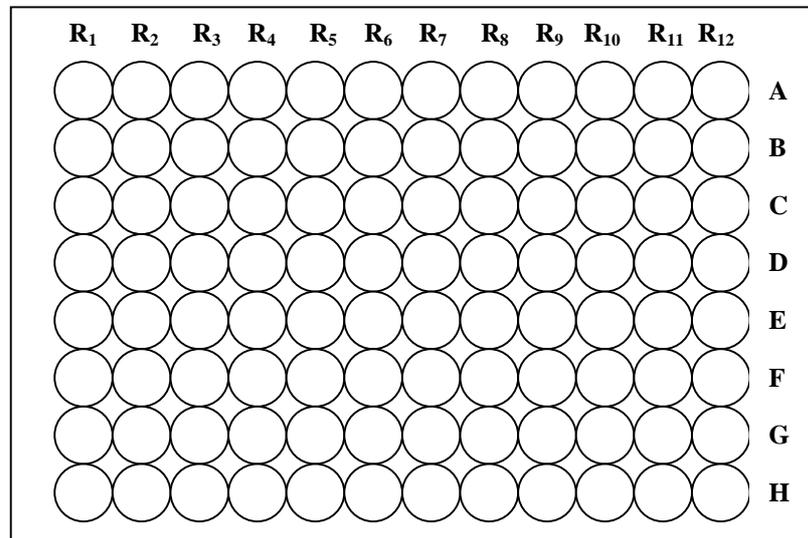


Abb. 16: Beispiel einer Plattenbelegung im Neutralrottest: R₃: Medium, R₄ und R₅ sowie R₇ bis R₁₁: Substanzen in aufsteigender Konzentration, R₆: Lösemittelkontrolle, R₁₂: Wachstumskontrolle

Nach 18 stündiger Substanzinkubation werden die Substanzen vorsichtig abgegossen, und es werden 200 μl der NR-Gebrauchslösung (s. 2.4.3.) pro Well der Reihen 3-11 aufgetragen. Die Zellen werden für 3 Stunden bei 37°C im Brutschrank mit der Neutralrotlösung inkubiert. Anschließend wird die NR-Lösung abgegossen, und die Reihen 3-11 werden fünfmal mit warmem PBS-Puffer (1-fach konzentriert) gespült. Danach kommen in jedes Well der Reihen 3-12 exakt 200 μl NR-Fixierlösung (2.4.3.), und zur restlosen Lösung des Farbstoffs kommen die Platten für 20 Minuten auf den „Schüttler“ (600 rpm). Eine photometrische Messung im Plattenreader bei 540 nm mit dem Programm „Tecan“ schließt sich an.

2.6.1.3. Auswertung

Jeder NR-Versuch wird mindestens einmal repliziert. Das Programm „Tecan“ berechnet nach Abzug der Leerwerte die jeweiligen Mittelwerte und Standardabweichungen der Meßdaten jeder Reihe. Die Versuche zu jeder untersuchten Konzentration einer Substanz werden zusammengefaßt, und die erhaltenen Extinktionswerte werden umgerechnet in Prozent (NR%). Hierbei wird die Mediumkontrolle gleich 100% Neutralrot gesetzt, und alle übrigen Werte entsprechend berechnet. Der Neutralrotgehalt in Prozent sowie die Konzentrationen werden in einer Grafik aufgetragen. Anhand der Grafiken läßt sich, je nach Kurvenverlauf, der IC₅₀ ermitteln, also diejenige Konzentration, bei der lediglich noch 50% der Zellen lebensfähig sind.

Direkt im Anschluß an die NR-Messung kann die BCA-Aufarbeitung erfolgen.

2.6.2. Proteinbestimmung mit Hilfe des BCA-Tests

Parallel zur Neutralrotaufnahme kann die Anzahl der inkubierten Zellen als Proteinwert ermittelt werden. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit Hilfe des BCA (bicinchoninic acid) Reagenz. Die Reaktion ist eine Kombination der Biuret-Reaktion und dem wasserlöslichen Natriumsalz der Bicinchoninsäure, einem sehr spezifischen Nachweisreagenz für Kupfer. Bei der Biuret-Reaktion wird zweiwertiges Kupfer zu einwertigem reduziert und ein stabiler Farbkomplex gebildet, und zwar durch die Interaktion zweier BCA-Moleküle mit einem Cu^+ -Ion. Der purpurfarbene Farbkomplex ist photometrisch quantifizierbar (*Smith et al. 1985*).

2.6.2.1. Durchführung

Die Reihen 3 bis 12 werden fünfmal mit warmem PBS-Puffer gespült, und anschließend wird die Platte gut ausgeklopft. Zur Proteinlösung wird 0,1%iges Triton (in A. dest.) auf die Zellen gegeben, und zwar 10 μl pro Well. Die Platten werden mit Alufolie umwickelt und für mindestens 30 Minuten bei -70°C eingefroren. Die Zellen werden unter dem Mikroskop betrachtet und müssen „zerrissen“ aussehen. Die zuvor mit Triton behandelte Platte wird aufgetaut, und in die Wells der Reihen 1 und 2 werden jeweils 10 μl der BCA-Standards wie folgt pipettiert: in je zwei Wells wird eine Standard-Konzentration in absteigender Konzentration gegeben. In die Wells A und B der Reihe 1 kommen jeweils 2 mg/ml, in die Wells C und D je 1mg/ml, in E und F je 0,8 mg/ml, in die Wells G und H je 0,6 mg/ml. In die Wells A und B der Reihe 2 kommen je 0,4 mg/ml, in C und D je 0,2 mg/ml und in E und F wird 0,1%iges Triton (je 10 μl) als Leerwert gegeben. Das frisch angesetzte BCA-Reagenz (2.4.4.) wird anschließend in alle Wells der Reihen 1 bis 12 gegeben (200 μl /well), und es schließt sich eine 30 minütige Inkubation bei 37°C im Brutschrank an. Die Proteinmessung erfolgt im Plattenreader bei 570 nm.

2.6.2.2. Auswertung

Die anschließende Auswertung erfolgt wie unter 2.6.1.3. zur Auswertung des Neutralrot-Tests beschrieben, wobei hier statt des NR-Gehaltes der Proteinwert in Prozent ermittelt wird.

2.6.3. Mikronukleus-Test an V79-Zellen

2.6.3.1. Durchführung

Die Durchführung des in dieser Arbeit eingesetzten Mikronukleus-Tests erfolgte in Anlehnung an die Methoden nach *Matsuoka et al. 1992* und *von der Hude et al. 2000*. Für den MN-Test werden für jede zu testende Substanz pro Versuchsansatz ca. 300.000 Zellen in eine 25 cm² Zellkulturflasche gegeben, die insgesamt genau 5 ml Medium enthält und bei 37°C im CO₂-Brutschrank inkubiert wird. Es werden pro Versuch bis zu 10 Zellkulturflaschen parallel angesetzt. Nach 24 h wird das Medium gewechselt. Weitere 24 h später erfolgt die Substanzbehandlung, wobei jeder Kulturflasche 50 µl der Testsubstanz in Medium zugefügt werden. Die Testsubstanzen werden zuvor so mit Medium verdünnt, daß nach Zugabe von 50 µl einer bestimmten Konzentration jeweils die gewünschten Endkonzentrationen in den Zellkulturflaschen erreicht werden. Als Negativkontrolle werden 50 µl Medium eingesetzt, während für die Positivkontrollen Methylmethansulfonat (MMS) bzw. Vinkristin (VCR) verwendet werden, wobei 10, 25 und 50 µg/ml MMS bzw. 2 nM, 5 nM und 10 nM VCR hierbei mögliche Endkonzentrationen sind. Für jeden Versuch wurde mindestens eine Positivkontrolle eingesetzt, vorzugsweise 10 nM VCR oder 25 µg/ml MMS.

2.6.3.2. Verwendete Substanzen und zugehörige Endkonzentrationen

Substanz	Endkonzentrationen
Bleiacetat	0,01/ 0,02/ 0,025/ 0,03/ 0,04/ 0,05/ 0,1/ 0,2/ 0,5/ 1/ 5/ 10/ 50/ 100/ 200 µM
Bleichlorid	0,036/ 0,18/ 0,36/ 0,72/ 1,1/ 1,44/ 1,62/ 1,8/ 3,6/ 4,5/ 7,2/ 18/ 36/ 180/ 360 µM
Benzonitril	0,001 / 0,005* / 0,01 / 0,05 / 0,01 / 0,1 / 1 / 10 / 100 µM
DMSO	0,04% / 0,4%
Butanol	-log 2,6 / -log 2,3 / -log 2,0 / -log 1,3 *
Hexanol	-log 3,9 / -log 3,6 / -log 3,3 / -log 3,0 *
MMS	10 / 25 / 50 / 75 / 100 µg/ml
Nitrobenzol	0,001 / 0,01 / 0,05 / 0,01 / 0,1 / 1 / 10 / 100 µM
Quecksilberchlorid	0,005 / 0,01 / 0,03 / 0,05 / 0,1 / 0,5 / 1 / 5 / 10 µM
Quecksilbernitrat	0,005 / 0,01 / 0,1 / 1 / 10 µM
VCR	0,5 / 1 / 2 / 5 / 10 nM

* lediglich 4 000 Zellen ausgewertet, c: Konzentration (M)

Nach Zugabe der Substanzen werden die Zellen für 18 Stunden im CO₂-Brutschrank bei 37°C inkubiert. Diese Zeit entspricht bei V79-Zellen 1,5 Zellzyklen, d.h. nach dieser Zeit sollten sich die Zellen je einmal geteilt haben.

2.6.3.3. MN-Aufarbeitung

Nach 18 stündiger Substanzbehandlung werden die Zellen wie oben beschrieben mit 2,5 ml Trypsin vom Flaschenboden gelöst und nach Abstoppen des Trypsinierungsprozesses (s. 2.5.2.) in 12 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1000 U/min (209 g) fünf Minuten zentrifugiert. Anschließend wird der Überstand bis auf einen kleinen Rest abgesaugt, und das Sediment in dem noch vorhandenen Medium mit einer sterilen Einwegpipette vorsichtig resuspendiert. Es folgt eine hypotone Behandlung der Zellen mit je 5 ml, 4°C kalter, 0,4%iger KCl-Lösung. Nach erneuter Zentrifugation (209 g, 10 Min) wird wiederum der Überstand bis auf einen Rest abgenommen, und die Zellen werden klopfend resuspendiert. Zur Fixierung der Zellen werden 5 ml eiskaltes (-20°C) Fixativ (Methanol/Eisessig; 3+1) tropfenweise unter leichtem Klopfen zugegeben. Die Fixierung wirkt 15 Minuten bei RT ein und anschließend wird nochmals für 10 Minuten zentrifugiert. Die Arbeitsschritte der Fixierung werden insgesamt viermal durchgeführt. Nach der letzten Zentrifugation wird nach Absaugen des Überstands 0,5 ml eiskaltes Fixativ zugegeben. So lassen sich die fixierten Zellen ca. zwei Wochen im Kühlschrank bei 4°C lagern.

2.6.3.4. Auftragen der Zellen auf Objektträger und Anfärbung

Die fixierten Zellen werden mit der Einwegpipette gut gemischt, vorsichtig auf beschriftete Objektträger aufgetragen und bei Raumtemperatur getrocknet. Das Zytoplasma der Zellen muß bei der Trocknung erhalten bleiben, da nur Zellen mit intaktem Zytoplasma ausgewertet werden dürfen. Die Erhaltung des Zytoplasmas während des Auftragens der Zellsuspension ist u.a. von der Raumtemperatur und der Luftfeuchtigkeit im Labor abhängig. Da diese Bedingungen nicht immer konstant sind, ist die Auftragung für jeden Versuch unterschiedlich zu handhaben und kann ggf. mit einer Wärmeplatte positiv beeinflußt werden. Die geeignete Temperatur der Wärmeplatte ist aufgrund der Schwankungen der Umgebungstemperatur und der Feuchtigkeit der Luft für jeden Versuch eine andere. Bei den V79-Zellen führt jedoch eine Heizplatten-Temperatur zwischen 30 und 50°C meist zum Erfolg.

Anschließend folgt die Färbung der Zellen mit Acridinorange. Die Objektträger werden dazu kurz in A. dest. getaucht, und es werden 50 µl Acridinorange-Färbelösung (s. 2.4.2.) mit einer Pipette auf dem Objektträger verteilt und mit einem Deckgläschen versehen. Überschüssige Färbelösung kann vorsichtig mit einem Papiertuch abgetupft werden.

2.6.3.5. Auswertung

Die Objektträger mit den gefärbten Zellen werden unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 400facher Vergrößerung ausgewertet. Die mittlere Anregungswellenlänge beträgt 450-490 nm (blauer Filter), während das Emissionsmaximum bei 515 nm liegt. Für jede Konzentration werden pro Versuch vier geeignete Objektträger berücksichtigt und pro Objektträger werden jeweils 1000 Zellen ausgezählt. Ein Objektträger, der hauptsächlich Zellen mit zerstörtem oder geschädigtem Zytoplasma enthält, wird nicht ausgewertet. Befinden sich insgesamt zu wenig Zellen auf dem Objektträger (zu wenig Zellsuspension aufgetragen), wird dieser

ebenfalls nicht ausgewertet. Falls noch ausreichend Zellsuspension vorhanden ist, werden „nicht auswertbare Objektträger“ durch geeignete neue OT ersetzt.

Es werden Auswertekriterien nach *Countryman und Heddle 1976* bzw. *Fenech et al. 1993* hinzugezogen: Zellen, die in die Auswertung eingehen, müssen einen deutlich vorhandenen und klar abgegrenzten Hauptkern (Nukleus und Mikronuklei dürfen nicht über Brückenfäden verbunden sein) sowie intaktes rot-orange gefärbtes Zytoplasma aufweisen. Auch die Mikronuklei müssen eine klare Kernmembran besitzen. Der Zellkern sollte rund und homogen gelb-grünlich gefärbt sein. Die Färbung und das Aussehen des Mikrokerns müssen dem Hauptkern ähneln. Die Größe des MN sollte maximal 1/3 des Hauptkerns betragen, und kleine „Fussel“ (Artefakte) werden nicht als Mikrokerne gewertet.

Zur Auswertung der Versuchsergebnisse werden jeweils Zellen mit, gegenüber Zellen ohne MN vermerkt. Für jeden ausgewerteten Objektträger liegt somit die MN-Rate pro 1000 Zellen vor. Für jede zu untersuchende Endkonzentration einer Substanz werden, wenn möglich, insgesamt mindestens 8000 Zellen gezählt (4000 Zellen pro Versuch pro Konzentration, wegen der Replikation der Versuche insgesamt mindestens 8000 Zellen). Für die Positivkontrollen, die zur Überprüfung des Versuchs dienen, wurden pro Versuch 2-4 OT ausgewertet.

Aus den einzelnen Datenpunkten (MN/1000 Zellen) werden für jede Konzentration der zu untersuchenden Substanzen die Mittelwerte und Standardabweichungen aus den zugehörigen Einzeldaten errechnet und in einer Grafik gegenüber der Konzentration aufgetragen. In Abb. 51 und 58 wurden die Standardabweichungen jeweils nur in einer Richtung aufgetragen, damit sich die Standardabweichungen der beiden Versuche nicht überschneiden.

Ist ein Objektträger nicht auswertbar (mögliche Gründe hierfür s.o. und unter 2.6.3.4.), wird ein neuer Objektträger derselben Probe hergestellt. Falls es nicht möglich ist, einen adäquaten Ersatz herzustellen, wird ein Objektträger weniger gezählt und in der Ergebnistabelle als n.a. (nicht auswertbar) vermerkt. Somit ergeben sich nicht immer grundsätzlich mindestens 8000 gezählte Zellen pro Konzentration [s. Quecksilbernitrat und Bleiacetat, Tabelle A.4 und A.2 im Anhang. Hier konnten bei 1 μM $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ bzw. 0,2 μM $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ jeweils lediglich 7000 Zellen ausgewertet werden]. Insgesamt wurden folgende Zellzahlen ausgewertet: Bleichlorid 8000-24.000, Bleiacetat: 7000-56.000, Quecksilberchlorid: 12.000-16.000, Quecksilbernitrat: 7000-8000, Nitrobenzol: 8000-16.000, Benzotrinitril: 12000-16.000 Zellen. Für die beiden Alkohole Butanol und Hexanol wurden jeweils 4000-8000 Zellen ausgewertet, was hier nicht in Schwierigkeiten bei der Objektträgerherstellung begründet lag. Für die jeweils höchste gewählte Konzentration der Alkohole wurden jeweils lediglich 4000 Zellen gezählt, da anhand des ersten Versuchsergebnisses ersichtlich wurde, daß die verdoppelte MN-Spontanzrate für Hexanol und Butanol vermutlich noch unterhalb der niedrigsten gewählten Endkonzentration liegt. Aus diesem Grunde wurden die beiden höchsten ausgewählten Konzentrationen nicht weiter untersucht, und stattdessen je eine unterhalb der niedrigsten Konzentration liegende Endkonzentration einbezogen (Tabellen 3 und 4; 3.7.1 und 3.7.2.). Der Vollständigkeit halber sind die beiden höchsten Konzentration mit den je 4000

ausgezählten Zellen in der Tabelle A.7 aufgeführt. Die Unterschiede der Mittelwerte der untersuchten Konzentrationen sowie der zugehörigen Kontrolle wurden mit Hilfe des zweiseitigen Students t-Tests für zwei Stichproben mit ungleicher Varianz überprüft. Die Nullhypothese wurde hierbei bei einem Signifikanzniveau unter 1% festgelegt ($P < 0,01$).

Anmerkung:

Die Wahl der im MN-Test eingesetzten Alkoholverbindungen und geeigneter zu untersuchender Konzentrationsbereiche geschah in Anlehnung an die Publikation von *Schultz und Önfelt* (2000). Im Anschluß an die Untersuchungen wurde die mittlere MN-Rate pro 1000 Zellen gegenüber der zugehörigen Konzentration aufgetragen. Zusätzlich wurden, wie auch bei *Schultz und Önfelt*, die Mittelwerte der Mikronuklei (bei *Schultz und Önfelt*: BIN) pro 1000 Zellen der Kontrollen (0,04% Ethanol als Kontrolle der Hexanolversuche bzw. Mediumkontrolle der Butanolexperimente) gleich 1,0 gesetzt. Die Ergebnisdaten der beiden Alkohole wurden entsprechend umgerechnet und in den Tabellen 3 und 4 (s. 3.7.1 und 3.7.2.) dargestellt. Anhand dieser Tabellen lassen sich die Daten von *Schultz und Önfelt* mit den Daten der vorliegenden Arbeit vergleichen. Der Konzentrationsbereich, in dem die Verdopplung der MN-Spontanrate liegt, kann für Butanol und Hexanol aus dieser Tabelle abgelesen werden. Die exakte Ermittlung der Konzentration, bei der eine Verdopplung der Spontanrate binukleärer (BIN) Zellen vorliegt, geschah bei *Schultz und Önfelt* durch lineare Interpolation der beiden Konzentrationen, die am nächsten an der möglichen Konzentration mit verdoppelter BIN-Spontanrate liegen. Das Verfahren der linearen Interpolation eignete sich allerdings nicht für die Daten der vorliegenden Arbeit, da die Daten keiner exakten Linearität folgen. Deshalb wurde jeweils der Konzentrationsbereich angegeben, in der die verdoppelte Spontanrate an Mikronuklei vorliegt. Zur Auftragung in die Grafik (Abb. 72) wurde der Wert abgeschätzt.

Aufgetragen wurde hierbei jeweils der negative Logarithmus der Konzentration, bei dem eine Verdopplung der MN-Spontanrate vorlag, gegen den Logarithmus des Verteilungskoeffizienten des jeweiligen Alkohols in Octanol/Wasser (Abb. 72). Die Ergebnisse der Induktion binukleärer Zellen (*Schultz und Önfelt*, 2000) sowie die eigenen MN-Ergebnisse werden unter der Annahme verglichen, daß sich die Ergebnisse der beiden Testsysteme nicht wesentlich unterscheiden.

Auch Nitrobenzol, Benzonitril, VCR und MMS wurden in die Grafik von *Schultz und Önfelt* aufgenommen. Hier wurden die Konzentrationen, bei denen verdoppelte MN-Spontanraten zu finden sind, aus den jeweiligen Ergebnisgrafiken der Mikrokernuntersuchungen abgelesen.

2.6.4. CREST-Analyse

Der sogenannte CREST-Antikörper wird aus dem Serum von CREST-Patienten (Calcinosis, Raynaud phenomenon, Esophageal dysmotility, Sclerodactyly and Teleangiectasia) gewonnen. Ein positiver Kinetochorbefund bedeutet, daß der Mikronukleus aus einem oder mehreren vollständigen Chromosomen besteht, und die Testsubstanz primär aneugene Wirkung zeigt (Miller und Adler 1990, Schuler et al. 1997). Die hier verwendete Methode entwickelte sich aus verschiedenen Methoden zur CREST-Analyse und beruht hauptsächlich auf den Methoden nach Renzi et al. (1996) und Russo et al. (1992).

2.6.4.1. Durchführung

Für die CREST-Analyse werden Quadripermschalen mit sterilen Objektträgern verwendet, und auf jeden Objektträger werden 50.000 V79-Zellen in 5 ml Medium ausgepflanzt. Nach 24 h Inkubation bei 37°C wird das Medium gewechselt, und nach weiteren 24 h im Brutschrank erfolgt die Substanzbehandlung (in Anlehnung an den MN-Test) für 18 h. Im Anschluß daran werden die Zellen mit einfach konzentriertem PBS kurz gespült und für 15 Minuten bei 37°C mit 0,075 M warmer KCl inkubiert. Zur Fixierung werden die OT mit den Zellen zunächst für 30 Minuten in Methanol bei -20°C und anschließend 10 Minuten in Aceton bei -20°C eingefroren. Es folgt eine fünfminütige Behandlung mit 4°C kühler PBS-Lösung, die 0,1% Tween 20 (PBS-0,1% Tween 20) enthält, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Der Überschuß wird verworfen, und 50 µl CREST-Serum (1:50 verdünnt mit PBS-Lösung, die 0,2% Tween 20 enthält) werden auf jeden Objektträger verteilt. Die OT werden erneut in Quadripermschalen gegeben und für 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank mit dem Antikörper inkubiert. Am nächsten Tag wird zweimal zwei Minuten mit PBS (0,1% Tween 20) gespült. Die überschüssige Flüssigkeit wird abgesaugt, bevor der 2. Antikörper aufgetragen wird. Auf jeden OT kommen 50 µl des 1:100 in PBS mit 0,5% Tween 20 verdünnten zweiten Antikörpers [FITC-labelled goat anti-human IgG F(ab)₂ fragment serum]. Der Antikörper wird gut verteilt und verbleibt so eine Stunde im Brutschrank. Zwei weitere kurze Spülvorgänge mit PBS-0,1% Tween 20 schließen sich an. Vor der Anfärbung werden die Zellen durch kurzes Eintauchen in kaltem Soerensen-Puffer (pH 6,8, s. 2.4.5.) rehydriert. Gefärbt werden die Präparate mit 50 µl CREST-Färbelösung (s. 2.4.5.), die bei abgedunkeltem Licht zugegeben wird.

2.6.4.2. Auswertung

Die Auswertung der Kinetochore erfolgt bei 400 oder 1000 facher Vergrößerung im Dunkeln. Die mittlere Anregungswellenlänge liegt bei 340-380 nm für DAPI und 515-560 nm für Propidiumiodid. Die zugehörigen Emissionsmaxima betragen 425 nm bzw. 590 nm. Ist ein MN detektiert, kann die Anwesenheit eines Kinetochors mit Hilfe eines speziellen Filters (FITC) beobachtet werden (Anregungswellenlänge: 490 nm, Emissionsmaximum: 525 nm). Es werden pro Objektträger 1000 Zellen gezählt, wobei unterschieden wird zwischen „CREST-positiven“, „CREST-negativen“ und „CREST-unklaren“ Mikronuklei. Als „unklar“

wird ein Mikronukleus bezeichnet, wenn die Klassifizierung als „Crest-positiv“ oder „CREST-negativ“ nicht eindeutig möglich ist, z.B. aufgrund eines sehr schwachen Kinetochorsignals oder einer hohen Hintergrund-Fluoreszenz. Jede CREST-Analyse wird mindestens einmal wiederholt, und aus den Einzeldaten pro untersuchter Konzentration wird der Mittelwert pro 1000 Zellen für die „CREST-positiven“, „CREST-negativen“ und „CREST-unklaren“ Mikronuklei errechnet. Diese Mittelwerte werden als Balkendiagramm für die untersuchten Konzentrationen aufgetragen.

4.6.4.3. Verwendete Substanzen und zugehörige Endkonzentrationen

Substanz	Endkonzentrationen
Bleiacetat	1 / 10 μ M
Bleichlorid	1 / 100 μ M
Benzonitril	0,1 / 10 / 100 μ M
DMSO	0,04% / 0,4%
MMS	25 μ g/ml
Nitrobenzol	0,01 / 0,1 / 10 μ M
Quecksilberchlorid	0,01 / 0,1 / 1 / 5 μ M
VCR	10 nM

2.6.5. DAPI-Test auf Mycoplasmen

Die verwendeten Zellkulturen werden in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen getestet (Hessling *et al.* 1980).

2.6.5.1. Testprinzip

Ein Befall der Zellkulturen mit Mycoplasmen führt normalerweise nicht zum Zelltod, sondern behindert das normale Wachstum der Zellen. Mycoplasmenbefall kann mit bloßem Auge nicht erkannt werden, läßt sich aber mit der DAPI-Färbung nachweisen. Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet an doppelsträngige DNA und bildet DNA-DAPI-Komplexe, die stark fluoreszierend sind. DAPI wird rasch in den Zellkern aufgenommen, und es entstehen stark fluoreszierende Zellkerne. Zellkulturen, die mit Mycoplasmen infiziert sind, zeigen zusätzlich zur nukleären auch extranukleäre Fluoreszenz. Es befinden sich einzelne fluoreszierende Punkte im Zytoplasma und gelegentlich auch im Interzellularraum. Da nicht immer alle Zellen infiziert sind, muß das gesamte Präparat untersucht werden, bevor die Kultur beurteilt werden kann.

2.6.5.2. Durchführung und Auswertung

50.000 V79-Zellen werden auf sterilen Objektträgern in Quadripermschalen ausgepflanzt. Die Zellen bleiben 2-3 Tage im Brutschrank bevor sie zweimal mit warmem PBS (1-fach) gewaschen werden. Es folgt ein Fixiervorgang mit Methanol (5 Minuten) und erneute Spülung mit PBS. Mit 2 ml DAPI in Methanol (0,1 µg/ml) wird anschließend für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach erneuter PBS-Spülung erfolgt die Auswertung wie oben beschrieben unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellpassagen waren frei von Mycoplasmen.

3. Ergebnisse

3.1. Mikronukleustest: Positivkontrollen

Als Positivkontrollen für die der Arbeit zugrundeliegenden Fragestellungen eignen sich die klastogene Substanz Methylmethansulfonat (MMS) sowie das aneugene Agens Vinkristin (VCR) [s.1.1.1.3.3. und 1.1.1.3.2.]. Zunächst wurde abgeklärt, welche Konzentrationen für MMS und VCR für den Mikronukleus-Test geeignet sind. Die Mikrokern-Rate der Positivkontrollen sollen durch die gewählte Konzentration im Vergleich zur Mediumkontrolle erhöht sein, ohne daß die Zellen sichtbare Schäden erleiden. Für MMS und VCR wurden unterschiedliche Konzentrationen (s.u.) eingesetzt.

3.1.1. Methylmethansulfonat (MMS)

3.1.1.1. Mikrokerninduktion

MMS induziert in V79-Zellen konzentrationsabhängig Mikronuklei (MN). Im Vergleich zur Kontrolluntersuchung, bei der durchschnittlich fünf Mikrokern pro 1000 Zellen beobachtet werden, erhöht sich die MN-Frequenz beim Einsatz von 10 µg/ml MMS deutlich. Bei 25 µg/ml MMS ist die Mikrokernrate etwa verdreifacht, bei 50 µg/ml MMS ca. vierfach erhöht, und bei 75 µg/ml sind etwa siebenmal mehr MN als in der Kontrolle zu finden (Abb. 17). Auch 100 µg/ml MMS wurden eingesetzt, allerdings waren diese Ansätze nicht auswertbar, da lediglich Zellreste und tote Zellen nach der Inkubation beobachtet werden konnten. Auch bei 75 µg/ml sahen die Zellen geschädigt aus, was sich in einer sehr hohen MN-Frequenz widerspiegelte. Anhand dieser Ergebnisse wurde entschieden, grobenteils 25 µg/ml MMS als mögliche Positivkontrolle zu verwenden, da sich die Mikrokern-Rate dieser Konzentration signifikant ($P < 0,01$) von der MN-Rate der Mediumkontrolle unterscheidet.

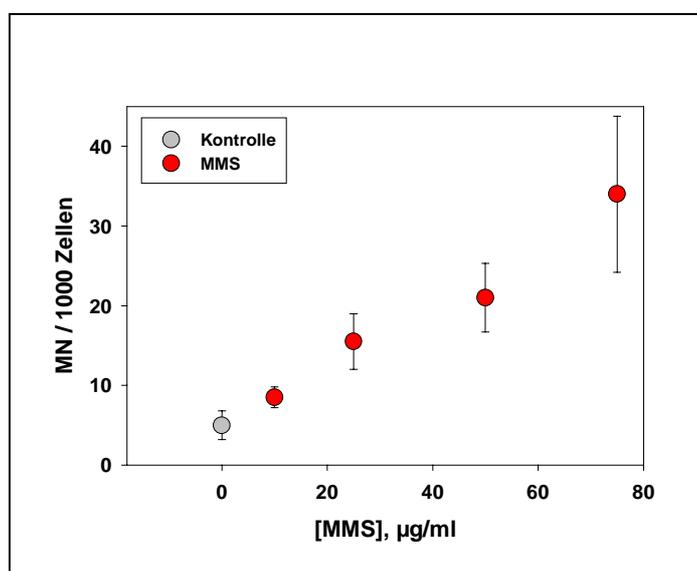


Abb. 17: Induktion von Mikrokernen durch MMS (in V79-Zellen)

Mikrokerngrößen

Die durch die klastogene Substanz MMS induzierten Mikronuklei erscheinen im Vergleich zu Mikrokernen, die durch aneugene Substanzen wie z.B. VCR induziert werden, relativ klein (vgl. Abb. 18 und 22), sie enthalten also meist nur Chromosomen-Bruchstücke. Somit weisen schon die Mikrokerngrößen auf einen klastogenen Entstehungsmechanismus der durch MMS-Behandlung induzierten Mikrokerne hin.

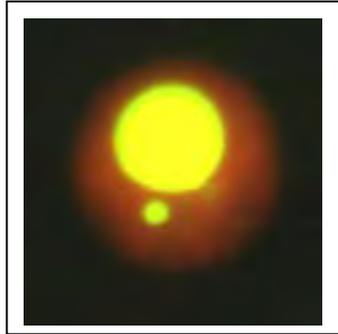


Abb. 18: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit 50 µg/ml MMS (V79-Zellen)

3.1.1.2. CREST-Analysen

Im Rahmen der CREST-Analysen verifizierte sich der klastogene Entstehungsmechanismus der MN-Induktion nach Inkubation mit MMS (Abb. 19). Der überwiegende Anteil der durch MMS induzierten Mikrokerne liegt ohne Kinetochor und somit als Chromosomen-Bruchstück vor („CREST-negativ“; Abb. 20). Die geringe Anzahl „CREST-positiv“ markierter Mikronuklei sind spontan entstandene MN, wie sie auch in Medienkontrollen vorkommen. In der Medienkontrolle finden sich „CREST-positive“, „CREST-negative“ und „unklare“ MN. Die durch MMS hervorgegangene MN-Rate der CREST-Analyse entspricht der im MN-Test beobachteten MN-Rate (bei 25 µg/ml MMS liegt im Mittel eine etwa verdreifachte MN-Anzahl pro 1000 Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle vor).

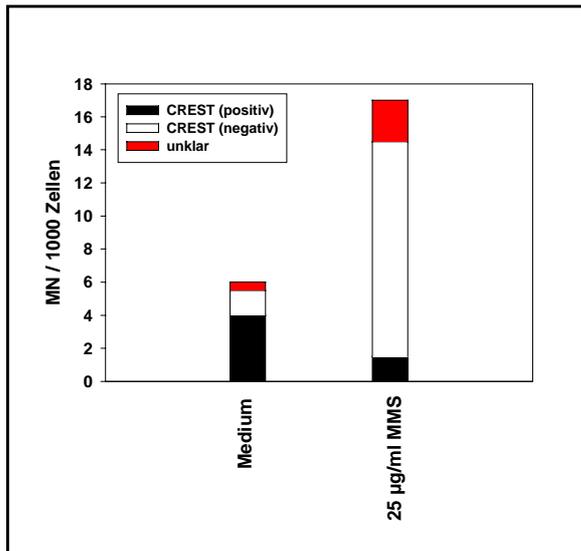


Abb. 19: CREST-Analyse: Durch MMS induzierte MN entstehen hauptsächlich durch einen klastogenen Mechanismus (V79-Zellen)

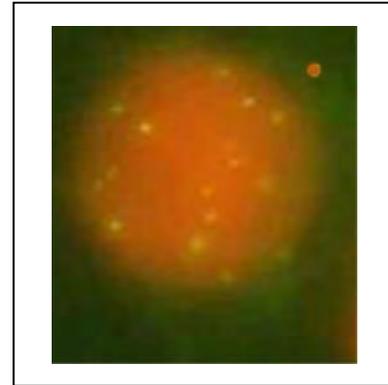


Abb. 20: Durch MMS (25 µg/ml) induzierter Mikronukleus mit negativem Kinetochorbefund (V79-Zellen).

3.1.2. Vinkristin (VCR)

3.1.2.1. Mikrokerninduktion

Vinkristin induziert ebenfalls konzentrationsabhängig MN in V79-Zellen (Abb. 21), wobei bei einer Konzentration von 0,5 nM VCR kein Unterschied zu den MN-Ergebnissen der Kontrolle besteht (fünf MN pro 1000 Zellen). Die Inkubation mit 1 nM VCR führt zu einer deutlichen Zunahme der MN-Frequenz (durchschnittlich neun Mikronuklei pro 1000 Zellen), und bei 2 nM VCR ist die MN-Rate mehr als verdoppelt. 5 nM bzw. 10 nM VCR führen zu einer weiteren Erhöhung der mittleren MN-Rate (13 bzw. 17 Mikrokerne pro 1000 Zellen). Für alle weiteren Versuche wurden meistens 10 nM VCR ($P < 0,01$), gelegentlich 5 nM VCR ($P < 0,01$) als Positivkontrolle eingesetzt.

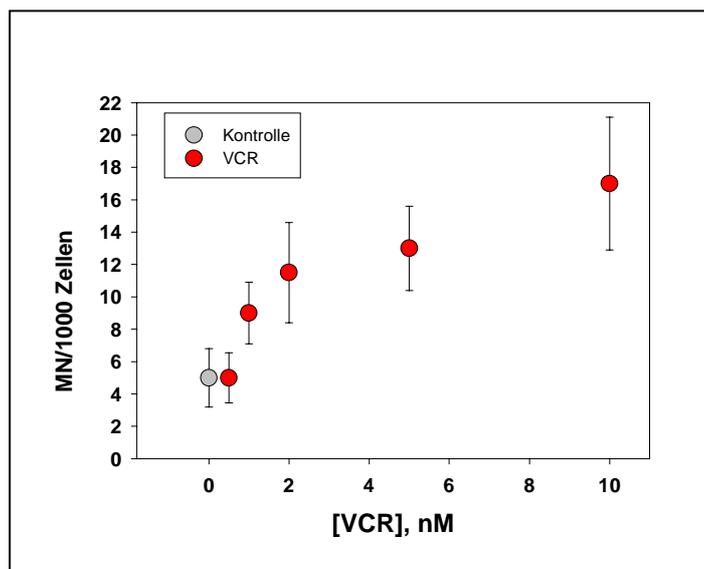


Abb. 21: Induktion von Mikrokernen in V79-Zellen durch VCR

Mikrokerngrößen

Die durch Vinkristin induzierten Mikronuklei weisen anhand ihrer Größen auf einen aneugenen Entstehungsmechanismus hin (Abb. 22). Die Mikrokerne sind im Vergleich zu den durch die klastogene Substanz MMS induzierten MN relativ groß und enthalten normalerweise vollständige Chromosomen.

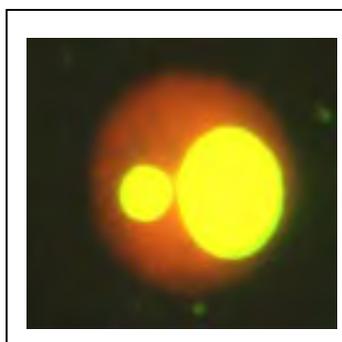


Abb. 22: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit 5 nM VCR (V79-Zellen)

3.1.2.2. CREST-Analysen

Die CREST-Analysen bestätigen den Befund der Größencharakterisierung der Mikronuklei (Abb. 23). In ca. 2/3 aller durch VCR induzierten MN werden Kinetochore detektiert, d.h. die MN enthalten jeweils ein oder mehrere Chromosomen (Abb. 24). VCR wirkt somit hauptsächlich aneugen und führt zu Chromosomenfehlverteilungen während der Mitose.

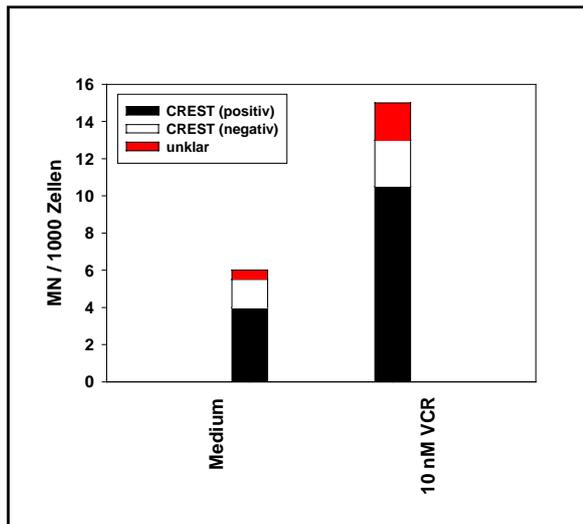


Abb. 23: Durch VCR induzierte MN entstehen in V79-Zellen hauptsächlich durch aneugene Wirkweise

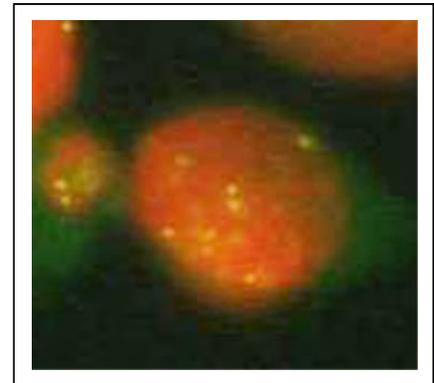


Abb. 24: Mikronukleus mit positivem Kinetochorbefund (Behandlung mit 10 nM VCR). Der MN enthält zwei ganze Chromosomen.

3.2. Lösemittelkontrolle

3.2.1. DMSO

3.2.1.1. Zytotoxizitätstest

Die durch DMSO induzierte Neutralroteinlagerung in V79-Zellen entspricht bis zu einer Konzentration von etwa 1% DMSO der Mediumkontrolle (nahe 100%), wobei die Inkubation mit 1% DMSO zu einer relativ hohen Standardabweichung ($\pm 11\%$) im NR-Test führt. DMSO-Konzentrationen über 1% führen zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme des Neutralrotgehaltes in V79-Zellen. Der Einsatz von 4% DMSO führt zu einer durchschnittlichen Abnahme der NR-Einlagerung um 25%. Der IC_{50} für DMSO liegt für V79-Zellen bei einer DMSO-Konzentration zwischen 4% und 10%. 10% DMSO führt zu einer 65%igen Abnahme der NR-Einlagerung, während 20% und 40% DMSO zu 78%iger Erniedrigung des NR-Gehaltes führen (Abb. 25).

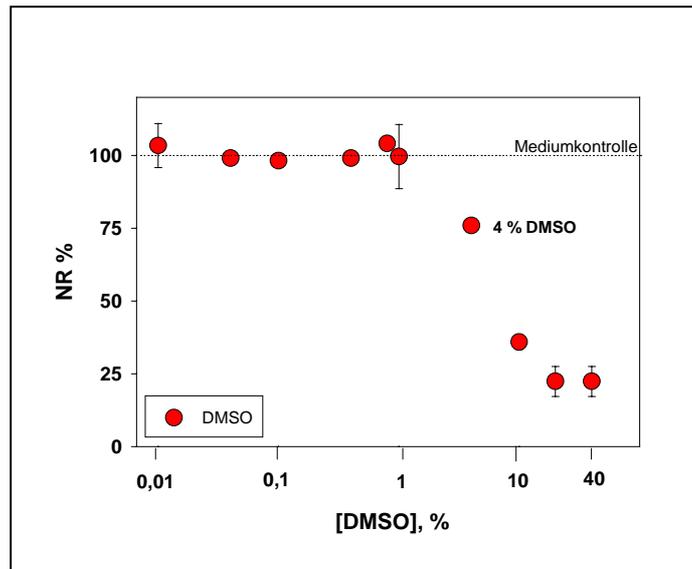


Abb. 25: Durch DMSO induzierte Neutralrotaufnahme in V79-Zellen

3.2.1.2. BCA-Test

Die im BCA-Test ermittelte Kurve zum Proteingehalt der Zellen in Prozent nach Inkubation mit unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen zeigt einen der Neutralrottestkurve ähnlichen Verlauf (Abb. 26). Bis zu einer Konzentration von 0,8% DMSO zeigt sich kein signifikanter Unterschied zur Medienkontrolle. Ab 1% DMSO sinkt der Proteingehalt der Zellen mit zunehmender DMSO-Konzentration, wobei eine Behandlung mit 4% DMSO den Proteingehalt schon um 59% reduziert. Der IC_{50} wird hier erst bei Konzentrationen zwischen 10 und 20% DMSO erreicht.

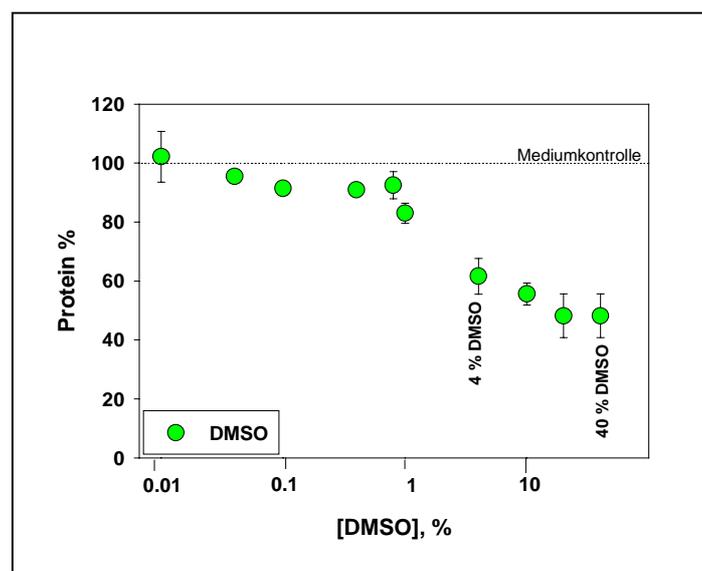


Abb. 26: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit DMSO

3.2.1.3. Mikrokerninduktion

Aufgrund des Ergebnisses des Zytotoxizitäts-Tests für DMSO wurde für die Mikrokerntests zunächst eine 0,4%ige DMSO-Konzentration als Lösemittelkontrolle festgelegt. Im Rahmen der MN-Auswertungen zeigte sich jedoch eine erhöhte Rate an Mikrokernen nach Behandlung mit 0,4% DMSO gegenüber der Mediumkontrolle ($P < 0,01$), ($9,0 \pm 1,9$ MN bei 0,4% DMSO versus $5,5 \pm 1,0$ MN pro 1000 Zellen für die Kontrolle; Abb. 27). Eine zehnfach niedrigere DMSO-Konzentration (0,04%) führt im MN-Test zu Mikrokernraten, wie sie auch in den Kontrollen zu finden sind ($P > 0,01$).

Anhand dieser Ergebnisse wurde für alle Versuche, in denen DMSO als Lösemittel verwendet wurde (Nitrobenzol und Benzonitril), der Einsatz von 0,04% DMSO für jede Probe festgelegt.

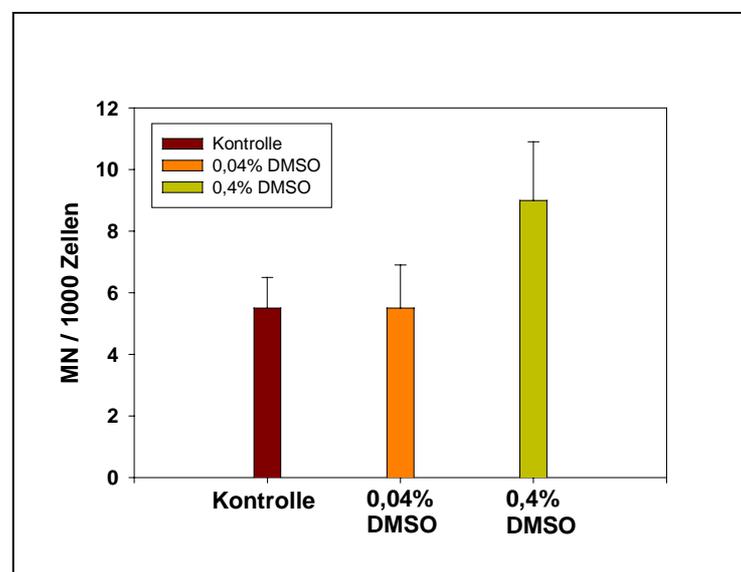


Abb. 27: Induktion von Mikrokernen durch DMSO (in V79-Zellen)

Mikrokerngrößen

Die Verwendung von 0,04% DMSO führt zu Mikronuklei, die in ihrer Größenverteilung den MN der Mediumkontrollen ähneln: es finden sich somit Mikrokernkerne deren Größen sehr unterschiedlich sind. Es werden im Rahmen der Auswertungen in nahezu gleichen Teilen große, mittlere und kleine Mikronuklei beobachtet (Abb. 28 a-c). Somit scheint es sich, wie auch bei der Medienkontrolle, um spontane MN zu handeln.

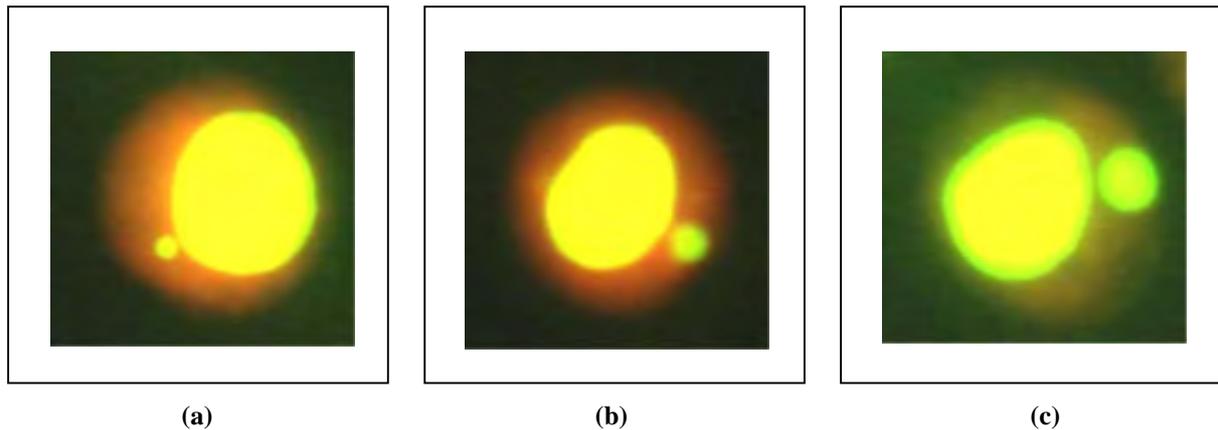


Abb. 28: Typische Mikronuklei nach Inkubation mit 0,04% DMSO (V79-Zellen)

3.2.1.4. CREST-Analysen

Die Ergebnisse der CREST-Analysen zeigen ebenso wie die MN-Größenbeurteilung nach Behandlung mit 0,04% DMSO ein mit der Mediumkontrolle vergleichbares Ergebnis. Sowohl für die Mediumkontrolle als auch für 0,04% DMSO finden sich nebeneinander „CREST-positive“, „CREST-negative“ und „unklare“ Mikrokerne (Abb. 29), wobei der Anteil „CREST-positiver“ MN in diesem Versuchsansatz etwas größer ist als die Anteile „CREST-negativer“ oder „unklarer“ MN, was vermutlich zufallsbedingt ist.

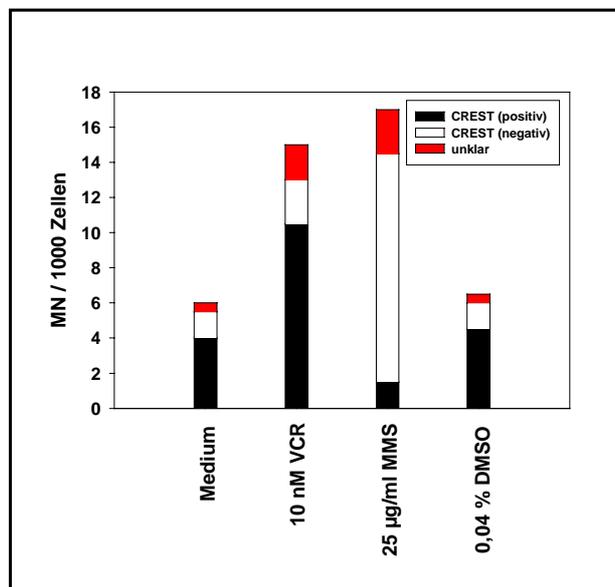


Abb. 29: CREST-Analyse: Durch DMSO induzierte MN (V79-Zellen)

3.3. Schwermetalle:

3.3.1. Anorganische Bleiverbindungen:

3.3.1.1. Bleichlorid

3.3.1.1.1. Zytotoxizitätstest

Im Rahmen der Neutralrotmessungen werden für Bleichlorid bis 500 μM keine zytotoxischen Effekte verzeichnet. (Abb. 30). Bleichlorid in Konzentrationsbereichen über 500 μM führt zur Abnahme des Neutralrotgehaltes in V79-Zellen und somit zur Zytotoxizität. Aufgrund des vorliegenden Ergebnisses wurde für den Mikronukleus-Test der Einsatz von maximal 360 μM PbCl_2 festgelegt, um nicht in den zytotoxischen Konzentrationsbereich zu gelangen.

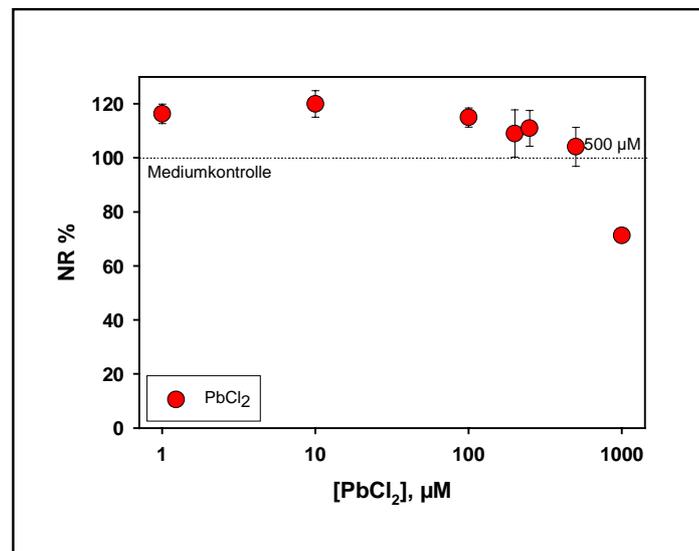


Abb. 30: NR-Test: Durch Bleichlorid induzierte Neutralrotaufnahme in V79-Zellen

3.3.1.1.2. Proteinbestimmung (BCA-Test)

Der BCA-Test für Bleichlorid bestätigt die Ergebnisse des NR-Tests; Konzentrationen über 500 μM führen zur Abnahme des Proteingehaltes in V79-Zellen im Vergleich zur Medienkontrolle (Abb. 31).

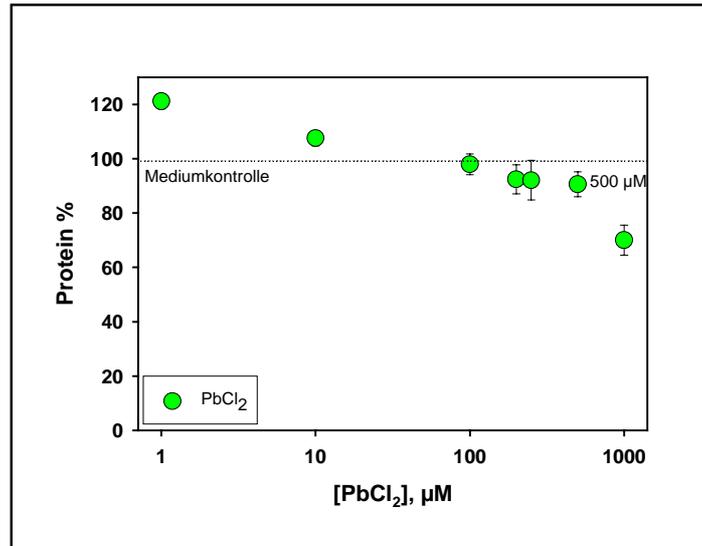


Abb. 31: BCA-Test: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Bleichlorid

3.3.1.1.3. Mikrokerninduktion

Bleichlorid induziert konzentrationsabhängig Mikrokerne in V79-Zellen (Abb. 32). Ab 1,1 µM PbCl₂ hat sich die mittlere MN-Frequenz pro 1000 Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit $4,4 \pm 2,2$ Mikronuklei deutlich erhöht (auf $7,8 \pm 2,0$ Mikrokerne, $P < 0,01$). Bei Konzentrationen von 180 bzw. 360 µM PbCl₂ ist die MN-Rate mehr als dreifach erhöht ($13,9 \pm 3,1$ bzw. $13,3 \pm 4,3$ MN pro 1000 Zellen) gegenüber der Mediumkontrolle. Mit zunehmender PbCl₂-Konzentration finden sich neben der zunehmenden MN-Frequenz auch höhere Standardabweichungen (Tabelle A.1).

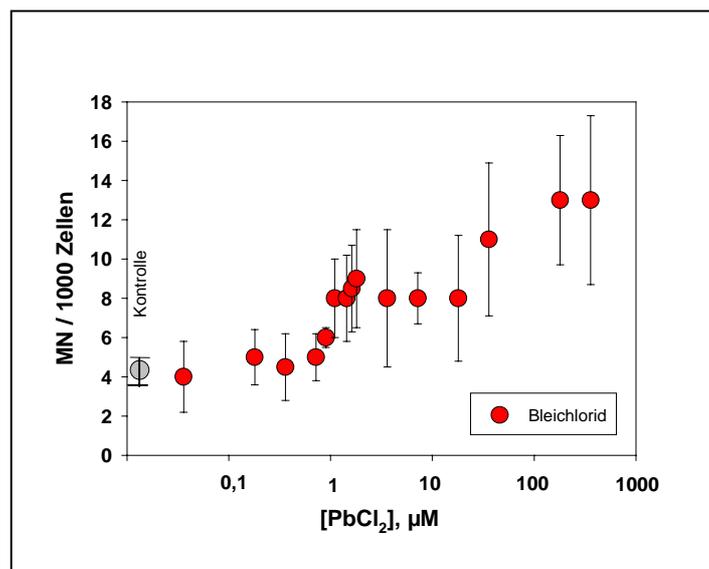


Abb. 32: MN-Test: Induktion von Mikrokernen durch Bleichlorid (in V79-Zellen)

Mikrokerngrößen

Die Größenbeurteilung der durch Bleichlorid induzierten Mikronuklei weist auf einen aneugenischen Wirkungsmechanismus der MN-Entstehung durch PbCl_2 hin; der größte Teil der Mikrokerne ist im Vergleich zu MN, die durch die klastogene Substanz MMS induziert werden, relativ groß (Abb. 33).

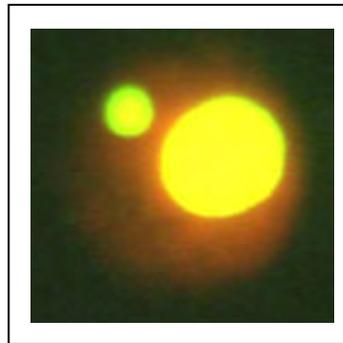


Abb. 33: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit 0,1 μM Bleichlorid (V79-Zellen)

3.3.1.1.4. CREST-Analysen

Die CREST-Analysen für PbCl_2 bestätigen den aufgrund der MN-Größenbeurteilung erhaltenen Hinweis auf einen aneugenischen Entstehungsmechanismus. Sowohl bei 1 μM als auch bei 100 μM PbCl_2 finden sich überwiegend „CREST-positiv“ Mikrokerne (66,7% bei 1 μM PbCl_2 und 69,3% bei 100 μM PbCl_2). 14,2% (bei 1 μM PbCl_2) bzw. 19,2% (bei 100 μM PbCl_2) der ausgewerteten MN sind „CREST-negativ“, und die übrigen 19,1% bzw. 11,5% sind nicht klar zu beurteilende Mikrokerne (Abb. 34). Die Positivkontrollen zeigen, wie bekannt, für VCR einen überwiegend aneugenischen und für MMS einen hauptsächlich klastogenen Mechanismus der MN-Entstehung.

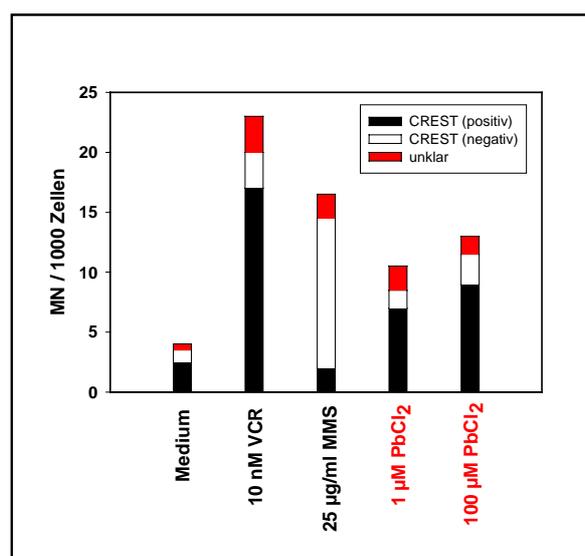


Abb. 34: CREST-Analyse: Durch Bleichlorid induzierte MN (V79-Zellen)

3.3.1.2. Bleiacetat

3.3.1.2.1. Zytotoxizitätstest

Für Bleiacetat liegt (wie auch bei Bleichlorid) im Neutralrottest bis 500 μM $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ keine Zytotoxizität vor (Abb. 35). Bei Konzentrationen über 500 μM $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ wird die NR-Einlagerung der Zellen reduziert und der zytotoxische Konzentrationsbereich erreicht. Bei einer Konzentration von 1000 μM $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ liegt eine 40%ige NR-Reduktion vor.

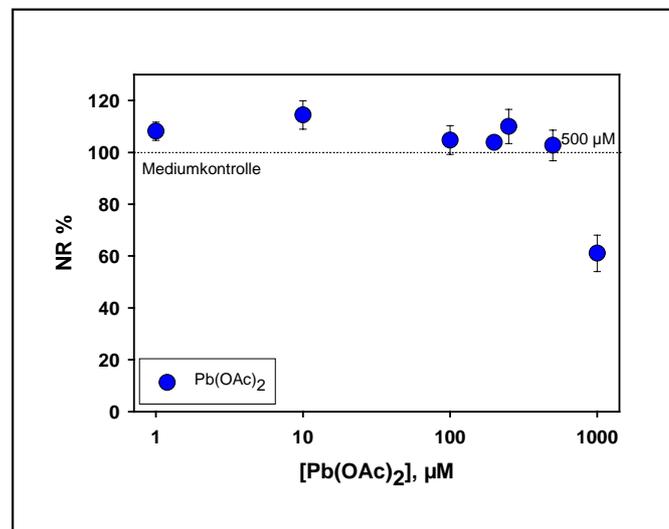


Abb. 35: Durch Bleiacetat induzierte Neutralrotaufnahme in V79-Zellen

3.3.1.2.2. BCA-Test

Der Kurvenverlauf zum Proteingehalt der Zellen nach 18 stündiger Inkubation mit $\text{Pb}(\text{OAc})_2$ entspricht in etwa dem Kurvenverlauf des NR-Tests für $\text{Pb}(\text{OAc})_2$; Konzentrationen über 500 μM Bleiacetat führen zu einer Reduktion des Proteingehaltes der Zellen (Abb. 36).

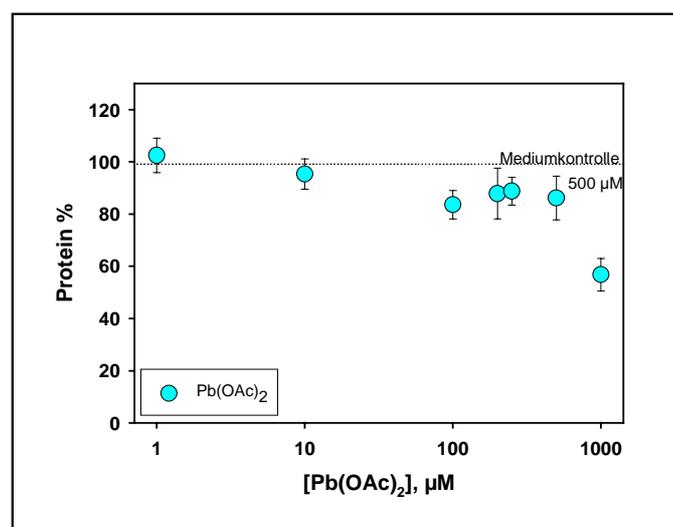


Abb 36: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Bleiacetat

3.3.1.2.3. Mikrokerninduktion

Bleiacetat induziert in V79-Zellen konzentrationsabhängig MN (Abb. 37). Eine Konzentration von bis $0,01 \mu\text{M Pb(OAc)}_2$ unterscheidet sich im Hinblick auf die MN-Rate nicht signifikant ($P > 0,01$) vom Ergebnis der Mediumkontrolle ($4,4 \pm 0,8$ MN pro 1000 Zellen). Konzentrationen von $0,025$, $0,03 \mu\text{M}$ und $0,04 \mu\text{M}$ Bleiacetat führen zu einer leicht erhöhten MN-Frequenz gegenüber der Mediumkontrolle ($7,7 \pm 0,8$ bzw. $8,3 \pm 1,4$ MN pro 1000 Zellen). Nach Inkubation mit $0,05 \mu\text{M Pb(OAc)}_2$ unterscheidet sich die MN-Rate ($9,4 \pm 1,8$ MN/1000 Zellen) hoch signifikant ($P < 0,01$) von den Kontrollergebnissen. Zwischen $0,1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ Bleiacetat liegen die durchschnittlichen MN-Anzahlen zwischen $9,3$ und $11,7$ MN pro 1000 Zellen. Eine Bleiacetat-Konzentration von $50 \mu\text{M}$ führt zu einem leichten Abflachen der MN-Rate auf $9,1 \pm 0,6$ MN pro 1000 Zellen (gegenüber $11,7 \pm 1,5$ MN pro 1000 Zellen bei $10 \mu\text{M Pb(OAc)}_2$). $100 \mu\text{M Pb(OAc)}_2$ induziert $8,0 \pm 1,3$ MN pro 1000 Zellen (Tabelle A.2).

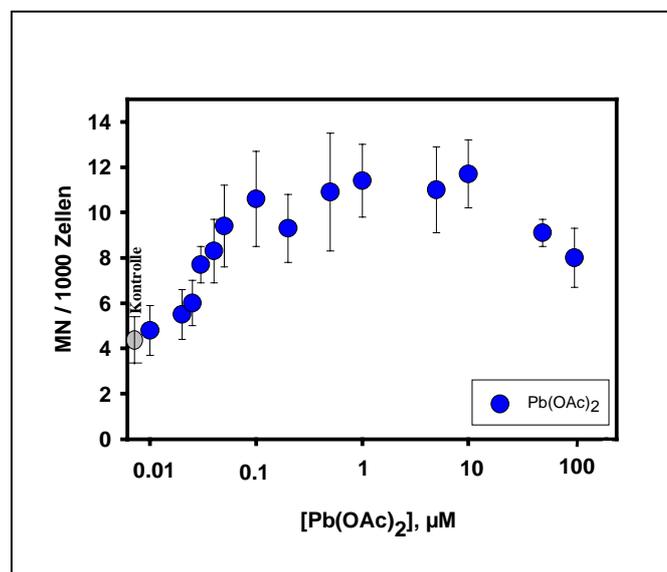


Abb. 37: MN-Test: Induktion von Mikrokernen durch Bleiacetat (in V79-Zellen)

Mikrokerngrößen

Auch durch Bleiacetat induzierte MN sind im Vergleich zu MMS-induzierten Mikronuklei relativ groß (Abb. 38) und deuten auf eine Fehlverteilung von Chromosomen durch Pb(OAc)_2 hin.

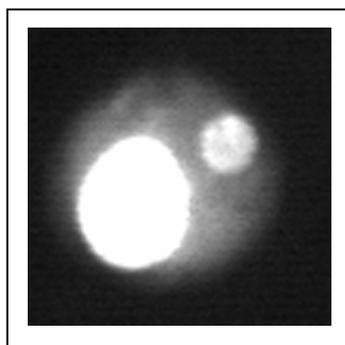


Abb. 38: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit $0,1 \mu\text{M}$ Bleiacetat (V79-Zellen)

3.3.1.2.4. CREST-Analysen

Die CREST-Analysen in V79-Zellen verifizieren den Befund der MN-Größenbeurteilungen nach Behandlung der Zellen mit Bleiacetat. Die eingesetzten $Pb(OAc)_2$ -Konzentrationen führen hauptsächlich zu „CREST-positiven“ MN (Abb. 39). Es finden sich 71,4% „CREST-positiv“ und 14,3% „CREST-negativ“ MN nach Inkubation mit 1 μM $Pb(OAc)_2$, während 10 μM Bleiacetat zu 69,6% „CREST-positiven“ und 17,4% „CREST-negativen“ MN führt. Die restlichen 14,3 bzw. 13% der MN waren nicht eindeutig beurteilbar. Die durchschnittliche Gesamtanzahl an Mikrokernen pro 1000 Zellen entspricht wie erwartet der im MN-Test ermittelten MN-Rate.

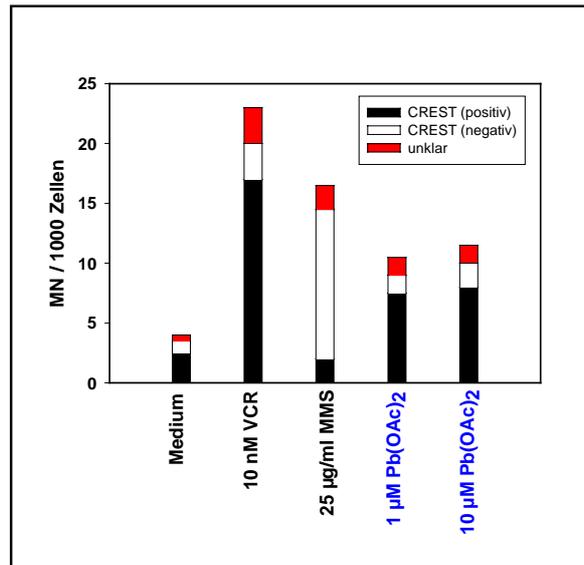


Abb. 39: CREST-Analyse: Durch Bleiacetat induzierte MN (V79-Zellen)

3.3.1.3. Gegenüberstellung und Zusammenfassung aller Ergebnisse für Bleichlorid und Bleiacetat

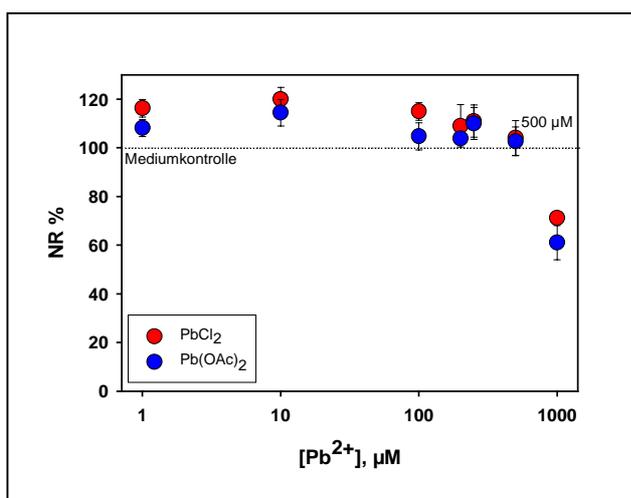


Abb. 40: NR-Test: Durch Pb(II) induzierte Neutralrotaufnahme in V79-Zellen

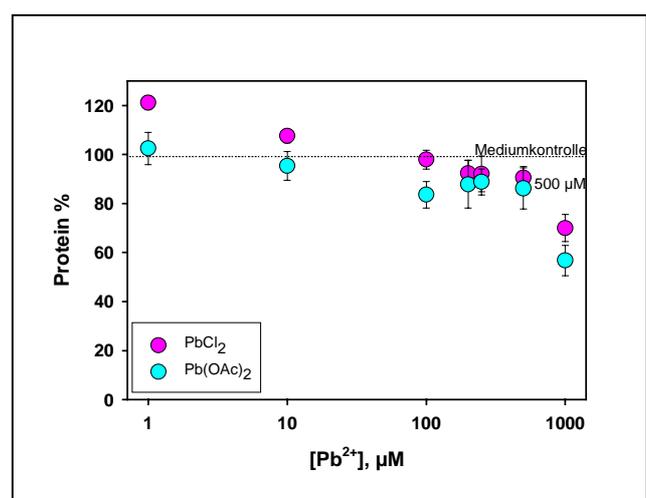


Abb. 41: BCA-Test: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Pb(II)

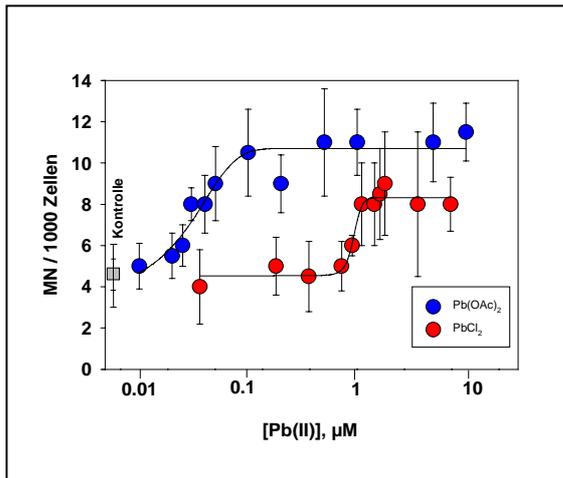


Abb. 42: Gegenüberstellung durch Bleichlorid und -acetat induzierte MN in V79-Zellen

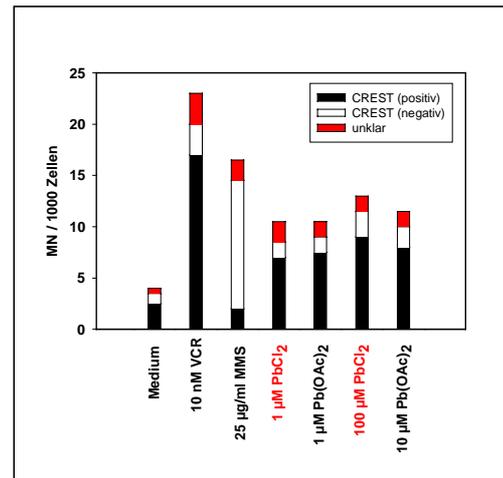


Abb. 43: CREST-Analyse: Durch PbCl₂ oder Pb(OAc)₂ induzierte MN entstehen überwiegend durch aneugene Wirkweise

Im Rahmen der Zytotoxizitätstests mit Neutralrot zeigen sich für Bleichlorid und Bleiacetat ähnliche Kurvenverläufe; die NR-Einlagerung nimmt für beide Bleiverbindungen bei Konzentrationen über 500 µM ab, und der zytotoxische Konzentrationsbereich ist erreicht (Abb. 40). Die Ergebniskurve des BCA-Tests verläuft ebenso; über 500 µM Pb (II) nimmt der Proteingehalt der V79-Zellen ab (Abb. 41). Die MN-Ergebnisse für Bleichlorid und Bleiacetat differieren: Eine erhöhte MN-Rate wird nach Behandlung mit Bleichlorid in Konzentrationen über 1,1 µM gefunden, während es nach einer Inkubation mit Bleiacetat schon ab 0,05 µM Pb(OAc)₂ zu einer erhöhten durchschnittlichen MN-Anzahl pro 1000 Zellen kommt (Abb. 42). Da die MN-Untersuchungen zu PbCl₂ und Pb(OAc)₂ mit zwei unterschiedlichen V79-Zellpassagen durchgeführt wurden (P7 und P8), wurden während der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit weitere MN-Tests beider Bleiverbindungen mit einer Zellpassage (P18) durchgeführt, um abzuklären, ob der unterschiedliche Wirkbeginn der erhöhten MN-Raten bestätigt werden kann. Dieses wurde bestätigt (o. Abb.). Die CREST-Analyse zeigt für beide Bleiverbindungen vergleichbare Ergebnisse; sowohl Bleichlorid als auch Bleiacetat induzieren in jeweils zwei untersuchten Konzentrationen hauptsächlich Mikrokerne mit positivem Kinetochor- bzw. Zentromerbefund (Abb. 43). Diese MN entstehen somit durch aneugene Wirkungen.

3.3.2. Anorganische Quecksilberverbindungen

3.3.2.1. Quecksilberchlorid

3.3.2.1.1. Zytotoxizitätstest

Quecksilberchlorid wirkt in Konzentrationen über 17 µM zytotoxisch. Bis etwa 16 µM entspricht die NR-Einlagerung der Zellen in etwa der der Mediumkontrolle (100%). Zwischen 15 µM und 20 µM HgCl₂ nimmt der Kurvenverlauf extrem steil ab; die NR-Einlagerung wird in diesem Bereich um über 50% reduziert. Der IC₅₀ liegt etwa zwischen 19 µM und 20 µM

HgCl₂. Bei Quecksilberchlorid-Konzentrationen über 25 µM beläuft sich die NR-Einlagerung auf ca. Null bis 10% Prozent (Abb. 44).

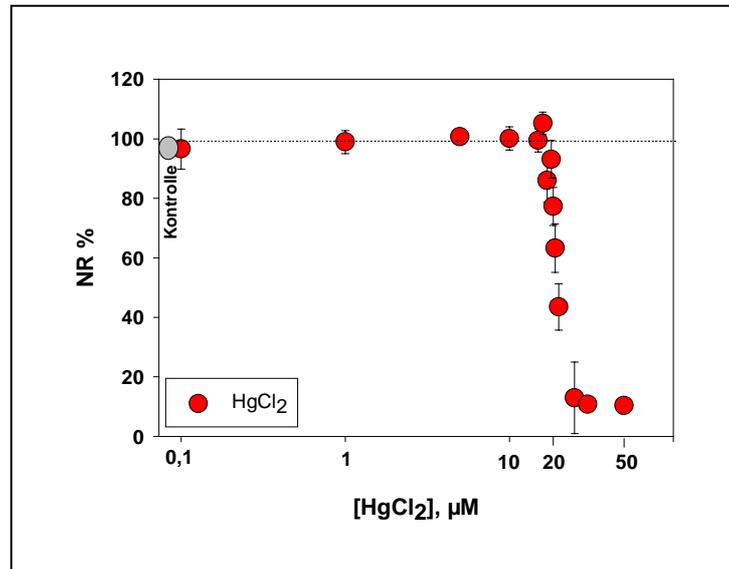


Abb. 44: Durch Quecksilberchlorid induzierte Neutralrotaufnahme in V79-Zellen

3.3.2.1.2. BCA-Test

Die Ergebniskurve des BCA-Tests zeigt einen dem NR-Test ähnlichen Kurvenverlauf, wobei jedoch höhere Standardabweichungen und leichte Schwankungen zu finden sind. Auch im BCA-Test liegt der IC₅₀ zwischen 19 µM und 20 µM HgCl₂ (Abb. 45). Nach Inkubation mit HgCl₂-Konzentrationen über 25 µM waren im Rahmen des BCA-Tests keine Proteingehalte mehr detektierbar.

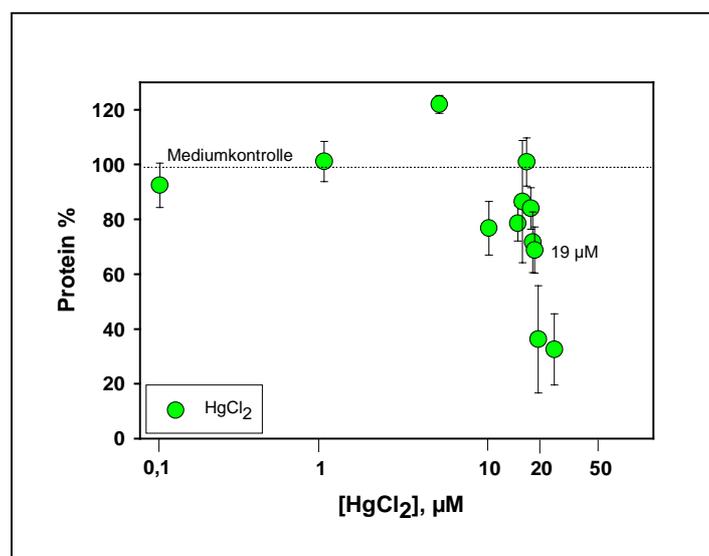


Abb. 45: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Quecksilberchlorid

3.3.2.1.3. Mikrokerninduktion

HgCl₂ induziert in V79-Zellen von 0,01 µM bis 0,1 µM mit zunehmender Konzentration eine ansteigende MN-Rate (Abb. 46). Bei einer Konzentration von 0,03 µM HgCl₂ ist die Mikrokernrate etwa doppelt so hoch ($8,3 \pm 1,0$ MN) wie die MN-Anzahl der Mediumkontrolle mit $4,4 \pm 0,7$ MN pro 1000 Zellen ($P < 0,01$). Bei 0,1 µM HgCl₂ wird eine maximale MN-Anzahl von $13,3 \pm 1,6$ MN pro 1000 Zellen gefunden. Zwischen 0,1 µM und 10 µM HgCl₂ ist ein leichtes Abflachen der Kurve, also eine Abnahme der MN-Frequenz zu verzeichnen. Bei 10 µM HgCl₂ beträgt die MN-Rate $9,9 \pm 1,1$ MN/1000 Zellen.

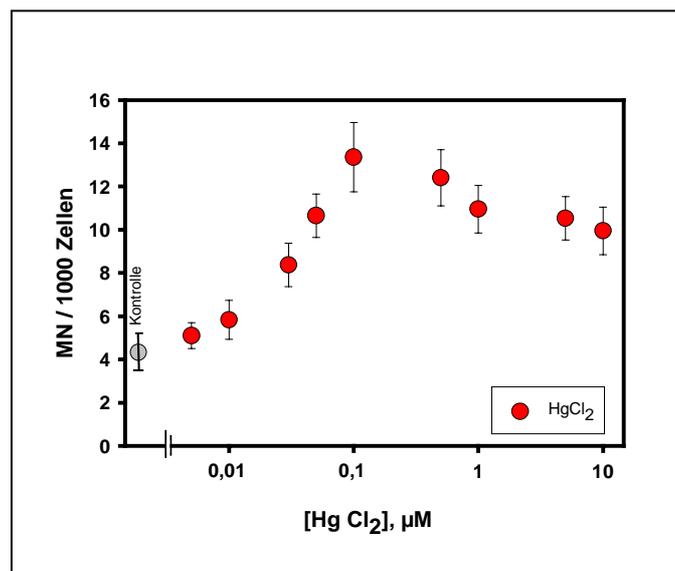


Abb. 46: Induktion von Mikrokernen durch Quecksilberchlorid (in V79-Zellen)

Mikrokerngrößen

Die Größen der durch HgCl₂ induzierten MN geben einen Hinweis auf zwei unterschiedliche Entstehungsmechanismen. Es sind etwa ebenso viele große wie kleine Mikrokern bei unterschiedlichen HgCl₂-Konzentrationen zu finden (Abb. 47 a,b). Dies spräche sowohl für klastogene als auch für aneugene Wirkweise von HgCl₂.

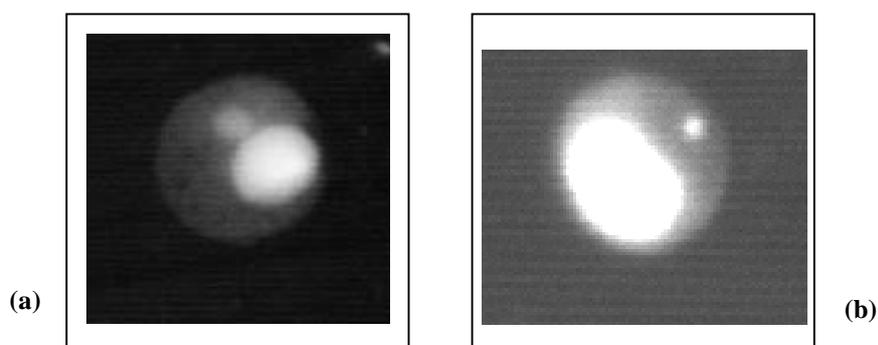


Abb. 47 (a, b): Typische Mikronuklei nach Inkubation mit 0,05 µM Quecksilberchlorid (V79-Zellen)

3.3.2.1.4. CREST-Analysen

Die Hinweise der Größenbeurteilung der durch HgCl_2 induzierten Mikrokerne werden im Rahmen der CREST-Analysen verifiziert. Bei vier gewählten HgCl_2 -Konzentrationen liegt etwa die Hälfte der MN mit positivem Kinetochorbefund vor (Abb. 48). Für die niedrigste in der CREST-Analyse eingesetzte Konzentration von $0,01 \mu\text{M}$ HgCl_2 , finden sich 60% „CREST-positiv“ MN. Nach Inkubation mit $0,1 \mu\text{M}$, $1 \mu\text{M}$ bzw. $5 \mu\text{M}$ HgCl_2 zeigen 50%, 46,2% bzw. 47% der MN positiven Kinetochorbefund. Zusätzlich gibt es auch einen großen Teil „CREST-negativer“ MN: 25% bei $0,01 \mu\text{M}$, 31,8% bei $0,1 \mu\text{M}$, 30,8% bei $1 \mu\text{M}$ und 41,2% bei $5 \mu\text{M}$ HgCl_2 . Der übrige Teil der detektierten MN war nicht eindeutig zu beurteilen. Insgesamt zeichnet sich die Existenz zweier unterschiedlicher Entstehungsmechanismen der MN-Induktion durch HgCl_2 ab. Die Mikrokerne entstehen teilweise auf klastogenem und teilweise auf aneugenem Wege. Auch in der CREST-Analyse ist, wie auch im MN-Test, bei höheren Konzentrationen (hier $5 \mu\text{M}$ HgCl_2) ein Rückgang der MN-Frequenz zu verzeichnen.

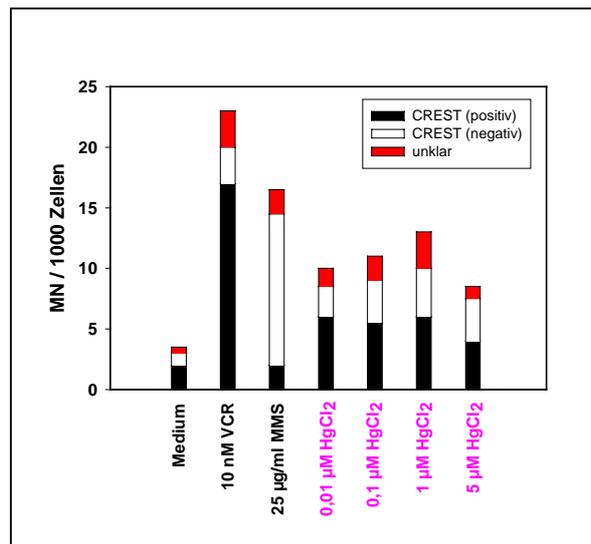


Abb. 48: CREST-Analyse: Durch Quecksilberchlorid induzierte MN (V79-Zellen)

3.3.2.2 Quecksilbernitrat

3.3.2.2.1. Mikrokerninduktion

Quecksilbernitrat induziert ebenfalls konzentrationsabhängig Mikronuklei (Abb. 49). Zwischen $0,01 \mu\text{M}$ und $0,1 \mu\text{M}$ verdoppelt sich die MN-Frequenz pro 1000 Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit $4,5 \pm 1,8$ MN pro 1000 Zellen. Bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ unterscheidet sich die MN-Rate gegenüber der Mediumkontrolle hoch signifikant ($P < 0,01$). Nach Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ ist eine maximale MN-Rate von $15,3 \pm 3,0$ MN pro 1000 Zellen zu finden. Die Inkubation mit $10 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ führt zu einer Abnahme auf ca. $9 \pm 2,6$ MN pro 1000 Zellen der durchschnittlichen Mikrokernrate. Die Standardabweichungen sind bei höheren Quecksilbernitrat-Konzentrationen ($1 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$) größer als bei Konzentrationen unter $1 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ (Tabelle A.4).

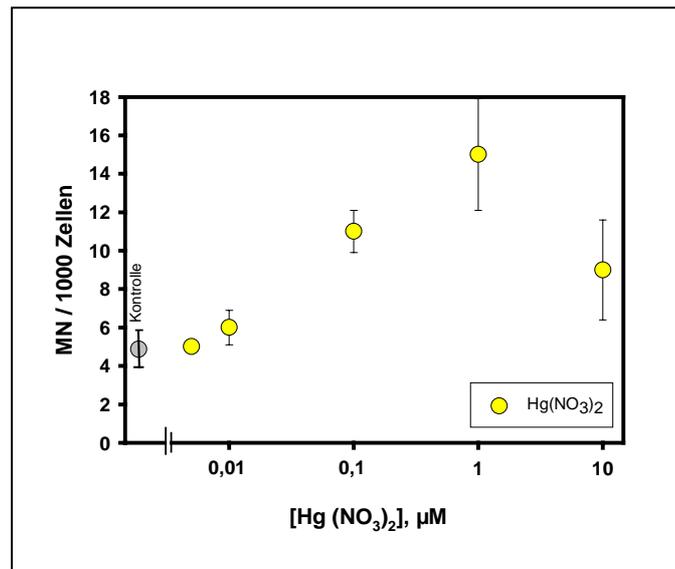


Abb. 49: Induktion von Mikrokernen durch Quecksibernitrat (V79-Zellen)

Mikrokerngrößen

Die durch $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ induzierten Mikrokerne weisen auf einen gemischten Wirkungsmodus der MN-Entstehung hin. Es finden sich sowohl relativ große (Abb. 50 a) als auch kleine MN (Abb. 50 b) in den ausgewerteten Proben. Somit scheint Quecksilbernitrat ebenso wie Quecksilberchlorid Mikronuklei sowohl aufgrund klastogener als auch aufgrund aneugener Wirkweise zu induzieren.

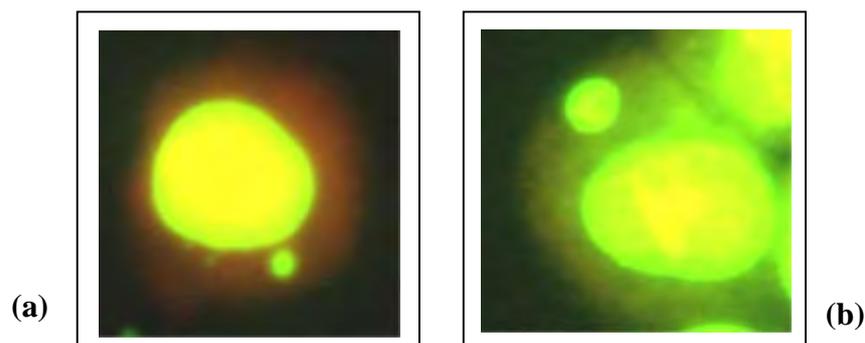


Abb. 50 (a, b): Typische Mikronuklei nach Inkubation mit Quecksilbernitrat (V79-Zellen)

3.3.2.3. Gegenüberstellung der MN-Induktion für Quecksilberchlorid und Quecksilbernitrat

Die Ergebniskurven für HgCl_2 und $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ zeigen einen ähnlichen Verlauf: Quecksilberchlorid und Quecksilbernitrat in Konzentrationen über $0,01 \mu\text{M}$ erhöhen die MN-Raten (Abb. 51). Die durchschnittlichen MN-Raten für HgCl_2 und $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ in Konzentrationen von $0,005 \mu\text{M}$, $0,01 \mu\text{M}$ und $10 \mu\text{M}$ liegen nahezu exakt beieinander. Die MN-Rate bei $0,1 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ liegt leicht unter der durch HgCl_2 induzierten MN-Anzahl pro 1000 Zellen ($11,4 \pm 1,2$ MN vs $13,3 \pm 1,6$ MN pro 1000 Zellen). Die maximal erreichten MN-Raten liegen für HgCl_2 bei $0,1 \mu\text{M}$ und für Quecksilbernitrat bei $1 \mu\text{M}$, wobei nach Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ eine relativ hohe Standardabweichung gefunden wird. Auch $10 \mu\text{M}$ $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ führt zu einer relativ hohen Standardabweichung.

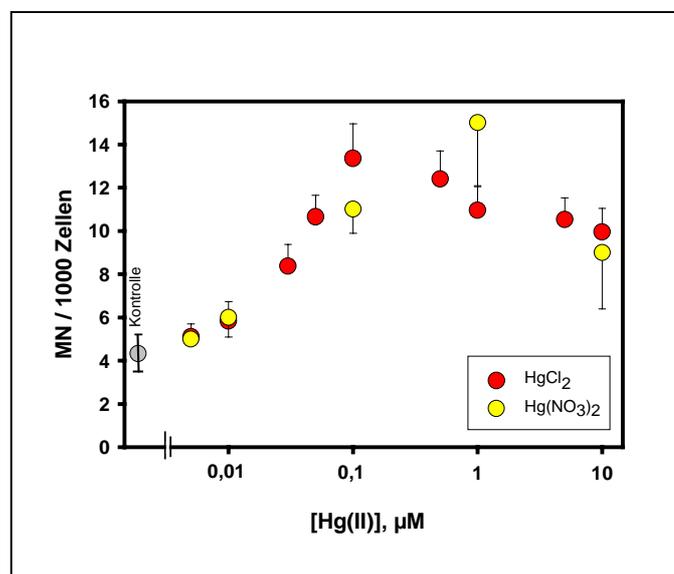


Abb. 51: Induktion von Mikrokernen durch Quecksilberchlorid und Quecksilbernitrat (V79-Zellen)

3.3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse für anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen

	PbCl₂	Pb(OAc)₂	HgCl₂	Hg(NO₃)₂
Zytotoxizität	> 500 µM	> 500 µM	18,5 µM	
↑ MN-Rate	1,1 µM	0,05 µM	0,03 µM	> 0,01 µM
CREST	+	+	+/-	

Tabelle 1: Zusammenfassung der Befunde für anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen

3.3.3.1. Anorganische Bleiverbindungen

Zytotoxizität (Reduktion des NR-Gehaltes) in V79-Zellen beginnt für Bleichlorid und -acetat in Konzentrationen über 500 µM Pb (II) (Abb. 40). Der Proteingehalt der Zellen nimmt für beide Bleiverbindungen ebenfalls in Konzentrationen über 500 µM Pb (II) ab (Abb. 41). Weiterhin induzieren Bleichlorid und -acetat konzentrationsabhängig Mikronuklei in V79-Zellen; erhöhte MN-Raten finden sich ab 1,1 µM PbCl₂ bzw. 0,05 µM Pb(OAc)₂ (Abb. 42). Die MN-Größen sowie die CREST-Analysen sprechen für einen aneugenen Wirkungsmechanismus von Pb (II) (Abb. 43).

3.3.3.2. Anorganische Quecksilberverbindungen

Im Rahmen des NR-Tests wird beginnende Zytotoxizität in Konzentrationen über 17 µM HgCl₂ festgestellt (Abb. 44). Zwischen 15 µM und 20 µM nimmt die Ergebniskurve relativ stark ab. Der Proteingehalt der Zellen sinkt nach Inkubation mit Konzentrationen über 19 µM HgCl₂ (Abb. 45). HgCl₂ und Hg (NO₃)₂ induzieren konzentrationsabhängig Mikrokerne, eine Erhöhung der MN-Rate ist für beide Verbindungen in Konzentrationen über 0,01 µM Hg (II) zu verzeichnen (Abb. 51). Die CREST-Analyse spricht für einen gemischten Entstehungsmodus der Mikronuklei durch HgCl₂; die Mikronuklei entstehen teils durch klastogene und teils durch aneugene Effekte (Abb. 48).

3.4. Organische Verbindungen

Zunächst wurden für verschiedene organische Substanzen (Acetamid, Acetonitril, Acrylamid, Acrylnitril und Nitrobenzol) Vortests (NR-Test und BCA-Test) durchgeführt, um zusammen mit einer umfangreichen Literaturrecherche zur Gentoxizität der genannten Verbindungen eine Substanz für detaillierte Untersuchungen auszuwählen.

3.4.1. Acetamid

3.4.1.1. Zytotoxizitätstest

Acetamid wirkt in V79-Zellen in Konzentrationen über 100 mM zytotoxisch (Abb. 52). Bei Inkubation mit 250 mM Acetamid ist die NR-Einlagerung um ca. 54% reduziert; der IC_{50} wird bei einer etwas geringeren Acetamid-Konzentration erreicht. Die höchste gemessene Acetamid-Konzentration von 5000 mM führt zu einer etwa 75%igen NR-Reduktion.

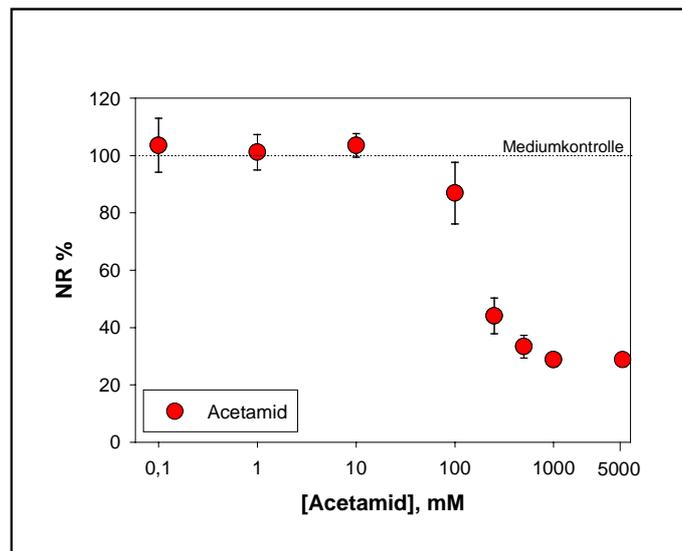


Abb. 52: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Acetamid

3.4.1.2. BCA-Test

Im BCA-Test findet sich ein dem NR-Test für Acetamid ähnliches Ergebnis; die Abnahme des Proteingehaltes der V79-Zellen setzt im Vergleich zur NR-Reduktion jedoch etwas später ein (bei Konzentrationen über 200 mM). Auch der IC_{50} wird hier etwas später erreicht, und zwar erst zwischen 1000 und 5000 mM Acetamid. 5000 mM Acetamid verringert den Proteingehalt um fast 60% (Abb. 53).

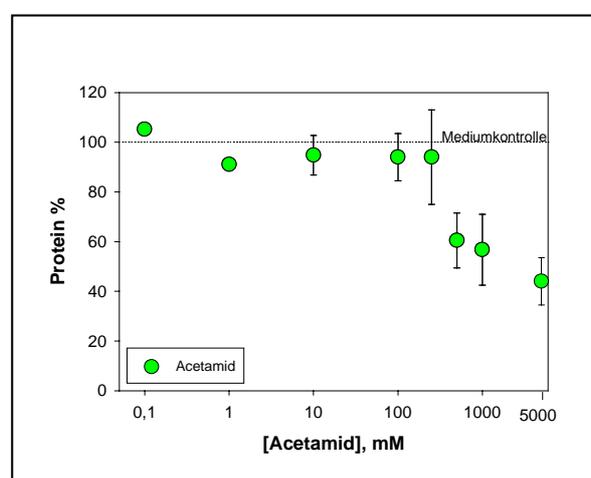


Abb. 53: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Acetamid

3.4.2. Acetonitril

3.4.2.1. Zytotoxizitätstest

Acetonitril wirkt bis 500 mM nicht zytotoxisch (Abb. 54); im Vergleich zur Medienkontrolle gibt es keine bedeutsamen Unterschiede der NR-Einlagerung in V79-Zellen; der NR-Gehalt liegt für alle untersuchten Konzentrationen nahe 100%.

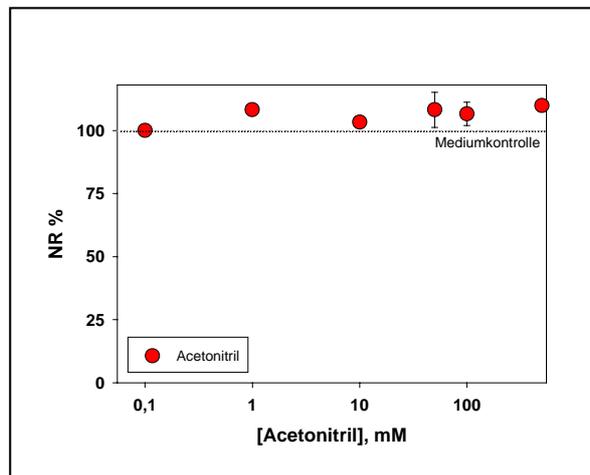


Abb. 54: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Acetonitril

3.4.2.2. BCA-Test

Auch im BCA-Test gibt es hinsichtlich der Proteinwerte für Konzentrationen von 0,1 bis 500 mM Acetonitril nahezu keine Unterschiede zur Medienkontrolle; der Proteingehalt bleibt für alle gewählten Konzentrationen nahe 100% (Abb. 55).

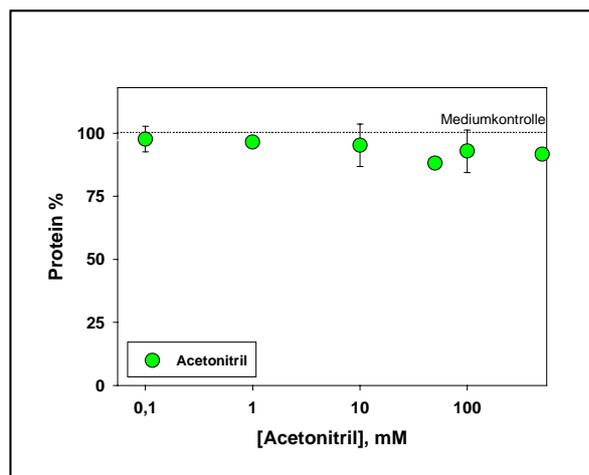


Abb. 55: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Acetonitril

3.4.3. Acrylamid

3.4.3.1. Zytotoxizitätstest

Acrylamid bewirkt in Konzentrationen über 1 mM eine Reduktion des NR-Gehaltes in V79-Zellen und somit Zytotoxizität. Zwischen 1 mM und 10 mM Acrylamid wird der NR-Gehalt der Zellen stark reduziert und der IC_{50} erreicht. Bei 10 mM Acetamid ist eine Reduktion des NR-Gehaltes um ca. 78% zu finden. Bei Konzentrationen über 100 mM Acrylamid beläuft sich der NR-Gehalt der Zellen auf ca. 10% (Abb. 56).

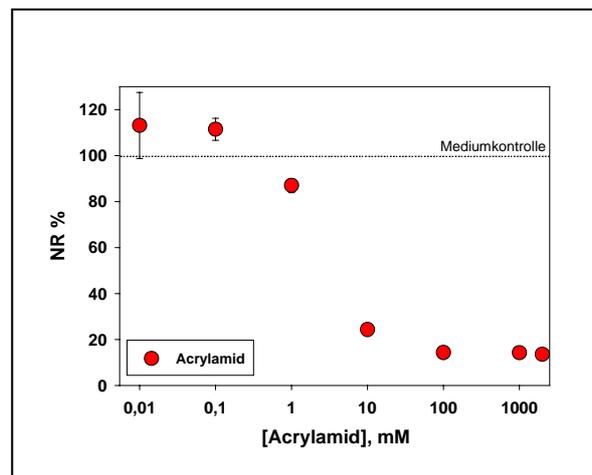


Abb. 56: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Acrylamid

3.4.3.2. BCA-Test

Der Proteingehalt der V79-Zellen wird bei Konzentrationen über 1 mM Acrylamid reduziert; die Kurve verläuft somit ähnlich wie die Kurve des NR-Tests, lediglich nicht entsprechend steil. Acrylamid-Konzentrationen von ca. 1000 bzw. 2000 mM führen hier lediglich zu einer Reduktion des Proteinwertes um ca. 60%. Der IC_{50} wird bei einer Konzentration um 100 mM erreicht (Abb. 57).

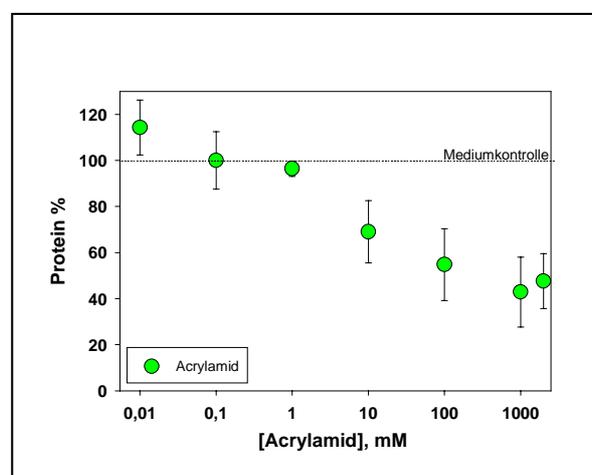


Abb. 57: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Acrylamid

3.4.4. Acrylnitril

3.4.4.1. Zytotoxizitätstest

Acrylnitril wirkt im Konzentrationsbereich von 0,001 bis 1000 mM in V79-Zellen nicht zytotoxisch, denn es sind keine bedeutsamen Unterschiede zur Kontrolle meßbar. Der NR-Gehalt liegt für alle gewählten Konzentrationen um 100% (Abb. 58). Weiterhin ist Acrylnitril aufgrund der hohen Flüchtigkeit relativ schwer zu beurteilen.

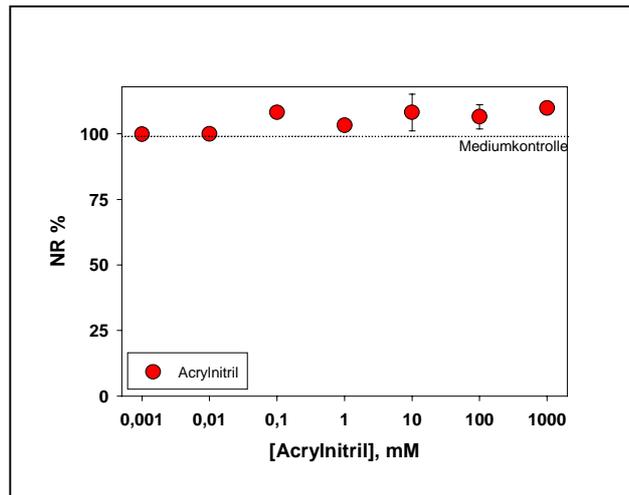


Abb. 58: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Acrylnitril

3.4.4.2. BCA-Test

Auch im BCA-Test werden bei Konzentrationen von 0,001 bis 1000 mM keine bedeutsamen Unterschiede zur Medienkontrolle gemessen; die Proteingehalte liegen um 100% (Abb. 59).

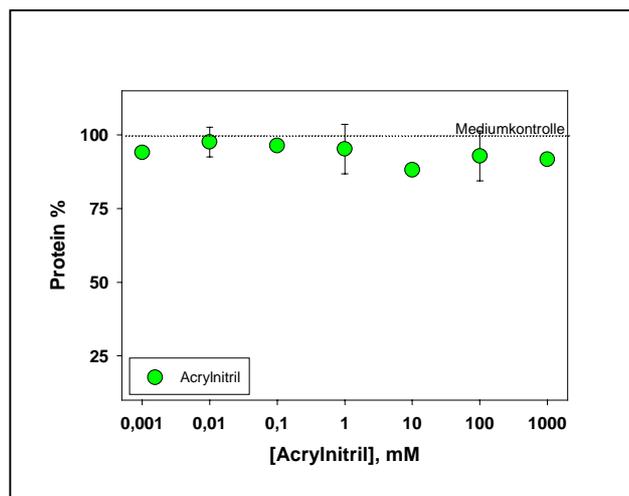


Abb. 59: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Acrylnitril

3.4.5. Nitrobenzol

Da Nitrobenzol in Wasser nahezu unlöslich ist, wurde es für alle Zytotoxizitätsversuche in einer Endkonzentration von 0,4% DMSO gelöst, da sich diese DMSO-Konzentration im Rahmen der Neutralrottests als nicht zytotoxisch herausstellte (s. 3.2.1.1). Für alle MN-Untersuchungen und die CREST-Analysen wurden lediglich 0,04% DMSO eingesetzt, da diese DMSO-Konzentration mit der Medienkontrolle vergleichbare MN-Raten induziert (s. 3.2.1.3).

3.4.5.1. Zytotoxizitätstest

Bis zur Löslichkeitsgrenze in DMSO fand sich bei keiner der gewählten Konzentrationen ein Unterschied zur Mediumkontrolle, und Nitrobenzol wirkt somit in V79-Zellen bis 1000 μM nicht zytotoxisch (Abb. 60).

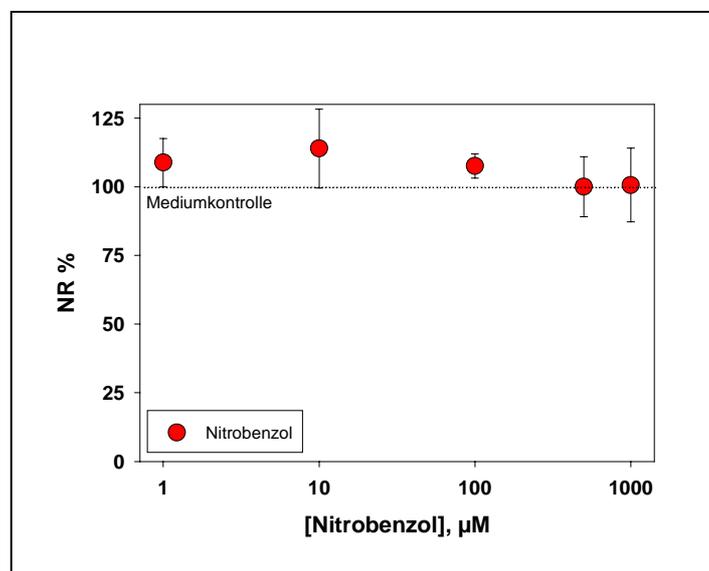


Abb. 60: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Nitrobenzol

3.4.5.2. BCA-Test

Auch der Proteingehalt der V79-Zellen nach Inkubation mit Nitrobenzol in 0,4% DMSO verändert sich bis 1000 μM nicht und entspricht in etwa der Mediumkontrolle mit 100% (Abb. 61).

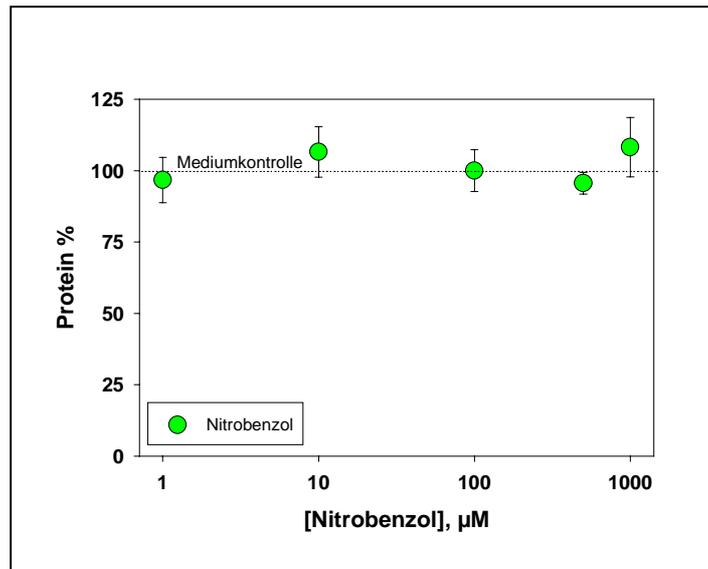


Abb. 61: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Nitrobenzol

Anmerkung:

Eine Literaturrecherche zur Gentoxizität der organischen Verbindungen Acrylamid, Acetamid, Acrylnitril, Nitrobenzol, Acetonitril und Benzonitril sowie Vortests im Neutralrottest führten zur Auswahl von Nitrobenzol für weitere Untersuchungen. Die Literaturrecherche ergab, daß Nitrobenzol insgesamt ungenügend auf Gentoxizität untersucht ist. Mikronukleusinduktionen sind *in vitro* unzureichend und *in vivo* gar nicht untersucht, und weiterhin hat sich Nitrobenzol in Langzeit-Tierversuchen an B6C3F1-Mäusen und an F344- sowie CD-Ratten bei inhalatorischer Gabe als krebserzeugend herausgestellt (s. 1.8.1.2.). Acrylnitril und Acetonitril sind vermutlich aufgrund ihrer relativ hohen Flüchtigkeit auch schon bei 37°C schwer zu beurteilen und wurden aus diesem Grunde ausgeschlossen. Zusätzlich zum Nitrobenzol wurde die strukturell ähnliche Verbindung Benzonitril als zweite zu untersuchende Substanz gewählt.

3.4.5.3. Mikrokerninduktion

Die Mikrokern-Tests für Nitrobenzol wurden mit Endkonzentrationen von 0,04% DMSO durchgeführt. Es zeigt sich eine erhöhte MN-Rate bei einer Nitrobenzol-Konzentration über 0,01 µM (Abb. 62, $P < 0,01$). Zwischen 0,1 und 1 µM Nitrobenzol verdoppelt sich die MN-Rate im Vergleich zur Kontrolle. 0,1 µM Nitrobenzol induziert durchschnittlich $10,2 \pm 1,3$ MN pro 1000 Zellen, während in den Kontrollpräparaten $5,1 \pm 0,7$ MN zu finden waren ($P < 0,01$). Bei 1 µM bzw. 10 µM Nitrobenzol werden im Durchschnitt $12,0 \pm 1,1$ bzw. $12,2 \pm 1,6$ Mikrokern pro 1000 Zellen erreicht. Eine Nitrobenzol-Konzentration von 100 µM führt zu einer leichten Abflachung der Kurve auf $10,9 \pm 1,1$ MN pro 1000 Zellen.

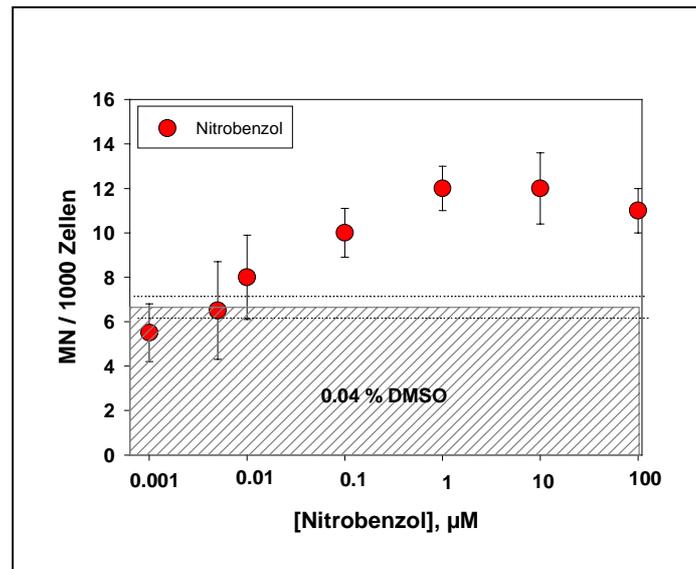


Abb. 62: MN-Induktion in V79-Zellen durch Nitrobenzol

Mikrokerngrößen

Die durch Nitrobenzol induzierten Mikronuklei sind im Vergleich zu Mikrokernen, die durch VCR oder MMS induziert werden, zum größten Teil „mittelgroß“ (Abb. 63), und es kann keine Aussage über den Wirkungsmechanismus der Mikrokernentstehung getroffen werden. Es ist unklar, ob es sich um relativ große Bruchstücke von Chromosomen (klastogene Effekte) oder eher kleinere aber vollständige Chromosomen (aneugene Wirkung) handelt, die zu dieser mittleren MN-Größe führen.

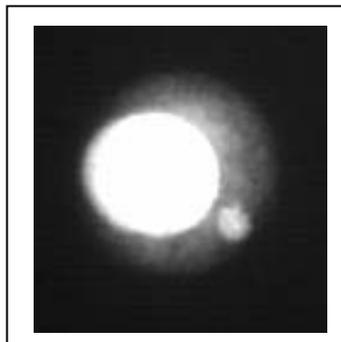


Abb. 63: Typischer Mikronukleus nach Inkubation mit 0,1 µM Nitrobenzol (V79-Zellen)

3.4.5.4. CREST-Analysen

Im Rahmen der CREST-Analysen für Nitrobenzol in V79-Zellen finden sich überwiegend CREST-positive Mikronuklei, d.h. Nitrobenzol induziert Mikrokerne hauptsächlich über aneugene Wirkweise (Abb. 64). Die Ergebnisse der drei gewählten Nitrobenzol-Konzentrationen stellen sich wie folgt dar: 0,01 µM Nitrobenzol ist noch nicht eindeutig zu beurteilen, da es gleichmäßig viele „CREST-positive“, „CREST-negativ“ und „unklar“ zu beurteilende MN induziert (insgesamt jeweils 33,3%). Bei einer Nitrobenzol-Konzentration von 0,1 µM liegen 72,7% der MN „CREST-positiv“, 9,1% „CREST-negativ“ und 18,2%

„unklare“ Mikronuklei vor, womit 0,1 μM Nitrobenzol die Mikrokerne vorwiegend aufgrund aneugener Wirkweisen induziert. 10 μM Nitrobenzol bestätigen den aneugenen Weg der Mikrokernbildung, denn auch hier sind hauptsächlich „CREST-positive“ MN zu finden (62,5%). 16,7% der MN sind bei 10 μM Nitrobenzol „CREST-negativ“, während ein Rest von 20,8% der Mikrokerne nicht zu beurteilen war. Die Gesamtzahlen der Mikrokerne pro 1000 Zellen entsprechen in etwa den Zahlen, die auch im MN-Test gefunden wurden. Für 0,01 μM Nitrobenzol wurden im Rahmen der CREST-Analysen sechs MN pro 1000 Zellen gefunden; im MN-Test waren es $7,9 \pm 1,8$. Bei 0,1 μM Nitrobenzol fanden sich 11,0 MN in der CREST-Analyse und $10,2 \pm 1,3$ im MN-Test, während 10 μM Nitrobenzol zu 12,0 MN im Rahmen der CREST-Untersuchungen bzw. zu $12,2 \pm 1,6$ MN pro 1000 Zellen im MN-Test führt.

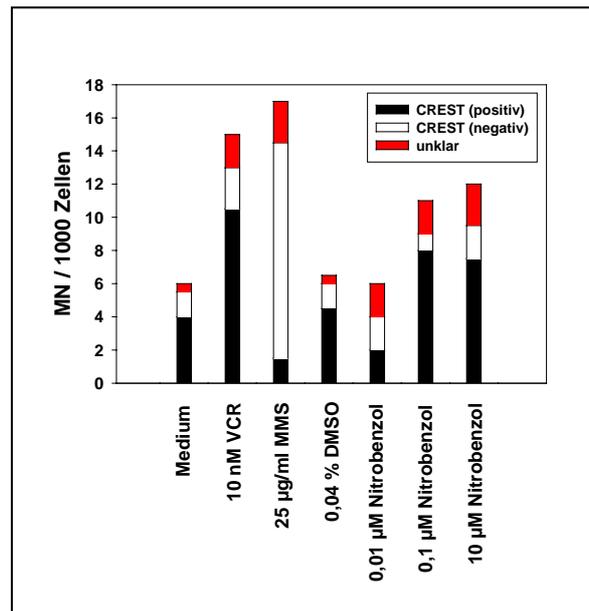


Abb. 64: CREST-Analyse: Durch Nitrobenzol induzierte MN in V79-Zellen sind überwiegend „CREST-positiv“, entstehen somit durch aneugene Wirkweise

3.4.6. Benzotriazol

Auch für Benzotriazol wurden DMSO-Endkonzentrationen gewählt, wie sie schon zuvor für die Versuche mit Nitrobenzol verwendet wurden (0,04% DMSO).

3.4.6.1. Zytotoxizitätstest

Auch für Benzotriazol wird bis 1000 μM keine Zytotoxizität festgestellt; alle gewählten Benzotriazol-Konzentrationen liegen etwa um 100% und weichen somit nicht von der Mediumkontrolle ab (Abb. 65).

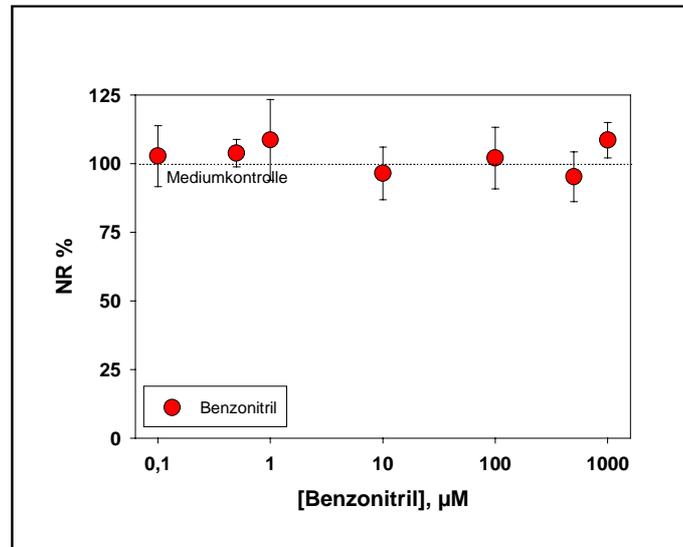


Abb. 65: Neutralrotaufnahme in V79-Zellen nach Inkubation mit Benzonitril

3.4.6.2. BCA-Test

Im BCA-Test gibt es ebenfalls bis 1000 µM Benzonitril keine Veränderung des Proteinwertes im Vergleich zur Mediumkontrolle (Abb. 66).

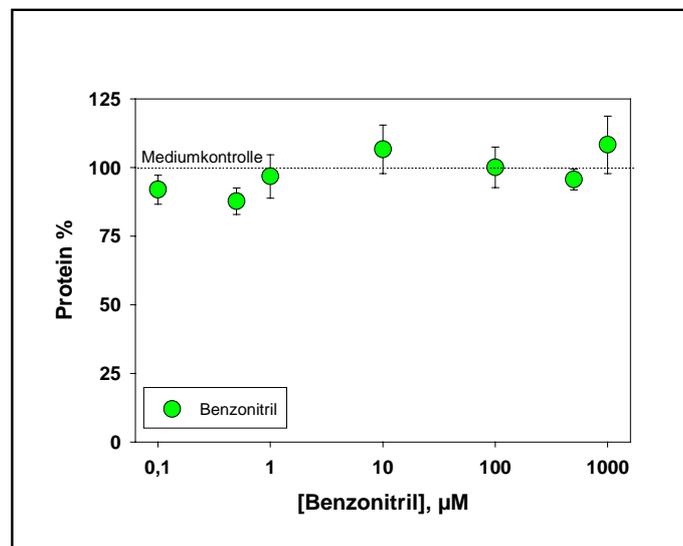


Abb. 66: Proteingehalt in V79-Zellen nach Inkubation mit Benzonitril

3.4.6.3. Mikrokerninduktion

Benzonitril induziert konzentrationsabhängig Mikronuklei, wobei Konzentrationen ab $0,01 \mu\text{M}$ Benzonitril zu einer im Vergleich zur DMSO-Kontrolle erhöhten MN-Rate führen (Abb. 67, $P < 0,01$). Etwa bei $0,1 \mu\text{M}$ Benzonitril wird die Verdopplung der bei der DMSO-Kontrolle induzierten durchschnittlichen MN-Rate erreicht ($0,04\%$ DMSO: $5,5 \pm 1,1$ bzw. $11,0 \pm 1,1$ MN pro 1000 Zellen). Bei $10 \mu\text{M}$ Benzonitril wird eine maximale MN-Rate von $12,5 \pm 1,3$ MN pro 1000 Zellen erreicht, und bei Konzentrationen über $10 \mu\text{M}$ Benzonitril nimmt die MN-Rate leicht ab; bei $100 \mu\text{M}$ Benzonitril liegen im Durchschnitt $10,5 \pm 1,3$ MN pro 1000 Zellen vor (Abb. 67).

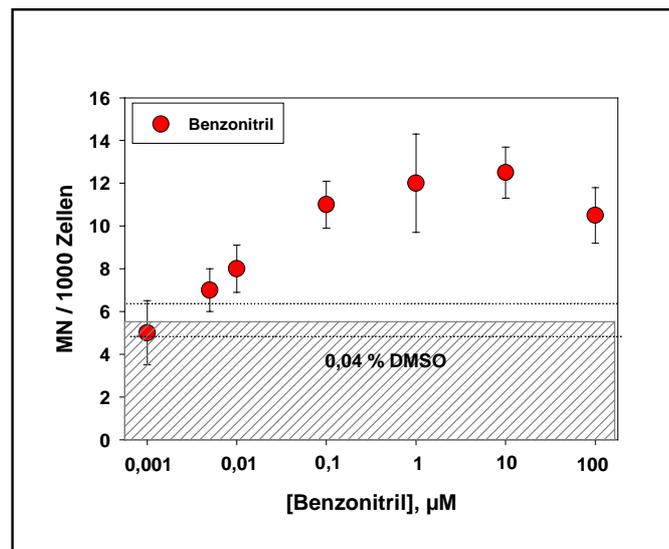


Abb. 67: MN-Induktion in V79-Zellen durch Benzonitril (in V79-Zellen)

Mikrokerngrößen

Anhand der Größenbeurteilung der durch Benzonitril induzierten Mikronuklei lässt sich der Entstehungsmechanismus der MN nicht erschließen, denn es werden häufig große (Abb. 68 b) und ebenso häufig kleine MN (Abb. 68 a), aber gelegentlich auch mittelgroße MN gefunden.

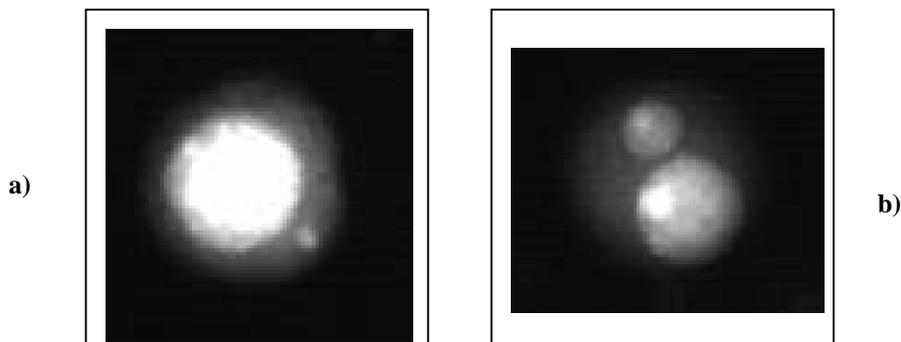


Abb. 68 a, b: Besonders häufig gefundene Mikronuklei nach Inkubation mit $0,1 \mu\text{M}$ Benzonitril (V79-Zellen)

3.4.6.4. CREST-Analysen

Benzonitril induziert MN hauptsächlich über einen aneugenischen Wirkungsmechanismus (Abb. 69). In den drei untersuchten Konzentrationen finden sich vor allem „CREST-positive“ Mikronuklei: bei einer Konzentration von 0,1 μM sind es 47,4%, bei 10 μM Benzonitril 88% und bei 100 μM Benzonitril fanden sich 70,8% „CREST-positive“ MN. Die „CREST-negativen“ MN hingegen liegen lediglich mit 21% bei 0,1 μM Benzonitril, 0% bei 10 μM Benzonitril und 12,5% bei 100 μM Benzonitril vor. Der übrige Teil der MN (31,6% bei 0,1 μM Benzonitril, 12% bei 10 μM und 16,7% bei 100 μM Benzonitril) war nicht eindeutig zu beurteilen.

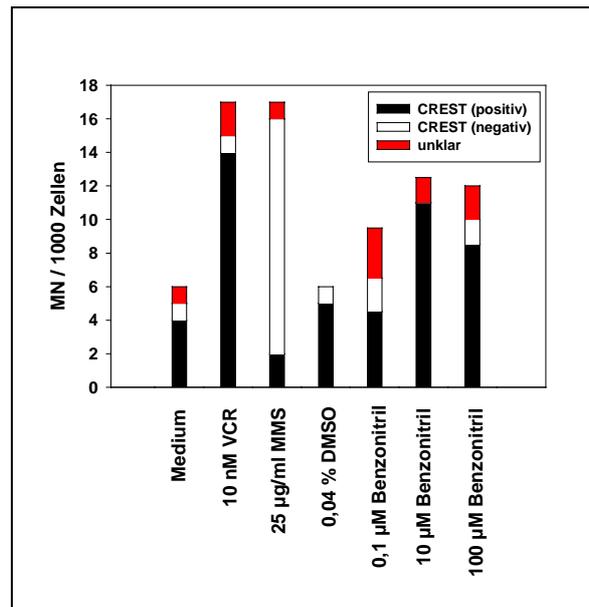


Abb. 69: CREST-Analyse: Durch Benzonitril induzierte MN in V79-Zellen sprechen für aneugene Wirkweise

3.5. Zusammenfassung der Ergebnisse für Nitrobenzol und Benzonitril

	Nitrobenzol	Benzonitril
Zytotoxizität	bis 1000 μM : nein	bis 1000 μM : nein
↑ MN-Rate	0,01 μM	0,01 μM
CREST	+	+

Tabelle 2: Zusammenfassung der Befunde für Nitrobenzol und Benzonitril.

In nicht zytotoxischen Konzentrationen induzieren Nitrobenzol und Benzonitril in V79-Zellen konzentrationsabhängig Mikronuklei. Bei einer Konzentrationen von 0,01 μM liegt für beide Verbindungen ein Effekt vor (Abb. 62 und 67). Da die MN-Größen keinen adäquaten Hinweis auf die Mechanismen der MN-Entstehung gaben, wurde diese Frage im Rahmen der CREST-Analysen abgeklärt. Die Ergebnisse sprechen für aneugene Wirkweisen von Nitrobenzol und Benzonitril (Abb. 64 und 69).

3.6. Alkohole

Die Wahl der im MN-Test eingesetzten Alkoholverbindungen sowie geeigneter zu untersuchender Konzentrationen geschah in Anlehnung an die Publikation von *Schultz und Önfelt* (2000). Wie auch bei *Schultz und Önfelt* wurden die Mittelwerte, die für die Kontrollen erhalten wurden (0,04% Ethanol als Kontrolle der Hexanolversuche bzw. Mediumkontrolle der Butanolexperimente), gleich 1,0 gesetzt und die Ergebnisdaten der beiden Alkohole wurden für die untersuchten Konzentrationen entsprechend umgerechnet und in den Tabellen 3 und 4 dargestellt. Anhand dieser Tabellen lassen sich die Daten von *Schultz und Önfelt* mit den Daten der vorliegenden Arbeit vergleichen.

3.6.1. Hexanol

3.6.1.1. Mikrokerninduktion

Hexanol induziert in V79-Zellen Mikronuklei (Abb. 70). Die MN-Induktion durch 0,04% Ethanol (Kontrolle) liegt im Mittel bei $6,4 \pm 1,2$ MN/1000 Zellen, während sich für die gewählten Hexanol-Konzentrationen folgende mittlere MN-Raten pro 1000 Zellen ergeben: bei $-\log 3,9$ fanden sich $11,4 \pm 2,7$, bei $-\log 3,6$ schon $15,9 \pm 3,0$, bei $-\log 3,3$ gab es $16,4 \pm 1,8$ und bei $-\log 3,0$ lagen im Mittel $17,5 \pm 2,0$ MN/1000 Zellen vor. Eine Verdopplung der Spontanrate liegt somit zwischen $-\log 3,9$ und $-\log 3,6$.

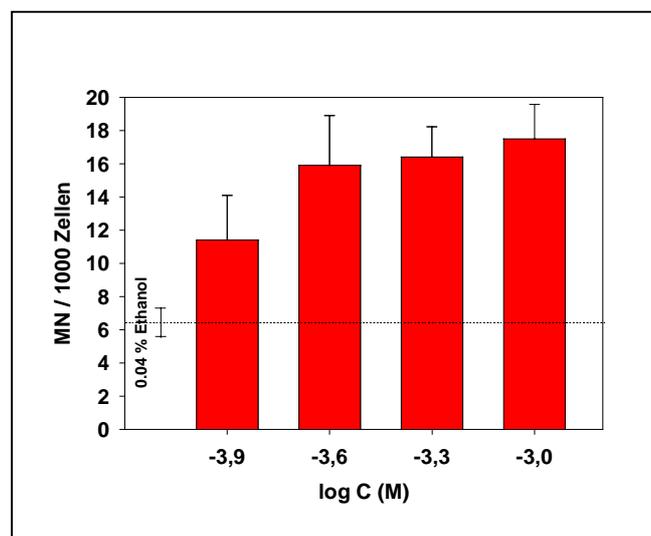


Abb. 70: Induktion von Mikronuklei durch Hexanol (in V79-Zellen)

3.6.2. Butanol

3.6.2.1. Mikrokerninduktion

Auch Butanol induziert in V79-Zellen eine Erhöhung der Mikrokernrate im Vergleich zur MN-Rate der Mediumkontrolle, allerdings werden für Butanol erst in höheren Konzentrationsbereichen erhöhte MN-Raten gefunden als dies bei Hexanol der Fall war (Abb. 71). So findet sich für Butanol bei $-\log 2,6$ eine MN-Rate, die mit $5,4 \pm 1,6$ MN/1000

Zellen im Bereich der Mediumkontrolle liegt. Bei der Mediumkontrolle liegen $6,8 \pm 1,2$ MN/1000 Zellen vor. In höheren Butanol-Konzentrationen finden sich folgende gemittelte MN-Daten pro 1000 Zellen: $15,6 \pm 2,1$ (bei $-\log 2,3$), $18,0 \pm 2,5$ (bei $-\log 2,0$) und $19,3 \pm 1,7$ (bei $-\log 1,3$). Für Butanol liegt die Verdopplung der MN-Spontanrate im Konzentrationsbereich zwischen $-\log 2,6$ und $-\log 2,3$.

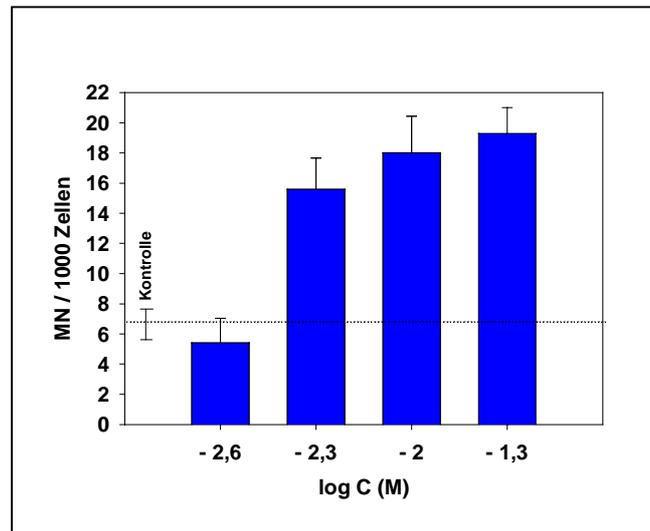


Abb. 71: Induktion von Mikronuklei durch Butanol (in V79-Zellen)

3.7. Vergleich: MN-Test/Induktion binukleärer Zellen

Die Ergebnisse zur Induktion binukleärer Zellen (*Schultz und Önfelt, 2000*) sowie die eigenen MN-Ergebnisse können zunächst unter der Annahme verglichen werden, daß sich die Ergebnisse der beiden Testsysteme nicht wesentlich unterscheiden sollten. Hierzu werden auch die in dieser Arbeit ermittelten Nitrobenzol-, Benzonitril-, VCR- und MMS-Daten hinzugezogen. Die Konzentrationen, bei denen für die vier erwähnten Substanzen eine Verdopplung der MN-Spontanrate gefunden wird, wurde anhand der vorliegenden MN-Ergebnisgrafiken ermittelt und in die Abb. 72 eingefügt.

3.7.1. Hexanol

In Tabelle 3 sind die Ergebnisse für Hexanol der Publikation von *Schultz und Önfelt* sowie die MN-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gegenübergestellt. Läßt man zunächst die unterschiedlichen Versuchsbedingungen außer acht, zeigt sich, daß die MN-Daten der vorliegenden Arbeit insgesamt etwas höher liegen als die bei *Schultz und Önfelt* gefundenen Raten binukleärer (BIN) Zellen. Die Verdopplungen der MN bzw. BIN-Spontanraten finden sich bei unterschiedlichen Konzentrationen, allerdings nicht um Zehnerpotenzen voneinander entfernt. Bei *Schultz und Önfelt* liegt die Verdopplung der BIN-Spontanrate bei einer Konzentration von $-\log 3,3$, während die verdoppelte MN-Spontanrate der vorliegenden Arbeit zwischen $-\log 3,6$ und $-\log 3,9$ liegt. Der mittlere Bereich dieses Ergebnisses wurde in

Abb. 72 aufgetragen, und es zeigt sich, daß für Hexanol die Verdopplung der MN-Spontanrate der vorliegenden Arbeit, ebenso wie die Daten von *Schultz und Önfelt*, nahe an der von *Schultz und Önfelt* ermittelten Geraden „der hydrophoben Wechselwirkung“ liegen.

	log C (M)	<i>Schultz und Önfelt</i> , BIN, 24 h *	MN-Raten der vorliegenden Arbeit	log P (Octanol/Wasser)
Kontrolle (0.04% Ethanol)		1,00 ± 0,04	1,00 ± 0,19	
Hexanol	-4,0	1,13 ± 0,16	/	2,03
	-3,9	/	1,78 ± 0,42	
	-3,6	1,36 ± 0,16	2,48 ± 0,47	
	-3,3	2,07 ± 0,28	2,56 ± 0,28	
	-3,0	/	2,73 ± 0,32	

 Verdopplung der BIN-Spontanrate, *Schultz und Önfelt* 2000

 Verdopplung der MN-Spontanrate

* BIN: binukleäre Zellen

Tabelle 3: Mikronuklei- bzw. BIN-Induktion in V79-Zellen durch Hexanol. Der Verteilungskoeffizient für Hexanol wurde einer Datenbank (Syracuse Research Corporation, USA) entnommen.

3.7.2. Butanol

Auch für Butanol werden die Ergebnisse der Publikation von *Schultz und Önfelt* mit den Daten dieser Arbeit verglichen (Tabelle 4). Auch für Butanol liegen die MN-Spontanraten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit ermittelt wurden, etwas über den von *Schultz und Önfelt* erhaltenen BIN-Raten. Eine Verdopplung der Spontanrate binukleärer Zellen findet sich bei *Schultz und Önfelt* bei einer Konzentration von $-\log 2,0$, während in der vorliegenden Arbeit die Verdopplung der MN-Spontanrate zwischen $-\log 2,3$ und $-\log 2,6$ erwartet wurde. Auch dieses Ergebnis wurde gegen den Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser in die Abb. 72 eingefügt. Auch für Butanol finden sich die Verdopplungen der MN-Spontanraten in einem ähnlichen Konzentrationsbereich wie er auch bei *Schultz und Önfelt* für die Induktion binukleärer Zellen ermittelt wurde, und dies deutet auf hydrophobe Wechselwirkung mit der Mitosespindel hin.

	log C (M)	Schultz und Önfelt, BIN, 24 h *	MN-Raten der vorliegenden Arbeit	log P (Octanol/Wasser)
Kontrolle		1,00 ± 0,25	1,00 ± 0,18	
Butanol	-3	1,54 ± 0,33	/	0,88
	-2,6	/	0,79 ± 0,23	
	-2,3	1,76 ± 0,22	2,29 ± 0,30	
	-2,0	1,95 ± 0,21	2,64 ± 0,37	
	-1,3	4,26 ± 0,11	2,83 ± 0,25	

* BIN: binukleäre Zellen

 Verdopplung der BIN-Spontanrate, Schultz und Önfelt 2000

 Verdopplung der MN-Spontanrate

Tabelle 4: Mikronuklei- bzw. BIN-Induktion in V79-Zellen durch Butanol. Der Verteilungskoeffizient für Butanol wurde einer Datenbank (Syracuse Research Corporation, USA) entnommen.

3.7.3. Verdopplungen der MN-Spontanraten für MMS, VCR, NB und BN

3.7.3.1. Methylmethansulfonat (MMS)

Die Konzentration, bei der eine Verdopplung der MN-Spontanrate vorliegt, findet sich für MMS etwa drei Zehnerpotenzen oberhalb der nach der Geraden aus *Schultz und Önfelt* zu erwartenden Werte für den Einfluß einer hydrophoben Wechselwirkung (Abb. 72). Der rechnerisch ermittelte Verteilungskoeffizient für Octanol/Wasser liegt für MMS bei -0,66, und der negative Logarithmus der Konzentration, bei der die Verdopplung der MN-Spontanrate gefunden wird, liegt bei etwa 3,9. Mit diesem Ergebnis wird der spezifische Wirkmechanismus von MMS bestätigt.

3.7.3.2. Vinkristin (VCR)

Der negative Logarithmus der VCR-Konzentration, für die eine Verdopplung der Spontanrate an Mikronuklei gefunden wird, beträgt 9,2. Dieser Wert liegt fast drei Zehnerpotenzen über dem Wert, der im Falle einer hydrophoben Wechselwirkung zu erwarten wäre (Abb. 72). Somit wird auch für VCR der spezifische Wirkmechanismus der MN-Entstehung bestätigt.

3.7.3.3. Nitrobenzol

Für Nitrobenzol wird eine Verdopplung der MN-Spontanrate bei einem negativen Logarithmus von 6,0 gefunden (Abb. 72). Dieser Wert liegt über zwei Zehnerpotenzen oberhalb der von *Schultz und Önfelt* erstellten Geraden. Da die MN-Ergebnisse zur Verdopplung der Spontanrate weit außerhalb des Konzentrationsbereichs liegen, für den hydrophobe Wechselwirkung vorläge, weist das Ergebnis auf einen spezifischen Wirkmechanismus der MN-Induktion durch Nitrobenzol hin.

3.7.3.4. Benzonitril

Auch für Benzonitril findet sich die Konzentration, bei der eine Verdopplung der MN-Spontanrate vorliegt (-log 6,0), weit außerhalb (ca. 2,5 Zehnerpotenzen) des Wertebereichs,

für den eine hydrophobe Wechselwirkung zu erwarten wäre (Abb. 72). Somit deutet sich auch für Benzonnitril ein spezifischer Wirkmechanismus der MN-Entstehung an.

	log P, Octanol/Wasser	log C (der vorliegenden Arbeit)
Methylmethansulfonat	-0,66	-3,9
Vinkristin	2,5	-9,2
Nitrobenzol	1,85	-6,0
Benzonnitril	1,56	-6,0

Tabelle 5: Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser und Konzentrationen, bei denen eine Verdopplung der Mikrokern-Spontanrate vorliegt. Die Verteilungskoeffizienten für Nitrobenzol und Benzonnitril wurden einer Datenbank (Syracuse Research Corporation, USA) entnommen. Die Verteilungskoeffizienten für MMS und VCR wurden mit Hilfe des Kalkulationsprogrammes $K_{ow}Win$ (Syracuse Research Corporation, USA) ermittelt.

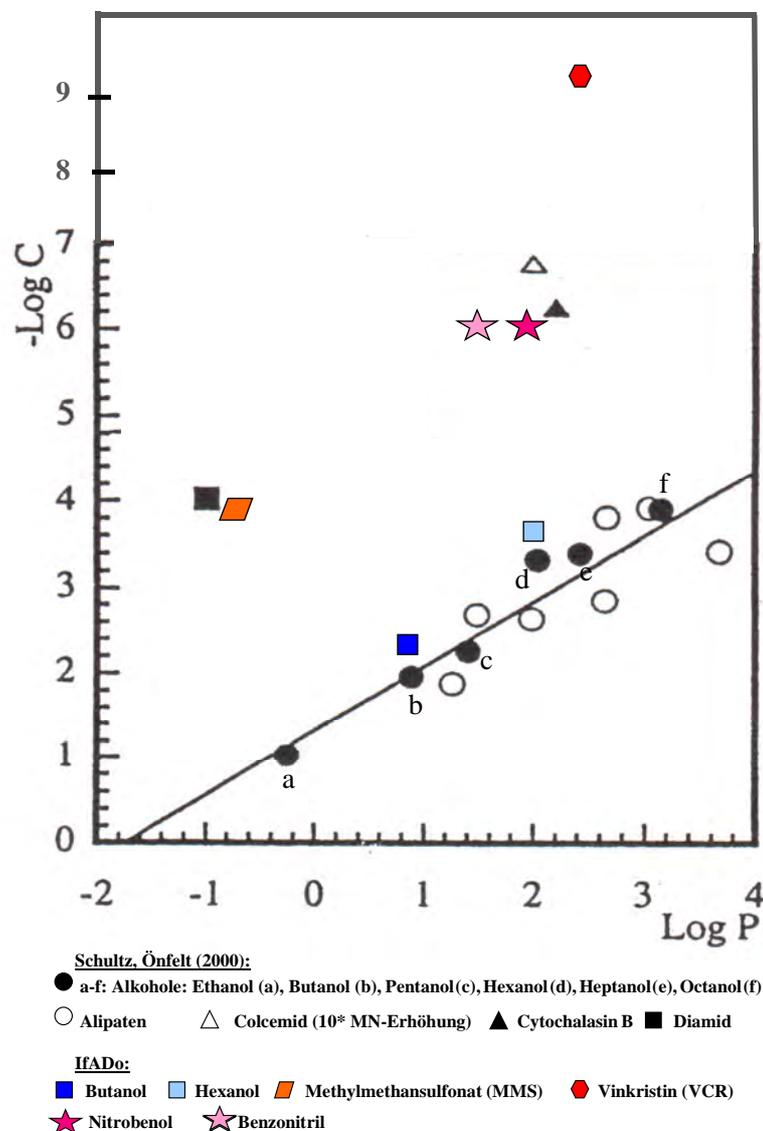


Abb. 72: Zusammenhang zwischen der Konzentration C, die eine Verdopplung der MN- (vorliegende Arbeit) bzw. BIN-Spontanrate (Schultz und Önfelt) in V79-Zellen induziert, und dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten P der Testsubstanzen in Octanol/Wasser.

3.8. Zusammenfassung der Ergebnisse für die untersuchten organischen Stoffe (Hexanol, Butanol, Methylmethansulfonat, Vinkristin, Nitrobenzol und Benzonitril)

Nach Annahme, daß sich die Beziehung zwischen dem $\log P$ und dem $-\log C$ für hydrophobe Interaktionen in den beiden Testmethoden nicht unterscheidet, liegt folgendes Ergebnis vor: die Konzentrationen für die Verdopplungen der MN-Spontanraten für Nitrobenzol und Benzonitril liegen ebenso wie für die Referenzsubstanzen Methylmethansulfonat (MMS) und Vinkristin (VCR) jeweils mindestens drei Zehnerpotenzen oberhalb der nach der Geraden aus *Schultz und Önfelt* zu erwartenden Werte für den Einfluß hydrophober Wechselwirkungen. Dies weist somit auf einen spezifischen Wirkungsmechanismus der MN-Induktion durch MMS, VCR, Nitrobenzol und Benzonitril hin. Die Ergebnisse für Hexanol und Butanol lassen, wie auch bei *Schultz und Önfelt* beschrieben, auf hydrophobe Wechselwirkung der Alkohole mit der Mitosespindel schließen.

4. Diskussion

In eukaryotischen Zellen sind Zytoskelettproteine an Prozessen der Zellteilung beteiligt, und Störungen oder Schädigungen von Zytoskelettproteinen können den korrekten Ablauf der Chromosomen-Segregation beeinträchtigen. Insbesondere Mikrotubuli, deren Polymerisation zu den wichtigsten Prozessen innerhalb des Zellzyklus zählt, sind an der Bildung der Mitosespindel und somit am korrekten Ablauf der Chromosomen-Segregation beteiligt. Viele antimitotische Stoffe verändern die Struktur der Mikrotubuli und führen so zu Störungen beim Aufbau des Spindelapparates (*Hamel 2002*). Zahlreiche aneugene Substanzen stören oder schädigen Komponenten der mitotischen Spindel oder der Kinetochorregion, wodurch es zu Fehlern bei der Wanderung der Chromosomen (*Pisano et al. 2000*) sowie zur Bildung von Mikronuklei kommen kann. Substanzen, die das Zytoskelett beeinflussen, können gentoxische Schäden auf chromosomaler Ebene hervorrufen, die sich in einer erhöhten Mikronukleus-Rate oder in Aneuploidie beobachten lassen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten neue Erkenntnisse über die chromosomale Gentoxizität von Substanzen gewonnen werden, die in nicht-zytotoxischen Konzentrationen das Zytoskelett beeinflussen könnten. Insbesondere anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen sowie die organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzotrinitril sollten in dieser Arbeit untersucht werden. Zur Überprüfung der Zytotoxizität wurde der Neutralrottest eingesetzt und zur Abklärung des gentoxischen Potentials von Substanzen wurde der Mikronukleus-Test verwendet. Mit Hilfe des Mikronukleus-Tests wird die Verbindung zum Zytoskelett, insbesondere zum Tubulin hergestellt. Den Nachweis, ob eine Testsubstanz primär aneugen oder klastogen wirkt, lieferte in der vorliegenden Arbeit die CREST-Analyse über die Markierung von Kinetochorstrukturen. Wird ein Mikronukleus mit Kinetochor detektiert, besteht der Mikrokern aus einem Chromosom oder mehreren vollständigen Chromosomen. Erhält man hauptsächlich Mikrokerne mit positivem Kinetochorbefund, so wirkt die Testsubstanz primär aneugen (*Miller und Adler 1990*).

Am Institut für molekulare Biotechnologie (IMB, Jena) wurden parallel zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit komplementäre Untersuchungen mit Hilfe zellfreier Testmethoden durchgeführt, um Effekte auf die funktionelle Aktivität der Zytoskelettproteine Tubulin und Kinesin abzuklären. Hierzu dienten der sogenannte "Tubulin Assembly Assay" und der "Mikrotubuli-Gliding Assay" (s. 1.1.1.2. und 1.1.1.4.1.).

Für die gewählten anorganischen und organischen Verbindungen ist das gentoxische Potential beim Menschen nicht abschließend geklärt. Die mögliche Wirkung der Substanzen auf das Zytoskelett sowie deren Konsequenzen sind weitestgehend unbekannt und sollten in dieser Arbeit geklärt werden. Als Substanzen wurden hierbei anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen sowie die organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzotrinitril näher untersucht.

Zusätzlich wurden Mikrokern-Untersuchungen verschiedener organischer Verbindungen (s.u.) in Anlehnung an die Publikation von *Schultz und Önfelt (2000)* durchgeführt, um weiteren Einblick in den Entstehungsmechanismus der durch diese Verbindungen induzierten

Mikrokerne zu gewinnen. In der Publikation von *Schultz und Önfelt* wird für zahlreiche organische Verbindungen ein linearer Zusammenhang zwischen dem Logarithmus des Verteilungskoeffizienten in Octanol/Wasser und dem negativen Logarithmus der Substanzkonzentration angenommen, für die eine Verdopplung der Rate binukleärer Zellen in V79-Zellen vorliegt. Es könne eine Aussage gemacht werden, ob ein spezifischer Wirkungsmechanismus einer Substanz vorläge, oder ob der Befund aufgrund unspezifischer, hydrophober Wechselwirkungen entstanden sei. Es sollte geklärt werden, wie sich die von uns untersuchten organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzotrinitril in diesen Zusammenhang einordnen lassen. Zusätzlich wurden Butanol und Hexanol, wie auch bei *Schultz und Önfelt* (2000), näher im Mikrokern-Test untersucht. Dies sollte Aufschluß über die Vergleichbarkeit der beiden Testmethoden geben (in der vorliegenden Arbeit wurde der Mikronukleus-Test eingesetzt, während bei *Schultz und Önfelt* die Frequenz binukleärer Zellen untersucht wurde).

Insgesamt sollte die vorliegende Arbeit neue Daten zur Gentoxizität und Zytotoxizität anorganischer und organischer Substanzen liefern und näheren Einblick in die Wirkmechanismen dieser Substanzen sowie deren mögliche Beeinflussung des Zytoskeletts geben.

4.1. Anorganische Bleiverbindungen

Bleichlorid und Bleiacetat induzieren in V79-Zellen in nicht zytotoxischen Konzentrationsbereichen [$<500 \mu\text{M Pb (II)}$] konzentrationsabhängig Mikronuklei. Eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Mikrokernrate liegt ab $1,1 \mu\text{M PbCl}_2$ vor. Dieses Ergebnis ähnelt Mikronukleus-Daten von 103 mit Blei exponierten Arbeitern, bei denen in Lymphozyten konzentrationsabhängige Erhöhungen der Mikrokernraten ab $1,2 \mu\text{M Pb (II)}$ gefunden wurden (*Vaglenov et al. 2001*). Eine weitere Studie, die sich allerdings nicht mit der Induktion von Mikrokernen befaßt, paßt von der Größenordnung her ebenfalls zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit: Arbeiter, die einen Blutbleispiegel von $1,4 \mu\text{M}$ aufweisen, hätten ein erhöhtes Risiko ein Gliom zu bekommen (*Anttila et al. 1996*). Erhöhte Mikronukleus-Raten wurden auch nach intraperitonealer Gabe von Bleiacetat in Knochenmarkszellen der Maus gefunden, allerdings war dieser Mikrokern-Anstieg nicht dosisabhängig (*Jagetia und Aruna 1998*).

Bleiacetat induziert schon ab einer Konzentration von $0,05 \mu\text{M}$ eine gegenüber der Mediumkontrolle erhöhte Mikrokern-Rate. Die Konzentrationen, bei der erste Mikronukleus-Effekte im Vergleich zur Kontrolle auftreten, liegen somit für beide Bleiverbindungen etwa 20-fach auseinander ($0,05 \mu\text{M Pb(OAc)}_2$ versus $1,1 \mu\text{M PbCl}_2$). Für Bleiacetat ist eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Mikrokernrate schon in einer deutlich niedrigeren Konzentration als für das Bleichlorid zu finden. Die geringere Wirksamkeit des Bleichlorids gegenüber dem Bleiacetat bezüglich der Mikrokernbildung in V79-Zellen wurde in unabhängigen Versuchen validiert. Aus der organischen Chemie ist bekannt, daß in wässrigen Lösungen komplexe Bleiaceto-Kationen vorliegen (*Hofmann und Rüdorff 1966*). Demnach

liegen bei Auflösung von Bleiacetat in Wasser keine Pb (II)-Kationen, sondern Bleiaceto-Komplexe vor. Diese Besonderheit des Bleiacetats könnte den Unterschied zum Bleichlorid erklären. Eine Bleibelastung des Menschen wäre demnach eher durch das PbCl₂ gegeben.

Die Zusammensetzung des Mediums sowie des zugesetzten Serums könnten bei der unterschiedlichen Wirksamkeit der beiden Bleiverbindungen ebenfalls eine Rolle spielen. Im Rahmen der Zytotoxizitätstests der vorliegenden Arbeit gab es allerdings keine Unterschiede zwischen den beiden Bleiverbindungen. In der Publikation von *Apostoli et al.* (2000) wurden für vier verschiedene Bleiverbindungen Proliferationsstudien an REL-Zellen durchgeführt. Für jede Bleiverbindung wurde eine typische Dosis-Wirkungskurve gefunden. Unter bestimmten Versuchsbedingungen [48 h, 10 µM Pb (II), REL-Zellen] stellte sich in Bezug auf Zytotoxizität (Zelldichte) heraus, daß Bleiacetat effektiver wirkte als Bleichlorid. Die Spezifität der Effekte der verschiedenen Bleiverbindungen könnte in unterschiedlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften jeder einzelnen Verbindung begründet liegen. Die genauen Wirkmechanismen seien unbekannt und müßten näher untersucht werden.

In Pflanzenzellen gab es ebenfalls Beobachtungen unterschiedlicher Wirksamkeiten verschiedener Bleiverbindungen. Bleichlorid und Bleinitrat induzierten in den Wurzeln von *Allium cepa* colchizinähnliche Effekte. Außerdem wirkte Bleichlorid in niedrigen Konzentrationen stärker toxisch als Bleinitrat (*Malgarzata und Wierzbicka 1988*). Insgesamt scheint es somit Unterschiede in den Wirksamkeiten verschiedener Bleiverbindungen zu geben. Für anorganische Quecksilberverbindungen werden derartige Unterschiede nicht gefunden (s.u.).

Im Mikronukleus-Test deuten die Größen der durch anorganische Bleiverbindungen induzierten Mikrokerne auf einen aneugenen Wirkungsmechanismus von Pb (II) hin. Im Vergleich zu Mikrokerneln, die durch die klastogene Substanz MMS induziert werden, erscheinen die durch Blei hervorgerufenen Mikronuklei relativ groß und enthalten somit vermutlich ganze Chromosomen, da große Mikrokerne hauptsächlich aufgrund aneugener Wirkweisen entstehen (*Yamamoto et al. 1980*). Da die korrekte Zuordnung anhand der Mikrokerngröße relativ schwierig ist (*Kramer et al. 1990*), sollte die Beurteilung nicht ausschließlich auf diesem Wege erfolgen. Zusätzlich zur Größenbeurteilung wurden anhand der CREST-Analysen für Bleichlorid, Bleiacetat sowie für die Kontrollsubstanzen auch Kinetochorstrukturen der Chromosomen untersucht. Die Ergebnisse der Positivkontrollen VCR und MMS entsprachen den aus der Literatur bekannten Wirkungen und zeigten die Korrektheit der Versuche. Für VCR wurde die überwiegend aneugene Wirkweise bestätigt, und für das MMS waren verstärkt klastogene Effekte zu finden. VCR bindet an β -Tubulin und stört den korrekten Auf- und Abbau der Mikrotubuli, während MMS schädigend auf die DNA in V79- und in Blutzellen wirkt (*Kreja und Seidel 2002*). Die durch Blei induzierten Mikronuklei zeigten in der Mehrheit einen positiven Kinetochorbefund, und somit liegt nach *Miller und Adler (1990)* eine primär aneugene Wirkung der Testsubstanz vor.

Das Ergebnis der aneugenen Wirkweise der untersuchten Bleiverbindungen unterstützt weitere Studien über Blei (*Zelikoff et al. 1988, Hartwig et al. 1990, Robbiano et al. 1999, Valverde et al. 2001, Hengstler et al. 2003, Malgarzata und Wierzbicka 1988, Wierzbicka 1989*). Untersuchungen an Pflanzenzellen zeigten Schädigungen der mitotischen Spindel

durch anorganische Bleiverbindungen (*Wierzbicka 1989, Malgarzata und Wierzbicka 1988*). Bei *Malgarzata und Wierzbicka* agierten Bleitionen als Spindelgifte, die zu typischen C–Mitosen führten. Bleichlorid und -nitrat induzierten in den Wurzeln der *Allium cepa* colchizinähnliche Effekte.

Verschiedene Studien beschäftigten sich auch mit einer möglichen Schädigung der DNA durch anorganische Bleiverbindungen. In Studien an Human- und Säugerzellen sowie an exponierten Arbeitern konnten keine Erhöhungen der DNA-Strangbrüche detektiert werden (*Zelikoff et al. 1988, Hartwig et al. 1990, Valverde et al. 2001*), was somit gegen eine primär klastogene Wirkweise der untersuchten Konzentrationsbereiche spräche. Bei *Zelikoff et al.* (1988) fielen DNA-Einzelstrangbrüche nach Inkubation mit Bleinitrat (500/1000 μM) in V79-Zellen negativ aus. In der Studie von *Hartwig et al.* (1990) wurden in Säugerzellen nach 20 h Inkubation mit Bleinitrat (bis 3 mM) keine DNA-Strangbrüche detektiert. Bei *Valverde et al.* (2001) induziert Bleiacetat in nicht-zytotoxischen Konzentrationen (0,01/0,1/1 μM) keine DNA-Strangbrüche in Lunge, Leber oder Niere von CD-1-Mäusen. Da Bleiacetat nicht direkt mit der DNA interagiert (*Valverde et al. 2001*), unterstützen die genannten Publikationen sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit eines anderen Wirkmechanismus. *Leonard* (1988) vermutete den Grund der Gentoxizität von Blei aufgrund der Interaktion des Bleis mit Proteinen, die zu einer Störung der Chromosomen-Segregation während der Zellteilung führen könnte. In einer Studie über Bleiacetat fanden sich DNA-Schäden an Nierenzellen von Mensch und Ratte. Da die Schädigungen der DNA allerdings erst in sehr hohen, millimolaren und zytotoxischen Konzentrationsbereichen auftraten (*Robbiano et al. 1999*), stehen sie nicht im Widerspruch zu den Daten der vorliegenden Arbeit.

Es gab allerdings auch Studien, in denen in nicht zytotoxischen Konzentrationen durch Blei induzierte DNA-Schäden beobachtet wurden (*Ariza et al. 1999, Fracasso et al. 2002, Palus et al. 2003, Wozniak et al. 2003*). Allerdings werden diese DNA-Strangbrüche hauptsächlich bei Arbeitern, die eine längere Zeit (3 bis $12,4 \pm 5,6$ Jahre) mit Blei exponiert waren (*Palus et al. 2003, Fracasso et al. 2002*), bzw. in Zellkulturen nach relativ kurzer Inkubationszeit (1 h) beobachtet (*Wozniak et al. 2003, Ariza et al. 1999*). Dies könnte darauf hindeuten, daß die durch Blei induzierten DNA-Schäden bei längerer Inkubationszeit bis zu einem gewissen Maße repariert werden. In der Literatur wird die Hemmung von Reparaturenzymen in Säugerzellen durch Bleiacetat in nicht zytotoxischen Konzentrationen gefunden (*Hartwig et al. 1994*). Eine Studie von *Hengstler et al.* (2003) zeigt, daß auch mit Blei exponierte Arbeiter, die nicht zusätzlich mit anderen Metallen exponiert waren, keine Erhöhungen an DNA-Strangbrüchen gegenüber Personen aufwiesen, die nicht mit Blei exponiert waren. Allerdings gibt es Kritikpunkte, die die Aussagekraft dieser Studie anzweifeln (*Kirsch Volders und Lison 2003*). Außerdem wiesen die Arbeiter der Studie von *Hengstler et al.* (2003) im Vergleich zu den übrigen Studien, in denen DNA-Schäden bleiexponierter Arbeiter detektiert wurden, einen deutlich niedrigeren Bleispiegel im Blut [44,1 $\mu\text{g/l}$ vs 504 ± 92 $\mu\text{g/l}$ Pb (II)] auf. Dies könnte die Erklärung dafür sein, daß in der Studie von *Hengstler et al.* (2003) keine DNA-Schädigungen bei bleiexponierten Arbeitern gefunden wurden, möglicherweise kann das Reparatursystem zumindest bei niedrigeren Blei-

Konzentrationen noch effektiv DNA-Schäden reparieren. Bei *Palus et al.* (2003) wiesen mehrjährig mit Blei exponierte Arbeiter ($12,4 \pm 5,6$ Jahre) im Vergleich zur Kontrollgruppe ca. zehnfach höhere Blei-Blutwerte ($504 \pm 92 \mu\text{g/l Pb}$) auf. Die Mikronukleusraten der Arbeiter waren gegenüber den Kontrollpersonen erhöht, wobei aneugene und klastogene Mikrokerne etwa in gleicher Häufigkeit detektiert wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden hauptsächlich Mikronuklei detektiert, die aufgrund aneugener Wirkweise entstanden sind. Dies könnte zusammen mit den oben genannten Publikationen dafür sprechen, daß die vermutlich zuvor durch Bleieinwirkung entstandenen DNA-Schäden im Verlauf der 18 h Inkubation im Zellkulturversuch nach einmaliger Zugabe des Bleis repariert werden konnten, und somit die Rate der Mikrokerne, die aufgrund klastogener Effekte entstehen, relativ niedrig bleibt.

Bei Behandlung von Zellkulturen spielt auch die Zellzyklusphase, in der die Testsubstanz zugegeben wird, eine Rolle (*Kasschau et al.* 1977). Die Reparatur von DNA-Schäden vor der Synthesephase verhindert beispielsweise die Manifestation eines DNA-Schadens (*Duesberg und Rasnick* 2000). Eine 1 h Inkubation der Zellen mit einer Testsubstanz könnte beispielsweise in der G_1 -Phase des Zellzyklus erfolgt sein. Je nach Zellsystem dauert eine G_1 -Phase 2-20 Stunden. Der G_1 -Phase-Kontrollpunkt, der verhindert, daß geschädigte DNA in die Synthesephase übergeht, würde somit nicht erreicht, und eine Reparatur der Schäden hätte zu diesem Zeitpunkt noch nicht stattfinden können. Dies könnte auch erklären, daß bei *Wozniak et al.* (2003) und *Ariza et al.* (1999) nach 1 h Inkubation DNA-Strangbrüche beobachtet werden konnten.

Eine Arbeitsgruppe des Instituts für molekulare Biotechnologie (IMB, Jena) untersuchte parallel zu den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit anorganische Bleiverbindungen mit Hilfe zellfreier Tests (Tubulin Assembly Assay und Mikrotubuli-Gliding Assay), um Effekte auf die funktionelle Aktivität der Zytoskelettproteine Tubulin und Kinesin abzuklären. Bleichlorid, Bleiacetat und Bleinitrat beeinträchtigten in Konzentrationen über $20 \mu\text{M Pb (II)}$ die Tubulin-Assemblierung. Im Mikrotubuli-Gliding Assay beeinträchtigte Bleinitrat ab $25 \mu\text{M}$ konzentrationsabhängig die Gleitgeschwindigkeit der Mikrotubuli. Bei $500 \mu\text{M}$ Bleinitrat wurde eine vollständige Bewegungsunfähigkeit der Mikrotubuli gefunden.

In einer Studie von *Zimmermann et al.* (1985/1988) wurde die Tubulinassemblierung von Triethyl-Bleichlorid in vitro untersucht. Eine Konzentration von $50 \mu\text{M}$ Triethyl-Bleichlorid führte zu einer Inhibierung der Tubulin-Assemblierung. Die Autoren *Zimmermann et al.* (1985/1988) vermuten, daß durch die Interaktion mit dem Tubulin-System in vivo Aneuploidie entstehen könnte.

Die Ergebnisse des Mikrotubuli-Gliding Assays und des Tubulin Assembly Assays der Arbeitsgruppe des Instituts für molekulare Biotechnologie sowie die Ergebnisse von *Zimmermann et al.* (1985/1988) passen von der Größenordnung her zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. Erste Effekte, die im Rahmen der beiden zellfreien Tests detektiert wurden, treten bei $25 \mu\text{M}$ (Gliding Assay) bzw. ab $20 \mu\text{M}$ (Tubulin Assembly Assay) Pb (II) auf. Die Konzentrationen, bei denen erste Effekte der zellfreien Tests zu beobachten sind, liegen allerdings insgesamt etwas höher als bei den in dieser Arbeit verwendeten zellulären

Tests (MN-Test und CREST-Analyse). Daß das biologische System „Zelle“ sensitiver reagiert als ein zellfreies Testsystem scheint nicht ungewöhnlich, da dem biologischen System „Zelle“ (MN-Test, CREST-Analyse) mit all seinen komplexen Strukturen und Funktionen hier ein einfacheres zellfreies Verfahren gegenübergestellt wurde. Da erste Effekte der zellulären und der zellfreien Tests für anorganische Bleiverbindungen jeweils im mikromolaren Konzentrationsbereich auftreten, scheinen die Daten aber insgesamt betrachtet recht gut zusammenzupassen.

Insgesamt liefert die vorliegende Arbeit neue Daten zur Gentoxizität anorganischer Bleiverbindungen und unterstützt zusammen mit Daten des Instituts für molekulare Biotechnologie die Hypothese der durch anorganische Bleiverbindungen hervorgerufenen Störungen oder Schädigungen des Zytoskeletts.

4.2. Anorganische Quecksilberverbindungen

Quecksilberchlorid wirkte im Rahmen des Neutralrottests in Konzentrationen über $17 \mu\text{M HgCl}_2$ in V79-Zellen zytotoxisch. Im Konzentrationsbereich zwischen $15 \mu\text{M}$ und $20 \mu\text{M HgCl}_2$ nimmt die Ergebniskurve relativ stark ab. Dieses Ergebnis unterstützt Daten aus der Literatur zur Zytotoxizität von Quecksilberchlorid in V79-Zellen (*Ochi et al. 2002*, *Ogura et al. 1996*) bzw. HeLa-Zellen (*Eheleben I, 1998*) und CHO-Zellen (*Cantoni et al. 1984a*). Bei *Aleo et al. (1992)* wurde an proximalen Tubuluszellen der Niere des Kaninchens nach einer Inkubation mit HgCl_2 ebenfalls eine extrem steile Konzentrations-Wirkungskurve zur Zytotoxizität gefunden.

Im Mikronukleus-Test der vorliegenden Arbeit induzierten Quecksilberchlorid und Quecksilbernitrat in V79-Zellen konzentrationsabhängig Mikrokerne. Für Quecksilberchlorid sind erhöhte MN-Raten bei $0,03 \mu\text{M Hg (II)}$ zu verzeichnen, während für Quecksilbernitrat zwischen $0,01$ und $0,1 \mu\text{M}$ eine gegenüber der Kontrolle erhöhte MN-Rate vorliegt.

Durch Quecksilber hervorgerufene Erhöhungen der Mikronukleus-Raten finden sich auch in der Literatur. Es wurden sowohl bei exponierten Arbeitern (*Anwar und Gabal 1991*), bei Fischern (*Franchi et al. 1994*) als auch bei der Behandlung humaner Blutproben (*Ogura et al. 1996*) erhöhte Mikronukleus-Raten gefunden. Die untersuchten Arbeiter waren mit Quecksilberfulminat exponiert ($123,2 \pm 54,1 \mu\text{g/l}$ Urin gegenüber $39,2 \pm 11,2 \mu\text{g/l}$ der 29 Kontrollpersonen), allerdings gab es keine Korrelation der Effekte mit der Hg (II)-Konzentration im Urin oder mit der Dauer der Exposition. Die Mikronukleus-Rate der Fischer, die durch kontaminierten Fisch mit Quecksilber exponiert waren ($81,97 \pm 54,09 \text{ ng/g}$ Frischgewicht, im Blut), korrelierte hingegen signifikant mit der Hg (II)-Konzentration im Blut. Die Vollblutproben der Studie von *Ogura et al. (1996)* wurden mit $10 \mu\text{M}$ bzw. $20 \mu\text{M HgCl}_2$ für 24 h behandelt, und dies führte zu erhöhten Mikronukleus-Raten. Eine 24 h Inkubation mit Quecksilbernitrat führte auch in Forellen zu einer Erhöhung der Mikronuklei (*Sanchez Galan et al. 1999*).

Die Mikrokernraten der vorliegenden Arbeit steigen konzentrationsabhängig bis $0,1 \mu\text{M HgCl}_2$ bzw. $1 \mu\text{M Hg(NO}_3)_2$ an. In höheren Konzentrationen [$0,1 \mu\text{M}$ - $10 \mu\text{M HgCl}_2$ bzw. 1 - $10 \mu\text{M Hg(NO}_3)_2$] flachen die Kurven der durchschnittlichen Mikrokernraten pro 1000 Zellen konzentrationsabhängig etwas ab, bleiben aber gegenüber den Mediumkontrollen sichtbar erhöht. Das Abflachen der Mikrokernraten in höheren Hg (II)-Konzentrationen könnte entweder an einer erniedrigten Aufnahme höherer Hg (II)-Konzentrationen in die Zelle liegen (Aleo et al. 1992), oder es könnten in höheren Hg (II)-Konzentrationen die Reparaturmechanismen der Zelle überfordert sein und es können zahlreiche Zellen absterben (Eheleben 1998). In diesem Fall wären die Mikronuklei der abgestorbenen Zellen nicht mehr detektierbar. In der Arbeit von I. Eheleben scheint Quecksilberchlorid (ab $20 \mu\text{M}$) nach 4 h Inkubation die Reparatursysteme der Zellen zu überfordern, und die Zellen werden stark geschädigt oder sterben ab (Eheleben I 1998). Die höheren im Mikrokernstest der vorliegenden Arbeit untersuchten Quecksilber-Konzentrationen liegen auch relativ nah am zytotoxischen Bereich, und die Zellproliferation könnte in diesem Konzentrationsbereich inhibiert sein, wodurch ebenfalls reduzierte MN-Raten erklärbar wären.

In der Publikation von Aleo et al. (1992) wurden die Aufnahmen nicht zytotoxischer HgCl_2 -Konzentrationen in proximale Tubuluszellen für zwei unterschiedliche HgCl_2 -Konzentrationen ($9 \mu\text{M HgCl}_2$ und $25 \mu\text{M HgCl}_2$) in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. Nach 24 h wurde für die niedrigere Quecksilberkonzentration intrazellulär 80% der zugegebenen Menge gefunden, während bei Inkubation mit $25 \mu\text{M HgCl}_2$ nach 24 h lediglich 43% in die Zelle aufgenommen wurde. Möglicherweise könnten in der vorliegenden Studie ähnliche Effekte aufgetreten sein.

Die CREST-Analyse der vorliegenden Arbeit spricht für einen gemischten Entstehungsmodus der durch anorganisches Quecksilber induzierten Mikronuklei; die Mikronuklei entstehen teils durch klastogene und teils durch aneugene Effekte. Auch in der Studie von Ogura et al. (1996) wird vermutet, daß gentoxische Effekte des Quecksilberchlorids auf zwei unterschiedlichen Mechanismen beruhen, denn einerseits induziere HgCl_2 nach 24 h Inkubation in peripheren Blutlymphozyten in Konzentrationen von 10 und $20 \mu\text{M}$ strukturelle Chromosomenaberrationen, und andererseits agiere HgCl_2 als Inhibitor der mitotischen Spindel.

Die Ergebnisse eines gemischten Wirkmodus der Mikronukleus-Entstehung unterstützt zugleich Studien, die primär DNA-Schädigungen durch Hg (II) detektierten, (Cantoni et al. 1983, Burkart und Ogorek 1986, Tsuzuki et al. 1994, Bucio et al. 1999) sowie Studien, die aneugene Effekte von Hg (II) beschreiben (Andersen 1983, Verschaeve et al. 1984/1985). In der Studie von Andersen (1983) gab es in Humanlymphozyten, die mit $10 \mu\text{M HgCl}_2$ für 4 h behandelt wurden, Hinweise auf Störungen des Spindelapparates durch HgCl_2 . Verschaeve et al. (1984) beschreiben Fehlverteilungen von Chromosomen in Humanlymphozyten nach 28 h Inkubation mit bis zu $100 \mu\text{M HgCl}_2$. Chromosomenfehlverteilungen wurden auch in Eizellen von Swiss-Webster-Mäusen nach Inkubation mit $25 \mu\text{g/ml HgCl}_2$ Quecksilberacetat (5 bzw. 16 h) gefunden (Jagiello und Lin 1973). Bei Lee et al. (1997) führten $30 \mu\text{M Hg (II)}$ in Humanlymphozyten zu einer signifikanten Erhöhung an Endoreduplikationen, möglicherweise durch Störungen des

Spindelapparates. Störungen der Mitose bzw. ein Anstieg an C-Anaphasen wurden in humanen Blutzellen in HgCl_2 -Konzentrationen von 1,0/5,2 und 10,5 μM detektiert (Rao *et al.* 2001). Erhöhte C-Anaphasen hängen mit der Bindung des Quecksilbers an Proteine zusammen, die an der Kinetochor-Reifung und -Saturation beteiligt sind (Verschaeve *et al.* 1984, Vig 1987) und können so zu Beeinträchtigungen der mitotischen Spindel führen (Sujatha und Hegde 1998).

Andere Autoren sehen die DNA als Angriffspunkt anorganischer Quecksilberverbindungen an (Cantoni *et al.* 1983, Burkart und Ogorek 1986, Tsuzuki *et al.* 1994, Bucio *et al.* 1999). In verschiedenen Studien an Säugerzellen (CHO, V79, Muskelzellen von Hühnerembryonen) wurden DNA-Einzelstrangbrüche detektiert (Cantoni *et al.* 1983, Christie *et al.* 1985, Robinson *et al.* 1982, Burkart und Ogorek 1986, Bucio *et al.* 1999).

Studien an Humanzellen (Leberzelllinie, WRL-68) beschreiben durch HgCl_2 induzierte DNA-Strangbrüche (Bucio *et al.* 1999), wobei mechanistisch direkte Interaktionen mit der DNA sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von den Autoren vermutet werden. Auch in der Diplomarbeit von I. Eheleben (1998) wurden in HeLa-Zellen durch HgCl_2 in Konzentrationen ab 1 μM nach 4 h Inkubation DNA-Strangbrüche beobachtet, allerdings wurden dort keine oxidativen Schäden durch Hg (II) nach 4 h Inkubation detektiert.

Mit einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Strangbrüche wurde auch eine Zunahme der Bindung des HgCl_2 an die DNA von CHO-Zellen beobachtet (Cantoni *et al.* 1984 a), wobei die Bindung des Hg (II) an die DNA stabil, aber nicht kovalent war (Cantoni *et al.* 1984 b). Die konzentrationsabhängige Bindung von Quecksilberacetat an die DNA wurde auch bei humanen Zellen (KB-Zelllinie) sowie an der CHO-Zelllinie (AS53) des Hamsters in nicht-zytotoxischen Konzentrationen beobachtet (Ariza *et al.* 1994).

Im Zusammenhang mit den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen, die für einen gemischten Wirkmodus von Hg (II) sprechen, scheinen die Resultate anderer Studien, die eine klastogene oder eine aneugene Wirkweise von Hg (II) in den Vordergrund stellen, nicht im Widerspruch zueinander zu stehen. Vielmehr sollten die Studien insgesamt betrachtet werden.

In einem parallelen Projekt einer Arbeitsgruppe des Instituts für molekulare Biotechnologie (IMB, Jena) wurden Quecksilberchlorid und Quecksilbernitrat mit Hilfe zellfreier Tests (Tubulin Assembly Assay und Mikrotubuli-Gliding Assay) untersucht. Die beiden Quecksilberverbindungen inhibierten die Tubulin-Assemblierung in Konzentrationen über 1 μM Hg (II), und ab 10 μM Hg (II) lag eine vollständige Inhibierung der Tubulinassemblierung vor.

Diese Ergebnisse des IMB passen zu den Daten einer Studie von Liliom *et al.* (2000), in der ebenfalls die Beeinflussung der Mikrotubuli-Assemblierung durch Hg (II) untersucht wurde. Bei Liliom *et al.* (2000) wurde eine Inhibierung der Tubulinassemblierung zwischen 14 und 24 μM Hg (II) gefunden. Auch bei Wallin *et al.* (1977) wurde eine starke Inhibierung der Mikrotubuli-Assemblierung durch Quecksilberchlorid beobachtet. Weiterhin ist bekannt, daß Quecksilber mit Sulfhydrylgruppen von Spindelproteinen interagiert (Franchi *et al.* 1994).

Die Arbeitsgruppe des IMB untersuchte Quecksilberchlorid auch im Gliding Assay. Quecksilberchlorid führte ab 0,1 μM zur Inhibierung der Gleitgeschwindigkeit der

Mikrotubuli. Eine vollständige Inhibierung der Bewegung der Mikrotubuli wurde bei 1 μM HgCl_2 detektiert.

In der vorliegenden Arbeit werden im Mikronukleus-Test und in der CREST-Analyse erste Effekte schon in niedrigeren Konzentrationen gefunden als in den zellfreien Tests des IMB bzw. bei *Liliom et al.* (2000). Unter Berücksichtigung der Unterschiede zellfreier und zellulärer Testmethoden passen die Daten der untersuchten Quecksilberverbindungen der vorliegenden Arbeit von der Größenordnung her zu den Resultaten des IMB und zur Studie von *Liliom et al.* (2000).

Insgesamt bestätigen die Ergebnisse der Untersuchungen der vorliegenden Arbeit ein gentoxisches Potential für anorganische Quecksilberverbindungen. Der Induktion von Mikrokernen unterhalb zytotoxischer Konzentrationen liegt scheinbar auch eine Interaktion mit dem Zytoskelettprotein Tubulin zugrunde, allerdings gibt es ebenso viele Mikronuklei, die aufgrund klastogener Effekte entstehen, und somit scheint für Hg (II) ein gemischter Wirkmodus vorzuliegen.

4.3. Nitrobenzol und Benzonnitril

Zusätzlich zu den anorganischen Metallverbindungen wurden auch organische Verbindungen in die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit mit einbezogen. Hierbei wurden insbesondere Nitrobenzol und Benzonnitril näher untersucht.

Nitrobenzol induziert in V79-Zellen in nicht zytotoxischen Konzentrationen konzentrationsabhängig Mikronuklei. Eine im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Mikrokernrate liegt bei einer Konzentration von 0,01 μM Nitrobenzol vor. Da die Größen der Mikronuklei keinen adäquaten Hinweis auf die Mechanismen der Mikronuklei-Entstehung gaben, wurde diese Frage im Rahmen der CREST-Analysen abgeklärt. Die Ergebnisse der CREST-Analysen sprechen für eine primär aneugene Wirkungsweise von Nitrobenzol. Schon 1939 wurden durch Nitrobenzol (allerdings in toxischen Dosen) induzierte Störungen der Mitose in Getreidesamen gefunden (*Favorsky 1939, Simonet und Guinochet 1939*).

Benzonnitril induziert in V79-Zellen in nicht zytotoxischen Konzentrationen ebenfalls konzentrationsabhängig Mikronuklei. Bei einer Konzentration von 0,01 μM Benzonnitril werden im Vergleich zur Kontrolle erhöhte Mikrokernraten beobachtet. Da nach Inkubation mit Benzonnitril die Größen der induzierten Mikronuklei ebenfalls keinen adäquaten Hinweis auf den Entstehungsmechanismus geben, wurde diese Frage auch im Rahmen einer CREST-Analyse geklärt. Die Ergebnisse sprechen für eine primär aneugene Wirkweise von Benzonnitril. Aneugene Wirkweise von Benzonnitril wurde auch bei *Albertini und Zimmermann* (1991) und bei *Whittaker et al.* (1990) beobachtet. *Albertini und Zimmermann* (1991) beobachteten, bei Verwendung eines „Kälteprotokolls“ (zwischenzeitliche Kältebehandlung um 0°C zur Optimierung der Aneuploidie-Induktion) für verschiedene Nitrile und insbesondere für Benzonnitril in millimolaren Konzentrationen, Fehlverteilungen von

Chromosomen in Hefen- und Säuger-Tubulin. Bei *Whittaker et al.* (1990) wurden ebenfalls Chromosomen-Fehlverteilungen nach Kältebehandlung detektiert.

In einem parallelen Projekt einer Arbeitsgruppe des Instituts für molekulare Biotechnologie (IMB, Jena) wurden Nitrobenzol und Benzonitril im Rahmen zweier zellfreier Tests (Tubulin Assembly Assay und Mikrotubuli-Gliding Assay) untersucht. Nitrobenzol führte in Abwesenheit von DMSO ab 1 mM Nitrobenzol zu einer Beeinflussung der Mikrotubuliassemblierung. Benzonitril beeinflusste in Anwesenheit von 1% DMSO ab 2 mM konzentrationsabhängig die Tubulin-Assemblierung.

Im Gliding Assay beeinträchtigt Nitrobenzol ab 7,5 μM konzentrationsabhängig die Gleitgeschwindigkeit von Mikrotubuli entlang einer mit Kinesin beschichteten Glasfläche. Vollständige Bewegungsunfähigkeit wurde bei 30 μM Nitrobenzol beobachtet. Für Benzonitril wurde die Gleitgeschwindigkeit von Mikrotubuli bis zur maximal meßbaren Konzentration (200 μM Benzonitril) nicht beeinträchtigt.

Insgesamt besitzen die beiden untersuchten organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzonitril gentoxisches Potential; es wurden erhöhte Mikronukleus-Raten in nicht zytotoxischen Konzentrationen beobachtet. Der zugrundeliegende Wirkmechanismus der Mikronukleus-Entstehung ist für beide Verbindungen aneugen. Die Wirkschwellen der zellulären Tests der vorliegenden Arbeit sowie der zellfreien Tests (IMB) weisen für Benzonitril beträchtliche Unterschiede auf. Im Mikronukleustest und in der CREST-Analyse wurden Effekte im mikromolaren Konzentrationsbereich gefunden, während im zellfreien Tubulin Assembly Assay Effekte durch Nitrobenzol oder Benzonitril erst in millimolaren Konzentrationsbereichen gefunden wurden. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine Interaktion mit dem Zytoskelettprotein Tubulin als Wirkmechanismus der Mikrokernentstehung durch Nitrobenzol und Benzonitril.

Daß die durch Nitrobenzol bzw. Benzonitril hervorgerufene MN-Induktion aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit der Mitosespindel entstanden sein könnten, wurde in Anlehnung an die Publikation von *Schultz und Önfelt* (2000) ausgeschlossen (s.u.).

An der aneugenen Wirkweise des Nitrobenzols könnte das Motorprotein Kinesin beteiligt sein. Für die Aneugenität des Benzonitrils scheinen die Zytoskelettproteine Tubulin und Kinesin beide keine tragende Rolle spielen. Es kommen deshalb zahlreiche andere Proteine und proteinhaltige Strukturen in Frage, die an der Genauigkeit der Chromosomensegregation beteiligt sind. Hierzu gehören beispielsweise das Kinetochor mit seinen zahlreichen Proteinen, der Spindelkontrollpunkt oder das Zytoskelettprotein Dynein. Aneugene Effekte und Verluste ganzer Chromosomen könnten möglicherweise die Folge eines Angriffs am Kinetochor sein (*Gaskin et al.* 1974). Das eukaryotische Kinetochor und dessen Proteine haben während der Mitose zahlreiche Aufgaben, beispielsweise die exakte Bindung der Mikrotubuli, um die korrekte Segregation der Chromosomen zu ermöglichen. Weiterhin enthält das Kinetochor molekulare Motorproteine, die bei der komplexen Bewegung der Chromosomen während der Mitose zusammenspielen. Außerdem ist das Kinetochor in die Kontrollpunkt-Maschinerie involviert. Es ist möglich, daß Verluste von Chromosomen (aneugene Effekte) durch Kinetochorschäden entstehen, allerdings verlieren dann die

Kinetochore ihre Antigen-Kapazität, und CREST-positive Mikronuklei werden somit undetektierbar (*Seoane und Dulout 2001*). Entstehen CREST-positive Mikronuklei durch Inaktivierung des Kinetochors oder durch Inhibierung der Formation der Kinetochorproteine, so können Kinetochor-positive Mikrokerne nicht mehr beobachtet werden (*Kirsch-Volders et al. 1998*). Da im Rahmen der CREST-Analysen der vorliegenden Arbeit eindeutig ein aneugener Wirkmechanismus verifiziert wurde, sind Schädigungen des Kinetochors vermutlich auch keine Erklärung für die Entstehung der beobachteten Effekte.

Der Spindelkontrollpunkt bringt Zellen in der Anaphase zum Arrest, um Fehler zu korrigieren, die während der Bindung der Mikrotubuli an die Kinetochore möglicherweise entstanden sind. Zum Spindelkontrollpunkt gehören wiederum zahlreiche Proteine und Proteinkomplexe.

Das Motorprotein Dynein sowie assoziierte Proteine übernehmen verschiedene Aufgaben im Rahmen der Zellteilung und sie sind unter anderem an der Spindelassemblierung sowie an der Anordnung und Segregation der Chromosomen beteiligt (*Wittmann et al. 2001, Sharp et al. 2000, Biggins et al. 2003*). Das p50 Dynamitin ist eine Untereinheit des Dynein-aktivierenden Komplexes Dynactin, und eine Überexpression dieser Untereinheit kann beispielsweise zu Defekten der Chromosomen-Anordnung während der Zellteilung führen (*Echeverri et al. 1996*).

Insgesamt gibt es in Bezug auf das Kinetochor, das Motormolekül Dynein und den Spindelkontrollpunkt sowie deren Interaktionen viele offene Fragen. Es ist unklar, wie sich Kinetochore und Mikrotubuli verbinden, und welche Proteine hierbei eine wichtige Rolle spielen. Ebenfalls unklar bleibt wie der Spindel-Kontrollpunkt Defekte korrigiert, und in welchen Fällen Defekte gar nicht vom Kontrollpunkt bemerkt werden. Vermutet wird in diesem Zusammenhang, daß es möglicherweise aktive Reparaturmechanismen für die Mitosespindel gibt (*Biggins et al. 2003*).

Der genaue Entstehungsmechanismus für Aneuploidie durch Nitrile ist bislang unbekannt (*Osgood und Cyr 1998*). Die vorliegende Arbeit trägt für die organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzonitril zur Klärung der Frage nach einer möglichen Beeinflussung des Zytoskeletts bei. Für das Nitrobenzol scheint zumindest das Tubulin keine besondere Rolle zu spielen, während Interaktionen mit dem Kinesin in Frage kommen könnten. Für das Benzonitril scheinen Interaktionen mit den Zytoskelettproteinen Tubulin und Kinesin nicht als Hauptmechanismus der aneugenen Wirkung des Benzonitrils in Frage zu kommen. Die spezifischen Wirkmechanismen der Mikronukleus-Entstehung durch Nitrobenzol und Benzonitril können insgesamt als sehr komplex angesehen werden.

4.4. Untersuchungen in Anlehnung an die Publikation von *Schultz und Önfelt* (2000)

Im Rahmen der Mikronukleus-Tests wurden in Anlehnung an die Publikation von *Schultz und Önfelt* (2000) zunächst die beiden Alkohole Butanol und Hexanol untersucht, um eine Aussage über die Vergleichbarkeit der Testmethoden (Induktion von Mikronuklei bzw. binukleärer Zellen) treffen zu können. Zusätzlich sollten Mikrokern-Untersuchungen für Nitrobenzol und Benzonitril näheren Einblick in die Wirkmechanismen bezüglich der Mikronukleus-Induktion geben. Laut *Schultz und Önfelt* besteht für viele organische Verbindungen ein linearer Zusammenhang zwischen dem Verteilungskoeffizienten einer Substanz in Octanol/Wasser und dem negativen Logarithmus der Konzentration, bei der eine Verdopplung der Spontanrate an binukleären Zellen erreicht wird. Substanzen mit spezifischen Wirkmechanismen sind demnach schon in viel geringeren Konzentrationen wirksam als erwartet.

Die Wahl der im Mikronukleus-Test eingesetzten Alkohol-Konzentrationen geschah in Anlehnung an die Publikation von *Schultz und Önfelt*, in der für das Butanol vier Konzentrationen, und für das Hexanol drei Konzentrationen nach 24 h Inkubation in binukleären (BIN) V79-Zellen untersucht wurden. Die in der vorliegenden Arbeit im Mikrokerntest untersuchten Konzentrationen der Alkoholverbindungen lagen für das Butanol bei $-\log 2,6/-\log 2,3/-\log 2,0/-\log 1,3$ und für das Hexanol bei $-\log 3,9/-\log 3,6/-\log 3,3$ und $-\log 3,0$. Die Inkubationszeit betrug in dieser Arbeit 18 h.

Es zeigt sich, daß die Mikronukleus-Daten der vorliegenden Arbeit insgesamt etwas höher liegen als die Raten binukleärer Zellen bei *Schultz und Önfelt*. Die Verdopplungen der BIN-Spontanraten im Vergleich zur Kontrolle finden sich bei *Schultz und Önfelt* für das Butanol bei einer Konzentration von $-\log 2,0$ und für Hexanol bei $-\log 3,3$, während in der vorliegenden Arbeit für Butanol eine Verdopplung der MN-Spontanrate im Konzentrationsbereich zwischen $-\log 2,6$ und $-\log 2,3$ und für Hexanol zwischen $-\log 3,9$ und $-\log 3,6$ zu finden ist.

Die Verdopplungen der Mikrokern- bzw. BIN-Spontanraten der beiden Alkohole finden sich in der vorliegenden Arbeit sowie bei *Schultz und Önfelt* für die beiden Testmethoden somit in unterschiedlichen Konzentrationen, allerdings nicht um Zehnerpotenzen voneinander entfernt. Somit sind die beobachteten Effektraten (MN/BIN) in ihrer Größenordnung vergleichbar. Für das Butanol liegen die MN-Spontanraten, die in dieser Arbeit ermittelt wurden, etwas über den von *Schultz und Önfelt* erhaltenen BIN-Raten. Es zeigt sich, daß für Butanol die Verdopplung der MN-Spontanrate ebenso wie die Daten von *Schultz und Önfelt* nahe an der von *Schultz und Önfelt* ermittelten „Geraden der hydrophoben Wechselwirkung“ liegen. Auch für Hexanol finden sich die Verdopplungen der MN-Spontanraten in einem Konzentrationsbereich, der nicht sehr weit abweicht von der bei *Schultz und Önfelt* ermittelten Konzentration, bei der die Verdopplung der Spontanrate binukleärer Zellen vorliegt, und dies deutet somit auf hydrophobe Wechselwirkung der Alkohole mit der Mitosespindel hin und unterstützt somit die Studie von *Schultz und Önfelt* (2000).

Auch die in dieser Arbeit ermittelten Nitrobenzol-, Benzonitril-, VCR- und MMS-Daten der Mikronukleustests wurden im Hinblick auf die von *Schultz und Önfelt* aufgestellte Theorie untersucht, um vor allem für Nitrobenzol und Benzonitril weiteren Einblick in den möglichen Entstehungsmechanismus der Mikronuklei zu erhalten. VCR und MMS wurden als Positivkontrollen berücksichtigt, da deren Wirkungsmechanismus bezüglich der Mikrokernentstehung bekannt ist. Für alle vier untersuchten Substanzen wurde jeweils der Wert ermittelt, bei dem eine Verdopplung der Mikronukleus-Spontanrate vorliegt, und zwar anhand der vorliegenden Ergebnisgrafiken der jeweiligen Mikrokerntests.

Für MMS liegt im Mikrokern-Test der negative Logarithmus der Konzentration, bei der die Verdopplung der Mikrokern-Spontanrate gefunden wird, bei ca. 3,9, und somit etwa drei Zehnerpotenzen oberhalb der nach der Geraden der Publikation von *Schultz und Önfelt* zu erwartenden Werte für den Einfluß einer hydrophoben Wechselwirkung. Mit diesem Ergebnis wird der spezifische Wirkmechanismus von MMS bestätigt.

Für das Vinkristin beträgt der negative Logarithmus der Konzentration, bei der eine Verdopplung der Spontanrate an Mikronuklei gefunden wird, etwa 9,2. Dieser Wert liegt ebenfalls fast drei Zehnerpotenzen über dem Wert, der im Falle einer hydrophoben Wechselwirkung zu erwarten wäre. Somit wird auch für das Vinkristin der spezifische Mechanismus für die Entstehung von Mikrokernen untermauert.

Die Verdopplung der MN-Spontanrate für das Nitrobenzol wird bei einem negativen Logarithmus von 6,0 erreicht. Dieser Wert liegt mehr als zwei Zehnerpotenzen oberhalb der von *Schultz und Önfelt* erstellten „Geraden der hydrophoben Wechselwirkungen“. Somit weist auch dieses Ergebnis auf einen spezifischen Wirkmechanismus der Mikrokern-Induktion durch Nitrobenzol hin. Auch für Benzonitril findet sich die Konzentration, bei der eine Verdopplung der Spontanrate an Mikronuklei zu finden ist ($-\log 6,0$), weit außerhalb (ca. 2,5 Zehnerpotenzen) des Wertebereichs, für den eine hydrophobe Wechselwirkung zu erwarten wäre. Somit deutet sich auch für Benzonitril ein spezifischer Wirkmechanismus für die Entstehung der Mikronuklei an.

Insgesamt liegen die Konzentrationen für die Verdopplungen der Spontanraten der Mikrokerne nach 18 stündiger Inkubation von V79-Zellen mit Nitrobenzol und Benzonitril ebenso wie die Ergebnisse der Referenzsubstanzen MMS und VCR jeweils mindestens zwei bis drei Zehnerpotenzen oberhalb der nach der Geraden der Publikation von *Schultz und Önfelt* zu erwartenden Werte für den Einfluß hydrophober Wechselwirkungen. Dies weist somit auf einen spezifischen Wirkungsmechanismus der Mikronukleus-Induktion durch MMS, VCR, Nitrobenzol und Benzonitril hin. Die Ergebnisse für Hexanol und Butanol lassen, wie auch bei *Schultz und Önfelt* (2000) beschrieben, auf hydrophobe Wechselwirkung der Alkohole mit der Mitosespindel schließen.

Die spezifischen Wirkmechanismen der Mikronukleus-Induktion durch MMS und VCR sind aus der Literatur bekannt. MMS schädigt unterhalb zytotoxischer Konzentrationen die DNA von V79- und von Blutzellen (*Kreja und Seidel 2002*), während Vinca Alkaloide die Tubulin-Polymerisation inhibieren (*Bai et al. 1990 a*).

Die spezifischen Wirkmechanismen der Mikronukleus-Entstehung durch Nitrobenzol und Benzonitril scheinen insgesamt sehr komplex zu sein (s. Diskussion Nitrobenzol und Benzonitril).

4.5. *Schlußdiskussion*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden anorganische Blei- und Quecksilberverbindungen sowie die organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzonitril in Bezug auf ihr gentoxisches Potential und im Hinblick auf deren mögliche Beeinflussung des Zytoskeletts untersucht.

Die Auswirkungen niedriger Blei-Konzentrationen auf den Menschen wurden bisher kontrovers diskutiert (*Thacker et al. 1992*), und es gibt kaum Studien in eukaryotischen Zellen zur Abklärung des möglichen mutagenen Potentials von Schwermetallen in niedrigen Konzentrationen (*Ariza und Williams 1996*). Der molekulare Mechanismus der Gentoxizität von Blei ist in der Literatur nicht vollständig geklärt (*Winder und Bonin 1993, IARC 1987*), und eine Reihe von Studien sind nicht beweiskräftig.

Auch der Zusammenhang zwischen gentoxischem und kanzerogenem Potential von Pb (II) wurde zahlreich untersucht, und es liegen Anhaltspunkte für eine krebserzeugende Wirkung von Pb (II) vor (*DFG 2000*).

Bei *Ariza und Williams (1996)* wurde gefolgert, daß niedrige Pb (II)- und Hg (II)-Konzentrationen mutagenes Potential besitzen, und weitere Untersuchungen auch bezüglich der möglichen Wirkmechanismen folgen müßten.

Der Mechanismus der Gentoxizität von Hg (II) wird als sehr komplex angesehen (*Rao et al. 2001*), und das kanzerogene Potential von Hg (II) ist nicht abschließend geklärt (*DFG 1999*).

Die vorliegende Arbeit liefert nähere Einblicke in die Wirkmechanismen der chromosomalen Gentoxizität niedriger Blei- und Quecksilberkonzentrationen. Insgesamt deuten die Ergebnisse der untersuchten Bleiverbindungen auf eine durch Interaktion mit Zytoskelettproteinen induzierten Bildung von Mikrokernen hin. Anorganische Quecksilberverbindungen wirken sowohl aneugen als auch klastogen. Somit scheinen hier Zytoskelettproteine an der Bildung von Mikrokernen zumindest beteiligt zu sein.

Weiterhin sollte die vorliegende Arbeit nähere Einblicke in die Gentoxizität von Nitrobenzol und Benzonitril geben. Die beiden organischen Verbindungen besitzen gentoxisches Potential, wobei der Entstehung von Mikrokernen durch Nitrobenzol und Benzonitril aneugene Wirkmechanismen zugrunde liegen. Zumindest für das Benzonitril scheint eine Beeinflussung der Zytoskelettproteine Tubulin und Kinesin nicht der alleinige Wirkmodus der Mikronukleus-Entstehung zu sein. Ein Entstehungsmechanismus aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit der Mitosespindel kann aufgrund der durchgeführten Untersuchungen ebenfalls ausgeschlossen werden. Andere proteinhaltige Strukturen oder Motormoleküle, wie

beispielsweise das Dynein, könnten an den Prozessen der Mikrokerninduktion durch Nitrobenzol und Benzonitril beteiligt sein (*Wittmann 2001, Sharp 2000, Biggins 2003*).

Zytogenetische Veränderungen, die mit Hilfe des MN-Tests detektiert werden, sind möglicherweise frühe Effekte der Karzinogenese. Aneuploidie spielt eine wesentliche Rolle bei der Entwicklung humaner Tumoren und bei der Aquisition und Erwerbung maligner Tumoren (*Duesberg und Rasnick 2000*). Studien an Nagern zeigen ebenfalls, daß Chemikalienexposition zur Induktion von spezifischen Aneuploidien führen kann, die wiederum eine Rolle bei der Tumor-Progression spielen (*Haesen et al. 1993, Van Goethem et al. 1995*). Somit scheinen auch in dieser Hinsicht insbesondere die Substanzen von Bedeutung zu sein, die sich in dieser Arbeit eindeutig als wirkend herausstellten.

Insgesamt trägt die vorliegende Arbeit zur Klärung der möglichen Beeinflussung des Zytoskeletts durch verschiedene Substanzen bei. Eine derartige Interaktion scheint für verschiedene toxische Substanzen relevant zu sein. Die in der vorliegenden Arbeit gewählten anorganischen und organischen Substanzen zeigen mögliche Wirkmechanismen auf. Die anorganischen Bleiverbindungen zeigen eine primär aneugene Wirkweise, vermutlich aufgrund von Interaktionen mit dem Zytoskelett. Anorganische Quecksilberverbindungen deuten ebenfalls auf eine Beeinflussung des Zytoskeletts hin, Mikronuklei entstehen hier allerdings nicht überwiegend auf aneugenem sondern auch auf klastogenem Wege. Somit liegt für Quecksilber ein gemischter Wirkmodus vor. Die organischen Verbindungen Nitrobenzol und Benzonitril zeigen ebenfalls gentoxisches Potential sowie eine primär aneugene Wirkweise. Allerdings ist der genaue Mechanismus nicht eindeutig und die genauen Zusammenhänge können als sehr komplex angesehen werden.

5. Literatur

- ACGIH (1996). American Conference of Governmental Industrial Hygienists. Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices, nitrobenzene. ACGIH, Cincinnati, Ohio.
- Albertini S, Zimmermann F K (1991). The detection of chemically induced chromosomal malsegregation in *Sacharomyces cerevisiae* D61. M: a literature survey (1984-1990). *Mutat. Res.* **258**: 237-258.
- Aleo M D, Taub M L, Kostyniak P J (1992). Primary cultures of rabbit renal proximal tubule cells. Comparative cytotoxicity of inorganic and organic mercury. *Toxicol. and applied Pharmacol.* **112**: 310-317.
- Andersen O (1983). Effects of coal combustion products and metal compounds on sister chromatid exchange (SCE) in a macrophagelike cell line. *Environ. Health Perspect.* **47**: 239-253.
- Anderson D, Styles J A (1978). The bacterial mutation test. Six tests for carcinogenicity. *Br. J. Cancer.* Jun. **37**(6): 924-30.
- Antocchia A, Tanzarella C, Modesti D, Degrassi F (1993). Cytokinesis-block micronucleus assay with kinetochore detection in colchicine-treated human fibroblasts. *Mutat. Res.* **287**(1): 93-9.
- Anttila A, Heikkilä P, Nykyri E, Kauppinen T, Pukkala E, Hernberg S, Hemminki K (1996). Risk of nervous system cancer among workers exposed to lead. *J Occup. Environ. Med.* **38**(2): 131-6
- Anwar W A, Gabal M (1991). Cytogenetic study in workers exposed to mercury fulminate. *Mutagenesis* **6**: 189-192.
- Apostoli P, Huard C, Chaumontet C, Martel P, Alessio L, Mazzoleni G (2000). Effects of four inorganic lead compounds on the proliferation and junctional coupling of cultured REL liver cells. *Am J. Ind. Med.* **38**: 340-8.
- Ariza M E, Holliday J and Williams M V (1994). Mutagenic effect of mercury (II) in eukaryotic cells. *In vivo* **8**: 559-563.
- Ariza M E and Williams M V (1996). Mutagenesis of AS52 cells by low concentrations of lead (II) and mercury (II). *Environ. Mol. Mutagen.* **27**: 30-33.
- Ariza M E and Williams M V (1999). Lead and mercury mutagenesis: type of mutation dependent upon metal concentration. *J. Biochem. Toxicol.* **13**: 107-112.
- Askham J M, Moncur P, Markham A F and Morrison E E (2000). Regulation and function of the interaction between the APC tumour suppressor protein and EB1. *Oncogene* **19**: 1950-1958.
- Bai R, Pettit G R, Hamel E (1990 a). Dolastatin 10, a powerful cytostatic peptide derived from a marine animal. Inhibition of tubulin polymerization mediated through the vinca alkaloid binding domain. *Biochem. Pharmacol.* **15**; **39**: 1941-9
- Barregard L, Hogstedt B, Schutz A, Karlsson A, Sallsten G, Thiringer G (1991). Effects of occupational exposure to mercury vapor on lymphocyte micronuclei. *Scand. J. Work Environ. Health.* **17**(4): 263-8
- BASF (1996). Report: Cytogenetic study in vivo of nitrobenzene in mice. Project No 26 M0116/949019, unveröffentlicht.

- BASF AG (1994). Werksärztlicher Dienst. Schriftliche Mitteilung an die Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie.
- Bernard A (1999). Mechanisms of lead toxicity and carcinogenicity. Lead Exposure, Reproductive Toxicity and Carcinogenicity, Gargnano, Italy, 7-9 June 1999.
- Beyersmann D, Hartwig A (1993). Genotoxic effects of metal compounds. In: Bolt H M, Hellman B, Dencker L (Hrsg). Use of mechanistic information in risk assessment. *Springer, Berlin* 192-198.
- Beyersmann D (2002). Dokumentation und Bewertung von Daten zur möglichen Gentoxizität anorganischer Bleiverbindungen.
- Biggins S, Walczak C E (2003). Captivating capture: how microtubules attach to kinetochores. *Curr. Biol.* **27**; **13**(11): R449-60.
- Binder L I et al. (1975). Assembly of chick brain tubulin onto flagellar microtubules from *Clamydomonas* and sea urchin sperm. *Proceedings of the National Academy of science USA* **72**, 1122-1126.
- Block S M, Goldstein L S, Schnapp B J (1990). Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature* **348**: 348-352.
- Böhm K J, Vater W, Fenske H, Unger E (1984). Effect of microtubule-associated proteins on the protofilament number of microtubules assembled in vitro. *Biochem. Biophys. Acta.* **800**: 119-126.
- Böhm K J, Steinmetzer P, Daniel A, Vater W, Baum M, Unger E (1997 b). Kinesin-driven microtubule motility in the presence of alkaline-earth metal ions. Indication for calcium ion-dependent motility. *Cell Motility and Cytoskeleton* **37**:226-31.
- Böhm K J, Stracke R, Unger E (2000 a). Speeding up kinesin-driven microtubule gliding in vitro by variation of cofactor composition and physicochemical parameters. *Cell Biology International* **24**: 335-341.
- Böhm K J, Stracke R, Baum M, Zieren M, Unger E (2000 b). Effect of temperature on kinesin-driven microtubule gliding and kinesin ATPase activity. *FEBS Letters* **466**: 59-62.
- Bonassi S, Neri M and Puntoni R (2001). Validation of biomarkers as early predictors of disease. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **480-481**: 349-358.
- BUA (Beratungsgremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft deutscher Chemiker) (1991). Nitrobenzol, BUA-Stoffbericht 59. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Bucio L, Garcia C, Souza V, Hernandez E, Gonzales C, Betancourt M and Gutierrez-Ruiz M C (1999). Uptake, cellular distribution and DNA damage produced by mercuric chloride in a human fetal hepatic cell line. *Mutat. Res.* **25**: 65-72.
- Burkart W, Ogorek B (1986). Genotoxic action of cadmium and mercury in cell cultures and modulation of radiation effects. *Toxicol. Environ. Chem.* **12**: 173-183.
- Burke D J (2000). Complexity in the spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev.* **10**(1): 26-31.
- Cantoni O, and Costa M (1983). Correlation of DNA strand breaks and their repair with cell survival following acute exposure to mercury II and X-rays. *Mol. Pharmacol.* **24**: 84-89.
- Cantoni O, Christie N T, Robison S H and Costa M (1984 a). Characterization of DNA lesions produced by HgCl₂ in cell culture systems. *Chem. Biol. Interact.* **49**: 209-224.

- Cantoni O, Christie N T, Swann A, Draht D B and Costa M (1984 b). Mechanism of HgCl₂ cytotoxicity in cultured mammalian cells. *Mol. Pharmacol.* **26**: 360-368.
- Carboni J M, Farina V, Rao S, Hauck S I, Horwitz S B, Ringel I (1993). Synthesis of a photoaffinity analog of taxol as an approach to identify the taxol binding site on microtubule. *J. Med. Chem.* **36**: 1918-1922.
- Cattley R C, Everitt J I, Gross E A, Moss G O, Hamm T E and Popp J A (1994). Carcinogenicity and Toxicity of inhaled Nitrobenzene in B6C3F1 mice and F344 and CD rats. *Fundamental and applied Toxicology* **22**: 382-340.
- Cavenee W K, Scrabble H J and James C D (1991). Molecular genetics of human cancer predisposition and progression. *Mutat. Res.* **247**: 199-202.
- Chiu C W, Lee L H, Wang C Y, Bryan G T (1978). Mutagenicity of some commercially available nitro compounds for Salmonella typhimurium. *Mutat. Res. Sep* **58**(1): 11-22.
- Christie N T, Cantoni O, Sugiyama M, Cattabeni F and Costa M (1985). Differences in the effects of Hg II on DNA repair induced in Chinese hamster ovary cells by ultraviolet or X-rays. *Mol. Pharmacol.* **29**: 173-178.
- Choo K H (2000). Centromerization. *Trends Cell Biol.* **10** (5): 182-188.
- CIIT (Chemical Industry Institute of Toxicology) (1993). A chronic inhalation toxicity study of nitrobenzene in F344-rats, CD rats and B6C3F1 mice. In report, issued by the Chemical Industrie Institute of Toxicology, Research Triangle Park, NC.
- Countryman P I and Heddle J A (1976). The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research* **41**: 321-332.
- Crevel I M, Lockhart A, Cross R A (1997). Kinetic evidence for low chemical processivity in ncd and Eg5. *J. Mol. Bio.* **273**: 160-170.
- Curvall M, Enzell C R, Pettersson B (1984). An evaluation of the utility of four in vitro short term tests for predicting the cytotoxicity of individual compounds derived from tobacco smoke. *Cell Biol. Toxicol.* Oct **1**(1): 173-93.
- Decordier I, Dillen L, Cundari E, Kirsch-Volder M (2002). Elimination of micronucleated cells by apoptosis after treatment with inhibitors of microtubules. *Mutagenesis* **17**: 337-344.
- De Flora S, Bennicelli C and Bagnasco M (1994). Genotoxicity of mercury compounds. A Review. *Mutat. Res.* **317**: 57-79.
- Deknudt G H, Deminatti M (1978). Chromosome studies in human lymphocytes after in vitro exposure to metal salts. *Toxicology* **10**: 67-75.
- DFG (1999) Quecksilber und anorganische Quecksilberverbindungen. In: Greim H (ed.) Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten. 28. Lieferung, pp. 1-42, WILEY-VCH, Weinheim
- DFG (2000). MAK-Werteliste. Blei und seine anorganischen Bleiverbindungen, außer Bleiarsenat und Bleichromat.
- Duesberg P, Rasnick D (2000). Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of it's own. *Cell Motil. Cytoskeleton* **47**: 81-107.

- Duhr E F, Pendergrass J C, Slevin J T, Haley B E (1993). HgEDTA complex inhibits GTP interactions with the E-site of brain beta-tubulin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **122**: 273-80.
- Dujardin D, Wacker U I, Moreau A, Schroer TA, Rickard JE and De Mey JR (1998). Evidence for a role of CLIP-170 in the establishment of metaphase chromosome alignment. *J. Cell Biol.* **141**: 849–862.
- Dunkel V C et al. (1984). Reproducibility of microbial mutagenicity assays: Tests with *Salmonella typhimurium* and *E. coli* using standardized protocol. *Environ. Mol. Mutagen.* **6**:1-254.
- Earnshaw W C und Rattner J B (1989). A map of the centromere (primary constriction) in vertebrate chromosomes at metaphase. *Prog. Clin. Biol. Res.* 318:33-42.
- Echeverri C J, Paschal B M, Vaughan K T, Vallee R B (1996). Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J. Cell. Biol.* **132**(4):617-33.
- Eheleben I (1998). Einfluß von Quecksilber (II) auf die Induktion und Reparatur von oxidativen DNA-Schäden. Diplomarbeit.
- Erickson H P and O` Bieren E T (1992). Microtubule dynamics instability and GTP hydrolysis. *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 145-166.
- Faulkner N E, Dujardin D L, Tai C Y, Vaughan K T, O'Connell C B, Wang Y and Vallee R B (2000). A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol.* **2**: 784–791.
- Favorsky MV (1939). New polyploidy-inducing chemicals. *CR Acad. Sci. URSS* **25**: 71-74
- Fenech M, Morley A (1989). Kinetochore detection in Micronuclei; an alternative method for measuring chromosome loss. *Mutagenesis* **4** (2): 98-104.
- Fenech M (1993). The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat. Res.* **285**: 35-44.
- Fenech M (1998). Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. *Mutat. Res.* 3; **404** (1 bis 2): 155-65.
- Fenech M, Holland N, Chang WP, Zeiger E, Bonassi S (1999). The Human MicroNucleus Project-An international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. Review. *Mutat Res.* **428** (1-2): 271-83.
- Fenech M (2000). The in vitro micronucleus technique. *Mutat. Res.* **455**(1-2): 81-95.
- Fischer A B (1985). Factors influencing cadmium uptake and cytotoxicity in cultured cells. *Xenobiotica.* 1985 Aug-Sep;15(8-9):751-7.
- Fracasso M E, Perbellini L, Solda S, Talamini G, Franceschetti P (2002). Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. *Mut. Res.* **515**: 159-169.
- Franchi E, Loprieno G, Ballardini M, Petrozzi L, Migliore L (1994). Cytogenetic monitoring of fishermen with environmental mercury exposure. *Mut. Res.* **320** (1-2): 23-29.

- Fu PP, Chou MW, Miller DW, White GL, Heflich RH, Beland FA (1985). The orientation of the nitro substituent predicts the direct-acting bacterial mutagenicity of nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mut. Res.* **143**: 173-181.
- Fu H, Boffetta P (1995). Cancer and occupational exposure to inorganic lead compounds: a meta-analysis of published data. *Occup. Environ. Med.* **52**: 73-81.
- Gardner R D, Burke D J (2000). The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol.* **10**(4): 154-8
- Garner R C, Nutman C A (1977). Testing of some azo dyes and their reduction products for mutagenicity using *Salmonella typhimurium* TA 1538. *Mutat. Res.* Jul **44**(1): 9-19.
- Gaskin F, Cantor C R, Shelanski M L (1974). Turbidimetric studies of the in vitro assembly and disassembly of porcine neurotubules: *J. Mol. Biol.* **89**: 737-755.
- Ghosh A K, Sen S, Sharma A, Talukder G (1991). Effect of chlorophyllin on mercuric chloride-induced clastogenicity in mice. *Food Chem. Toxicol.* **29**(11): 777-9
- Haesen S, Timmermans M, Kirsch-Volders, M (1993). Induction of micronuclei and karyotype aberrations during in vivo mouse skin carcinogenesis. *Carcinogenesis* **14**: 2319-2327.
- Hagmar L, Bonassi S, Strömberg S, Mikoczy Z, Lando C, Hansteen I L, Huici Montagud A, Knudsen L, Norppa H, Reuterwall C (1998). Cancer predictive value of cytogenetic markers used in occupational health surveillance programs: a report from an ongoing study by the European Study Group on Cytogenetic Biomarkers and Health.. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **405**: 171-178.
- Hamel E, Covell DG (2002). Antimitotic peptides and depsipeptides. *Curr. Med. Chem. Anti-Canc. Agents.* **2**(1):19-53
- Hamilton-Koch W, Snyder R D, Lavelle JM (1986). Metal induced DNA and repair in human diploid fibroblasts and Chinese hamster ovary cells. *Chem. Biol. Interact* **59**: 17-28.
- Hanahan D and Weinberg RA (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**: 57-70
- Hansteen I L, Ellingsen D G, Clausen K O, Kjuus H (1993). Chromosome aberrations in chloralkali workers previously exposed to mercury vapor. *Scand J Work Environ Health.* **19**(6): 375-81.
- Hartwig A, Schlepegrell R, Beyersmann D (1990). Indirect Mechanism of lead induced genotoxicity in cultured mammalian cells. *Mutat. Res.* **241**: 75-82.
- Hartwig A (1994). Role of DNA repair inhibition in lead and cadmium-induced genotoxicity: a review. *Environ. Health Perspect.* **102** (suppl. 3): 45-50.
- Heddle J A, Benz R D, Countryman P (1978 a). Measurement of chromosomal breakage in cultured cells by micronucleus technik. Aus Evans H J: Mutagen-induced chromosomal damage in man. *Edinburgh University Press.* 191-200.
- Heddle J A, Lue C B, Saunders E F, Benz R D (1978 b). Sensitivity to five mutagens in Franconi's Anemia as measured by the micronucleus method. *Cancer Research* **38**: 2983-2988.
- Hengstler J G, Bolm-Audorff U, Faldum A, Janssen K, Reifenrath M, Gotte W, Jung D, Mayer-Popken O, Fuchs J, Gebhard S, Bienfait H G, Schlink K, Dietrich C, Faust D, Epe B, Oesch F (2003). Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis.* **24**(1): 63-73.

- Hentschler D, Lehnert G (1989). Biologische Arbeitsstoff-Toleranz-Werte (BAT-Werte) und Expositionsäquivalente für krebserzeugende Arbeitsstoffe (EKA). 4. Lieferung, Nitrobenzol, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim.
- Hessling J J, Miller S E, Levy N L (1980). A direct comparison of procedures for the detection of mycoplasma in tissue culture. *J. Immunol. Methods*. **38**(3-4): 315-24.
- Hirose K, Amos L A (1999). Three-dimensional structure of motor molecules. *Cell Mol. Life Sci* **56**: 184-199.
- Hofmann U, Rüdorf W (1966) Anorganische Chemie, 19. Auflage, Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig, S. 551.
- Holder J W (1999 a). Nitrobenzene carcinogenicity in animals and human hazard evaluation. *Toxicol. Ind. Health* **15**: 445-457.
- Holder J W (1999 b). Nitrobenzene potential human cancer risk based on animal studies. *Toxicol. Ind. Health* **15**: 458-463.
- Howard J (2001). Mechanics of motor proteins and the cytoskeleton. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Howard W D, Timasheff S N (1988). Linkages between the effects of taxol, colchicine and GTP on tubulin polymerisation. *J. Biol. Chem.* **263**: 1342-1346.
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (1987). Overall evaluations of carcinogenicity: An updating of IARC monographs Band 1-42, Suppl. 7, IARC, Lyon, 230-232.
- Jagetia G C, Aruna R (1998). Effect of various concentrations of lead nitrate on the induction of micronuclei in mouse bone marrow. *Mutat. Res.* Jul 8 **415**(1-2): 131-7.
- Jagiello G, Lin J S (1973). An assessment of the effects of mercury on the meiosis of mouse ova. *Mutat. Res.* **17**: 93-99.
- Kallio M, Lahdetie J (1996). Fragmentation of centromeric DNA and prevention of homologous chromosome separation in male mouse meiosis in vivo by the topoisomerase II inhibitor etoposide. *Mutagenesis* **11**(5): 435-443.
- Kalweit S, Utesch D, von der Hude W, Madle S (1999). Chemically induced micronucleus formation in V79 cells- comparison of different test approaches. *Mutation Research* **439**: 183-190.
- Kaplan K B, Burds A A, Swedlow J R, Bekir S S, Sorger P K and Nathke I S (2001). A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat. Cell Biol.* **3**: 429-432.
- Kasschau M R, Elder J, Meyn R E (1977). Effects of mercuric chloride on synchronized Chinese hamster ovary cells: survival and DNA replication. *Chem. Biol. Interact* **18**: 205-215.
- Kaufmann W K und Paules R S (1996). DNA damage and cell cycle checkpoints. *Faseb J.* **10**: 238-247.
- Keates R A B and Yott B (1984). Inhibition of microtubule polymerization by micromolar concentrations of mercury (II). *Can. J. Biochem. Cell Biol.* **62**:814-8.
- Kirkland D J, Hayashi M, MacGregor J T, Müller L, Schechtman L, Sofuni T (2000). Summary of major conclusions from the international workshop on genotoxicity test procedures. *Environmental and Molecular Mutagenesis* **35**: 162-166.

- Kirsch-Volders M, Cundari E and Verdoodt B (1998). Towards an unifying model for the metaphase/anaphase transition. *Mutagenesis* **13**: 321–335.
- Kirsch-Volders M et al. (2000). Report from the in vitro micronucleus assay working group. *Environ. Mol. Mutagen* **35**: 167-172.
- Kirsch-Volders M, Lison D (2003). Re: Hengstler, J.G., Bolm-Auorff, U., Faldum, A., Janssen, K., Reifenrath, M., Gotte, W., Jung, D., Mayer-Popken, O., Fuchs, J., Gebhard, S., Bienfait, H.G., Schlink, K., Dietrich, C., Faust, D., Epe, B. and Oesch, F. Occupational exposure to heavy metals: DNA damage induction and DNA repair inhibition prove co-exposures to cadmium, cobalt and lead as more dangerous than hitherto expected. *Carcinogenesis*, 2003, 24, 63-73. *Carcinogenesis*. 2003 24(11):1853-4; author reply 1855-7.
- Kirsch-Volders M, Vanhauwaert A, Eichenlaub-Ritter U, Decordier I (2003) Indirect mechanisms of genotoxicity. *Toxicol. Lett.* **140/141**: 63-74.
- Klein C B, Kargacin B, Su L, Cosentino S, Snow E T, Costa M (1994). Metal mutagenesis in transgenic Chinese hamster cells lines. *Environ. Health Perspect.* **102**: 63-67.
- Kligerman A D, Erexson G L, Wilmer J L, Phelps M C (1983). Analysis of cytogenetic damage in rat lymphocytes following in vivo exposure to nitrobenzene. *Toxicol. Lett.* **18**: 219-226.
- Kline-Smith S L, Walczak C E (2002). Centromere-bound KCM1 is required for proper progression through prometaphase in cells. *Mol. Biol. Cell.* **13**: 175a.
- Kochendörfer U, Stammberger I, Mayer D, Schwanitz G (1996). A new possible parameter for the detection of aneuploidy inducing substances: the analysis of qualitative and quantitative abnormalities of the spindle apparatus. *Mutat. Res.* **361**: 55-66
- Kramer J, Schaich-Walch G, Nusse M (1990). DNA synthesis in radiation-induced micronuclei studied by bromodeoxyuridine (BrdUrd) labelling and anti-BrdUrd antibodies. *Mutagenesis* **5**(5):491-495
- Kreja L, Seidel H J (2002). On the cytotoxicity of some microbial volatile organic compounds as studied in the human lung cell line A549. *Chemosphere* **49**(1): 105-110.
- Krigman M, Bouldin T W, Mushak P (1980) Lead. In: P. S. Spencer, H. H. Schaumburg (Hrsg): *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Kull F J (2000). Motor proteins of the kinesin superfamily: structure and mechanism. *Essays in Biochemistry*. Molecular Motors edited Banting G, Higgins S. J. Portland Press, London, pp. 61-73.
- Kuriyama R, Sakai H (1974). Role of tubulin-SH groups in polymerization to microtubules. *J. Biochem.* **76**: 651-654.
- Lee C H, Lin R H, Liu S H, Lin-Shiau S Y (1997). Distinct genotoxicity of phenylmercury acetate in human lymphocytes as compared with other mercury compounds. *Mutat. Res.* **392**: 269-276.
- Lengauer C, Kinzler K W, Vogelstein B (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* **396**: 643-649.
- Leonard A (1988). Mechanisms in metal genotoxicity: the significance of the in vitro approaches. *Mut. Res.* **198**(2): 321-326. Review.
- Li X and Nicklas R B (1995). Mitotic forces control a cell-cycle checkpoint. *Nature* **373**: 630–632.

- Liliom K, Wagner G, Pacz A, Cascante M, Kovacs J, Ovadi J (2000). Organization-dependent effects of toxic bivalent ions microtubule assembly and glycolysis. *Eur. J. Biochem.* **267**: 4731-9.
- Lindholm C, Norppa H, Hayashi M, Sorsa M (1991). Induction of micronuclei and anaphase aberrations by cytochalasin B in human lymphocyte cultures. *Mutat Res.* **260** (4): 369-75.
- Maki T, Suzuki Y (1985). Benzoic acid and derivatives in: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry. 5th ed., vol. A3, p. 555, 559, 562, 567-569, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim.
- Malgazata and Wierzbicka (1988). Mitotic disturbances induced by low doses of inorganic lead. *Caryologia* vol. **41**, 2, 143-160.
- Maney T, Hunter A W, Wagenbach M and Wordeman L (1998). Mitotic centromere-associated kinesin is important for anaphase chromosome segregation. *J. Cell Biol.* **142**: 787-801.
- Martell A E, Smith R M (1974). Critical Stability Constants, vol. 1, amino acids, Plenum Press, New York.
- Matsuoka A, Yamazaki N, Suzuki T, Hayashi M, Sofuni T (1992). Evaluation of the micronucleus test using a Chinese hamster cell line as an alternative to the conventional in vitro chromosomal aberration test. *Mut. Research* **272**: 223-236.
- Matsushima T, Hayashi M, Matsuoka A, Ishidate M, Miura K, Shimizu H, Suzuki Y, Morimoto K, Ogura Y, Mure K, Koshi K, Sofuni T (1999). Validation study of the in vitro micronucleus test in a Chinese hamster lung cell line (CHL/IU). *Mutagenesis* **14** (6): 569-80.
- McDonald KL, O'Toole ET, Mastronarde DN, McIntosh JR (1992). Kinetochore microtubules in PTK cells *J. Cell Biol.* **118**(2): 369-83
- McEwen B F, Chan G K, Zubrowski B , Savoian M S, Sauer M T and Yen T J (2001),, CENP-Eis essential for reliable bioriented spindle attachment, but chromosome alignment can be achieved via redundant mechanisms in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **12**: 2776-2789.
- Microbiological Associates, Bethesda, Maryland, USA (1982). Mouse lymphoma mutagenesis assay. Unveröffentlichter Bericht, Contract No. N01-CP-15739, im Auftrag des National Cancer Institute, USA.
- Microtest Research Ltd., Heslington, UK (1988). Study to determine the ability of benzonitrile to induce mutation in five histidine-requiring strains of salmonella typhimurium (according to OECD guideline 471). Unveröffentlichter Bericht, Study No. STG 2/S, im Auftrag der SKW Trostberg AG.
- Miller B M, Adler I D (1990). Application of antikinetochore antibody staining (CREST staining) to micronuclei in erythrocytes induced in vivo. *Mutagenesis* Jul **5** (4): 411-5.
- Mirsalis J C, Tyson C K, Butterworth B E (1982). Detection of genotoxic carcinogens in the in vivo-in vitro hepatocyte DNA repair assay. *Environ. Mutagen.* **4**(5): 553-62
- Miura K, Inokawa M, Imura N (1984). Effects of methylmercury and some metal ions on microtubule networks in mouse glioma cells and in vitro tubulin polymerization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **73**: 218-31.
- Morimoto K, Iijima S, Koizumi A (1982). Selenite prevents the induction of sister-chromatid exchanges by methyl mercury and mercuric chloride in human whole blood cultures. *Mutat. Res.* **102**: 183-192.
- Musacchio A and Hardwick K G (2002). The spindle checkpoint: structural insights into dynamic signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**: 731-741.

- Nakamura M, Zhou X Z and Lu K P (2001). Critical role for the EB1 and APC interaction in theregulation of microtubule polymerization. *Curr. Biol.* **11**: 1062–1067.
- NCI (National Cancer Institute (1984). Short term test program sponsored by the division of cancer etiology. Zitiert in: *CCRIS* (1993).
- Nohmi T, Yoshikawa K, Nakadate M, Miyata R, Ishidate M Jr (1984). Mutations in Salmonella typhimurium and inactivation of Bacillus subtilis transforming DNA induced by phenylhydroxylamine derivatives. *Mutat. Res.* Jun **136**(3): 159-68.
- NTP (National Toxicology Program) (1988a). Chemical test results for cytogenetic effect in Chinese hamster ovary cells. Fiscal Year 1988 Annual Plan, p. 87.
- NTP (National Toxicology Program) (1993). Toxicology and carcinogenesis studies of mercuric chloride (CAS.No 7487-94-7) in F344 rats and B6C3F1 mice (gavage studies). Technical report no. 408, NIH Publication No 91-3139, National Institutes of health, Bethesda.
- NTP (National Toxicology Program) (1995). Schriftliche Mitteilung an die Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie vom 27.02.1995.
- NTP (National Toxicology Program) *Unpublished data*
- Ochi T (2002). Methylmercury, but not inorganic mercury, causes abnormalities of centrosome integrity (multiple foci of γ -tubulin), multipolar spindles and multinucleated cells without microtubule disruption in cultured Chinese hamster V79 cells. *Toxicology* **175**: 111-121
- Ogura H, Takeuchi T, Morimoto K (1996). A comparison of the 8-hydroxydeoguanosine, chromosome aberrations and micronucleus techniques for the assesment of the genotoxicity of mercury compounds in human blood lymphocytes. *Mutat. Res.* **340**: 175-182.
- Osgood C J, Cyr K (1998). Induction by nitriles of sex chromosome aneuploidy: tests of mechanism. *Mutation Res* **403**: 149-157.
- Oshimura M, Barrett J C (1986). Chemically induced aneuploidy in mammalian cells: mechanisms and biological significance in cancer. *Environ. Mutagen.* **8**: 129–159
- Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E, Wyszynska K, Natarajam A T, Nilsson R (2003). Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. *Mut. Res.* **540**: 19-28.
- Pines J (1993). Cyclin and cyclin-dependent kinases: take your partners. *NBS* **18**: 195-197.
- Pisano C, Battistoni A, Antoccia A, Degrassi F, Tanzarella C (2000). Changes in microtubule organisation after exposure to a benzimidazole derivative in chinese hamster cells. *Mutagenesis* **15**: 507-515.
- Popescu H I, Negru L, Lancranjan I (1979). Chromosome aberrations induced by occupational exposure to mercury. *Arch. Environ. Health* **34**: 461-463.
- Purchase I F, Longstaff E, Ashby J, Styles J A, Anderson D, Lefevre PA, Westwood F R (1978). An evaluation of 6 short-term tests for detecting organic chemical carcinogens. *Br. J. Cancer* Jun **37**(6): 873-903.
- Queiroz M L, Bincoletto C, Quadros M R, De Capitani E M. (1999). Presence of micronuclei in lymphocytes of mercury exposed workers. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **21**(1):141-50.
- Rao M V, Chinoy N J, Suthar M B, Rajvanshi M I (2001). Role of ascorbic acid on mercuric chloride-induced genotoxicity in human blood cultures. *Toxicol. in vitro* **15**: 649-654.

- Reddy K R, Chaparro C, Saichek R E (2003). Removal of mercury from clayey soils using electrokinetics. *J Environ Sci Health Part A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **38**: 307-338.
- Renneberg A J, Dudas M J (2001). Transformations of elemental mercury to inorganic and organic forms in mercury and hydrocarbon co-contaminated soils. *Chemosphere* **45**: 1103-1109.
- 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.
- Richards R I (2001). Fragile and unstable chromosomes in cancer: causes and consequences. *Trends in Genetics* **17**(6): 339-345.
- Rieder C L (1982). The formation, structure, and composition of the mammalian kinetochore and kinetochore fiber. Review. *Int. Rev. Cytol.* **79**:1-58.
- Rieder C L, Cole R W, Khodjakov A and Sluder G (1995). The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *J. Cell Biol.* **130**: 941-948.
- Rhind N, Russell P (2000). Checkpoint: it takes more than time to heal some wounds. *Curr. Biol.* **10**: R908-11.
- Ritter L, Solomon K, Sibley P, Hall K, Keen P, Mattu G (2002). Linton. Sources, pathways, and relative risks of contaminants in surface water and groundwater: a perspective prepared for the Walkerton inquiry. *J. Toxicol. Environ. Health* **65**: 1-142.
- Robbiano L, Carrozzino R (1999). Correlation between induction of DNA fragmentation and MN formation in kidney cells from rats and humans and tissue specific carcinogenic activity. *Toxicology and Applied Pharmacology*. Dec. 1; **161** (2): 153-159.
- Robinson S H, Cantoni O, Costa M (1982). Strand breakage and decreased molecular weight of DNA induced by specific metal compounds. *Carcinogenesis* **3**: 657-662.
- Rossmann TG, Molina M, Meyer LW (1984). The genetic toxicology of metal compounds: I. Induction of lambda prophage in E coli WP2s (lambda). *Environ Mutagen.* **6**(1): 59-69
- Russo A, Stocco A, Majone F (1992). Identification of kinetochore-containing (CREST+) micronuclei in mouse bone marrow erythrocytes. *Mutagenesis* **7**: 195-197.
- Saitoh H, Tomkiel J, Cooke C A, Rattie H, Maurer M, Rothfield N F, Earnshaw W C (1992). CENP-C, an autoantigen in scleroderma, is a component of the human inner kinetochore plate. *Cells* **70**: 115-125.
- Sanchez-Galan S, Linde A R, Garcia-Vazquez E (1999). Brown trout and european minnow as a target species for genotoxicity test: differential sensitivity to heavy metals. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **43**(3): 301-304
- Saunders W S, Shuster M, Huang X, Gharaibeh B, Enyenihi A H, Petersen I, Gollin S M (2000). Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **97**(1): 303-8.
- Savoian M S, Goldberg M L and Rieder C L (2000). The rate of poleward chromosome motion is attenuated in *Drosophila* zw10 and rod mutants. *Nat. Cell Biol.* **2**: 48-952.

- Schaar B T, Chan G K T, Maddox P, Salmon E D and Yen T J (1997). CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *J. Cell Biol.* **139**: 1373–1382.
- Schempp W, Vogel W (1979). Difference between diploid and aneuploid Chinese hamster cells in replication at mid-S-phase. *Chromosoma* **21**; **73**(1): 109-15
- Schiff P B, Fant J, Horwitz S B (1979). Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**: 665-667.
- Schuler M, Rupa D S, Eastmond D A (1997) A critical evaluation of centromeric labeling to distinguish micronuclei induced by chromosomal loss and breakage in vitro. *Mutation Res.* **392**: 81-95.
- Schultz N und Önfelt A (2000). Sensitivity of cytokinesis to hydrophobic interactions. Chemical induction of bi-and multinucleated cells. *Chemico-Biological Interactions* **126**: 97-123.
- Schulze E and Kirschner M (1987). Dynamic and stable populations of microtubules in cells. *Journal of cell Biology* **104**: 277-288.
- Seoane A I, Dulout F (2001). Genotoxic ability of cadmium, chromium and nickel salts studied by kinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay. *Mutation Res* **490**: 99-106
- Shackelford R E, Kaufmann W K, Paules R S (1999). Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ. Health Perspect.* **107** (1): 5-24.
- Sharp D J, Rogers G C and Scholey J M (2000). Microtubule motors in mitosis. *Nature* **407**: 41–47.
- Shelanski M L, Gaskin F, Cantor C R (1973). Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **70**:765-8.
- Sherr C J (1993). Mammalian G1 cyclins. *Cell* **73**: 1059-1065.
- Simonet M, Guinochet M (1939). L'ation de quelques derives halogenes et nitres des carbures cycliques sur le nitroses, dans les cellules vegetables. *CR Soc. Biol.* **132**: 455-457.
- SKW Trostberg AG, Produktsicherheit Toxikologie (1994). Schriftliche Mitteilung an die Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie vom 18.11.1994.
- Smith P K et al. (1985). Measurement of Protein using Bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**: 76-85.
- Speit G, Habermeier B, Helbig R (1994). Differences in the response to mutagens between two V79 sublines. *Mutat. Res.* **325**: 105-111.
- Steenland K and Bofetta P (2000). Lead and Cancer in Humans: Where are we now?. *Am. Journal of Ind. Medicine.* **23**: 295-299.
- Stryer (1991). Biochemie, 3. Auflage. *Spektrum Akad. Verl.*, New York, Heidelberg, Berlin.
- Sujatha T V, Hegde M J (1998). C-mitotic effects of trichloroethylene (TCE) on bone marrow cells of mice. *Mutat. Res.* Mar 16; **413**(2):151-8.
- Suzuki J, Koyama T, Suzuki S (1983). Mutagenicities of mono-nitrobenzene derivatives in the presence of norharman. *Mutat. Res.* May **120**(2-3): 105-10.
- Tai C Y, Dujardin D L, Faulkner N E and Vallee R B (2002). Role of dynein, dynactin and CLIP-170 interactions in LIS1 kinetochore function. *J. Cell Biol.* **156**: 959–968.

- Tao K S; Urlando C; Heddle J A (1993). Mutagenicity of methyl methanesulfonate (MMS) in vivo at the Dlb-1 native locus and a lacI transgene. *Environ. Mol. Mutagen.* **22**: 293-6 (1993).
- Thacker S B, Hoffmann D A, Smith J, Steinberg K, Zack M (1992). Effects of low-level body burdens of lead on the mental development of children: Limitations of meta-analysis in a review of longitudinal data. *Arch. Environ. Health* **47**: 336-346.
- Thier R, Bonacker D, Stoiber T, Böhm KJ, Wang M, Unger E, Bolt H M, Degen G (2003) Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems. *Toxicol. Lett.* **140/141**: 75-81.
- Trielli M O, Andreassen P R, Lacroix F B und Margolis R L (1996). Differential Taxol-dependent arrest of transformed and nontransformed cells in the G1 phase of the cell cycle, and specific-related mortality of transformed cells. *J. Cell Biol.* **135** (3): 689-700.
- Tutt A, Gabriel A, Bertwistle D, Connor F, Paterson H, Peacock J, Ross G and Ashworth A (1999). Absence of Brca2 causes genome instability by chromosome breakage and loss associated with centrosome amplification. *Current Biology* **9**: 1107-1110
- Tsuzuki K, Sugiyama M, Haramaki N (1994). DNA Single-strand breaks and Cytotoxicity induced by chromatin (VI), Cadmium (II) and Mercury (II) in Hydrogen-Peroxide-resistant Cell-Lines. *Environ. Health Persp.* **102** (3): 341-342.
- Unger E, Böhm K J, Vater W (1990). Struktural diversity and dynamics of microtubules and polymorphic tubulin assemblies. Review. *Electron. Microsc. Rev.* **3**: 355-395.
- U.S. EPA (1987). U.S. Environmental Protection Agency. Health Effects Assessment for Nitrobenzene. Office of Research and Development, Cincinnati, OH. EPA/600/8-88/049. ECAO-C-H073
- Vaglenov A, Creus A, Laltchev S, Petkova V, Pavlova S, Marcos R (2001). Occupational exposure to lead and induction of genetic damage. *Environ. Health Persp.* **109**: 295-298.
- Valverde M, Trejo C, Rojas E (2001). Is the capacity of lead acetate and cadmium chloride to induce genotoxic damage due to direct DNA-metal interaction? *Mutagenesis* **3**: 265-270.
- Vance W A, Levin D E (1984). Structural features of nitroaromatics that determine mutagenic activity in Salmonella typhimurium. *Environ. Mutagen.* **6**: 797-811.
- Van Goethem F, Stoppelaar J, Hoebee B, Kirsch-Volders, M (1995). Identification of clastogenic and/or aneugenic events during the preneoplastic stages of experimental rat hepatocarcinogenesis by fluorescence in situ hybridisation. *Carcinogenesis* **16**: 1824-1834.
- Vater W, Böhm K J, Unger E (1997). Tubulin assembly in the presence of calcium ions and taxol: microtubule bundling and formation of macro-tubule-ring complexes. *Cell Motil. Cytoskeleton* **36**: 76-83.
- Verschaeve L, Kirsch-Volders, Susanne C (1984). Mercury-induced segregational errors of chromosomes in human lymphocytes and in indian muntjac cells. *Toxicol. Lett.* **21**: 247-253.
- Verschaeve L, Kirsch-Volders, Hens L, Susanne C (1985). Comparative in vitro cytogenetic studies in mercury-exposed human lymphocytes. *Mutat. Res.* **157**: 221-226.
- Vig BK. Sequence of centromere separation: a possible role for repetitive DNA. *Mutagenesis* (1987). **2**(3): 155-9. Review.
- Von der Hude W, Kalweit S, Engelhardt G, McKiernan S, Kasper P, Slacik-Erben R, Miltenburger HG, Honarvar N, Fahrig R, Gorlitz B, Albertini S, Kirchner S, Utesch D, Potter-Locher F, Stopper H,

- Madle S (2000). In vitro micronucleus assay with chinese hamster V79 cells – results of a collaborative study with in situ exposure to chemical substances. *Mutat Res.* **468**: 137-163.
- Walczak C, Gan E C, Desai A, Mitchison T J and Kline-Smith S L (2002). The microtubule-destabilizing kinesin, XKCM1 is required for chromosome positioning during spindleassembly. *Curr. Biol.* **12**: 1885–1889.
- Wallin M, Larsson H, Edstrom A (1977). Tubulin sulfhydryl groups and polymerization in vitro. Effects of di- and trivalent cations. *Exp. Cell Res.* **107**: 219-25.
- Whittaker S G, Zimmermann F K, Dicus B, Piergorsch W W, Resnick M A, Fogel S (1990). Detection of induced mitotic chromosome loss in *saccharomyces cervisiae* - an interlaboratory assessment of 12 chemicals. *Mutat. Res.* **241**: 225-242.
- WHO (World Health Organisation) (1991). Inorganic mercury. IPCS. Environmental health criteria 118, WHO, Genf.
- Wierzbicka M (1989). Disturbances in cytokinesis caused by inorganic lead. *Envi. Exp. Bot.* Vol. **29**, No 2: 123-133.
- Winder C, Bonin T (1993). The genotoxicity of lead. *Mutat. Res.* **285**: 117-124.
- Wittman G B (1992). Axonemal dyneins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 74-79.
- Wittmann T, Hyman A and Desai A (2001). The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors. *Nat. Cell Biol.* **3**: E28–E34.
- Wozniak K, Blasiak J (2003). In vitro genotoxicity of lead acetate: induction of single and double strand breaks and DNA-protein cross-links. *Mutation Res* **535**: 127-139
- Würgeler F E (1993). Genetische Endpunkte. In Fahrig R (Hrsg) „ Mutationsforschung und genetische Toxikologie“, Darmstadt. *Wissenschaftliche Buchgesellschaft*: 18-29.
- Yamamoto K I und Kikuchi Y (1980). A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res.* **71**: 127-131.
- Yao X, Abrieu A, Zheng Y, Sullivan K F and Cleveland D W (2000). CENP-E forms a link between attachment of spindle microtubules to kinetochores and the mitotic checkpoint. *Nat. Cell Biol.* **2**: 484–491.
- Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K (1988). Salmonella mutagenicity tests: IV. Results from the testing of 300 chemicals. *Environ. Mol. Mutagen.* **11** (12): 1-157.
- Zelikoff J T, Li J H, Hartwig A, Wang X W, Costa M, Rossman T G (1988). Genetic toxicology of lead compounds. *Carcinogenesis* **9**: 1727-1732.
- Zeller H, Hofmann H T, Thiess A M, Hey W (1969). Toxicity of nitrile (results of animal experiments and 15 years of experience in industrial medicine). *Zentralbl. Arbeitsmed.* Aug **19**(8): 225-38.
- Zimmermann H P, Doenges K H, Roderer G (1985). Interaction of triethyl lead chloride with microtubules in vitro and in mammalian cells. *Exp Cell Res.* **156**(1): 140-52.
- Zimmermann H P, Faulstich H, Hansch G M, Doenges K H, Stournaras C (1988). The interaction of triethyl lead with tubulin and microtubules. *Mutat Res.* **201**(2): 293-30.

ANHANG

Einzeldaten der Mikronukleus-Versuche

MN/1000 Zellen - Bleichlorid

μM PbCl_2		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	n	MN ₂ Ø	Stabw.
0	K0	8 0	4 2	2 5	4 6	5 8		6 4	4 3	7 3	3 4	4 2	40	4,4	+/-2,2
		2 6	2 4	4 2	3 5	6 9	/	8 5	2 1	9 6	9 6	5 3	4 5	23	17,7
	10 nM VCR	19 14 15 16	15 25	17 18	23 16	28 30	14 15	13	9 11	20 21	15 15	20 19	23	17,7	+/-5,1
0,036		/	/	/	/	/	/	/	/	6 6	6 2	2 4	12	4,1	+/-2,2
0,18		/	/	/	/	/	/	/	/	8 2	5 3	5 1	12	4,9	+/-1,4
		/	/	/	/	/	/	/	/	5 5	6 5	5 3	12	4,9	+/-1,4
0,36		/	/	/	/	/	/	/	/	8 5	6 4	4 3	16	4,6	+/-1,7
		/	/	/	/	/	/	/	/	5 8	4 3	4 3	16	4,6	+/-1,7
0,72		/	/	/	/	/	/	/	/	9 6	4 5	4 4	16	4,9	+/-1,2
		/	/	/	/	/	/	/	/	5 7	4 6	4 6	16	4,9	+/-1,2
0,9		/	/	/	/	/	/	/	/	4 6	4 4	5 4	8	5,8	+/-0,5
		/	/	/	/	/	/	/	/	4 6	5 6	6 6	8	5,8	+/-0,5
1,1		/	/	/	/	/	/	/	/	9 10	6 7	8 6	16	7,8	+/-2,0
		/	/	/	/	/	/	/	/	9 7	9 12	6 5	15	8	+/-2,0
1,44		/	/	/	/	/	/	/	/	4 4	10 10	8 7	15	8	+/-2,0
		/	/	/	/	/	/	/	/	10 9	8 9	9 n.a.	8	8	+/-2,0
1,62		/	/	/	/	/	/	/	/	7 10	10 9	9 6	8	8,8	+/-2,2
		/	/	/	/	/	/	/	/	9 12	10 8	/	8	8,8	+/-2,2
1,8		/	/	/	/	/	/	/	/	11 9	7 5	/	24	8,9	+/-2,5
		/	/	/	/	/	/	/	/	13 11	8 9	10 9	24	8,9	+/-2,5
3,6		/	/	/	/	/	/	/	/	14 11	8 9	10 8	16	8,0	+/-3,2
		/	/	/	/	/	/	/	/	9 4	14 11	8 9	16	8,0	+/-3,2
7,2		/	/	/	/	/	/	/	/	6 11	/	/	8	8,3	+/-1,2
		/	/	/	/	/	/	/	/	10 9	/	/	8	8,3	+/-1,2
18		/	/	/	/	/	/	/	/	7 8	7 8	/	16	8,3	+/-3,2
		/	/	/	/	/	/	/	/	10 8	8 10	/	16	8,3	+/-3,2
36		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	12	10,6	+/-4,2
		/	/	/	/	/	/	/	/	13 17	15 19	/	12	10,6	+/-4,2
180		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	12	13,9	+/-3,1
		/	/	/	/	/	/	/	/	14 17	16 13	10 13	12	13,9	+/-3,1
360		/	/	/	/	/	/	/	/	12 15	7 16	/	8	13,3	+/-4,3
		/	/	/	/	/	/	/	/	11 12	17 11	/	8	13,3	+/-4,3

Tabelle A. 1: Einzeldaten der MN-Auswertungen für Bleichlorid. Pro Versuch wurden für jede gewählte Konzentration maximal vier Objektträger (bei der Positivkontrolle z.T. zwei OT) a 1000 Zellen ausgewertet. Insgesamt wurden 11 Versuche mit Bleichlorid durchgeführt, und für jeden ausgewerteten Objektträger sind die Einzeldaten (MN/1000 Zellen) in der Tabelle aufgeführt.

MN/1000 Zellen - Bleiacetat

μM Pb(II)		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	L	M	N	O	n	MN \bar{x}	Stdabw.
0	K0	4 7 4 5	3 4 3 5	3 4 3 3	5 6 4 3	5 5 5 4	4 5 4 6	5 6 5 4	5 4 5 5	4 4 5 4	5 4 4 5	4 5 3 4	5 4 4 4	4 4 4 5	4 5 3 5	56	4,4	+/- 0,8
	10 nM VCR	18 14	19 17	14 16	15 16	10 13 12 10	11 10 11 12	13 13 14 15	9 14 13 11	14 14 13 15	12 15 14 13	18 15 16 19	16 15 14 14	14 11 15 13	13 16 12 11	48	13,8	+/- 2,3
0,01		5 7 3 4	6 7 8 6	6 3 6 5	5 4 5 3	3 6 4 4	6 3 5 4	4 6 5 6	6 4 4 5	5 5 4 5	5 4 6 5	5 4 6 5	5 5 3 3	5 4 4 5	4 4 5 5	56	4,8	+/- 1,1
		/	/	/	5 6 6 7	4 4 4 3	5 3 5 4	6 5 6 6	5 6 5 6	6 7 7 6	6 6 7 5	6 7 5 7	5 7 6 5	5 5 4 6	5 5 6 5	44	5,5	+/- 1,1
0,025		/	/	/	5 3 6 7	5 6 5 5	6 5 6 7	5 7 7 6	6 5 6 6	7 8 7 6	7 6 8 6	/	/	6 5 7 5	/	32	6,0	+/- 1,0
		/	/	/	6 7 5 3	5 5 5 5	6 7 6 7	7 6 7 6	6 6 6 5	7 6 7 6	8 6 8 6	8 9 7 6	8 9 8 7	9 8 7 7	9 8 7 7	24	7,7	+/- 0,8
0,03		/	/	/	/	/	/	/	/	8 9 7 8	7 8 7 8	8 9 7 6	8 9 8 7	9 8 7 7	8 7 9 7	24	7,7	+/- 0,8
		/	/	/	9 7 5 8	8 7 8 9	8 7 8 9	9 8 7 6	9 8 8 8	9 10 8 8	8 11 10 10	/	/	11 8 9 10	/	28	8,3	+/- 1,4
0,04		/	/	/	9 14 10 12	8 9 12 10	8 9 8 9	9 10 11 10	9 9 8 7	10 9 11 10	10 12 9 12	9 10 11 12	13 12 8 10	9 9 10 11	9 11 9 10	52	9,4	+/- 1,8
		/	5 6 7 6	6 8 9 7	9 14 10 12	8 9 12 10	8 9 8 9	9 10 11 10	9 9 8 7	10 9 11 10	10 12 9 12	9 10 11 12	11 12 12 10	11 14 12 10	12 11 14 9	56	10,6	+/- 2,1
0,1		9 10 11 12	4 6 7 8	7 11 9 5	10 9 8 11	10 12 10 11	10 9 11 9	11 11 12 10	13 11 13 9	11 10 12 13	13 13 13 14	11 12 12 10	11 14 12 10	12 11 12 13	10 12 14 9	56	10,6	+/- 2,1
		/	/	10 8 8 9	10 n.a. 8 12	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7	9,3	+/- 1,5
0,5		/	10 8 11 7	10 12 10 9	9 8 9 10	12 10 9 10	8 7 8 7	10 9 9 11	14 15 12 15	11 11 12 9	15 15 16 14	/	/	13 15 14 13	/	40	10,9	+/- 2,6
		/	8 13 9 11	12 8 10 9	13 12 10 10	10 13 12 14	10 11 12 11	11 10 13 14	12 10 11 9	/	/	/	13 13 12 10	13 13 12 12	/	44	11,4	+/- 1,6
5		11 11 11 15	14 9 7 n.a.	10 12 11 10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	15	11,0	+/- 1,9	
		10 12 11 13	13 11 14 10	13 11 14 10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8	11,7	+/- 1,5	
10		nicht ausw.	10 12 11 13	13 11 14 10	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	8	11,7	+/- 1,5	
		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	10 9 9 9	8 9 9 10	8	9,1	+/- 0,6
100		/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	7 6 8 9	7 9 9 10	/	10 8 7 7	12	8,0	+/- 1,3

Tabelle A. 2: Einzeldaten der MN-Auswertungen für Bleiacetat. Pro Versuch wurden für jede gewählte Konzentration maximal vier Objektträger (bei der Positivkontrolle z.T. zwei OT) a 1000 Zellen ausgewertet. Insgesamt wurden 14 Versuche durchgeführt, und für jeden ausgewerteten Objektträger sind die Einzeldaten (MN/1000 Zellen) in der Tabelle aufgeführt.

Quecksilberchlorid - MN/1000 Zellen

$\mu\text{M HgCl}_2$		1	2	3	4	n	MN $\bar{\varnothing}$	Stdabw
0	K0	4 3	5 4	6 4	4 4	16	4,4	+/- 0,7
		5 4	5 5	4 5	4 5			
	5 nM VCR	14 12	12 12	14 15	17 13	16	13,4	+/- 1,3
		16 12	13 15	12 14	13 13			
	25$\mu\text{g/ml}$ MMS	14 11	13 14	15 14	17 13	16	13,8	+/-1,5
		16 13	12 14	16 13	13 13			
0,005		/	6 5 4 5	5 6 5 5	5 6 5 4	12	5,1	+/- 0,6
0,01		7 5	7 5	6 7	5 6	16	5,8	+/- 0,9
		5 7	7 5	5 5	6 5			
0,03		/	8 7 9 9	7 9 10 8	8 9 9 7	12	8,3	+/- 1,0
0,05		10 10	11 11	12 9	11 10	16	10,6	+/- 1,0
		12 10	11 9	10 12	12 11			
0,1		13 14	11 12	14 12	14 12	16	13,3	+/- 1,6
		13 11	16 12	16 15	15 13			
0,5		11 12	10 12	13 12	14 11	16	12,4	+/- 1,3
		14 14	11 13	14 13	13 11			
1,0		11 10	10 12	11 12	12 12	16	10,9	+/- 1,1
		13 11	10 10	11 10	11 9			
5		11 10	10 9	11 9	12 10	16	10,5	+/- 1,0
		10 10	9 12	12 12	11 10			
10		11 11	9 11	10 9	9 11	16	9,9	+/- 1,1
		8 9	9 9	11 10	10 12			

Tabelle A. 3: Einzeldaten der MN-Auswertungen für Quecksilberchlorid. Pro Versuch wurden für jede gewählte Konzentration vier Objektträger a 1000 Zellen ausgewertet. Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt, und für jeden ausgewerteten Objektträger sind die Einzeldaten (MN/1000 Zellen) in der Tabelle aufgeführt.

Quecksilbernitrat - MN/1000 Zellen

Hg (II), μM		1	2	n	MN $\bar{\varnothing}$	Stdabw
0	K0	7 5	5 3	8	4,5	+/- 1,8
		3 2	7 4			
	10 nM VCR	15	18	4	17,3	+/- 1,7
		17	19			
0,005		6 4	6 3	8	5,3	+/- 1,3
		6 5	7 4			
0,01		7 6	7 6	8	6,1	+/- 1,0
		6 6	4 7			
0,1		14 11	11 11	8	11,4	+/- 1,2
		10 12	11 11			
1		16 13	17 10	7	15,3	+/- 3,0
		15 n.a.	19 17			
10		9 8	14 7	8	9,0	+/- 2,6
		8 8	12 6			

Tabelle A. 4: Einzeldaten der MN-Auswertungen für Quecksilberchlorid. Pro Versuch wurden für jede gewählte Quecksilbernitrat-Konzentration vier Objektträger (bei der Positivkontrolle zwei OT) a 1000 Zellen ausgewertet. Insgesamt wurden zwei Versuche durchgeführt, und für jeden ausgewerteten Objektträger sind die Einzeldaten (MN/1000 Zellen) in der Tabelle aufgeführt.

Nitrobenzol, L15 Medium, 0,04% DMSO

μM NB		1	2	3	4	5	n	MN, \emptyset	Stdabw. +/-
0	K0	n.a.	4 6 5 6	6 5 5 5	4 6 4 6	5 5 5 5	16	5,1	0,7
	10 nM VCR	12	16 15 18 18	16 16 14 18	15 16 15 17	15	14	15,7	1,6
	25 $\mu\text{g/ml}$ MMS	/	12 10 11 13	/	12 1 13 14	/	8	12,0	1,3
0,04%	DMSO	/	5 7 5 6	6 n.a 6 7	8 7 6 7	/	11	6,3	0,9
0,001		6 5 4 4	6 5 4 5	6 5 4 5	6 8 7 8	/	16	5,5	1,3
0,005		2 4 8 6	5 6 5 6	8 3 7 7	9 9 10 8	/	16	6,4	2,2
0,01		8 5 7 6	7 6 8 9	10 7 8 6	10 9 10 11	/	16	7,9	1,8
0,1		8 9 8 10	10 10 11 9	10 11 12 11	10 12 11 12	/	16	10,2	1,3
1		/	/	/	12 13 11 13	13 10 12 12	8	12,0	1,1
10		11 8 12 n.a.	12 12 11 13	12 13 11 13	14 13 14 15	/	15	12,2	1,6
100		10 11 10 9	10 11 12 11	11 13 12 11	/	/	12	10,9	1,1

Tabelle A. 5: Einzeldaten der MN-Auswertungen für Nitrobenzol. Pro Versuch wurden für jede gewählte Konzentration maximal vier Objektträger a 1000 Zellen ausgewertet. Insgesamt wurden fünf Versuche durchgeführt, und für jeden ausgewerteten Objektträger sind die Einzeldaten (MN/1000 Zellen) in der Tabelle aufgeführt.

Benzonitril / L-15 Medium / 0,04% DMSO

μM BN		A	B	C	D	n	MN, \emptyset	Stdabw. +/-
0	K0	6 5 4 5	6 6 4 5	6 5 7 7	6 4 3 5	16	5,5	1,1
	10 nM VCR	17 18 21 22	/	15 18 17 18	16 13 11 9	12	16,5	3,8
	0,04 % DMSO	8 5 8 6	5 5 5 6	6 5 6 7	4 5 5 5	16	5,5	1,1
0,001		3 4 3 8	8 5 4 6	6 4 5 5	5 6 4 4	16	5,0	1,5
0,01		8 6 7 9	6 7 8 7	8 7 9 7	9 10 9 8	16	8,0	1,1
0,1		11 9 11 10	9 12 10 12	11 12 10 9	11 11 12 12	16	11,0	1,1
1		17 8 10 8	13 12 10 13	13 11 15 12	13 12 14 12	16	12,0	2,3
10		15 13 15 12	11 13 12 13	11 14 12 12	13 12 11 14	16	12,5	1,3
100		11 10 12 8	11 9 12 12	11 10 12 10	/	12	10,5	1,3

Tabelle A. 6: Einzeldaten der MN-Auswertungen für Benzonitril. Pro Versuch wurden für jede gewählte Konzentration maximal vier Objektträger a 1000 Zellen ausgewertet. Insgesamt wurden vier Versuche durchgeführt, und für jeden ausgewerteten Objektträger sind die Einzeldaten (MN/1000 Zellen) in der Tabelle aufgeführt.

Alkohole / DMEM

log C		1	2	3		n	MN,Ø	Stdabw
	K0	5 7 6 9	7 6 8 7	/		8	6,8	1,2
	10 nM VCR	16 17	16 14	14 15		6	15,3	1,2
	Hexanol in	0,04%	Ethanol					
-3,9	Hexanol	/	14 9 15 11	7 10 11 14		8	11,4	2,7
-3,6	Hexanol	13 15 11 16	18 15 18 20	/		8	15,9	3,0
-3,3	Hexanol	16 17 15 13	17 15 18 16	/		8	16,4	1,8
-3,0	Hexanol	18 20 15 17	/	/		4	17,5	2,0
-2,6	Butanol	/	5 6 6 6	3 7 7 3		8	5,4	1,6
-2,3	Butanol	14 17 14 13	14 18 17 18	/		8	15,6	2,1
-2	„	18 22 19 20	16 18 17 14			8	18,0	2,5
-1,3	„	20 21 17 10	/			4	19,3	1,7
	0,04% Ethanol		6 6 6 8	5 8 7 5		8	6,4	1,2

Tabelle A. 7: Einzeldaten der MN-Auswertungen für Butanol und Hexanol. Pro Versuch wurden für jede gewählte Alkohol-Konzentration vier Objektträger (bei der Positivkontrolle zwei OT) a 1000 Zellen ausgewertet. Insgesamt wurden drei Versuche durchgeführt, und für jeden ausgewerteten Objektträger sind die Einzeldaten (MN/1000 Zellen) in der Tabelle aufgeführt.

	log C	Schultz und Önfelt, BIN, 24 h *	MN-Raten der vorliegenden Arbeit	log P
Kontrolle (0,04% Ethanol)		1,00± 0,04	1,00± 0,19	
Hexanol	-4,0	1,13± 0,16	/	2,03
	-3,9	/	1,78± 0,42	
	-3,6	1,36± 0,16	2,48± 0,47	
	-3,3	2,07± 0,28	2,56± 0,28	
	-3,0	/	2,73± 0,32	
Kontrolle Butanol		1,00± 0,25	1,00± 0,18	
	-3	1,54± 0,33	/	0,88
	-2,6	/	0,79± 0,23	
	-2,3	1,76± 0,22	2,29± 0,30	
	-2,0	1,95± 0,21	2,64± 0,37	
	-1,3	4,26± 0,11	2,83± 0,25	

* BIN: binukleäre Zellen

Verdopplung der BIN-Spontanrate, Schultz und Önfelt 2000

Verdopplung der MN-Spontanrate

Tabelle A.8: Vergleich: Verdopplung der Spontanrate binukleärer Zellen (BIN) bzw. der Mikronuklei (MN) in V79-Zellen für die beiden Alkohole Hexanol und Butanol.

<i>Endpunkte</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration/Dosis</i>	<i>Effekt</i>	<i>Literatur</i>
B. subtilis Rec-Assay	Bleiacetat	0,05 M	negativ	Nishioka et al. 1975
S. typhimurium his-Rev.	Bleiacetat		negativ	Nestmann et al 1979
E.coli WP2 Fluktuationstest	Bleiacetat		negativ	Nestmann et al 1979
S. typhimurium his-Reversion	Bleiacetat		negativ	Rosenkranz and Poirier 1979
B. subtilis Rec-Assay	Bleichlorid		negativ	Kada et al 1980
B. subtilis Rec-Assay	Bleiacetat		negativ	Kada et al 1980
B. subtilis Rec-Assay	Blei(II)oxid		negativ negativ negativ	Kada et al 1980
S. typhimurium his-Reversion	Bleiacetat	0,05-0,5 M	negativ	Kanematsu et al. 1980
B. subtilis Rec-Assay	Bleiacetat	0,05-0,5 M	negativ	Kanematsu et al. 1980
S. typhimurium his-Rev.	Bleiacetat		negativ	Dunkel et al. 1984
E.coli WP2 Fluktuationstest	Bleiacetat		negativ	Dunkel et al. 1984
E.coli WP(λ) prophage Induktion	Bleinitrat	0,32 mM	positiv	Rossmann et al. 1984

Tabelle A.9: Genetische Toxizität von Bleiverbindungen in bakteriellen Tests (Originaltabelle Beyersmann 2002)

<i>Endpunkte</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration/Dosis</i>	<i>Effekt</i>	<i>Literatur</i>
CA in CHO-Zellen	Bleiacetat	0,1-10 mM	Keine strukturellen Aberrationen, aber gaps bei der höchsten Konz.	Bauchinger und Schmid 1972
Zelltransformation SHE-Zellen, malignant	Bleiacetat	1-2,5 g/l	positiv	DiPaolo et al. 1978
Tk-Mutation in Maus-Lymphomzellen	Bleiacetat	300-1000 ug/ml (toxisch: 85-72% survival)	negativ	Amacher and Paillet 1980
Hprt-Mutation, CHO-Zellen	Bleiacetat	zytotoxisch	Schwach positiv	Hsie et al. 1980
Zelltransformation SHE-Zellen, morphologisch	Bleiacetat	10-50 µM, 10 d	Anstieg dosisabhängig bis 2%	Zelikoff et al. 1988
Hprt-Mutation, V79-Zellen	Pbs, 24 h, phagozytiert	376 µM 563 µM 938 µM	positiv (5,5 x) positiv (4,6 x) negativ (0,9 x)	Zelikoff et al. 1988
SCE in V79-Zellen	Pbs, 24 h, phagozytiert	376 µM 563 µM 938 µM	Negativ negativ negativ	Zelikoff et al. 1988
Hprt-Mutation, V79-Zellen	Bleininitrat, 5 d	500 µM 1000 µM	Positiv (6 x) grenzwertig (2 x)	Zelikoff et al. 1988
SCE in V79-Zellen	Bleininitrat, 5 d	500 µM 1000 µM	negativ	Zelikoff et al. 1988
DNA-Einzelstrangbrüche in V79-Zellen	Bleininitrat, 5 d	500 µM und 1000 µM	negativ	Zelikoff et al. 1988

Tabelle A.10: Säugerzell-Tests in vitro (Originaltabelle *Beversmann 2002*)

SCE-Test mit CHO-Zellen	Bleiacetat	„nicht toxische Konzentration“	negativ	Hartwig et al. 1990
Mutation im in V79-Zellen transfizierten E. coli-gpt-Gen	Bleinitrat	400 µM	positiv	Roy and Rossman 1992
tk-Mutation in Maus-Lymphomzellen	Bleinitrat	500 µg/ml (toxische)	Schwach positiv (2x)	Oberly et al. 1992
SCE-Test, CHO-Zellen	Bleinitrat	1-30 mM	positiv, dosisabhängig	Lin et al. 1994
MN in CHO-Zellen	Bleinitrat	1-30 mM	negativ	Lin et al. 1994
CA in CHO-Zellen	Bleinitrat	1-30 mM	negativ	Lin et al. 1994

Tabelle A.10: Säugerzell-Tests in vitro (Originaltabelle *Beyersmann 2002*)

<i>Endpunkte</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration</i>	<i>Effekt</i>	<i>Literatur</i>
SCE bei Human-Lymphozyten nach in vitro Exposition	Bleiacetat	0,1 M	vermehrt	Andersen 1983
SCE bei Human-Lymphozyten nach in vitro Exposition	Bleiacetat	0,01 mM	negativ	Beek und Obe 1975
CA bei Human-Leukozyten nach in vitro Exposition	Bleiacetat	0,01 mM	Signifikanter Anstieg in achromatischen Läsionen und Chromatidbrüchen	Beek and Obe 1974
CA bei Human-Lymphozyten nach in vitro Exposition	Bleiacetat	0,001 – 10 mM	negativ	Schmid et al 1972
CA bei Human-Lymphozyten nach in vitro Exposition	Bleiacetat	0,5; 3,0; 10,0 mM	Keine strukturellen Aberrationen, aber Chromosomen-Fragmentierung	Deknudt and Deminatti 1978,

Tabelle A.11: Tests mit Humanzellen in vitro (Originaltabelle *Beyersmann 2002*)

<i>Endpunkte</i>	<i>Substanz</i>	<i>Konzentration/Dosis</i>	<i>Effekt</i>	<i>Literatur</i>
CA in Lymphozyten der Maus	Bleiacetat	10 g Bleiacetat/kg Nahrung über 2 Wochen.	Zunahme an Gaps, Brüchen und Fragmenten	Muro and Goyer 1969
Chromosomenschäden in Knochenmarkszellen der Maus	Bleiacetat oral mit dem Wasser	0,1-1000 mg Pb/l über 9 Monate = 3,3 mg-31 kg/kg KG	Keine Zunahme	Leonard et al. 1973
Chromosomenschäden in Knochenmarkszellen der Maus	Bleiacetat oral mit der Nahrung	2,5-10 mg Bleiacetat/kg Nahrung über 1-3 Monate	Keine strukturellen CA	Jacquet et al. 1977
Mikronuclei in Knochenmarkszellen der Maus	Blei i.p.	Zwei i.p. Injektionen mit 25 mg Pb/kg KG	Keine Zunahme an MN	Jacquet et al. 1977
CA in Lymphozyten exponierter Makaken	Bleiacetat oral mit der Nahrung	1; 5; 6; 15 mg Bleiacetat/d mit der Nahrung über 16 Monate, Zellen nach 3; 10; 16 Monaten kultiviert. Pb(B)=100-1340 µg/l,	Keine behandlungsbedingten strukturellen CA außer Gaps. Unter Calciummangel-Bedingungen auch Dizenitrische, Ringe und Fragmente	Deknudd et al. 1977
Chromosomenschäden in Knochenmarkszellen der Maus	Bleiacetat oral mit der Nahrung	0,5% in der Nahrung = LD50/30d uner Calciummangel (0,003%)	Vermehrt CA	Deknudd und Gerber 1979
Chromosomenschäden in Knochenmarkszellen der Maus	Bleiacetat oral mit der Nahrung	0,5% in der Nahrung bei normaler Calcium-Diät (1,1%)	Keine vermehrten CA	Deknudd und Gerber 1979
Mikronuclei und SCE in Knochenmarkszellen des Kaninchens, männlich	Bleiacetat subcutan	0; 0,25; 0,5 mg Bleiacetat/kg KG 3x pro Woche, 14 Wochen Pb(B)=0,32; 2,57; 2,97µM	Keine Spermata-Anomalien nicht vermehrt MN in Knochenmarkszellen, nicht vermehrt SCE in Lymphozyten	Willems et al. 1982

Tabelle A.12: Tierversuche (Originaltabelle Beyersmann 2002)

SCE in Knochenmarkszellen der Maus, trächtig	Bleiacetat i.p. am Tag 13	50-200 mg Pb/kg KG	Leichte aber signifikante Zunahme der SCE in maternalen und fetalen Zellen bei der höchsten Dosis	Sharma et al. 1985
Mikronuclei in Knochenmarkszellen der Maus	Bleiacetat i.p.	0,6-80 mgPb/kg KG i.p. Analyse 12-36 h nach Behandlung	Signifikanter Anstieg an MN, aber fluktuierend ohne Dosis-Bezug	Jagetia and Aruma 1998
Ratten	Bleiacetat	Toxische Dosis	Zunahme an CA Zunahme an MN	Tachi et al. 1985
CA in Knochenmarkszellen der Maus, trächtig	Bleinitrat i.v. am Tag 9	100-200 mgPb/kg KG intravenös	In maternalen Zellen vermehrt SCE	Nayak et al. 1989
SCE in Knochenmarkszellen der Maus, trächtig	Bleinitrat i.v. am Tag 9	100-200 mgPb/kg KG intravenös	In maternalen Zellen leichte aber signifikante Erhöhung der CA (meist Deletionen) und Aneuploidie.	Nayak et al. 1989
DNA-Schäden im Blut der Maus (Comet-Assay)	Bleinitrat oral	0,7-89,6 mg Pb/kg KG	24-72 h nach der Verabreichung signifikante Zunahme des tail length im Comet-Assay, aber fluktuierend ohne Zeit- und Dosisbezug	Devi et al. 2000
DNA-Schäden (Comet-Assay) in mehreren Organen der Maus	Bleiacetat inhalativ	Daten fehlen, Literatur ist bestellt	Tail Moment erhöht	Valverde et al. 2002
Chromosomenaberrationen im Knochenmark und Spermatozyten der Maus	Bleiacetat	200 und 400 mg/kg Futter, 1x täglich, 5d/Woche	Signifikant vermehrte Chromosomenaberrationen (mit und ohne gaps)	Aboul-Ela 2002

Tabelle A.12: Tierversuche (Originaltabelle Beyersmann 2002)

<i>Art der Exposition</i>	<i>Zahl der Exponierten</i>	<i>Blut- oder Urinwerte</i>	<i>Beobachtete zytogenetische Veränderungen</i>	<i>Literatur</i>
Bleioxid-Hersteller	8	Pb(B)=620-890 µg/l	Chromatid- und Chromosomenbrüche, korreliert mit Erhöhung der ALA(U)	Schwanitz et al. 1970
Chemie-Arbeiter	10	Pb(B)=600-1000 µg/l	Chromatiden-Gaps und -Brüche, nicht korreliert mit Pb(B)	Gath und Thiess 1972
Bleixponierte Arbeiter	32, davon 3 mit akuter Bleivergiftung	Pb(B) bis 590 µg/l	Keine vermehrten strukturellen Aberr., aber vermehrt Gaps	Schmid et al. 1972
Wertarbeiter, beschäftigt mit Abbreimen von bleihaltigem Anstrich	35	Pb(B)=400-1200 µg/l	Nicht signifikant vermehrte Chromosomen-Aberrationen	O'Riordan and Evans 1974
Bleibatteriefabrik-Arbeiter	11	Pb(B)=340-640 µg/l	Gaps, Brüche, Fragmente. Keine Korrelation mit Pb(B) oder ALA(U)	Forni et al. 1976
Bleioxid-Hersteller	44	Pb(B)=300-750 µg/l	Chromatid- und Chromosomenaberrationen, korreliert mit Expositionsdauer	Garza-Chapa et al. 1977
Bleibatterierhersteller	23	Pb(B)=440-950 µg/l	Dizentrische Chrom., Ringe, Fragmente	Deknudt et al. 1977
Kinder mit Wohnung neben Bleihütte	38	Pb(B)=290-330 µg/l	Nicht vermehrt CA	Bauchinger et al. 1977
Hüttenarbeiter	26 (4 niedrig, 18 mittel, 6 hoch Exponierte)	Pb(B)=225-650 µg/l	Chromatid- und Chromosomen aberrationen einschl. Gaps, korreliert mit Pb(B)	Nordenson et al. 1978

Tabelle A.13: Zytogenetische Befunde bei exponierten Menschen (Originaltabelle Beyersmann 2002)

Frauen in der Batterieherstellung	12	Pb(B)=240-490 µg/l, Pb(U) erhöht	Verdopplung der Metaphasen mit Chromatid- und Chromosomen-Aberr.	Forni et al. 1980
Bleiexponierte Arbeiter, langfristig	10	Erhöht Zn-Protoporphyrin	Vermehrt SCE, korreliert mit Zn-PP	Grandjean et al. 1983
Dieselben nach dem Sommerurlaub		Erhöht Zn-Protoporphyrin	Ohne Befund	Grandjean et al. 1983
Bleiexponierte Arbeiter, 4 Monate	18	Erhöht Zn-Protoporphyrin	Ohne Befund	Grandjean et al. 1983
Kinder mit Wohnung neben Bleihütte	19	Pb(B) >300 µg/l	Nicht vermehrte SCE	Dalpra et al. 1983

Tabelle A.13: Zytogenetische Befunde bei exponierten Menschen (Originaltabelle Beyersmann 2002)

<i>Endpunkte</i>	<i>Belastung</i>	<i>Konzentration/Dosis</i>	<i>Effekt</i>	<i>Literatur</i>
hprt-Mutation in V79-Zellen	Bleiacetat	0,5-3 µM nicht toxisch	Verstärkung der UV-induzierten Mutagenität	Hartwig et al. 1990
Mutation im transfizierten E. coli-gpt-Gen in V79-Zellen	Bleinitrat	400 µM	Verstärkung der durch UV und MNGG induzierten Mutagenität	Roy und Rossman 1992
Hemmung der DNA-Reparatur in Säugerzellen	Bleiacetat	Nicht zytotoxische Konzentrationen	Hemmung der Nukleotid-Exzisions-Reparatur	Hartwig 1994
In vivo: DNA-Schäden (Comet-Assay) in Blut bleiexponierter Arbeiter (n=43)	Berufliche Bleibelastung im Mittel 7 Jahre. Pb(B) im Mittel 985 µg/l. In vitro Behandlung mit 300 cGray Röntgenbestrahlung	4 Expositions-kategorien: niedrig (<400 µg Pb/l), mittel (41-80 µg Pb/l), hoch (>1200 µg Pb/l)	bei Hochexponierten signifikant erhöhtes Ausmaß an DNA-Schäden und signifikant vermehrte Röntgen-induzierte DNA-Schäden	Groot de Restrepo et al. 2000

Tabelle A.14: Verstärkung der Genotoxizität anderer Agenzien (Originaltabelle Beyersmann 2002)

Autor	Zellen	Beh Zeit	Konzentration	Verbindung	DNA-Strangbrüche	Spindel-Effekte	MN ↑	Sonstiges
Mikromikrosens-Daten								
<i>Vaglenov et al. 2000</i>	humane Lymphoz (Arbeiter)		bis 2,88 µM	Pb(II)			+ ab 1,2 µM	
<i>Palus et al. 2003</i>	Arbeiter	12,4±5,6 Jahre	504±92 µg/l Ko: 56±28	Pb(II)	+	+	+	MN: Centromer-pos. und neg. defektiert
<i>Ariza und Williams 1999</i>	A552 Ovariale Zellen	1 h	0,1-1 µM	PbCl ₂	<0,5 µM: Punktnut. >0,5 µM: Deletion		1mg/dm ³ : +	
DNA Schäden								
<i>Hartwig et al. 1990</i>	V79 HeLa	20/26 h	0,5/1,0/3,0/5,0 µM	PbAcetat	-			Pb inhibiert Reparaturenzyme
<i>Valverde et al. 2001</i>	CD1-Mäuse: Lunge Leber Niere	1 h Inhalation	0,01-1 µM	PbAcetat	-			keine direkte Interaktion mit der DNA
<i>Zeitkoff et al. 1988</i>	V79		500 und 1000 µM	PbNitrat	-			
<i>Hengstler et al. 2003</i>	78 Arbeiter		44,1 µg Pb/l Blut		-			
<i>Fracasso et al. 2002</i>	Arbeiter	φ 3 Jahre exponiert	39,63±7,56 µg/100ml		+			
<i>Palus et al. 2003</i>	Arbeiter	12,4±5,6 Jahre	504±92 µg/l Ko: 56±28	Pb(II)	+	+	+	MN: Centromer-pos. und neg. defektiert
<i>Wozniak et al. 2003</i>	humane Lymphozyten	1 h	1/10/100 µM	PbAcetat	1/10 µM:comets↑ 100 µM:comets↓			Gentox nicht allein durch direkte Interaktion mit DNA
<i>Ariza+Williams 1999</i>	A552 Ovariale Zellen	1 h	0,1-1 µM	PbCl ₂	<0,5 µM: Punktnut. >0,5 µM: Deletion		1mg/dm ³ : +	
<i>Robbiano et al. 1999</i>	Nierenzellen: human/Ratte		mM: 0,56-1,8	PbAcetat	+			
Arbeiter und DNA-Schäden								
<i>Palus et al. 2003</i>	Arbeiter	12,4±5,6 Jahre	504±92 µg/l Ko: 56±28	Pb(II)	+	+	+	MN: Centromer-pos. und neg. defektiert
<i>Fracasso et al. 2002</i>	Arbeiter	φ 3 Jahre exponiert	39,63±7,56 µg/100ml		+			
<i>Hengstler et al. 2003</i>	78 Arbeiter		44,1 µg Pb/l Blut		-			

Tabelle A.15: Literatur-Zusammenstellung für anorganische Blei-Verbindungen (MN-Untersuchungen, Spindel-effekte, DNA-Schäden)

Autor	Zellen	Beh. Zeit	Konzentration	Verbindung	DNA-Strangbrüche	Spindel-Effekte	MN ↑	Sonstiges
Pflanzenzellen								
<i>Wierzbicka 1989</i>	allium cepa	1/3/6/12/24 h	1,0/2,5/3,0 mg/dm ³	PbCl ₂ Pb(NO ₃) ₂		nach 3 h: C-Mitosen+Spindelschäden		
<i>Malgarzata 1988</i>	allium cepa	1-24 h	1,0/2,5/3,0 mg/dm ³	PbCl ₂ Pb(NO ₃) ₂	1 mg/dm ³ : klastogene Effekte	Colchizin-ähnll. Effekte, Spindelschäd.		PbCl ₂ mit gr. Tox. als Pb(NO ₃) ₂ (1 mg/dm ³)

Tabelle A.15: Literatur-Zusammenstellung für anorganische Blei-Verbindungen (MN-Untersuchungen, Spindel-effekte, DNA-Schäden)

Autor	Zellen	Beh. Zeit	Konzentration	Verbindung	DNA-Strangbrüche	Spindel-Effekte	MN ↑	Sonstiges
Mikromiklens- Daten								
<i>Ogura et al. 1996</i>	Blut-Lymphozyten	24 h	10 / 20 µM	HgCl ₂	strukturelle CA	inhibiert mitot. Spindel	+	2 Mechanismen der Gento. vermutet
<i>Sanchez Galan nur Abstract</i>	Forellen	24 h	?	Quecksilbernitr.			+	
<i>Franchi et al. 1994</i>	51 Fischer kont.Fisch	Studie über 2 Jahre	88,97±54,09 ng/g Frischgewicht, Blut				+	Korrelation MN + Hg-Konzentration im Blut
<i>Anwar-Gabal 1991</i>	29 Arbeiter		123,2±54,1 µg/l im Urin. KO 39,2±11,2	Quecksilberfulminat			+	keine Korrelation MN mit Exp.zeit/Hg-Konz. im Urin
<i>Queiroz et al. 1999</i>	15Arbeiter, φ 36 J Blutlymphozyten	φ12 Jahre	19,3±13 µg/g Kreatinin. KO <5				+	keine Korrel. MN mit Alter/ Exp.zeit/Hg-Konz. im Urin
<i>Barregard et al. 1991</i>	26Arbeiter Chlor-Alkali	φ10 Jahre	78 nmol/l Blut, KO:33/ 252 nmol/l Urin. KO: 19				-	25-50 µg/m ³ Luft
<i>Hansteen et al. 1993</i>	77Arbeiter Chlor-Alkali	φ11,8 Jahre	611 nmol/l Urin pro Jahr, kumulativ: 5827 nmol/l Urin				-	
Wirkung auf die Mitosespindel								
<i>Lee et al. 1997</i>	Humane Lymphozyten	68 h	30 µM	Hg(II)		↑ C-Anaphasen Endoreduplikat.		evtl. durch Spindelapparatstörungen
<i>Rao et al. 2001</i>	humane Blutzellen	68 h	1/5,2/10,5 µM	HgCl ₂		↑ C-Anaphasen		
<i>Verschaeve et al. 1984/85</i>	Humane Lymphozyten	28 h	100 µM	HgCl ₂		Chromosomen-Fehlverteilungen C-Mitosen		
<i>Andersen et al. 1983</i>	Humane Lymphozyten	4h 48h	10 / 1 µM	HgCl ₂		10µM:Störungen des Spindelapp.		1 µM, 48 h ohne Effekt, evtl Entgiftung d. Metallothionein
DNA Schäden								
<i>Ariza + Williams 1999</i>	ASS2	1 h	0,1-1 µM	HgAcetat	< 0,5µM:Punktmut. >0,5µM:Deletionen			
<i>Cantoni et al. 1983</i>	CHO	1 h	25-100 µM (akut toxisch)	HgCl ₂	+			
<i>Cantoni et al. 1984a</i>	CHO	1 h	10-100 µM	HgCl ₂	10 µM: - ab 25 µM: +			↑ Strangbrüche⇒↑ der Bindung an DNA

Tabelle A.16: Literatur-Zusammenstellung für anorganische Quecksilber-Verbindungen (MN-Untersuchungen, Spindel-effekte, DNA-Schäden)

Autor	Zellen	Beh. Zeit	Konzentration	Verbindung	DNA-Strangbrüche	Spindel-Effekte	MIN ↑	Sonstiges
DNA-Schäden								
<i>Christie et al. 1984</i>	CHO	15 min 1 h	0,1-10 µM	HgCl ₂				Bindg. an DNA in Konz., die diese nicht schädigt. 2,5 µM, 15 min: DNA-Reparatur reduziert
<i>Bucio et al. 1999</i>	humane Leberzelllinie WRL-68	3 h	0,5 / 5 µM	HgCl ₂	+			
<i>Eheleben 1 Diplomarbeit</i>	HeLa-Zellen	4 h	1 µM 100 µM	HgCl ₂	> 1 µM: + 100 µM: vollst. geschäd. DNA			- keine oxid. Schäden - ab 20 µM ist Reparatur. der Zelle überfordert
<i>Beh-Ozger 2000</i>	U-937 (human)	24, 48, 72 h	1-50 µM	HgCl ₂	+, aber in höheren Konz.: ↓ Comets			
<i>Tsuzuki et al 1994</i>	CHO		2 µM	HgCl ₂	+			
<i>Ariza et al. 1994</i>	CHO/ hum. KB-Zelllinie		0,1-0,4 µM nicht zytotox. Konz.	HgAcetat				Bindg. Hg an DNA

Tabelle A.16: Literatur-Zusammenstellung für anorganische Quecksilber-Verbindungen (MN-Untersuchungen, Spindel-effekte, DNA-Schäden)

