

# Untersuchungen zum genotoxischen Potenzial von Substanzen mit estrogenen Wirkung

Zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
von der Fakultät für Chemie  
der Universität Karlsruhe (TH)  
angenommene

## DISSERTATION

von  
Diplom-Lebensmittelchemikerin

**Leane Lehmann**

aus Freiburg

<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. Dr. M. Metzler
<b>1. Gutachter:</b>	Prof. Dr. Dr. M. Metzler
<b>2. Gutachter:</b>	Prof. Dr. A. Hartwig

**Tag der mündlichen Prüfung:** 01.02.2002

---

## Danksagung

Ich danke ...

- Herrn Prof. Dr. M. Metzler für die Überlassung des interessanten Themas und seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung meiner Arbeit.
- Erika Pfeiffer für die wertvollen Diskussionen (besonders wenn wir nicht einer Meinung sind) sowie für die Unterstützung durch Rat und Tat (DANKE!).
- Marcel Thom für die ersten Versuche zur DNA-Sondern-Herstellung mittels PCR während seines Forschungspraktikums.
- David Schumacher für Optimierung der DNA-Sonden während seiner Diplomarbeit, die kritischen Diskussionsbeiträge und die Unterstützung beim Verfassen dieser Arbeit.
- Oliver Bauer für die Charakterisierung der AG01522C-Zellen während seiner Diplomarbeit und für seine Ideen, die nicht nur die Zellkulturarbeit bereichert haben.
- Sybille Mayer für die Unterstützung bei der Zellkulturarbeit und am Mikroskop.
- Stefan Kranz für die Unterstützung bei der Elektrophorese.
- Ingo Ehleben für das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- Dieter für das Lebensmittelchemiestudium, das er ungeplant mit mir absolviert hat.
- Harald für alles.
- Omi.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1 Estrogene . . . . .	9
1.1.1 Natürliche und synthetische Estrogene . . . . .	9
1.1.2 Endokrine Disruptoren . . . . .	10
1.1.3 Phytoestrogene: Isoflavone . . . . .	10
1.1.4 Xenoestrogene: Bisphenole . . . . .	16
1.1.5 Hormonelle Kanzerogenese . . . . .	18
1.2 Aneuploidie . . . . .	19
1.2.1 Bedeutung . . . . .	19
1.2.2 Schwellenwerte bei chemisch-induzierter Aneuploidie . . . . .	21
1.2.3 Testsysteme zur Erfassung von Aneuploidie . . . . .	21
1.2.4 Angriffspunkte chemischer Substanzen bei der Aneuploidie-Induktion . . . . .	23
1.3 Verwendete Testsysteme zur Erfassung chemisch-induzierter Genotoxizität . . . . .	26
1.3.1 Mikrokerntest . . . . .	26
1.3.2 Erfassung von Chromosomenfehlverteilung (Nondisjunction) mittels FISH . . . . .	31
<b>2 Problemstellung</b>	<b>33</b>
<b>3 Ergebnisse und Diskussion der biologischen Aktivität verschiedener Isoflavonoide</b>	<b>35</b>
3.1 Effekte in V79-Zellen . . . . .	35
3.1.1 Zytotoxizität . . . . .	35
3.1.2 Mitosearrest . . . . .	35
3.1.3 Reversibilität des Mitosearrests . . . . .	38
3.1.4 Mikrokerninduktion . . . . .	39
3.2 Effekte in AG01522C-Fibroblasten . . . . .	41
3.2.1 Zytotoxizität . . . . .	41
3.2.2 Mitosearrest . . . . .	43
3.2.3 Mikrokerninduktion . . . . .	43
3.3 Mitosearrest in HCV-Zellen . . . . .	44
3.4 Mitosearrest in OSV-Zellen . . . . .	44
<b>4 Zusammenfassung Isoflavonoide</b>	<b>46</b>
4.1 Effekte in V79-Zellen . . . . .	46
4.2 Effekte in menschlichen Zelllinien . . . . .	48
4.2.1 Genistein . . . . .	48
4.2.2 Wieso kein aneugener Effekt in den menschlichen Zelllinien? . . . . .	48
<b>5 Ergebnisse und Diskussion der biologischen Aktivität verschiedener Bisphenole</b>	<b>51</b>
5.1 Mitosearrest in V79-Zellen . . . . .	51
5.2 Untersuchungen in AG01522C-Zellen . . . . .	53
5.2.1 Bestimmung geeigneter Substanzkonzentrationen . . . . .	53

5.2.2	Optimierung der Versuchsbedingungen für den CB-Mikrokerntest . . . . .	56
5.2.3	Mitoseindex, Metaphasebilder und zweikernige Zellen . . . . .	63
5.2.4	Klassischer Mikrokerntest und CB-Mikrokerntest . . . . .	74
5.2.5	CB-Mikrokerntest mit FISH . . . . .	85
5.2.6	Effekte auf den CMTC . . . . .	94
5.2.7	Zusammenfassung der Ergebnisse in AG01522C-Zellen . . . . .	98
<b>6</b>	<b>Diskussion ausgewählter Fragestellungen</b>	<b>101</b>
6.1	Der CB-Mikrokerntest . . . . .	101
6.1.1	Einfluss von Cytochalasin B auf die Mikrokerninduktion . . . . .	101
6.1.2	Substanzinduzierte Polyploidie . . . . .	104
6.1.3	Unterschiede im CB-Mikrokerntest mit und ohne FISH . . . . .	107
6.1.4	Vorteile und Grenzen des CB-Mikrokerntests mit Tandem-FISH . . . . .	108
6.2	Aneuploidie in AG01522C-Zellen . . . . .	110
6.2.1	Spontane Aneuploidie in AG01522C-Zellen . . . . .	110
6.2.2	Anteil von Chromosom 9 an den Mikrokernen . . . . .	110
6.2.3	Konzentrationsabhängigkeit von Chromosomenverlust und Chromosomenfehlverteilung . . . . .	111
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>113</b>
<b>8</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>117</b>
8.1	Geräte . . . . .	117
8.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	118
8.3	Herstellung der Sonde für die klassische Satellitenregion . . . . .	119
8.3.1	Lösungen . . . . .	119
8.3.2	Durchführung . . . . .	120
8.4	Herstellung der Sonde für die $\alpha$ -Satellitenregion . . . . .	121
8.4.1	Lösungen . . . . .	121
8.4.2	Durchführung . . . . .	121
8.5	Markierung der Sonde für die $\alpha$ -Satellitenregion durch Nicktranslation . . . . .	122
8.5.1	Lösungen . . . . .	122
8.5.2	Durchführung . . . . .	122
8.6	Elektrophorese der Reaktionsprodukte . . . . .	123
8.6.1	Lösungen . . . . .	123
8.6.2	Durchführung . . . . .	123
8.7	DNA-Isolierung . . . . .	124
8.7.1	Lösungen . . . . .	124
8.7.2	Durchführung . . . . .	124
8.8	Zellkultur . . . . .	125
8.8.1	Zellen . . . . .	125
8.8.2	Lösungen . . . . .	125
8.8.3	Durchführung . . . . .	126
8.9	Substanzbehandlung der Zellen . . . . .	126
8.9.1	Testsubstanzen . . . . .	126

## Inhaltsverzeichnis

---

8.9.2	Durchführung . . . . .	127
8.10	Zytotoxizitätstest durch Zellzahlbestimmung . . . . .	128
8.10.1	Lösungen . . . . .	128
8.10.2	Durchführung . . . . .	128
8.11	Immunologische Färbung . . . . .	128
8.11.1	Lösungen . . . . .	128
8.11.2	Durchführung . . . . .	129
8.11.3	Auswertung . . . . .	130
8.11.4	Dokumentation . . . . .	131
8.12	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung . . . . .	132
8.12.1	Lösungen . . . . .	132
8.12.2	Durchführung . . . . .	134
8.12.3	Auswertung . . . . .	135
8.12.4	Dokumentation . . . . .	135
<b>9</b>	<b>Literatur</b>	<b>136</b>
	<b>Anhang</b>	<b>147</b>
<b>A</b>	<b>V79-Zellen</b>	<b>147</b>
A.1	Isoflavone . . . . .	147
A.1.1	Mitosearrest . . . . .	147
A.1.2	Reversibilität des substanzinduzierten Mitosearrests . . . . .	148
A.1.3	Mikrokerninduktion . . . . .	152
A.2	Mitosearrest durch Bisphenole . . . . .	157
<b>B</b>	<b>AG01522-Zellen</b>	<b>158</b>
B.1	Mitosearresttest . . . . .	158
B.1.1	Mitosenindizes (MI) nach Behandlung mit E2, DES und verschiedenen Bisphenolen . . . . .	158
B.1.2	Metaphasebilder nach Behandlung mit E2, DES und verschiedenen Bisphenolen . . . . .	160
B.1.3	Reversibilität des DES-induzierten Mitosearrests . . . . .	162
B.2	Relative Lebendzellzahl . . . . .	163
B.3	Klassischer Mikrokerntest . . . . .	164
B.3.1	Potenzielle Aneuploidogene . . . . .	164
B.3.2	Potenzielle Klastogene . . . . .	165
B.4	CB-Mikrokerntest . . . . .	166
B.4.1	Potenzielle Aneuploidogene . . . . .	166
B.4.2	Potenzielle Klastogene . . . . .	167
<b>C</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>169</b>
<b>D</b>	<b>Veröffentlichungen aus dieser Arbeit</b>	<b>170</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -sat	Alpha-Satellitenregion
Abb.	Abbildung
AG01522C	Humane Vorhautfibroblasten
AP	Alkalische Phosphatase
BCA	Biochanin A
BN	<b>bin</b> ukleäre (zweikernige) Zelle
BPA	Bisphenol A
BSA	Bovine Serum Albumin
CB	<b>Cytokinesis</b> blocked (Zytokinese-gehemmt)
CHO	Chinesische Hamster-Ovarienzellen
CMTc	<b>CytoplasmicMicroTubuleComplex</b> (Zytoplasmatischer Mikrotubuli-Komplex)
CREST	Akronym aus <b>C</b> alcinosis cutis, <b>R</b> aynaud-Phänomen, <b>M</b> otilitätsstörungen des <b>E</b> sophagus, <b>S</b> klerodaktylie und <b>T</b> eleangiektasien
c-sat	Klassische Satellitenregion
CYB	Cytochalasin B
CYP	Cytochrom P450
DAI	Daidzein
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
DES	Diethylstilbestrol
DMBP	Dimethylbisphenol A
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E2	17 $\beta$ -Estradiol
EAC	Estrogen Active Compound
ECETOC	European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals

## Abkürzungsverzeichnis

---

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogenrezeptor
EtOH	Ethanol
EPA	Environmental Protection Agency (US-amerikanische Behörde)
EQU	Equol
F10	Modifiziertes Minimal Essential Medium nach Hank
FISH	Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötale Kälberserum
FORM	Formononetin
GC/MS	Gekoppelte Gaschromatographie/Massenspektrometrie
GEN	Genistein
h	Stunde
HCV	Humane Chorion Villi Zellen
HeLa	Humane Cervix-Karzinomzellen
HepG1	Humane Hepatomazellen
HULY	Humane periphere Lymphozyten
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
KG	Körpergewicht
KUL	Kullenin
LZZ	Lebendzellzahl
MAPs	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MI	Mitoseindex
MN	Mikronukleus (Mikrokern)
MRC5	Humane fötale Lungenfibroblasten
MT	Mikrotubuli

## *Abkürzungsverzeichnis*

---

MTOC	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
ND	Nondisjunction (Fehlverteilung)
NQO	4-Nitochinolin-N-oxid
OD	Optische Dichte
OSV	Ovine seminal vesicle (Schafsamenblasen)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaktion
PBS-CMF	PBS ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rotations per minute
SHBG	Sex-Hormon-bindendes Globulin
SHE	Syrische Hamsterembryo Fibroblasten
S-Phase	(DNA-) Synthese-Phase
SSC	Standard-Salz-Citratlösung
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TMBP	Tetramethylbisphenol A
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	Ultraviolett
V79	Lungenfibroblasten des Chinesischen Hamsters



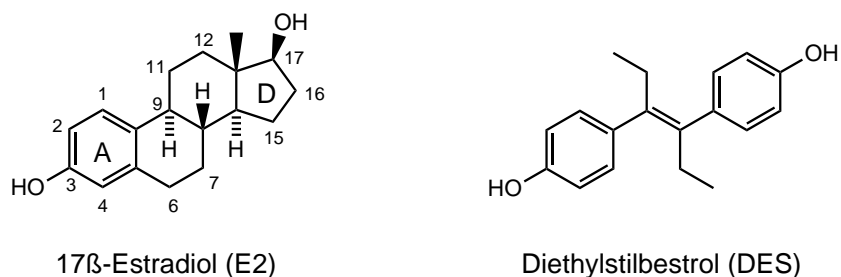
## 1 Einleitung

### 1.1 Estrogene

#### 1.1.1 Natürliche und synthetische Estrogene

Estrogene zählen zu den Steroidhormonen. Das wichtigste Estrogen im weiblichen Körper ist das  $17\beta$ -Estradiol (E2). Die Strukturformeln von E2 sowie die des synthetischen Estrogens Diethylstilbestrol (DES) sind in Abb. 1 dargestellt.

**Wirkungsweise von Steroidhormonen** Steroidhormone wirken durch Bindung an intrazelluläre zytosolische oder kernständige Rezeptoren. Die Liganden-aktivierten Rezeptoren binden an spezifische DNA-Sequenzen (hormone responsive elements) in der Regulatorregion bestimmter Gene und stimulieren deren Transkription und damit die Synthese der von diesen Genen codierten Proteine. Steroidrezeptoren können daher auch als Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren bezeichnet werden. Welche Gene in einer Zelle aktiviert werden, und wie stark sie aktiviert werden, hängt nicht nur von der Art und Konzentration der aktivierten Steroidrezeptoren sondern auch von zahlreichen anderen die Genaktivität regulierenden Faktoren ab (Mueller und Korach, 2001). In den klassischen Zielgeweben für Estrogene wie Uterus und Brust wurde als Bindungsprotein der sogenannte Estrogenrezeptor-(ER-) $\alpha$  identifiziert. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass Estrogenwirkungen beziehungsweise Estrogenrezeptoren auch in Geweben wie Leber, Niere, ZNS, Prostata oder Knochen auftreten, so dass offenbar neben der Reproduktion noch weitere Körperfunktionen unter dem Einfluss von Estrogenen stehen (Gustafsson, 1998). Durch die Entdeckung eines weiteren Estrogenrezeptors, des ER- $\beta$  wurden verschiedene Aspekte der vielfältigen Wirkungen von Estrogenen besser verständlich. Im Vergleich zum bisher bekannten ER- $\alpha$  weist ER- $\beta$  eine andere Organverteilung und eine deutlich höhere Affinität für einige Phytoestrogene auf (Kuiper et al., 1998).



**Abb. 1:** Strukturformeln von  $17\beta$ -Estradiol (E2) und Diethylstilbestrol (DES).

### 1.1.2 Endokrine Disruptoren

**Definition** (nach der US-Umweltbehörde EPA, 1997) „Unter einem in der Umwelt relevanten endokrinen Disruptor versteht man eine körperfremde Substanz, die mit der Synthese, der Ausscheidung, dem Transport, der Bindung, der Wirkung oder dem Abbau der natürlichen Hormone im Körper konkurriert, welche für die Aufrechterhaltung der physiologischen Körperfunktionen, die Fortpflanzung, die Entwicklung und/oder das Verhalten verantwortlich sind.“ Die meisten endokrinen Disruptoren gehören zu den Estrogenen. Gelegentlich werden „schwach estrogen wirksame“ Substanzen auch als „antiestrogen“ oder „partiell antiestrogen“ bezeichnet. Dahinter steht die Vorstellung, dass die Wirkung eines potenten Estrogens (in der Regel  $17\beta$ -Estradiol) durch ein schwaches Estrogen vermindert werden kann, wenn es kompetitiv das potentere Estrogen verdrängt. „Estrogene oder antiestrogene“ Wirkung beschreibt also eher das relative Stoffverhalten im jeweiligen biologischen Testsystem und weniger eine konstante Stoffeigenschaft. Daher hat sich in letzter Zeit für derartige Stoffe der Begriff „Estrogen Active Compound“ (EAC) durchgesetzt (Mueller und Korach, 2001). Neben natürlichen und synthetischen Estrogenen, bei denen die Hormonwirkung erwünscht ist, kommen in der Umwelt eine Vielzahl EACs vor, bei denen die Hormonwirkung nicht im Vordergrund steht, sondern einen unerwünschten Nebeneffekt darstellt. So kann der Mensch durch die Nahrung Rückstände und Kontaminanten anthropogen hergestellter Stoffe aber auch hormonell aktive Pflanzeninhaltsstoffe aufnehmen. Naturgemäß spielen hormonell aktive Rückstände und Kontaminanten aufgrund ihrer geringen Affinität zu den Estrogenrezeptoren und ihren niedrigen Konzentrationen in Nahrungsmitteln für den Menschen nur eine untergeordnete Rolle, während hormonell wirksame Pflanzeninhaltsstoffe nach oraler Aufnahme teilweise hohe Plasmakonzentrationen erreichen können (Gesellschaft Deutscher Chemiker, 2000).

### 1.1.3 Phytoestrogene: Isoflavone

Phenolische, estrogen-wirksame Pflanzeninhaltsstoffe erfüllen in Pflanzen wichtige biologischen Funktionen. So werden folgende mögliche Wirkungsweisen diskutiert:

- Signalsubstanz bei der Wurzelknöllchenbildung
- Zwischenprodukt beim Phytoalexinmetabolismus
- Kontrolle der Population der Herbivoren durch hormonelle Wechselwirkung zwischen Pflanze und Vertebraten
- Fraßabwehrstoff
- Funktion beim Wachstum und bei der Ausbildung der Blüte oder der Geschlechter
- Speicherfunktion

In Abb. 2 sind die Strukturformeln der im Folgenden kurz vorgestellten Isoflavone dargestellt.

**Genistein (GEN)** Eines der Hauptisoflavone in Soja. GEN kann auch durch Demethylierung von Biochanin A entstehen.

**Daidzein (DAI)** Ein weiteres Hauptisoflavon in Soja. Es kann auch durch Demethylierung von Formononetin entstehen.

**Biochanin A (BCA)** Ein Genisteinmonomethylether. Es kommt natürlicherweise im Klee vor.

**Formononetin (FORM)** Eines der Hauptisoflavone in Klee. Strukturell stellt es einen Daidzeinmonomethylether dar.

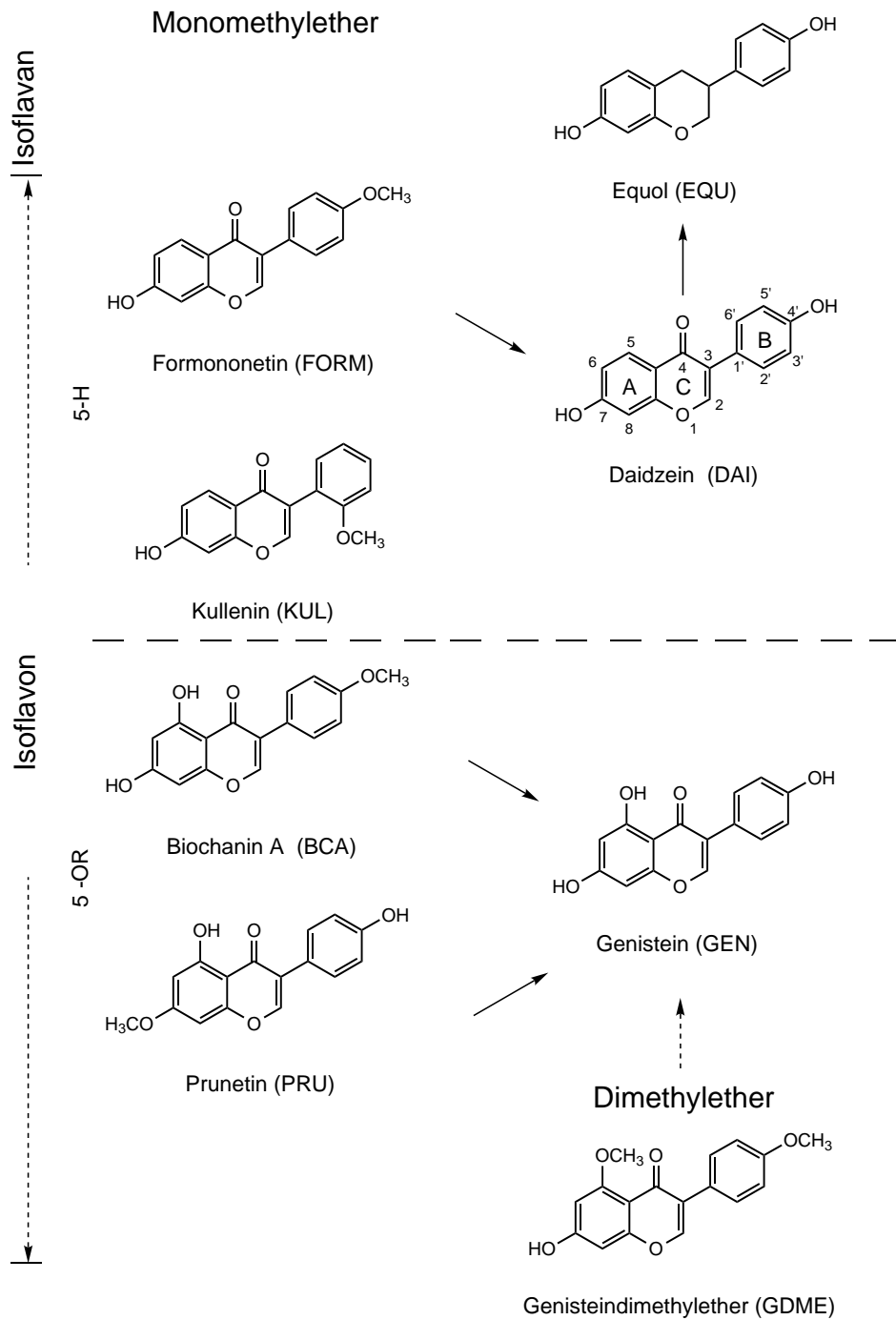
**Kullenin (KUL)** Ein synthetisches Isoflavon, das strukturell einen weiteren Daidzeinmonomethylether darstellt.

**Prunetin (PRU)** Ein Genisteinmonomethylether, der in geringen Mengen in verschiedenen Pflanzen vorkommt.

**Genisteindimethylether (GDME)** Ein synthetisches Isoflavon.

**Equol (EQU)** Reduktiver Metabolit (Isoflavan) des FORM und DAI. Es wird durch Mikroorganismen im Verdauungstrakt aus FORM entweder über Demethylierung zum DAI und dessen Reduktion oder über Reduktion des FORM zum O-Methylequol und anschließende Demethylierung gebildet.

**Bedeutung und Vorkommen** Der Phytoestrogengehalt ist bei den Hülsenfrüchtleartigen (Leguminosae), insbesondere den Schmetterlingsblütlern (Fabaceae), die eine grosse wirtschaftliche Bedeutung haben, besonders hoch (Mazur, 1998). Aufgrund ihrer Fähigkeit Luftstickstoff anzureichern, sind Klee-Arten und Luzerne zur Gründüngung geeignet, werden aber auch als Futterpflanzen verwendet. Heute deckt Sojaschrot in Deutschland den Bedarf für Eiweißfuttermittel zu mindestens zwei Dritteln. Hülsenfruchtartige wie Saubohne, Erbse, Bohnen und die Sojabohne sind bedeutende Nahrungsmittel für den Menschen. Isoflavone sind in Pflanzen überwiegend als glykosylierte und malonylierte Verbindungen enthalten. Diese sehr hydrophile Verbindungen stellen den ganz überwiegenden Anteil der Isoflavone in Sojabohnen und Sojamehl, während der Gehalt an freien Isoflavonen in nativen Produkten meist sehr gering ist. In Tab. 1 sind die Isoflavon-Konzentrationen in einigen Nahrungs- und Futtermitteln aufgeführt. Seit einiger Zeit sind auch kapselförmige Nahrungsergänzungsmittel aus Soja- und/oder



**Abb. 2:** Strukturformeln der Isoflavone Daidzein (DAI, 7,4'-Dihydroxyisoflavon), Genistein (GEN, 5,7,4'-Trihydroxyisoflavon), Formanonetin (FORM, 5-Hydroxy-4'-methoxyisoflavon), Kullenin (KUL, 5-Hydroxy-2'-methoxyisoflavon), Biochanin A (BCA, 5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon), Prunetin (PRU, 5,4'-Dihydroxy-7-methoxyisoflavon), Genisteindimethylether (GDME, 7-Hydroxy-5,4'-dimethoxyisoflavon).

**Tabelle 1:** Isoflavongehalte in Futter- und Nahrungsmitteln. TG, Trockengewicht; n.n., nicht nachweisbar. Nach Gesellschaft Deutscher Chemiker (2000); Mazur (1998).

Spezies	Konz. in g/kgTG			
	GEN	BCA	FORM	DAI
Wiesenklee	0,1	3,5	5,5	0,1
Erdklee	5	1	0,29	n.n.
Sojabohnen	0,841	0,00015	0,000406	0,56

Klee-Extrakten erhältlich, die GEN und DAI, aber auch BCA und FORM in Milligramm- bis Gramm-Mengen enthalten.

Mit der Nahrung zugeführte Isoflavone sind die wesentliche Quelle exogener EACs, wenn von therapeutisch oder kontrazeptiv zugeführten Präparaten abgesehen wird (Sonnenschein und Soto, 1998). Dabei hängt die Exposition des Menschen vor allem von den individuellen Ernährungsgewohnheiten ab. In westlichen Ländern wird die tägliche Aufnahme auf <1 mg Isoflavone geschätzt, während in asiatischen Ländern täglich 20-40 mg aufgenommen werden (Setchell und Cassidy, 1999). Die höchsten Plasmakonzentrationen an Phytoestrogenen wurden bisher bei Säuglingen ermittelt, die Babynahrung auf Sojabasis erhielten. Seit rund 40 Jahren erhalten Säuglinge mit einer Unverträglichkeit von Milcheiweiß Ersatzdiäten auf der Basis von Sojamehl. Wegen des hohen Verzehrs und des hohen Phytoestrogengehalts resultieren dabei hohe Aufnahmemengen von 28 bis 47 mg Isoflavonen, die sonst nur bei erwachsenen Asiaten und Vegetariern erreicht werden. Bezogen auf das Körpergewicht lag die tägliche Dosis von 6 bis 9 mg/kg Körpergewicht für diese Säuglinge um den Faktor 10 über der für Asiaten geschätzten Dosis. Die mittleren Plasmaspiegel der Summe von GEN, DAI und EQU (2-3 Größenordnungen unter GEN) betragen zirka 4  $\mu\text{M}$  gegenüber einem Plasmaspiegel von 0,01  $\mu\text{M}$  bei gestillten oder mit Kuhmilch ernährten Säuglingen (Gesellschaft Deutscher Chemiker, 2000).

**Estrogenität** In den 40er Jahren ging in Australien der Anteil gebärender Schafe auf unter 30 % zurück, wenn sie längere Zeit auf Weiden mit Erdklee grasten. Bei der so genannten „Kleerkrankheit“ („Clover disease“) traten Infertilität, erschwerte Geburten, Hyperplasie des Endometriums und Laktation juveniler und nicht-trächtiger Schafe und Hypertrophie der Brustwarzen und der Samenblase bei kastrierten männlichen Schafen auf. Außer den klinischen Symptomen wurde in Abhängigkeit von Expositionsdauer und -höhe bei adulten weiblichen Tieren auch eine reversible oder irreversible Infertilität beobachtet. Primär wurde FORM, ein Vorläufer des DAI, nicht aber GEN oder BCA, als Ursache für die in Australien nur bei Schafen beobachteten Effekte angesehen. Dabei war der Metabolismus dieser Wiederkäuer für

den Effekt ausschlaggebend. Der estrogene Metabolit EQU wird beim FORM-Abbau gebildet. Auch beim Menschen können estrogene Effekte wie Zyklusveränderungen nach Konsum stark phytoestrogenhaltiger Nahrung beobachtet werden (Cassidy et al., 1994, 1995). In Rezeptorbindungsstudien zeigen die Phytoestrogene meist eine um zirka 3 Größenordnungen geringe Bindungsaffinität zum ER- $\alpha$  als E2, wohingegen die Bindungsaffinität beispielsweise des GEN zum ER- $\beta$  nur um 2 Größenordnungen unter der des E2 liegt (Kuiper et al., 1998). In den meisten *in vitro*-Testsystemen verhält sich das estrogene Potenzial der Isoflavonoide folgendermaßen: EQU>GEN>DAI>BCA>(FORM), wobei FORM in einigen Estrogenitätstests negativ ist (Willard und Frawley, 1998; Verma und Goldin, 1998). Über PRU und KUL liegen keine Untersuchungen zur Estrogenität vor.

**Genotoxizität** Über ein mögliches genotoxisches Potenzial von Isoflavonen ist trotz der teilweise hohen Aufnahmemenge mit der menschlichen Nahrung wenig bekannt. Genistein hat sich *in vitro* in Konzentrationen von einigen  $\mu\text{M}$  als Klastogen erwiesen (Kulling et al., 1999; Kulling und Metzler, 1997). Gesellschaft Deutscher Chemiker (2000) schätzen allerdings unter der für den Menschen gegebenen Expositionssituation das Risiko einer klastogenen Wirkung von GEN trotz der positiven *in vitro*-Befunde als vernachlässigbar ein. Trotz seiner Strukturähnlichkeit zum GEN zeigt DAI bis 200  $\mu\text{M}$  in den meisten Untersuchungen kein genotoxisches Potenzial. In einer Untersuchung von Anderson et al. (1997) wurde ein schwach klastogenes Potenzial auch für DAI nachgewiesen. Über ein mögliches genotoxisches Potenzial der anderen aufgeführten Isoflavone ist wenig bekannt. Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigten für BCA ein aneuploidogenes Potenzial in kultivierten V79-Zellen. An den Beispielen GEN (klastogen), DAI (kein Effekt bis 200  $\mu\text{M}$ ) und BCA (aneuploidogen) wird deutlich, dass bereits geringe Variationen der Substituenten am A- und/oder B-Ring einen starken Einfluss auf die biologische Aktivität von Isoflavonen haben: So unterscheidet sich GEN nur durch eine zusätzliche OH-Gruppe in 5-Position vom DAI, und BCA stellt den GEN-4'-methylether dar (Abb. 2).

**Weitere biologische Effekte** In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an Studien durchgeführt, die zumeist eine positive Wirkung von Isoflavonen auf die menschliche Gesundheit belegen sollten. So stehen in diesem Zusammenhang vor allem Untersuchungen zu einer möglichen chemoprotektiven Wirkung einiger Isoflavone bei einigen Krebsarten sowie Studien über ihren Einfluss auf das Herz-Kreislaufsystem im Vordergrund. Einige Ergebnisse von *in vivo*-Studien sind im Folgenden aufgeführt:

- In zahlreichen tierexperimentellen Modellen zur Krebsentstehung mit Ratte und Maus wirkten Genistein, Sojaprotein, Sojabohnen oder Isoflavone mehrheitlich protektiv für verschiedene Tumorlokalisationen (Barnes, 1995; Messina et al., 1997; Messina und Benink, 1998).
- Erhöhung des Plasmaspiegels der Schilddrüsenhormone (Potter et al., 1996).
- Absenkung des Plasmaspiegels von Cholesterin nach Soja-haltiger Diät (Potter et al., 1996).

Auch eine Vielzahl von Isoflavon-induzierten *in vitro*-Effekten, von denen hier einige beispielhaft aufgezählt sind, sind beschrieben worden:

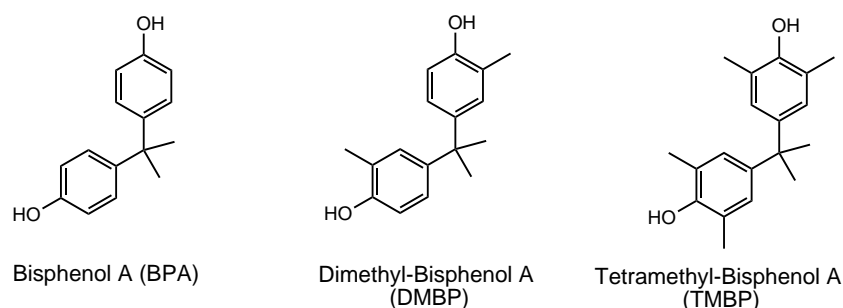
- Hemmung von Tyrosinkinasen (GEN) (Ye et al., 2001; Bergan et al., 2001).
- Einfluss auf die Signaltransduktion (GEN, EQU) (Schultze-Mosgau et al., 1998).
- Hemmung von Alkohol-Dehydrogenasen (GEN, DAI, FORM, BCA, PRU) (Keung, 1993).
- Hemmung von Aldehyd-Dehydrogenasen (PRU) (Keung und Vallee, 1993; Sheikh und Weiner, 1997).
- Antiproliferativ (GEN) (Barnes und Peterson, 1995).
- Hemmung der DNA-Topoisomerase II (GEN, PRU) (Constantinou et al., 1995). Aufgrund des Zusammenhangs einer Topoisomerase II-Hemmung mit dem Auftreten von sekundärer Leukämie und möglicherweise auch akuter Leukämie im Kindesalter spekulierte Abe (1999) über eine Beteiligung von Genistein und anderen Phytoestrogenen an der Pathogenese dieser Erkrankung. Diese Hypothese bedarf jedoch einer experimentellen Bestätigung.
- Antioxidative Effekte GEN > DAI > BCA (Wei et al., 1995).
- Verminderte Schilddrüsenperoxidase-katalysierte Iodierung verschiedener Substrate durch GEN.

### 1.1.4 Xenoestrogene: Bisphenole

In Abb. 3 sind die Strukturformeln von Bisphenol A (BPA) sowie eines dimetylierten BPA-Derivats (DMBP) und eines tetramethylierten BPA-Derivats (TMBP) dargestellt.

**Bedeutung und Vorkommen** Bisphenole stellen die strukturelle Grundlage der Polycarbonate und Epoxyharze dar. Ihr Anwendungsbereich ist daher sehr breit gefächert und reicht von Lacken über Brems- und Kupplungsbeläge bis hin zum Korrosionsschutz für Schiffe und Stahlbauten. Außerdem werden sie in vielen Kunststoffen und Flüssigkeiten wie Vinyl- und Acrylharzen sowie Gummi als Antioxidanzien zugesetzt. Bisphenol A (BPA, Abb. 3) gehört weltweit zu den meist produzierten Chemikalien. Allein in der BRD werden jährlich über 200.000 t synthetisiert (Lengauer et al., 1998). Die Emission von BPA bei der Produktion und Weiterverarbeitung, durch Migration des nicht umgesetzten Monomers aus Polycarbonaten und beim Recycling von Fax-Papier wird auf mehr als insgesamt 3 t jährlich geschätzt. Nach Angaben der Hersteller werden bei Produktion und Verarbeitung weniger als 1 t/Jahr in Luft, beziehungsweise Wasser emittiert (Gesellschaft Deutscher Chemiker, 1996; Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der DFG, 1996).

Populär in der breiten Öffentlichkeit wurde BPA durch Pressemitteilungen über seine Migration aus Kronkorken von Bierflaschen oder Auskleidungen von Konservendosen (Brotons et al., 1995). So enthielten 50 ml aus dem flüssigen Inhalt einer Konservendose 23 µg BPA. In der EG-Kunststoffrichtlinie 90/128/EWG ist für BPA ein Migrationswert von 3 mg/kg Lebensmittel zulässig (siehe Anlage 3 der Bedarfsgegenstände VO, 1992). BPA und BPA-Glycidyl-Methylacrylat können ebenfalls aus Kunststoff-Zahnfüllungen freigesetzt werden. In Untersuchungen von Olea et al. (1996); Spahl et al. (1991) migrierten in der ersten Stunde nachdem Patienten eine neue Zahnfüllung erhalten hatten, BPA-Mengen von 90 bis über 900 µg in den Speichel der Patienten. Fung et al. (2000) konnten allerdings im Plasma solcher Patienten kein BPA nachweisen.



**Abb. 3:** Strukturformeln von Bisphenol A (BPA), Dimethyl-Bisphenol A (DMBP) und Tetramethyl-Bisphenol A (TMBP).



**Estrogenität** Die Kenntnis des estrogenen Potenzials der Bisphenole ist schon über 50 Jahre alt (Reid und Wilson, 1944). Eingehendere Untersuchungen der letzten Zeit zeigten seine proliferationsfördernde Wirkung auf MCF-7-Zellen (Brotons et al., 1995), die Bindung an die Estrogenrezeptoren ER- $\alpha$  (Krishnan et al., 1993) und ER- $\beta$  (Kuiper et al., 1998) und die Förderung der Vitellogeninsynthese in Amphibienleberzellen. Die relative estrogene Potenz lag in all diesen Tests um drei bis fünf Größenordnungen unter der von DES. Aufgrund dieser Daten wurden ein LOEL (Lowest Observable Effect Level) von BPA von 50 mg/kgKG/Tag errechnet und nach Einbeziehung eines Sicherheitsfaktors 50  $\mu$ g/kgKG/Tag als akzeptable Exposition festgelegt. Veröffentlichungen von Nagel et al. (1997, 1999) und Welshons et al. (1999) über die Steigerung des Prostatagewichts von Mäusen nach fötaler BPA-Exposition mit BPA-Dosen unter der bisher als sicher erachteten Konzentration (2 bis 20  $\mu$ g/kg Körpergewicht) werden kontrovers diskutiert (Safe, 2000; Sheehan, 2000). Gupta (2000) konnte die beschriebenen Effekte bestätigen, Cagen et al. (1999) dagegen nicht. Howdeshell et al. (1999) beschrieben auch Entwicklungsstörungen nach der *in utero*-Exposition von weiblichen Mäusen mit niedrigen BPA-Dosen, während Kwon et al. (2000) im gleichen BPA-Konzentrationsbereich nach Exposition von weiblichen Rattenföten keinen Effekt auf die Reproduktionsorgane der Tiere feststellen konnten. Markey et al. (2001a) zeigten, dass BPA Veränderungen im Mäuseuterus induziert, die von der BPA-Konzentration und dem beobachteten Endpunkt abhängen. Das oft als Endpunkt bestimmte Uterusgewicht schien dabei ein besonders unempfindlicher Parameter zu sein. Des Weiteren demonstrierten sie, dass einige Gewebefeffekte einen nicht-monotonen Zusammenhang mit der Konzentration aufweisen (Markey et al., 2001b). Beobachtete Unterschiede der Estrogenität von BPA bei verschiedenen Verabreichungsarten wird von Pottenger et al. (2000) mit der von der Verabreichungsart abhängigen Bioverfügbarkeit von BPA in Ratten begründet, die nach oraler Gabe am geringsten ist. Für die Übertragbarkeit vom Tierversuch auf den Menschen ist interessant, dass Mikrosomen aus Human- und Rattenleber beide BPA glukoronidieren, was zu einer deutlichen Herabsetzung des estrogenen Potenzials führt. Allerdings wird BPA von Humanlebermikrosomen zu einem deutlich geringeren Anteil konjugiert als von Rattenlebermikrosomen. Daher könnten menschliche Zielgewebe einer höheren BPA-Konzentration ausgesetzt sein als Ratten in *in vivo*-Versuchen (Elsby et al., 2001).

Kanai et al. (2001) konnten mit DMBP eine ER-abhängige Steigerung der Proliferationsrate der Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigen. Dabei trat die proliferationsstimulierende Wirkung erst bei zehnfach höheren Konzentration als bei BPA auf (3-4 Größenordnungen schwächer als E2) und war beim maximalen Effekt schwächer ausgebildet als bei E2 oder BPA. In eigenen Untersuchungen unseres Arbeitskreis konnte *in vitro* eine ER-vermittelte Steigerung der Expression der alkalischen Phosphatase (AP) durch DMBP im gleichen Konzentrationsbereich wie durch BPA nachgewiesen werden. Dazu waren um zirka 3 Größenordnungen höhere Konzentrationen

als mit E2 notwendig. TMBP vermittelt eine ER-abhängige Expression der AP erst in einem Konzentrationsbereich, in dem die Genexpression durch Zytotoxizität der Substanz überlagert wird.

**Genotoxizität** Pfeiffer et al. (1997) konnten *in vitro* im zellfreien System sowie in kultivierten V79-Zellen einen Effekt von BPA, DMBP und TMBP auf die Mikrotubuli-Assoziation beobachten. Die Effekte von BPA in V79-Zellen wurden von Ochi (1999) bestätigt. Takahashi et al. (2001) wiesen ein mutagenes Potenzial von BPA nach. In Untersuchungen in SHE-Zellen wirkten BPA und DMBP wachstumshemmend, wobei der Effekt bei DMBP stärker ausgeprägt war (Kanai et al., 2001; Tsutsui et al., 2000). Außerdem wird durch beide Bisphenole Aneuploidie im annähernd diploiden Bereich und morphologische Zelltransformation von SHE-Zellen induziert, wobei sowohl die Aneuploidie-Induktion als auch die Häufigkeit der Zelltransformation bei DMBP höher ist. Keines der beiden Bisphenole induziert gemäß Tsutsui et al. (2000) Mutationen im *hprt* oder im Na(+)/K(+)-ATPase Locus. Auch Chromosomenaberrationen konnten nicht nachgewiesen werden. Über ein transformierendes Potenzial von TMBP gibt es noch keine Untersuchungen.

**Weitere biologische Effekte** BPA hemmt *in vitro* im Konzentrationsbereich um 100  $\mu\text{M}$  eine Vielzahl von Enzymen, unter anderem die Cytochrom P450-Isoenzyme CYP1A2, CYP2A2, CYP2B2, CYP2C11, CYP2D1, CYP2E1 und CYP3A2 in Rattenlebermikrosomen (Hanioka et al., 2000; Cannon et al., 2000). Eine Wechselwirkung von BPA mit humanen Lebercytochromen, insbesondere CYP2C8 und CYP2C19, konnte von Niwa et al. (1999, 2001) in Mikrosomen aus, mit menschlichen Cytochromen transfizierten, Hefezellen gezeigt werden. In Hepatomazellen von Mäusen konnten Jeong et al. (2000) eine Down-Regulierung der CYP1A1-Genexpression durch BPA beobachten. Dieser Effekt schien durch Wechselwirkung mit dem AH-Rezeptor vermittelt zu sein.

### 1.1.5 Hormonelle Kanzerogenese

E2 induziert Tumore in verschiedenen Organen von Ratten, Mäusen und Hamstern. In Menschen erhöhen leichte Steigerungen der zirkulierenden Estrogenspiegel durch gesteigerte endogene Produktion oder therapeutische Dosen von Estrogenen das Brust- und Uteruskrebsrisiko (Nandi et al., 1995; Kristensen und Borresen-Dale, 2000). Dabei kann die Kanzerogenität nicht hinreichend mit der proliferationsstimulierenden Wirkung der Estrogene erklärt werden (Lieber, 2000). So sind manche Estrogene keine Kanzerogene, und die Stärke der Kanzerogenität korreliert meist nicht mit der Estrogenität einer Substanz (Kanai et al., 2001). Deshalb werden

weitere mögliche Mechanismen der Kanzerogenese durch Estrogene erforscht. Neuere Studien unterstützen eine doppelte Rolle von Estrogenen bei der Kanzerogenese: Stimulation der Proliferation und Induktion eines genetischen Schadens als Prokanzerogen. Dabei scheint die Initiation durch E2 durch die Aktivierung von E2 zu 4-Hydroxyestradiol und weitere Aktivierung dieses Katechols zu reaktiven Semichinon/Chinon-Intermediaten zu erfolgen (Zhu et al., 1996). In zellfreien Systemen, *in vitro* und *in vivo* wurden direkte und indirekte durch freie Radikale vermittelte DNA-Schäden nachgewiesen. So konnten Banerjee et al. (1994) die Induktion von Chromosomenaberrationen in syrischen Hamster Nierenzellen durch verschiedene Estrogene zeigen, und Hodgson et al. (1998) wiesen nach Estrogen-Behandlung Genamplifikation und Mikrosatelliteninstabilität in kultivierten Zellen und *in vivo* nach. Des Weiteren konnten Genmutationen in einigen Zelltestsystemen nachgewiesen werden. Auch Tsutsui und Barrett (1997) gehen von einem komplexen Mechanismus bei der hormonellen Kanzerogenese aus: So wird Estrogen-induzierte Genotoxizität nach Behandlung von syrischen Hamsterembryo(SHE)-Zellen mit Estrogenmetaboliten oder exogener metabolischer Aktivierung beobachtet. Estrogene induzieren DNA-Addukte, die mittels  $^{32}\text{P}$ -Postlabeling detektiert werden können. SHE-Zellen, die keinen nachweisbaren Gehalt eines Estrogenrezeptors exprimieren, werden des Weiteren auch durch E2 und seine Metaboliten neoplastisch transformiert (Yagi et al., 2001). Parallel zur Adduktbildung wird in diesen Zellen auch Aneuploidie induziert. Aneuploidie-Induktion und DNA-Schäden durch Adduktbildung korrelieren dabei mit der morphologischen Zelltransformation und könnten somit beide in der hormonellen Kanzerogenese eine Rolle spielen.

## 1.2 Aneuploidie

### 1.2.1 Bedeutung

Schon seit längerem gibt es Bemühungen, die Bedeutung von Aneuploidie für die menschliche Gesundheit zu erfassen und zu bewerten (Dellarco et al., 1985). So ist Aneuploidie die verbreitetste Art chromosomaler Abnormität in Menschen. Sie tritt in mindestens 0,3 % der Neugeborenen und ungefähr 50 % der spontanen Fehlgeburten auf. Als Klasse ist sie die häufigste Ursache geistiger Störungen und der Hauptgrund für Schwangerschaftsabbruch (Abruzzo und Hassold, 1995). Untersuchungen zur Häufigkeit und Ursache natürlicher Aneuploidie wurden in den letzten Jahren durch die Entwicklung von Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungstechniken zur Detektion von Aneuploidie in menschlichen Keimzellen erleichtert (Martin, 1998).

**Aneuploidie und Krebs** In menschlichen Tumoren wird gewöhnlich Aneuploidie beobachtet. Die Frage, ob Aneuploidie eine Folge oder die Ursache von Krebs ist, ist seit langem umstritten (Bialy, 2001). Bereits vor einem Jahrhundert schlug Boveri Aneuploidie als Ursa-

che von Krebs vor. Als man ein halbes Jahrhundert später nachwies, dass Krebszellen nicht klonal für Aneuploidie, aber für einige Genmutationen sind, wurde diese Theorie aufgegeben und seither wird Genmutation als Ursache und Aneuploidie als Folge der Krebsentstehung angesehen. Sen (2000) glaubt nun, dass drei Erkenntnisse neuerer Untersuchungen dafür sprechen, Aneuploidie als eigenständiges Ereignis zu betrachten, das zur malignen Transformation und dem Progressionsprozess beiträgt.

1. Spezifische Chromosomen Aneusomien (durch *in situ*-Hybridisierung und vergleichende genomische Hybridisationstechniken in primären Tumoren nachgewiesen) korrelieren mit bestimmten Tumorphänotypen.
2. Aneuploide Tumorzelllinien und *in vitro* transformierte Nagerzellen weisen eine erhöhte genetische Instabilität auf und deuten damit darauf hin, dass Aneuploidie ein dynamisches Ereignis ist, das mit der Transformation von Zellen assoziiert ist (Li et al., 1997; Duesberg et al., 2000a).
3. Eine Anzahl mitotischer Gene, die die Chromosomen Verteilung regulieren, wurden in humanen Tumorzellen in mutierter Form vorgefunden (Cahill et al., 1998), was auf eine Bedeutung solcher Mutationen bei der Induktion von Aneuploidie hindeutet. Einige dieser Genmutationen, die ungleiche Chromosomenverteilung erlauben, induzieren *in vitro* maligne Transformation von Zellen.

Im Gegensatz zu diesen Überlegungen, die von Genmutationen als Grundlage der Aneuploidie-Induktion ausgehen, wird von Duesberg et al. (2000a) sogar die Kanzerogenese als ein zweistufiger Aneuploidie-induzierter Prozess, der keine Beteiligung von Genmutationen benötigt, postuliert:

1. Initiation durch eine präneoplastische Aneuploidie.
2. Autokatalytische Weiterentwicklung des Karyotyps der initiierten Zelle durch numerisch und strukturell veränderte Zentrosomen und an der Mitose beteiligten Proteine. Dies führt zu einer Vielzahl neuer Karyotypen, unter denen zufällig neoplastische sind (Analog der Evolution neuer Spezies).

Duesberg und Rasnick (2000) begründen ihre Hypothese mit (a) der Aneuploidie solider Tumoren, (b) der Aneuploidie-Induktion durch genotoxische und nicht-genotoxische Kanzerogene, (c) der starken Änderung biochemischer Phänotypen durch Aneuploidie und fehlender phänotypischer Veränderung durch Mutation von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen, (d) der Immortalisierung von Zellen durch Aneuploidie, (e) der Schaffung abnormer nicht-kanzerogener Phänotypen durch Aneuploidie, (f) der Proportionalität von Aneuploidiegrad und Ausmaß der

Abnormität in Tumor- und anderen Zellen, (g) der Variation biologischer Phänotypen durch Polyploidie und (h) der Variation der Chromosomenzahl als Basis der Artenbildung. Dabei sehen sich Duesberg et al. (2000b) durch Versuche zur Arzneimittelresistenz in transformierten Zellen und Interpretation (Li et al., 2000) einer Arbeit von Hahn et al. (1999), die die Genmutationsvariante unterstützt, bestätigt.

### 1.2.2 Schwellenwerte bei chemisch-induzierter Aneuploidie

Es mehren sich die Hinweise, dass bei der Konzentrationsabhängigkeit chemisch induzierter Aneuploidie Schwellenwerte auftreten, unterhalb derer keine Effekte auftreten (Elhajouji et al., 1995, 1997; Schuler et al., 1998). Die Frage, ob das Auftreten solcher Schwellenwerte bei der Beurteilung von Substanzen berücksichtigt werden sollte, wird seit einiger Zeit diskutiert (Aardema et al., 1998; ECETOC, 1997). Die komplexe Schwellenwert-Problematik wurde von ECETOC (2000) zusammengestellt.

### 1.2.3 Testsysteme zur Erfassung von Aneuploidie

Bereits 1985 wurde bei einem von der EPA organisierten Workshop versucht, Testmethoden zur Erfassung von Aneuploidie zusammenzutragen, ihre Validierung zu unterstützen und die Notwendigkeit der Aufnahme solcher Testsysteme in Testbatterien zur Risikoabschätzung neuer Substanzen unterstrichen (Dellarco et al., 1985). Es ist zwar eine große Vielfalt von Methoden zur Bestimmung von chemisch-induzierter Aneuploidie beschrieben (zusammengefasst von Parry et al. (1996)), jedoch wird von Aardema et al. (1998) keine dieser Methoden als ausreichend validiert oder als weit verbreitet in Routinetestbatterien eingeschätzt (ECETOC, 1997). In der folgenden Aufzählung sind die etablierten Testsysteme für Aneuploidie-Induktion aufgeführt.

- Nicht-Säuger und zellfreie Systeme
  - Pflanzen
  - Hefen
  - Drosophila
  - Tubulin-Polymerisation
- Säuger *in vitro*-Testsysteme
  - Mitotische Aberrationen
  - Mikrokerninduktion
  - Mikrokerninduktion + FISH
  - Auszählen der Metaphase-Chromosomen

- Somatische *in vivo*-Säuger-Testsysteme
  - Mitotische Aberrationen
  - Mikrokerninduktion
  - Mikrokerninduktion + FISH
  - Mikrokerninduktion + Cytochalasin B
  - Auszählen der Metaphase-Chromosomen

**Aktuelle Situation** Aardema et al. (1998) fassten den Kenntnisstand wie folgt zusammen:

1. Bis 1997 gab es 9 in Nagertestsystemen *in vivo* identifizierte, erwiesene Aneugene (Acrylamid, Benomyl, Carbendazim, Chloralhydrat, Colchizin/Colcemid, Diethylstilbestrol, Griseofulvin, Hydrochinon und Vinblastinsulfat).
2. Wie erwartet, ist der Hauptanteil der erwiesenen oder vermuteten Aneugene negativ in Genmutationstests.
3. Die Mehrheit der erwiesenen Aneugene induziert Polyploidie *in vivo* und mit wenigen Ausnahmen induzieren diese Stoffe auch strukturelle Chromosomenaberrationen *in vitro*.
4. Alle erwiesenen Aneugene induzieren *in vivo* Mikrokerne in Knochenmarkzellen von Nagern. Einige dieser Chemikalien induzieren *in vivo* auch strukturelle Chromosomenaberrationen.
5. Es gibt keine Hinweise auf eine Substanz, die ausschließlich in Keimzellen Aneuploidie induziert. Der Anteil an Substanzen, die *in vitro* Polyploidie, aber keine Chromosomenaberrationen induzieren, ist gering.

Daraus leiten Aardema et al. (1998) Anforderungen an eine Standard-Testbatterie in der Genotoxizitätsprüfung ab. So fordern sie, dass ein *in vitro*-Testsystem, welches Polyploidie und Klastogenität zum selben Zeitpunkt der Substanzbehandlung bestimmt, in der routinemäßig angewandten Genotoxizitätsprüfung enthalten sein sollte. Erst wenn in diesem Test Polyploidie beobachtet wird, brauchen weitere Tests zur Aneuploidie-Induktion erfolgen.

Das Konzept der Untersuchung des aneuploidogenen Potenzials einer Substanz erst nach Hinweisen durch Polyploidie-Induktion wird allerdings auch kritisch beurteilt (Parry, 1998).

#### 1.2.4 Angriffspunkte chemischer Substanzen bei der Aneuploidie-Induktion

Ein wichtiger Mechanismus der Aneuploidie-Induktion ist die Störung des Ablaufs der Mitose. In Abb. 4 sind die wichtigsten Mitosestadien schematisch dargestellt. Einige potenzielle Angriffspunkte für Aneugene sind im Folgenden näher beschrieben:

**Mitosespindel** Spindelgifte greifen in den Aufbau der Mitosespindel ein, indem sie die Polymerisation der Tubulin-Dimere zu den Mikrotubuli hemmen oder stabilisieren, so dass kein kontinuierlicher Auf- und Abbau der Mikrotubuli, der für die ordnungsgemäße Funktion der Spindel notwendig ist (Cassimeris, 1999), erfolgen kann. Die Mitosespindel von Humanfibroblasten beinhaltet pro Zelle zirka 1600 Mikrotubuli (je zur Hälfte Kinetochor-Mikrotubuli und Mikrotubuli der Zentralspindel). Dabei binden normalerweise ungefähr 18 Mikrotubuli pro Chromosom, allerdings kann auch bei weniger Kinetochor-Mikrotubuli die Funktion erhalten bleiben (Dellarco et al., 1985).

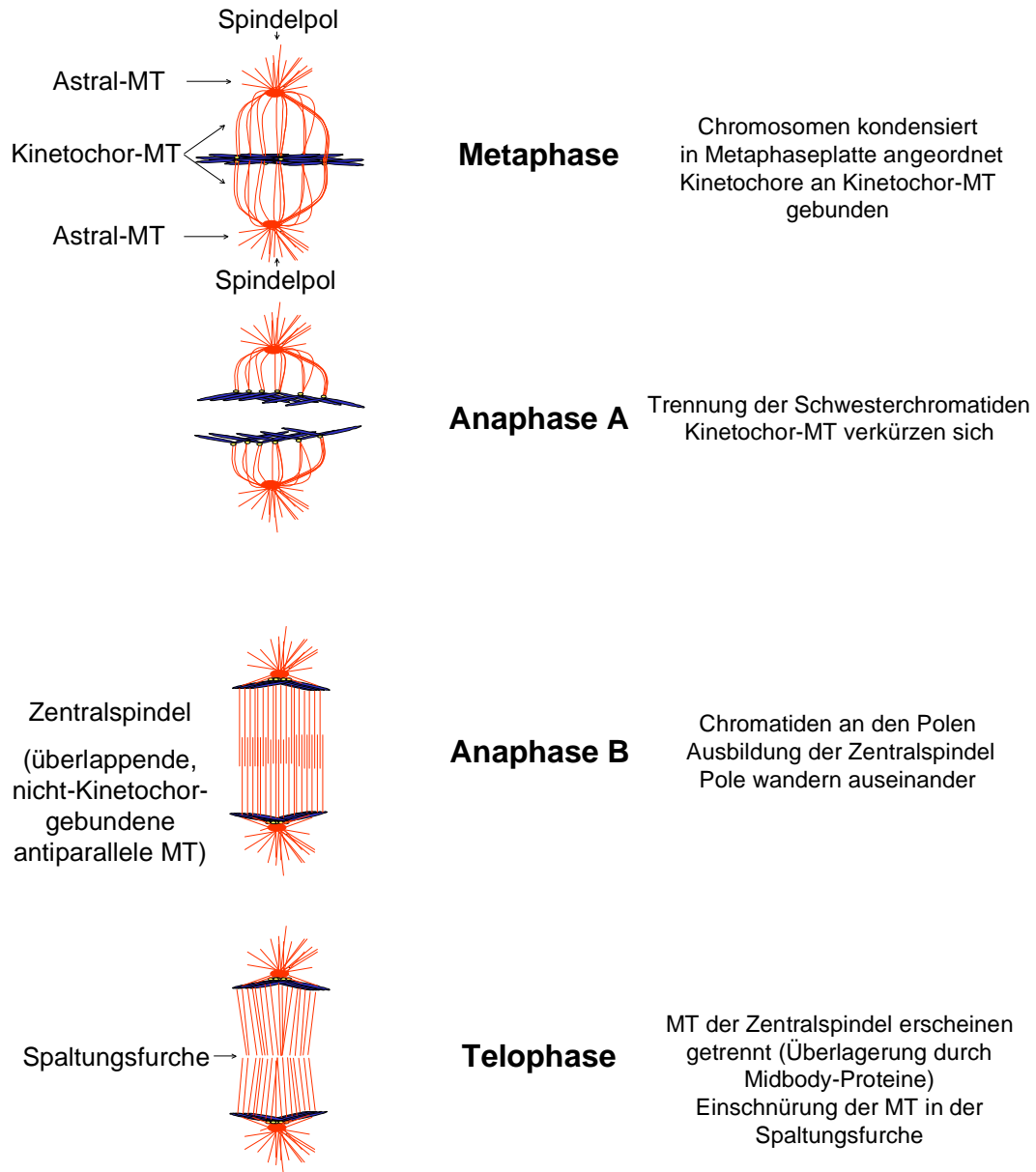
**Kinetochore und Zentromere** Ein funktionstüchtiges Kinetochor ist notwendig zur Bindung der Kinetochor-Mikrotubuli und Trennung der Schwesterchromatiden. Potenzielle Angriffspunkte hier sind die Kinetochorreplikation während der S-Phase und die Kinetochor-Aktivierung in der Prometaphase. Außerdem scheint das Kinetochor bei der Chromosomenbewegung und Chromatidtrennung eine Rolle zu spielen (Bourgeois, 1974; Choo, 2000). Des Weiteren kann das Kinetochor beispielsweise durch Mitomycin C ganz vom Chromosom abgelöst werden (Dellarco et al., 1985).

**Zentrosomen** Die Zentrosomen bilden die Pole der Mitosespindel. Sie bestehen jeweils aus 2 Zentriolen und einer Vielzahl mit diesen assoziierten Proteine. Dabei spielt das  $\gamma$ -Tubulin eine wichtige Rolle als Verbindung zwischen Spindelpol und Mikrotubuli (Schiebel, 2000; Zimmerman et al., 1999). Die Replikation und Separation der Zentriolen erfolgt in der S-Phase und G2-Phase (Adams und Kilmartin, 2000). Ein Zusammenhang zwischen Störungen der Zentrosomenreplikation und -funktion und der genetischen Instabilität von Tumorzellen wird von verschiedenen Autoren vermutet (Brinkley, 2001; Duesberg, 1999; Lingle et al., 1998).

Der Übergang von der Meta- zur Anaphase ist über ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Proteinen kontrolliert (Anaphasekontrollpunkt) (Burke, 2000; Gardner und Burke, 2000). Wenn alle Kinetochore Mikrotubuli gebunden haben, und durch die Anordnung eines Chromosoms zwischen den Kinetochor-Mikrotubuli beider Spindelpole eine gewisse Zugspannung an den Kinetochoren erreicht ist, verschwindet das von ungebundenen Kinetochoren ausgelöste „Wait-Anaphase-Signal“ und die Anaphase kann beginnen (Trielli et al., 1996). Ist

die Funktion des Spindelapparats oder der Kinetochore beeinträchtigt, so dass der Anaphasekontrollpunkt nicht überschritten werden kann, kommt es zu einem zahlenmäßigen Anstieg der Zellen, die sich in der Metaphase befinden (Mitosearrest, hier genauer: Metaphasearrest). Dabei bleiben die Zellen nicht unbegrenzt im Metaphasestadium: nach einer gewissen Zeit beginnt trotzdem die Anaphase, die Zellen beenden die Zellteilung und gehen in der Interphase zur Apoptose über (Lanni und Jacks, 1998; Stewart und Pietenpol, 2001). Des Weiteren können zu lange in der Metaphase arretierte Zellen direkt die morphologischen Merkmale apoptotischer Zellen ausbilden.



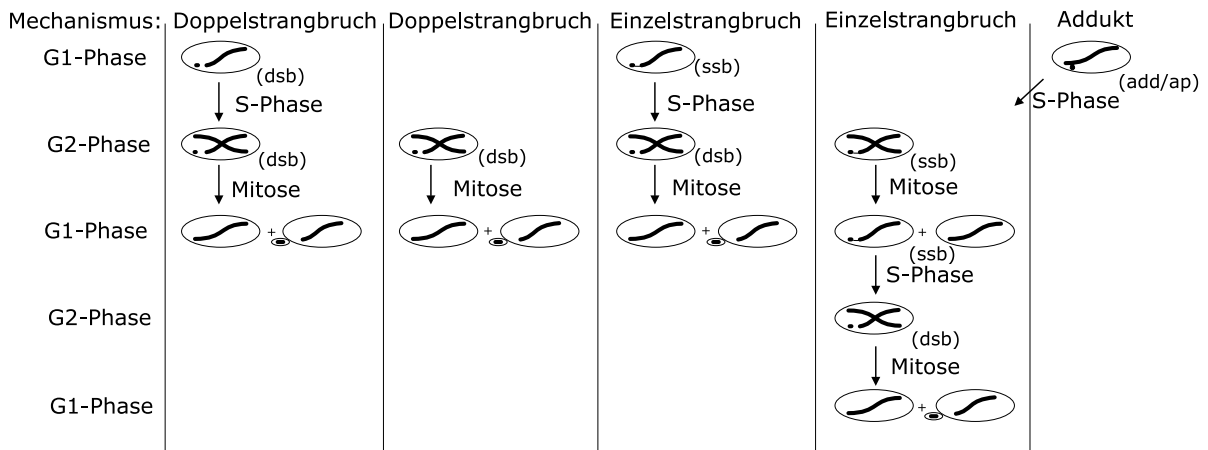


**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Mitosestadien Metaphase, Anaphase und Telophase (nach Saxton und McIntosh (1987)). MT, Mikrotubuli. Die Farben sind entsprechend dem fluoreszenzmikroskopischen Erscheinungsbild gewählt: rot,  $\alpha$ -Tubulin; blau, DNA; gelb, Kinetochore.

### 1.3 Verwendete Testsysteme zur Erfassung chemisch-induzierter Genotoxizität

#### 1.3.1 Mikrokernstest

Mikrokern sind chromatinhaltige Partikel, die von einer Kernhülle umgeben sind und zusätzlich zum Hauptkern in einer Zelle vorkommen. Sie unterscheiden sich durch ihre geringere Größe vom Zellkern. Die Entstehung von Mikrokernen kann durch Substanzbehandlung induziert werden. Mikrokern enthalten Chromosomenfragmente oder ganze Chromosomen, die nach der Zellteilung nicht in einen der Tochterkerne integriert wurden und damit aus den Zellkernen verloren gehen. Abb. 5 zeigt mögliche Ereignisse, durch die Mikrokern mit Chromosomenbruchstücken gebildet werden können und wie viel Zeit zwischen dem genetischen Schaden und seiner Darstellung als Mikrokern vergehen muss. Die Bildung von Mikrokernen, die ganze Chromosomen enthalten, erfolgt nach einem einfacheren zeitlichen Verlauf, da die Zelle zum Auftreten der Mikrokern die Mitose, aber in der Regel nicht unbedingt die S-Phase durchlaufen muss. Dieser Zeitverlauf der Mikrokerninduktion durch Chromosomenverlust geht von einer direkten Beeinflussung der mitotischen Spindel oder der Kinetochore durch die Testsubstanz aus. Fehler in der Chromosomenverteilung durch Genmutationen, beispielsweise von Genen, die Kontrollpunkte bei Eintritt in die der Mitose (O'Connell et al., 2000) oder deren Fortschreiten (Burke, 2000; Nasmyth, 1999) kontrollieren, könnten theoretisch auch erst nach längeren Nachinkubationszeiten auftreten.

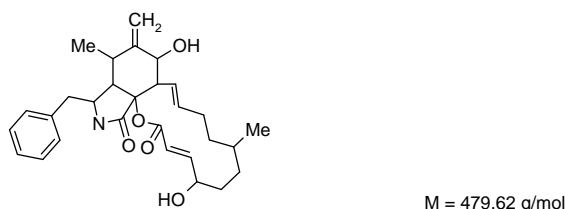


**Abb. 5:** Schematische Darstellung für die Entstehung von Mikrokernen. Reparaturmechanismen sind hier nicht berücksichtigt. (dsb: Doppelstrangbruch; ssb: Einzelstrangbruch; add: DNA-Addukt; ap: Apurine/apyrimidine Stelle)

**Mikrokerntest mit und ohne Cytochalasin B-Zugabe** Ein wichtiges Merkmal des Mikrokerntests ist, dass die Zellen zumindest eine Zellteilung durchlaufen müssen damit ein Mikrokernel gebildet werden kann. Bei Zelllinien, deren Wachstumsverhalten Schwankungen unterliegt oder bei Humanlymphozyten, die starke inter-individuellen Schwankungen hinsichtlich ihrer Stimulierbarkeit zur Zellteilung aufweisen, besteht die Gefahr, viele Zellen zu erfassen, die sich während des bei der Auswertung erfassten Zeitraums nicht geteilt haben. Daher erscheint es zweckmäßig, bei der Auswertung des Mikrokerntests nur Zellen zu erfassen, die eine Mitose vollzogen haben. Fenech und Morley (1985) haben Cytochalasin B (Abb. 6) erstmals im Mikrokerntest eingesetzt, um Zellen, die sich innerhalb eines bestimmten Zeitraums geteilt haben, zu erkennen: Nach oder bereits während der Substanzinkubation wird durch Cytochalasin B die Zytokinese der Zellen gehemmt. Alle Zellen, die eine Mitose unter Cytochalasin B-Einfluss durchgeführt haben, sind am gemeinsamen Zytoplasma erkennbar (CB-Mikrokerntest, Zytokinese-gehemmter (engl: **cytokinesis blocked**) Mikrokerntest ).

Zweikernige Zellen sind an der charakteristischen Form der Kerne (gleiche Größe und Geometrie) und der jeweiligen Lage der Kerne zueinander („Spiegelebene“ und Abstand) erkennbar (Fenech, 1997; Fenech et al., 1997). Als zusätzliche Hilfe zum Erkennen der zweikernigen Zellen wird der zytoplasmatische Mikrotubuli-Komplex (CMTC, engl: **cytoplasmic microtubuli complex**) immunologisch fluoreszenzmarkiert. Bei dem Zeitpunkt der Cytochalasin B-Zugabe ist zu beachten, dass die Cytochalasin B-Behandlung den Zeitraum einschließt, in dem theoretisch die meisten Mikrokerne gebildet werden müssten. Dabei sollten die Zellen nach Möglichkeit keine zweite Mitose unter Cytochalasin B-Einfluss durchführen, da dabei Zellen mit drei oder vier Zellkernen entstehen. Außerdem können besonders bei niedrigen Cytochalasin B-Konzentrationen zweikernige Zellen den Zytokinese-Block überwinden und nach der Kern- und Zellteilung wieder zweikernige Zellen bilden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit aneuploid sind (Zijno et al., 1994).

Bei Verwendung von Zelllinien, die eine geringe Populationsverdopplungszeit haben und deren annähernd gesamte Zellpopulation teilungsfähig ist, zum Beispiel V79, sind die Ergebnisse des Mikrokerntests mit und ohne Cytochalasin B vergleichbar (Kalweit et al., 1999).

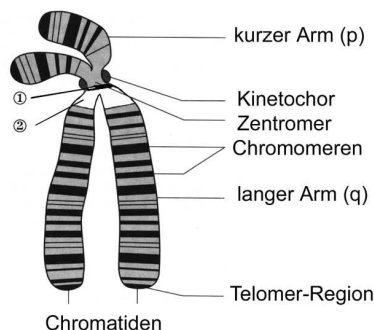


**Abb. 6:** Strukturformel von Cytochalasin B

**Unterscheidung von ganzen Chromosomen und Chromosomenbruchstücken** Die Unterscheidung, ob ein Mikrokern ganze Chromosomen oder Chromosomenbruchstücke enthält, kann auf zwei verschiedene Arten erfolgen: Bei der immunologischen Fluoreszenzmarkierung von Kinetochorproteinen (Abb. 7) werden als Primärantikörper Anti-Kinetochor-Antikörper verwendet (Eastmond und Tucker, 1989; Hermine et al., 1997; Dopp et al., 1995; Crofton-Sleigh et al., 1993). Diese stammen aus dem Serum von Personen mit bestimmten Formen von *Scleroderma pigmentosum* (CREST: **C**alcinosis cutis, **R**aynauds-Phänomen, ösophagealer (engl: esophagus) **D**ysfunktion, **S**klerodaktylie und **T**eleangiektasien). Die Primärantikörper werden mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht. Die Annahme, dass bei Vorhandensein der Kinetochorregion ein ganzes Chromosom vorliegt (Kinetochor-positiver Mikrokern), ist eine Vereinfachung, da auch Chromosomenbruchstücke zufällig die Kinetochorregion enthalten können. Eine potenzielle Fehlerquelle bei dieser Art der Detektion liegt bei der Ablösung des Kinetochors vom Chromosom (beispielsweise durch Mitomycin C oder Koffein) oder einer Kinetochorveränderung vor, die seine Eigenschaften als Antigen für die CREST-Antikörper beeinträchtigt. Derartige Kinetochorschäden könnten Mikrokerne induzieren, die ganze Chromosomen enthalten, obwohl sie kein Fluoreszenzsignal aufweisen.

Eine weitere Unterscheidungsmöglichkeit von Mikrokernen mit ganzen Chromosomen oder Chromosomenfragmenten stellt die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) dar. Das Prinzip der FISH ist in Abb. 8 (Kap. 1.3.2) zu sehen. In diesem Falle werden fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden für die Zentromere und/oder die Telomere der Chromosomen eingesetzt (Humpage et al., 2000; Kirsch-Volders et al., 1997; Elhajouji et al., 1995). Beim kombinierten Einsatz der Zentromer- und Telomersonden kann sichergestellt werden, dass ein ganzes Chromosom und nicht nur ein zentromerhaltiges Chromosomenbruchstück detektiert wird (Kirsch-Volders et al., 1997; Tusell et al., 1996; Miller und Nüsse, 1993; Miller et al., 1992).

In der Praxis sind die Ergebnisse, die mit der immunologischen und der FISH-Methode zur Unterscheidung von Aneuploidogenen und Klastogenen ermittelt werden, meist vergleichbar (Kallio und Lahdetie, 1996).



**Abb. 7:** Schema eines Chromosoms; Lage der Kinetochor-Proteine, der  $\alpha$ -Satellitenregion (1) und der klassischen Satellitenregion (2) (nach Plattner und Hentschel, 1997)

**Standardisierung des Mikrokerntests** Die mittlerweile weit verbreitete Anwendung des Mikrokerntests hat das Bedürfnis nach einer gewissen Standardisierung zur Qualitätskontrolle und besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Labors mit sich gebracht. So wurde versucht sowohl auf nationaler (Miller et al., 1998) als auch internationaler Ebene (Kirsch-Volders et al., 2000) allgemein anerkannte Anforderungen an einige Versuchsparameter beim Mikrokerntest aufzustellen. Hier eine Zusammenfassung der wichtigsten Versuchsparameter:

- **Zellen** Die Wahl der Zelllinie ist frei, sollte jedoch begründet sein und die Verdopplungszeit sowie die spontane Mikrokernrate in Betracht ziehen (Kirsch-Volders et al., 2000). Miller et al. (1998) ergänzen dies um die Forderung bei Routinetests die am weitesten verbreiteten Zelllinien wie Hamsterzelllinien (V79, CHO), Mauslymphomzellen oder Humanlymphozyten einzusetzen.
- **Fixierung der Zellen** Kirsch-Volders et al. (2000) verlangen eine Fixiermethode, die die Integrität der Zellmembran erhält und Klumpen vermeidet, und sie unterstützen die Verwendung eines Fluoreszenzfarbstoffs zur besseren Detektion kleiner Mikrokern.
- **Analyse** Erste Kriterien zur Analyse von Mikrokernen wurden von Countryman und Heddle (1976) veröffentlicht und haben sich in neueren Stellungnahmen im Prinzip nicht geändert: Der Durchmesser eines Mikrokerns sollte  $< 1/3$  des Radius des Hauptkerns betragen und der Mikrokern klar vom Hauptkern unterscheidbar sein. Beim CB-Mikrokerntest sollen die Tochterkerne klar unterscheidbar sein. Außerdem sollen keine Mikrokern in apoptotischen Zellen gezählt werden (Kirsch-Volders et al., 2000). Diese allgemeinen Auswahlkriterien wurden von Fenech (2000a) weiter ergänzt und für den CB-Mikrokerntest optimiert:

Anforderungen an die Tochterkerne in zweikernigen Zellen:

- intakte Kernmembran
- im selben Zytoplasma, dessen Grenze oder Zellmembran intakt und von den benachbarten Zellen unterscheidbar ist
- ungefähr gleich groß
- gleiches Farbmuster und gleiche Farbintensität
- können durch eine Nukleoplasmabrücke verbunden sein, sofern diese dünner als  $1/4$  des Kernradius ist
- können sich berühren, sollten sich im Idealfall aber nicht überlappen
- können bei Überlappung gezählt werden, wenn die Grenzen jedes Kerns erkennbar sind

Anforderungen an Mikrokerne in zweikernigen Zellen:

- Durchmesser 1/16 bis 1/3 des Kerndurchmessers
- nicht lichtbrechend
- nicht mit den Hauptkernen verbunden
- können die Hauptkerne berühren aber nicht überlappen, die Grenze des Mikrokerns muss von der Kernmembran klar unterscheidbar sein
- meist die gleiche Farbtintensität wie die Hauptkerne, können aber gelegentlich intensiver gefärbt sein

Zellkernausstülpungen (Genamplifizierung und Ausknospung dieser Gene als „Buds“ während der S-Phase), die schließlich vom Kern gelöst werden und einen Mikrokern bilden (Shimizu et al., 1998), sollten nicht als Mikrokern gezählt werden.

- **Toxizität** Parallel zu jedem Mikrokerntest-Ergebnis sollten Daten zur Zytotoxizität der getesteten Substanzkonzentrationen vorliegen. Hinsichtlich der Nachweismethode von Zytotoxizität (Zellwachstum, Zellzahl, Anteil an zweikernigen Zellen, Proliferationsindex, Konfluenz) werden keine Präferenzen gezeigt, jedoch sollten die Testbedingungen möglichst nahe denen des Mikrokerntests sein. Bei Routinetests sollte die höchste getestete Konzentration (nach einer beliebigen Methode) mindestens 50 % Zytotoxizität induzieren (Kirsch-Volders et al., 2000; Miller et al., 1998).
- **Cytochalasin B** Die Zugabe von Cytochalasin B beim Mikrokerntest ist umstritten. In Humanlymphozyten wird die Anwendung des CB-Mikrokerntests verlangt. Für andere Zelllinien konnte bisher weder ein klarer Vor- noch Nachteil des CB-Mikrokerntests gezeigt werden, daher bleibt die Verwendung optional (Kirsch-Volders et al., 2000; Miller et al., 1998). Kirsch-Volders et al. (2000) verweisen auf weitere Untersuchungen mit und ohne Cytochalasin B, um diese Fragestellung zu lösen.
- **Dauer der Substanzbehandlung** Kirsch-Volders et al. (2000) schlagen in Anlehnung an den Chromosomenaberrationstest eine kurze Substanzbehandlung mit Erholungszeit und eine lange Behandlung mit oder ohne Erholungszeit vor. Miller et al. (1998) erweitern dies um eine Behandlungsdauer von mindestens 0,5 Verdopplungszeiten (besser 1 Zellzyklusdauer) zusätzlich zu einer Kurz- und einer Langzeitbehandlung bei der Routineprüfung neuer Substanzen.

### 1.3.2 Erfassung von Chromosomenfehlverteilung (Nondisjunction) mittels FISH

Aneuploidogene können neben dem Verlust von Chromosomen als Mikrokern auch Fehlverteilungen von Chromosomen zwischen den Tochterkernen induzieren. Durch eine Modifikation des CB-Mikrokerntests kann diese numerische Chromosomenaberration erfasst werden. Mittels FISH (Prinzip siehe Abb. 8) werden Chromosomenabschnitte einzelner Chromosomen mit einer fluoreszenzmarkierten DNA-Sonde sichtbar gemacht, und so die Anzahl dieser Chromosomen in den Tochterkernen bestimmt. Während zwei diploide Zellkerne je 2 Kopien eines Chromosoms enthalten (2 Fluoreszenzsignale), enthält nach einer Chromosomenfehlverteilung ein Tochterkern nur 1 oder 0 Kopien (**Hypodiploidie**) und der andere Tochterkern 3 oder 4 Kopien des markierten Chromosoms (**Hyperdiploidie**). Die Auswertung in zweikernigen Zellen ist zur Erfassung von Nondisjunction gut geeignet, da nur zweikernige Zellen mit der „richtigen“ Anzahl an Signalen ausgewertet werden und so Fehlermöglichkeiten wie Artefaktbildung oder Überlagerungen weitgehend ausgeschlossen werden können (Doherty et al., 1996; Elhajouji et al., 1997). Eine weitere Minimierung von Fehlinterpretationen stellt die Markierung zweier benachbarter Chromosomenregionen dar (Eastmond und Pinkel, 1990; Dopp et al., 1997; Dopp und Schiffmann, 1998). In Abb. 9 sind die mittels CB-Mikrokerntest mit immunologischer Kinetochorfärbung und CB-Mikrokern mit FISH erfassbaren Endpunkte dargestellt.

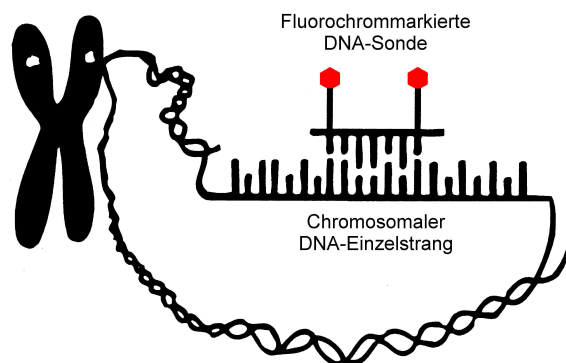
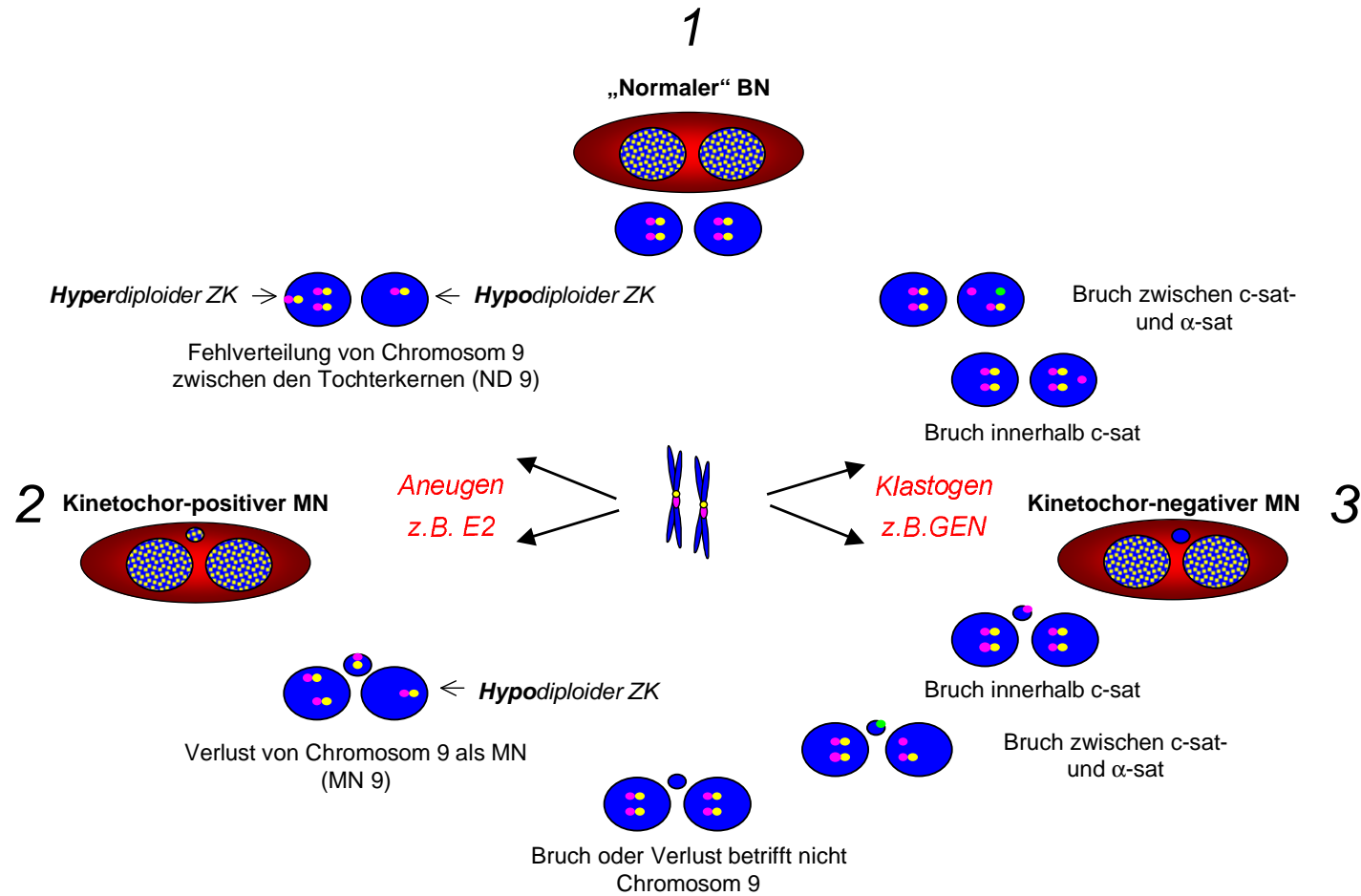


Abb. 8: Prinzip der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (Cremer et al., 1995)



**Abb. 9:** Schematische Darstellung der Detektion möglicher genetischer Schäden in zweikernigen Zellen mittels Tandem-FISH zweier benachbarter Regionen auf Chromosom 9 oder CB-Mikrokerntest nach immunologischer Markierung der Kinetochorproteine und des zytoplasmatischen Mikrotubuli-Komplexes. ND, Nondisjunktion; MN, Mikrokern; ZK, Zellkern; E2, 17β-Estradiol; GEN, Genistein; gelbe Kreise, α-Satellitenregion (α-sat); rote Kreise, klassische Satellitenregion (c-sat).



## 2 Problemstellung

Bei Untersuchungen zum genotoxischen Potenzial verschiedener estrogen wirksamer Substanzen zeigte sich, dass sich bei Isoflavonen geringfügige Änderungen der Substituenten am A- oder B-Ring hinsichtlich des genotoxischen Potenzials dieser Substanzen stark bemerkbar machen. So wirkt Genistein als Klastogen, während Daidzein, das sich vom Genistein nur durch das Fehlen der Hydroxy-Gruppe in 5-Position unterscheidet, im getesteten Konzentrationsbereich ohne biologische Aktivität ist. Im Gegensatz dazu hat Biochanin A, ein Genisteinmonomethylether, in V79-Zellen ein aneugenes Potenzial. Daher wurden Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung bei Isoflavonen mit verschiedenen Substituenten am A- und B-Ring durchgeführt.

Als Testsysteme sollten der Mitosearresttest und der Mikrokerntest dienen. Beide sind etablierte Testsysteme, die in unserem Arbeitskreis bisher in kultivierten V79-Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters durchgeführt werden. Neben den untersuchten Isoflavonen können Estrogene wie das natürliche Estrogen E2, das synthetische Estrogen DES und viele estrogen aktive Substanzen Aneuploidie *in vitro* induzieren. Interessant ist die Aneuploidie-Induktion durch verschiedene Estrogene, da sich bei Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Estrogenen die Fähigkeit zur Zelltransformation proportional zu der Stärke des aneuploidogenen und nicht des estrogenen Potenzials verhält. Aus diesem Grund wurde verstärktes Augenmerk auf Methoden zur Detektion von Aneuploidie gelegt.

Neben der Detektion von Chromosomenverlust mit dem angewandten Mikrokerntest sollte als weiterer Endpunkt die Induktion von Chromosomenfehlverteilungen mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden. Kommerzielle DNA-Sonden sind vor allem für humane Chromosomenabschnitte erhältlich. Als Testsystem wurde daher eine diploide primäre menschliche Zelllinie ausgewählt. Nach Etablierung der Methode mit kommerziell erhältlichen DNA-Sonden sollten die benötigten DNA-Sonden nach Modifikation einer bereits veröffentlichten Vorschrift mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und teilweise bereits bei der Polymerase-Kettenreaktion, teilweise im Anschluss daran mittels Nick-Translation mit einem Fluorochrom markiert werden.

Da die Isoflavone in den einsetzbaren Konzentrationen kein aneuploidogenes Potenzial in mehreren menschlichen und einer nicht-menschlichen Zelllinie aufwiesen, wurden zur Methodenetablierung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung die Aneuploidogene 17 $\beta$ -Estradiol, Diethylstilbestrol und die Bisphenole Bisphenol A, Dimethylbisphenol A und Tetramethylbisphenol A verwendet. Diese hatten sich in vorangehenden Untersuchungen unseres Arbeitskreises als potente Aneugene in kultivierten V79-Zellen, aber auch in humanen Tumorzelllinien erwiesen. Zur besseren Handhabung des Nachweis von Nondisjunction mittels Fluoreszenz-*in situ*-

Hybridisierung war die Einführung des Zytokinese-gehemmten Mikrokerntests notwendig. Zur Bewertung der Ergebnisse war ein Vergleich dieser Mikrokerntestvariante mit dem in herkömmlicher Weise in unserem Arbeitskreis verwendeten Mikrokerntest unabdingbar. Ein Inkubationsprotokoll, das beide Methoden einschließt und direkt vergleichbar macht, sollte entwickelt, und die Eignung der Mikrokerntestvarianten für die verschiedenen Substanzen beurteilt werden.

### 3 Ergebnisse und Diskussion der biologischen Aktivität verschiedener Isoflavonoide

Die untersuchten Isoflavone FORM, KUL, PRU und GDME sowie das Isoflavan EQU (Strukturformeln in Abb. 2 in Kap. 1.1.3) weisen qualitativ eine ähnliche biologische Aktivität in kultivierten V79-Hamsterzellen auf. Aus diesem Grund werden diese Isoflavonoide in den folgenden Abschnitten zumeist gemeinsam diskutiert.

#### 3.1 Effekte in V79-Zellen

##### 3.1.1 Zytotoxizität

In Tab. 2 ist der Einfluss der Exposition von V79-Zellen mit Isoflavonoiden auf die Lebendzellzahl im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle dargestellt. Nach 6-stündiger Substanzbehandlung, wie sie in den folgenden Genotoxizitätstests erfolgt, nimmt in V79-Zellen bei allen Substanzen, außer FORM, die Lebendzellzahl im Vergleich zur Kontrolle ab. Bei KUL, EQU und PRU wird bei der höchsten eingesetzten Konzentration die Grenze zur Zytotoxizität erreicht. Von Zytotoxizität kann dann sicher ausgegangen werden, wenn die Lebendzellzahl nach der Substanzinkubation geringer ist als vor der Substanzinkubation. Dies ist bei optimalem Wachstum theoretisch der Fall, wenn die Lebendzellzahl im Vergleich zur Kontrolle nach 6 h unter 67 %, nach 12 h unter 50 %, nach 24 h unter 25 % und nach 48 h unter 6,3 % absinkt. Bedingt durch die größeren Zellzahlen wird der konzentrationsabhängige Rückgang der Lebendzellzahlen nach längeren Inkubationszeiten deutlicher.

##### 3.1.2 Mitosearrest

Abb. 10 zeigt die Substanz- und Konzentrationsabhängigkeit des Metaphasearrests durch die untersuchten Isoflavonoide. Bei allen untersuchten Substanzen und den meisten Konzentrationen ist es auffällig, dass der beobachtete Mitosearrest genauso wie nach E2-Behandlung nicht vollständig ist, da weiterhin Ana- und Telophasen auftreten und die Mitose somit beendet wird. Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Isoflavonoide im Mitosearresttest aufgeführt.

**FORM** In Abb. 10 ist zu sehen, dass nach Inkubation von V79-Zellen mit 25  $\mu\text{M}$  bis 75  $\mu\text{M}$  FORM die Anzahl der (Pro-)Metaphasen konzentrationsabhängig bis zu dem dreifachen Wert der Lösungsmittelkontrolle ansteigt (Anstieg der Mittelwerte von 34 auf 102 (Pro)Metaphasen pro 1000 Zellen). Ab 75  $\mu\text{M}$  FORM ist mit einer Erhöhung der Konzentration der Effekt nicht weiter zu steigern. Höhere Konzentrationen als 100  $\mu\text{M}$  FORM sind in Medium mit 1 % DMSO als Lösungsvermittler nicht löslich.

**Tabelle 2:** Relative Lebendzellzahl (LZZ) nach Inkubation von V79-Zellen mit verschiedenen Isoflavonoiden (in Prozent). 100 % entspricht der Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO). Die Inkubationszeit 6 + 21 bedeutet 21-stündige substanzfreie Nachinkubation nach 6-stündiger Substanzbehandlung. \*, LZZ nach Substanzexposition < LZZ vor Substanzexposition.

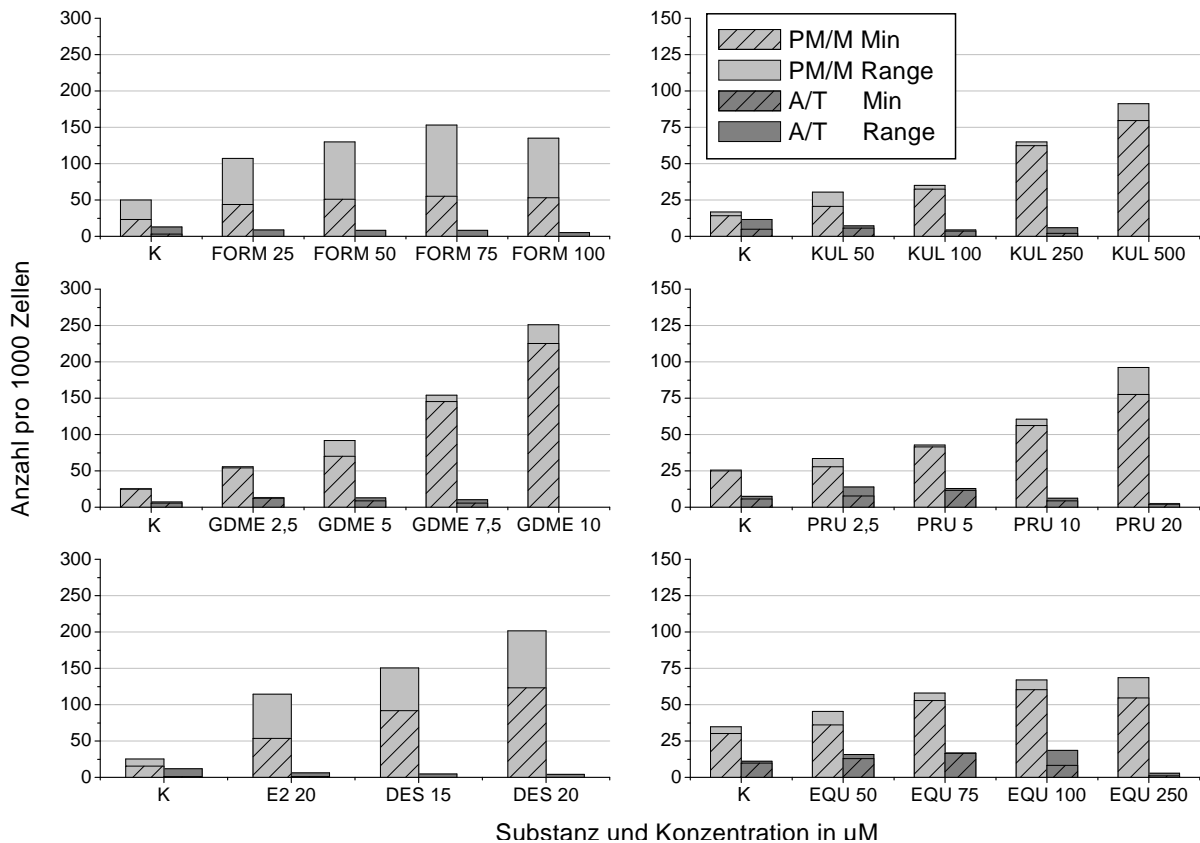
Isoflavonoid	Konz. in $\mu\text{M}$	Substanzbehandlung in h				
		6	12	24	48	6 + 21
FORM	25	94	89	88	66	89
	50	93	93	69	27	75
	75	90	83	55	30	64
	100	96	84	53	44	64
KUL	50	98	91	82	74	87
	100	82	77	68	51	78
	150	79*	75	51	38	70
	200	70*	70	44	26	35
EQU	50	98	95	85	57	91
	100	90	80	52	25	73
	250	69	45	22	6*	61
	500	57*	29*	14*	3*	31
PRU	7,5	88	81	74	70	99
	10	91	83	88	68	93
	15	93	75	66	42	87
	20	65*	62	45	16	72
GDME	2,5	95	91	96	97	98
	5	93	92	67	61	82
	7,5	87	89	50	27	79
	10	80	81	47	20	81

**KUL** Ein ähnliches Bild zeigt sich nach Inkubation der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  bis 500  $\mu\text{M}$  KUL. Bis zu der höchsten getesteten Konzentration steigt die Anzahl an (Pro-)Metaphasen bis zu dem drei- bis vierfachen des Kontrollwertes konzentrationsabhängig an, wobei die beiden höchsten getesteten Konzentrationen bereits zytotoxisch wirken (Tab. 2). Eine Konzentration von 500  $\mu\text{M}$  KUL ist dabei nur noch bedingt löslich.

**PRU** Nach Exposition mit 5  $\mu\text{M}$  bis 20  $\mu\text{M}$  PRU (Löslichkeitsgrenze) ist ein konzentrationsabhängiger Metaphasearrest zu beobachten. Die höchste getestete Konzentration ist dabei zytotoxisch (Tab. 2).

**GDME** Wie die bereits diskutierten Isoflavone hat auch GDME das Potenzial, V79-Zellen in der Metaphase zu arretieren. Dieser Effekt ist im Vergleich zu FORM, KUL und PRU allerdings deutlich stärker ausgeprägt: Bereits nach Behandlung von V79-Zellen mit 2,5  $\mu\text{M}$  GDME verdoppelt sich die Anzahl der Zellen, die sich in der (Pro-)Metaphase befinden und steigt dann konzentrationsabhängig stark an, um nach Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  GDME (Löslichkeitsgrenze) das Zehnfache des Kontrollwertes zu erreichen (250 Metaphasen bei 1000 ausgewerteten Zellen). Dies befindet sich im Größenordnungsbereich des Mitosearrests nach Behandlung von V79-Zellen mit 20  $\mu\text{M}$  DES.

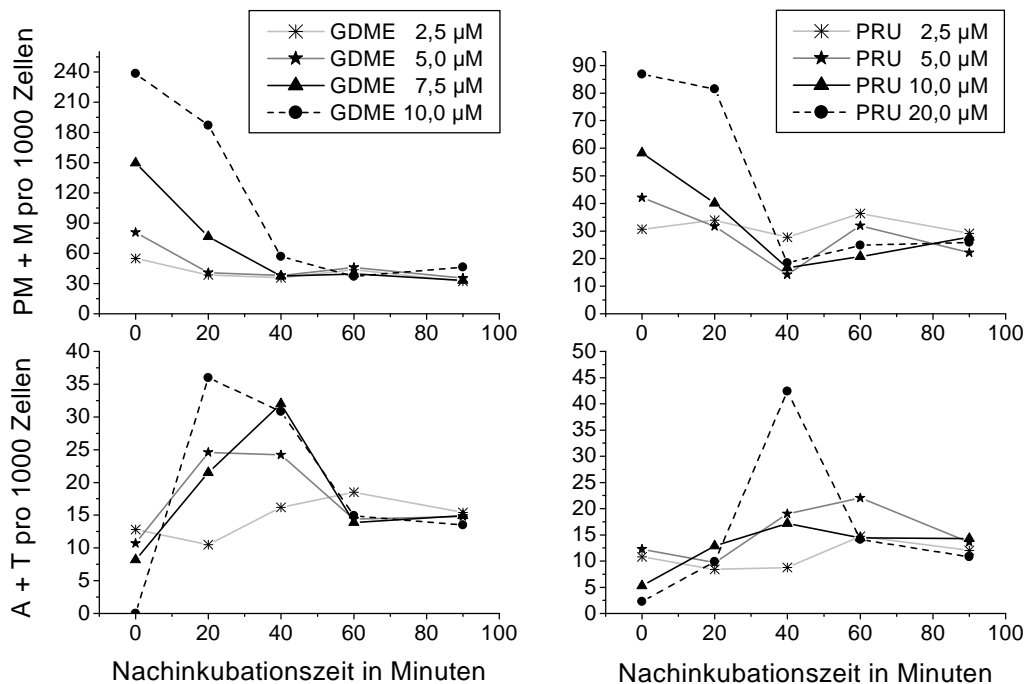
**EQU** Durch EQU wird nur ein leichter Mitosearrest induziert. Der maximale Effekt wird nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  EQU mit dem Doppelten bis Dreifachen an (Pro-)Metaphasen gegenüber der Kontrolle beobachtet.



**Abb. 10:** Anzahl der Prometa- und Metaphasen (PM + M) und Ana- und Telophasen (A + T) pro 1000 Zellen nach 6-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit verschiedenen Isoflavonoiden sowie mit E2 oder DES. Range, Differenz zwischen dem Minimal- und dem Maximalwert bei einer Doppel- oder Mehrfachbestimmung. Man beachte die unterschiedliche Y-Achseinteilung in der rechten und linken Spalte.

### 3.1.3 Reversibilität des Mitosearrests

Der substanzinduzierte Mitosearrest bei den untersuchten Isoflavonoiden, sowie bei DES und E2, ist nach dem Entfernen der Testsubstanz reversibel. In Abb. 11 ist die Abhängigkeit der Anzahl an Zellen, die sich in der (Pro-)Metaphase, beziehungsweise in der Ana- und Telophase befinden, von der substanzfreien Nachinkubationszeit am Beispiel von PRU- oder GDME-behandelten V79-Zellen dargestellt. Nach Inkubation mit einem der beiden Isoflavone ist die Anzahl an (Pro-)Metaphasen konzentrationsabhängig erhöht. Während der substanzfreien Nachinkubationszeit sinkt sie bei den niedrigen Konzentrationen innerhalb von 20 Minuten, bei den höheren Substanzkonzentrationen innerhalb 40 Minuten wieder auf ein normales Niveau ab. Parallel dazu nimmt die Anzahl an Ana- und Telophasen rasch zu, erreicht nach 20 bis 40 Minuten ein Maximum und sinkt danach auf ein normales Maß ab. Das heißt, dass die in der Metaphase arretierten Zellen nach dem Entfernen der Isoflavone den Anaphase-Kontrollpunkt (siehe 1.2.4) überschreiten und zur Ana- und dann zur Telophase übergehen können. Die Anzahl der Ana- und Telophasen steigt nicht so stark an wie die Anzahl der (Pro-)Metaphasen abnimmt, was in der geringen Zeitspanne von der Metaphase bis zur Telophase begründet sein kann.



**Abb. 11:** Reversibilität des Metaphasearrests nach 6-stündiger Behandlung von V79-Zellen mit den Isoflavonen GDME (linke Spalte) oder PRU (rechte Spalte). Obere Reihe, Anzahl der Prometa- und Metaphasen (PM + M) pro 1000 Zellen; untere Reihe, Anzahl der Ana- und Telophasen (A + T) pro 1000 Zellen in Abhängigkeit von der substanzfreien Nachinkubationszeit.

Zur Auswertung wurden lediglich die Chromosomen der Zellen mit einem blauen Fluoreszenzfarbstoff (DAPI) sichtbar gemacht. Da der Verlauf der Mitose nicht kontinuierlich beobachtet werden konnte, wurden die Zellen beim Herauslaufen aus dem Mitosearrest im Abstand von 20 Minuten fixiert und ausgewertet. Innerhalb dieser Zeit könnten Zellen die Mitose bereits vollendet haben und daher nicht erfasst worden sein. Dies könnte besser gezeigt werden durch gleichzeitige immunologische Färbung des Spindelapparates, da dann die einzelnen Mitosestadien besser identifiziert, und gerade erst beendete Mitosen noch längere Zeit an der Struktur des Mikrotubuli-Apparates identifiziert werden können.

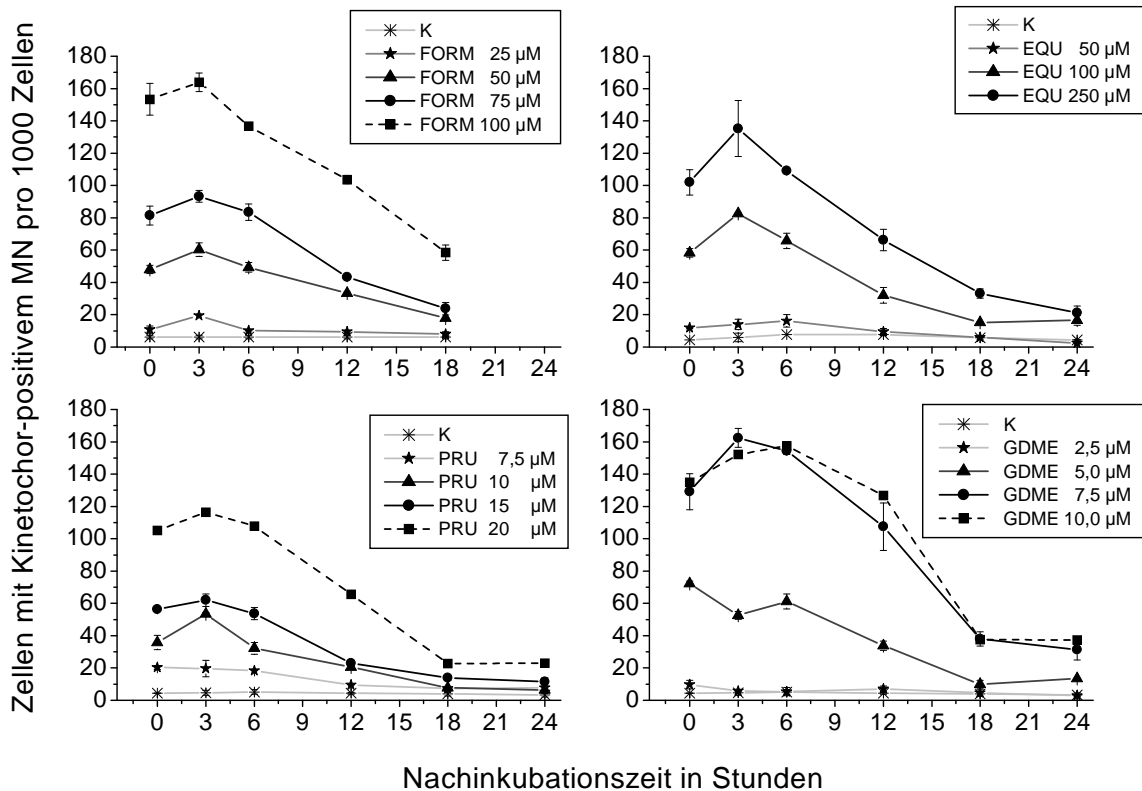
### 3.1.4 Mikrokerninduktion

Alle untersuchten Isoflavonoide induzieren in kultivierten V79-Zellen konzentrationsabhängig Kinetochor-positive Mikrokern. In Abb. 12 ist die Mikrokerninduktion durch verschiedene Isoflavonoid-Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten der substanzfreien Nachinkubation der Zellen zu sehen. Bei allen Isoflavonoiden zeigt die hohe Anzahl an Zellen mit Kinetochor-positivem Mikrokern direkt nach der Substanzbehandlung, dass die Substanzen keinen vollständigen Mitosearrest induzieren, sondern bereits während der Substanzexposition fehlerhafte Mitosen durchlaufen werden, die zum Verlust von ganzen Chromosomen aus den Tochterkernen führen. Dies wird durch das Auftreten von Ana- und Telophasen unter Substanzeinfluss (Abb. 10) bestätigt. Die Mikrokernrate erlangt nach 3-stündiger substanzfreier Nachbehandlungszeit ein Maximum, da zu diesem Zeitpunkt auch die durch die Isoflavonoide in der Mitose arretierten Zellen die Mitose fortgesetzt und sich geteilt haben. Die dabei resultierenden Tochterzellen haben mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Mikrokern.

**FORM** Im Konzentrationsbereich von 50  $\mu\text{M}$  bis 100  $\mu\text{M}$  induziert FORM Mikrokern, die ein Kinetochor-Signal enthalten. Obwohl es viel schwächer Mitosearrest induziert als beispielsweise GDME, ist FORM mit der Induktion von 170 mikrokernhaltigen Zellen/1000 Zellen (100  $\mu\text{M}$ ) ein genauso starker Induktor von Kinetochor-positiven Mikrokernen wie GDME, das einen sehr starken Anstieg der Anzahl der Zellen, die sich in der Mitose befinden, auslöst.

**PRU** Es kann ein zahlenmäßiger Anstieg der Zellen mit Kinetochor-positivem Mikrokern bei nicht-zytotoxischen PRU-Konzentrationen nachgewiesen werden. So ist nach Inkubation mit 7,5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  PRU eine Erhöhung der Anzahl mikronukleierter Zellen (von 20 über 40 auf 60/1000 Zellen gegenüber  $6\pm 1/1000$  Zellen in der Lösungsmittelkontrolle) zu beobachten. Die höchste getestete PRU-Konzentration ist zytotoxisch (Tab. 2). Da bei der Auswertung nur die Kinetochore und die DNA gefärbt wurden, so dass eine fälschliche Miterfassung

von Kernzerfall und Ungenauigkeiten bei der Zuordnung der Mikrokerne zu den Hauptkernen (gerade wenn mehrere Mikrokerne pro Zelle induziert werden) bei der mit  $20 \mu\text{M}$  festgestellten Mikrokernrate nicht auszuschließen sind, könnte die hohe Mikrokernrate bei dieser Konzentration ein Artefakt sein.



**Abb. 12:** Induktion Kinetochor-positiver Mikrokerne durch 6-stündige Inkubation von V79-Zellen mit den Isoflavonen FORM, PRU und GDME sowie mit dem Isoflavan EQU und unterschiedlich langer substanzfreier Nachinkubationszeit. Die Fehlerbalken geben den Abstand des Minimal- und Maximalwertes einer Doppelbestimmung an.

**GDME** Obwohl GDME einen starken Mitosearrest induziert (Abb. 10), sind auch bei dieser Substanz bereits direkt nach der Substanzbehandlung viele Zellen mit Mikrokernen zu beobachten (Abb. 12). Nach Inkubation mit  $10 \mu\text{M}$  können zwar keine Ana- und Telophasen mehr beobachtet werden, der Mitosearrest scheint aber trotzdem auch bei dieser Konzentration nicht vollständig zu sein. Zur besseren Unterscheidung der Mitosestadien erscheint auch hier eine immunologische Markierung des Spindelapparates zur Auswertung des Mitosearresttests



angebracht. Die Steigerung der Mikrokernrate bei der folgenden substanzfreien Nachinkubation ist niedriger als erwartet. Das könnte daran liegen, dass sich nicht alle in der Mitose arretierten Zellen nach Entfernung der Testsubstanz erholen, sondern zum Teil direkt, zum Teil nach Durchlaufen der Mitose die morphologischen Merkmale apoptotischer Zellen annehmen. Die höchste eingesetzte GDME-Konzentration (10  $\mu\text{M}$ ) unterscheidet sich hinsichtlich der Mikrokerninduktion nicht von 7,5  $\mu\text{M}$ , obwohl sich die Anzahl arretierter Mitosen deutlich unterscheidet.

**EQU** Nach 6-stündiger Behandlungszeit induziert EQU in V79-Zellen zwar kaum Mitosearrest, aber viele Zellen beinhalten nach der Substanzbehandlung einen Mikrokern (60/1000 bei 100  $\mu\text{M}$  und 100/1000 bei 250  $\mu\text{M}$  EQU). Nach 3-stündiger substanzfreier Nachinkubation erreicht die Mikrokernrate mit 80, beziehungsweise 140 Zellen mit Mikrokern/1000 Zellen ein Maximum.

**KUL** Die Ergebnisse des Mikrokerntests mit KUL werden graphisch nicht dargestellt, da zwar eine schwache Erhöhung der Mikrokernrate beobachtet werden kann (von 6 in der Kontrolle über 13 auf 24/1000 nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$ , beziehungsweise 100  $\mu\text{M}$ ), eine deutliche Erhöhung (63/1000) allerdings erst nach Inkubation mit der höchsten, zytotoxischen KUL-Konzentrationen (200  $\mu\text{M}$ ) erfolgt.

## 3.2 Effekte in AG01522C-Fibroblasten

### 3.2.1 Zytotoxizität

Die Lebendzellzahlen von AG01522C-Fibroblasten nach Behandlung mit verschiedenen Isoflavonoiden sind Tab. 3 zu entnehmen. Nach Substanzinkubation von Zellen mit jeder eingesetzten Konzentration der Isoflavone FORM, KUL, PRU und GDME für 0,5; 1 und 2 Verdopplungszeiten ist kein deutlicher Einfluss auf die Zellzahl zu beobachten. Die beiden höchsten eingesetzten Konzentrationen von EQU dagegen sind zytotoxisch. Von Zytotoxizität ist theoretisch in AG01522C-Zellen auszugehen, wenn die relative Lebendzellzahl bei optimalem Wachstum nach 12 h unter 67 %, nach 24 h unter 50 % und nach 48 h unter 25 % sinkt.

**Tabelle 3:** Relative Lebendzellzahl (LZZ) nach Inkubation von AG01522C-Zellen mit verschiedenen Isoflavonoiden (in Prozent). 100 % entspricht der Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO). \*, LZZ nach Substanzexposition < LZZ vor Substanzexposition.

Isoflavonoid	Konz. in $\mu\text{M}$	Inkubationszeit in h		
		12	24	48
E2	25	94	96	80
	50	87	90	72
	75	79	88	66
	100	80	83	54
FORM	25	104	101	110
	50	108	100	100
	75	101	98	106
	100	98	101	103
KUL	50	110	86	84
	100	102	82	90
	150	89	77	76
	200	90	70	60
EQU	50	98	94	108
	100	85	92	107
	250	66*	72*	86
	500	58*	50*	36*
PRU	7,5	85	96	99
	10	89	99	103
	15	89	93	100
	20	86	87	107
GDME	2,5	101	102	102
	5	104	94	96
	7,5	95	90	97
	10	105	93	88

### 3.2.2 Mitosearrest

Die Induktion eines starken Mitosearrests durch die untersuchten Isoflavonoide kann bereits aufgrund der Ergebnisse des Zytotoxizitätstests ausgeschlossen werden. Tab. 4 zeigt das Ergebnis des Mitosearresttests in AG01522C-Fibroblasten mit den Isoflavonoiden und E2. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, induziert außer E2 keine der getesteten Substanzen eine Erhöhung der Anzahl an Zellen, die sich in der Metaphase befinden. Auch die Anzahl der Ana- und Telophasen sowie der apoptotischen Zellen unterscheidet sich nicht von der in Kontrollzellen. Nach 24-stündiger Substanzbehandlung (1 Verdopplungszeit von AG011522C-Fibroblasten) fällt auf, dass bei E2-Behandlung die Zahl der (Pro-)Metaphasen zugunsten apoptotischer Zellen abnimmt.

**Tabelle 4:** Anzahl an Prometa- und Metaphasen (PM + M), Ana- und Telophasen (A + T) und apoptotischen Zellen (APOP) pro 1000 Zellen nach 12- und 24-stündiger Substanzbehandlung von AG01522C-Fibroblasten. K, Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO); n.n., nicht nachweisbar. Werte aus 2 parallelen Bestimmungen, durch unabhängige Doppelbestimmung bestätigt.

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Anzahl pro 1000 Zellen					
		12 h			24 h		
		PM + M	A + T	APOP	PM + M	A + T	APOP
K		25	9	2	20	8	3
E2	100	245	0	2	57	0	77
BCA	25	25	7	1	23	7	2
FORM	100	26	11	n.n.	18	7	1
KUL	250	25	9	1	20	8	0
EQU	250	21	5	1	13	3	7
PRU	15	29	11	1	20	8	1
GDME	7,5	24	7	n.n.	21	6	1

### 3.2.3 Mikrokerninduktion

**FORM, KUL, PRU, GDME, PRU und EQO** Nachdem die genannten Isoflavonoide in Humanfibroblasten keinen Mitosearrest induzieren und nach Auswertung der Objektträger des Mitosearresttests auch keine Hinweise auf eine Erhöhung der Mikrokernrate direkt nach Substanzexposition vorliegen, wurde auf weitere Mikrokerntests verzichtet.

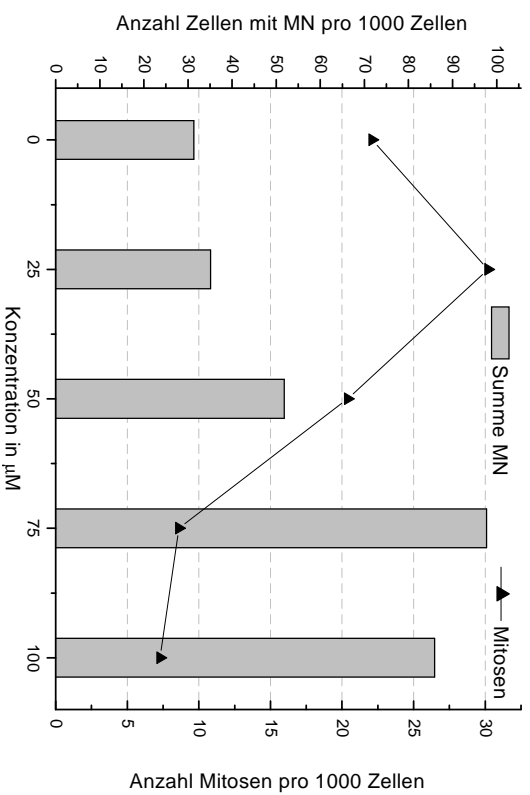
**GEN** In V79-Zellen konnte von Kulling und Metzler (1997) bereits die Induktion Kinetochor-negativer Mikrokerne durch GEN gezeigt werden. Auch in kultivierten Humanlymphozyten konnten Kulling et al. (1999) das klastogene Potenzial von GEN bestätigen. Daher sollte hinsichtlich der geringeren Empfindlichkeit der Humanfibroblasten gegenüber aneuploidogenen Isoflavonoiden das klastogene Potenzial von GEN in AG0152C-Fibroblasten mittels Mikrokerntest mit und ohne Cytochalasin B-Zugabe überprüft werden. Wie in Abb. 13 und Abb. 14 zu sehen ist, steigt bei beiden Testvarianten die Anzahl an Zellkernen mit Mikrokern nach Behandlung von AG01522C-Zellen mit GEN bis 75  $\mu\text{M}$  konzentrationsabhängig an. Dabei ist der überwiegende Anteil dieser Mikrokerne Kinetochor-negativ, enthält also Chromosomenbruchstücke. Parallel dazu sinkt die Anzahl der Mitosen (Abb. 13), beziehungsweise der Anteil zweikerniger Zellen (Abb. 14) ab. Dies spricht für eine deutliche Wachstumshemmung und/oder Zytotoxizität von GEN.

### 3.3 Mitosearrest in HCV-Zellen

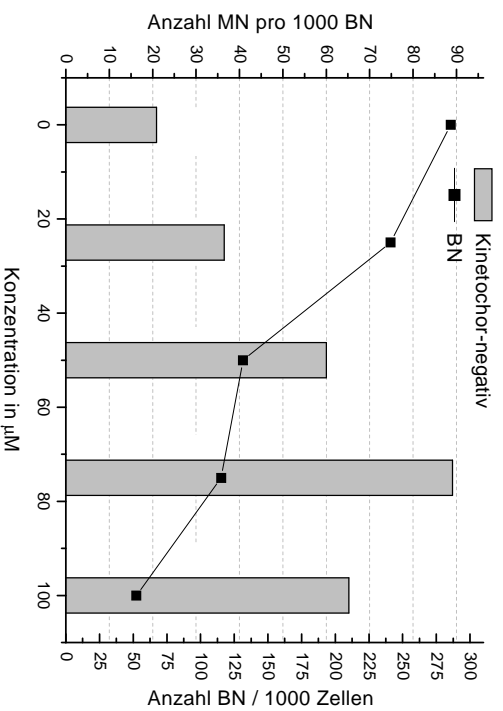
Wie in Tab. 5 zu sehen ist, entspricht das Ergebnis des Mitosearresttests in HCV-Zellen qualitativ dem Ergebnis nach Inkubation von AG01522C-Fibroblasten: Nur bei den Positivkontrollen E2 und DES ist eine Erhöhung des Mitoseindex zu bewirken. Dabei werden bei E2 die fünf-fache (100  $\mu\text{M}$  gegenüber 20  $\mu\text{M}$ ) und bei DES die dreifache Konzentration benötigt (50  $\mu\text{M}$  gegenüber 15  $\mu\text{M}$ ), um einen ähnlich starken Mitosearrest wie in V79-Zellen zu induzieren (Abb. 10).

### 3.4 Mitosearrest in OSV-Zellen

Wie in AG01522C- und in HCV-Zellen, erzeugen die Isoflavone BCA, FORM, KUL, PRU und GDME auch in OSV-Zellen im Bereich nicht-toxischer Konzentrationen keinen Mitosearrest. Die Positivkontrollen DES und E2 induzieren dagegen in vergleichbaren Konzentrationen wie in AG01522C- und HCV-Zellen einen zahlenmäßigen Anstieg der Prometa- und Metaphasen.



**Abb. 13:** Induktion von Mikrokerneln (MN) im Mikrokerneltest ohne Cytochalasin B nach 12-stündiger Inkubation von AG01522C-Fibroblasten mit GEN und 36-stündiger substanzfreier Nachinkubation. Linie/Symbol-Diagramm in Verbindung mit der rechten Y-Achse: Anzahl Mitosen von 1000 Zellen.



**Abb. 14:** Induktion von Mikrokerneln (MN) im Mikrokerneltest mit Cytochalasin B (CYB) nach Inkubation von AG01522C-Fibroblasten mit GEN (12-stündige GEN-Inkubation + 12-stündige substanzfreie Zwischeninkubation + 24-stündige CYB-Behandlung). Linie/Symbol-Diagramm in Verbindung mit der rechten Y-Achse: Anteil zweikernige Zellen (BN) pro 1000 Zellen.

**Tabelle 5:** Anzahl an Prometa- und Metaphasen (PM + M), Ana- und Telophasen (A + T) und apoptotischen Zellen (APOP) pro 1000 Zellen nach 12- und 24-stündiger Substanzbehandlung von HCV-Zellen. K, Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO); n.n., nicht nachweisbar. E2, 17 $\beta$ -Estradiol; BCA, Biochanin A. Werte aus 2 parallelen Bestimmungen, durch unabhängige Doppelbestimmung bestätigt.

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Anzahl pro 1000 Zellen		
		PM + M	A + T	APOP
K		18	6	1
E2	100	142	1	7
DES	50	123	5	20
BCA	25	11	9	2
	50	14	8	2
FORM	100	23	5	5
KUL	200	20	4	1
PRU	15	9	7	1
	20	16	7	3
GDME	7,5	14	2	1

## 4 Zusammenfassung Isoflavonoide

### 4.1 Effekte in V79-Zellen

In V79-Zellen haben alle untersuchten Isoflavonoide ein aneuploidogenes Potenzial. Sie induzieren einen reversiblen Mitosearrest (GDME  $\approx$  DES > PRU > BCA > FORM > KUL  $\approx$  EQU) und den Verlust von Chromosomen als Kinetochor-positive Mikrokerne (GDME > PRU > BCA > FORM > EQU  $\gg$  KUL). Dabei ist die Mikrokerninduktion unabhängig von der Stärke des Mitosearrests, und die Erhöhung gegenüber dem Kontrollwert ist um ein Vielfaches stärker als beim Mitosearrest. Das aneugene Potenzial der Isoflavone scheint abhängig von der Anzahl und der Position der Methoxy-Substituenten am A- und B-Ring zu sein (siehe Abb. 2 in Kap. 1.1.3). In Tab. 6 und Tab. 7 ist die Strukturabhängigkeit der biologischen Aktivitäten einiger Isoflavonoide zusammenfassend dargestellt. Die angegebenen Konzentrationen stellen die Konzentration dar, bei der an den meisten Endpunkten maximaler Effekt erzielt wird. Bei negativen Ergebnissen ist die höchste getestete Konzentration angegeben.

**Tabelle 6:** Biologische Aktivität verschiedener Isoflavonoide in V79-Zellen. MT, Mikrotubuli; CMTC, Zytoplasmatischer Mikrotubuli-Komplex; MS, Mitosespindel; APOP, Apoptotische Zellen; n.b., nicht bestimmt; -, kein Effekt; +, schwacher Effekt; ++, deutlicher Effekt, +++, starker Effekt.

		Isoflavon		Isoflavan	
		DAI	FORM	KUL	EQU
		100 $\mu$ M	75 $\mu$ M	150 $\mu$ M	250 $\mu$ M
Substituenten	5				
	7	OH	OH	OH	OH
	2'			OCH <sub>3</sub>	
	4'	OH	OCH <sub>3</sub>		OH
MT-Assoziation	<i>in vitro</i>	-	-	-	-
	CMTC	-	-	+	+
	MS	-	+++	+	+
MN-Induktion	Chromosomen	-	+++	+	++
	Fragmente	-	-	-	-
APOP		n.b.	++	-	-

**Tabelle 7:** Biologische Aktivität weiterer Isoflavonoide in V79-Zellen. MT, Mikrotubuli; CMTC, Zytoplasmatischer Mikrotubuli-Komplex; MS, Mitosespindel; APOP-K, Apoptotische Zellen; n.b., nicht bestimmt; -, kein Effekt; +, schwacher Effekt; ++, deutlicher Effekt, +++, starker Effekt.

		Isoflavon			
		GEN	BCA	PRU	GDME
		25 $\mu$ M	25 $\mu$ M	15 $\mu$ M	7,5 $\mu$ M
Substituenten	5	OH	OH	OH	OCH <sub>3</sub>
	7	OH	OH	OCH <sub>3</sub>	OH
	2'				
	4'	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	OCH <sub>3</sub>
MT-Assoziation	<i>in vitro</i>	-	-	-	-
	CMTC	-	++	+	++
	MS	-	+++	++	++
MN-Induktion	Chromosomen	-	+	++	+++
	Fragmente	++	-	-	-
APOP		n.b.	++	+	+

## 4.2 Effekte in menschlichen Zelllinien

### 4.2.1 Genistein

Das in V79-Zellen und Humanlymphozyten nachgewiesene klastogene Potenzial von Genistein (Kulling et al., 1999; Kulling und Metzler, 1997) konnte bestätigt werden: Auch in AG01522C-Fibroblasten induziert GEN Mikrokerne, die Chromosomenfragmente enthalten (Tab. 8), allerdings muss eine höhere Konzentration als in V79-Zellen eingesetzt werden (75  $\mu\text{M}$  gegenüber 25  $\mu\text{M}$ ). Dies ist im Gegensatz zu den Methoxy-Isoflavonen durch die bessere Wasser-Löslichkeit des GEN möglich. Im Gegensatz dazu können nach Inkubation von AG01522C-Fibroblasten mit Nitrochinolin-N-Oxid (NQO) im CB-Mikrokerntest mit der gleichen (0,5  $\mu\text{M}$ ) bis niedrigeren (0,3  $\mu\text{M}$ ) Konzentration Kinetochor-negative Mikrokerne induziert werden. Eine Verallgemeinerung bezüglich der Empfindlichkeit von AG01522C-Zellen gegenüber Klastogenen kann daher nicht getroffen werden.

**Tabelle 8:** Biologische Aktivität einiger Isoflavonoide in AG01522C-Fibroblasten. (Alle in Tab. 6 aufgeführten Isoflavone sind an den aufgeführten Endpunkten in AG01522C-Fibroblasten negativ.) MT, Mikrotubuli; CMTC, Zytoplasmatischer Mikrotubuli-Komplex; MS, Mitosespindel; APOP, Apoptotische Zellen; n.b., nicht bestimmt; -, kein Effekt; +, schwacher Effekt; ++, deutlicher Effekt, +++, starker Effekt.

Endpunkt		Isoflavonoid			
		GEN 75 $\mu\text{M}$	BCA 25 $\mu\text{M}$	PRU 15 $\mu\text{M}$	GDME 7,5 $\mu\text{M}$
MT-Assoziation	CMTC	-	-	-	-
	MS	-	-	-	-
MN-Induktion	Chromosomen	-	-	-	-
	Fragmente	++	-	-	-
APOP		+	-	-	-

### 4.2.2 Wieso kein aneugener Effekt in den menschlichen Zelllinien?

In den einsetzbaren Konzentrationen zeigte keines der untersuchten Isoflavonoide ein aneuploidogenes Potenzial in den menschlichen Zelllinien HCV und AG01522C. Nicht nur nach Inkubation mit Isoflavonoiden zeigen sich V79-Zellen und Humanzelllinien unterschiedlich empfindlich gegenüber den Testsubstanzen: Um in AG01522C-Zellen durch E2-Behandlung einen mit dem in V79-Zellen vergleichbaren aneugenen Effekt zu erzielen, muss die vierfache Sub-



stanzkonzentration eingesetzt werden. Auch bei den in dieser Arbeit untersuchten methylierten Bisphenolen DMBP und TMBP treten die beobachteten Effekte in V79-Zellen nach Behandlung mit geringeren Konzentrationen auf, während die Effekte von BPA in V79-Zellen nicht auf Humanfibroblasten übertragen werden können (Kap. 5.1, Kap. 5.2.3 und Kap. 5.2.4). Bei den untersuchten Isoflavonoiden wurden die höchsten noch löslichen Konzentrationen eingesetzt, so dass eine Steigerung nicht mehr möglich ist. Tsutsui et al. (1990) verglichen die Induktion numerischer Chromosomenaberrationen durch spezifische Aneugene in normalen Humanfibroblasten und in syrischen Hamsterfibroblasten. Aneuploide Zellen mit annähernd diploider Chromosomenzahl wurde in den Hamsterzellen nach Behandlung mit E2 oder DES bei niedrigeren Konzentrationen und in höherem Ausmaß als in den Humanfibroblasten induziert. Aneuploide Zellen mit annähernd tetraploider Chromosomenzahl traten nach Substanzbehandlung in Humanzellen mit vergleichbarer Inzidenz wie in Hamsterzellen auf. Das Ausmaß der beobachteten Speziesdifferenz variierte mit den verschiedenen Substanzen. Die Autoren schlossen daraus, dass Humanzellen auf Aneuploidogene anders reagieren als Hamsterzellen.

Im Folgenden sind einige Einflussmöglichkeiten auf die Vergleichbarkeit von Ergebnissen, die mit unterschiedlichen Zelllinien erzielt wurden, aufgeführt.

**Behandlungsdauer** Die 12-stündige Substanzbehandlung entspricht 0,5 Verdopplungszeiten und damit der 6-stündigen Substanzbehandlung von V79-Zellen, von daher sollte die Dauer der Substanzbehandlung ausreichend sein.

**Bindung an Serumproteine** AG01522C-Fibroblasten werden in Medium mit 16 % fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert, während das Medium für V79-Zellen 9 % FKS enthält. Es ist bekannt, dass viele Substanzen an Serumproteine binden können (Nagel et al., 1998). Dabei können innerhalb der gleichen Stoffklasse beträchtliche Unterschiede bezüglich des Anteils freier und ungebundener Substanz vorkommen. So bindet in dem von Nagel et al. (1998) beschriebenen Testsystem BCA in einem größeren Ausmaß an Serumproteine als E2, während von DES, GEN und EQU ein größerer Anteil als von E2 frei vorliegt. Diese Proteinbindung kann sich jedoch bei 9 % und 16 % FKS nicht so stark auswirken, dass durch sie allein die um den Faktor 3 bis 5 höheren Konzentrationen von E2 und DES in AG01522C-Zellen zur Erzielung des gleichen Effekts wie in V79-Zellen zu erklären wären. Bei der Übertragung von *in vitro*-Ergebnissen aus Zellkulturversuchen, die zumeist mit 5 bis 20 % Serum ermittelt werden, auf die *in vivo*-Situation (100 % Serum), spielt die Bindung an Serumproteine sicherlich eine bedeutendere Rolle.

**Zellspezifische Unterschiede** Die unterschiedliche Empfindlichkeit der Hamster- und Humanzelllinien könnte auf der unterschiedlichen Substanzaufnahme, Enzymausstattung und Zellzykluskontrolle (Kung et al., 1990; Cross et al., 1995) von Zellen verschiedener Spezies (und der Herkunft innerhalb einer Spezies) zu beruhen.

Hinsichtlich der Substanzaufnahme in die Zellen ist von beiden Zelllinien nichts bekannt. In diesem Zusammenhang fällt allerdings auf, dass bei den Zytotoxizitätstest die zytotoxischen Substanzkonzentrationen weitgehend gleich sind (Tab. 2 und Tab. 3), was gegen eine unterschiedliche Aufnahmefähigkeit der verschiedenen Zelllinien spricht.

V79-Zellen sind nicht zu einem oxidativen Phase I-Metabolismus befähigt, da sie keine Gene für Cytochrom P450-abhängige Monooxygenasen exprimieren (Glatt et al., 1987). Eine hohe metabolische Aktivität ist in Hautfibroblasten wie AG01522C-Zellen ebenfalls nicht zu erwarten und sollte daher mit der von V79-Zellen vergleichbar sein.

Die Unterschiede bezüglich der Ausstattung mit Enzymen des Stoffwechsels und des Fremdstoff-Metabolismus, der Zellzykluskontrolle und auch der Reparatur von DNA-Schäden sind bereits in verschiedenen Geweben innerhalb derselben Spezies vielfältig. Zwischen verschiedenen Spezies gibt es eine weitere Vielzahl an Unterschieden insbesondere hinsichtlich Metabolismus und Zellzykluskontrolle (Kung et al., 1990). Die hohe Empfindlichkeit von V79-Zellen gegenüber Aneugenen (und manchen Klastogenen) ist sicherlich in einigen dieser Unterschiede begründet, eine genaue Zuordnung zu einzelnen Mechanismen wäre allerdings rein spekulativ.

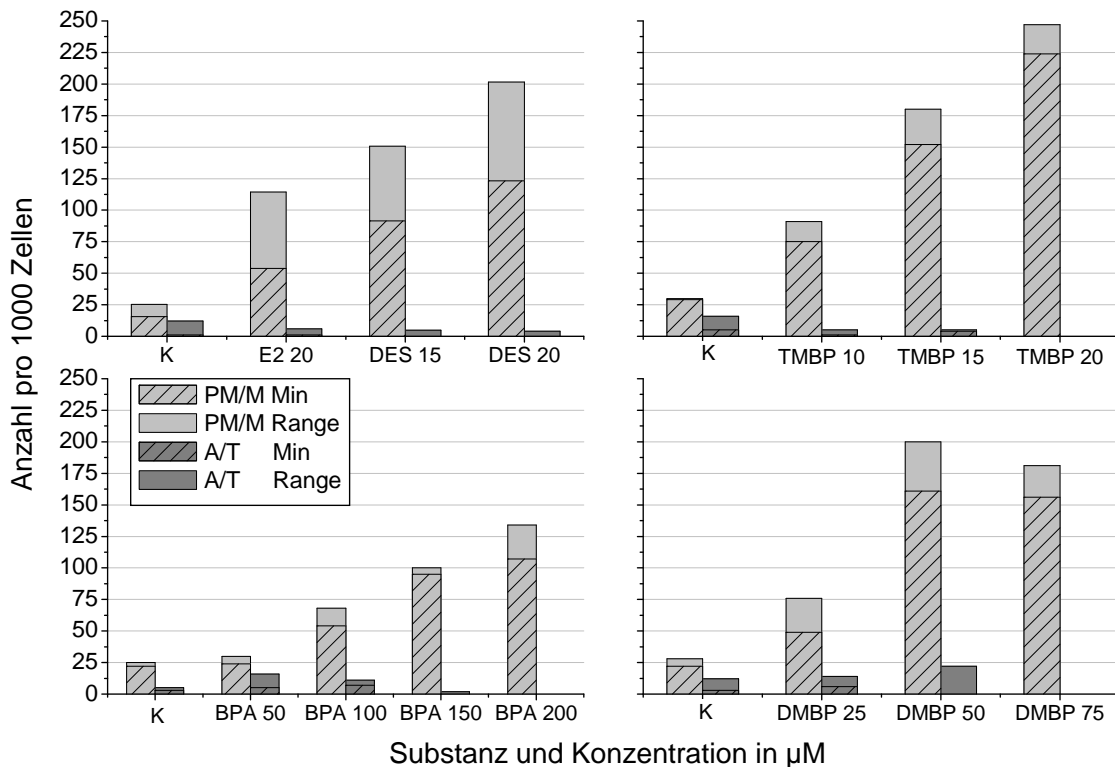
## 5 Ergebnisse und Diskussion der biologischen Aktivität verschiedener Bisphenole

### 5.1 Mitosearrest in V79-Zellen

Wie in Abb. 15 zu sehen ist, induzieren die untersuchten Bisphenole BPA, DMBP und TMBP sowie die Aneuploidogene DES und E2 in kultivierten V79-Zellen konzentrationsabhängig Mitosearrest.

**DES und E2** Der Effekt von DES auf die Mitose von V79-Zellen steht im Einklang mit bereits veröffentlichten Ergebnissen (Ochi, 1999). Die Minimalwerte des Mitoseindex (prozentualer Anteil der Zellen in einem beliebigen Mitosestadium an der gesamten Zellzahl) nach Inkubation von V79-Zellen mit 15  $\mu\text{M}$  DES stimmen mit einem Mitoseindex von 15 % relativ genau mit den von Ochi (1999) beschriebenen Ergebnissen überein. Bei gleicher Konzentration bewirkt E2 eine weniger starke Erhöhung des Mitoseindex als DES.

**BPA** Wie Abb. 15 zeigt, induziert eine 6-stündige Behandlung von V79-Zellen mit BPA einen konzentrationsabhängigen Anstieg des Mitoseindex. Somit konnten die Ergebnisse von Pfeiffer et al. (1997) bestätigt werden. Ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  BPA ist ein leichter Anstieg, bei 150  $\mu\text{M}$  BPA ist eine Vervierfachung der Anzahl der Zellen, die sich in Mitose befinden, gegenüber der Kontrolle zu sehen (10 % gegenüber 2,5 %). Der maximale Effekt ist nach Inkubation der Zellen mit 200  $\mu\text{M}$  BPA erreicht. Ab dieser Konzentration sind keine Anaphasen mehr zu beobachten, die Mitose ist folglich völlig in der Metaphase blockiert. Das von Ochi (1999) beobachtete Auftreten von Mitosen mit mehreren Spindelpolen kann nach Immunfluoreszenzfärbung des  $\alpha$ -Tubulins bestätigt werden (Ergebnis nicht dargestellt). Bei höheren Konzentrationen sinkt der Mitoseindex wieder ab (Ergebnisse nicht dargestellt). Ochi (1999) beschreibt einen Mitoseindex von zirka 7 % nach 6-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit 200  $\mu\text{M}$  BPA, während sich in den in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen bei gleichen Inkubationsbedingungen ein Mitoseindex von 11 % bis 13 % ergibt. Da die Absolutwerte sowohl bei Wiederholung mit demselben V79-Stamm als auch innerhalb V79-Zellen verschiedener Herkunft stärkeren Schwankungen unterliegen (eigene Beobachtungen, nicht dargestellt), sind diese Abweichungen nicht ungewöhnlich.



**Abb. 15:** Anzahl der Prometa-/Metaphasen (PM/M) und Ana-/Telophasen (A/T) nach 6-stündiger Inkubation von V79-Zellen mit den Bisphenolen BPA, DMBP und TMBP sowie mit E2 und DES. Als „Range“ wird die Differenz zwischen dem Minimal- (Min) und dem Maximalwert bei einer Doppel- bis Mehrfachbestimmung bezeichnet.

**DMBP** Nach Inkubation von Fibroblasten mit DMBP ist ab einer Konzentration von 25 µM eine Erhöhung der Anzahl an Prometa- und Metaphasen zu beobachten. Der maximale Effekt (mit 225 Prometa- und Metaphasen eine Verzehnfachung gegenüber der Kontrolle) wird nach Behandlung von V79-Zellen mit 50 µM DMBP erreicht. Nach Inkubation mit 75 µM DMBP werden keine Ana- oder Telophasen mehr beobachtet, was ebenso wie nach Inkubation mit BPA auf eine vollständige Arretierung der Zellen in der Metaphase hindeutet.

**TMBP** TMBP induziert in V79-Zellen ab einer Konzentration von 10 µM Mitosearrest (siehe Abb. 15). Dies stimmt mit vorhergehenden Arbeiten in unserem Arbeitskreis überein (Pfeiffer et al., 1997). Bereits nach Behandlung der Zellen mit 10 µM TMBP ist eine Verdreifachung der (Pro-) Metaphasen gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Nach der Inkubation mit 15 µM TMBP findet man die sechsfache Anzahl (Pro-) Metaphasen und unter Einfluss von 20 µM

nahezu die zehnfache Anzahl an (Pro-) Metaphasen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle und keine Anaphasen und Telophasen mehr (nahezu 25 % aller Zellen in der Mitose). Die Anzahl an (Pro-) Metaphasen beim maximalen Effekt ist also deutlich höher als nach Inkubation mit 200  $\mu$ M BPA, obwohl auch dort keine Anaphasen mehr beobachtet werden können. Bei einem vollständigen Mitosearrest sollten sich - unabhängig von der Testsubstanz - während des gleichen Zeitraums gleich viele Zellen in der Metaphase ansammeln. Unterschiede in der Höhe des Mitoseindex können durch zytotoxische Effekte oder gleichzeitige Arretierung der Zellen an anderen Stellen des Zellzyklus zustandekommen.

## **5.2 Untersuchungen in AG01522C-Zellen**

### **5.2.1 Bestimmung geeigneter Substanzkonzentrationen**

Nachdem der Mitosearresttest in V79-Zellen mit den untersuchten Bisphenolen in dieser Arbeit und in früheren Arbeiten (Pfeiffer et al., 1997) auf ein aneuploidogenes Potenzial der getesteten Substanzen hinweist, ist der nächste Schritt, dieses Potenzial in einer menschlichen Zelllinie zu bestätigen. Die bei den Untersuchungen in V79-Zellen verwendeten Inkubationszeiten und Substanzkonzentrationen sind nicht direkt auf andere Zelllinien übertragbar, daher müssen diese den Bedürfnissen der verwendeten humanen Zelllinie angepasst werden. Die Inkubationsdauer soll entsprechend den Versuchen in V79-Zellen eine halbe Populations-Verdopplungszeit betragen. Die Populations-Verdopplungszeit der humanen AG01522C-Fibroblasten beträgt zirka 24 h, deshalb dauern alle im Folgenden beschriebenen Substanzbehandlungen 12 h.

Zur Bestimmung des geeigneten Konzentrationsbereichs wird die Zytotoxizität der zu untersuchenden Substanzen mit Hilfe zweier Methoden abgeschätzt: Die relative Lebendzellzahl nach Substanzbehandlung wird durch elektronische Zellzahlbestimmung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle ermittelt. Als zweiter Endpunkt wird fluoreszenzmikroskopisch auf die Bildung apoptotischer Körperchen geprüft. Die in den weiteren Genotoxizitätstests eingesetzten Substanzkonzentrationen sollten einen Konzentrationsbereich von nicht-zytotoxischen bis zytotoxischen Konzentrationen einschließen. Als zytotoxisch wird eine Substanzkonzentration angesehen, wenn die Anzahl lebender Zellen nach Substanzbehandlung geringer ist als vor Substanzinkubation. Dieses Kriterium wurde gewählt, da bei Substanzen, die einen vollständigen Mitosearrest induzieren, die Zellzahl während der Substanzexposition nicht zunimmt. Unter diesen Bedingungen kann die Zellzahl - je nach Wachstumsverhalten der Zellen - nach einer Behandlungsdauer von einer halben Verdopplungszeit höchstens 67 % der Kontrolle betragen. Ein Rückgang der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle kann daher, wenn die Zellzahl nach Substanzexposition ohne Erholungsphase bestimmt wird, ohne ein direkt zytotoxisches Potenzial der Substanz bewirkt werden. Wenn die Zellzahl allerdings unter den Wert vor der Substanzzugabe fällt (\*markierte Werte in Tab. 9), kann von direkter Zytotoxizität gesprochen

werden.

Ein weiterer wichtiger Parameter bei der Erfassung von Aneuploidogenen ist die Quantifizierung von Mitosen. Dabei wird zwischen den Mitosestadien vor (Pro- und Prometaphase) und einschließlich der Metaphase und nach der Metaphase (Ana- und Telophase) unterschieden. Solange Ana- und Telophasen auftreten, können die Zellen sich noch - wenn auch langsamer - vermehren, daher sind in Tab. 9 zu den Zytotoxizitätsdaten diese charakteristischen Daten zur Erfassung von Aneuploidogenen in einem breiten Konzentrationsbereich angegeben.

**Tabelle 9:** Bestimmung des geeigneten Konzentrationsbereichs bei 12-stündiger Inkubation von AG01522C-Zellen mit verschiedenen Bisphenolen. ZK, Zellkerne; RLZZ, Lebendzellzahl relativ zur Lösungsmittelkontrolle;  $\sum$  PM + M, Summe der Prometa- und Metaphasen;  $\sum$  A + T, Summe der Ana- und Telophasen; APOP, Apoptotische Körperchen; K, Lösungsmittelkontrolle (1 % DMSO); n.n., nicht nachweisbar; n.b., nicht bestimmt; \*, Zellzahl nach Substanzinkubation < Zellzahl vor Substanzinkubation.

Substanz	Konz. in $\mu$ M	RLZZ in %	pro 1000 ZK		
			$\sum$ PM + M	$\sum$ A + T	APOP
K		100	12	8	n.n.
BPA	50	99	8	5	n.n.
	100	93	7	2	n.n.
	150	n.b.	13	10	n.n.
	200	83	15	8	n.n.
	400	57*	6	n.n.	n.n.
DMBP	50	n.b.	7	9	n.n.
	100	78	46	8	n.n.
	150	n.b.	90	4	n.n.
	200	n.b.	64	2	4
	250	36*	n.b.	n.b.	n.b.
	300	n.b.	2	n.n.	42
	400	n.b.	4	n.n.	111
	500	27*	n.b.	n.b.	n.b.
TMBP	10	n.b.	11	7	n.n.
	20	92	13	6	n.n.
	40	n.b.	27	2	n.n.
	50	59*	n.b.	n.b.	n.b.
	60	n.b.	47	1	n.n.
	80	n.b.	121	n.n.	n.n.
	90	n.b.	33	n.n.	n.n.
	100	47*	3	2	n.n.

**BPA** BPA induziert in AG01522C-Zellen keinen zahlenmäßigen Anstieg der Prometa- und Metaphasen (Tab. 9). Nach Inkubation der Zellen mit 400  $\mu\text{M}$  BPA, das bei dieser Konzentration auch zytotoxisch wirkt, treten keine Ana- und Telophasen mehr auf, obwohl die Zahl der (Pro-)Metaphasen nicht erhöht ist. Dem könnte ein weiterer Zellzyklusblock zugrunde liegen, den BPA bei geringeren oder gleichen Konzentrationen wie einen Mitosearrest induziert. Unter diesen Umständen könnte keine große Anzahl Zellen die Mitose überhaupt erreichen. So haben bei einem vollständigen Arrest zu Beginn der S-Phase (beispielsweise durch Thymidin-Zugabe) nach 7 h bis 8 h alle Zellen, die sich zu Beginn der Substanzexposition in einem weiter fortgeschrittenen Zellzyklusstadium als dem arretierten befanden, die Mitose vollzogen. Nach 12-stündiger Substanzexposition sind demnach keine Zellen mehr „übrig“, die in der Metaphase arretiert werden könnten. Da die Zellzyklus-Kontrolle starke Spezies-abhängige Unterschiede aufweist (Cross et al., 1995; Kung et al., 1990; Lanni und Jacks, 1998; Stewart und Pietenpol, 2001), kann es sein, dass BPA in V79-Zellen in der Mitose arretiert, weil es dort andere Zellzyklusblocks nicht oder nur schwach induziert. In den humanen Krebszelllinien HeLa (Cervix) und Ishikawa (Endometrium) wird durch BPA ebenfalls kein Mitosearrest induziert (Ergebnisse nicht dargestellt).

**DMBP** Der optimale Konzentrationsbereich scheint zwischen 50  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  DMBP zu liegen. Höhere Konzentration zeigen ein zytotoxisches Potenzial, wobei auch apoptotische Körperchen zu beobachten sind (Tab. 9).

**TMBP** Nach ersten Versuchen (Tab. 9) deutet sich ein Effekt bei Konzentrationen um 60  $\mu\text{M}$  bis 80  $\mu\text{M}$  TMBP an. Da leichte Veränderungen in der Konzentration der Inkubationslösungen (beispielsweise bei unabhängigen Mehrfachbestimmungen) bereits eine deutliche Verschiebung des beobachteten Effekts bewirken, sollten in einem engen Konzentrationsbereich mehrere TMBP-Konzentrationen getestet werden. Im Folgenden wird daher TMBP in Konzentrationen zwischen 15  $\mu\text{M}$  und 90  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Bei der Bewertung der Effekte, die mit zytotoxischen Substanzkonzentrationen ermittelt wurden, muss selbstverständlich die Zytotoxizität berücksichtigt werden.

### 5.2.2 Optimierung der Versuchsbedingungen für den CB-Mikrokerntest

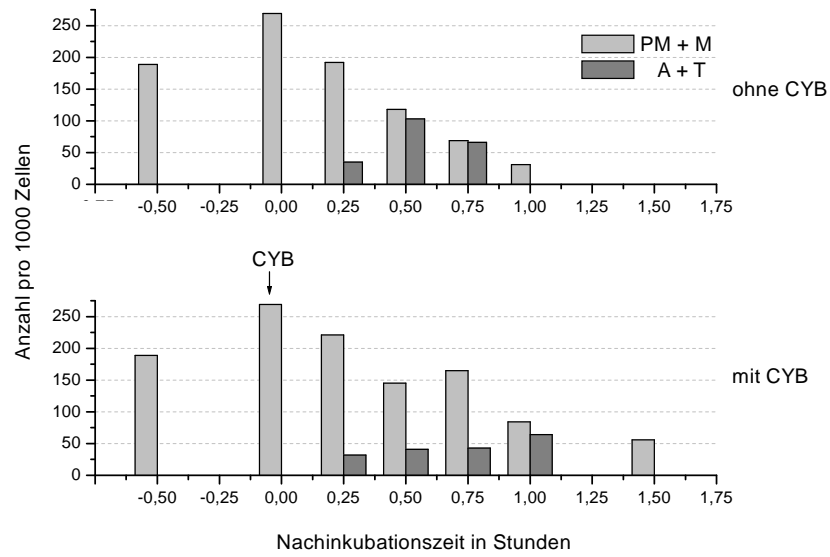
Das aneuploidogene Potenzial der Bisphenole soll mittels differenzierter Betrachtung von Zahl und Erscheinungsbild der Mitosen und der Induktion von Chromosomenverlust und Chromosomen-Fehlverteilung in verschiedenen Variationen des Mikrokerntests überprüft werden. Deshalb wird ein einziges Inkubationsprotokoll angestrebt, das die gleichzeitige Erfassung aller zu untersu-



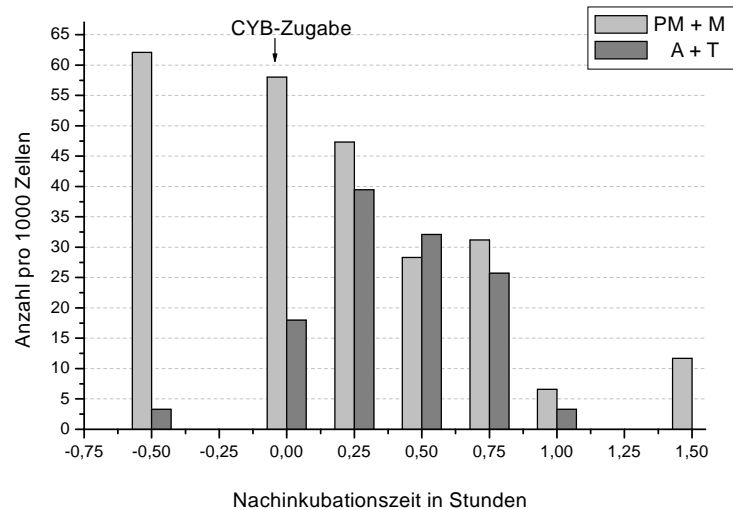
chenden Endpunkte während eines einzigen Versuchsverlaufs ermöglicht. Das geplante Versuchsprotokoll sieht aus den in Kap. 1.3.1 aufgeführten Gründen unter anderem die Verwendung von Cytochalasin B zur Verhinderung der Zytokinese vor. Kritische Punkte eines solchen Inkubationsprotokolls stellen die Zeitpunkte der Cytochalasin B-Zugabe und der Fixierung der Zellen dar.

**Zeitpunkt der Cytochalasin B-Zugabe** Die Cytochalasin B-Behandlung kann entsprechend der jeweiligen Fragestellung entweder gleichzeitig mit der Substanzbehandlung erfolgen oder an sie anschließen. Eine gleichzeitige Inkubation von AG01522C-Zellen mit E2 oder DES mit Cytochalasin B setzte die Lebensfähigkeit der Zellen stark herab, so dass diese Variante verworfen wurde. Daraufhin wurde ein Inkubationsprotokoll mit einer der Substanzbehandlung unmittelbar anschließenden Cytochalasin B-Zugabe getestet. Auch dieser Ansatz musste verworfen werden, da sich die Zellen auf diese Weise nicht mehr von dem substanzinduzierten Mitosearrest erholten. Die in Abb. 16 dargestellten Versuche zur Reversibilität des Mitosearrests nach Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  DES zeigen die Lösung des Problems mit dem Zeitpunkt der Cytochalasin B-Zugabe: Nach Behandlung von AG01522C-Zellen mit Substanzen, die Mitosearrest induzieren, nimmt je nach Konzentration die Anzahl an Prometa- und Metaphasen bis zu einer halben Stunde nach dem Entfernen der Testsubstanz weiter zu (Abb. 16), oder bleibt konstant (Abb. 17). Erst danach beginnt sie abzusinken, während gleichzeitig die Anzahl der Ana- und Telophasen erhöht ist, was das normale Fortschreiten der Mitose widerspiegelt. Maximal 2 h nach dem Entfernen der Testsubstanz ist die Mitose der (beispielsweise durch DES) in der Mitose arretierten Zellen beendet.

Vor diesem Hintergrund erscheint eine Cytochalasin B-Zugabe nach 0,5 Stunden substanzfreier Erholungszeit angebracht, da nach dieser Zeit der Mitosearrest noch nicht aufgehoben ist, oder bei niedrigeren Konzentrationen die Anaphase gerade erst beginnt (Abb. 17). Dies steht im Einklang damit, dass gewöhnlich eine gewisse Zeit verstreichen muss, bis sich die Mitosespindel wieder soweit erholt hat, dass die nötigen Voraussetzungen für eine Überschreitung des Anaphase-Kontrollpunkts (keine freien, nicht von Mikrotubuli gebundenen Kinetochore, ausreichende Zugspannung an den Kinetochoren) erfüllt sind (Canman et al., 2000; Andreassen und Margolis, 1994; Burke, 2000; Gardner und Burke, 2000). Da die Cytochalasin B-Zugabe den weiteren zeitlich Ablauf der Mitose zwar leicht zu verzögern, aber sonst nicht zu beeinträchtigen scheint (Abb. 16), wird eine substanzfreie Erholungsphase von 0,5 h in das Versuchsprotokoll aufgenommen.

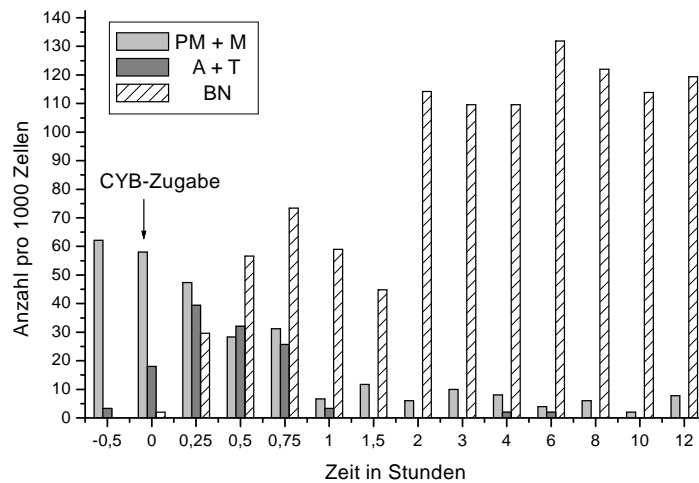


**Abb. 16:** Anzahl der Prometa- + Metaphasen (PM + M) und der Ana- + Telophasen (A + T) pro 1000 Zellen nach Inkubation von AG01522C-Zellen mit 75  $\mu$ M DES. Nach einem Mediumwechsel ( $t = -0,5$  h) wird 0,5 h substanzfrei zwischeninkubiert ( $t = 0$  h) und dann Cytochalasin B (CYB) zugegeben (mit CYB, untere Abbildung) oder nicht (ohne CYB, obere Abbildung).

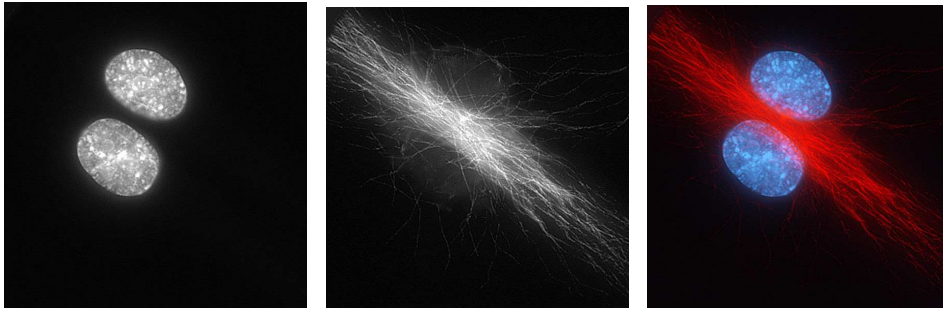


**Abb. 17:** Anzahl der Prometa- + Metaphasen (PM + M) und der Ana- + Telophasen (A + T) pro 1000 Zellen nach Inkubation von AG01522C-Zellen mit 60  $\mu$ M TMBP. Nach einem Mediumwechsel ( $t = -0,5$  h) wird 0,5 h substanzfrei zwischeninkubiert und dann Cytochalasin B (CYB) zugegeben ( $t = 0$  h).

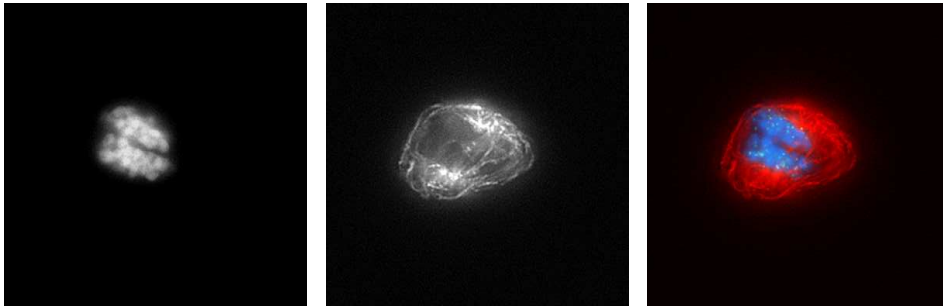
**Zeitpunkt des Fixierens** Ein weiterer kritischer Punkt beim Erstellen eines Inkubationsprotokolls ist der Zeitpunkt, an dem die Cytochalasin B-Behandlung abgebrochen wird, und die Zellen zur Auswertung vorbereitet werden. Nachdem die Anzahl der Ana- und Telophasen beim Herauslaufen aus dem Mitosearrest ansteigt, nimmt erwartungsgemäß sofort auch die Anzahl der zweikernigen Zellen (BN) stark zu (Abb. 18). Der leichte Rückgang der Anzahl zweikerniger Zellen nach 1,5 h ist durch die Unsicherheit bei der Zuordnung von Zellkernen zu zweikernigen Zellen, die gerade erst die Zellteilung beendet haben, begründet. Diese weisen nicht die typische Morphologie einer zweikernigen Zelle auf (Abb. 19), sondern sind durch eng neben- oder übereinander liegende Zellkerne und einen nicht vollständig ausgebildeten CMTC charakterisiert. In Abb. 20 bis Abb. 23 sind zweikernige Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Kernteilung dargestellt.



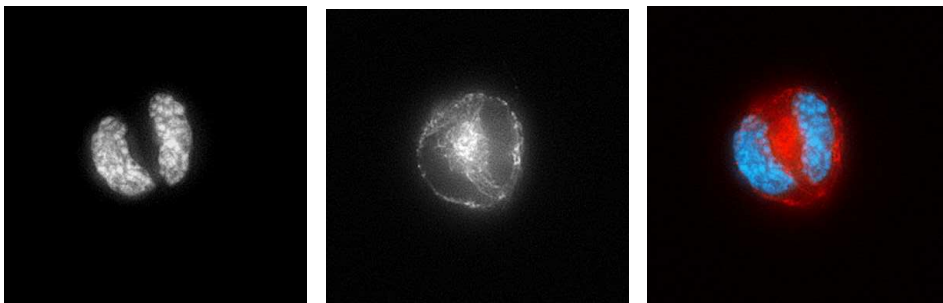
**Abb. 18:** Anzahl der Prometa- + Metaphasen (PM + M), der Ana- + Telophasen (A + T) und der zweikernigen Zellen (BN) pro 1000 Zellen nach Inkubation von AG01522C-Zellen mit 60  $\mu\text{M}$  TMBP. Nach einem Mediumwechsel ( $t = -0,5$  h) wird 0,5 h substanzfrei zwischeninkubiert und dann Cytochalasin B (CYB) zugegeben ( $t = 0$  h CYB).



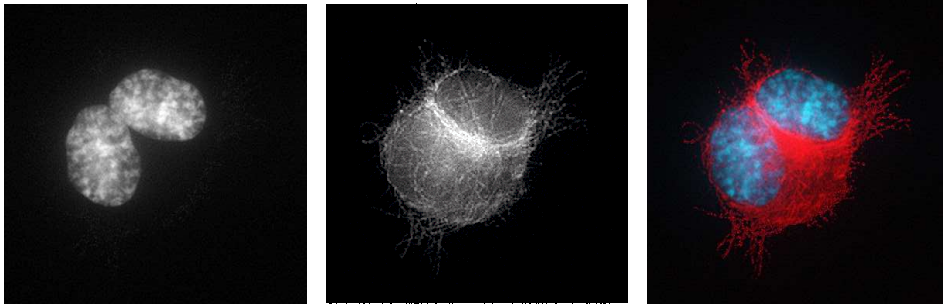
**Abb. 19:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer zweikernigen AG01522C-Zelle nach 10-stündiger CYB-Behandlung. Links: DAPI-gefärbte Zellkerne; Mitte, immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierter CMTC; Rechts: Überlagerung aller Kanäle.



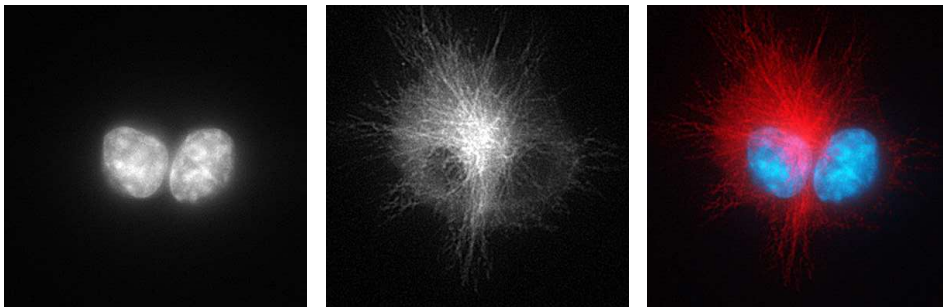
**Abb. 20:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer zweikernigen Zelle wenige Minuten nach der Kernteilung. Links: DAPI-gefärbte Zellkerne; Mitte, immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierter CMTC; Rechts: Überlagerung aller Kanäle. Grüngelbe Signale: immunologisch FITC-markierte Kinetochorproteine. Die Tochterzellkerne liegen noch sehr dicht nebeneinander. Der CMTC ist noch nicht ausgebildet, sondern es sind noch die ehemaligen Spindelpole zu erkennen.



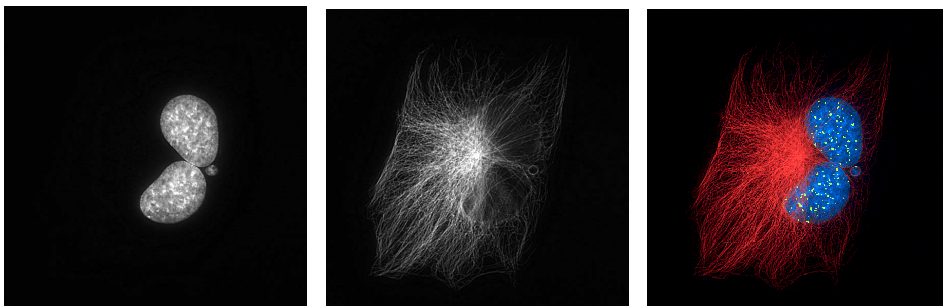
**Abb. 21:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer zweikernigen Zelle ungefähr 0,5 h nach der Kernteilung. Die Zellkerne liegen dicht nebeneinander. Links: DAPI-gefärbte Zellkerne; Mitte, immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierter CMTC; Rechts: Überlagerung aller Kanäle. Das neu gebildete MTOC ist zwischen den Zellkernen zu sehen, die Mikrotubuli-Filamente sind allerdings noch ringförmig um die Zellkerne angeordnet.



**Abb. 22:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer zweikernigen Zelle ungefähr 1 h nach der Kernteilung. Die Zellkerne sind etwas auseinander gerückt. Links: DAPI-gefärbte Zellkerne; Mitte, immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierter CMTC; Rechts: Überlagerung aller Kanäle. Der CMTC weist mittlerweile erste langgestreckte Mikrotubuli-Filamente auf.



**Abb. 23:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer zweikernigen Zelle wenige Stunden nach der Kernteilung. Die Zellkerne sind weiter auseinander gerückt. Links: DAPI-gefärbte Zellkerne; Mitte, immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierter CMTC; Rechts: Überlagerung aller Kanäle. Der CMTC hat eine für Fibroblasten typische spindelförmige Morphologie mit langen Mikrotubuli-Ausläufern angenommen.



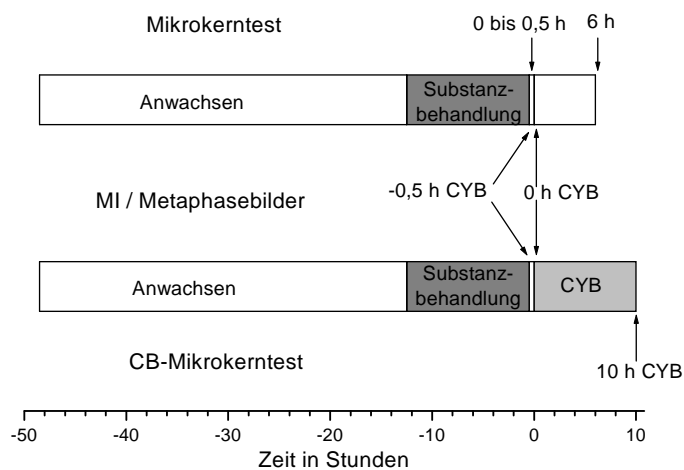
**Abb. 24:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer zweikernigen Zelle mit Kinetochor-positivem Mikrokern (MN). Links: DAPI-gefärbte Zellkerne; Mitte, immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierter CMTC; Rechts: Überlagerung aller Kanäle. Grün gelbe Signale: immunologisch FITC-markierte Kinetochorproteine. Im MN ist deutlich ein Kinetochorsignal zu erkennen.

Zehn Stunden nach Cytochalasin B-Zugabe weisen so gut wie alle zweikernigen Zellen ihre typische Morphologie auf. Eventuell auftretende Mikrokerne sind gut zu erkennen (Abb. 24). Daher wird dieser Zeitpunkt für das Beenden des Inkubationsprotolls des CB-Mikrokerntests gewählt. In kultivierten Lymphozyten sind erst 6 Stunden nach Cytochalasin B-Zugabe zweikernige Zellen zu erkennen. Daher wird von Fenech (2000a) vermutet, dass Cytochalasin B bis zu 6 Stunden benötigt, um seine Zytokinese-hemmende Wirkung zu entfalten. Die eigenen Untersuchungen deuten allerdings stark darauf hin, dass Cytochalasin B sofort nach Zugabe wirksam ist und nur der Aufbau des CMTC und die morphologische Ausprägung der Zelle unter Cytochalasin B-Einfluss mehrere Stunden benötigt. Außerdem ist der starke Anstieg der Anzahl zweikerniger Zellen 2 h nach Cytochalasin B-Zugabe in Abb. 18 mit einer Latenzzeit des Cytochalasin B unvereinbar. Da die in Suspension wachsenden humanen Lymphozyten nach dem Aufzentrifugieren eine runde Morphologie, sehr nahe zusammen liegende Kerne und einen schlecht ausgeprägten CMTC aufweisen (eigene Beobachtung), könnte es zu schwierig sein, gerade erst entstandene zweikernige Zellen in Humanlymphozyten zu erkennen. Außerdem werden Inkubationsprotokolle, die auf einer unmittelbaren Wirkung des Cytochalasin B basieren, häufig für Untersuchungen der Mitose und vor allem der Zytokinese angewendet (Cimini et al., 2001; Canman et al., 2000).

Nach einer Inkubationsdauer mit Cytochalasin B von 2 h bleibt die Anzahl der zweikernigen Zellen relativ konstant, das heißt nahezu alle zweikernigen Zellen stammen von Zellen, die unter Substanzeinfluss in der Mitose arretiert wurden. Auf eine längere Nachinkubationszeit als 10 h wurde aus diesem Grund verzichtet, obwohl die Erfassung der Zellen, die unter Substanzeinfluss ein anderes Stadium des Zellzyklusses durchlaufen haben, sicherlich ebenfalls interessant wäre. Allerdings deuten die Ergebnisse in V79-Zellen darauf hin, dass die untersuchten Bisphenole kein klastogenes Potenzial aufweisen (Pfeiffer et al., 1997), somit ist das Auftreten Kinetochor-negativer MN bei längerer Dauer der Nachinkubation unwahrscheinlich.

Zusätzlich zu dem CB-Mikrokerntest soll in den AG01522C-Zellen analog zu dem bisher in unserem Arbeitskreis durchgeführten Mikrokerntest die Mikrokernelrate 6 h nach dem Entfernen der Substanz ohne Cytochalasin B-Zugabe bestimmt werden. Die Mikrokernelrate (Inkubation mit 75  $\mu$ M DES) bei 6 oder 10, 5 h substanzfreier Nachinkubation unterscheidet sich nicht statistisch signifikant (t-Test, Signifikanzniveau 95 %). Aus diesem Grund sind die Ergebnisse der Mikrokerntests mit und ohne Cytochalasin B trotz der etwas unterschiedlichen Nachinkubationszeiten (5.2.4) direkt vergleichbar. Eine mögliche Einschränkung könnte dann vorliegen, wenn die Substanz mehrere verschiedene Effekte induziert, besonders bei weiteren Arrests innerhalb des Zellzyklusses, die zwischen 6 h und 10 h vor der Mitose liegen. Bei AG01522C-Zellen wäre das in der S-Phase.

**Resultierendes Inkubationsprotokoll** Das aufgrund der vorgestellten Vorversuche vorgeschlagene Inkubationsprotokoll ist in Abb. 25 dargestellt: Für jede Substanzkonzentration werden im Idealfall 8 Objektträger vorbereitet. Nach dem Ausstreuen der Zellen auf Objektträger werden sie mindestens 36 h anwachsen gelassen und dann einen halbe Verdopplungszeit (12 Stunden) mit der Testsubstanz inkubiert. Danach wird bei 7 Objektträgern pro Substanzkonzentration ein Mediumwechsel durchgeführt und der Objektträger, der zur fluoreszenzmikroskopischen Ermittlung des Mitoseindex, der Mikrokernrate und der Begutachtung der Metaphasebilder dienen soll, wird fixiert ( $t = -0,5$  h CYB). Nach einer halbstündigen Erholungsphase wird ein weiterer Objektträger fixiert ( $t = 0$  h CYB) und bei 4 der restlichen 6 Objektträger wird Cytochalasin B zugegeben. Die 2 Objektträger ohne Cytochalasin B werden nach insgesamt 6 h substanzfreier Nachinkubation fixiert, die restlichen 4 Objektträger werden nach insgesamt 10 h CYB-Inkubation je zur Hälfte für die FISH und die immunologische Fluoreszenzmarkierung fixiert ( $t = 10$  h CYB).



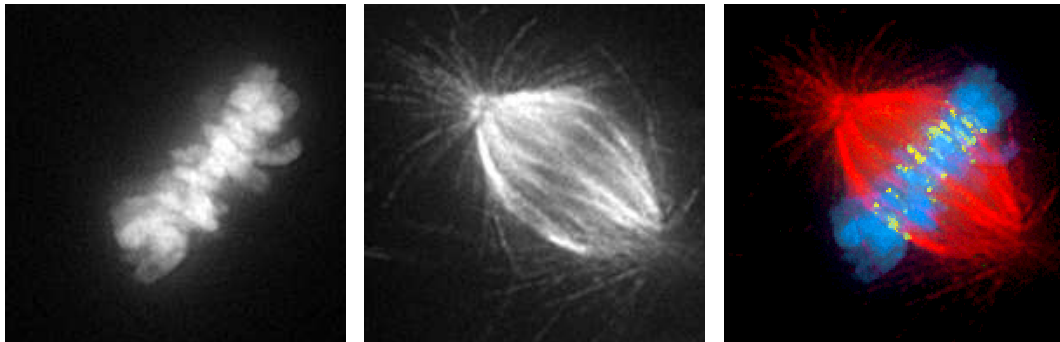
**Abb. 25:** Zeitprotokoll für die Inkubation von AG015522C-Zellen mit Aneugenen. CYB, Cytochalasin B.

### 5.2.3 Mitoseindex, Metaphasebilder und zweikernige Zellen

Da der Mitoseindex und die Morphologie der Metaphasen nach Substanzinkubation sowie vor der Cytochalasin B-Zugabe in unmittelbarem Zusammenhang mit der Anzahl an zweikernigen Zellen im CB-Mikrokerntest stehen, werden die Endpunkte Mitoseindex, Metaphasebilder und die Anzahl zweikerniger Zellen nach Cytochalasin B-Behandlung in einem gemeinsamen Kapitel diskutiert.

Um abschätzen zu können, ob die unter Substanzeinfluss in der Metaphase arretierten Zellen beim Mediumwechsel verlorengelassen oder bereits während der Erholungsphase die Mitose vollenden und daher der Auswertung entzogen werden, wird der Mitoseindex sowohl nach der Substanzinkubation ( $t = -0,5$  h CYB) als auch vor der Cytochalasin B-Zugabe ( $t = 0$  h CYB) erfasst.

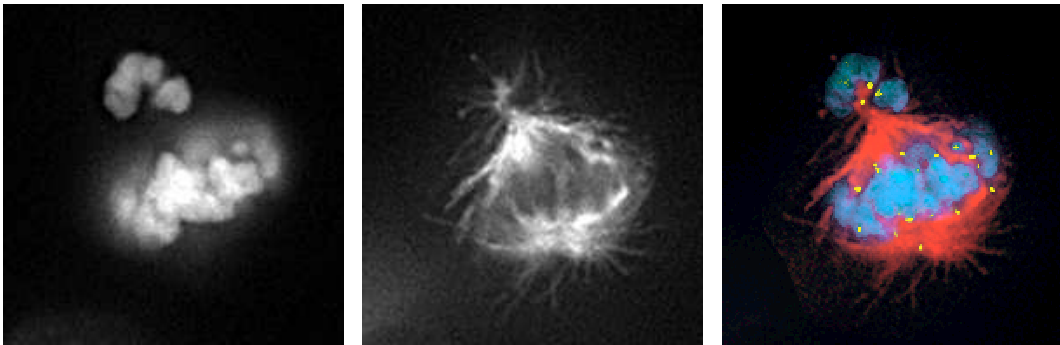
Eine Mitose kann unter dem Einfluss eines potenziellen Aneugens eine stark veränderte Morphologie aufweisen. So wird das Erscheinungsbild einer Mitose nach Inkubation mit dem Spindelgift Colchizin „C-Mitose“ genannt. Das fluoreszenzmikroskopische Aussehen der meist in der Metaphase arretierten Zellen (die sogenannten „Metaphasebilder“) können Hinweise auf einen möglichen Wirkmechanismus (beispielsweise Effekte auf die Mitosespindel) und Hilfestellung bei der Bewertung von Effekten an anderen Endpunkten (zum Beispiel die Induktion von Mikrokernen) geben. Die Morphologie einer Metaphase kann Substanz- oder konzentrationsabhängig beeinflussbar sein. Um eine grobe Einteilung der beobachteten Metaphasebilder machen zu können, werden im Folgenden neben der „normalen“ Metaphase, wie sie in Abb. 26 dargestellt ist, drei Klassen von Metaphasestörungen unterschieden, die sich hinsichtlich der Stärke und der Reversibilität des Schadens unterscheiden:



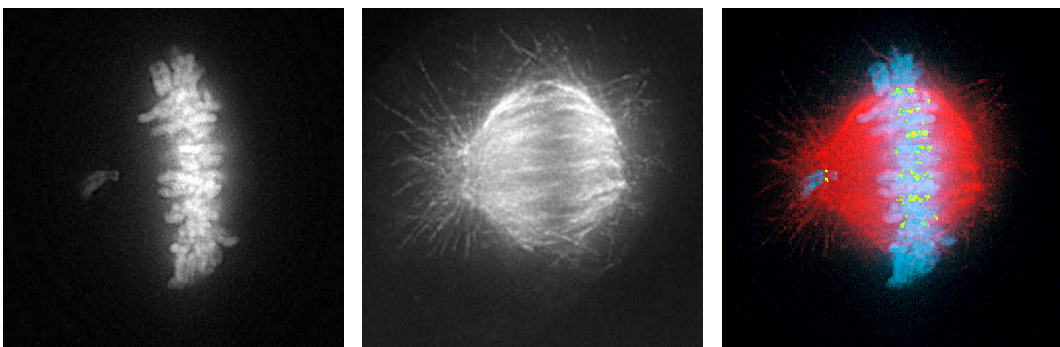
**Abb. 26:** Mikroskopisches Erscheinungsbild einer normalen Metaphase in AG01522C-Fibroblasten. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere die immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierte Mitosespindel und das rechte Bild eine Überlagerung aller Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen.



- „Off-Plate-Chromosomen“: Bei ihnen liegt ein einzelnes Chromosom oder auch mehrere Chromosomen außerhalb der von den beiden Spindelpolen begrenzten Ebene (Abb. 27 und Abb. 28). Dieser Schaden scheint nach dem Entfernen der Substanz teilweise reversibel zu sein. Außerdem verhindert das Auftreten von „Off-Plate-Chromosomen“ den Beginn der Anaphase nicht vollständig.

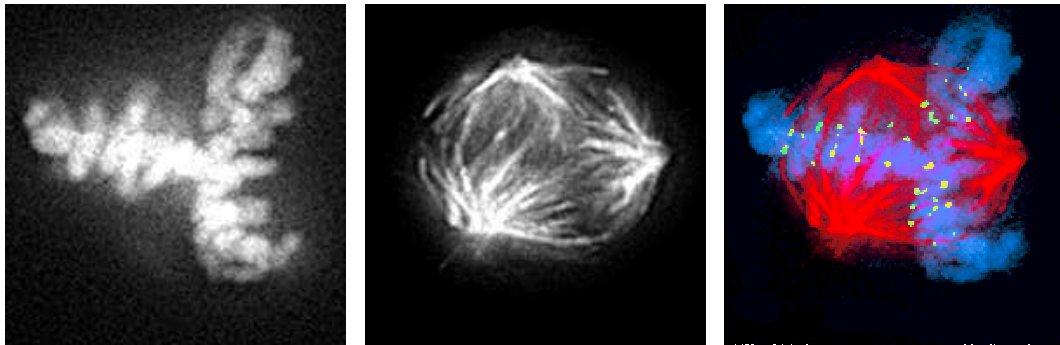


**Abb. 27:** Mikroskopisches Erscheinungsbild mehrerer „off-plate“-Chromosomen nach Inkubation von AG01522C-Fibroblasten mit E2. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere die immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierte Mitosespindel und das rechte Bild eine Überlagerung aller Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen. Die Kinetochore der „Off-Plate-Chromosomen“ scheinen an Astral-Mikrotubuli gebunden zu sein.



**Abb. 28:** Mikroskopisches Erscheinungsbild eines „off-plate“-Chromosoms nach Inkubation von AG01522C-Fibroblasten mit E2. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere die immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierte Mitosespindel und das rechte Bild eine Überlagerung aller Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen. Hier ist unsicher, ob das „Off-Plate-Chromosom“ zwischen zwei eng benachbarten Spindelpolen oder innerhalb der Astral-Mikrotubuli eines Pols gebunden ist.

- >2-polare Spindeln: Hier kommen drei oder mehrere Spindelpole vor, die die Chromosomen zwischen sich anordnen (Abb. 29). Dieser Effekt scheint nach Entfernung der Substanz nicht reversibel zu sein und kann beispielsweise bei einer tripolaren Spindel je nach Geometrie der Spindelpole zu zwei Tochterkernen mit Mikrokern oder zu einer dreikernigen Zelle führen (Abb. 30 und Abb. 51 in Kap. 5.2.5).

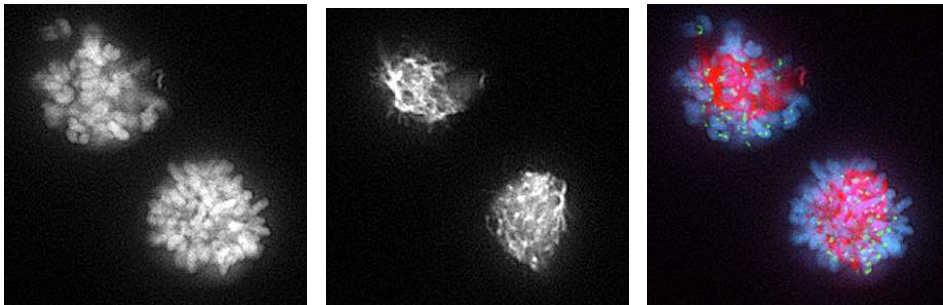


**Abb. 29:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer Metaphase mit tripolarer Mitosespindel nach Inkubation von AG01522C-Fibroblasten mit E2. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere die immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierte Mitosespindel und das rechte Bild eine Überlagerung aller Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen.

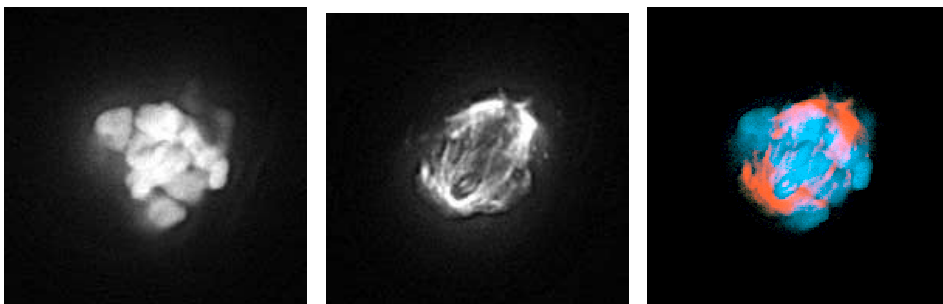


**Abb. 30:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer multipolaren Telophase. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Chromosomen, das mittlere die immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierte Mitosespindel und das rechte Bild eine Überlagerung der beiden Kanäle. Die Chromosomensätze werden zu zwei Hauptpolen (später Tochterzellkerne?) und zwei kleineren Polen (später Mikrokern?) gezogen.

- Strukturelle Störungen: In dieser Klasse sind sowohl Strukturstörungen der Chromosomen wie Überkondensation, als auch Mitosespindelschäden, wie deutlich reduzierte rudimentäre Mitosespindeln vereinigt (Abb. 31). Auch die bereits erwähnte „C-Mitose“ wurde in diese Kategorie aufgenommen. Diese Effekte scheinen nur im geringen Ausmaß reversibel zu sein, auch wenn sich die Dichte der Spindel-Mikrotubuli wieder vergrößern kann, nachdem Mikrotubuli-Polymerisations-Hemmstoffe wie DES wieder aus dem Inkubationsmedium entfernt werden. Solche schweren Schäden verhindern oftmals nach Entfernung der Testsubstanz die Kernteilung und führen so zu Polyploidie. Mitosen mit sehr stark überkondensierten Chromosomen, wie in Abb. 32 dargestellt, bilden im Verlauf der substanzfreien Nachinkubationszeit die morphologischen Merkmale apoptotischer Zellen aus (starke Kondensation der DNA, daher charakteristische, mikroskopisch sehr helle runde Kernfragmente).



**Abb. 31:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer C-Mitose nach Inkubation von AG01522C-Fibroblasten mit DES. Links, DAPI-gefärbte Zellkerne; Mitte, immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierte Mitosespindel; rechts: Überlagerung aller Kanäle; grünelbene Signale, immunologisch FITC-markierte Kinetochorproteine. Das einzeln liegende Chromosom könnte noch über das Kinetochor eines Chromatids mit der stark geschädigten Spindel verbunden zu sein.



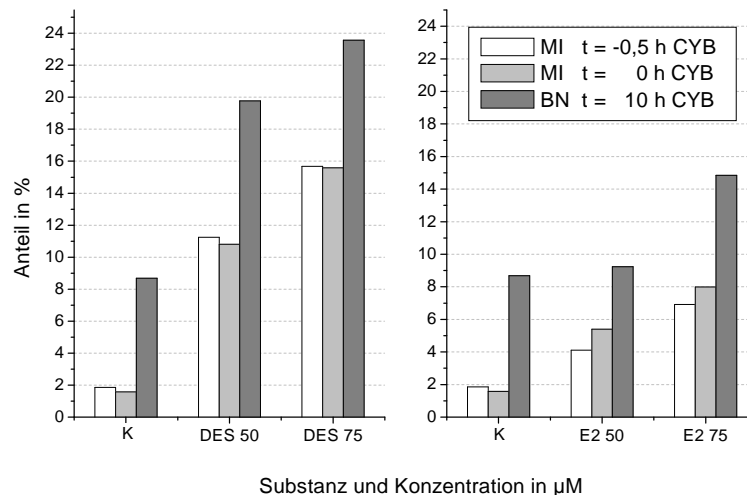
**Abb. 32:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer AG01522C-Zelle nach Inkubation mit TMBP. Links: DAPI-gefärbte Zellkerne; Mitte, immunologisch gegen  $\alpha$ -Tubulin fluoreszenzmarkierte Mitosespindel; rechts: Überlagerung aller Kanäle.

Bei der dargestellten Einteilung kommt es teilweise zu Überschneidungen der Effekte: So können „Off-Plate-Chromosomen“ an einer visuell völlig intakten Mitosespindel, aber auch an einer nur noch rudimentär vorhandenen Spindel vorkommen. Auch kann manchmal das Vorhandensein eines weiteren Spindelpols, dessen Kinetochormikrotubuli das vermeintliche „Off-Plate-Chromosom“ binden, nicht ausgeschlossen werden (Abb. 28). Auch die an der Mitose beteiligten Chromosomen können sich hinsichtlich des Kondensationsgrades deutlich unterscheiden. Außerdem ist es gerade bei schweren Spindelschäden nicht leicht, polypolare Spindeln auszuschließen. Bei der Auswertung der im Folgenden vorgestellten Ergebnisse wurden fragliche Mitosen jeweils der Klasse zugeordnet, die ihr Erscheinungsbild am deutlichsten zu charakterisieren schien.

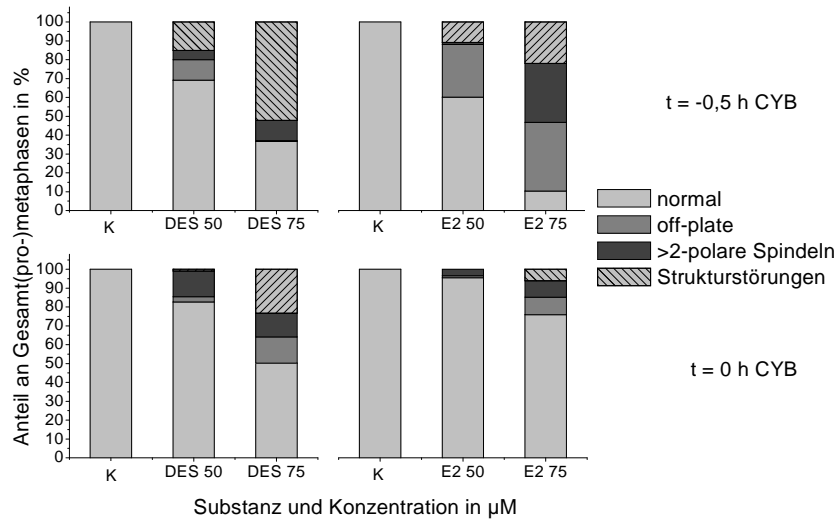
Anders als beim CB-Mikrokerntest mit Klastogenen von Fenech (2000a) beschrieben, ist der Anteil an zweikernigen Zellen an der Gesamtzellzahl kein geeignetes Maß für wachstumshemmende oder zytotoxische Eigenschaften einer aneuploidogenen Substanz, die Mitosearrest induziert. In diesem Fall ist ein Maximum an zweikernigen Zellen nicht bei der Kontrolle, sondern bei der Substanzkonzentration zu erwarten, die einen möglichst vollständigen, aber reversiblen, Mitosearrest induziert. Bei höheren Konzentrationen ist dann ein Rückgang der Rate der zweikernigen Zellen durch irreversible Mitosearrest und andere zytotoxische oder apoptotische Effekte zu erwarten.

**DES und E2** Wie in Abb. 33 zu sehen ist, bewirkt eine Substanzbehandlung für die Dauer eines halben Zellzyklus sowohl bei DES als auch bei E2 erwartungsgemäß einen Anstieg des Mitoseindex im Vergleich zur Kontrolle. Sowohl nach Inkubation mit DES als auch mit E2 verändert sich der Mitoseindex nach der halben Stunde Erholungszeit zwischen Substanz- und Cytochalasin B-Inkubation, kaum. Dabei ist zu beachten, dass im Mitoseindex zwar auch die Ana- und Telophasen enthalten sind, zu den beiden aufgeführten Zeitpunkten aber zum überwiegenden Anteil Metaphasen vorliegen. Der Effekt ist bei DES weitaus stärker ausgeprägt als bei E2. So bewirken 50  $\mu\text{M}$  DES eine Verfünf- und 75  $\mu\text{M}$  sogar eine Verachtfachung des Mitoseindex, während bei E2 der Mitoseindex bei gleichen Konzentrationen nur um das Drei- bis Vierfache steigt. Dies macht sich auch in dem prozentualen Anteil an zweikernigen Zellen bemerkbar: Je höher der Mitoseindex nach Substanzinkubation, desto höher ist nach 10 Stunden Cytochalasin B-Inkubation auch der Anteil an zweikernigen Zellen. Allerdings muss beachtet werden, dass sich gerade bei der höchsten DES-Konzentration nicht alle Mitosen wieder erholen und zweikernige Zellen bilden, sondern einige irreversibel arretieren und zur Apoptose übergehen. Die unterschiedlich starke Erhöhung des Mitoseindex bei DES und E2 liegt zum Einen daran, dass nach Behandlung der Zellen mit 75  $\mu\text{M}$  DES die Mitose komplett arretiert ist (keine Ana- oder Telophasen), während bei E2 die Mitose nur verzögert durchlaufen wird und auch bei der höchsten eingesetzten E2-Konzentration noch Ana- und Telophasen zu

sehen sind (Ergebnis nicht dargestellt). Beide Substanzen scheinen aufgrund eines unterschiedlichen Mechanismus die Mitose zu beeinflussen: Während DES unter anderem die zellfreie Mikrotubuli-Polymerisation hemmt, kann eine solche Eigenschaft für E2 nicht nachgewiesen werden (Pfeiffer et al., 1997). Auch das Erscheinungsbild der arretierten Mitosen stellt sich bei den Substanzen völlig anders dar (Abb. 34): Nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  DES ist vor allem die Struktur sowohl der Mitosespindeln als auch die der Chromosomen stark gestört. So ist teilweise die Mitosespindel nur noch rudimentär ausgebildet und Chromosomen liegen zumeist stark überkondensiert vor. Bei alleiniger Betrachtung der Chromosomen nach Färbung der DNA mit DAPI liegt bei der höchsten DES-Konzentration die Hälfte der Mitosen als „C-Mitose“ (Abb. 31) vor. Dabei ist zu beachten, dass bei der C-Mitose die Mikrotubuli der Mitosespindel teilweise deutlich ausgeprägt sind und auch keine Überkondensation der Chromosomen vorhanden sein muss. Nach einer halben Stunde substanzfreier Erholungszeit scheinen sich die Mitosespindeln deutlich zu regenerieren: Die Anzahl der normalen Metaphasen nimmt zu, allerdings bleiben weiterhin multipolare und „Off-Plate-Chromosomen“ (Abb. 34) zu sehen. Obwohl nach Inkubation der Zellen mit E2 der Mitoseindex viel geringer ist als nach Exposition mit DES, erkennt man bei Betrachtung der Metaphasebilder, dass nach 12-stündiger Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  E2 fast keine Metaphase mehr ein normales Erscheinungsbild hat. Fast alle Metaphasen haben mehr als 2 Pole oder ein oder mehrere „Off-Plate-Chromosomen“. Die Zahl der „Off-Plate-Chromosomen“ nimmt nach der Erholungsphase stark ab, so dass unmittelbar vor der Cytochalasin B-Zugabe ( $t = 0$  h CYB) 80 % der Metaphasen normal erscheinen.

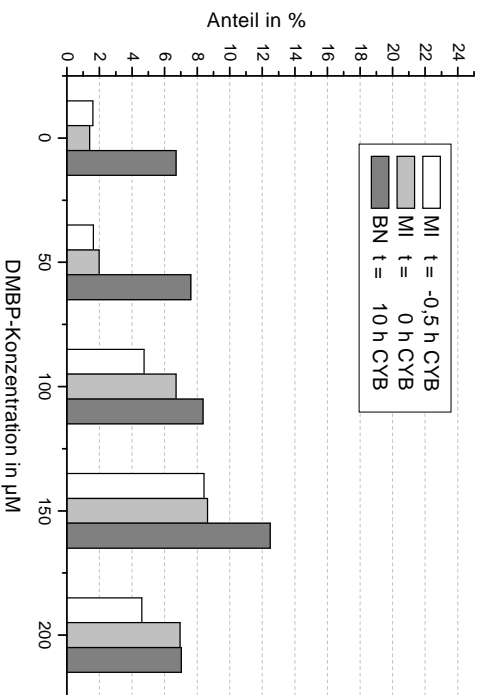


**Abb. 33:** Mitoseindex (MI) unmittelbar nach Substanzbehandlung von AG01522C-Zellen mit DES oder E2 ( $t = -0,5$  h CYB) und nach 0,5-stündiger substanzfreier Nachinkubation, unmittelbar vor Cytochalasin B-Zugabe ( $t = 0$  h CYB). Die dunkelgrauen Säulen stellen den Anteil zweikerniger Zellen (BN) nach 10-stündiger Nachinkubation mit CYB dar.

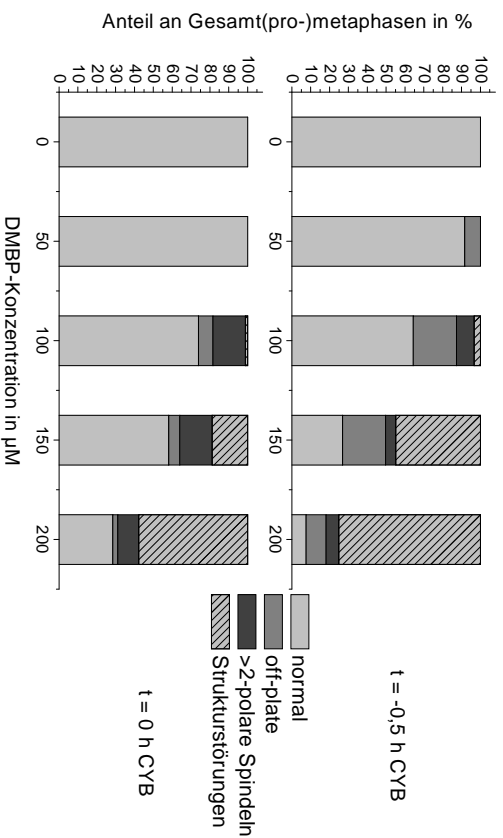


**Abb. 34:** Einfluss der Behandlung von AG01522C-Fibroblasten mit DES oder E2 auf die Morphologie der Metaphase.  $t = -0,5$  h CYB, nach der Substanzbehandlung;  $t = 0$  h CYB, nach 0,5-stündiger substanzfreier Nachinkubation (vor der CYB-Zugabe).

**DMBP** In Abb. 35 ist der Einfluss der DMBP-Konzentration auf den Mitoseindex, beziehungsweise auf den Anteil an zweikernigen Zellen nach 10-stündiger Cytochalasin B-Inkubation dargestellt. Ab  $100 \mu\text{M}$  ist eine Erhöhung des Mitoseindex gegenüber der Kontrolle zu beobachten. Der maximale Effekt wird mit einer Vervielfachung der Kontrolle bei  $150 \mu\text{M}$  DMBP erreicht (8 % gegenüber knapp 2 %). Dies liegt etwa in der Größenordnung des Effekts von  $50 \mu\text{M}$  DES (Abb. 33). Bei der höchsten getesteten Konzentration ( $200 \mu\text{M}$  DMBP) sinkt der Mitoseindex möglicherweise durch zytotoxischer Effekte wieder ab. Auch der Anteil an zweikernigen Zellen steigt nicht so stark wie aufgrund der Zunahme des Mitoseindex zu erwarten wäre. Dies kann daran liegen, dass nicht jede beobachtete Metaphase die Mitose nach einem Mediumwechsel beenden kann, sondern die Zellen teilweise irreversibel geschädigt sind. Die Abhängigkeit der Metaphasebilder von der DMBP-Konzentration ist in Abb. 36 dargestellt. Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der strukturell gestörten Mitosen. Obwohl nach Inkubation mit  $100 \mu\text{M}$  und  $200 \mu\text{M}$  DMBP der Mitoseindex der gleiche ist, ist deutlich zu erkennen, dass die Metaphasen nach DMBP-Behandlung mit  $200 \mu\text{M}$  strukturell viel stärker geschädigt sind, als mit  $100 \mu\text{M}$ , bei denen „Off-Plate-Chromosomen“ überwiegen. Nach der halbstündigen Erholungsphase ist der Anteil an „Off-Plate-Chromosomen“ zugunsten normal erscheinender Metaphasen deutlich verringert. Es erscheint daher fraglich, ob bei Substanzvergleichen bezüglich der Effekte auf den Aufbau des Mikrotubuli-Apparates wie bei Ochi (1999) Konzentrationen miteinander verglichen werden sollten, die den gleichen Mitoseindex induzieren.

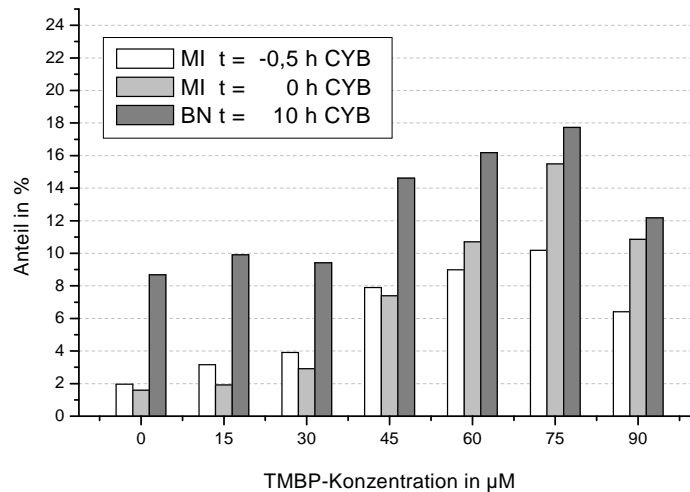


**Abb. 35:** Mitoseindex (MI) unmittelbar nach Substanzbehandlung von AG01522C-Zellen mit DMBP ( $t = -0,5$  h CYB) und nach 0,5-stündiger substanzfreier Nachinkubation, unmittelbar vor der CYB-Zugabe ( $t = 0$  h CYB). Die dunkelgrauen Säulen stellen den Anteil zweikerniger Zellen (BN) nach 10-stündiger Nachinkubation mit CYB dar.



**Abb. 36:** Einfluss der Behandlung von AG01522C-Fibroblasten mit DMBP auf die Morphologie der Metaphase.  $t = -0,5$  h CYB, nach der Substanzbehandlung;  $t = 0$  h CYB, nach 0,5-stündiger substanzfreier Nachinkubation (vor der CYB-Zugabe).

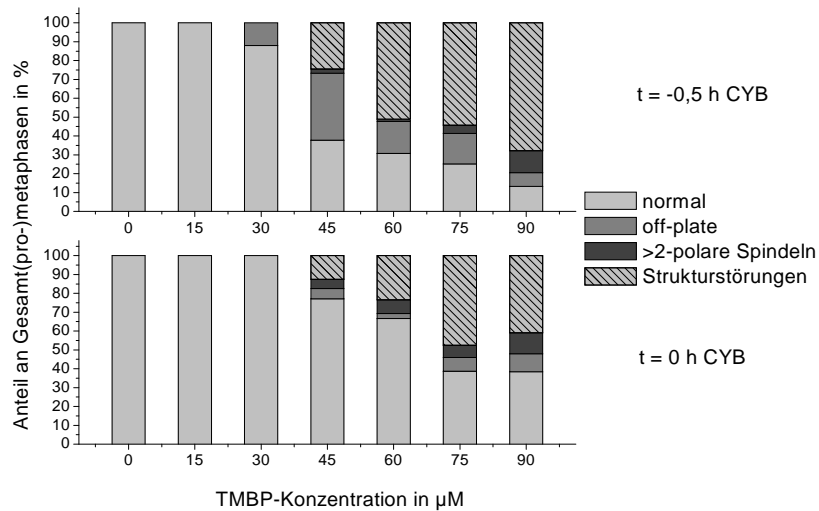
**TMBP** In Abb. 37 ist der Einfluss der TMBP-Konzentration auf den Mitoseindex, beziehungsweise auf den Anteil an zweikernigen Zellen nach 10-stündiger Cytochalasin B-Inkubation dargestellt. Ab 45  $\mu\text{M}$  ist eine Erhöhung des Mitoseindex auf 8 % gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (mit einem Mitoseindex von etwa 2 %) zu beobachten. Der maximale Effekt wird mit einer Verachtfachung des Mitoseindex der Kontrolle bei 75  $\mu\text{M}$  TMBP erreicht (MI = 16 %). Dies liegt etwa in der Größenordnung des Effekts nach Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  DES (siehe auch Abb. 33). Bei der höchsten getesteten Konzentration (90  $\mu\text{M}$  TMBP) sinkt der Mitoseindex wie bei Inkubation mit 200  $\mu\text{M}$  DMBP, aufgrund zytotoxischer Effekte wieder ab. Besonders auffällig ist, dass der Mitoseindex ab 60  $\mu\text{M}$  TMBP nach der halbstündigen Erholungsphase nochmals deutlich, gegenüber dem Zeitpunkt unmittelbar nach Substanzinkubation, ansteigt. Dies könnte durch einen zusätzlichen Zellzyklusblock in der späten G2-Phase unmittelbar vor der Mitose zustande kommen. Tatsächlich ist ein Zellzyklus-Kontrollpunkt, der den Eintritt in die Mitose regelt, beschrieben (O'Connell et al., 2000). Auch der Anteil an zweikernigen Zellen steigt nicht so stark wie aufgrund der Zunahme des Mitoseindex zu erwarten wäre. So wird nach Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  DES bei ähnlichem Mitoseindex eine deutlich höhere Anzahl an BN nach 10-stündiger Inkubation mit Cytochalasin B erreicht. Dies kann daran liegen, dass auch bei TMBP nicht jede beobachtete Metaphase die Mitose nach einem Mediumwechsel beenden kann.



**Abb. 37:** Mitoseindex (MI) unmittelbar nach 12-stündiger Substanzbehandlung von AG01522C-Zellen mit TMBP ( $t = -0,5$  h CYB) und nach 0,5-stündiger substanzfreier Nachinkubation, unmittelbar vor der CYB-Zugabe ( $t = 0$  h CYB). Die dunkelgrauen Säulen stellen den Anteil zweikerniger Zellen (BN) nach 10-stündiger Nachinkubation mit CYB dar.



Die Betrachtung der Morphologie der Metaphasen (in Abb. 38 zusammengefasst), zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme der strukturell gestörten Metaphasen. Auch nach Behandlung der Zellen mit TMBP zeigen Konzentrationen, die den gleichen Mitoseindex bewirken (60  $\mu\text{M}$  und 90  $\mu\text{M}$  TMBP) ein unterschiedliches Erscheinungsbild der arretierten Metaphasen. Wie bei DMBP nimmt der Anteil an Strukturschäden gegenüber den normalen Metaphasen und den überwiegend reversiblen „Off-Plate-Chromosomen“ zu, wenn auch nicht so deutlich wie bei DMBP.



**Abb. 38:** Einfluss der Behandlung von AG01522C-Fibroblasten mit TMBP auf die Morphologie der Metaphase. t = -0,5 h CYB, nach der Substanzbehandlung; t = 0 h CYB, nach 0,5-stündiger substanzfreier Nachinkubation (vor der CYB-Zugabe).

#### 5.2.4 Klassischer Mikrokerntest und CB-Mikrokerntest

Die Auswertung der Metaphasebilder nach Behandlung von AG01522C-Fibroblasten mit den zu untersuchenden Substanzen deutet darauf hin, dass bei dem Herauslaufen aus dem Mitosearrest ganze Chromosomen verloren gehen oder fehlverteilt werden können. Mit Hilfe des Mikrokerntests ohne Cytochalasin B-Zugabe sowie mit Cytochalasin B im CB-Mikrokerntest ist es möglich, Chromosomenverluste in Form eines Mikrokerns zu detektieren. Mittels immunfluorimetrischer Markierung der Kinetochorproteine können ganze Chromosomen (Kinetochor-positiv) von Chromosomen-Bruchstücken (Kinetochor-negativ) unterschieden werden. In Abb. 24 (in Kap. 5.2.2) ist eine zweikernige Zelle mit Kinetochor-positivem Mikrokern dargestellt.

Beim CB-Mikrokerntest werden normalerweise nur zweikernige Zellen auf Mikrokern untersucht, da man davon ausgehen kann, dass Mikrokern nur in sich teilenden Zellen auftreten können. Meist wird der Anteil der zweikernigen Zellen mit Mikrokern bezogen auf 500 oder 1000 zweikernige Zellen angegeben (Fenech, 1997, 2000a). Um einen möglicherweise negativen Einfluss des Cytochalasin B auf die Mikrokerninduktion erfassen zu können und das Ergebnis des CB-Mikrokerntests mit dem Mikrokerntest ohne Cytochalasin B vergleichen zu können, kann der CB-Mikrokerntest zusätzlich „klassisch“ ausgewertet werden. Dazu werden alle Zellkerne, wie sie bei der mikroskopischen Auswertung erscheinen (unabhängig ob sie einer ein- oder zweikernigen Zelle entstammen), auf Mikrokern untersucht. Die auf diese Weise ermittelte Mikrokernrate sollte der des Mikrokerntests ohne Cytochalasin B entsprechen (Minissi et al., 1999). Ist sie niedriger, ist von einem Einfluss des Cytochalasin B auf die Mikrokerninduktion auszugehen. Minissi et al. (1999) konnten auf vergleichbare Weise einen negativen Einfluss von Cytochalasin B auf die Mikrokerninduktion durch Colchizin in humanen Lymphozyten zeigen.

Zur besseren Vergleichbarkeit des CB-Mikrokerntests in zweikernigen Zellen mit der „klassischen“ Auswertung des CB-Mikrokerntests und dem Mikrokerntest ohne Cytochalasin B, wird das Ergebnis des CB-Mikrokerntests daher nicht wie gewöhnlich als Anteil von zweikernigen Zellen mit Mikrokern relativ zur Gesamtzahl an zweikernigen Zellen angegeben, sondern durch 2 geteilt. Dies gibt das Ergebnis nicht bezogen auf Zellen, sondern bezogen auf Zellkerne an. Dadurch sind die Zahlenwerte der verschiedenen Tests und Auswertungsvarianten direkt vergleichbar. Wie bereits in Kap. 5.2.2 diskutiert, können die durch „klassische“ Auswertung des CB-Mikrokerntest gewonnenen Mikrokernraten trotz der geringfügig unterschiedlichen substanzfreien Nachinkubationszeit direkt mit den Ergebnissen des Mikrokerntests ohne Cytochalasin B verglichen werden. In Tab. 10 sind die Ergebnisse der verschiedenen Varianten des Mikrokerntests zusammenfassend dargestellt.

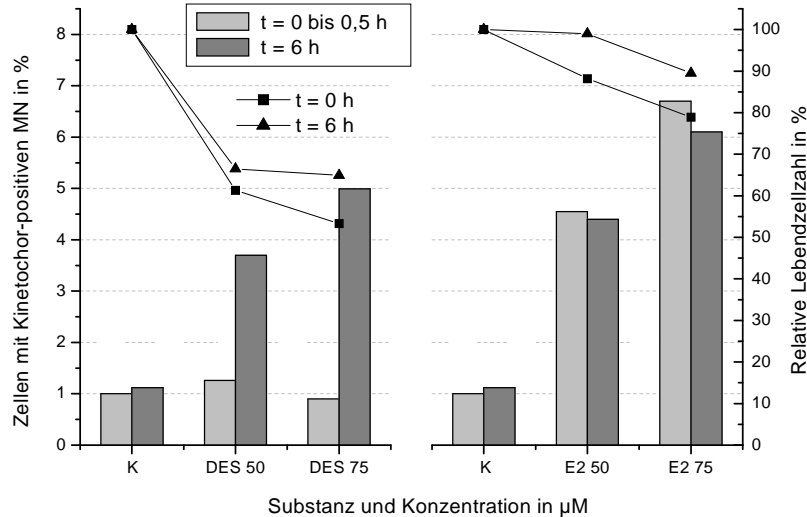
**Tabelle 10:** Prozentualer Anteil mikronukleierter Zellkerne nach 12-stündiger Inkubation von AG01522C-Fibroblasten mit DES, E2 und den Bisphenolen TMBP, DMBP und BPA. MN, Kinetochor-positiver Mikrokern; CYB, Cytochalasin B; 0 h, unmittelbar nach Substanzinkubation; 6 h, 6-stündige Erholungsphase nach Substanzinkubation; Gesamt-ZK, Summe der Zellkerne aller Zellen; BN-ZK, Zellkerne zweikerniger Zellen; K, Lösungsmittelkontrolle; n.n., nicht nachweisbar; n.b., nicht bestimmt. Die Werte werden erhalten durch Addition sowohl der Doppelbestimmung aus einem Versuch als auch der 2 bis 4 unabhängigen Versuche.

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Zellkerne mit MN in %			
		Ohne CYB		Mit CYB	
		0 h	6 h	Gesamt-ZK	BN-ZK
K		1,0	1,1	0,7	0,4
DES	50	1,3	3,7	2,8	4,2
	75	0,9	5,0	2,8	4,5
E2	50	4,4	6,1	3,3	3,7
	75	6,7	6,1	6,1	5,6
DMBP	50	1,0	1,6	1,1	1,4
	100	1,5	2,8	1,9	2,2
	150	1,6	3,3	2,3	4,9
	200	1,7	2,7	2,7	8,3
TMBP	15	0,7	0,6	0,4	1,0
	30	1,6	1,6	0,7	1,5
	45	3,0	2,8	2,5	3,1
	60	1,3	2,7	2,2	3,4
	75	1,4	2,8	2,9	4,3
	90	1,3	2,9	1,9	3,6
BPA	50	n.b.	0,4	0,7	n.n.
	100	1,4	1,0	1,0	n.n.
	150	n.b.	0,7	0,6	n.n.
	200	1,1	0,8	0,6	1,7
	250	n.b.	0,9	0,5	1,1

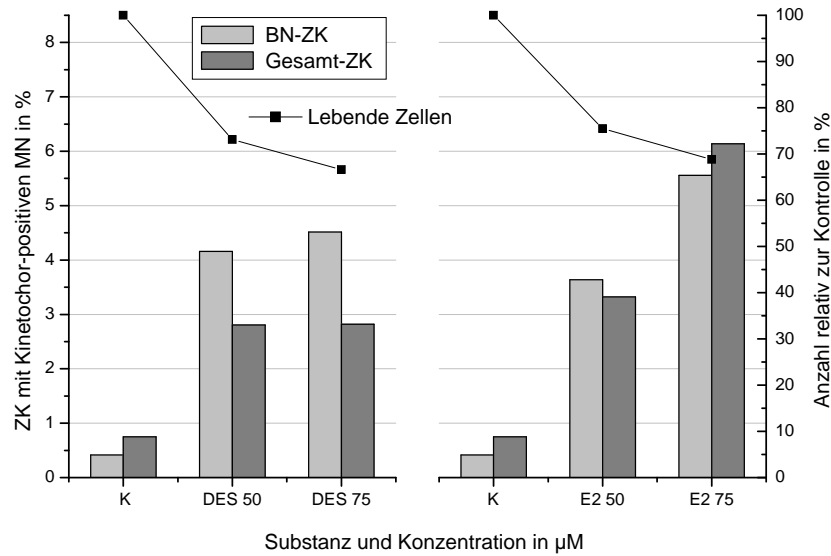
**DES und E2** Abb. 39 zeigt die konzentrationsabhängige Induktion Kinetochor-positiver Mikrokerne im Mikrokerntest ohne Cytochalasin B nach Inkubation mit DES oder E2 als Säulendiagramm. Daneben ist als Linie/Symbol-Diagramm die relative Lebendzellzahl bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle (100 %) dargestellt. Deutlich ist zu erkennen, dass DES und E2

nach einem unterschiedliche Mechanismus Mikrokerne in AG01522C-Fibroblasten induzieren: Nach Inkubation mit DES ist der Mitosearrest vollständig, so dass unter Substanzeinwirkung keine Zelle die Mitose verlassen kann und daher bei dem Zeitpunkt ( $t = 0$  bis 0,5 h) keine Erhöhung der Mikrokernrate sichtbar ist. Nach 6-stündiger substanzfreier Nachinkubationszeit jedoch steigt der prozentuale Anteil an Kinetochor-positiven Mikrokerneln von zirka 1 % in der Kontrolle auf 4 % bei 50  $\mu\text{M}$  DES, beziehungsweise 5 % bei 75  $\mu\text{M}$  deutlich an.

Im Gegensatz zum DES, fällt nach Inkubation mit E2 eine deutlich erhöhte Mikrokernrate unmittelbar nach Substanzinkubation auf. Wie bereits die relativ geringe Erhöhung des Mitoseindex und die Morphologie der arretierten Metaphasen (Abb. 33 und Abb. 34) andeuten, ist der Mitosearrest durch E2 nicht vollständig, so dass aus den Mitosen, die unter Substanzeinfluss durchlaufen werden, Mikrokerne entstehen können. Der Unterschied zwischen  $t = 0$  h bis 0,5 h und  $t = 6$  h ist demnach nur noch gering. Der leichte Rückgang der relativen Lebendzellzahl nach Inkubation mit E2 kommt im wesentlichen weniger durch echte Zytotoxizität als vielmehr durch den Mitosearrest zustande. Die Lebendzellzahl nach 6-stündiger Nachinkubationszeit (Abb. 39) zeigt hier, dass sich fast alle in der Mitose arretierten Zellen innerhalb von 6 Stunden erholen und nach Abschluss der Zellteilung genauso viele lebende Zellen wie in der Kontrolle gemessen werden.



**Abb. 39:** Induktion Kinetochor-positiver Mikrokerne (MN) durch DES und E2 im Mikrokern-test ohne CYB. Hellgraue Säulen, MN unmittelbar nach 12-stündiger Substanzexposition ( $t = 0$  bis 0,5 h); dunkelgraue Säulen, MN nach 6 h substanzfreier Nachinkubation ( $t = 6$  h); Linie/Symbol-Diagramm in Verbindung mit der rechten Y-Achse, relative Lebendzellzahl nach entsprechender Nachinkubationszeit.



**Abb. 40:** Induktion Kinetochor-positiver Mikrokerne (MN) im CB-Mikrokerntest nach 12-stündiger Exposition mit DES und E2 und 10-stündiger Cytochalasin B (CYB)-Behandlung. ZK, Zellkerne; die hellgrauen Säulen entsprechen dem prozentualen Anteil an zweikernigen Zellen (BN) mit MN geteilt durch 2 (BN-ZK); die dunkelgrauen Säulen entsprechen der Mikrokernelrate der Zellkerne aus ein- und zweikernigen Zellen (Gesamt-ZK); Linie/Symbol-Diagramm in Verbindung mit der rechten Y-Achse, relative Lebendzellzahl nach entsprechender Nachinkubationszeit.

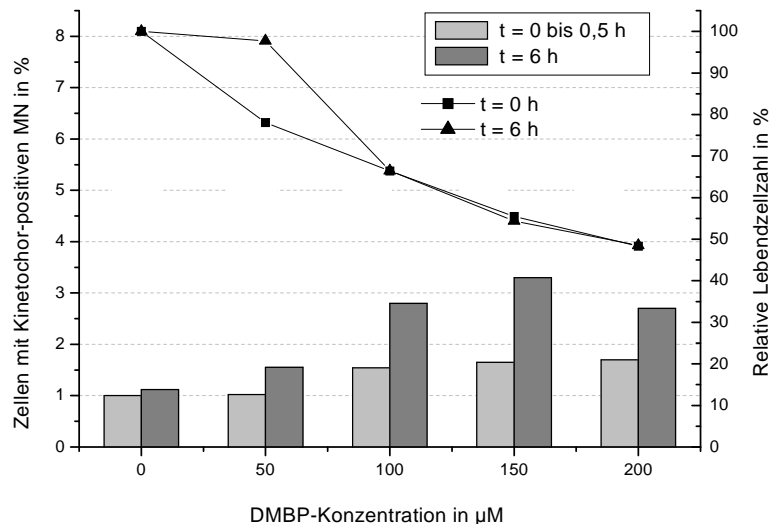
Nach Inkubation der Fibroblasten mit DES ist das Ergebnis des CB-Mikrokerntests (Abb. 40), wenn nur die zweikernigen Zellen ausgewertet werden, vergleichbar mit dem Ergebnis des klassischen Mikrokerntests (4 %, beziehungsweise 5 % der zweikernigen Zellen). Allerdings ist darauf zu achten, dass die Mikrokernelrate in der Lösungsmittelkontrolle beim CB-Mikrokerntest mit unter 0,5 % weniger als halb so gross ist wie beim Mikrokerntest ohne Cytochalasin B und damit im gleichen Größenbereich wie die natürliche Mikrokernelrate in V79-Hamsterlungenfibroblasten, die häufig für Mikrokerntests eingesetzt werden (von der Hude et al., 2000; Kalweit et al., 1999). Die gleiche Prozentzahl der Mikrokernelrate bedeutet im CB-Mikrokerntest eine doppelt so hohe Steigerung der Mikrokernelrate gegenüber der Kontrolle wie im Mikrokerntest ohne Cytochalasin B. Dies gilt mit der Einschränkung, dass die natürliche Mikrokernelrate wie auch das Wachstumsverhalten bei den primären AG01522C-Fibroblasten Schwankungen unterliegt. Durch die Verwendung von Cytochalasin B werden solche Schwankungen etwas ausgeglichen, da der Anteil zweikerniger Zellen das Wachstumsverhalten der Zellen widerspiegelt.

Die klassische Auswertung aller Zellkerne des CB-Mikrokerntests mit Cytochalasin B ergibt einen um zirka ein Prozent geringeren Anstieg der Mikrokernrate gegenüber der Auswertung der zweikernigen Zellen. Die selektive Auswertung der zweikernigen Zellen erfasst demnach besser die Zellen, in denen Mikrokerne gebildet werden können. Wenn das Cytochalasin B keinerlei Einfluss auf die Mikrokerninduktion hat, ist das gleiche Ergebnis wie in Abb. 39 (dunkelgraue Säulen) zu erwarten. Es ist aber in Abb. 40 zu sehen, dass die Mikrokerninduktion geringer als erwartet ausfällt (knapp 3 % anstatt 4 %, beziehungsweise 5 %, siehe auch Tab. 10). Unter Cytochalasin B-Einfluss sterben eventuell mehr Zellen ab, die sich ohne Cytochalasin B noch von dem Mitosearrest erholen und die Mitose normal durchlaufen.

Im Falle von E2 ist bereits beim Vergleich des Mikrokerntests ohne Cytochalasin B mit 0 h, beziehungsweise 6 h Nachinkubationszeit abzusehen, dass der CB-Mikrokerntest kein deutlicheres Ergebnis als der herkömmliche Mikrokerntest liefern kann. Da der überwiegende Anteil an Mikrokernen bereits während der Substanzinkubation gebildet wird (vergleiche Abb. 39), werden diese Mikrokerne mit dem CB-Mikrokerntest nicht erfasst, da unter den gewählten Inkubationsbedingungen nur die Zellen erfasst werden, die sich zum Zeitpunkt der Cytochalasin B-Zugabe in oder kurz vor der Mitose befunden haben. Ein großer Anteil an Mikrokernen geht so bei der Auswertung der zweikernigen Zellen verloren. Im Vergleich zum Mikrokerntest ohne Cytochalasin B, ist im CB-Mikrokerntest nach Inkubation mit E2 daher keine stärkere Mikrokerninduktion zu sehen. Bei der „klassischen“ Auswertung des CB-Mikrokerntests ist das Ergebnis identisch mit der selektiven Auswertung der zweikernigen Zellen, da durch die Miterfassung der einkernigen Zellen der Anteil an Zellen, die bereits vor der Cytochalasin B-Zugabe einen Mikrokern ausgebildet haben, mitberücksichtigt wird. Da ein potenzieller negativer Einfluss des Cytochalasin B auf die Mikrokerninduktion wie von Minissi et al. (1999); Cimini et al. (1999, 1998) beschrieben, beim herkömmlichen Mikrokerntest wegfällt, ist dieser der empfindlichere Test zum Nachweis der Mikrokerninduktion durch E2 und anderen Substanzen, die keinen dichten Metaphaseblock induzieren.

**DMBP** Nach Inkubation mit 50 bis 200  $\mu\text{M}$  DMBP ist im klassischen Mikrokerntest ohne Cytochalasin B unmittelbar nach Substanzinkubation keine deutliche Erhöhung des prozentualen Anteils an Zellkernen mit Kinetochor-positivem Mikrokern zu erkennen (Abb. 41). Nach 6-stündiger Erholungszeit ist eine Erhöhung der Mikrokernrate von 1,6 % (50  $\mu\text{M}$ ) über 2,8 % (100  $\mu\text{M}$ ) auf einen Maximalwert von 3,3 % nach Inkubation mit 150  $\mu\text{M}$  zu sehen. Eine weitere Erhöhung der Konzentration bringt keine Steigerung des Effekts.

Die relative Lebenszellzahl nimmt bereits nach Behandlung der Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  DMBP auf 75 % der Lösungsmittelkontrolle ab. Allerdings ist nach der 6-stündigen Erholungsphase wieder die Lebenszellzahl der Kontrolle erreicht. Da bei dieser Konzentration noch keine Erhöhung des Mitoseindex festzustellen ist (Abb. 35), könnte dafür ein Zellzyklusblock in einem Stadium des Zellzyklus verantwortlich sein, der mehr als eine halbe und weniger als 6 Stunden vor der Mitose liegen müsste. Nach Inkubation mit höheren DMBP-Konzentrationen, die Mitosearrest induzieren (5.2.3) verhält sich die relative Lebenszellzahl mit und ohne Erholungsphase gleich. Das bedeutet, dass der Mitosearrest zwar teilweise reversibel ist, da sich aus zumindest einigen arretierten Mitosen im weiteren Inkubationsverlauf bei Testsubstanz-freier Nachinkubation zweikernige Zellen bilden, zusätzlich aber eine gewisse Anzahl an Zellen abstirbt. Bei den DMBP-Konzentrationen, bei denen Mikrokerne auftreten (150  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$ ), ist die Lebenszellzahl auf 55 % der Kontrolle abgesunken.

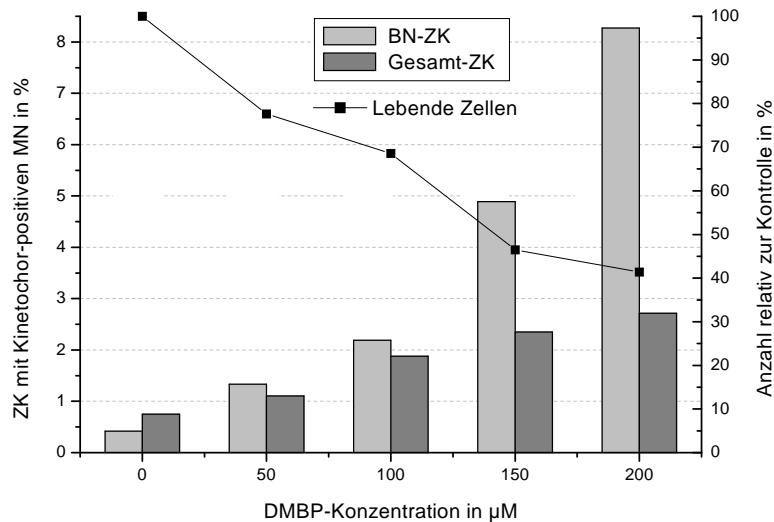


**Abb. 41:** Induktion von Kinetochor-positiven Mikrokernen (MN) im Mikrokerntest ohne CYB. Hellgraue Säulen, MN unmittelbar nach 12-stündiger DMBP-Exposition ( $t = 0$  bis 0,5 h); dunkelgraue Säulen, MN nach 6 h substanzfreier Nachinkubation ( $t = 6$  h); Linie/Symbol-Diagramm in Verbindung mit der rechten Y-Achse, relative Lebenszellzahl nach entsprechender Nachinkubationszeit.

Wie die hellgrauen Säulen in Abb. 42 deutlich zeigen, ist nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$  DMBP im CB-Mikrokerntest bei ausschließlicher Auswertung der zweikernigen Zellen ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg der Anzahl Kinetochor-positiver Mikrokerne zu erkennen. Nach Inkubation mit der höchsten DMBP-Konzentration hat sich die Mikrokernrate mit 8,3 % gegenüber der Kontrolle verzwanzigfacht. Selbst bei Zugrundelegen des

höheren Kontrollwertes von 1 % ist das Ergebnis wesentlich deutlicher als im in Abb. 41 dargestellten Cytochalasin B-freien Mikrokerntest. Das heißt, dass das aneuploidogene Potenzial von DMBP in CB-Mikrokerntest empfindlicher detektiert werden kann, da bei diesem Test selektiv sich teilende Zellen erfasst werden und die Teilungsfähigkeit der Zellen (die auch durch die reduzierten Lebendzellzahl widergespiegelt ist) bei Behandlung mit DMBP deutlich eingeschränkt zu sein scheint. Daher gehen im Mikrokerntest ohne Cytochalasin B zu viele Zellkerne in die Auswertung ein, die sich nicht unter Substanzeinfluss oder während der substanzfreien Nachinkubation geteilt haben. So zeigt sich denn auch bei der klassischen Auswertung der Cytochalasin B-behandelten Zellen unabhängig von der Anzahl an Kernen pro Zelle, nur ein leichter Anstieg der Mikrokernelrate, der erwartungsgemäß im Wesentlichen mit dem Mikrokerntest ohne Cytochalasin B mit 6-stündiger Erholungszeit (Abb. 41) übereinstimmt.

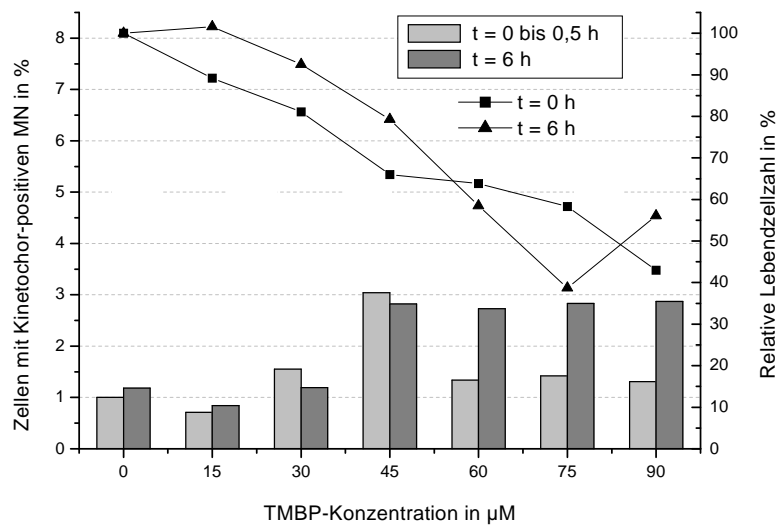
Die relative Lebendzellzahl verhält sich entsprechend den Werten unmittelbar nach Substanzinkubation (Abb. 41). Allerdings sinkt sie bei den beiden höchsten DMBP-Konzentrationen etwas stärker ab, was auf einen leichten Einfluss des Cytochalasin B auf die Lebensfähigkeit der Zellen schließen lässt. Trotzdem wirkt sich dies nicht negativ auf die Mikrokernelinduktion im CB-Mikrokerntest aus.



**Abb. 42:** Induktion von kinetochor-positiven Mikrokerneln (MN) im CB-Mikrokerntest nach 12-stündiger DMBP-Exposition und 10-stündiger Cytochalasin B (CYB)-Behandlung. ZK, Zellkerne; die hellgrauen Säulen entsprechen dem prozentualen Anteil an zweikernigen Zellen (BN) mit MN geteilt durch 2 (BN-ZK); die dunkelgrauen Säulen entsprechen der Mikrokernelrate der Zellkerne aus ein- und zweikernigen Zellen (Gesamt-ZK); Linie/Symbol-Diagramm in Verbindung mit der rechten Y-Achse, relative Lebendzellzahl nach entsprechender Nachinkubationszeit.



**TMBP** Das Ergebnis des Mikrokerntests ohne Cytochalasin B in AG01522C-Fibroblasten nach Inkubation mit TMBP zeigt Abb. 43. Nach Behandlung der Zellen mit 15  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  TMBP ist keine Erhöhung der Mikrokernelrate zu sehen. Der niedrige Wert nach Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  TMBP kann durch natürliche Schwankungen zustande kommen, da von den beiden niedrigsten Konzentrationen weniger Daten als von den anderen Konzentrationen zur Verfügung stehen. Nach Inkubation mit 45  $\mu\text{M}$  TMBP ist eine Erhöhung der Zellkerne mit Mikrokerneln um den Faktor Drei im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle zu beobachten. Dabei hat es kaum einen Einfluss auf das Ergebnis, ob die Zellen unmittelbar nach Substanzexposition oder nach einer 6-stündigen Erholungsphase ausgewertet werden. Dies lässt sich anhand Abb. 37 in Verbindung mit Abb. 38 in 5.2.3 erklären: Nach Behandlung der Zellen mit 45  $\mu\text{M}$  TMBP beträgt der Mitoseindex zwar bereits das Vierfache der Kontrolle, bei Betrachtung der Metaphasebilder fällt aber auf, dass der überwiegende Anteil der Metaphasen normal erscheint oder „Off-Plate-Chromosomen“ aufweist. Ein zusätzlicher Hinweis auf den nicht-vollständigen Mitosearrest, ist das Auftreten von Anaphasen (Tab. 9 und nicht dargestellte Ergebnisse). Wie schon bei E2-behandelten Fibroblasten gezeigt wurde, ist ein derartiger Mitosearrest nicht vollständig, sondern es ist nur die Dauer der Mitose verzögert, so dass bereits während der Substanzinkubation die Mitose vollendet und Mikrokerne ausgebildet werden können.



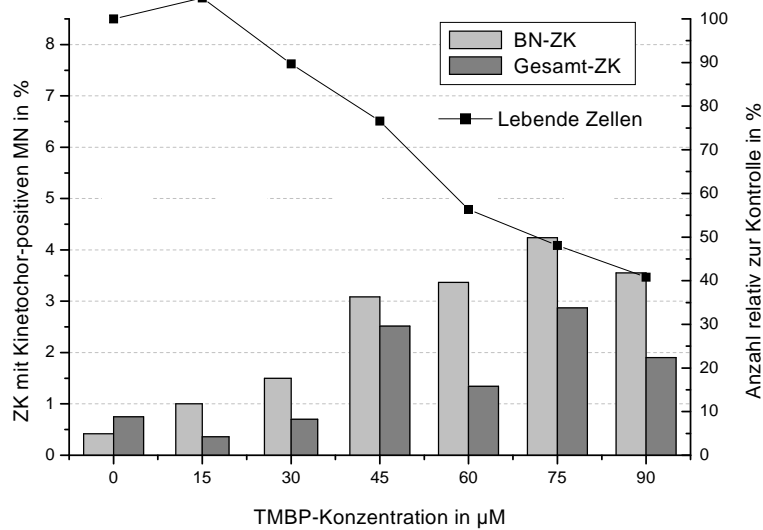
**Abb. 43:** Induktion von Kinetochor-positiven Mikrokerneln (MN) im Mikrokerntest ohne CYB. Hellgraue Säulen, MN unmittelbar nach 12-stündiger TMBP-Exposition ( $t = 0$  bis  $0,5$  h); dunkelgraue Säulen, MN nach 6 h substanzfreier Nachinkubation ( $t = 6$  h); Linie/Symbol-Diagramm in Verbindung mit der rechten Y-Achse, relative Lebendzellzahl nach entsprechender Nachinkubationszeit.

Ein anderes Bild ergibt sich nach Inkubation mit 60  $\mu\text{M}$  TMBP. Obwohl unmittelbar nach der Substanzexposition die Mikrokernrate kaum erhöht ist, beträgt der Anteil der Zellen mit Kinetochor-positivem Mikrokern nach der Erholungsphase das Doppelte bis Dreifache der Kontrolle (2,7 % gegenüber 1,1 %). Auch dies steht im Einklang mit den Ergebnissen des Mitosearresttests und der mikroskopischen Auswertung der Metaphasen. Der Mitoseindex unmittelbar nach Substanzinkubation ist stärker erhöht und sein weiterer Anstieg nach einer halben Stunde lässt auf einen weiteren Arrest innerhalb des Zellzyklus vor der Mitose schließen. Die Zellen sind während der Substanzinkubation also nur zu ganz geringem Ausmaß in der Lage, die Mitose zu vollenden. Erst nach dem Entfernen der Testsubstanz werden eventuell vorliegende Arreste aufgehoben, und es können nach der erforderlichen Zellteilung Mikrokerne entstehen. Durch eine weitere Erhöhung der TMBP-Konzentration kann die beobachtete Induktion Kinetochor-positiver Mikrokerne nicht gesteigert werden. Das ausgesprochen enge Konzentrationsfenster bei TMBP (kein Effekt bis zu 30  $\mu\text{M}$ , Effekt ohne Erholungsphase bei 45  $\mu\text{M}$  und Effekt nach Erholungsphase mit 60  $\mu\text{M}$  TMBP nicht mehr zu steigern) erschwert die Reproduzierbarkeit bei einer gegebenen Konzentration.

Auffällig bei Betrachtung der Lebendzellzahl nach Substanzexposition (Abb. 43), ist der Rückgang der Lebendzellzahl relativ zur Kontrolle bereits bei niedrigen TMBP-Konzentrationen bis 45  $\mu\text{M}$ . Bei diesen ist nach der 6-stündigen substanzfreien Nachinkubationszeit eine Erholung der Zellen zu beobachten. Zumindest nach Inkubation mit 45  $\mu\text{M}$  TMBP kann das auf die Reversibilität des Mitosearrests zurückzuführen sein. Nach der Inkubation mit höheren TMBP-Konzentrationen erholen sich die Zellen nicht mehr, sondern die Zellzahl sinkt im Vergleich zur Kontrolle weiterhin ab. Da unter den gewählten Auswertebedingungen (gleichzeitige Markierung und Bewertung des CMTC) eine irrtümliche Bewertung von apoptotischen Körperchen oder Kernfragmenten durch Kernzerfall als Mikrokerne weitgehend ausgeschlossen ist, erscheint eine Auswertung trotz der reduzierten Lebendzellzahl möglich, wenn auch die Ergebnisse vor dem Hintergrund der relativ hohen Zytotoxizität bewertet werden müssen.

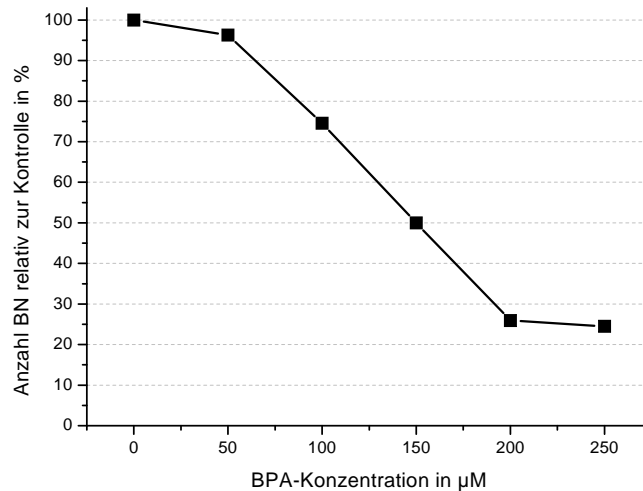
Das Ergebnis des CB-Mikrokerntests ist in Abb. 44 dargestellt. Bei der selektiven Auswertung der zweikernigen Zellen ist ein leichter, konzentrationsabhängiger prozentualer Anstieg an Zellkernen mit Kinetochor-positivem MK zu sehen. Der maximale Effekt mit dem Zehnfachen des Kontrollwertes (4,3 % gegenüber 0,4 %) wird nach Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  TMBP erreicht. Inkubation mit dieser Substanzkonzentration bewirkt auch den höchsten Anteil an zweikernigen Zellen (Abb. 37).

Die Auswertung der gleichen Objektträger ohne Unterscheidung zwischen zweikernigen und einkernigen Zellen zeigt ein uneinheitlicheres Ergebnis. Tendenziell scheint die Mikrokerninduktion mit dem herkömmlichen Mikrokerntest ohne Cytochalasin B-Zugabe und 6 h Erholungszeit vergleichbar zu sein.



**Abb. 44:** Induktion von Kinetochor-positiven Mikrokernen (MN) im CB-Mikrokerntest nach 12-stündiger TMBP-Exposition und 10-stündiger Cytochalasin B (CYB)-Behandlung. ZK, Zellkerne; Hellgraue Säulen, zweikernige Zellen (BN) mit MN geteilt durch 2 (BN-ZK); dunkelgraue Säulen, Mikrokernrate der Zellkerne aus ein- und zweikernigen Zellen (Gesamt-ZK); Linie/Symbol-Diagramm in Verbindung mit der rechten Y-Achse, relative Lebendzellzahl nach entsprechender Nachinkubationszeit.

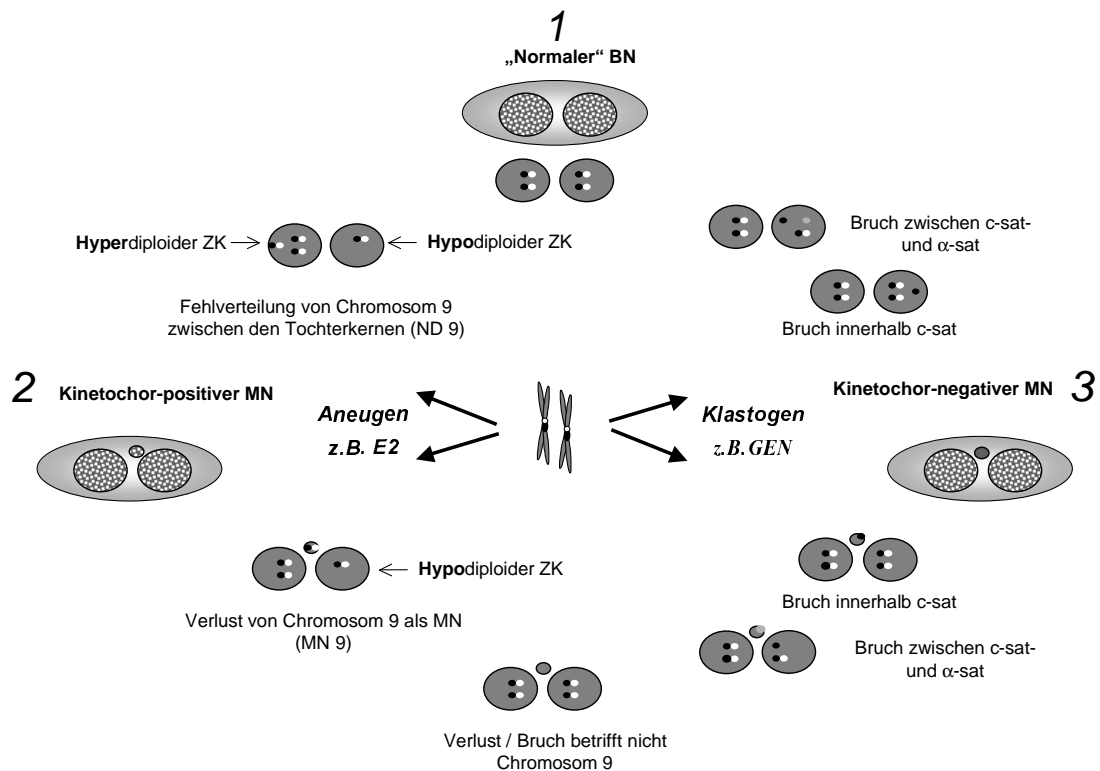
**BPA** Wie in Abb. 45 zu sehen ist, ist aufgrund der stark wachstumshemmenden Wirkung höherer BPA-Konzentrationen keine Auswertung eines CB-Mikrokerntests möglich, da nur sehr wenige zweikernige Zellen erhalten werden. Die Anzahl an zweikernigen Zellen in der Kontrolle ist nach 10-stündiger Cytochalasin B-Inkubation relativ gering (bei schlechtem Wachstum ungefähr 10 % der Zellen, beziehungsweise 20 % der Zellkerne), daher ist eine Auswertung mit noch weniger BN nahezu unmöglich. So konnten im CB-Mikrokerntest mit BPA nur Konzentrationen bis 150  $\mu\text{M}$  angemessen untersucht werden (was einem Anteil an zweikernigen Zellen von zirka 5% der Zellen entspricht. Um 500 zweikernige Zellen auszuwerten, müssen demnach 10000 Zellen mikroskopisch bewertet werden). Weder im CB-Mikrokerntest noch im klassischen Mikrokerntest konnte im Konzentrationsbereich von 50  $\mu\text{M}$  bis 250  $\mu\text{M}$  eine zuverlässige Erhöhung der Mikrokernrate festgestellt werden (Tab. 10). Demnach scheint unter den verwendeten Bedingungen mit dem Mikrokerntest mit und ohne Cytochalasin B in AG01522C-Zellen kein aneuploidogener Effekt des BPA nachweisbar zu sein. Dies steht im Widerspruch zu Ergebnissen nach denen BPA Kinetochor-positive Mikrokernne in V79-Zellen induziert (Pfeiffer et al., 1997). Jedoch lässt bereits das Fehlen eines Mitosearrests nach Inkubation von humanen Fibroblasten und humanen Krebszelllinien mit BPA darauf schließen, dass in dieser Zelllinie unter den gewählten Inkubationsbedingungen keine Mikrokernne induziert werden.



**Abb. 45:** Relativer Anteil an zweikernigen Zellen (BN) im Vergleich zur Kontrolle nach 12-stündiger Inkubation von AG01522C-Zellen mit BPA, 0,5-stündiger substanzfreier Erholungsphase und 10-stündiger CYB-Inkubation.

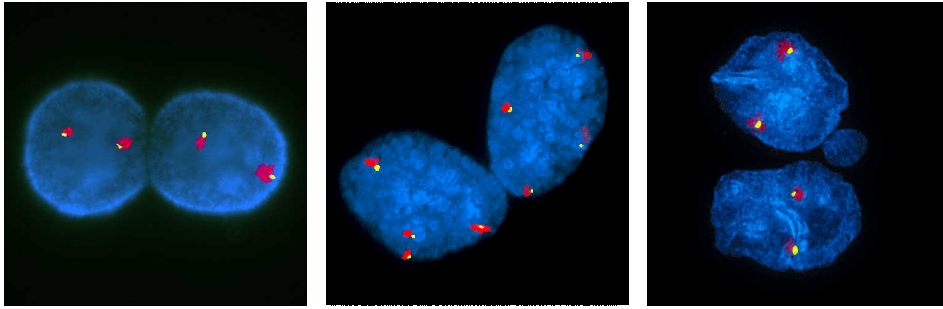
### 5.2.5 CB-Mikrokerntest mit FISH

Durch die Markierung der Satellitenregion des humanen Chromosoms 9 mittels Fluorochrommarkierter DNA-Sonden kann die Fehlverteilung (Nondisjunction, ND) und der Verlust als Mikrokern dieses Chromosoms in Interphasezellen sichtbar gemacht werden. Zur Erinnerung, wie sich genetische Aberrationen mit dem CB-Mikrokerntest mit Tandem-FISH-Markierung eines einzelnen Chromosoms im Vergleich zu dem in Kap. 5.2.4 behandelten CB-Mikrokerntest darstellen, sind in Abb. 46 die in den beiden Tests mikroskopisch erfassbaren Aberrationen schematisch dargestellt. Auf eine mikroskopische Auswertung der Chromosomen-Brüche innerhalb der markierten klassischen Satellitenregion von Chromosom 9 wurde verzichtet, da sich in Vorversuchen die Auswertung aufgrund der zu hohen Strangbruchrate in unbehandelten Kontrollzellen gegenüber der beobachteten Steigerung der Strangbruchrate durch erwiesene Klastogene als zu unempfindlich erwies (eigene Beobachtung).

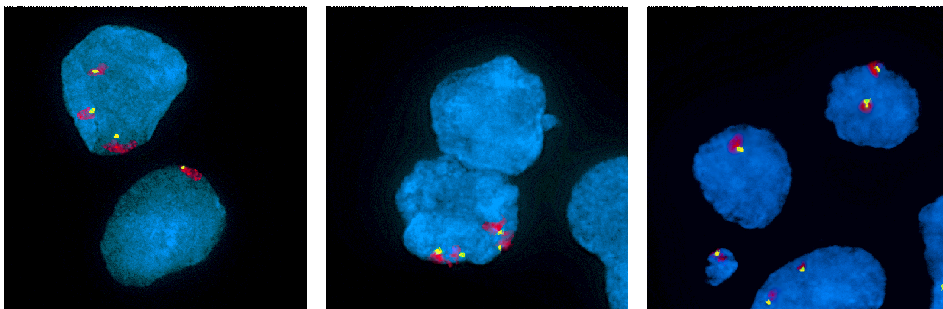


**Abb. 46:** Schematische Darstellung der Detektion möglicher genetischer Schäden in zweikerigen Zellen (BN) mittels Tandem-FISH zweier benachbarter Regionen auf Chromosom 9 oder CB-Mikrokerntest nach immunologischer Markierung der Kinetochorproteine und des zytoplasmatischen Mikrotubuli-Komplexes. ND, Nondisjunction; MN, Mikrokern; ZK, Zellkern; E2, 17 $\beta$ -Estradiol; GEN, Genistein; weiße Kreise,  $\alpha$ -Satellitenregion ( $\alpha$ -sat); schwarze Kreise, klassische Satellitenregion (c-sat).

Abb. 47 und Abb. 48 zeigen die fluoreszenzmikroskopischen Bilder, wie sie sich nach Färbung der Zellkerne mit einem blauen Chromatinfarbstoff (DAPI) und der FISH-Markierung zweier Abschnitte des Chromosoms 9 (klassische Satellitenregion, rot und  $\alpha$ -Satellitenregion, gelbgrün) darstellen. Abb. 47 zeigt bezüglich des Chromosoms 9 normal verteilte Zellkerne. Zellkerne, die sich wie das linke (diploid) und mittlere Bild (tetraploid) in Abb. 47 darstellen, sind in Tab. 11 als „normal“ aufgeführt. Die bezüglich Chromosom 9 tetraploiden Zellkerne werden als „normal“ angesehen, weil sie die Zellteilung unter Substanzeinfluss ohne **Veränderung** ihrer Ploidie vollzogen haben. Je nach Ursprung der Zellen kann ein gewisser Anteil der Zellen einer Zellpopulation polyploid vorliegen (beispielsweise 0,12 % in humanen Lymphozyten und bis zu 40 % in der Leber) (Mitchell et al., 1995), so dass davon auszugehen ist, dass die bei dem CB-Mikrokerntest mit FISH beobachteten zweikernigen Zellen mit jeweils 4 Signalen für Chromosom 9 polyploide Zellen darstellen. Aus diesem Grund ist die verwendete Zelllinie auch für die Detektion substanzinduzierter Polyploidie zu unempfindlich, da relativ oft einkernige Zellen mit 4 Signalen für Chromosom 9, wie sie in diesem Fall zu erwarten sind, vorkommen. Gerade wenn diese in Zweier- oder Vierer-Gruppen auftreten, liegt die Vermutung nahe, dass sie einkernigen Zellen entstammen, die sich in der Zeit der Cytochalasin B-Behandlung nicht geteilt haben. Zellkerne, wie sie das rechte Bild in Abb. 47 zeigt, entsprechen einer bezüglich des Chromosoms 9 diploiden zweikernigen Zelle, die einen Mikrokern enthält. Solche Zellen erscheinen in Tab. 11 zusammen mit den Chromosom 9 als Mikrokern enthaltenden zweikernigen Zellen in der Spalte „MN“. In Abb. 48 sind verschiedene mikroskopisch erfassbare Aneuploidien von Chromosom 9 dargestellt. Für die Chromosomen-Fehlverteilungen (3 + 1) und (4 + 0) wird in Tab. 11 und im Folgenden die Abkürzung „ND 9“ verwendet. Nondisjunction führt zu einem **hypodiploiden** und einem **hyperdiploiden** Tochterzellkern. Der im rechten Bild der Abb. 48 gezeigte Verlust des Chromosoms 9 als Mikrokern, wird in Tab. 11 und im Folgenden MN 9 abgekürzt. Chromosomenverlust als Mikrokern führt zu **Hypodiploidie** in einem der beiden Tochterzellkerne.



**Abb. 47:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild von Zellkernen in zweikernigen AG01522C-Zellen nach Sichtbarmachung der klassischen Satellitenregion des Chromosoms 9 mit einer Rhodamin-markierten DNA-Sonde (rot); der  $\alpha$ -Satellitenregion mit einer FITC-markierten DNA-Sonde (gelbgrün) und Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Von links nach rechts: Bezüglich Chromosom 9 diploide Zellkerne; bezüglich Chromosom 9 tetraploide Zellkerne; bezüglich Chromosom 9 diploide Zellkerne mit einem Mikrokern.



**Abb. 48:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild von Zellkernen in zweikernigen AG01522C-Zellen nach Sichtbarmachung der klassischen Satellitenregion des Chromosoms 9 mit einer Rhodamin-markierten DNA-Sonde (rot); der  $\alpha$ -Satellitenregion mit einer FITC-markierten DNA-Sonde (gelbgrün) und Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Von links nach rechts: Fehlverteilung von Chromosoms 9, ND 9 (3+1); Fehlverteilung von Chromosoms 9, ND 9 (4+0); Verlust von Chromosom 9 als Mikrokern (MN 9).

In Tab. 11 sind die Ergebnisse des CB-Mikrokerntests mit Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung zusammenfassend dargestellt. In den nächsten Abschnitten wird auf die Verteilung des Chromosoms 9 nach Inkubation von AG01522C-Zellen mit den Einzelsubstanzen näher eingegangen.

**Tabelle 11:** Anteil aneuploidogener zweikerniger Zellen (BN) und dreikerniger Zellen (TN) durch DES, E2 sowie durch die Bisphenole DMBP, TMBP und BPA. MN, Verlust eines beliebigen Chromosoms (auch 9!) in Form eines Mikrokerns (MN); MN 9, Verlust des Chromosoms 9 in Form eines MN; ND 9, Nondisjunction (Chromosomen-Fehlverteilung) bezüglich Chromosom 9; K, Lösungsmittelkontrolle; n.n., nicht nachweisbar.)

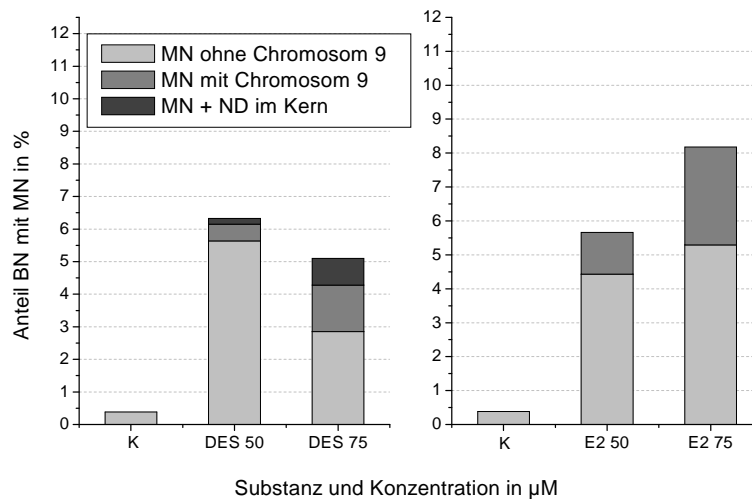
Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Anteil an allen erfassten sich teilenden Zellen in %					CB-MN
		Normal	MN	MN 9	ND 9	ND 9 (TN)	
K		99,4	0,4	n.n.	0,2	n.n.	0,8
DES	50	92,6	6,4	0,5	0,5	0,8	8,3
	75	92,9	5,1	1,4	1,8	1	9,0
E2	50	92,7	5,7	1,2	1,2	0,4	7,3
	75	89,8	8,2	2,9	1,1	0,8	11,1
DMBP	50	96,5	3,0	0,5	0,5	n.n.	2,7
	100	92,7	6,8	1,0	0,3	0,2	4,4
	150	89,1	8,4	1,6	1,4	0,6	9,8
	200	88,0	11,4	0,9	1,3	0,3	16,5
TMBP	15	96,1	2,9	0,6	0,9	0,3	2,0
	30	95,3	4,3	0,7	0,3	0,1	3,0
	45	92,5	6,7	0,4	0,8	0,3	6,2
	60	92,7	6,3	0,5	0,5	0,3	6,8
	75	92,9	5,4	0,7	1,0	0,5	8,5
	90	93,7	5,0	0,8	0,6	0,7	7,1
BPA	50	98,1	1,4	0,2	0,3	0,2	(n.n.)
	100	98,4	1,3	n.n.	0,1	0,1	(n.n.)
	150	98,2	1,8	n.n.	n.n.	n.n.	(n.n.)
	200	98,0	1,8	n.n.	n.n.	0,2	(3,3)
	250	97,7	2,1	0,1	0,4	n.n.	(2,2)

**DES und E2** In Abb. 49 ist der Verlust von Chromosomen als Mikrokern mit und ohne Chromosom 9 (MN 9 und MN in Abb. 49) nach Inkubation von AG01522C-Zellen mit den bekannten Aneugenen DES und E2 als prozentualer Anteil an allen sich teilenden Zellen dargestellt. Nach Inkubation von Fibroblasten mit 50  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  DES steigt die Anzahl der zweikernigen Zellen mit Mikrokern (6,4 % und 5,1 %) gegenüber der Kontrolle (0,4 %) deutlich an. Bei einer zufälligen Verteilung der Chromosomen auf die Mikrokerne, müssten ungefähr 4,4 % (1/23) der Mikrokerne ein Doppelsignal für Chromosom 9 enthalten. Das trifft nach



Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  DES ungefähr zu. Nach der Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  DES enthalten allerdings fast ein Drittel aller Mikrokerne Chromosom 9. Außerdem fällt auf, dass bei der hohen DES-Konzentration der Anteil der Zellen, die sowohl Nondisjunction als auch einen Mikrokerneln aufweisen, deutlich höher ist.

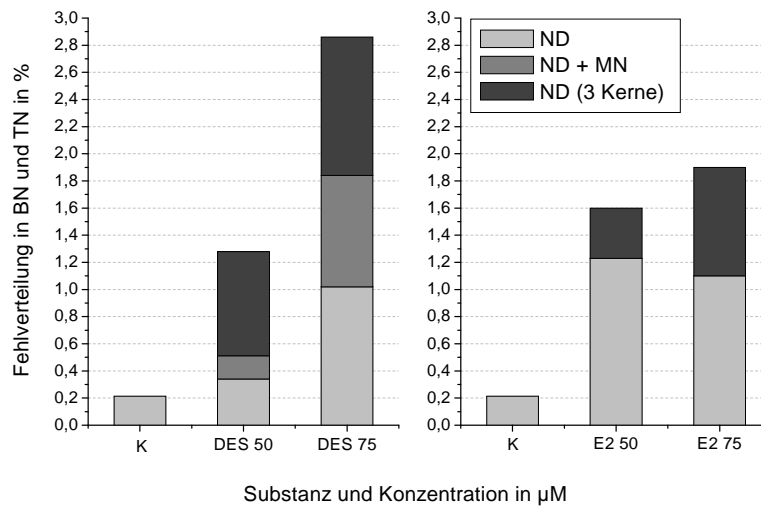
Nach Behandlung von AG01522C-Fibroblasten mit E2 ist im CB-Mikrokerntest mit FISH wie im bereits in Kap. 5.2.4 vorgestellten, (CB-)Mikrokerntest ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg an zweikernigen Zellen mit Mikrokerneln zu beobachten (von 0,4 % auf 5,7 %, beziehungsweise 8,2 %). Chromosom 9 ist nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  E2 zu rund einem Viertel und nach Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  E2 an zirka einem Drittel aller Mikrokerne beteiligt, was deutlich über den statistisch bei einer zufälligen Verteilung erwarteten 4,4 % liegt. Es werden keine doppelten Effekte (MN + ND) beobachtet.



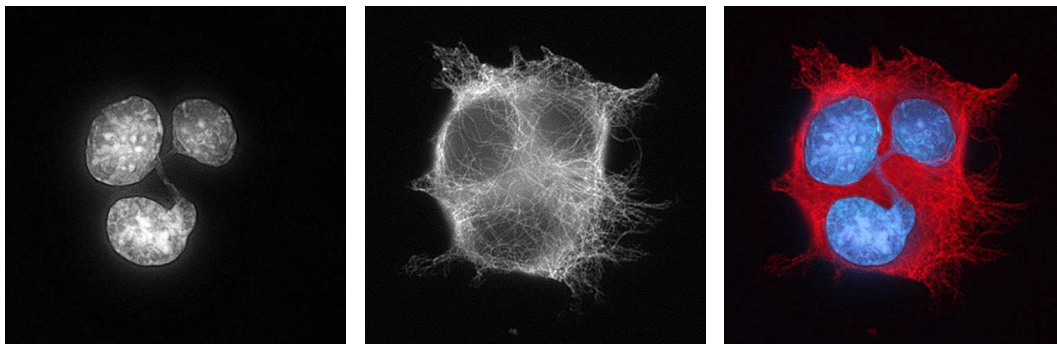
**Abb. 49:** Differenzierung der durch DES und E2 induzierten Mikrokerne (MN) mittels FISH mit zwei für Chromosom 9 spezifischen DNA-Sonden. BN, zweikernige Zellen; ND, Nondisjunction (Chromosomen-Fehlverteilung).

Eine genauere Betrachtung der Induktion von Nondisjunction durch DES und E2 ermöglicht Abb. 50. Der Anteil an Tochterkernen, von denen der eine bezüglich Chromosom 9 **hypodiploid** und der andere **hyperdiploid** ist, steigt nach Behandlung der Zellen mit DES deutlich an. Dabei spielt neben der Chromosomen-Fehlverteilung auch die Kombination von Fehlverteilung und Chromosomenverlust und die Fehlverteilung auf drei oder mehrere Tochterkerne eine Rolle (Abb. 50). Bei der Verteilung der Chromosomen auf mehr als zwei Zellkerne ist es fraglich, ob lebensfähige Tochterzellen entstehen. Mehrkernige Zellen, aber auch Mikrokerne können durch

die in Kap. 5.2.3 vorgestellten polypolaren Mitosespindeln entstehen. Abb. 30 zeigt die unter dem Einfluss einer multipolaren Mitosespindel stattfindende Mitose. In Abb. 51 ist das Ergebnis einer solchen Kernteilung unter Verhinderung der Zytokinese durch Cytochalasin B dargestellt. Die drei Tochterkerne sind durch dünne Chromatinbrücken miteinander verbunden. Nach den von Fenech (2000a) veröffentlichten Kriterien sind zweikernige Zellen mit einer DNA-Brücke, deren Durchmesser 1/4 des Kernradius nicht übersteigt, als zweikernige Zellen zu werten; daher werden Zellen, die sich wie in Abb. 51 darstellen, als dreikernige Zelle (TN) angesehen.



**Abb. 50:** Differenzierung der durch DES und E2 induzierten Chromosomen-Fehlverteilung (Nondisjunction, ND) mittels FISH mit zwei für Chromosom 9 spezifischen DNA-Sonden. BN, zweikernige Zellen; TN, dreikernige Zellen.



**Abb. 51:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer dreikernigen AG01522C-Zelle (TN). Die drei Zellkerne sind untereinander über chromatinhaltige Brücken verbunden. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere den fluoreszenzmarkierten CMTC, und das rechte Bild eine Überlagerung der beiden Kanäle.

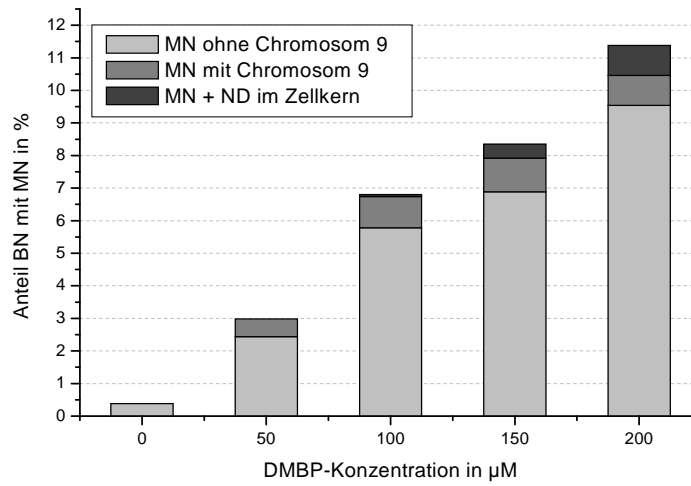
Schuler et al. (1998) konnten in kultivierten humanen Lymphozyten bereits durch Inkubation mit 30 bis 40  $\mu\text{M}$  DES maximale Induktion von ND 9 erzielen. Dabei kamen ungefähr 10% hyperdiploide Zellen vor. Bei Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  kamen sowohl echte Hyperdiploidie als auch Polyploidie vor, bei 30  $\mu\text{M}$  DES ist in einkernigen kultivierten Lymphozyten nur Polyploidie zu beobachten.

Nach Inkubation von AG01522C-Zellen mit 50  $\mu\text{M}$  E2 steigt der Anteil an ND 9 gegenüber der Kontrolle deutlich an (von 0,2 % auf 1,2 %). Nach Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  E2 nimmt ND 9 (1,1 %) zugunsten der Chromosomen-Fehlverteilung zwischen 3 Zellkernen etwas ab. Schuler et al. (1998) beobachteten nach Inkubation von kultivierten humanen Lymphozyten nach Inkubation mit E2 einen Anteil von maximal 6 % Zellen mit 3 Chromosomen-Signalen. Diese 6 % setzten sich nach Inkubation mit 40  $\mu\text{M}$  und 75  $\mu\text{M}$  aus echter Hyperdiploidie und Polyploidie zusammen. Die von Schuler et al. (1998) eingesetzten Substanzkonzentrationen sind allerdings durch die längere Behandlungsdauer der Zellen mit der Testsubstanz (Lymphozyten 2 Verdopplungszeiten ohne Erholungsphase, AG01522C-Fibroblasten 1/2 Verdopplungszeit mit Erholungsphase) sowohl bei DES als auch bei E2 nicht mit den in dieser Arbeit diskutierten Konzentrationen vergleichbar. Des Weiteren wird beim CB-Mikrokerntest durch die selektive Erfassung zweikerniger Zellen die Miterfassung polyploider Zellen ausgeschlossen.

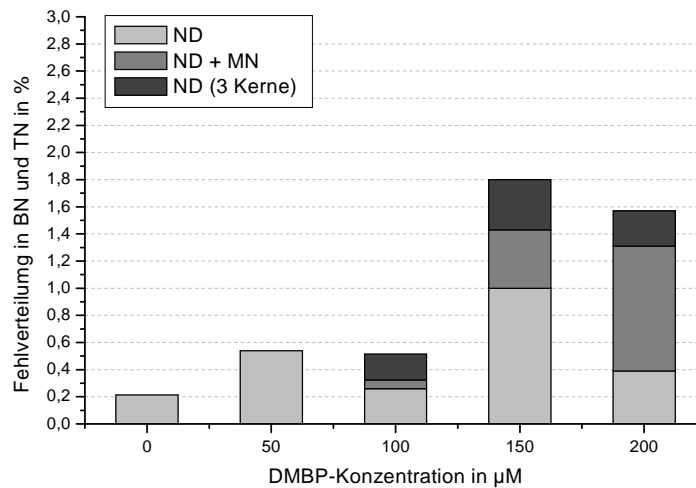
**DMBP** Abb. 52 zeigt die konzentrationsabhängige Induktion von Chromosomenverlust durch DMBP. Wie nach den Ergebnissen der anderen Mikrokerntests zu erwarten ist (Kap. 5.2.4), ist ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg der Anzahl an zweikernigen Zellen mit Mikrokern zu beobachten. Der Anteil von MN 9 an allen Mikrokernen bleibt dabei ungefähr gleich (10 % bis 15 %, Abb. 52). Ab 100  $\mu\text{M}$  DMBP tritt auch Verteilung der beiden Kopien von Chromosom 9 auf 3 Tochterzellkerne auf und nimmt konzentrationsabhängig weiter zu.

In Abb. 53 ist die Induktion von Nondisjunction durch DMBP dargestellt. Ein konzentrationsabhängiger Effekt ist nur bezüglich der Kombination von Nondisjunction und Chromosomenverlust in derselben Zelle zu beobachten. Dieser steigt nach Inkubation mit 100  $\mu\text{M}$  bis 200  $\mu\text{M}$  DMBP an.

Tendenziell bestätigen die Ergebnisse des CB-Mikrokerntests mit FISH in einer menschlichen Zelllinie die von Tsutsui et al. (2000) durch Chromosomenaberrationsanalyse in SHE-Zellen gezeigte Aneuploidie-Induktion durch DMBP.

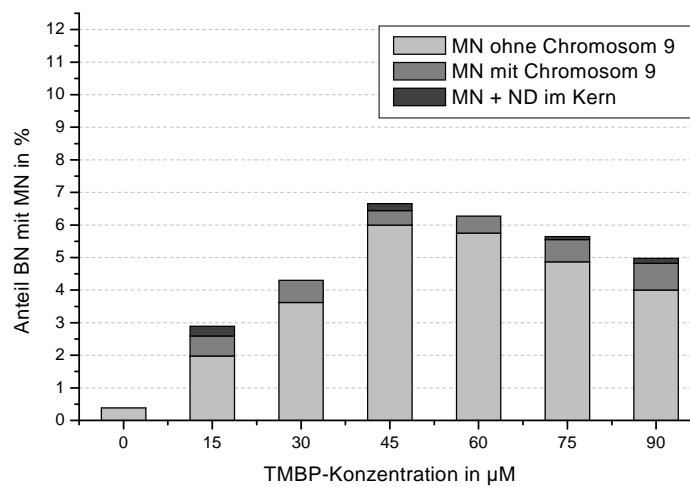


**Abb. 52:** Differenzierung der durch DMBP induzierten Mikrokerne (MN) mittels FISH mit zwei für Chromosom 9 spezifischen DNA-Sonden. BN, zweikernige Zellen; ND, Non-disjunction (Chromosomen-Fehlverteilung).



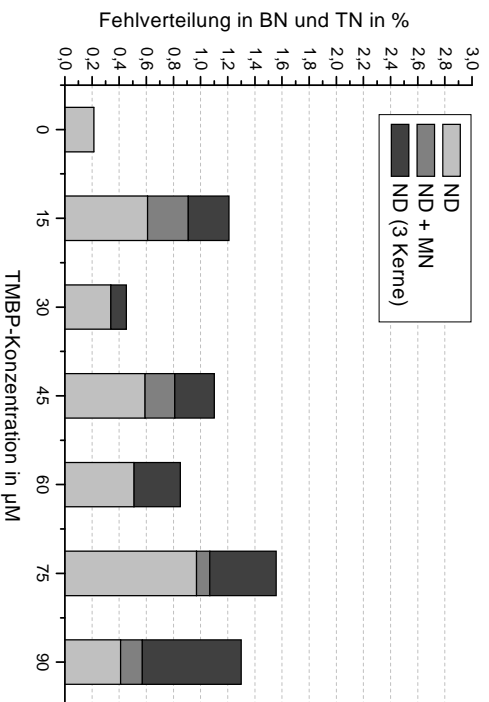
**Abb. 53:** Differenzierung der durch DMBP induzierten Chromosomen-Fehlverteilung (Nondisjunction, ND) mittels FISH mit zwei für Chromosom 9 spezifischen DNA-Sonden. BN, zweikernige Zellen; TN, dreikernige Zellen.

**TMBP** Wie in Abb. 54 zu sehen ist, entspricht der Verlauf der Mikrokerninduktion nach Inkubation von Humanfibroblasten mit verschiedenen TMBP-Konzentrationen erwartungsgemäß weitgehend den mittels CB-Mikrokerntest ermittelten Daten (Kap. 5.2.4). Die Summe an zweikernigen Zellen mit Mikrokernen nimmt nach Inkubation mit 15  $\mu\text{M}$  bis 45  $\mu\text{M}$  deutlich im Vergleich zur Kontrolle zu, erreicht ein Maximum und sinkt dann wieder bis zur höchsten getesteten Konzentration von 90  $\mu\text{M}$  TMBP etwas ab. Der Anteil an Chromosom 9 an den Mikrokernen bleibt relativ konstant unter 10 %. Die Kombination von Chromosomenverlust und Nondisjunction stellt sich uneinheitlich dar.



**Abb. 54:** Differenzierung der durch Inkubation mit TMBP induzierten Mikrokerne (MN) mittels FISH mit zwei für Chromosom 9 spezifischen DNA-Sonden. BN, zweikernige Zellen; ND, Nondisjunction (Chromosomen-Fehlverteilung).

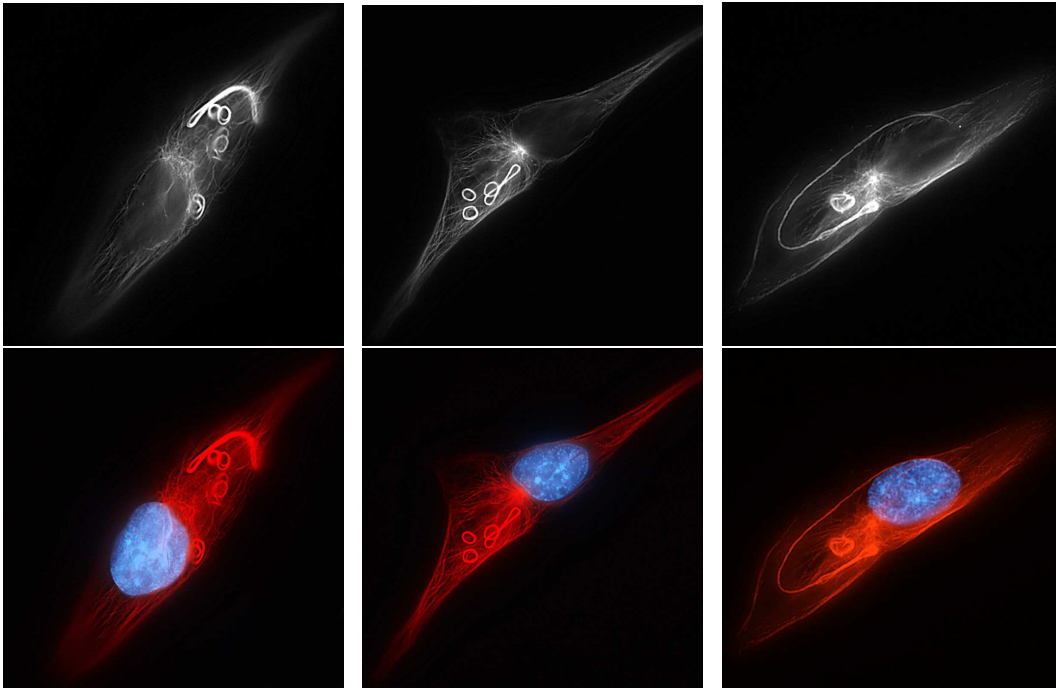
In Abb. 55 ist zwar eine allgemeine Erhöhung der Nondisjunction-Rate nach Behandlung von AG01522C-Zellen mit TMBP zu beobachten, eine Konzentrationsabhängigkeit eines der drei dargestellten Effekte ist aber nicht zu sehen. Nach Inkubation mit der höchsten TMBP-Konzentration (90  $\mu\text{M}$ ) fällt der hohe Anteil an Chromosomen-Fehlverteilung in 3 Tochterkerne auf. Dies spricht für eine besonders starke Störung der Mitose (siehe dazu auch Abb. 38 in Kap. 5.2.3).



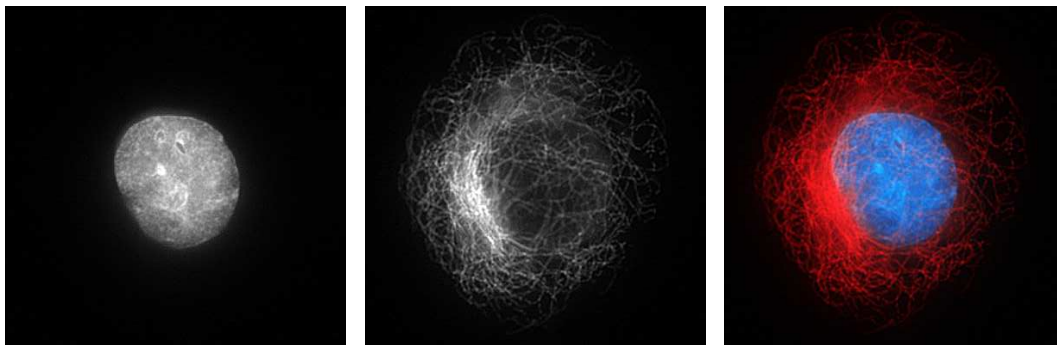
**Abb. 55:** Differenzierung der durch Inkubation mit TMBP induzierten Chromosomen-Fehlverteilung (Nondisjunction, ND) mittels FISH mit zwei für Chromosom 9 spezifischen DNA-Sonden. BN, zweikernige Zellen; TN, dreikernige Zellen.

### 5.2.6 Effekte auf den CMTC

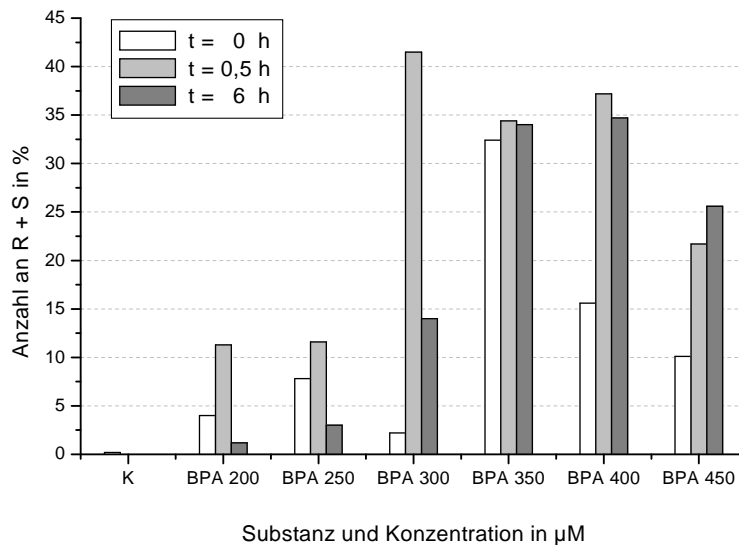
**BPA** Bei der mikroskopischen Bewertung der fluoreszenzmarkierten CMTC von AG01522C-Fibroblasten nach BPA-Exposition fallen Veränderungen des CMTC auf. Einige BPA-induzierte ring- und schleifenförmige Veränderungen des CMTC sind in den mikroskopischen Aufnahmen der Abb. 56 zu sehen. Diese Veränderungen unterscheiden sich deutlich von den Effekten, die hohe Konzentrationen von Tubulin-Polymerisationshemmern (zum Beispiel des DES) auf den CMTC haben (Abb. 57). Die Anzahl dieser CMTC-Veränderungen nimmt konzentrationsabhängig zu (Abb. 58). Während in der Kontrolle fast gar keine Veränderungen am CMTC auffallen, weisen nach Inkubation mit 200 µM BPA 4 % der Interphasezellen ring- und schleifenförmige Veränderungen in einem ansonsten normal ausgebildeten CMTC auf. Der Anteil an Zellen mit diesen Veränderungen nimmt nach einer 0,5-stündigen substanzfreien Nachinkubationszeit auf über 10 % zu. Bei dieser Konzentration scheint der Effekt reversibel zu sein, da nach einer Erholungszeit von 6 h nur noch eine geringe Anzahl der Interphasezellen Veränderungen des CMTC aufweisen. Ab einer Inkubation der Zellen mit 300 µM BPA und mehr, bleibt der Effekt des BPA auch nach einer Erholungsphase von 6 h erhalten.



**Abb. 56:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild von 3 AG01522C-Zellen, die nach 12-stündiger BPA-Exposition Ringe und Schleifen innerhalb des CMTC aufweisen. In der oberen Reihe ist der immunologisch fluoreszenzmarkierte CMTC, in der unteren Reihe die Überlagerung der Aufnahmen des CMTC und der DAPI-gefärbten Zellkerne abgebildet.



**Abb. 57:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer AG01522C-Zelle nach Inkubation mit DES. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere den fluoreszenzmarkierten CMTC und das rechte Bild eine Überlagerung der beiden Kanäle. Der CMTC ist im Vergleich zum CMTC von unbehandelten Zellen (langgestreckt, spindelförmig, hier nicht dargestellt) deutlich abgerundet.



**Abb. 58:** Konzentrationsabhängigkeit der Induktion von Ringen und Schleifen (R + S) im zytoplasmatischen Mikrotubuli-Komplex (CMTC) von kultivierten AG01522C-Zellen durch BPA. Auswertung unmittelbar nach 12-stündiger Substanzinkubation ( $t = 0$  h), nach 0,5-stündiger substanzfreier Nachinkubation ( $t = 0,5$  h) und nach 6-stündiger substanzfreier Nachinkubation ( $t = 6$  h). Angegeben ist der prozentuale Anteil an Interphasezellen mit Ringen und/oder Schleifen im CMTC an allen ausgewerteten Interphasen. Werte beispielhaft aus Einzelbestimmung, durch unabhängige Wiederholungen bestätigt.

Tab. 12 zeigt die Abhängigkeit der Induktion von Ringen und Schleifen im CMTC von der Nachinkubationszeit nach Exposition von Humanfibroblasten mit  $400 \mu\text{M}$  BPA. Die Anzahl an Interphasezellen mit Veränderungen des CMTC nimmt tendenziell während der gesamten Zeit, die der Substanzbehandlung folgt, zu. Erst nach einer Nachinkubationszeit, in der theoretisch alle Zellen mit Ringen und Schleifen die nächste Mitose erreicht haben sollten ( $t = 36$  h), nimmt die Anzahl an veränderten Zellen leicht ab. Nach einer Nachinkubationszeit von 48 h (maximal 2 Mitosen nach der Substanzbehandlung) ist immer noch ein Anteil von 5 % veränderter Zellen zu beobachten. Dabei ist nicht sicher, ob Zellen mit einer derartigen Veränderung des CMTC in die Mitose übergehen und eine funktionstüchtige Spindel ausbilden können. Erste mikroskopische Beobachtungen von Prometaphasen mit CMTC-Veränderungen deuten darauf hin, dass die Ringe und Schleifen nach Auflösung des CMTC zurück bleiben. Nach dieser langen Nachinkubationszeit sind viele apoptotische Zellen und Kernfragmente zu sehen, so dass anzunehmen ist, dass Zellen mit diesen CMTC-Veränderungen nicht längere Zeit lebens- und teilungsfähig



sind. Diese Effekte können mit dem *in vitro* von Pfeiffer et al. (1997) gezeigten Einfluss von BPA auf die Tubulin-Polymerisation in Zusammenhang stehen. Die Tubulin-Polymerisation wird durch BPA irreversibel gestört, wobei die einzelnen Mikrotubuli eine abnorme Struktur aufweisen. Dieser Mechanismus der Polymerisationshemmung unterscheidet sich deutlich von der DES-induzierten, reversiblen Hemmung der Tubulin-Polymerisation.

Das Zytoskelett ist entgegen seinem Namen kein starres Gebilde, sondern einem ständigen Auf- und Abbau unterworfen, der durch eine Vielzahl von Proteinen gesteuert wird (Joshi, 1998; Cassimeris, 1999; Matsuno et al., 1997; Keating et al., 1997). Der Mechanismus nach dem die Veränderungen des CMTC zustande kommen, könnte auf einem direkten Abgriff des BPA auf die Tubulin-Dimere, aber auch durch Funktionsstörung der Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAPs) begründet sein. Diese Proteine liegen auch bei dem *in vitro*-Polymerisationsassay im Reaktionsansatz vor. Ob MAPs oder Tubulin selbst einen Angriffspunkt für BPA bieten, könnte durch Durchführung des Polymerisations-Assays mit von MAPs gereinigtem Tubulin im Vergleich zu einem Polymerisations-Assay nach Vorinkubation der isolierten MAPs mit BPA gezeigt werden.

**Tabelle 12:** Induktion von Ringen und Schleifen (R + S) im zytoplasmatischen Mikrotubuli-Komplex (CMTC) durch 400  $\mu\text{M}$  BPA. MI, Mitoseindex.

Substanzfreie Nachinkubationszeit in h	R + S in Prozent	MI in Prozent
0	15,9	1,6
0,25	22,7	3,4
0,5	31,5	3,2
0,75	32,2	0,8
1,0	37,7	1,0
3,0	22,6	0,6
6,0	37,3	1,0
10,5	46,0	1,0
36	28,8	0,2
48	5,2	0,4

**DMBP, TMBP, DES und E2** Auch nach Behandlung von AG01522C-Fibroblasten mit 150  $\mu\text{M}$  DMBP oder 75  $\mu\text{M}$  TMBP ist eine deutliche Zunahme an Zellen zu beobachten, die nach einer 6-stündigen Erholungsphase ring- und schleifenförmige Veränderungen am CMTC aufweisen. Unmittelbar nach der 12-stündigen Substanzinkubation können allerdings keine Ringe und Schleifen im CMTC nachgewiesen werden (Tab. 13). Auch diese Substanzen sind in

der Lage die Tubulin-Polymerisation *in vitro* irreversibel zu hemmen (Pfeiffer et al., 1997). Im Gegensatz dazu können weder nach 12-stündiger Exposition von AG01522C-Zellen mit DES noch mit E2 (mit und ohne substanzfreie Nachinkubationszeit) Ringe oder Schleifen im CMTC beobachtet werden.

**Tabelle 13:** Induktion von Ringen und Schleifen (R + S) im zytoplasmatischen Mikrotubuli-Komplex (CMTC) durch DMBP und TMBP. n.n., nicht nachweisbar; n.b., nicht bestimmt.

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Zellen mit Veränderungen des CMTC in %		
		0 h	0,5 h	6 h
DMBP	50	n.n.	n.n.	n.n.
	100	n.n.	n.n.	n.n.
	150	n.n.	1,0	18,5
	200	n.n.	0,6	23,2
TMBP	15	n.n.	n.n.	n.n.
	30	n.n.	n.n.	n.n.
	45	0,4	n.b.	n.n.
	60	n.n.	n.b.	7,0
	75	n.n.	n.b.	16,4
	90	n.n.	n.b.	5,6

### 5.2.7 Zusammenfassung der Ergebnisse in AG01522C-Zellen

In Tab. 14 ist die biologische Aktivität der untersuchten Bisphenole BPA, DMBP und TMBP im Vergleich zu E2 und DES an verschiedenen Endpunkten aufgeführt. Die angegebenen Konzentrationen stellen die niedrigsten getesteten Konzentrationen dar, bei denen die genannten Effekte auftreten.

DES und E2 zeigen im gleichen Konzentrationsbereich ein aneugenes Potenzial in AG01522C-Zellen. Beide Substanzen arretieren die Mitose reversibel in der Metaphase, induzieren Mikrokerne, die ganze Chromosomen enthalten (Kap. 5.2.4) und Chromosomen-Fehlverteilung in den Tochterkernen (Kap. 5.2.5). Der diesen Effekten zugrunde liegende Mechanismus scheint allerdings unterschiedlich zu sein, da nur DES, nicht aber E2 einen vollständigen Mitosearrest auslöst. Des Weiteren unterscheiden sich die durch DES oder E2 arretierten Metaphasen morphologisch deutlich voneinander (Kap. 5.2.3).

**Tabelle 14:** Biologische Aktivität verschiedener Bisphenole und der Aneugene E2 und DES in kultivierten Humanfibroblasten. Die angegebenen Konzentrationen entsprechen den niedrigsten getesteten Konzentrationen, bei denen der genannte Effekt beobachtet wird. MT, Mikrotubuli; CMTC, zytoplasmatischer Mikrotubulikomplex; MN, Mikronuklei; n.n., nicht nachweisbar; \*, nur nach mindestens 1 h substanzfreier Erholungsphase.

	BPA	DMBP	TMBP	E2	DES
	Konzentration in $\mu\text{M}$				
<b>Zellfreie MT-Polymerisation</b>	100	100	100	n.n.	25
<b>Mitosespindelschäden</b>					
Multiple Spindeln	n.n.	100	45	50	50
Strukturschäden	n.n.	100	45	50	50
<b>CMTC-Schäden</b>					
Ringe + Schleifen	200	150*	75*	n.n.	n.n.
Strukturschäden	350	150	90	n.n.	75
<b>Mitosearrest</b>	n.n.	100	45	50	50
<b>Kinetochor-positive MN</b>		100	30	50	50
Chromosomenverlust		50	15	50	50
Nondisjunction		50	15	50	50
<b>Apoptotische Körperchen</b>	500	300	100	n.n.	n.n.

BPA induziert in humanen Fibroblasten unter den angegebenen Bedingungen weder Mitosearrest (Kap. 5.2.2) noch Kinetochor-positive Mikrokerne (Kap. 5.2.4). Stattdessen wird eine starke Abnahme der Teilungsfähigkeit der Zellen beobachtet. Ob dies auf einen Zellzyklusarrest oder den in Kap. 5.2.6 vorgestellten Effekt von BPA auf den CMTC zurückzuführen ist, kann nicht eindeutig gesagt werden.

Die untersuchten methylierten Bisphenole induzieren Mitosearrest, morphologische Veränderungen der Metaphasen, Kinetochor-positive Mikrokerne (Kap. 5.2.4) und Fehlverteilung der Chromosomen auf die Tochterkerne (Kap. 5.2.5). Dabei ist TMBP bei etwa halb so hohen Konzentrationen wirksam wie DMBP. Mechanistisch lassen sich die Effekte weder ausschließlich dem E2- noch dem DES-Typ zuordnen. So weisen beispielsweise die Metaphasen ein breites Spektrum morphologischer Veränderungen auf, die sowohl E2-behandelten als auch DES-behandelten Zellen gleichen (Kap. 5.2.3). Das aneuploidogene Potenzial dieser Substanzen geht mit weiteren, bisher unbekanntem Effekten auf den Aufbau des CMTC einher, die nach Inkubation mit E2 oder DES nicht beobachtet werden (Kap. 5.2.6). Die meisten der genannten Effekte treten allerdings bei DMBP und vor allem TMBP bei Substanzkonzentrationen auf, die in AG01522C-Fibroblasten bereits wachstumshemmend und/oder zytotoxisch sind.

**Einfluss des Inkubationsprotokolls auf die Ergebnisse** Hinsichtlich der Eignung des CB-Mikrokerntests in kultivierten primären Humanfibroblasten gibt es starke Unterschiede zwischen den getesteten Substanzen, aber auch bei verschiedenen Konzentrationen der selben Substanz. Diese Variationen kommen durch die Art des Inkubationsprotokolls, das auf der Induktion eines vollständigen Mitosearrest basiert, zustande. Für Substanzen, die aufgrund des Mechanismus, nach dem sie Aneuploidie induzieren, keinen vollständigen Mitosearrest auslösen oder Substanzkonzentrationen von Mikrotubuli-Polymerisationshemmern, die zu gering sind, um einen vollständigen Mitosearrest zu verursachen, ist das verwendete Inkubationsprotokoll des CB-Mikrokerntests nicht optimal. Hinzu kommen unerwünschte zytotoxische Effekte des Cytochalasin B in Kombination mit beispielsweise DES. Dies wird durch die Ergebnisse der getesteten Einzelsubstanzen deutlich.

Obwohl DES einen relativ vollständigen Mitosearrest induziert, bietet der CB-Mikrokerntest, in der bei dieser Arbeit angewandten Form, bei dieser Substanz weder Vor- noch Nachteile gegenüber dem Mikrokerntest ohne Cytochalasin B-Zugabe. Für die Detektion von E2-induzierten Mikrokernen ist das verwendete Inkubationsprotokoll des CB-Mikrokerntests etwas schlechter geeignet als der Mikrokerntest ohne Cytochalasin B. Im Gegensatz zu DES und E2 ist der CB-Mikrokerntest bei DMBP der empfindlichere Mikrokerntest. Auch bei TMBP ist der CB-Mikrokerntest in der angewandten Form dem Mikrokerntest ohne Cytochalasin B überlegen, allerdings nicht so deutlich wie beim DMBP.

Die Entscheidung für oder gegen den CB-Mikrokerntest kann demnach nicht generell getroffen werden, sondern muss der Einzelsubstanz, dem gewünschten Konzentrationsbereich und der Fragestellung entsprechend getroffen werden. Bei der verwendeten Zelllinie ist die geringere Mikrokernrate der Lösungsmittelkontrolle im CB-Mikrokerntest gegenüber dem Mikrokerntest ohne Cytochalasin B von Vorteil. Des Weiteren ist im CB-Mikrokerntest das Wachstumsverhalten dieser primären Zelllinie besser erfassbar. Auf jeden Fall sollte ein negatives Ergebnis im Mikrokerntest im CB-Mikrokerntest überprüft werden, gerade wenn Hinweise auf ein wachstumshemmendes Potenzial der Testsubstanz vorliegen. Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit haben Fenech (2000b) berechnet, dass die Wahrscheinlichkeit falsch-negativer Ergebnisse im Mikrokerntest ohne Cytochalasin B größer ist als im CB-Mikrokerntest.

## 6 Diskussion ausgewählter Fragestellungen

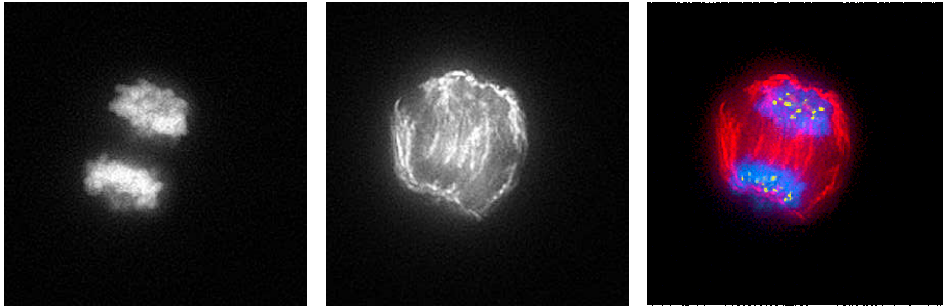
### 6.1 Der CB-Mikrokerntest

#### 6.1.1 Einfluss von Cytochalasin B auf die Mikrokerninduktion

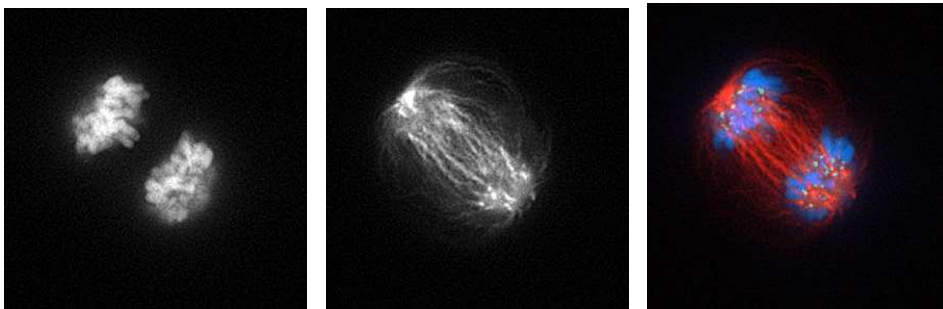
Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass sich das im CB-Mikrokerntest zur Hemmung der Zytokinese eingesetzte Cytochalasin B negativ auf die Mikrokerninduktion auswirkt. So beobachteten Minissi et al. (1999) nach Inkubation von humanen Lymphozyten mit dem Spindelgift Colchizin weniger Zellen mit Mikrokern im CB-Mikrokerntest als im Mikrokerntest ohne CYB. Cimini et al. (1999) konnten zeigen, dass in Ana- und Telophase-Zellen nach Inkubation mit dem Mikrotubuli-Polymerisations-Hemmstoff Nocodazol die ND (7, 11)-Rate und die MN (7, 11)-Rate höher sind als in den nach Cytochalasin B-Zugabe erhaltenen zweikernigen Zellen. Aus diesem Grund besteht Grund zu der Annahme, dass nicht nur die Zell-, sondern auch die Kernteilung unter Cytochalasin B-Einfluss beeinträchtigt sein könnte. Es ist lange bekannt, dass die Zytokinese-inhibierende Wirkung von Cytochalasin B unter anderem auf der Verhinderung der Bildung des zur Zytokinese notwendigen kontraktiven Rings beruht (Aubin et al., 1981; Atlas und Lin, 1978). Weitere Untersuchungen zeigten, dass während der Mitose der kontraktile Ring und die Zentralspindel bei der Zytokinese und der Festlegung von Distanz und Verteilung der beiden Tochterchromosomensätze eng miteinander kooperieren (Canman et al., 2000; Hales et al., 1999; Eckley et al., 1997; Wheatley und Wang, 1996). Unter ähnlichen Inkubationsbedingungen wie in dem in 5.2.2 und 5.2.4 beschriebenen CB-Mikrokerntest beobachteten Cimini et al. (1998) in humanen embryonalen Fibroblasten (MRC5) unter Cytochalasin B-Einfluss das Fehlen der Zentralspindel. Bei einem Kontrollversuch ohne Cytochalasin B-Zugabe wurde die Zentralspindel normal aufgebaut. Der gleiche Effekt konnte von Cimini et al. (1998) auch in humanen Hepatomazellen (HepG1) und in Hamsterzellen (CHO), nicht aber von Martineau et al. (1995) in Dihydrocytochalasin B-behandelten HeLa-Zellen beobachtet werden. Cimini et al. (1998) stellten außerdem bei Inkubation von Fibroblasten mit Cytochalasin B neben der erwarteten Erhöhung der Anzahl zweikerniger Zellen, eine Erhöhung der Anzahl polyploider Zellen fest.

Eigene Untersuchungen zeigen, dass sich die Anaphasen B der im CB-Mikrokerntest eingesetzten AG01522C-Fibroblasten nach Behandlung mit TMBPA oder DES und Nachinkubation mit Cytochalasin B hinsichtlich des Aufbaus der Zentralspindel nicht von den Kontrollzellen (TMBP oder DES ohne Cytochalasin B) unterscheiden (Abb. 59 und Abb. 60). Auch der Aufbau der Zentralspindel in der Telophase scheint nicht gestört zu sein (Abb. 62 und Abb. 63). Die Distanz zwischen den Spindelpolen in CYB-behandelten Zellen erscheint im Gegensatz zu der Beobachtung von Cimini et al. (1999) zumindest nicht augenfällig geringer als in Kontroll-

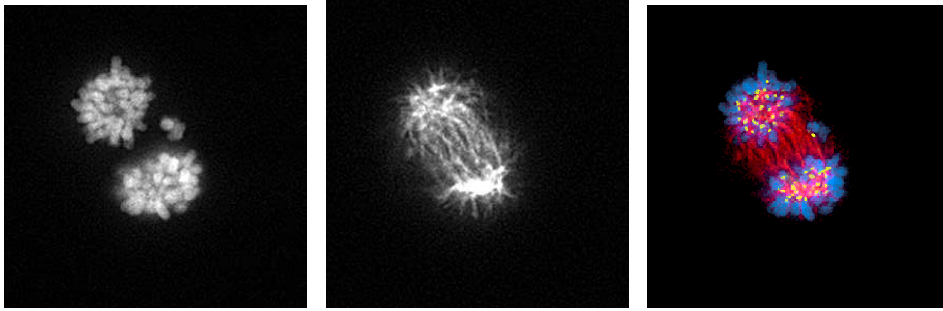
zellen ohne Cytochalasin B: Sowohl mit (Abb. 59 und Abb. 62) als auch ohne Cytochalasin B (Abb. 60 und Abb. 61) kommen nach Substanzbehandlung sehr kurze bis normale Abstände zwischen den Mitosespindelpolen in der Ana- und Telophase vor. Deshalb wurde auf ein Ausmessen der Distanz zwischen den Spindelpolen verzichtet. Die gleichen Ergebnisse werden auch erzielt, wenn anstelle mit DES oder TMBP mit Nocodazol (30 ng/mL, entsprechend 0,1  $\mu$ M) inkubiert wird.



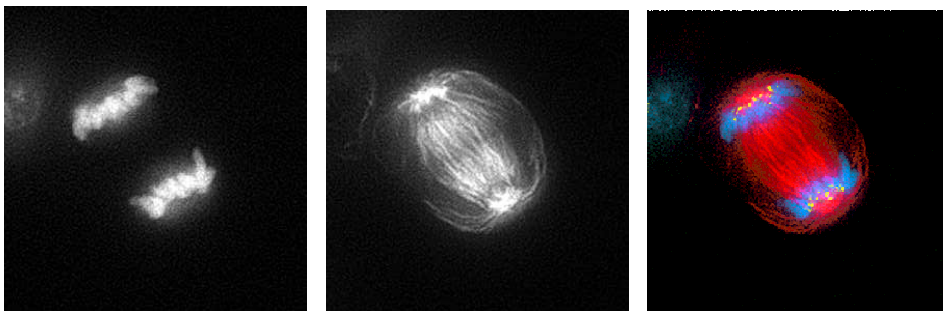
**Abb. 59:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer Anaphase B nach 12-stündiger Inkubation von AG01522C-Zellen mit TMBP, 30 Minuten Erholungsphase und 25 Minuten Nachinkubation mit CYB. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Chromosomen, das mittlere die fluoreszenzmarkierte Mitosespindel mit den parallel angeordneten Mikrotubuli-Strängen der Zentralspindel, und das rechte Bild eine Überlagerung aller aufgenommenen Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen.



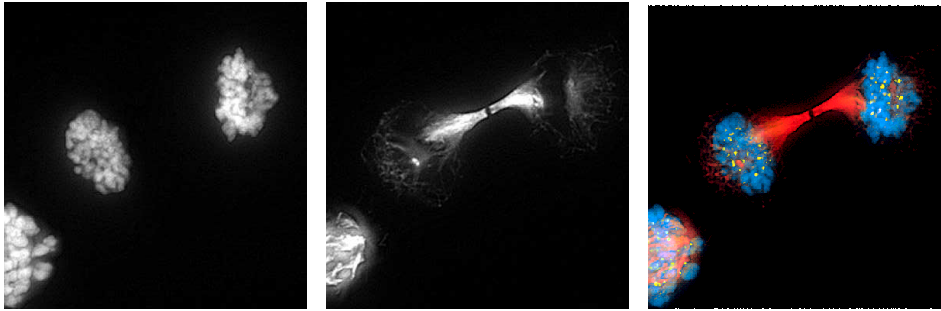
**Abb. 60:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer Anaphase B nach 12-stündiger Inkubation von AG01522C-Zellen mit TMBP und 45 Minuten substanzfreier Nachinkubation. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Chromosomen, das mittlere die fluoreszenzmarkierte Mitosespindel mit den parallel angeordneten Mikrotubuli-Strängen der Zentralspindel, und das rechte Bild eine Überlagerung aller aufgenommenen Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen.



**Abb. 61:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer Anaphase B nach Inkubation mit TMBP und 45 Minuten substanzfreier Nachinkubation. Das in der Ebene der ehemaligen Metaphaseplatte liegende einzelne Chromosom ('lagging chromosome', von Cimini et al. (2001) beschrieben) kann nach Beenden der Mitose einen Mikrokern bilden. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Chromosomen, das mittlere die fluoreszenzmarkierte Mitosespindel mit den sich überlappenden, parallel angeordneten Mikrotubuli-Strängen der Zentralspindel, und das rechte Bild eine Überlagerung aller aufgenommenen Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen. Die Kinetochor-Region des zurückgebliebenen Chromosoms ist deutlich zu erkennen.



**Abb. 62:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer Telophase nach Inkubation mit TMBP, 30 Minuten substanzfreier Zwischeninkubation und 30 Minuten CYB-Behandlung. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Chromosomen, das mittlere die fluoreszenzmarkierte Mitosespindel mit den parallel angeordneten Mikrotubuli-Strängen der Zentralspindel (die dunkle Lücke zwischen den interzonalen Mikrotubuli-Bündeln erscheint wahrscheinlich artifiziell aufgrund Fluoreszenzlöschung durch in der ehemaligen Metaphaseplatte akkumulierte Midbody-Proteine (Saxton und McIntosh, 1987)), und das rechte Bild eine Überlagerung aller aufgenommenen Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen.

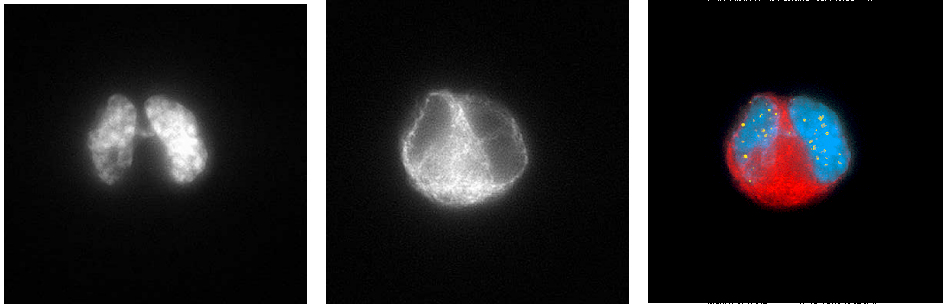


**Abb. 63:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer Telophase nach Inkubation mit TMBP und 45 Minuten substanzfreier Nachinkubation. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere den fluoreszenzmarkierten CMTC und das rechte Bild eine Überlagerung der beiden Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen.

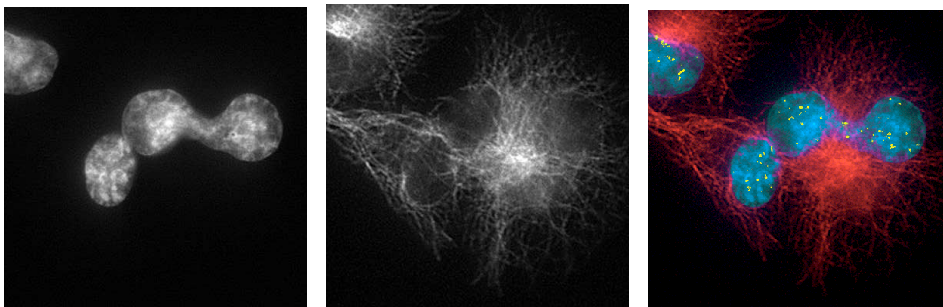
### 6.1.2 Substanzinduzierte Polyploidie

Da Cytochalasin B den Ablauf der Mitose in AG01522C-Fibroblasten nicht nachweislich beeinflusst hat, entfällt eine der beschriebenen potenziellen Einflussmöglichkeiten des Cytochalasin B. Jedoch unterscheiden sich die Ana- und Telophasen oft nach Substanzbehandlung morphologisch von unbehandelten Kontrollzellen. Daher kann eine Testsubstanz-induzierte Polyploidie, vor allem bei DES, aber auch bei den höheren Konzentrationen der methylierten Bishenole, eine Rolle spielen. Beispielweise bestätigen Schuler et al. (1998) die Induktion von Polyploidie in humanen Lymphozyten (ohne Cytochalasin B) durch DES. Zijno et al. (1996) haben gezeigt, dass vollständig arretierte Zellen eine hohe Polyploidie-Rate haben und sehr anfällig für den Verlust von Chromosomen sind. Einen vollständigen Mitosearrest induzieren, nach den in Kap. 5.2.1 und Kap. 5.2.3 dargestellten Ergebnissen, 75  $\mu\text{M}$  DES und TMBP in Konzentrationen ab 60  $\mu\text{M}$ . Wenn während der Kernteilung mehrere Chromosomen zwischen den Tochterkernen liegen bleiben (Abb. 61), können neben Mikrokernen auch unterschiedlich breite Brücken zwischen den beiden Tochterkernen entstehen (Abb. 64 und Abb. 65), die dann von einer einzigen Kernhülle eingeschlossen werden können (Cimini et al., 1999). Fenech (2000a) schlägt vor, zwei Tochterzellkerne, die nur durch einer dünne Brücke miteinander verbunden sind, beim CB-Mikrokernstest als zweikernige Zellen auszuwerten. Solche Chromatinbrücken können auch durch dizentrische Chromosomen (nach DNA-Strangbrüchen) oder durch ungetrennte Chromatiden bei Topoisomerase II-Hemmung gebildet werden (Fenech, 2000a; Cimini et al., 1997; Downes et al., 1991).





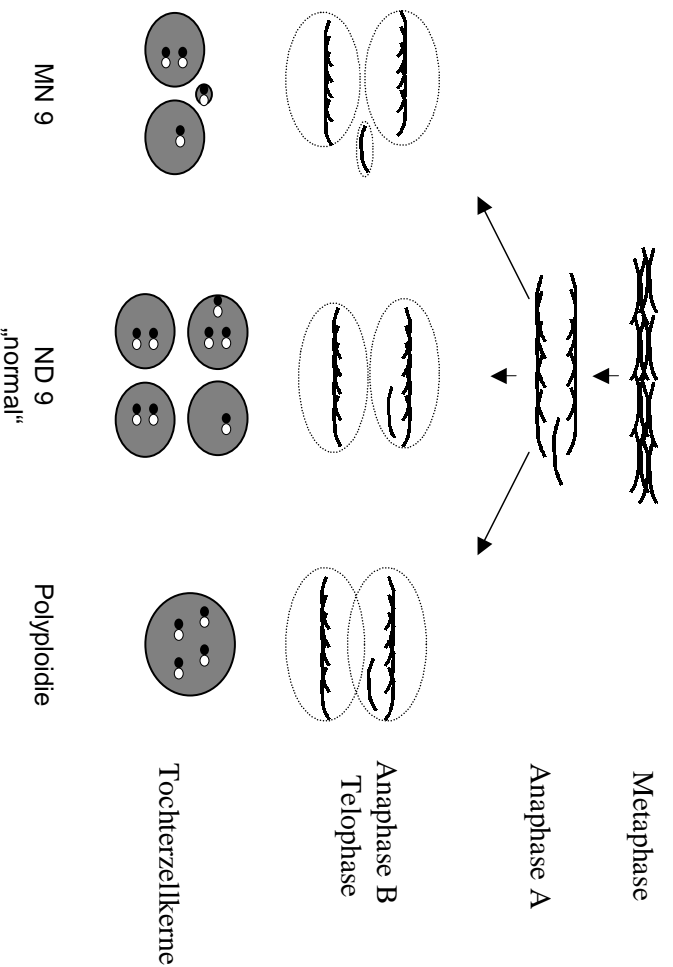
**Abb. 64:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer zweikernigen Zelle 1 h nach der Zellteilung. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere den fluoreszenzmarkierten CMTC und das rechte Bild eine Überlagerung der beiden Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen. Deutlich sind die FITC-markierten Kinetochorproteine des Chromosoms, das die Zellkerne verbindet, zu sehen.



**Abb. 65:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer zweikernigen Zelle wenige Stunden nach der Zellteilung. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere den fluoreszenzmarkierten CMTC und das rechte Bild eine Überlagerung der beiden Kanäle. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen. In der breiten Chromatin-Brücke, die die Zellkerne verbindet, sind die Signale von mindestens 3 Kinetochorregionen zu sehen.

Neben der Induktion von Polyploidie kann eine Reintegration eines potenziellen Mikrokerns in der Endphase der Mitose in einen der Tochterkerne mit einer Wahrscheinlichkeit von 50 % zu Nondisjunction führen (Abb. 66). Der mit FISH kombinierte CB-Mikrokernstest ist allerdings nicht empfindlich genug, diese Erhöhung statistisch signifikant nachzuweisen (Minissi et al., 1999). Bei der Abschätzung des Anteils Reintegration/Polyploidie am Rückgang der Mikrokernrate unter Cytochalasin B-Einfluss ist zudem zu beachten, dass das jeweilige Ereignis stark von anderen Faktoren wie Dosis und Zelltyp beeinflusst werden kann (Cimini et al., 1999).

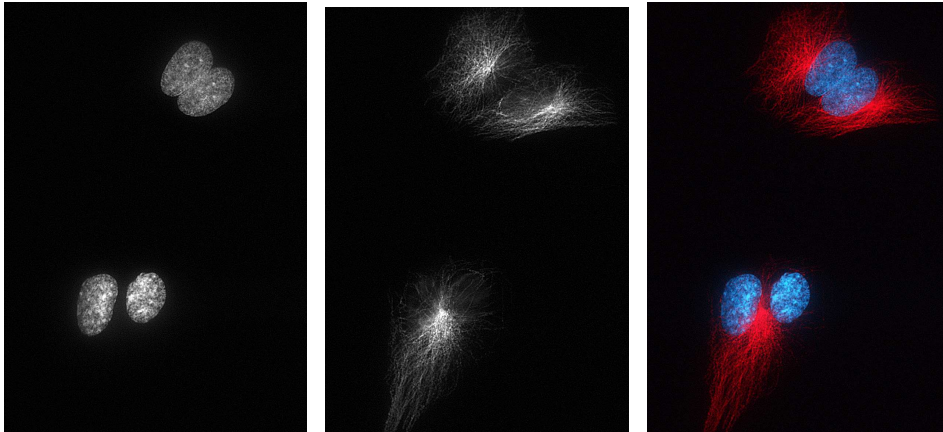
Bei der Kombination des CB-Mikrokerntests mit FISH ist die Induktion von Polyploidie prinzipiell erfassbar, da bei der Verhinderung der Kernteilung einer diploiden Zelle eine neue einkernige Zelle mit tetraploidem Chromosomensatz (vier Fluoreszenzsignale pro markiertem Chromosom im Zellkern) entsteht. Bei Verdacht auf Polyploidie können mehrere verschiedene Chromosomen gleichzeitig markiert werden. Bei 4 Kopien von mehreren verschiedenen Chromosomen kann davon ausgegangen werden, dass Polyploidie vorliegt (Schuler et al., 1998). Leider gibt es, wie in 5.2.5 bereits ausgeführt wurde, einen nicht vernachlässigbaren Anteil an polyploiden Zellen in unbehandelten AG01522C-Zellen, der eine empfindliche Erfassung der Induktion zusätzlicher polyploider Zellen unmöglich macht. Da induzierte Polyploidien viel heteroploider als spontane Polyploidie sind, wird von Mitchell et al. (1995) angenommen, dass die Bildung induzierter Polyploidie nach einem anderen Mechanismus als spontane Polyploidie erfolgt. Eine genaue Charakterisierung des Ploidiegrades zur Unterscheidung substanzinduzierter von spontaner Polyploidie könnte allerdings nur durch Chromosomenaberrationsanalyse, Bestimmung des DNA-Gehalts oder durch FISH-Markierung jedes einzelnen Chromosoms gleichzeitig erzielt werden.



**Abb. 66:** Schematische Darstellung des Schicksals eines zurückbleibenden Chromatids während der Anaphase (beim Zurückbleiben eines ganzen Chromosoms würden die hypodiploiden Zellkerne kein Signal, die hyperdiploiden Zellen 4 Signale und die Mikrokerne 2 Signale aufweisen). Links: Chromosomen Verlust in Form eines Mikrokerms (MN 9). Mitte: Chromosomen Fehlerteilung (ND 9) oder Reintegrierung in den 'richtigen' Tochterzellkern. Rechts: Polyploidie-Induktion.

### 6.1.3 Unterschiede im CB-Mikrokerntest mit und ohne FISH

Bei den verschiedenen in Kap. 5.2.4 vorgestellten Mikrokerntests zeigte sich, dass fast alle auftretenden Mikrokerne nach Inkubation mit den untersuchten Substanzen ganze Chromosomen und keine Chromosomenfragmente enthalten. Es kann also davon ausgegangen werden, dass auch die beim CB-Mikrokerntest mit FISH detektierten Mikrokerne ganze Chromosomen enthalten. Die Summe der Mikrokerne mit und ohne Chromosom 9 im CB-Mikrokerntest mit FISH sollte daher gleich sein oder etwas höher liegen als der Anteil Kinetochor-positiver Mikrokerne beim CB-Mikrokerntest ohne FISH. Nach Inkubation mit E2, DMBP und TMBP stimmt die Summe an Mikrokerne beim CB-Mikrokerntest mit und ohne FISH gut überein. Der einzige Fall, bei dem sich Zahlenwert und auch die Gesamttendenz etwas stärker unterscheiden, ist nach Inkubation mit 75  $\mu\text{M}$  DES. Dabei könnte in beiden Tests ein Maximum der Wirkung bereits nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  erreicht sein, und zufällig die Mikrokernelrate mal bei der einen, mal bei der anderen Variante des CB-Mikrokerntests bei einer der beiden Konzentrationen geringfügig erhöht sein. Auch eine Unterschätzung der Mikrokernelrate im CB-Mikrokerntest mit FISH erscheint aus den im Folgenden erläuterten Gründen möglich. In den meisten Fällen liegen die Werte bei dem CB-Mikrokerntest mit FISH etwas niedriger als ohne FISH, was durch die fälschliche Miterfassung nebeneinander liegender einkerniger Zellen, die sich nicht geteilt haben, zu erklären wäre. Bei der Auswertung des CB-Mikrokerntests mit FISH ist es manchmal schwierig, ohne gleichzeitige Fluoreszenzmarkierung des zytoplasmatischen Mikrotubuli-Komplexes (CMTc), Zellkerne aus zweikernigen Zellen und zwei benachbarte, einzelne Kerne zu unterscheiden (Abb. 67). Die beiden Tochterkerne in zweikernigen Zellen sind häufig gleich groß und zeigen oft auch eine gewisse Symmetrie (Fenech, 2000a). Daher werden zur Auswertung eines CB-Mikrokerntests oft nur Zellen mit zwei gleich großen Tochterkernen als zweikernige Zellen anerkannt. Trotzdem sind gerade bei Chromosomenfehlverteilungen, die mehrere Chromosomen betreffen, die resultierenden Tochterkerne nicht gleich groß. Abb. 67 zeigt deutlich, dass allein auf Grundlage der DAPI-Färbung keine gesicherte Aussage darüber getroffen werden kann, ob zwei Kerne in einer einzigen Zelle vorliegen oder nicht. Da die Vorbehandlung der Zellen für die FISH sowohl eine Pepsin-, als auch eine Proteinase K-Behandlung einschließt, ist eine Sichtbarmachung des CMTc durch Immunfluoreszenzmarkierung des  $\alpha$ -Tubulins wie beim CB-Mikrokerntest ohne FISH nicht möglich. Eine Fluoreszenzmarkierung des CMTc in Formaldehyd-fixierten Zellen vor der Enzymbehandlung bleibt zwar größtenteils bestehen, stört aber durch eine deutliche Erhöhung des Hintergrunds und einer Überlagerung der Signale in den Zellkernen, die Auswertung der FISH-Signale. Ebenso erschwert eine Sichtbarmachung des Zytoplasmas dermaßen die Auswertung der Signale, dass eher eine gewisse Unsicherheit bei der Zuordnung der Zellkerne zu ein- oder zweikernigen Zellen akzeptabel erscheint. Die einzige Möglichkeit die Zellmembran sichtbar zu machen, scheint der Einsatz von Phasenkontrastmikroskopie zusätzlich zur Fluoreszenzmikroskopie zu sein.

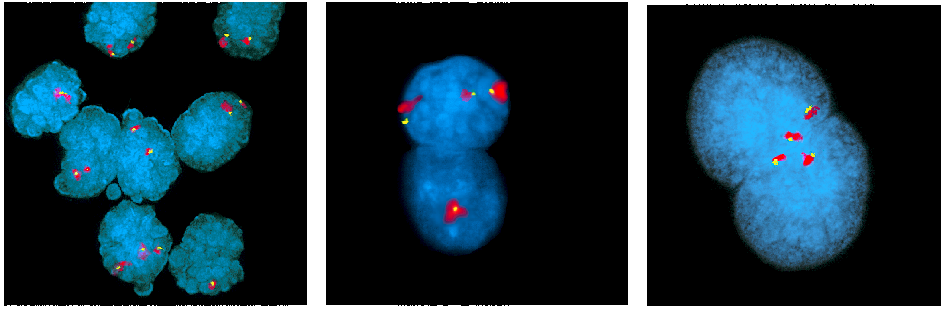


**Abb. 67:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer zweikernigen Zelle (BN) (unten) und zwei benachbart liegender einkerniger Zellen. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das mittlere den fluoreszenzmarkierten CMTC und das rechte Bild eine Überlagerung der beiden Kanäle. Entgegen der Erwartung nach Betrachtung der DAPI-gefärbten Zellkerne gehören die unteren Zellkerne zu einer BN, die oberen dagegen nicht.

#### 6.1.4 Vorteile und Grenzen des CB-Mikrokerntests mit Tandem-FISH

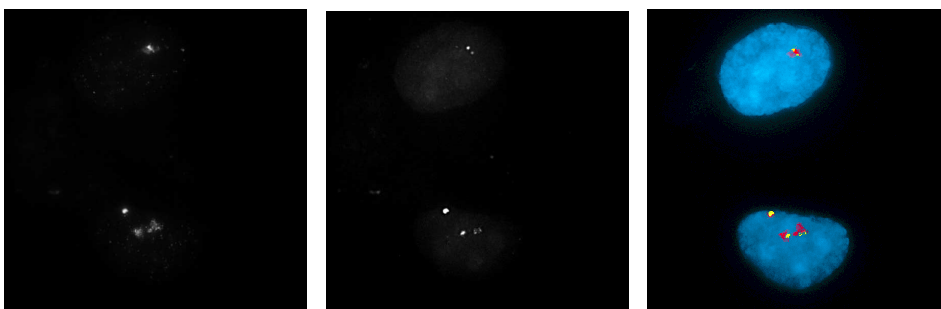
Die Problematik der Auswertung der FISH-Signale in zweikernigen Zellen verdeutlicht Abb. 68. Im linken Bild ist eine Ansammlung zweikerniger Zellen, zum Teil mit Mikrokern zu sehen. Auch eine Chromosomen-Fehlverteilung (3+1, unterer Bildrand) ist abgebildet. Obwohl die Zuordnung der einzelnen Zellkerne zu den entsprechenden Zellen zum Teil unmöglich ist, können die meisten ausgewertet werden, da ihre Zuordnung keinen Einfluss auf das Ergebnis hat (beispielsweise 4 bezüglich Chromosom 9 'normale' Zellkerne aus 2 zweikernigen Zellen, unabhängig davon, welche zwei Zellkerne zusammen gehören). Die Zuordnung der beiden Tochterzellkerne nach einer Fehlverteilung von Chromosom 9 ist eindeutig möglich, da bei einem **hypodiploiden** Kern (1 Kopie von Chromosom 9), der andere **hyperdiploid** (3 Kopien von Chromosom 9) sein muss. Auch zweikernige Zellen mit sich leicht überlappenden Zellkernen können ausgewertet werden, wenn eine eindeutige Zuordnung der Fluoreszenzsignale zu den einzelnen Zellkernen möglich ist (siehe mittleres Bild in Abb. 68). Wenn sich die Signale allerdings wie im rechten Bild der Abb. 68 in den sich überlagernden Regionen der beiden Zellkerne befinden, kann diese Zelle nicht ausgewertet werden.

Wie sinnvoll die Doppelmarkierung zweier benachbarter Chromosomenabschnitte mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen (Tandem-FISH) ist, zeigt Abb. 69. Bei alleiniger Betrachtung der klassischen Satellitenregion (linkes Bild in Abb. 69), scheint der eine Zellkern drei Kopien und



**Abb. 68:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild zweikerniger AG01522C-Zellen (BN) nach Sichtbarmachung der klassischen Satellitenregion des Chromosoms 9 mit einer Rhodamin-markierten DNA-Sonde (rot), der  $\alpha$ -Satellitenregion mit einer FITC-markierten DNA-Sonde (gelbgrün) und Färbung der Zellkerne mit DAPI (blau). Von links nach rechts: BN, die trotz schwieriger Zuordnung der Zellkerne und Mikrokerne ausgewertet werden können; BN, der trotz Überlagerung der Tochterzellkerne ausgewertet werden kann; BN, der wegen Überlagerung der Tochterzellkerne nicht ausgewertet werden kann.

der andere Zellkern nur eine Kopie von Chromosom 9 zu beinhalten. Unter Zuhilfenahme des zweiten zentromernahen Chromosomenabschnitts ( $\alpha$ -Satellitenregion) fällt allerdings auf, dass sich an der Stelle des erwarteten Einzelsignals ein Doppelsignal für die  $\alpha$ -Satellitenregion befindet, während das vermeintliche dritte Signal im anderen Zellkern in Form und Position genau mit dem der klassischen Satellitenregion zusammenfällt (mittleres Bild in Abb. 69). Da sich die Signale zwar überlagern können, aber keine identische Größe haben, muss es sich bei diesem dritten Signal um ein Artefakt handeln. Das 'Fehlen' des Signals für die klassische Satellitenregion in dem vermeintlich **hypodiploiden** Kern kann durch Überlagerung der beiden Signale zustande kommen. Dieser Effekt wird bei der Auswertung von FISH-Signalen häufiger beobachtet, weshalb **Hypodiploidie** in einkernigen Zellen mittels FISH nicht sensitiv detektiert werden kann (Eastmond et al., 1995).



**Abb. 69:** Fluoreszenzmikroskopisches Erscheinungsbild einer AG01522C-Zelle im CB-Mikrokerntest mit FISH. Das linke Bild zeigt die Rhodamin-markierte klassische Satellitenregion von Chromosom 9, das mittlere die FITC-markierte  $\alpha$ -Satellitenregion von Chromosom 9 und das rechte Bild eine Überlagerung der beiden Kanäle zusätzlich zu den DAPI-gefärbten Zellkernen.

## 6.2 Aneuploidie in AG01522C-Zellen

### 6.2.1 Spontane Aneuploidie in AG01522C-Zellen

Die von Zijno et al. (1996) in kultivierten humanen Lymphozyten für Chromosom 1 bestimmte spontane Nondisjunction-Rate (ND 1-Rate) ( $4/2000$  BN = 0,20 %) stimmt gut mit der in AG01522C-Fibroblasten festgestellten ND 9-Rate überein ( $5/2352$  BN = 0,21 %). Berechnet man die Nondisjunction-Rate des gesamten Chromosomensatzes in AG01522C-Zellen (unter Zugrundelegen der gleichen Wahrscheinlichkeit der Fehlverteilung für jedes Chromosom) erhält man einen Anteil an BN-Zellen mit fehlverteilten Chromosomen von 4,6 %. Im Gegensatz zu Zijno et al. (1996) beobachteten Elhajouji et al. (1997), dass die spontane Nondisjunction-Rate aller Chromosomen in humanen Lymphozyten starken interindividuellen Variationen unterliegt (7,0 % bis 15,4 %, berechnet aus der ND-Rate einzelner Chromosomen). Ähnliche Zahlen errechneten auch Kirsch-Volders et al. (1996) (18,4 % in Humanlymphozyten und 11,5 % in humanen Fibroblasten). Zur Berechnung der spontanen Nondisjunction-Rate ist anzumerken, dass nicht alle Chromosomen bei der Chromosomenfehlverteilung gleich stark betroffen zu sein scheinen, wobei noch unklar ist, ob dies auf Zufall beruht (Elhajouji et al., 1997; Kirsch-Volders et al., 1996). Bei spontaner Nondisjunction und chemisch induzierter Nondisjunction konnte von Elhajouji et al. (1997) kein Unterschied bezüglich der Nondisjunction-Häufigkeit der Chromosomen 1 und 17 beobachtet werden während bei der strahlungsinduzierten Nondisjunction Unterschiede zwischen den untersuchten Chromosomen auftraten (Kirsch-Volders et al., 1996). Hinsichtlich des Auftretens an spontaner Nondisjunction scheinen die primären AG01522C Fibroblasten als Testsystem geeignet und den häufig eingesetzten Humanlymphozyten nicht nachzustehen.

### 6.2.2 Anteil von Chromosom 9 an den Mikrokernen

Wie in 5.2.5 erläutert ist, scheint nach Inkubation von Fibroblasten mit 50  $\mu$ M und 75  $\mu$ M E2 und 75  $\mu$ M DES der Anteil der mittels CB-Mikrokerntest mit FISH bestimmten Mikrokernkerne, die Chromosom 9 enthalten, höher zu sein als rechnerisch zu erwarten ist (mehr als 20 % anstatt 4,4 %). Im Gegensatz dazu haben Schuler et al. (1998) nach Inkubation von Lymphozyten mit E2 und DES mit ähnlichen Maximalkonzentrationen keinen Unterschied zwischen der ND-Rate von Chromosom 1, 9 und 16 feststellen können. Auch in kultivierten humanen Lymphozyten Benzol-exponierter Arbeiter konnte kein Unterschied zwischen den Chromosomen 1, 7 und 9 bezüglich der Anfälligkeit für ND gezeigt werden (Marcon et al., 1999). Es ist noch nicht geklärt, ob sich Nondisjunction und Mikrokern-Induktion bezüglich der Häufigkeit der an ihnen beteiligten Chromosomen unterscheiden. Cimini et al. (1999) konnten jedoch sowohl in Ana-

und Telophasezellen, als auch in zweikernigen Zellen keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit von Chromosomenverlust und Chromosomenfehlverteilung zwischen den Chromosomen 7 und 11 nachweisen. Auch die Trichlorfon-induzierte Nondisjunction der Autosomen 2, 7 und 18 in zwei Lymphoblastoid-Zelllinien wies keine Unterschiede bei der Häufigkeit der beteiligten Chromosomen auf (Doherty et al., 1996). Marshall et al. (1996) beobachteten in Carbendazim-behandelten Humanlymphozyten zwar keine Unterschiede in der Sensitivität zwischen den Chromosomen 1, 8, 11, 17 und 18 bezüglich der Häufigkeit der Induktion von ND oder MN, Chromosom X schien aber anfälliger für ND zu sein als die Autosomen. Das häufigere Auftreten von ND X gegenüber der Fehlverteilung von den Autosomen 7, 11 und 18 konnte in primären und kultivierten Humanlymphozyten von Carere et al. (1999) bestätigt werden. Auch in unkultivierten Humanlymphozyten scheint Chromosom X im Vergleich zu den Autosomen bevorzugt verloren zu gehen (Muller und Kasper, 2000).

Ob der beobachtete bevorzugte Verlust von Chromosom 9 in AG01522C-Zellen nach Behandlung mit DES oder E2 möglicherweise artifiziell durch eine bessere Detektion von Mikrokernen mit Fluoreszenzsignal gegenüber Mikrokernen ohne Signal zustande kommt, müsste in zukünftigen Versuchen gezeigt werden. Die im Vergleich zum CB-Mikrokernstest ohne FISH geringere Mikrokernrate bei der FISH-Auswertung könnte ein Hinweis auf einen derartigen Fehler sein.

### **6.2.3 Konzentrationsabhängigkeit von Chromosomenverlust und Chromosomenfehlverteilung**

Gleichzeitig mit einer Erhöhung des Mitoseindex konnten Zijno et al. (1996) in kultivierten humanen Lymphozyten nach Behandlung mit Colchizin und Cytochalasin B eine Erhöhung der Anzahl zweikerniger Zellen mit Mikrokern und mit Chromosomenfehlverteilung bezüglich Chromosom 1 und X beobachten. Dabei waren in weiblichen Lymphozyten für die Induktion von ND 1 geringere Konzentrationen notwendig als für die Induktion von Mikrokernen. Beide Effekte waren auch bei Konzentrationen zu beobachten, die keine Erhöhung des Mitoseindex induzieren. Die Art der Fehler in der Chromosomenverteilung hängen sehr wahrscheinlich von dem beteiligten zellulären Angriffspunkt ab. Wenn zum Beispiel das Zentromer geschädigt wird, sollte die ND-Induktion und die Induktion von Chromosomenverlust in Form eines Mikrokerns gleich sein (Elhajouji et al., 1995). Bei einer der Störung der Tubulinpolymerisation durch die untersuchte Substanz, sollte bei niedrigen Substanzkonzentrationen bevorzugt Nondisjunction auftreten, da die Abwesenheit von einigen Tubulin-Protofilamenten am Kinetochor wahrscheinlich ausreichend ist, um Nondisjunction zu induzieren, während beim Chromosomenverlust, keines der beiden Kinetochore der zusammenhängenden Schwesterchromatiden an der ausgebildeten Spindel angeheftet ist. Dabei muss berücksichtigt werden, dass Mikrokerne

auch durch zusätzliche Spindelpole induziert werden können. In den von Zijno et al. (1996) beschriebenen Untersuchungen wurden zur Aneuploidie-Induktion klassische Spindelgifte eingesetzt, was die bevorzugte Induktion von Nondisjunction bei niedrigen Konzentrationen erklärt. In Einklang mit den Beobachtungen von Zijno et al. (1996) und Elhajouji et al. (1997) wurde nach Inkubation von AG01522C-Zellen mit DMBP (50  $\mu\text{M}$ ) und TMBP (15  $\mu\text{M}$ ) bereits bei Konzentrationen Mikrokerne, MN 9 und ND 9 induziert, die zu keiner Erhöhung des Mitoseindex führen. Bei DES und E2 induzierte die niedrigste eingesetzte Konzentration bereits eine Erhöhung des Mitoseindex, daher kann für diese Substanzen keine Aussage darüber getroffen werden, ob Chromosomen-Verlust oder ND 9 auch bei niedrigeren Konzentrationen auftreten. Bei DES konnte die ND-Rate noch konzentrationsabhängig gesteigert werden, während die optimale Konzentration für die Induktion von ND bei der höchsten getesteten E2-Konzentration bereits überschritten ist.

Unter den von Zijno et al. (1996) beschriebenen Versuchsbedingungen werden Zellpopulationen mit nur geringer oder gar keiner Beeinflussung des mitotischen Apparates (nämlich die Zellen, die die Fähigkeit, eine Mitose zu durchlaufen, beibehalten haben) erfasst. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen (in 5.2.2 beschrieben) wurden hauptsächlich Zellpopulationen erfasst, deren Fähigkeit, die Mitose zu durchlaufen, zumindest eingeschränkt ist. Aus diesem Grund liegen für die untersuchten Bisphenole und Positivkontrollen nur wenige Ergebnisse mit Substanzkonzentrationen vor, die keinen Mitosearrest induzieren. Konzentrationen, die keine Erhöhung der Mikrokernrate induzieren, wurden ebenfalls nicht untersucht. Ein Nachteil dieses Inkubationsprotokolls ist sicherlich, dass die Mitose nicht unter Substanz Einfluss, sondern erst in der substanzfreien Erholungsphase stattfindet. Um niedrigere Substanzkonzentrationen, die keinen Mitosearrest induzieren, untersuchen zu können und um eventuell vorkommende Schwellenwerte zu bestimmen, könnte eine Ko-Inkubation der Zellen mit Cytochalasin B einen Lösungsansatz darstellen. Allerdings sind bei gleichzeitiger Behandlung der Zellen mit einem Spindelgift und dem Zytokinesinhibitor aufgrund der in 6.1.2 beschriebenen Wechselwirkungen zwischen Kern- und Zellteilung weitere experimentelle Probleme zu erwarten. Solche deuteten sich bereits in den ersten Vorversuchen an, was schließlich zur Verwerfung eines derartigen Inkubationsprotokolls führte. Ein Inkubationsprotokoll ohne Cytochalasin B-Zugabe erscheint, zumindest bei der verwendeten primären Zelllinie, nicht zu einer empfindlichen Detektion von FISH-Signalen zu führen, da in einkernigen Zellen die Störung durch diverse Fehlermöglichkeiten bei der Auswertung der Fluoreszenzsignale (Eastmond und Pinkel, 1990; Eastmond et al., 1995) deutlich höher ist als bei der CB-FISH.



## 7 Zusammenfassung

Viele estrogen wirksame Substanzen weisen neben ihrem hormonellen ein genotoxisches Potential auf, das nicht Estrogenrezeptor-vermittelt ist und sich auch nicht proportional zur Estrogenität dieser Substanzen verhält.

Bei früheren Untersuchungen mit einigen zu den Phytoestrogenen gehörenden Isoflavonen fiel auf, dass geringfügige Änderungen der Substituenten am A- oder B-Ring das genotoxische Potenzial dieser Substanzen stark beeinflussen. So wirkte Genistein als Klastogen, während Daidzein, das sich vom Genistein nur durch das Fehlen einer Hydroxy-Gruppe unterscheidet, im getesteten Konzentrationsbereich ohne biologische Aktivität war. Im Gegensatz dazu hatte Biochanin A, ein Genisteinmonomethylether, in V79-Zellen ein aneuploidogenes Potenzial. Daher war ein Ziel dieser Arbeit, die Struktur-Wirkungsbeziehungen bei Isoflavonen mit verschiedenen Substituenten am A- und B-Ring zu untersuchen. Dazu wurde die genotoxische Aktivität einiger Isoflavonoide mit unterschiedlicher Anzahl und/oder Position von Methoxygruppen in kultivierten V79-Zellen untersucht. In diesen Zellen hatten alle untersuchten Isoflavonoide ein aneuploidogenes Potenzial. Sie induzierten einen reversiblen Mitosearrest (Genisteindimethylether  $\approx$  Diethylstilbestrol > Prunetin > Biochanin A > Formononetin > Kullenin  $\approx$  Equol) und den Verlust von Chromosomen als Kinetochor-positive Mikrokerne (Genisteindimethylether > Prunetin > Biochanin A > Formononetin > Equol  $\gg$  Kullenin). Dabei korrelierte das Ausmaß der Mikrokerninduktion nicht mit der Stärke des Mitosearrests. Das aneuploidogene Potenzial der Isoflavone schien abhängig von der Anzahl und der Position der Methoxy-Substituenten am A- und B-Ring zu sein. In primären Schafsamenblasenzellen und zwei primären menschlichen Zelllinien konnte mit den gleichen Isoflavonoid-Konzentrationen kein aneuploidogenes Potential festgestellt werden. Die in diesen Zellen als Positivkontrollen mitgeführten Estrogene Diethylstilbestrol und  $17\beta$ -Estradiol mussten in höheren Konzentrationen als in V79-Zellen eingesetzt werden, um einen Effekt zu erzielen. Höhere Substanzkonzentrationen waren aufgrund der schlechten Löslichkeit bei den meisten Isoflavonoiden nicht möglich. Die Unterschiede in der Empfindlichkeit verschiedener Zelllinien gegenüber Aneuploidogenen können auf einer Vielzahl von Faktoren, zum Beispiel Enzymausstattung und Zellzykluskontrolle beruhen.

Die Fähigkeit zur Aneuploidie-Induktion ist ein weit verbreitetes Merkmal unter estrogen wirksamen Substanzen, daher sollte im Zuge dieser Arbeit neben der Detektion von Chromosomenverlusten mit dem Mikrokerntest als ein weiterer Endpunkt die Induktion von Chromosomenfehlverteilungen mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung nachgewiesen werden. Als Testsystem wurde aus praktischen Gründen eine diploide primäre menschliche Zelllinie ausgewählt.

Da die Isoflavone in den einsetzbaren Konzentrationen kein aneuploidogenes Potenzial in mehreren menschlichen und einer nicht-menschlichen Zelllinie aufwiesen, wurden zur Methoden-

etablierung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung die Aneuploidogene  $17\beta$ -Estradiol, Diethylstilbestrol und die Bisphenole Bisphenol A, Dimethylbisphenol A und Tetramethylbisphenol A verwendet. Diese hatten sich in vorangehenden Untersuchungen unseres Arbeitskreis als potente Aneuploidogene in kultivierten V79-Zellen, aber auch in humanen Tumorzelllinien erwiesen.

Nach Etablierung der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung mit kommerziell erhältlichen DNA-Sonden wurden die benötigten DNA-Sonden nach Modifikation einer bereits veröffentlichten Vorschrift mittels Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert und teilweise bereits bei der Polymerase-Kettenreaktion, teilweise im Anschluss daran mittels Nick-Translation mit einem Fluorochrom markiert.

Die verwendete Zelllinie erwies sich bezüglich der Häufigkeit spontaner Aneuploidien als ebenso gut geeignet wie die häufig verwendeten Humanlymphozyten. Die Detektion der zweikernigen Zellen sollte allerdings noch verbessert werden.

Zum eindeutigeren Nachweis von Nondisjunction mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung war die Einführung des Zytokinese-gehemmten Mikrokerntests notwendig. Die Bewertung der Ergebnisse erforderte einen Vergleich dieser Mikrokerntestvariante mit dem in herkömmlicher Weise in unserem Arbeitskreis verwendeten Mikrokerntest. Ein Inkubationsprotokoll, das beide Methoden einschließen und direkt vergleichbar machen sollte, wurde entwickelt, und die Eignung der Mikrokerntestvarianten für die verschiedenen Substanzen beurteilt.

Diethylstilbestrol und  $17\beta$ -Estradiol zeigten im gleichen Konzentrationsbereich ein aneuploidogenes Potenzial in Humanfibroblasten (AG01522C). Beide Substanzen arretierten die Mitose reversibel in der Metaphase, induzierten Mikrokerne mit ganzen Chromosomen und Chromosomenfehlverteilungen in den Tochterkernen. Der diesen Effekten zugrunde liegende Mechanismus schien allerdings unterschiedlich zu sein, da nur Diethylstilbestrol, nicht aber  $17\beta$ -Estradiol, einen vollständigen Mitosearrest auslöste. Des Weiteren unterschieden sich die durch Diethylstilbestrol oder  $17\beta$ -Estradiol arretierten Metaphasen morphologisch deutlich voneinander.

Bisphenol A induzierte in humanen Fibroblasten unter den angegebenen Bedingungen weder Mitosearrest noch Kinetochor-positive Mikrokerne. Stattdessen wurde eine starke Abnahme der Teilungsfähigkeit der Zellen beobachtet. Ob dies auf einen Zellzyklusarrest oder auf einen Effekt von Bisphenol A auf den zytoplasmatischen Mikrotubuli-Komplex zurückzuführen ist, konnte nicht eindeutig ermittelt werden.

Die untersuchten methylierten Bisphenole induzierten Mitosearrest, morphologische Veränderungen der Metaphasen, Kinetochor-positive Mikrokerne und Fehlverteilung der Chromosomen auf die Tochterkerne. Dabei war Tetramethylbisphenol A bei etwa halb so hohen Konzentrationen wirksam wie Dimethylbisphenol A. Mechanistisch ließen sich die Effekte weder ausschließlich dem  $17\beta$ -Estradiol- noch dem Diethylstilbestrol-Typ zuordnen. So wiesen beispiels-

weise die Metaphasen ein breites Spektrum morphologischer Veränderungen auf, die sowohl  $17\beta$ -Estradiol-behandelten als auch Diethylstilbestrol-behandelten Zellen glichen. Das aneuploidogene Potenzial dieser Substanzen ging mit weiteren, bisher unbekanntem Effekten auf den Aufbau des zytoplasmatischen Mikrotubuli-Komplex einher, die nach Inkubation mit  $17\beta$ -Estradiol oder Diethylstilbestrol nicht beobachtet wurden. Allerdings traten die meisten der genannten Effekte bei Substanzkonzentrationen auf, die in AG01522C-Fibroblasten bereits wachstumshemmend und/oder zytotoxisch waren.

Hinsichtlich der Eignung des Zytokinese-gehemmten Mikrokerntests in kultivierten primären Humanfibroblasten gab es starke Unterschiede zwischen den getesteten Substanzen, aber auch bei verschiedenen Konzentrationen der selben Substanz. Diese Variationen kamen durch die Art des Inkubationsprotokolls, das auf der Induktion eines vollständigen Mitosearrests basiert, zustande. Für Substanzen, die keinen vollständigen Mitosearrest auslösen, wie zum Beispiel  $17\beta$ -Estradiol, ist das verwendete Inkubationsprotokoll des Zytokinese-gehemmten Mikrokerntests nicht optimal. Hinzu kamen unerwünschte zytotoxische Effekte des Cytochalasin B in Kombination mit beispielsweise Diethylstilbestrol.

Die Entscheidung für oder gegen den Zytokinese-gehemmten Mikrokerntest kann demnach nicht generell getroffen werden, sondern muss der Einzelsubstanz, dem gewünschten Konzentrationsbereich und der Fragestellung entsprechend getroffen werden. Bei der verwendeten Zelllinie ist die geringere Mikrokernrate der Lösungsmittelkontrolle im Zytokinese-gehemmten Mikrokerntest gegenüber dem Mikrokerntest ohne Cytochalasin B von Vorteil. Des Weiteren ist im Zytokinese-gehemmten Mikrokerntest das Wachstumsverhalten einer primären Zelllinie besser erfassbar. Auf jeden Fall sollte ein negatives Ergebnis im Mikrokerntest im Zytokinese-gehemmten Mikrokerntest überprüft werden, besonders wenn Hinweise auf ein wachstumshemmendes Potenzial der Testsubstanz vorliegen.

Diese Arbeit zeigt deutlich, dass die Betrachtung eines einzigen Endpunkts in einem einzelnen Testsystem nicht genügt, um das genotoxische Potential einer Substanz auch nur annähernd bewerten zu können. Am Beispiel der Isoflavone wird deutlich, dass nicht alle Zelllinien die gleiche Sensitivität für einen Endpunkt aufweisen. Zu quantitativen Unterschieden in der Empfindlichkeit der verwendeten Zelllinien können weitere qualitative Unterschiede in der Art und Weise, in der die Zellen auf die Substanzexposition reagieren, kommen: Bisphenol A, das in V79 einen deutlichen Mitosearrest induziert, bewirkt in der primären menschlichen Zelllinie keinen Mitosearrest, aber dafür einen bisher unbekanntem Effekt auf die zelluläre Mikrotubuli-Assoziation in der Interphase, die in V79-Zellen nicht beobachtet wird.

Neben der Wahl der Zelllinie spielt das verwendete Inkubationsprotokoll eine große Rolle. Zum einen ist die Verwendung des Zytokinese-gehemmten Mikrokerntests nicht bei jeder Testsub-

stanz zu empfehlen, da Cytochalsin B selbst, wie am Beispiel des Diethylstilbestrols gezeigt, mit der Mikrokerninduktion interferieren kann. Zum anderen ist der Zeitpunkt der Cytochalsin B-Zugabe bei dieser Variante des Mikrokerntests ein ausgesprochen kritischer Parameter, wie beim  $17\beta$ -Estradiol deutlich wurde. Eine Möglichkeit, diese Fehlermöglichkeit abschätzen zu können, bietet die zusätzliche Auswertung des Zytokinese-gehemmten Mikrokerntests in herkömmlicher Art ohne Unterscheidung zwischen ein- und zweikernigen Zellen.

Des Weiteren sollte auf die Kombination des Mikrokerntests mit der immunologischen Sichtbarmachung der Mikrotubuli nicht verzichtet werden, da die Erkennung sowohl der zweikernigen Zellen als auch zusätzlicher Endpunkte wie Apoptoseinduktion, Zytotoxizität und Beeinflussung der Zellteilung wertvolle zusätzliche Informationen bietet.

## 8 Material und Methoden

Nicht näher spezifizierte Chemikalien stammen vom Carl Roth (Karlsruhe), Fluka / Sigma / Aldrich (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) in der Reinheit mind. „zur Analyse“.

Wenn nicht anders angegeben, wird entionisiertes Wasser aus der Hausversorgung verwendet.

### 8.1 Geräte

**Sterilbank** Uni Equip Uniflow UVUB 1200 Biohazard

**Zellzählgerät, elektronisch** CASY®1 Schärfe Systeme

#### **Fluoreszenzmikroskop**

Zeiss Axioskop Plan Neofluor

Okular: 10x; Objektive: 63x/100x (Oil)

Filterblocks: A (DAPI), I2/3 (FITC), N2 (Rhodamin), Tripelfilter

Nikon Eclipse E400

Okular: 10x; Objektive: Plan Apo 60x, 100x (Öl)

Filterblocks: UV-2A (DAPI, Ex<sup>1</sup>: 330-380, DM<sup>2</sup>: 400, BA<sup>3</sup>: 420), G-2A (Rhodamin, Ex: 510-560, DM: 575, BA: 590), FITC (Ex: 465-495, DM: 505, BA: 515-555), Tripelfilter

Dokumentation: Spot-RT monochrom CCD-Digitalkamera (Diagnostic Instruments), MetaView (Universal Imaging Corp.)

**Phasenkontrastmikroskop** Leitz Labovert FS; Objektive: 10x, 20x, 32x

**Elektrophorese** Biorad PowerPac 300; Pharmacia Biotech GNA 100

#### **Handzählgeräte**

**Pipetten** Biozym Precision 0,5 – 10 µl / 5 – 50 µl / 50 – 200 µl

Eppendorf 50 µl / 100 µl / Research 2 – 20 µl

Abimed Pipetman P1000 / P200 / P100

**Thermocycler** MJ Research Mini Cycler PTC-150 mit Hot Bonnet

---

<sup>1</sup>Anregung, Wellenlänge in nm

<sup>2</sup>Dichroitischer Spiegel, Wellenlänge in nm

<sup>3</sup>Emissionsfilter, Wellenlänge in nm

**Zentrifugen** Eppendorf 5414S und 5417R

National Labmed C-1200

Hereaus Megafuge 1.0R

**Trockenschrank** Heraeus

**Wasserbad** mgw Lauda, Thermostar

**Waagen** Mettler

Sartorius H110

Sartorius PT1200

**Heizplatte** Omnilab Jürgens (Bremen) PST100

**Magnetrührer**

**pH-Meter** Metrom 610 Ion-Meter; pH-Elektrode Blueline 12 (Schott)

**Ultraschallbad**

**Mikrowellenherd**

**Brutschrank** Sanyo CO<sub>2</sub> -Inkubator MCO-17AI

**Geldokumentationssystem** Herolab Darkroom Hood RH-6;

Dokumentation: E.A.S.Y. Win 32; Mitsubishi CP700DS-Drucker

## 8.2 Verbrauchsmaterialien

**CASYTON** (Schärfesysteme)

**CASY<sup>®</sup>cup** (Schärfesysteme)

**Reaktionsgefäße** 1, 5 ml (Sarstedt)

**Pipettenspitzen, Plastik** 1 ml, 200 µl (Sarstedt)

**PCR-Tubes**, 0, 2 ml (Biozym)

**„Quatriperm“-Inkubationsgefäße** (Heraeus) Multischalen 132x82 mm<sup>2</sup>, 4 Vertiefungen

**Zellkulturflaschen** Cellstar 550 ml (Greiner)

**Petrischalen** 94/16 mm (Greiner)

**Petrischalen** 34/16 mm (Greiner)

**Objektträger, superfrost** (Menzel)

**Deckgläser** 24x60 mm (Roth)

**Zentifugenröhrchen** 50 ml (Greiner); 15 ml (Sarstedt); 2 ml (Greiner, „cryo.s“)

**Coplinbecher (Glas, Plastik)** (Merck)

### 8.3 Herstellung der Sonde für die klassische Satellitenregion (c-sat)<sup>4</sup>

#### 8.3.1 Lösungen

**Wasser** sterilfiltriert

**MasterAmp Tfl DNA Polymerase** (1 U/ $\mu$ l) (Epicentre Technologies)

**20x MasterAmp Tfl PCR-Puffer** (Epicentre Technologies)

**Nukleotid-Lösungen** (je 100 mM) (Boehringer Mannheim)

**MgCl<sub>2</sub>-Lösung** (1 M) Es werden 304,9 mg MgCl<sub>2</sub>\*6 H<sub>2</sub>O (M=203,3 g/mol) in 1,5 ml sterilem Wasser gelöst. Die Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt.

**MgCl<sub>2</sub>-Lösung** (0,25 M) Die MgCl<sub>2</sub>-Lösung (1 M) wird 1:4 (v/v) mit sterilem Wasser verdünnt. Die Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt.

**Tween-/Nonidet-Lösung** (je 25 % (w/w)) Es werden jeweils 250 mg Nonidet P-40 (Sigma) und Tween-20 (Serva) eingewogen, gemischt und in 0,5 ml sterilem Wasser gelöst. Die Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt.

**Tween-/Nonidet-Lösung** (je 2,5 % (w/w)) Die Tween-/Nonidet-Lösung (je 25 %) wird 1:10 (v/v) mit sterilem Wasser verdünnt. Die Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt.

**d[GAC]TP-Mix** (je 10 mM) Es werden von dGTP, dATP und dCTP (je 100 mM) jeweils 50  $\mu$ l gemischt und mit 350  $\mu$ l sterilem Wasser verdünnt. Die Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt.

**dTTP-Lösung** (1 mM) Die dTTP-Stammlösung (100 mM) wird zweimal zu je 1:10 (v/v) mit sterilem Wasser verdünnt. Die Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt.

---

<sup>4</sup>modifiziert nach Hasegawa et al. (1995)

**dUTP-Fluorored** (100  $\mu\text{M}$ ) Die Stammlösung (Amersham Pharmacia) wird 1:10 (v/v) mit sterilem Wasser verdünnt. Die Lösung wird bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt.

**DNA** ( $\sim 0,3\text{ mg/ml}$  in TE-Puffer) (Coriell Cell Repositories oder isoliert (siehe 8.7)) NA10611 (Produktnummer) aus GM10611-Zellen („CHO“) isoliert.

**Primer** (Birsner & Grob Biotech) (40  $\mu\text{M}$ ) Sequenz: 5'-TCC ACT CGG GTT GAT T-3'

### 8.3.2 Durchführung

Die Lösungen werden entsprechend Schema 8.1 pipettiert.

Lösung	Volumen	Endkonzentration
Wasser	5,0 $\mu\text{l}$	
20x Puffer	1,3 $\mu\text{l}$	1,04 x
Tween-Nonidet (je 2,5%)	2,5 $\mu\text{l}$	0,25 %
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (0,25 M)	1,6 $\mu\text{l}$	16,00 mM
DNA	0,7 $\mu\text{l}$	$\sim 8,40\text{ }\mu\text{g/ml}$
Primer	0,9 $\mu\text{l}$	1,44 $\mu\text{M}$
d[GAC]TP-Mix (je 10 mM)	0,5 $\mu\text{l}$	0,20 mM
dTTP-Lösung (1 mM)	4,5 $\mu\text{l}$	0,18 mM
dUTP-Fluorored (100 $\mu\text{M}$ )	5,5 $\mu\text{l}$	22,00 $\mu\text{M}$
Polymerase (1 U/ $\mu\text{l}$ )	2,5 $\mu\text{l}$	0,10 U / $\mu\text{l}$
Gesamtvolumen	25,0 $\mu\text{l}$	

**Schema 8.1:** Pipettierschema für die Herstellung der c-sat-Sonde nach der Optimierung.

Das Temperaturprogramm ist in Schema 8.2 angegeben. Die Polymerase wird nach Schritt 1 zugegeben.

1.	8 min	94 $^\circ\text{C}$	} 24 mal
2.	30 sec	93 $^\circ\text{C}$	
3.	1 min	40 $^\circ\text{C}$	
4.	2 min	72 $^\circ\text{C}$	
5.	15 min	72 $^\circ\text{C}$	
6.		-4 $^\circ\text{C}$	

**Schema 8.2:** Temperaturprogramm für die Herstellung der c-sat-Sonde.



## 8.4 Herstellung der Sonde für die $\alpha$ -Satellitenregion ( $\alpha$ -sat)<sup>5</sup>

### 8.4.1 Lösungen

**Primer 9A** (Birsner & Grob Biotech) (20  $\mu$ M) Sequenz: 5'-CCT GAA AGC GCT TAA AAC GTC-3'

**Primer 9B** (Birsner & Grob Biotech) (20  $\mu$ M) Sequenz: 5'-CCT ATG ATG AAA AAG GT-3'

**d[GACT]TP-Mix** (je 10 mM) (Boehringer Mannheim)

Hier nicht aufgeführte Lösungen entsprechen den Angaben in Kap. 8.3.

### 8.4.2 Durchführung

Die Lösungen werden entsprechend Schema 8.3 pipettiert.

Lösung	Volumen	Endkonzentration
Wasser	14,1 $\mu$ l	
20x Puffer	1,3 $\mu$ l	1,04 x
Tween-Nonidet (je 2,5 %)	2,5 $\mu$ l	0,25 %
Mg Cl <sub>2</sub> -Lösung (0,25 M)	1,6 $\mu$ l	16,00 mM
DNA	0,7 $\mu$ l	8,40 $\mu$ g/ml
Primer 9a	0,9 $\mu$ l	0,72 $\mu$ M
Primer 9b	0,9 $\mu$ l	0,72 $\mu$ M
d[GACT]TP-Mix (je 10 mM)	0,5 $\mu$ l	0,20 mM
Polymerase (1 U/ $\mu$ l)	2,5 $\mu$ l	0,10 U/ $\mu$ l
Gesamtvolumen	25,0 $\mu$ l	

**Schema 8.3:** Pipettierschema für die Herstellung der  $\alpha$ -sat-Sonde.

Das Temperaturprogramm ist in Schema 8.4 angegeben. Die Polymerase wird nach Schritt 1 zugegeben.

1.	8 min	94°C	} 26 mal
2.	30 sec	93°C	
3.	1 min	45°C	
4.	2 min	72°C	
5.	15 min	72°C	
6.		-4°C	

**Schema 8.4:** Temperaturprogramm für die Herstellung der  $\alpha$ -sat-Sonde.

<sup>5</sup>modifiziert nach Hasegawa et al. (1995)

## 8.5 Markierung der Sonde für die $\alpha$ -Satellitenregion durch Nicktranslation<sup>6</sup>

### 8.5.1 Lösungen

**Nicktranslations-Kit** (Boehringer Mannheim) (bestehend aus 10x Puffer, Nukleotid-Lösungen (je 0,4 mM), Enzym-Mix (Polymerase, DNase I: je 1 U/ $\mu$ l))

**Fluorogreen** (1 mM) (Amersham Pharmacia)

**MgCl<sub>2</sub>-Lösung** (0,2 M) Die MgCl<sub>2</sub>-Lösung (1 M, Kap. 8.3) wird 1:5 (v/v) mit sterilem Wasser verdünnt. Die Lösung wird bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

**EDTA-Lösung** (0,2 M) Die Lösung wird mit sterilem Wasser angesetzt. Die Lösung wird bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 8.5.2 Durchführung

Die Lösungen werden entsprechend Schema 8.5 pipettiert.

Lösung	Volumen	Endkonzentration
dCTP	2,5 $\mu$ l	64,00 $\mu$ M
dGTP	2,5 $\mu$ l	64,00 $\mu$ M
dATP	2,5 $\mu$ l	64,00 $\mu$ M
dTTP	1,6 $\mu$ l	41,00 $\mu$ M
Fluorogreen (1 mM)	0,8 $\mu$ l	51,00 $\mu$ M
10x Puffer	2,0 $\mu$ l	1,28 x
MgCl <sub>2</sub> -Lösung (0,2 M)	1,0 $\mu$ l	12,80 $\mu$ M
PCR-Produkt	0,7 $\mu$ l	
Enzym-Mix	2,0 $\mu$ l	
Gesamtvolumen	15,6 $\mu$ l	

**Schema 8.5:** Pipettierschema für die Nicktranslation der  $\alpha$ -sat-Sonde.

Das Temperaturprogramm ist in Schema 8.6 angegeben. Nach Ablauf des Temperaturprogramms wird mit 2  $\mu$ l EDTA-Lösung abgestoppt.

1. 3,5 h  $15^{\circ}\text{C}$
2.  $-4^{\circ}\text{C}$

**Schema 8.6:** Temperaturprogramm für die Nicktranslation der  $\alpha$ -sat-Sonde.

---

<sup>6</sup>modifiziert nach Hasegawa et al. (1995)

## 8.6 Elektrophorese der Reaktionsprodukte

### 8.6.1 Lösungen

**50x TAE-Puffer** Es werden 242 g TRIS-Base, 57 ml Eisessig und 100 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0) gemischt. Die Mischung wird mit Wasser auf 1 l Volumen aufgefüllt. Die Lösung ist bei Raumtemperatur haltbar.

**1x TAE-Puffer** Ein Volumenteil 50x TAE-Puffer wird mit 49 Volumenteil Wasser gemischt.

**Ethidiumbromid-Lösung** (10 mg/ml) Ethidiumbromid (Sigma) wird in Wasser gelöst

**10x Gelpuffer** Der Puffer besteht aus je 0,42% Bromphenolblau und Xylencyanol FF, sowie 50 % Glycerin in Wasser.

**100bp DNA-Leiter** (New England BioLabs)

### 8.6.2 Durchführung

Die Trennung erfolgt in einem 1 %-igen Agarose-Gel (0,5 g Agarose (NEEO) in 50 ml 1xTAE). Die Mischung wird in einem Mikrowellen-Herd zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wird das Gel gegossen. Es werden jeweils

- 5 µl PCR-Produkt und 1 µl 10x Gelpuffer
- 0,5 µl DNA-Leiter, 4,5 µl Wasser (sterilfiltriert) und 1 µl 10x Gelpuffer

gemischt. Davon werden jeweils 5 µl in eine Probenflasche pipettiert. Die Trennung erfolgt während einer Stunde bei Raumtemperatur bei 70 V.

Bei farblosen PCR-Produkten können 2,5 µl Ethidiumbromid-Lösung in das noch flüssige Gel gegeben werden. Alternativ kann das Gel nachträglich mit Ethidiumbromid gefärbt werden. Dazu wird das Gel für 15 min in eine Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gelegt. Anschließend wird für 5 min mit Wasser entfärbt. Die Auswertung erfolgt unter einer UV-Lampe.

Die Dokumentation erfolgt mit Hilfe des Gel-Dokumentationssystems.

## 8.7 DNA-Isolierung<sup>7</sup>

### 8.7.1 Lösungen

**NaCl-Lösung** (6 M)

**SE-Puffer** (75 mM NaCl, 25 mM EDTA (pH 8,0), 1 % SDS (w/v), pH 8,0)

**TE-Puffer** (10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA, pH 8,0)

**Proteinase K** 30 U/mg (Appligen Oncor)

### 8.7.2 Durchführung

Als DNA-Quelle dient die Zelllinie GM10611D („CHO“, *Coriell Cell Repositories*). Das sind Ovarien-Zellen von Chinesischen Hamstern, in die das humane Chromosom 9 eingebracht wurde. Sie enthalten in etwa 76 % der Zellen das humane Chromosom 9 (Produktbeschreibung zur Zelllinie). Eigene Hybridisierungsversuche mit den beschriebenen DNA-Sonden für Chromosom 9 ergaben einen Anteil von mindestens 90 % Zellen, die das humane Chromosom 9 enthalten.

Es werden mind. 10 Mio. Zellen benötigt.

Nach dem Abtrypsinieren werden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen und bei 188 g für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 9 ml SE-Puffer aufgenommen. Proteinase K (Endkonz. 200 µg/ml) wird zugegeben. Die Mischung wird über Nacht bei 55 °C im Schüttelwasserbad inkubiert, danach 3 ml NaCl-Lösung zugeben und mischen. Es werden 12 ml (1 Vol) Chloroform zugegeben und durch rotieren (30 min bis 1 h) extrahiert. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugieren (1800 g bei 4 °C). Der Überstand (wässrige Phase) wird in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol (1 Vol) vorsichtig gemischt (DNA fällt aus). Die Lösung wird zentrifugiert und die DNA mit einer Pasteurpipette (Plastik) in einen Eppendorf-Reaktionsbehälter überführt. Es wird für mindestens 1 h mit einer Ethanol-Lösung (70%) bei 4 °C (Kühlschrank) gewaschen. Das Ethanol wird abgegossen und das restliche Ethanol verdampft (N<sub>2</sub>-Strom). Die DNA wird in 60 µl TE-Puffer bei Raumtemperatur gelöst.

Die Quantifizierung erfolgt durch Messung der Extinktion bei 260 nm (1 OD  $\hat{=}$  50 µg/ml). Die Reinheit wird durch Messung der Extinktion bei 280 nm (Proteine) bestimmt.

Die DNA-Lösung wird mit TE-Puffer auf  $\sim 0,3$  mg/ml eingestellt. Zur Kontrolle wird eine Sonde hergestellt (Kap. 8.3) und diese hybridisiert (Kap. 8.12).

---

<sup>7</sup>nach Müllenbach et al. (1989)

## 8.8 Zellkultur

### 8.8.1 Zellen

#### Permanente Zelllinien

**V79** Lungenfibroblasten aus einem männlichen chinesischen Hamster. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 12 h.

**GM16011** In die Parentalzelllinie CHO UV 34 wurde das menschliche Chromosom 9 eingebracht. CHO Zellen stammen aus den Ovarien eines weiblichen Hamsters. Die Linie CHO UV 34 ist defizient bezüglich ihrer Fähigkeit zur DNA-Reparatur. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 16 h.

#### Primäre Zelllinien

**AG01522C** Vorhautfibroblasten eines 3 Tage alten Jungen. Die Verdopplungszeit beträgt zirka 24 h. Die Zellen lassen sich ungefähr 29 Verdopplungszeiten lang in Kultur halten. Die von Coriell Cell Repositories gelieferten Zellen haben bei ihrer Ankunft zehn Populationsverdopplungen hinter sich.

**HCV** Humane Chorion villi-Zellen (Fötale Zellen). Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 24 h.

**OSV** Schafssamenblasenzellen. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 24 h.

#### Tumorzelllinien

**HeLa** Zelllinie aus einem humanen Cervixkarzinom. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 24 h.

**Ishikawa** Zelllinie aus einem humanen Karzinom des Endometriums. Die Zelllinie steht sowohl in ihrer natürlichen Form, das heißt Estrogenrezeptor(ER)-positiv, als auch ER-negativ zur Verfügung. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 24 h (ER-positiv), beziehungsweise 36 h (ER-negativ).

### 8.8.2 Lösungen

Medien und alle Mediumzusätze von GibcoBRL. Allen Medien werden Penizillin (Endkonzentration: 100 U/ml) und Streptomycin (Endkonzentration 100 µg/ml) zugesetzt.

#### Medium

**V79** Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % FKS.

**GM16011** RPMI Medium 1640 mit 10 % FKS.

**AG0** Minimal Essential Medium mit 16 % FKS. Der Nährstoffgehalt wird mit MEM-Vitaminen, MEM-essenziellen Aminosäuren, MEM-nichtessenziellen Aminosäuren und L-Glutamin erhöht (Anhang, Tab. 16). Der pH-Wert wird mit sterilfiltrierter NaOH-Lösung (1 M) auf 7,0 eingestellt.

**HCV** F10-Medium mit 15 % FKS.

**OSV** Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 10 % FKS.

**HeLa** F12-Medium mit 10 % FKS.

**Ishikawa** F12-Medium/DMEM im Verhältnis 1+1 (v/v) mit 10 % FKS.

**PBS-CMF** 10x PBS-CMF (Kap. 8.11) wird 1:10 (v/v) verdünnt. Der pH-Wert beträgt 7,4.

**Trypsin** (Sigma) 0,25 %

**Trypsin-EDTA** In 900 ml PBS-CMF 200 mg EDTA (freie Säure, Sigma) lösen, den pH-Wert auf 7,4 einstellen und autoklavieren. Danach 100 ml Trypsin steril zugeben.

### 8.8.3 Durchführung

Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre inkubiert.

Vor der Benutzung werden alle Lösungen auf 37 °C erwärmt.

Zum Passagieren wird das Medium abgegossen, der Zellrasen mit 10 ml PBS-CMF gewaschen und für 30 s mit 10 ml Trypsin bedeckt. Die Lösung wird abgegossen und die Zellkulturflasche solange in den Brutschrank gestellt, bis sich die Zellen abgekugelt haben. Die Zellen werden durch Klopfen vom Flaschenboden getrennt, und in 10 ml Medium aufgenommen. Etwa 1 Mio. Zellen werden in 20 ml Medium ausgestreut.

Alle zwei Tage wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wird das bisherige Medium aus der Kulturflasche gegossen, der Zellrasen mit PBS-CMF gewaschen und 20 ml frisches Medium in die Flasche gefüllt.

## 8.9 Substanzbehandlung der Zellen beim Mitosearrest- und Mikrokerntest

### 8.9.1 Testsubstanzen

Alle Testsubstanzen werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

**5,7,4'-Trihydroxyisoflavon, Genistein** (Fluka)

**5,4'-Dihydroxy-7-methoxyisoflavon, Prunetin** (Indofine)

**7-Hydroxy-5,4'-dimethoxyisoflavon, Genisteindimethylether** (Indofine)

**5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon, Biochanin A** (Sigma)

**7-Hydroxy-2'-methoxyisoflavon, Kullenin** (nach Wahala et al. (1995), Reinheit mit GC/MS überprüft)

**7-Hydroxy-4'-methoxyisoflavon, Formononetin** (nach Wahala et al. (1995), mit präparativer HPLC aufgereinigt, Reinheit mit GC/MS überprüft)

**Diethylstilbestrol** (Sigma)

**17 $\beta$ -Estradiol** (Sigma)

**2,2-Bis(4-hydroxy-phenyl)propan, Bisphenol A** (Sigma)

**2,2-Bis(4-hydroxy-3-methyl-phenyl)propan, Dimethylbisphenol A** (Sigma)

**2,2-Bis(4-hydroxy-3,5-dimethyl-phenyl)propan, Tetramethylbisphenol A** (Sigma)

### 8.9.2 Durchführung

Die Zellen werden auf Objektträgern (OT) in Quatriperm-Schalen inkubiert. Je Objektträger werden 5 ml Medium mit etwa 50 000 bis 75 000 Zellen verwendet.

Die Zellen werden bei 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.

Vor dem Versuchsbeginn wachsen die Zellen für 24 h (V79) bis 48 h (AG01522C) an den Objektträgern an. Dann erfolgt die Zugabe der Testlösung. Die Endkonzentration von DMSO im Medium beträgt in der Regel 1 % (v/v). Nach meistens 1/2 Verdopplungszeit wird fixiert (s. Kap. 8.12 und Kap. 8.11) oder das Medium gewechselt. Nach gewünschter substanzfreier Nachinkubationszeit kann fixiert oder Cytochalasin B (Sigma, in DMSO gelöst, Endkonzentration im Medium: 6 µg/ml) zugegeben und weitere 10 h inkubiert werden (das genaue Inkubationsprotokoll kann Kap. 5.2.2 und Abb. 25 entnommen werden). Beim Mikroerntest mit potenziellen Klastogenen wird nach dem Mediumwechsel 12 h substanzfrei zwischeninkubiert und nach Cytochalasin B-Zugabe weitere 24 h inkubiert.

Zur Kontrolle werden die Zellen mit 1 % (v/v) DMSO inkubiert.

## 8.10 Zytotoxizitätstest durch Zellzahlbestimmung

### 8.10.1 Lösungen

**PBS-CMF** (Kap. 8.8.2)

**Trypsin-EDTA** (Kap. 8.8.2)

**Medium** (Kap. 8.8.2)

### 8.10.2 Durchführung

**Substanzinkubation** Die Zellen werden in Petrischalen (PS, 35 mm im Durchmesser) ausgestreut (V79: 50000/PS; AG01522C: 25000/PS) und solange anwachsen gelassen, bis sie exponentielles Wachstum erreicht haben (24 bis 48 h). Danach wird die Zellzahl bestimmt und die restlichen PS analog der Substanzbehandlung von Zellen auf Objektträgern (Kap. 8.9) inkubiert.

**Elektronische Zellzahlbestimmung** Das Medium wird abgegossen, der Zellrasen zweimal mit PBS-CMF gewaschen, 1 ml Trypsin-EDTA zugegeben und 5 min im Brutschrank bei 37 °C belassen. Die abgekugelten Zellen werden durch Klopfen von der PS gelöst und 1 ml Medium zugegeben. Die Zellsuspension wird quantitativ (2x mit je 0,5 ml Medium nachspülen) in ein Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen gut vereinzelt und ein Aliquot in ein 10 ml CASY-TON enthaltendes CASY<sup>®</sup> cup gegeben und sofort mittels CASY<sup>®</sup> die Zellzahl bestimmt.

## 8.11 Immunologische Färbung

### 8.11.1 Lösungen

**2x CB-Puffer** Der Puffer besteht aus NaCl (137 mM), KCl (5 mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1,1 mM), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,4 mM), MgCl<sub>2</sub> (2 mM), EDTA (2 mM), Pipes (5 mM), Glucose (5,5 mM). Der pH-Wert ist 6,1.

**Triton X-100-Lösung** Triton-X-100 (Sigma) wird als 10%ige (w/v) Lösung in Wasser eingesetzt.

**Formaldehyd-Fixans** Es werden 3,5 g Paraformaldehyd (Merck) in 50 ml Wasser suspendiert und mit 1 ml NaOH-Lösung (1 M) gemischt. Für 5 min auf 60 °C erhitzen. Davon



40 ml mit dem gleichen Volumen 2x CB-Puffer mischen und den pH-Wert auf 6,1 einstellen. Es werden 2 ml Triton X-100-Lösung zugemischt. Die Lösung ist im Kühlschrank etwa 4 h haltbar.

**10x PBS-CMF** Es werden 80 g NaCl (1,37 M), 2 g KCl (27 mM), 11,1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (wasserfrei) (78 mM) und 2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (15 mM) in 1 l Wasser gelöst.

**PBS-CMF** Ein Volumenteil 10x PBS-CMF wird in etwa 5 Volumenteilen Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wird auf 8,0 eingestellt. Es wird mit Wasser auf 10 Volumenteile aufgefüllt.

**Ziegenullserum** (GibcoBRL)

**BSA-Lösung** (1 % (m/v)) Rinderserumalbumin (Serva) wird in PBS-CMF gelöst

#### **Primäre Antikörper**

Centromer positive Control („CREST-Antikörper“) (DPC Biermann, Bad Nauheim)  
Monoclonaler Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper aus Maus-Ascitesflüssigkeit (Sigma)

**Primärantikörper-Lösung** Die Primärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (CREST: 1:15; Tubulin: 1:500).

#### **Sekundäre Antikörper**

Polyvalenter Anti-Human-Antikörper der Ziege (Sigma); FITC-konjugiert  
Anti-Maus-Antikörper der Ziege (Jackson Immuno Research); CY3-konjugiert

**Sekundärantikörper-Lösung** Die Sekundärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (Anti-Human: 1:200; Anti-Maus: 1:250).

**DAPI-Antifade-Lösung** (siehe Kap. 8.12)

### **8.11.2 Durchführung**

**Fixierung** Die Objektträger werden für 5 min in Formaldehyd-Fixans gestellt. Anschließend bis zur Verwendung (mindestens 30 min) in Methanol (−20 °C) gelagert.

**Färbung** Alle Inkubationsschritte erfolgen in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

Die Objektträger werden dreimal für 5 min in PBS-CMF gewaschen.

Es wird mit 200  $\mu$ l Ziegenserum (Deckglas) für 1 h inkubiert. Die Deckgläser werden entfernt und die Objektträger in PBS-CMF geschwenkt.

Mit 100  $\mu$ l Primärantikörper-Lösung (Deckglas) für 1 h inkubieren. Die Deckgläser werden entfernt und die Objektträger dreimal für 5 min in PBS-CMF gewaschen.

Die OT für 1,5 h mit je 100  $\mu$ l Sekundärantikörper-Lösung (Deckglas) behandeln. Die Objektträger dreimal für 5 min in PBS-CMF gewaschen.

Die Objektträger werden mit etwa 30  $\mu$ l DAPI-Antifade-Lösung eingedeckt.

Die Markierung ist im Dunkeln mehrere Wochen haltbar.

### 8.11.3 Auswertung

**Mitosearrest (V79)** Es werden mindesten 1000 Zellen je OT ausgewertet. Dabei wird die Anzahl der einzelnen Mitosestadien bestimmt (ohne immunologische Färbung des CMTCs und der mitotischen Spindel, da Fixieren der Zellen mit Carnoy's Fixans (Kap. 8.12) erfolgt). Die Anzahl der Prometa- und Metaphasen sowie der Ana- und Telophasen wird auf 1000 Zellen angegeben. In der graphischen Darstellung werden die Minimal- und Maximalwerte einer oder mehrerer Bestimmungen dargestellt.

**Mikrokerntest (V79)** Es werden mindestens 2000 Zellen ausgewertet. Die Anzahl der Zellen, der Mikrokerne (Kinetochor-positiv oder -negativ) und der Kernzerfälle wird bestimmt und der Mittelwert zwischen den ausgewerteten Objektträgern berechnet. In die graphischen Darstellung wird zu jedem Zahlenwert ein Fehlerbalken, der vom Minimal- zum Maximalwert reicht, eingezeichnet.

Alle weiteren Tests werden nach kombinierter immunologischer  $\alpha$ -Tubulin- und Kinetochor-markierung ausgewertet.

**Mitosearrest (AG01522C)** Es werden mindesten 500 Zellen je OT ausgewertet. Dabei wird die Anzahl der einzelnen Mitosestadien, das Aussehen der Metaphasen, die Anzahl der Mikrokerne (Kinetochor-positiv oder -negativ), der Kernzerfälle und der Apoptosen bestimmt. Zur Berechnung des Mitoseindex werden die Anzahl der Pro-, Prometa-, Meta-, Ana- und Telophasen addiert und als prozentualer Anteil an allen Zellen angegeben. Die Einteilung der Metaphasen in die verschiedenen Klassen erfolgt als prozentualer Anteil der Summe aller zu einer Klasse zählenden Metaphasen an allen Metaphasen.

**Mikrokerntest (AG01522C)** Es werden mindestens 1000 Zellen (oder so viele, wie auf dem OT auswertbar sind) ausgewertet. Die Anzahl der Zellen, der Mitosen, der Mikrokerne (Kinetochor-positiv oder -negativ), der Kernzerfälle und der apoptotischen Zellen wird bestimmt und die Ergebnisse der einzelnen unabhängigen Versuche sowie der Doppelbestimmung innerhalb eines Versuchs werden addiert und der prozentuale Anteil an allen Zellen berechnet.

**CB-Mikrokerntest** Unter dem Fluoreszenzmikroskop wird die Anzahl der einkernigen- und zweikernigen Zellen, der Mitosen, der Mikrokerne (in ein- bzw. zweikernigen Zellen (BN); Kinetochor-positiv oder -negativ), der Kernzerfälle, der apoptotischen Zellen und gegebenenfalls andere auffällige Merkmale (z. B. Kernform) bestimmt. Dabei werden die Kriterien von Fenech (2000a) berücksichtigt. Es werden nach Möglichkeit 500 BN ausgewertet. Die Anzahl der Mikrokerne in BN aus den einzelnen Versuchen wird addiert (Mikrokerne pro BN), durch 2 geteilt (Mikrokerne pro Zellkerne) und der prozentuale Anteil an allen Zellkernen aus BN berechnet.

**Klassische Auswertung des CB-Mikrokerntests** Alle Zellkerne werden unabhängig, ob sie ein- oder zweikernigen Zellen entstammen, ausgewertet. Jeweils die Summe der Kinetochor-positiven oder Kinetochor-negativen Mikrokerne aus ein- und zweikernigen Zellen wird als prozentualer Anteil der Summe aller ausgewerteten Zellkerne berechnet und das Ergebnis in Prozent der Zellkerne angegeben.

Wenn die Rohdaten summiert werden, kann keine Standardabweichung oder Range für die Ergebnisse ermittelt werden.

#### 8.11.4 Dokumentation

Für jede Aufnahme wird von jedem Fluoreszenzfilter mit einer digitalen Kamera ein Graustufenbild aufgenommen. Diesen Bildern werden mit Hilfe der Software MetaView Farbkanäle zugewiesen, diese übereinandergelegt und als einzige Tiff-Datei gespeichert. Die Zuordnung der Farben erfolgt dabei entsprechend der Fluoreszenzfarbe, die im Mikroskop beobachtet wird. Diese Datei kann zur weiteren Bildbearbeitung beispielsweise mit Photoshop® (Adobe) wieder in ihre ursprünglichen Kanäle zerlegt und die Kanäle getrennt bearbeitet werden. Alle in dieser Arbeit dargestellten digitalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden allenfalls hinsichtlich Schärfe sowie Helligkeit und Kontrast bearbeitet.

## 8.12 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

### 8.12.1 Lösungen

**Carnoy's Fixans** 3 Volumenteile Methanol werden mit 1 Volumenteil Eisessig gemischt. Bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  lagern.

**Formaldehyd-Lösung** Es werden 2 g Paraformaldehyd (Merck) in 50 ml Wasser suspendiert, mit 1 ml NaOH-Lösung (1 M) versetzt und für 10 min auf  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  erwärmt. Die Lösung vor Gebrauch frisch herstellen.

**TRIS/HCl-NaCl** (10 mM TRIS, 15 mM NaCl, pH 7,5)

**RNase A-Lösung** 10 mg RNase A (aus Rinderpankreas, 85 U/mg, Serva) werden in 0,99 ml TRIS/HCl-NaCl gelöst. Die Lösung wird für 15 min im kochenden Wasserbad erhitzt (DNase zerstören). In Portionen zu 10  $\mu\text{l}$  einfrieren. Vor Gebrauch mit 1 ml 2x SSC verdünnen.

**Pepsin-Lösung** Pepsin (aus Schweinemagen, 3000 U/mg, Fluka) in HCl (0,01 M) lösen (5–10 mg/ml), die Lösung 1:10 (v/v) verdünnen und in Portionen zu 10  $\mu\text{l}$  einfrieren. Vor Gebrauch mit 0,99 ml HCl (0,01 M) verdünnen.

**Proteinase K-Lösung** Proteinase K (aus *Triticium album*, 30 U/mg) in Proteinase K-Reaktions-Puffer lösen (3 mg/ml), 1:10 (v/v) verdünnen und portioniert zu 10  $\mu\text{l}$  einfrieren. Vor Verwendung mit 0,99 ml Proteinase K-Reaktions-Puffer verdünnen.

**TRIS/HCl-Puffer** (20 mM, pH 8,0) Es werden 4,8 g TRIS-Base in etwa 1,8 l Wasser gelöst. Der pH-Wert wird mit HCl-Lösung (1 M) auf pH 8,0 eingestellt. Das Volumen wird mit Wasser auf 2 l aufgefüllt.

**Proteinase K-Reaktionspuffer** (2 mM  $\text{CaCl}_2$ ) In 2 l TRIS/HCl-Puffer werden 0,56 g Calciumchlorid  $\cdot 2\text{ H}_2\text{O}$  gelöst. In Portionen à 50 ml bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  einfrieren.

**Proteinase K-Stop-Puffer** (2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{MgCl}_2$ ) In 1 l Proteinase K-Reaktionspuffer werden 10,17 g  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{ H}_2\text{O}$  gelöst. In Portionen à 50 ml bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  einfrieren.

**20x SSC-Lösung** (3 M NaCl, 0,3 M  $\text{Na}_3\text{-Citrat}$ ) 87,65 g NaCl und 44,1 g  $\text{Na}_3\text{-Citrat} \cdot 2\text{ H}_2\text{O}$  werden in etwa 0,4 l Wasser gelöst. Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt. Das Volumen der Lösung wird auf 0,5 l ergänzt. In Portionen à 50 ml bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  einfrieren.

**2x SSC-Lösung** Ein Volumenteil 20x SSC-Lösung wird mit neun Volumenteilen Wasser gemischt (1:10-Verdünnung).

**Natriumphosphat-Puffer** (0,5 M, pH 8,0) 1,9 l einer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Lösung (0,5 M) werden mit  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ -Lösung (0,5 M) auf pH 8,0 eingestellt.

**Ethanol** (96%, DAB 10) mit Petrolether denaturiert (Brüggemann)

**PN-Puffer** 200 ml Natriumphosphat-Puffer (0,5 M, pH 8,0) werden mit 5,0 g Nonidet P-40 (Sigma) und 800 ml Wasser gemischt (pH 8,0). In Portionen à 50 ml bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  einfrieren.

**Master Mix 1** (Konzentration im Hybridisierungsmix: 47 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 2x SSC) Es werden 5,5 ml Formamid (entionisiert), 1 g Dextransulfat und 1 ml 20x SSC gemischt, auf  $70\text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt und gelöst (Ultraschallbad). Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt, und das Volumen mit Wasser auf 7,0 ml ergänzt. Bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahren.

**Master Mix 2** (Endkonzentration im Hybridisierungsmix: 55 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 2x SSC) Es werden 5,5 ml Formamid (entionisiert), 1 g Dextransulfat, 0,175 g NaCl und 0,0822 g tri-Natriumcitrat gemischt, auf  $70\text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt und gelöst (Ultraschallbad). Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt, und das Volumen mit Wasser auf 6,0 ml ergänzt. Bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahren.

**Fischsperma-DNA** (10 mg/ml) Die DNA wird in TRIS/HCl (10 mM, pH 7,5) gelöst. Bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahren.

**Formamid-Lösung** (70 %, 2x SSC, pH 7,0) 70 ml Formamid (entionisiert) werden mit 10 ml 20x SSC gemischt. Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt. Es wird auf 100 ml aufgefüllt. Bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahren. Die Lösung kann mehrfach verwendet werden.

**Formamid-Lösung** (60 %, 2x SSC, pH 7,0) 90 ml Formamid (entionisiert) werden mit 15 ml 20x SSC gemischt. Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt. Es wird auf 150 ml aufgefüllt. Bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahren. Die Lösung kann mehrfach verwendet werden.

**PBS-CMF** 10x PBS-CMF (Kap. 8.11) mit bidest. Wasser 1:10 (v/v) verdünnen, den pH-Wert auf 7,4 einstellen. Die Lösung autoklavieren.

**PBS-Lösung** 100 mg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{ H}_2\text{O}$  (650  $\mu\text{M}$ ) und 132 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{ H}_2\text{O}$  (680  $\mu\text{M}$ ) in 1 l PBS-CMF lösen.

**Antifade-Lösung** 100 mg p-Phenylendiamin-dihydrochlorid (Sigma) in 10 ml PBS-Lösung lösen und mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösung (0,5 M, pH 9,0 mit NaOH) auf pH 8,0 einstellen. Mit Glycerin auf 100 ml auffüllen. Sterilfiltrieren und bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  lichtgeschützt aufbewahren.

**DAPI-Antifade-Lösung** In 10 ml Antifade-Lösung werden 10  $\mu\text{l}$  DAPI-Lösung (1 mg/ml in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gelöst (Konz.: 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). In Portionen à ca. 0,7 ml lichtgeschützt bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahren.

**DAPI-Antifade-Verdünnung** DAPI-Antifade-Lösung wird mit Antifade-Lösung 1:50 (v/v) verdünnt (Konz.: 0,02 µg/ml). Die Lösung wird lichtgeschützt bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 8.12.2 Durchführung

**Fixierung** Zum Medium werden 1 ml Carnoys Fixans gegeben. Nach 5 min wird der Objektträger in einen Coplin-Becher mit Carnoys Fixans ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) umgesetzt. Die Objektträger werden mind. 5 h bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  fixiert. Dann können sie luftgetrocknet werden.

#### Vorbereitung

Alle Inkubationsschritte erfolgen bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  in einer feuchten Kammer.

**RNase A-Behandlung** Die Objektträger (OT) werden mit je 200 µl RNase-Lösung (etwa 100 µg/ml in 2x SSC) behandelt und mit Deckgläsern 1 h inkubiert. Die OT in 2x SSC schwenken und dann dreimal für je 5 min in 2x SSC waschen.

**Pepsin-Behandlung** Die OT werden für 2 min in 0,01 M HCl-Lösung eingestellt. Sie werden mit je 200 µl Pepsin-Lösung (5 – 10 µg/ml in 0,01 M HCl) behandelt. Nachdem die OT 20 min mit Deckglas inkubiert wurden, werden sie in Wasser geschwenkt, 2 min in Wasser und dann zweimal für je 5 min in 2x SSC gewaschen.

**Proteinase K-Behandlung** Die OT werden zweimal für je 5 min in Proteinase K-Reaktionspuffer eingestellt. Dann werden sie mit je 200 µl Proteinase K-Lösung (0,5 – 1 µg/ml in Reaktionspuffer) eingedeckt und für 20 – 30 min inkubiert. Die OT in 2x SSC schwenken und dann dreimal für je 5 min in Proteinase K-Stop-Puffer waschen.

**Fixierung** Die OT für 10 min in Formaldehyd-Lösung einstellen, anschließend in 2x SSC schwenken und dreimal für je 5 min in 2x SSC einstellen. Nach dem Entwässern in einer Ethanol-Lösungen (70 %, 90 %, 100 % (v/v), je 3 min) werden die OT luftgetrocknet.

**Altern** Die OT für 15 min auf der Heizplatte bei  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  backen.

### **Hybridisierung**

**Hybridisierungsmix** Es werden je OT 16  $\mu$ l Mastermix, je 4  $\mu$ l Sonde (c-sat und  $\alpha$ -sat) und 2,6  $\mu$ l Fischesperma-DNA gemischt.

**Denaturierung der Ziel-DNA** OT für 3 min in Formamid-Lösung (70 %) bei 70 °C denaturieren und anschließend nacheinander für je 2 min in eiskalte Ethanol-Lösungen (70 %, 90 %, 100 % (v/v)) einstellen. Nachdem die OT an der Luft getrocknet sind, werden sie für 5 min auf 39 – 40 °C auf einer Heizplatte erwärmt.

**Denaturierung des Hybridisierungsmix** Der Hybridisierungsmix wird 5 min auf 70 °C erwärmt und dann für 5 min auf Eis gekühlt.

**Hybridisierung** Pro OT werden 25  $\mu$ l Hybridisierungsmix aufgegeben und mit einem Deckglas bedeckt. Der Objektträger wird mit Fixogum (Marabu) versiegelt und über Nacht bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert.

**Waschen** Die Deckgläser werden vorsichtig entfernt (evtl. in 2x SSC schwenken) und die OT dreimal für je 5 min in Formamid-Lösung (60%) bei 44 °C gewaschen. Die OT dreimal für je 2 min in 2x SSC bei 44 °C waschen, anschließend zweimal für je 5 min in PN-Puffer bei Raumtemperatur waschen.

Die OT mit etwa 30  $\mu$ l DAPI-Antifade-Verdünnung eindecken.

#### **8.12.3 Auswertung**

Unter dem Fluoreszenzmikroskop werden je Konzentration soviel zweikernige Zellen wie möglich ausgewertet (der ganze OT oder mindestens 500 zweikernige Zellen (BN)). Es wird die Anzahl der hybridisierten Sonden je Kern gezählt. Dabei werden nur BN ausgewertet, in deren beiden Kernen zusammen 4 (oder 8) Doppelsignale zweifelsfrei zugeordnet werden können.

Die Ergebnisse der einzelnen Versuche werden summiert und der prozentuale Anteil an allen BN berechnet. Da die Rohdaten summiert werden, kann keine Standardabweichung für die Ergebnisse berechnet werden.

#### **8.12.4 Dokumentation**

Die Dokumentation erfolgt analog Kap. 8.11.4.

## 9 Literatur

- Aardema, M. J., Albertini, S., Arni, P., Henderson, L. M., Kirsch-Volders, M., Mackay, J. M., Sarrif, A. M., Stringer, D. A. und Taalman, R. D., 1998. Aneuploidy: a report of an ECETOC task force. *Mutat Res*, 410(1), 3–79.
- Abe, T., 1999. Infantile leukemia and soybeans—a hypothesis. *Leukemia*, 13(3), 317–320.
- Abruzzo, M. A. und Hassold, T. J., 1995. Etiology of nondisjunction in humans. *Environ Mol Mutagen*, 25(Suppl 26), 38–47.
- Adams, I. R. und Kilmartin, J. V., 2000. Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication? *Trends Cell Biol*, 10(8), 329–335.
- Anderson, D., Dobrzynska, M. M. und Basaran, N., 1997. Effect of various genotoxins and reproductive toxins in human lymphocytes and sperm in the Comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen*, 17(1), 29–43.
- Andreassen, P. R. und Margolis, R. L., 1994. Microtubule dependency of p34cdc2 inactivation and mitotic exit in mammalian cells. *J Cell Biol*, 127(3), 789–802.
- Atlas, S. J. und Lin, S., 1978. Dihydrocytochalasin B. Biological effects and binding to 3T3 cells. *J Cell Biol*, 76(2), 360–370.
- Aubin, J. E., Osborn, M. und Weber, K., 1981. Inhibition of cytokinesis and altered contractile ring morphology induced by cytochalasins in synchronized PtK2 cells. *Exp Cell Res*, 136(1), 63–79.
- Banerjee, S. K., Banerjee, S., Li, S. A. und Li, J. J., 1994. Induction of chromosome aberrations in Syrian hamster renal cortical cells by various estrogens. *Mutat Res*, 311(2), 191–197.
- Barnes, S., 1995. Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer. *J Nutr*, 125(3 Suppl), 777S–783S.
- Barnes, S. und Peterson, T. G., 1995. Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1), 103–108.
- Bergan, R. C., Waggle, D. H., Carter, S. K., Horak, I., Slichenmyer, W. und Meyers, M., 2001. Tyrosine kinase inhibitors and signal transduction modulators: Rationale and current status as chemopreventive agents for prostate cancer. *Urology*, 57(4 Suppl 1), 77–80.
- Bialy, H., 2001. Aneuploidy and cancer—the vintage wine revisited. *Nat Biotechnol*, 19(1), 22–23.
- Bourgeois, C. A., 1974. Distribution of mitomycin C-induced damage in human chromosomes with special reference to regions of repetitive DNA. *Chromosoma*, 48(2), 203–211.
- Brinkley, B. R., 2001. Managing the centrosome numbers game: from chaos to stability in cancer cell division. *Trends Cell Biol*, 11(1), 18–21.
- Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V. und Olea, N., 1995. Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans. *Environ Health Perspect*, 103(6), 608–612.
- Burke, D. J., 2000. Complexity in the spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev*, 10(1), 26–31.
- Cagen, S. Z., Waechter, J. M., J., Dimond, S. S., Breslin, W. J., Butala, J. H., Jekat, F. W., Joiner, R. L., Shiotsuka, R. N., Veenstra, G. E. und Harris, L. R., 1999. Normal reproductive organ development in CF-1 mice following prenatal exposure to bisphenol A. *Toxicol Sci*, 50(1), 36–44.



- Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers [see comments]. *Nature*, 392(6673), 300–303.
- Canman, J. C., Hoffman, D. B. und Salmon, E. D., 2000. The role of pre- and post-anaphase microtubules in the cytokinesis phase of the cell cycle. *Curr Biol*, 10(10), 611–614.
- Cannon, J. M., Kostoryz, E., Russo, K. A., Smith, R. E. und Yourtee, D. M., 2000. Bisphenol A and its biomaterial monomer derivatives alteration of in vitro cytochrome P450 metabolism in rat, minipig, and human. *Biomacromolecules*, 1(4), 656–664.
- Carere, A., Antocchia, A., Cimini, D., Crebelli, R., Degrassi, F., Leopardi, P., Marcon, F., Sgura, A., Tanzarella, C. und Zijno, A., 1999. Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes of 24 male subjects. *Mutagenesis*, 14(5), 491–496.
- Cassidy, A., Bingham, S. und Setchell, K., 1995. Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *Br J Nutr*, 74(4), 587–601.
- Cassidy, A., Bingham, S. und Setchell, K. D., 1994. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr*, 60(3), 333–340.
- Cassimeris, L., 1999. Accessory protein regulation of microtubule dynamics throughout the cell cycle. *Curr Opin Cell Biol*, 11(1), 134–141.
- Choo, K. H., 2000. Centromerization. *Trends Cell Biol*, 10(5), 182–188.
- Cimini, D., Antocchia, A., Tanzarella, C. und Degrassi, F., 1997. Topoisomerase II inhibition in mitosis produces numerical and structural chromosomal aberrations in human fibroblasts. *Cytogenet Cell Genet*, 76(1-2), 61–67.
- Cimini, D., Fioravanti, D., Tanzarella, C. und Degrassi, F., 1998. Simultaneous inhibition of contractile ring and central spindle formation in mammalian cells treated with cytochalasin B. *Chromosoma*, 107(6-7), 479–485.
- Cimini, D., Howell, B., Maddox, P., Khodjakov, A., Degrassi, F. und Salmon, E. D., 2001. Merotelic kinetochore orientation is a major mechanism of aneuploidy in mitotic mammalian tissue cells. *J Cell Biol*, 153(3), 517–527.
- Cimini, D., Tanzarella, C. und Degrassi, F., 1999. Differences in malsegregation rates obtained by scoring ana-telophases or binucleate cells. *Mutagenesis*, 14(6), 563–568.
- Constantinou, A., Mehta, R., Runyan, C., Rao, K., Vaughan, A. und Moon, R., 1995. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure- activity relationships. *J Nat Prod*, 58(2), 217–225.
- Countryman, P. I. und Heddle, J. A., 1976. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutation Research*, 41, 312–332.
- Cremer, T., Jauch, A., Ried, T., Schröck, E., Lengauer, C., Cremer, M. und Speicher, M. R., 1995. Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). *Deutsches Ärzteblatt*, 92(22), B-1177–B-1185.
- Crofton-Sleigh, C., Doherty, A., Ellard, S., Parry, E. M. und Venitt, S., 1993. Micronucleus assays using cytochalasin-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydrolase. *Mutagenesis*, 8(4), 363–372.

- Cross, S. M., Sanchez, C. A., Morgan, C. A., Schimke, M. K., Ramel, S., Idzerda, R. L., Raskind, W. H. und Reid, B. J., 1995. A p53-dependent mouse spindle checkpoint. *Science*, 267(5202), 1353–1356.
- Dellarco, V. L., Mavournin, K. H. und Tice, R. R., 1985. Aneuploidy and health risk assessment: current status and future directions. *Environ Mutagen*, 7(3), 405–424.
- Doherty, A. T., Ellard, S., Parry, E. M. und Parry, J. M., 1996. A study of the aneugenic activity of trichlorfon detected by centromere-specific probes in human lymphoblastoid cell lines. *Mutat Res*, 372(2), 221–231.
- Dopp, E., Saedler, J., Stopper, H., Weiss, D. G. und Schiffmann, D., 1995. Mitotic disturbances and micronucleus induction in Syrian hamster embryo fibroblast cells caused by asbestos fibers. *Environ Health Perspect*, 103(3), 268–271.
- Dopp, E. und Schiffmann, D., 1998. Analysis of chromosomal alterations induced by asbestos and ceramic fibers. *Toxicol Lett*, 96-97, 155–162.
- Dopp, E., Schuler, M., Schiffmann, D. und Eastmond, D. A., 1997. Induction of micronuclei, hyperdiploidy and chromosomal breakage affecting the centric/pericentric regions of chromosomes 1 and 9 in human amniotic fluid cells after treatment with asbestos and ceramic fibers. *Mutat Res*, 377(1), 77–87.
- Downes, C. S., Mullinger, A. M. und Johnson, R. T., 1991. Inhibitors of DNA topoisomerase II prevent chromatid separation in mammalian cells but do not prevent exit from mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(20), 8895–8899.
- Duesberg, P., 1999. Are centrosomes or aneuploidy the key to cancer? *Science*, 284(5423), 2091–2092.
- Duesberg, P., Li, R., Rasnick, D., Rausch, C., Willer, A., Kraemer, A., Yerganian, G. und Hehlmann, R., 2000a. Aneuploidy precedes and segregates with chemical carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet*, 119(2), 83–93.
- Duesberg, P. und Rasnick, D., 2000. Aneuploidy, the somatic mutation that makes cancer a species of its own. *Cell Motil Cytoskeleton*, 47(2), 81–107.
- Duesberg, P., Stindl, R. und Hehlmann, R., 2000b. Explaining the high mutation rates of cancer cells to drug and multidrug resistance by chromosome reassortments that are catalyzed by aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(26), 14 295–14 300.
- Eastmond, D. A. und Pinkel, D., 1990. Detection of aneuploidy and aneuploidy-inducing agents in human lymphocytes using fluorescence in situ hybridization with chromosome-specific DNA probes. *Mutat Res*, 234(5), 303–318.
- Eastmond, D. A., Schuler, M. und Rupa, D. S., 1995. Advantages and limitations of using fluorescence in situ hybridization for the detection of aneuploidy in interphase human cells. *Mutat Res*, 348(4), 153–162.
- Eastmond, D. A. und Tucker, J. D., 1989. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ Mol Mutagen*, 13(1), 34–43.
- ECETOC, 1997. Aneuploidy. ECETOC, Brüssel.
- ECETOC, 2000. Proceedings of the ECETOC - EEMS Symposium on Dose-Response and Threshold-Mediated Mechanisms in Mutagenesis. Salzburg, Austria, 7 September 1998. *Mutat Res*, 464(1), 1–158.

- Eckley, D. M., Ainsztein, A. M., Mackay, A. M., Goldberg, I. G. und Earnshaw, W. C., 1997. Chromosomal proteins and cytokinesis: patterns of cleavage furrow formation and inner centromere protein positioning in mitotic heterokaryons and mid-anaphase cells. *J Cell Biol*, 136(6), 1169–1183.
- Elhajouji, A., Tibaldi, F. und Kirsch-Volders, M., 1997. Indication for thresholds of chromosome non-disjunction versus chromosome lagging induced by spindle inhibitors in vitro in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 12(3), 133–140.
- Elhajouji, A., Van Hummelen, P. und Kirsch-Volders, M., 1995. Indications for a threshold of chemically-induced aneuploidy in vitro in human lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 26(4), 292–304.
- Elsby, R., Maggs, J. L., Ashby, J. und Park, B. K., 2001. Comparison of the modulatory effects of human and rat liver microsomal metabolism on the estrogenicity of bisphenol A: implications for extrapolation to humans. *J Pharmacol Exp Ther*, 297(1), 103–113.
- Fenech, M., 1997. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. *Mutat Res*, 392(1-2), 11–18.
- Fenech, M., 2000a. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res*, 455(1-2), 81–95.
- Fenech, M., 2000b. A mathematical model of the in vitro micronucleus assay predicts false negative results if micronuclei are not specifically scored in binucleated cells or in cells that have completed one nuclear division. *Mutagenesis*, 15(4), 329–336.
- Fenech, M. und Morley, A. A., 1985. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutation Research*, 147(1-2), 29–36.
- Fenech, M., Perepetskaya, G. und Mikhalevich, L., 1997. A more comprehensive application of the micronucleus technique for biomonitoring of genetic damage rates in human populations—experiences from the Chernobyl catastrophe. *Environ Mol Mutagen*, 30(2), 112–118.
- Fung, E. Y., Ewoldsen, N. O., St Germain, H. A., J., Marx, D. B., Miaw, C. L., Siew, C., Chou, H. N., Gruninger, S. E. und Meyer, D. M., 2000. Pharmacokinetics of bisphenol A released from a dental sealant. *J Am Dent Assoc*, 131(1), 51–58.
- Gardner, R. D. und Burke, D. J., 2000. The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends Cell Biol*, 10(4), 154–158.
- Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hg.), 1996. Bisphenol A. (2,2-Bis-(4-hydroxyphenyl)propan) BUA-Stoffbericht 203. S. Hirzel Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hg.), 2000. Genistein Modellstoff zur Beschreibung endokriner Wirkungen von Phytoöstrogenen BUA-Stoffbericht 222. S. Hirzel Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Glatt, H., Gemperlein, I., Turchi, G., Heinritz, H., Doehmer, J. und Oesch, F., 1987. Search for cell culture systems with diverse xenobiotic-metabolizing activities and their use in toxicological studies. *Mol Toxicol*, 1(4), 313–334.
- Gupta, C., 2000. Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med*, 224(2), 61–68.
- Gustafsson, J. A., 1998. Therapeutic potential of selective estrogen receptor modulators. *Curr Opin Chem Biol*, 2(4), 508–511.

- Hahn, W. C., Counter, C. M., Lundberg, A. S., Beijersbergen, R. L., Brooks, M. W. und Weinberg, R. A., 1999. Creation of human tumour cells with defined genetic elements [see comments]. *Nature*, 400(6743), 464–468.
- Hales, K. G., Bi, E., Wu, J. Q., Adam, J. C., Yu, I. C. und Pringle, J. R., 1999. Cytokinesis: an emerging unified theory for eukaryotes? [see comments]. *Curr Opin Cell Biol*, 11(6), 717–725.
- Hanioka, N., Jinno, H., Tanaka-Kagawa, T., Nishimura, T. und Ando, M., 2000. Interaction of bisphenol A with rat hepatic cytochrome P450 enzymes [In Process Citation]. *Chemosphere*, 41(7), 973–978.
- Hasegawa, L. S., Rupa, D. S. und Eastmond, D. A., 1995. A method for the rapid generation of alpha- and classical satellite probes for human chromosome 9 by polymerase chain reaction using genomic DNA and their application to detect chromosomal alterations in interphase cells. *Mutagenesis*, 10(6), 471–476.
- Hermine, T., Jones, N. J. und Parry, J. M., 1997. Comparative induction of micronuclei in repair-deficient and -proficient Chinese hamster cell lines following clastogen or aneugen exposures. *Mutat Res*, 392(1-2), 151–163.
- Hodgson, A. V., Ayala-Torres, S., Thompson, E. B. und Liehr, J. G., 1998. Estrogen-induced microsatellite DNA alterations are associated with Syrian hamster kidney tumorigenesis. *Carcinogenesis*, 19(12), 2169–2172.
- Howdeshell, K. L., Hotchkiss, A. K., Thayer, K. A., Vandenberg, J. G. und vom Saal, F. S., 1999. Exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature*, 401(6755), 763–764.
- von der Hude, W., Kalweit, S., Engelhardt, G., McKiernan, S., Kasper, P., Slacik-Erben, R., Miltenburger, H. G., Honarvar, N., Fahrig, R., Gorlitz, B., Albertini, S., Kirchner, S., Utesch, D., Potter-Locher, F., Stopper, H. und Madle, S., 2000. In vitro micronucleus assay with Chinese hamster V79 cells - results of a collaborative study with in situ exposure to 26 chemical substances. *Mutat Res*, 468(2), 137–163.
- Humpage, A. R., Fenech, M., Thomas, P. und Falconer, I. R., 2000. Micronucleus induction and chromosome loss in transformed human white cells indicate clastogenic and aneugenic action of the cyanobacterial toxin, cylindrospermopsin. *Mutat Res*, 472(1-2), 155–161.
- Jeong, H. G., Kimand, J. Y. und Choi, C. Y., 2000. Down-regulation of murine Cyp1a-1 in mouse hepatoma Hepa-1c1c7 cells by bisphenol A. *Biochem Biophys Res Commun*, 277(3), 594–598.
- Joshi, H. C., 1998. Microtubule dynamics in living cells. *Curr Opin Cell Biol*, 10(1), 35–44.
- Kallio, M. und 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. und Madle, S., 1999. Chemically induced micronucleus formation in V79 cells—comparison of three different test approaches. *Mutat Res*, 439(2), 183–190.
- Kanai, H., Barrett, J. C., Metzler, M. und Tsutsui, T., 2001. Cell-transforming activity and estrogenicity of bisphenol-A and 4 of its analogs in mammalian cells. *Int J Cancer*, 93(1), 20–25.
- Keating, T. J., Peloquin, J. G., Rodionov, V. I., Momcilovic, D. und Borisy, G. G., 1997. Microtubule release from the centrosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(10), 5078–5083.

- Keung, W. M., 1993. Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Radix puerariae*. *Alcohol Clin Exp Res*, 17(6), 1254–1260.
- Keung, W. M. und Vallee, B. L., 1993. Daidzin: a potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(4), 1247–1251.
- Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Cundari, E. und Van Hummelen, P., 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. *Mutat Res*, 392(1-2), 19–30.
- Kirsch-Volders, M., Sofuni, T., Aardema, M., Albertini, S., Eastmond, D., Fenech, M., Ishidate, M., Lorge, E., Norppa, H., Surralles, J., von der Hude, W. und Wakata, A., 2000. Report from the In Vitro Micronucleus Assay Working Group. *Environ Mol Mutagen*, 35(3), 167–172.
- Kirsch-Volders, M., Tallon, I., Tanzarella, C., Sgura, A., Hermine, T., Parry, E. M. und Parry, J. M., 1996. Mitotic non-disjunction as a mechanism for in vitro aneuploidy induction by X-rays in primary human cells. *Mutagenesis*, 11(4), 307–313.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permeth, S. F., Tokes, L. und Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, 132(6), 2279–2286.
- Kristensen, V. N. und Borresen-Dale, A. L., 2000. Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism. *Mutat Res*, 462(2-3), 323–333.
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. und Gustafsson, J. A., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*, 139(10), 4252–4263.
- Kulling, S. E. und Metzler, M., 1997. Induction of micronuclei, DNA strand breaks and HPRT mutations in cultured Chinese hamster V79 cells by the phytoestrogen coumestrol. *Food Chem Toxicol*, 35(6), 605–613.
- Kulling, S. E., Rosenberg, B., Jacobs, E. und Metzler, M., 1999. The phytoestrogens coumestrol and genistein induce structural chromosomal aberrations in cultured human peripheral blood lymphocytes. *Arch Toxicol*, 73(1), 50–54.
- Kung, A. L., Sherwood, S. W. und Schimke, R. T., 1990. Cell line-specific differences in the control of cell cycle progression in the absence of mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(24), 9553–9557.
- Kwon, S., Stedman, D. B., Elswick, B. A., Cattley, R. C. und Welsch, F., 2000. Pubertal development and reproductive functions of Crl:CD BR Sprague-Dawley rats exposed to bisphenol A during prenatal and postnatal development. *Toxicol Sci*, 55(2), 399–406.
- Lanni, J. S. und Jacks, T., 1998. Characterization of the p53-dependent postmitotic checkpoint following spindle disruption. *Mol Cell Biol*, 18(2), 1055–1064.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643–649.
- Li, R., Sonik, A., Stindl, R., Rasnick, D. und Duesberg, P., 2000. Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(7), 3236–3241.
- Li, R., Yerganian, G., Duesberg, P., Kraemer, A., Willer, A., Rausch, C. und Hehlmann, R., 1997. Aneuploidy correlated 100hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(26), 14506–14511.

- Liehr, J. G., 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocr Rev*, 21(1), 40–54.
- Lingle, W. L., Lutz, W. H., Ingle, J. N., Maihle, N. J. und Salisbury, J. L., 1998. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(6), 2950–2955.
- Marcon, F., Zijno, A., Crebelli, R., Carere, A., Veidebaum, T., Peltonen, K., Parks, R., Schuler, M. und Eastmond, D., 1999. Chromosome damage and aneuploidy detected by interphase multicolour FISH in benzene-exposed shale oil workers. *Mutat Res*, 445(2), 155–166.
- Markey, C., Michaelson, C., Sonnenschein, C. und Soto, A. M., 2001a. Alkylphenols and Bisphenol A as Environmental Estrogens. In Metzler, M. (Hg.), *Endocrine Disruptors*, Band 3 von *The Handbook of Environmental Chemistry*, 129–153. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Markey, C. M., Michaelson, C. L., Veson, E. C., Sonnenschein, C. und Soto, A. M., 2001b. The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ Health Perspect*, 109(1), 55–60.
- Marshall, R. R., Murphy, M., Kirkland, D. J. und Bentley, K. S., 1996. Fluorescence in situ hybridisation with chromosome-specific centromeric probes: a sensitive method to detect aneuploidy. *Mutat Res*, 372(2), 233–245.
- Martin, R. H., 1998. Genetics of human sperm. *J Assist Reprod Genet*, 15(5), 240–245.
- Martineau, S. N., Andreassen, P. R. und Margolis, R. L., 1995. Delay of HeLa cell cleavage into interphase using dihydrocytochalasin B: retention of a postmitotic spindle and telophase disc correlates with synchronous cleavage recovery. *J Cell Biol*, 131(1), 191–205.
- Matsuno, A., Takekoshi, S., Sanno, N., Utsunomiya, H., Ohsugi, Y., Saito, N., Kanemitsu, H., Tamura, A., Nagashima, T., Osamura, R. Y. und Watanabe, K., 1997. Modulation of protein kinases and microtubule-associated proteins and changes in ultrastructure in female rat pituitary cells: effects of estrogen and bromocriptine. *J Histochem Cytochem*, 45(6), 805–813.
- Mazur, W., 1998. Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12(4), 729–742.
- Messina, M., Barnes, S. und Setchell, K. D., 1997. Phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet*, 350(9083), 971–972.
- Messina, M. und Bennink, M., 1998. Soyfoods, isoflavones and risk of colonic cancer: a review of the in vitro and in vivo data. *Baillieres Clin Endocrinol Metab*, 12(4), 707–728.
- Miller, B., Potter-Locher, F., Seelbach, A., Stopper, H., Utesch, D. und Madle, S., 1998. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM Working Group on the in vitro micronucleus test. *Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung. Mutat Res*, 410(1), 81–116.
- Miller, B. M. und Nüsse, M., 1993. Analysis of micronuclei induced by 2-chlorobenzylidene malonitrile (CS) using fluorescence in situ hybridization with telomeric and centromeric DNA probes, and flow cytometry. *Mutagenesis*, 8(1), 35–41.
- Miller, B. M., Werner, T., Weier, H. U. und Nüsse, M., 1992. Analysis of radiation-induced micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) simultaneously using telomeric and centromeric DNA probes. *Radiat Res*, 131(2), 177–185.

- Minissi, S., Gustavino, B., Degrassi, F., Tanzarella, C. und Rizzoni, M., 1999. Effect of cytochalasin B on the induction of chromosome missegregation by colchicine at low concentrations in human lymphocytes. *Mutagenesis*, 14(1), 43–49.
- Mitchell, I. D., Lambert, T. R., Burden, M., Sunderland, J., Porter, R. L. und Carlton, J. B., 1995. Is polyploidy an important genotoxic lesion? *Mutagenesis*, 10(2), 79–83.
- Müllenbach, R., Lagoda, P. J. L. und Welter, C., 1989. An efficient salt-chloroform extraction of DNA from blood and tissues. *Trends Genet.*, 5, 391.
- Mueller, S. und Korach, K. S., 2001. Mechanisms of Estrogen Receptor-Mediated Agonistic and Antagonistic Effects. In Metzler, M. (Hg.), *Endocrine Disruptors*, Band 3 von *The Handbook of Environmental Chemistry*, 3–25. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Muller, L. und Kasper, P., 2000. Human biological relevance and the use of threshold-arguments in regulatory genotoxicity assessment: experience with pharmaceuticals. *Mutat Res*, 464(1), 19–34.
- Nagel, S. C., vom Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boechler, M. und Welshons, W. V., 1997. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol [see comments]. *Environ Health Perspect*, 105(1), 70–76.
- Nagel, S. C., vom Saal, F. S. und Welshons, W. V., 1998. The effective free fraction of estradiol and xenoestrogens in human serum measured by whole cell uptake assays: physiology of delivery modifies estrogenic activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, 217(3), 300–309.
- Nagel, S. C., vom Saal, F. S. und Welshons, W. V., 1999. Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an in vitro assay incorporating modification of cell uptake by serum. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 69(1-6), 343–357.
- Nandi, S., Guzman, R. C. und Yang, J., 1995. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(9), 3650–3657.
- Nasmyth, K., 1999. Separating sister chromatids. *Trends Biochem Sci*, 24(3), 98–104.
- Niwa, T., Fujimoto, M., Kishimoto, K., Yabusaki, Y., Ishibashi, F. und Katagiri, M., 2001. Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17. *Biol Pharm Bull*, 24(9), 1064–1067.
- Niwa, T., Sato, R., Yabusaki, Y., Ishibashi, F. und Katagiri, M., 1999. Contribution of human hepatic cytochrome P450s and steroidogenic CYP17 to the N-demethylation of aminopyrine. *Xenobiotica*, 29(2), 187–193.
- Ochi, T., 1999. Induction of multiple microtubule-organizing centers, multipolar spindles and multipolar division in cultured V79 cells exposed to diethylstilbestrol, estradiol-17beta and bisphenol A. *Mutat Res*, 431(1), 105–121.
- O’Connell, M. J., Walworth, N. C. und Carr, A. M., 2000. The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol*, 10(7), 296–303.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M. und Sonnenschein, C., 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*, 104(3), 298–305.

- Parry, J. M., 1998. Detecting chemical aneugens: a commentary to 'Aneuploidy: a report of an ECETOC task force'. *Mutat Res*, 410(1), 117–120.
- Parry, J. M., Parry, E. M., Bourner, R., Doherty, A., Ellard, S., O'Donovan, J., Hoebee, B., de Stopelaar, J. M., Mohn, G. R., Onfelt, A., Renglin, A., Schultz, N., Soderpalm-Berndes, C., Jensen, K. G., Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Van Hummelen, P., Degrassi, F., Antoccia, A., Cimini, D., Izzo, M., Tanzarella, C., Adler, I. D., Kliesch, U., Hess, P. und et al., 1996. The detection and evaluation of aneugenic chemicals. *Mutat Res*, 353(1-2), 11–46.
- Pfeiffer, E., Rosenberg, B., Deuschel, S. und Metzler, M., 1997. Interference with microtubules and induction of micronuclei in vitro by various bisphenols. *Mutat Res*, 390(1-2), 21–31.
- Plattner, H. und Hentschel, J., 1997. Taschenlehrbuch Zellbiologie. Thime, Stuttgart.
- Pottenger, L. H., Domoradzki, J. Y., Markham, D. A., Hansen, S. C., Cagen, S. Z. und Waechter, J. M., J., 2000. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci*, 54(1), 3–18.
- Potter, S. M., Pertile, J. und Berber-Jimenez, M. D., 1996. Soy protein concentrate and isolated soy protein similarly lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters. *J Nutr*, 126(8), 2007–2011.
- Reid, E. E. und Wilson, E., 1944. The relation of estrogenic activity to structure in some 4,4'-Dihydroxydiphenylmethanes. *J Am Chem Soc*, 66, 967–971.
- Safe, S., 2000. Bisphenol A and related endocrine disruptors. *Toxicol Sci*, 56(2), 251–252.
- Saxton, W. M. und McIntosh, J. R., 1987. Interzone microtubule behavior in late anaphase and telophase spindles. *J Cell Biol*, 105(2), 875–886.
- Schiebel, E., 2000. gamma-tubulin complexes: binding to the centrosome, regulation and microtubule nucleation. *Curr Opin Cell Biol*, 12(1), 113–118.
- Schuler, M., Hasegawa, L., Parks, R., Metzler, M. und Eastmond, D. A., 1998. Dose-response studies of the induction of hyperdiploidy and polyploidy by diethylstilbestrol and 17beta-estradiol in cultured human lymphocytes using multicolor fluorescence in situ hybridization. *Environ Mol Mutagen*, 31(3), 263–273.
- Schultze-Mosgau, M. H., Dale, I. L., Gant, T. W., Chipman, J. K., Kerr, D. J. und Gescher, A., 1998. Regulation of c-fos transcription by chemopreventive isoflavonoids and lignans in MDA-MB-468 breast cancer cells. *Eur J Cancer*, 34(9), 1425–1431.
- Sen, S., 2000. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol*, 12(1), 82–88.
- Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe der DFG (Hg.), 1996. Bisphenol A (4,4'-Isopropylidendiphenol). 23. Lieferung. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe. Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten (Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen). VHC, München.
- Setchell, K. D. und Cassidy, A., 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*, 129(3), 758S–767S.
- Sheehan, D. M., 2000. Activity of environmentally relevant low doses of endocrine disruptors and the bisphenol A controversy: initial results confirmed [editorial; comment]. *Proc Soc Exp Biol Med*, 224(2), 57–60.



- Sheikh, S. und Weiner, H., 1997. Allosteric inhibition of human liver aldehyde dehydrogenase by the isoflavone prunetin. *Biochem Pharmacol*, 53(4), 471–478.
- Shimizu, N., Itoh, N., Utiyama, H. und Wahl, G. M., 1998. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase. *J Cell Biol*, 140(6), 1307–1320.
- Sonnenschein, C. und Soto, A. M., 1998. An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65(1-6), 143–150.
- Spahl, W., Budzikiewicz, H. und Geurtsen, W., 1991. [Study on the residual monomer contents of different light curing hybrid composite resins]. *Dtsch Zahnarztl Z*, 46(7), 471–475.
- Stewart, Z. A. und Pietenpol, J. A., 2001. p53 Signaling and cell cycle checkpoints. *Chem Res Toxicol*, 14(3), 243–263.
- Takahashi, S., Chi, X. J., Yamaguchi, Y., Suzuki, H., Sugaya, S., Kita, K., Hiroshima, K., Yamamori, H., Ichinose, M. und Suzuki, N., 2001. Mutagenicity of bisphenol A and its suppression by interferon-alpha in human RSa cells. *Mutat Res*, 490(2), 199–207.
- 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.
- Tsutsui, T. und Barrett, J. C., 1997. Neoplastic transformation of cultured mammalian cells by estrogens and estrogenlike chemicals. *Environ Health Perspect*, 105 Suppl 3, 619–624.
- Tsutsui, T., Suzuki, N., Maizumi, H. und Barrett, J. C., 1990. Aneuploidy induction in human fibroblasts: comparison with results in Syrian hamster fibroblasts. *Mutat Res*, 240(4), 241–249.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Suzuki, A., Hirose, Y., Kobayashi, M., Nishimura, H., Metzler, M. und Barrett, J. C., 2000. Mammalian cell transformation and aneuploidy induced by five bisphenols. *Int J Cancer*, 86(2), 151–154.
- Tusell, L., Alvarez, R., Genesca, A., Caballin, M. R., Miro, R. und Egozcue, J., 1996. Analysis of radiation-induced micronuclei in two-cell human-hamster embryos using telomeric and centromeric FISH probes. *Cytogenet Cell Genet*, 74(1-2), 102–106.
- Verma, S. P. und Goldin, B. R., 1998. Effect of soy-derived isoflavonoids on the induced growth of MCF-7 cells by estrogenic environmental chemicals. *Nutr Cancer*, 30(3), 232–239.
- Wahala, K., Hase, T. und Adlercreutz, H., 1995. Synthesis and labeling of isoflavone phytoestrogens, including daidzein and genistein. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1), 27–32.
- Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S. und Wang, Y., 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1), 124–130.
- Welshons, W. V., Nagel, S. C., Thayer, K. A., Judy, B. M. und Vom Saal, F. S., 1999. Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health*, 15(1-2), 12–25.
- Wheatley, S. P. und Wang, Y., 1996. Midzone microtubule bundles are continuously required for cytokinesis in cultured epithelial cells. *J Cell Biol*, 135(4), 981–989.

- Willard, S. T. und Frawley, L. S., 1998. Phytoestrogens have agonistic and combinatorial effects on estrogen- responsive gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrine*, 8(2), 117–121.
- Yagi, E., Barrett, J. C. und Tsutsui, T., 2001. The ability of four catechol estrogens of 17beta-estradiol and estrone to induce DNA adducts in Syrian hamster embryo fibroblasts. *Carcinogenesis*, 22(9), 1505–1510.
- Ye, R., Boderro, A., Zhou, B. B., Khanna, K. K., Lavin, M. F. und Lees-Miller, S. P., 2001. The plant isoflavenoid genistein activates p53 and Chk2 in an ATM- dependent manner. *J Biol Chem*, 276(7), 4828–4833.
- Zhu, B. T., Evaristus, E. N., Antoniak, S. K., Sarabia, S. F., Ricci, M. J. und Liehr, J. G., 1996. Metabolic deglucuronidation and demethylation of estrogen conjugates as a source of parent estrogens and catecholestrogen metabolites in Syrian hamster kidney, a target organ of estrogen-induced tumorigenesis. *Toxicol Appl Pharmacol*, 136(1), 186–193.
- Zijno, A., Marcon, F., Leopardi, P. und Crebelli, R., 1994. Simultaneous detection of X-chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked human lymphocytes by in situ hybridization with a centromeric DNA probe; implications for the human lymphocyte in vitro micronucleus assay using cytochalasin B. *Mutagenesis*, 9(3), 225–232.
- Zijno, A., Marcon, F., Leopardi, P. und Crebelli, R., 1996. Analysis of chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent damage resulting from low dose exposure to spindle poisons. *Mutagenesis*, 11(4), 335–340.
- Zimmerman, W., Sparks, C. A. und Doxsey, S. J., 1999. Amorphous no longer: the centrosome comes into focus. *Curr Opin Cell Biol*, 11(1), 122–128.

Anhang

A V79-Zellen

A.1 Isoflavone

A.1.1 Mitosearrest

Fixierung: Carnoy's Fixans. Färbung: DNA (DAPI).  $\sum$  PM + M, Summe von Prometa- und Metaphasen;  $\sum$  A + T, Summe von Ana- und Telophasen.

Substanz	Konz. in $\mu$ M	Mitosestadium pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		$\sum$ PM + M		$\sum$ A + T		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
FORM	0	23	50	3	13	4
	25	44	107	0	9	4
	50	51	130	0	8	4
	75	55	153	8	5	4
	100	53	135	0	5	4
KUL	0	14	16	4	11	2
	50	20	30	5	7	2
	100	32	35	3	4	2
	250	62	64	2	5	2
	500	91	79	0	0	2
PRU	0	25	25	5	7	2
	2,5	27	33	7	13	2
	5,0	42	41	11	13	2
	10	56	60	4	6	2
	20	77	96	2	2	2
GDME	0	25	25	5	7	2
	2,5	54	55	12	13	2
	5,0	70	91	8	12	2
	7,5	145	154	5	10	2
	10	225	251	0	0	2
EQU	0	22	25	3	5	2
	50	24	30	5	16	2
	100	54	68	7	11	2
	150	95	100	0	2	2
	200	107	134	0	1	2

### A.1.2 Reversibilität des substanzinduzierten Mitosearrests

Fixierung: Carnoy's Fixans. Färbung: DNA (DAPI).  $\sum$  PM + M, Summe von Prometa- und Metaphasen;  $\sum$  A + T, Summe von Ana- und Telophasen; n.b., nicht bestimmt.

#### FORM

Zeit in min	Konz. in $\mu$ M	Mitosestadium pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		$\sum$ PM + M		$\sum$ A + T		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	100	206	145	4	8	2
	200	81	n.b.	10	n.b.	1
10	100	184	153	8	17	2
	200	128	n.b.	12	n.b.	1
20	100	108	162	12	19	2
	200	85	n.b.	26	n.b.	1
40	100	48	60	23	62	2
	200	54	n.b.	22	n.b.	1
60	100	32	51	8	17	2
	200	57	n.b.	15	n.b.	1
90	100	23	25	7	8	2
	200	26	n.b.	11	n.b.	1

#### EQU

Zeit in min	Konz. in $\mu$ M	Mitosestadium pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		$\sum$ PM + M		$\sum$ A + T		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	50	36	45	12	15	2
	75	52	58	16	16	2
	100	60	66	8	18	2
20	50	41	44	7	8	2
	75	48	54	9	10	2
	100	57	62	18	20	2
40	50	38	40	7	9	2
	75	39	41	12	12	2
	100	56	61	15	20	2
60	50	38	41	9	18	2
	75	39	43	16	21	2
	100	37	47	16	19	2
90	50	33	34	21	22	2
	75	24	37	9	13	2
	100	38	38	11	17	2

A V79-Zellen

**KUL**

Zeit in min	Konz. in $\mu\text{M}$	Mitosestadium pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		$\sum \text{PM} + \text{M}$		$\sum \text{A} + \text{T}$		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	100	33	44	4	5	2
	250	63	68	3	6	2
	500	85	86	0	2	2
10	100	34	n.b.	14	n.b.	1
	250	62	126	11	11	2
	500	81	140	6	3	2
20	100	29	n.b.	6	n.b.	1
	250	78	104	12	16	2
	500	73	128	2	4	2
40	100	5	n.b.	18	n.b.	1
	250	21	37	20	53	2
	500	31	33	32	41	2
60	100	33	n.b.	3	n.b.	1
	250	32	36	14	18	2
	500	23	35	10	19	2
90	100	24	n.b.	15	n.b.	1
	250	18	33	6	15	2
	500	19	21	3	12	2

A V79-Zellen

PRU

Zeit in min	Konz. in $\mu\text{M}$	Mitosestadium pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		$\sum \text{PM} + \text{M}$		$\sum \text{A} + \text{T}$		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	2,5	27	33	7	13	2
	5,0	42	41	11	13	2
	10	56	60	4	6	2
	20	77	96	2	2	2
20	2,5	30	37	6	9	2
	5,0	30	33	8	10	2
	10	14	18	3	14	2
	20	15	21	41	43	2
40	2,5	27	33	7	13	2
	5,0	42	41	11	13	2
	10	56	60	4	6	2
	20	77	96	2	2	2
60	2,5	36	36	12	16	2
	5,0	27	35	20	23	2
	10	17	24	11	17	2
	20	20	29	13	15	2
90	2,5	28	30	8	16	2
	5,0	17	26	11	15	2
	10	21	34	13	14	2
	20	18	33	6	15	2

## GDME

Zeit in min	Konz. in $\mu\text{M}$	Mitosestadium pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		$\sum \text{PM} + \text{M}$		$\sum \text{A} + \text{T}$		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	2,5	54	55	12	13	2
	5,0	70	91	8	12	2
	7,5	145	154	5	10	2
	10	225	251	0	0	2
20	2,5	33	43	9	11	2
	5,0	31	50	19	29	2
	7,5	73	79	14	28	2
	10	183	190	26	45	2
40	2,5	35	35	13	18	2
	5,0	34	41	20	27	2
	7,5	27	47	31	32	2
	10	52	60	30	31	2
60	2,5	41	45	17	20	2
	5,0	36	55	13	15	2
	7,5	37	41	8	16	2
	10	30	43	12	16	2
90	2,5	31	32	15	16	2
	5,0	33	37	13	16	2
	7,5	30	36	12	17	2
	10	46	46	13	14	2

## A.1.3 Mikrokerninduktion

Fixierung: Methanol. Färbung: DNA (DAPI), Kinetochore (FITC). MN, Mikrokern; K-positiv, Kinetochor-positive MN; K-negativ, Kinetochor-negative MN; n.b., nicht bestimmt.

## FORM

Zeit in h	Konz. in $\mu\text{M}$	MN pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		K-positiv		K-negativ		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	25	8	12	8	8	2
	50	45	50	6	10	2
	75	75	87	8	8	2
	100	143	163	9	9	2
3	25	19	n.b.	10	n.b.	1
	50	56	64	8	10	2
	75	89	97	6	8	2
	100	158	159	9	10	2
6	25	10	10	3	5	2
	50	46	52	4	9	2
	75	78	88	7	7	2
	100	136	136	7	7	2
12	25	8	10	6	9	2
	50	32	34	6	6	2
	75	43	43	7	7	2
	100	20	29	13	15	2
18	25	6	9	6	7	2
	50	17	18	6	7	2
	75	20	27	7	8	2
	100	53	63	6	8	2



A V79-Zellen

**KUL**

Zeit in h	Konz. in $\mu\text{M}$	MN pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		K-positiv		K-negativ		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	50	9	n.b.	4	n.b.	1
	100	32	n.b.	7	n.b.	1
	200	38	n.b.	5	n.b.	1
3	50	11	15	4	8	2
	100	19	28	6	6	2
	200	60	64	6	7	2
6	50	7	10	7	11	2
	100	23	41	6	7	2
	200	40	58	37	2	
18	50	3	9	7	7	2
	100	12	12	11	12	2
	200	15	23	11	14	2
24	50	4	5	12	13	2
	100	4	6	10	12	2
	200	8	10	11	18	2

A V79-Zellen

PRU

Zeit in h	Konz. in $\mu\text{M}$	MN pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		K-positiv		K-negativ		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	7,5	19	21	8	10	2
	10	31	40	5	9	2
	15	56	56	8	9	2
	20	105	n.b.	7	n.b.	1
3	7,5	14	24	7	8	2
	10	52	54	8	9	2
	15	58	65	7	9	2
	20	116	n.b.	3	n.b.	1
6	7,5	18	18	9	12	2
	10	28	35	4	6	2
	15	50	57	6	8	2
	20	107	n.b.	4	n.b.	1
12	7,5	9	9	5	10	2
	10	18	22	9	10	2
	15	22	23	7	7	2
	20	65	n.b.	7	n.b.	1
18	7,5	7	7	6	7	2
	10	7	8	6	7	2
	15	21	34	13	14	2
	20	105	n.b.	7	n.b.	1
24	7,5	4	10	6	10	2
	10	4	8	2	2	2
	15	8	13	6	11	2
	20	23	n.b.	13	n.b.	1

## GDME

Zeit in h	Konz. in $\mu\text{M}$	MN pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		K-positiv		K-negativ		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	2,5	7	12	4	8	2
	5,0	70	73	4	9	2
	7,5	117	140	1	2	2
	10	134	n.b.	7	n.b.	1
3	2,5	5	5	3	4	2
	5,0	50	55	3	7	2
	7,5	156	168	3	9	2
	10	152	n.b.	6	n.b.	1
6	2,5	2	7	2	10	2
	5,0	56	65	6	12	2
	7,5	152	156	3	7	2
	10	157	n.b.	4	n.b.	1
12	2,5	5	8	6	9	2
	5,0	30	36	7	11	2
	7,5	92	122	7	8	2
	10	126	n.b.	6	n.b.	1
18	2,5	2	6	10	11	2
	5,0	7	12	8	10	2
	7,5	33	42	11	12	2
	10	37	n.b.	16	n.b.	1
24	2,5	2	3	6	9	2
	5,0	13	13	6	7	2
	7,5	24	37	9	12	2
	10	37	n.b.	20	n.b.	1

A V79-Zellen

---

**EQU**

Zeit in h	Konz. in $\mu\text{M}$	MN pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		K-positiv		K-negativ		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0	50	11	12	2	4	2
	100	55	61	4	9	2
	250	94	109	4	8	2
3	50	10	17	2	6	2
	100	82	83	6	8	2
	250	117	152	8	10	2
6	50	20	21	3	4	2
	100	66	70	7	10	2
	250	108	127	5	8	2
12	50	11	7	8	10	2
	100	27	36	7	8	2
	250	59	73	6	9	2
18	50	4	6	7	7	2
	100	15	15	9	9	2
	250	30	36	5	6	2
24	50	2	3	4	8	2
	100	13	19	3	10	2
	250	16	25	12	15	2

**Lösungsmittelkontrolle K**

Zeit in h	Konz. in $\mu\text{M}$	MN pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		K-positiv		K-negativ		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
0		4	7	5	8	6
3		3	8	4	6	4
6		3	8	6	9	6
12		4	8	3	9	4
18		2	8	5	10	6
24		2	5	5	10	6

## A.2 Mitosearrest durch Bisphenole

Fixierung: Carnoy's Fixans. Färbung: DNA (DAPI).  $\sum$  PM + M, Summe von Prometa- und Metaphasen;  $\sum$  A + T, Summe von Ana- und Telophasen.

Substanz	Konz. in $\mu$ M	Mitosestadium pro 1000 Zellen				Anzahl Bestimmungen
		$\sum$ PM + M		$\sum$ A + T		
		Min.	Max.	Min.	Max.	
DES	0	16	25	1	12	8
	15	91		0	5	8
	20	123	202	0	4	8
E2	0	16	25	1	12	8
	20	54	114	1	6	8
DMBP	0	22	28	3	12	4
	25	49	76	6	14	4
	50	161	200	0	22	4
	75	156	181	0	0	4
TMBP	0	29	30	5	16	2
	10	75	91	1	5	2
	15	152	180	4	5	2
	20	224	247	0	0	2
BPA	0	22	25	3	5	2
	50	24	30	5	16	2
	100	54	68	7	11	2
	150	95	100	0	2	2
	200	107	134	0	1	2

## B AG01522-Zellen

### B.1 Mitosearresttest

#### B.1.1 Mitosenindizes (MI) nach Behandlung mit E2, DES und verschiedenen Bisphenolen

–0,5 h, unmittelbar nach Substanzinkubation; 0 h CYB, nach 0,5-stündiger Erholungsphase vor Cytochalasin B-Behandlung; MW, Mittelwert; K, Lösungsmittelkontrolle. Das Ergebnis jedes unabhängigen Versuchs setzt sich aus der Auswertung von 2 Objektträgern zusammen.

#### DMBP

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	MI in %				MW
		1	2	3	4	
–0,5 h CYB	50		1,9	0,8	2,2	1,6
	100	4,4	1,7	6,8	6,0	4,7
	150	6,5	11,9	9,9	5,4	8,4
	200	2,8	8,6	2,0	5,0	8,4
0 h CYB	50		2,4	2,3	1,3	2,0
	100	5,6	4,4	9,4	7,4	6,7
	150	5,3	11,2	12,2	5,8	8,6
	200	7,7	12,1	6,1	1,8	6,9

#### TMBP

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	MI in %				MW
		1	2	3	4	
–0,5 h CYB	15			3,2	1,0	2,1
	30			3,9	1,0	2,5
	45		10,2	5,5	8,0	7,9
	60	1,6	8,6	13,3	12,5	9,0
	75	6,6	10,6	13,5	10,0	10,2
	90	2,0	8,6	7,0	9,1	6,4
0 h CYB	15			1,9	0,5	1,2
	30			2,9	1,1	2,0
	45		10,6	3,6	8,0	7,4
	60	1,6	16,0	10,5	14,8	10,7
	75	14,7	19,0	18,8	9,5	15,5
	92	3,1	11,6	13,4	15,3	10,9

**DES**

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	MI in %			MW
		1	2	3	
-0,5 h CYB	50	13,4	13,0	7,4	11,3
	75	16,3	15,5	15,3	15,7
0 h CYB	50	1,7	16,0	14,7	10,8
	75	5,6	21,0	20,2	15,6

**E2**

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	MI in %			MW
		1	2	3	
-0,5 h CYB	50	3,4	1,4	7,6	4,1
	75	6,2	5,6	8,7	6,9
0 h CYB	50	4,7	7,4	4,1	5,4
	75	6,2	11,5	6,3	8,0

**1 % DMSO (Lösungsmittelkontrolle)**

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	MI in %				MW
		1	2	3	4	
-0,5 h CYB	0	1,5	1,0	2,3	3,1	2,0
0 h CYB	0	1,8		1,4		1,6

**B.1.2 Metaphasebilder nach Behandlung mit E2, DES und verschiedenen Bisphenolen**

–0,5 h, unmittelbar nach Substanzinkubation; 0 h CYB, nach 0,5-stündiger Erholungsphase vor Cytochalasin B-Behandlung; K, Lösungsmittelkontrolle. Ergebnisse entsprechen dem Mittelwert aus 3-4 unabhängigen Versuchen.

**DMBP**

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Metaphasebild in %			
		normal	Off-Plate	>2-polare Spindeln	Strukturstörungen
–0,5 h CYB	50	91,7	8,3	0	0
	100	64,4	22,9	9,3	3,3
	150	27,0	22,8	5,4	44,8
	200	7,5	10,6	6,7	75,1
0 h CYB	50	100	0	0	0
	100	74,0	7,6	17,3	1,1
	150	58,1	5,9	17,2	18,7
	200	28,5	2,7	11,1	57,8

**TMBP**

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Metaphasebild in %			
		normal	Off-Plate	>2-polare Spindeln	Strukturstörungen
–0,5 h CYB	15	100	0	0	0
	30	88	12	0	00
	45	37,7	35,6	2,2	24,5
	60	30,8	16,9	1,2	51,1
	75	25,5	16,2	4,3	54,3
	90	13,2	7,3	11,7	67,8
0 h CYB	15	100	0	0	0
	30	100	0	0	0
	45	77,1	5,5	4,9	12,5
	60	66,7	2,6	7,3	23,4
	75	38,7	7,2	6,6	47,5
	92	38,4	9,5	11,2	40,9



*B AG01522-Zellen*

**DES**

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Metaphasebild in %			
		normal	Off-Plate	>2-polare Spindeln	Strukturstörungen
-0,5 h CYB	50	69,2	10,8	4,9	15,1
	75	36,7	0,4	10,8	52,1
0 h CYB	50	82,7	2,7	13,7	0,9
	75	50,2	13,9	12,7	23,2

**E2**

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Metaphasebild in %			
		normal	Off-Plate	>2-polare Spindeln	Strukturstörungen
-0,5 h CYB	50	60,1	28,0	1,1	10,8
	75	10,4	36,4	31,3	21,9
0 h CYB	50	95,6	1,1	3,3	0
	75	75,9	9,2	8,8	6,1

**1 % DMSO (Lösungsmittelkontrolle)**

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Metaphasebild in %			
		normal	Off-Plate	>2-polare Spindeln	Strukturstörungen
-0,5 h CYB	0	100	0	0	0
0 h CYB	0	100	0	0	0

**B.1.3 Reversibilität des DES-induzierten Mitosearrests**

Fixierung: Formaldehyd in CB-Puffer/ Methanol. Färbung: DNA (DAPI), Kinetochore (FITC),  $\alpha$ -Tubulin (CY3). CYB, Cytochalasin B.  $\Sigma$  PM + M, Summe von Prometa- und Metaphasen;  $\Sigma$  A + T, Summe von Ana- und Telophasen; n.b., nicht bestimmt.

Zeit in min	Konz. in $\mu$ M	Mitosestadium pro 1000 Zellen			
		ohne CYB		mit CYB	
		$\Sigma$ PM + M	$\Sigma$ A + T	$\Sigma$ PM + M	$\Sigma$ A + T
-30	75	189	0	189	0
0	75	269	0	269	0
15	75	192	35	221	32
30	75	118	103	154	41
45	75	69	66	165	43
60	75	31	0	84	64
90	75	n.b.	n.b.	56	0
120	75	n.b.	n.b.	52	0

## B.2 Relative Lebendzellzahl

**Tabelle 15:** Relative Lebendzellzahl (LZZ) von AG01522C-Zellen nach Inkubation mit DES, E2, DMBP und TMBP (bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle in %). CYB, Cytochalasin B; K, Lösungsmittelkontrolle; n.n., nicht nachweisbar; n.b., nicht bestimmt; \*, LZZ nach Substanzexposition < LZZ vor Substanzexposition.

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Relative Lebendzellzahl in %		
		Ohne CYB		Mit CYB
		0 h	6 h	10 h CYB
K		100	100	100
DES	50	61,3	66,5	73,1
	75	53,3	64,9	66,6
E2	50	88,2	99,0	75,5
	75	78,9	89,5	68,8
DMBP	50	78,1	97,7	77,6
	100	66,4	66,5	68,6
	150	55,5	54,4	46,5
	200	48,3	48,5	41,4
TMBP	15	89,2	101,6	104,8
	30	81,1	92,5	89,7
	45	66,0	79,3	76,6
	60	63,8	58,5	56,3
	75	58,3	38,7	48,1
	90	43,0*	56,1	40,8

### B.3 Klassischer Mikrokerntest

#### B.3.1 Potenzielle Aneuploidogene

MN pos., Kinetochor-positiver Mikrokern; MN neg., Kinetochor-negativer Mikrokern; CYB, Cytochalasin B; 0 h, unmittelbar nach Substanzinkubation; 6 h, 6-stündige Erholungsphase nach Substanzinkubation; SN+BN, ein- und zweikernige Zellen; BN, zweikernige Zellen K, Lösungsmittelkontrolle; n.b., nicht bestimmt

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Mikrokerntest ohne CYB					
		t = 0 h			t = 6 h		
		$\sum$ MN pos.	$\sum$ MN neg.	$\sum$ ZK	$\sum$ MN pos.	$\sum$ MN neg.	$\sum$ ZK
K		82		4646	64	120	5606
DES	50	29	37	2301	96	37	2585
	75	21	31	2337	196	188	5470
E2	50	139	45	3052	134	55	3026
	75	204	40	3047	190	57	3121
DMBP	50	16	20	1564	32	45	2068
	100	56	30	3639	85	46	3053
	150	59	30	3618	67	31	2048
	200	61	31	3595	83	46	3059
TMBP	15	29	75	4096	17	105	3015
	30	62	69	3988	36	101	3024
	45	95	23	3115	87	15	3079
	60	48	54	3585	147		4734
	75	58	55	4088	61	39	2511
	90	54	68	4135	72	53	2508
BPA	50	n.b.	n.b.	n.b.	2	5	500
	100	17	15	1048	5	12	526
	150	n.b.	n.b.	n.b.	4	9	570
	200	11	10	998	8	6	1006
	250	n.b.	n.b.	n.b.	5	6	534

**B.3.2 Potenzielle Klastogene**

**GEN** MN, Mikrokern; MN pos., Kinetochor-positiver MN; MN neg., Kinetochor-negativer MN

Versuch		Konzentration in $\mu\text{M}$					
		0	12,5	25	50	75	100
25.08.2000 Tub/CREST	Zellen	532		592	505	504	547
	Mitosen	17		12	8	5	4
	MN pos.	3		2	4	1	2
	MN neg.	18		11	31	49	45
	Summe MN	21		13	35	50	47
27.10.2000 DAPI	Zellen	1003	1047	1030	1116	1000	
	Mitosen	17	33	37	25	8	
	Summe MN	27	37	44	49	97	
Summe	Zellen	1535	1047	1622	1621	1504	547
	Mitosen	34	33	49	33	13	4
	Summe MN	48	37	57	84	147	47

**NQO** MN, Mikrokern; MN pos., Kinetochor-positiver MN; MN neg., Kinetochor-negativer MN

Versuch		Konzentration in $\mu\text{M}$					
		0	0,01	0,05	0,1	0,3	0,5
26.08.2000 Tub/CREST	Zellen	532	583	548	596		
	Mitosen	17	12	9	9		
	MN pos.	3	2	2	2		
	MN neg.	18	12	11	21		
	Summe MN	21	14	13	23		
27.10.2000 DAPI	Zellen	1003	596	596	616	523	562
	Mitosen	17	18	18	12	1	0
	Summe MN	27	13	11	16	13	7
Summe	Zellen	1535	1179	1144	1212	523	562
	Mitosen	34	30	27	21	1	0
	Summe MN	48	27	24	39	13	7

**B.4 CB-Mikrokerntest**

**B.4.1 Potenzielle Aneuploidogene**

MN pos., Kinetochor-positiver Mikrokern; MN neg., Kinetochor-negativer Mikrokern; ZK, Zellkern; CYB, Cytochalasin B; BN, zweikernige Zellen; K, Lösungsmittelkontrolle.

Substanz	Konz. in $\mu\text{M}$	Mikrokerntest mit CYB					
		MN pos.		MN neg.		$\Sigma$ ZK	
		gesamt	in BN	gesamt	in BN	gesamt	aus BN
K		64	6	78	8	8547	1440
DES	50	79	38	23	8	2814	914
	75	86	52	37	11	3049	1152
E2	50	103	19	42	5	3099	522
	75	191	41	18	4	3112	738
DMBP	50	58	11	55	4	5241	824
	100	113	21	81	5	6013	960
	150	143	63	58	9	6013	1288
	200	107	43	58	6	3938	520
TMBP	15	8	4	32	3	2207	398
	30	33	12	57	10	4744	816
	45	97	30	43	11	3853	972
	60	110	46	47	7	4967	1366
	75	204	89	71	12	7103	2100
	90	109	44	59	10	5729	1238
BPA	50	21	2	26	0	3016	480
	100	27	0	37	0	2797	376
	150	17	0	49	0	2904	274
	200	28	5	44	2	4748	300
	250	16	2	39	3	2918	180

**B.4.2 Potenzielle Klastogene**

**GEN** BN, zweikernige Zelle; BN pos., BN mit Kinetochor-positivem Mikrokern (MN); BN neg., BN mit Kinetochor-negativem MN; MN pos., Kinetochor-positive MN in einkernigen Zellen; MN neg., Kinetochor-negative MN in einkernigen Zellen.

Versuch		Konzentration in $\mu\text{M}$					
		0	12,5	25	50	75	100
08.08.2000 Tub/CREST	Zellen	593		518	514	575	
	Kerne	679		572	537	619	
	BN	86		54	23	44	
	BN pos.	0		0	1	0	
	BN neg.	0		2	1	0	
	MK pos.	1		0	0	2	
	MK neg.	3		12	18	15	
25.08.2000 Tub/CREST	Zellen	520		565	525	556	941
	Kerne	659		703	597	592	987
	BN	139		138	72	36	46
	BN pos.	0		0	0	0	0
	BN neg.	3		2	5	4	3
	MK pos.	1		0	0	4	7
	MK neg.	4		10	27	27	23
27.10.2000 Tub/CREST	Zellen	563	745	743	417	838	
	Kerne	817	1023	1044	522	1005	
	BN	254	278	301	105	167	
	BN pos.	2	1	10	0	3	
	BN neg.	7	16	14	6	18	
	MK pos.	0	7	9	3	14	
	MK neg.	5	12	20	6	43	
Summe	Zellen	1676	745	1826	1456	1969	941
	Kerne	2155	1023	2319	1656	2216	987
	BN	479	278	493	200	247	46
	BN pos.	2	1	10	1	3	0
	BN neg.	10	16	18	12	22	3
	MK pos.	2	7	9	3	20	7
	MK neg.	12	12	42	51	85	23

*B AG01522-Zellen*

---

**NQO** BN, zweikernige Zelle; BN pos., BN mit Kinetochor-positivem Mikrokern (MN); BN neg., BN mit Kinetochor-negativem MN; MN pos., Kinetochor-positivem MN in einkernigen Zellen; MN neg., Kinetochor-negativem MN in einkernigen Zellen.

Versuch		Konzentration in $\mu\text{M}$					
		0	0,01	0,05	0,1	0,3	0,5
26.08.2000 Tub/CREST	Zellen	520	545	543	1104		
	Kerne	659	653	651	1136		
	BN	139	108	108	32		
	BN pos.	0	0	1	0		
	BN neg.	3	2	0	1		
	MK pos.	1	2	3	2		
	MK neg.	4	5	3	16		
27.10.2000 Tub/CREST	Zellen	563	679	1044	810	954	858
	Kerne	817	1033	1521	1055	1002	1040
	BN	254	354	477	245	48	182
	BN pos.	2	3	8	4	0	0
	BN neg.	7	3	18	18	4	3
	MK pos.	0	5	7	3	7	6
	MK neg.	5	18	12	22	23	42
Summe	Zellen	1083	1224	1587	1914	954	858
	Kerne	1476	1686	2172	2191	1002	1040
	BN	393	462	585	277	48	182
	BN pos.	2	3	9	4	0	0
	BN neg.	10	5	18	19	4	3
	MK pos.	1	7	10	5	7	6
	MK neg.	9	23	15	38	23	42



## C Zellkultur

**Tabelle 16:** Nährstoffgehalt des Mediums für die Zelllinie AG01522C (nach Katalog Gibco-BRL)

<b>Anorganische Salze</b>		<b>Aminosäuren</b>	
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	264,00 mg/l	L-Alanin	8,90 mg/l
KCl	400,00 mg/l	L-Arginin · HCl	252,40 mg/l
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	200,00 mg/l	L-Asparagin	13,20 mg/l
NaCl	6885,00 mg/l	L-Asparaginsäure	13,30 mg/l
NaHCO <sub>3</sub>	2200,00 mg/l	L-Cystin	48,02 mg/l
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	158,00 mg/l	L-Glutamin	292,30 mg/l
		L-Glutaminsäure	14,70 mg/l
		Glycin	7,50 mg/l
<b>Andere Komponenten</b>		L-Histidin HCl · H <sub>2</sub> O	43,92 mg/l
D-Glucose	1000,00 mg/l	L-Isoleucin	104,46 mg/l
Phenolrot	10,00 mg/l	L-Leucin	104,46 mg/l
		L-Lysin HCl	146,06 mg/l
<b>Vitamine</b>		L-Methionin	29,92 mg/l
D-Ca-Pantothenat	2,00 mg/l	L-Phenylalanin	65,02 mg/l
Cholinchlorid	2,00 mg/l	L-Prolin	11,50 mg/l
Folsäure	2,00 mg/l	L-Serin	10,50 mg/l
i-Inositol	4,00 mg/l	L-Threonin	95,64 mg/l
Nicotinamid	2,00 mg/l	L-Tryptophan	20,20 mg/l
Pyridoxal HCl	2,00 mg/l	L-Tyrosin	72,22 mg/l
Riboflavin	0,20 mg/l	L-Valin	92,86 mg/l
Thiamin HCl	2,00 mg/l		

## **D Veröffentlichungen aus dieser Arbeit**

### Zeitschriftenpublikation

- Sabine E. Kulling, Leane Lehmann and Manfred Metzler: Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens: a brief review. *Journal of Chromatography B* (im Druck).

### Kongresse und Fachtagungen

- L. LEHMANN, S.E. KULLING, M. METZLER: Genotoxic potential of isoflavone and coumestane phytoestrogens. Symposium of the DFG Senate Commission on Food Safety, Carcinogenic/Anticarcinogenic Factors in Food: Novel Concepts?, Kaiserslautern, Germany, October 04-07, 1998. Abstract Book.
- S.E. KULLING, L. LEHMANN, S. MAYER, M. METZLER: Genotoxic potential of isoflavone and coumestane phytoestrogens. Third Karlsruhe Nutrition Symposium, Karlsruhe, Germany, October 18-20, 1998. Abstract Book p.23.
- L. LEHMANN, S.E. KULLING, M. METZLER: Detection of aneuploidy in binucleated human lymphocytes using multicolor fluorescence in situ hybridization (FISH). Third Karlsruhe Nutrition Symposium, Karlsruhe, Germany, October 18-20, 1998. Abstract Book p.55.
- L. LEHMANN, S.E. KULLING, M. METZLER: Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Isoflavonen in kultivierten V79-Zellen. Jahrestagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Hohenheim, Germany, March 22-23, 1999. *Lebensmittelchemie* 53, 124 (1999).
- M. METZLER, L. LEHMANN, S.E. KULLING: Structure-activity relationship for the aneuploidogenic and clastogenic potential of isoflavone phytoestrogens. Eighth Gordon Research Conference on Hormonal Carcinogenesis, Tilton, USA, August 01-06, 1999.
- S.E. KULLING, L. LEHMANN, D. HONIG, M. METZLER: Untersuchungen zur in-vitro Biotransformation des Soja-Isoflavons Daidzein. Deutscher Lebensmittelchemikertag 1999, Hamburg, Germany, September 13-15, 1999. *Lebensmittelchemie* 54, 16 (1999).
- L. LEHMANN, S.E. KULLING, M. METZLER: Zur Strukturabhängigkeit des genotoxischen Potentials verschiedener Isoflavone. Deutscher Lebensmittelchemikertag 1999, Hamburg, Germany, September 13-15, 1999. *Lebensmittelchemie* 54, 15 (2000).

- S.E. KULLING, L. LEHMANN, D. HONIG, M. METZLER: Oxidative in vitro metabolism of the phytoestrogen daidzein. Fourth Karlsruhe Nutrition Symposium, Karlsruhe, Germany, October 10-12, 1999. Abstract Book.
- L. LEHMANN, S.E. KULLING, M. METZLER: Structure-activity relationship for the aneuploidogenic and clastogenic potential of isoflavone phytoestrogens. Fourth Karlsruhe Nutrition Symposium, Karlsruhe, Germany, October 10-12, 1999. Abstract Book.
- S.E. KULLING, D. HONIG, L. LEHMANN, T.J. SIMAT, M. METZLER: Zum oxidativen Metabolismus der Soja-Isoflavone Daidzein und Genistein. Jahrestagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Karlsruhe, Germany, April 03-04, 2000. *Lebensmittelchemie* 54, 70 (2000).
- L. LEHMANN, S.E. KULLING, M. METZLER: Molekularbiologische Methoden in der Lebensmitteltoxikologie: Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Jahrestagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Karlsruhe, Germany, April 03-04, 2000. *Lebensmittelchemie* 54, 81-82 (2000).
- D.M. SCHUMACHER, L. LEHMANN, S.E. KULLING, M. METZLER: Untersuchungen zum klastogenen Potential von Genistein. Jahrestagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Kaiserslautern, Germany, April 02-03, 2001. *Lebensmittelchemie* 55, 130 (2001).
- L. LEHMANN, E. PFEIFFER, M. METZLER: Genotoxic potential of 17 beta-estradiol and various bisphenols in cultured human fibroblasts. Ninth Gordon Research Conference on Hormonal Carcinogenesis, Meriden, USA, Juli 08-13, 2001.
- L. LEHMANN, E. PFEIFFER, M. METZLER: Genotoxic potential of 17 beta-Estradiol and various bisphenols in cultured human fibroblasts. GUM-Tagung, Karlsruhe, Germany, September 25-28, 2001.

## **Lebenslauf**

**Name** Leane Lehmann

**Geburtsdatum** 28. April 1972

**Geburtsort** Freiburg

**Staatsangehörigkeit** deutsch

## **Schulbildung**

**1978-1982** Grundschule Bendorf

**1982-1991** Gymnasium Bendorf Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

## **Hochschulausbildung**

**Oktober 1991- März 1996** Studium der Lebensmittelchemie/Umwelttoxikologie an der Universität Kaiserslautern

**20. Oktober 1993** Staatliche Vorprüfung

**April - Juni 1995** Wissenschaftliche Abschlussarbeit

**13. März 1996** 1. Staatsexamen

**April - September 1996** Wissenschaftliche Abschlussarbeit an der Universität Kaiserslautern, Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, AK Prof. Dr. G. Eisenbrand (zur späteren Anerkennung als wissenschaftliche Abschlussarbeit im Rahmen der Prüfungsordnung für die Verleihung des akademischen Grades Diplom-Lebensmittelchemikerin des Fachbereichs Chemie der Universität Kaiserslautern). Praktischer Teil an der staatlichen Lehr- und Forschungsanstalt (SLFA) für Landwirtschaft, Wein- und Gartenbau in Neustadt a.d. Weinstraße, Abteilung Kellerwirtschaft.

**Oktober 1996 - September 1997** Praktische Ausbildung am CUA Speyer

**September 1997** 2. Staatsexamen: Praktischer Teil

**24. November 1997** 2. Staatsexamen: Mündlicher Teil

**Seit 1. Januar 1998** Wissenschaftliche Angestellte an der Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Prof. Dr. M. Metzler