

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Department für Lebensmittel und Ernährung
Lehrstuhl für Allgemeine Lebensmitteltechnologie

Nachweis und Quantifizierung chemisch induzierter DNA-Schäden in einem Zellkultursystem

Staatl. gepr. Lebensmittelchemikerin
Lucie Wolz

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für
Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur
Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. habil. S. Scherer
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. K.-H. Engel
2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat., Dr. rer. biol. hum. habil. G. Scherer,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Die Dissertation wurde am 21.03.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 11.06.2001 angenommen.

Danksagung

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Engel für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, seinem steten Interesse und seiner Unterstützung.

Bei Herrn PD Dr. Gerhard Scherer möchte ich mich für die Überlassung des Themas, das mir entgegengebrachte Vertrauen, die wertvollen Anregungen, seine engagierte Anleitung, seine jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft und für die Freiheit bei der Anfertigung dieser Arbeit bedanken.

Herrn Dr. Günter Krause danke ich für die Einarbeitung in die Techniken der Molekularbiologie, die Unterstützung und Betreuung bei der Durchführung der Arbeit und seine vielfältigen Ratschläge und Anregungen während dieser Zeit.

Herrn Dr. Johannes Engel danke ich für die Unterstützung bei der Bestimmung der 8OHdG-Konzentration mittels LC-MS/MS.

Bei Frau Dr. Annette Schuler-Metz möchte ich mich für die freundschaftliche Unterstützung und Ratschläge bei den alltäglichen Problemen in der Molekularbiologie bedanken.

Allen Mitarbeitern des ABF danke ich für ihre freundliche Unterstützung und die nette kollegiale Atmosphäre.

Besonderer Dank gilt meiner Familie – für alles.

Mein ganz spezieller Dank gilt Ben Bauerschaper, der mich zur Anfertigung dieser Arbeit ermutigte und mich mit großem Einsatz und Freundschaft unterstützte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	1
2	Grundlagen	4
2.1	Mutagenese und Cancerogenese.....	4
2.1.1	Stufen der Krebsentstehung.....	4
2.1.2	Tumorsuppressorgen <i>p53</i>	6
2.1.3	Onkogen <i>K-ras</i>	9
2.1.4	Translokation t(14;18)	11
2.1.5	8-Hydroxy-2'-deoxy-Guanosin (8OHdG)	12
2.1.6	Möglichkeiten zum Biomonitoring	13
2.2	Wirkmechanismen von Mutagenen.....	15
2.2.1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	16
2.2.2	Heterozyklische aromatische Amine	19
2.2.3	N-Nitrosoverbindungen.....	21
2.2.4	Zigaretterrauchkondensat.....	23
2.3	Beobachtung chemisch induzierter Veränderungen in Säugerzellkulturen.....	24
2.3.1	MCL-5-Zellen als <i>in vitro</i> Testsystem	24
2.3.2	HFBE-Zelllinie	25
2.3.3	Expositionen.....	25
2.4	Ermittlung von DNA-Läsionen.....	26
2.4.1	Strangbrüche in der Einzelzell-Gelelektrophorese	26
2.4.2	Nachweis von 8-Hydroxy-2'-deoxy-Guanosin	28
2.5	Nachweismethoden für DNA-Mutationen	29
2.5.1	Polymerasekettenreaktion.....	29
2.5.1.1	RFLP-PCR zur Anreicherung von Punktmutationen im Codon 248 des <i>p53</i> Tumorsuppressorgens	30
2.5.1.2	PCR-RFLP zur Anreicherung von Punktmutationen im Codon 12 des <i>K-ras</i> -Onkogens	31
2.5.1.3	Anreicherung der Translokation t(14;18) durch semi-nested PCR	34
2.5.2	DNA-Sequenzanalyse.....	35
3	Material und Methoden	36
3.1	Verwendete Mutagene	36
3.2	Verwendete Zelllinien	38

3.2.1	Anzuchtbedingungen.....	38
3.2.1.1	Medien.....	38
3.2.1.2	Aufbewahrung von lymphoblastoiden Zellen (MCL-5-Zellen).....	40
3.2.1.3	Anzucht von gefrorenen lymphoblastoiden Zellen (MCL-5-Zellen)	40
3.2.2	Bestimmung der Zelldichte und Vitalität	40
3.2.3	Expositionsbedingungen.....	41
3.2.3.1	Exposition von MCL-5-Zellen.....	41
3.2.3.2	Exposition von menschlichen Föta-Bronchial-Epithel-Zellen.....	42
3.3	Ermittlung von DNA-Läsionen.....	43
3.3.1	Comet-Test	43
3.3.1.1	Zusatz von Inhibitoren der DNA-Synthese	44
3.3.1.2	Einbetten der Zellen auf Objektträger	45
3.3.1.3	Lyse	46
3.3.1.4	Alkalische Elektrophorese	46
3.3.1.5	Neutralisation	47
3.3.1.6	Färbung.....	47
3.3.1.7	Auswertung.....	47
3.3.2	8OHdG-Addukt-Bestimmung mittels LC-MS/MS	48
3.4	Anreicherung, Quantifizierung und Charakterisierung lokalisierter Mutationen....	52
3.4.1	Allgemeines	52
3.4.2	Isolierung und Quantifizierung genomischer DNA	52
3.4.2.1	DNA-Isolierung.....	52
3.4.2.2	DNA-Quantifizierung.....	53
3.4.2.3	DNA-Ethanol-fällung	53
3.4.3	Restriktionsanalyse	53
3.4.4	Agarosegelelektrophorese	54
3.4.5	Polymerasekettenreaktion.....	55
3.4.5.1	Protokoll zur Anreicherung von Punktmutationen am Codon 248 des <i>p53</i> -Gens	58
3.4.5.2	Protokoll zur Anreicherung von Punktmutationen im Codon 12 des <i>K-ras</i> -Gens	62
3.4.5.3	Protokoll zur Anreicherung der Translokation t(14;18).....	67
3.4.5.4	Berechnung der Mutationshäufigkeit	69
3.4.6	Auftragssequenzierung von PCR-Produkten.....	69

4	Ergebnisse	70
4.1	Anreicherung und Quantifizierung von Mutationen mit PCR-Methoden	70
4.1.1	Einflüsse auf die Amplifikationseffizienz und -genauigkeit	70
4.1.2	Genotypische Selektion von Punktmutationen am Codon 248 des Gens <i>p53</i>	74
4.1.3	Genotypische Selektion von Punktmutationen am Codon 12 des <i>K-ras</i> -Gens	75
4.1.4	Genotypische Selektion der Translokation t(14;18)	76
4.1.5	Bestimmung der Mutationshäufigkeit	76
4.1.6	Charakterisierung der angereicherten Mutationen	78
4.2	Behandlung von MCL-5-Zellen mit direkt wirksamen Mutagenen	80
4.2.1	Mutagenese mit MNNG	80
4.2.1.1	Cyto- und genotoxische Effekte	80
4.2.1.2	Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit MNNG	81
4.2.1.3	MNNG-induzierte Basenaustausch-Mutationen	82
4.2.2	Mutagenese mit BPDE	84
4.2.2.1	Cyto- und genotoxische Effekte	84
4.2.2.2	Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit BPDE	85
4.2.2.3	BPDE-induzierte Basenaustausch-Mutationen	86
4.3	Behandlung von MCL-5-Zellen mit indirekt wirksamen Mutagenen	87
4.3.1	Mutagenese mit BaP	87
4.3.1.1	Cyto- und genotoxische Effekte	87
4.3.1.2	Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit BaP	88
4.3.1.3	BaP-induzierte Basenaustausch-Mutationen	89
4.3.2	Mutagenese mit PhIP	91
4.3.2.1	Cyto- und genotoxische Effekte	91
4.3.2.2	Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit PhIP	92
4.3.2.3	PhIP-induzierte Basenaustausch-Mutationen	92
4.3.3	Mutagenese mit NNK	94
4.3.3.1	Cyto- und genotoxische Effekte	94
4.3.3.2	Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit NNK	95
4.3.3.3	NNK-induzierte Basenaustausch-Mutationen	96
4.4	Behandlung von menschlichen Zellen mit Mutagengemischen	98
4.4.1	Exposition mit verdünntem Nebenstromrauch von Zigaretten (ADS)	98
4.4.2	Mutagenese mit CSC	99
4.4.2.1	Cyto- und genotoxische Effekte	99

4.4.2.2	Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit CSC	101
4.4.2.3	CSC induzierte Basenaustausch-Mutationen	102
5	Diskussion.....	104
5.1	Expositionssystem und Bestimmung der Messgrößen.....	104
5.1.1.	Verwendung von MCL-5-Zellen.....	104
5.1.2	Bestimmung der Cytotoxizität (Feststellung von Veränderungen der Zellproliferation)	105
5.1.3	Feststellung induzierter DNA-Strangbrüche mit dem Comet-Test.....	106
5.1.4	8OHdG-Adduktkonzentrationen	107
5.1.5	Mutationsnachweis	108
5.1.5.1	Translokation t(14;18)	109
5.1.5.2	Punktmutationen im Codon 12 des <i>K-ras</i> -Gens und im Codon 248 des <i>p53</i> -Gens	110
5.2	Diskussion der Ergebnisse anhand der einzelnen Stoffklassen.....	112
5.2.1	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	112
5.2.1.1	Cytotoxische und genotoxische Effekte	113
5.2.1.2	Induzierte Mutationshäufigkeiten und Basenaustausch-Typen.....	114
5.2.2	Heterozyklische aromatische Amine	116
5.2.2.1	Cytotoxische und genotoxische Effekte	116
5.2.2.2	Induzierte Mutationshäufigkeiten und Basenaustausch-Typen.....	116
5.2.3	N-Nitrosoverbindungen.....	117
5.2.3.1	Cytotoxische und genotoxische Effekte	118
5.2.3.2	Induzierte Mutationshäufigkeiten und Basenaustausch-Typen.....	119
5.2.4	Tabakrauch.....	121
5.2.4.1	Cytotoxische und genotoxische Effekte	121
5.2.4.2	Induzierte Mutationshäufigkeiten und Basenaustausch-Typen.....	122
5.3	Durch Chemikalien induzierte DNA-Läsionen.....	123
5.3.1	Häufigkeit der Translokation t(14;18)	124
5.3.2	Basenaustausch-Mutationen am <i>p53</i> Codon 248	125
5.3.3	Basenaustausch-Mutationen am <i>K-ras</i> Codon 12	126
6	Zusammenfassung	127
7	Literatur	130

Abkürzungsverzeichnis

A:	Adenin
8OHdG:	8-Hydroxy-2'-deoxy-Guanosin
ADS:	Aged and Diluted Sidestream Smoke
AGT:	O ⁶ -Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase
araC:	Cytosin-Arabinosid
AS:	Aminosäure
BaP:	Benzo[a]pyren
BPDE:	Benzo[a]pyren-Diolepoxid
C:	Cytosin
cDNA:	komplementäre DNA (engl.: copy DNA)
CSC:	Zigarettenrauchkondensat (engl.: Cigarette smoke condensate)
CYP:	Cytochrom P450 Enzymkomplex
DNA:	Desoxyribonukleinsäure (engl.: Deoxyribonucleic Acid)
dNTP:	Deoxynukleosid-Triphosphat
DMSO:	Dimethylsulfoxid
ECD:	Elektrochemischer Detektor
ETS:	tabakrauchbelastete Umgebungsluft (engl.: Environmental Tobacco Smoke)
fw:	in Richtung des Sinnstranges (engl.: forward)
G:	Guanin
GAP:	GTPase aktivierendes Protein
GDP:	Guanosindiphosphat
GTP:	Guanosintriphosphat
HAA:	Heterozyklische aromatische Amine (engl.: Heterocyclic Aromatic Hydrocarbons)
HPB:	4-Hydroxy-1-(pyridyl)-1-butanon
HPLC:	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HU:	Hydroxyharnstoff (engl.: Hydroxyurea)
LC-MS/MS:	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie mit 2 Massenspektrometern zur Detektion
mEH:	mikrosomale Epoxidhydrolase
MF:	Mutationsfrequenz
MNNG:	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin

Mut:	Mutante
NNK:	4-(N-Nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (engl.: Nicotine-derived N-nitrosoketone)
PAH:	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (engl.: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)
PBS:	phosphatgepufferte Saline (engl.: Phosphate Buffered Saline)
PCR:	Polymerasekettenreaktion (engl.: Polymerase Chain Reaction)
PhIP:	2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin
re:	in Richtung des komplementären Stranges (engl.: reverse)
RFLP:	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RSM:	Restriktionsstellenmutation (engl.: Restriction Site Mutation)
T:	Thymin
WT:	Wildtyp

1 Einleitung und Problemstellung

Krebs ist heute eine der häufigsten Todesursachen weltweit. Dabei stellt die Krebsentstehung einen Mehrstufenprozess dar, der sich in die Initiation, d.h. der Schädigung der Molekularstruktur und Induzierung von Mutationen durch Wechselwirkungen der DNA mit Cancerogenen, die Promotion, der Vermehrung der initiierten Zellen, und die Progression, der Umwandlung der initiierten Zellen in maligne Neoplasmen und Tumoren, einteilen lässt. Bei dem Mehrstufenprozess der Cancerogenese durchlaufen vermehrungsfähige (proliferationskompetente) Zellen eine Reihe von Veränderungen, denen Modifikationen in der Struktur und Expression verschiedener Gene zu Grunde liegen, und an deren Ende die Ausprägung maligner Phänotypen steht. Dabei sind die malignen Zellen durch genetische Instabilität und phänotypische Heterogenität gekennzeichnet. Sie sind daher nur bedingt geeignet, um an ihnen diejenigen Veränderungen eindeutig ablesen zu können, die für die maligne Transformation ihrer Ursprungszelle verantwortlich waren. Die Anzahl der Schritte der Cancerogenese und ihre molekularen Charakteristika, vor allem die jeweils kausal beteiligten Gene und Genprodukte, sind aus diesem Grund nur bruchstückhaft bekannt. Mindestens zwei Kategorien von Genen sind heute bekannt, die bei der malignen Transformation der Zelle eine wichtige Rolle spielen: Proto-Onkogene und Tumorsuppressorgene. Proto-Onkogene sind Gene, deren unkontrollierte Expression, Expression in veränderter Form oder Überexpression, beispielsweise in Folge einer Änderung der Basensequenz (Mutation) oder einer Vermehrung der Anzahl der Genkopien (Gen-Amplifikation) die maligne Transformation begünstigen. Gegensinnig zu diesen Proto-Onkogenen begünstigt im Falle der Tumorsuppressorgene die Ausschaltung eines Gens eine maligne Transformation der Zelle [1].

Bei der Initiation des Cancerogeneseprozesses spielen chemisch induzierte DNA-Schäden eine wesentliche Rolle. Bei einer Exposition mit Cancerogenen ist es deshalb interessant, ob bestimmte Mutagene spezifische und wiedererkennbare Veränderungen hervorrufen. Um einen kausalen Zusammenhang zwischen Chemikalienexposition und Entstehung von Mutationen bis hin zur Krebsfrüherkennung zu ermöglichen, ist es notwendig, einen geeigneten Marker zu finden, der möglichst in allen Fällen und bereits früh auf allen Stufen der Krebsentstehung zugegen ist.

Ein sogenannter Biomarker muss außerdem weitere Anforderungen erfüllen. Er sollte relevant für die Tumorentstehung und die Ganzkörperexpositionen sein; die

Probengewinnung sollte leicht erfolgen können, und er sollte zudem stabil und ein Indikator für gehäufte Expositionen sein [2,3]. Dabei ist die DNA-Schädigung von zahlreichen anderen Faktoren wie der Exposition an sich, der Absorption und des Metabolismus der Cancerogene, sowie der DNA-Reparatur abhängig. Ein endgültiges Ziel ist es, typische, chemisch induzierte DNA-Schäden in leicht zugänglichen Zellen und Geweben von Probanden nachzuweisen und gegebenenfalls einen quantitativen Zusammenhang mit der erfolgten Schadstoffexposition zu zeigen.

In dieser Arbeit bestand die Aufgabe darin, Nachweismethoden für ein Auftreten von DNA-Schäden zu etablieren und einen Zusammenhang zwischen einer Chemikalien-Exposition und den beobachteten Effekten zu untersuchen.

Die Untersuchungen sollten in einem *in vitro*-System durchgeführt werden, der metabolisch kompetenten, menschlichen lymphoblastoiden Zelllinie MCL-5 [4]. Die Exposition der Zellen sollte mit einigen bekannten experimentellen Mutagenen, Umweltcancerogenen und Tabakrauchmutagenen erfolgen: Als Vertreter der PAH BaP und dessen ultimales Cancerogen BPDE, als heterozyklisches aromatisches Amin PhIP, als N-Nitrosoverbindungen MNNG und NNK und ein komplexes Gemisch, Zigarettenrauchkondensat. In dieser Arbeit sollten folgende genetische Veränderungen krebsrelevanter Gene untersucht werden:

- (1) Ein Onkogen, bei dem eine Veränderung zu einer Überexpression des Gens führt - die Chromosomentranslokation t(14;18), durch die die Expression des bcl-2-Onkogens verändert wird.
- (2) Ein Onkogen, bei dem eine Mutation zur Produktion eines veränderten Proteins führt - Punktmutationen im Codon 12 des K-*ras*-Onkogens, durch die das Onkogen aktiviert wird.
- (3) Ein Tumorsuppressorgen, bei dem eine Mutation in beiden Kopien eines diploiden Organismus zum vollständigen Ausfall des Proteins führt - Punktmutationen im Codon 248 des Tumorsuppressorgens *p53*, durch die die Aktivität des P53-Proteins als Transkriptionsfaktor beeinträchtigt wird.

Bei den Mutationen (2) und (3) handelt es sich um sogenannte Hotspots, d.h. Codons der jeweiligen Gene, die besonders oft von Mutationen betroffen sind, wie anhand von Mutationsspektren (Verteilung von Mutationstypen und -stellen in gegebenen DNA-Sequenzabschnitten) festgestellt wurde [5]. Die Mutation im Gen *p53* Codon 248 ist beispielsweise eine der häufigsten Mutationen im *p53*-Gen und besonders bei Darmkrebs und auch Lungenkrebs vorhanden. Mutationen im K-*ras*-Gen werden in

Adenocarcinomen des Dickdarms immer gefunden, sind aber auch bei Lungenkrebs häufig. Das dabei am häufigsten im *K-ras*-Gen betroffene Codon ist das Codon 12. Die Translokation t(14;18) tritt besonders häufig beim bösartigen Lymphknotenkrebs auf [6]. Bei allen drei Mutationen nimmt man einen Zusammenhang zwischen Schadstoffexposition und Entstehung der Mutationen an, sodass eine genaue Untersuchung auch im Hinblick auf die Verwendung dieser Mutationsuntersuchungen als Biomarker interessant ist.

Da Mutationen seltene Ereignisse sind, musste in dieser Arbeit mutierte DNA gegenüber den entsprechenden in erheblichen Überschuss vorhandenen Wildtypsequenzen angereichert werden. Der Nachweis der Mutation (1), der Chromosomentranslokation, erfolgte durch eine nested PCR, einer selektiven Amplifikation, die durch die bei der Umlagerung entstandenen Sequenzen möglich ist [7,8]. Für die Selektion von Punktmutationen (im *K-ras* und *p53*-Gen) wurde die als Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-PCR (RFLP-PCR) oder Restriktionsstellen-Mutation-PCR (RSM-PCR) bezeichnete Methode gewählt. Bei dieser Methode werden vorhandene oder eingeführte Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme dazu genutzt, solche Matrizen zu spalten, die an dieser Stelle unverändert (Wildtypsequenzen) sind. Wenn Mutationen an diesen Stellen vorliegen, tritt auf Grund der veränderten Sequenz ein nachweisbares Amplifikat auf [9,10].

Als Hinweise auf genotoxische Wirkungen werden Effekte an der DNA verwendet, die einer Mutation vorausgehen oder sie begleiten können. Zur ersten Gruppe gehören etwa die kovalente Bindung von Substanzen an die DNA und induzierte DNA-Strangbrüche, zur zweiten die DNA-Reparatursynthese und der Schwesterchromatidenaustausch.

In dieser Arbeit sollten genotoxische Schäden als induzierte DNA-Strangbrüche mit Hilfe des Comet-Tests, der mit dieser Arbeit etabliert werden sollte, ermittelt werden [11]. Die Ergebnisse der Mutationsanalyse und des Comet-Tests sollten verglichen werden und die Bewertung als Biomarker für eine Exposition mit Chemikalien erfolgen [12]. Außerdem sollte ein DNA-Addukt, das 8-Hydroxy-Guanosin (8OHdG), nach Exposition mit einem komplexen Mutagengemisch in dem *in vitro*-System ermittelt und eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit untersucht werden.

Weiterhin sollte die genotoxische Wirkung von verdünntem Nebenstromrauch mittels Comet-Test an Bronchialepithelzellen von Menschen in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer Institut, Hannover, untersucht werden.

2 Grundlagen

2.1 Mutagenese und Cancerogenese

Mutationen können durch Mutagene künstlich erzeugt (induziert) werden. Der Mechanismus der chemischen Mutagenese beinhaltet eine Modifikation der DNA, gefolgt von fehlerhafter Reparatur oder Replikation [13]. Als Mutagene können Strahlen, chemische Substanzen, aber auch Viren wirken. Sie können die Mutationshäufigkeit und durch die hohe Korrelation zwischen mutagener und cancerogener Wirkung ebenfalls die Tumorfrequenz erhöhen. Unter der Cancerogenese versteht man den Prozess, bei dem es z.B. infolge der Einwirkung chemischer Krebsrisikofaktoren zur unkontrollierten und ungeordneten Neubildung von Gewebe (Neoplasie) kommt. Neoplasien umfassen sowohl benigne (gutartige) als auch maligne (bösartige) Tumoren.

Krebserzeugende Substanzen können durch Mutationen in bestimmten Genen die Umwandlung von normalen Zellen in Krebszellen auslösen oder beschleunigen [14].

2.1.1 Stufen der Krebsentstehung

Krebs entsteht nicht wie manche andere Krankheit unvermittelt und als Folge eines einmaligen Ereignisses. Der mehrstufige Vorgang der Krebsentstehung beginnt mit dem Auftreten von Fehlern in der molekularen Steuerung der betroffenen Zellsysteme, lange bevor eine Tumorerkrankung diagnostizierbar wird. Oftmals ist dabei das zelluläre Fehlverhalten auf Wechselwirkungen der Zellen mit cancerogenen Umweltfaktoren zurückzuführen [1].

Bei der Krebsentstehung müssen zwei Aspekte berücksichtigt werden. Die Exposition des Individuums mit chemischen Substanzen aus Nahrung und Umwelt, auf die die Mehrzahl der menschlichen Tumore zurückgeführt wird und die genetische Prädisposition eines Individuums [15,16].

Dabei geht die Entstehung von Tumoren nach heutiger Vorstellung von einer einzelnen veränderten Zelle aus mit dem Ergebnis der klonalen Proliferation. Dieser Vorgang kann sich über Jahrzehnte hinziehen, wodurch die Bildung von Tumoren mit dem Alter stark ansteigt [1,17].

Das Mehrstufenmodell der Krebsentstehung unterteilt diesen Prozess in Initiation, Promotion, Progression und Metastasierung (siehe Abb. 2.1). Die Initiation umfasst die

direkten Auswirkungen von cancerogenen Substanzen auf die DNA, wodurch Mutationen und veränderte Genexpressionen hervorgerufen werden können. Dies kann dazu führen, dass die Zellen weniger auf Inhibitoren (negative Wachstumsfaktoren) oder programmierten Zelltod reagieren und es so zur Zellproliferation kommt. Die Tumorpromotion ist in einer frühen Phase reversibel und wird als Vermehrung der initiierten Zellen angesehen. Während dieses Prozesses erscheinen progressive phänotypische Veränderungen und genomische Instabilitäten (Aneuploidie, Mutationen, Genamplifikationen). Diese genetischen Veränderungen werden an die Tochterzelle weitergegeben und erhöhen die Wahrscheinlichkeit der Umwandlung der initiierten Zellen in maligne Neoplasmen, die zu Tumoren heranwachsen können. Diese Stufe wird die Tumorprogression genannt. Schließlich können sich die Tumorzellen durch die Blut- und Lymphbahnen ausbreiten, auf entferntes Gewebe übergreifen und dort Metastasen bilden [18,19].

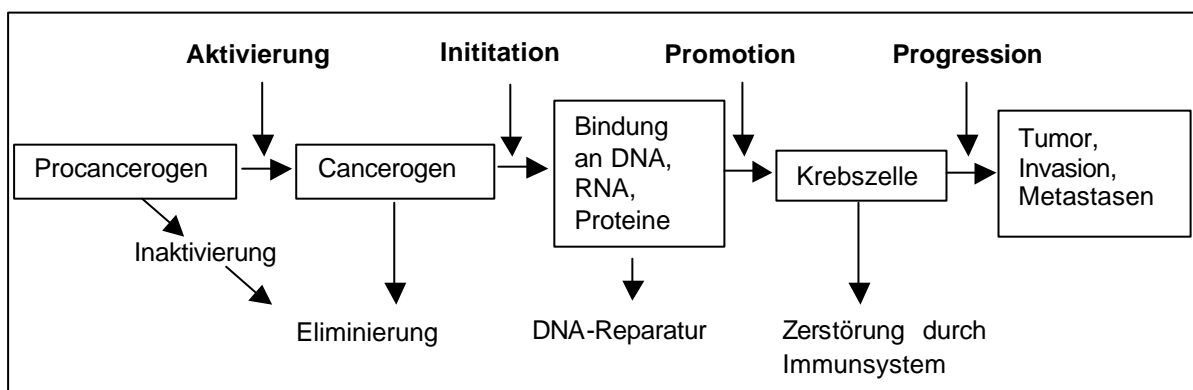


Abbildung 2.1: Stufen der Krebsentstehung

Die Untersuchungen der letzten Jahre haben eine Vielzahl von Genen aufgedeckt, deren Veränderung dazu führt, dass die Zellen krebsartig entarten. Man unterscheidet zwei Gruppen von Genen, die eine wichtige Rolle bei der Krebsentstehung spielen. Zum einen sogenannte Onkogene, die nach einer Mutation oder einer Expressionsstörung eine neoplastische Proliferation herbeiführen. Zur Abgrenzung wurden die nicht mutierten Gene Proto-Onkogene genannt; sie fungieren als Wachstums- und Differenzierungsregulatoren. Zum anderen Tumorsuppressorgene, die ebenfalls bei der normalen Zellteilung und Differenzierung mitwirken. Bei ihnen kann ein Verlust oder die Inaktivierung zu neoplastischen Veränderungen führen.

Prinzipiell unterscheidet man heute drei genetische Veränderungen, die Zellen auf den Weg von der Normalzelle zur Tumorzelle führen:

1. Die vermehrte Produktion eines Onkoproteins, z.B. indem das Onkogen unter die Kontrolle eines starken Promotors gerät oder indem es in der Zelle selektiv amplifiziert wird, also in einer größeren Kopienzahl vorliegt als die anderen Gene (z.B. bei der Translokation t(14;18)).
2. Die Produktion eines veränderten Proteins, das neue Eigenschaften besitzt (z.B. *ras*).
3. Der vollständige funktionelle Ausfall eines Proteins. Das bedeutet in einem diploiden Organismus den Ausfall beider Kopien eines Gens (z.B. *p53*).

Da bei einer Fusion von Zellen, die durch Gene der ersten beiden Gruppen transformiert sind, mit den entsprechenden nichttransformierten Zellen, das Hybrid im allgemeinen den transformierten Phänotyp zeigt, bezeichnet man die Onkogene der ersten beiden Gruppen als dominante Onkogene [20]. Entsprechend werden die Gene der dritten Gruppe als rezessive Onkogene oder als Tumorsuppressorgene bezeichnet, da hier erst der homozygote Verlust (bzw. Mutation) zur neoplastischen Zelltransformation führt [21].

In keinem Fall weiß man im einzelnen, wie die veränderte Struktur oder Expression des Onkogens zur Transformation der Zellen führt; bestenfalls kennt man biochemische Funktionen, die verändert sind. Es ist sehr wahrscheinlich, dass diese Veränderungen in dem Onkoprotein (oder seine verstärkte Expression) zu einer Vielzahl sekundärer Veränderungen in der Zelle führen, die die Zelle unkontrolliert wachsen lassen. Die Komplexität der Situation wird durch den Befund erhöht, dass zur Transformation primärer Zellen in vielen Fällen nicht ein Onkogen, sondern zwei oder sogar mehr Onkogene eine Rolle spielen [13].

2.1.2 Tumorsuppressorgen *p53*

P53, eines der bekanntesten Tumorsuppressorgene, benannt nach seinem Molekulargewicht von ca. 53 kDa (bestehend aus 11 Exons mit 393 Aminosäuren) besitzt besondere Relevanz, da es eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle des Zellwachstums spielt. In mehr als der Hälfte aller menschlichen Tumore können Mutationen in diesem Gen nachgewiesen werden [22,23].

Tumorsuppressorgene sind Gene, die für Proteine codieren, die eine negative Regulationsfunktion im Zellzyklus haben. Wird diese Regulationsfunktion beeinträchtigt oder ganz aufgehoben, kommt es zur ungehemmten Proliferation der betroffenen Zellen und mit großer Wahrscheinlichkeit zur Entwicklung von Tumoren.

Das Tumorsuppressorgen *p53* codiert für ein nukleäres Phosphorprotein, welches eine Vielzahl biochemischer Aktivitäten besitzt (siehe Abb. 2.2). So ist es unter anderem an der Gentranskription, der DNA-Reparatur, der Zellzyklus-Kontrolle, der genomischen Stabilität und der Apoptose beteiligt [24,25]. Diese unterschiedlichen biochemischen Aktivitäten lassen sich funktionellen Domänen von *p53* zuordnen. Der N-terminale Bereich (AS 1-100, Exon 2-4) zeichnet sich durch eine Anhäufung von sauren Aminosäuren (AS) aus, dient als Transaktivator-domäne und besitzt transkriptionale Funktionen, die durch Mutationen zerstört werden. In dem basischen, C-terminalen Ende (AS 300-393, Exon 9-11) lassen sich die Oligomerisierungsdomäne, die nicht-sequenzspezifischen DNA- und RNA-Bindungsdomänen und die RNA/DNA-Reannealingdomäne lokalisieren. Die zentrale, hydrophobe Region (AS 100-300, Exon 5-8) enthält die sequenzspezifische DNA-Bindungsdomäne.

Die Mehrzahl der Mutationen (90%) liegt innerhalb dieses zentralen Bereichs, was auf eine wichtige Rolle dieser Regionen für die *p53*-Funktion hinweist. Diese „Missense“-Mutationen und Aminosäure-Substitutionen verschlüsseln, beeinträchtigen oder zerstören die Interaktion von P53-Protein mit der korrespondierenden Target-DNA-Sequenz und damit die durch P53 ausgelöste transkriptionale Aktivierung. Aminosäuren, die den direkten DNA-Kontakt vermitteln (AS 175, AS 248, AS 273) sind dabei besonders häufig von Mutationen betroffen, so dass heute davon ausgegangen wird, dass eine zentrale Funktion von P53 die eines Transkriptionsfaktors ist [23].

In der Zelle kommt P53 vorwiegend als Homotetramer vor, das mit vielen zellulären und viralen Proteinen spezifisch reagiert [26]. Normalerweise kommt das P53-Protein in sehr geringen Mengen vor (10^3 bis 10^4 Moleküle pro Zelle) und wird erst bei Schädigung der DNA stark akkumuliert. Seine Funktionen umfassen die Arretierung der Zellen in der G1-Phase (dies verhindert die ungezügelte Teilung der Zelle), den Einfluss auf die DNA-Synthese und -Reparatur und den programmierten Zelltod (Apoptose).

Entfällt durch eine Mutation im *p53*-Gen die wichtige G1-Arretierung, so wird die Zelle die entstandenen Fehler nicht rechtzeitig eliminieren können, und die Fehler werden über die mitotische Teilung in nachfolgende Zellgenerationen fortgeschrieben.

Neben der Arretierung in der G1-Phase besitzt P53 auch Checkpoint-Kontrolle in der S (während der DNA-Synthese/-Replikation) und in der G2/M-Phase (nach der DNA-Synthese) sowie bei der Einleitung der Apoptose. DNA-Strangbrüche werden von bestimmten Enzymen erkannt, wodurch eine katalytische Wirkung ausgelöst wird, im Falle der Atm-Kinase die Phosphorylierung von P53. Diese Phosphatgruppen schützen

P53 vor dem Kontakt mit der Protein-Abbau-Maschinerie und erhöhen dadurch die P53-Menge in der Zelle.

P53 ist nicht lebensnotwendig, allerdings zeichnen sich z.B. Mäuse mit *p53*-Defizienz durch eine dramatisch erhöhte Häufigkeit von Krebserkrankungen aus. Bei Menschen, die an dem autosomal dominant vererbten Li-Fraumeni-Syndrom leiden, ist von Geburt an eines der beiden *p53*-Allele durch Mutation inaktiviert. Betroffene Individuen entwickeln sich zunächst normal, zeigen aber später eine hohe Tumoranfälligkeit, wobei in allen Tumoren auch das zweite Allel von *p53* mutiert ist.

Der Verlust der Funktion des *p53*-Gens kann durch Punktmutationen oder Deletionen hervorgerufen werden. Fast ein Drittel der menschlichen *p53*-Mutationen sind Transitionen an bestimmten Codons (Hotspots) mit einer CpG-Stelle (Cytosin gefolgt von Guanin in der Sequenz z.B. im Codon 175, 196, 213, 248, 273, und 282) [5].

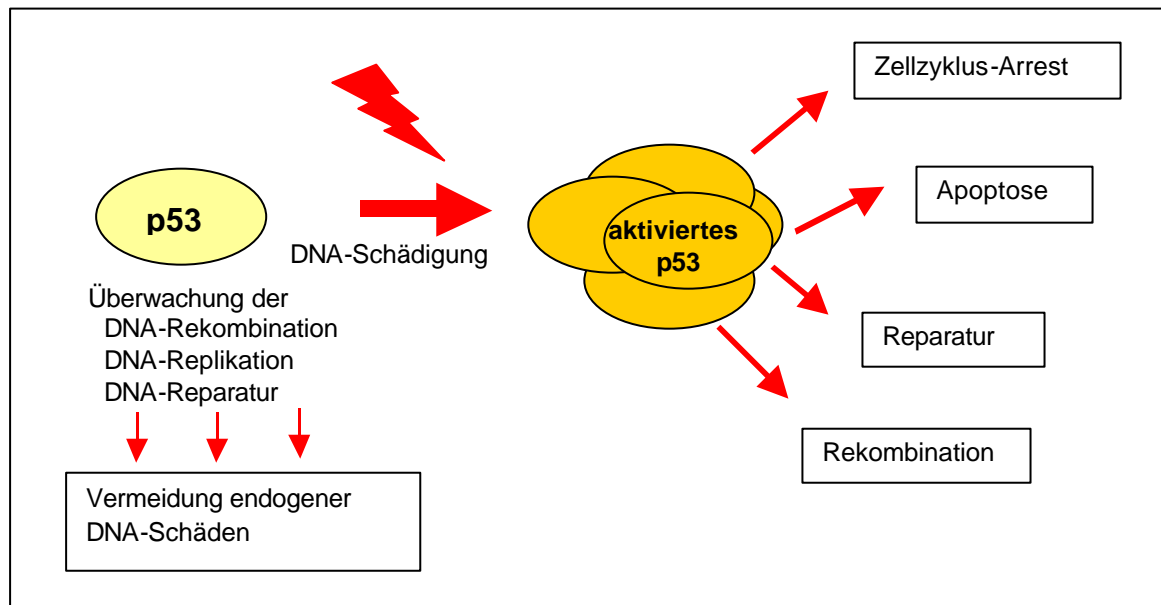


Abbildung 2.2: Rolle von *p53* als Wächter des Genoms [27]

2.1.3 Onkogen K-ras

Unter einem Onkogen versteht man ein dominant wirkendes krebsrelevantes Gen.

Unter mehreren Dutzend tumorrelevanten Genen ist die Familie der *ras*-Gene (benannt nach dem *rat sarcoma*, bei dem es entdeckt wurde) eine der am besten charakterisierten. Mutationen im *ras*-Gen können zur Produktion eines veränderten Proteins führen, welches neue Eigenschaften besitzt.

Zur Familie der *ras*-Onkogene zählen das *Hras* (*Harvey Murine Sacroma Virus*) auf dem menschlichen Chromosom 11, das *K-ras* (*Kirsten*) auf dem Chromosom 12 und das *N-ras* (*Neuroblastoma*) auf dem Chromosom 1.

Die drei Gene besitzen je vier codierende Exons, die zur Synthese sehr ähnlicher Proteine von 21 kD führen [28,29]. Diese Proteine sitzen auf der Innenseite der Zellmembran und sind mit dieser über Palmitinsäurereste verbunden. Sie binden GTP (Guanosin-5'-Triphosphat) und GDP (Guanosin-5'-Diphosphat) mit hoher Affinität und besitzen GTPase-Aktivität, die die GTP-Form des Proteins in die GDP-Form überführt. Die GTP-bindenden Proteine nehmen wichtige Schaltfunktionen zwischen extrazellulären Signalen und dem Zellinneren ein und existieren in zwei Zustandsformen: Haben sie GTP gebunden, sind sie aktiv, haben sie GDP gebunden, sind sie inaktiv (siehe Abb. 2.3). Das aktivierte *ras*-Protein kann ein weiteres Protein stimulieren, das *raf-1* Protein. Dieses *raf-1* Protein kann dann eine Reihe von Kinasen (MAP (mitogen-activated protein)-Kinasen) phosphorylieren, die wiederum verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphorylieren, welche dann in den Zellkern eindringen und das Signal übermitteln können.

Die GTPase-Aktivität ist von der Bildung des GTPase-aktivierenden Proteins (GAP) abhängig, welches das *ras*-Gen reguliert. Wenn aus irgendeinem Grund zu viel *ras* in der GTP-Form in der Zelle vorliegt und dieses dann, da die Signaltransduktion eingeschaltet ist, transformierend wirkt, hemmt die Überexpression von *ras*-GAP die transformierende Wirkung von *ras*-GTP. Bei mutierten *ras*-Proteinen kann GAP die GTPase-Aktivität nicht aktivieren, wodurch die onkogene Form des *ras*-Proteins die Eigenschaft GTP zu binden behält, aber nicht mit GAP reagiert, wodurch sie nicht in die inaktive GDP-gebundene Form überführt werden kann und weiter Signale überträgt, die zur Zellproliferation führen [13].

Die Mechanismen zur Aktivierung von *ras*-Onkogenen umfassen Punktmutationen, DNA-Rearrangements, Gen-Amplifikationen und Promotor-Insertionen. Die Mutationsstellen sind beim *ras* auf die Codons 12, 13 und 61 beschränkt, die in der Nähe des Bereiches

liegen, der für die GTP/GDP-Bindungsstelle codiert. Es handelt sich dabei um Basenaustausche [30].

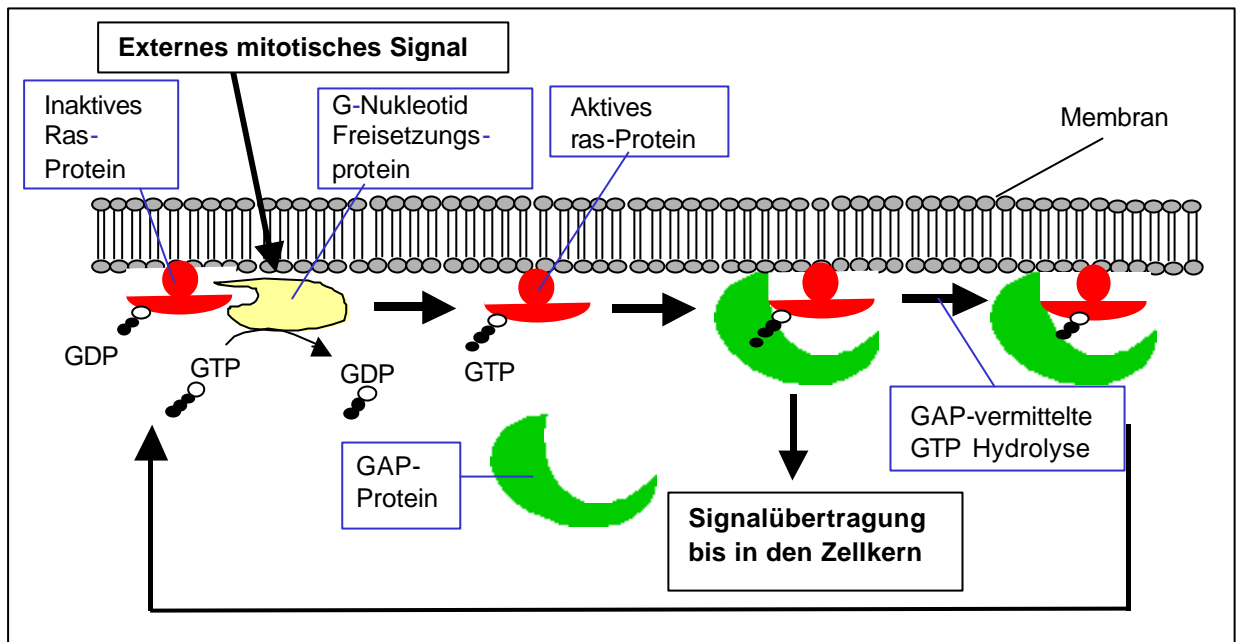


Abbildung 2.3: Mechanismus der Signalübertragung durch *ras* [31]

Wie in vielen Tierversuchen festgestellt wurde, ist die *K-ras* Mutation bei vielen Krebsarten ein frühes Ereignis im Mehrstufenprozess der Cancerogenese wie z.B. Colorectal- und Pankreascarcinomen [32,33].

In etwa 15 % aller menschlicher Tumore liegen *ras*-Mutationen vor. Etwa 50 % der Adenome und Adenocarcinome des Dickdarms enthalten mutiertes *K-ras*, bei den anderen 50 % ist unklar, ob ein anderes Protein diese Aufgabe übernimmt. Zudem ist unklar, zu welchem Zeitpunkt der Entwicklung des Dickdarmkarzinoms es zur Mutation im *ras*-Gen kommt [34].

Fast 100 % der Adenocarcinome des Pankreas zeigen Mutationen im *K-ras*-Gen, 50 % der Schilddrüsenkarzinome zeigen Mutationen in einem der drei *ras*-Gene und ein hoher Prozentsatz der Krebszellen von Patienten mit myeloischer Leukämie zeigen Mutationen im *N-ras*-Gen. Lungentumore weisen etwa 30 % *ras*-Mutationen auf.

Die am häufigsten aktivierte Position vom *K-ras* Gen in menschlichen Tumoren wurde im Codon 12 gefunden [35].

2.1.4 Translokation t(14;18)

Unter einer Translokation versteht man die oft reziproke Umlagerung von Teilen eines Chromosoms auf ein anderes.

Bei der Translokation t(14;18) entsteht eine Fusion zwischen den Immunglobulin-Schwerketten-Genen auf Chromosom 14 (Position: q32) und dem *bcl-2*-Onkogen auf Chromosom 18 (Position: q21). Siehe Abb. 2.4.

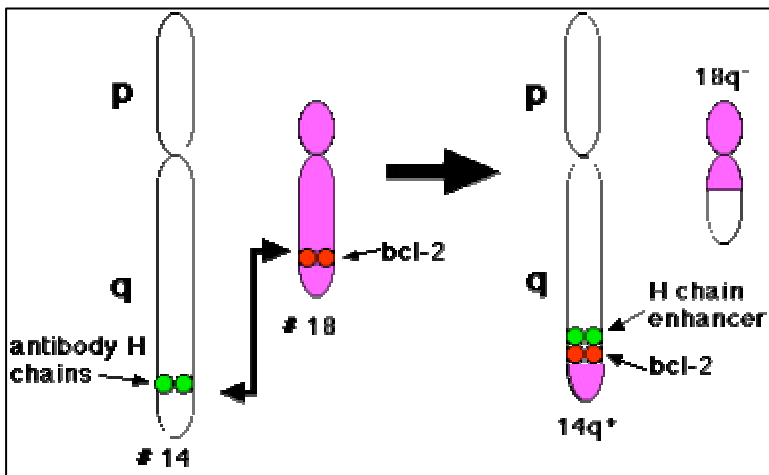


Abbildung 2.4: Translokation t(14;18) nach [8]

Bei dieser Gen-Translokation kommt das normalerweise schwach exprimierte *bcl-2*-Onkogen in den Einflussbereich eines aktivierenden Regulators und das Onkogen wird übermäßig aktiviert. Dies führt zu einer vermehrten Produktion des *bcl-2*-Proteins.

Der Name des *bcl-2* Onkogens kommt von der B-Zell-Leukämie, bei der es entdeckt wurde. Das *bcl-2*-Gen codiert für ein Membran-Protein in der Mitochondrienmembran sowie in der Membran des endoplasmatischen Reticulums.

Wie der Name sagt, wird *bcl-2* in den B-Zellen exprimiert. Diese sind neben den T-Zellen für die Immunantwort verantwortlich. Diese Zellen reifen entweder im Knochenmark (B) oder im Thymus (T) und ergeben naive Lymphocyten, die in den lymphatischen Organen durch Kontakte mit Antigenen zu Effektorzellen werden. B-Zellen synthetisieren in hohem Maße Antikörper und werden danach durch Apoptose eliminiert.

Normalerweise wirkt das *bcl-2*-Gen zusammen mit einigen anderen Proto-Onkogenen (*c-myc*, *ras*) gegen den programmierten Zelltod, d.h. es unterdrückt oder verzögert die Apoptose, z.B. bei Hitzeschock oder Strahlung. Durch eine vermehrte Produktion des *bcl-2*-Proteins wird der Zelltod der B-Zellen durch Verhinderung der Apoptose gestoppt. Dies führt zu einem hohen Bestand an B-Zellen, wodurch die Lymphknoten in starkem Maße anschwellen und auf andere Organe drücken können. Zudem können Zellen mit

Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen weiterbestehen, was zu Lymphomen führen kann.

Die Translokation t(14;18) tritt bei einem hohen Anteil der Fälle von Non-Hodgkin-Lymphom (NHL), einem bösartigen Lymphknotenkrebs, als ein Fehler der Rekombinase auf. Sie tritt in 85 % der folliculären Lymphome und in 30 % der diffusen Großzell-Lymphome auf [36].

Translokationen können als Marker für maligne Klone verwendet werden, um nach Therapien eine minimale residuale Erkrankung frühzeitig anzuzeigen. Die Translokation t(14;18) kann in geringem Ausmaß auch bei gesunden Personen festgestellt werden. Die Häufigkeit der Translokation t(14;18) nimmt mit dem Alter zu [2,36] und ist bei starken Rauchern erhöht [37]. Sie könnte somit einen Biomarker für genotoxische Exposition darstellen.

2.1.5 8-Hydroxy-2'-deoxy-Guanosin (8OHdG)

Von einer C⁸-Oxidation im Guanin-Molekül wurde erstmals 1984 berichtet, als Kasai und Mitarbeiter ein Guanin-Derivat zu einer erhitzten Glucose-Lösung gaben [38].

Exogene und endogene Oxidantien können oxidative Schäden an nuklearer und mitochondrialer DNA bewirken [39,40]. In menschlicher und tierischer DNA ist gewöhnlich eine große Anzahl oxidativer DNA-Läsionen vorhanden. Eine dieser Läsionen, das 8OHdG, kann zu Basenmisspaarungen (Mutationen) bei der DNA-Replikation führen [41], was wiederum eine Aktivierung von Proto-Onkogenen zur Folge haben kann [42,43].

Die Zellen eines Organismus verfügen über eine Reparaturkapazität, die normalerweise ausreicht, die Effekte des „normalen“ Levels an oxidativen Schäden zu eliminieren. Oxidative DNA-Schäden erscheinen direkt durch die Interaktion von Sauerstoffradikalen mit verschiedenen Gruppierungen der DNA-Helix oder indirekt durch die Aktivierung von Endonukleasen. Sauerstoffradikale, die die Integrität der DNA stören können, entstehen zum Beispiel durch freigesetzte Peroxide bei der Lipidoxidation. Diese Peroxide entstehen beim Abbau von Fetten während des normalen Verdauungsprozesses [42], also endogenen Zellmetabolismen. Sauerstoffradikale entstehen aber auch durch Chemikalien, Drogen, Strahlung und Sonnenlicht [44]. Die Zahl an oxidativen Treffern auf die DNA wird mit über 10.000 pro Zelle pro Tag geschätzt. Obwohl die meisten dieser DNA-Schäden durch spezifische oder nicht-spezifische Reparaturmechanismen entfernt werden,

entgeht ein kleiner Teil dieser DNA-Läsionen der Reparatur und bildet ein wichtiges mutagenes Potential, welches sich mit dem Alter summieren soll [45,46].

2.1.6 Möglichkeiten zum Biomonitoring

Die Aufgaben des biologischen Monitorings (Biomonitoring) bestehen darin, gesundheitliche Risiken in Form von Chemikalienexpositionen am Arbeitsplatz, in der Freizeit sowie durch Ess-, Trink- und Rauchgewohnheiten aufzudecken, zu quantifizieren und bestmöglich zu verhüten. Für ein Biomonitoring ist die Auswahl des Biomarkers von entscheidender Bedeutung. Ein Biomarker kann ein Fremdstoff (oder sein Metabolit) im Organismus, ein Umsetzungsprodukt mit zellulären Bestandteilen (z.B. Protein- oder DNA-Addukte) oder ein biologischer Effekt sein (z.B. Chromosomenaberrationen oder Mutationen). Im Fall einer Exposition mit einem Cancerogen sollte sich ein geeigneter Biomarker auf dem kausalen Weg in dem mehrstufigen Prozess zwischen Exposition und Krebs befinden (siehe Abb. 2.5). So sollte die Präsenz, die Quantität und das Erscheinungsbild des Biomarkers mit der Wahrscheinlichkeit der malignen Transformation der Zelle oder des Gewebes korrelieren [3].

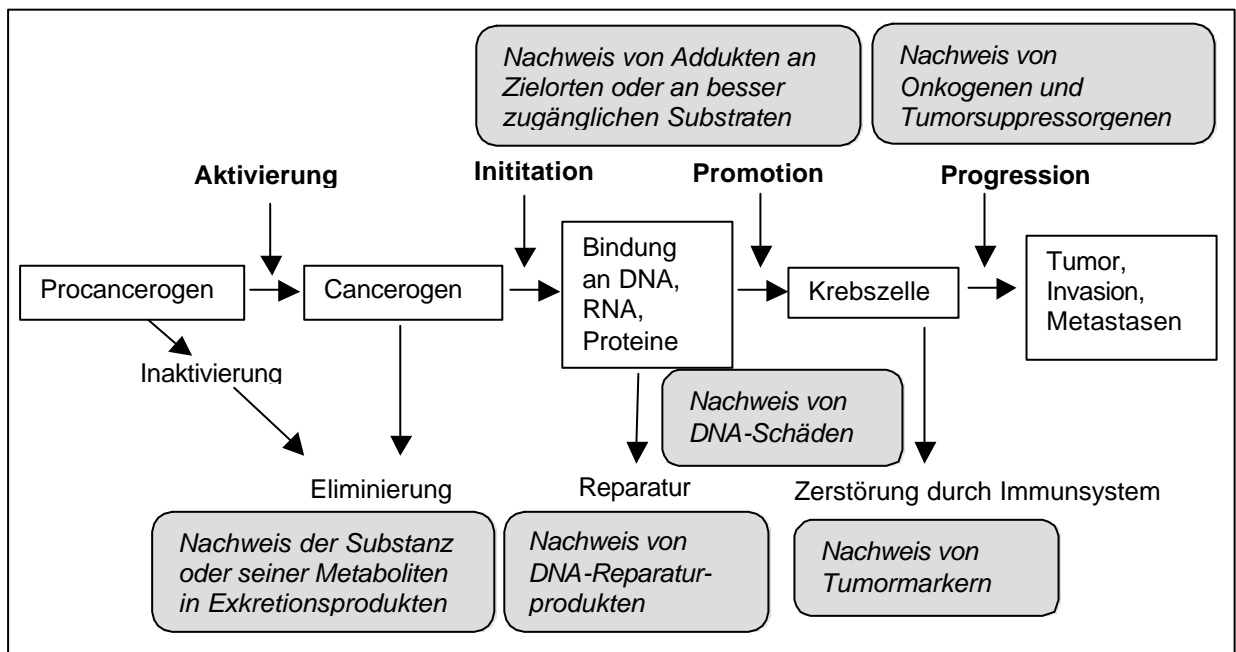


Abbildung 2.5: Biomarker in der Cancerogenese (graue Felder)

Als Hinweise auf genotoxische Wirkungen gelten u.a. DNA-Strangbrüche. DNA-Strangbrüche stellen ein frühes biologisches Ereignis im Cancerogenese-Prozess dar. Sie können durch chemische oder physikalische Einwirkungen entstehen. Einzel- und Doppelstrangbrüche sind die zelluläre Antwort auf die direkte Einwirkung von Mutagenen oder entstehen indirekt durch unvollständige Reparatur. Der Comet-Test stellt eine einfache und sensible Technik dar, um DNA-Strangbrüche zu ermitteln. Er wird zunehmend auch für das Human-Biomonitoring eingesetzt [12].

Chemische Substanzen (in aller Regel reaktive Metaboliten von aufgenommenen Substanzen) bilden DNA-Addukte durch kovalente Bindung an die DNA-Nukleotide. DNA-Addukte können zu Mutationen führen und damit zur malignen Entartung von Zellen zu Krebszellen beitragen. Sie können deshalb als biochemische Beanspruchungsmarker für die Prozesse von Mutagenese und Cancerogenese betrachtet werden [47]. Zum Beispiel liegt die Grundbelastung von Menschen mit PAH über Nahrung und Luft bei Adduktraten im Bereich von 1-10 Addukten auf 10^8 unveränderten Nukleotiden.

Erhöhte 8OHdG-Level wurden bei vielen Tierversuchen nach Expositionen mit UV-Strahlung, Asbest, BaP und vielem mehr gefunden. 8OHdG scheint daher ein geeigneter Marker für die Einschätzung oxidativer Schäden zu sein, da dieses Addukt nicht nur stabil in der isolierten DNA ist, sondern auch mit hoher Sensitivität durch HPLC-ECD und LC-MS/MS gemessen werden kann [38,48,49].

Ein guter Biomarker für Expositionen von Menschen mit Mutagenen muss einige Merkmale beinhalten: Relevanz für Tumorentstehung, leichte Probengewinnung sowie Relevanz für Ganzkörperexpositionen. Er sollte zudem stabil und ein Indikator für gehäufte Expositionen sein [2]. Auf DNA-Ebene können solche Biomarker Mutationen in Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen sein.

Die Translokation t(14;18) erfüllt einige der oben genannten Kriterien. Sie ist die häufigste Translokation in menschlichen Lymphoma und kann im Blut von Probanden nachgewiesen werden.

Mutationen im Tumorsuppressorgen *p53* sind die häufigsten genetischen Veränderungen in menschlichen Tumoren. Die Mutationen sind auf vier hochkonservierte Domänen konzentriert und dabei die meisten auf wenige Codons („Hotspots“). Von Mutationen im Codon 248, CGG, wurde in 114 von 1178 Tumoren mit *p53*-Mutationen berichtet. Sie erscheinen dabei hauptsächlich bei Darmkrebs [5,50]. Aus diesem Grund ist es interessant nachzuweisen, ob eine Beziehung zwischen dieser Mutation im Gen *p53* Codon 248 in

gesundem Gewebe und Mutagenexpositionen besteht und der Nachweis dieser Mutation eventuell für ein Biomonitoring einsetzbar ist.

Ein weiteres sehr gut charakterisiertes tumorrelevantes Gen ist das *K-ras*, welches somatisch mutiert in vielen menschlichen Krebsarten vorkommt. Da Mutationen in diesem Gen nur an drei „Hotspots“ (Codon 12, 13 und 61) auftreten und häufig und gut charakterisiert in Colorectal-, Pankreas- und Lungenkrebs vorkommen, sind molekulare Diagnosen und Risiko-Abschätzung besonders interessant [33].

Beim *K-ras* ist die am meisten aktivierte Position in menschlichen Tumoren das Codon 12. Die Detektion von *ras*-Mutationen könnte gerade bei Lungenkrebs als Marker dienen. Dort findet man sie zu 90 % in den Adenocarcinomen der Lunge, davon wiederum zu 80 % im Codon 12 [51].

2.2 Wirkmechanismen von Mutagenen

Mutagene Substanzen induzieren eine Vielzahl von Schäden, die den Cancerogenese-prozess durch Beeinflussung der Mutationsrate, der Wachstumsgeschwindigkeit und der Expression der Zelldifferenzierung in Gang bringen oder beschleunigen. Chemische Cancerogene können in zwei Gruppen klassifiziert werden, die genotoxischen und die nicht-genotoxischen Substanzen. Genotoxische Substanzen sind (meist nach metabolischer Aktivierung) chemisch reaktiv (elektrophil) und interagieren mit zellulären Makromolekülen, u.a. mit der DNA unter Addukt-Bildung, was zu Mutationen führen kann. Diese Mutationen können Proto-Onkogene aktivieren oder Tumorsuppressorgene inaktivieren. Bei genotoxischen Substanzen zeigt sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Adduktrate und Dosis über weite Konzentrationsbereiche. Bei nicht-genotoxischen Substanzen können eine Vielzahl von anderen Mechanismen zu permanenten Modifikationen des genetischen Materials auf Gen-, Chromosom- oder Genomlevel führen. Indirekte Mechanismen umfassen unter anderem Interaktionen mit Topoisomerasen, erniedrigte DNA-Replikationsgenauigkeit, Unausgewogenheit des Nukleotidpools, Interaktionen mit der Zellstruktur verbunden mit Chromosomen-spaltungen sowie Störung des Spindelapparates bei der Zellteilung [52].

Von besonderer Bedeutung sind genotoxische Substanzen, die in der Umwelt vorkommen. Halogenierte Substanzen, Nitrosamide und Nitrosoharnstoff sind direkte Cancerogene, da sie ohne metabolische Aktivierung chemisch reaktiv sind und mit zellulären Makromolekülen interagieren können. Sie kommen üblicherweise nicht in der Natur vor,

sondern werden in der chemischen Industrie oder als Chemotherapeutika verwendet. Umweltrelevante chemische (indirekte) Mutagene benötigen eine metabolische Aktivierung, d.h. eine Aktivierung in eine elektrophile Form, um mutagen wirken zu können [53,54]. Die meisten dieser oxidativen Reaktionen werden dem Cytochrom-P450-Enzymkomplex zugeschrieben. Die Komponenten des Cytochrom-P450-Enzymkomplex sind hauptsächlich an das endoplasmatische Retikulum gebunden [55]. Die Biotransformation spielt eine große Rolle in der mutagenen und cancerogenen Aktivität und der Organspezifität von Umweltmutagenen. Es ist bekannt, dass es große individuelle Unterschiede in der Biotransformation gibt, die heute nur zum Teil durch die genetischen Polymorphismen in Enzymen des Fremdstoffstoffwechsels erklärt werden können.

Die Konzentration des ultimalen Cancerogens, welches mit der DNA reagiert, wird durch das Gleichgewicht in der Aktivierungs- und Detoxifizierungsrate des Individuums für die betreffende Substanz bestimmt [56,57].

2.2.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Das in dieser Arbeit verwendete Mutagen Benzo[a]pyren (BaP) und sein Aktivierungs-Metabolit Benzo[a]pyren-Diolepoxid (BPDE) gehören zur Klasse der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAH), die hauptsächlich durch die unvollständige Verbrennung von organischem Material entstehen und dadurch seit Jahrtausenden in der Umwelt gegenwärtig sind [58]. Die PAH sind zudem in Abgasen von Verbrennungsmotoren enthalten und können bei der Pyrolyse von Aminosäuren, Fettsäuren, Kohlenhydraten, Lösungsmitteln und Wachs sowie beim Rösten von Kaffee entstehen. Des weiteren kommen PAH im Haupt- und Nebenstrom des Tabakrauchs sowie in gebratenen, gegrillten und geräucherten Lebensmitteln vor [14,59].

Die PAH müssen metabolisch in ultimale Cancerogene, dies sind reaktive elektrophile Substanzen, überführt werden, bevor sie toxisch und mutagen wirken können (siehe Abb. 2.6). Die metabolische Aktivierung der PAH besteht in der Epoxidierung der Dihydrodiole. Sie erfolgt im endoplasmatischen Retikulum und wird durch das Membran-gebundene Cytochrom-P450-System katalysiert. Hierbei zeigt das Isoenzym CYP1A1 neben CYP2C9 und CYP3A4 für große planare Substrate wie PAH die größte Spezifität [56,60]. Durch CYP1A1 wird aus Benzo(a)pyren das Benzo(a)pyren-7,8-Epoxid gebildet, welches wiederum ein gutes Substrat für die Epoxidhydrolase ist. Diese fungiert in diesem Fall als Aktivierungssystem, da der Metabolit, das *trans*-Dihydrodiol, erneut durch

Cytochrom P450-Isoenzyme epoxidiert werden kann [61,62]. Ein Stereoisomer des gebildeten Dihydrodiol-Epoxids gilt als das ultimale Cancerogen, welches dann mit der DNA reagiert.

Metabolisch aktivierte PAH führen zu DNA-Addukten, wobei das Diolepoxid sowohl mit dem Ringstickstoff als auch mit der NH₂-Gruppe von Guanin und Adenin reagieren kann. Essentiell für die genotoxische Wirkung ist die sogenannte Bay-Region des Moleküls [58]. Der ultimale cancerogene Metabolit von BaP, das anti-BPDE, bildet hauptsächlich Addukte mit der N²-Position von Guanin [63,64].

Die Häufung von DNA-Addukten ist abhängig von der Konzentration an vorhandenen ultimalen Cancerogenen und der DNA-Reparaturrate. DNA-Addukte verschiedener PAH lassen sich in praktisch allen Organen sowie den weißen Blutzellen und der Haut nachweisen.

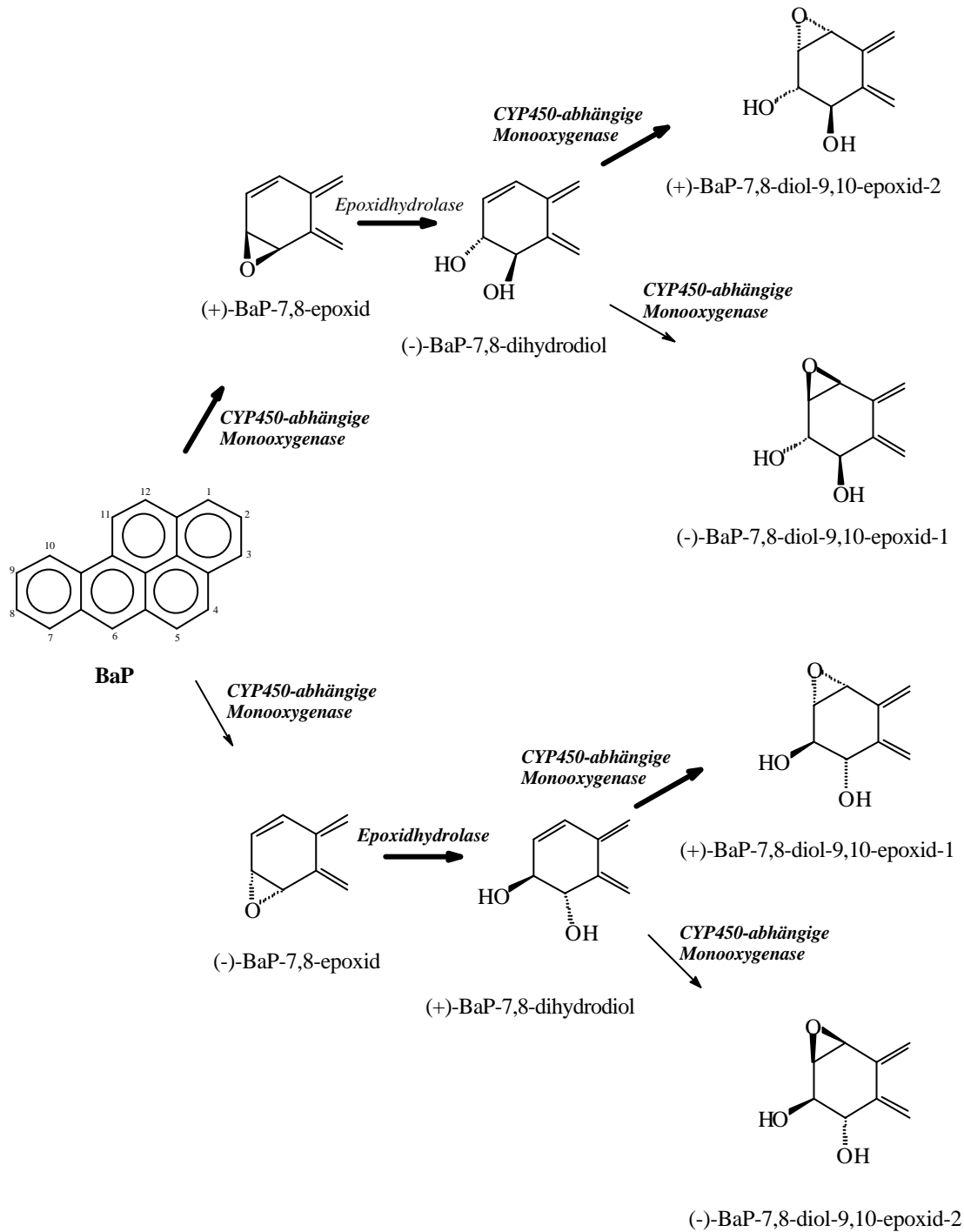


Abbildung 2.6: Metabolische Aktivierung von BaP: Aufgrund stereoselektiver Eigenschaften der Cytochrom-P450-Isoenzyme ist die mengenmäßige Verteilung der vier optisch aktiven Isomeren des als ultimales Cancerogen eingestuftes 7,8-Diol-9,10-epoxid ungleich. Die Hauptwege der BaP-Aktivierung werden mit fettgedruckten Pfeilen dargestellt [53].

2.2.2 Heterozyklische aromatische Amine

Heterozyklische aromatische Amine (HAA) entstehen durch pyrolytische Prozesse (wobei auch die Maillard-Reaktion eine Rolle spielt) beim Braten, Grillen und jeglicher mit Erhitzen verbundenen Zubereitungsform von proteinhaltigen Lebensmitteln. Die Hauptvorläufer der heterozyklischen aromatischen Amine in Fleisch und Fisch sind Kreatin oder Kreatinin, freie Aminosäuren und Zucker. Dabei steigt die Bildung der HAA mit ansteigender Temperatur und Kochzeit. In gebratenem Fleisch und Fisch ist 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP) am stärksten vertreten. PhIP kommt ebenso in Zigarettenrauchkondensat, Luftpartikeln, Abgasen, Wein und Bier vor [65,66].

Die heterozyklischen aromatischen Amine müssen wie die PAH metabolisch aktiviert werden, bevor sie genotoxisch wirken (siehe Abb. 2.7). Die metabolische Aktivierung erfolgt ebenfalls über den P450-Enzymkomplex, wobei hier das Isoenzym CYP1A2 die höchste Spezifität zeigt [67,68]. Durch CYP1A2 erfolgt die N-Hydroxylierung von heterozyklischen aromatischen Amine in der Leber [69]. Der N-Hydroxyarylaminmetabolit kann in der Leber glucuronidiert werden. Das Glucuronid gelangt nach biliärer Ausscheidung in das Colon, wo es durch bakterielle β -Glukuronidasen gespalten wird. Die heterozyklischen aromatischen Amine werden durch eine Acetyl-CoA-abhängige O-Acetyltransferase oder durch intramolekulare N,O-Acetylierung in hochreaktive N-Acetoxyarylamine überführt, die als ultimale Cancerogene gelten. Aus diesen instabilen Produkten kann nun das elektrophile Nitreniumion entstehen, das mit nukleophilen Zentren der DNA hauptsächlich unter Bildung von C⁸-Deoxyguanosin-Addukten reagiert [56,66]. Diese Addukte können zu GC>TA Transversionen führen. Das für die Acetyl-CoA-abhängige O-Acetylierung im Colon verantwortliche Enzym unterliegt einem genetischen Polymorphismus, der Individuen in schnelle, mittelschnelle und langsame Acetylierer charakterisiert. So wurden ethnische Variationen in der Aktivität dieses Enzyms beobachtet.

Das Colon ist Hauptzielorgan für die cancerogene Wirkung heterozyklischer aromatischer Amine. In der Regel sind bei Coloncanceromen schnelle Acetylierer mehr gefährdet [56].

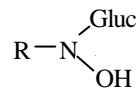
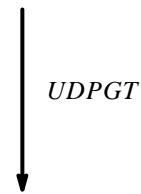
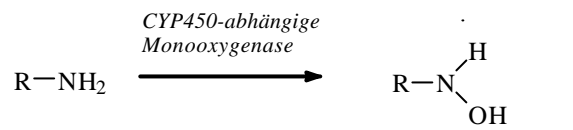
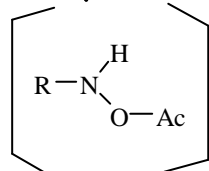
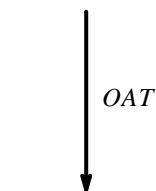
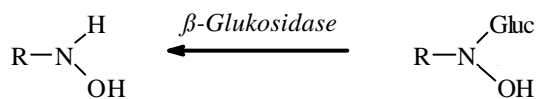
Leber**Galle****Colon**

Abbildung 2.7: Metabolische Aktivierung heterozyklischer aromatischer Amine. Diese werden durch das CYP1A2 N-hydroxyliert und von UDP-Glukuronyltransferasen (UDPGT) N-glukuronidiert. Im Colon wird das Glukuronid gespalten, und das Hydroxylamin durch eine Acetyl-CoA-abh\u00e4ngige O-Acetyltransferase (OAT) in der Colonmucosa in das hochreaktive N-Acetoxyarylammin \u00fcberf\u00fchrt, das leicht Essigs\u00e4ure abspaltet. Das entsprechende Nitreniumion kann nukleophile Zentren in der DNA angreifen [53].

2.2.3 N-Nitrosoverbindungen

N-Nitrosoverbindungen spielen als Umweltcancerogene eine bedeutende Rolle. Es handelt sich dabei um relativ einfach aufgebaute Substanzen, die sich hinsichtlich ihrer Struktur und ihrer Wirkungsweise in zwei Gruppen einteilen lassen: N-Nitrosamine und N-Nitrosamide. In dieser Arbeit wurde ein tabakspezifisches Nitrosamin, das 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK: Nicotine-derived N-nitrosoketone) als Expositionsmutagen verwendet. Nitrosamine kommen ubiquitär vor. In Lebensmitteln z.B. in gebratenem und geräuchertem Fleisch und Wurstwaren, Käse und Bier, wurden Spuren von Nitrosaminen nachgewiesen. Kosmetika, Umweltchemikalien (Pestizide), können ebenfalls Nitrosoverbindungen enthalten. Am Arbeitsplatz kann es in der Gummiindustrie, in Ledergerbereien und bei der Metallverarbeitung zur Exposition mit diesen Verbindungen kommen. Im Tabakrauch sind sie insbesondere im Haupt- und Nebenstrom nachweisbar.

Nitrosamine entstehen auch endogen im Magen unter sauren Bedingungen aus Nitrit (z.B. aus Fleisch oder bakterieller Reduktion von Nitrat oder Stickoxiden) und sekundären Aminen, die sich bei der Zubereitung von Lebensmitteln bilden [14,70].

Nitrosamine werden durch Oxidation an einem der Aminogruppe benachbarten C-Atom metabolisch aktiviert. Durch die enzymatische α -C-Hydroxylierung durch CYP2E1 oder CYP2A3 entstehen bei kleinen Nitrosaminen (z.B. N-Nitrosodimethylamin) reaktive elektrophile Metaboliten wie Alkyldiazohydroxide, Diazonium-Ionen und Carbeniumionen. Letztere können als ultimale Cancerogene mit der DNA reagieren [53].

Aus NNK entstehen nach metabolischer Aktivierung in der Leber methylierende und pyridyloxobutylierende Diazohydroxide. Diese werden durch eine α -C-Hydroxylierung, die vor allem von CYP1A2 neben CYP2E1, CYP2A6 und CYP3A5 katalysiert wird, gebildet. Die Alkylantien reagieren mit zellulären Nukleophilen, was u.a. zur Entstehung von Globin- und DNA-Addukten (Methyl- und Pyridyloxobutyladdukte) führt [71-73].

Die Oxobutylierung führt zudem zur Hemmung des Reparaturenzyms O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT), wodurch die Reparatur von Methyladdukten verlangsamt wird [74]. AGT stellt eine Schutzmöglichkeit der Zellen gegen alkylierende Agenzien dar. Sie entfernt v.a. Alkyl-Gruppen aus der O⁶-Position von Guanin in der DNA. Durch eine Einzelschrittreaktion überträgt die AGT die Alkyl-Gruppe auf einen Cysteinrest an seinem Carboxylende. Dadurch verbraucht sich das Enzym. Ein Enzym-Molekül kann daher nur einmal eine Alkyl-Gruppe entfernen.

Beim Menschen verursacht die Exposition mit Nitrosaminen insbesondere Krebs in Leber und Speiseröhre. Bei Nagern löst NNK Lungentumore aus, so dass vermutet wird, dass es auch an der Lungenkrebsentwicklung bei Rauchern maßgeblich beteiligt ist [75].

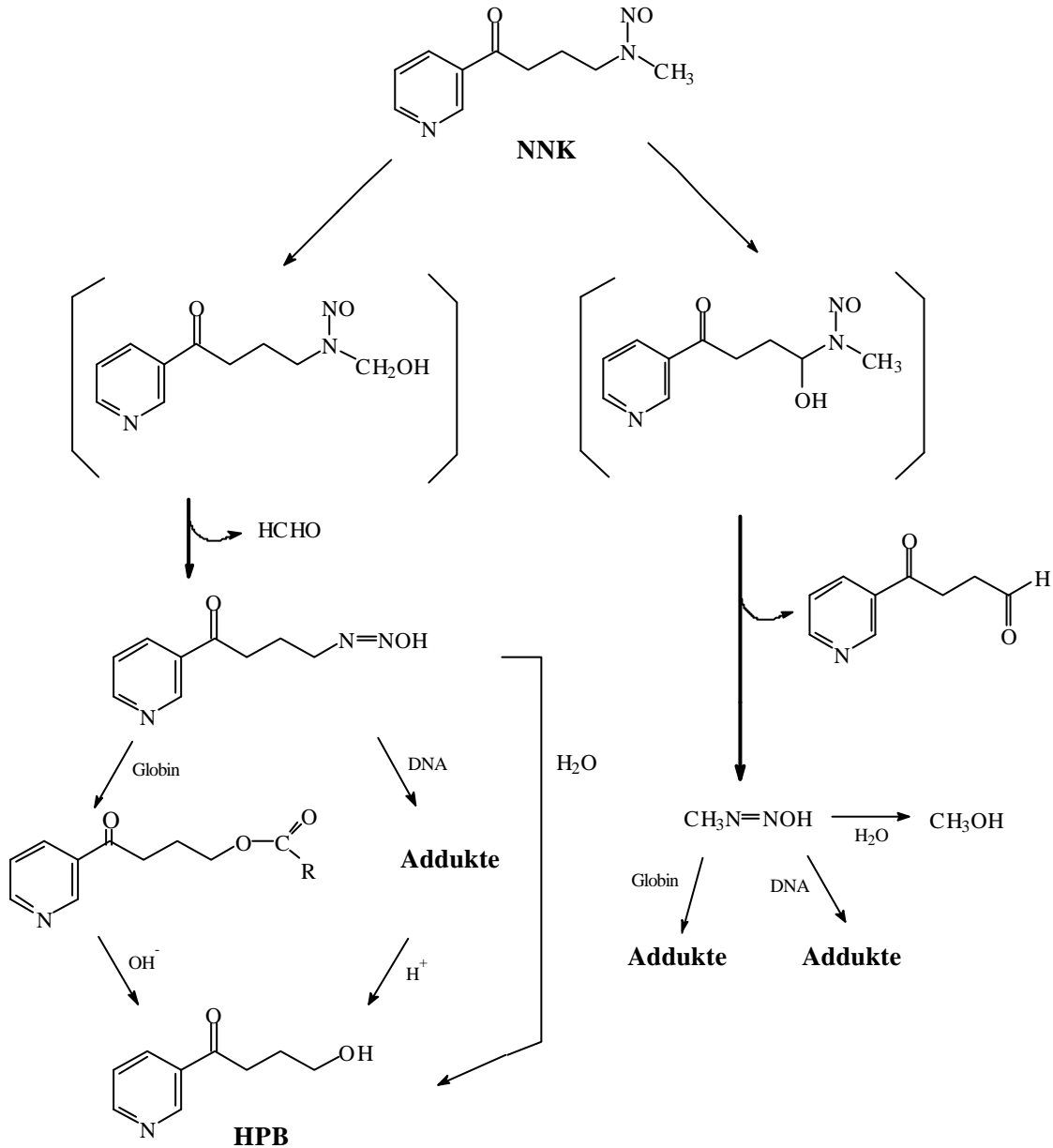


Abbildung 2.8: Metabolische Aktivierung von NNK: Durch Cytochrom-P450-vermittelte α -C-Hydroxylierung werden methylierende und pyridyloxobutylierende Intermediate gebildet, die mit Biopolymeren (DNA, Globulin) entsprechende Addukte bilden, die entweder als solche oder nach hydrolytischer Freisetzung von 4-Hydroxy-1-(pyridyl)-1-butanon (HPB) nachgewiesen werden können [53].

Ferner wurde in dieser Arbeit eine weitere N-Nitrosoverbindung eingesetzt, das N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG). MNNG ist ein monofunktionales Alkylierungsmittel, das meistens die N⁷-Position des Guanins und die N³-Position des Adenins methyliert [76]. MNNG wird als Standardmutagen bei Tierversuchen eingesetzt, um Magen- und Darmkrebs zu erzeugen. Es reagiert im Zielorgan unter spontaner Freisetzung eines Alkylkations, das mit der DNA in den Zellkernen unter Bildung von G>A Transitionen reagieren kann.

2.2.4 Zigaretterrauchkondensat

Tabakrauchen stellt ein erhebliches Krebsrisiko für den Menschen dar. Tabakrauch ist ein komplexes Gemisch aus ca. 4000 identifizierten Einzelverbindungen. Von diesen Komponenten haben sich etwa 40 als cancerogen in Tierversuchen erwiesen. Zu diesen Substanzen zählen PAH, N-Nitrosamine, aromatische Amine, HAA, Aldehyde, anorganische Komponenten und verschiedene organische Chemikalien wie Styrol, Benzol und Vinylchlorid [53,77].

Beim Abrauchen von Tabak entstehen Pyrolyseprodukte, die sich in Haupt- und Nebenstrom aufteilen. Der Hauptstromrauch ist der Rauch, der sich während des Zuges bildet und vom Raucher inhaliert wird, während der Nebenstromrauch in dem Intervall zwischen den Zügen, den Rauchpausen, entsteht und in die Umgebungsluft abgegeben wird [78]. Die Gasphase des Hauptstromrauches von Zigaretten besteht hauptsächlich aus Stickstoff, Sauerstoff, Kohlendioxid und Kohlenmonoxid. Diese Komponenten machen 85-95 % des Gesamtgewichtes des Hauptstromrauches aus. Zu den cancerogenen Verbindungen der Gasphase gehören 1,3-Butadien, Benzol, einige Aldehyde und flüchtige Nitrosamine. Die Partikelphase enthält als Hauptkomponenten Nicotiana-Alkaloide, wobei das pharmakologische Nikotin die wichtigste Verbindung ist. Das Tabakrauchkondensat (CSC), das durch Abrauchen der Zigaretten nach den standardisierten Bedingungen gemäß DIN/ISO mit einer automatischen Abrauchmaschine und Niederschlagung der Partikel auf einem Glasfaserfilter erhalten wird, enthält als cancerogene Verbindungen PAH, aromatische Amine, HAA und tabakspezifische Nitrosamine [53].

Während das Rauchen kausal an der Entstehung von Lungenkrebs beteiligt ist, ist die Rolle des Passivrauchens, d.h. der Exposition mit ETS („environmental tobacco smoke“), für die Entstehung von Lungenkrebs noch nicht eindeutig geklärt [79]. Die genaue

Zuordnung der Ursache wird unter anderem dadurch erschwert, dass viele im Tabakrauch enthaltenen Cancerogene, wie z.B. Benzol und PAH, auch in der Umwelt vorkommen und den Nichtraucher belasten.

2.3 Beobachtung chemisch induzierter Veränderungen in Säugerzellkulturen

2.3.1 MCL-5-Zellen als *in vitro* Testsystem

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine (B-)lymphoblastoide Zelllinie. Sie stammt von RPMI 1788 Zellen (Rosewell Parc Memorial Institute) ab, die 1968 einem gesunden männlichen Spender entnommen wurden [80,81].

Im Gegensatz zu den meisten Zelllinien haben MCL-5-Zellen bei der Kultivierung eine induzierbare CYP1A1-Expression behalten.

Die MCL-5-Zelllinie enthält in zwei episomalen Vektoren mit *OriP*-Sequenzen des Epstein Barr Virus (EBV) fünf humane cDNAs, die jeweils für ein Fremdstoff-metabolisierendes Enzym (CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1, CYP3A4) und für die microsomale Epoxidhydrolase codieren. Die Expression wird bei beiden Vektoren durch den Thymidinkinase-Promoter des Herpes-simplex-Virus kontrolliert [4,82]. Die Zelllinie entstand durch Transformation bekannter menschlicher cDNAs in eine stabile humane Zelllinie. Die Fremd-DNA befindet sich in zwei Hygromycin-B und Hystidinol selektierbaren Plasmiden (siehe Tab. 2.1).

Durch die eingefügten Cytochrom-P450 cDNAs ist die Zelllinie MCL-5 in der Lage, Procancerogene zu aktivieren.

Vektor	Selektion	Anzahl der Kopien	Eingefügte cDNAs
pMF6	100 µg/ml Hygromycin B	5	CYP1A2 CYP2A6 mEH
pEBVHistk	2 mM Histidinol	40	CYP2E1 CYP3A4

Tabelle 2.1: In die MCL-5-Zelllinie eingefügte cDNA.

Die Expression der eingefügten cDNAs wird von dem Promotor des Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase-Gens kontrolliert. Dieser Promotor zeigt keine Antwort auf die klassischen CYP-Induktoren. Die konstitutive CYP1A1-Aktivität wird von PAH induziert.

Die Zelllinie wächst mit einer Verdopplungszeit von 16-19 Stunden in supplementierten RPMI-Medium mit 9 % Pferdeserum [4].

2.3.2 HFBE-Zelllinie

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um menschliche Fötal-Bronchial-Epithel-Zellen (HFBE). Sie wurden von einem weiblichen Fötus, bei dessen Mutter die Schwangerschaft nach 18 Wochen contrainduziert künstlich abgebrochen wurde, entnommen und in 75 cm² Gewebekulturflaschen in supplementierten RPMI-Medium mit 20 % Fötal-Kalbsserum weiterkultiviert. Die Verdopplungszeit beträgt ca. 24 Stunden[83].

2.3.3 Expositionen

Die Expositionen von MCL-5-Zellen mit direkten Mutagenen erfolgten eine Stunde und für indirekte Mutagene 24 Stunden in Kulturflaschen im Kulturmedium bei bestimmten Dosen an Mutagenen. Die Kultivierung erfolgte nach den Angaben von Crespi [82].

Die Exposition der HFBE-Zellen mit ADS erfolgte in einer speziell angefertigten Apparatur des *Fraunhofer Institutes, Hannover* (siehe Abbildung 3.1).

Die Zellen wurden mit synthetischer Luft und NO₂ als Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle und dem verdünnten Nebenstromrauch (ADS) der „Kentucky reference cigarettes, K1R4F“, und einer etwa 1:10 Verdünnung V1 von diesem mit synthetischer Luft je eine Stunde ausgesetzt.

2.4 Ermittlung von DNA-Läsionen

DNA-Läsionen wurden in dieser Arbeit auf verschiedenen Ebenen betrachtet. Zur Ermittlung der Genotoxizität der einzelnen Mutagene wurden DNA-Strangbrüche mittels der Einzelzell-Gelelektrophorese nachgewiesen. Eine andere Ebene ist die Betrachtung von DNA-Addukten als Vorstufe von Mutationen. In dieser Arbeit wurde das DNA-Addukt 8-Hydroxy-2'-deoxy-Guanosin (8OHdG) mit Hilfe der LC-MS/MS bestimmt.

2.4.1 Strangbrüche in der Einzelzell-Gelelektrophorese

Die Einzelzell-Gelelektrophorese, auch Comet-Test genannt, beruht auf der Messung von DNA-Strangbrüchen in einzelnen kernhaltigen Zellen. Diese Methode wurde erstmals von Östling und Johanson 1984 beschrieben.

Einzel- und Doppelstrangbrüche können durch chemische oder physikalische Einwirkungen entstehen. Sie sind die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden [84]. Die nachgewiesenen Strangbrüche können direkt durch die Mutagene, durch Apoptose oder indirekt durch unvollständige DNA-Reparatur bedingt sein [85].

Bei dem Comet-Test werden Säugerzellen aller Art nach Exposition mit Mutagenen und Einwirkung von Inhibitoren auf Objektträgern (3-schichtig) in Agarose eingebettet. Der Vorteil dabei liegt in der geringen Zahl an Zellen (10.000-100.000), die für diesen Test benötigt werden [11]. Die eingebetteten Zellen werden mit einer hyperosmotischen Salzlösung und Detergenzien lysiert und die DNA auf dem Objektträger elektrophoretisiert. Vor und während der Elektrophorese findet das sogenannte "Unwinding", d.h. die Auflösung der Chromosomenstruktur und die Entspiralisierung der DNA in alkalischer Lösung statt, in der dann auch die Elektrophorese durchgeführt wird. Durch die alkalischen Bedingungen, unter denen die Elektrophorese erfolgt, sind nicht nur Doppelstrangbrüche, sondern auch Einzelstrangbrüche durch die veränderte Wanderung im elektrischen Feld nachweisbar [86].

Die Fragmente wandern dabei je nach ihrer Länge weiter als der Kern, sodass sich ein Bild ergibt, das an einen Kometen erinnert und zur Namensgebung des Testes führte (siehe Abb. 2.9).

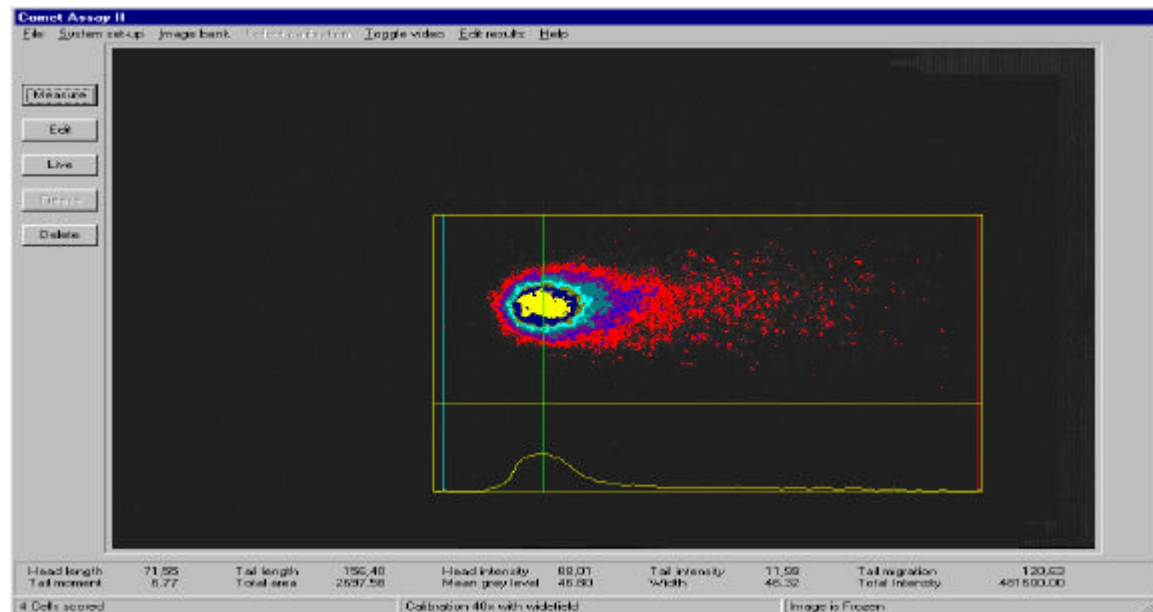


Abbildung 2.9: Comet-Auswertung

Je länger und intensiver ein solcher „Kometenschweif“ ist, umso mehr Strangbrüche sind in einer individuellen Zelle enthalten gewesen, da sich die Wanderungstrecke im elektrischen Feld umgekehrt proportional zum Molekulargewicht verhält und intakte DNA unter den gewählten Bedingungen nicht migriert.

Zur Auswertung werden die Objektträger mit Ethiumbromid angefärbt und unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Ausgewertet werden die „Kometen“ über eine automatische Software, die für jeden „Kometen“ das Tailmoment berechnet, welches sich als Produkt aus dem Verhältnis der Intensität in Kopf und Schweif und der Schweiflänge zusammensetzt.

Die Sensitivität liegt bei 50 Einzelstrangbrüchen pro diploide Zelle [87].

Erhöhung der Sensitivität durch Zusatz von DNA-Reparatur-Inhibitoren

Durch die Zugabe von Hydroxyharnstoff (HU) und Cytosin-Arabinosid (ara-C), welche den ersten Schritt der DNA-Reparatur, die Excision, erlauben, aber den zweiten Schritt, die DNA-Resynthese, hemmen, kann die Sensitivität im Comet-Test erhöht werden [88]. HU hemmt die Ribonukleosid-Diphosphat-Reduktase, was zur Entleerung der nuklearen dATP und/oder GTP-Pools führt [89]. Ara-C inhibiert den DNA-Polymerisationsschritt, der normalerweise nach dem Herausschneiden der fehlerhaften Nukleotide oder Basen während der Reparatur erfolgt [90,91]. Beide Reagenzien können zur Synchronisierung von Zellkulturen eingesetzt werden. Beide Stoffe allein hemmen die DNA-Reparatur

nicht, ergeben zusammen aber einen synergetischen Effekt [92]. Die Fragmente bleiben gerade bei längeren Expositionen erhalten und das ganze Ausmaß der Schädigung wird ersichtlich.

2.4.2 Nachweis von 8-Hydroxy-2'-deoxy-Guanosin

8-Hydroxy-2'-deoxy-Guanosin (8OHdG)-Levels können sensitiv nach enzymatischem Verdau der DNA mit HPLC/ECD oder auch mit LC-MS/MS nachgewiesen werden. Die übliche Methode zur 8OHdG-Bestimmung ist die HPLC/ECD-Methode. Durch die HPLC ist eine spezifische Trennung von 8OHdG und dG gegeben. Die Detektion erfolgt bei dG mit UV, während das 8OHdG elektrochemisch detektiert werden kann. Diese elektrochemische Detektion ist für die 8OHdG-Bestimmung sensitiver als die optische Absorptionsmethode [93,94].

Bei der in dieser Arbeit verwendeten LC-MS/MS-Methode liegen die Vorteile in der spezifischen Trennung durch die HPLC und die sensitive Detektion durch die gekoppelten Massenspektrometer. Durch die MS/MS-Detektion kann die Sensitivität im Vergleich zur HPLC/ECD-Methode nochmals um ca. Faktor 10 gesteigert werden.

Hochmolekulare isolierte DNA wird mit Nuklease P1 behandelt und vollständig in Nukleotide hydolysiert [47]. Anschließend erfolgt die Spaltung zu Nukleosiden durch die alkalische Phosphatase, die die Phosphatgruppe am 5'-Ende entfernt. Die Nukleoside werden nun mittels HPLC aufgetrennt und massenspektrometrisch detektiert. Dabei wurden für die Bestimmung von 8OHdG der Massenübergang 284,2/168,1 und für dG der Massenübergang 268,1/134,9 verwendet [48].

Zur Auswertung wird die Menge 8OHdG auf die Menge dG bezogen (üblicherweise: $8\text{OHdG}/10^6 \text{ dG}$) [95,96].

Um Artefaktbildung bei der Isolierung der DNA zu vermeiden, wird diese direkt nach der Exposition soweit möglich unter Stickstoffatmosphäre isoliert und gespalten.

Die Nachweisgrenze liegt bei ca. einer modifizierten Base in 10^6 unveränderten Basen (5 pg 8OHdG absolut), was ausreichend für die vorkommenden Level an 8OHdG in zellulärer DNA ist. Für eine Messung werden ca. 25 µg DNA benötigt [97].

2.5 Nachweismethoden für DNA-Mutationen

Die Arbeiten von Mullis und Mitarbeitern ermöglichten es seit Mitte der 80er Jahre, Segmente der DNA mit Oligonukleotidprimern zu versehen und mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) zu vervielfältigen [98]. Die PCR wurde bald zu einem Routineverfahren und ermöglicht die Untersuchung von winzigen DNA-Mengen.

Die hier angewendeten Methoden zur Untersuchung der Mutation im Gen *p53* Codon 248, dem *K-ras* Gen Codon 12 und der Translokation t(14;18) beruhen auf dem Prinzip der PCR. Dabei sind spezielle Verfahren der PCR notwendig, um die geringe Zahl an mutierten Zellen in einem großen Überschuss an normalen Zellen detektieren zu können.

2.5.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein enzymatisches Verfahren zur *in vitro* Vervielfältigung (Amplifizierung) spezifischer DNA-Abschnitte. Im Prinzip entspricht sie der DNA-Replikation in der lebenden Zelle, jedoch wird die Duplizierung einer DNA-Sequenz in kurzer Zeit so häufig wiederholt, dass es zu einer exponentiellen Zunahme der ursprünglichen DNA-Menge kommt und aus einem einzigen Molekül Nanogramm-Mengen eines Segments entstehen, die durch Färbung nachgewiesen werden können. Das Prinzip lässt sich folgendermaßen beschreiben: Es basiert auf der Denaturierung eines doppelsträngigen DNA-Templates, an welches sich an den Enden des zu amplifizierenden Bereiches spezifische Oligonukleotidmoleküle, sogenannte Primer, anlagern (Annealing). Diese Primer werden von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) verlängert (Elongation). Die DNA-Polymerase elongiert den entstehenden DNA-Doppelstrang (dsDNA) solange, bis sie von der DNA „abfällt“ oder die Reaktion unterbrochen wird. Dieser Abbruch kann durch eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95 °C verbunden mit einer Denaturierung der dsDNA erfolgen. Kühlt man den Ansatz in Anwesenheit freier Primer wieder auf 60-40 °C ab, so binden diese in Abhängigkeit ihres mittleren Schmelzwertes an die komplementären Sequenzen des Templates. Die Synthese eines weiteren Doppelstranges kann jetzt wiederholt werden. Die PCR bietet in Kombination mit der Verwendung einer thermostabilen DNA-Polymerase den Vorteil, dass alle Komponenten in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt und die DNA vollautomatisch in einem Thermocycler amplifiziert werden kann. Ab dem dritten Zyklus verdoppelt sich theoretisch in jedem Zyklus die Menge der von den Startmolekülen eingerahmten Zielsequenz, wodurch es zur

exponentiellen Vervielfältigung kommt. Nach Abbruch der Reaktion, d.h. im allgemeinen nach 25-40 Zyklen, wird der PCR-Ansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fragmentlänge des gebildeten PCR-Produkts mit Hilfe eines DNA-Größenstandards überprüft.

2.5.1.1 RFLP-PCR zur Anreicherung von Punktmutationen im Codon 248 des *p53* Tumorsuppressorgens

Bei der Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus-PCR (RFLP-PCR) wird das Vorhandensein einer Restriktionsstelle in dem zu untersuchenden Codon ausgenutzt. Die Mutation wird dabei durch den Verlust der Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym detektierbar [9].

Durch den RFLP-Ansatz wird der Hintergrund, der in der Gegenwart von großen Mengen an Wildtypsequenzen besteht, reduziert. Basenpaaraustausche, die in der Erkennungsstelle eines Restriktionsenzym liegen und die mutierte Stelle durch eine Resistenz gegenüber der entsprechenden Endonuklease zeigen, können gemessen werden [10].

Bei der Untersuchung der Mutation im Gen *p53* Codon 248 (CGG) wird die Erkennungsstelle des *Msp* I-Restriktionsenzymes (CCGG) ausgenutzt, die in diesem Codon vorliegt.

Es wird zunächst die genomische DNA verdaut, sodass im nachfolgenden PCR-Schritt nur mutierte oder ungeschnittene Wildtyp (WT)-Sequenzen amplifiziert werden. Durch Wiederholen dieser beiden Schritte wird die Mutante so stark angereichert, dass sie im Agarosegel sichtbar gemacht und sequenziert werden kann (siehe Abb. 2.10).

Die maximale Sensitivität des RFLP-PCR-Protokolls ist von der Vollständigkeit der WT-Entfernung und der Fehlerrate der in der PCR benutzten Polymerase abhängig [10].

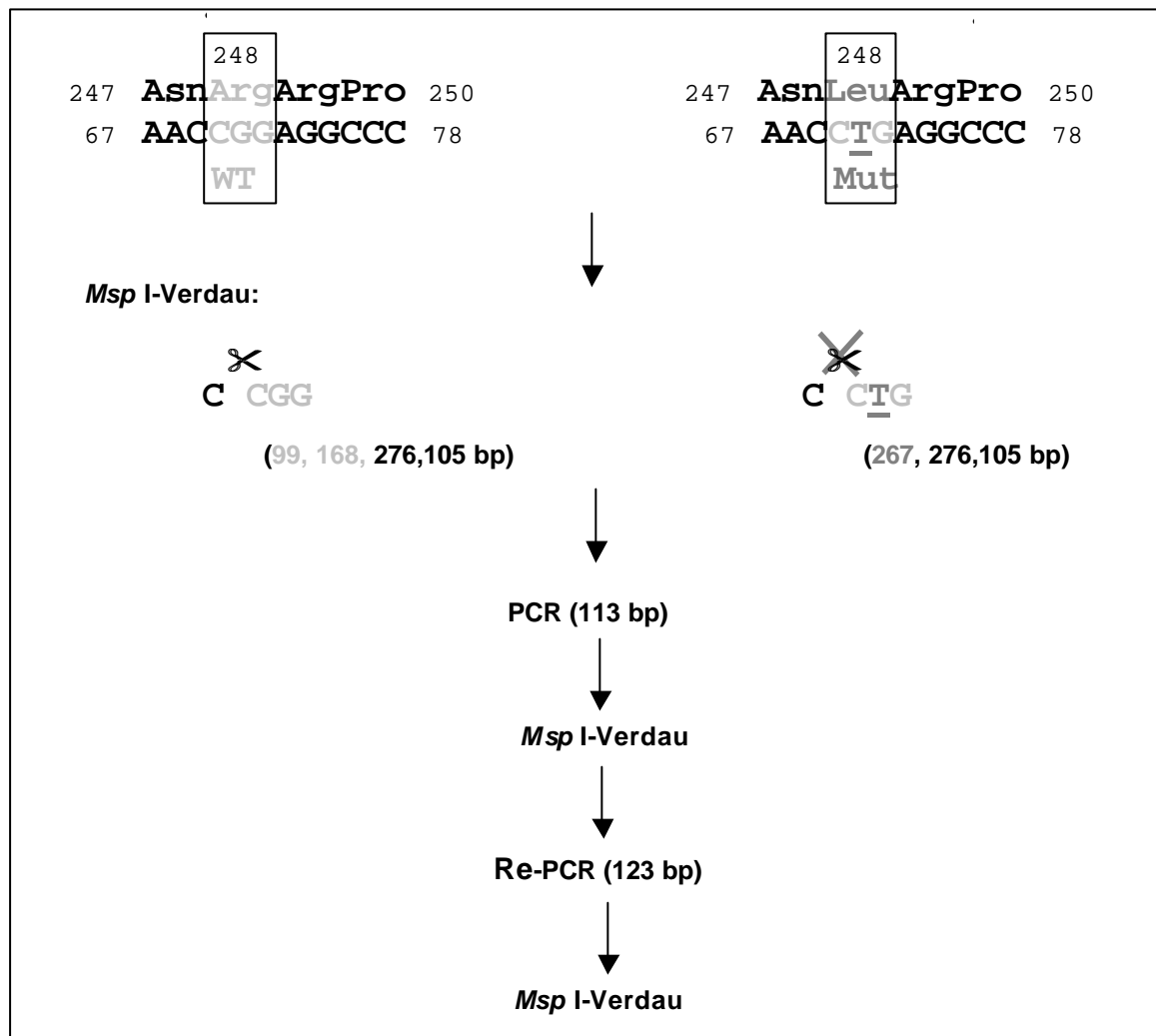


Abbildung 2.10: Prinzip zur Anreicherung der Mutation im Gen *p53* Codon 248

2.5.1.2 PCR-RFLP zur Anreicherung von Punktmutationen im Codon 12 des *K-ras*-Onkogens

Bei der PCR-RFLP, folgt auf eine PCR, bei der in dem zu untersuchendem Codon eine Restriktionsstelle für die normalen Allelsequenzen geschaffen wird, die Restriktion des WT, während die mutierten Sequenzen restriktionsresistent sind und dadurch selektiv angereichert werden können [9,34,99].

Diese Methode beruht zunächst auf einer nested PCR, wobei in der zweiten PCR ein Mismatch-Primer verwendet wird, durch den eine Restriktionsstelle eingeführt wird [100]. Durch die Einführung der künstlich geschaffenen *Bst* N I-Restriktionsstelle (CCTGG) durch eine G>C Substitution an der ersten Stelle des Codon 11 (d.h. nahe der zu untersuchenden Stelle im Codon 12 vom *K-ras*-Gen) durch den 5'-Primer und

anschließendem Verdau sollten in der folgenden PCR-Runde nur noch mutierte und wenige ungeschnittene WT-Sequenzen vorhanden sein (siehe Abb. 2.11).

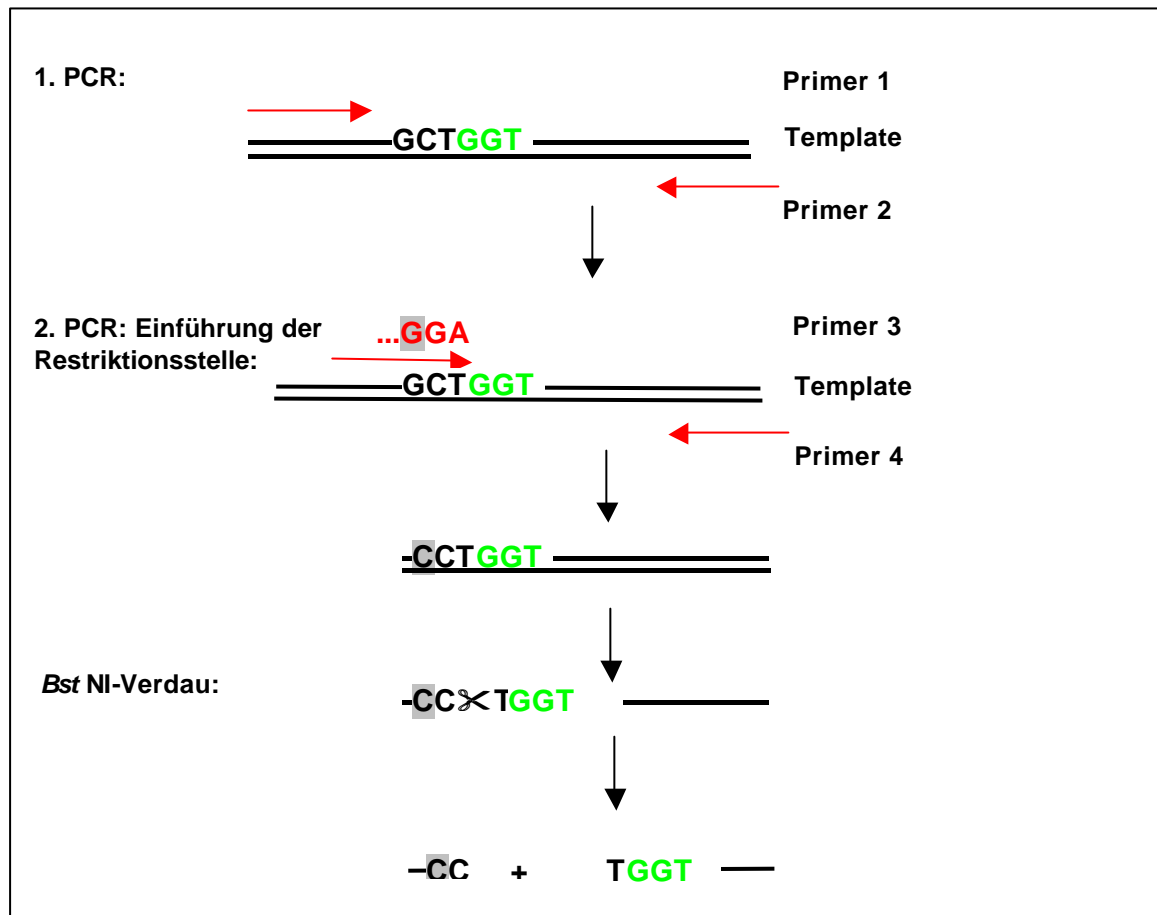


Abbildung 2.11: Einführung der *Bst* NI-Restriktionsstelle im K-ras Codon 12

Durch mehrmaliges Wiederholen von PCR und Verdau ist die Anreicherung der mutierten DNA soweit möglich, dass eine Auswertung im Agarosegel durchgeführt werden kann [100,101] (siehe Abb. 2.12). Die maximale Sensitivität des RFLP-PCR-Protokolls ist wie bei der Anreicherung der Mutation im Codon 248 des Gen *p53* von der Vollständigkeit der WT-Entfernung und der Fehlerrate der in der PCR benutzten Polymerase abhängig [10].

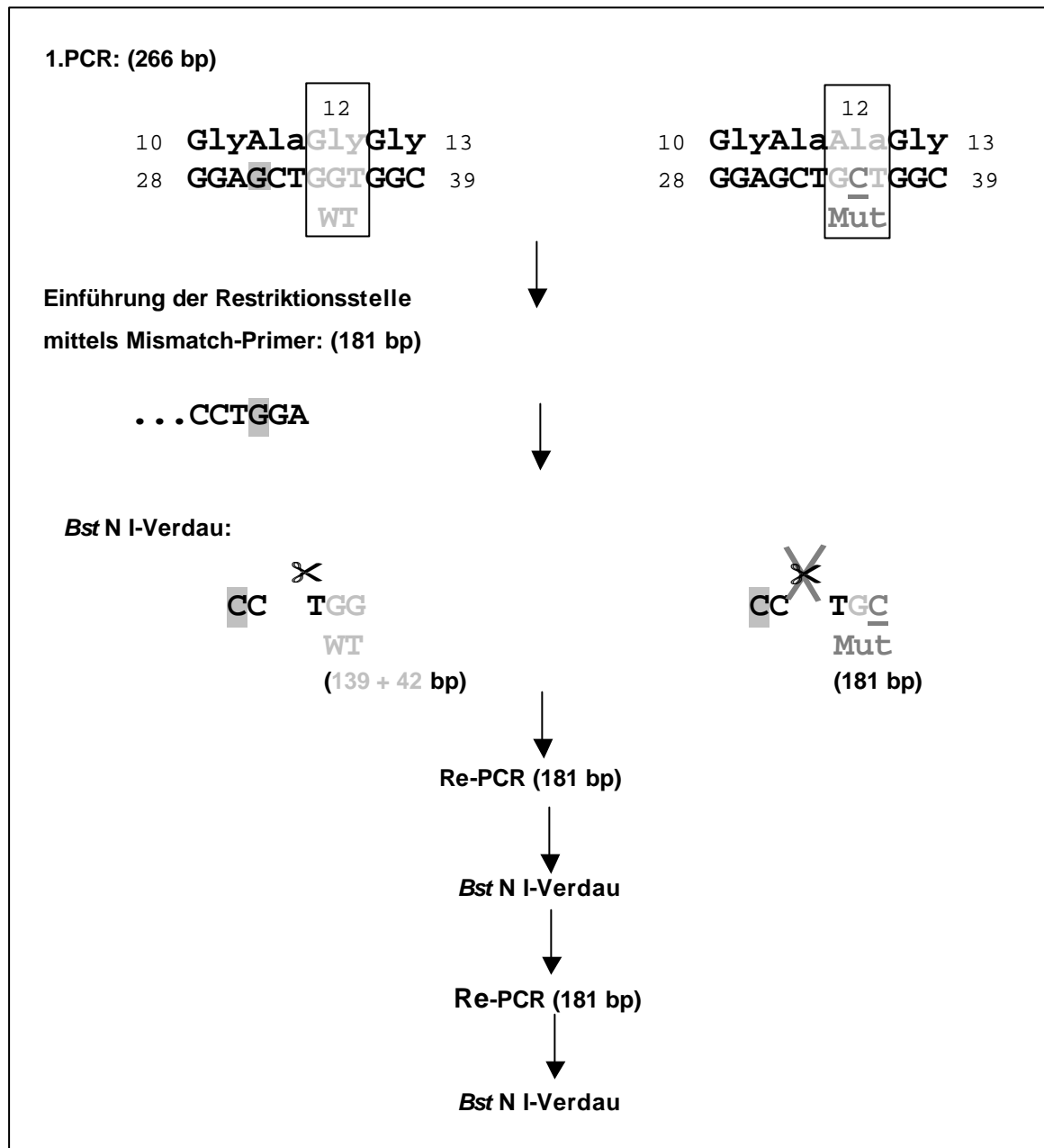


Abbildung 2.12: Prinzip der Anreicherung der Mutation im K-ras-Gen Codon 12

2.5.1.3 Anreicherung der Translokation t(14;18) durch semi-nested PCR

Da nach einer Translokation Sequenzen benachbart sind, die normalerweise auf verschiedenen DNA-Molekülen liegen, stellen Umlagerungen dieser Art besonders günstige Ausgangssituationen für die Anwendung einer genotypischen Selektion dar.

In über der Hälfte der Fälle der Translokation t(14;18) fällt die Bruchstelle auf dem Chromosom 18 in eine 150 bp Region von dem *bcl-2*-Gen (*mbr*). Die andere Bruchstelle auf dem Chromosom 14 liegt auf dem 5'-Ende auf einem der sechs J-Segmente der Immunglobulin-Schwerkettengene [7]. Durch diese relativ gut beschriebenen Stellen ist es möglich, sich Primer für diese Translokation herzustellen. Der eine Primer muss komplementär zu einem Stück der 150 bp Region des *bcl-2*-Gens sein, während der andere komplementär zu einem J-Segment sein muss. Da sich die J-Segmente sehr stark ähneln, was zu einer Reihe von Nebenprodukten führen kann, wird eine semi-nested PCR durchgeführt (siehe Abb. 2.13).

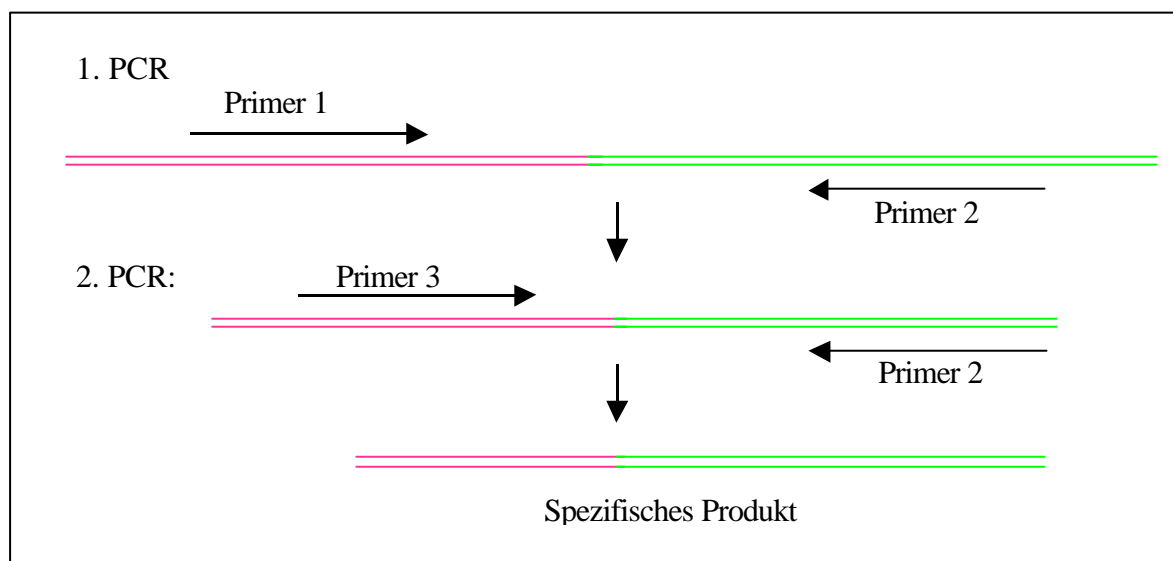


Abbildung 2.13: Semi-nested PCR

Bei der nested PCR werden zwei Primerpaare verwendet. Das zweite Primerpaar liegt innerhalb des ersten Paares. D.h. es wird immer zwei Runden amplifiziert. Bei der semi-nested PCR ist in der zweiten PCR-Runde nur ein Primer verändert. Der zweite ist der gleiche wie in der ersten Runde. Diese Art der PCR wird zur Erhöhung der Sensitivität und Spezifität durchgeführt, da der innere Primer nur in dem Produkt der ersten Runde anlagern kann und somit keine unerwünschten Produkte entstehen können.

Die Produkte werden anschließend auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Nachweisgrenze der Translokation t(14,18) liegt bei $1/10^6$ [8,102].

2.5.2 DNA-Sequenzanalyse

Nukleotidsequenzierungen wurden nach der Didesoxyterminationsmethode nach Sanger durchgeführt.

Für die Sequenzierungen wurden die letzten PCR-Produkte, nach deren Spaltung Banden in den Agarosegelen (positive Ergebnisse) gesehen wurden, reamplifiziert.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Mutagene

Für die Exposition von MCL-5-Zellen wurden Reinsubstanzen aus verschiedenen chemischen Klassen (Tabelle 3.1) und ein Komplexbgemisch (Zigarettenrauchkondensat) verwendet. Die toxischen Substanzen wurden unter den erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen benutzt.

Die zur Mutagenese einzusetzenden Konzentrationen wurden durch genotoxische (Comet-Test) und cytotoxische (Wachstum-) Tests ermittelt. Ziel dabei war es, eine hohe Mutationsrate bei einer ausreichenden Überlebensrate zu erzielen.

Die Test-Mutagene wurden von folgenden Firmen bezogen:

- MNNG und BaP von *Sigma, Deisenhofen*
- BPDE von *NCI (National Cancer Institute Chemical Carcinogen Reference Standard Repository), Kansas City, MO, USA*
- NNK und PhIP von *Toronto Chemicals, Toronto, Canada*
- CSC wurde von *Dr. Pachinger, Austria Tabak*, erhalten. Es wurde nach DIN/ISO-Abrauchnorm aus einer kommerziellen Filterzigarette gewonnen und in DMSO gelöst.
- ADS wurde im *Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Hannover*, erzeugt. Dieser verdünnte Nebenstromrauch wurde in einer speziellen Apparatur (siehe Abb. 3.1) durch kontinuierliches Abrauchen von zwei Referenzzigaretten gleichzeitig nach DIN/ISO-Abrauchnorm erhalten und als Gasphase über die Zellen geleitet.

Substanz	Lösungsmittel	Stammlösungen	
		mg/ml	mM
PAHs			
BPDE	DMSO	5,2	17,3
BaP	DMSO	10	39,6
N-Nitrosoverbindungen			
NNK	DMSO	100	482,5
MNNG	DMSO	20	136
Heterozyklische aromatische Amine			
PhIP	DMSO/EtOH 4:1 (v/v)	20	88,8
Mutagengemische			
CSC	DMSO	90 mg Feuchtkondensat/ml	

Tabelle 3.1: Mutagene, Lösungsmittel und Konzentrationen der Stammlösungen, mit denen die MCL-5-Zellen exponiert wurden.

Die Prüfatmosphären für die Exposition der Fötal-Bronchial-Epithel (HFBE)-Zellen setzten sich gemäß Tab. 3.2 zusammen.

Behandlungsgruppe	Gaskomponenten
Synthetische Luft	80 % N ₂ , 20 % O ₂
NO ₂	300 ppb NO ₂ in synthetischer Luft
ADS	Nebenstrom-Rauch der Zigarette K1R4F Partikel-Konzentration (rel.) 32,55 +/- 1,13 V CO-Konzentration 802,0 +/- 27,0 ppm
V1	Nebenstrom-Rauch der Zigarette K1R4F Partikel-Konzentration (rel.) 2,45 +/- 0,12 V CO-Konzentration 150,2 +/- 4,5 ppm

Tabelle 3.2: Zusammensetzung der Prüfatmosphären für die Exposition von HFBE-Zellen.

3.2 Verwendete Zelllinien

Die lymphoblastoide Zelllinie MCL-5 wurde von *Gentest Corporation, Woburn, USA* erhalten.

Die menschlichen Fötal-Bronchial-Epithel-Zellen (HFBE) wurden im *Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Abteilung In-Vitro Toxikologie in Hannover* kultiviert und exponiert.

3.2.1 Anzuchtbedingungen

Die MCL-5-Zellen wuchsen in Suspension bei 37 °C und 5 % CO₂ im begasbaren Brutschrank (IR 1500, *Flow Laboratories, USA*). Die Kulturen wurden in sterilen Einmalkulturflaschen (*Nunc, Wiesbaden*) gezüchtet (10 ml in 25 ml-Kulturflaschen oder 50 ml Kulturen in 250 ml Flaschen).

Die HFBE-Zellen wuchsen in 75 cm² Gewebekulturflaschen bei 37 °C und 10 % CO₂ im begasbaren Brutschrank im *Fraunhofer Institut, Hannover*.

3.2.1.1 Medien

Die MCL-5-Zellen wurden bis zur Mutagenexposition in RPMI-Medium gezüchtet, das an Stelle von Histidin L-Histidinol enthielt (*NatuTec, Frankfurt*). Dies und die regelmäßige Zugabe von Hygromycin B waren zur Selektion der beiden in den Zellen vorliegenden Vektoren pMF6 und pEBVHist erforderlich, die sonst nur wenige Tage bzw. Wochen stabil in der Zelllinie replizieren. Hygromycin B wurde alle zwei Tage frisch zugegeben, da das Antibiotikum im Kulturmedium sehr instabil ist.

Nach der Exposition wuchsen die MCL-5-Zellen in RPMI 1640-Medium ohne vektorselektierende Substanzen.

Die menschlichen Fötal-Bronchial-Epithel-Zellen (HFBE) wurden in RPMI-1640-Medium mit 2 g/L Natriumhydrogencarbonat und 20 % Fötal-Kalbsserum gezüchtet.

Fünffach konzentriertes Medium für die Vektorselektion in MCL-5-Zellen

- Gentest-Pulvermedium (*NatuTec, Frankfurt*) in 1 L bidestilliertem Wasser lösen
- 400 ml Aliquots des Konzentrats einfrieren

Das Konzentrat wurde mit bidestilliertem Wasser 1:5 verdünnt, anschließend mit 2 g/L NaHCO₃ versetzt und angesäuert (pH 6,2) und in eine autoklavierte Flasche sterilfiltriert. Das so erhaltene Medium wurde im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt.

Zu 500 ml Medium wurden die folgenden Zusätze steril hinzugefügt:

- 50 ml Pferdeserum (*c.c. Pro, Neustadt*)
- 5 ml 200 mM Glutamin (*c.c. Pro, Neustadt*)
- 5 ml 100 x Antibio/mycoticum

Zusätze zu 40 ml Kulturmedium:

- 40 µl 30 mg/ml 5-Aminolävulinsäure (*Sigma, Deisenhofen*)
- 200 µl 20 mg/ml Hygromycin B (*ICN Biomedicals GmbH, Eschwege*) für zwei Tage, bzw. das Doppelte für drei Tage.

Hygromycin B-Vorratslösung

- 20 mg/ml in PBS
- 34 mM Essigsäure (*Promochem, Wesel*)

Bei jeder Verdünnung der Kulturen wurde erneut Hygromycin B-Stammlösung zugegeben: entweder jeden zweiten Tag 100 µg/ml oder jeden dritten Tag 200 µg/ml Hygromycin-Lösung.

5-Aminolävulinsäure-Stammlösung

- 30 mg/ml Aminolävulinsäure (*Sigma, Deisenhofen*) in bidestilliertem Wasser, sterilfiltrieren

Die Häm-Vorstufe 5-Aminolävulinsäure wurde bei -20 °C aufbewahrt und bis zu einer Endkonzentration von 30 µg/ml zu den Zellen zugegeben.

Nicht vektorselektierendes Medium für MCL-5-Zellen

RPMI 1640 (*c.c. Pro, Neustadt*)

Zusätze zu 500 ml Medium:

- 50 ml Pferdeserum (*c.c. Pro, Neustadt*)
- 5 ml 200 mM Glutamin (*c.c. Pro, Neustadt*)
- 5 ml 100 x Antibio/mycoticum

3.2.1.2 Aufbewahrung von lymphoblastoiden Zellen (MCL-5-Zellen)

Die Stammkulturen der Zelllinie wurden bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Hierzu wurden die Kulturen mit ca. 10^7 Zellen fünf Minuten bei 1000 x g zentrifugiert und das Zellsediment anschließend in $700\text{ }\mu\text{l}$ Medium mit $12\text{ }\%$ (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO, *Sigma, Deisenhofen*) resuspendiert und in einem Kryo-Röhrchen (*Nunc, Wiesbaden*) aufbewahrt. Das Einfrieren erfolgte langsam, um die Zellstrukturen nicht zu zerstören.

3.2.1.3 Anzucht von gefrorenen lymphoblastoiden Zellen (MCL-5-Zellen)

Die Vials mit DMSO wurden durch Erwärmen auf $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wurde dann zu 50 ml vorgewärmten und supplementierten Medium gegeben.

Das Zellwachstum wurde durch das DMSO nicht beeinflusst, da dieses anschließend in dem Kulturmedium nach der 1:50 Verdünnung nur in einer sehr geringen Konzentration vorhanden ist.

3.2.2 Bestimmung der Zelldichte und Vitalität

Die Cytotoxizität wurde anhand von Wachstumskurven ermittelt. Hierzu wurde die Zelldichte nach der Exposition über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen beobachtet.

Die Zelldichte wurde unter dem Mikroskop (*Carl-Zeiss, Jena*) bestimmt. Hierfür wurden aus den Kulturen $50\text{ }\mu\text{l}$ entnommen und mit Trypanblau-Lösung (*Sigma, Deisenhofen*) gemischt. Mit dem 16/0,40 Objektiv wurden in der Neubauer-Kammer (*Brand, Wertheim*) die nicht blau gefärbten, d.h. lebenden Zellen, und die blau gefärbten, d.h. toten Zellen, gezählt. Die Zelldichte der Kulturen wurde aus den durchgeführten Verdünnungsschritten und dem Volumen ($0,1\text{ }\mu\text{l}$) über der ausgezählten Fläche berechnet:

$$\text{Zellen/ml} = F \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

F: durchschnittlich gezählte Zellen pro Quadrat
10⁴: Umrechnungsfaktor von 0,1 µl auf ml

Anhand der Zelldichten wurden Wachstumskurven über den jeweiligen Zeitraum erstellt.

Die jeweilige Konzentration an Mutagenen richtete sich nach dem Überleben der Zellen. Es wurde die Konzentration für die Mutationsanalyse genommen, bei der eine möglichst hohe Genotoxizität im Comet-Test und eine möglichst niedrige Cytotoxizität erhalten wurde.

3.2.3 Expositionsbedingungen

3.2.3.1 Exposition von MCL-5-Zellen

Die Exposition der MCL-5-Zellen erfolgte in 50 ml Kulturen in RPMI-Medium mit ca. 5×10^5 Zellen/ml. Hierzu wurden die Kulturen mit den Mutagenen entweder für eine Stunde im Falle der direkten Mutagene (MNNG und BPDE) oder für 24 Stunden im Falle der Mutagene, die durch die Zellen metabolisch aktiviert werden mussten (BaP, NNK, PhIP, CSC) inkubiert.

Parallel dazu wurde eine Kontrollkultur, die nur DMSO in der Konzentration enthielt, die zur Lösung der Mutagene nötig war, gleichermaßen behandelt.

Bei der Exposition mit den direkten Mutagenen wurden der Kultur nach einer Stunde, bei den indirekten Mutagenen nach 24 Stunden 10^5 Zellen zur Ermittlung der genotoxischen Schädigung durch den Comet-Test entnommen.

Die restliche Kultur wurde nach der Expositionszeit zur Entfernung des Mutagens bei 3500 g zentrifugiert und das Zellsediment in RPMI-Medium aufgenommen und weiterkultiviert.

Sobald eine genügende Zellzahl (ca. 200 Mio. Zellen) für die Mutationsanalyse erhalten wurde, wurden die exponierten Zellen und die Kontrollzellen sedimentiert und bis zur DNA-Isolierung bei -20 °C aufbewahrt.

3.2.3.2 Exposition von menschlichen Fötal-Bronchial-Epithel-Zellen

Diese Zellen wurden im *Fraunhofer Institut für Toxikologie und Aerosolforschung, Abteilung in-vitro Toxikologie in Hannover* kultiviert und je 5×10^5 Zellen exponiert. Diese adhären Zellen wurden 1 Stunde mit den Prüfatosphären exponiert und anschließend nach vorsichtiger Trypsinierung direkt für den Comet-Test eingesetzt.

Der in dieser Arbeit zur Exposition von Bronchialepithelzellen verwendete „Aged and Diluted Sidestream Smoke“ (ADS) ist ein verdünnter Nebenstromrauch vom *Fraunhofer Institut für in vitro Toxikologie, Hannover*, welcher mit einer speziellen Apparatur erhalten und in dieser durchmischt wurde (siehe Abb. 3.1). Dieser ADS wurde durch kontinuierliches halbautomatisches Abrauchen von zwei Zigaretten gleichzeitig nach den ISO-Vorschriften in einer Rauchmaschine der *Firma Teague Enterprises Inc, USA* erhalten. Dabei wurde die Forschungs- und Referenzzigarette K1R4F verwendet. Der Nebenstromrauch wurde in einer Metallkammer mit einem Volumen von 70 L gesammelt und nochmals durchmischt, bevor er über die Zellen geleitet wurde.

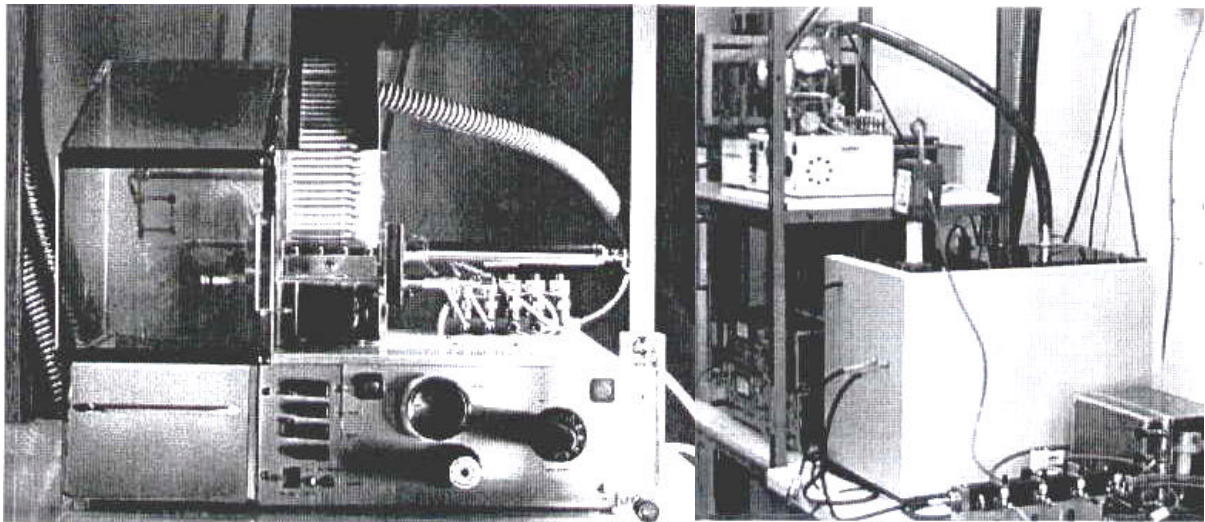


Abbildung 3.1: Links: Rauchmaschine der Firma *Teague Enterprises Inc, USA*. Sie wurde 1994 von *Stephen Teague* konstruiert. Diese Rauchmaschine ermöglicht ein kontinuierliches halbautomatisches Abrauchen von 2, 5 oder 10 Zigaretten nach ISO-Vorschriften gleichzeitig und kann Haupt- und Nebenstrom liefern. Rechts: „Aging and dilution system“ mit einem Volumen von 70 L und einem Durchfluss von 12-13 L/min.

Der Gasstrom der Prüfatosphäre wurde mit kleiner Strömungsgeschwindigkeit unter Vermeidung der direkten Anströmung an die im Monolayer adhären wachsenden Lungenzellen herangeführt. Die Zellen selbst wurden auf einer mikroporösen Membran kultiviert, deren Porengröße derart dimensioniert ist (0,4 μm), dass während der Exposition nur so viel Flüssigkeit durch die Membran tritt, wie zur Stabilisierung des Mikroklimas über den Zellen nötig ist (siehe Abb. 3.2). So wurde eine Reaktion des

Prüfmediums mit dem Kulturmedium verhindert. Die Zellen wurden so mit synthetischer Luft und NO₂ als Negativ- bzw. Positiv-Kontrolle und dem verdünnten Nebenstromrauch (ADS) der „Kentucky reference cigarettes, K1R4F“, und einer etwa 1:10 Verdünnung (V1) von diesem ausgesetzt. Die Verdünnung (V1) wurde nach dem Prinzip der Wasserstrahlpumpe in einem Aerosol-Verdünnungssystem durch Einleitung von synthetischer Luft hergestellt.

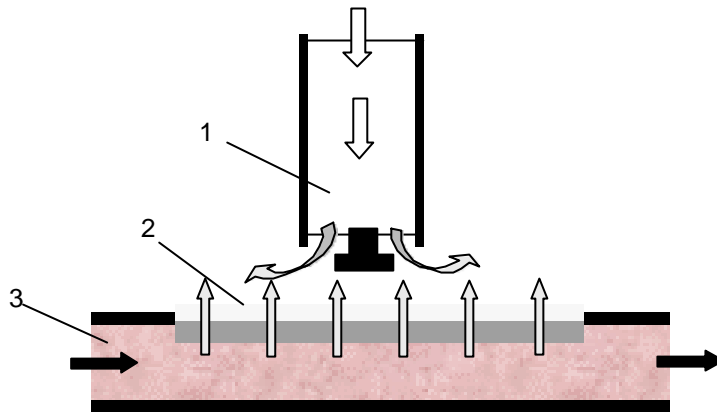


Abbildung 3.2: Theoretisches Konzept der Exposition adherenter humaner Lungenzellen. 1 Expositionsgasstrom, 2 auf permeabler, mikroporöser Membran kleiner Porengröße (0,4 µm) kultivierte humane Lungenzellen, 3 Kulturmediumstrom

3.3 Ermittlung von DNA-Läsionen

3.3.1 Comet-Test

Die Genotoxizität wurde anhand der Einzelzell-Gelelektrophorese (Comet-Test) ermittelt.

Die Durchführung des alkalischen Comet-Tests erfolgte unter den üblichen Bedingungen nach den Angaben der Arbeitsgruppe von Prof. Rüdiger (*Klinische Abteilung Arbeitsmedizin, Wien*), die an die im Labor vorhandene Elektrophorese-Ausstattung und das bearbeitete Zellkultursystem angepasst wurden. Eine Zelldichte von ca. 100.000 Zellen pro Objektträger stellte sich als zur Auswertung geeignet heraus. In der Thermostat-gekühlten GNA-200-Elektrophoresekammer ergab sich bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA eine Spannung von 24 V. Vorversuche zur Ermittlung der optimalen „Unwinding“- und Elektrophoresezeiten zeigten, dass bei einer Elektrophoresezeit von 40 Minuten durch geringe Mutagendosen hervorgerufene DNA-Schäden empfindlicher detektiert wurden als bei kürzeren Elektrophoresezeiten. Eine neutrale Elektrophorese, bei der nur die physiologisch bedeutenden Doppelstrangbrüche,

aber keine Einzelstrangbrüche ermittelt werden können [11], ist für die hier bearbeitete Fragestellung nicht empfindlich genug. Wegen starker Diffusion der Kerne, die eine Auswertung erschweren, wurde der neutrale Comet-Test nicht weiter verfolgt. Eine Zunahme der DNA-Schädigung durch Lichteinwirkung wurde durch weitgehende Abdunkelung minimiert. Bei einem Testversuch mit Lichteinwirkung stellte sich heraus, dass künstliches Licht im Gegensatz zu Sonnenstrahlung einen nur unbedeutenden Einfluss auf die DNA-Schäden hat.

Bei Expositionsversuchen wurde immer eine Kontrollkultur mituntersucht, d.h. Zellen, die mit dem Lösungsmittel des Mutagens behandelt wurden. Das ermittelte Tailmoment sollte dabei immer $<0,5$ sein, sonst ist eine Schädigung durch das Lösungsmittel oder sonstige Störeinflüsse nicht auszuschließen, wodurch die Aussage der Schädigung durch das Mutagen verringert würde.

3.3.1.1 Zusatz von Inhibitoren der DNA-Synthese

Es stellte sich heraus, dass die Zugabe einer Hemmstofflösung (Hydroxyharnstoff und Cytosinarabinosid) [88] die Empfindlichkeit des Comet-Tests durch Hemmung der Resynthese der DNA bei der Nukleotid-Excisionsreparatur erhöht. Die Zugabe der Hemmstofflösung erfolgte bei einstündigen Expositionen während der gesamten Expositionszeit, bei 24 Stunden Expositionen eine Stunde vor Beginn des Comet-Tests. Mit dieser einstündigen Zugabe der Hemmstofflösung wurden die besten Ergebnisse erzielt (siehe Abb. 3.3).

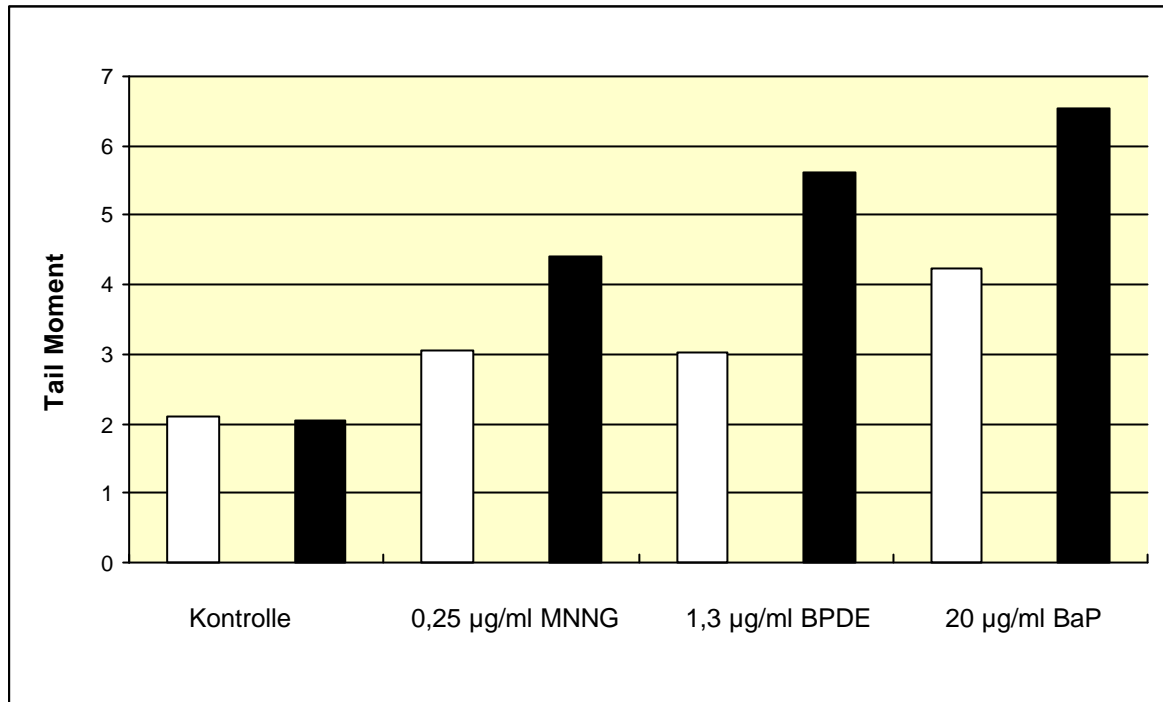


Abbildung 3.3: Erhöhung der Sensitivität des Comet-Tests durch Zugabe von Inhibitoren der DNA-Synthese. MCL-5-Zellen wurden eine Stunde lang bei 37 °C mit den angegebenen Mutagendosen, bzw. mit 0,5 % DMSO, behandelt und zwar nach Zusatz von HU/araC-Lösung (schwarze Säulen) oder PBS (weiße Säulen). Für jeden Versuchsansatz (Objektträger) wurde das arithmetische Mittel der Tailmoment-Werte von 50 Zellkernen festgestellt.

Dazu wurde zur erforderlichen Zellzahl (10^5 Zellen) außer der Mutagenlösung ein Zehntel Inkubationsvolumen einer 10fach konzentrierten HU/ara-C-Lösung zugegeben.

Inhibitorenlösung 10fach-Konzentrat: 100 mM Hydroxyharnstoff (*Sigma, Deisenhofen*), 18 mM Cytosin-Arabinosid-Hydrochlorid (*Sigma, Deisenhofen*); pH 7,0

3.3.1.2 Einbetten der Zellen auf Objektträger

Die für den Comet-Test abgenommenen Zellen wurden zentrifugiert, das Zellsediment in 0,6 %iger "Low-Melting"-Agarose, die für diesen Zweck auf 37 °C flüssig gehalten wurde, vorsichtig resuspendiert und auf "fully frosted"-Objektträger, die mit 1,5 %iger Agarose beschichtet wurden, aufgetragen. Nach Verfestigung dieser Agaroseschicht erfolgte die Auftragung einer weiteren Schicht 0,6 %iger "Low-Melting"-Agarose, so dass die Zellen dreischichtig eingebettet waren.

Beschichtung der Objektträger

In einer Färbeküvette wurden die „fully-frosted“-Objektträger zu $\frac{3}{4}$ in 1,5 %ige Agaroselösung (*peqlab, Erlangen*) in PBS eingetaucht und anschließend mindestens über Nacht zur Erhärtung der Agarosegelschicht im Kühlschrank gelagert.

Die Agarose wurde in PBS im Mikrowellenofen aufgeschmolzen.

Phosphatgepufferte Saline (PBS): 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na₂HPO₄;
1,4 mM KH₂PO₄; pH 7,3 (alle Substanzen von
Sigma, Deisenhofen)

3.3.1.3 Lyse

Die Objektträger wurden in Quadriperm-Fächer (*quadriPERM plus, Heraeus, Osterode/Harz*) gelegt und mit 5 ml Lyse-Lösung überschichtet und in diesem Zustand für mindestens 1 h 15 min, meistens über Nacht bei 4 °C, belassen.

Lyse-Lösung

Lyse-Vorratslösung: 2,5 M NaCl (*Sigma, Deisenhofen*); 100 mM EDTA (*Sigma, Deisenhofen*); 10 mM Tris-HCl, pH 10 (*Roth, Karlsruhe*);
10 % Laurylsarcosin (*Sigma, Deisenhofen*)

Am Tag der Lyse wurde der Lyse-Vorratslösung 1 % Triton X 100 (*Sigma, Deisenhofen*) und 10 % DMSO (*Sigma, Deisenhofen*) zugesetzt und diese Lösung mindestens eine Stunde vor Gebrauch bei 4 °C gelagert.

3.3.1.4 Alkalische Elektrophorese

Die Objektträger wurden nach der Lyse mit der Elektrophorese-Lösung gespült und anschließend für 20 Minuten in die bereits auf 2 °C vorgekühlte Elektrophoresekammer (*GNA-200, Pharmacia Biotech, Freiburg*) in die Elektrophoreselösung zum “Unwinding“ gelegt. Anschließend wurde für die Elektrophorese für 40 Minuten eine Spannung von 22 V angelegt, was einem Stromfluss von 400 mA entspricht (Spannungsquelle DC Power Supply PS 3000, *Hofer, Pharmacia Biotech, Freiburg*).

Elektrophorese-Lösung: 300 mM NaOH; 1 mM EDTA (*Sigma, Deisenhofen*)

Die Elektrophorese-Lösung wurde für jede Elektrophorese frisch aus den NaOH- und EDTA-Stammlösungen angesetzt.

3.3.1.5 Neutralisation

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger mehrmals mit Neutralisationslösung behandelt und bis zur Färbung (nicht länger als einen Tag) in feuchten Kammern (Quadriperms) im Kühlschrank aufbewahrt.

Neutralisationslösung: 400 mM Tris-HCl, pH 7,5 (*Roth, Karlsruhe*)

3.3.1.6 Färbung

Die Objektträger wurden 30 Sekunden lang in Färbelösung gestellt, mit destilliertem Wasser gespült und mit einem Deckglas versehen.

Färbelösung: 20 µg Ethidiumbromid/ml (*Roth, Karlsruhe*)

3.3.1.7 Auswertung

Die Zellkerne wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop (*Olympus, Hamburg*) bei 400facher Vergrößerung unter Verwendung des Auswertungs-Programms „COMET ASSAY II“ (Version 2.11, *Perceptive Instruments, Suffolk, England*) ausgewertet. Hierbei wird das Bild über eine CCD Video-Kamera direkt auf den Bildschirm übertragen und kann dort über die Software ausgewertet werden. Die „Comets“ werden dabei eingerahmt und automatisch unter Berücksichtigung des Hintergrundes unter Verwendung eines Excel-Makros vermessen. In diesem Makro werden verschiedene Parameter wie Tailmoment, Taillength, Tailintensity, Headintensity errechnet.

In dieser Arbeit wurde zur Auswertung das Tailmoment [µm] herangezogen, das wie folgt definiert ist:

$$TM = \frac{FS}{SFC} \times (SS - FM)$$

TM: Tailmoment

FS: Fluoreszenz im Schweif

SFC: Gesamte Fluoreszenz im Comet

SS-FM: Abstand zwischen dem Schwerpunkt im Schweif und dem Fluoreszenz-Maximum [µm]

Dabei wurde sowohl über den Mittelwert der Tailmoments der 50 ausgezählten „Comets“ als auch über den Median ausgewertet, um die Verteilung der Schäden beurteilen zu können.

3.3.2 8OHdG-Addukt-Bestimmung mittels LC-MS/MS

Die MCL-5-Zellen wurden wie bei den übrigen Versuchen exponiert. Die DNA der exponierten MCL-5-Zellen wurde direkt nach der Exposition nach 3.4.2.1 isoliert, nach 3.4.2.3 aufkonzentriert und nach 3.4.2.2 quantifiziert. Diese Schritte erfolgten soweit möglich unter N₂-Atmosphäre. 25 µg dieser DNA wurde für die weitere Aufarbeitung pro Ansatz eingesetzt. Die DNA wurde in 66 µl 20 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 4,6 (*Merck, Darmstadt*) gelöst. Anschließend erfolgte der Nuklease P1-Verdau, dann der alkalische Phosphatase-Verdau. Das Verhältnis 8OHdG/dG der Proben wurde mittels LC-MS/MS ermittelt. Anhand von Standardlösungen an Deoxyguanosin und 8-Hydroxyguanosin wurden die Einstellungen des LC-MS/MS-Gerätes optimiert. Um eine bestmögliche Trennung der beiden Substanzen zu erzielen, wurden zwei Trennsäulen in Reihe bei einer Säulentemperatur von 45 °C installiert. Für die Substanz- und Konzentrationsbestimmung wurden die Massenübergänge 284/168,1 für 8OHdG und 268/134,9 für dG verwendet (siehe Abb. 3.4).

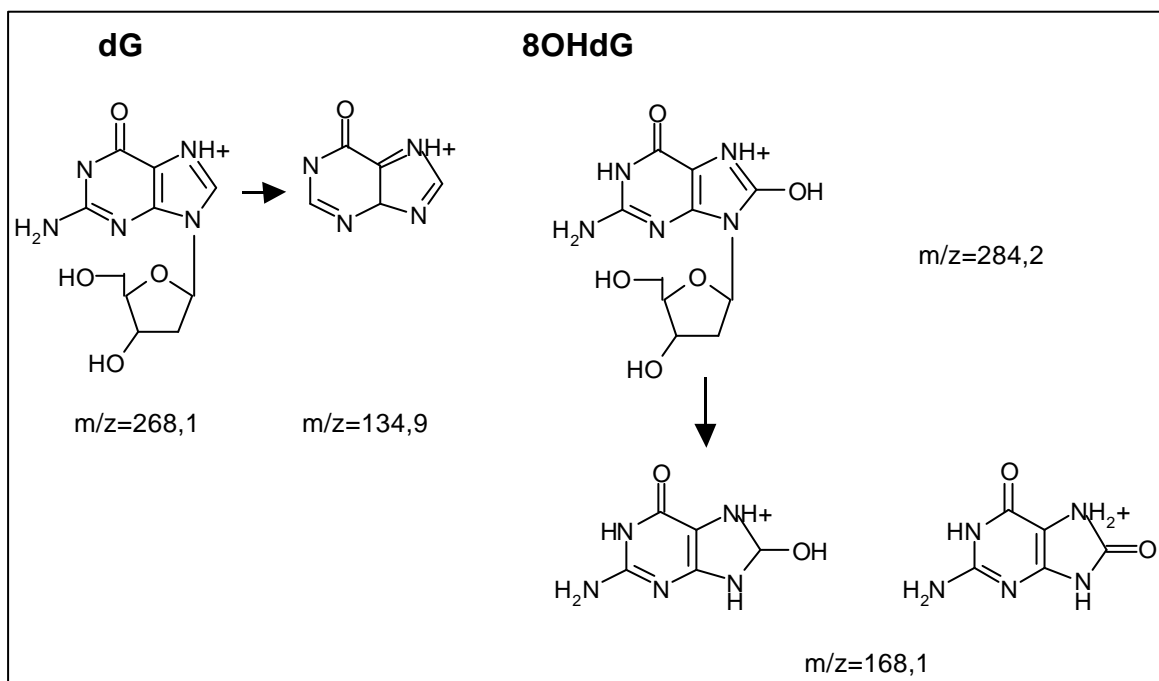


Abbildung 3.4: Massenübergänge von dG und 8OHdG

Bei 8OHdG konnte eine absolute Menge von 5 pg gemessen werden. Bei einer eingesetzten Menge von ca. 30 µg DNA entspricht dies einer Nachweisgrenze von einem Addukt in 10^{-7} dG Basen.

Nuklease P1-Verdau:

Zu 66 µl DNA-Lösung wurden 4 µl Nuklease P1 (6 U/4µl) gegeben, N₂ darüber geleitet und die Lösung eine Stunde bei 37°C im Dunkeln inkubiert.

Nuklease P1 wurde lyophilisiert von *Sigma, Deisenhofen* bezogen und in 30 mM Natrium-Acetat-Puffer pH 5,3 (*Merck, Darmstadt*) suspendiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Alkalische Phosphatase-Verdau:

Zu den 70 µl DNA-Lösung wurden 8 µl 0,5 M KH₂PO₄-Lösung pH 5,3 gegeben, diese Lösung mit 2 µl alkalischer Phosphatase (1 U/ µl) versetzt, N₂ darüber geleitet und eine Stunde bei 37 °C im Dunkeln inkubiert.

Alkalische Phosphatase wurde lyophilisiert von *Sigma, Deisenhofen* bezogen und in 10 mM Tris-HCl pH 8,3 (*Roth, Karlsruhe*), 5 mM MgCl₂ (*Merck, Darmstadt*), 0,2 mM ZnCl₂ (*Merck, Darmstadt*), 50 % Glycerin (v/v) (*Sigma, Deisenhofen*) suspendiert und bei 4 °C aufbewahrt.

8OHdG und dG-Standards wurden von *Sigma, Deisenhofen* erhalten, in Wasser aufgenommen und vermessen.

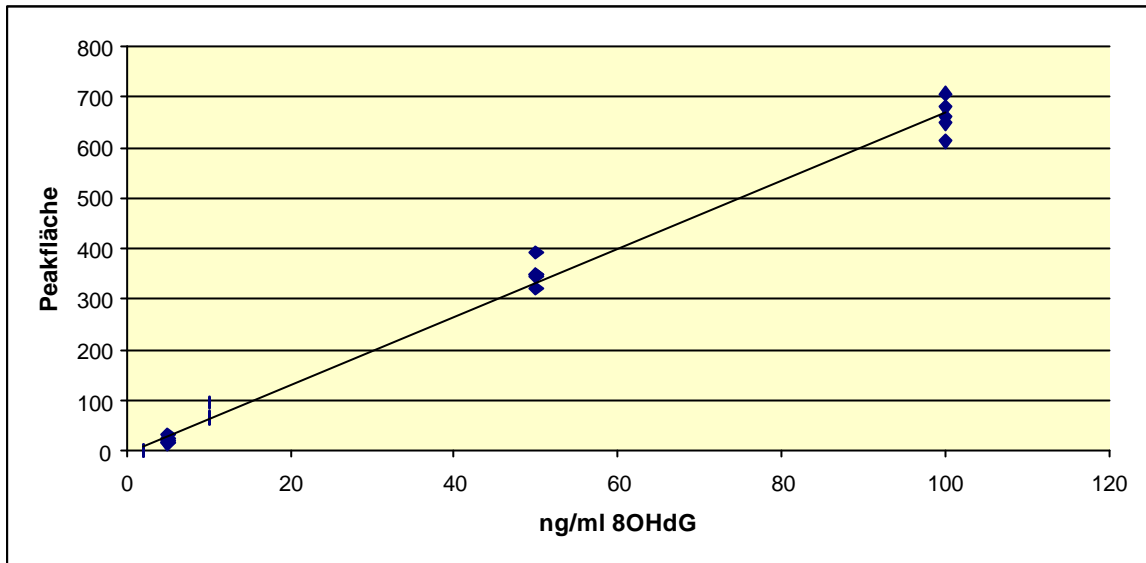


Abbildung 3.5: Beispiel einer Kalibriergeraden für 8OHdG.

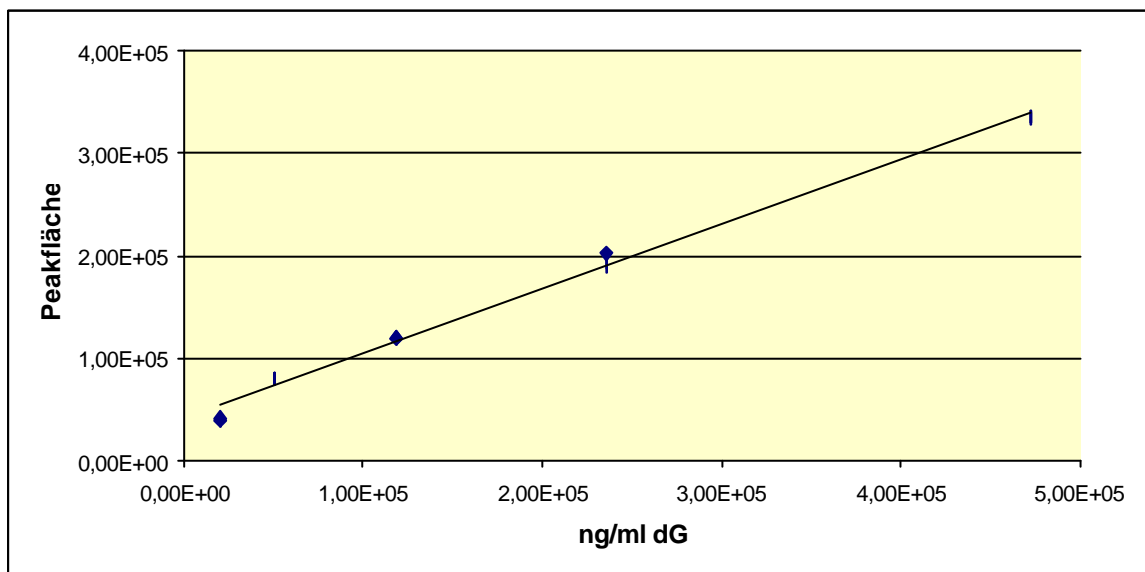


Abbildung 3.6: Beispiel einer Kalibriergeraden für dG.

LC-MS/MS

LC:

Gerät: HP 1100 mit Autosampler, Degaser, binärer Gradientenpumpe, Säulenofen (*Agilent Technologies, Waldbronn*)

Vorsäule: C18 ODS; 4 x 2 mm

1. Säule: Prodigy 3 μ ODS3; 100 Å; 30 x 2 mm (*Phenomenex, Aschaffenburg*)

2. Säule: Prodigy 3 μ ODS3; 100 Å; 100 x 2 mm (*Phenomenex, Aschaffenburg*)

Säulentemperatur: 45 °C

Puffersystem: A: 10 mM NH₄OAC (pH: 4,3)

B: MeOH

Zeit [min]	Flußrate [µl/min]	A [%]	B [%]
0,0	250,0	98,0	2,0
3,5	250,0	75,0	25,0
6,0	250,0	20,0	80,0
7,0	250,0	20,0	80,0
7,1	250,0	98,0	2,0
15,0	250,0	98,0	2,0

Tabelle 3.3: Lösungsmittelgradient

Fluss: 250 µl/min

Druck: ca. 75 bar

Injektionsvolumen: 60 µl

MS/MS

Gerät: API 2000, *PE Biosystems, Langen*

Quelle: Elektrospray Ion Quelle (Turbo Ion)

Scan Type: positive MRM (multiple reaction monitoring)

Massenübergänge: 8OHdG: m/z=284,2/168,1

dG m/z=268,1/134,9

3.4 Anreicherung, Quantifizierung und Charakterisierung lokalisierter Mutationen

3.4.1 Allgemeines

Alle hier verwendeten Verbrauchsmaterialien aus Kunststoff und Lösungen wurden (außer Enzyme), soweit sie nicht vom Hersteller steril geliefert wurden, autoklaviert. Zur Vermeidung von Kontaminationen wurde mit aerosolgeschützten Filterspitzen pipettiert.

3.4.2 Isolierung und Quantifizierung genomischer DNA

3.4.2.1 DNA-Isolierung

Zur Isolierung der DNA aus den MCL-5-Zellen wurde der Qiagen Kit QIAmp® DNA Mini Kit (*Quiagen, Hilden*) verwendet. Die Lösungen (Proteinase K, Puffer AL, Waschlösung AW1 und 2, Puffer EL) wurden entsprechend der Firma Quiagen verwendet.

Das MCL-5-Zellsediment wurde in PBS in 1,5 ml Eppendorf-Tubes gelöst, sodass in 200 µl PBS $1-10 \times 10^5$ Zellen resuspendiert waren. Anschließend wurde nach den Angaben des Herstellers vorgegangen:

Nach Zugabe von 20 µl Proteinase K und 200 µl Lyse-Puffer AL wurde die Mischung gut durchmischt und 10 min bei 56 °C inkubiert. Dann zur Entfernung von Tropfen an den Gefäßwänden kurz zentrifugiert und 200 µl 96-100 % Ethanol zugegeben, gründlich durchmischt, nochmals kurz zentrifugiert und die gesamte Lösung vorsichtig auf die Spin-column gegeben und diese bei 8000 rpm 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Die Spin-column wurde einmal mit Waschlösung AW1 gewaschen und bei 8000 rpm 1 min zentrifugiert und anschließend mit Waschpuffer AW2 gewaschen und 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Die Filtrate wurden ebenfalls verworfen. Zur Eluierung der DNA von der Spin-column wurde 200 µl Puffer EL auf diese gegeben und das ganze 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde 1 min bei 8000 rpm zentrifugiert und die isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

3.4.2.2 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Menge im Filtrat wurde fluoreszenz-spektrophotometrisch mit Ethidiumbromid ermittelt [103].

Hierzu wurde eine Kalbsthymusstandardverdünnungsreihe (*Sigma, Deisenhofen*) von 0 µg/ml bis 50 µg/ml (0, 5, 10, 20, 30, 50 µg/ml) erstellt. Von diesen Standardlösungen wurden je 20 µl mit 180 µl Ethidiumbromid-Lösung (625 ng/ml) gemischt, in eine Quarz-Ultramikroküvette (*Hitachi, Tokio, Japan*) gefüllt und bei Exzitation (365 nm) und Emission (590 nm) im Fluorimeter (*Hitachi, Tokio, Japan*) gemessen. Anhand dieser Verdünnungsreihe wurden dann die Proben mit unbekannter Konzentration gemessen, indem sie so mit Wasser verdünnt wurden, dass ihre DNA-Konzentration in dem Bereich der Verdünnungsreihe lag.

Das Programm berechnet automatisch die Probenkonzentration anhand der Regressionsgraden aus den DNA-Standards.

3.4.2.3 DNA-Ethanol-fällung

Die DNA-Ethanol-fällung erfolgte zur Aufkonzentrierung der DNA. Das Filtrat der DNA-Isolierung wurde mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat-Lösung pH 5,2 (*Merck, Darmstadt*) versetzt und mit dem 3fachen Volumen eiskaltem Ethanol (96-100 %) gefällt (30-60 min Lagerung bei -80 °C und 30 min Zentrifugation bei 0 °C und 14000 rpm). Das Ethanol wurde dekantiert und das Pellet noch 2 x mit 200 µl eiskaltem 70 %igem Ethanol gewaschen. Zwischendurch wurde der Niederschlag im N₂-Strom getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in der gewünschten Menge Wasser oder für die 8OHdG-Bestimmung in 20 mM Natrium-Acetat-Puffer aufgenommen.

3.4.3 Restriktionsanalyse

Die Restriktionsenzyme wurden mit 10x Inkubationspuffern geliefert (*New England BioLabs, Frankfurt*), die unterschiedliche Salzkonzentrationen haben können.

Die Enzymvorratslösungen wurden bei -20 °C gelagert und so kurz wie möglich höheren Temperaturen ausgesetzt. DNA-Templates wurden 4 h in Gegenwart des Inkubationspuffers bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur mit 5-10 U Restriktionsenzym pro µg DNA im Wasserbad oder im Thermocycler inkubiert.

-
- Restriktionsansatz:
- 2,5 U Enzym
 - 1facher Puffer
 - 5 µl PCR-Produkt
 - Wasser auf insgesamt 25 µl Reaktionsvolumen

Für die Restriktionen wurden Mastermixe aus 10 x Puffer und Enzymen hergestellt, die die Konzentrationen des oben dargestellten Restriktionsansatzes enthielten.

Das Ergebnis der Restriktionen wurde gelelektrophoretisch überprüft.

3.4.4 Agarosegelelektrophorese

Die PCR-Produkte und Restriktionsfragmente wurden mittels Gelelektrophorese untersucht. Da hier sehr kleine Fragmente (80-300 bp) zu untersuchen waren, wurden Gele mit einer Agarosekonzentration von 2,5 % hergestellt. Die Agarose wurde hierzu in Tris-Acetat-Puffer (TAE) im Mikrowellenofen aufgekocht. Die Lösung wurde auf etwa 60 °C abgekühlt und je 100 ml Gel mit 5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) (*Roth, Karlsruhe*) versetzt. In einem Gelträger (*peqlab, Erlangen*) mit eingesetztem Probenkamm konnte die Lösung erstarren. Zur Variation der Taschengröße standen unterschiedliche Kämmen zur Verfügung.

Die Proben wurden mit 10fach konzentriertem Ladungspuffer versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Als Laufpuffer wurde Tris-Acetat-Puffer (1 x TAE) bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA bis zur ausreichenden Trennung der DNA Fragmente verwendet.

Anschließend wurden die Gele zur Visualisierung der Banden auf einem Transilluminator mit UV-Licht durchstrahlt und das Ergebnis mit dem ImageMaster VDS (*Pharmacia-Biotech, Freiburg*) dokumentiert. Die Fragmente wurden anhand eines mitaufgetragenen Markers (100 bp-Leiter, *New England BioLabs, Frankfurt*) der Größe zugeordnet.

TAE-Puffer:

- 0,04 M Tris-Acetat
- 0,002 M EDTA

50fachkonzentrierter TAE-Puffer:

- 242 g Tris (*Roth, Karlsruhe*)
- 57,1 ml Eisessig (99,5 %) (*Promochem, Wesel*)
- 100 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0 (*Fluka, Buchs, Schweiz*)
- entionisiertes Wasser auf 1 L

Ladungspuffer:

- 0,25 % Bromphenolblau
- 50 % Glycerin
- 40 mM Tris-HCl, pH 8,2 (*Roth, Karlsruhe*)
- 0,5 % SDS
- 1 mM EDTA (*Fluka, Buchs, Schweiz*)

3.4.5 Polymerasekettenreaktion

Die Herstellung der Mastermixe und das Ansetzen der einzelnen Reaktionen bis auf die DNA-Templatezugabe erfolgte zum Schutz vor Kontaminationen in einer PCR-Arbeitskammer, die mit UV-Röhren ausgestattet war.

Im allgemeinen wurde folgendermaßen vorgegangen: Entionisiertes und autoklaviertes Wasser, PCR-Reaktionspuffer (10fach-Konzentrat), 20-200 μM dNTPs (*Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg*), gegebenenfalls MgCl_2 -Lösung (25 mM, *Roche Diagnostics*), die Primer in erforderlicher Konzentration sowie die Polymerase (0,5 U/ μl) wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen (*Eppendorf, Hamburg*) für je 30 Ansätze auf Eis pipettiert, gemischt und dieser Mastermix auf 0,6 ml dünnwandige Reaktionsgefäße (*peqlab, Erlangen*) verteilt. Als letztes wurde die Template-DNA bzw. für die Negativ-Kontrolle eine entsprechende Menge Wasser dem Mastermix zupipettiert. Die PCR-Tubes wurden sofort in den Thermocycler (*Omn-E, Hybaid, Heidelberg*) mit beheizbarem Deckel gestellt und das entsprechende Temperatur-Zeit-Programm gestartet. Nach Abschluss der Reaktion wurden die Ansätze bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Kontrolliert wurden die entstandenen PCR-Produkte durch die Agarosegelelektrophorese (3.4.4).

dNTPs:

Aus den einzelnen dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) wurde ein dNTP-Mix hergestellt, in dem die Konzentration der einzelnen dNTPs 1 mM betrug. Dieser Mix wurde so aliquotiert und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, dass jeder Mix nur einmal zum direkten Verbrauch aufgetaut wurde. Ein mehrmaliges Auftauen und Einfrieren des dNTP-Mix ergab eine niedrigere Ausbeute an PCR-Produkt.

Primer:

Die Primer wurden von *Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg* synthetisiert, in lyophilisierten Zustand verschickt und nach dem Lösen als 200 μM Stammlösungen bei -20°C gelagert. Für die PCR-Anwendungen wurden hiervon 1:40 Verdünnungen (5 μM -Lösungen) hergestellt, die ebenfalls bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert wurden.

Bez:	Sequenz (5'® 3')	AL [bp]	Ref:
P86F	CCT CCA CCG CTT CTT GTC CTG CTT GCT TAC CTC GCT	647	[100]
P90R	CCT CAT CTT GGG CCT GTG TTA CCT AGG TTG GCT		
P72F	GTT GGC TCT GAC TGT ACC AC	113	[104]
P73R	CCT GAC CTG GAG TCT TCC AG		
P74F	GCA <i>GAA TTC</i> TGC GTT GGC TCT GAC TGT ACC AC	123	[104]
P75R	GCC <i>GAA TTC</i> TGG TCC AGT GTG ATG ATG GTG AG		
K62F	GTA TTA ACC TTA TGT GTG ACA TGT TCT AAT	266	[100]
K63R	ACT CAT GAA AAT GGT CAG AGA AAC CTT TAT CTG		
K64F	CTG CTG AAA ATG ACT GAA TAT AAA CTT GTG GTA GTT GGA CCT	180	[100]
K65R	CCT TTA TCT GTA TCA AAG AAT GGT CCT GCA CCA ATA TGC		
T57	CAG GGT CCC TTG GCC CCA G	Ca. 80	[36, 105]
T80	GAG AGT TGC TTT ACG TGG CCT		
T57	CAG GGT CCC TTG GCC CCA G	Ca. 80	[36]
T81	CAA CAC AGA CCC ACC CAG AGC		

Tabelle 3.4: Primersequenzen

GAA TTC: Eco R1-Erkennungsstelle
 AL: Amplifikationslänge
 P: *p53*
 K: *Ki-ras*
 T: Translokation t(14;18)
 F / R: vorwärts bzw. revers komplementär zum Sinnstrang
 (Transkriptionsrichtung)

3.4.5.1 Protokoll zur Anreicherung von Punktmutationen am Codon 248 des *p53*-Gens

Um die Nachweisgrenze für Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens ermitteln zu können, wurde der Mutantenstandard (Mut), H1573 (*Zentrum für Innere Medizin, Abt. Haematologie/Onkologie, Marburg*), in genomischer DNA von MCL-5-Zellen als Wildtyp (WT) verdünnt.

Zur besseren Quantifizierung wurde der Mutantenstandard zunächst amplifiziert. Hierzu wurde ein Exon 7 und 8 Amplifikat (647 bp) erstellt. Diese erste PCR wurde mit der Pwo-Polymerase mit Proofreading-Aktivität (*Boehringer Mannheim, Mannheim*) durchgeführt, um Polymerasefehler zu vermeiden. Bei der Pwo-Polymerase ist es erforderlich, einen Mastermix ohne Puffer und Enzym und getrennt einen Enzymmix anzusetzen. Der Enzymmix wird direkt vor Beginn des Temperatur-Zeit-Programms zugesetzt, um einen Hotstart zu umgehen und eine Interaktion zwischen Primern, Template und dem Enzym zu vermeiden. Die PCR wurde in 50 µl Ansätzen durchgeführt.

a) Herstellung eines Amplifikats mit mutierter Sequenz:

Pro PCR-Ansatz

<i>Mastermix:</i>	<i>Stammlösung [µl]</i>	<i>finale Konzentration [µM]</i>
Steriles H ₂ O	auf 50 ergänzt	
dNTP-Mix	10	200
Primer P86	1,5	150
Primer P90	1,5	150
Template DNA (150 ng/µl)	5	

<i>Enzymmix</i>	<i>Stammlösung [µl]</i>
Steriles H ₂ O	auf 25 ergänzt
10 x PCR-Puffer mit	5
20 mM MgSO ₄	
Pwo-Polymerase (5 U/µl)	0,5

Temperatur-Zeit-Programm

95 °C	2 min	1 x
94 °C	1 min	} 30 x
60 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	7 min	1 x

Diese PCR-Produkte wurden fluorimetrisch quantifiziert und anschließend die Produkte des Mutantenstandards in 2 µg MCL-5-DNA (WT-DNA) verdünnt (1 amplifizierte Mutantenkopie in 2 µg WT-DNA, 10, 10², 10³, 10⁴ und 10⁵ amplifizierte Mutantenkopien in je 2 µg WT-DNA). Um die erforderliche Menge an Mutantenkopien zu erhalten, wurden die quantifizierten Amplifikate in Wasser verdünnt und anschließend der WT-DNA zugegeben. Bei den Verdünnungsschritten wurden keine Mengen unter 10 µl pipetiert, um Pipetierfehler zu vermeiden. Die Verdünnungsschritte lagen zwischen 1:10 und 1:10000.

Anschließend wurde wie mit den Proben vorgegangen.

b) Optimierte Mutationsanreicherungsmethode:Probenanalyse

Pro Expositionsversuch wurden 60 µg DNA auf diese Mutation untersucht. Es wurden pro Versuch je 60 µg exponierte MCL-5-DNA sowie 60 µg Kontroll-MCL-5-DNA auf das Vorliegen der *p53*-Mutation untersucht. Die DNA wurde auf 30 Ansätze mit je 2 µg DNA aufgeteilt.

Die Analyse erfolgte durch drei Restriktionsschritte mit *MSP I*, zwischen denen eine nested PCR zur Anreicherung der Fragmente mit mutierter DNA durchgeführt wurde. Diese PCRs wurden mit der thermostabilen AmpliTaq Gold-Polymerase (*Perkin Elmer, Roche Molecular Systems*) durchgeführt, wodurch kein Hotstart nötig war.

1. *Verdau der genomischen DNA:*

- Restriktionsansatz:
- 1 μl *MSP I*-Restriktionsenzym (20000 U/ml)
 - 2,5 μl (10 x Puffer)
 - 10-15 μl genomische DNA (2 μg)
 - Wasser auf insgesamt 25 μl Reaktionsvolumen

Die Restriktion wurde 10 h bei 37 °C im Thermocycler durchgeführt.

Hierbei ergaben sich beim WT vier Fragmente: 99 bp, 168 bp, 276 bp, 105 bp.

2. *PCR zur Anreicherung der mutierten DNA-Fragmente*

Pro PCR-Ansatz: (50 μl Reaktionen)

<i>Mastermix:</i>	<i>Stammlösung [μl]</i>	<i>finale Konzentration [μM]</i>
Steriles H ₂ O	31,5	
dNTP-Mix	1	20
10 x PCR-Puffer	5	
25 mM MgCl ₂ -Lösung	3	1500
Primer P72	2	200
Primer P73	2	200
DNA-Lösung des 1. Verdaus	5	
AmpliTaq Gold-Polymerase (5 U/ μl)	0,5	

Temperatur-Zeit-Programm

94 °C 10 min	1 x
94 °C 30 sec	} 25 x
62 °C 1 min	
72 °C 2 min	
72 °C 7 min	1 x

Hier entstand bei den Mutationen und bei ungeschnittenem WT ein 113 bp großes Fragment.

3. *Verdau der amplifizierten DNA:*

- Restriktionsansatz:
- 1 μl *MSP* I-Restriktionsenzym (20000 U/ml)
 - 2,5 μl (10 x Puffer)
 - 5 μl amplifizierte DNA aus Schritt 2
 - 16,5 μl steriles H_2O

Die Restriktion wurde 4 h bei 37 °C im Thermocycler durchgeführt.

Hierbei ergaben beim WT zwei Fragmente: 67 bp, 46 bp, bei der Mutante wurde das 113 bp große Fragment nicht geschnitten.

4. *PCR zur Anreicherung der mutierten DNA-Fragmente*

Pro PCR-Ansatz: (50 μl Reaktionen)

<i>Mastermix:</i>	<i>Stammlösung [μl]</i>	<i>finale Konzentration [μM]</i>
Steriles H_2O	31,5	
dNTP-Mix	1	20
10 x PCR-Puffer	5	
25 mM MgCl_2 -Lösung	3	1500
Primer P74	2	200
Primer P75	2	200
DNA-Lösung des 2. Verdaus	5	
AmpliTaq Gold-Polymerase (5 U/ μl)	0,5	

Temperatur-Zeit-Programm

94 °C 10 min	1 x
94 °C 30 sec	} 25 x
62 °C 1 min	
72 °C 2 min	
72 °C 7 min	1 x

Hier ergab sich für die Mutationen, aber auch für nicht geschnittenen WT ein 123 bp großes Fragment.

5. Verdau der amplifizierten DNA:

- Restriktionsansatz:
- 1 μ l *MSP* I-Restriktionsenzym (20000 U/ml)
 - 2,5 μ l (10 x Puffer)
 - 5 μ l amplifizierte DNA aus Schritt 4
 - 16,5 μ l steriles H₂O

Die Restriktion wurde 4 h bei 37 °C im Thermocycler durchgeführt.

Hierbei ergaben sich beim WT zwei Fragmente: 89 bp, 44 bp, bei der Mutante wurde das 123 bp große Fragment nicht geschnitten und konnte auf einem 2,5 %igen Agarosegel sichtbar gemacht werden.

3.4.5.2 Protokoll zur Anreicherung von Punktmutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens

Um die Nachweisgrenze für Mutationen im Codon 12 des *Ki-ras*-Gens ermitteln zu können, wurde der Mutantenstandard (Mut), H2009 (heterozygot) (*Zentrum für Innere Medizin, Abt. Haematologie/Onkologie, Marburg*), in genomischer DNA von MCL-5-Zellen als Wildtyp (WT) verdünnt.

Zur besseren Quantifizierung wurde der Mutantenstandard zunächst amplifiziert. Hierzu wurde zunächst ein 266 bp-Amplifikat erstellt. Diese erste PCR wurde mit der Pwo-Polymerase mit Proofreading-Aktivität (*Boehringer Mannheim, Mannheim*) durchgeführt, um Polymerasefehler zu vermeiden. Die PCR wurde in 50 μ l Ansätzen durchgeführt.

a) Herstellung eines Amplifikats mit mutierter Sequenz:

Pro PCR-Ansatz

<i>Mastermix:</i>	<i>Stammlösung [μl]</i>	<i>finale Konzentration [μM]</i>
Steriles H ₂ O	auf 50 ergänzt	
dNTP-Mix	10	200
Primer K62	1,5	150
Primer K63	1,5	150
Template DNA (150 ng/ μ l)	5	

<i>Enzymmix</i>	<i>Stammlösung [μl]</i>
Steriles H ₂ O	auf 25 ergänzt
10 x PCR-Puffer mit 20 mM MgSO ₄	5
Pwo-Polymerase (5 U/μl)	0,5

Temperatur-Zeit-Programm

95 °C	2 min	1 x
94 °C	1 min	} 30 x
60 °C	1 min	
72 °C	2 min	
72 °C	7 min	1 x

Diese PCR-Produkte wurden fluorimetrisch quantifiziert und anschließend die Produkte des Mutantenstandards in 2 μg MCL-5-DNA (WT-DNA) verdünnt (10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸ und 10⁹ amplifizierte Mutantenkopien in 10⁹ amplifizierten WT-Kopien).

Anschließend wurde wie mit den Proben nach der ersten PCR vorgegangen.

b) Optimierte Mutationsanreicherungsmethode:

Probenanalyse

Pro Expositionsversuch wurden 60 μg DNA auf diese Mutation hin untersucht. Es wurden pro Versuch je 60 μg exponierte MCL-5-DNA sowie 60 μg Kontroll-MCL-5-DNA auf das Vorliegen der *K-ras*-Mutation hin untersucht. Die DNA wurde auf 30 Ansätze mit je 2 μg DNA aufgeteilt.

Die Analyse erfolgte zunächst wie bei dem Standard mit einer PCR mit Pwo-Polymerase zur fehlerfreien Anreicherung der Mutation. Anschließend erfolgte eine PCR mit der thermostabilen AmpliTaq Gold-Polymerase (*Perkin Elmer, Roche Molecular Systems*) und einem Mismatch-Primer, um die Restriktionsstelle einzuführen. Dann erfolgten drei Restriktionsschritte zwischen denen noch zwei PCR-Anreicherungs-schritte durchgeführt wurden:

1. PCR zur Anreicherung der mutierten DNA-Fragmente mit Pwo-Polymerase

<i>Mastermix:</i>	<i>Stammlösung [μl]</i>	<i>finale Konzentration [μM]</i>
Steriles H ₂ O	auf 25 ergänzt	
dNTP-Mix	10	200
Primer K62	1,5	150
Primer K63	1,5	150
Template DNA (2 μ g)	10-15	

<i>Enzymmix</i>	<i>Stammlösung [μl]</i>
Steriles H ₂ O	auf 25 ergänzt
10 x PCR-Puffer mit 20 mM MgSO ₄	5
Pwo-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5

Temperatur-Zeit-Programm

95 °C 2 min	1 x
94 °C 1 min	} 30 x
60 °C 1 min	
72 °C 2 min	
72 °C 7 min	1 x

2. PCR zur Einführung der Restriktionsstelle

Pro PCR-Ansatz: (50 μ l Reaktionen)

<i>Mastermix:</i>	<i>Stammlösung [μl]</i>	<i>finale Konzentration [μM]</i>
Steriles H ₂ O	31,5	
dNTP-Mix	1	20
10 x PCR-Puffer	5	
25 mM MgCl ₂ -Lösung	3	1500
Primer K64	2	200
Primer K65	2	200
DNA-Lösung des 1. Verdaus	5	
AmpliTaq Gold-Polymerase	0,5	

(5 U/ μ l)

Temperatur-Zeit-Programm

94 °C	10 min	1 x
94 °C	30 sec	} 25 x
68 °C	45 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1 x

Hier entstand ein 180 bp großes Fragment.

3. Verdau der amplifizierte DNA:

Restriktionsansatz:

- 2 μ l *Bst*NI-Restriktionsenzym (10000 U/ml)
- 2,5 μ l (10 x Puffer)
- 5 μ l amplifizierte DNA aus Schritt 2
- Wasser auf insgesamt 25 μ l Reaktionsvolumen

Die Restriktion wurde 4 h bei 60 °C im Thermocycler durchgeführt.

Hierbei ergaben sich beim WT zwei Fragmente: 139 bp und 41 bp; die Mutante wurde nicht geschnitten.

4. PCR zur Anreicherung der mutierten DNA-Fragmente

Dazu wurde die Restriktions-Lösungen 1:1000 verdünnt und davon 5 μ l in die PCR eingesetzt.

Pro PCR-Ansatz: (50 μ l Reaktionen)

<i>Mastermix:</i>	<i>Stammlösung [μl]</i>	<i>finale Konzentration [μM]</i>
Steriles H ₂ O	31,5	
dNTP-Mix	1	20
10 x PCR-Puffer	5	
25 mM MgCl ₂ -Lösung	3	1500
Primer K64	2	200
Primer K65	2	200

DNA - Verdünnung	5
AmpliTaq Gold-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5

Temperatur-Zeit-Programm

94 °C	10 min	1 x
94 °C	30 sec	} 20 x
68 °C	45 sec	
72 °C	1 min	
72 °C	10 min	1 x

Hier entstand bei der Mutante und bei nicht verdaulichem Wildtyp ein 180 bp großes Fragment.

3. *Verdau der amplifizierten DNA:*

Der Verdau wurde wie im Schritt 3 durchgeführt.

4. *PCR zur Anreicherung der mutierten DNA-Fragmente*

Dazu wurden die Restriktions-Lösungen 1:1000 verdünnt und davon 5 μ l in die PCR eingesetzt und die PCR wie im Schritt 4 durchgeführt, statt 20 Zyklen jedoch nur 17.

5. *Verdau der amplifizierten DNA:*

Der Verdau wurde wie Schritt 3 durchgeführt.

Hierbei ergaben sich beim WT 2 Fragmente: 139 bp und 41 bp, bei der Mutante wurde das 180 bp große Fragment nicht geschnitten. Dieses konnte auf einem 2,5 %igen Agarosegel sichtbar gemacht werden.

3.4.5.3 Protokoll zur Anreicherung der Translokation t(14;18)

Die Translokation wurde durch eine semi-nested PCR untersucht.

Um die Nachweisgrenze für die Translokation t(14;18) ermitteln zu können, wurde der Mutantenstandard, DNA einer Leukämie-Patientin (*Hämatologie, Klinikum Innenstadt, München*), in genomischer DNA von MCL-5-Zellen als Wildtyp verdünnt.

Probenanalyse

Pro Expositionsversuch wurden 60 µg DNA auf diese Mutation untersucht. Es wurden pro Versuch je 60 µg exponierte MCL-5-DNA sowie 60 µg Kontroll-MCL-5-DNA auf die Translokation geprüft. Die DNA wurde auf 30 Ansätze mit je 2 µg DNA aufgeteilt.

In der ersten PCR-Runde wurden PCR-Beads der Firma *Pharmacia biotech, Freiburg* für 25 µl Reaktionen eingesetzt, in der zweiten Runde erfolgte die PCR mit der thermostabilen AmpliTaq Gold-Polymerase (*Perkin Elmer, Roche Molecular Systems*), wodurch weniger Nebenamplifikate erhalten wurden.

1. PCR:

Pro PCR-Ansatz: (25 µl Reaktionen)

<i>Mastermix:</i>	<i>Stammlösung [µl]</i>	<i>finale Konzentration [µM]</i>
Zu den Beads:		
Steriles H ₂ O	auf 25 ergänzt	
Primer T80	1	100
Primer T57	1	100
DNA –Verdünnung (2 µg)	10-15	

Temperatur-Zeit-Programm

94 °C 2 min	1 x
94 °C 1 min	} 30 x
55 °C 1 min	
72 °C 2 min	
72 °C 7 min	1 x

2. *PCR zur Anreicherung der mutierten DNA-Fragmente:*

Nach der ersten PCR wurden die PCR-Produkte 1:20 in entionisiertem Wasser verdünnt.

Pro PCR-Ansatz: (50 μ l Reaktionen)

<i>Mastermix:</i>	<i>Stammlösung [μl]</i>	<i>finale Konzentration [μM]</i>
Steriles H ₂ O	31,5	
dNTP-Mix	4	100
10 x PCR-Puffer	5	
25 mM MgCl ₂ -Lösung	3	1500
Primer T81	2	200
Primer T57	2	200
DNA-Verdünnung der 1. Runde	5	
AmpliTaq Gold-Polymerase (5 U/ μ l)	0,5	

Temperatur-Zeit-Programm

94 °C 2 min	1 x
94 °C 1 min	} 30 x
61 °C 1 min	
72 °C 1 min	
72 °C 7 min	1 x

Hier entstand bei Anwesenheit der Translokation ein ca. 80 bp großes Fragment, welches in einem 2,5 % Agarosegel sichtbar gemacht werden konnte.

3.4.5.4 Berechnung der Mutationshäufigkeit

Die Mutationshäufigkeit wurde anhand der Poisson-Formel berechnet [7]:

$$MF = -\ln(1 - p/n) / M$$

MF:	Mutationshäufigkeit
p:	Zahl an positiven Reaktionen
n:	Anzahl der Reaktionen
M:	Gesamtzahl an Templatekopien in einem Ansatz

3.4.6 Auftragssequenzierung von PCR-Produkten

Für die Sequenzierungen wurden die PCR-Produkte, bei denen am Ende jeder Mutationsanreicherung eine Bande auf dem Agarosegel zu sehen war, nochmals nach dem jeweiligen letzten PCR-Verfahren amplifiziert und diese Produkte zur Firma *GENterprise, Mainz* zur Sequenzierung geschickt.

Für die Sequenzierung nach Sanger wurde der Sense-Primer (Primer 74) bei Mutationen im *p53*-Gen miteingereicht. Bei Mutationen im *K-ras*-Gen wurde der Antisense-Primer (Primer 65) für die Sequenzierung verwendet, da der Sense Primer zu nahe an der Mutationsstelle liegt und so bei der Sequenzierung die Gefahr bestand, dass die ersten Basen nicht eindeutig erkannt werden.

4 Ergebnisse

4.1 Anreicherung und Quantifizierung von Mutationen mit PCR-Methoden

Zur Erstellung der im Methodenteil dargestellten mehrstufigen Mutations-Anreicherungsprotokolle mussten zunächst die Effizienz und der Anreicherungsgrad der einzelnen Amplifikations- und Selektionsschritte untersucht werden, um die erforderliche Verdünnung zwischen diesen Schritten einstellen zu können. Dabei zeigte sich unter anderem, dass Ready-to-Go-PCR-Beads, d.h. vorgefertigte Perlen, welche die meisten zur PCR erforderlichen Komponenten einschließlich Deoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs) und Taq-DNA-Polymerase enthalten, wegen einer zu hohen Polymerase-Fehlerrate nicht zur Anreicherung von Punktmutationen durch die RFLP-PCR-Methode geeignet sind.

4.1.1 Einflüsse auf die Amplifikationseffizienz und -genauigkeit

Am Beispiel der *Bst*NI-spaltbaren Wildtyp-K-*ras*-Amplifikate wurde der Einfluss der PCR-Bedingungen auf den Amplifikationsgrad und auf die Häufigkeit der Entstehung falscher, d.h. spaltungsresistenter PCR-Signale, durch Einsatz bekannter Matrizenmengen und verschiedener Amplifikationsbedingungen untersucht. Dazu wurde eine bekannte Menge K-*ras*-Amplifikat, wie im Methodenteil unter 3.4.5.2 beschrieben, amplifiziert, mit *Bst*NI geschnitten, verdünnt und einer Anschluß-PCR unterzogen (siehe Abb. 4.1).

Zur Bestimmung der am besten geeigneten PCR-Bedingung für die Mutationsanreicherung wurden die Polymerasen AmpliTaq und Taq in den Ready-to-Go-PCR-Beads miteinander verglichen. PCR-Ansätze mit AmpliTaq wurden mit dNTP-Konzentrationen von 20 μ M und 200 μ M durchgeführt. Als Matrize bei der Bestimmung der Fehlerrate und Amplifikationseffizienz wurden K-*ras*-Amplifikate verwendet, die mit Pwo-Polymerase aus genomischer DNA erhalten worden waren. Je 10^8 Kopien (0,029 ng) dieser Amplifikate wurden unter den drei folgenden Bedingungen über 30 Zyklen weiteramplifiziert:

1. AmpliTaq mit 20 μ M dNTPs
2. AmpliTaq mit 200 μ M dNTPs
3. Ready-to-Go-PCR-Beads mit 200 μ M dNTPs

Auf das in Abb. 4.1 gezeigte Gel wurden 10 μl aus den 50 μl PCR-Ansätzen aufgetragen. Zur *Bst*NI-Spaltung wurden die Ansätze 1:5 verdünnt. Von dieser Spaltung wurden jeweils 10 μl in den Gelspuren 6-9 aufgetragen. Zusätzlich wurden die Restriktionsansätze vor der Anschluss-PCR wie folgt verdünnt:

- a) keine Verdünnung
- b) 1:10
- c) 1:100
- d) 1:1000

Da die Anschluss-PCR (2. PCR) lediglich dazu diente, die Polymerasefehler aus der ersten PCR-Runde aufzuzeigen, wurde für die unterschiedlich verdünnten Ansätze Nr. 1 - 3 einheitlich das System mit der höchsten Amplifikationseffizienz verwendet, d.h. Ready-to-Go-PCR-Beads. Von den erhaltenen PCR-Produkten wurden jeweils 10 μl auf das Gel in Abb. 4.1 aufgetragen.

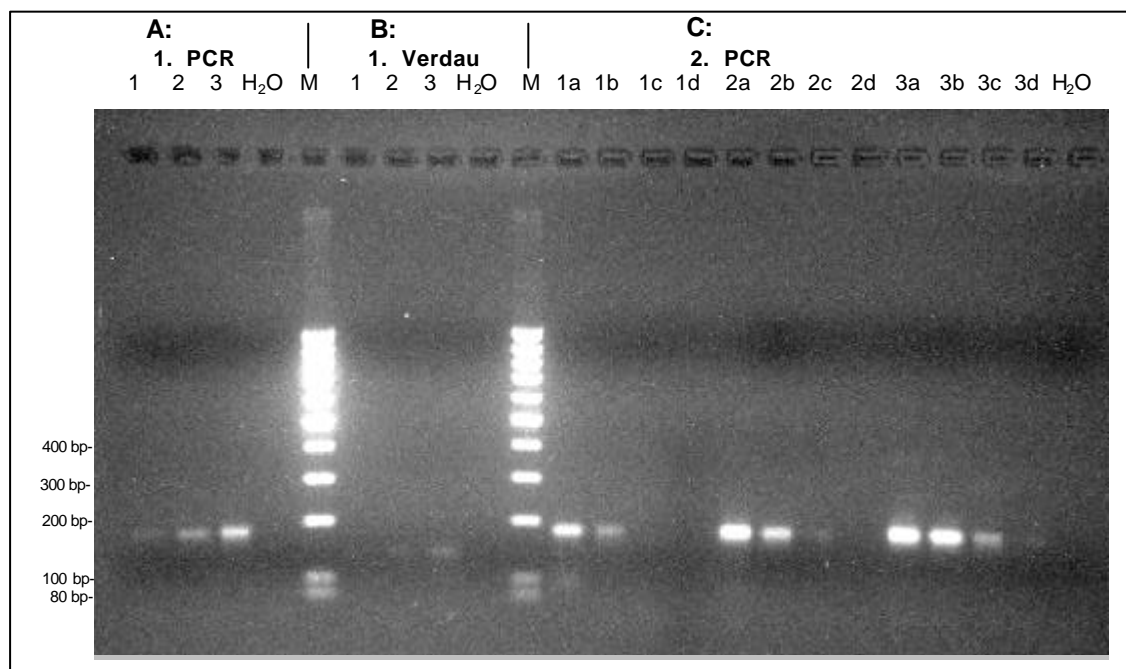


Abbildung 4.1: Einfluß der Amplifikationsbedingungen auf die PCR-RFLP-Anreicherung von Punktmutationen am Codon 12 des *K-ras*-Gens. Auf dem Agarosegel wurden PCR-Produkte aufgetrennt aus Ansätzen mit AmpliTaq und 20 μM dNTPs (1) bzw. 200 μM dNTPs (2) sowie mit Ready-to-Go-PCR-Beads (3), die 200 μM dNTPs enthalten. Gezeigt werden PCR-Produkte nach der ersten PCR-Runde (A), nach der *Bst*NI-Spaltung (B) und nach der Anschluß-PCR, der 2. PCR (C), unterschiedlich nach der *Bst*NI-Spaltung (a-d). Als Längenstandard wurde eine 100 bp-Leiter verwendet.

Stufe A (1. PCR-Runde):

Bei der ersten PCR-Runde ist eine deutliche Zunahme der Amplifikatmengen von 1 nach 3 erkennbar. Die Amplifikationsbedingung 1 (AmpliTaq + 20 nM dNTPs) lässt eine schwache Bande mit ca. 10-20 ng PCR-Produkt erkennen. Bei der 2. Bedingung (AmpliTaq + 200 nM dNTPs) ist eine deutliche Bande bei 181 bp erkennbar (ca. 20-40 ng PCR-Produkt). Bei der 3. Bedingung (PCR-Beads) ist am meisten PCR-Produkt zu erkennen (ca. 60-80 ng). Somit zeigt die Amplifikation mit den PCR-Beads die höchste Amplifikationseffizienz.

Stufe B (1. Verdau):

Unter den drei getesteten Bedingungen (und bei der aufgetragenen DNA-Menge) war kein spaltungsresistentes Produkt zu erkennen. Von den aus Wildtyp-Amplifikat entstandenen *Bst*NI-Fragmenten wurden entsprechend der Amplifikationsausbeute von 1 nach 3 steigende Mengen beobachtet.

Stufe C (2. PCR):

Nach der Anschluss-PCR wurden noch nachweisbare Amplifikatmengen unter folgenden Bedingungen erhalten:

- Mit AmpliTaq und 20 μ M dNTP bei 1:10-Verdünnung;
- mit AmpliTaq und 200 μ M dNTP bei 1:100-Verdünnung;
- mit Ready-to-Go-PCR-Beads (200 μ M dNTP) bei 1:1000-Verdünnung.

Da drei der fünf Nukleotidpositionen der *Bst*NI-Erkennungsstelle durch den Primer K64 abgedeckt werden, muss eine Veränderung, die zum Verlust der Schnittstelle führt, am ersten und zweiten Nukleotid des Codons 12 (GGT) des *K-ras*-Gens stattfinden. Der Einfluss der Amplifikationsbedingungen auf Mutationen an diesen beiden Nukleotidpositionen wurde durch Spaltung mit *Bst*NI der Amplifikate der zweiten PCR untersucht. Mindestens 10-20 ng spaltungsresistentes Amplifikat (Pfeile in Abb. 4.2) traten auf:

- bei Verwendung von unverdünntem mit dem Reagenziensatz 1 erhaltenem Amplifikat;
- bei 1:10 verdünntem mit dem Reagenziensatz 2 erhaltenem Amplifikat;
- bei 1:100 verdünntem mit dem Reagenziensatz 3 erhaltenem Amplifikat.

Außer der Amplifikatmenge nahm der Anteil an spaltungsresistenten Amplifikats an der Gesamtmenge vor allem durch die Verwendung von Ready-to-Go-PCR-Beads an Stelle von AmpliTaq zu.

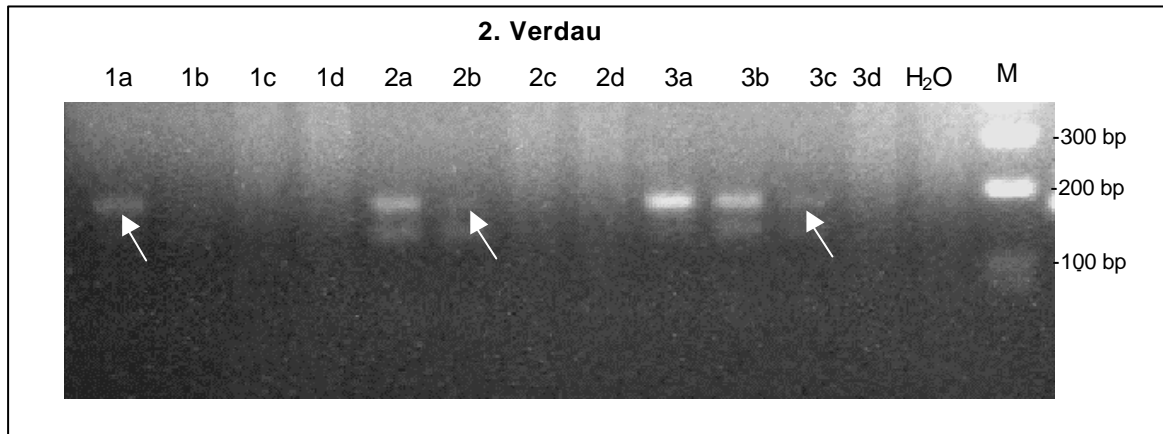


Abbildung 4.2: Einfluß der Amplifikationsbedingungen auf die Häufigkeit von Polymerasefehlern am Codon 12 des K-ras-Gens. PCR-Produkte aus den Ansätzen mit 1. AmpliTaq und 20 μ M dNTPs bzw. 2. 200 μ M dNTPS sowie 3. Ready-to-Go-PCR-beads wurden nach der ersten PCR-Runde mit *Bst*NI gespalten und nach unterschiedlicher Verdünnung (a-d) einer Anschluss-PCR unterworfen und nach Behandlung mit *Bst*NI analysiert. Wildtyp-Amplifikat von 181 bp wird durch das Restriktionsenzym *Bst*NI in 139 bp und 42 bp Fragmente gespalten. Durch Polymerasefehler an der *Bst*NI-Stelle mutiertes Amplifikat (Banden bei 181 bp auf diesem Gel) ist spaltungsresistent. Die Pfeile zeigen die geringste Verdünnung, bei der in den Amplifikationsbedingungen 1-3 gerade noch ein Bande zu erkennen ist.

Um eine praktikable Durchführung der Anreicherung der Mutationen zu ermöglichen, musste die Bedingung ausgewählt werden, bei der möglichst spät oder gar nicht spaltungsresistente Amplifikate bei nicht exponierter genomischer DNA auftraten, um falsch positive Ergebnisse ausschließen zu können. Aus diesem Grund wurde die erste Bedingung dieses Versuches zur weiteren Etablierung der Anreicherungsverfahren gewählt. Bei dieser Bedingung traten nach einer 1:10 Verdünnung nach dem zweiten Verdau keine spaltungsresistenten Amplifikate auf.

4.1.2 Genotypische Selektion von Punktmutationen am Codon 248 des Gens *p53*

Um die Nachweisgrenze der genotypischen Selektion von Punktmutationen am Codon 248 des Gens *p53* bestimmen zu können, wurde ein 647 bp Amplifikat des Mutantenstandards hergestellt und quantifiziert. Anschließend wurden 0 - 10⁵ dieser Mutantenkopien mit 2 µg genomischer Wildtyp-DNA verdünnt und wie im Methodenteil unter 3.4.5.1 beschrieben verfahren. Da die Restriktionsstelle in dem zu untersuchenden Wildtyp-Codon bereits vorhanden ist, konnte direkt mit einer Restriktion begonnen werden. Dieser folgten zwei PCR-Runden mit einer dazwischen liegenden und einer anschließenden Restriktion.

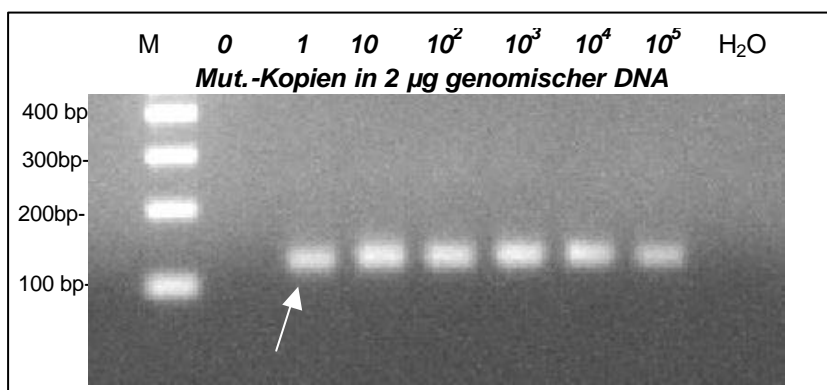


Abbildung 4.3: RFLP-PCR-Anreicherung von Punktmutationen am Codon 248 des *p53*-Gens. Die angegebene Kopienzahl an mutiertem Amplifikat wurde mit 2 µg genomischer DNA aus MCL-5-Zellen gemischt und dem Mutationsanreicherungsverfahren unterworfen. Von dem letzten Restriktionsschritt, auch von einem Kontrollansatz ohne Matrize (stattdessen Wasser) in der rechten Bahn, wurden 15 µl auf das gezeigte Agarosegel aufgetragen.

Durch die 2 µg genomische Wildtyp-DNA (rechts neben dem Längenstandard in Abb. 4.3) ist kein Hintergrund zu erkennen. Durch Zusatz einer Verdünnungsreihe von quantifiziertem am Codon 248 mutiertem Amplifikats (WT Codon 248: CGG; Mut. Codon 248: CTG) konnte eine Nachweisgrenze von 1 amplifizierten Mutantenkopien in 2 µg Wildtyp-DNA ermittelt werden (siehe Abb.4.3).

4.1.3 Genotypische Selektion von Punktmutationen am Codon 12 des K-ras-Gens

Um die Nachweisgrenze der genotypischen Selektion von Punktmutationen am Codon 12 des K-ras-Gens bestimmen zu können, wurde ein 266 bp Amplifikat des Mutantenstandards hergestellt und quantifiziert. Anschließend wurden 0 - 10^9 dieser Mutantenkopien mit 10^9 amplifizierten Wildtyp-Kopien verdünnt und wie im Methodenteil unter 3.4.5.2 beschrieben verfahren.

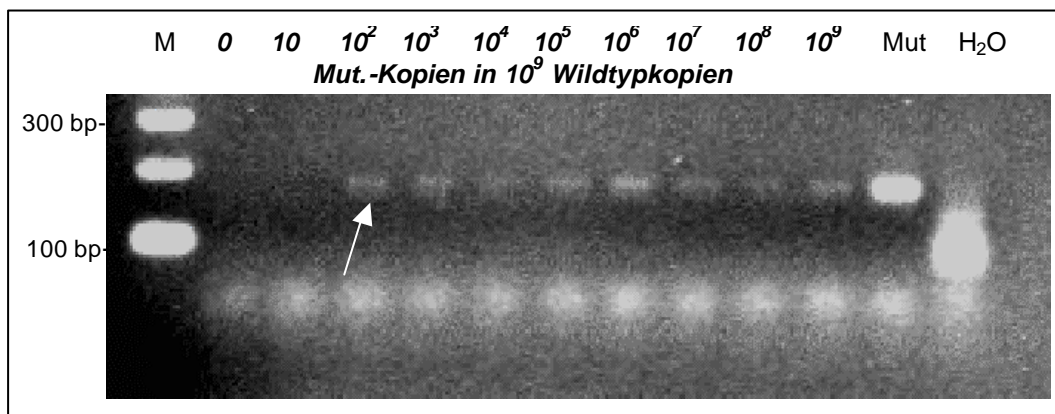


Abbildung 4.4: PCR-RFLP-Anreicherung von Punktmutationen am Codon 12 des K-ras-Gens. Die angegebene Kopienzahl an mutiertem Amplifikat wurde mit 10^9 amplifizierten DNA-Kopien aus MCL-5-Zellen (WT) gemischt und dem Mutationsanreicherungsverfahren unterworfen. Von dem letzten Restriktionsschritt, auch von einem Kontrollansatz ohne Matrize in der rechten Bahn, wurden 15 μ l auf das gezeigte Agarosegel aufgetragen.

Da bei dieser Anreicherungs-methode die Restriktionsstelle eingeführt werden musste, sind im nachfolgenden Restriktionsschritt noch Amplifikate der 1. PCR in dem Restriktionsansatz enthalten, die zu spaltungsresistenten Produkten führen. Diese müssen im Verlauf des Anreicherungsverfahrens durch Verdünnungen minimiert werden. Aus diesem Grund erfolgte nach den Restriktionen jeweils eine 1:1000 Verdünnung. Bei der hier etablierten Methode wurden keine positiven Signale durch 10^9 Wildtyp-Kopien erhalten. Durch Zusatz einer Verdünnungsreihe von quantifiziertem am Codon 12 mutiertem Amplifikat (WT Codon 12: GGT; Mut. Codon 12: GCT) konnte eine Nachweisgrenze von 1 amplifizierten Mutantenkopie in 10^9 Wildtyp-Kopien ermittelt werden (siehe Abb. 4.4).

4.1.4 Genotypische Selektion der Translokation t(14;18)

Um die Nachweisgrenze der genotypischen Selektion der Translokation t(14;18) bestimmen zu können, wurde ein 80 bp Amplifikat des Mutantenstandards hergestellt und quantifiziert. Anschließend wurden 0 - 10⁴ dieser Mutantenkopien mit 2 µg genomischer Wildtyp-DNA verdünnt und die Selektion mittels einer nested-PCR, wie im Methodenteil unter 3.4.5.3 beschrieben, durchgeführt.

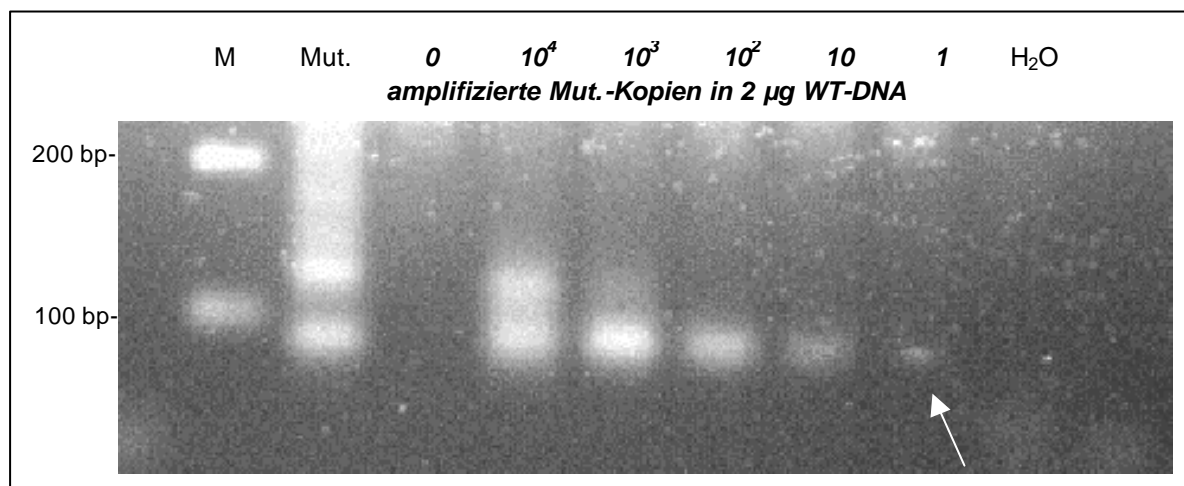


Abbildung 4.5: Nested-PCR-Anreicherung der Translokation t(14;18). Die angegebene Kopienzahl an mutiertem Amplifikat wurde mit 2 µg DNA aus MCL-5-Zellen gemischt und dem Mutations-Anreicherungsverfahren unterworfen. Von der zweiten PCR-Runde, auch von einem Kontrollansatz ohne Matrize in der rechten Bahn, wurden 20 µl auf das gezeigte Agarosegel aufgetragen.

Bei der hier etablierten Methode wurden keine positiven Signale durch 2 µg Wildtyp-DNA erhalten. Durch Zusatz einer Verdünnungsreihe von quantifiziertem mutierten Amplifikat konnte eine Nachweisgrenze von 1 amplifizierten Mutantenkopie in 2 µg Wildtyp-DNA ermittelt werden (siehe Abb. 4.5).

4.1.5 Bestimmung der Mutationshäufigkeit

Um die Induktion der drei untersuchten Arten von potentiell onkogenen Mutationen durch unterschiedliche Chemikalienbehandlung zu untersuchen, wurden je 1,7 x 10⁷ haploide Genomkopien (d.h. 60 µg genomische DNA) in 30 Parallelansätzen mit Hilfe der oben geschilderten Mutationsanreicherungsverfahren durchgemustert. Da die verwendeten PCR-Verfahren einerseits beim Vorliegen von 2 µg genomischer DNA kein nachweisbares Amplifikat erzeugen und andererseits beim Vorliegen bereits einer Mutantenkopie (vor der ersten Amplifikationsrunde) ein charakteristisches Signal entsteht,

kann man aus der Häufigkeit positiver Ansätze die Mutationshäufigkeit berechnen. Wie die Abb. 4.6 – 4.8 beispielhaft zeigen, traten bei den Kontrollansätzen ohne Mutagenbehandlung nie die mutationsspezifischen PCR-Signale auf.

Dabei betrug die Überlebensrate der MCL-5-Zellen in den Kontroll-Ansätzen definitionsgemäß 100 % und das Tailmoment lag zwischen 0 und 0,5.

Es traten demnach weder nachweisbare Translokationen spontan auf, noch wurden spontane Punktmutationen an den untersuchten Stellen der *p53*- und *K-ras*-Gene gefunden.

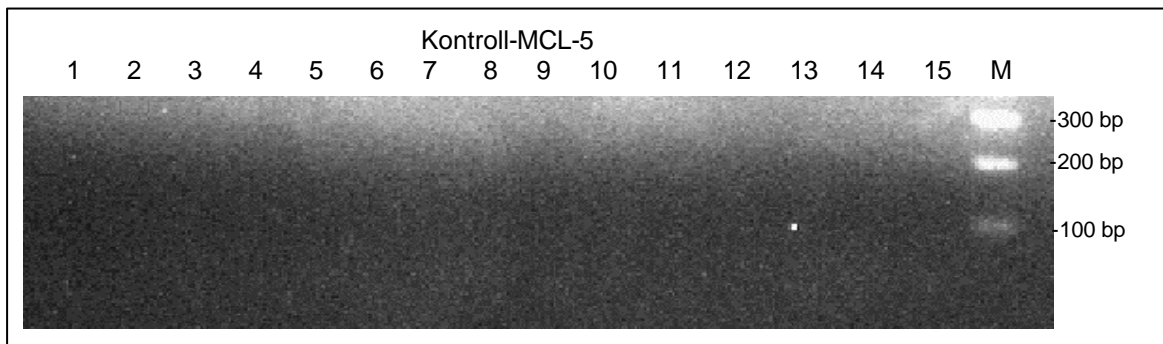


Abbildung 4.6: Untersuchung der DNA aus den Kontrollzellen des BPDE-Expositionsversuches auf die Mutation im Codon 248 des Gens *p53*. Das Gel zeigt 15 x 2 µg DNA-Ansätze nach der Anreicherungs-methode.

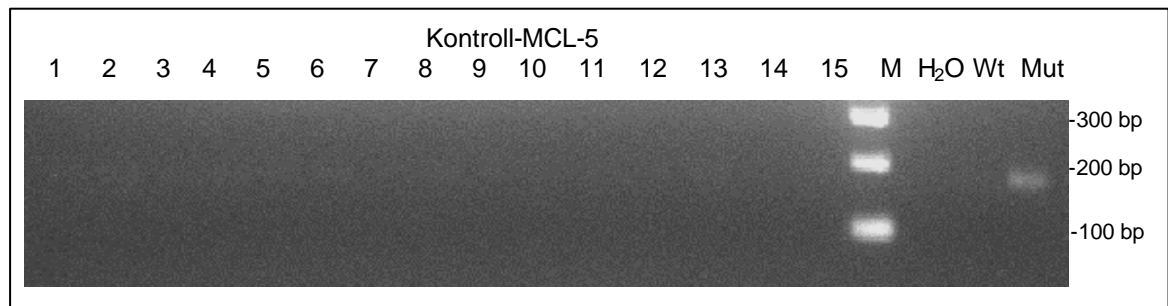


Abbildung 4.7: Untersuchung der DNA aus den Kontrollzellen des CSC-Expositionsversuches auf die Mutation im Codon 12 des *K-ras* Gens. Das Gel zeigt 15 x 2 µg DNA-Ansätze nach der Anreicherungs-methode.

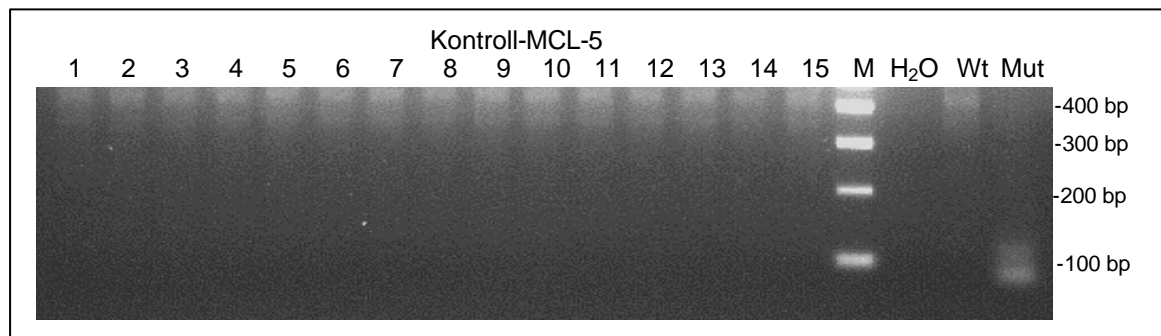


Abbildung 4.8: Untersuchung der DNA aus den Kontrollzellen des PhIP-Expositionsversuches auf die Translokation t(14;18). Das Gel zeigt 15 x 2 µg DNA-Ansätze nach der Anreicherungs-methode.

4.1.6 Charakterisierung der angereicherten Mutationen

Nach RFLP-Selektion erhaltene und daher an den Restriktionsstellen mutierte PCR-Produkte wurden weiter amplifiziert und einer DNA-Sequenzanalyse unterworfen. Ausschnitte aus den erhaltenen Elektropherogrammen, welche die Sequenzen in der Umgebung der untersuchten Codons jeweils in Wildtyp- und PCR-angereichertem mutiertem Amplifikat zeigen, sind in Abb. 4.9 und Abb. 4.10 zusammengestellt.

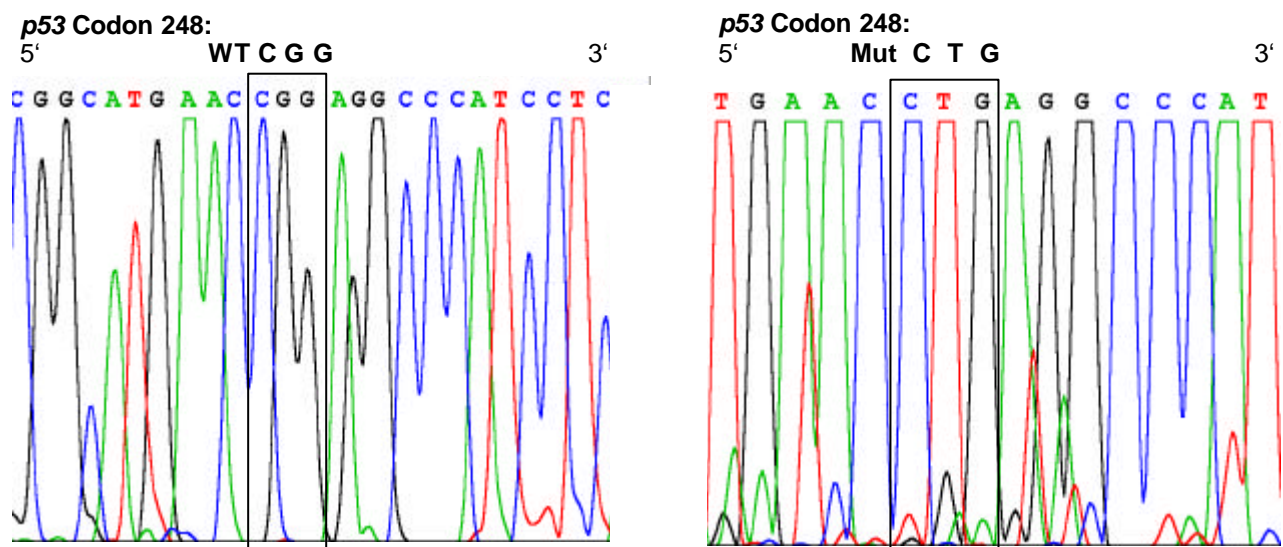


Abbildung 4.9: Elektropherogramm von Codon 248 des Wildtyp-*p53*-Gens aus MCL-5-Zellen, (links) und des Mutantenstandards (rechts).

Für die Sequenzierung der *K-ras*-Amplifikate wurde der Antisense-Primer K65 verwendet, da der Sense-Primer K64 und somit der Anfang des Amplifikats (vom Sense-Strang her betrachtet) sehr dicht an der zu untersuchenden Restriktionsstelle liegt. Bei der Sequenzierung können die ersten Basen der Sequenz oft nicht eindeutig erkannt werden. Dies würde bei der Sequenzierung mit dem Sense-Primer die Restriktionsstelle betreffen. Die Elektropherogramme zeigen daher den sequenzierten Antisense-Strang vom 3'-Ende aus. Die Beschriftung des WT und der erfolgten Mutation über den Elektropherogrammen bei *K-ras*-Mutationen zeigt die Basen des Sense-Stranges (also komplementär zu dem Elektropherogramm) in 3' → 5' Richtung (siehe Abb. 4.10).

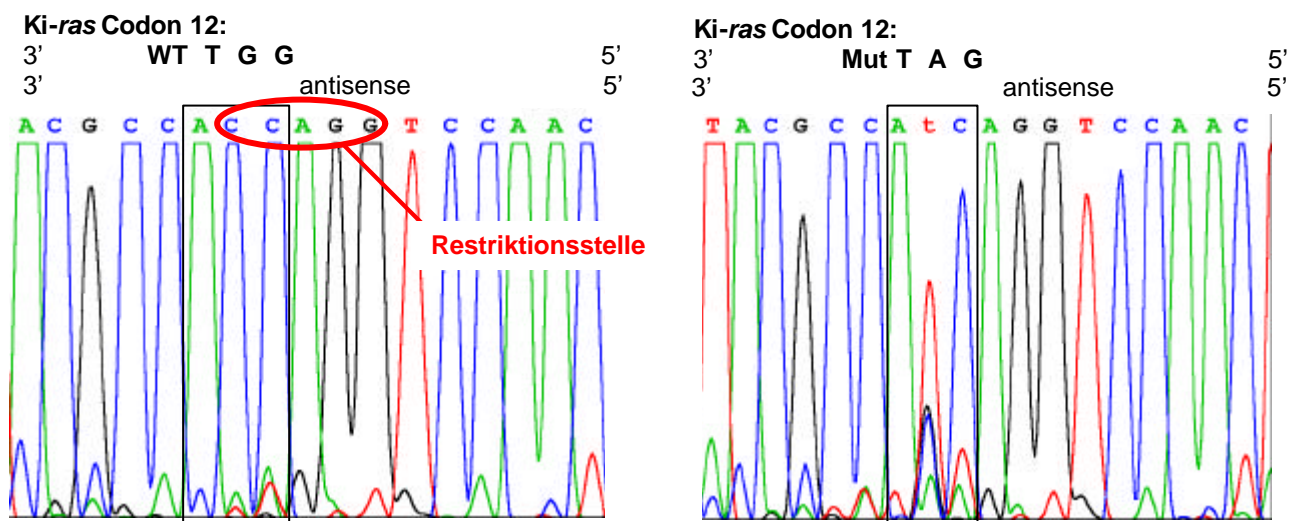


Abbildung 4.10: Elektropherogramm von Codon 12 des Wildtyp-*K-ras*-Gens aus MCL-5-Zellen, (links) und des Mutantenstandards (rechts). Das t im rechten Elektropherogramm steht für eine Base, die nicht eindeutig erkannt wurde, da sich mehrere Basen, sowohl Purin- als auch Pyrimidinbasen überlagern.

4.2 Behandlung von MCL-5-Zellen mit direkt wirksamen Mutagenen

4.2.1 Mutagenese mit MNNG

4.2.1.1 Cyto- und genotoxische Effekte

Bei der Exposition konnte eine Erhöhung des Tailmoments durch MNNG-Behandlung im Dosisbereich von 0,7-6,8 μM festgestellt werden (siehe Abb. 4.11).

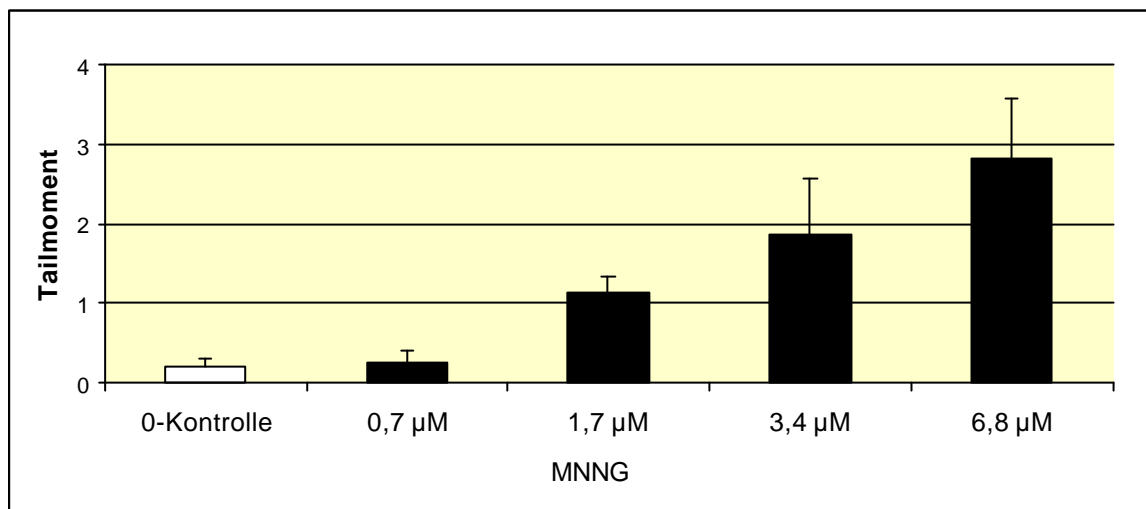


Abbildung 4.11: Dosisabhängige Strangbruchinduktion durch MNNG. Für jeden Versuchsansatz (Objektträger) wurden das arithmetische Mittel und die Standardabweichung der Tailmoment-Werte von 2 Objektträgern mit je 50 Zellkernen dargestellt.

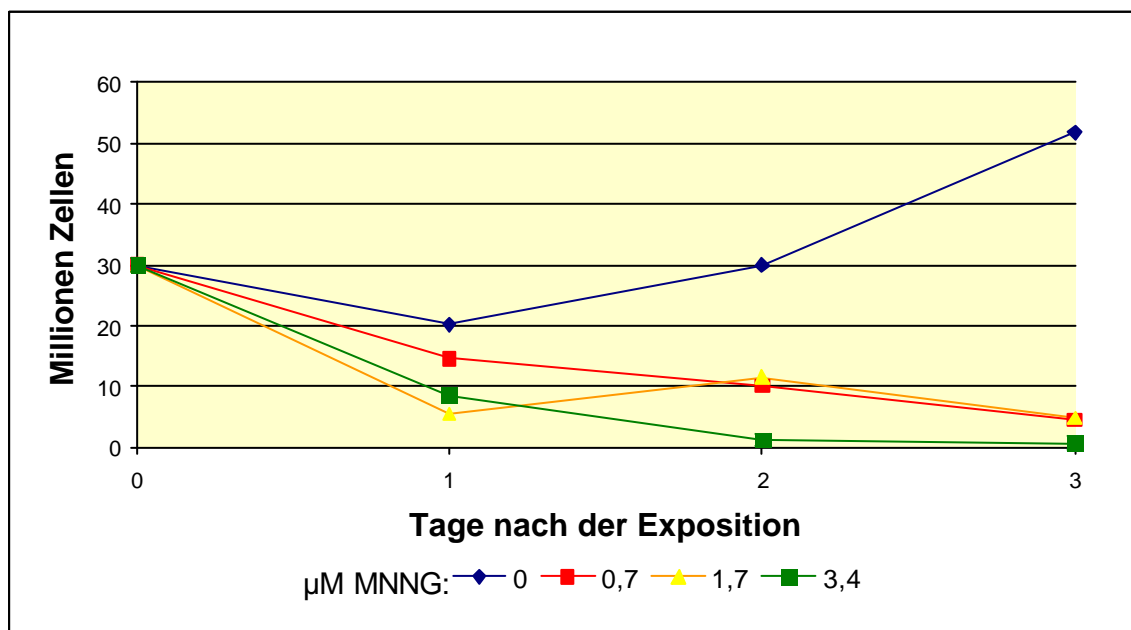


Abbildung 4.12: Wachstumskurven von MCL-5-Zellen nach Exposition mit 0 – 3,4 μM MNNG.

Da bei den im Comet-Test zu strangbruchführenden Konzentrationen an MNNG keine Proliferation der MCL-5-Zellen mehr zu beobachten war (siehe Abb. 4.12), musste die Behandlungsdosis auf 0,2 μM MNNG (30 ng/ml) reduziert werden. Erst bei dieser Konzentration war eine ausreichende Proliferation gegeben (siehe Abb. 4.13).

Wachstumskurven nach Behandlung mit direkten Mutagenen:

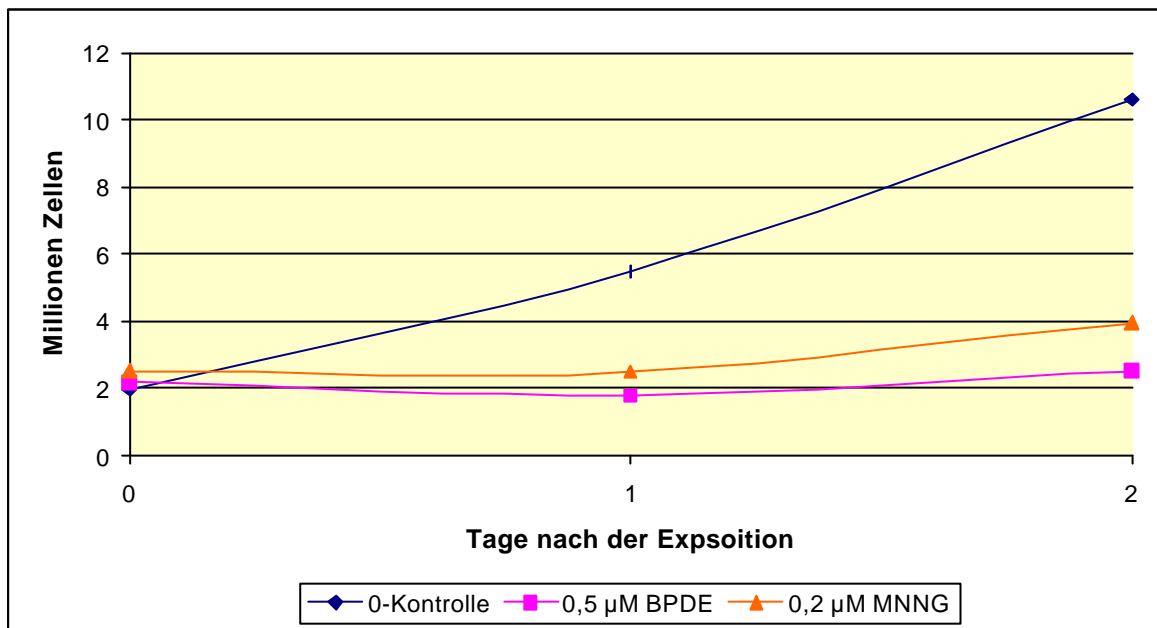


Abbildung 4.13: Beispiel für Wachstumskurven der MCL-5-Zellen nach Exposition mit den für die Mutationsanalyse verwendeten Konzentrationen an direkten Mutagenen MNNG und BPDE.

4.2.1.2 Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit MNNG

Bei der Behandlungsdosis von 0,2 μM MNNG waren, wie oben gezeigt, keine Strangbruchinduktion und nur eine geringe Wachstumshemmung zu beobachten. Dennoch traten, wie in Abb. 4.14 für Punktmutationen am *K-ras* Codon 12 gezeigt, häufiger positive Signale bei der Mutationsanreicherungs-PCR-RFLP-Methode auf, als ohne Chemikalienbehandlung.

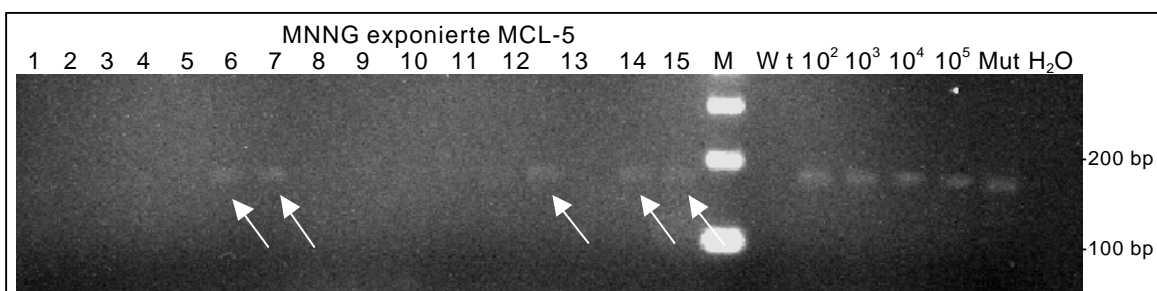


Abbildung 4.14: Beispiel positiver Banden nach MNNG-Exposition für die Anreicherung der Mutation im Codon 12 des *K-ras*-Gens.

Nach Einsetzen der Anzahl an positiven Banden in die Poisson-Formel wurden die in der Tabelle 4.1 angegebenen Mutationshäufigkeiten erhalten. So wurden im Fall der Punktmutation am Codon 12 des *K-ras*-Gens neun Mutationen in $1,7 \times 10^7$ haploiden Genomkopien gefunden.

Mutagen Dosis [μM]	<i>p53</i>		<i>K-ras</i>		<i>t(14;18)</i>		
	X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)	
Kontrolle	-	0	<0,6	0	<0,6	0	<0,6
MNNG	0,2	3	1,9	9	6,3	1	0,61

Tabelle 4.1: Anzahl an positiven Reaktionen (X) und Mutationshäufigkeiten (MF) nach MNNG-Exposition.

4.2.1.3 MNNG-induzierte Basenaustausch-Mutationen

Anhand der Sequenzierung wurden folgende Punktmutationen nach MNNG-Exposition erkennbar.

Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.15 zeigt am Codon 248 des *p53*-Gens neben der Wildtypsequenz CGG auch kleinere A-Peaks an der zweiten und dritten Position des Codons. Die in Tabelle 4.2 zusammengefasste Sequenzanalyse der drei selektierten Mutantenamplifikate zeigte in allen Fällen mehrere Mutationen an der *MSP* I-Restriktionsstelle, bei der es sich ausschließlich um GC>AT-Transitionen handelt.

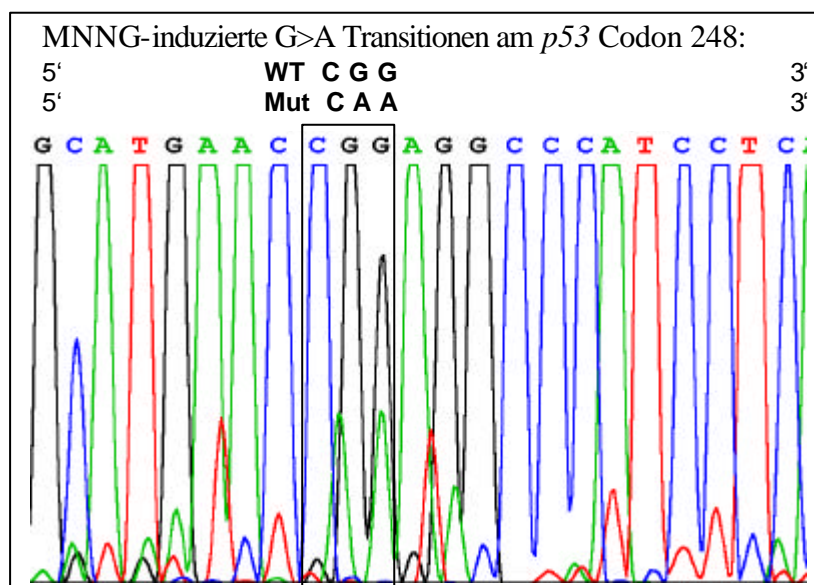


Abbildung 4.15: Elektropherogramm einer Sequenzierung des Amplifikats des *p53*-Gens nach MNNG-Exposition (Positive Bande Nr. 24).

Nr. der positiven Bande	Mutation (Restriktionsstelle: CCGG)			
	C	C	G	G
19	C>T			G>A
24			G>A	G>A
28		C>T	G>A	G>A

Tabelle 4.2: Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens nach MNNG-Exposition.

Nach MNNG-Exposition wurden somit als Mutationen im *p53* Codon 248 G>A und C>T Transitionen gefunden.

Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.16 zeigt am Codon 12 des *K-ras*-Gens eine deutliche Überlagerung der Wildtypsequenz GGT durch A-Peaks an der ersten und zweiten Position des Codons.

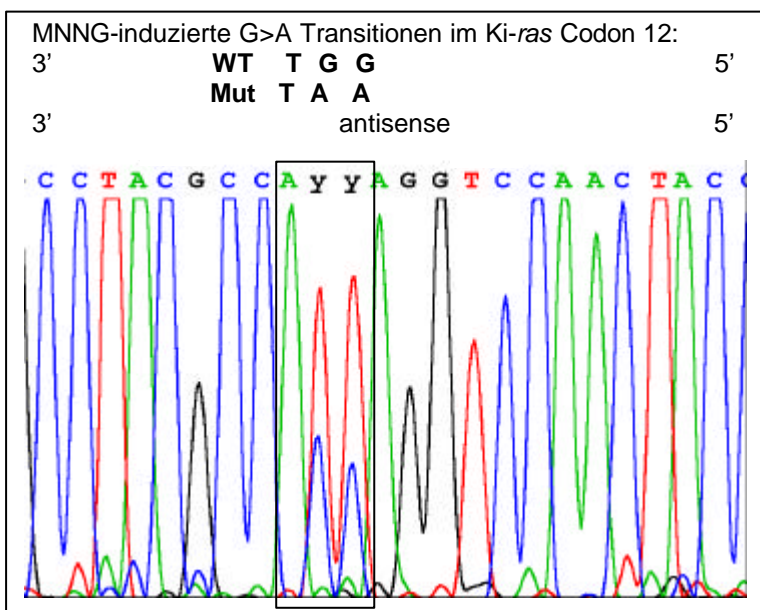


Abbildung 4.16: Elektropherogramm einer Sequenzierung des Amplifikats des *K-ras*-Gens nach MNNG-Exposition. Das y im Elektropherogramm steht für eine Pyrimidinbase, die nicht eindeutig erkannt wurde (Positive Bande Nr. 06).

Nach der MNNG-Exposition wurden neun Mutationen im *K-ras* Codon 12 gefunden, darunter nur G>A Transitionen und diese jeweils in beiden Gs des Codons.

4.2.2 Mutagenese mit BPDE

4.2.2.1 Cyto- und genotoxische Effekte

Bei der Exposition konnte eine Erhöhung des Tailmoments durch BPDE-Behandlung im Dosisbereich von 0,17-0,52 μM festgestellt werden (siehe Abb. 4.17).

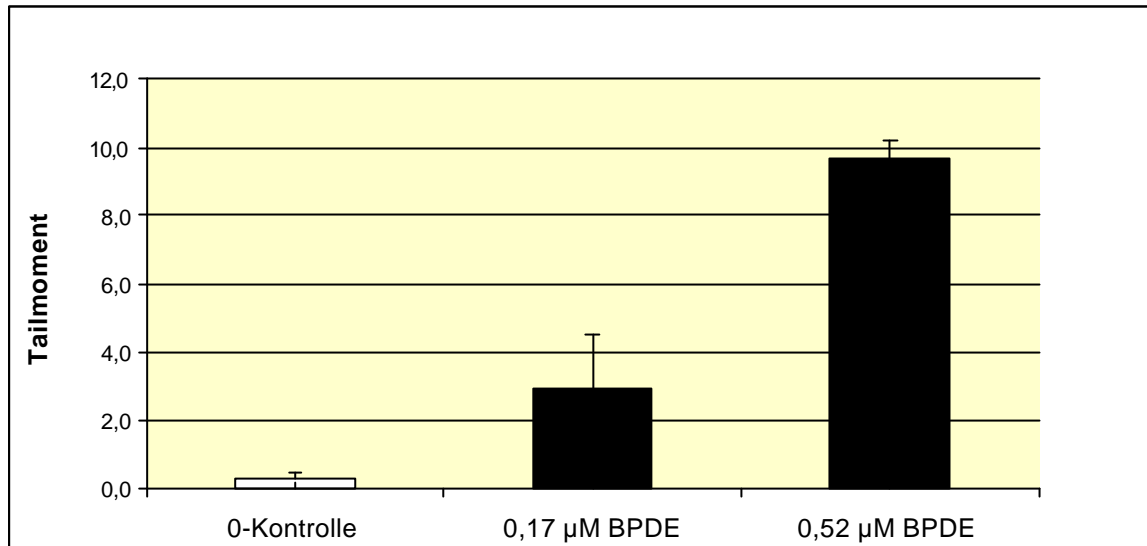


Abbildung 4.17: Dosisabhängige Strangbruchinduktion durch BPDE. Für jeden Versuchsansatz (Objektträger) wurden das arithmetische Mittel der Tailmoment-Werte und die Standardabweichung der Tailmoment-Werte von 2 Objektträgern mit je 50 Zellkernen dargestellt.

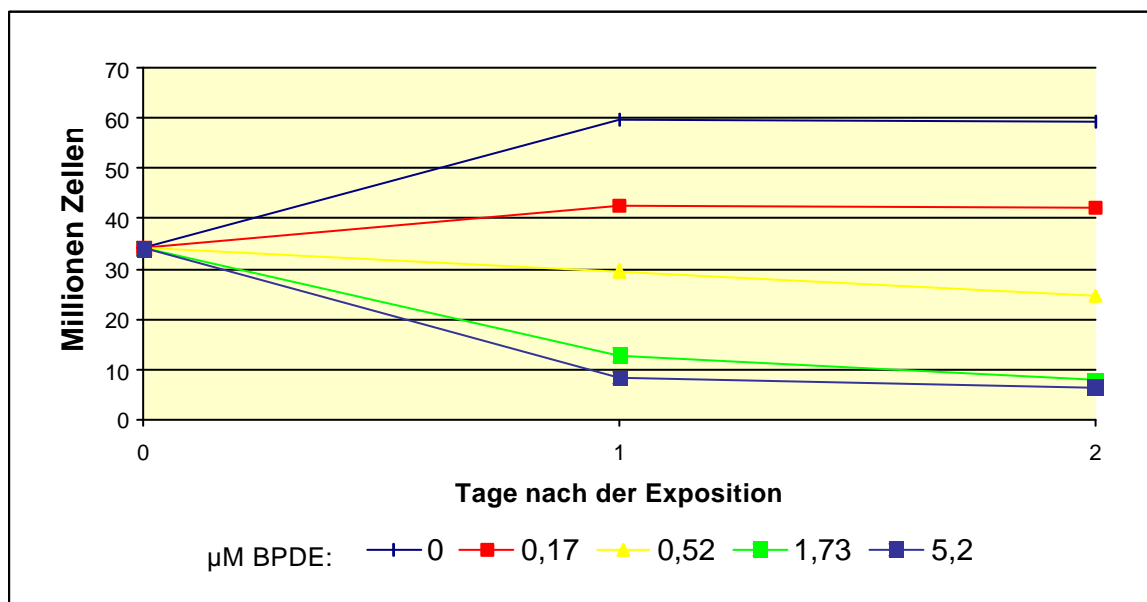


Abbildung 4.18: Wachstumskurven von MCL-5-Zellen nach Exposition mit BPDE.

Bei einer Konzentration von 0,52 μM BPDE (siehe Abb. 4.13) ergab sich eine ausreichende Proliferation der Zellen für die anschließende Mutationsanalyse. Bei höheren Konzentrationen war nur ein Rückgang der Zellpopulation zu beobachten (siehe Abb. 4.18).

Bei der Dosis-Wirkungskurve von BPDE ist schon bei 0,17 μM ein signifikanter Anstieg des Tailmoments erkennbar. Bei der für die Mutationsanalyse verwendeten Expositions-konzentration von 0,52 μM ist die Erhöhung der Strangbruchrate mit 9,2 sehr stark.

4.2.2.2 Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit BPDE

Bei der Behandlungsdosis von 0,52 μM BPDE waren, wie oben gezeigt, eine starke Strangbruchinduktion und nur geringe Wachstumshemmung zu beobachten. Bei der Mutationsanreicherung traten wie in Abb. 4.19 für Punktmutationen am Gen *p53* Codon 248 gezeigt, anders als bei den Kontrollansätze (siehe Abb. 4.6), häufig positive Signale auf, die somit eindeutig auf die Chemikalienbehandlung zurückzuführen sein müssen.

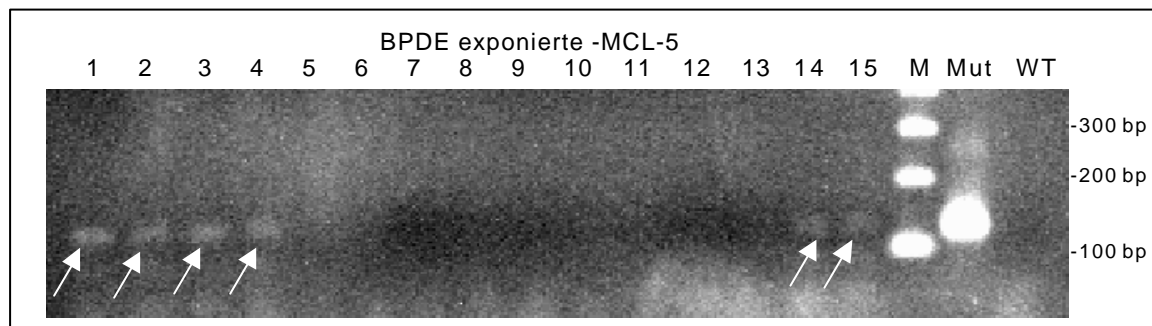


Abbildung 4.19: Beispiel positiver Banden nach BPDE-Exposition für die Anreicherung von Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens.

Nach Einsetzen der Anzahl an positiven Banden in die Poisson-Formel wurden die in der Tabelle 4.3 angegebenen Mutationshäufigkeiten erhalten. So wurden im Fall der Punktmutation am Codon 248 des *p53*-Gens neun Mutationen in $1,7 \times 10^7$ haploiden Genomkopien gefunden.

Mutagen Dosis [μM]	<i>p53</i>		<i>K-ras</i>		t(14;18)		
	X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)	
Kontrolle	-	0	<0,6	0	<0,6	0	<0,6
BPDE	0,52	9	6,3	0	<0,6	2	1,2

Tabelle 4.3: Anzahl an positiven Reaktionen (X) und Mutationshäufigkeiten (MF) nach BPDE-Exposition.

4.2.2.3 BPDE-induzierte Basenaustausch-Mutationen

Anhand der Sequenzierung wurden folgende Punktmutationen nach BPDE-Exposition erkennbar:

Mutationen im Codon 248 des p53-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.20 zeigt am Codon 248 des *p53*-Gens neben der Wildtypsequenz CGG auch kleinere T-Peaks an der zweiten und dritten Position des Codons. Die in Tabelle 4.4 zusammengefasste Sequenzanalyse der neun selektierten Mutantenamplifikate zeigte in 10 von 13 der beobachteten Basenaustausche G>T Transversionen, überwiegend in der ersten Position des Codons.

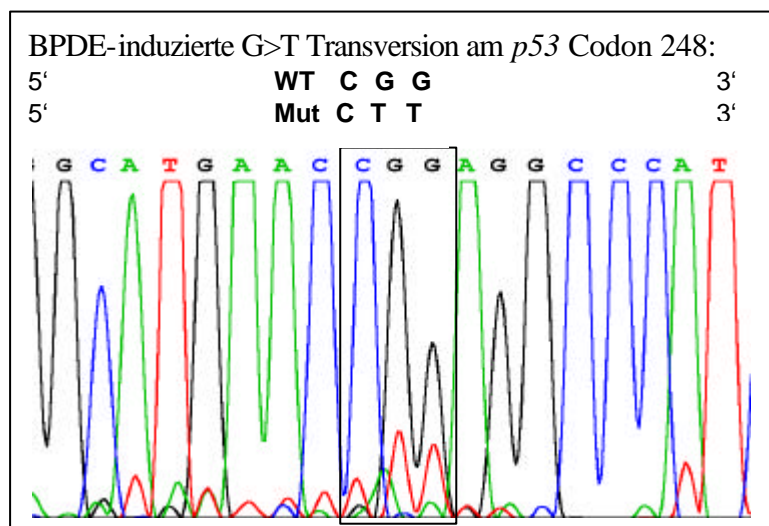


Abbildung 4.20: Elektropherogramm einer Sequenzierung des Amplifikats des *p53*-Gens nach BPDE-Exposition (Positive Bande Nr. 14)

Nr. der positiven Bande	Mutation (Restriktionsstelle: CCGG)			
	C	C	G	G
1			G>T	
2			G>T	
3			G>A	G>T
4			G>T	
14			G>T	G>T
15			G>A	G>T
16			G>A	G>T
17			G>T	
23			G>T	

Tabelle 4.4: Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens nach BPDE-Exposition.

Es wurden keine Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens gefunden.

4.3 Behandlung von MCL-5-Zellen mit indirekt wirksamen Mutagenen

4.3.1 Mutagenese mit BaP

4.3.1.1 Cyto- und genotoxische Effekte

Bei der Exposition mit BaP wurde die höchstmögliche Dosis für die Exposition verwendet, die im Expositionsmedium noch löslich ist. Bei höheren Konzentrationen fällt BaP aus, was sich in der Abnahme des Tailmoments, d.h. einem Rückgang der Schädigung im Comet-Test bemerkbar macht. Bei einer Konzentration von 198 μM BaP war ein ausreichendes Überleben der Zellen vorhanden (siehe Abb. 4.21), eine Zunahme des Tailmoments deutlich erkennbar (siehe Abb. 4.22) und BaP im Expositionsmedium löslich.

Wachstumskurven nach Behandlung mit indirekten Mutagenen (BaP, PhIP, NNK, CSC):

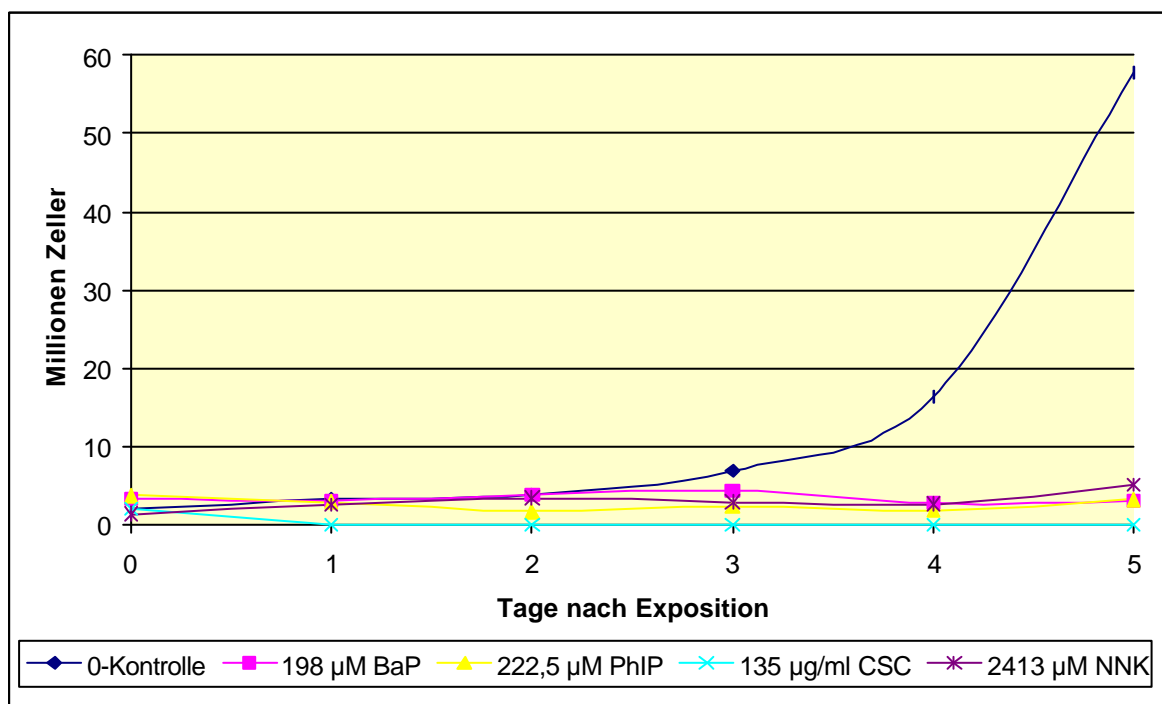


Abbildung 4.21: Beispiele für Wachstumskurven nach Exposition mit für die Mutationsanalyse verwendeten Konzentrationen an indirekten Mutagenen.

Anhand der Wachstumskurven ist ein Anwachsen der Zellpopulation oftmals erst nach 5 Tagen bis zu einer Woche nach der Exposition erkennbar.

Die Schwankungen in den Kurven sind durch Fehler bei der Zellzahlbestimmung zu erklären.

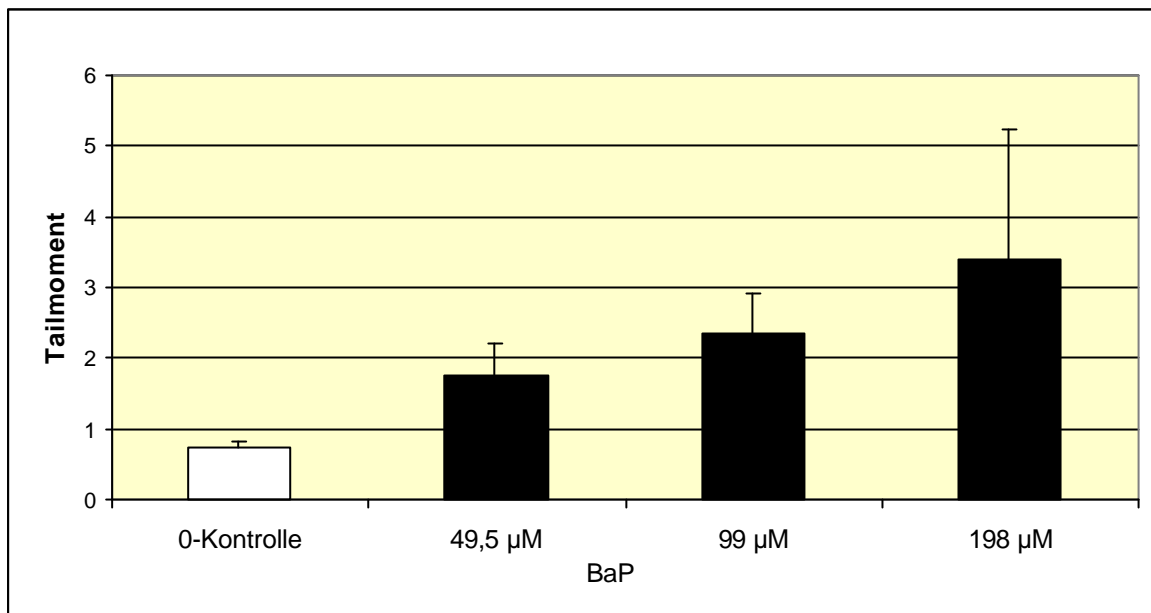
Dosis-Wirkungskurve der Strangbruch-Induktion durch BaP

Abbildung 4.22: Dosisabhängige Strangbruchinduktion durch BaP. Für jeden Versuchsansatz (Objekträger) wurden das arithmetische Mittel der Tailmoment-Werte und die Standardabweichung der Tailmoment-Werte von 2 Objekträgern mit je 50 Zellkernen dargestellt.

In der Abbildung der Dosis-Wirkungskurve der Strangbruch-Induktion durch BaP (Abb. 4.22) ist erkennbar, dass die niedrigste hier verwendete Dosis an BaP schon eine signifikante Erhöhung des Tailmoments bewirkt. Die Erhöhung ist im Vergleich zu der entsprechenden Exposition mit BPDE nicht ganz so hoch, aber auch hier ist eine Zunahme des Tailmoments um 2,66 (bezogen auf die Kontrolle) bei der für die Mutationsanalyse verwendeten Konzentration zu verzeichnen.

4.3.1.2 Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit BaP

Bei der Behandlungsdosis von 198 µM BaP waren (siehe Abb. 4.22) eine starke Strangbruchinduktion und eine geringe, aber für die Mutationsanalyse ausreichende Zellproliferation (siehe Abb. 4.21), zu beobachten. Bei der Mutationsanreicherung traten, wie in Abb. 4.23 für Punktmutationen am Gen *p53* Codon 248 gezeigt, positive Signale auf, die aufgrund der negativen Kontrollergebnisse auf die Chemikalienbehandlung zurückzuführen sein müssen.

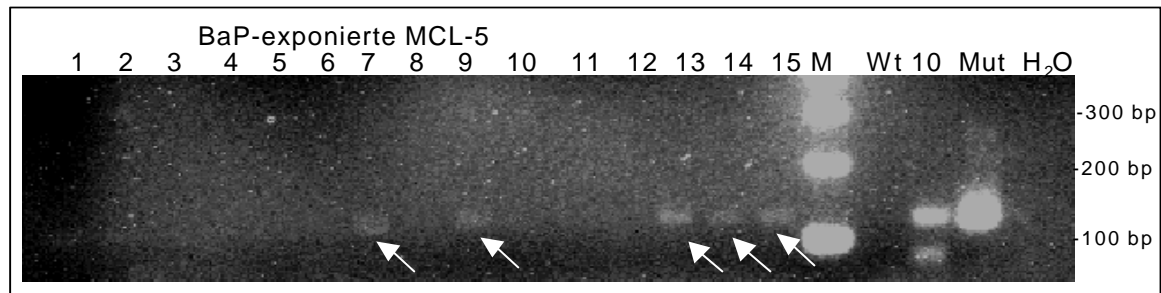


Abbildung 4.23: Beispiel positiver Banden nach BaP-Exposition für die Anreicherung der Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens.

Nach Einsetzen der Anzahl an positiven Banden in die Poisson-Formel wurden die in der Tabelle 4.5 angegebenen Mutationshäufigkeiten erhalten.

Mutagen	Dosis [μM]	<i>p53</i>		<i>K-ras</i>		t(14;18)	
		X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)
Kontrolle	-	0	<0,6	0	<0,6	0	<0,6
BaP	198	5	3,2	0	<0,6	1	0,61

Tabelle 4.5: Anzahl an positiven Reaktionen (X) und Mutationshäufigkeiten (MF) nach BaP-Exposition.

4.3.1.3 BaP-induzierte Basenaustausch-Mutationen

Anhand der Sequenzierung wurden folgende Punktmutationen nach BaP-Exposition erkennbar:

Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.24 zeigt am Codon 248 des *p53*-Gens neben der Wildtypsequenz CGG auch T- und A-Peaks an der zweiten und dritten Position des Codons.

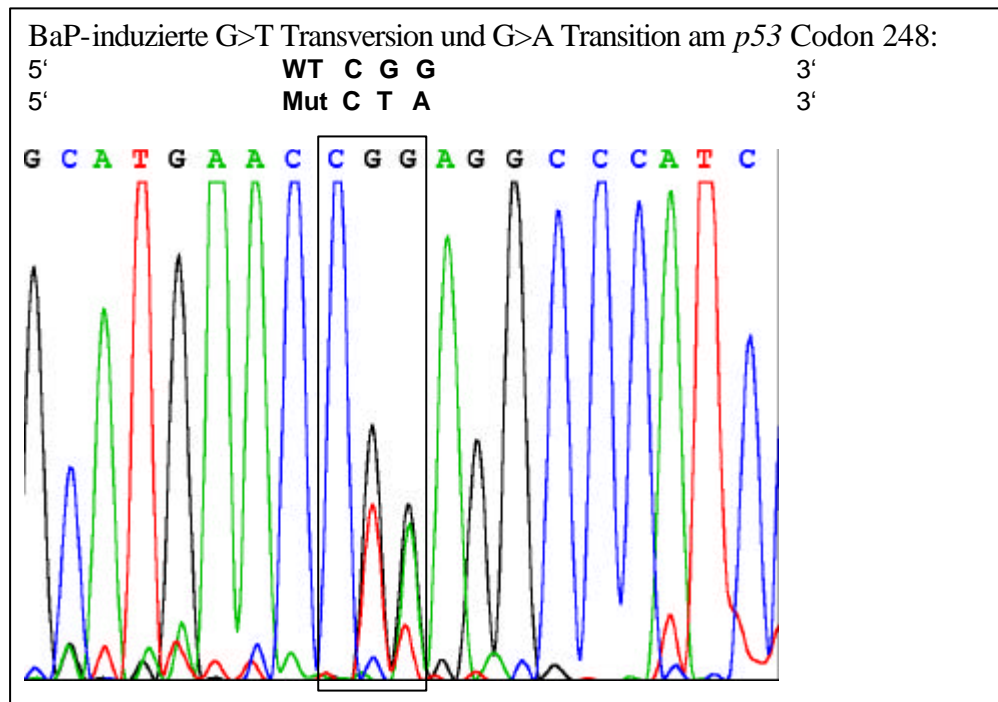


Abbildung 4.24: Elektropherogramm einer Sequenzierung eines Amplifikats des *p53*-Gens nach BaP-Exposition (Positive Bande Nr. 14).

Nr. der positiven Bande	Mutation (Restriktionsstelle: CCGG)			
	C	C	G	G
7		C>T		
9			G>A	G>A; G>T
13				G>A ;G>T
14			G>T	G>A
15			G>T	G>T

Tabelle 4.6: Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens nach BaP-Exposition.

Nach BaP-Exposition wurden als Mutationen im *p53* Codon 248 hauptsächlich G>T Transversionen und G>A Transitionen gefunden.

Es wurden keine Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens gefunden.

4.3.2 Mutagenese mit PhIP

4.3.2.1 Cyto- und genotoxische Effekte

Bei der Exposition mit PhIP wurde wie bei der Exposition mit BaP die höchstmögliche Dosis für die Exposition verwendet, die im Expositionsmedium noch löslich war. Bei höheren Konzentrationen fällt PhIP aus, was sich in der Abnahme des Tailmoments, d.h. einem Rückgang der Schädigung im Comet-Test bemerkbar macht. Bei einer Konzentration von 222,6 μM PhIP war ein ausreichendes Überleben der Zellen vorhanden (siehe Abb. 4.21), eine Zunahme des Tailmoments (siehe Abb. 4.25) deutlich erkennbar und PhIP im Expositionsmedium löslich.

Wachstumskurve nach Behandlung mit PhIP

In Abb. 4.21 ist ein geringer Anstieg der Population nach fünf Tagen erkennbar. Die Schwankungen können durch Fehler bei der Zellzahlbestimmung bedingt sein.

Dosis-Wirkungskurve der Strangbruch-Induktion durch PhIP

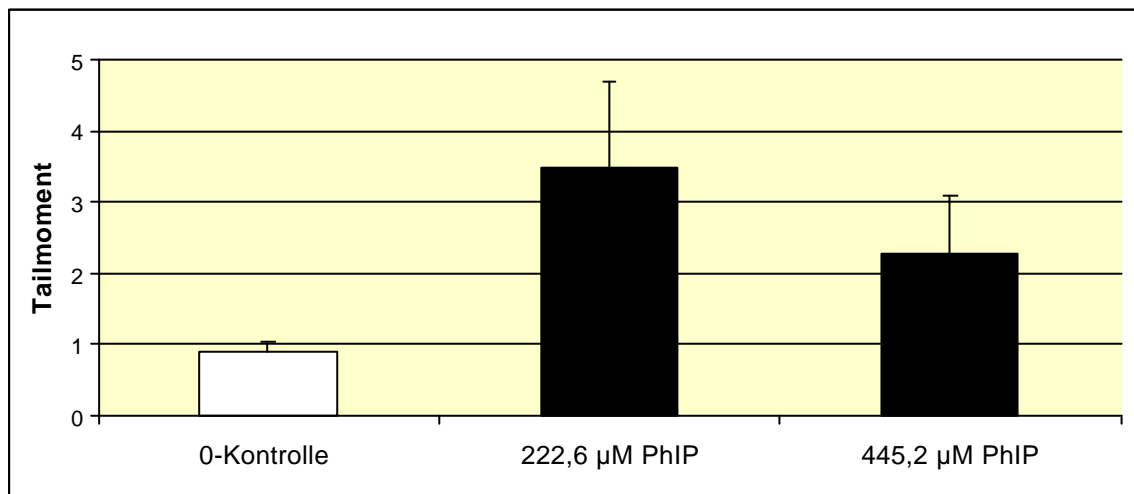


Abbildung 4.25: Dosisabhängige Strangbruchinduktion durch PhIP. Für jeden Versuchsansatz (Objektträger) wurden das arithmetische Mittel der Tailmoment-Werte und die Standardabweichung der Tailmoment-Werte von 2 Objektträgern mit je 50 Zellkernen dargestellt. Der Rückgang der Schädigung bei 445,2 μM PhIP ist auf das Ausfallen des Mutagens im Expositionsmedium zurückzuführen.

4.3.2.2 Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit PhIP

Bei der Behandlungsdosis von 222,6 μM PhIP waren wie oben gezeigt eine starke Strangbruchinduktion und eine Wachstumshemmung, die ein für die Mutationsanalyse ausreichendes Zellwachstum ermöglichte, zu beobachten. Bei der Mutationsanreicherung wurden, wie in Abb. 4.26 für Punktmutationen am *K-ras*-Gen Codon 12 gezeigt, positive Signale beobachtet. Da in einem entsprechenden Kontrollansatz keine Amplifikate beobachtet wurden, müssen die auftretenden Mutationen auf die Chemikalienbehandlung zurückzuführen sein.

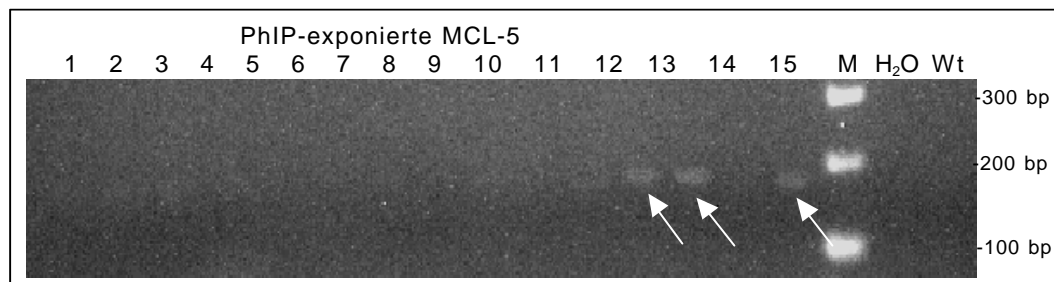


Abbildung 4.26: Beispiel positiver Banden nach PhIP-Exposition für die Anreicherung der Mutation im Codon 12 des *K-ras*-Gens.

Nach Einsetzen der Anzahl an positiven Banden in die Poisson-Formel wurden die in der Tabelle 4.7 angegebenen Mutationshäufigkeiten erhalten.

Mutagen	Dosis [μM]	<i>p53</i>		<i>K-ras</i>		<i>t(14;18)</i>	
		X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)
Kontrolle	-	0	<0,6	0	<0,6	0	<0,6
PhIP	222,5	9	6,3	8	5,5	1	0,61

Tabelle 4.7: Anzahl an positiven Reaktionen (X) und Mutationshäufigkeiten (MF) nach PhIP-Exposition.

4.3.2.3 PhIP-induzierte Basenaustausch-Mutationen

Anhand der Sequenzierung wurden folgende Punktmutationen nach PhIP-Exposition erkennbar:

Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.27 zeigt am Codon 248 des *p53*-Gens neben der Wildtypsequenz CGG auch A-Peaks an der zweiten und dritten Position des Codons.

Nach PhIP-Exposition wurden als Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens nur G>A Transitionen gefunden. Die C>T Transitionen wurden nicht im Codon 248 gefunden, sondern in der letzten Base des vorherigen Codons (siehe Tab. 4.8).

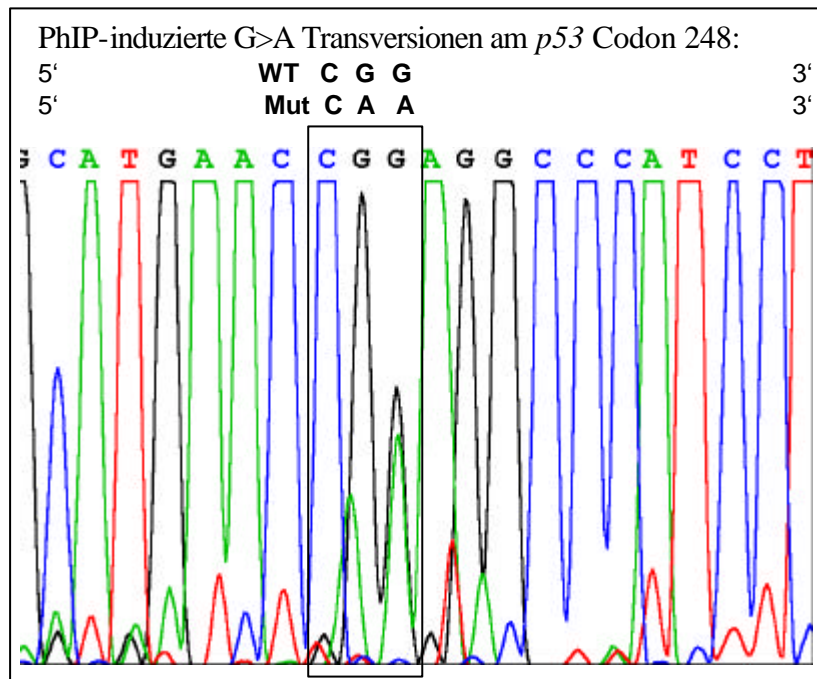


Abbildung 4.27: Elektropherogramm einer Sequenzierung eines Amplifikats des *p53*-Gens nach PhIP-Exposition (Positive Bande Nr. 14).

Nr. der positiven Bande	Mutation (Restriktionsstelle: CCGG)			
	C	C	G	G
12	C>T			
14			G>A	G>A
15	C>T			
20			G>A	G>A
22			G>A	G>A
24			G>A	
25			G>A	G>A
26	C>T		G>A	G>A
27			G>A	G>A

Tabelle 4.8: Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens nach PhIP-Exposition.

Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.28 zeigt am Codon 12 des *K-ras*-Gens neben der Wildtypsequenz GGT auch A-Peaks an der ersten und zweiten Position des Codons.

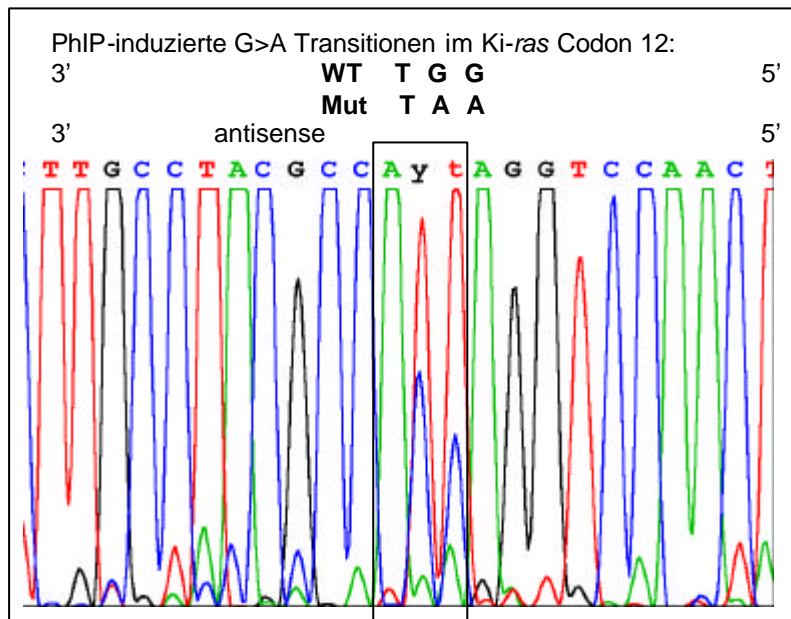


Abbildung 4.28: Elektropherogramm einer Sequenzierung eines Amplifikats des K-ras-Gens nach PhIP-Exposition (Positive Bande Nr. 13).

Nach der PhIP-Exposition wurden in den acht Positiv-Banden als Mutationen im K-ras Codon 12 nur G>A Transitionen gefunden und diese jeweils in beiden Gs des Codons.

4.3.3 Mutagenese mit NNK

4.3.3.1 Cyto- und genotoxische Effekte

Bei der Exposition mit NNK wurde die höchstmögliche Konzentration für die Exposition verwendet, die durch die vorhandene Stammlösung gegeben war. Bei einer Konzentration von 2413 μM NNK war ein ausreichendes Überleben der Zellen für die Mutationsanalyse vorhanden (siehe Abb. 4.21) und eine deutliche Zunahme des Tailmoments (siehe Abb. 4.29) erkennbar.

Wachstumskurve nach Behandlung mit NNK

In Abb. 4.21 ist ein geringer Anstieg der Population nach fünf Tagen erkennbar. Dieser Anstieg war für die anschließende Mutationsanalyse ausreichend. Die Schwankungen können durch Fehler bei der Zellzahlbestimmung bedingt sein.

Dosis-Wirkungskurve der Strangbruch-Induktion durch NNK

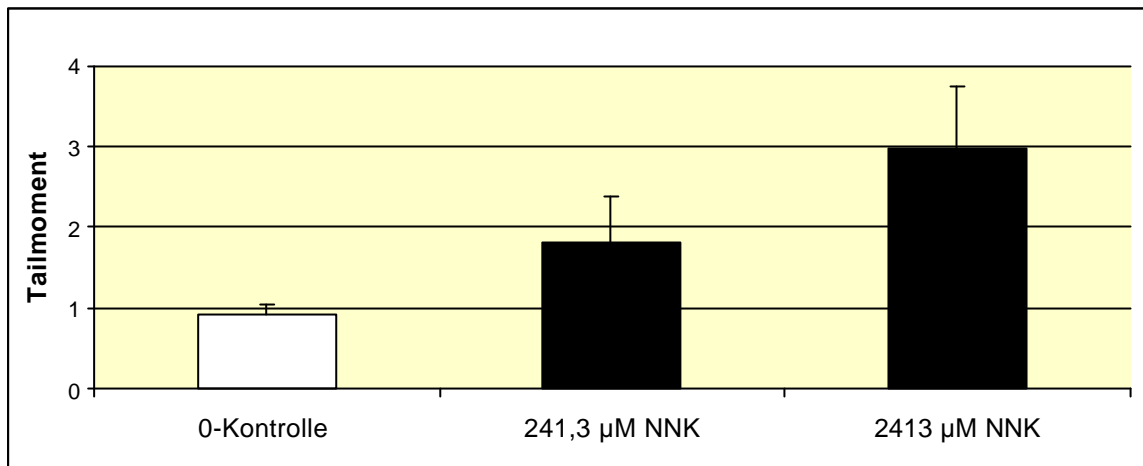


Abbildung 4.29: Dosisabhängige Strangbruchinduktion durch NNK. Für jeden Versuchsansatz (Objekträger) wurden das arithmetische Mittel der Tailmoment-Werte und die Standardabweichung der Tailmoment-Werte von 2 Objekträgern mit je 50 Zellkernen dargestellt.

4.3.3.2 Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit NNK

Bei der Behandlungsdosis von 2413 µM NNK waren, wie oben gezeigt, eine deutliche Strangbruchinduktion (siehe Abb. 4.29) und eine Wachstumshemmung (siehe Abb. 4.21), die ein für die Mutationsanalyse ausreichendes Wachstum zuließ, zu beobachten. Bei der Mutationsanreicherung traten, wie in Abb. 4.30 für Punktmutationen am *K-ras*-Gen Codon 12 gezeigt, im Gegensatz zu den entsprechenden negativen Kontrollansätzen, positive Signale auf, die somit auf die Chemikalienbehandlung zurückzuführen sein müssen.

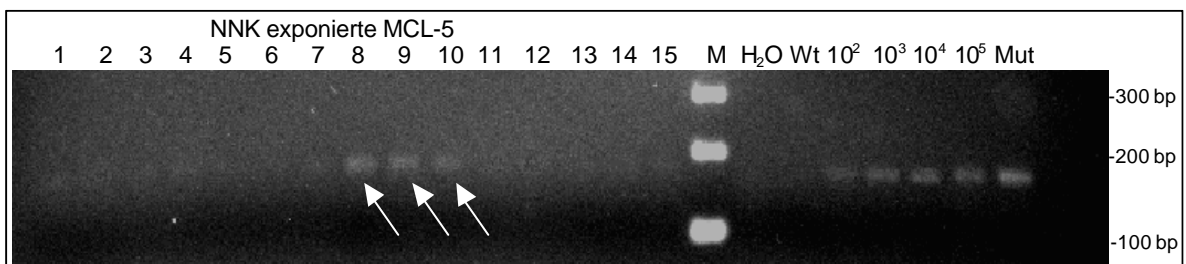


Abbildung 4.30: Beispiel positiver Banden nach NNK-Exposition für die Anreicherung von Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens.

Nach Einsetzen der Anzahl an positiven Banden in die Poisson-Formel wurden die in der Tabelle 4.9 angegebenen Mutationshäufigkeiten erhalten.

Mutagen	Dosis [μM]	<i>p53</i>		<i>K-ras</i>		<i>t(14;18)</i>	
		X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)
Kontrolle	-	0	<0,6	0	<0,6	0	<0,6
NNK	2413	10	7,2	9	6,3	2	1,2

Tabelle 4.9: Anzahl an positiven Reaktionen (X) und Mutationshäufigkeiten (MF) nach NNK-Exposition.

4.3.3.3 NNK-induzierte Basenaustausch-Mutationen

Anhand der Sequenzierung wurden folgende Punktmutationen nach NNK-Exposition erkennbar:

Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.31 zeigt am Codon 248 des *p53*-Gens neben der Wildtypsequenz CGG auch einen T-Peak an der ersten Position des Codons.

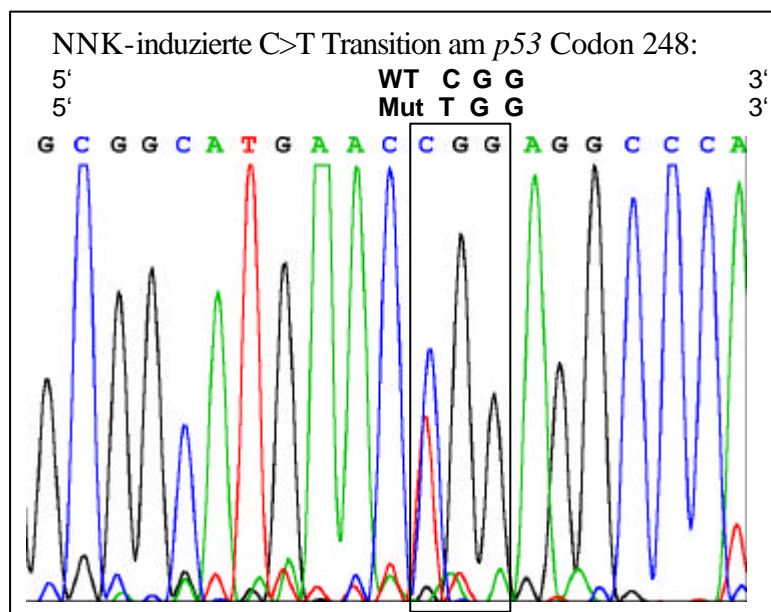


Abbildung 4.31: Elektropherogramm einer Sequenzierung eines Amplifikats des *p53*-Gens nach NNK-Exposition (Positive Bande Nr. 22).

Nr. der positiven Bande	Mutation (Restriktionsstelle: CCGG)			
	C	C	G	G
6				G>A
10				G>A
11		C>T		
13		C>T		G>A
18	C>T			G>A
21	C>G			
22		C>T		
23	C>T			G>A
27	C>T	C>T		G>A
30				G>A

Tabelle 4.10: Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens nach NNK-Exposition.

Nach NNK-Exposition wurden als Mutationen im *p53* Codon 248 bis auf eine C>G Transversion nur G>A Transitionen im Sense- und Anti-Sense-Strang gefunden. Diese wurden nicht nur im Codon 248 gefunden, sondern auch an der letzten Base des vorherigen Codons (siehe Tab.4.10).

Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.32 zeigt am Codon 12 des *K-ras*-Gens neben der Wildtypsequenz GGT auch A-Peaks an der ersten und zweiten Position des Codons.

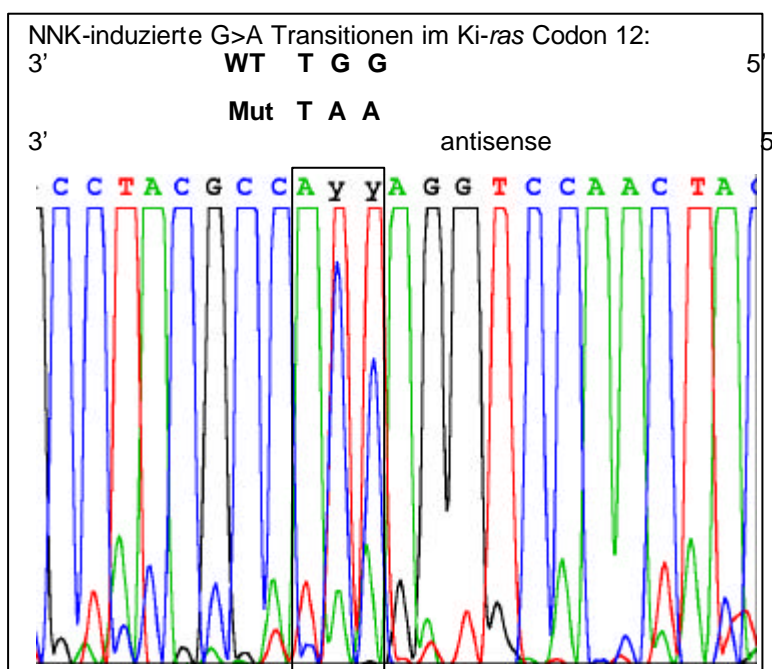


Abbildung 4.32: Elektropherogramm einer Sequenzierung eines Amplifikats des *K-ras*-Gens nach NNK-Exposition (Positive Bande Nr. 09).

Nach NNK-Exposition wurden in den neun Positiv-Banden als Mutationen im *K-ras*-Gen Codon 12 nur G>A Transitionen gefunden und diese jeweils in beiden Gs des Codons.

4.4 Behandlung von menschlichen Zellen mit Mutagengemischen

4.4.1 Exposition mit verdünntem Nebenstromrauch von Zigaretten (ADS)

Bei der Exposition mit ADS zeigte sich eine starke Erhöhung der Strangbruchrate durch das ADS und auch durch eine 1:10 Verdünnung (V1) von diesem. Bei der Kontrolle konnte kein schädigender Einfluss durch die Trypsinierung der Zellen festgestellt werden. Auch synthetische Luft schädigt die Zellen nicht. NO₂ zeigt einen im Vergleich zum ADS geringen Einfluss auf die Strangbruchrate (siehe Abb. 4.33).

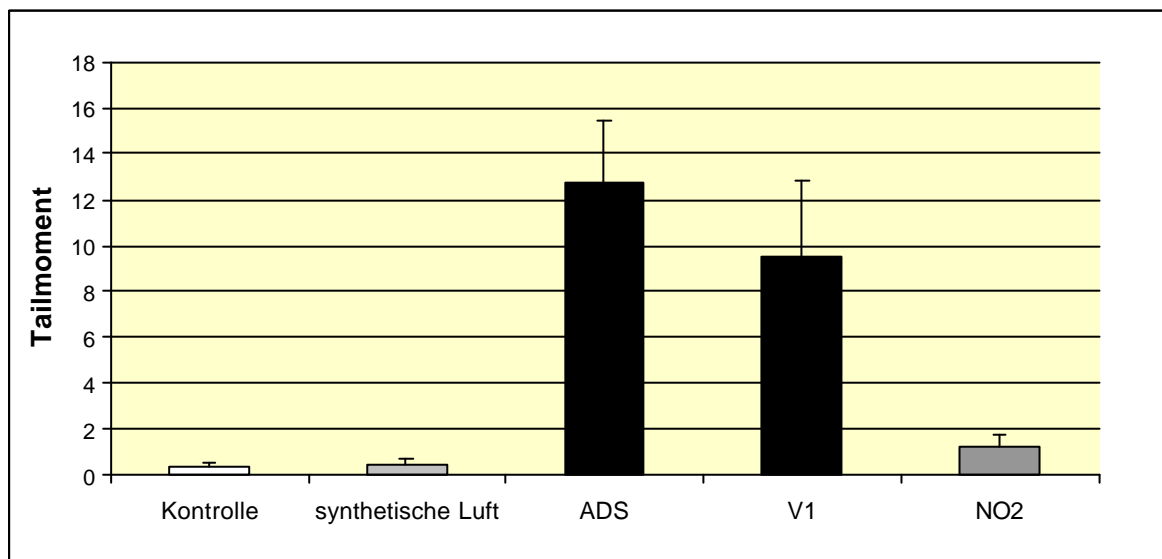


Abbildung 4.33: Ermittlung der Genotoxizität für menschliche Bronchial-Epithel-Zellen nach Exposition mit ADS, einer 1:10 Verdünnung von ADS, synthetischer Luft und NO₂. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von N= 3 Messungen.

4.4.2 Mutagenese mit CSC

4.4.2.1 Cyto- und genotoxische Effekte

Bei der Exposition mit CSC wurde die höchstmögliche Konzentration für die Exposition verwendet, bei der die Genotoxizität möglichst hoch und die Cytotoxizität möglichst niedrig war.

Wachstumskurve nach Behandlung mit CSC

In Abb. 4.21 ist für die mit CSC behandelten Zellen kein Wachstum zu erkennen. Hier stellte sich in dem in der Abbildung dargestellten Zeitraum ein Gleichgewicht zwischen dem Absterben der Zellen und der Zellproliferation ein. Nach etwa einer Woche konnte ein Anwachsen der Zellkultur beobachtet werden. Diese nach etwa einer Woche erhaltene Zellzahl reichte für die anschließende Mutationsanalyse aus.

Dosis-Wirkungskurve der Strangbruch-Induktion durch CSC

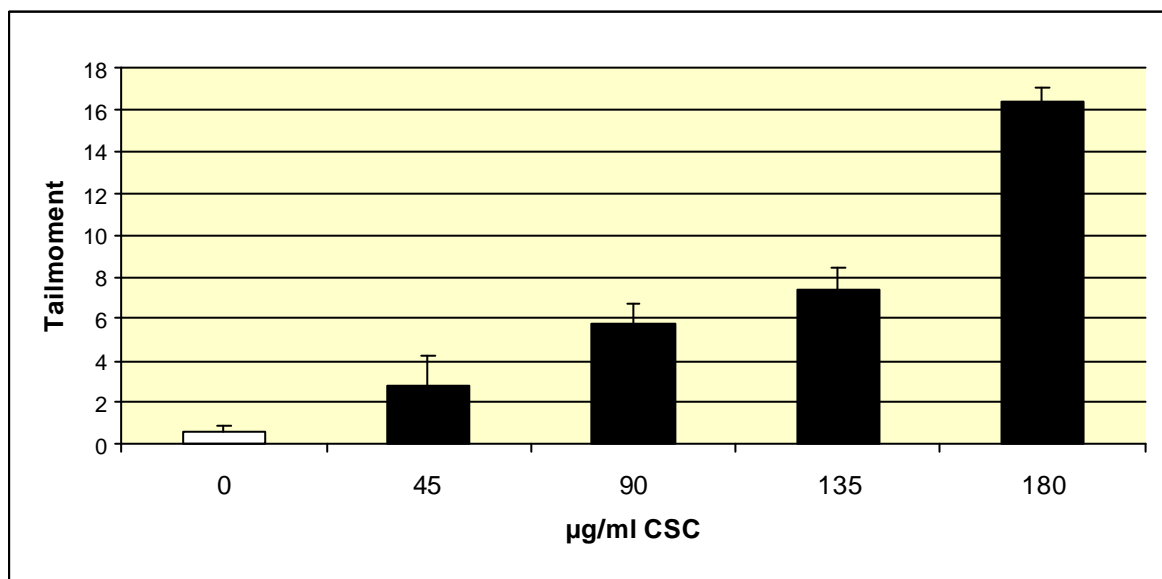


Abbildung 4.34: Dosisabhängige Strangbruchinduktion durch CSC. Für jeden Versuchsansatz (Objekträger) wurden das arithmetische Mittel der Tailmoment-Werte und die Standardabweichung der Tailmoment-Werte von 2 Objekträgern mit je 50 Zellkernen dargestellt.

Bei einer Konzentration von 135 µg/ml CSC war ein starker Anstieg des Tailmoments im Comet-Test und eine geringe Zellproliferation nach einer Woche erkennbar.

Dosis-Wirkungskurve der Adduktrate durch CSC:

Bei der Bestimmung des 8OHdG-Adduktkonzentration zeigt sich bei der Exposition mit CSC eine deutliche Dosis-Wirkungskurve ab (siehe Abb. 4.35):

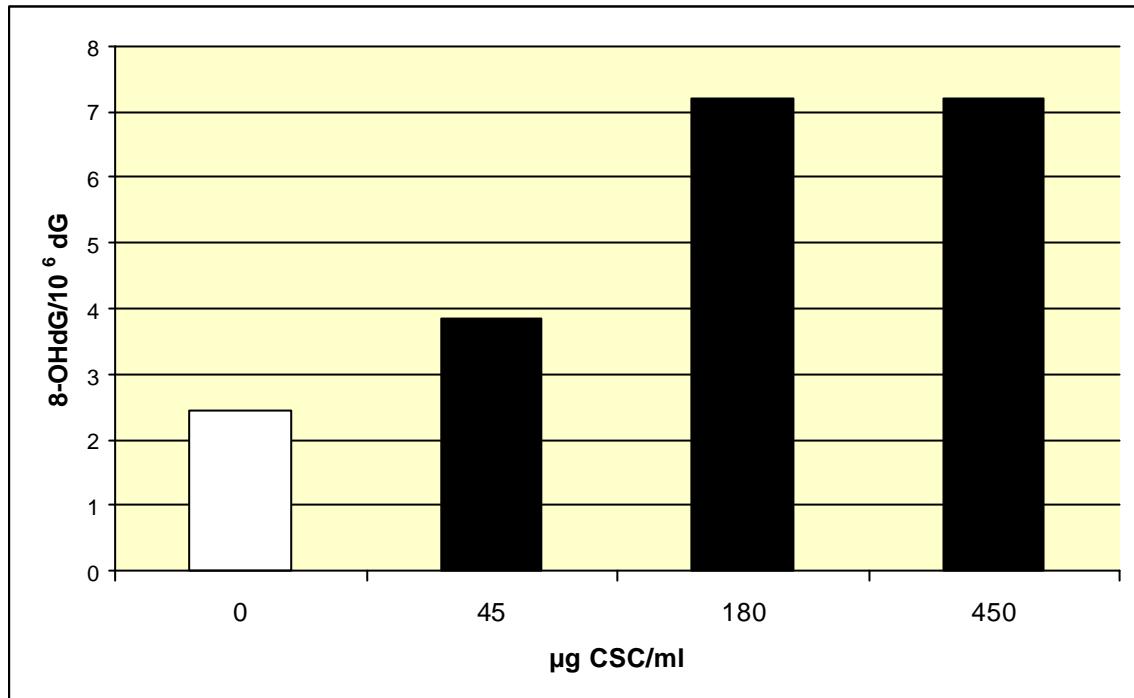


Abbildung 4.35: Verhältnis von 8OHdG zu 10⁶ dG nach Exposition mit verschiedenen Konzentrationen an CSC.

Die Bestimmung der 8OHdG-Adduktkonzentration erfolgte außerdem nach 1 h und 24 h Exposition mit der für die Mutationsanalyse verwendeten Konzentrationen an BPDE, BaP und CSC. Dabei konnte festgestellt werden, dass BPDE zu beiden Zeitpunkten eine leichte Erhöhung des 8OHdG-Levels zeigte, während bei BaP erst nach metabolischer Aktivierung eine signifikante Erhöhung zu beobachten war. Bei CSC war zu beiden Zeitpunkten eine starke Erhöhung zu sehen (siehe Abb. 4.36).

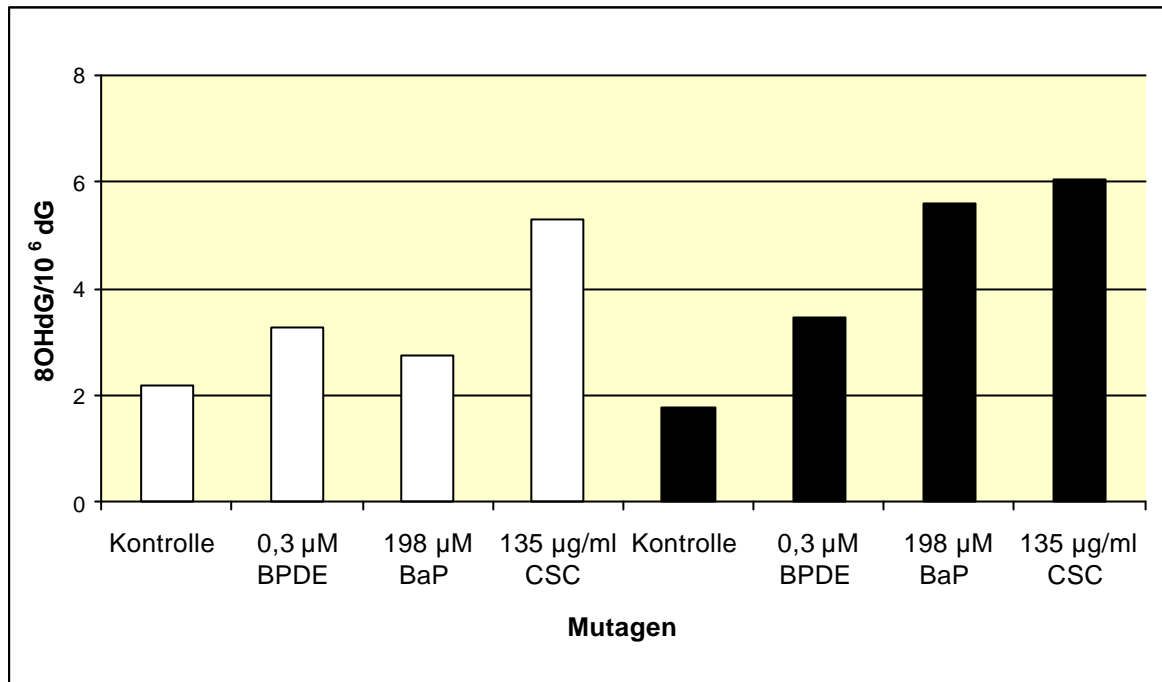


Abbildung 4.36: 8OHdG-Spiegel nach 1 h (weiß) und 24 h (schwarz) – Exposition von MCL-5-Zellen mit den Mutagenen BPDE, BaP und CSC.

4.4.2.2 Häufigkeit der untersuchten Mutationen nach Behandlung mit CSC

Bei der Behandlungsdosis von 135 µg/ml CSC waren, wie oben gezeigt, eine starke Strangbruchinduktion und eine starke Wachstumshemmung zu beobachten. Trotzdem reichte die Zellproliferation für eine anschließende Mutationsanalyse, bei der eindeutige, auf die CSC-Exposition zurückführbare positive Signale, wie anhand des Gels nach Anreicherung der Mutation im Codon 248 des *p53*-Gens in Abb. 4.37 gezeigt, auftraten.

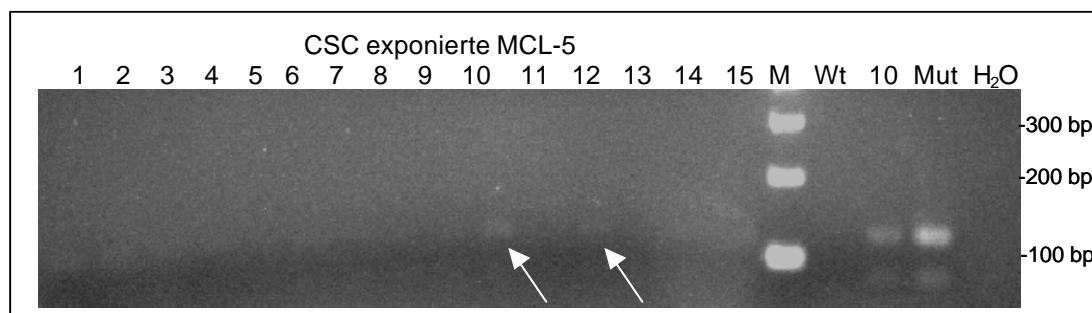


Abbildung 4.37: Beispiel positiver Banden nach CSC-Exposition für die Anreicherung von Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens.

Nach Einsetzen der Anzahl an positiven Banden in die Poisson-Formel wurden die in der Tabelle 4.11 angegebenen Mutationshäufigkeiten erhalten.

Mutagen	Dosis [μM]	<i>p53</i>		<i>K-ras</i>		t(14;18)	
		X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)	X	MF ($\times 10^{-7}$)
Kontrolle	-	0	<0,6	0	<0,6	0	<0,6
CSC	135	4	2,5	5	3,3	0	<0,6

Tabelle 4.11: Anzahl an positiven Reaktionen (X) und Mutationshäufigkeiten (MF) nach CSC-Exposition.

4.4.2.3 CSC induzierte Basenaustausch-Mutationen

Anhand der Sequenzierung wurden folgende Punktmutationen nach CSC-Exposition erkennbar:

Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.38 zeigt am Codon 248 des *p53*-Gens neben der Wildtypsequenz CGG auch einen A-Peak an der zweiten Position des Codons.

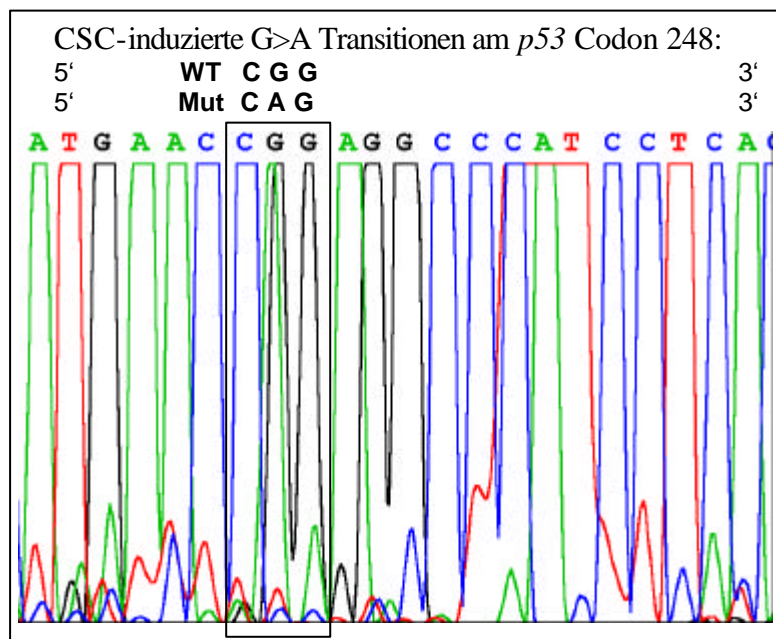


Abbildung 4.38: Elektropherogramm einer Sequenzierung eines Amplifikats des *p53*-Gens nach CSC-Exposition (Positive Bande Nr. 28).

Nr. der positiven Bande	Mutation (Restriktionsstelle: CCGG)			
	C	C	G	G
10	C>T	C>T	G>A	
12			G>A	
28			G>A	
29			G>A; G>T	

Tabelle 4.12: Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens nach CSC-Exposition. Bei der Bande Nr. 29 war eine Überlagerung der A- und T-Peaks zu erkennen.

Nach CSC-Exposition wurden als Mutationen im *p53* Codon 248 hauptsächlich G>A und C>T Transitionen gefunden.

Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens:

Das Beispiel-Elektropherogramm in Abb. 4.39 zeigt am Codon 12 des *K-ras*-Gens neben der Wildtypsequenz GGT auch A-Peaks an der ersten und zweiten Position des Codons.

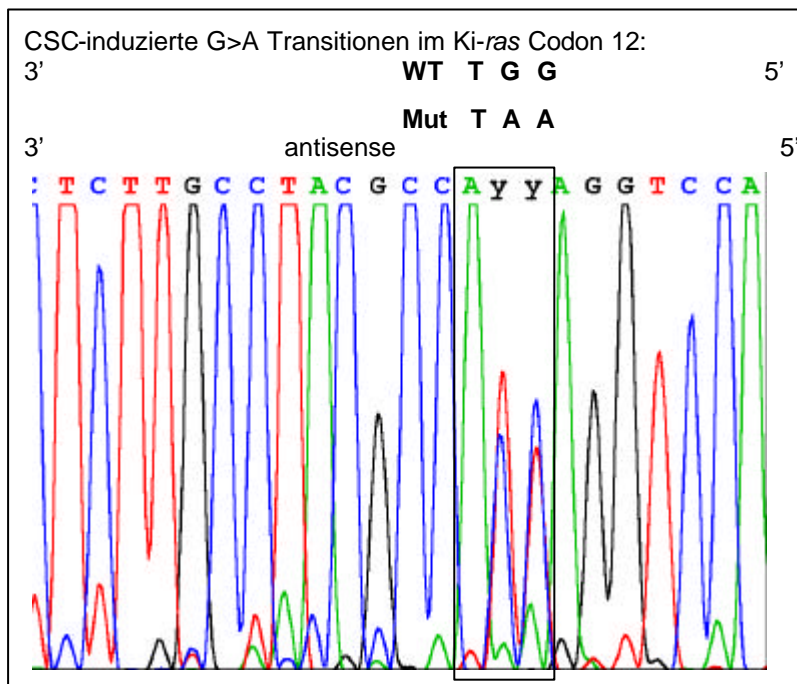


Abbildung 4.39: Elektropherogramm einer Sequenzierung eines Amplifikats des *K-ras*-Gens nach CSC-Exposition (Positive Bande Nr. 23).

Nach der CSC-Exposition wurden als Mutationen im *K-ras* Codon 12 fünf Amplifikate alle mit G>A Transitionen an beiden mutierten Positionen (Gs) des Codons gefunden.

5 Diskussion

5.1 Expositionssystem und Bestimmung der Messgrößen

5.1.1. Verwendung von MCL-5-Zellen

Die Zelllinie MCL-5 zeigte sich im Rahmen dieser Arbeit für die durchgeführten Versuche geeignet, da es sich um eine menschliche lymphoblastoide Zelllinie handelt und diese metabolisch kompetent ist. Die metabolische Kompetenz besteht durch die induzierbare CYP1A1-Aktivität und durch die in zwei episomalen Vektoren enthaltene humane cDNA für einige Fremdstoff-metabolisierende Enzyme (CYP1A2, CYP2A6, CYP2E1, CYP 3A4) sowie für die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH). Es wurde gezeigt, dass die drei zu dem Cytochrom P450-Enzymkomplex gehörenden Enzyme CYP1A2, CYP2E1 und CYP3A4, in erster Linie für die Aktivierung verschiedener PAH, Nitrosamine, aromatischer Amine, Mykotoxine und anderer Procancerogene verantwortlich sind [82]. Durch die in dieser Zelllinie exprimierten Enzyme, konnten die in dieser Arbeit verwendeten Procancerogene aktiviert und induzierte Veränderungen bestimmt werden. Dies zeigte sich z.B. an den beobachteten genotoxischen Effekte im Comet-Test.

Das heterozygote Vorliegen der *p53*-Mutation am Codon 281/2 in AHH-1-(ursprüngliche Zelllinie) oder MCL-5-Zellen [82] und deren Auswirkung auf die Apoptosefähigkeit sind zwischen den Arbeitsgruppen von J. Parry und D. Casciano umstritten [106-108]. Die Mutation wurde in unserem Labor mit der RFLP-PCR-Methode in den MCL-5-Zellen gefunden. Die Häufigkeit spontaner Mutationen im autosomalen Thymidinkinase-Gen und der Verlust der Heterozygotität (LOH: loss of heterozygosity) ist bei der Zelllinie AHH-1 größer als bei der MCL-5-Zelllinie [109].

Für den Mikronucleus-Test und andere cytogenetische Tests wie Chromosomenaberrationen sind MCL-5-Zellen wegen genetischer Instabilität weniger geeignet [110-112]. Für diese Anwendungen hat sich die Hamster-Fibroblasten-Zelllinie V79 bewährt [113], in denen auch Fremdstoff-metabolisierende Enzyme aus verschiedenen Säugerarten exprimiert wurden, um den Fremdstoffstoffwechsel untersuchen zu können [114]. Die Induktion von HPRT-Mutationen in V79-Zellen ist ein Standard-Mutagenitätstest und wird z.T. als Ergänzung des Ames-(Salmonella)-Tests in einem Säugersystem angesehen [115]. Trotz hoher Sequenzhomologien zwischen Säugerarten auf Proteinebene, sind

wegen unterschiedlichen Codongebrauchs Mutationsspektren aus verschiedenen Spezies kaum vergleichbar, weshalb zur Zeit ein Versuchstiersystem mit menschlichem *p53*-Gen, die sogenannte HupKi-Maus (human *p53* knock-in), etabliert wird [26]. Um Vergleiche mit menschlichen *in vivo* Mutationen anzustellen (z.B. mit *p53*-Mutationsspektren aus Tumoren oder mit HPRT-Mutationen aus menschlichen Lymphozyten von Probanden), muss man daher menschliche Zielsequenzen untersuchen, also eine menschliche Zelllinie, wie z.B. MCL-5, verwenden. Für Mutationstests in selektierbaren Genen wurde die Zelllinie MCL-5 konstruiert [4], die erfolgreich zur Isolierung Chemikalien-induzierter Mutanten eingesetzt werden konnten. In dieser Arbeit wurde ohne Chemikalienbehandlung weder das Auftreten von Punktmutationen noch eine Erhöhung der Häufigkeit der Translokation t(14;18) beobachtet.

5.1.2 Bestimmung der Cytotoxizität (Feststellung von Veränderungen der Zellproliferation)

Die in dieser Arbeit dargestellten Wachstumskurven wurden anhand der Ergebnisse der Trypanblau-Färbung der Zellen nach der Exposition mit den Mutagenen ermittelt. Dabei wurden die Zellen über einen Zeitraum von mindestens sieben Tagen betrachtet. Der Vorteil dieser Betrachtungsweise liegt in der Beobachtung der Langzeitwirkung einiger Mutagene. Bei MNNG z.B. war von Anfang an eine Dosis-abhängige Cytotoxizität erkennbar, die Abnahme der Zellzahl jedoch setzte sich auch nach einer Woche nach der Exposition fort.

Bei der Beurteilung des Wachstumsverhaltens von mit Chemikalien behandelten Zellkulturen müssen einerseits Ungenauigkeiten bei der mikroskopischen Zellzahlbestimmung, andererseits Unterschiede zwischen einzelnen Bestimmungen, die nicht auf die spezifische Behandlung, sondern auf den unterschiedlichen Wachstumszustand der Kulturen zurückgehen, in Betracht gezogen werden.

Da aufgrund des Aufwandes, der bei einer großen Anzahl an Kulturen durch das visuelle Zählen auftritt, meist nur eine Einfachbestimmung, d.h. eine einmalige Entnahme einer Probe pro Tag aus der Kultur vorgenommen werden konnte, konnten Fehler nicht ausgeschlossen werden. Oftmals sind eine repräsentative Probennahme (50 μ l aus 40 ml) und auch die optimale Verteilung in der Zählkammer nicht vollständig gegeben. Bei der Zählung wurde versucht, die Fehler durch Auszählen von vier möglichst weit auseinander liegenden Quadraten und durch Mitbestimmung der Gesamtzellzahl (einschließlich

Trypanblau-gefärbter Zellen) besser zu kontrollieren. Der Zeitpunkt der Probennahme entsprach nicht immer genau 24 Stunden, wodurch sich geringe Differenzen ergeben konnten. Weiterhin ist nicht bekannt, ab welchem Stadium der Schädigung sich die Zellen blau färben und bei der Betrachtung des Anteils der Trypanblau gefärbten Zellen stellt sich die Frage, ab wann sich die gefärbten Zellstrukturen auflösen.

Oftmals waren die Experimente untereinander bzw. der Kontrollansätze und der behandelten Kulturen untereinander schwer vergleichbar. Auch in den Kontrollkulturen variierte die relative Zellzahl-Zunahme pro Tag. Der Wachstumszustand hing unter anderem vom Mediumverbrauch und dem pH-Wert im Medium ab. Eine zu hohe Zelldichte behinderte die Zellen bei der weiteren Proliferation. Temperatur- und CO₂-Schwankungen konnten während der Verarbeitung nicht verhindert werden.

Da die Kontrollzellen sich oftmals schneller vermehrten als die exponierten Zellen und dadurch öfters verdünnt werden mussten, mussten diese Verdünnungsschritte bei der Erstellung der Wachstumskurven mitberücksichtigt werden.

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche war die Erstellung der Wachstumskurven durch die Zählung der mit Trypanblau angefärbten Zellen ausreichend, um die Cytotoxizität der eingesetzten Mutagene beurteilen zu können.

5.1.3 Feststellung induzierter DNA-Strangbrüche mit dem Comet-Test

Der Comet-Test ermöglicht die Ermittlung von Einzelstrangbrüchen, die in der Zelle z.B. nach Exposition entweder direkt durch die Chemikalien oder durch Mechanismen in der Zelle (Reparatur) entstehen können. Der Comet-Test ist zudem ein schneller, sensitiver Test, bei dem nur wenig biologisches Material gebraucht wird und der auch mit nicht-proliferierenden Zellen durchgeführt werden kann [116].

In dieser Arbeit wurde der Comet-Test für *in vitro*-Genotoxizitätsuntersuchungen mit proliferierenden Zellen (MCL-5 und HFBE) eingesetzt. Bei der Exposition der metabolisch kompetenten MCL-5-Zelllinie sollte durch den Comet-Test die geeignete Behandlungsdosis für eine weitere Mutationsanalyse festgestellt und die Wirksamkeit (Genotoxizität) der Behandlung mit den Mutagenen frühzeitig festgestellt werden.

Bei MCL-5-Zellen lässt sich die Sensitivität des Comet-Tests durch die Zugabe von Hydroxyhamstoff und Cytosin-Arabinosid steigern [88]. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde die Inkubationszeit mit diesen Hemmstoffen von der in

der Literatur angegebene Zeit von einer halben Stunde auf eine Stunde ausgedehnt, wodurch besser reproduzierbare Ergebnisse erzielt wurden. Zudem erfolgte bei den indirekten Mutagenen eine „Vorinkubation“, d.h. eine Inkubation nur mit dem Mutagen allein, da die metabolische Aktivierung eines Procancerogens einige Zeit in Anspruch nimmt. Verschiedene Versuche zeigten, dass der Test bei Zugabe der Hemmstoffe am Ende der Exposition am sensitivsten war.

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen war, bis auf die Exposition mit MNNG, stets eine Erhöhung des Tailmoments im Bereich der für die Mutationsanalyse verwendeten Expositionsdosis gegeben und somit eine Abschätzung der Genotoxizität dieser Konzentration möglich.

5.1.4 8OHdG-Adduktkonzentrationen

DNA-Addukte können durch kovalente Bindung von chemisch reaktiven Substanzen an die DNA-Nukleotide gebildet werden. Ebenso können exogene wie auch endogene Oxidantien zur Schädigung der DNA führen. Die Schädigung der DNA erfolgt dabei durch reaktive freie Radikale, die während des Metabolismus in der Zelle gebildet werden. Da die meisten Krebs erregenden Substanzen einer metabolischen Aktivierung unterliegen, bevor sich ihre onkogenen Effekte entfalten, resultiert die Menge an ultimalem Cancerogen in der kompetenten Aktivierung des Mutagens und der Detoxifizierungseffizienz. Aus diesem Grund spielen interindividuelle Variationen im cancerogenen Metabolismus bei der Krebsentstehung eine wichtige Rolle [57]. Oxidative DNA-Schäden können außer durch reaktive Sauerstoffspezies auch endogen, z.B. durch den intrazellulären Botenstoff NO entstehen [117].

Da die reaktiven Sauerstoffspezies kurzlebig sind, werden oxidierte Basen wie das 8OHdG als Biomarker für den oxidativen Stress verwendet.

Neben 8-Hydroxy-Adenin und Thymidinglycol stellt 8-Hydroxyguanin ein Hauptprodukt der Oxidation von reaktiven Sauerstoffspezies mit der DNA dar. Durch Misspaarung des 8-Oxoguanins (ein Tautomer des 8OHdG) mit Adenin während der Replikation kommt es zu GC>TA Transversionen (siehe Abb. 5.1), einer häufigen somatischen Mutation in menschlichen Tumorgewebe [41,118].

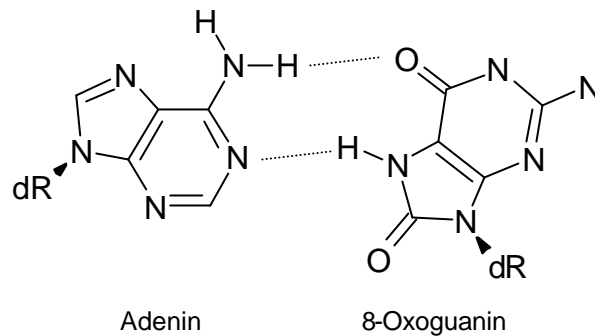


Abbildung 5.1: Basenfehlpaarung von 8-OH-Deoxyguanosin mit Adenin. Die Fehlpaarung kann zu GC>TA Transversionen führen.

Da 8OHdG durch verschiedene Nachweismethoden empfindlich bestimmt werden kann, wird 8OHdG als Biomarker für den oxidativen Stress eingesetzt.

Bei einer Exposition einer menschlichen Fibroblasten-Zelllinie mit BaP und BPDE konnten Adduktkonzentrationen von bis zu 25 Addukten in 10^7 Nukleotiden durch Postlabeling erfasst werden [119]. Dort konnte kein Zusammenhang zwischen Adduktkonzentrationen und Mutationen im HPRT-Gen festgestellt werden,

In menschlichem Gewebe wird von 8-OHdG-Leveln von einem Addukt in 10^7 Nukleotiden bis zu einem Addukt in 10^3 Nukleotiden berichtet [120].

Bei der in dieser Arbeit angewendeten LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der 8-OHdG-Konzentration in DNA von MCL-5-Zellen nach Mutagenexposition wurde eine Nachweisgrenze von einem Addukt in 10^7 Nukleotiden erreicht. Mit dieser Nachweisgrenze und dem geringen Hintergrund an 8OHdG-Konzentrationen in den MCL-5-Kontrollen konnten Einflüsse von Mutagenen auf die 8OHdG-Konzentration in der DNA von MCL-5-Zellen nachgewiesen werden.

5.1.5 Mutationsnachweis

Die Mutationsnachweise unterscheiden sich in ihrer Komplexität. So ist die Translokation mit einer einfachen semi-nested PCR nachweisbar, während die Punktmutationen mittels RFLP-PCR-Methoden angereichert werden müssen. Bei der Anreicherung der Mutation im *K-ras*-Gen muss die Restriktionsstelle durch einen Mismatchprimer eingeführt werden, wodurch eine weitere PCR notwendig wird, während die Restriktionsstelle im Gen *p53*

bereits vorhanden ist. Die nested PCR ist mit zwei einfachen PCR-Ansätzen durchführbar, während die RFLP-PCR-Methoden einige aufeinanderfolgende und damit zeitaufwendige PCR- und Restriktions-ansätze benötigen.

Da erwartet wurde, dass die Häufigkeit der Mutationen nach den Expositionen sehr gering sein würde (ca. 10^{-6} – 10^{-7}), wurden je 30 Ansätze mit je 2 µg DNA eines Expositionsansatzes oder Kontrollansatzes hergestellt, um durch die Mehrfachansätze eine ausreichende Zahl an Genomkopien durchmusteren zu können. Bei der Analyse wurde jeweils eine Positiv- und eine Negativ-Kontrolle mituntersucht.

Da aus unbehandelten Kontrollansätzen nie mutiertes Amplifikat erhalten wurde, kann man davon ausgehen, dass in den sequenzierten Amplifikaten nur induzierte (d.h. keine spontanen) Mutationen vorliegen. Die Mutationshäufigkeit wurde mit der Poisson-Formel ermittelt [7].

5.1.5.1 Translokation t(14;18)

Bei der Translokation t(14;18) liegt in über 50 % der Fälle die Bruchstelle in einer 150 bp-Region des *bcl-2*-Gens auf dem Chromosom 18. Die Bruchstelle auf dem Chromosom 14 liegt am Ende von einem der sechs J-Segmente des IgH-Locus [7]. Da die J-Segmente sehr ähnlich aufgebaut sind, wird mit dem auf der DNA dieses Chromosoms hybridisierenden Primer die Bruchstelle auf diesem Chromosom mit hoher Sicherheit erfasst.

Je nach Position der *bcl-2*-Primer werden unterschiedliche Amplifikatlängen erhalten.

Bei Wildtyp-Zellen hybridisieren die Primer auf verschiedene Chromosomen, und es kommt zu keinem translokationsspezifischen Produkt. Mit einer semi-nested PCR kann die Spezifität einer ersten PCR gesteigert werden, da dort Primer verwendet werden, die im Inneren des Amplifikats der ersten Runde liegen.

Für Probandenstudien werden weitere Anreicherungs- und Quantifizierungsmöglichkeiten für die Translokation t(14;18) beschrieben. Bei klinischen Anwendungen reicht die in Einfachansätzen (eine PCR) erreichbare Sensitivität von 10^{-4} in der Regel aus. Für die Quantifizierung der Translokationen nach einer semi-nested PCR ist eine Direkt-Sequenzierung möglich [8,121]. Eine weitere Quantifizierungsmöglichkeit stellt die Amplifikation in der Echt-Zeit-PCR dar. Mit der Echt-Zeit-Technologie wird der Nachweis von einer Translokation in 50-100000 Wildtyp-Zellen in einem Ansatz reproduzierbar erreicht. Zum Nachweis der minimalen Resterkrankung (nach Leukämiebehandlung) reicht diese Empfindlichkeit aus.

Bei der Anwendung der Untersuchung auf die Translokation t(14;18) für ein Biomonitoring werden aufgrund der mangelnden Sensitivität höhere Matrizenmengen bis zu 10 µg/Ansatz benötigt [102]. Eine weitere Möglichkeit ist die in dieser Arbeit ebenfalls durchgeführte Methode, die hohe Matrizenmenge auf mehrere Parallelansätze zu verteilen [7].

Die in dieser Arbeit durchgeführte Methode einer semi-nested PCR mit anschließender Auswertung im Agarosegel war mit einer Nachweisgrenze von einer Translokation pro $5,6 \times 10^5$ Genomkopien sensitiv genug, um durch Mutagene induzierte Translokationen nachweisen zu können. Für Nachweise durch *in vitro*-Induktion der Translokation t(14;18) wurden in der Literatur keine Hinweise gefunden.

5.1.5.2 Punktmutationen im Codon 12 des K-ras-Gens und im Codon 248 des p53-Gens

Eine genotypische Selektionsmethode, die die nötige Sensitivität zeigt, spontane oder chemisch induzierte Mutationen nachweisen zu können, ist der mit der PCR kombinierte Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus-Verdau (RFLP-PCR). Dieses Verfahren ermöglicht die Detektion von Mutationen, deren Sequenz sich von der Erkennungsstelle einer Restriktionsendonuklease unterscheidet, während die Sequenz des Wildtyps mit der Erkennungsstelle übereinstimmt. Ein Verdau durch das Restriktionsenzym verringert den hohen Hintergrund an Wildtypsequenzen. Durch eine PCR mit Primern, die diese Restriktionsstelle umgeben, ist eine Amplifikation der unschneidbaren Mutantensequenz bis zu dem Punkt möglich, an dem diese detektiert werden kann. Oftmals wird zur Detektion eine Klonierung oder oligonukleotidspezifische Hybridisierung durchgeführt [9]. Bei der hier durchgeführten RFLP-PCR-Methode zur Anreicherung der Punktmutationen bedurfte es nach den Verdau- und PCR-Zyklen nur der Agarosegeldetektion, um ein Vorhandensein von Mutationen ermitteln zu können.

Bei der RFLP-PCR-Methode ist es wichtig, das richtige Maß zwischen einerseits Amplifikationseffizienz zur Erhöhung der Sensitivität und andererseits Verringerung der Fehlerrate während der Amplifikation, was zu falsch-positiven Ergebnissen führt, zu finden.

Bei der RFLP-PCR-Methode kann es leicht zu falsch-positiven Ergebnissen kommen. Zum einen durch unvollständiges Schneiden der Restriktionsenzyme, zum anderen durch Fehler der verwendeten Polymerase. Das unvollständige Schneiden durch das Restriktionsenzym kann durch Verdünnen der Probe nach dem Verdau und wiederholte

Verdau soweit verringert werden, dass keine nachweisbaren falsch-positiven Ergebnisse erhalten werden. Es werden Fehlerraten durch die Taq-Polymerase von 1/6000 – 1/8000 Basen beschrieben. Diese Fehlerrate kann durch Verringerung der Nukleotid-Menge und der $MgCl_2$ -Konzentration reduziert werden [122]. In dieser Arbeit wurden für die RFLP-PCR-Methode verschiedene Polymerasen (Taq-Polymerase von Ready-to-Go-PCR-Beads und die Ampli-Taq-Gold) miteinander und unter verschiedenen Bedingungen verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Ready-to-Go-PCR-Beads für eine RFLP-PCR-Methode durch frühzeitiges Auftreten falsch-positiver Ergebnisse ungeeignet sind. Die RFLP-PCR-Methode erwies sich unter Verwendung der Ampli-Taq-Gold mit einer sehr geringen Konzentration an Nukleotiden als am geeignetsten.

Die RFLP-PCR-Methode wurde bisher zur Rest-Anreicherung von Mutationen aus Tumoren oder prämaligen Läsionen angewendet [100] und auch zur Bestimmung der Mutationsspezifität [104], wobei anschließend eine Klonierung zur Differenzierung der Mutationen durchgeführt wurde.

Mit der in dieser Arbeit durchgeführten RFLP-PCR-Methode war durch die anschließende Sequenzierung der positiven Banden, die bei der Anreicherung der Mutationen in den beiden Genen erhalten wurden, eine Charakterisierung der Mutationen möglich. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, dass im Gegensatz zu einer anschließenden Klonierung, wodurch eine große Anzahl an verschiedenen Mutanten ermittelt werden können [104], hier durch die Sequenzierung keine unterschiedlichen Mutanten in einer positiven Bande differenziert wurden, da alle Mutationen gleichzeitig in einem Elektropherogramm zu sehen sind. Der Vorteil der hier angewandten Methode liegt in der hohen Anzahl an Genomkopien, die durch die Parallelansätze auf Mutationen untersucht werden können.

Die hier durchgeführte RFLP-PCR-Analyse für die Anreicherung der Mutation im Codon 248 des *p53*-Gens und die PCR-RFLP-Analyse für die Anreicherung der Mutation im Codon 12 des *K-ras*-Gens waren sensitiv genug, um durch Cancerogene induzierte Mutationen in diesen Genen nachweisen können.

Für Biomonitoringstudien an Probanden ist die RFLP-PCR-Nachweismethode sehr aufwendig, da ein Nachweis mehrere Tage in Anspruch nimmt. Eine RFLP-PCR-Methode wurde für Biomonitoring bei Bronchialgewebe von Lungenkrebspatienten mit einer für diesen Zweck ausreichenden Nachweisgrenze von einer Mutante in 10^4 normalen Allelen beschrieben [100].

5.2 Diskussion der Ergebnisse anhand der einzelnen Stoffklassen

In der nachfolgenden Tabelle 5.1 wurden die Ergebnisse, die in dieser Arbeit erzielt wurden, zusammengefasst. Dabei wurden die Ergebnisse der Genotoxizität und Cytotoxizität für die bei der Mutationsanalyse verwendeten Dosis angegeben.

Substanz	Behandlung Dosis		Überleben nach 3 Tagen [%]	Erhöhung des mittleren Tail moments	Mutationshäufigkeit [$\times 10^{-7}$]		
	[$\mu\text{g/ml}$]	[μM]			<i>P53</i>	<i>K-ras</i>	<i>t(14;18)</i>
unbehandelt	-	-	100	0	<0,6	<0,6	<0,6
MNNG	0,03	0,2	51	0	1,9	6,3	0,61
BPDE	0,16	0,52	28	11,8	6,3	<0,6	1,2
BaP	50	198	68	6,8	3,2	<0,6	0,61
PhIP	50	222,5	73	2,8	6,3	5,5	0,61
NNK	500	2413	63	1,1	7,2	6,3	1,2
CSC	135	-	9	6,5	2,5	3,3	<0,6

Tabelle 5.1: Chemisch induzierte Cyto- und Genotoxizität und potentiell onkogene Mutationen.

5.2.1 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

PAH zeigen nach metabolischer Aktivierung zu ihren Dihydrodiolepoxiden eine spezifische DNA-Adduktbildung, die sich von anderen Mutagenen unterscheidet [58,123]. Die elektrophile Reaktion der PAH-Dihydrodiolepoxide mit den DNA-Basen findet an den exozyklischen Amino-Gruppen der Basen statt. BPDE, das ultimale Cancerogen von BaP, bildet vorwiegend kovalente (+)-trans-Addukte am N² des Guanins [58]. Es wurde gezeigt, dass sich im *p53*-Gen BPDE-Addukte bevorzugt an CpG-Sequenzen bilden, und dass Methylierungen am Cytosin diese Adduktbildung fördern [124,125]. Außerdem wurde gezeigt, dass BPDE bevorzugt an die Guanosinstellen in den Codons 157, 248 und 273 im *p53*-Gen bindet [124]. Diese Codons sind zugleich Hotspots beim mit Tabakrauch in Zusammenhang gebrachten Lungenkrebs [22,126]. Diese Addukte führen bevorzugt zu G>T und G>A Basenaustauschen (siehe Abb. 5.2) [127].

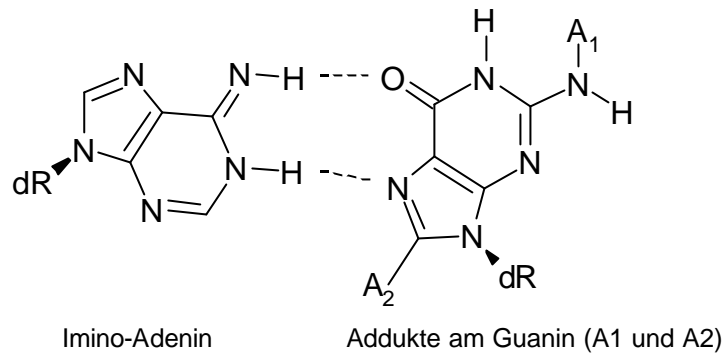


Abbildung 5.2: Basenmisspaarung durch Addukte am Guanin. PAH (A1) und heterozyklische aromatische Amine (A2) greifen an N2 oder C8 von Guanin an.

5.2.1.1 Cytotoxische und genotoxische Effekte

Das direkte Mutagen BPDE zeigt eine deutlich höhere Toxizität als seine Ausgangssubstanz BaP. Obwohl bei BaP die 400fache Konzentration für die Exposition eingesetzt wurde, zeigte sich, dass die Zellen diese hohe Konzentration genauso überlebten wie die niedrige Konzentration an BPDE (siehe Abb. 4.13 und 4.21). Dies lässt vermuten, dass nur ein Teil des Mutagens BaP metabolisch aktiviert wurde oder die metabolische Aktivierung zum Zeitpunkt der Untersuchung noch nicht abgeschlossen war, was durch die Induktion von CYP1A1 bedingt sein könnte. Bei Untersuchung der genotoxischen Effekte im Comet-Test wurden die gleichen Beobachtungen gemacht (siehe Abb. 4.17 und 4.22). Bei der Untersuchung der Effekte von BaP und BPDE durch den lacZ-Reversionstest wurde nur ein 30facher Unterschied zwischen den Dosis-Wirkungs-Effekten der beiden Substanzen gefunden [128]. Ein Vergleich der Expositionen von einer menschlichen Fibroblasten-Zelllinie mit BaP und BPDE zeigte einen 100fachen Unterschied zwischen den Dosis-Wirkungs-Effekten der beiden Substanzen im Comet-Test [119]. Zur metabolischen Aktivierung von BaP wurde in dem Fibroblasten-System ein S9-Extrakt zugesetzt, wodurch eine Erhöhung des Tailmoments bei einer Dosis von 50 μM BaP zu erkennen war. Höhere Dosen verursachten keine weitere Erhöhung. Bei dieser Konzentration war auch bei den MCL-5-Zellen ein Anstieg des Tailmoments zu erkennen, der sich jedoch bei höheren Dosen verstärkte. Auch die für BPDE verwendete Dosis von 0,1 μM zeigte bei den MCL-5-Zellen wie bei den Fibroblasten einen deutlichen Anstieg des Tailmoments. Die von Martin berichtete Dosisabhängigkeit der Strangbruchinduktion entspricht in demselben Testsystem (MCL-5-Zellen) weitgehend der hier beobachteten, trotz kleiner Änderungen im Protokoll und anderer Auswertung [88].

8OHdG-Konzentration in genomischer DNA nach einer Stunde und 24 Stunden Exposition mit BPDE und BaP

Bei der Behandlung der MCL-5-Zellen mit den primär nicht oxidativen Mutagenen BaP und BPDE war ein signifikanter Anstieg der 8OHdG-Addukte erkennbar (siehe Abb. 4.36). Bei Behandlung mit dem direkt wirksamen Mutagen BPDE hatte die Behandlungsdauer keinen Einfluss auf die beobachteten oxidativen DNA-Schäden. Bei der Adduktkonzentration von BPDE schien sich schon nach einer Stunde ein Gleichgewicht zwischen Adduktbildung und Reparaturkapazität eingestellt zu haben, das auch nach 24 Stunden auf dem gleichen Addukt-Level bestehen blieb. Die Adduktkonzentration nach Behandlung mit BPDE war nicht vergleichbar mit der Menge an migrierter DNA, die im Comet-Test beobachtet wurde (siehe Abb. 4.17 und 4.22). Dieser Befund lässt sich durch die Tatsache erklären, dass im Comet-Test hauptsächlich DNA-Fragmente, die durch die Excisions-Reparatur entstehen, sichtbar gemacht werden, während bei der Bestimmung der 8OHdG-Konzentration ein Gleichgewicht zwischen Adduktbildung und Reparaturkapazität erfasst wird. Dieses Ergebnis wurde auch bei der Behandlung von Fibroblasten mit BPDE erhalten [119].

Bei der Exposition mit BaP war eine deutliche Zunahme der 8OHdG-Konzentration nach 24 Stunden zu erkennen, die auf den Metabolismus des Mutagens in den Zellen hinweist, aber auch schon nach einer Stunde wurde der Adduktspiegel durch das Mutagen erhöht. Die metabolische Aktivierung von BaP geschieht hauptsächlich durch CYP1A1, was in den Zellen zunächst induziert werden muss und die geringe Zunahme des 8OHdG-Levels nach einer Stunde erklärt. Im Vergleich zu BPDE stellt sich das Gleichgewicht zwischen Adduktbildung und Reparaturkapazität nach 24 Stunden nach BaP-Behandlung auf einem höheren Adduktlevel ein. Ein Vergleich der Ergebnisse, die nach BaP-Behandlung im Comet-Test erhalten wurden, mit der Adduktkonzentration nach 24 Stunden zeigt im Gegensatz zu der Behandlung mit BPDE einen ähnlichen Anstieg des Tailmoments sowie der Adduktrate.

5.2.1.2 Induzierte Mutationshäufigkeiten und Basenaustausch-Typen

In dieser Arbeit wurden die Mutationshäufigkeiten in den Genen *p53* und *K-ras* sowie die Häufigkeit des Auftretens der Translokation t(14;18) nach Exposition mit BaP und BPDE untersucht. Dabei wurden durch BaP und BPDE induzierte Translokationen und Mutationen im Gen *p53* gefunden (siehe Tab.5.1). Bei der Translokation t(14;18) zeigte sich bei der Exposition mit dem direkten Mutagen BPDE eine doppelt so hohe

Mutationshäufigkeit wie bei Exposition mit dem indirekten Mutagen BaP. Dies kann wie bei den cytotoxischen und genotoxischen Effekten auf die nicht vollständige und relativ langsam erfolgende Metabolisierung zurückgeführt werden, die durch die Induzierung von CYP1A1 erfolgt.

Die Häufigkeit der im Codon 248 des *p53*-Gens gefundenen Mutationen wies wie die cytotoxischen und genotoxischen Effekte, den Unterschied zwischen dem direkten und dem indirekten Mutagen auf. Es wurden ebenfalls fast doppelt so viele Mutationen nach BPDE-Exposition wie nach BaP-Exposition gefunden. Die Mutationshäufigkeit ist in der Größenordnung von 10^{-7} mit der in der Literatur angegebenen vergleichbar [104].

In dieser Arbeit wurden nach Exposition mit BPDE hauptsächlich G>T Transversionen und wenige G>A Transitionen im Codon 248 des *p53*-Gens gefunden, während die Exposition mit BaP zur Hälfte zu G>T Transversionen und zur anderen Hälfte zu G>A Transitionen führte. Dies stimmt mit den in der Literatur angegebenen Mutationstypen überein [50,127,129]. Bei Tierversuchen mit Mäusen z.B. konnten in durch BaP induzierten Hauttumoren im *p53*-Gen 71 % G>T Transversionen nachgewiesen werden [130]. Bei der Untersuchung von Mutationen im HPRT-Gen der MCL-5-Zellen konnten nach Behandlung mit 0,1 µg/ml BaP in neun von 21 Basenpaarsubstitutionen G>T Transversionen gefunden werden [131].

In dieser Arbeit wurden keine Mutationen im *K-ras*-Gen nach BaP- und BPDE-Exposition gefunden. In der Literatur gibt es wenig Angaben über *K-ras*-Mutationen nach BaP- und BPDE-Exposition. In einer Studie mit CD-1-Mäusen wurden in den Adenomen der Lunge wenige Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gen nach BaP-Exposition gefunden. Im ähnlich aufgebauten *H-ras*-Gen (*K-ras*-Gen Codon 12: GGT Gly; *H-ras*-Gen Codon 12: GGA Gly) konnten bei Mäusen in Hautpapillomen nach BaP-Exposition nur Mutationen im Codon 13 nachgewiesen werden, nicht im Codon 12 [61].

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen der Cytotoxizität, Genotoxizität und der Mutationsinduktion nach BaP-Exposition konsistente Ergebnisse, d.h. die beobachteten Effekte lassen sich mit der Einwirkung des ultimalen Cancerogens BPDE erklären.

5.2.2 Heterozyklische aromatische Amine

Aus den instabilen durch metabolische Aktivierung gebildeten hochreaktiven N-Acetoxyarylaminen können elektrophile Nitreniumionen entstehen, die mit der DNA unter Bildung von C8-Deoxyguanosin-Addukten reagieren können (siehe Abb. 5.2) [66]. Diese Addukte können zu GC>TA Transversionen führen.

5.2.2.1 Cytotoxische und genotoxische Effekte

Bei dem heterozyklischen aromatischen Amin PhIP ergab sich die optimale Konzentration für die Exposition der MCL-5-Zellen durch die Löslichkeit der Substanz im Expositionsmedium. Bei einer höheren Konzentration als 222,5 µM PhIP fiel dieses im Medium aus, was sich im Rückgang der Schädigung im Comet-Test bemerkbar machte (siehe Abb. 4.25). Bei der in dieser Arbeit verwendeten Konzentration von 222,5 µM PhIP konnte ein signifikanter Anstieg der Schäden im Comet-Test gesehen werden. Die von Martin und Mitarbeitern berichtete Dosisabhängigkeit der Strangbruchinduktion entspricht im selben Testsystem weitgehend der in dieser Arbeit beobachteten, trotz kleiner Änderungen im Protokoll und anderer Auswertung [88]. Bei der Exposition von menschlichen lymphoblastoiden TK6-Zellen wurde bei einer vierstündigen Exposition mit 0,5 µg/ml PhIP und einem externen Metabolisierungssystem (S9) eine Überlebensrate von 70 % erhalten [132]. In dieser Arbeit wurde bei der 10fachen Expositions-dosis von 50 µg/ml PhIP eine Überlebensrate von 73 % nach drei Tagen erhalten (siehe Tab. 5.1). Dies kann durch die nicht vollständige oder langsame Metabolisierung in den MCL-5-Zellen sowie der Reparaturkapazität erklärt werden.

5.2.2.2 Induzierte Mutationshäufigkeiten und Basenaustausch-Typen

In dieser Arbeit wurden die Mutationshäufigkeiten in den Genen *p53* und *K-ras* sowie die Häufigkeit des Auftretens der Translokation t(14;18) nach Exposition mit 222,6 µM PhIP untersucht. Es konnten durch PhIP-induzierte Translokationen und Mutationen im Gen *p53* und *K-ras* (siehe Tab. 4.7) mit einer Mutationshäufigkeit von $1,2 - 7,2 \times 10^{-7}$ beobachtet werden. In verschiedenen menschlichen Zelllinien, denen zur externen metabolischen Aktivierung S9-Extrakt zugesetzt wurde, konnte nach Behandlung mit 5 – 10 µM PhIP eine Mutationshäufigkeit im HPRT-Gen von $2,3 - 16 \times 10^{-7}$ festgestellt werden [133]. Die hohe Mutationshäufigkeit im HPRT-Gen im Gegensatz zu der in dieser Arbeit beobachteten Mutationshäufigkeit bei der 20fach geringeren Konzentration an PhIP

kann an der nicht vollständigen oder langsamen metabolischen Aktivierung von PhIP in den MCL-5-Zellen liegen.

In dieser Arbeit wurden bei den Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens vorwiegend GC>AT Transitionen gefunden (siehe Tab. 4.8). Im HPRT-Gen der menschlichen lymphoblastoiden Zelllinie TK6 wurden nach Exposition mit 0,5 µg/ml PhIP 56,1 % GC>TA Transversionen und 29 % GC>AT Transitionen beobachtet [132]. Im HPRT-Gen einer Hamsterzelllinie mit CYP1A2-Aktivität, XEMh1A2, konnten bei PhIP-induzierten Mutationen neben ca. 50 % GC>TA Transversionen auch 10 % GC>AT Transitionen ermittelt werden [134]. PhIP-induzierte Mutationen zeigen sich vor allem an den Stellen in DNA-Sequenzen, die ein für Adduktbildung bevorzugtes Guanin beinhalten, welches am 5'-Ende von einem Guanin und/oder am 3'-Ende von einem Adenin begrenzt wird [135]. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Codon 248 des *p53*-Gens trifft dieses auf das zweite Guanin in diesem Codon zu (siehe Abb. 2.11). Dieses Guanin an der zweiten Position des Codons ist auch in fast jeder in dieser Arbeit untersuchten Mutation mutiert (siehe Tab. 4.8), allerdings als Doppelmutation der beiden Guanins in diesem Codon. Eine mögliche Ursache für die hier gefundenen G>A Transitionen ist eine fehlerhafte Reparatur z.B. durch oxidative Schäden, die beim Metabolismus von PhIP entstehen und unter anderem zu GC>AT Transversionen führen können [136].

Nach PhIP-Exposition wurden in vier von 13 Tumoren in weiblichen F344 Ratten im Codon 12 des *H-ras*-Gens Mutationen gefunden. Bei drei dieser Mutationen handelte es sich um GGA>GAA Transitionen [137]. Im Falle des ähnlich aufgebauten Codon 12 des *K-ras*-Gens wurden in dieser Arbeit ebenfalls nur G>A Transitionen beobachtet. Dabei waren jedoch immer beide Gs, also die ersten beiden Positionen im Codons 12 des *K-ras*-Gens von dieser Mutation betroffen (siehe 4.3.2.3).

5.2.3 N-Nitrosoverbindungen

Ein wesentlicher Reaktionsmechanismus bei der Mutagenese durch N-Nitrosoverbindungen ist die Alkylierung von Nukleobasen, v.a. von Guanin. Unter diesen Addukten ist besonders das O⁶-Methylguanin cytotoxisch und mutagen [138]. Durch die Methylierung wird die Enol-Form des substituierten Purins bevorzugt, die im Gegensatz zur Ketoform mit Thymin paart. Dies führt in der nächsten Replikationsrunde zur Thymidin-Adenin-Paarung, so dass das ursprüngliche Guanin durch Adenin ersetzt wird und es zu einer GC>AT Transition kommt (siehe Abb. 5.3).

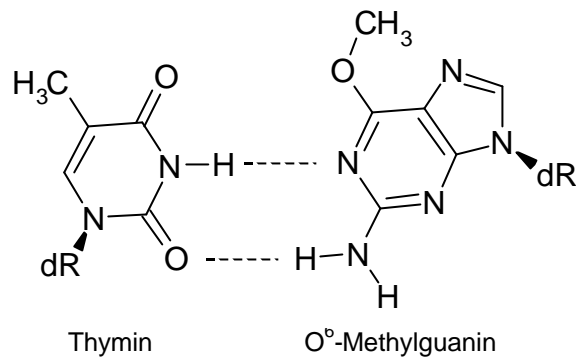


Abbildung 5.3: Basenpaarung von O⁶-Methylguanin mit Thymin.

NNK gilt als das cancerogenste tabakspezifische Nitrosamin [139,140]. Es kommt in Mengen von 120-990 ng in Zigaretten vor, abhängig von der eingesetzten Tabaksorte [141]. NNK kann nach metabolischer Aktivierung durch Methylierung und Pyridyloxobutylierung DNA-Addukte bilden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass im *K-ras*-Gen in Lungentumoren von A/J-Mäusen die Methylierung der DNA hauptsächlich zu G>A Transitionen und die Pyridyloxobutylierung sowohl zu G>A Transitionen als auch zu G>T Transversionen führt [142]. Weiterhin scheint die Bildung von GC>AT Transitionen durch Inhibition der Reparatur von O⁶-Methyl-guanosin-Addukten durch pyridyloxobutylierte DNA gefördert zu werden [74].

5.2.3.1 Cytotoxische und genotoxische Effekte

MNNG wird im Comet-Test oft in Konzentrationen von 70 μ M als Positivkontrolle verwendet [143], da es schon in geringen Konzentrationen zu einem Anstieg der Strangbruchhäufigkeit führt. Durch Modifikationen (Erhöhung der Elektrophoresezeit und Zugabe von HU/araC) können genotoxische Effekte noch bei deutlich geringeren Behandlungsdosen im Comet-Test nachgewiesen werden. So fand Martin und Mitarbeiter noch einen Anstieg der Taillength bei Behandlungsdosen von 600 nM [88], und auch in dieser Arbeit konnte ein leichter Anstieg des Tailmoments bei einer Konzentration von 700 nM MNNG festgestellt werden (siehe Abb. 4.11). Unmittelbar nach Behandlung mit 600 nM MNNG wird kein Anstieg der Trypanblau gefärbten Zellen gefunden [88]. Der Anteil Trypanblau gefärbter Zellen nahm jedoch mindestens eine Woche lang zu (siehe Abb. 4.12). Dies steht im Einklang mit einer vorwiegend genotoxischen Wirkung des

Mutagens. Erst nach Replikation entstehen aus den Addukten Mutationen, die unter Umständen lebenswichtige Gene betreffen können.

Die Firma *Gentest* gibt für die Zelllinie h2D6v2 eine Behandlungskonzentration von 30 µg/ml NNK sowie eine Überlebensrate von 15 % und eine HPRT-Mutationshäufigkeit von 25×10^{-6} [144]. Bei der Behandlung von MCL-5-Zellen wurden in unserem Labor 1 µg/ml NNK eingesetzt, was zu einer Abnahme der Plattierungseffizienz von 33 % auf 9 % und zu einer 8,8fachen Erhöhung der HPRT-Mutationsfrequenz führte [131].

Im erwähnten Dosisbereich (1-30 µg/ml) war keine Strangbruchinduktion im Comet-Test zu beobachten. Dies war auch bei Zugabe von HU/araC und Vorinkubation mit dem Pro-Mutagen erst bei einer Dosis von 241 µM möglich (siehe Abb. 4.29). Eine eindeutige Strangbruchinduktion ergab sich bei 2,4 mM, einer NNK-Konzentration, bei der ohne phänotypische Mutantenselektion ein ausreichendes Zellwachstum für die Mutageneseversuche festgestellt wurde. Im Vergleich zur BaP-Behandlung ist bei ähnlicher Cytotoxizität die Strangbruchinduktion durch NNK deutlich schwächer.

Allerdings kann bei NNK eine 10fach höhere Dosis für die Exposition eingesetzt werden als bei den PAH.

5.2.3.2 Induzierte Mutationshäufigkeiten und Basenaustausch-Typen

Verglichen mit der Strangbruchinduktion im Comet-Test ist die Mutationshäufigkeit sowohl bei MNNG als auch bei NNK hoch. O⁶-Methylguanosin-Addukte, die durch MNNG und metabolisch aktiviertes NNK entstehen können, führen nicht zu Strangbrüchen, da sie auch ohne Endonuklease durch AGT repariert werden können [145].

Nach MNNG-Exposition zeigten sich mehr Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens (MF= $6,3 \times 10^{-7}$) als im Codon 248 des *p53*-Gens (MF= $1,9 \times 10^{-7}$) (siehe Tab. 4.1). Dabei wurden im Codon 248 des *p53*-Gens ausschließlich GC>AT Transitionen gefunden (siehe Tab. 4.2). Im Codon 12 des *K-ras*-Gens wurden nur G>A Transitionen induziert, obwohl in der Restriktionsstelle ebenfalls Cs enthalten sind, also C>T Transitionen hätten gefunden werden können (siehe 4.2.1.3). Bei Untersuchungen des HPRT-Gens in Säugerzellen, die mit MNNG behandelt wurden, wurden in 60 % der gesamten Mutationen GC>AT Transitionen gefunden [146,147], was mit dem Befund in dieser Arbeit übereinstimmt. Im lacZ-Reversionstest in *ada*+*E.coli* wurden nach MNNG-Behandlung ebenfalls G>A-Transitionen gefunden [128].

In NNK-induzierten *K-ras*- und *p53*-Punktmutationen in Lungentumoren von Hamstern wurden ausschließlich G>A Transitionen gefunden [148]. Im HPRT-Gen von

Hamsterzellen betrug die Mutationshäufigkeit nach NNK-Exposition 77 %. Dabei wurden in 84 % der gefundenen Transitionen 81 % GC>AT Transitionen beobachtet [149]. Im HPRT-Gen der menschlichen lymphoblastoiden Zelllinie MCL-5 wurden nach Exposition mit NNK in vier von sieben Basensubstitutionen GC>AT Transitionen beobachtet [131]. Nach NNK-Exposition wurden in dieser Arbeit ebenfalls ausschließlich GC>AT gefunden. Im p53-Gen wurden mehr C>T Transitionen und diese nicht nur im C des Codons 248, sondern auch im C des vorigen Codons, das in der Erkennungsstelle für das Restriktionsenzym vorhanden ist (siehe Tab. 4.10). Da Methylierungen der DNA G>A Transitionen, Pyridyloxobutylierungen G>A Transitionen und G>T Transversionen induzieren [142], scheint bei der Exposition von MCL-5-Zellen mit NNK im Codon 248 des *p53*-Gens und im Codon 12 des *K-ras*-Gens die Methylierung der DNA vorzuherrschen, da keine G>T Transversionen gefunden werden konnten. Eine andere Erklärung wäre eine derart starke Hemmung der O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT) durch die Pyridyloxo-butylierung der DNA, dass die Reparatur der Methyl-Addukte gestört war und es so vorwiegend zu G>A Transitionen kam. Im Codon 12 des *K-ras*-Gens wurden immer beide Gs des Codons 12 gleichzeitig mutiert gefunden (siehe 4.3.3.3). Dies widerspricht Studien, in denen im *K-ras*-Gen in Lungentumoren von A/J-Mäusen nur G>A Transitionen in der zweiten Base des Codon 12 gefunden wurden [150,151].

Bezüglich der Translokation t(14;18) zeigte die Exposition mit dem direkten Mutagen MNNG eine halb so große Mutationshäufigkeit wie das indirekte Mutagen NNK. NNK bildet nach metabolischer Aktivierung nicht nur Methyl-Addukte wie MNNG, sondern auch Pyridyloxobutyl-Addukte. Man kann vermuten, dass die Pyridyloxobutyl-Adduktbildung die Ursache hierfür darstellt. Des weiteren könnte auch die deutlich längere Einwirkzeit von NNK bzw. seiner aktivierten Metaboliten hierfür verantwortlich sein.

5.2.4 Tabakrauch

Zigarettenrauch enthält eine Vielzahl Cancerogene, unter anderem PAH, aromatische Amine, heterozyklische aromatische Amine und tabakspezifische Nitrosamine [152,153]. Neben toxischen Komponenten wie Formaldehyd, Acetaldehyd und Acrolein werden durch Redoxreaktionen des Hydrochinon-Systems kurzlebige Radikale und reaktive Zwischenprodukte gebildet, wobei auch NO_x eine wichtige Rolle bei toxischen und cancerogenen Effekten spielen kann. Komponenten im Tabakrauch, die die DNA direkt schädigen, beinhalten reaktive Zwischenprodukte des Sauerstoffs, Peroxynitrite, ethylierende Agentien und andere noch nicht identifizierte Spezies [154,155]. Dabei ist der Zusammenhang zwischen der Einwirkung von Einzelsubstanzen oder Komponentenklassen im Tabakrauch und den durch Tabakrauch verursachten DNA-Schäden noch ungeklärt. Durch Zigarettenrauch induzierte Mutationen werden unter anderem den PAH und HAA zugesprochen [156]. Beim Lungenkrebs, für den in vielen Fällen das Rauchen verantwortlich ist, sind im *p53*-Gen einige „Hotspots“ vorzugsweise von Mutationen betroffen. Dazu zählen vor allem Codon 157 und 273, daneben aber auch das bei Krebs mit am häufigsten betroffene Codon 248. Allerdings werden bei Lungenkrebs im Codon 248 ausschließlich G>T Transversionen gefunden. Diese Mutationen werden auch nach Exposition mit PAH gefunden [157].

5.2.4.1 Cytotoxische und genotoxische Effekte

CSC erwies sich bei der Behandlung von MCL-5-Zellen als sehr cytotoxisch, wodurch die Proliferation der Zellen nach der Exposition stark verlangsamt war (siehe Abb. 4.21). Bei der hier verwendeten Konzentration war nur eine geringe Überlebensrate zu erkennen. Neben dieser hohen Cytotoxizität konnte bei der angewendeten Konzentration auch eine hohe Genotoxizität im Comet-Test festgestellt werden (siehe Abb. 4.34). Die hohe Cytotoxizität und Genotoxizität lassen sich vor allem durch die Entstehung von freien Radikalen erklären, die zu einem hohen Level an oxidativen Stress gemessen an der 8OHdG-Konzentration führen (siehe Abb. 4.35).

Comet-Test nach Exposition von Bronchial-Epithelzellen mit verdünntem Nebenstromrauch

Die Trypsinierung unbehandelter adhärenter Bronchial-Epithel-Zellen, dargestellt als Kontrolle in Abb. 4.33, verursachte keine Erhöhung der Schäden im Comet-Test. Ebenso wenig hat die Exposition mit synthetischer Luft einen Einfluss auf die Strangbruchrate (siehe Abb. 4.33). Das als toxisch geltende und zu DNA-Schäden führende NO_2 [53] zeigt

eine im Vergleich zum verdünnten Nebenstromrauch (ADS) nur geringe Erhöhung der Schäden im Comet-Test. Auch eine Verdünnung des ADS auf etwa 1:10 äußert sich noch mit einer starken Erhöhung des Tailmoments. Eine Exposition mit ADS über eine Stunde führt demnach zu massiven genotoxischen Schäden.

Diese Ergebnisse lassen sich mit dem Zigarettenrauchkondensat vergleichen, bei dem ebenfalls eine starke genotoxische Wirkung im Comet-Test ermittelt wurde (siehe Abb.4.34).

8OHdG-Addukte nach Exposition mit CSC

Die Exposition mit CSC führt sowohl nach einer Stunde wie auch nach 24 Stunden zu einer stark erhöhten 8OHdG-Adduktkonzentration (siehe Abb. 4.36). Schon eine Stunde nach Exposition ist eine erhöhte Adduktrate erkennbar, die wahrscheinlich vorzugsweise durch direkte Mutagene ausgelöst wird. Der weitere Anstieg der Adduktkonzentration nach 24 Stunden weist auf weiteren oxidativen Stress hin, der durch metabolische Aktivierung von Tabakrauchinhaltsstoffen ausgelöst worden sein kann.

5.2.4.2 Induzierte Mutationshäufigkeiten und Basenaustausch-Typen

In dieser Arbeit wurden die Mutationshäufigkeiten in den Genen *p53* und *K-ras* sowie die Häufigkeit des Auftretens der Translokation t(14;18) nach Exposition mit CSC untersucht. Dabei wurden durch CSC induzierte Mutationen in den Genen *p53* und *K-ras* gefunden, jedoch keine Translokation t(14;18) (siehe Tab. 4.11).

Bei CSC ist trotz hoher Cytotoxizität (siehe Abb. 4.21), hoher Genotoxizität (siehe Abb. 4.34) und hoher 8OHdG-Adduktkonzentration (siehe Abb. 4.36) nur eine vergleichsweise geringe Mutationshäufigkeit im *K-ras*-Gen und im *p53*-Gen zu beobachten (siehe Tab. 4.11). Aus der niedrigen Überlebensrate nach Exposition mit CSC lässt sich entnehmen, dass die Zellen durch CSC sehr stark geschädigt werden und es so eher zur Apoptose als zu Mutationen kommt.

Obwohl in der Literatur über ein erhöhtes Auftreten von t(14;18)-Translokationen bei starken Rauchern berichtet wurde [37], konnten in dieser Arbeit keine durch CSC induzierten Translokationen beobachtet werden. Dies kann zum einen dadurch bedingt sein, dass nicht alle Tabakinhaltsstoffe, die durch das Inhalieren aufgenommen werden, im CSC enthalten sind (es fehlen alle flüchtigen Verbindungen), zum anderen durch die einmalige Exposition der Zellen im Gegensatz zur chronischen Langzeitexposition beim menschlichen Rauchen.

Es wurden einige Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens gefunden (siehe Tab. 4.12). Unter diesen befanden sich hauptsächlich GC>AT Transitionen. G>A Transitionen sind v.a. für endogene Mutationen typisch. Dies würde dem oben erwähnten Befund widersprechen, wonach in Lungenkrebszellen vorwiegend G>T Transversionen gefunden wurden.

Auch im *K-ras*-Gen konnten einige Mutationen im Codon 12 festgestellt werden. Dabei handelte es sich ausschließlich um G>A Transitionen (siehe 4.4.2.3).

5.3 Durch Chemikalien induzierte DNA-Läsionen

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer Chemikalienbehandlung von Zellen hinsichtlich cytotoxischer und genotoxischer Effekte, veränderter DNA-Adduktkonzentrationen (in dieser Arbeit anhand der 8OHdG-Bestimmung nach CSC-, BPDE- und BaP-Behandlung) sowie induzierter Mutationen zu untersuchen.

Für eine optimale Exposition mit den verschiedenen Mutagenen war die Dosisfindung von entscheidender Bedeutung. So sollte sich bei der optimalen Konzentration des jeweiligen Cancerogens eine möglichst geringe Cytotoxizität und möglichst hohe Genotoxizität zeigen. Die optimale Konzentration sollte zu einem maximalen Effekt im Comet-Test bei einer noch tolerierbaren Wachstumshemmung führen. Oftmals stellte die Löslichkeit des Mutagens (dies gilt für BaP und PhIP) den limitierenden Faktor dar. Ausgegangen wurde jeweils von den in der Literatur für Expositionsversuche verwendeten Konzentrationen.

Bei den cytotoxischen Effekten zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen den direkten und den indirekten Mutagenen. So zeigte sich bei den direkten Mutagenen eine Überlebensrate von unter 50 % bei einer Konzentration von ca. 0,5 µM, während bei den indirekten Mutagenen bei einer 100 bis 1000fachen Konzentration immer noch ein Überleben von über 60 % erkennbar war. Dies lässt darauf schließen, dass die indirekten Mutagene nur sehr langsam zu cytotoxischen Metaboliten umgesetzt werden.

Bei den genotoxischen Effekten konnte bei der für die Mutationsanalyse eingesetzten Konzentration an MNNG keine Schädigung im Comet-Test ermittelt werden. Bei BPDE war im Vergleich zum BaP eine doppelt so starke Schädigung im Comet-Test bei 200fach niedrigerer Konzentration zu beobachten. Dies unterstützt die Annahme, dass BaP zu langsam und nicht vollständig umgesetzt wurde und/oder dass die Schäden während der Exposition zum Teil repariert wurden. Bei einem Vergleich der indirekten Mutagene untereinander fällt auf, dass BaP zu den meisten Schäden im Comet-Test führte. NNK

wirkte trotz 10facher Konzentration im Vergleich zu BaP nur schwach genotoxisch. Dies ist durch die Entstehung anderer Addukte und anderer Reparaturmechanismen zu erklären. CSC erwies sich als stark genotoxisch, was, wie die 8OHdG-Adduktkonzentrationsbefunde zeigen, auch auf die Entstehung freier Radikale zurückgeführt werden kann.

5.3.1 Häufigkeit der Translokation t(14;18)

In den B-Zellen stellt die Translokation t(14;18) einen falschen V(D)J-Rekombinationsprozess zwischen den Immunglobulin-Schwerkettengenen und dem *bcl-2*-Locus dar. Die Translokation t(14;18) ist die häufigste Translokation in Lymphomen. Im follikulären B-Zell-Lymphom, einer Art des Non-Hodgkin-Lymphoms, ist sie zu 80 % vertreten. Das BCL-2 spielt eine wichtige Rolle bei der Apoptose und der Kontrolle des Zellzyklus.

Die Häufigkeit der Translokation in Blut von Neugeborenen und Erwachsenen betrug bei Neugeborenen weniger als $0,05 \times 10^{-7}$, bei Erwachsenen durchschnittlich 133×10^{-7} [158]. Liu und Mitarbeiter stellten eine signifikante Erhöhung der Translokationshäufigkeit mit dem Alter fest [36]. Außerdem wurde eine erhöhte Konzentration an t(14;18)-Translokationen bei Rauchern festgestellt [37] sowie ein 3,8fach erhöhtes Risiko bei Rauchern an Non-Hodgkin-Lymphomen zu erkranken. Die Translokation t(14;18) wird daher als möglicher Biomarker für genotoxische Effekte und vielleicht zur Abschätzung des Risiko für die Lymphomenstehung gesehen [2].

Bei gesunden Probanden wird die Translokation t(14;18) mit einer Häufigkeit von $<0,8-96 \times 10^{-7}$ gefunden [7].

Für die Anreicherung der Translokation t(14;18) wurde in dieser Arbeit eine semi-nested PCR-Methode entwickelt, deren Sensitivität im Bereich der bei Menschen natürlich auftretenden (spontanen) Anzahl an Translokationen liegt [7].

Die Nachweisgrenze, die in dieser Arbeit erreicht werden konnte, lag mit einem Auftreten der Translokationshäufigkeit von $0,6 \times 10^{-7}$ in einem Bereich, in dem durch die Anwendung von 30 Parallelansätzen mit je $2 \mu\text{g}$ DNA in unbehandelten und CSC-behandelten Kulturen keine Translokationen und bei allen anderen Behandlungen eine leichte Erhöhung der Translokationshäufigkeit festgestellt wurde.

5.3.2 Basenaustausch-Mutationen am *p53* Codon 248

Mutationen im Gen *p53* werden in über der Hälfte aller menschlichen Tumore gefunden. Dabei sind die Mutationen nicht zufällig verteilt, sondern es handelt sich dabei um Missense-Mutationen in der DNA-Bindungsdomäne des Gens (Exon 5-8), wobei sich der Großteil der Mutationen wiederum auf wenige „Hotspot“-Codons beschränkt. Die Verteilung der Mutationen wird dabei von der Proteinstruktur und -funktion bestimmt. Von Mutationen im Codon 248 (CGG) wird in 114 von 1178 Tumoren mit *p53*-Mutationen berichtet. Sie kommen vor allem beim Darmkrebs vor, wo ein Viertel aller Mutationen in diesem Codon liegen [26,50,104]. Die Mutationen im Codon 248 bei menschlichen Krebsarten bestehen ausschließlich aus Mutationen an den CpG Dinukleotiden, wobei GC>AT und CG>TA Transitionen mit gleicher Häufigkeit beobachtet werden [104]. Die Desaminierung von 5-Methyl-Cytosin (oder Cytosin) zu Thymidin (oder Uracil) an CpG-Dinukleotiden (Cytosin gefolgt von Guanin in der Sequenz) [159,160] sowie die aliphatische Alkylierung des Guanins an der O⁶-Position werden als die Ursachen für die Transitionen angesehen [161]. Eine weitere Ursache für Basenaustausche kann eine fehlerhafte Reparatur sein. So sind z.B. 91 % der GC>TA Transversionen bei Lungenkrebs am nicht-transkribierten DNA-Strang zu finden, an dem die Reparatur sehr viel langsamer als am transkribierten Strang vollzogen wird [50].

In T-Lymphozyten von gesunden Personen werden am häufigsten G>A Transitionen als spontane Mutationen gefunden [104]. Durchschnittlich werden pro Basenpaar in der menschlichen Zelle zwischen 10⁻⁸ und 10⁻¹⁰ spontane Mutationen gefunden. Diese Zahl wächst nach Mutagenexposition um das 10-1000fache an [22]. In Fibroblasten wurde nach Mutagenbehandlung eine Mutationshäufigkeit von 4-12 x 10⁻⁷ gefunden [104,162]. Aus diesem Grund müssen Nachweismethoden für diese Mutationen eine Erfassungsgrenze von 10⁵ bis 10¹⁰ Kopien zulassen.

Die Nachweisgrenze, die in dieser Arbeit für die Bestimmung der Mutationen am Codon 248 des *p53*-Gens erreicht werden konnte, lag mit einer Mutantenkopie in 5,6 x 10⁵ Genomkopien in einem Bereich, in dem durch die Anwendung von 30 Parallelansätzen mit je 2 µg DNA in unbehandelten Zellen keine Mutationen festgestellt wurden. Die induzierten Mutations-häufigkeiten lagen beim drei bis 12fachen Wert der Bestimmungsgrenze.

5.3.3 Basenaustausch-Mutationen am K-ras Codon 12

Mutationen in *ras*-Genen sind eine der häufigsten genetischen Alterationen in menschlichen Krebsarten. Dabei sind die meisten *ras*-Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens aufzufinden. Zwischen 65-100 % der Carcinome in der Bauchspeicheldrüse beinhalten *K-ras*-Mutationen, wobei die Mutationen hauptsächlich im Codon 12 gefunden werden. Bei Darmcarcinomen sind es bis zu 50 %. In den Adenocarcinomen der Lunge sind 90 % *K-ras*-Mutationen, davon 80 % im Codon 12 [163,164]. In einer Studie über Adenocarcinome in der Lunge von Rauchern und Nichtrauchern wurden mehr *K-ras*-Mutationen bei Rauchern festgestellt. Die hierbei beobachteten Mutationen sind GGT nach TGT (58 %), GGT nach GTT (16%) und GGT nach GAT (19 %) [30]. Das bevorzugte Auftreten von G>T Transversionen wurde mit der Interaktion der DNA mit den Metaboliten der heterozyklischen aromatischen Amine begründet, während eine andere Studie zeigt, dass auch Pyridyloxobutylierung der DNA durch NNK zu G>T Transversionen führen kann [142]. Allerdings wurden in der zweiten Studie bei Lungentumoren in Mäusen mehr G>A Transitionen nach NNK-Behandlung gefunden, was wahrscheinlich auf eine O⁶-Methylierung zurückzuführen ist [142].

In Fibroblasten wurden nach Mutagenbehandlung zwischen fünf und 12×10^{-7} Mutationen gefunden [165].

Die Nachweisgrenze, die in dieser Arbeit für die Bestimmung der Mutationen am Codon 12 des *K-ras*-Gens erreicht werden konnte, lag mit einer Mutantenkopie in 1×10^7 Genomkopien in einem Bereich, in dem durch die Anwendung von 30 Parallelansätzen mit je 2 µg DNA in unbehandelten Zellen keine Mutationen festgestellt wurde. Die induzierten Mutationshäufigkeiten lagen beim drei bis 12fachen Wert der Bestimmungsgrenze.

Es konnten keine Mutationen im Codon 12 des *K-ras*-Gens nach Exposition mit PAH festgestellt werden.

6 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nachweismethoden für ein Auftreten von DNA-Schäden etabliert und ein Zusammenhang zwischen Chemikalienexpositionen und zu beobachtenden frühen und späten Effekten untersucht. Hierzu wurden DNA-Schäden auf verschiedenen Levels untersucht. Zum einen als Einzelstrangbrüche im Comet-Test, wodurch die Genotoxizität von Substanzen ermittelt werden kann. Des Weiteren wurde die DNA-Adduktkonzentration von 8OHdG als Marker für oxidativen Stress gemessen. Schließlich wurde die Mutationsrate in drei krebisrelevanten Genen als persistenter DNA-Schaden erfasst. Es wurden die cyto- und genotoxischen Effekte einiger umweltrelevanter Mutagene aus verschiedenen Stoffklassen untersucht: Als Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe Benzo[a]pyren (BaP) und dessen ultimales Cancerogen Benzo[a]pyren-Diolepoxid (BPDE), als heterozyklisches aromatisches Amin 2-Amino-1-Methyl-6-Phenylimidazo[4,5-b]pyridin (PhIP), als N-Nitrosoverbindungen N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) und 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) und ein komplexes Gemisch, Zigarettenrauchkondensat.

Als *in vitro*-Untersuchungssystem diente eine gentechnisch veränderte menschliche lymphoblastoide Zelllinie.

Die verwendete Zelllinie MCL-5 stellte sich für diese Untersuchungen als geeignet heraus, da sie sich als stabil erwies und in der Lage war, Procancerogene metabolisch zu aktivieren. Es konnten keine spontan auftretenden Mutationen in dieser Zelllinie nachgewiesen werden. Ein weiterer, wichtiger Vorteil ist, dass es sich bei der MCL-5-Zelllinie um menschliche lymphoblastoide Zellen handelt, wodurch Vergleiche mit menschlichen Mutationsspektren direkt möglich sind.

Die Untersuchung der Cytotoxizität anhand von Wachstumskurven erwies sich als ausreichend, um cytotoxische Effekte nach Behandlung mit Mutagenen beobachten zu können.

Der in dieser Arbeit etablierte Comet-Test erwies sich als ausreichend sensitiv und reproduzierbar, um Dosiswirkungskurven für genotoxische Schäden der einzelnen Mutagene aufstellen zu können. Bei den in dieser Arbeit durchgeführten Expositionen konnte bei den für die Mutationsanalyse verwendeten Mutagendosen eine Erhöhung des Tailmoments (als Maß für die DNA-Schädigung) bei allen angewendeten Mutagenen bis auf MNNG (erwies sich als zu stark cytotoxisch) ermittelt werden.

Die Messung der 8OHdG-Adduktkonzentration mit einer LC-MS/MS-Methode erwies sich als sehr sensitiv, sodass schon geringe Erhöhungen der Adduktrate nach Mutagenexpositionen erfasst werden konnten. Tabakrauch (in Form von CSC) erwies sich als Agens, das einen besonders starken oxidativen Stress ausübt.

Der Schwerpunkt der Arbeit lag in der Etablierung von Anreicherungsverfahren für Mutationen in einigen krebsrelevanten Genen:

Für die Anreicherung der Translokation t(14,18) wurde eine semi-nested PCR-Methode entwickelt, deren Sensitivität im Bereich der bei Menschen natürlich (spontan) auftretenden Anzahl an Translokationen liegt. Ein Biomonitoring ist demnach mit dieser Methode möglich. Bei der Exposition mit allen hier verwendeten Mutagenen bis auf CSC konnte eine Erhöhung der Häufigkeit von Translokationen ermittelt werden.

Weiterhin wurden Methoden für die Anreicherung von Punktmutationen in dem Codon 12 des *K-ras*-Gens und dem Codon 248 des *p53*-Gens erstellt. Diese Methoden beruhen auf dem Prinzip der RFLP-PCR-Anreicherung. Mit Hilfe dieser Vorgehensweise konnten Punktmutationen in den angegebenen Genen mit einer Empfindlichkeit von einer Mutantenkopie in zehn Millionen Wildtypkopien erreicht werden. Dadurch war die Untersuchung von durch Chemikalien induzierten Mutationen in diesen Genen möglich. Der Nachteil dieser Vorgehensweise liegt in dem hohen zeitlichen Aufwand, den diese Methoden erfordern.

Die Exposition mit dem polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff BaP und seinem ultimalen Cancerogen BPDE führte zu einer erhöhten t(14;18)-Translokationshäufigkeit sowie zur Induktion von Mutationen im Codon 248 des *p53*-Gens. Keine Mutationen konnten nach PAH-Exposition im Codon 12 des *K-ras*-Gens induziert werden. Die durch BPDE erhaltenen Effekte lagen bei allen untersuchten Parametern um das Doppelte höher als bei BaP, obwohl eine 600fach höhere Konzentration an BaP verwendet wurde.

Nach Exposition der MCL-5-Zellen mit dem heterozyklischen aromatischen Amin PhIP konnte in allen drei untersuchten Genen eine Erhöhung der Mutationshäufigkeit festgestellt werden.

Als Vertreter der Klasse der N-Nitrosoverbindungen wurden MNNG und NNK eingesetzt. MNNG zeigte eine sehr starke Cytotoxizität. Die für die Mutationsanalyse angewandte Konzentration an MNNG führte zu keiner Schädigung im Comet-Test. Trotzdem konnte eine Induktion von Mutationen in den drei untersuchten Genen beobachtet werden. NNK dagegen zeigte im Vergleich zu den anderen indirekten Mutagenen nur eine geringe cytotoxische und genotoxische Wirkung, dagegen eine gleich große induzierte Wirkung.

Eine Exposition mit Tabakrauch sowohl in Form von Zigarettenrauchkondensat wie auch in Form des verdünnten Nebenstromrauches (ADS) führte zu starken cytotoxischen und genotoxischen Effekten. Des weiteren konnte eine starke Erhöhung der 8OHdG-Adduktkonzentration nach Exposition mit CSC beobachtet werden. Trotz der starken genotoxischen Wirkung wurden nach CSC-Exposition relativ wenig Mutationen induziert.

Anhand dieser Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die hier etablierten Methoden für die Untersuchung der Genotoxizität, der 8OHdG-Adduktrate und der Induktion von Mutationen empfindlich genug sind, um durch Chemikalien *in vitro* induzierte Effekte zu erfassen. Die Erfassung dieser Effekte beim Menschen mit diesen Methoden erscheint auf Grund der erreichten Empfindlichkeiten möglich.

7 Literatur

- [1] Rajewsky MF. Ein Prozeß in vielen Schritten. *Essener Unikate* 1992;1:7-21.
- [2] Cortopassi G, Liu Y. Genotypic selection of mitochondrial and oncogenic mutations in human tissue suggests mechanisms of age-related pathophysiology. *Mutat Res* 1995;338:151-9.
- [3] Bartsch H. Studies on biomarkers in cancer etiology and prevention: a summary and challenge of 20 years of interdisciplinary research. *Mutat Res* 2000;462:255-79.
- [4] Crespi CL, Langenbach R, Penman BW. Human cell lines, derived from AHH-1 TK+/- human lymphoblasts, genetically engineered for expression of cytochromes P450. *Toxicology* 1993;82:89-104.
- [5] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
- [6] Yarkoni S, Lishner M, Tangi I, Nagler A, Lorberboum-Galski H. B-cell non-Hodgkin's lymphoma: Evidence for the t(14;18) translocation in all hematopoietic cell lineages. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:973-9.
- [7] Fuscoe JC, Setzer RW, Collar DD, Moore MM. Quantification of t(14;18) in the lymphocytes of healthy adult humans as a possible biomarker for environmental exposures to carcinogens. *Carcinogenesis* 1996;17:1013-20.
- [8] Zhang X-Y, Ehrlich M. Detection and quantitation of low numbers of chromosomes containing bcl-2 oncogene translocations using semi-nested PCR. *BioTechniques* 1994;16:502-7.
- [9] Parsons BL, Heflich RH. Genotypic selection methods for the direct analysis of point mutations. *Mutat Res* 1997;387:97-121.

-
- [10] Pourzand C, Cerutti P. Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR. *Mutat Res* 1993;288:113-21.
- [11] McKelvey-Martin VJ, Green MHL, Schmezer P, Pool-Zobel BL, De M, o MP, Collins A. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. *Mutat Res* 1993;288:47-63.
- [12] Kassie F, Parzefall W, Knasmüller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat Res* 2000;463:13-31.
- [13] Fahrig R. *Mutationsforschung und genetische Toxikologie*. Darmstadt: Wissenschaftliche Buchgesellschaft, 1992.
- [14] Greim H, Deml E. *Toxikologie*. Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo: VCH Verlagsgesellschaft mbH, 1996.
- [15] Friend SH. Genetic models for studying cancer susceptibility. *Science* 1993;259:774-5.
- [16] Willett WC. Diet and health: What should we eat? *Science* 1994;264:532-7.
- [17] Frei B, Ames BN. Antioxidant and free radical scavenging functions. Ascorbic acid protects plasma lipids against oxidative damage. *Nutr Cancer* 1991;15:250-1.
- [18] Shields PG, Harris CC. Molecular epidemiology and the genetics of environmental cancer. *JAMA* 1991;266:681-7.
- [19] Harris CC. Chemical and physical carcinogenesis: Advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* 1991;51:5023-44.
- [20] Bishop JM. The molecular genetics of cancer. *Science* 1987;235:305-11.
- [21] Marshall E. Toxicology goes molecular. *Science* 1993;259:1394-8.

-
- [22] Hussain SP, Harris CC. p53 Mutation spectrum and load: the generation of hypotheses linking the exposure and endogenous of exogenous carcinogens to human cancer. *Mutat Res* 1999;428:23-32.
- [23] Albrechtsen N, Janus F. p53 - Neue Einsichten in die Funktion: "Wächter des Genoms". *Das Fachmagazin für Biotechnologie* 1996;5:17-8.
- [24] Harris CC. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: Clues for rational cancer therapeutic strategies. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1442-55.
- [25] Shimamura A, Fisher DE. p53 in life and death. *Clinical Cancer Research* 1996;2:435-40.
- [26] Hollstein M, Hergenhahn M, Yang Q, Bartsch H, Wang ZQ, Hainaut P. New approaches to understanding p53 gene tumor mutation spectra. *Mutat Res* 1999;431:199-209.
- [27] Wiesmüller L. Genetische Stabilität durch p53. *Bioforum* 1999;22:530-533.
- [28] Bos JL. ras Oncogenes in human cancer: A Review. *Cancer Res* 1989;49:4682-9.
- [29] Bos JL. The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res* 1988;195:255-71.
- [30] Rodenhuis S, Slebos RJC. Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 1992;52:2665s-9s.
- [31] Gilbert SF. *Developmental Biology*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., 1994.
- [32] Vogelstein B, Fearon ER. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.

-
- [33] Minamoto T, Mai M, Ronai Z. K-ras mutation: Early detection in molecular diagnosis and risk assessment of colorecta, pancreas, and lung cancers - a review. *Cancer Detect Prev* 2000;24:1-12.
- [34] Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, Ronai Z. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant K-ras genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene* 1991;6:1079-83.
- [35] Chin L, Tam A, Pomerantz J, Wong M, Holash J, Bardeesy N, Shen Q, O'Hagan R, Pantginis J, Zhou H, Horner JW, Cordon-Cardo C, Yancopoulos GD, DePinho R. Essential role for oncogenic ras in tumour maintenance. *Nature* 1999;400:468-72.
- [36] Liu Y, Hernandez AM, Shibata D, Cortopassi GA. BCL2 translocation frequency rises with age in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:8910-4.
- [37] Bell DA, Liu Y, Cortopassi GA. Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:223-4.
- [38] Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, as a marker of cellular oxidative stress during carcinogenesis. *Mutat Res* 1997;387:147-63.
- [39] Jiang W, Feng Y, Hein DW. Higher DNA adduct levels in urinary bladder and prostate of slow acetylator inbred rats administered 3,2'-dimethyl-4-aminobiphenyl. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999;156:187-94.
- [40] Cadet J, Delatour T, Douki T, Gasparutto D, Pouget J-P, Ravanat J-L, Sauvaigo S. Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutat Res* 1999;424:9-21.

-
- [41] Cheng KC, Cahill DS, Kasai H, Nishimura S, Loeb LA. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G → T and A → C substitutions. *J Biol Chem* 1991;267:166-72.
- [42] Clayson DB, Mehta R, Iverson F. Oxidative DNA damage - The effects of certain genotoxic and operationally non-genotoxic carcinogens. *Mutat Res* 1994;317:25-42.
- [43] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature* 1993;362:709-15.
- [44] Cadet J, Douki T, Ravanat J-L. Artifacts associated with the measurement of oxidized DNA bases. *Environ Health Perspect* 1997;105:1034-9.
- [45] Ahmed FE. The role of oxidative stress in environmental carcinogenesis. *Environ Carcino & Ecotox Revs* 1999;C17:111-42.
- [46] MacGregor TJ, Wehr CM, Hiatt RA, Peters B, Tucker JD, Langlois RG, Jacob RA, Jensen RH, Yager JW, Shigenaga MK, Frei B, Eynon BP, Ames BN. 'Spontaneous' genetic damage in man: evaluation of interindividual variability, relationship among markers of damage, and influence of nutritional status. *Mutat Res* 1997;377:125-35.
- [47] Lutz WK. DNA-Addukte als Genotoxizitätsmarker für ein biologisches Monitoring. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 2000;35:303-11.
- [48] Renner T, Fechner T, Scherer G. Fast quantification of the urinary marker of oxidative stress 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with triple-stage quadrupole mass detection. *J Chromatogr B* 2000;738:311-7.
- [49] Harris G, Bahir S, Winyard PG. 7,8-Dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine present in DNA is not simply an artefact of isolation. *Carcinogenesis* 1994;15:411-3.

-
- [50] Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
- [51] Mills NE, Fishman CL, Scholes J, Anderson SE, Rom WN, Jacobson DR. Detection of K-ras oncogene mutations in bronchoalveolar lavage fluid for lung cancer diagnosis. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1056-60.
- [52] Crebelli R. Threshold-mediated mechanisms in mutagenesis: implications in the classification and regulation of chemical mutagens. *Mutat Res* 2000;464:129-35.
- [53] Marquardt H, Schäfer SG. *Lehrbuch der Toxikologie*. Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich: Wissenschaftsverlag, 1994.
- [54] Pelkonen O, Nebert DW. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: Etiologic role in carcinogenesis. *Pharmacol Rev* 1982;34:189-222.
- [55] Guengerich FP. Oxidation of toxic and carcinogenic chemicals by human cytochrome P-450 enzymes. *Chem Res Toxicol* 1991;4:391-407.
- [56] Autrup H. Genetic polymorphisms in human xenobiotica metabolizing enzymes as susceptibility factors in toxic response. *Mutat Res* 2000;464:65-76.
- [57] Harris CC. Interindividual variation among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis* 1989;10:1563-6.
- [58] Dipple A. Reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons with DNA. In: Hemminki K, Dipple A, Shuker DEG, Kadlubar FF, Segerböck D, Bartsch H, eds. *DNA-Adducts: Identification and Biological Significance*. v. 125. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1994:107-29.
- [59] Sugimura T. Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. *Cancer* 1982;49:1970-83.

-
- [60] Rojas M, Cascorbi I, Alexandrov K, Kriek E, Auburtin G, Mayer L, Kopp-Schneider A, Roots I, Bartsch H. Modulation of benzo[a]pyrene diolepoxide-DNA adduct levels in human white blood cells by CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphism. *Carcinogenesis* 2000;21:35-41.
- [61] Ross JA, Nesnow S. Polycyclic aromatic hydrocarbons: correlations between DNA adducts and ras oncogene mutations. *Mutat Res* 1999;424:155-66.
- [62] Harvey RG, Geacintov NE. Intercalation and binding of carcinogenic hydrocarbon metabolites to nucleic acids. American Chemical Society 1988;21:66-73.
- [63] Denissenko MF, Venkatachalam S, Ma Y-H, Wani AA. Site-specific induction and repair of benzo[a]pyrene diol epoxide DNA damage in human H-ras protooncogene as revealed by restriction cleavage inhibition. *Mutat Res* 1996;363:27-42.
- [64] Wani MA, Zhu Q, El-Mahdy M, Venkatachalam S, Wani AA. Enhanced sensitivity to anti-benzo(a)pyrene-diol-epoxide DNA damage correlates with decreased global genomic repair attributable to abrogated p53 function in human cells. *Cancer Res* 2000;60:2273-80.
- [65] Skog KI, Johansson MAE, Jägerstad MI. Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: A review on formation, occurrence and intake. *Fd Chem Toxicol* 1998;36:879-96.
- [66] Sabbioni G, Richter E. Aromatic amines, nitroarenes, and heterocyclic aromatic amines. In: Marquardt H, Schäfer SG, McClellan R, Welsch F, eds. *Toxicology*. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, 1999:729-41.
- [67] Schut HAJ, Snyderwine EG. DNA adducts of heterocyclic amine food mutagens: implications for mutagenesis and carcinogenesis. *Carcinogenesis* 1999;20:353-68.

-
- [68] Turesky RJ, Lang NP, Butler MA, Teitel CH, Kadlubar FF. Metabolic activation of carcinogenic heterocyclic aromatic amines by human liver and colon. *Carcinogenesis* 1991;12:1839-45.
- [69] Robbana-Barnat S, Rabache M, Rialland E, Fradin J. Heterocyclic amines: Occurrence and prevention in cooked food. *Environ Health Perspect* 1996;104:280-8.
- [70] Wolf D. N-Nitrosamine am Arbeitsplatz. *Staub-Reinhalt Luft* 1989;49:183-6.
- [71] Staretz ME, Murphy SE, Patten CJ, Nunes MG, Koehl W, Amin S, Koenig LA, Guengerich FP, Hecht SS. Comparative metabolism of the tobacco-related carcinogens benzo[a]pyrene, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, 4-(methylnitrosamine)-1-(3pyridyl)-1-butanol, and N'-nitrosornicotine in human hepatic microsomes. *Drug Metab Dispos* 1997;25:154-62.
- [72] Smith TJ, Guo Z, Guengerich FP, Yang CS. Metabolism of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) by human cytochrome P450 1A2 and its inhibition by phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 1996;17:809-13.
- [73] Smith TJ, Stoner GD, Yang CS. Activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in human lung microsomes by cytochromes P450, lipoxygenase, and hydroperoxides. *Cancer Res* 1995;55:5566-73.
- [74] Peterson LA, Liu X-K, Hecht SS. Pyridyloxobutyl DNA adducts inhibit the repair of O6-methylguanine. *Cancer Res* 1993;53:2780-5.
- [75] Magee PN. Nitrosamines and human cancer: introduction and overview. *European Journal of Cancer Prevention* 1996;5:7-10.

-
- [76] Lukash LL, Boldt J, Pegg AE, Dolan ME, Maher VM, McCormick JJ. Effect of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase on the frequency and spectrum of mutations induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the HPRT gene of diploid human fibroblasts. *Mutat Res* 1991;250:397-409.
- [77] Phillips DH. DNA adducts in human tissues: Biomarkers of exposure to carcinogens in tobacco smoke. *Environ Health Perspect* 1996;104:453-8.
- [78] Löfroth G. Environmental tobacco smoke: Overview of chemical composition and genotoxic components. *Mutat Res* 1989;222:73-80.
- [79] Scherer G, Adlkofer F. Tabakrauch in der Raumluft - Erfassung der Schadstoffbelastung durch Passivrauchen zur Bewertung des gesundheitlichen Risikos. *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 1999;59:435-43.
- [80] Minowada J, Nonoyama M, Moore GE, Rauch AM, Pagano JS. The presence of the Epstein-Barr viral genome in human lymphoblastoid B-cell lines and its absence in a myeloma cell line. *Cancer Res* 1974;34:1898-903.
- [81] Freedman HJ, Parker NB, Marinello AJ, Gurtoo HL, Minowada J. Induction, inhibition, and biological properties of aryl hydrocarbon hydroxylase in a stable human B-lymphocyte cell line, RPMI-1788. *Cancer Res* 1979;39:4612-9.
- [82] Crespi CL, Gonzalez FJ, Steimel DT, Turner TR, Gelboin HV, Penman BW, Langenbach R. A metabolically competent human cell line expressing five cDNAs encoding procarcinogen-activating enzymes: Application to mutagenicity testing. *Chem Res Toxicol* 1991;4:566-72.
- [83] Ochiai A, Emura M, Mohr U, Tahara E, Dungworth DL. Induction and characterization of secretory differentiation in human fetal bronchial epithelial cell line (HFBE) cultured on collagen gel in growth hormone and vitamin A-supplemented medium. *Exp Pathol* 1991;41:157-68.

-
- [84] Collins AR, Dobson VL, Dusinsk M, Kennedy G, Stetina R. The comet assay: what can it really tell us? *Mutat Res* 1997;375:183-93.
- [85] Hallier E, Westphal G. UDS-Tests und COMET-Assay: Anwendung im Biomonitoring. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 2000;35:517-24.
- [86] Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res* 1995;339:37-59.
- [87] Olive PL, Johnston PJ, Banáth JP, Durand RE. The comet assay: A new method to examine heterogeneity associated with solid tumors. *Nature Medicine* 1998;4:103-5.
- [88] Martin FL, Cole KJ, Orme MH, Grover PL, Phillips DH, Venitt S. The DNA repair inhibitors hydroxyurea and cytosine arabinoside enhance the sensitivity of the alkaline single-cell gel electrophoresis ('comet') assay in metabolically-competent MCL-5 cells. *Mutat Res* 1999;445:21-43.
- [89] Walsh CT, Craig RW, Agarwal RP. Increased activation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine by hydroxyurea in L1210 cells. *Cancer Res* 1980;40:3286-92.
- [90] Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique: A detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. *Mutat Res* 1993;285:35-44.
- [91] Fenech M, Rinaldi J, Surralles J. The origin of micronuclei induced by cytosine arabinoside and its synergistic interaction with hydroxyurea in human lymphocytes. *Mutagenesis* 1994;9:273-7.
- [92] Frankfurt OS. Inhibition of DNA repair and the enhancement of cytotoxicity of alkylating agents. *Int J Cancer* 1991;48:916-23.

-
- [93] Halliwell B, Dizdaroglu M. The measurement of oxidative damage to DNA by HPLC and GC/MS techniques. *Free Radic Res Commun* 1992;16:75-87.
- [94] Floyd RA, Watson JJ, Wong PK, Altmiller DH, Rickard RC. Hydroxyl free radical adduct of deoxyguanosine: Sensitive detection and mechanisms of formation. *Free Radic Res Commun* 1986;1:163-72.
- [95] Shigenaga MK, Park J-W, Kenneth CC, Gimeno CJ, Ames BN. In vivo oxidative DNA damage: Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA and urine by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, Cap.54. In: *Oxygen radicals in biological systems. Part B. Oxygen radicals and antioxidants.* (Eds: Packer L, Glazer AN) (Methods in enzymology. Vol. 186). Academic Press, Inc., New York, 1990:521-30.
- [96] Garipey K, Acworth I, Bailey B, Greaney M. A practical method for the analysis of adducts from the oxidation and alkylation of 2'deoxyguanosine. Presented at the 43rd Pittsburgh Conference and Exposition, New Orleans, March 1992.
- [97] Cadet J, Weinfeld M. Detecting DNA damage. *Anal Chem* 1993;65:675A-82A.
- [98] Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* 1987;155:335-50.
- [99] Jacobson DR, Mills NE. A highly sensitive assay for mutant ras genes and its application to the study of presentation and relapse genotypes in acute leukemia. *Oncogene* 1994;9:553-63.
- [100] Behn M, Qun S, Pankow W, Havemann K, Schuermann M. Frequent detection of ras and p53 mutations in brush cytology samples from lung cancer patients by a restriction fragment length polymorphism-based "enriched PCR" technique. *Clinical Cancer Research* 1998;4:361-71.

-
- [101] Jacobs G, Tscholl E, Sek A, Pfreundschuh M, Daus H, Trümper L. Enrichment polymerase chain reaction for the detection of Ki-ras mutations: relevance of Taq polymerase error rate, initial DNA copy number, and reaction conditions on the emergence of false-positive mutant bands. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:395-401.
- [102] Ji W, Qu G-z, Ye P, Zhang X-Y, Halabi S, Ehrlich M. Frequent detection of bcl-2/HH translocations in human blood and organ samples by a quantitative polymerase chain reaction assay. *Cancer Res* 1995;55:2876-82.
- [103] Karsten U, Wollenberger A. Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorimetric estimation of DNA and RNA in cell and tissue homogenates. *Anal Biochem* 1977;77:464-70.
- [104] Hussain SP, Aguilar F, Cerutti P. Mutagenesis of codon 248 of the human p53 tumor suppressor gene by N-ethyl-N-nitrosourea. *Oncogene* 1994;9:13-8.
- [105] Liu J, Johnson RM, Traweck ST. Rearrangement of the bcl-2 gene in follicular lymphoma. Detection by PCR in both fresh and fixed tissue samples. *Diagn Mol Pathol* 1993;2:241-7.
- [106] Morris SM, Domon OE, McGarrity LJ, Chen JJ, Manjanatha MG, Andrews AM, Aidoo A, Casciano DA. A role for apoptosis in the toxicity and mutagenicity of bleomycin in AHH-1 tk^{+/-} human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 1996;357:143-65.
- [107] Morris SM, Chen JJ, Domon OE, McGarrity LJ, Bishop ME, Manjanatha MG, Casciano DA. p53, mutations, and apoptosis in genistein-exposed human lymphoblastoid cells. *Mutat Res* 1998;405:41-56.
- [108] Guest RD, Parry JM. P53 integrity in the genetically engineered mammalian cell lines AHH-1 and MCL-5. *Mutat Res* 1999;423:39-46.

-
- [109] Dobo KL, Giver CR, Eastmond DA, Rumbos HS, Grosovsky AJ. Extensive loss of heterozygosity accounts for differential mutation rate on chromosome 17q in human lymphoblasts. *Mutagenesis* 1995;10:53-8.
- [110] Crofton-Sleigh C, Doherty A, Ellard S, Parry EM, Venitt S. Micronucleus assays using cytochalasin-blocked MCL-5 cells, a proprietary human cell line expressing five human cytochromes P-450 and microsomal epoxide hydrolase. *Mutagenesis* 1993;8:363-72.
- [111] Doherty AT, Ellard S, Parry EM, Parry JM. An investigation into the activation and deactivation of chlorinated hydrocarbons to genotoxins in metabolically competent human cells. *Mutagenesis* 1996;11:247-74.
- [112] Einspanier R, Klotz A, Meyer HHD. Koppelung von Polymerase-Kettenreaktion, Ligase-Kettenreaktion und Enzym-Immuno-assay: Ein sensitives Screening-Verfahren. *GIT Fachz Lab* 1999;1:27-30.
- [113] Kersten B, Zhang J, Brendler-Schwaab SY, Kasper P, Müller L. The application of the micronucleus test in Chinese hamster V79 cells to detect drug-induced photogenotoxicity. *Mutat Res* 1999;445:55-71.
- [114] Doehmer J, Buters JTM, Luch A, Soballa V, Baird WM, Morisson H, Stegeman JJ, Townsend AJ, Greenlee WF, Glatt HR, Seidel A, Jacob J, Greim H. Molecular studies on the toxifying effects by genetically engineered cytochromes P450. *Drug Metab Rev* 1999;31:423-35.
- [115] Bartsch H, Malaveille C, Camus AM, Martel-Planche G, Brun G, Hautefeuille A, Sabadi N, Barbin A, Kukoki T, Devron G, Piccoli C, Montesano R. Validation and comparative studies on 180 chemicals with *S. typhimurium* strains and V79 chinese hamster cells in the presence of various metabolizing systems. *Mutat Res* 1980;76:1-50.

-
- [116] Møller P, Knudsen LE, Loft S, Wallin H. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev* 2000;9:1005-15.
- [117] Thomas S, Lowe J, Knowles RG, Green IC, Green MHL. Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. *Mutat Res* 1998;402:77-84.
- [118] Bruner SD, Norman DPG, Verdine GL. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA. *Nature* 2000;403:859-66.
- [119] Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G. A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res* 1997;390:179-88.
- [120] Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000;21:361-70.
- [121] Kneba M, Eick S, Herbst H, Willigeroth S, Pott C, Bolz I, Bergholz M, Neumann C, Stein H, Krieger G. Frequency and structure of t(14;18) major breakpoint regions in non-Hodgkin's lymphomas typed according to the Kiel classification: Analysis by Direct DNA Sequencing. *Cancer Res* 1991;51:3243-50.
- [122] Mills NE, Fishman CL, Rom WN, Dubin N, Jacobson DR. Increased prevalence of K-ras oncogene mutations in lung adenocarcinoma. *Cancer Res* 1995;55:1444-7.
- [123] Dipple A. DNA adducts of chemical carcinogens. *Carcinogenesis* 1995;16:437-41.

-
- [124] Denissenko MF, Pao A, Tang M-S, Pfeifer GP. Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* 1996;274:430-2.
- [125] Denissenko MF, Pao A, Pfeifer GP, Tang M-S. Slow repair of bulky DNA adducts along the nontranscribed strand of the human p53 gene may explain the strand bias of transversion mutations in cancers. *Oncogene* 1998;16:1241-7.
- [126] Denissenko MF, Chen JX, Tang M-S, Pfeifer GP. Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3893-8.
- [127] Kozack RE, Shukla R, Loechler EL. A hypothesis for what conformation of the major adduct of (+)-anti-B[a]PDE (N2-dG) causes G-T versus G-A mutations based upon a correlation between mutagenesis and molecular modeling results. *Carcinogenesis* 1999;20:95-102.
- [128] Garganta F, Krause G, Scherer G. Base-substitution profiles of externally activated polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic amines determined in a lacZ reversion assay. *Environ Mol Mutagen* 1999;33:75-85.
- [129] Moriya M, Spiegel S, Fernandes A, Amin S, Liu T, Geacintov N, Grollman AP. Fidelity of translesional synthesis past benzo[a]pyrene diol epoxide-2'-deoxyguanosine DNA adducts: Marked effects of host cell, sequence context, and chirality. *Biochemistry* 1996;35:16646-51.
- [130] Ruggeri B, DiRado M, Zhang SY, Bauer B, Goodrow T, Klein-Szanto AJP. Benzo[a]pyrene-induced murine skin tumors exhibit frequent and characteristic G to T mutations in the p53 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:1013-7.
- [131] Krause G, Garganta F, Vrieling H, Scherer G. Spontaneous and chemically induced point mutations in hprt cDNA of the metabolically competent human lymphoblastoid cell line MCL-5. *Mutat Res* 1999;431:417-28.

-
- [132] Morgenthaler P-ML, Holzhäuser D. Analysis of mutations induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in human lymphoblastoid cells. *Carcinogenesis* 1995;16:713-8.
- [133] Glaab WE, Skopek TR. Cytotoxic and mutagenic response of mismatch repair-defective human cancer cells exposed to a food-associated heterocyclic amine. *Carcinogenesis* 1999;20:391-4.
- [134] Yadollahi-Farsani M, Gooderham NJ, Davies DS, Boobis AR. Mutational spectra of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) at the Chinese hamster hprt locus. *Carcinogenesis* 1996;17:617-24.
- [135] Gooderham NJ, Murray S, Lynch AM, Edwards RJ, Yadollahi-Farsani M, Bratt C, Rich KJ, Zhao K, Murray BP, Bhadresa S, Crosbie SJ, Boobis AR, Davies DS. Heterocyclic amines: evaluation of their role in diet associated human cancer. *Br J of Clinical Pharmacology* 1996;42:91-8.
- [136] Blanco M, Herrera G, Urios A. Increased mutability by oxidative stress in OxyR-deficient *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* cells: clonal occurrence of the mutants during growth on nonselective media. *Mutat Res* 1995;346:215-20.
- [137] Hokaiwado N, Asamoto M, Cho Y, Imaida K, Shirai T. Frequent c-Ha-ras gene mutations in rat mammary carcinomas induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo. *Cancer Lett* 2001;163:187-90.
- [138] Bignami M, O'Driscoll M, Aquilina G, Karran P. Unmasking a killer: DNA O6-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. *Mutat Res* 2000;462:71-82.
- [139] Hecht SS, Chen CB, Orna RM, Hoffmann D. Chemical studies on tobacco smoke LVI. Tobacco specific nitrosamines: Origins, carcinogenicity and

- metabolism. In: Walker EA, Castegnaro M, Gričič L, Lyle RE, eds. Environmental Aspects of N-Nitroso Compounds. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1977:395-413.
- [140] Hecht SS. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:1194-210.
- [141] Gray N, Boyle P, Zatonski W. Tar concentrations in cigarettes and carcinogen content. *Lancet* 1998;352:787-8.
- [142] Ronai ZA, Gradia S, Peterson LA, Hecht SS. G to A transitions and G to T transversions in codon 12 of the K_i-ras oncogene isolated from mouse lung tumors induced by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and related DNA methylating and pyridyloxobutylating agents. *Carcinogenesis* 1993;14:2419-22.
- [143] Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK, Harr,us UA. Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the Comet assay. *Mutat Res* 2000;467:21-30.
- [144] Crespi CL, Penman BW, Gelboin HV, Gonzalez FJ. A tobacco smoke-derived nitrosamine, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone, is activated by multiple human cytochrome P450s including the polymorphic human cytochrome P4502D6. *Carcinogenesis* 1991;12:1197-201.
- [145] Maher VM, Domoradzki J, Bhattacharyya NP, Tsujimura T, Corner RC, McCormick JJ. Alkylation damage, DNA repair and mutagenesis in human cells. *Mutat Res* 1990;233:235-45.
- [146] Cariello NF, Craft TR, Vrieling H, Van Zeeland AA, Adams T, Skopek TR. Human HPRT mutant database: Software for data entry and retrieval. *Environ Mol Mutagen* 1992;20:81-3.

-
- [147] Cariello NF, Keohavong P, Kat AG, Thilly WG. Molecular analysis of complex human cell populations: mutational spectra of MNNG and ICR-191. *Mutat Res* 1990;231:165-76.
- [148] Oreffo VIC, Lin H-W, Padmanabhan R, Witschi H. K-ras and p53 point mutations in 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced hamster lung tumors. *Carcinogenesis* 1993;14:451-5.
- [149] Tiano HF, Wang R-L, Hosokawa M, Crespi C, Tindall KR, Langenbach R. Human CYP2A6 activation of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK): mutational specificity in the gpt gene of AS52 cells. *Carcinogenesis* 1994;15:2859-66.
- [150] Kawano R, Takeshima Y, Inai K. Effects of K-ras gene mutations in the development of lung lesions induced by 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone in A/J mice. *Jpn J Cancer Res* 1996;87:44-50.
- [151] Matzinger SA, Crist KA, Stoner GD, Anderson MW, Pereira MA, Steele VE, Kelloff GJ, Lubet RA, You M. K-ras mutations in lung tumors from A/J and A/JXTSG-p53 F1 mice treated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone and phenethyl isothiocyanate. *Carcinogenesis* 1995;16:2487-92.
- [152] International Agency for Research on Cancer. Tobacco Smoking. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. v. 38. Lyon: IARC, 1986.
- [153] Hoffmann D, Hoffmann I. Letters to the Editor: Tobacco smoke components. *Beitr Tabakforsch Int* 1998;18:49-52.
- [154] Müller T, Haussmann H-J, Schepers G. Evidence for peroxynitrite as an oxidation stress-inducing compound of aqueous cigarette smoke fractions. *Carcinogenesis* 1997;18:295-301.

-
- [155] Yoshie Y, Ohshima H. Synergistic induction of DNA strand breakage by cigarette tar and nitric oxide. *Carcinogenesis* 1997;18:1359-63.
- [156] Yang Q, Hergenbahn M, Weninger A, Bartsch H. Cigarette smoke induces direct DNA damage in the human B-lymphoid cell line Raji. *Carcinogenesis* 1999;20:1769-75.
- [157] Hollstein M, Moeckel G, Hergenbahn M, Spiegelhalter B, Keil M, Werle-Schneider G, Bartsch H, Brickmann J. On the origins of tumor mutations in cancer genes: insights from the p53 gene. *Mutat Res* 1998;405:145-54.
- [158] Scheerer JB, Xi L, Knapp GW, Setzer RW, Bigbee WL, Fuscoe JC. Quantification of illegitimate V(D)J recombinase-mediated mutations in lymphocytes of newborns and adults. *Mutat Res* 1999;431:291-303.
- [159] Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: Contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res* 1998;58:4023-37.
- [160] Rideout III WM, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA. 5-methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* 1990;249:1288-90.
- [161] Bronstein SM, Cochrane JE, Craft TR, Swenberg JA, Skopek TR. Toxicity, mutagenicity, and mutational spectra of N-ethyl-N-nitrosourea in human cell lines with different DNA repair phenotypes. *Cancer Res* 1991;52:5188-97.
- [162] Hussain SP, Aguilar F, Amstad P, Cerutti P. Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene* 1994;9:2277-81.
- [163] Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327:293-7.

-
- [164] Sugio K, Kishimoto Y, Virmani AK, Hung JY, Gazdar AF. K-ras mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 1994;54:5811-5.
- [165] Pourzand C, Cerutti P. Mutagenesis of H-ras codons 11 and 12 in human fibroblasts by N-ethyl-N-nitrosourea. *Carcinogenesis* 1993;14:2193-6.

Lebenslauf:

Persönliche Daten

Name: Lucie-Luisa Graziella Wolz
 Geburtsdatum: 07.05.1973
 Geburtsort: Bonn

Ausbildung

1979-1983 Grundschole St. Michael, Bonn
 1983-1992 Gymnasium der Heimschole Kloster Wald,
 Wald (Kreis Sigmaringen);
 Abschluss: Abitur
 1989-1992 abgeschlossene Schreinerlehre
 1993-1997 Studium der Lebensmittelchemie an der Technischen
 Universität Braunschweig
 1997 1. Staatsexamen in den mündlichen Prüfungsfächern
 Lebensmittelchemie, Lebensmittelrecht, Biologie
 und Mikrobiologie und in den praktischen Prüfungsfächern
 Lebensmittelanalytik, Toxikologie und Mikroskopie
 1997 Wissenschaftliche Abschlussarbeit bei der Firma Storck, Halle/
 Westfalen; Thema: Untersuchung über das Kristallisations-
 verhalten von pflanzlichen Fetten und Fettfüllungen mittels
 TRG, Micro DSC, NMR und HPLC
 1997-1998 Praktisches Jahr am Lebensmitteluntersuchungsamt
 Braunschweig und dem Bedarfsgegenständeuntersuchungsamt
 Lüneburg;
 1998 2. Staatsexamen: Untersuchung und rechtliche Beurteilung eines
 Lebensmittels, eines Bedarfsgegenstandes und einer
 Trinkwasserprobe

Promotion

Seit Februar 1999 Promotion im Analytisch-biologischen Forschungslabor,
 München