

Kontamination von Stadtgewässern mit mutagenen Substanzen

Inaugural Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

- Dr. rer. nat. -

des Fachbereichs
Bio- und Geowissenschaften,
Landschaftsarchitektur

an der

Universität-Gesamthochschule Essen

vorgelegt von

Carmen Ehrenstein

aus
Koblenz

im Dezember 1999

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden in der Abteilung für Genetik der Universität-GHS Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Günter Obe

2. Gutachter: Prof. Dr. Albert W. Rettenmeier

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Helmut Schuhmacher

Tag der mündlichen Prüfung: 31.05.2000

**„Mutation fascinates because of its three faces:
the variability it generates that conditions all evolutionary change,
the disease it generates that consumes a substantial proportion of our resources,
and the means it offers for dissecting all facets of biological phenomena.“**

(JAN DRAKE, 1991)

Inhaltsverzeichnis

A. Abbildungsverzeichnis	IV
B. Tabellenverzeichnis	VII
C. Abkürzungsverzeichnis	IX
1. EINLEITUNG	1
1.1 Mutationen	2
1.1.1 Mutationen nach Einwirkung physikalischer Noxen	6
1.1.1.1 Ionisierende Strahlung	6
1.1.1.2 UV-Strahlung	7
1.1.2 Mutation nach Einwirkung chemischer Noxen	8
1.2 Chromosomenaberrationen	11
1.3 Schwesterchromatidenaustausche (SCE)	17
1.4 Fremdstoffmetabolismus	22
1.5 Verfahren der Schadstoffkonzentration zur Gewässeruntersuchung	25
1.5.1 Blue-Cotton- / Blue-Rayon-Methode	25
1.5.1.1 Historischer Hintergrund	26
1.5.1.2 Präparation von Blue-Cotton und Blue-Rayon	27
1.5.1.3 Spezifität als Adsorbens für Mutagene	28
1.5.1.4 Einsatz in Mutagenitäts- und Karzinogenitätsuntersuchungen	29
1.5.2 Blue-Chitin -Methode	32
1.5.2.1 Herstellung von Blue-Chitin	32
1.5.2.2 Anwendung der Blue-Chitin-Methode	34
1.6 Metall- und metalloorganische Verbindungen	36
1.6.1 Charakterisierung	36
1.6.2 Bioalkylierung	36
1.6.3 Toxizität	39
1.6.3.1 Quecksilberverbindungen	39
1.6.3.2 Zinnverbindungen	41
1.6.3.3 Arsenverbindungen	43

1.7 Ziele der Arbeit	45
2 MATERIAL UND METHODEN	46
2.1 CHO-Stammkulturen	46
2.2 Kultivierung der CHO-Zellen	47
2.3 Blue-Cotton-/ Blue-Chitin-Methode	48
2.3.1 Probennahme für die Wasseruntersuchungen	49
2.3.2 Elution der PAK	50
2.4 Behandlung der CHO-Zellen	51
2.4.1 Negativ- und Positivkontrollen	51
2.4.2 Behandlung der Zellen mit Extrakten der Wasserproben	52
2.4.3 Behandlung der Zellen mit metall(oid)organischen Verbindungen	53
2.5 Aufarbeitung der behandelten Zellkulturen	54
2.6 Färbung der Präparate	55
2.7 Auswertung	55
2.8 Ames-Test	57
2.9 Bezugsquellen der Materialien	58
3. ERGEBNISSE	59
3.1 Ergebnisse der Gewässeruntersuchungen	63
3.1.1 Autobahnabfluß	78
3.1.2 Bach	80
3.1.3 Teich	82
3.1.4 Fluß	84
3.1.5 Kläranlage	86
3.1.6 Dach- und Straßenanfluß	88
3.1.7 Regen und Schnee	88
3.1.8 Leitungswasser	89

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen mit metall(oid)organischen Verbindungen	91
3.2.1 Organische Quecksilberverbindungen	92
3.2.2 Organische Zinnverbindungen	100
3.2.3 Organische Arsenverbindungen	103
4. DISKUSSION	110
4.1 Gewässeruntersuchungen	111
4.1.1 Anreicherungsverfahren	111
4.1.2 Untersuchung ausgewählter Wässer	113
4.1.2.1 Autobahn- und Straßenabfluß	114
4.1.2.2 Abwasser	114
4.1.2.3 Fließende Gewässer	116
4.1.2.4 Stehende Gewässer	117
4.1.2.5 Niederschläge	118
4.1.2.6 Leitungswasser	118
4.1.3 HPLC-Analyse	120
4.1.4 Wirkung der PAK auf die DNA	121
4.1.5 Anwendung der Blue -Rayon-/ Blue-Chitin -Methode mit CHO -Zellen und dem Ames -Test	122
4.1.6 Einfluß des Metabolisierungssystems	124
4.1.7 <i>In-vivo</i> -Tests im Einsatz bei Gewässeruntersuchungen	124
4.1.8 Wasserhaushaltsgesetz	125
4.2 Metall(oid)organische Verbindungen	126
4.2.1 Organische Quecksilberverbindungen	130
4.2.2 Organische Zinnverbindungen	137
4.2.3 Organische Arsenverbindungen	140
5. ZUSAMMENFASSUNG	145
6. LITERATUR	147

A. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung induzierter DNA-Schäden nach Einwirkung verschiedener mutagener Agenzien	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung verschiedener Möglichkeiten der Schwesterchromatidendifferenzierung	19
Abbildung 3: Metabolische Aktivierung unpolarer polyzyklischer Chemikalien durch das Cytochrom P450-System	23
Abbildung 4: Chemische Struktur von Blue-Cotton	26
Abbildung 5: Blue-Rayon in Nylonsäckchen in einen Flußlauf eingebracht	31
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Blue-Chitin-Säule	34
Abbildung 7: Metaphase einer unbehandelten CHO-Zelle	59
Abbildung 8: Metaphase einer CHO-Zelle mit mehreren Chromatidentypaberrationen nach Einwirkung von Methylquecksilberchlorid	60
Abbildung 9: Metaphase einer CHO-Zelle mit komplexen Chromatidenaustauschen (RB-Komplex) nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Autobahnabflußwasser	60
Abbildung 10: Pulverisierte Metaphase einer CHO-Zelle nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Autobahnabflußwasser	61
Abbildung 11: Metaphase einer unbehandelten CHO-Zelle mit SCE nach FPG-Färbung	61
Abbildung 12: Metaphase einer CHO-Zelle nach FPG-Färbung mit erhöhter SCE-Frequenz nach Einwirkung von Trimethylzinnchlorid	62
Abbildung 13: Metaphase einer CHO-Zelle nach FPG-Färbung mit stark erhöhter SCE-Frequenz nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Autobahnabflußwasser	62
Abbildung 14: Stark kondensierte „C-Mitose“ einer CHO-Zelle nach Einwirkung von Methylquecksilberchlorid	63
Abbildung 15: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-/ Blue-Chitin-Extrakten unterschiedlicher Wasserproben	72
Abbildung 16: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-/ Blue-Chitin-Extrakten unterschiedlicher Wasserproben	73
Abbildung 17: Ergebnisse im Ames-Test. Anzahl der Revertanten bei zwei Stämmen von <i>Salmonella typhimurium</i> nach Einwirkung von Blue-Rayon-/ Blue-Chitin-Extrakten und metabolischer Aktivierung	75

Abbildung 18: Ergebnisse ausgewählter Wasserproben aus dem Ames-Test und CA-Test im Vergleich	76
Abbildung 19: Ergebnisse ausgewählter Wasserproben aus dem Ames-Test und SCE-Test im Vergleich	77
Abbildung 20: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Autobahnabflüssen	79
Abbildung 21: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Autobahnabflüssen	79
Abbildung 22: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus zwei verschiedenen Bachläufen	81
Abbildung 23: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus zwei verschiedenen Bachläufen	81
Abbildung 24: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus zwei verschiedenen Teichen	83
Abbildung 25: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus zwei verschiedenen Teichen	83
Abbildung 26: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus verschiedenen Entnahmestellen eines Flußlaufes	85
Abbildung 27: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus verschiedenen Entnahmestellen eines Flußlaufes	85
Abbildung 28: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus Zu- und Abläufen zweier Kläranlagen	87
Abbildung 29: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus dem Zu- und Abläufen zweier Kläranlagen	87
Abbildung 30: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Wasserproben von Leitungswasser, Regen, Schnee, Dach- und Straßenabfluß	90
Abbildung 31: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Wasserproben von Leitungswasser, Regen, Schnee, Dach- und Straßenabfluß	90
Abbildung 32: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Methylquecksilberchlorid	98
Abbildung 33: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Methylquecksilberchlorid	98
Abbildung 34: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Dimethylquecksilber	99

Abbildung 35: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Dimethylquecksilber	99
Abbildung 36: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Trimethylzinnchlorid	102
Abbildung 37: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Trimethylzinnchlorid	102
Abbildung 38: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Monomethylarsinsäure	105
Abbildung 39: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Monomethylarsinsäure	105
Abbildung 40: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Dimethylarsinsäure	107
Abbildung 41: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Dimethylarsinsäure	107
Abbildung 42: Vergleich der Anzahl aberranter Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Monomethyl- und Dimethylarsinsäure	108
Abbildung 43: Vergleich der SCE-Frequenzen in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Monomethyl- und Dimethylarsinsäure	108

B. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Überblick über die in der Arbeit ausgewerteten Aberrationstypen	56
Tabelle 2: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen in den Kontrollexperimenten	65
Tabelle 3: Mengen an PAK (mg/l) in ausgewählten Wasserproben nach HPLC-Analyse	66
Tabelle 4: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Extrakte aus Autobahnabfluß und Teichwasser	67
Tabelle 5: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Extrakte aus Bachwasser und Straßenabfluß	68
Tabelle 6: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Extrakte aus Flußwasser und Dachabflüssen	69
Tabelle 7: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Extrakte aus dem Zu- und Ablauf zweier Kläranlagen	70
Tabelle 8: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Extrakte aus Regen, Schnee und Leitungswasser	71
Tabelle 9: Ergebnisse im Ames-Test. Anzahl der Revertanten aus zwei Stämme von <i>Salmonella typhimurium</i> nach Einwirkung von Blue-Rayon-/Blue-Chitin-Extrakten und metabolischer Aktivierung	74
Tabelle 10: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten metallorganischen Verbindungen und die eingesetzten Konzentrationen	91
Tabelle 11: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Methylquecksilberchlorid	94
Tabelle 12: Ergebnisse der analytischen Quecksilberbestimmung	95
Tabelle 13: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Dimethylquecksilber	96
Tabelle 14: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Quecksilberchlorid	97

<u>Tabelle 15:</u> Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Trimethylzinnchlorid	101
<u>Tabelle 16:</u> Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Monomethylarsinsäure	104
<u>Tabelle 17:</u> Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen Dimethylarsinsäure	106

C. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AAS	Kaltdampf-Atomadsorptionsspektrometrie
AB	Autobahnabflußwasser
ADP	Adenosinmonophosphat
As	Arsen
ATP	Adenosintriphosphat
B'	Chromatidenbruch
B''	Chromosomenbruch, Isochromatidenbruch
B (A)	Wasserprobe aus Bach A
B (B)	Wasserprobe aus Bach B
BC	Blue-Cotton/ Blue-Chitin
BR	Blue-Rayon
BrdUrd	Bromdesoxyuridin
C	Cytosin
CA	Chromosomenaberration(en)
CH ₃	Methylgruppe
CHO	Chinese Hamster Ovary
CP	Cyclophosphamid
CPT	Trisulfokupferphthalocyanin (Copper Phthalocyanine Trisulfonate)
CSA	Chromosomentypaberrationen
CTA	Chromatidentypaberrationen
D	Wasserprobe eines Dachabflusses
DD	Duplikationsdeletion
DIZ	dizentrisches Chromosom
DMA	Dimethylarsinsäure
DMS	Dimethylsulfat
DMSA	Dimercaptosuccininsäure
DMSO	Dimethylsulphoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	DNA-Doppelstrangbruch (Double-strand-break)
EDTA	Ethylen-diamin-terta-acetat

EZ	Erholungszeit
FKS	fötale Kälberserum
FPG	Fluoreszenz-plus-Giemsa-Färbemethode
FW	Flußwasser
G	Guanin
G1	G1-Phase des Zellzyklus
G2	G2-Phase des Zellzyklus
GC-MS	Kopplung von Gaschromatograph und Massenspektrometer
Ge	Germanium
h	Stunde(n)
Hg	Quecksilber
HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
IC	Intrachromatid Intrachange
ICP-MS	Inductively-Coupled Plasma Mass Spectrometry
ID	Interstitielle Deletion
KA-A	Ablauf einer Kläranlage
KA-Z	Zulauf einer Kläranlage
konz	konzentriert
LW	Leitungswasser
M	Mol
M1	1. Mitose nach Behandlung
M2	2. Mitose nach Behandlung
MeCoB ₁₂	Methylcobalamin
MeTHF	Methyltetrahydrofolsäure
MIN	Double Minute
min	Minute(n)
mM	Millimol
MMA	Monomethylarsonsäure
MMS	Methylmethansulfonat
MNNG	N-Methyl-N-Nitrosoguanin
MNU	N-Methyl-N-Nitrosourea
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
nm	Nanometer
PAK	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
Pb	Blei
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCC	vorzeitige Chromosomenkondensation
PIXE	Particle Induced X-Ray Emission
PS	Petrischale(n)
R	Regenwasser
RB''	Chromatid-Isochromatidentranslokation (Triradial)
RB'	interchromosomale Chromatidentranslokation, (Quadriradial)
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure
S	Schnee
S9	Lebermikrosomen aus Ratten
SAM	S-Adenosylmethionin
Sb	Antimon
Se	Selen
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Sn	Zinn
SCE	Schwesterchromatidenaustausch(e)
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
SSB	DNA-Einzelstrangbruch (Single-strand-break)
ST	Wasserprobe eines Straßenabflusses
SU	Sister Union, Schwesterchromatidenvereinigung
T	Thymin
T (A)	Wasserprobe aus Teich A
T (B)	Wasserprobe aus Teich B
Te	Tellur
TRITC	Tetramethyl-rhodamin-isothiocyanat
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
W	Winter
WHG	Wasserhaushaltsgesetz

1 Einleitung

Fortschritte von Technik und Naturwissenschaften haben zu einer erheblichen Verbesserung der Lebensqualität des Menschen beigetragen, aber auch dazu geführt, daß dieser in zunehmendem Maße mit chemischen Stoffen in Berührung gerät, die schädliche biologische Wirkungen hervorrufen können. Eine große Zahl künstlich erzeugter oder natürlich vorkommender Substanzen kann mit der zellulären DNA interagieren und so Veränderungen der Erbanlagen hervorrufen. Dazu gehören Lebensmittelinhaltsstoffe, Pflanzenschutzmittel, Kosmetika, Arzneimittel und Verunreinigungen von Luft und Wasser. Viele dieser Stoffe sind noch in hohen Verdünnungen wirksam (Schwermetalle und Kanzerogene) und können gesundheitliche Schäden hervorrufen. Deshalb strebt man an, sie aus der menschlichen Umwelt weitgehend zu eliminieren oder zumindest mengenmäßig zu reduzieren. Toxische Effekte manifestieren sich in Veränderungen an Struktur und Funktion der Zellen. Sie können mit Hilfe morphologischer, zellbiologischer und molekularbiologischer Methoden erfaßt und analysiert werden. Einige Substanzen reagieren mit der DNA, binden sich kovalent daran oder führen zu Veränderungen einzelner Basen der DNA. Andere Substanzen, wie die kanzerogenen polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAK), werden erst von zellulären Enzymen in reaktive Produkte überführt, die dann toxische Schäden verursachen. Chemikalien, die mit der DNA in den Zellen reagieren und zu Struktur- und/ oder Funktionsänderungen führen, werden als „genotoxisch“ bezeichnet.

Wenn chemische Substanzen das Erbgut lebender Zellen schädigen, können verschiedene Mutationstypen entstehen. Mit geeigneten Tests ist es möglich, diese induzierten Mutationen, aber auch Vorstufen, aus denen sie entstanden sind, nachzuweisen. Bei *in-vitro*-Tests geht man davon aus, daß die auslösenden Agenzien, wenn sie *in vivo* auf Zellen des Menschen treffen, dieselben genetischen Veränderungen hervorrufen können. Zur Erfassung von mutagenen Wirkungen gibt es eine Vielzahl von Testsystemen. Mit zytogenetischen Methoden, die seit Jahren erfolgreich im Biomonitoring eingesetzt werden, lassen sich an kultivierten Säugerzellen verschiedene genetische Endpunkte, wie Chromosomenaberrationen und Schwesterchromatidenaustausche, analysieren (MÜLLER *et al.*, 1982; OBE und

NATARAJAN, 1993). Übersichten über die heute routinemäßig verwendeten Mutagenitätstestmethoden geben KILBEY *et al.* (1984) und HSU (1982).

Über die genaue Häufigkeit der von natürlichen oder künstlichen Substanzen hervorgerufenen Mutationen und damit über den Grad der Gefährdung für kommende Generationen ist kaum etwas bekannt. Eine Belastung des Menschen mit solchen genetisch aktiven Stoffe ist vorhanden, und diese Belastungen nehmen von Jahr zu Jahr zu. Wenn auch heute der Schutz des Menschen vor genotoxischen Einflüssen im Vordergrund steht, so darf nicht vergessen werden, daß solche Substanzen, wenn sie in die Umwelt gelangen, auch die Organismen in ihren Ökosystemen schädigen und etwa Veränderungen in Populationen von Tieren, Pflanzen und Mikroorganismen hervorrufen können. Eine mögliche Rückwirkung auf den Menschen kann über die Nahrungskette erfolgen.

Die Identifizierung relevanter Mutagene und die Vermeidung möglichst jeder Mutagenexposition ist erforderlich, um die Häufigkeit genetisch bedingter Erkrankungen und Krebserkrankungen zu reduzieren. Die Gefährdung des menschlichen Erbguts infolge mutagener Belastung spielt im Bewußtsein der Öffentlichkeit eine immer größere Rolle. Die relative Bedeutung genetisch bedingter Erkrankungen im Vergleich zu anderen Krankheiten nimmt zu. Genotoxizitätsprüfungen führen dazu, Mutagene zu erkennen, die Exposition des Menschen gegenüber solchen Substanzen zu vermeiden und damit genetische Risiken zu verhindern. Politische Entscheidungen sind jedoch notwendig, um die wissenschaftlichen Erkenntnisse in der Praxis wirksam werden zu lassen.

1.1 Mutationen

Mutationen sind ein Grundphänomen lebender Systeme. Für das einzelne Individuum haben sie oft dramatische Folgen, für die Evolution von Organismen sind sie jedoch unentbehrlich.

Unter einer Mutation versteht man spontane oder induzierte Veränderungen im Informationsgehalt des genetischen Materials in somatischen Zellen oder Keimzellen.

An der Entstehung spontaner Mutationen können unterschiedliche molekulare Mechanismen beteiligt sein, wobei die meisten auf normale zelluläre Ereignisse oder Stoffwechselprozesse zurückgehen. Dazu gehören Replikationsfehler aufgrund falschen Nukleotideinbaus der DNA-Polymerase, spontane Basenveränderungen nach Desaminierung oder Tautomerie, Destabilisierung mobiler genetischer Elemente (Transposons) und Crossing-over-Fehler während der Meiose aufgrund von Fehlpaarung homologer Chromosomen. Mutationen können auch von einer Vielzahl physikalischer (UV-Strahlung, Röntgenstrahlung), chemischer (Alkylanzien, Basenanaloga) oder biologischer (Nukleasen, Viren) Agenzien induziert werden.

Veränderungen von Basensequenzen oder der DNA-Struktur können auf verschiedene Weise und auf unterschiedlichen Ebenen stattfinden, angefangen bei einem einzigen Nukleotid innerhalb eines Codons, bis zu Veränderungen in der Chromosomenzahl. Die Mutationen können daher drei verschiedenen Klassen zugeordnet werden.

- Punkt- oder Genmutationen
- Chromosomenmutationen (strukturelle Aberrationen)
- Genommutationen (numerische Aberrationen)

Punkt- oder Genmutationen stellen Veränderungen in codierenden Segmenten innerhalb eines Gens dar. Sie können als Basensubstitution, -addition oder -deletion einer oder mehrerer Basen auftreten. Jede Veränderung der Basensequenz in codogenen DNA-Bereichen kann zu Veränderungen in der Aminosäuresequenz entsprechender Proteine bis hin zu deren Funktionsverlust führen.

Chromosomenmutationen, die auch als Chromosomenaberrationen (CA) bezeichnet werden, sind morphologische Veränderungen in der Chromosomenstruktur und können mikroskopisch an fixierten und gefärbten Metaphasezellen beobachtet werden. Sie resultieren aus Brüchen und

Wiedervereinigung chromosomalen Materials. Verlust oder Falschpositionierung genetischen Materials haben dramatische Folgen für die Genexpression. In einigen Fällen sind Chromosomenmutationen für die betroffene Zelle letal. Diese Art der Mutation wird im Kapitel 1.2 ausführlich behandelt.

Genommutationen stellen Veränderungen der Chromosomenzahl innerhalb des Genoms dar. Man unterscheidet zwischen Verlust oder Zunahme einzelner Chromosomen (Aneuploidie) und Vervielfachung des kompletten Chromosomensatzes (Polyploidie). Genommutationen entstehen bei Störungen der Chromosomenverteilung. Während Mitose und Meiose wird der Spindelapparat aus Tubulinfasern aufgebaut. Für den Chromosomentransport erfolgt eine Anheftung der Spindelfasern an den Kinetochoren der Chromosomen, die nach Anordnung in der Äquatorialebene und Trennung in die Schwesterchromatiden, während der Anaphase auf die beiden Zellpole verteilt werden. Bestimmte Chemikalien können direkt oder indirekt mit dem Spindelapparat in Wechselwirkung treten und Störungen bei der Spindelbildung, bei der Anheftung der Chromosomen an die Spindel und beim Chromosomentransport verursachen (ÖNFELT, 1983,1986). Substanzen mit solchen Effekten werden als Spindelgifte oder Aneugene bezeichnet. Am Auffälligsten ist die Ausbildung von C-Mitosen, wie sie zum Beispiel von Colcemid oder Colchicin induziert werden.

Die DNA besitzt viele reaktive Stellen und ihre Struktur kann auf verschiedene Art und Weise verändert werden. Damit eine vererbare Veränderung entsteht, muß eine solche Modifikation „fixiert“ werden. Mutagene Agenzien induzieren unterschiedliche Läsionen in der chromosomalen DNA (Abbildung 1), wobei einige Mutagene mehrere Schadenstypen hervorrufen können. Dazu gehören:

- Einzelstrangbrüche (Single-strand-breaks, SSB)
- Doppelstrangbrüche (Double-strand-breaks, DSB)
- DNA-Protein- sowie DNA-DNA-Vernetzungen (Crosslinks)
- Basenveränderungen
- apurine und apyrimidine Stellen
- Alkylierungen
- Interkalierungen
- Intrastrangvernetzungen

- Anlagerung großer Moleküle (Bulky Adducts)
- Radikalbildung
- Phosphotriesterbildung

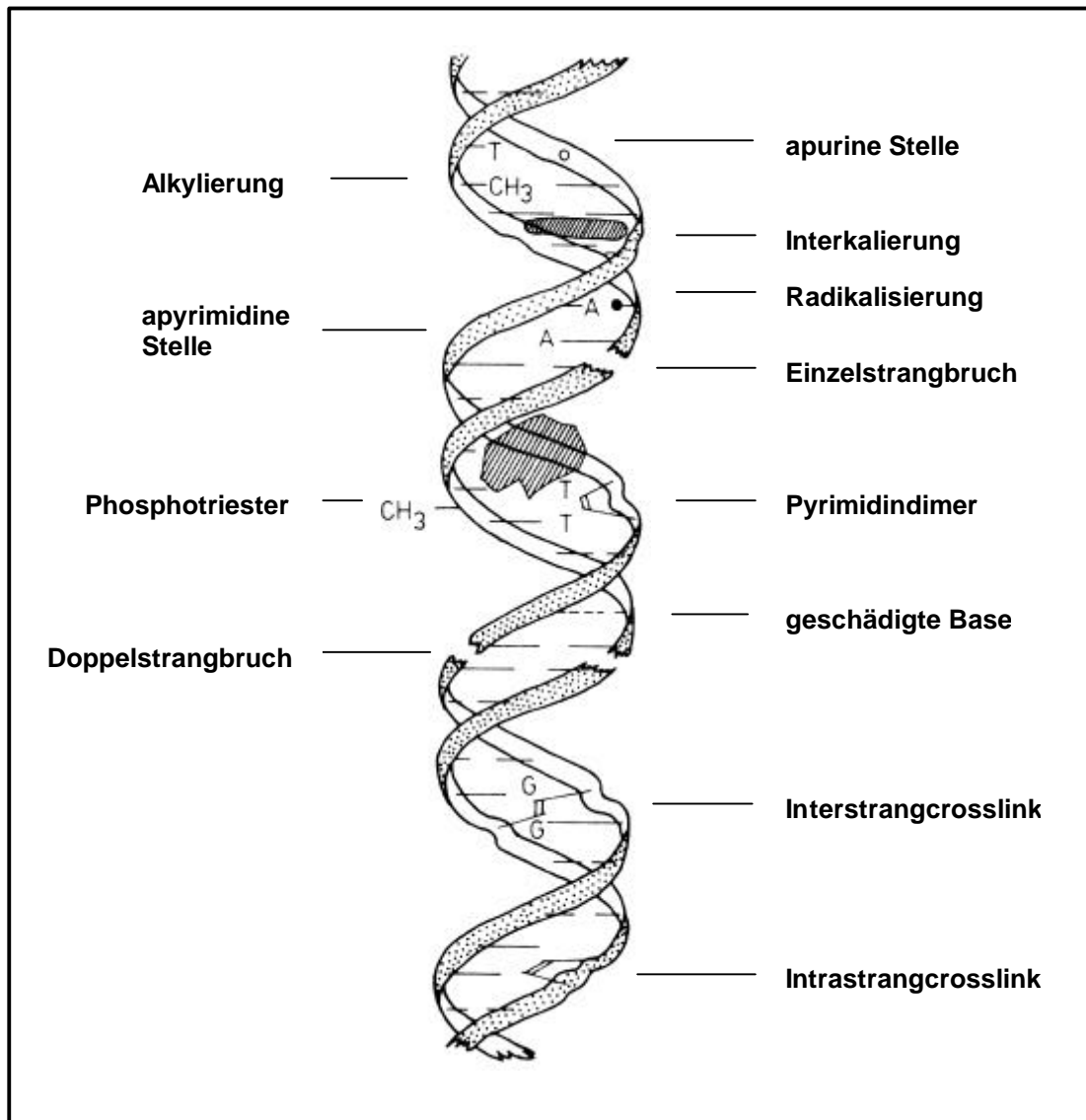


Abbildung 1: Schematische Darstellung induzierter DNA-Schäden nach Einwirkung verschiedener mutagener Agenzien (verändert nach OBE und NATARAJAN, 1980a).

Die Zelle kann auf einen primären DNA-Schaden unterschiedlich reagieren. Sie besitzt mehrere Reparaturmechanismen, die den entstandenen Schaden reparieren und somit den intakten Ausgangszustand des DNA-Moleküls wieder herstellen

können. Sollte der Schaden so schwerwiegend sein, daß etwa die Replikation verhindert wird, stirbt die Zelle. Die schadhafte Stelle kann aber auch repariert werden, ohne daß dabei der ursprüngliche Zustand wieder hergestellt wird (Fehlreparatur), wodurch eine Mutation manifestiert wird.

Die biologischen Folgen von Mutationen sind unterschiedlich, je nachdem, ob sie sich in der Keimbahn oder in somatischen Zellen ereignen. Mutationen in den Keimzellen oder ihren Vorläufern können zu Erbkrankheiten führen, die sich bei den Trägern oft als körperliche und geistige Fehlbildungen äußern und an die Nachkommen weitergegeben werden können. Mutationen sind sehr oft auch Ursache für Totgeburten und Spontanaborte. In somatischen Zellen können Mutationen zu Zelltod, Fehl- oder Minderfunktion von Zellpopulationen und malignen Transformationen führen (MURKEN und CLEVE, 1988).

1.1.1 Mutationen nach Einwirkung physikalischer Noxen

Die Mutationsmechanismen für unterschiedliche Strahlungsarten unterscheiden sich ganz erheblich und hängen vor allem vom Energiegehalt der einwirkenden Strahlung ab.

1.1.1.1 Ionisierende Strahlung

Ionisierende Strahlung wie Röntgen- oder Neutronenstrahlung schädigt nahezu alle zellulären Systeme und verursacht eine Vielzahl verschiedener DNA-Läsionen (GOODHEAD, 1989; FRANKENBERG-SCHWAGER, 1990). Neben der direkten Wirkung auf die DNA übt sie ihren schädlichen Einfluß in erster Linie über den ionisierenden Effekt auf andere Moleküle aus. Die infolge von Ionisierung entstehenden Radikale können in der DNA Einzel- und Doppelstrangbrüche induzieren, aber auch Veränderungen einzelner Basen hervorrufen. Einzelstrangbrüche können gut repariert werden und führen nur selten zu Mutationen. Doppelstrangbrüche führen entweder zu Rearrangements oder zu Deletionen. Beide Ereignisse sind für die betroffene Zelle oft letal. Doppelstrangbrüche können prinzipiell in Reparaturprozessen repariert werden, da ein Bruchereignis nicht unbedingt mit

einem Konstitutionsverlust des Chromosoms einhergeht, weil die Chromosomen von chromosomalen Proteinen in ihrer Struktur zusammengehalten werden.

Während der Ionisierung können bei Anwesenheit von Sauerstoff Peroxide entstehen, die zu Basenveränderungen führen und Bereiche aktiver Gene schädigen können, denn hier ist die DNA nicht wie im Chromosom von Proteinen geschützt. Die in der Zelle ebenfalls vorhandenen Peroxidasen können Peroxide inaktivieren.

1.1.1.2 UV-Strahlung

UV-Strahlung kann in drei verschiedene Klassen eingeteilt werden, UV-A (400-320 nm), UV-B (320-290 nm) und UV-C (290-100 nm). Die Wirkung auf die DNA ist bei einer Wellenlänge um 260 nm am effektivsten, weil hier die höchste Energieabsorption stattfindet. Die Schäden äußern sich in der Induktion von Pyrimidindimeren, insbesondere Thymindimeren, bei denen ein Cyclobutanring zwischen benachbarten Basen der DNA ausgebildet wird. Solche Dimere führen zur Störung der Replikation. UV-Licht induziert auch 6-4-Photoreaktionsprodukte (FRANKLIN *et al.*, 1985), wobei zwei Thymin nicht über einen Cyclobutanring miteinander verbunden werden, sondern zwischen C₄ des einen und C₆ des zweiten Thymins. Diese Photoprodukte führen zu einer starken Deformation der Doppelhelix und zur Blockierung der DNA-Polymerase während der Replikation.

Zellen verfügen über verschiedene Reparaturmechanismen, die UV-induzierte DNA-Läsionen entfernen können. Bei der Photoreaktivierung werden die Dimere unter Einwirkung von sichtbarem Licht enzymatisch entfernt. Während der Exzisionsreparatur (excision repair) wird die schadhafte Stelle von Nukleasen aus der DNA herausgeschnitten und die entstehende Lücke von einer Polymerase mit Nukleotiden aufgefüllt. Bei der Rekombinationsreparatur, die während der DNA-Replikation stattfindet, bleibt die schadhafte Stelle zunächst als Einzelstrang unrepliziert, wird dann aber über einen Rekombinationsvorgang ergänzt.

Bakterien haben ein weiteres Reparatursystem, das als SOS-Reparatur bezeichnet wird. Die Reparatur ist unvollständig, erlaubt aber eine Replikation über Dimere hinweg, ohne diese aus der DNA zu entfernen.

Mutationen im UV-Reparatursystem führen nach Exposition zu einer erhöhten Rate an Hauttumoren, was zum Beispiel an Patienten mit der Krankheit *Xeroderma pigmentosum* beobachtet werden kann (MURKEN und CLEVE, 1988).

1.1.2 Mutationen nach Einwirkung chemischer Noxen

Es ist schon lange bekannt, daß Chemikalien Schäden in der DNA induzieren können. Diesen Umstand macht man sich bei der Chemotherapie gegen Krebs zunutze. Schäden in der DNA hemmen die DNA-Synthese und können zu einem Zellzyklusarrest der Tumorzellen führen. In den letzten Jahren fanden umweltbedingte Mutagene und Karzinogene immer größeres Interesse. Dies führte dazu, die Mechanismen zu untersuchen, mit denen genotoxische Chemikalien mit der DNA interagieren und diese schädigen.

Bei der Mutationsinduktion von Chemikalien spielen unterschiedliche chemische Mechanismen eine Rolle. Nach der Art ihres Wirkungsmechanismus können folgende Gruppen mutagener Agenzien unterschieden werden:

- a) Basenanaloga
- b) basenmodifizierende Agenzien
- c) Crosslinking verursachende Agenzien
- d) interkalierende Agenzien

a) Jede Base in der DNA kann aufgrund einer vorübergehenden Veränderung von Bindungen in ein strukturelles Isomer (Tautomer) überführt werden, was veränderte Paarungseigenschaften bedingt. Tautomere Formen der Basen sind in der Regel instabil. Existiert eine Base während der DNA-Replikation in ihrer seltenen tautomeren Form, kann es zum Einbau eines falschen Nukleotids in dem neu synthetisierten Tochterstrang kommen. Die N-Atome von Purin- und Pyrimidinringen liegen gewöhnlich in der Aminoform (NH_2) vor, können aber spontan in die tautomere Iminoform (NH) verschoben werden. Während der Replikation können sie zu Basenaustauschen führen, wenn zum Beispiel die Iminoform des Adenins nicht mit Thymin, sondern mit Cytosin paart. In ähnlicher Weise kann der Sauerstoff am C-6 Atom von Guanin oder Thymin von der

gewöhnlichen Ketoform (C=O) in die seltene Enolform (C-OH) wechseln. Thymin paart in der Enolform mit Guanin anstelle von Adenin. Basenanaloga wie Bromdesoxyuridin (BrdUrd) besitzen eine stärkere Tendenz zur Ausbildung ihrer tautomeren Formen. BrdUrd paart in seiner stabileren Ketoform mit Adenin, in seiner instabileren Enolform jedoch mit Guanin, Aminopurin paart in seiner stabilen Aminoform mit Thymin und in seiner instabileren Iminoform mit Cytosin. Während der Replikation können sich aufgrund von Basenfehlpaarungen Mutationen manifestieren.

b) Zu den Substanzen, die eine Modifikation der Basen hervorrufen, gehören Alkylanzien und desaminierende Verbindungen. Alkylierende Agenzien sind elektrophile Verbindungen mit einer hohen Affinität zu nukleophilen Stellen in organischen Makromolekülen und können die in der DNA vorhandenen Basen modifizieren (SINGER, 1975; SINGER und GRUNDBERGER, 1983). Alkylanzien sind entweder monofunktionell und besitzen nur eine reaktive Gruppe, die an der DNA kovalent binden kann, oder sie sind polyfunktionell und besitzen mehrere reaktive Gruppen, die an verschiedenen Stellen mit der DNA reagieren können. Monofunktionelle Alkylantien induzieren mindestens 12 verschiedene DNA-Alkylierungsprodukte (KAINA *et al.*, 1997). Hauptangriffspunkte sind jedoch N⁷ des Guanins und N³ des Adenins. Alkylierungen in diesem Bereich destabilisieren die N-glykosidischen Bindungen der betreffenden Basen und führen zu Depurinierung. Obwohl Substanzen wie Dimethylsulfat (DMS) und Methylmethansulfonat (MMS) starke N-Alkylierungen an den Basen bewirken, induzieren sie nur wenige Punktmutationen. Diese Agenzien sind jedoch stark klastogen, was auf eine Beteiligung von N-Basenalkylierungen an der Induktion von CA hinweist (KAINA *et al.*, 1991). Schäden werden nicht nur von Substanzen induziert, die in der Umwelt vorkommen. Auch endogene Methylendonatoren wie S-Adenosylmethionin können ihre Alkylgruppe auf die Basen der DNA übertragen (SINGER und GRUNDBERGER, 1983; BERANEK, 1990). Weitere für Alkylierungen besonders anfällige Positionen sind O⁶ des Guanins und der O⁴ des Thymins, die nach Einwirkung alkylierender Agenzien, wie N-Alkylnitrosamine und N-Alkylnitrosamide, zu O⁶-Methylguanin und O⁴-Methylthymin werden. O⁶-Methylguanin paart während der Replikation mit Thymin, woraus eine Transition von GC zu AT resultiert (MURRAY, 1987),

O⁴-Methylthymine induziert Transitionen von AT zu GC (SAFFHILL *et al.*, 1985). KAINA *et al.* (1991) konnten zeigen, daß O⁶-Methylguanin und O⁴-Methylthymine Schwesterchromatidenaustausche (SCE) induzieren und klastogen wirken. Eine Alkylierung des Sauerstoffs in Phosphordiesterbindungen führt zur Ausbildung von Phosphortriestern. Für diese Läsionen gibt es noch keinen Hinweis auf eine toxische, mutagene oder replikationsblockierende Wirkung (KAINA *et al.*, 1991). Schäden an den Basen der DNA, die durch Alkylierung entstanden sind, können mittels eines Reparaturenzyms, der Alkyltransferase, entfernt werden (MITRA und KAINA, 1991, KAINA *et al.*, 1997). In einer einstufigen Reaktion wird die Methylgruppe auf einen internen Cystein-Rest der Alkyltransferase übertragen, was zu einer Inaktivierung des Enzyms führt („Suizid“-Enzym). Neben Methylgruppen können auch länger-kettige Alkylgruppen auf dieses Reparaturprotein übertragen werden, wobei die Effizienz mit zunehmender Länge des Alkylrestes abnimmt.

Desaminierende Verbindungen können Aminogruppen aus den Basen abspalten. Adenin wird nach Desaminierung zu Hypoxanthin, das andere Paarungseigenschaften besitzt und mit Cytosin statt mit Thymin paart, so daß während der Replikation eine Transition eines AT-Paares zu einem GC-Paar erfolgt. Cytosin wird durch Desaminierung in Uracil umgewandelt, worauf eine Transition eines GC-Paares zu einem AT-Paar erfolgt. Die bekannteste desaminierende Verbindung ist die salpetrige Säure.

c) Andere Substanzen können zwischen die Basen oder die beiden Nukleotidstränge interkalieren und mit zwei verschiedenen nukleophilen Zentren der DNA unter Ausbildung kovalenter Bindungen reagieren. Es kommt zur Ausbildung von Vernetzungen (crosslinks) innerhalb eines Polynukleotidstranges (Intrastrang-Crosslinks) oder zwischen zwei verschiedenen Strängen (Interstrang-Crosslinks). Interstrang-Crosslinks verhindern die Trennung der Tochterstränge während der Replikation und Transkription und blockieren den normalen Ablauf des Zellzyklus. Viele Substanzen, die Crosslinks induzieren, wie Mitomycin C, Psoralen oder *cis*-Platin werden in der Chemotherapie bei Krebserkrankungen angewandt (BOROWY-BOROWSKI *et al.*, 1990; CHU, 1994). Crosslinks können auch zwischen DNA und Proteinen gebildet werden.

d) Interkalierende Agenzien, wie die polyzyklischen Acridinfarbstoffe, können sich aufgrund ihrer flachen Konformation zwischen die Basen der DNA einfügen und so lokale Deformationen der Doppelhelix hervorrufen. Sie führen zu Replikationsfehlern, Deletionen oder Einbau zusätzlicher Basen, was eine Veränderung des Leserasters zur Folge hat.

Viele chemische Verbindungen, wie PAK, besitzen nur eine geringe chemische Reaktivität und unterliegen im Körper verschiedenen enzymatischen Reaktionen (siehe 1.4). Die biologische Funktion solcher Reaktionen liegt darin, die unpolaren Verbindungen in wasserlösliche und aus dem Körper ausscheidbare Formen umzuwandeln und somit die Zelle gegen cytotoxische Effekte zu schützen. Einige Substanzen werden hierbei aber aktiviert und können als elektrophiles Agens mit nukleophilen Stellen in der DNA reagieren. An der Umsetzung im Organismus ist in erster Linie das Enzymsystem Cytochrom P450 beteiligt. Unter Sauerstoffbeteiligung entstehen sehr reaktive Zwischenstufen, die eine hohe mutagene Wirkung besitzen. So wird Benzo[a]pyren zunächst oxidiert und anschließend hydroxyliert, wodurch es wasserlöslich wird. In der weiteren Umsetzung zum 7,8-diol-9,10-Epoxid wird es stark reaktiv und bildet mit Guaninbasen Komplexe, die zur Deformation der DNA-Doppelhelix führen.

1.2 Chromosomenaberrationen

Chromosomenaberrationen (CA) sind im Lichtmikroskop erkennbare strukturelle Veränderungen der Chromosomen, die in Colcemid-arretierten Metaphasen (C-Metaphasen) analysiert werden. Diese Veränderungen stammen von Brüchen in den Chromosomen und/oder Austausch von Chromosomenfragmenten, die entweder nur ein Chromosom (intrachromosomal, Intrachanges) oder mehrere Chromosomen (interchromosomal, Interchanges) betreffen.

Folgende allgemeine Bruch- und Umbautypen können unterschieden werden (SAVAGE, 1976):

- Deletion: Verlust von terminalen oder interstitiellen Chromosomenstücken
- Duplikation: Verdopplung von Chromosomenfragmenten
- Inversion: Drehung eines interstitiellen Segments um 180° und anschließender Wiedereinbau
- Translokation: Einbau eines Segments in neuer Lage im gleichen Chromosom oder Übertragung eines Segments in neuer Lage auf ein anderes Chromosom (reziproke oder nicht reziproke Translokation)

CA können in seltenen Fällen aufgrund verschiedener endogener und exogener Einflüsse spontan entstehen. In der Regel werden sie aber von physikalischen (Ionisierende Strahlung, UV-Strahlung), chemischen (Alkylantien, Basenanaloga) oder biologischen (Viren, Nukleasen) Agenzien induziert, die als Klastogene bezeichnet werden.

Mutagene, wie ionisierende Strahlen, Bleomycin und Restriktionsendonukleasen, induzieren Läsionen, die unabhängig vom Zellzyklusstadium der behandelten Zellen, unmittelbar zu CA führen. Sie werden als S-Phase-unabhängige Mutagene bezeichnet. Je nachdem, in welcher Phase des Zellzyklus die Schäden gesetzt werden, manifestieren sich die daraus hervorgehenden chromosomalen Aberrationen als Chromosomen- oder Chromatidenaberrationen. Werden teilungsfähige Zellen mit einem S-Phase-unabhängigen Mutagen behandelt, so erhält man in der G₁-Phase Aberrationen des Chromosomentyps, nach Behandlung in der G₂-Phase Aberrationen des Chromatidentyps. Nach Behandlung in der S-Phase des Zellzyklus werden beide Aberrationstypen induziert. Zu der Gruppe der S-Phase-abhängigen Mutagene gehören die meisten chemischen Klastogene sowie UV-Strahlung. Sie führen nur dann zu CA, wenn die Zellen nach Behandlung mit dem Mutagen eine S-Phase durchlaufen. Bei S-Phase-abhängigen Mutagenen sind in der auf die Behandlung in der G₁-Phase folgenden Mitose ausschließlich Chromatidentypaberrationen zu finden (EVANS, 1977a). Bruchereignisse, und die sich daran anschließenden Restitutions- und Reunionsvorgänge, laufen im Zusammenhang mit der DNA-Replikation

während der S-Phase des Zellzyklus ab. Dies ist der Grund, warum nach Behandlung unreplizierten Chromatins (G₁-Phase) in der darauffolgenden Mitose (M1) Chromatidentypaberrationen gefunden werden. Nach Behandlung bereits replizierten Chromatins (G₂-Phase) treten in der darauffolgenden Mitose jedoch keine Aberrationen auf. Erst nach Durchlaufen einer S-Phase können in der zweiten Mitose nach Behandlung (M2) Chromatidentypaberrationen gefunden werden.

Untersuchungen an vorzeitig kondensierten Interphasechromosomen (PCC, Premature Chromosome Condensation) haben gezeigt, daß auch in teilungsinaktiven Zellen im G₀-Stadium des Zellzyklus strukturelle Chromosomenaberrationen induziert werden können (PANTELIAS und MAILLIE, 1984; MILLER, 1991).

Strukturelle Aberrationen können in Abhängigkeit ihrer Fähigkeit in teilungsfähigen Zellpopulationen zu persistieren, als stabil oder instabil klassifiziert werden. Zu den instabilen Aberrationen werden dizentrische Chromosomen, Ringe und azentrische Fragmente gerechnet. Solche Aberrationen führen für die betroffene Zelle zum Tod, weil die Zellteilung während der Mitose gestört ist, oder Chromosomenfragmente, und damit genetisches Material, während der Anaphase verloren gehen. Balancierte Translokationen und Inversionen zählen zu den stabilen Aberrationen, die lange Zeit in proliferierenden Zellen erhalten bleiben und während jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben werden können.

Für die Entstehung und den Ursprung chromosomaler Aberrationen gibt es verschiedene Erklärungsversuche, wobei die Theorien von SAX (1940) und REVELL (1959) die bekanntesten sind. Beide Hypothesen beruhen auf Daten aus dem Bereich der Mutationsforschung. Es konnte nachgewiesen werden, daß es sich bei interchromosomalen Umbauprozessen um mehrphasige, zeitlich voneinander trennbare Schritte handelt (SAVAGE, 1976).

Sax formulierte die „Breakage-First-Hypothese“ (Bruch-Reunions-Hypothese). Nach Röntgenbestrahlung von Mikrosporen aus *Tradescantia paludosum* (SAX, 1940) erhielt er eine lineare Dosis-Effekt-Beziehung für Chromosomenbrüche und eine mit dem Quadrat der Dosis ansteigende Anzahl dizentrischer Chromosomen. Aus diesen Ergebnissen schloß SAX, daß für die Entstehung eines dizentrischen Chromosoms zwei unabhängig von einander induzierte Brüche erforderlich sind, und

daß Chromosomenbrüche das primäre Ereignis für die Entstehung von CA sind. Brüche können entweder unter Ausbildung des ursprünglichen Zustandes miteinander verheilen (Restitution), oder sie werden stabilisiert und führen zu sichtbaren Brüchen. Verheilen zwei nicht zueinander gehörende Bruchenden (Reunion) kommt es zur Ausbildung von CA.

REVELL formulierte nach Röntgenbestrahlung in G_2 an Wurzelmeristemzellen von *Vicia faba* die „Contact-First-Hypothese“ (Austausch- oder Rekombinationshypothese). Danach sind nicht freie Bruchenden, sondern lokale Instabilitätszustände die Primärläsionen für die Entstehung von CA. Fallen solche Läsionen zeitlich und räumlich zusammen, können sie an Austauschprozessen teilnehmen. Seine experimentellen Ergebnisse zeigten, daß auch für Chromatidenbrüche die Dosis-Effekt-Beziehung nicht linear ist (REVELL, 1974).

Die DNA ist das primäre Ziel für die Induktion von CA. OBE und NATARAJAN (1982) zeigen dazu eine Reihe von Beweisen auf.

- UV-Licht führt bei einer Wellenlänge von 260 nm, bei der das Absorptionsmaximum der DNA liegt, am wirkungsvollsten zu CA.
- An *Xeroderma pigmentosum* erkrankte Menschen besitzen einen genetischen Defekt für die Reparatur von UV-Schäden. Bei ihnen können deutlich höhere Raten an CA nach UV-Bestrahlung gefunden werden.
- Licht der Wellenlänge 320-410 nm kann UV-induzierte Pyrimidindimere photolytisch spalten, was zu einer Verringerung der Anzahl von CA führt (Photoreaktivierung).
- DNA-Doppelstrangbrüche sind für die Induktion von CA verantwortlich. Gering ionisierende Strahlung (Röntgenstrahlung) induziert hauptsächlich DNA-Einzelstrangbrüche, die mit geeigneten Endonukleasen in DNA-Doppelstrangbrüche umgewandelt werden können und so zu CA führen. Dicht ionisierende Strahlung mit hoher Energie (Neutronen und α -Partikel) induziert hauptsächlich DNA-Doppelstrangbrüche.
- Ionisierende Strahlung induziert in Abhängigkeit vom Zellzyklus unterschiedliche Aberrationstypen.

- Der Einbau halogenerter Basenanaloga (BrdUrd) in chromosomale DNA führt zu CA.
- Substanzen, wie Cytosinarabinsid, Hydroxylharnstoff, 5-Fluorodesoxyuridin und Deoxyadenosin, hemmen die Synthese von DNA oder DNA-Vorstufen und führen zu CA.
- Chemikalien, wie Neocarcinostatin und Bleomycin, induzieren sehr effektiv Brüche in der DNA und CA.
- Zellen mit einem Reparaturdefizit für Schäden, die von DNA-quervernetzenden Agenzien induziert werden (Fanconianämie), sind sensitiver für die Induktion von CA.
- Die Effektivität monofunktionaler Alkylantien, wie N-Methyl-N-Nitrosoguanin (MNNG) und N-Methyl-N-Nitrosourea (MNU), CA zu induzieren, korreliert mit der Fähigkeit nukleophile Bereiche in der DNA zu alkylieren.

Die Zelle besitzt mehrere Mechanismen, DNA-Schäden zu reparieren. Wird der ursprüngliche Zustand nicht wieder hergestellt können CA entstehen. Untersuchungen an Zellen, die DNA-Doppelstrangbrüche nicht reparieren können, zeigen, daß die Einwirkung ionisierender Strahlen eine erhöhte Anzahl von CA hervorruft (KEMP und JEGGO, 1986). Diese und weitere Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß DSB die ultimate Läsion für die Entstehung von CA darstellen. Ionisierende Strahlen, Restriktionsendonukleasen (RE) und verschiedene chemische Mutagene wie Bleomycin und Neocarcinostatin, induzieren direkt DSB und führen S-Phase-unabhängig zu CA (HITTELMAN und POLLAND, 1982; DIKOMEY und FRANZKE, 1986; WINEGAR und PRESTON, 1988). UV-Strahlung und die meisten chemischen Mutagene induzieren nicht unmittelbar DSB, sondern andere Läsionen. CA können nur beobachtet werden, wenn die Zelle nach dem Schadensereignis eine S-Phase durchläuft. Während dieser Phase können dann Läsionen zu DSB umgewandelt werden und so zu Chromatidentypaberrationen führen („misreplication“ (EVANS, 1977a)). S-Phase abhängige Mutagene können nur dann zu CA führen, wenn DSB während der Reparaturvorgänge vor der Replikation auftreten.

Gegen Ende der 70er Jahre gelangen erste Beweise, daß DSB für die Entstehung der CA verantwortlich sind. (NATARAJAN und OBE, 1978; NATARAJAN *et al.*, 1980; OBE und NATARAJAN, 1980b; OBE *et al.* 1982, 1986; NOWAK und OBE, 1984, 1985; NOWAK *et al.*, 1984) CHO-Zellen und menschliche Lymphozyten wurden in der G₁-Phase des Zellzyklus mit Agenzien behandelt, die primär DNA-Einzelstrangbrüche induzieren. Eine Nachbehandlung mit einer einzelstrangspezifischen Endonuklease aus *Neurospora crassa* führte zu einer signifikanten Erhöhung von Chromatidentypaberrationen, was sich mit einer möglichen Transformation von Einzelstrangbrüchen in Doppelstrangbrüche erklären läßt.

In Experimenten mit RE konnte letztendlich der Beweis erbracht werden, daß DNA-Doppelstrangbrüche die Läsionen sind, die zu CA führen (SUBRAHMANJAN *et al.*, 1976; BRYANT, 1984, 1985; NATARAJAN und OBE, 1984; OBE *et al.* 1985, 1987; GUTAVINO *et al.*, 1986; JOHANNES und OBE, 1991). RE-induzierte CA weisen ein ähnliches Induktionsmuster auf, wie CA nach Einwirkung ionisierender Strahlung. Beide wirken S-Phase-unabhängig und induzieren in der G₁-Phase des Zellzyklus Chromosomentypaberrationen, in der G₂-Phase Chromatidentypaberrationen und in der S-Phase beide Aberrationstypen (OBE und WINKEL 1985; OBE und JOHANNES, 1987; MORGAN *et al.*, 1990; OBE *et al.*, 1993).

Chromosomenaberrationen als Endpunkt in Mutagenitätstests

Schon Ende der 70er Jahre schätzte man die Menge an anthropogen in die Umwelt eingebrachten Chemikalien auf etwa 30 000 und jedes Jahr kommen etwa 500 – 800 neue Verbindungen hinzu (CLAYSON 1977). Lange Zeit wurden Chemikalien allein in Tierversuchen auf mögliche Kanzerogenität hin untersucht. Solche Untersuchungen waren mit hohen Kosten verbunden und außerdem enorm zeitaufwendig. Die Durchführung eines Tests auf Induktion von CA ist so schnell und einfach durchzuführen, daß er zur Identifizierung mutagener oder kanzerogener Stoffe rasch Zugang in die Mutagenitätsforschung gefunden hat. Für die Verwendung des CA-Tests im Rahmen von Mutagenitätsprüfungen wurden internationale Richtlinien (Guidelines) etabliert. Die OECD-Richtlinie 473 beschreibt den *in vitro*-Test für die Induktion von CA in Säugerzellen (OECD, 1983).

Es gibt eine Gruppe von Chemikalien, die nicht mit bakteriellen Mutagenitätstests, sondern nur mit Zellkulturtests erkannt werden können (AU und HSU, 1984). Diese Substanzen reagieren mit dem mitotischen Spindelapparat, aber nicht unbedingt mit der DNA. Colchicin und Vincristin verhindern die Ausbildung der Mitosespindel, so daß die Chromosomen in der Metaphase der Mitose arretiert bleiben. Andere Verbindungen, wie Halothan, induzieren einen defekten Spindelapparat und führen zu aneuploiden Tochterzellen. Ein Mutagenitätstest allein reicht nicht aus, eine Substanz als eindeutig positiv oder eindeutig negativ zu klassifizieren. So sind Diethylstilbestrol und Urethan im Ames-Test negativ, induzieren aber CA (AU und HSU, 1982).

1.3 Schwesterchromatidenaustausche (SCE)

Schwesterchromatidenaustausche (*sister chromatid exchange*, SCE) sind reziproke Austausche an homologen Stellen zwischen den zwei genetisch identischen Schwesterchromatiden eines Chromosoms. Sie können spontan auftreten oder von einer Vielzahl physikalischer und chemischer Agenzien induziert werden.

SCE wurden zum ersten Mal 1938 von Barbara McClintock postuliert. Sie erkannte während der mitotischen Anaphase in Maisendospermzellen ringförmige, dizentrische Chromosomen, die zwischen den Spindelpolen aufgespannt waren und deutete diese als Austausche zwischen den Schwesterchromatiden monozentrischer Ringchromosomen (MCCLINTOCK, 1938).

Der erste Nachweis von SCE gelangten TAYLOR *et al.* (1958) in autoradiographischen Untersuchungen von Pflanzenchromosomen des Wurzelmeristems von *Vicia faba* und *Bellevalia romana*. Nach Markierung der zellulären DNA mit ³H-Thymidin während einer S-Phase konnte in der zweiten darauf folgenden Mitose in den Metaphasechromosomen eine radioaktiv markierte von einer unmarkierten Chromatide unterschieden werden. SCE wurden als Wechsel der radioaktiven Markierung von einer Chromatide auf die andere sichtbar (TAYLOR, 1958). Diese Methode ist aufgrund verschiedener Faktoren als Routinetest für genotoxische Substanzen ungeeignet. Zum einen ist sie sehr zeitaufwendig und hat

nur ein begrenztes Auflösungsvermögen, zum anderen konnte gezeigt werden, daß das eingebaute ^3H -Thymidin radioaktiv zerfällt und somit selbst SCE hervorruft (GIBSON und PRESCOTT, 1972). Erst der Einsatz halogener Nucleoside wie 5-Bromdesoxyuridin (BrdUrd) führte zu einer deutlichen Verbesserung der Methode und damit zu ihrer schnellen Verbreitung. BrdUrd wird von der Zelle anstelle von Thymin eingebaut. Chromosomen, die zwei S-Phasen in Anwesenheit von BrdUrd durchlaufen haben, besaßen eine einsträngig und eine zweisträngig mit BrdUrd substituierte Chromatide. Die SCE ließen sich durch einfache Giemsa-Färbung sichtbar machen. Anfänglich kamen sehr hohe Dosen von BrdUrd zum Einsatz, die sich nachteilig auf die DNA-Synthese und den Zellzyklus auswirkten und sogar CA induzieren konnten (HUANG, 1967; ZAKHAROV und EGOLINA, 1972). Erst in Kombination mit Fluoreszenzfarbstoffen, wie Hoechst 33258 (Bisbenzimid), konnte die BrdUrd-Konzentration erheblich gesenkt werden (LATT, 1973). Die starke Photoinstabilität führte jedoch zu einem raschen Ausbleichen der Präparate, so daß nur eine Auswertung über Photographie möglich war.

1974 entwickelten PERRY und WOLFF eine Methode zur dauerhaften Schwesterchromatidenfärbung, die später von HILL und WOLFF (1982) leicht modifiziert wurde. Dabei wurden die mit BrdUrd-substituierten Präparate zunächst mit dem Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33258 gefärbt und anschließend einer normalen Giemsa-Färbung unterzogen (FPG-Methode; Fluoreszenz-plus-Giemsa). Es wird vermutet, daß der Einbau des Basenanalogs eine Veränderung in der Chromatinstruktur der Chromosomen hervorruft, wodurch die Farbmoleküle aus der Giemsa-Lösung einen schlechten Zugang zur DNA finden. Die FPG-Technik ermöglicht eine schnelle und routinemäßige Untersuchung, da die Chromosomen ohne Einbau von ^3H -Thymidin differentiell gefärbt und mit einem normalen Hellfeld-Durchlichtmikroskop ausgewertet werden können.

Die Verwendung von BrdUrd bietet zwei Alternativen zur differentiellen Markierung der Schwesterchromatiden (Abbildung 2). Eine Differenzierung kann erst erreicht werden, wenn die Zellen zwei S-Phasen absolviert haben. In beiden Fällen durchlaufen die Zellen den vorletzten Zellzyklus in Gegenwart von BrdUrd. Beide Chromatiden eines Chromosoms besitzen einen alten, thyminhaltigen und einen neuen, mit BrdUrd substituierten DNA-Strang. Der darauf folgende Zellzyklus

kann in An- oder Abwesenheit von BrdUrd erfolgen. Die Metaphasechromosomen sind dann in der zweiten Mitose (M2) asymmetrisch substituiert. Bei Anwesenheit von BrdUrd während des zweiten Zellzyklus erhält man Chromosomen, deren eine Chromatide einfach und die zweite Chromatide doppelt substituiert ist (BB-BT-Chromosomen). Bei Abwesenheit besitzen die Chromosomen eine unsubstituierte Chromatide und eine Chromatide, die zur Hälfte mit BrdUrd substituiert ist (TT-TB-Chromosomen).

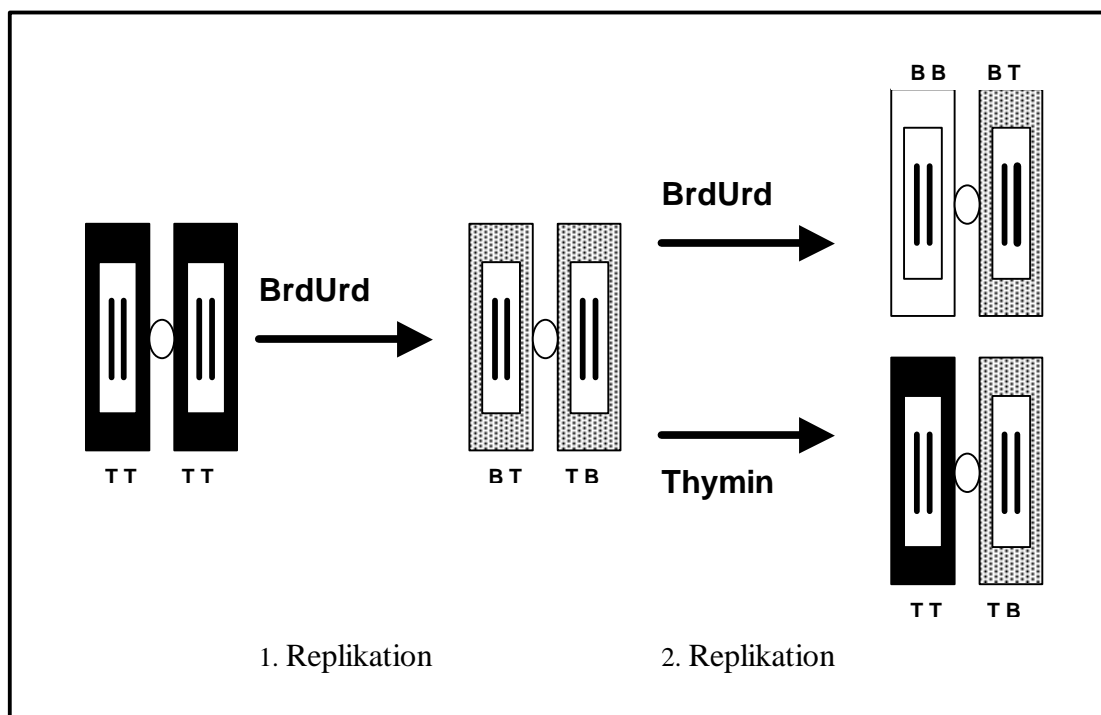


Abbildung 2: Schematische Darstellung verschiedener Möglichkeiten der Schwesterchromatidendifferenzierung.

Nach zwei S-Phasen in Anwesenheit von BrdUrd besitzt das Chromosom eine bifilar und eine unifilar mit BrdUrd substituierte Chromatide (BB-BT-Chromosom). Erfolgt eine S-Phase in Gegenwart von BrdUrd und die zweite S-Phase in Gegenwart von Thymin, besitzt das Chromosom eine unifilar substituierte Chromatide und eine unsubstituierte Chromatide (TT-TB-Chromosom).

Die BrdUrd-Markierung ermöglicht neben SCE auch Informationen über die Proliferation der Zellen zu erhalten. Aufgrund des Färbemusters zum Präparationszeitpunkt lassen sich die Mitosen eindeutig nach der Anzahl durchlaufener Zellzyklen unterscheiden.

Ein Nachteil der Verwendung von BrdUrd liegt darin, daß diese Substanz spontan oder induziert radikalisiert werden kann und somit zu einer Erhöhung der SCE-Frequenz beiträgt (MORRIS, 1991). BRUCKMANN *et al.* (1999a) gelang es eine Differenzierung der Schwesterchromatiden ohne Einbau von BrdUrd in die DNA. Sie brachten Biotin-dUTP (Biotin-16-2'-deoxythymidin-5'-triphosphat) mittels Elektroporation in CHO-Zellen ein und detektierten die Substanz mit TRITC-konjugiertem Avidin. Eine fluoreszenzmikroskopische Auswertung der M2 zeigte eine deutliche Differenzierung der Schwesterchromatiden. Die Autoren konnten mit dieser Methode zeigen, daß signifikant niedrigere SCE-Frequenzen in Biotin-dUTP-substituierten Zellen zu beobachten waren als in BrdUrd-substituierten Zellen.

Die molekularen Mechanismen der Entstehung von SCE und ihre genetische Relevanz sind bis heute noch nicht geklärt. Die Modelle, die einen theoretischen Ansatz liefern, lassen sich in zwei Gruppen einteilen. Bei der einen Gruppe wird angenommen, daß die SCE direkt in oder unmittelbar hinter der Replikationsgabel gebildet werden und mit Mechanismen der DNA-Reparatur in Verbindung stehen (KATO, 1977; SHAFER, 1977; EVANS, 1977b; SCHUBERT, 1990). Vertreter der anderen Gruppe sehen die SCE-Bildung unabhängig von einer DNA-Reparatur (PAINTER, 1980; CLEAVER, 1981).

Spontane SCE werden mit einem Bruch der Elternstränge an der Replikationsgabel und der reziproken Wiedervereinigung mit den neu entstandenen Tochtersträngen erklärt. Bei induzierten SCE findet dieser Bruch vermutlich an einer geschädigten Stelle der DNA statt (WOLFF *et al.*, 1974). Lange Zeit wurde vermutet, daß SCE ausschließlich während der S-Phase des Zellzyklus gebildet werden. S-Phase unabhängige Mutagene, wie RE, Bleomycin, Neocarcinostatin, DNaseI und ionisierende Strahlen, die in der Lage sind, direkt DNA-Doppelstrangbrüche zu induzieren, führen ebenfalls zu SCE (FOLLE *et al.*, 1992; NATARAJAN *et al.*, 1985; OBE *et al.*, 1994; WOLFF *et al.*, 1974). MÜHLMANN-DIAZ und BEDFORD (1995) vermuten, daß die SCE, die nach Röntgenbestrahlung in G1-Zellen entstehen, aus chromosomalen Rearrangements hervorgehen, wobei Inversionen die größte Rolle spielen. Diese Annahme wird von WOJCIK *et al.* (1999) und BRUCKMANN *et al.* (1999b) widerlegt.

Seit langer Zeit wird die Frage diskutiert, welchen Einfluß BrdUrd auf die Induktion von SCE hat (HUTCHINSON, 1973; MORGAN und WOLFF, 1984; ZWANENBURG, *et al.*, 1985; MORRIS, 1991; BRUCKMANN *et al.*, 1999b). Brom kann besonders nach Einwirkung ionisierender Strahlen aus dem Molekül entfernt werden und über radikalische Reaktionen Schäden in der DNA induzieren, die zu SCE führen.

Eine Inhibition von Enzymen, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, führt ebenfalls zu einer Erhöhung der SCE-Frequenz (SCHWARTZ und WEICHSELBAUM, 1984; ZWANENBURG und NATARAJAN, 1984). Das Enzym Poly(ADP-ribose)-polymerase ist an der Exzisionsreparatur in Säugetierzellen beteiligt (FRIEDBERG *et al.*, 1995). Eine Inhibierung dieses Enzyms mit 3-Aminobenzamid induziert eine Anhäufung unreparierter Stellen in der DNA, die während der S-Phase des Zellzyklus zu SCE führen können.

Untersuchungen an Zellen mit Endoreduplikationen zeigen, daß die SCE-Frequenz nach Röntgenbestrahlung nur dann erhöht ist, wenn die Zellen vorher BrdUrd inkorporierten. In Biotin-dUTP-substituierten Zellen ist die SCE-Frequenz deutlich geringer (BRUCKMANN *et al.*, 1999b).

Schwesterchromatidenaustausche als Genotoxizitätstest

Die SCE-Analyse ist ein empfindlicher Test in der Mutagenitäts- und Genotoxizitätsprüfung (PERRY, 1980; PERRY und EVANS, 1975; TUCKER *et al.*, 1993). Für die Verwendung des SCE-Tests im Rahmen von Mutagenitätsprüfungen wurden internationale Richtlinien (Guidelines) etabliert. Die OECD-Richtlinien für die Prüfung von Chemikalien lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen. Die Forschung unterscheidet Tests für Genmutationen, Chromosomenaberrationen und DNA-Effekte. Die letztgenannten, zu denen auch der SCE-Test gehört, werden auch als Indikatortests bezeichnet. Die OECD-Richtlinie 479 beschreibt den *in vitro*-SCE-Test an Säugerzellen (OECD, 1983).

PERRY und EVANS (1975) zeigten für UV-Licht und verschiedene Chemikalien, daß der SCE-Test eine sensitive und schnelle Methode für den Nachweis von Umweltmutagenen darstellt. Besonders S-Phase-abhängige Mutagene führen zu einer deutlichen Erhöhung der SCE-Häufigkeit (PERRY und EVANS, 1974). Zahlreiche

Publikationen haben sich mit dem Mechanismus und der biologischen Bedeutung von SCE auseinandergesetzt (LATT, 1981; LATT *et al.*, 1981). Andere Arbeiten versuchen SCE gegenüber anderen genetischen Endpunkten, wie CA (GEBHART, 1981) und Genmutationen (CARRANO und THOMPSON, 1982) abzugrenzen. Viele Substanzen wurden inzwischen auf ihre SCE-induzierende Wirkung hin untersucht, und die Befunde in umfangreichen Übersichtsartikeln zusammengestellt (LATT *et al.*, 1981; TAKEHISA, 1982; GALLOWAY *et al.*, 1985, 1987; ANDERSON *et al.* 1990).

Eine Steigerung der SCE-Häufigkeit kann fast immer auf mutagene Einflüsse zurückgeführt werden. Ein positiver *in vitro*-SCE-Test sollte eine Verdopplung des Kontrollwertes und eine Dosis-Effekt-Beziehung ergeben. Ein negatives Ergebnis schließt die mutagene und kanzerogene Wirkung eines Agens allerdings nicht aus. Eine Ergänzung des SCE-Test mit anderen Tests (Test auf CA-Induktion) erscheint sinnvoll.

Die Vorteile des Tests liegen vor allem in seiner Empfindlichkeit, Schnelligkeit und eindeutigen Auswertbarkeit, sowie der geringen Störanfälligkeit und guten Reproduzierbarkeit. Während der mikroskopischen Auswertung erhält man neben den SCE-Werten auch andere wichtige Informationen über Chromosomenmorphologie, Zellproliferation und Polyploidisierung, welche auf zytotoxische und genotoxische Wirkungen hinweisen können.

1.4 Fremdstoffmetabolismus

Lebewesen sind ständig exogenen und endogenen chemischen Einflüssen ausgesetzt. Einige körperfremde Substanzen interferieren bereits in geringsten Konzentrationen mit physiologischen Prozessen womit sich die Notwendigkeit ihrer Ausschleusung ergibt. Bei höheren Organismen erfolgt dies hauptsächlich über Leber und Nieren, wozu die Substanzen in einer wasserlöslichen Form vorliegen müssen. Die meisten chemischen Mutagene reagieren nicht direkt mit der DNA, sondern werden erst im Stoffwechsel, überwiegend in der Leber, enzymatisch aktiviert und so in eine wasserlösliche, ausscheidbare Form gebracht (Abbildung 3). Zu diesen indirekten Mutagenen gehören Verbindungen mit ganz unterschiedlichen

Strukturen, wie PAK, chlorierte Kohlenwasserstoffe, Nitrosamine, Alkaloide, Aflatoxine und Azofarbstoffe.

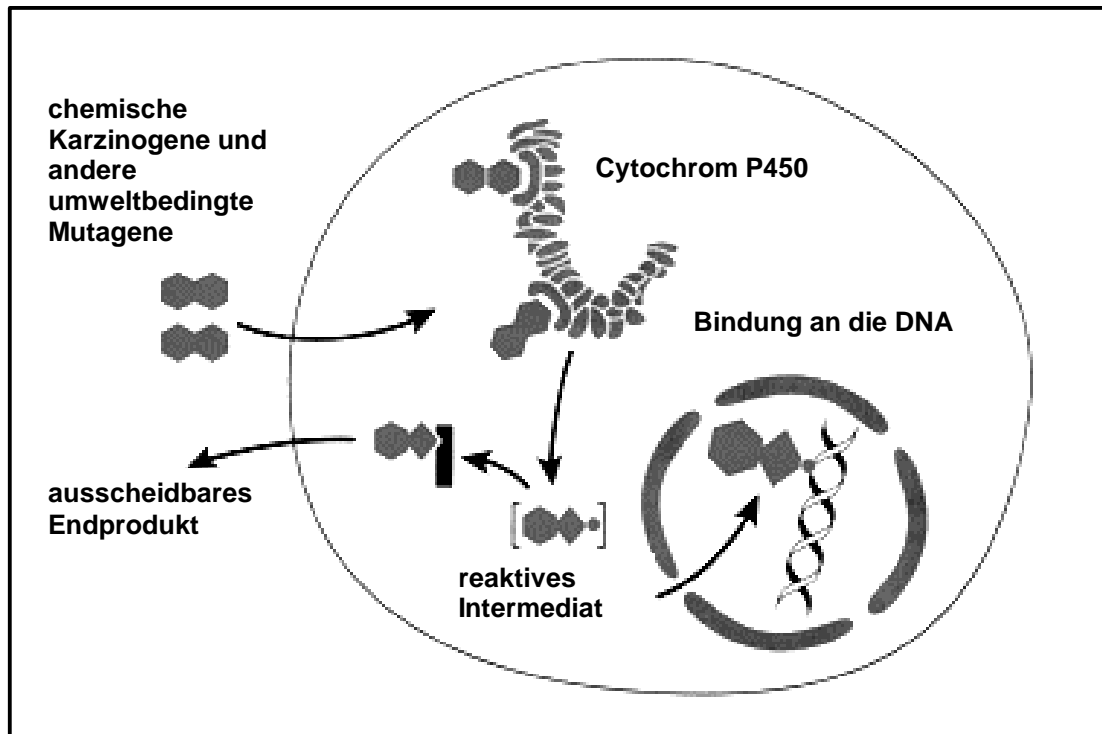


Abbildung 3: Metabolische Aktivierung unpolarer polyzyklischer Chemikalien durch das Cytochrom P450-System (verändert nach FRIEDBERG *et al.*, 1995)

Anfang der 70er Jahre wurden subzelluläre Leberpräparationen zur Aktivierung von Promutagenen in bakteriellen Mutagenitätstests eingeführt (MALLING, 1971; AMES *et al.*, 1973). Dadurch gelang es, den Stoffwechsel wie er in Säugetieren abläuft, *in vitro* zu simulieren. Bei AMES *et al.* (1973) findet sich eine ausführliche Beschreibung zur Herstellung der Lebermikrosomen (S9). Ratten werden mit Substanzen wie Aroclor 1254 (verschiedene polychlorierte Biphenyle), die ein breites Spektrum fremdstoffmetabolisierender Enzyme induzieren, vorbehandelt. Nach fünf Tagen wird die Leber präpariert, homogenisiert und bei 9000 g zentrifugiert. Im Überstand befindet sich die S9-Fraktion mit Vesikeln des endoplasmatischen Retikulums, an die die Enzyme gebunden sind.

Die wichtigste Gruppe unter den fremdstoffmetabolisierenden Enzymen sind die Cytochrome P450 (GONZALES, 1989), von denen im Säugerorganismus mehrere Gruppen unterschieden werden. Alle Cytochrome P450 gehören aufgrund von Sequenzhomologien zu einer gemeinsamen Enzymsuperfamilie. Einigen kommt eine zentrale Bedeutung im endogenen Stoffwechsel zu, etwa in der Biosynthese von Steroidhormonen, andere haben eine breite Substratspezifität gegenüber Fremdstoffen. Diese Enzyme sind überwiegend im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert. Sie kommen zwar in allen Geweben vor, doch findet sich in Leberparenchymzellen eine besonders hohe Konzentration und Vielfalt. Art und Menge der exprimierten Enzyme werden überdies stark von Alter, Geschlecht, Zellproliferationsstatus und Umwelteinflüssen beeinflusst.

Cytochrome P450 fungieren vor allem als Monooxygenasen, indem sie ein Atom von molekularem Sauerstoff in den Fremdstoff einführen. Das zweite Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert. Neben O₂ benötigen die P450-Enzyme Elektronen als Cosubstrate, die meist über die ebenfalls membranständige Cytochrom P450-Reduktase aus NADPH zur Verfügung gestellt werden. Als primäre Monooxygenierungsprodukte entstehen vor allem Epoxide und Hydroxylverbindungen. Die meisten Epoxide verfügen über eine ausgeprägte Elektrophilie und können Addukte mit Nukleinsäuren und Proteinen bilden. Im Gegensatz dazu sind Hydroxylverbindungen nukleophil und als solche kaum DNA-aktiv. Eine mutagene Wirkung ist erst nach spontaner oder enzymatischer Weiterreaktion zu erwarten.

S9 kam anfangs nur in bakteriellen Mutagenitätstests zum Einsatz. In der Folgezeit wurde die Verwendung auf viele weitere Genotoxizitätstests, wie an Hefen und kultivierten Säugerzellen, ausgedehnt. (NATARAJAN *et al.*, 1976; MADLE und OBE, 1977; WEINSTEIN *et al.*, 1977; MATSUOKA *et al.*, 1979). In Experimenten mit verschiedenen Cytostatika, die auch in der Krebstherapie Anwendung finden, zeigte sich ein breites Wirkungsspektrum von S9, da die klastogene Aktivität mutagener Substanzen auf verschiedene Weise modifiziert werden kann. Der Zusatz von S9 kann eine Aktivierung (Cyclophosphamid), Verstärkung (Bleomycin) oder Verminderung (Adriamycin und Neocarcinostatin) der Wirkung zur Folge haben

oder ohne Auswirkungen (Actinomycin D, Mitomycin C, Cytosinarabinosid, Methotrexat und Vincristin) bleiben (AU und HSU, 1982).

1.5 Verfahren der Schadstoffkonzentration zur Gewässeruntersuchung

1.5.1 Blue-Cotton- / Blue-Rayon-Methode

Der Mensch ist in seiner Umwelt von zahlreichen mutagenen und karzinogenen Substanzen umgeben (AMES, 1983, 1987; HAYATSU, 1991). Weltweit bemühen sich Wissenschaftler umweltbedingte Mutagene sowohl qualitativ als auch quantitativ zu bestimmen. Die Schwierigkeit liegt darin, daß diese Substanzen in nur sehr geringer Konzentration existieren. Die Blue-Cotton/Blue-Rayon-Methode bietet eine Möglichkeit, Mutagene über einen Konzentrierungsprozeß aus der Umwelt zu isolieren und nachzuweisen.

Blue-Cotton ist ursprünglich Baumwolle, an die der blaue Farbstoff Trisulfokupferphthalocyanin (CPT: Copper Phthalocyanine Trisulfonate) kovalent gebunden ist (Abbildung 4) (HAYATSU *et al.*, 1983b). Ein großer Vorteil dieser Substanz liegt in ihrer Fähigkeit ausschließlich PAK und heterozyklische Kohlenwasserstoffe, die drei und mehr Ringsysteme besitzen, sehr effektiv zu adsorbieren. Viele PAK in der Umwelt wirken mutagen und oft auch karzinogen.

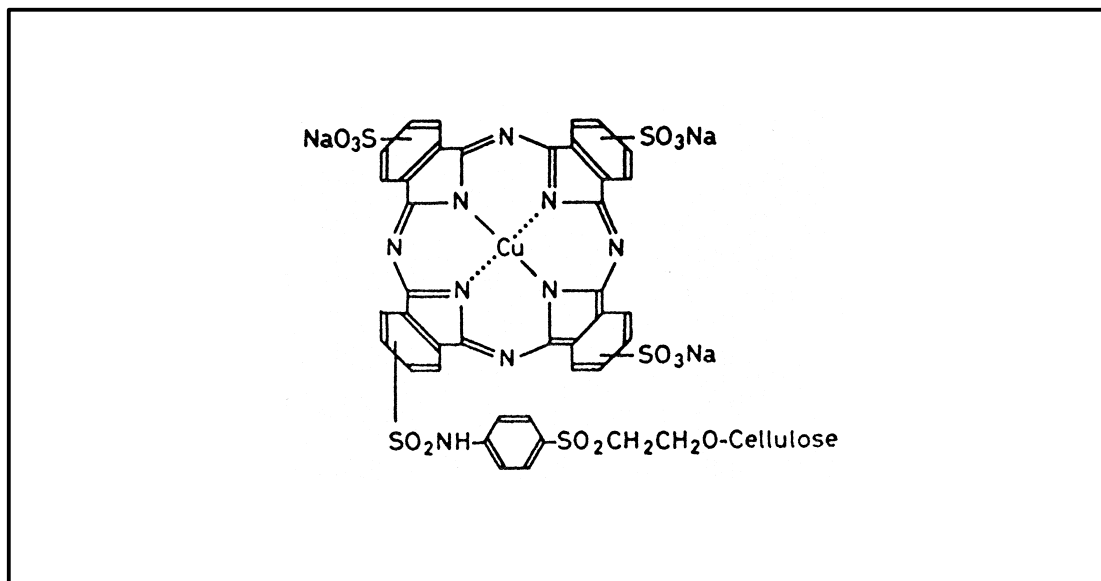


Abbildung 4: Chemische Struktur von Blue-Cotton (aus HAYATSU *et al.*, 1983b)

1.5.1.1 Historischer Hintergrund

Die Entdeckung der Eigenschaften des Blue-Cotton erfolgte eher zufällig. Einige Substanzen, wie zum Beispiel Porphyrine, können die Wirkung von Mutagenen und Karzinogenen inhibieren. Häm, Bestandteil von Hämoglobin und Myoglobin, inhibiert selektiv die Aktivität von Mutagenen, die polyzyklische Strukturen besitzen, indem es Komplexe mit diesen Verbindungen eingeht (ARIMOTO *et al.*, 1980b; HAYATSU *et al.*, 1993; HAYATSU, 1995). Häm hat keinen Einfluß auf die Mutagenität von Substanzen ohne ringförmige Struktur. (ARIMOTO *et al.*, 1980a, 1980b; HAYATSU *et al.*, 1993; HAYATSU, 1995; ARIMOTO-KOBAYASHI, 1997). ARIMOTO *et al.*, (1980a, 1980b) konnten zeigen, daß die Mutagenität von 8 nmol Benzo(a)pyren in *Salmonella typhimurium* TA98, bei Anwesenheit von S9 und 10 nmol Häm, um 50 % reduziert wird. In diesem Zusammenhang werden zwei Wirkmechanismen diskutiert, die für die Reduktion der mutagenen Wirkung verantwortlich sein könnten. Man vermutet, daß aufgrund einer Modifikation der Cytochrome P450 die metabolische Aktivierung der schädlichen Substanzen verhindert wird. Ebenfalls ist möglich, daß zwar eine Aktivierung stattfindet, das

aktivierte Mutagen aber in seiner Wirkung durch Komplexbildung mit dem Häm inhibiert wird. Pflanzliches Chlorophyll und seine stabile Form Chlorophyllin gehören auch zur Gruppe der Porphyrine. Sie besitzen eine ähnliche Struktur wie Häm und sind in der Lage die mutagene Aktivität polyzyklischer Verbindungen zu inhibieren. HAYATSU *et al.* (1985, 1986b) konnten in menschlichem Urin nach Aufnahme fleischhaltiger Nahrung mutagene Substanzen nachweisen. Die Aufnahme von Chlorophyllin verminderte deutlich den Gehalt an mutagenen Substanzen im Urin. Kupferphthalocyanin hat eine porphyrinartige Struktur und zeigt ähnliche Selektivität und Affinität bezüglich polyzyklischer Verbindungen.

HAYATSU (1983c) untersuchte während seiner Lehrtätigkeit Kreide auf mögliche Mutagenität, mit dem Ergebnis, daß Kreidestaub von blauer Kreide mutagen, der von weißer hingegen nicht mutagen wirkte. Weitere Untersuchungen ergaben, daß das zum Färben der Kreide verwendete blaue Pigment Kupferphthalocyanin eine mutagen wirkende Verunreinigung enthielt. Aufgrund der sehr ähnlichen Struktur mit Häm lag die Vermutung nahe, daß dieses Pigment einen Komplex mit PAK bilden und diese adsorbieren konnte und somit für den routinemäßigen Einsatz als Adsorbens für polyzyklische aromatische Verbindungen geeignet schien. Auf der Suche nach einem passenden Trägermaterial wählte man Baumwolle, da dieses Material im Wasser anschwillt und so einen guten Kontakt zu Molekülen in der Lösung erlaubt. Darüber hinaus ist sie sehr kostengünstig, ungiftig und einfach in der Handhabung.

1.5.1.2 Präparation von Blue-Cotton und Blue-Rayon

Phthalocyanine sind blaue und grüne Pigmente, die auf vielfältige Weise kommerziell zum Einsatz kommen (MOSER und THOMA 1983). Sie besitzen eine große Hitze- und Lichtstabilität und ein Farbverlust erfolgt erst nach Chlorierung des Pigments.

Es gibt eine Reihe Phthalocyanine, die aufgrund ihrer porphyrinartigen Struktur PAK adsorbieren können. Das Kupferphthalocyaninderivat C.I. Reactive Blue 21 ist für diesen Zweck besonders geeignet, da es mit Hydroxylgruppen der Zellulose

reagiert. Es besitzt drei schwefelhaltige Substituenten, die die Verbindung stark hydrophil machen und den Einsatz in wässrigen Medien begünstigt.

Die Verbindung zwischen C.I. Reaktive Blue 21 und Zellulose erfolgt nach der Schotten-Baumann-Reaktion. Die Kondensation erfolgt in wässrigem Medium unter alkalischen Bedingungen bei 70°C und dauert etwa zwei Stunden (HAYATSU, 1983b). Anschließend wird die Baumwolle mehrfach mit Wasser und DMSO gewaschen, um möglichst alle ungebundenen Pigmente zu entfernen. Da während des Herstellungsprozesses bereits PAK adsorbiert werden können, erfolgt zunächst eine Behandlung mit einer Mischung aus Methanol und konzentriertem Ammoniak (50:1) und danach mit Methanol. Baumwolle, die nach diesem Verfahren präpariert wird, zeigt einen reproduzierbaren CPT-Gehalt von etwa 10 µmol pro Gramm getrocknetem Material und einen Gehalt an ungebundenem Pigment von etwa 6 ppm.

Bei dem Versuch diese Methode zu optimieren stieß man auf amorphe Rayonfasern, eine Art Kunstseide, die nach dem gleichen Prozeß wie Baumwolle gefärbt werden. Rayon kann die dreifache Menge des Farbpigments C.I. Reaktive Blue 21 binden und enthält etwa 30 µmol CPT pro Gramm. Der Gehalt an freiem Pigment beträgt weniger als 1ppm. Amorphe Rayonfasern sind geringfügig schwächer gegen Zug- und Spannkraften als Baumwolle. Durch starkes Schütteln im Wasser können kleine Stücke, die etwa 0,5 % der eingesetzten Menge ausmachen, abbrechen (HAYATSU, 1990). Diese geringe Menge nimmt keinen Einfluß auf das Ergebnis und wird deshalb vernachlässigt (SAKAMOTO und HAYATSU, 1988).

1.5.1.3 Spezifität als Adsorbens für Mutagene

Die meisten Techniken zur Konzentration organischer Verbindungen beinhalten eine Vorbehandlung mit Lösungsmitteln und Adsorption an Aktivkohle, Silikaten und organischen Polymeren. Bei diesen Techniken ist die Adsorptionsspezifität bezüglich der Struktur der zu adsorbierenden organischen Substanzen relativ gering. Im Gegensatz dazu zeigt die Adsorption an Blue-Cotton/Blue-Rayon eine sehr hohe Spezifität gegenüber polyzyklischen Verbindungen mit drei oder mehr aromatischen oder heterozyklischen Ringen. Substanzen mit weniger als drei Ringstrukturen werden bis auf wenige Ausnahmen in nur sehr geringem Maße oder gar nicht

adsorbiert (HAYATSU *et al.*, 1983a). Die Adsorption an Blue-Cotton/Blue-Rayon wird von der Menge an gebundenem Pigment bestimmt. Die Fasern werden in einer mutagenhaltigen Lösung geschüttelt, anschließend mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Elution mit Methanol und konzentriertem Ammoniak im Verhältnis 50:1 hat sich als sehr effektiv erwiesen, wobei im Vergleich zu anderen Lösungsmitteln die größte Menge der zuvor adsorbierten Substanzen wieder heruntergelöst wird.

Lange Zeit gab es keine Untersuchungen über die Affinität aromatischer Verbindungen, sich an CPT zu binden. Ein Grund dafür wird darin gesehen, daß CPT in wässrigen Lösungen Dimere oder höhere Aggregate bildet, die eine quantitative Untersuchung erschweren. Erst die Bindung an ein Trägermaterial wie Zellulose oder Rayon verhindert die Ausbildung solcher Aggregate zwischen mehreren CPT-Molekülen. HAYATSU *et al.*, (1986a) konnten in Titrationsversuchen mit verschiedenen polyzyklischen aromatischen und heterozyklischen Verbindungen zeigen, daß diese mit CPT Komplexe im Verhältnis 1:1 bilden. Dieser Befund wurde mit spektroskopischen Untersuchungen bestätigt. In organischen Lösungsmitteln findet keine Komplexbildung statt. Die adsorbierten Substanzen können somit effektiv abgelöst werden.

1.5.1.4 Einsatz in Mutagenitäts- und Karzinogenitätsuntersuchungen

Die Blue-Cotton-Methode ist für den Einsatz im Biomonitoring geeignet. Eine große Zahl umweltbedingter Mutagene und Karzinogene besitzen polyzyklische aromatische Strukturen. Zu dieser Verbindungsklasse gehören PAK, heterozyklische Amine und Pyrolyseprodukte, die bei der Zubereitung von Nahrungsmitteln anfallen. Mycotoxine wie Aflatoxin B1 können ebenfalls von Blue-Cotton adsorbiert werden, auch wenn ihre Struktur nicht perfekt planar ist.

Mutagene in Nahrungsmitteln

Es ist bekannt, daß ein Zusammenhang zwischen verschiedenen Krebsarten und der aufgenommenen Nahrung besteht. Bei der Zubereitung von Nahrungsmitteln können aus Proteinen und Aminosäuren heterozyklische Amine entstehen, von denen die meisten in Mutagenitätstests bei Nagern als Karzinogene nachgewiesen werden

konnten (SUGIMURA, 1985, 1988). Mit Hilfe der Blue-Cotton-Methode wurden verschiedene Nahrungsmittel auf ihre mögliche mutagene Wirkung untersucht. Dazu wurden die Nahrungsmittelproben in siedendem Wasser extrahiert und das Wasser anschließend der Blue-Cotton-Methode unterzogen. Die in Folge der Elution gewonnenen Extrakte wurden anschließend dem Ames-Test unterzogen. An zwei Beispielen soll dieser Zusammenhang verdeutlicht werden: HAYATSU *et al.* (1983a, 1983b) fanden eine lineare Dosis-Effekt-Beziehung, bei der die Mutagenität gekochter Nahrungsmittel von der Menge, Dauer und Art der Zubereitung abhängig ist. Nach dem Genuß von gebratenem Fleisch wiesen sie in Exkrementen mutagene Substanzen nach (HAYATSU *et al.*, 1986b). KUHNLEIN *et al.*, (1981) zeigten, daß die Fäzes von Vegetariern deutlich weniger mutagene Substanzen enthielten als von Nichtvegetariern. Auch in dem traditionellen japanischen Gericht Bonito (geräucherter und getrockneter Fisch) wurden stark mutagen wirkende Substanzen nachgewiesen, die während der Räucherung bei 80-120 °C entstanden sein mußten. Sie ließen sich mit chromatographischen Methoden als heterozyklische aromatische Amine identifizieren (KIGUGAWA *et al.*, 1985, 1986; KIGUGAWA und KATO, 1987). Im Körper reichern sich diese auch in der Gallenflüssigkeit an. MANO *et al.* (1993) untersuchten die Gallenflüssigkeit auf ihre mögliche Mutagenität. Von 24 Gallenproben ergaben 14 ein positives Ergebnis im Ames-Test. Japan ist ein Land mit einer hohen Sterblichkeitsrate infolge von Gallenblasenkrebs.

Nahrungsmittel enthalten oft Substanzen, wie ungesättigte Fettsäuren (Ölsäure, Linol- und Linolensäure), die eine mutagene Wirkung maskieren können (HAYATSU *et al.*, 1981a, 1981b). Man vermutet, daß schädliche Verbindungen dabei in Fettsäuremizellen eingeschlossen werden, wodurch eine Adsorption an der Baumwolle verhindert wird.

Zigarettenrauch

Die beim Rauchen entstehenden Mutagene tragen zur Ausbildung von Krebs bei und lassen sich unter anderem auch im Urin nachweisen (YAMASAKI und AMES, 1977; HAYATSU *et al.*, 1983c; SHIMADA und GUENGERICH, 1991). MOHTASHAMIPUR *et al.* (1985) wiesen mit Hilfe der Blue-Cotton-Technik eine deutliche Korrelation zwischen der Mutagenität des untersuchten Urins und der Anzahl gerauchter Zigaretten nach. Andere Methoden (XAD-2-Chromatographie) zeigten kein

Ergebnis. Die Analyse von Exkretionsprodukten gibt wichtige Informationen über die interne Exposition mit Mutagenen und deren Metabolismus.

Untersuchung von Gewässern

Ein weiteres Einsatzgebiet dieser Methode ist die Untersuchung von Wasser. Unabhängig voneinander wurden in Meerwasser (KIRA *et al.*, 1989, 1994, 1995, 1997), marinen Sedimenten (HASHIZUME *et al.*, 1992) und Flußwasser (HAYATSU *et al.*, 1983b; SAKAMOTO und HAYATSU, 1990; SAYATO *et al.*, 1990; KUSAMRAN *et al.*, 1994) mutagene Substanzen nachgewiesen.

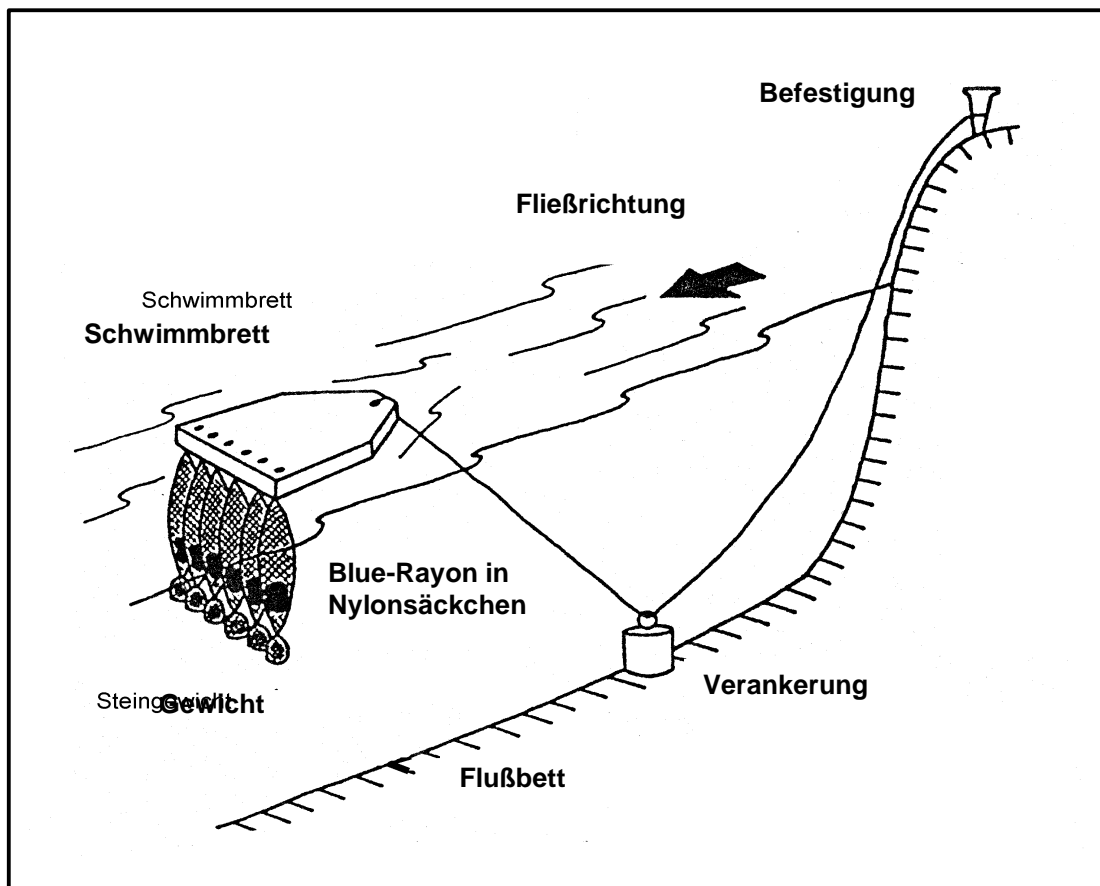


Abbildung 5: Blue-Rayon in Nylonsäckchen in einen Flußlauf eingebracht. (verändert nach SAKAMOTO und HAYATSU, 1990)

Für die Gewässeruntersuchung etablierten HAYATSU *et al.* (1983b) eine Standardmethode, die auch im Rahmen dieser Arbeit Anwendung fand (siehe 2.3). Mehrere Nylonsäckchen wurden mit jeweils 0,5 g Blue-Cotton oder Blue-Rayon gefüllt, mit einem Gewicht beschwert, an einem Schwimmbrett befestigt und für 24 h frei schwimmend in das zu untersuchende Gewässer eingebracht (Abbildung 5). Anschließend wurden die Proben im Labor mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Die Elution der Schadstoffe erfolgte mit Methanol-Ammoniak (50:1), wobei das Lösungsmittel an einem Rotationsverdampfer entfernt, der Rückstand in DMSO gelöst und auf Mutagenität getestet wurde. Diese Technik fand erstmals Anwendung im Rahmen der Untersuchung des Flusses Asahi in Okayama. Wasserproben aus dem Industriegebiet der Stadt induzierten nach metabolischer Aktivierung in dem Teststamm TA 98 von *Salmonella typhimurium* über 2000 Revertanten pro Gramm Blue-Cotton. Proben, die außerhalb des Industriegebietes flußaufwärts entnommen wurden, induzierten 40 Revertanten. An den Flüssen Yodo, Katsura, Kitsu und Uji in Osaka konnten an mehreren Stellen mutagene Substanzen im Wasser nachgewiesen werden (SAKAMOTO und HAYATSU, 1990). Die Quelle der Verunreinigung war jedes Mal der Abfluß einer Kläranlage, die stark mutagene polyzyklische Substanzen in die Flüsse abgab.

HAYATSU (1990, 1992) gelang es mit Hilfe dieser Technik, mutagene Substanzen in der Luft nachzuweisen. Dazu wird Luft durch einen Glasfaserfilter gesaugt und die Partikel, die auf dem Filter haften bleiben, mittels Ultraschall abgelöst. Nach Extraktion kann eine wässrige Lösung des Extraktes mit der Blue-Cotton-Methode untersucht werden.

1.5.2 Blue-Chitin-Methode

1.5.2.1 Herstellung von Blue-Chitin

Die Blue-Chitin-Methode stellt eine Weiterentwicklung der Blue-Cotton-Methode dar (HAYATSU *et al.*, 1996). Hierbei ist der blaue Farbstoff nicht an Baumwolle sondern an Chitin (poly-N-Acetylglucosamin) gebunden.

Ausgehend von der Blue-Cotton-Methode wurde ein Weg zur weiteren Vereinfachung dieser Technik gesucht. Die Basis der Weiterentwicklung bilden folgende Überlegungen: Ein Adsorbens wird in eine Säule gefüllt (Abbildung 6) und mit einer Spritze verbunden. Die zu untersuchenden Proben werden hindurchgespritzt. Für diesen Zweck ist puderförmige Zellulose ungeeignet, da der Pigmentgehalt mit etwa $10 \mu\text{mol CPT/g}$, zu gering ist, um eine genügend große Menge an Schadstoffen zu adsorbieren. Blue-Rayon als Alternative besitzt zwar einen höheren Pigmentgehalt, ist aber nicht in Puderform erhältlich. Die Lösung fand man schließlich mit Chitin, das aufgrund seiner fein dispersen Form eine große Adsorptionsoberfläche bietet und sich gut mit C.I. Reaktive Blue 21 anfärben ließ. Die Reaktionsbedingungen zur Herstellung von CPT-Chitin waren identisch mit denen von Blue-Cotton. HAYATSU *et al.* (1996) beschrieben den Vorgang folgendermaßen: Einer Lösung von 0,8 g C.I. Reaktive Blue 21 und 6,8 g Natriumsulfat in 133 ml Wasser wird 2 g Chitin zugesetzt und 20 Minuten bei 30°C gerührt. Unter Zugabe von 2,7 g Natriumcarbonat, läßt man die Lösung weitere 15 Minuten bei 30°C stehen und erhitzt sie anschließend für 60 Minuten auf 70°C . Eine Verlängerung der Reaktionszeit erhöhte nicht den Gehalt an gebundenem Pigment. Beim Einsatz größerer Mengen CPT wurde mehr Pigment an Chitin gebunden, allerdings stieg auch der Gehalt an ungebundenem Pigment, der selbst durch intensives Waschen nicht entfernt werden konnte. Nach der Reaktion wurde die Lösung gefiltert und der Rückstand auf dem Filter mit einem Liter Wasser und 100 ml DMSO gewaschen. Die puderförmige Substanz wurde über Nacht in DMSO aufbewahrt, am nächsten Tag erneut filtriert und mit DMSO (100 ml), Methanol (100ml), Methanol-Ammoniak (200 ml), Methanol (100 ml) und Diethylether (100ml) gewaschen und anschließend getrocknet. Mittels Photometeranalyse konnte der Pigmentgehalt von Blue-Chitin auf etwa $44 \mu\text{mol/g}$ bestimmt werden. Damit war er fast doppelt so hoch wie bei Blue-Rayon und vierfach so hoch wie bei Blue-Cotton. Untersuchungen zeigten, daß polyzyklische aromatische oder heterozyklische Verbindungen mit drei oder mehr planaren Ringen nahezu vollständig von Blue-Chitin adsorbiert wurden.

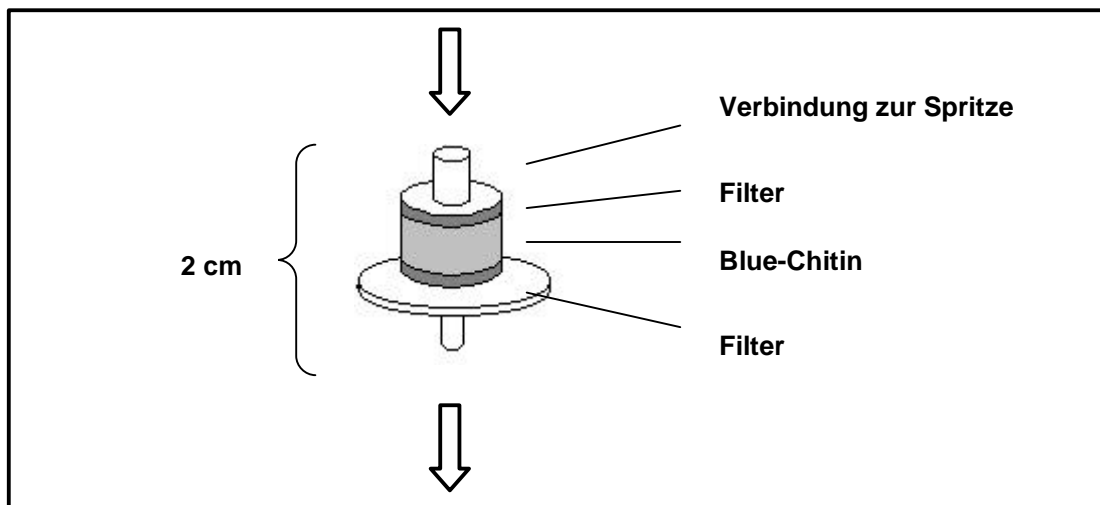


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Blue-Chitin-Säule

1.5.2.2 Anwendung der Blue-Chitin-Methode

Die Blue-Chitin-Methode eignet sich für alle Untersuchungen, die auch mit der Blue-Cotton/Blue-Rayon-Methode durchgeführt werden können. Ihr Vorteil liegt darin, daß auch gering volumige Proben von unter 5 ml untersucht werden können.

Zur Gewässeruntersuchung wird ein Liter einer vorher filtrierten Wasserprobe mit einer Durchflußrate von etwa 10 ml/min durch die Säule gegeben. Anschließend wird die Säule mit 10 ml Wasser gewaschen und die adsorbierten Substanzen mit 100 ml Methanol-Ammoniak eluiert. Das CPT-Chitin wird entnommen und noch einmal 30 Minuten mit 100 ml Methanol-Ammoniak behandelt und filtriert. Das Lösungsmittel wird mit einem Rotationsverdampfer vollständig entfernt, der Rückstand in DMSO gelöst und einem Mutagenitätstest mit und ohne metabolischer Aktivierung unterzogen.

SAKAMOTO *et al.* (1996) untersuchten Parameter, wie Durchflußgeschwindigkeit und Probenvolumen, um Einflußgrößen auf die Adsorption zu erforschen. Sie wiesen nach, daß die Geschwindigkeit, mit der die zu untersuchenden Proben durch die Säule gegeben wurden, keinen Einfluß auf die Adsorption hatte. Selbst Substanzen mit einer geringen Affinität zu CPT wurden bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 20 ml/min noch effektiv adsorbiert. In der gleichen Versuchsreihe wurde der Einfluß

des Probenvolumens auf die Adsorptionsfähigkeit von CPT-Chitin untersucht. Es zeigte sich folgender Zusammenhang: Je größer das zu untersuchende Volumen, desto geringer ist die Adsorptionsleistung. Größere Volumina können dennoch effektiv auf Mutagenität untersucht werden, wenn entsprechend viele Blue-Chitin-Säulen hintereinander geschaltet und miteinander verbunden werden.

In einer Untersuchung wurden verschiedene Techniken (Blue-Rayon, Blue-Chitin, XAD) zur Konzentrierung von Wasserproben miteinander verglichen. SAKAMOTO *et al.* (1996) zeigten, daß mit allen Methoden solche Substanzen in Flußwasser nachweisbar waren, die ein positives Ergebnis im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* TA98 und metabolischer Aktivierung lieferten. Die Blue-Chitin-Methode erwies sich jedoch am effektivsten, gefolgt von der Blue-Rayon-Methode. Die XAD-Methode schnitt bei dieser Untersuchung am schlechtesten ab. XAD ist ein unpolares Copolymer aus Styrendiphenylbenzen und adsorbiert unspezifisch organische Substanzen. Erwartungsgemäß werden Dialkylnitrosamine sehr effektiv von dieser Substanz adsorbiert, nicht jedoch von CPT, das nur sehr spezifisch polyzyklische aromatische und heterozyklische Kohlenwasserstoffe mit drei oder mehr Ringen adsorbiert. Langkettige Fettsäuren können die mutagene Wirkung anderer Substanzen maskieren und den *Salmonella*-Test störend beeinflussen (HAYATSU *et al.*, 1981a). Solche langkettigen Fettsäuren können mit der XAD-Technik adsorbiert werden und so zu einem schlechteren Ergebnis geführt haben. Es wird auch die Möglichkeit diskutiert, daß die Affinität der im Flußwasser vorhandenen polyzyklischen Mutagene gegenüber XAD geringer war als die Affinität gegenüber CPT.

1.6 Metall- und metalloorganische Verbindungen

1.6.1 Charakterisierung

Als metallorganische Verbindungen sind Substanzen definiert, die mindestens eine Bindung zwischen einem Metall- und einem Kohlenstoffatom aufweisen. Stellen Germanium (Ge), Arsen (As), Selen (Se) oder Tellur (Te) das Metallatom, spricht man von metalloorganischen Verbindungen (THAYER, 1988). Charakteristisch für alle biologisch wichtigen metall(oid)organischen Verbindungen ist die relative Stabilität in wässrigen Lösungen. Dies ist unter anderem für die Betrachtung des Zellmetabolismus, den Transport und die Mobilisierung in aquatischen Ökosystemen bedeutsam. Metall(oid)organische Verbindungen kommen in der Umwelt aufgrund natürlicher biogeochemischer Prozesse oder anthropogenen Eintrags vor. Bei der biologischen Methylierung haben Mikroorganismen maßgeblichen Einfluß (THAYER, 1984), da diese auch an Abbau und Detoxifizierung metall(oid)organischer Verbindungen beteiligt sind (GADD, 1993). Solche Prozesse sind Komponenten natürlicher globaler biogeochemischer Kreisläufe für Elemente wie Quecksilber (Hg), As, Zinn (Sn), Blei (Pb), Se, Te, Ge und Antimon (Sb). Die weiteren Ausführungen beschränken sich auf die Elemente Hg, Sn und As, die in dieser Arbeit untersucht wurden.

1.6.2 Bioalkylierung

Biologische Alkylierung (Bioalkylierung) ist ein Mechanismus, bei dem Alkylgruppen an Metall- oder Metalloidatome unter Ausbildung einer Metall(oid)-Kohlenstoffbindung gebunden werden. Besteht die zu übertragende aliphatische Gruppe nur aus einer Methylgruppe, spricht man von Biomethylierung. Die intrazelluläre Methylierung organischer Moleküle, wie Basen der Nukleinsäuren, Proteine, Fettsäuren und Polysaccharide, ist ein wichtiger Aspekt der Zellphysiologie von Pro- und Eukaryonten und wird von S-Adenosylmethionin (SAM), Methyltetrahydrofolsäure (MeTHF) und Methylcobalamin (MeCoB₁₂), ein Vitamin B₁₂ Derivat, durchgeführt. Diese Substanzen sind auch an der Biomethylierung

toxischer Metalle beteiligt (THAYER und BRINCKMAN, 1982; THAYER, 1988, 1989), wobei das Metall als Elektrophil reagiert und die Methylgruppe gewöhnlich als Carbanion (CH_3^-) auf das Metall im höheren Oxidationszustand übertragen wird. MeCoB₁₂ (Methylierung von Hg und Sn), SAM (Methylierung von As und Se) und MeTHF können Methylgruppen auch als Radikale (CH_3^\cdot) oder Carboniumionen (CH_3^+) übertragen. Auch andere Substanzen wie Betain und Huminsäuren können Metallspezies oxidieren und methylieren (THAYER, 1989).

Methylierte metall(oid)organische Verbindungen lassen sich mit empfindlichen Analysemethoden in verschiedenen anaeroben Habitaten wie Ausgasungen aus Mülldeponien, Klärschlämmen (HIRNER *et al.*, 1994; FELDMANN und HIRNER, 1995) und verschiedenen Flußsedimenten (KRUPP, *et al.*, 1996) nachweisen.

Die Methylierung von Hg kann von vielen Bakterien und anderen Mikroorganismen in aquatischen und terrestrischen Habitaten durchgeführt werden, wobei die maximale Methylierung unter anaeroben Bedingungen erreicht wird. Dabei können zwei verschiedene Spezies, Monomethylquecksilber (CH_3Hg^+) und Dimethylquecksilber ($(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$), entstehen. In der Atmosphäre kommt es zu einem raschen photolytischen Zerfall von Methylquecksilber. In Flüssen sind 95% partikulär gebunden (CRAIG, 1986). Die Umwandlung zwischen anorganischen und organischen Hg-Verbindungen findet hauptsächlich mikrobiell in der freien Wassersäule und in den obersten Sedimentschichten statt, wobei Methylquecksilber ins Wasser abgegeben wird. Die Bildung dieser Substanz wird über Temperatur, Hg-Gehalt und Nährstoffangebot für die Bakterien reguliert. Eine Verminderung des pH-Wertes wirkt sich als erhöhte MeHg-Bildung aus. Der Eintrag von saurem Regen in Gewässer trägt somit zu einer erhöhten Mobilisierung organischer Hg-Verbindungen bei (CRAIG, 1986). Den gleichen Einfluß übt eine erhöhte Sulfatdeposition aus, die sich positiv auf die Aktivität sulfatreduzierender Bakterien auswirkt. CHOI *et al.* (1994) untersuchten eingehend solche Stoffwechselwege, die an der Methylierung von Hg bei *Desulfovibrio desulfuricans* LS beteiligt sind.

Methylierte Zinnverbindungen sind in der Umwelt so weit verbreitet, daß man nur schwer abschätzen kann, ob sie von anthropogenem Eintrag, über abiotische und biotische Methylierungsreaktionen, oder aus dem Abbau komplexer Zinnverbindungen entstanden sind (THAYER und BRINCKMAN, 1982; BLUNDEN und

CHAPMAN, 1986; COONEY, 1988). In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, daß anorganisches Zinn sowohl in reiner Bakterienkultur von *Pseudomonas spec.*, als auch in natürlichen Wasser- und Sedimentproben methyliert werden konnte (HALLAS *et al.*, 1982). Tetramethylzinn kann auch abiotisch in Folge einer Disproportionierungsreaktion entstehen.

In vielen aquatischen Habitaten wurden methylierte Arsenverbindungen nachgewiesen (TAMAKI und FRANKENBERGER, 1992). Die Methylierung von As erfolgt dabei über den Transfer eines Carboniumions von SAM auf anorganisches As und wurde von CHALLENGER (1945) bei verschiedenen Pilzen beobachtet. Bakterien sind an der Entstehung einer Vielzahl von Arsenderivaten, einschließlich Di- und Trimethylarsin, beteiligt. Auch in höheren Organismen, einschließlich Säugetieren, kommt Biomethylierung von Arsenverbindungen vor. Bisher ist noch nicht bekannt, ob bei diesem Prozeß die intestinale Mikroflora eine Rolle spielt (THAYER, 1984). Der Arsenkreislauf in terrestrischen Organismen wird über einfache methylierte Verbindungen charakterisiert. In aquatischen Systemen dominieren komplexe Arsenverbindungen. Methylierte Verbindungen stammen aus dem Abbau solcher komplexen Verbindungen (ANDREAE, 1986).

Die meisten Metalle und Metalloide sind für Mikroorganismen giftig. Es wird vermutet, daß die Methylierung an der Entgiftung dieser Substanzen beteiligt ist. Methylierte Arsenverbindungen sind weniger toxisch als anorganisches As. Sie binden schlechter an Zellwände und biologische Moleküle und können schneller aus der Zelle ausgeschieden werden (THAYER, 1984). Für Hg^{2+} ist dieser Detoxifizierungsmechanismus umstritten, weil aufgrund der Biomethylierung MeHg^+ entsteht, das sehr viel toxischer ist, als seine anorganische Form, auch wenn es sehr schnell aus der Zelle hinaus diffundieren kann.

Mikroorganismen können organische Metall(oid)verbindungen nicht nur synthetisieren, sondern sind auch maßgeblich an ihrem Abbau beteiligt. Bei den meisten Bakterien erfolgt die Hg-Resistenz über die enzymatische Reduktion von Hg^{2+} mittels Quecksilberreduktase zu Hg^0 , das flüchtig und geringer toxisch ist als Hg^{2+} . Bei organischen Quecksilberverbindungen muß erst die C-Hg-Bindung enzymatisch von der Organoquecksilberlyase gespalten werden, bevor eine Reduktion stattfinden kann. Dieser Vorgang kann in Bakteriengruppen, wie

Sulfatreduzierern und Methanogenen, beobachtet werden (OREMLAND *et al.*, 1991, MATILAINEN, 1995). MISRA (1992) konnte zeigen, daß zumindest bei *Staphylococcus aureus* die Quecksilbertoleranz genetisch determiniert ist. Einige Bakterienarten aus den Gattungen *Nocardia*, *Pseudomonas* und *Alcaligenes* können organische Arsenverbindungen in aquatischen und terrestrischen Habitaten demethylieren (ANDREAE, 1986). Der Abbau organischer Zinnderivate erfolgt über eine stufenweise Entfernung der organischen Gruppen und führt so zu einer verminderten Toxizität. Die Spaltung der Sn-C-Bindung kann mittels biotischer aber auch abiotischer Mechanismen vollzogen werden (BLUNDEN und CHAPMAN, 1986). Die chemische Spaltung erfolgt über Mineralsäuren oder andere Substanzen. Physikalisch können UV- und γ -Strahlung organische Zinnverbindungen abbauen. Der biotische Abbau erfolgt in erster Linie über Bakterien und einige Pilze.

1.6.3 Toxizität

Infolge der Biomethylierung erhalten Metalle und Metalloide veränderte Eigenschaften bezüglich ihrer Mobilität in der Umwelt und ihrer Toxizität im Organismus. Das toxische Potential organischer Metall(oid)verbindungen ist deutlich höher einzustufen, als das ihrer entsprechenden anorganischen Spezies. Eine Ausnahme stellen organische Arsen- und Antimonverbindungen dar. Der Fettlöslichkeit kommt dabei eine besondere Rolle zu, da diese Substanzen biologische Membranen durchdringen und im Körper toxische Reaktionen hervorrufen können. Metall(oid)organische Verbindungen werden von Lebewesen akkumuliert und über die Nahrungskette weitergegeben (GADD, 1993).

1.6.3.1 Quecksilberverbindungen

Erosion und Auswaschung führen zu einem jährlichen Eintrag von mehreren 1000 Tonnen Quecksilber in die Ozeane. Ausgasungen aus der Erdkruste und dem Meer in die Atmosphäre betragen etwa 30 000 Tonnen (LEONARD *et al.*, 1983). Etwa 6000-10 000 Tonnen werden jährlich industriell produziert und zur Herstellung von Elektrogeräten, Schiffsfarben, Zahnfüllungen und anderem genutzt. Davon werden lediglich etwa 20 % recycled, während der Rest als Abfall in Flüsse, Seen, Böden

und die Atmosphäre gelangt. In der Umwelt unterliegen die Quecksilberverbindungen dann verschiedenen Transformationen. Ein Beispiel ist die Biomethylierung anorganischer Quecksilberverbindungen zu hochtoxischen Methylquecksilberverbindungen (siehe 1.6.2).

Alle Quecksilberspezies unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Giftigkeit. Flüssiges Quecksilbermetall zeigt unter allen Verbindungen bei Aufnahme in den Organismus die geringste Toxizität. Die Absorption über den Gastrointestinaltrakt ist nur sehr gering und es kann leicht mit den Fäzes wieder ausgeschieden werden (LEONARD *et al.*, 1983). Quecksilberdämpfe, die aufgrund des niedrigen Dampfdruckes des Metalls entstehen, sind hingegen sehr giftig. Das Metall kann leicht über die Membran der Lungenalveolen in den Blutstrom übertreten. In den Erythrozyten, der Leber und den Nieren erfolgt eine enzymatische Oxidation zu ionischem Quecksilber (Hg^{2+}) (BOFFETTA *et al.*, 1993). Akkumulation und Deposition finden hauptsächlich in Gehirn und Nieren statt, in geringerem Maße auch in anderen Organen. Eine Elimination erfolgt nur sehr langsam und kann Jahre dauern.

Alle organischen Quecksilberverbindungen sind weitaus toxischer als die anorganischen Spezies. Methylquecksilberchlorid hat auf viele verschiedene biologische Systeme einen schädlichen Einfluß und kann die Zelle in unterschiedlichen Bereichen schädigen. Die Substanz beeinträchtigt in starkem Maße Neuronen, Neuroglia und Nervenfasern und verursacht neurologische Ausfälle, die als Minamata-Krankheit bezeichnet werden. Weiterhin wird die Synthese von DNA, RNA und Proteinen gestört und die Funktion von Membranen, wie Permeabilität, aktive und passive Transportvorgänge, Abgabe oder Aufnahme von Transmittern beeinträchtigt und elektronische Veränderungen von Axon- oder Muskelmembranen hervorgerufen. In allen Zellen werden eine große Anzahl membrangebundener oder cytosolischer Enzyme inhibiert.

Organische Quecksilberverbindungen schädigen die DNA. Es konnte gezeigt werden, daß MeHgCl verschiedene mutagene Effekte, wie Punktmutationen in CHO-Zellen, Chromosomenaberrationen in Pflanzenzellen und Säugetierzellen und Genommutationen in Knochenmarkszellen und männlichen Keimzellen beim Hamster, hervorruft (BETTI *et al.*, 1993). In fast allen Untersuchungen konnte besonders der Einfluß auf den mitotischen Spindelapparat und die Induktion von

stark kondensierten C-Mitosen beobachtet werden, was zu Aneuploidie und Polyploidie führen kann (LEONARD *et al.*, 1983; SAGER *et al.*, 1983; VOGEL *et al.*, 1985). Dabei interagiert MeHg direkt mit den Mikrotubuli, indem die Substanz an die freien Sulfhydrylgruppen der Tubulinuntereinheiten bindet.

Nach einer Exposition macht man sich die hohe Affinität des Quecksilbers zu Sulfhydrylgruppen zunutze. Eine Methode, toxische Schwermetallionen aus dem Körper zu entfernen, ist die Chelat-Therapie. Bei MeHg-Vergiftungen werden heute besonders Dithiole, wie 2,3-Dimercapto-1-propansulfonat und *meso*-2,3-Dimercaptobernsteinsäure eingesetzt. Bei der Reaktion bindet das MeHg⁺-Kation an die SH-Gruppen der Verbindungen.

1.6.3.2 Zinnverbindungen

Zinn kann in den Oxidationsstufen Sn²⁺ und Sn⁴⁺ auftreten, wobei die organischen Zinnverbindungen nahezu alle tetravalent sind. Anorganische Zinnverbindungen können chemisch und biologisch zu flüchtigen organischen Verbindungen umgewandelt und über den biogeochemischen Kreislauf verbreitet werden (BLUNDEN und CHAPMAN, 1982, 1986; CRAIG, 1988; ASHBY und CRAIG, 1988; HAMASAKI *et al.*, 1991). In Abhängigkeit von organischen Substituenten können die Substanzen als Mono-, Di-, Tri- und Tetraorganozinnverbindungen klassifiziert werden.

Organische Zinnverbindungen finden vielfach industrielle Verwendung als Stabilisatoren für Kunststoffe, Biozide, Katalysatoren und Antifäulniszusätze in Farben. Die weite Verbreitung dieser Substanzen fördert den Eintrag in Gewässer und schadet aquatischen Organismen (SNOEIJ *et al.*, 1987). Auch der Mensch ist in nicht unerheblichem Maße diesen Substanzen ausgesetzt. Organische Zinnverbindungen können über die Nahrungskette weitergegeben werden und reichern sich im Körper an (BOYER, 1989; GANGULY *et al.*, 1992; HAMASAKI *et al.*, 1992, HAMASAKI *et al.*, 1993; GANGULY, 1994). In Tierversuchen konnten verschiedene toxische Reaktionen an Zentralnervensystem, Haut, Leber, Nieren, Lunge, Blut, Fortpflanzungsorganen und dem lymphatischen Gewebe nachgewiesen werden (BOYER, 1989). Einen Überblick über die Toxizität bei Säugetieren liefern

SNOEIJ *et al.*, (1987). Es besteht eine Korrelation zwischen Giftigkeit und der Länge und Anzahl aliphatischer Kohlenstoffketten, die mit dem Zinnatom verbunden sind (BORENFREUND und BABICH, 1987; BOYER, 1989; GANGULY, 1994). Allgemein nimmt die Toxizität in Säugetieren von tri- zu monoorganischen Zinnverbindungen ab. Tetraorganozinn wirkt ähnlich wie Triorganozinn. Die Effekte treten oft verzögert auf, was mit einer Umwandlung von Tetra- zu Triorganozinn in der Leber erklärt wird.

Die Toxizität innerhalb einer Klasse wird über die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette bestimmt. Innerhalb der Trialkylzinnverbindungen haben die niedrig substituierten Verbindungen Trimethylzinn und Triethylzinn die größten Effekte. Eine Zunahme der Kettenlänge reduziert die Toxizität bei Säugetieren.

Organische Zinnverbindungen üben ihren Einfluß in unterschiedlichen Organen aus. Trimethyl- und Triethylzinn sind stark neurotoxisch. Die Effekte reichen von einer verringerten Neurotransmitterausschüttung bis zu nekrotischen Veränderungen von Nervenzellen. Menschen, die infolge eines Unfalls Trimethylzinn ausgesetzt waren, zeigten verschiedene physische und psychische Veränderungen, wie Kopfschmerzen, Schwindel, Depressionen und Aggressivität (SNOEIJ *et al.*, 1987). Die Substanzen wirken ebenfalls stark hepato- und immunotoxisch.

Di- und Triorganozinnverbindungen interagieren mit der mitochondrialen Respiration und hemmen die mitochondriale ATP-Synthese (ALDRIGE, 1976; PENNINKS und SEINEN, 1980).

Im Vergleich zu anderen toxikologischen Wirkungen organischer Zinnverbindungen gibt es nur wenige Untersuchungen zur Genotoxizität (HAMASAKI *et al.*, 1992). GHOSH wies eine dosisabhängige Induktion von Mikrokernen, CA, SCE, sowie eine verzögerte Wirkung auf den Zellzyklus von menschlichen Lymphozyten nach (GHOSH *et al.*, 1989a, 1989b, 1990, 1991; GANGULY *et al.*, 1992, GANGULY, 1993).

Die meisten organischen Zinnverbindungen wirken stark antibakteriell, was eine Verwendung des Ames-Tests ausschließt. HAMASAKI *et al.* (1993) benutzten zur Untersuchung der Genotoxizität einen modifizierten bakteriellen Mutationstest mit *Salmonella typhimurium* und konnten einige Verbindungen als mutagen einstufen.

Anorganische Zinnverbindungen sind nur gering zytotoxisch. Sie werden kaum absorbiert, sind wasserlöslich und werden rasch aus Geweben entfernt (GANGULY *et al.*, 1992). SnCl_4 ist klastogen und induziert dosisabhängig CA und SCE (GHOSH *et al.*, 1988). Organische Zinnverbindungen hingegen zeigen eine hohe Fettlöslichkeit und Stabilität in biologischen Flüssigkeiten, wodurch eine ausgedehnte Penetration ins Gehirn und Anreicherung im Zentralnervensystem ermöglicht wird (VENUGOPAL und LUCKEY, 1978).

1.6.3.3 Arsenverbindungen

Toxische Arsenverbindungen werden hauptsächlich als natürlich vorkommendes anorganisches As über kontaminiertes Trinkwasser und über Nahrungsmittel aufgenommen, die in kontaminierten Böden gewachsen sind. As in den Oxidationsstufen +3 und +5 zeigt die höchste akute Toxizität (SNOW, 1992). Arsenat (As^{+5}) übt seinen toxischen Effekt über die Entkopplung von essentiellen Phosphorylierungsreaktionen aus und Arsenit (As^{3+}) über eine direkte Reaktion mit biologischen Makromolekülen (HEALY *et al.*, 1997). Die Methylierung der anorganischen Spezies ist Teil des Detoxifizierungsprozesses, da organische Arsenverbindungen deutlich weniger giftig wirken als die anorganischen Vertreter. Anhand von LD_{50} -Werten bei Ratten zeigt sich, daß Dimethylarsinsäure (DMA) ($\text{LD}_{50} = 2600 \text{ mg/kg}$) eine etwa 50fach geringere Toxizität aufweist als Arsenit ($\text{LD}_{50} = 41 \text{ mg/kg}$) (APOSCHIAN, 1989). Anorganisches As wird als Arsenat oder Arsenit aufgenommen. Arsenat wird chemisch im Blut und enzymatisch in der Leber zu Arsenit reduziert und erst zu Monomethylarsinsäure (MMA) und dann zu DMA methyliert. Der Methylierungsprozeß vermindert die akute Toxizität, da methylierte Arsenverbindungen eine geringe Affinität zu zellulären Bestandteilen haben und über die Nieren mit dem Urin ausgeschieden werden können. HEALY *et al.* (1997) isolierten aus der Kaninchenleber eine Methyltransferase, die für die Übertragung einer aktivierten Methylgruppe von S-Adenosylmethionin auf Arsenit und MMA verantwortlich ist. Sie stellten gleichzeitig fest, daß die Kapazität, As zu methylieren, bei verschiedenen Tierarten unterschiedlich stark ausgeprägt ist und mit dem Vorhandensein der Methyltransferase korreliert.

Es gibt Untersuchungen, die einen genotoxischen Effekt von Arsenverbindungen *in vivo* und *in vitro* belegen (PETRES, *et al.*, 1977; YAMANAKA *et al.*, 1989; SNOW, 1992; YAMANAKA *et al.*, 1995; RUDEL *et al.*, 1996; EGUSHI *et al.*, 1997; HEALY *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 1997; YAMAMOTO *et al.*, 1997; YAMANAKA *et al.*, 1997; KASHIWADA, *et al.*, 1998). Anorganische As-Verbindungen wirken karzinogen, obwohl sie keine direkten DNA-Schäden induzieren (YAMANAKA *et al.*, 1997). Nach Exposition können jedoch chromosomale Veränderungen beobachtet werden, die auf eine Inhibition des DNA-Reparatursystems zurückgeführt werden. YAMANAKA *et al.* (1995) zeigten, daß die methylierte Verbindung DMA direkt Schäden, wie Einzelstrangbrüche und Crosslinks in Lungenepithelzellen von Ratten und Mäusen und menschlichen alveolaren Epithelzellen induzieren kann.

EGUSHI *et al.* (1997) fanden einen Einfluß auf den Zellzyklus für MMA und DMA. Beide Substanzen induzieren einen Zellzyklusarrest im Stadium der Mitose, indem vorübergehend der Aufbau der Mitosespindel unterbunden wird.

In vielen Regionen der Erde sind im Trinkwasser erhöhte As-Werte nachweisbar. Die deutsche Trinkwasserverordnung setzt den Grenzwert für As auf 10 µg/l fest. Eine chronische As-Exposition von 50 µg pro Tag führt beim Menschen zu einem signifikanten Rückgang der Lebenserwartung. Höhere Dosen führen zu Haut- und Leberkrebs. In diesem Zusammenhang untersuchten GONSEBATT *et al.* (1997) Personen, die über Trinkwasser erhöhten Arsenkonzentrationen ausgesetzt waren und fanden in Lymphozyten exponierter Personen eine signifikant erhöhte Frequenz von CA.

Neben den cyto- und genotoxisch wirkenden organischen As-Verbindungen gibt es auch solche, die keinen Einfluß auf Zellen und deren Bestandteile ausüben, und ohne Metabolisierung aus dem Körper ausgeschieden werden. Dazu gehören Arsenobetain und Arsenocholin (EGUSHI *et al.*, 1997). Akute Arsenvergiftungen können durch Zugabe von Dithiolverbindungen wie meso-Dimercaptobernsteinsäure behandelt werden. Die Wirkung dieses Antidots beruht auf der Funktion als Thiolgruppenliferant, der in Konkurrenz zu den SH-Funktionen Dithiol enthaltener Enzyme tritt. Infolge Ausbildung stabiler Fünfringe kann die Inhibierung von lebenswichtigen Enzymen aufgehoben werden (DELNOMDEDIEU *et al.*, 1993).

1.7 Ziele der Arbeit

Aufgrund der immer größer werdenden Vielfalt der chemisch/pharmazeutischen Produktpalette steigt auch die Gefahr der Entstehung und Einleitung mutagener, kanzerogener oder teratogener Stoffe in Oberflächengewässer. Epidemiologische Studien zeigten eine Korrelation zwischen genotoxischen Wasserbelastungen und kanzerogenen Effekten beim Menschen. Im Wasser enthaltene Genotoxine werden vor allem über das Trinkwasser aufgenommen. Daneben spielt aber auch die Bioakkumulation in Fischen und Meeresfrüchten eine Rolle.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Wasserproben auf Genotoxizität untersucht. Dabei wurden folgende Fragestellungen berücksichtigt:

- In welchen Wasserproben läßt sich eine genotoxische Wirkung nachweisen?
- Kann die mutagene Wirkung auf bestimmte Substanzen eingegrenzt werden?
- Eignet sich die Blue-Cotton-Methode für den routinemäßigen Einsatz bei Gewässeruntersuchungen?
- Eignet sich die Blue-Cotton-Methode für das Biomonitoring an Gewässern in Verbindung mit kultivierten Säugerzellen?
- Liefern Zellkulturtests (CA, SCE) und bakterielle Mutagenitätstests (Ames-Test) vergleichbare Ergebnisse?

In Zusammenhang mit den Untersuchungen mit metallorganischen Verbindungen stellen sich folgende Fragen:

- Induzieren metall(oid)organische Verbindungen CA und SCE?
- Welche Mechanismen sind für die genotoxischen Wirkungen verantwortlich?
- Lassen sich Angaben zu Konzentrationen innerhalb der Zelle machen?

2 Material und Methoden

2.1 CHO-Stammkulturen

Alle Experimente wurden mit CHO-Zellen durchgeführt. Diese permanente Zelllinie wurde aus dem Ovar des chinesischen Hamsters *Cricetulus griseus* etabliert und bietet die Möglichkeit, genetische Veränderungen von Säugetierzellen unter Kulturbedingungen zu untersuchen. CHO-Zellen haben eine unbegrenzte Lebensdauer und werden als permanente Zelllinien bezeichnet. Es gibt permanente Zelllinien des chinesischen Hamsters aus Milz, Lunge, Niere und Eierstock. In dieser Arbeit wurde die Zelllinie CHO-9 verwendet, die von Prof. Natarajan (Leiden) zur Verfügung gestellt wurde. Der Chromosomensatz besteht aus 21 statt 22 Chromosomen. Es ist nur ein X-Chromosom vorhanden. Nur 9 Chromosomen entsprechen noch dem Karyotyp des Chinesischen Hamsters. Die 12 veränderten Chromosomen entstanden hauptsächlich durch Translokationen und Inversionen. Die relativ großen metazentrischen und submetazentrischen Chromosomen sind gut erkennbar und leicht auszuwerten (FOLLE *et al.*, 1997).

Die Zellen können bei -80°C oder niedrigeren Temperaturen gelagert werden und bleiben so viele Jahre lang lebensfähig. Nach etwa 40 Passagen werden die Zellen verworfen und durch neue, frisch aufgetaute Zellen ersetzt.

CHO-Zellen wachsen auf einer geeigneten Unterlage als Monolayer, weil aufgrund von Kontaktinhibition ein Übereinanderwachsen verhindert wird. Mitotische Zellen runden sich ab, haften nur locker an der Unterlage und sind gut von den spindelförmigen Interphasezellen zu unterscheiden.

CHO-Zellen sind sehr widerstandsfähig und überstehen die Kulturbedingungen, ohne Schaden zu nehmen. Das Wachstum ist in einem weiten Temperaturbereich möglich (28° - 40° C), die optimale Temperatur liegt jedoch bei 36° - 38° C. Der günstigste pH-Wert für das Kulturmedium liegt bei 7 (GOTTESMANN 1985). Unter optimalen Bedingungen dauert ein Zellzyklus etwa 14 Stunden.

2.2 Kultivierung der CHO-Zellen

Beim Umgang mit Zellkulturen ist wichtig, daß steril gearbeitet wird. Das Medium bietet aufgrund des Nährstoffangebotes und der Kulturbedingungen nicht nur den CHO-Zellen gute Lebensbedingungen, sondern auch Bakterien und Pilzen. Kontamination führt dazu, daß sich Mikroorganismen rasant vermehren und mit ihren Stoffwechselprodukten das Medium "vergiften". Die Zellen werden in ihrem Wachstum gehemmt und sterben ab. Kontaminationen können auch zu Verfälschungen der Versuchsergebnisse führen.

Zur Vermeidung von Infektionen wird im Sterilraum unter einer Sterilbank gearbeitet. Das verwendete Medium wird mit einem Sterilfilter (Porengröße: 0,1 µm) filtriert, der auch Mykoplasmen zurückhält. Die verwendeten Einmalartikel wie Petrischalen (PS) werden vom Hersteller steril geliefert. Alle Glasgeräte werden in einem Trockenschrank bei 180°C zweimal sterilisiert, hitzeempfindliche Materialien werden bei 120°C und 1 Bar Druck 50 min autoklaviert. Alle anderen Materialien werden vor dem Gebrauch mit 70%igem Ethanol gewaschen.

CHO-Zellen wachsen als Monolayer in sterilen Kunststoff-Petrischalen von 96 mm Durchmesser. Das Kulturmedium muß regelmäßig gewechselt werden, damit ein ungestörtes Wachstum gewährleistet ist. Subkultivierung erfolgt alle zwei bis drei Tage, wenn die Bodenfläche der PS von Zellen bedeckt ist.

Für die Kultivierung der Zellen werden folgende vorgewärmte Lösungen benötigt:

- Vollmedium:

Das Vollmedium wird jeweils vor dem Arbeiten frisch angesetzt und besteht aus 90% McCoy's 5A-Medium und 10% fetalem Kälberserum (FKS). Gegen Bakterienkontaminationen werden zusätzlich die Antibiotika Penicillin (100 Einheiten/ml) und Streptomycin (100µg/ml) zugesetzt. Wenn im Folgenden von Medium gesprochen wird, ist immer McCoy's 5A-Medium gemeint.

- PBS (Phosphate Buffered Saline):
PBS ist eine phosphatgepufferte Salzlösung ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} mit folgender Zusammensetzung:
 - 8000 mg/l NaCl
 - 200 mg/l KCl
 - 1150 mg/l Na_2HPO_4
 - 200 mg/l KH_2PO_4

- Trypsin/EDTA-Lösung:
Diese Lösung besteht aus 0,05% Trypsin, einem proteolytisch aktivem Enzym, das die Ablösung festsitzender Zellen ermöglicht, und 0,02% EDTA (Ethylen-diamin-tetra-aacetat) in PBS gelöst.

Das Passagieren der Zellen umfaßt folgende Arbeitsschritte:

1. Makroskopische und mikroskopische Beurteilung der Zellkulturen
2. Abgießen des alten Kulturmediums und Abspülen des Monolayers mit 2-3 ml PBS
3. Überschichten der Zellen für 2-3 Minuten mit einem dünnen Film Trypsin/EDTA-Lösung
4. Abstoppen der Trypsinwirkung mit 2 ml Vollmedium
5. Abspülen und suspendieren der Zellen mit einer Pasteurpipette
6. Verteilen von jeweils 250-350 μl Zellsuspension auf neue Kulturschalen
7. Kultivierung Zellen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 -Atmosphäre und 95 % Luftfeuchtigkeit

2.3 Blue-Cotton-/ Blue-Chitin-Methode

Mutagene kommen in Gewässern oft nur in sehr geringen Konzentrationen vor. Dieser Umstand erfordert Verfahren, Schadstoffe aus Gewässern zu konzentrieren, um so eine mögliche schädliche Wirkung nachweisen zu können. Dazu bietet sich die von Hayatsu in Japan entwickelte Blue-Cotton-Methode an, die in Kapitel 1.5 beschrieben wurde (HAYATSU, 1990, 1992). Dabei wird der blaue Farbstoff

Trisulfokupferphthalocyanin (CPT, Copper Phthalocyanine Trisulfonate) kovalent an Baumwolle gebunden. Das Pigment adsorbiert in wässrigem Medium PAK mit drei oder mehr aromatischen Ringsystemen. In den durchgeführten Versuchen wurden ausschließlich Rayonfasern verwendet, da diese effektivere Adsorptionseigenschaften besitzen als Baumwolle (HAYATSU, 1990).

2.3.1 Probennahme für die Wasseruntersuchungen

In dieser Arbeit wurden verschiedene Wässer, die im städtischen Bereich anfallen, nach mutagenen Substanzen untersucht. Die Proben unterliegen teilweise der Vertraulichkeit und die genauen Entnahmestellen sind am Institut für Genetik der Universität GHS Essen hinterlegt.

- **Flußwasser** aus verschiedenen Regionen eines Flusses im Ruhrgebiet. Die Proben wurden dem Fluß oberhalb, unterhalb und unmittelbar an der Mündung eines Baches entnommen, in den eine Kläranlage einleitet.
- **Bachwasser** aus zwei Bächen, von denen Bach A durch eine ländliche Region fließt und Bach B mehrere Wohngebiete passiert. In Bach B entwässert bei Starkregenereignissen ein Mischwasserkanalsystem.
- **Teichwasser** aus einem natürlichen und einem künstlich angelegten stehenden Gewässer im Stadtgebiet von Essen.
- **Autobahnabfluß** aus Regenereignissen nach Versickerung durch eine 30 cm dicke Bodenschicht.
- **Abwasser** aus einer Mischung von Haushalts- und Gewerbeabwasser aus dem Zu- und Ablauf einer Kläranlage ohne großindustrielle Einleitung.
- **Straßenabfluß** eines Starkregenereignisses nach längerer Trockenperiode, gesammelt an einer mäßig stark befahrenen Kreuzung im Stadtgebiet von Essen.
- **Dachabfluß** eines Regenereignisses im Stadtgebiet von Essen.
- **Regenwasser**, das auf dem Campus der Universität GH Essen gesammelt wurde.
- **Leitungswasser** aus einem Haushalt im Stadtgebiet von Essen.

- **Schnee**, gesammelt auf dem Campus der Universität GH Essen.

Die Probenentnahmen wurde folgendermaßen durchgeführt:

- 0,5 g Rayonfasern je Versuchspunkt abwiegen
- 5 Minuten in Methanol waschen
- 2 x 5 Minuten mit destilliertem Wasser waschen und im Trockenschrank trocknen
- blaue Fasern in Nylonsäckchen geben und mit einem Gewicht beschweren
- 3-4 solcher Säckchen an einem Schwimmbrett befestigen
- für 24 Stunden freischwimmend, ohne Bodenkontakt im zu untersuchenden Gewässer an geeigneter Stelle ausbringen
- im Labor 3 x mit destilliertem Wasser waschen und im Trockenschrank trocknen

Die Weiterentwicklung der Blue-Cotton-Methode ist die Blue-Chitin-Methode (HAYATSU, *et al.*, 1996). Hier ist der blaue Farbstoff nicht an Baumwolle sondern an Chitin (poly-N-Acetylglucosamin) gebunden ist. Von der puderförmigen Substanz werden 0,12 g in kleine Kunststoffsäulen gefüllt, die mit einer Spritze verbunden werden können. Anschließend werden die Säulen mit 50 ml Methanol und mit 50 ml destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Ein Liter einer vorher gefilterten Wasserprobe wird mit einer Spritze langsam (Durchflußgeschwindigkeit etwa 5 ml/min) durch die Säule gespritzt. Anschließend werden 100 ml destilliertes Wasser durchgespritzt und die Säule bis zur Elution im Trockenschrank getrocknet. Elution und Behandlung erfolgen wie bei der Blue-Cotton-/ Blue-Rayon-Methode. Der Vorteil dieser Methode ist, daß auch Wasserproben mit einem geringen Volumen noch gut untersucht werden können.

2.3.2 Elution der PAK

Die aus dem Wasser stammenden und an dem blauen Farbstoff adsorbierten PAK müssen vor Versuchseinsatz wieder heruntergelöst werden. Dazu spritzt man 100 ml

Lösungsmittel, bestehend aus Methanol/ konz. Ammoniak (50:1) langsam durch die Säule (Durchflußgeschwindigkeit etwa 5 ml/min). Die Rayonfasern werden 3 x 10 Minuten in insgesamt 100 ml Lösungsmittel geschüttelt. Mit einem Rotationsverdampfer wird das Lösungsmittel soweit vorsichtig entfernt, bis nur noch etwa 2 ml übrig sind. Nach Zugabe von 5 ml Methanol und Überführung in einen kleinen Rundkolben, wird das restliche Lösungsmittel vollständig entfernt. Der Rückstand wird in 400 µl DMSO aufgenommen und kann für die Behandlung der Zellen verwendet werden.

2.4 Behandlung der CHO-Zellen

Die Zellkulturen werden vor der Behandlung nicht synchronisiert. 18 Stunden vor Behandlungsbeginn werden die Zellen subkultiviert und in neue PS gegeben, wobei die Zelldichte so gewählt wird, daß sich die Kultur während der Behandlung in exponentiellem Wachstum befindet und bei Beendigung der Kultur eine hohe mitotische Aktivität vorliegt. Für 18 h wird den Zellkulturen für die SCE-Bestimmung BrdUrd zugesetzt (Endkonzentration 2×10^{-5} M).

Die Erholungszeit (EZ) nach Exposition beträgt für alle Experimente 18 Stunden und erfolgt im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die EZ beginnt mit dem Auswaschen der Behandlungslösung. Den Kulturen, die für die Bestimmung von CA vorgesehen sind, wird während der EZ BrdUrd in der oben angegebenen Konzentration zugesetzt. Nach differentieller Färbung werden erste Nachbehandlungsmitosen (M1) auf strukturelle Veränderungen hin untersucht. Zellen für die SCE-Bestimmung erhielten während der Erholungszeit kein BrdUrd.

2.4.1 Negativ- und Positivkontrollen

In allen Experimenten werden Negativ- und Positivkontrollen durchgeführt. Unbehandelte Negativkontrollen dienen der Überprüfung, ob eine geeignete Zellcharge verwendet wurde, oder ob das Lösungsmittel in den verwendeten Konzentrationen einen Effekt auf die Zellen ausübt. Es handelt sich meist um eine

Mediumkontrolle und um eine Behandlung mit den eingesetzten Lösungsmitteln (Methanol und DMSO). Mit Blue-Rayon und Blue-Chitin wurden ebenfalls Kontrollexperimente durchgeführt.

Eine Positivkontrolle dient im Falle der Verwendung eines externen Metabolisierungssystems dazu, dessen Aktivität zu überprüfen. Für diesen Zweck wurde das Cytostatikum Cyclophosphamid (CP) verwendet, das nur nach Aktivierung CA und SCE induziert (BENEDICT *et al.*, 1978). Die eingesetzte Konzentration betrug 1×10^{-6} M.

2.4.2 Behandlung der Zellen mit Extrakten der Wasserproben

Die meisten Zellen in Kultur weisen keine ausreichende Kapazität fremdstoffmetabolisierender Enzyme auf. Viele mutagen und karzinogen wirkende Chemikalien können nicht direkt mit der DNA interagieren, sie müssen erst enzymatisch aktiviert und so in eine wasserlösliche Form gebracht werden. *In-vitro* erfolgt das gewöhnlich mit einem externen Metabolisierungssystem (S9) (siehe 1.4).

Der in den Versuchen verwendete S9-Mix besteht aus 100µl S9 und 900µl Cofaktoren, die sich aus folgenden Komponenten zusammensetzen:

- KCl	33 mM
- Glukose-6-Phosphat	5 mM
- NADP	4 mM
- MgCl ₂ x 6 H ₂ O	8 mM

gelöst in 100 mM Phosphatpuffer (Na₂HPO₄ x 2 H₂O in Aqua dest., pH 7,4) (MARON und AMES, 1984).

Für jedes Experiment wurde S9 der gleichen Charge verwendet, da trotz Standardisierung, Schwankungen in der enzymatischen Aktivität auftreten können. S9 wirkt auf Zellen zytotoxisch und wird deshalb in Dialysierschläuche eingeschlossen (MADLE und OBE, 1977). Die umgesetzten Substanzen könnten die semipermeable Membran passieren und ins Medium gelangen.

Die Experimente umfassen folgende Arbeitsschritte:

- Sterilisation der Dialysierschläuche
- Vorbereitung von 1 ml Behandlungslösung in Eppendorfgefäßen, bestehend aus 900µl Cofaktoren, 100µl Extrakt in DMSO, +/- 100µl S9
- Entfernen des Kulturmediums
- Waschen der Zellkulturen mit serumfreien Medium
- Überschichten der Zellen mit 5 ml serumfreien Medium
- Befüllen der Dialysierschläuche mit der Behandlungslösung und Schläuche in die Kulturschalen legen
- Inkubation für 2 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂
- Entfernen der Schläuche und zweimaliges Waschen der Zellen mit serumfreien Medium
- Zugabe von Vollmedium

2.4.3 Behandlung der Zellen mit metall(oid)organischen Verbindungen

Für die hier untersuchten metall(oid)organischen Verbindungen wurden Stammlösungen in Methanol angesetzt, die entweder im Kühlschrank bei + 4 °C oder im Tiefkühlschrank bei -18 °C gelagert wurden. Unmittelbar vor Versuchsbeginn wurde aus diesen Stammlösungen die Behandlungslösung frisch zubereitet. Die Behandlung der Zellen mit den Substanzen erfolgte im Monolayer und umfaßte folgende Arbeitsschritte:

- Entfernen des Kulturmediums
- Waschen der Zellen mit serumfreien Medium
- Zugabe der Behandlungslösung bestehend aus 3 ml Medium und unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz
- Inkubation für 2 h
- Entfernen der Behandlungslösung
- dreimaliges Waschen mit serumfreiem Medium

Experimente zur Bestimmung der Quecksilberspezies in den Zellen mit AAS (Atom-Adsorptions Spektrometrie) wurden ebenfalls durchgeführt. Dazu wurden die

Zellen nach der Exposition nicht kultiviert, sondern abtrypsiniert (siehe 2.2) und mit einer Zählkammer gezählt. Die Lyse der Zellen erfolgte mit 5 ml destilliertem Wasser für 15 Minuten. Nach dieser Zeit konnten bei mikroskopischer Untersuchung in der Lösung keine intakten Zellen mehr gefunden werden.

2.5 Aufarbeitung der behandelten Zellkulturen

Zwei Stunden vor Beginn der Aufarbeitung wurde den Zellen das Spindelgift Colcemid (Endkonzentration: 0,08 µg/ml) zugesetzt. Die induzierten C-Metaphasen erlauben eine verlässliche Analyse struktureller Chromosomenveränderungen. Die Aufarbeitung erfolgte unter nicht sterilen Bedingungen und umfaßte folgende Arbeitsschritte.

1. Überführen von etwa der Hälfte des Kulturmediums in ein nummeriertes Zentrifugenröhrchen
2. Abspülen der lose haftende mitotischen Zellen mit einer Pasteurpipette und Überführung der Zellsuspension in das gleiche Zentrifugenröhrchen
3. Zentrifugation bei 120 g für 5 Minuten
4. Absaugen des Überstandes und Zugabe von 5 ml einer hypotonen 1%igen Natriumcitratlösung (für 8 Minuten bei 37 °C)
5. Zentrifugation bei 120 g für 5 Minuten und absaugen des Überstandes
6. Tropfenweise Zugabe von 5 ml einer Fixierlösung aus Methanol und Eisessig im Verhältnis 3:1
7. Wiederholung von 5.
8. Wiederholung von 6.
9. Zentrifugation bei 120 g für 5 Minuten und Absaugen des Überstand in Abhängigkeit der Größe des Zellpellets bis auf etwa 0,5 ml
10. Suspendieren des Zellpellets mit einer Pasteurpipette
11. Auftropfen der Zellsuspension auf kalte, feuchte und fettfreie Objektträger

Vor der Färbung werden die Präparate 24 Stunden lang im Trockenschrank bei 37°C getrocknet.

2.6 Färbung der Präparate

Die differentielle Schwesterchromatidenfärbung (PERRY und WOLFF 1974, HILL und WOLFF 1982) ermöglicht, je nach Zugabezeitpunkt von BrdUrd, sowohl eine Detektion von SCE, als auch eine Unterscheidung zwischen ersten und zweiten Nachbehandlungsmitosen (M1 und M2) bei der Auswertung von CA.

Die FPG-Färbung wird folgendermaßen durchgeführt:

1. Färben der Präparate in einer wässrigen Lösung des Fluoreszenzfarbstoffes Hoechst 33258 (Bisbenzimid, 4,5µg/ml) für 20 Minuten
2. Spülen der Objektträger in destilliertem Wasser
3. Spülen der Präparate in PBS und Eindeckeln mit PBS-gespülten Objektträgern
4. Bestrahlung der Präparate mit Schwarzlicht für 20 Minuten auf einer Heizplatte bei 60°C
5. Entfernen der Objektträger in PBS und Spülen der Präparate mit destilliertem Wasser
6. Färben der Präparate in einer wässrigen GiemsaLösung (5 % GiemsaFarblösung, 20 % Phosphatpuffer bei pH 6,8) für 10 Minuten
7. Spülen der gefärbten Präparate mit destilliertem Wasser und Trocknen an der Luft

2.7 Auswertung

Die lichtmikroskopische Auswertung der Chromosomenpräparate erfolgte an einem Olympusmikroskop mit Ölimmersionsobjektiv (100x).

Pro Behandlungspunkt wurden 50 vollständig differentiell gefärbte Metaphasen mit 20-22 Chromosomen auf SCE hin ausgewertet. Diese Anzahl reicht für eine statistische Auswertung der Ergebnisse aus (LATT *et al.*, 1981, HILL und WOLFF, 1982). Als SCE wird ein Farbwechsel von hell nach dunkel und umgekehrt auf einer

Chromatide gewertet. Die SCE aller Chromosomen einer Metaphase wurden als SCE pro Zelle gewertet.

Für die Analyse von CA wurden pro Behandlungspunkt 100 uniform gefärbte erste Nachbehandlungsmitosen (M1) mit 20-22 Chromosomen ausgewertet. Für jede Zelle wurden die gefundenen Aberrationen notiert. Die allgemeinste Einteilung für CA ist die Unterscheidung von Chromosomentypaberrationen (CSA), die beide Schwesterchromatiden an homologen Stellen betreffen, und Chromatidentypaberrationen (CTA), die nur eine der beiden Schwesterchromatiden eines Chromosoms betreffen (Tabelle 1). Ausführliche Erläuterungen zu den einzelnen Aberrationen finden sich bei SAVAGE (1976, 1983) und IPCS (1985).

Chromosomentypaberrationen	
DIZ	Dizentrisches Chromosom
RING	Ringchromosom
MIN	Double Minute
B''	Chromosomenbruch
Chromatidentypaberrationen	
B'	Chromatidenbruch
B''	Isochromatidenbruch
RB'	interchromosomale Chromatidentranslokation
RB''	Chromatid/ Isochromatidtranslokation (Triradial)
RB-Kom	Metaphase mit komplexen, Chromatidentranslokationen
IC	intrachromosomale Chromatidentranslokation
ID	Interstitielle Deletion
DD	Duplikationsdeletion
SU	Schwesterchromatidenvereinigung
AL	Achromatische Läsion, Gap
PULV	pulverisierte Zelle

Tabelle 1: Überblick über die in der Arbeit ausgewerteten Aberrationstypen.

Achromatische Läsionen (Gaps) stellen Färbelücken in der Chromosomenstruktur dar, die definitionsgemäß nicht mit einem Bruch der DNA-Doppelhelix verbunden sind. Gaps beruhen wahrscheinlich auf einer Störung der Chromatinkondensation.

Einige der geschädigten Zellen wiesen so starke Fragmentierungen auf, daß keine einzelnen Aberrationen mehr ausgewertet werden konnten. Sie gingen in die Bewertung als pulverisierte Zellen ein. Ein Isochromatidenbruch ist nicht von einem Chromosomenbruch zu unterscheiden.

Die chemischen Analysen wurden am Institut für Umweltanalytik (Leitung: Prof. Dr. A. Hirner) der Universität GHS Essen und am KFZ Jülich (Leitung: PD Dr. H. Emons) durchgeführt. Frau Dipl.-Chem. Daniela Fläßbeck führte die Analyse der PAK mit HPLC (High Pressure Liquid Chromatography, Hochdruckflüssigkeitschromatographie) durch, Frau Dr. Peng Shu und Herr Dipl.-Chem. Markus Dolfen ermittelten die Quecksilberspezies in den Zellen.

2.8 Ames-Test

Zur Untersuchung der Wasserproben wurde neben dem cytogenetischen Testsystem an Säugerzellen auch ein bakterieller Mutagenitätstest (Ames-Test) herangezogen, der im Rahmen dieser Arbeit von Prof. Hayatsu aus Okayama, Japan ausgeführt wurde.

Dieser Test wird mit speziellen Stämmen des Bakteriums *Salmonella typhimurium* durchgeführt. Diese Bakterien weisen einen Defekt im *his⁻* - Gen auf und können auf histidinfreiem Medium nicht wachsen. Nach Mutationsinduktion mit einem Mutagen können Rückmutationen in diesem Gen auftreten, die die Revertanten befähigt, in Histidin-freiem Medium zu wachsen und Kolonien zu bilden. Einige Teststämme sprechen auf Basenpaarsubstitutionen an, andere auf Leserasterverschiebungen (Addition oder Deletion von Basen). Die Empfindlichkeit dieser Stämme wird zusätzlich aufgrund einer defekten Lipopolysachharidhülle, die ein Eindringen der Mutagene erleichtert, und fehlender Exzissionsreparatur, erhöht. Der Zusatz von S9 bezieht die Metabolisierungsfähigkeit des Säugerorganismus mit ein und ermöglicht die Erfassung reaktiver Metabolite.

2.9 Bezugsquellen der Materialien

Chemikalien:

Blue-Rayon/ Blue-Chitin	Funakoshi, Japan
BrdUrd	Serva, Heidelberg
Colcemid	Ciba, Basel
Cyclophosphamid	Fluka, Neu-Ulm
DMSO	Fluka, Neu-Ulm
Fötales Kälberserum	Gibco/BRL, Eggenstein
Giensa-Farbstofflösung	Merck, Darmstadt
Glucose-6-Phosphat	Fluka, Neu-Ulm
Hoechst 33258	Boehringer, Mannheim
Immersionsöl	Olympus, Hamburg
McCoy`s 5A Medium	Gibco, Eggenstein
NADPH	Fluka, Neu-Ulm
Penicillin	Hoechst, Frankfurt a. M.
Phosphatpuffer	Seromed, Berlin
S9	ICN Biomedicals, Eschwege
Streptomycin	Heyl, Berlin
Trypsin/EDTA	Seromed, Berlin

Alle nicht aufgeführten Laborchemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen

Geräte:

CO ₂ -Brutschrank	Heraeus, Hanau
Dialysierschlauch	Roth, Essen
Mikroskop	Olympus, Hamburg
Nylonnetz	Stinnes, Essen
Objektträger	Menzel, Braunschweig
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Sterile Kunststoffartikel	Greiner, Nürtingen
Sterilwerkbank	Heraeus, Hanau
Zählkammer (nach Neubauer)	Brand, Wertheim
Zentrifuge	Heraeus, Hanau

3. Ergebnisse

CHO-Zellen wurden mit Wasserextrakten, die mit der Blue-Rayon-Methode gewonnen wurden, und unterschiedlichen metall(oid)organischen Verbindungen behandelt (Tabelle 10). Die Zellmonolayer wurden jeweils für zwei Stunden exponiert. Nach einer Erholungszeit von 18 Stunden wurden Metaphasenpräparate hergestellt und differentiell gefärbt. In 100 ersten, uniform gefärbten Nachbehandlungsmitosen (M1) wurden chromosomale Aberrationen ausgewertet und in 50 ersten, differentiell gefärbten M1 die SCE-Frequenz bestimmt (Abbildungen 7-14).

Abbildungen von CHO-Metaphasen:



Abbildung 7: Metaphase einer unbehandelten CHO-Zelle.



Abbildung 8: Metaphase einer CHO-Zelle mit mehreren Chromatidentypaberrationen nach Einwirkung von Methylquecksilberchlorid.



Abbildung 9: Metaphase einer CHO-Zelle mit komplexen Chromatidenaustauschen (RB-Komplex) nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Autobahnabflußwasser.

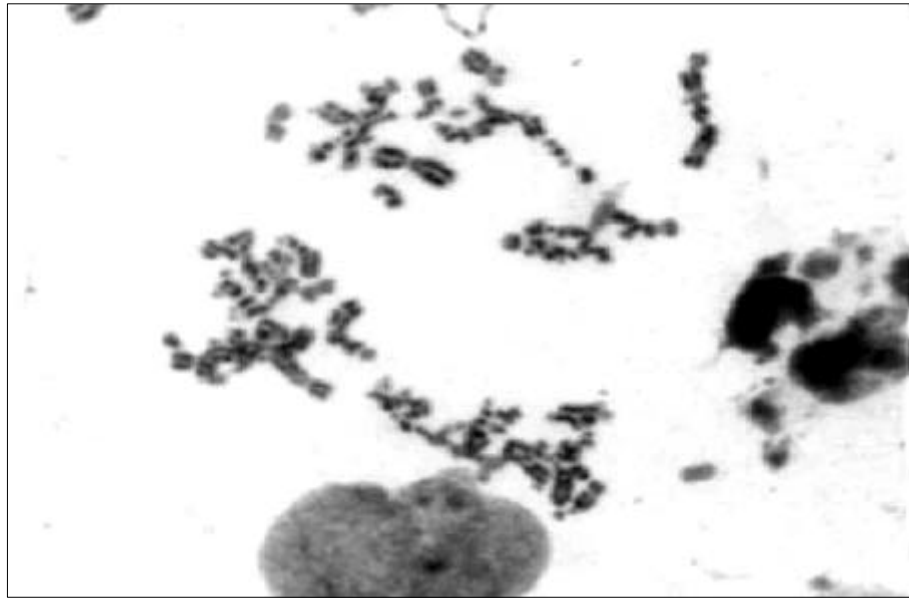


Abbildung 10: Pulverisierte Metaphase einer CHO-Zelle nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Autobahnabflußwasser.



Abbildung 11: Metaphase einer unbehandelten CHO-Zelle mit SCE nach FPG-Färbung.

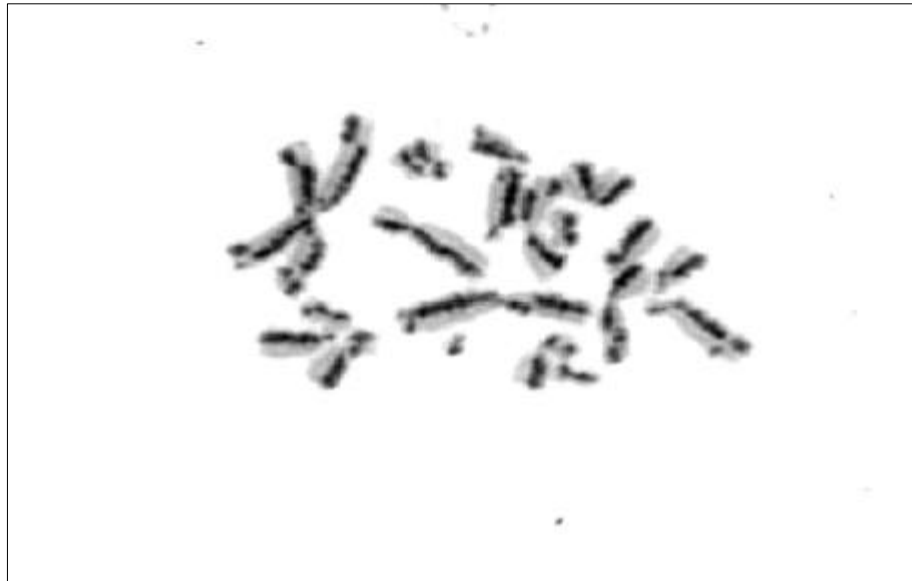


Abbildung 12: Metaphase einer CHO-Zelle nach FPG-Färbung mit erhöhter SCE-Frequenz nach Einwirkung von Trimethylzinnchlorid.

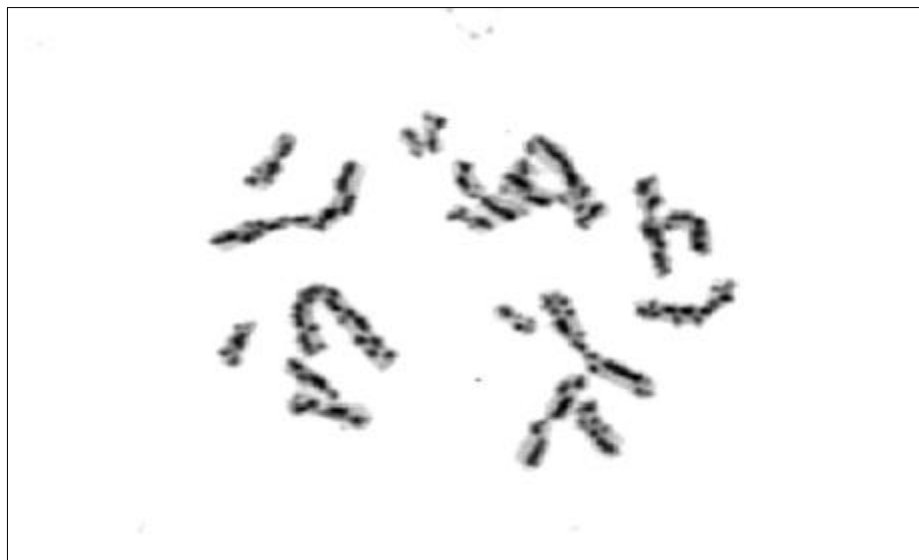


Abbildung 13: Metaphase einer CHO-Zelle nach FPG-Färbung mit stark erhöhter SCE-Frequenz nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Autobahnabflußwasser.

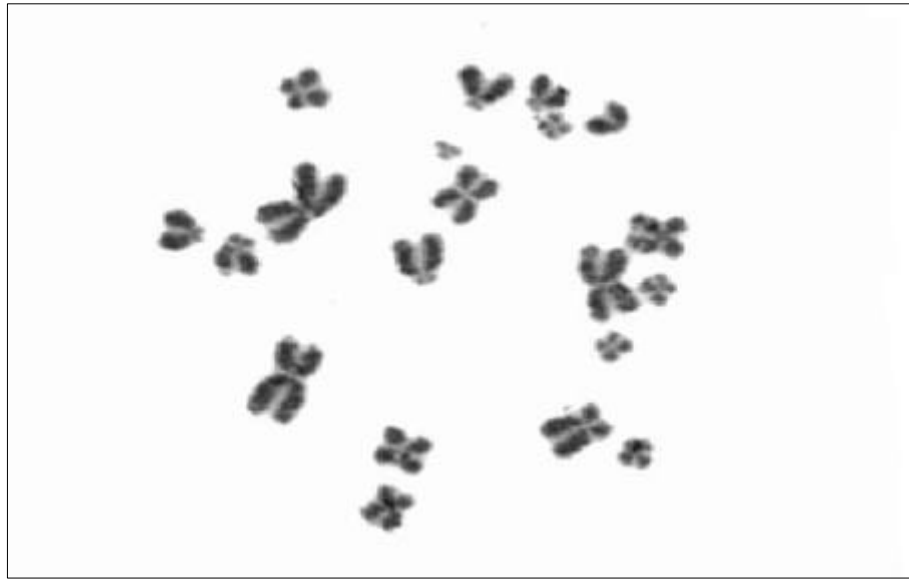


Abbildung 14: Stark kondensierte „C-Mitose“ einer CHO-Zelle nach Einwirkung von Methylquecksilberchlorid.

3.1 Ergebnisse der Gewässeruntersuchungen

CHO-Zellen wurden zwei Stunden mit Blue-Rayon-/Blue-Chitin-Extrakten unterschiedlicher Wasserproben behandelt (siehe 1.5.1, 1.5.2 und 2.3). Die Ergebnisse der Experimente können den Tabellen 4-8 entnommen werden. Die Anzahl aberranter Metaphasen und die SCE-Frequenzen werden in den Abbildungen 15, 16, 20-31 graphisch dargestellt. In allen Diagrammen wird die SCE-Frequenz abzüglich des Kontrollwertes wiedergegeben.

Zu jedem Versuchsansatz wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Tabelle 2 gibt einen Überblick über diese Ergebnisse. Weder die Materialien, die zur Gewinnung der Wasserextrakte verwendet wurden (Blue-Rayon, Blue-Chitin), noch S9 und DMSO sind mutagen. Es wurden weder CA noch erhöhte SCE-Frequenzen festgestellt. Cyclophosphamid (CP) wurde in den Experimenten mit S9 als Positivkontrolle eingesetzt. CP induziert nach metabolischer Aktivierung eine erhöhte SCE-Frequenz, die in allen Experimenten zu beobachten war und nach Einwirkung von 1×10^{-6} M CP durchschnittlich 41,23 SCE pro Zelle betrug.

Einige Blue-Cotton-Extrakte wurden am Institut für Umweltanalytik der Universität GHS Essen hinsichtlich der Menge ausgewählter PAK mittels HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie) bestimmt. Einen Überblick über die Meßergebnisse liefert die Tabelle 3.

Abkürzungen der Wasserproben:

AB I/ II/ III	Autobahnabflußwasser, Probe I, II und III
TW	Teichwasser
T (A) I/ II	Wasser aus Teich A, Probe I und II
T (B) I/ II	Wasser aus Teich B, Probe I und II
BW	Bachwasser
B (A) I/ II	Wasser aus Bach B, Probe I und II
B (B) I/ II	Wasser aus Bach B, Probe I und II
ST	Straßenabfluß
FW I	Flußwasser, Probe I oberhalb einer Bachmündung
FW II	Flußwasser, Probe II etwa 500 m unterhalb der Bachmündung
FW III	Flußwasser, Probe III aus der Mündungsregion eines Baches
D I/ II	Dachabfluß, Probe I und II
R I/ II	Regen, Probe I und II
S I/ II	Schnee, Probe I und II
LW	Leitungswasser
KA (A) Z I/ II	Kläranlage A, Zulauf, Probe I und II
KA (A) A I/ II	Kläranlage A, Ablauf, Probe I und II
KA (B) Z	Kläranlage B, Zulauf, Probe I
KA (B) A	Kläranlage B, Ablauf, Probe I

Ergebnisse

Kontrolle	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen										
			DIZ	RING /MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD	
Medium	2700 (27) / 1350 (27)	0,26	0,00	0,00	0,26	0,00	0,00	0,00	0,00	0,04	0,00	0,00	0,00
S9	2700 (27) / 1350 (27)	0,30	0,00	0,00	0,00	0,04	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CP *	- /1350 (27)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DMSO	600 (6) / 300 (6)	0,33	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Blue-Rayon	300 (3) / 150 (3)	0,33	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00
Blue-Chitin	300 (3) / 150 (3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

* CP: Positivkontrolle mit Cyclophosphamid (1×10^{-6} M) und metabolischer Aktivierung (S9). Es wurden nur SCE ausgewertet.

Tabelle 2: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCEFrequenz pro Zelle in CHO-Zellen in

Ergebnisse

Wasserprobe	AB I	AB II	BW II	BW III	DW II	FW III	KA II	KZ II	KA III	KZ III
PAK	PAK [mg/l]									
Naphthalin	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Acenaphthylen	0,279	0,278	s.	0,019	0,017	s.	0,013	0,039	s.	s.
Acenaphthen	0,116	0,151	0,019	s.	0,012	s.	s.	0,021	0,015	s.
Fluoren	0,180	0,232	0,029	0,025	0,023	0,032	0,019	0,030	0,027	0,025
Phenanthren	0,223	0,308	0,138	0,102	0,124	0,199	0,103	0,081	0,127	0,121
Anthracen	0,144	0,193	0,021	s.	s.	0,019	0,014	0,030	0,015	0,018
Fluoranthren	0,240	0,316	0,059	0,045	0,029	0,076	0,046	0,075	0,101	0,104
Pyren	0,307	0,273	0,063	0,051	0,024	0,092	0,058	0,069	0,107	0,087
Benzo[a]anthracen	0,388	0,479	0,042	0,062	0,016	0,065	0,044	0,064	0,075	0,055
Chrysen	0,126	0,120	0,050	0,021	0,026	s.	0,029	0,023	0,078	0,285
Benzo[b]fluoranthren	0,425	0,579	n.n.	n.n.	s.	n.n.	n.n.	0,067	n.n.	s.
Benzo[k]fluorenthren	0,423	0,476	s.	s.	s.	0,021	s.	0,062	s.	s.
Benzo[a]pyren	0,498	0,628	s.	s.	s.	s.	s.	0,081	0,020	s.
Indenopyren	0,331	0,441	s.	s.	s.	s.	0,007	0,060	0,022	0,025
Dibenzo[a,h]anthracen	0,452	0,590	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.	0,078	n.n.	n.n.
Benzo[g,h,i]perylen	0,252	0,328	0,018	0,018	0,010	0,017	0,011	0,038	0,020	0,024

Tabelle 3: Mengen an PAK (mg/l) in ausgewählten Wasserproben nach HPLGAnalyse.

n.n.: nicht nach

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen										
			DIZ	RING/MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD	S
AB I (-S9)	100 (1) / 50 (1)	45	0	0	9	17	17	9	14	2	1	4	
AB I (+S9)	100 (1) / 50 (1)	2	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	
AB II (-S9)	100 (1) / 50 (1)	80	0	1	46	31	29	14	45	7	6	14	
AB II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	54	0	0	37	21	40	11	28	7	4	6	
AB III (-S9)	100 (1) / 50 (1)	88	0	0	96	16	39	13	54	6	1	6	
AB III (+S9)	100 (1) / 50 (1)	31	0	1	30	9	16	5	11	2	1	1	
T (A) I (-S9)	100 (1) / 50 (1)	8	0	0	3	1	3	2	2	2	0	0	
T (A) I (+S9)	100 (1) / 50 (1)	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	
T (A) II (-S9)	100 (1) / 50 (1)	15	0	0	10	2	6	1	7	1	1	1	
T (A) II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	16	0	0	10	0	4	3	6	0	0	1	
T (B) II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	26	0	0	9	9	16	5	17	5	1	4	
T (B) II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	3	0	2	3	0	1	0	1	0	0	0	

AB : Autobahnabflußwasser T: Teichwasser (-S9): ohne metabolische Aktivierung (+S9): mit metabolischer Aktivierung

Tabelle 4: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCEFrequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach von Autobahnabflußwasser und Teichwasser

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen									
			DIZ	RING/ MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD
B (A) I (-S9)	100 (1) / 50 (1)	6	0	0	1	2	3	0	3	1	0	2
B (A) I (+S9)	100 (1) / 50 (1)	3	0	0	1	1	0	1	2	0	1	0
B (A) II (-S9)	100 (1) / 50 (1)	9	0	0	4	6	1	0	2	2	0	1
B (A) II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B (B) I (-S9)	100 (1) / 50 (1)	26	0	0	7	5	13	6	6	1	0	3
B (B) I (+S9)	100 (1) / 50 (1)	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
B (B) II (-S9)	100 (1) / 50 (1)	34	1	0	21	6	17	3	15	3	2	3
B (B) II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	6	0	0	6	0	4	0	1	0	1	0
ST (-S9)	100 (1) / 50 (1)	18	1	0	8	7	10	5	7	2	0	2
ST (+ S9)	100 (1) / 50 (1)	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

B: Bachwasser ST: Straßenabfluß (-S9): ohne metabolische Aktivierung (+S9): mit metabolischer Aktivierung I: Probe

Tabelle 5: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCEFrequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach von Bachwasser und Straßenabflußwasser

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen									
			DIZ	RING/ MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD
FW I (- S9)	100 (1) / 50 (1)	3	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
FW I (+ S9)	100 (1) / 50 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
FW II (- S9)	100 (1) / 50 (1)	5	0	0	1	0	3	0	1	0	0	0
FW II (+ S9)	100 (1) / 50 (1)	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
FW III (- S9)	100 (1) / 50 (1)	10	0	0	4	1	6	1	3	0	0	1
FW III (+ S9)	100 (1) / 50 (1)	3	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0
D I (- S9)	100 (1) / 50 (1)	14	0	0	3	3	6	4	12	2	2	1
D I (+ S9)	100 (1) / 50 (1)	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
D II (- S9)	100 (1) / 50 (1)	16	1	0	12	3	14	1	3	1	3	3
D II (+ S9)	100 (1) / 50 (1)	2	0	0	1	4	2	2	2	0	0	0

FW: Flußwasser I: oberhalb einer Bachmündung II: 500 m unterhalb einer Bachmündung III: Mündungsregion
D: Dachabfluß (-S9): ohne metabolische Aktivierung (+S9): mit metabolischer Aktivierung

Tabelle 6: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCEFrequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach von Flußwasser und Dachabflüssen

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA/ SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen										
			DIZ	RING /MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD	S
KA (A) Z I (-S9)	100 (1) / 50 (1)	19	0	0	3	10	10	4	2	2	0	3	
KA (A) Z I (+S9)	100 (1) / 50 (1)	8	0	0	2	4	7	1	2	1	0	0	
KA (A) A I (-S9)	100 (1) / 50 (1)	13	0	0	4	2	2	1	6	0	1	0	
KA (A) A I (+S9)	100 (1) / 50 (1)	11	0	0	9	1	1	1	2	0	0	1	
KA (A) Z II (-S9)	100 (1) / 50 (1)	23	0	0	2	9	5	7	4	2	0	0	
KA (A) Z II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	6	0	0	2	0	0	0	2	1	0	0	
KA (A) A II (-S9)	100 (1) / 50 (1)	19	0	0	3	10	10	4	2	2	0	3	
KA (A) A II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	8	0	0	2	4	7	1	2	1	0	0	
KA (B) Z (-S9)	100 (1) / 50 (1)	16	0	0	3	1	7	6	1	1	1	1	
KA (B) Z (+S9)	100 (1) / 50 (1)	7	0	0	1	0	2	1	0	0	0	1	
KA (B) A (-S9)	100 (1) / 50 (1)	15	0	0	4	4	6	2	5	2	0	2	
KA (B) A (+S9)	100 (1) / 50 (1)	12	0	0	7	2	5	1	4	1	0	0	

KA-Z: Zulauf einer Kläranlage KA-A: Ablauf einer Kläranlage (-S9): ohne metabolische Aktivierung (+S9): mit met
 (A): Kläranlage A (B): Kläranlage B I: Probe I II: Probe II

Tabelle 7: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach dem Zu- und Ablauf einer Kläranlage

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen										
			DIZ	RING/ MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD	S
R I (-S9)	100 (1) / 50 (1)	7	0	0	3	0	1	0	3	0	0	0	
R I (+S9)	100 (1) / 50 (1)	5	0	0	1	0	2	1	0	1	0	0	
R II (-S9)	100 (1) / 50 (1)	7	0	0	7	4	8	0	3	2	0	2	
R II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	8	0	0	0	4	4	2	2	2	0	0	
S I (-S9)	100 (1) / 50 (1)	11	0	0	4	2	3	1	8	1	0	1	
S I (+S9)	100 (1) / 50 (1)	8	0	0	2	2	3	1	7	1	0	2	
S II (-S9)	100 (1) / 50 (1)	14	0	0	5	3	5	0	3	3	1	1	
S II (+S9)	100 (1) / 50 (1)	4	0	0	4	0	0	0	1	0	0	0	
LW (-S9)	100 (1) / 50 (1)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
LW (+S9)	100 (1) / 50 (1)	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	

R: Regen S: Schnee LW: Leitungswasser I: Probe II: Probe II (-S9): ohne metabolische Aktivierung (+S9): mit r

Tabelle 8: Chromosomale Aberrationen in 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen nach Regen, Schnee und Leitungswasser

Ergebnisse

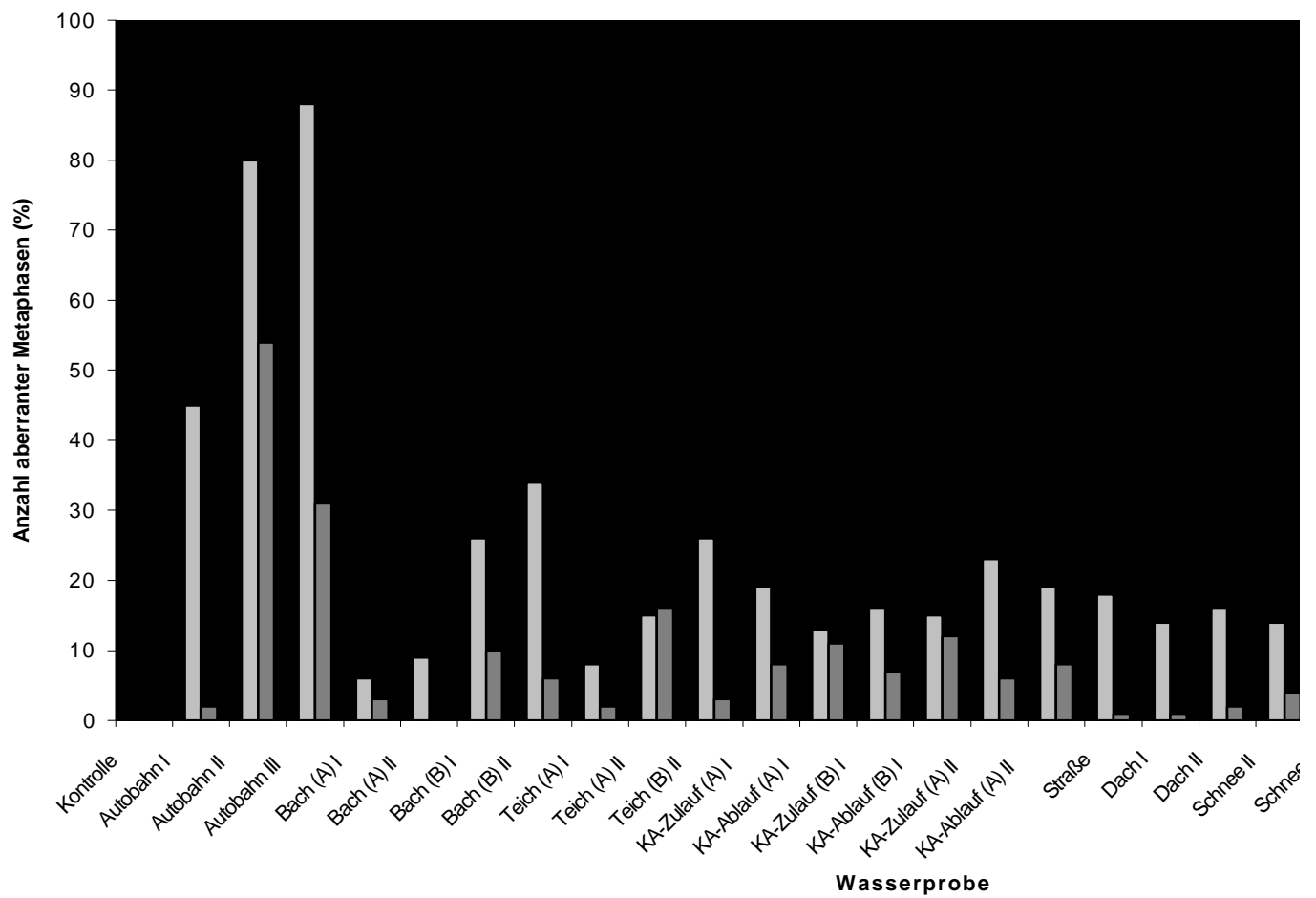


Abbildung 15: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Extrakten unterschiedlicher Wasserprobe

Ergebnisse

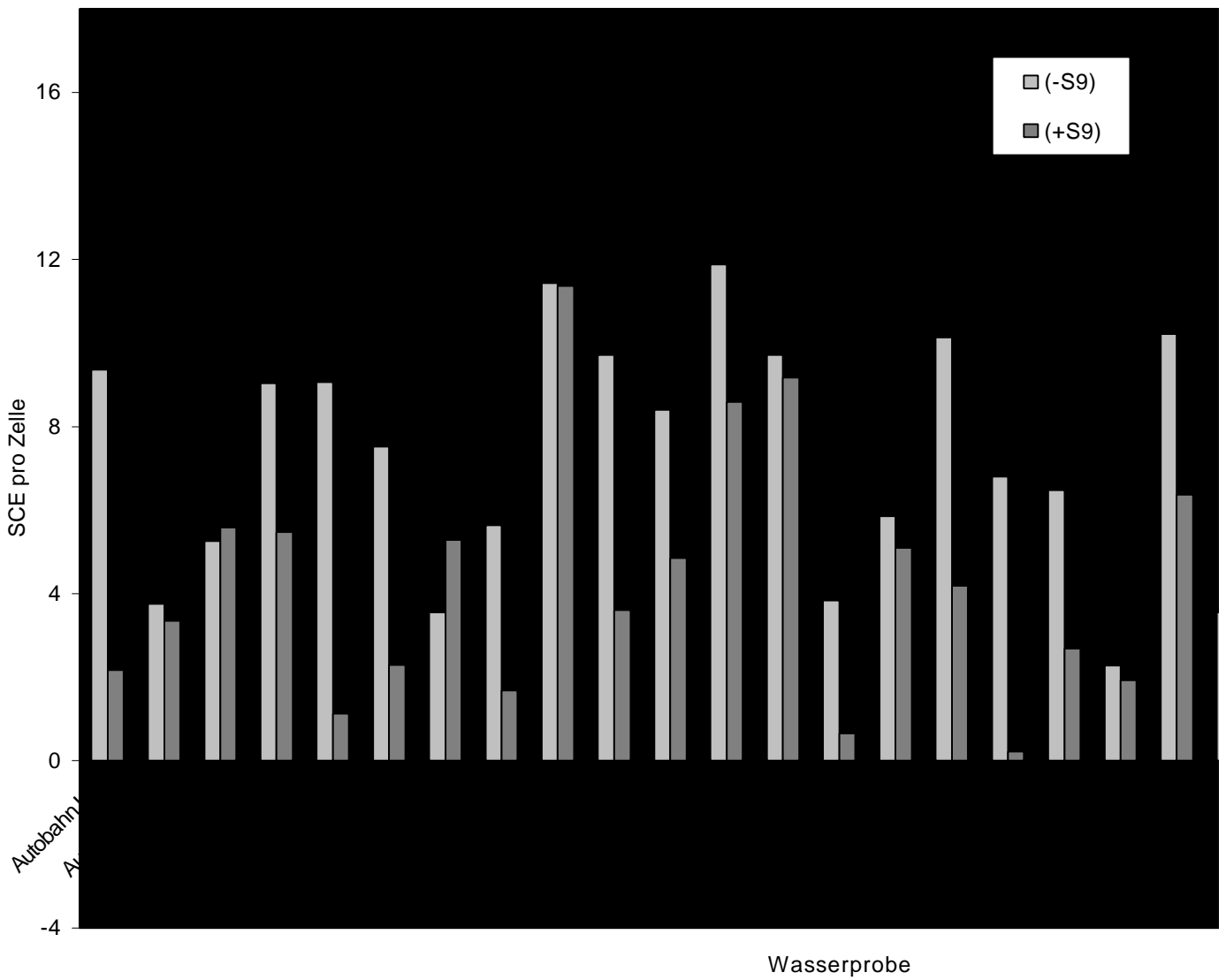


Abbildung 16: SCE-Frequenz abzüglich der Kontrollwerte (697) in CHO-Zellen nach Einwirkung von Extrakten unter

Salmonella-Stamm	TA 98		YG 1024		
	1/10	4/10	1/10	1/10	2/10
Wasserprobe					
LM-Kontrolle	41	-	23	18	-
Positivkontrolle	816	-	-	-	-
Autobahn III	9000	< 10 000	-	-	-
Autobahn I	49	96	42	31	63
Straße	44	93	33	44	39
KA-Ablauf (A) II	185	566	-	-	-
KA-Zulauf (A) II	125	635	-	-	-
Bach (B) I	39	103	91	109	218
Bach (A) I	37	89	-	-	-
Teich (A) I	39	129	-	-	-
Teich (A) II	46	43	68	33	43
Dach I	51	85	41	39	80
Schnee I	48	119	-	-	-
Regen I	56	77	41	50	72

- : nicht durchgeführt

Tabelle 9: Ergebnisse im Ames-Test.

Anzahl der Revertanten bei zwei Stämmen von *Salmonella typhimurium* nach Einwirkung von Blue-Rayon-/Blue-Chitin-Extrakten und metabolischer Aktivierung.

Ergebnisse

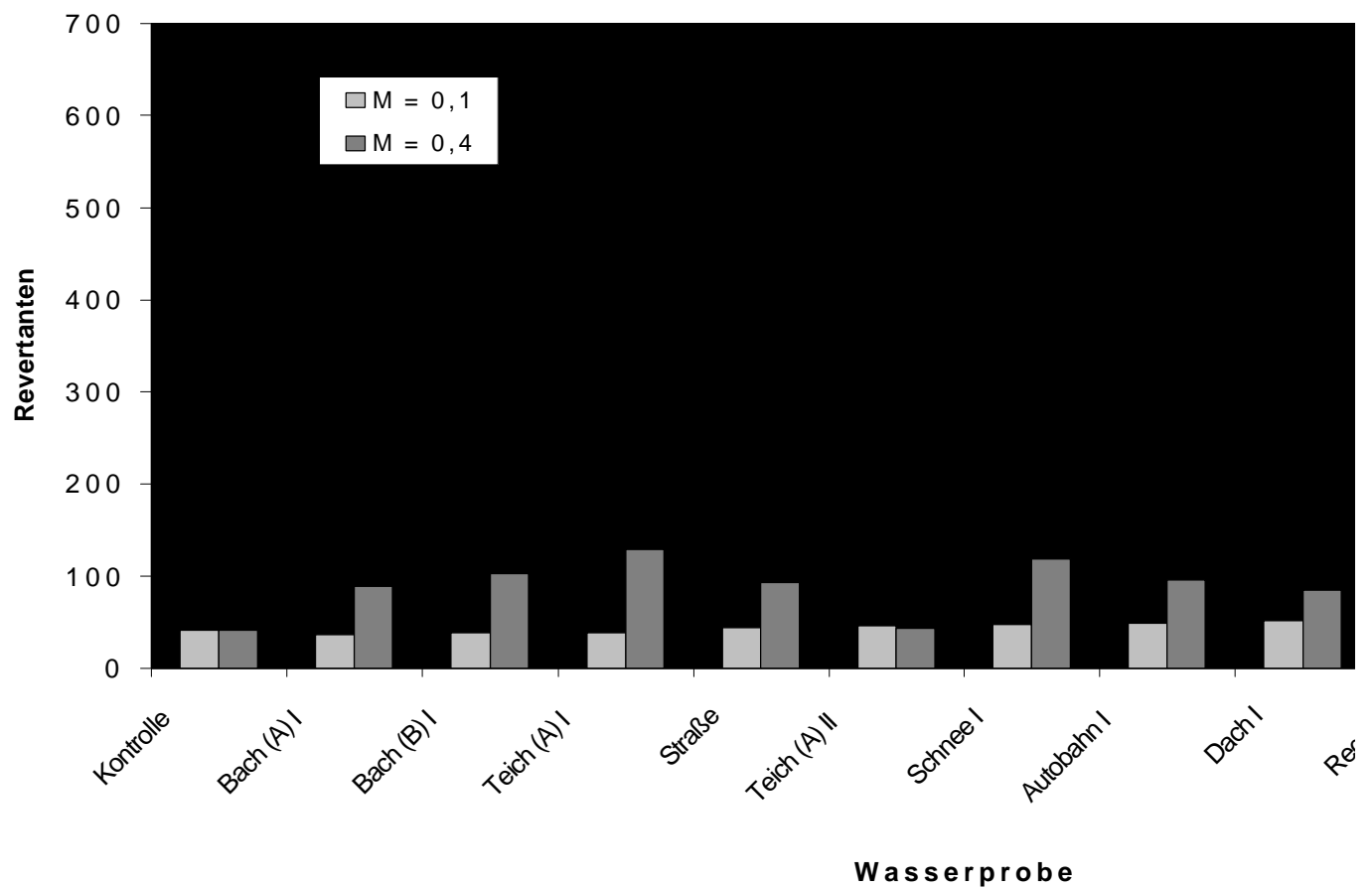


Abbildung 17: Ergebnisse im Ames-Test. Anzahl der Revertanten bei zwei Stämmen von *Salmonella typhimurium*: Blue-Chitin-Extrakten und metabolischer Aktivierung. Daten aus Tabelle 9. M = eingesetzte Menge des Extrakte Blue-Chitin Probe.

Ergebnisse

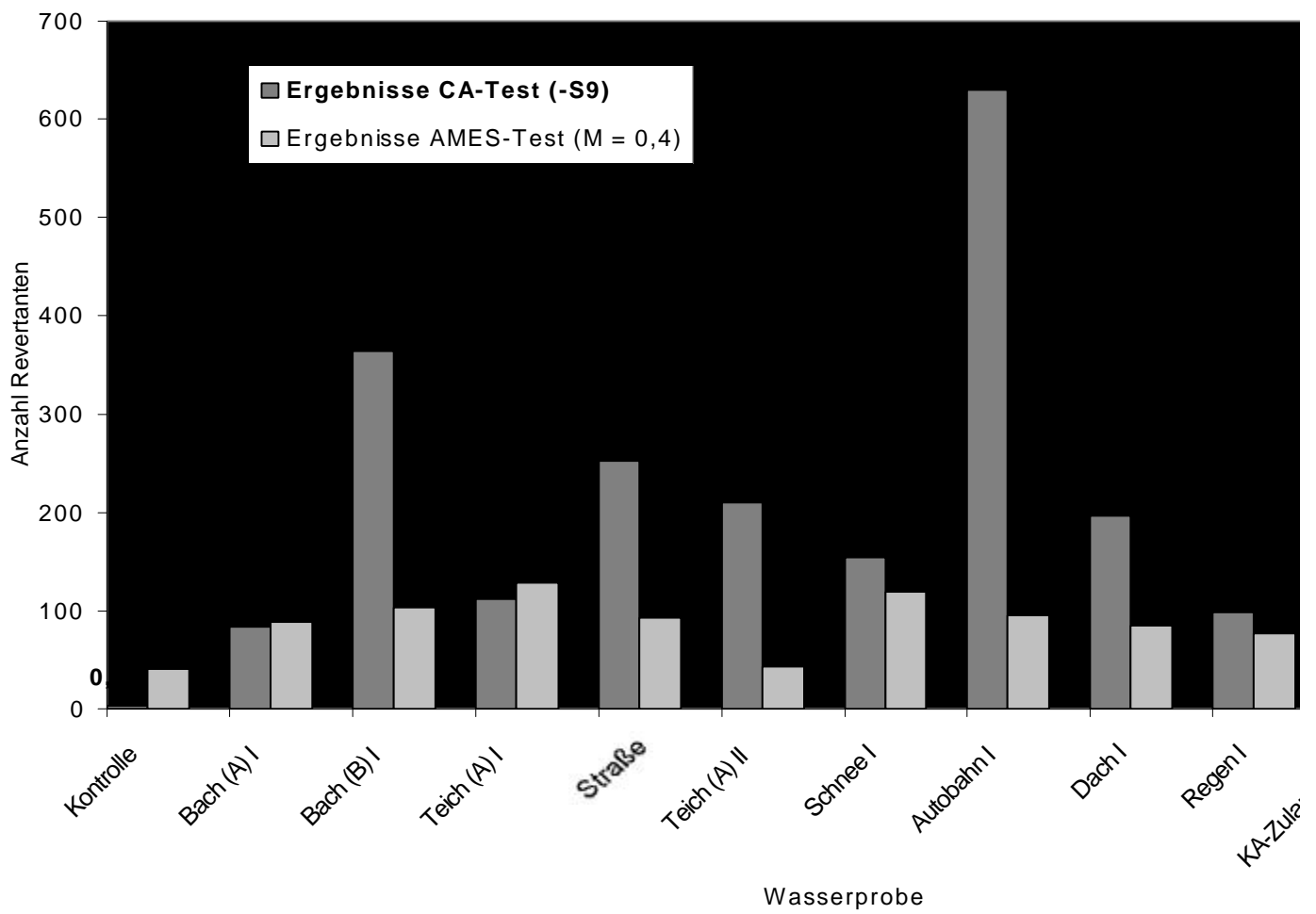


Abbildung 18: Ergebnisse ausgewählter Wasserproben aus dem Ames-Test und CA-Test im Vergleich. Daten aus T

Ergebnisse

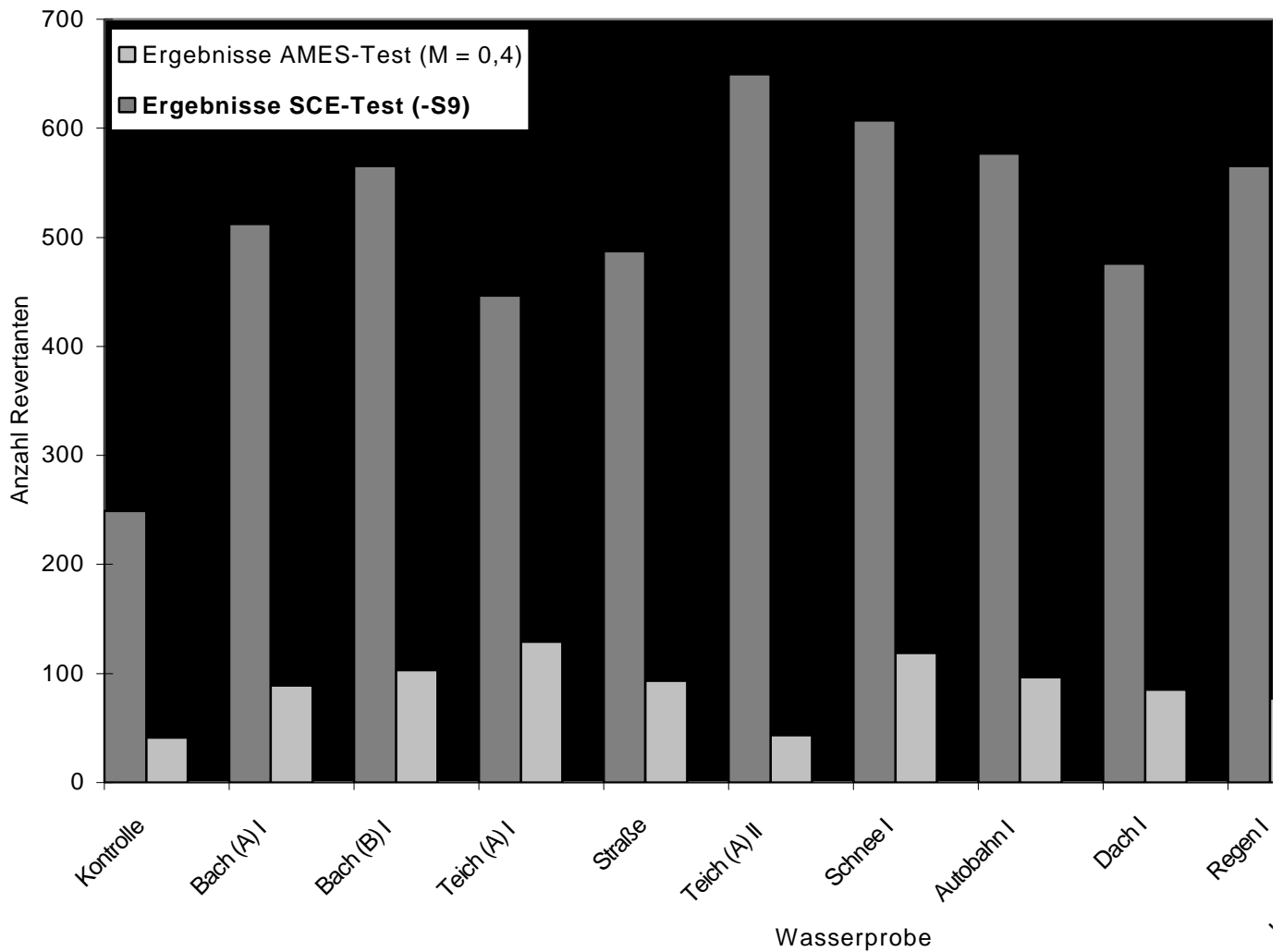


Abbildung 19: Ergebnisse ausgewählter Wasserproben aus dem AmesTest und SCE-Test im Vergleich. Daten aus

3.1.1 Autobahnabfluß

CHO-Zellen wurden mit Extrakten aus Autobahnabflußwasser behandelt, das nach Versickerung durch eine 30 cm dicke Bodenschicht gewonnen wurde. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Alle drei Wasserproben induzierten eine hohe Zahl an geschädigten Metaphasen (Abbildung 20). Probe I lieferte 45 %, Probe II 80 % und Probe III 88 % aberrante Metaphasen ohne metabolische Aktivierung. Bei Verwendung von S9-Mix wurden deutlich weniger aberrante Zellen gefunden. Die Extrakte induzierten überwiegend Chromatidentypaberrationen, wie triradiale und quadriradiale Chromosomenkonfigurationen. Bei einigen Zellen waren die Schäden so massiv, daß die Chromosomen pulverisiert und fragmentiert vorlagen (Abbildung 10).

Alle drei Proben induzierten eine erhöhte Anzahl SCE (Abbildung 21). Der höchste Wert wurde mit 16,48 SCE pro Zelle bei Probe I ohne metabolische Aktivierung festgestellt, mit metabolischer Aktivierung liegt der entsprechende Wert bei 10,00 SCE pro Zelle. Bei den anderen beiden Proben hatte der Zusatz von S9-Mix keinen Einfluß auf die SCE-Häufigkeit. Probe II lieferte ohne S9 10,88 und mit S9 11,18 SCE pro Zelle und bei Probe III lagen die Werte bei 12,38 ohne und 13,42 mit metabolischer Aktivierung.

An Probe II und III wurde von Mitarbeitern von Prof. Hayatsu in Japan der Ames-Test durchgeführt (Tabelle 9, Abbildung 17). Der Extrakt von Autobahn III erwies sich als stark mutagen und lieferte 9000 Revertanten bei Einsatz von 1/10 einer Blue-Chitin-Probe und über 10000 Revertanten bei 4/10. Probe I zeigte bei 4/10 mit 93 Revertanten eine schwache Mutagenität.

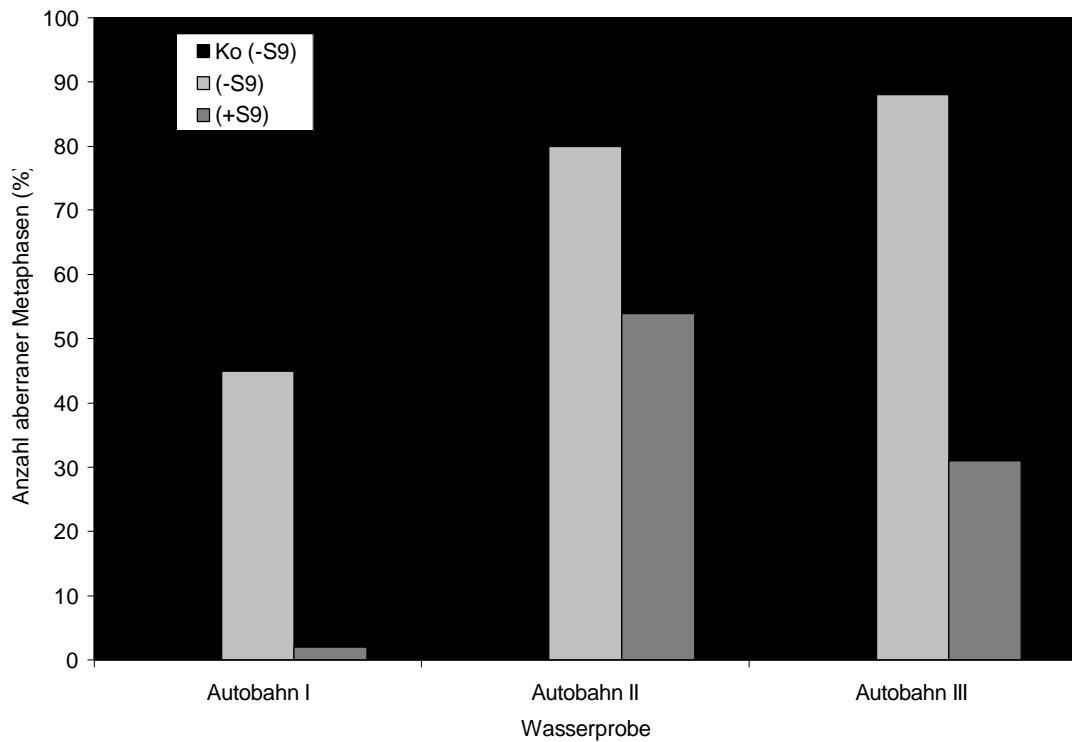


Abbildung 20: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakten aus Autobahnabfließwässern. Daten aus Tabelle 4

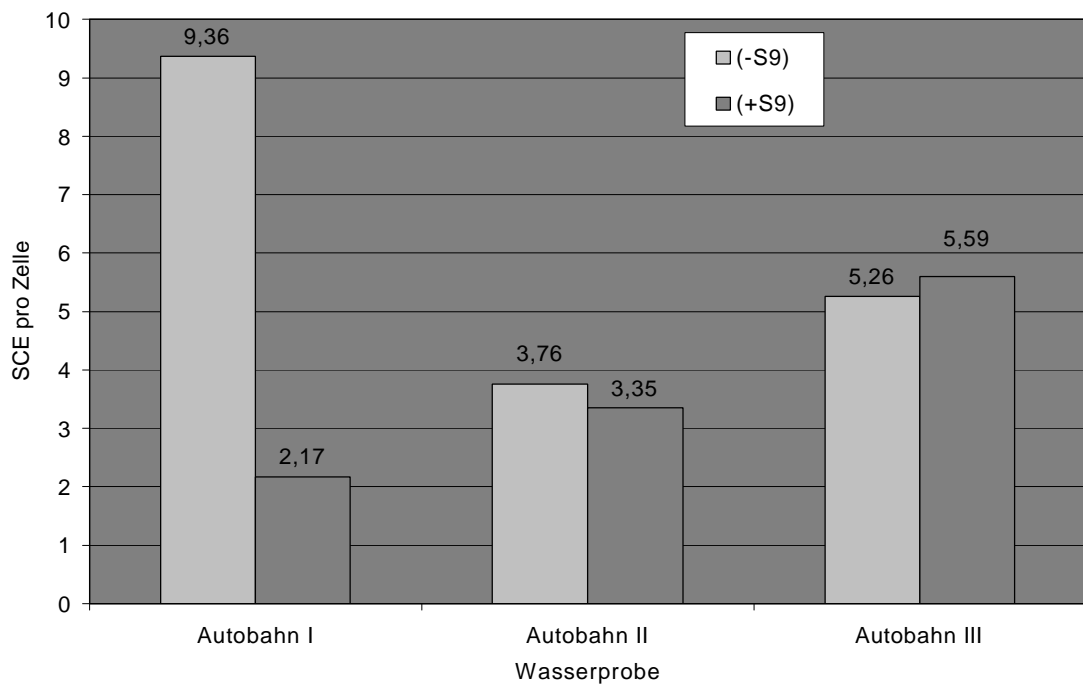


Abbildung 21: SCE-Frequenz abzüglich Kontrollwerten (6,97) in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Cotton-Extrakt aus Autobahnabfließwasser. Daten berechnet aus Tabelle 4.

3.1.2 Bach

Die Extrakte aus Wasserproben, mit denen die Zellen behandelt wurden, stammten aus zwei verschiedenen Bachläufen (Bach A und B) und wurden im Sommer (S) und im Winter entnommen (W). Bach A fließt durch ein ländliches Gebiet, Bach B durch mehrerer Wohngebiete. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Allen Proben waren mutagen und induzierten in CHO-Zellen CA und SCE. Zwischen beiden Bächen kann ein deutlicher Unterschied in der Mutagenität festgestellt werden. Extrakte aus Bach A riefen deutlich weniger geschädigte Metaphasen hervor als Extrakte aus Bach B. Die Werte mit metabolischer Aktivierung sind in allen Proben niedriger als ohne metabolische Aktivierung. Die induzierten CA sind überwiegend vom Chromatidentyp. In beiden Bachläufen läßt sich eine saisonale Abhängigkeit in der Mutagenität feststellen (Abbildung 22). Im Sommer wurden mehr aberrante Metaphasen induziert als im Winter. Bach A zeigt im Sommer 9 % geschädigte Metaphasen und im Winter 6 %. Wasserextrakt aus Bach B rief im Sommer 34 % aberrante Metaphasen hervor und im Winter 26 %.

Alle Wasserproben induzierten SCE (Tabelle 5, Abbildung 23). Die Proben aus Bach B waren mutagener als die Proben aus Bach A. Bei Betrachtung der SCE-Frequenz fällt keine saisonale Abhängigkeit auf. Bei Bach A wurden im Winter 14,64 SCE pro Zelle ohne metabolische Aktivierung gefunden und im Sommer 10,68. Wasserextrakte aus Bach B induzierten zu beiden Entnahmezeitpunkten ohne metabolische Aktivierung 16,1 SCE pro Zelle. Unter Verwendung der externen Metabolisierung wurden im Winter 13,30 SCE und im Sommer 8,96 SCE induziert.

Wasserproben aus beiden Bächen wurden dem Ames-Test unterzogen (Tabelle 9, Abbildung 17). Wasser aus Bach A, das im Winter entnommen wurde, induzierte 89 und die Winterprobe von Bach B 103 Revertanten. Der Ames-Test lieferte ein schwaches positives Ergebnis, die beiden anderen Tests ein deutlich positives Ergebnis.

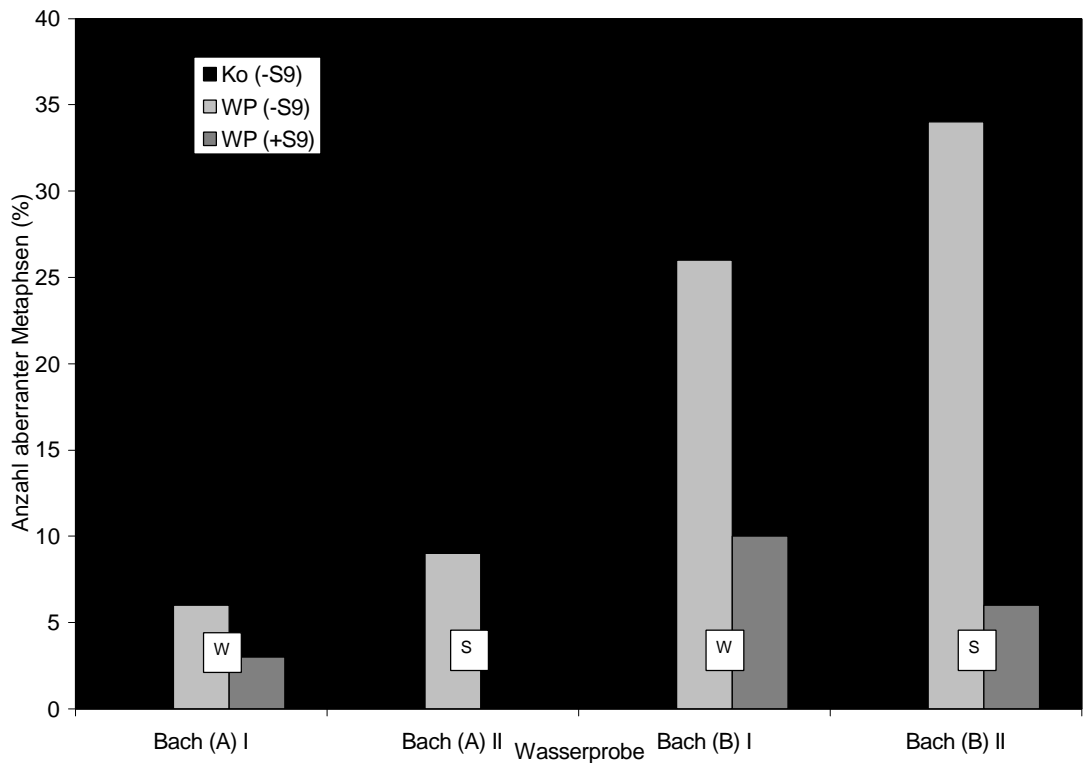


Abbildung 22: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus zwei verschiedenen Bachläufen (Bach A und B) zu unterschiedlichen Jahreszeiten (W = Winter, S = Sommer). Daten aus Tabelle 5.

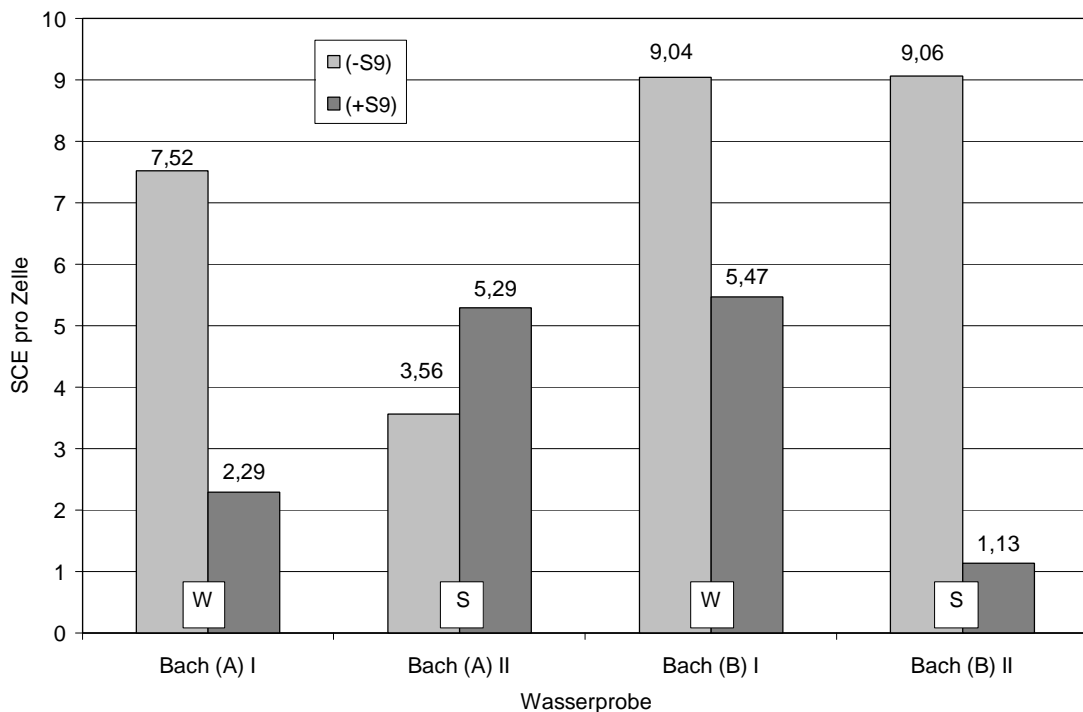


Abbildung 23: SCE-Frequenz abzüglich Kontrollwerten (6,97) in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus zwei verschiedenen Bachläufen (Bach A und B) zu unterschiedlichen Jahreszeiten (W = Winter, S = Sommer). Daten berechnet aus Tabelle 5.

3.1.3 Teich

Aus zwei verschiedenen Teichen wurden Blue-Rayon-Extrakte hergestellt und CHO-Zellen mit diesen Extrakten behandelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Alle Wasserproben induzierten CA und SCE. Wasserextrakte aus Teich A waren schwächer mutagen als Wasserextrakte aus Teich B (Abbildung 24). Der Extrakt aus Teich A induzierte im Winter 8 % und im Sommer 15 % geschädigte Metaphasen, der Extrakt aus Teich B induzierte 26 Metaphasen mit CA. Für Teich A war ein saisonaler Unterschied in der Induktion von CA zu erkennen. Wasserextrakt, der im Sommer gewonnen wurde, induzierte deutlich mehr Metaphasen mit CA als Wasserextrakt, der im Winter gewonnen wurde. Der Versuchsaufbau von Bach B wurde im Winter mutwillig zerstört, so daß keine Daten erhoben werden konnten.

Nach Behandlung mit den Extrakten konnten bei allen Wasserproben in den Zellen eine deutlich erhöhte SCE-Frequenz festgestellt werden (Tabelle 4, Abbildung 25). Bei metabolischer Aktivierung mit S9-Mix waren die SCE-Frequenzen niedriger als ohne metabolische Aktivierung. Bei Teich A war auch mit dem SCE-Test eine saisonale Abhängigkeit der Mutagenität feststellbar. Im Winter wurden ohne S9 12,76 SCE pro Zelle induziert und im Sommer 18,56. Der Extrakt aus Teich B induzierte im Sommer 16,84 SCE pro Zelle ohne metabolische Aktivierung.

Der Ames-Test wurde mit Blue-Rayon-Extrakten aus Teich A durchgeführt (Tabelle 9, Abbildung 17). Probe I, die im Winter genommen wurde, lieferte bei 4/10 der eingesetzten Menge 129 Revertanten und zeigt somit eine schwache Mutagenität. Die Probe, die im Sommer genommen wurde induzierte 43 Revertanten und lag mit diesem Wert im Bereich der Kontrolle.

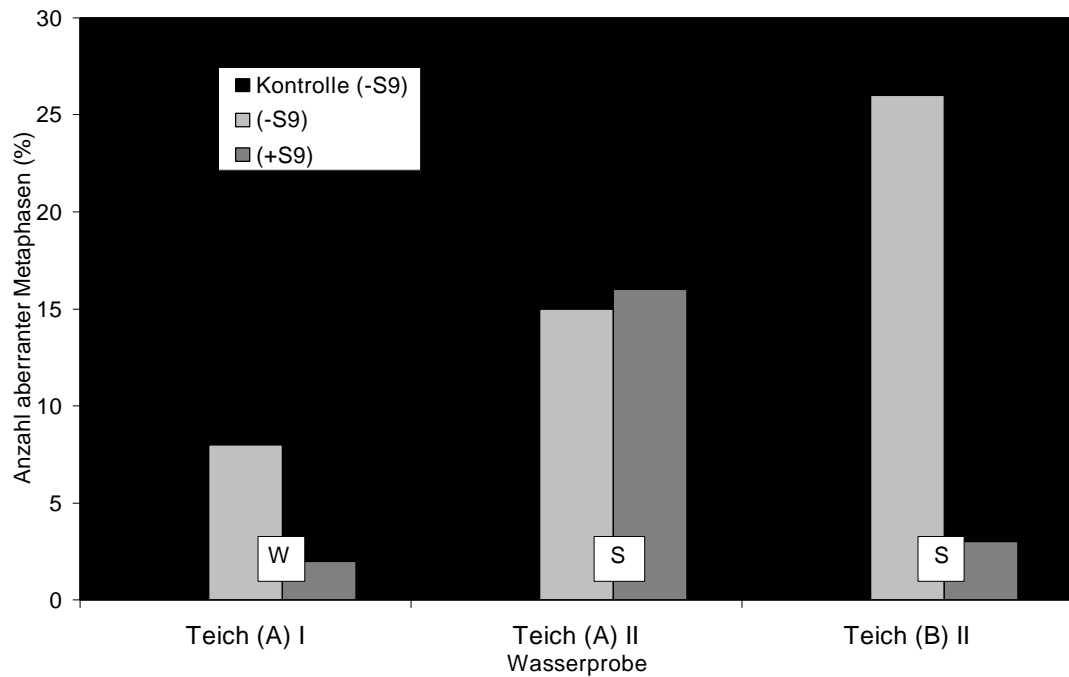


Abbildung 24: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus zwei verschiedenen Teichen (Teich A und B) zu unterschiedlichen Jahreszeiten (W = Winter, S = Sommer). Daten aus Tabelle 4.

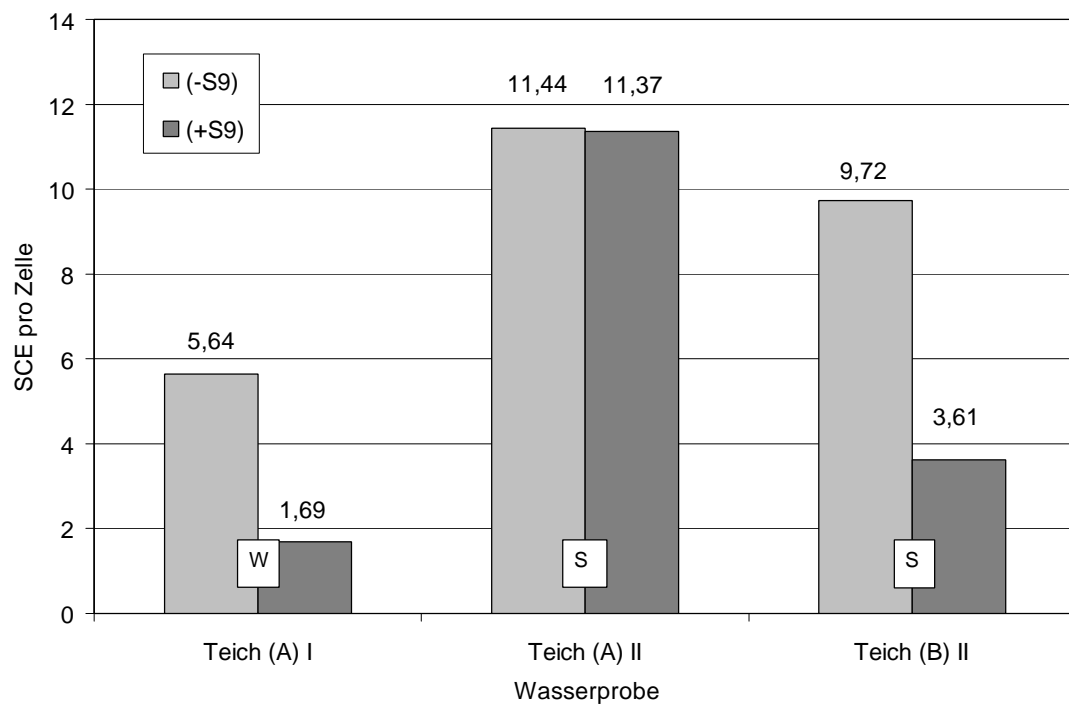


Abbildung 25: SCE-Frequenz abzüglich Kontrollwerten (6,97) in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus zwei verschiedenen Teichen (Teich A und B) zu unterschiedlichen Jahreszeiten (W = Winter, S = Sommer). Daten berechnet aus Tabelle 4.

3.1.4 Fluß

Blue-Rayon-Säckchen wurden an drei verschiedenen Stellen in einen Flußlauf eingebracht. Probe I stammte von einer Stelle oberhalb des Einlaufes eines Baches, in den eine Kläranlage ihr gereinigtes Abwasser einleitete. Probe III wurde unmittelbar hinter der Mündung des Baches genommen und Probe II stammte von einer Region etwa 500 m flußabwärts. Die Ergebnisse können Tabelle 6 entnommen werden.

Alle drei Wasserproben zeigten ein positives Ergebnis im Test auf CA-Induktion (Tabelle 6, Abbildung 26). Probe I lieferte 3 % aberrante Metaphase, Probe II 5 % und Probe III 10 %, jeweils ohne metabolische Aktivierung. Bei Zugabe von S9-Mix wurden deutlich weniger geschädigte Metaphasen gefunden. Die Wasserextrakte induzierten Chromatidentypaberrationen.

Der SCE-Test fiel für alle drei Wasserproben ebenfalls positiv aus, was sich in einer Verdopplung der SCE-Frequenz über den Kontrollwert äußerte (Tabelle 6, Abbildung 27). Probe I lieferte 14,64 SCE pro Zelle, Probe II 23,28 und Probe III 14,24. Auch bei Zugabe von S9-Mix konnte eine deutliche Erhöhung der SCE-Häufigkeit in allen Proben beobachtet werden, die für die erste Entnahmestelle bei 12,14 SCE pro Zelle lag, für die zweite bei 14,45 und für die dritte bei 9,86.

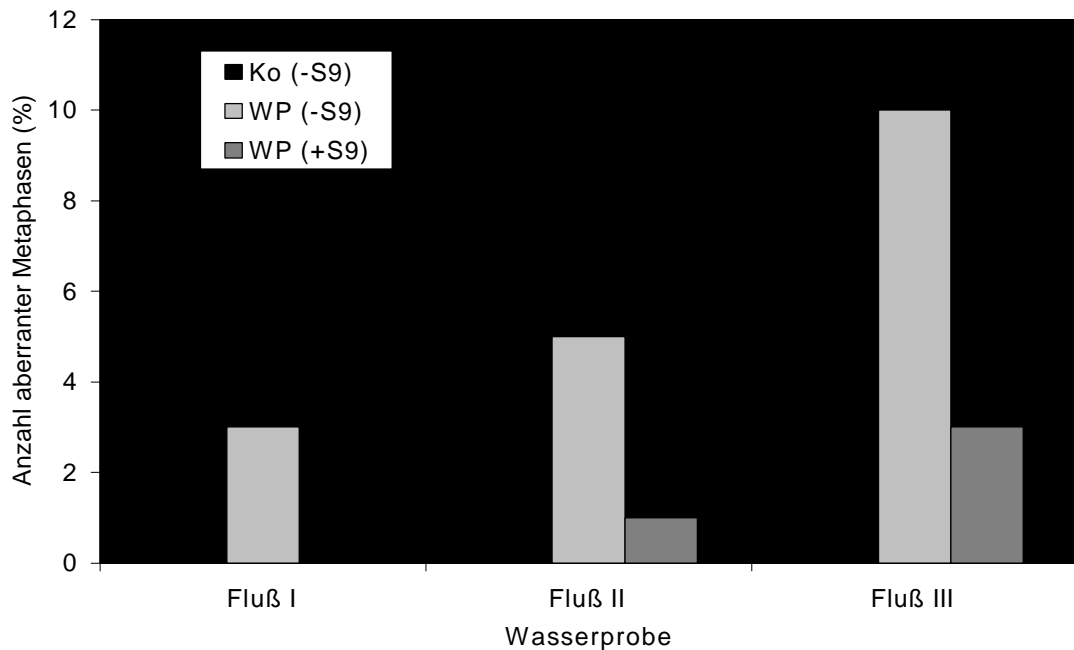


Abbildung 26: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus verschiedenen Entnahmestellen eines Flußlaufes. (I: oberhalb einer Bachmündung, in den eine Kläranlage gereinigtes Abwasser einleitet, II: etwa 500 m unterhalb der Bachmündung, III: unmittelbar an der Mündung des Baches). Daten aus Tabelle 6.

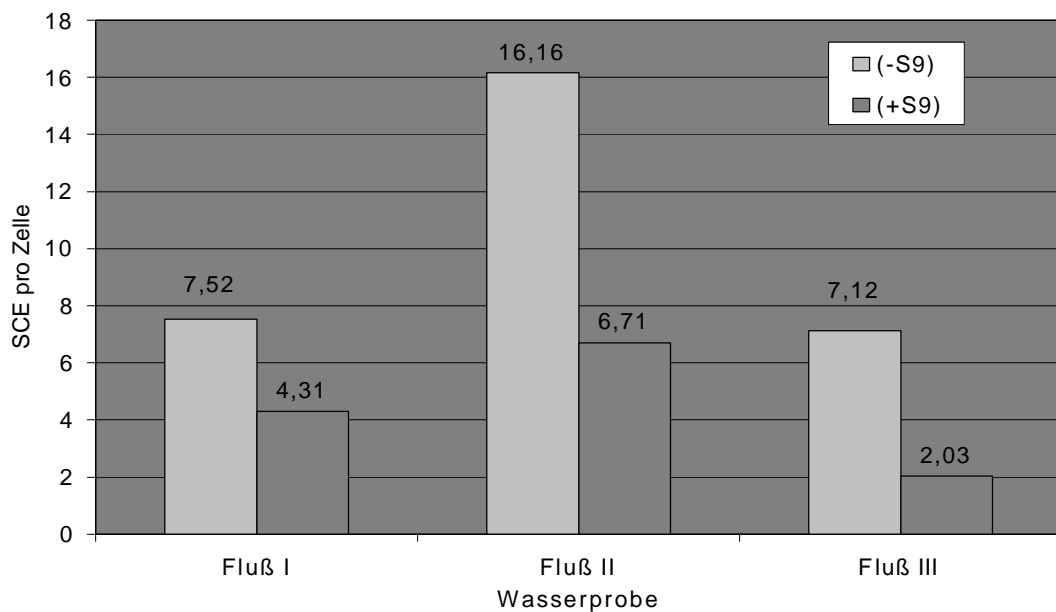


Abbildung 27: SCE-Frequenz abzüglich Kontrollwerten (6,97) in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus verschiedenen Entnahmestellen eines Flußlaufes. (I: oberhalb einer Bachmündung, in den eine Kläranlage das gereinigte Abwasser einleitet, II: etwa 500 m unterhalb der Bachmündung, III: unmittelbar an der Mündung des Baches). Daten berechnet aus Tabelle 6.

3.1.5 Kläranlage

Zwei verschiedene Kläranlagen wurden beprobt (A und B). Dazu wurden Blue-Rayon-Säckchen jeweils in den Abwasserzulauf, unmittelbar hinter dem Grobrechen der Kläranlage, eingebracht und in den Ablauf, unmittelbar an der Einleitungsstelle in einen Bach. Kläranlage A wurde im Sommer und Winter beprobt. Die Ergebnisse können Tabelle 7 entnommen werden.

Bei allen drei Untersuchungen zeigte sich, daß das schmutzige Abwasser aus dem Zulauf deutlich mehr aberrante Metaphasen induziert, als das gereinigte Abwasser aus dem Ablauf (Abbildung 28). Bei Kläranlage A induzierten Proben aus dem Zulauf im Winter 19 % und Proben aus Ablauf 13 % geschädigte Metaphasen. Im Sommer wurden 23 % aus dem Zulauf und 19 % aus dem Ablauf nachgewiesen. Bei Kläranlage B induzierte Wasser aus dem Zulauf 16 % aberrante Metaphasen und Wasser aus dem Ablauf 15 %. Bei den beobachteten Aberrationen handelte es sich fast ausschließlich um Chromatidentypaberrationen. Bei Kläranlage A konnte ein saisonaler Einfluß auf die Induktion von CA beobachtet werden. Wasserproben, die im Sommer entnommen wurden, zeigten eine höhere Mutagenität als Wasserproben, die im Winter entnommen wurden.

Alle Proben zeigten eine stark erhöhte SCE-Frequenz gegenüber dem Kontrollwert (Tabelle 7, Abbildung 29). Bei Kläranlage A war der Wert für die Wasserprobe aus dem Zulauf höher als aus dem Ablauf. Bei allen anderen Proben induzierten die Wasserextrakte aus dem Ablauf eine höhere SCE-Frequenz als die Proben aus dem Zulauf. Ohne metabolische Aktivierung wurden in allen Fällen mehr SCE induziert als mit Zugabe von S9-Mix.

Zwei Wasserproben aus Zu- und Ablauf der Kläranlage A (Winter) wurden dem Ames-Test unterzogen (Tabelle 9, Abbildung 17). Dieser zeigte für beide Proben ein eindeutig positives Ergebnis. Das Wasser aus dem Zulauf induzierte bei 1/10 der Menge einer Blue-Rayon-Probe 125 Revertanten und bei 4/10 625. Wasser aus dem Ablauf rief bei 1/10 185 Revertanten hervor und bei 4/10 566 Revertanten.

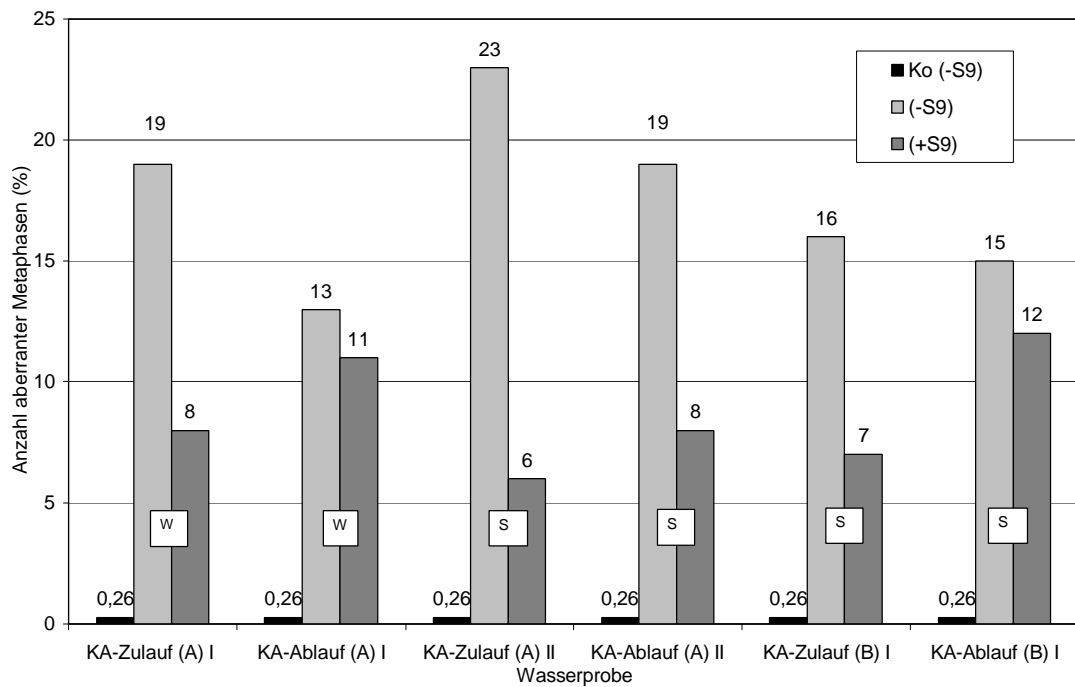


Abbildung 28: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus dem Zu- und Ablauf einer Kläranlage zu unterschiedlichen Jahreszeiten (S = Sommer, W = Winter). Daten aus Tabelle 7.

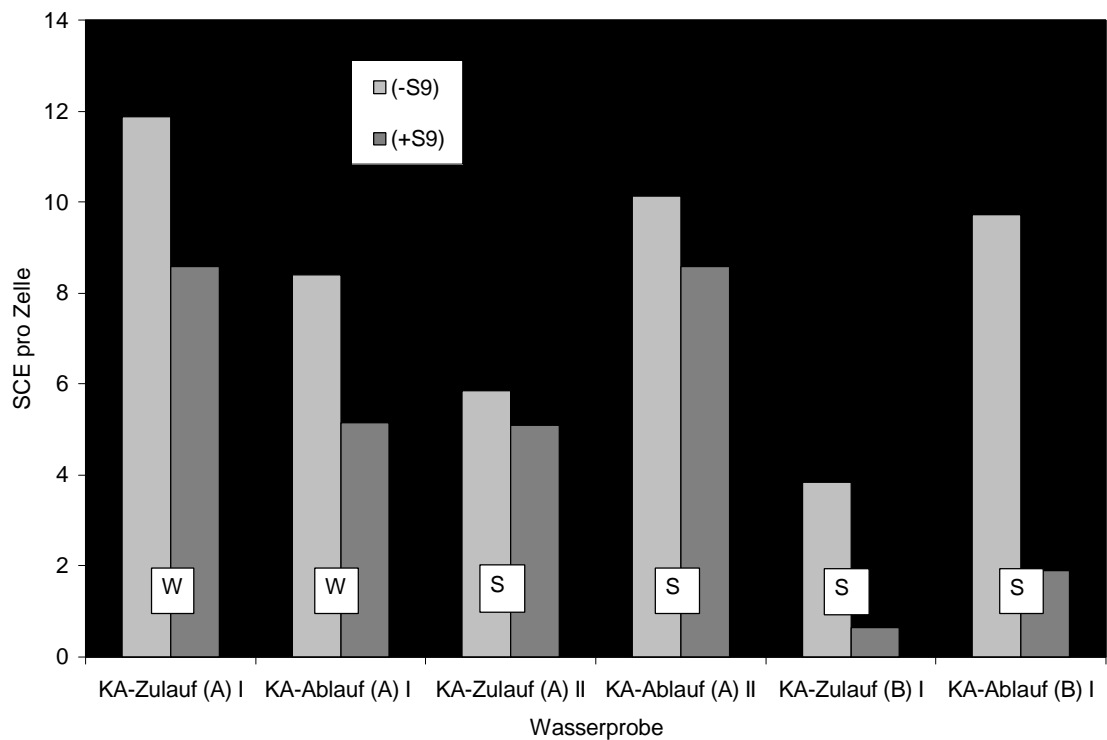


Abbildung 29: SCE-Frequenz abzüglich Kontrollwerten (6,97) in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Rayon-Extrakt aus dem Zu- und Ablauf einer Kläranlage zu unterschiedlichen Jahreszeiten (S = Sommer, W = Winter). Daten aus Tabelle 7.

3.1.6 Dach- und Straßenabfluß

CHO-Zellen wurden mit Blue-Chitin-Extrakten behandelt, die nach einem Regenereignis aus zwei Dachabläufen und einem Straßenabfluß gewonnen wurden. Die Tabellen 5 und 6 fassen die Ergebnisse zusammen. Alle Wasserproben zeigten im CA-Test ein positives Ergebnis. Der Extrakt des Straßenablaufs induzierte 18 % aberrante Metaphasen und die Mutagenität der Dachabflüsse äußerte sich in der Induktion von 14 % und 16 % geschädigten Metaphasen (Abbildung 30). Es wurden überwiegend Chromatidentypaberrationen induziert. Der Zusatz von S9-Mix reduzierte die Anzahl geschädigter Metaphasen.

Alle Proben riefen eine erhöhte Anzahl an SCE hervor (Tabelle 4 und 5). Der SCE-Wert nach Behandlung mit Wasserextrakt aus Dachablauf II mit 9,40 ohne metabolische Aktivierung und 9,76 mit metabolischer Aktivierung war nur wenig gegenüber dem Kontrollwert von 7,12 ohne und 7,83 SCE pro Zelle mit metabolischer Aktivierung erhöht. Der Wert nach Behandlung mit Extrakt aus Dachabfluß I lag mit 13,60 deutlich über dem Kontrollwert. Wasser von einem Straßenabfluß induzierte 13,92 SCE pro Zelle ohne metabolische Aktivierung.

Mit Extrakten aus Dachabfluß I und dem Straßenabfluß wurde der Ames-Test durchgeführt (Tabelle 9, Abbildung 17). 1/10 einer Blue-Chitin-Probe aus Dachabfluß I induzierte in *Salmonella typhimurium* TA98 51 Revertanten, 4/10 der gleichen Probe induzierte 85 Revertanten. Im Stamm YG1024 wurden 41 und 80 Revertanten induziert. Der Extrakt aus Straßenabfluß induzierte im Stamm TA98 44 Revertanten bei 1/10 der Probe und 93 Revertanten bei 4/10 und im Stamm YG1024 33 und 39 Revertanten.

3.1.7 Regen und Schnee

Jeweils zwei Blue-Chitin-Proben von Regen und Schnee wurden auf ihr mutagenes Potential hin untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 und den Abbildung 30 und 31 dargestellt. Alle Proben induzierten CA und SCE. Extrakte aus Schnee wirkten stärker mutagen als Extrakte aus Regen. Die Regenproben riefen jeweils 7 % aberrante Metaphasen hervor, die Schneeproben 11 % und 14 %. Ein

Zusatz von S9-Mix führte nicht zu einer erhöhten Anzahl geschädigter Zellen. In allen vier Proben wurden ausschließlich Chromatidentypaberrationen beobachtet.

Die SCE-Frequenz lag bei beiden Regenproben deutlich über dem Kontrollwert. Probe I zeigte eine durchschnittliche Anzahl SCE pro Zelle von 16,16 ohne und 13,62 mit metabolischer Aktivierung. Bei Probe II lagen die Werte bei 14,80 und 8,90. Die SCE-Häufigkeit, die nach Behandlung mit Extrakt aus Schnee I auftrat, lag bei 17,34 ohne und 14,20 mit metabolischer Aktivierung. Probe II zeigte im Mittel 10,68 SCE pro Zelle ohne und 7,30 mit metabolischer Aktivierung.

Proben von Regen I und Schnee I wurden dem Ames-Test unterzogen (Tabelle 9, Abbildung 17). Der Regenextrakt induzierte im Stamm TA98 bei 1/10 der Probe 56 Revertanten und bei 4/10 77 Revertanten. Im Stamm YG1024 wurden 41 und 72 Revertanten induziert. Die Werte liegen nur wenig über den Kontrollwerten von 41 Revertanten bei TA98 und 23 Revertanten bei YG1024. Die Schneeprobe induzierte im Stamm TA98 48 Revertanten bei 1/10 und 119 Revertanten bei 4/10.

3.1.8 Leitungswasser

CHO-Zellen wurden mit Blue-Chitin-Extrakt aus Leitungswasser behandelt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 und den Abbildungen 30 und 31 dargestellt. Es wurden weder CA noch SCE induziert. Eine Metaphase wies einen Chromatidenbruch auf. Die SCE-Frequenz liegt mit 5,62 ohne metabolische Aktivierung und 6,4 mit metabolischer Aktivierung unter den Kontrollwerten von 7,12 und 7,83.

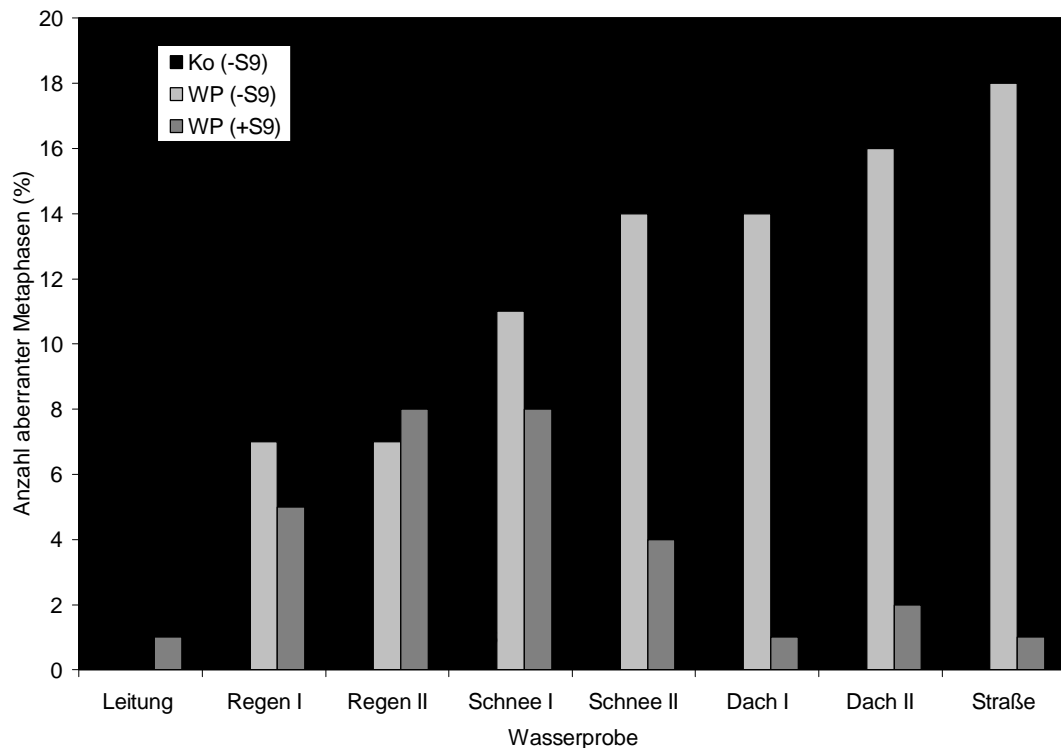


Abbildung 30: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Wasserproben von Leitungswasser, Regen, Schnee, Dach- und Straßenabfluß. Daten aus Tabelle 6 und 8.

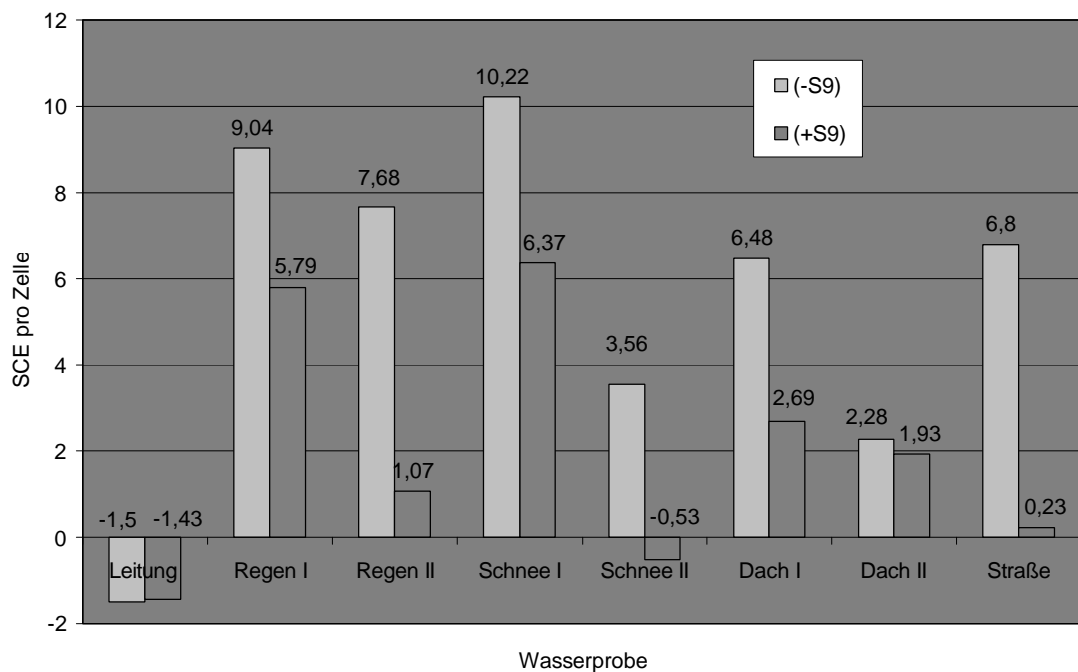


Abbildung 31: SCE-Frequenz abzüglich Kontrollwerten (6,97) in CHO-Zellen nach Einwirkung von Blue-Chitin-Extrakt aus Wasserproben von Leitungswasser, Regen, Schnee, Dach- und Straßenabfluß. Daten berechnet aus Tabelle 6 und 8

3.2 Ergebnisse der Untersuchungen mit metallorganischen Verbindungen

Allen hier dokumentierten Ergebnissen liegen jeweils drei unabhängige Experimente zugrunde, aus denen der Mittelwert und der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet wurde. Der SEM wurde als Fehlerbalken in die Diagramme eingefügt. Dosis-Effekt-Beziehungen für metallorganische Verbindungen wurden mittels Computer Trendlinien berechnet. Formel und Anpassung der Regression „r“ wurden in die Diagramme eingezeichnet.

Folgende metall(oid)organische Verbindungen wurden auf ihr mutagenes Potential untersucht (Tabelle 10):

- Monomethylquecksilberchlorid [MeHgCl, CH₃HgCl]
- Dimethylquecksilberchlorid [Me₂Hg, (CH₃)₂Hg]
- Trimethylzinnchlorid [Me₃SnCl, (CH₃)₃SnCl]
- Monomethylarsinsäure [MMA, CH₃AsO(OH₂)]
- Dimethylarsinsäure [DMA, (CH₃)₂AsOOH]

Verbindung	MeHgCl	Me ₂ Hg	Me ₃ SnCl	DMA	MMA
Konzentration [mmol/ml]					
7,5 x 10 ⁻⁷	X				
1 x 10 ⁻⁶	X	X			
2,5 x 10 ⁻⁶	X				
5 x 10 ⁻⁶	X	X			
7,5 x 10 ⁻⁶	X				
1 x 10 ⁻⁵	X	X			
2,5 x 10 ⁻⁵	T				
5 x 10 ⁻⁵		X	X	X	X
7,5 x 10 ⁻⁵			X		
1 x 10 ⁻⁴			X	X	X
2,5 x 10 ⁻⁴			X	X	X
5 x 10 ⁻⁴			X	X	X
7,5 x 10 ⁻⁴			T	X	X

X = getestete Konzentration T = toxische Konzentration

Tabelle 10: Übersicht über die in der Arbeit verwendeten metallorganischen Verbindungen und die eingesetzten Konzentrationen.

3.2.1 Organischen Quecksilberverbindungen

Nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen MeHgCl konnten in CHO-Zellen eine mit der Dosis zunehmende Anzahl aberranter Metaphasen beobachtet werden (Tabelle 11, Abbildung 32). Die erzielten Daten lassen sich an eine lineare Regression anpassen mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,8953. In den Experimenten betrug die höchste von den Zellen tolerierte Dosis 1×10^{-5} M. Bei dieser Konzentration wurden 35 % zum Teil sehr stark geschädigte Zellen gefunden. Eine Konzentrationserhöhung führte zum Absterben der gesamten Zellpopulation. Die Substanz induzierte S-Phase-abhängig CA. Nach Erholungszeiten von 18 Stunden wurden fast ausschließlich Aberrationen vom Chromatidentyp gefunden, wie triradiale oder quadriradiale Chromosomenkonfigurationen. Nur wenige Zellen wiesen CA vom Chromosomentyp, wie Dizentrische oder Ringchromosomen, auf. Die Verteilung der unterschiedlichen Aberrationstypen kann Tabelle 11 entnommen werden.

Eine Behandlung mit dieser Verbindung führte zu einem linearen Anstieg der durchschnittlichen SCE-Häufigkeit. Der Korrelationskoeffizient liefert einen Wert von 0,9429. Eine Konzentration von etwa 5×10^{-6} M induzierte mit 10,95 SCE pro Zelle eine deutliche Erhöhung der SCE-Frequenz gegenüber des Kontrollwertes von 6,60, eine Verdopplung wurde ab einer Konzentration von $7,5 \times 10^{-6}$ M beobachtet (Tabelle 11, Abbildung 33).

Zur Ermittlung der Aufnahme und Verteilung von MeHgCl wurden die Zellen für 30 und 60 min mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen dieser Substanz inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl mittels einer Zählkammer bestimmt, die Zellen in 5 ml bidestilliertem Wasser 15 min lysiert und das in der wässrigen Lösung enthaltene Quecksilber mit unterschiedlichen analytischen Meßmethoden, wie Kaltdampf-Adsorptionsspektrometrie (AAS) und Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) bestimmt. Die Meßdaten sowie die Ergebnisse der Umrechnung auf die Konzentration in den Zellen können Tabelle 12 entnommen werden. In den Messungen wurde das vorhandene Quecksilber als anorganisches Hg^{2+} detektiert. Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration wurde dieser Wert auf das eingesetzte Methylquecksilberchlorid umgerechnet. Die Ergebnisse

zeigen, daß die Substanz sehr rasch von den Zellen aufgenommen wurde. Innerhalb von 30 Minuten fand ein Konzentrationsausgleich zwischen den Zellen und dem sie umgebenden Außenmedium statt. Eine Erhöhung der Behandlungsdauer führte nicht zu einem höheren intrazellulären Gehalt an Quecksilber. Bei einer Konzentration von 1×10^{-7} M MeHgCl konnte nach 30 minütiger Inkubation in den Zellen $7,3 \times 10^{-6}$ ng MeHgCl nachgewiesen werden und nach einer Stunde $6,9 \times 10^{-6}$ ng. Eine Konzentrationserhöhung auf 1×10^{-6} M führte zu einer Erhöhung der Menge innerhalb der Zellen auf $4,48 \times 10^{-5}$ ng nach 30 Minuten und $5,0 \times 10^{-5}$ ng nach einer Stunde. Nach einer Behandlung von CHO-Zellen mit 1×10^{-7} M MeHgCl wurden keine Metaphasen mit Aberrationen gefunden. Mit analytischen Meßmethoden konnte in den Zellen aber eine Menge von etwa $6,9 \times 10^{-6}$ ng MeHgCl bei 60-minütiger Inkubation und $7,3 \times 10^{-6}$ ng MeHgCl bei 30-minütiger Inkubation festgestellt werden, was einer intrazellulären Konzentration von $2,70 \times 10^{-17}$ M und $2,90 \times 10^{-17}$ M entsprach. Eine Behandlung mit 1×10^{-6} M führte zu 2,67 % aberranten Metaphasen bei einer intrazellulären Menge von $4,84 \times 10^{-5}$ ng nach 30-minütiger Behandlung, was einer intrazellulären Konzentration von $1,90 \times 10^{-16}$ M entsprach, nach 60 Minuten lagen die entsprechenden Werte bei $5,9 \times 10^{-5}$ ng und $1,99 \times 10^{-16}$ M.

Neben der Induktion von CA und SCE konnte eine weitere Wirkung von MeHgCl beobachtet werden. Die Substanz wirkte ähnlich wie das Spindelgift Colcemid und induzierte sehr stark kondensierte C-Mitosen (Abbildung 14). Diese Effekte wurden nicht quantifiziert.

Nach Exposition der Zellen mit der sehr flüchtigen Verbindung Me₂Hg wurden weder Chromosomenaberrationen noch SCE induziert (Tabelle 13). Bei der höchsten getesteten Konzentration lag die Anzahl aberranter Zellen bei 2,3 % und die mittlere Anzahl SCE pro Zelle war mit 8,64 nur wenig höher als der Kontrollwert von 5,94.

Eine Behandlung mit anorganischem Quecksilber in Form von Hg₂Cl führte weder zu CA noch zu einer erhöhten Anzahl von SCE (Tabelle 14).

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	chromosomale Aberrationen										
			DIZ	RING/MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD	
Kontrolle	300 (3) / 150 (3)	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$7,5 \times 10^{-7}$ M	300 (3) / 150 (3)	2,67	0,67	0,00	0,00	0,33	0,67	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00
1×10^{-6} M	300 (3) / 150 (3)	2,67	0,00	0,00	0,33	0,00	0,67	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00
$2,5 \times 10^{-6}$ M	300 (3) / 150 (3)	7,00	0,33	1,00	3,67	2,00	1,00	0,33	1,33	0,33	0,00	0,00	0,00
5×10^{-6} M	300 (3) / 150 (3)	17,33	0,33	0,00	5,00	11,00	7,00	0,33	7,00	2,67	0,67	0,67	0,67
$7,5 \times 10^{-6}$ M	300 (3) / 150 (3)	29,67	0,00	0,00	9,67	17,67	14,67	2,33	19,33	2,67	0,67	2,67	2,67
1×10^{-5} M	300 (3) / 150 (3)	35,33	0,00	0,00	14,00	15,00	13,33	2,33	17,00	5,67	0,33	0,67	0,67

Tabelle 11: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCEFrequenz pro Zelle in CHO-Zellen bei Konzentrationen von Methylquecksilberchlorid. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Probe (Inkubations- zeit)	Konzentration (CH ₃ HgCl) der Behandlungs- lösung	Methode I: Hg als CH ₃ Hg ⁺ nach Austreiben von (CH ₃) ₂ Hg (AAS)	Methode II: Hg als CH ₃ Hg ⁺ nach Destillation (AAS)	Methode III: Hg als CH ₃ Hg ⁺ , Direktmessung (HPLC)	Mittelwert Hg (M I, M II, M III) bezogen auf 1 ml Lösung	Umrechnung auf CH ₃ HgCl in 5 ml Lösung	An :
		c (Hg) / ng/ ml	c (Hg) / ng/ ml	c (Hg) / ng/ ml	c (Hg) / ng / ml	c (CH ₃ HgCl) /ng / 5ml	
A (0,5 h)	1 x 10 ⁻⁷ M	11,00	7,10	9,00	9,03	56,50	7,7
B (1 h)	1 x 10 ⁻⁷ M	8,80	8,40	12,00	9,73	60,90	8,7
C (0,5 h)	1 x 10 ⁻⁶ M	85,10	78,20	82,70	82,00	513,10	1,0
D (1 h)	1 x 10 ⁻⁶ M	101,70	73,10	119,60	98,13	614,05	1,2

M (CH₃HgCl) = 251,04 mol/l M (Hg) = 200,59 mol/l

AAS: Kaltdampf-Atomadsorptionsspektrometrie

HPLC: Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Das Quecksilber wurde als anorganisches Hg²⁺ detektiert. Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration wurde dieser Wert umgerechnet.

Tabelle 12: Ergebnisse der analytischen Quecksilberbestimmung

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen										
			DIZ	RING/ MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD	
Kontrolle	300 (3) / 150 (3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1×10^{-6} M	300 (3) / 150 (3)	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5×10^{-6} M	300 (3) / 150 (3)	0,67	0,00	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1×10^{-5} M	300 (3) / 150 (3)	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5×10^{-5} M	300 (3) / 150 (3)	2,33	0,00	0,00	1,00	0,33	1,00	0,00	0,33	0,33	0,00	0,33	0,33

Tabelle 13: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCEFrequenz pro Zelle in CHO-Zellen bei Konzentrationen von Dimethylquecksilber. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen										
			DIZ	RING/ MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD	
Kontrolle	300 (3) / 150 (3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1×10^{-6} M	300 (3) / 150 (3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5×10^{-6} N	300 (3) / 150 (3)	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1×10^{-5} M	300 (3) / 150 (3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5×10^{-5} M	300 (3) / 150 (3)	0,66	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1×10^{-4} M	300 (3) / 150 (3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Tabelle 14: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCE-Frequenz pro Zelle in CHO-Zellen bei Konzentrationen von Quecksilberchlorid. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

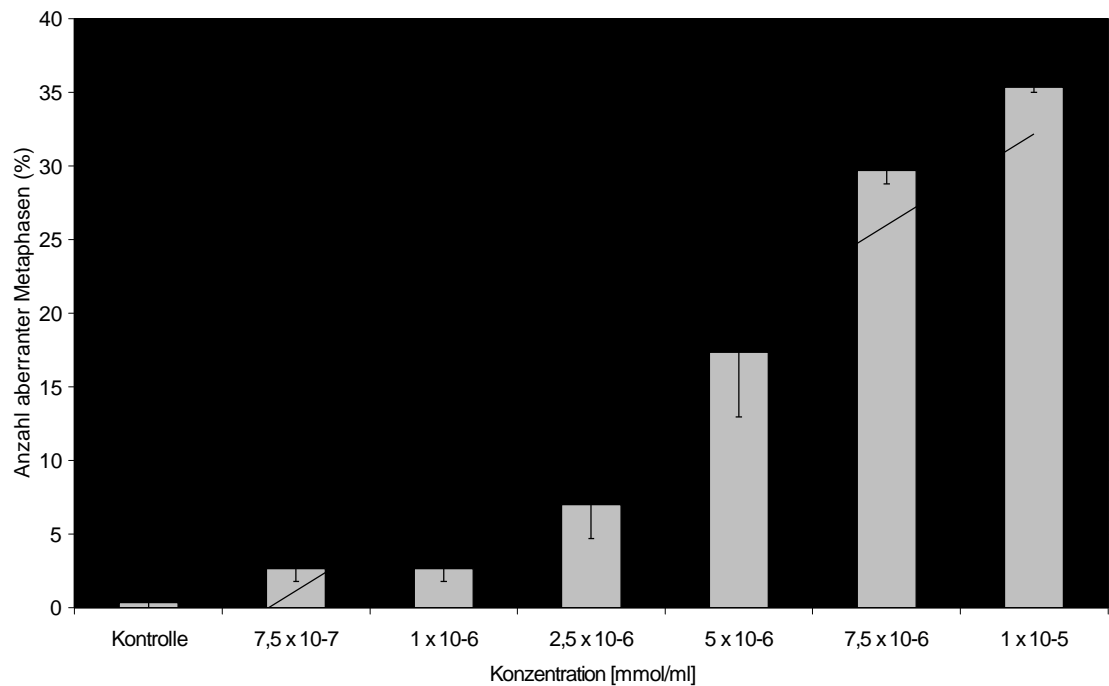


Abbildung 32: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Methylquecksilberchlorid. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, Standardfehler des Mittelwertes (SEM) und Trendlinie. Daten aus Tabelle 11.

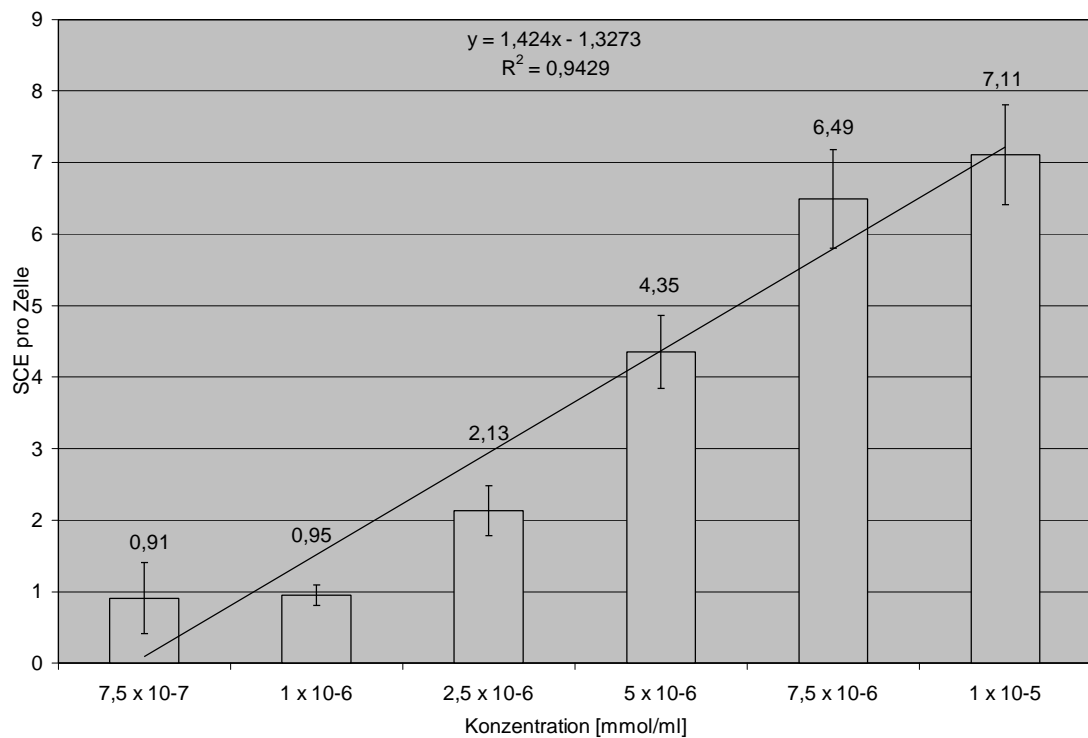


Abbildung 33: SCE-Frequenz in CHO-Zellen abzüglich des Kontrollwertes (6,72) nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Methylquecksilberchlorid. Mittelwerte SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Daten berechnet aus Tabelle 11.

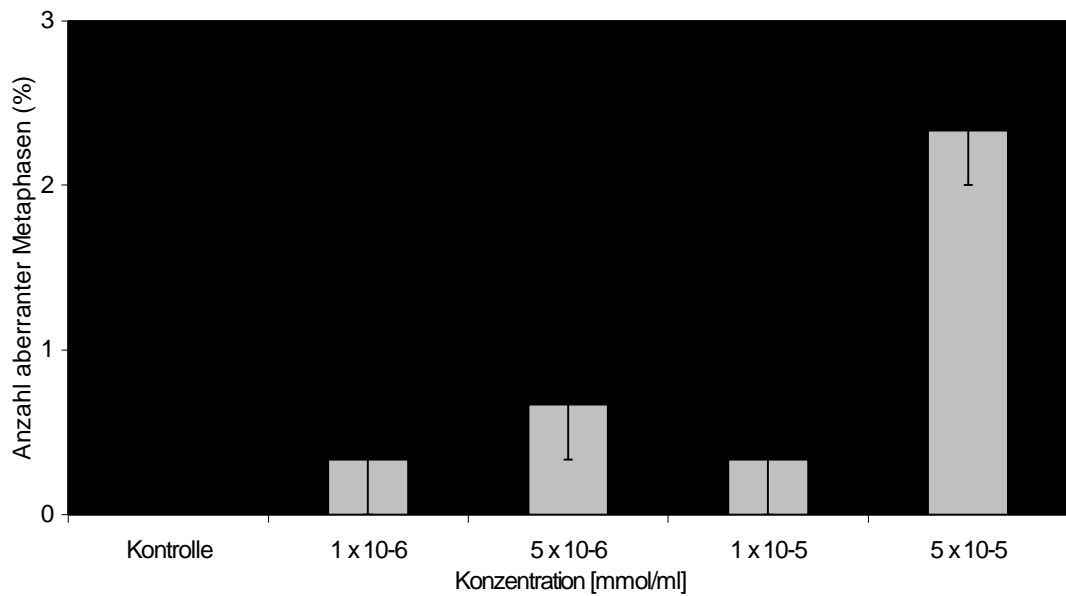


Abbildung 34: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung von Dimethylquecksilber. Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Daten aus Tabelle 13.

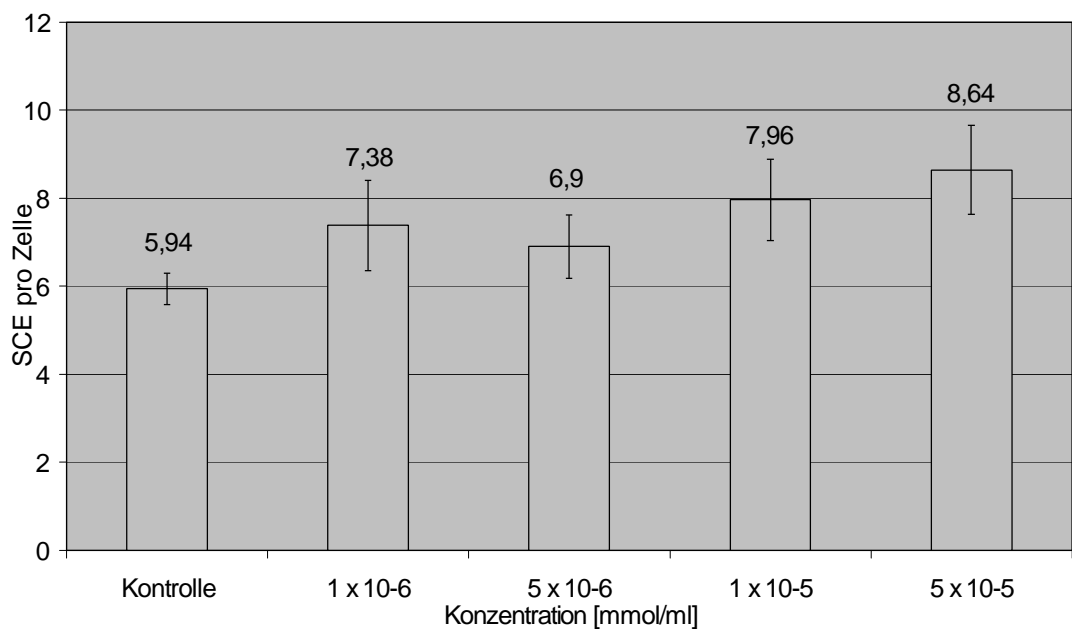


Abbildung 35: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung von Dimethylquecksilber. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und SEM. Daten aus Tabelle 13.

3.2.2 Organischen Zinnverbindungen

CHO-Monolayer wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen Trimethylzinnchlorid behandelt. Die in Tabelle 15 aufgeführten Daten zeigen, daß die Anzahl aberranter Metaphasen mit steigender Konzentration zunimmt (Abbildung 36). Die höchste Anzahl geschädigter Zellen wurde mit 17,33% bei einer Konzentration von 5×10^{-4} M erreicht. Eine Konzentrationserhöhung führte zum Absterben der gesamten Zellpopulation. Trimethylzinnchlorid induzierte überwiegend Chromatidentypaberrationen, nur in wenigen Zellen konnten Aberrationen vom Chromosomentyp, wie dizentrische Chromosomen oder Ringchromosomen beobachtet werden.

Die Substanz induzierte bei den höchsten eingesetzten Konzentrationen SCE (Abbildung 37). Die höchste SCE Frequenz ist mit 11,56 SCE pro Zelle fast doppelt so hoch wie der Kontrollwert mit 6,09 und wurde bei der Konzentration erreicht, die auch die höchste Anzahl aberranter Zellen induzierte.

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen										
			DIZ	RING/MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD	
Kontrolle	300 (3) / 150 (3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
LM-Kontrolle	300 (3) / 150 (3)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5×10^{-5} M	300 (3) / 150 (3)	1,00	0,00	0,00	0,67	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
$7,5 \times 10^{-5}$ M	300 (3) / 150 (3)	1,33	0,00	0,00	0,67	0,00	0,67	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1×10^{-4} M	300 (3) / 150 (3)	3,00	0,00	0,00	3,00	0,33	1,00	0,33	2,00	0,33	0,00	0,00	0,00
$2,5 \times 10^{-4}$ M	300 (3) / 150 (3)	6,00	0,33	0,33	5,33	0,67	2,00	1,00	2,00	0,33	0,33	0,00	0,00
5×10^{-4} M	300 (3) / 150 (3)	17,33	0,33	0,00	12,67	3,67	7,33	2,67	8,33	1,67	0,33	1,33	0,00

LM-Kontrolle = Lösungsmittelkontrolle (Methanol)

Tabelle 15: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCEFrequenz pro Zelle in CHO-Zellen n Konzentrationen von Trimethylzinnchlorid. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

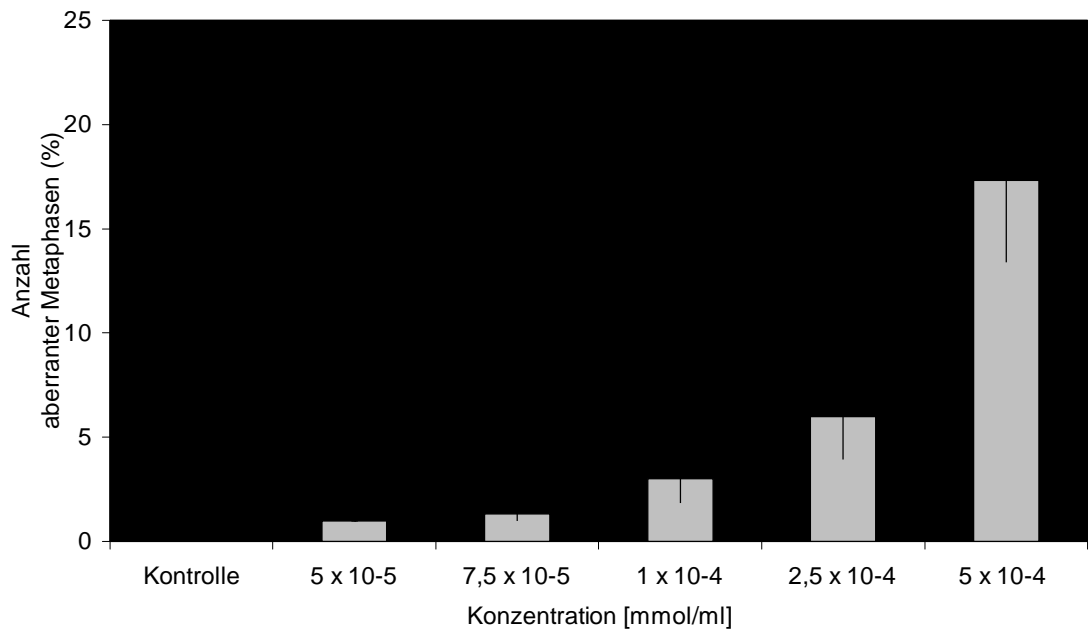


Abbildung 36: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Trimethylzinnchlorid. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten und SEM. Daten aus Tabelle 15.

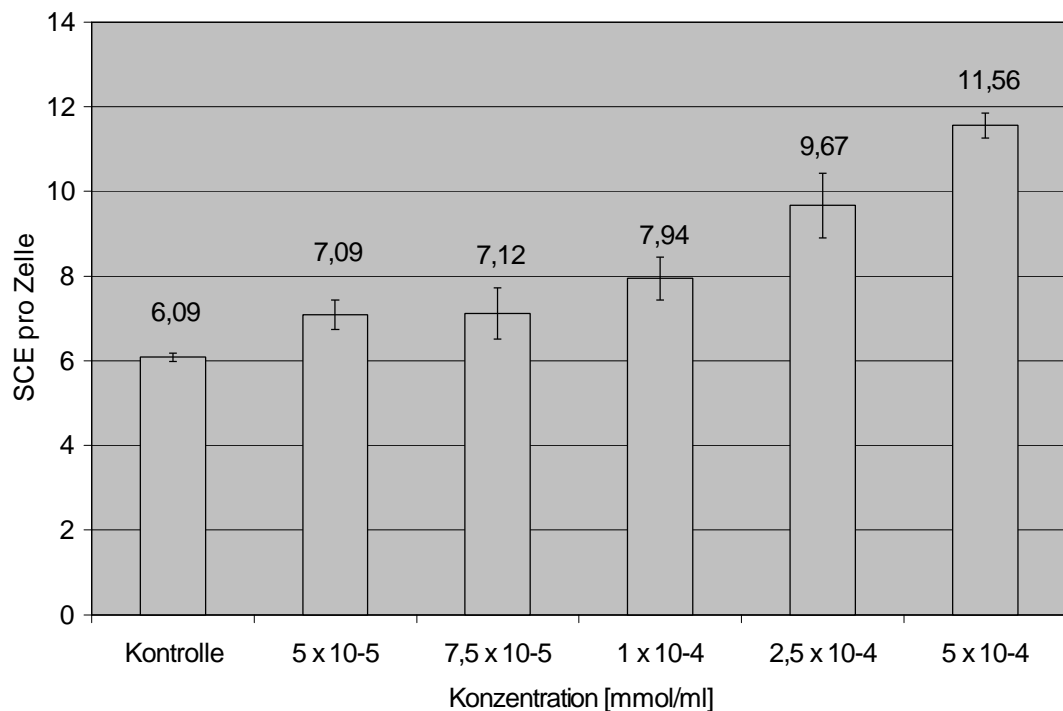


Abbildung 37: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Trimethylzinnchlorid. Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten und SEM. Daten aus Tabelle 15.

3.2.3 Organische Arsenverbindungen

CHO-Zellen wurden für zwei Stunden mit zwei organischen Arsenverbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Eine Übersicht der Ergebnisse liefern die Tabellen 16 und 17. Sowohl bei MMA als auch bei DMA konnte eine lineare Zunahme aberranter Metaphasen in Abhängigkeit der applizierten Konzentration festgestellt werden (Abbildungen 38 und 40), was auch in der Regressionsanalyse bestätigt wurde. Die Korrelationskoeffizienten betragen 0,9955 und 0,982. Die Anzahl aberranter Metaphasen lag für DMA bei allen verwendeten Konzentrationen über denen von MMA. Beide Substanzen induzierten in erster Linie Aberrationen vom Chromatidentyp. Bei DMA wurden zudem mehrere Chromosomentypaberrationen wie Dizentrische, Ringe und Double Minutes gefunden. Trotz relativ hoher Konzentrationen von $7,5 \times 10^{-4}$ M wurden nur wenige aberrante Zellen gefunden. Die maximale Anzahl betrug bei MMA durchschnittlich 9% und bei DMA 11%.

In der SCE-Frequenz konnte bei beiden Verbindungen keine lineare Zunahme mit der Konzentration beobachtet werden (Tabellen 16 und 17, Abbildungen 39 und 41). Lediglich für MMA wurde bei der höchsten Konzentration mit 12,30 nahezu eine Verdopplung der mittleren SCE-Frequenz pro Zelle gegenüber dem Kontrollwert von 6,77 gefunden.

Ein Vergleich der beiden Substanzen miteinander zeigt, daß bei allen Konzentrationen die Anzahl geschädigter Metaphasen bei DMA höher war als bei MMA (Abbildung 42). Bei der SCE-Häufigkeit lagen die Werte für MMA bei allen Konzentrationen über denen von DMA (Abbildung 43).

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen										
			DIZ	RING/ MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD	
Kontrolle	300 (3) / 150 (3)	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5×10^{-5} M	300 (3) / 150 (3)	1,67	0,33	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,33	0,00	0,00	0,00
1×10^{-4} M	300 (3) / 150 (3)	3,67	0,00	0,00	2,33	0,00	0,67	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00
$2,5 \times 10^{-4}$ M	300 (3) / 150 (3)	5,00	0,00	0,00	2,67	0,00	1,00	0,00	0,00	1,67	0,00	0,33	0,00
5×10^{-4} M	300 (3) / 150 (3)	7,00	0,00	0,00	4,67	0,67	1,00	0,00	0,00	3,00	0,00	0,00	0,00
$7,5 \times 10^{-4}$ M	300 (3) / 150 (3)	9,00	0,00	0,00	6,00	1,00	1,00	0,00	0,00	4,00	0,67	0,33	0,00

Tabelle 16: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCEFrequenz pro Zelle in CHO-Zellen bei Konzentrationen von Monomethylarsinsäure. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

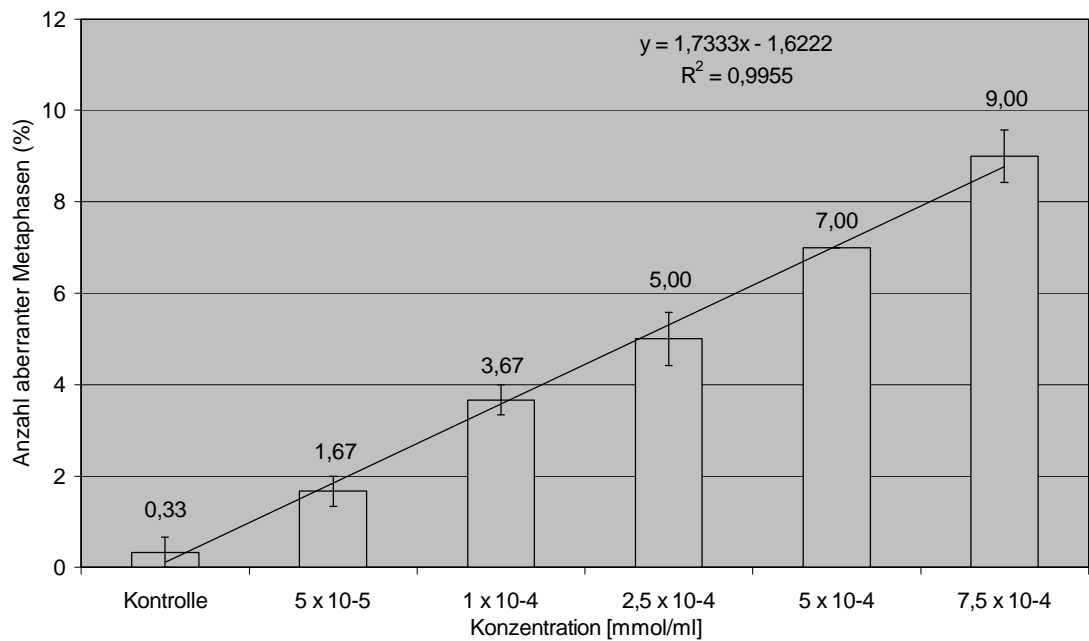


Abbildung 38: Geschädigte Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Monomethylarsinsäure. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, SEM und Trendlinie. Daten aus Tabelle 16.

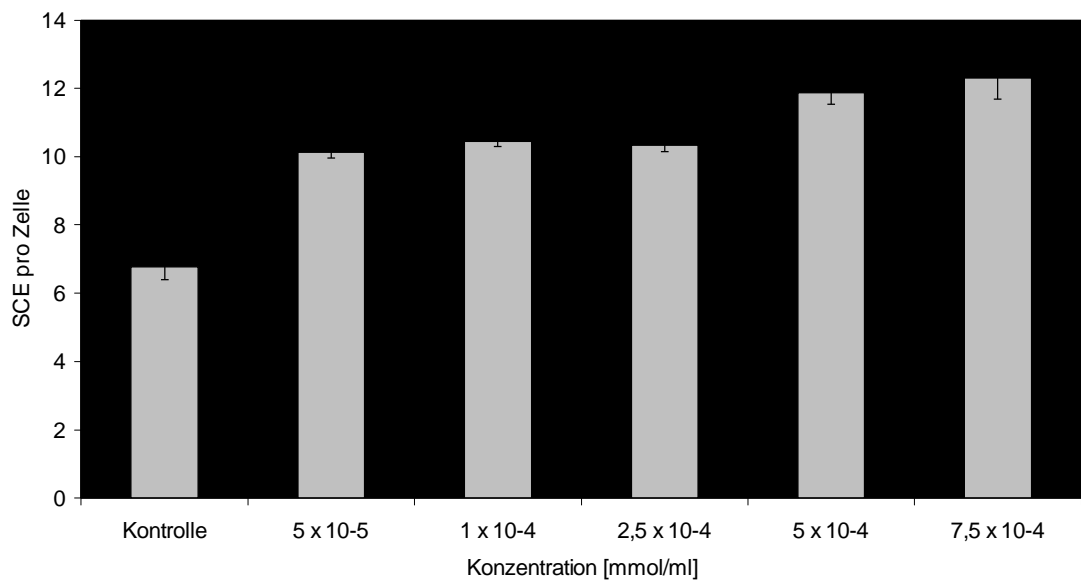


Abbildung 39: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Monomethylarsinsäure. Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Daten aus Tabelle 16.

Ergebnisse

Behandlung	Anzahl ausgewerteter Metaphasen (Anzahl unabhängiger Experimente) CA / SCE	Prozent aberrante Metaphasen	Chromosomale Aberrationen									
			DIZ	RING/ MIN	B''	RB'	RB'B''	RB-Kom.	B'	IC	ID	DD
Kontrolle	300 (3) / 150 (3)	0,33	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
5×10^{-5} M	300 (3) / 150 (3)	1,67	0,33	0,00	1,33	0,00	0,00	0,33	0,67	0,00	0,00	0,00
1×10^{-4} M	300 (3) / 150 (3)	4,67	0,00	0,00	3,33	0,33	0,67	0,00	0,33	0,33	0,00	0,00
$2,5 \times 10^{-4}$ M	300 (3) / 150 (3)	6,00	0,33	0,00	4,00	0,67	0,33	0,00	2,67	0,33	0,00	0,00
5×10^{-4} M	300 (3) / 150 (3)	7,67	0,00	1,33	7,67	0,00	0,33	0,00	3,00	0,33	0,00	0,00
$7,5 \times 10^{-4}$ M	300 (3) / 150 (3)	11,00	0,00	1,00	7,67	0,33	1,00	0,00	5,00	0,67	0,00	0,33

Tabelle 17: Chromosomale Aberrationen pro 100 Metaphasen und mittlere SCEFrequenz pro Zelle in CHO-Zellen n Konzentrationen Dimethylarsinsäure. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten.

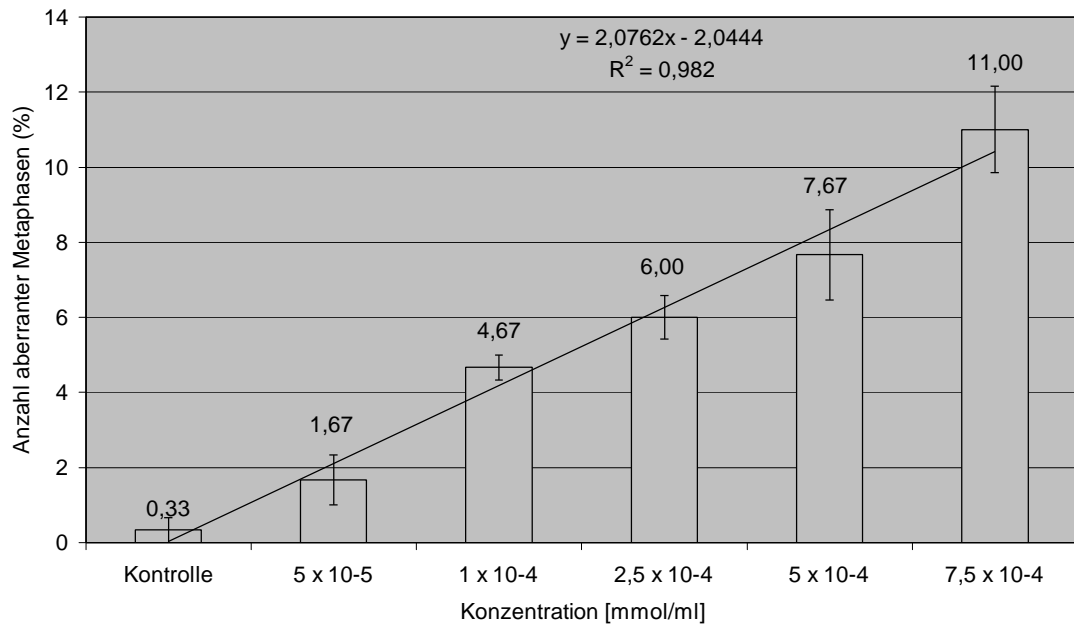


Abbildung 40: Anzahl geschädigter Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Dimethylarsinsäure. Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, SEM und Trendlinie. Daten aus Tabelle 17.

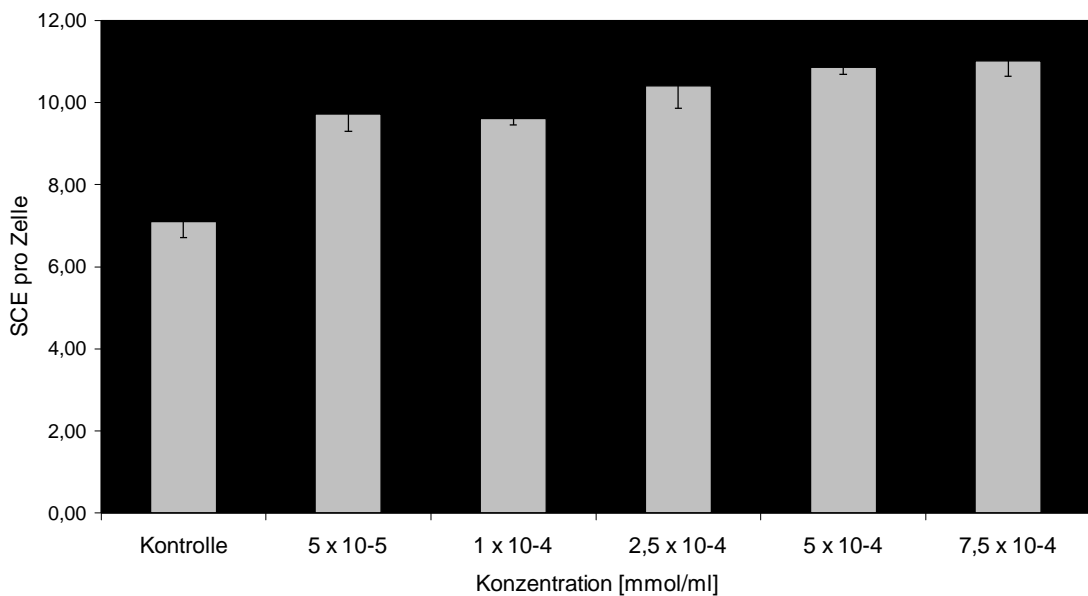


Abbildung 41: SCE-Frequenz in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Dimethylarsinsäure. Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Daten aus Tabelle 17.

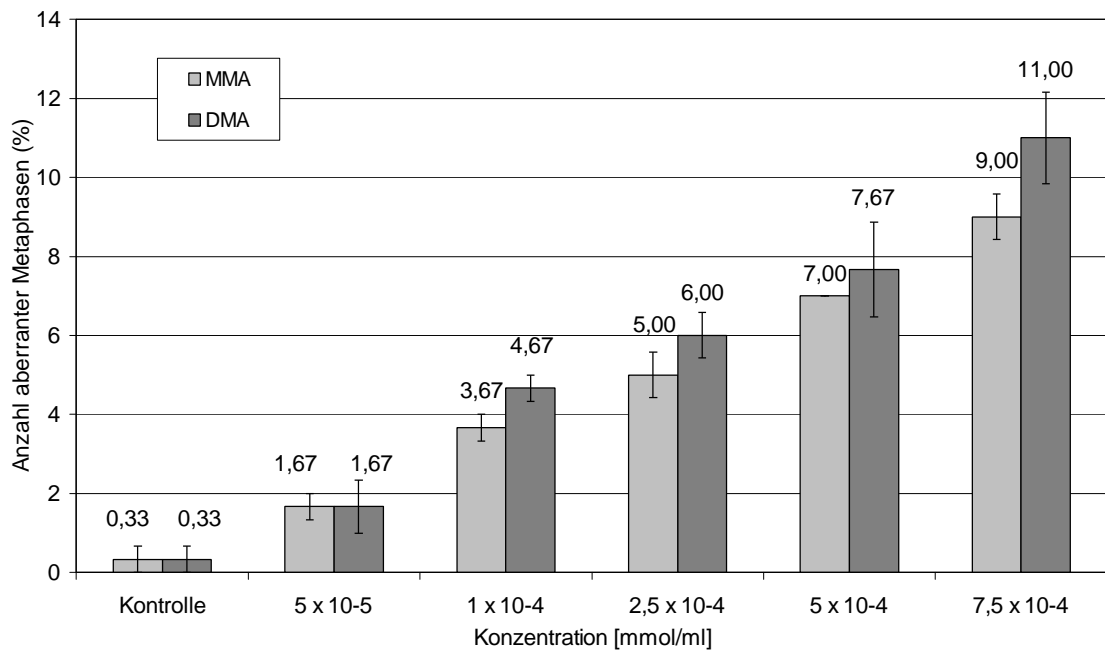


Abbildung 42: Vergleich der Anzahl aberranter Metaphasen in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Monomethyl- und Dimethylarsinsäure. Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Daten aus Tabelle 16 und 17.

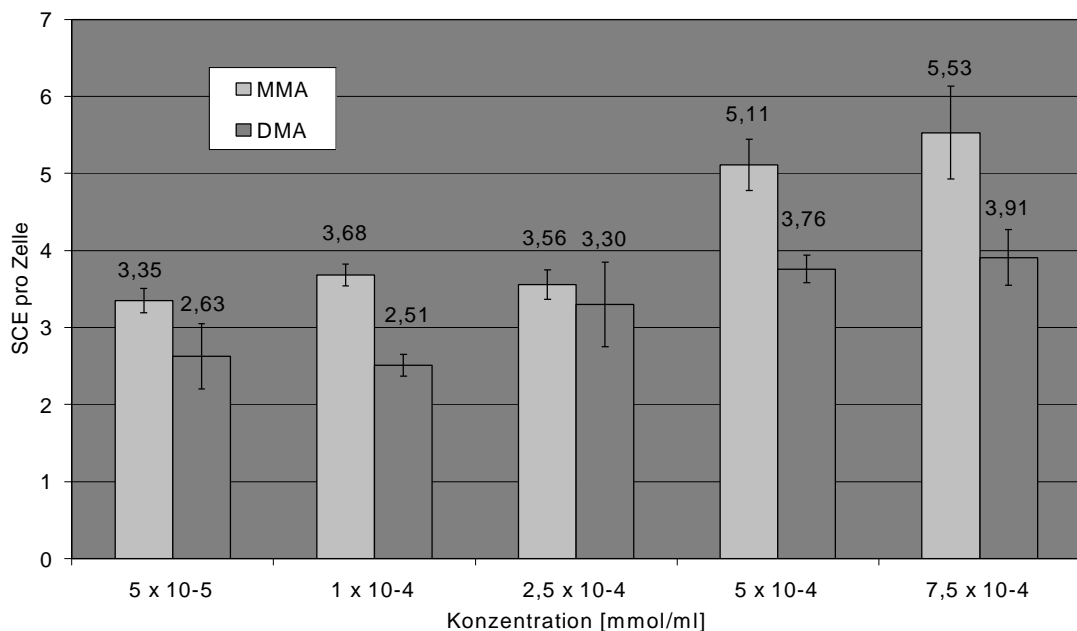


Abbildung 43: Vergleich der SCE-Frequenzen in CHO-Zellen nach Einwirkung verschiedener Konzentrationen von Monomethyl- und Dimethylarsinsäure. Mittelwerte und SEM aus drei unabhängigen Experimenten. Daten aus Tabelle 16 und 17.

4. Diskussion

Aufgrund der immer größer werdenden Vielfalt der chemisch/pharmazeutischen Produktpalette steigt auch die Gefahr der Entstehung und Einleitung mutagener, kanzerogener oder teratogener Stoffe in Oberflächengewässer. Stoffe, die eine oder mehrere dieser Wirkungen hervorrufen können, bezeichnet man als genotoxisch. In epidemiologischen Studien wurde auf die Möglichkeit hingewiesen, daß Krebserkrankungen infolge des Konsums chlorierten oder mit Industriechemikalien kontaminierten Trinkwassers (GRIFFITH and RIGGAN, 1989), sowie von Meeresfrüchten und Fischen aus belasteten Gebieten (SKERFVING *et al.*, 1970) hervorgerufen werden können.

Selbstverständlich stellen genotoxische Substanzen nicht nur eine Gefahr für den Menschen, sondern auch für die gesamte aquatische Lebensgemeinschaft dar. An Wasserorganismen, wie Muscheln und Fischen, wurden in mehreren Studien Krebserkrankungen nachgewiesen (BOLOGNESI, 1990; SMITH, 1990; STAHL, 1991). Diesem Umstand zufolge sah man die Notwendigkeit, Gewässer auf ein mögliches genotoxisches Potential zu untersuchen (HELMA *et al.*, 1994, HELMA and KNASMÜLLER, 1997a, 1997b).

Eine Klassifizierung genotoxischer Stoffe gelingt nur unzureichend. Neben Substanzen, deren Kanzerogenität beim Menschen aus epidemiologischen Untersuchungen erwiesen ist, gibt es auch Stoffe, die unter dem Verdacht stehen krebsauslösend zu sein. Dies begründet sich darin, daß Ergebnisse aus Tierversuchen nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können, da oft der vorhandene Datenbestand für begründete epidemiologische Äußerungen nicht ausreicht.

Nicht zu vernachlässigen sind auch die Wechselwirkungen einzelner Stoffe untereinander. Stoffe, die einzeln ungefährlich sind, können gemeinsam mit anderen Agenzien genotoxische Wirkungen (Synergismen) zeigen. Allerdings können sich unter bestimmten Umständen gefährliche Substanzen in Gegenwart von Antagonisten in ihrer Wirkung abschwächen oder neutralisieren (Antagonismus).

4.1 Gewässeruntersuchungen

Derzeit werden zur Kontrolle der Wasserqualität mit chemisch-analytischen Methoden entweder Summenparameter oder Konzentrationen von Einzelsubstanzen erfaßt. Selbst im Trinkwasser sind nur rund 10 % der organischen Inhaltsstoffe chemisch charakterisiert (WATERS, 1989), von denen wiederum nur ein Bruchteil auf Mutagenität getestet wurde. Nur in Einzelfällen gelang es, das mutagene Potential von Wasserproben chemisch zu charakterisieren (MEIER, 1988). Mit Summenparametern werden viele unterschiedliche Substanzen erfaßt und aus derartigen Daten können keine toxikologisch relevanten Informationen abgeleitet werden. Es ist daher sinnvoller, erst mit Hilfe geeigneter biologischer Testsysteme zu überprüfen, ob Schadwirkungen gegenüber Lebewesen auftreten können. Bei positivem Befund kann in einem zweiten Untersuchungsschritt versucht werden, diejenigen Substanzen oder Substanzgruppen zu ermitteln, die eine genotoxische Wirkung hervorgerufen haben. Die Gesamtwirkung einer Wasserprobe kann sich aus der Wirkung von Einzelsubstanzen, ihren Metaboliten und synergistischen beziehungsweise antagonistischen Effekten zusammensetzen (MEIER, 1988).

4.1.1 Anreicherungsverfahren

Mutagene Substanzen kommen in der Umwelt meist in nur sehr geringen Konzentrationen vor, was die qualitative und quantitative Bestimmung dieser Stoffe erschwert. Die Empfindlichkeit der Testverfahren (Bakterientests, Tests mit Zellkulturen) reicht oftmals nicht aus, um in unbehandelten Wasserproben genotoxische Effekte nachweisen zu können. Unkonzentrierte Wasserproben zeigen äußerst selten genotoxische Aktivität in Kurzzeittests, dagegen sind konzentrierte Wasserproben oft genotoxisch (NESTMANN *et al.*, 1979; STAHL, 1991). Die meisten Techniken zur Konzentration organischer Verbindungen beinhalten eine Vorbehandlung mit Lösungsmitteln und Adsorption an Aktivkohle, Silikaten oder organischen Polymeren. Bei all diesen Techniken ist die Adsorptionsspezifität bezüglich der Struktur der zu adsorbierenden organischen Substanzen relativ gering.

Das am häufigsten verwendete Anreicherungsverfahren ist die Adsorption an XAD-Harze (Styrol-Divinylbenzol Copolymere). Die adsorbierten Schadstoffe werden mit einem organischen Lösungsmittel eluiert, über Verdampfung des Lösungsmittels konzentriert und anschließend in ein mit dem Testsystem verträgliches Lösungsmittel überführt (HELMA *et al.*, 1994). Die Wiederfindungsraten bei der Verwendung von XAD-Harzen hängen stark von der Herkunft der zu untersuchenden Wasserproben ab. In der Literatur werden Werte zwischen 26 % und 50 % erwähnt (STAHL, 1991). Nachteile der XAD-Methode sind im hohen Lösungsmittelverbrauch zu sehen und dem Mangel, die Wasserproben am Ort der Probenentnahme zu konzentrieren.

Die von HAYATSU entwickelte Blue-Cotton/Blue-Chitin-Methode (siehe 1.5.1 und 1.5.2) stellt eine weitere Möglichkeit dar, Mutagene über einen Konzentrierungsprozeß aus wässrigen Lösungen zu isolieren und nachzuweisen (HAYATSU, 1983b). Der an ein Trägermaterial (Baumwolle, Rayon oder Chitin) kovalent gebundene Farbstoff Trisulfokupferphthalocyanin adsorbiert dabei selektiv und effektiv ausschließlich polyzyklische aromatische und heterozyklische Kohlenwasserstoffe, die drei oder mehr Ringsysteme besitzen. Viele dieser Substanzen wirken mutagen und sind oft auch karzinogen.

HAYATSU (1990) untersuchte in seinen Experimenten die Adsorption an einer Vielzahl von Verbindungen. Je nach Art der Substanz können fast 100 % aus einer Lösung an dem blauen Farbstoff CPT adsorbieren. Nur wenige Verbindungen zeigen eine Adsorption, die unter 50 % liegt. Die Extraktion mit dem Lösungsmittelgemisch aus Methanol aus Ammoniak ergab Wiederfindungsraten, die je nach Substanz zwischen 50 % und 95% und damit deutlich über denen der XAD-Methode lagen. INAMASU *et al.* (1988) verglichen die Adsorptionseigenschaften von Blue-Cotton und XAD-2 und fanden, daß diese erheblich von der Polarität der zu untersuchenden Substanzen abhängt. Die Autoren konnten zeigen, daß bei beiden Methoden polare Verbindungen weniger gut adsorbiert wurden, als unpolare.

Die Blue-Cotton/Blue-Chitin-Technik kann unmittelbar an dem Ort der Probenentnahme eingesetzt werden, so daß die Wasserproben nicht über weite Strecken transportiert oder einen längeren Zeitraum gelagert werden müssen. ECKL (1995) zeigte, daß das genotoxische Potential von Substanzen in der Wasserprobe

mit zunehmender Lagerdauer abnimmt. Dieses Phänomen läßt sich folgendermaßen erklären: möglicherweise vorhandene leichtflüchtige Substanzen in der Probe könnten entweichen (was allerdings bei einer Lagerung bei -20°C in verschlossenen Gefäßen verhindert werden kann) und instabile Verbindungen könnten zerfallen. Der Zerfall kann möglicherweise auch zu Produkten führen, die ein höheres genotoxisches Potential aufweisen.

Der Farbstoff in Blue-Cotton wird bei Anwesenheit von Chlor und Chlorverbindungen inaktiviert und macht diese Methode deshalb für die Untersuchung von chloriertem Leitungswasser ungeeignet. Bei dem Versuch, in Finnland Leitungswasser mit der Blue-Cotton-Methode zu untersuchen, konnte deshalb keine mutagene Aktivität festgestellt werden (VARTIAINEN *et al.*, 1987).

Es wurden auch bestimmte Parameter auf die Adsorption an Blue-Cotton, wie zum Beispiel die Wasserbewegung, analysiert. KIRA *et al.* (1996) untersuchten diesen Einfluß auf das Adsorptionsverhalten von Blue-Rayon und wiesen nach, daß die Adsorption mit steigender Wasserbewegung zunimmt. Damit eignet sich diese Methode besonders für Untersuchungen von fließenden Gewässern wie Bächen und Flüssen. Wenn native, unkonzentrierte Wasserproben an Zellkulturen getestet werden, ist die richtige Osmolarität der Flüssigkeiten eine wichtige Einflußgröße. Hohe Salzkonzentrationen können mutagen und cytotoxisch wirken (WATERS *et al.*, 1989). Bei der Blue-Cotton-Methode entfällt die Einstellung der Osmolarität, denn es wird mit Extrakten und nicht mit nativen Proben gearbeitet.

4.1.2 Untersuchung ausgewählter Wässer

In dieser Arbeit wurden verschiedene Wässer, die im städtischen Bereich anfallen, mit der Blue-Rayon- oder Blue-Chitin-Methode auf das Vorkommen mutagener Substanzen untersucht. Die Wasserproben stammten aus Flüssen, Bächen, Teichen, Straßen-, Autobahn- und Dachabflüssen, Regen, Schnee, Abwässern aus Kläranlagen und Leitungswasser. Mit Ausnahme des Leitungswassers, waren alle Proben mehr oder weniger stark mutagen.

4.1.2.1 Autobahn- und Straßenabfluß

Die Extrakte aus den Abflüssen von Autobahnen zeigten die höchste Mutagenität. Dies kann auf den hohen Schadstoffausstoß, besonders an PAK, der Automobile zurück geführt werden (ISHIMARA *et al.*, 1990). Je frequentierter die Straße befahren war, desto höher war die nachgewiesene mutagene Wirkung auf die Zellen. Neben der Verbrennung als eigentlichem Verursacher der Schadstoffe, tragen auch Faktoren, wie Abrieb von Reifen und Bremsen zu einer Schadstoffdeposition bei. Bei einem Regenereignis werden die Schadstoffe von der Straße abgewaschen und in den Boden oder die Kanalisation eingetragen. Im Boden kann ein biologischer Abbau der Substanzen erfolgen. Infolge der Versickerung können Verunreinigungen bis ins Grundwasser gelangen. Hinsichtlich deren Einflußnahme auf die Trinkwasserqualität und der damit einhergehenden potentiellen Gefährdung für den Menschen können nur Vermutungen angestellt werden. ISHIMARU *et al.* (1990) schlagen deshalb vor, die genotoxische Gefährdung, aufgrund hohen Schadstoffausstoßes der Automobile, bei der Planung von Autobahntrassen zu berücksichtigen. Oberflächenwässer sollten nicht versickern, sondern in speziellen Drainagesystemen aufgefangen und der Aufbereitung zugeführt werden.

4.1.2.2 Abwasser

Untersuchungen aus Zu- und Abläufen von Kläranlagen zeigten, daß diese Wässer eine mutagene Wirkung haben. Extrakte aus den Zuläufen zeigten dabei eine höhere Mutagenität als Extrakte aus den Abläufen, was auf eine mögliche biologische Inaktivierung mutagener Substanzen schließen läßt (STAHL, 1991). Neben den unterschiedlichen genotoxischen Potentialen der Proben war auch eine saisonale Abhängigkeit zu beobachten. Im Sommer war die mutagene Wirkung stärker als im Winter. Vermutlich führen geringere Niederschlagsmengen zu einer stärkeren Konzentration der mutagenen Substanzen. Ein niedrigerer Wasserstand, der zu einer Aufkonzentrierung der im Wasser enthaltenen Stoffe führt, scheint eher für dieses Phänomen verantwortlich zu sein, als ein eventuell verminderter Schadstoffeintrag. Auf der anderen Seite ist im Winter die atmosphärische Luftverschmutzung infolge der Verbrennung fossiler Brennstoffe in Heizungen größer (HARVEY, 1991). Erhöhte Niederschläge im Winter können zu einer Verdünnung der im Wasser enthaltenen

Schadstoffkonzentrationen führen. In diesem Zusammenhang zeigten KUSAMRAN *et al.* (1994), daß Wasserproben, die während der Regenzeit genommen wurden, weniger mutagen wirkten als Wasserproben, die an der gleichen Beprobungsstelle außerhalb der Regenzeit genommen wurden. Die Autoren führten dies auf das größere Wasservolumen und einer dadurch hervorgerufenen stärkeren Verdünnung von Mutagenen zurück.

Als Verursacher für die hohe mutagene Wirkung der Wasserextrakte aus Kläranlagen stehen mehrere Quellen zur Diskussion. Zum einen sieht man als Verursacher Abwässer aus industriellen Anlagen, die ungeklärt in das kommunale Abwasser eingeleitet werden, zum anderen könnten die Schadstoffe aus häuslichen Abwässern (GIMMLER-LUZ *et al.*, 1992) stammen. Bei einem Mischwasserkanalsystem werden zusätzlich stark belastete Abflüsse aus Oberflächenwässern eingeleitet. Ein nicht unerhebliches Gefährdungspotential stellen Pharmaka im Abwasser dar. Die Anwendung von Pharmaka ist ein unverzichtbarer Bestandteil der modernen Medizin. Hierbei kommen jährlich mehrere tausend Tonnen hydrophiler Substanzen zum Einsatz. Die Substanzen werden nach der Anwendung unverändert oder metabolisiert ausgeschieden und gelangen so in die Abwässer. Auch die unsachgemäße Entsorgung von Medikamenten stellt einen möglichen Eintragsweg in die Umwelt dar. Das Auftreten und Verhalten der Substanzen in der aquatischen Umwelt ist bisher weitgehend unbekannt. In einer Untersuchung konnten STUMPF *et al.* (1996) mittels der GC/MS-Methode Pharmaka wie Lipidsenker und deren Metabolite, Antirheumatika und Analgetika in verschiedenen Wässern nachweisen. Es konnte gezeigt werden, daß nahezu alle untersuchten Verbindungen sowohl in Abwasserteilströmen als auch in Kläranlagen auftraten. Als Folge der unvollständigen Elimination in der Kläranlage konnten Pharmaka auch in Fließgewässern in Konzentrationen bis 0,5 µg/l gefunden werden. Davon wurden einige Substanzen im Trinkwasser im ng/l-Bereich detektiert. Pharmaka und deren Abbauprodukte können damit als neue ubiquitär verbreitete Umweltchemikalien betrachtet werden. Besonders Rückstände von Cytostatika in Gewässern bedeuten für den Menschen eine hohe mutagene Gefährdung.

4.1.2.3 Fließende Gewässer

Fließgewässer, vor allem Flüsse, waren häufig das Ziel genotoxischer Untersuchungen (VAN KREIJL *et al.*, 1980; SAYATO *et al.*, 1990; HASHIZUME *et al.*, 1992; GIMMLER-LUZ *et al.*, 1992; OHE *et al.*, 1993; ECKL *et al.*, 1993; KUSAMRAN, *et al.*, 1994; REHANA *et al.*, 1996; SAKAMOTO *et al.*, 1996). In fast allen Fällen konnte mit kultivierten Säugerzellen oder bakteriellen Testsystemen Mutagenität festgestellt werden. Es zeigte sich, daß die Verunreinigungen im Wasser aus industriellen und häuslichen Abwässern stammten, deren Eintrag oft über Einleitungen von Kläranlagen erfolgte (KUSAMRAN *et al.*, 1994, SAKAMOTO *et al.*, 1996). In dieser Arbeit, wurde ein Fluß an drei verschiedenen Stellen beprobt, indem Nylonsäckchen mit Blue-Rayon in den Flußlauf eingebracht wurden. Dies erfolgte oberhalb, unterhalb und unmittelbar an der Mündung eines Bachlaufes, in den eine Kläranlage das geklärte Abwasser entläßt. Die Wasserextrakte, die aus der Probe der Mündungsregion stammten, wiesen die höchste Mutagenität auf, unterhalb der Mündung war die Mutagenität schwächer, aber immer noch deutlich höher als in dem Fluß oberhalb der Bachmündung. Die Kläranlage ist als möglicher Verursacher für die Verschmutzung anzusehen. Auch wenn mit Hilfe der Blue-Rayon-Methode Mutagene nicht eindeutig identifiziert werden können, so können doch mögliche Verbindungen eingegrenzt werden. Eine Analyse kann Hinweise auf den möglichen Verursacher geben (KUSAMRAN *et al.*, 1994). OHE *et al.* (1993) wiesen auf diese Weise nach, daß eine industrielle Anlage ungeklärte Abwässer in einen Fluß einleitete.

VAN KREIJL *et al.* (1980) wiesen in Rheinwasser zahlreiche organische Verbindungen nach, von denen die meisten identifiziert werden konnten. Bei diesen Untersuchungen wurden auch mutagene Substanzen gefunden. Viele dieser Verbindungen tauchten in geringen Mengen auch im Trinkwasser auf, welches aus dem Flußwasser gewonnen wurde.

Einträge aus der Landwirtschaft, wie Oberflächenabflüsse und Sickerwässer tragen ebenso zu einer genotoxischen Belastung von Flußwasser bei (ATHANASIOU and KYRTOPOULOS, 1983; MEIER, 1988), die besonders auf die Verwendung von Pestiziden zurückzuführen ist. REHANA *et al.* (1996) untersuchten Flußwasser aus

dem Ganges in Indien, der auch zur Trinkwassergewinnung herangezogen wird. Mittels HPLC konnten Pestizide, wie DDT und Dieldrin, in teilweise hohen Konzentrationen nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Bachläufe untersucht, von denen jeweils im Sommer und Winter Wasserextrakte hergestellt wurden. Wasser des einen Baches, der durch mehrere bewohnte Gebiete verläuft, war stark genotoxisch und induzierte eine hohe Frequenz aberranter Metaphasen. Als Ursache für die hohe mutagene Belastung ist die Einleitung belasteter Oberflächenwässer, wie Straßen- und Dachabläufe, zu sehen. Der zweite Bachlauf fließt durch ein eher ländlich geprägtes Gebiet ohne Anbindung an bewohnte Gebiete. Wasserextrakte aus diesem Bach waren nur schwach mutagen, was auf einen möglichen landwirtschaftlichen Eintrag zurückzuführen sein könnte. Bei beiden Bachläufen konnte eine saisonale Abhängigkeit der Mutagenität festgestellt werden, die im Sommer höher war als im Winter.

4.1.2.4 Stehende Gewässer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei stehende Gewässer untersucht, von denen eines natürlichen Ursprungs und das andere künstlich angelegt war. In Extrakten beider Gewässer wurde Mutagenität festgestellt, die in dem künstlich angelegten Teich höher war. Der Eintrag genotoxischer Substanzen könnte bei beiden Gewässern über Schadstoffdeposition aus der Luft oder infolge von Niederschlägen erfolgen, ein Zulauf aus anderen Quellen war nicht ersichtlich. Bei dem natürlich entstandenen Teich könnte ein Eintrag zusätzlich über unterirdische Zuläufe erfolgen. Die höhere Mutagenität im künstlichen Teich könnte auf einen mangelnden biologischen Abbau zurückzuführen sein (STAHL, 1991). Die Mutagenität in dem natürlich entstandenen Teich unterliegt einer saisonalen Abhängigkeit. Wie bei den anderen untersuchten Wässern war die Mutagenität im Sommer höher als im Winter. Ursächlich könnte auch hier eine Schadstoffkonzentration aufgrund hoher Verdunstung und mangelnder Niederschläge sein (KUSAMRAN *et al.*, 1994).

4.1.2.5 Niederschläge

Die an die Luft abgegebenen PAK wurden in Niederschlägen, wie Regen und Schnee nachgewiesen (VAN NOORT and WONDERGEN, 1985, ISHIMARU, 1990). Die Schadstoffkonzentration war dabei vom Grad der Luftverschmutzung abhängig. In stark industriell geprägten Gebieten werden größere Mengen Schadstoffe emittiert als in ländlichen Gebieten. Die PAK sind an Partikel gebunden (HARVEY, 1991) und werden als solche deponiert oder finden sich in gelöster Form in den Niederschlägen. Die in dieser Arbeit untersuchten Niederschläge (zwei Regen- und zwei Schneeproben) wirkten auf CHO-Zellen mutagen. Die Blue-Chitin-Extrakte aus Schnee zeigten eine höhere Mutagenität als die aus Regen gewonnenen Extrakte. Auch dieses Ergebnis läßt sich auf eine saisonale Abhängigkeit der PAK-Konzentration zurückführen (HARVEY, 1991). Im Winter sind die Emissionswerte aufgrund der vermehrten Verbrennung fossiler Brennstoffe in Haushaltsheizungen höher als im Sommer.

Partikulär gebundene PAK können auf Dächern deponiert und bei Regenereignissen abgespült werden. Versickert das Oberflächenwasser der Dächer, können die Schadstoffe ins Grundwasser gelangen. Die in dieser Arbeit untersuchten Extrakte der Dachabflüsse wirkten auf kultivierte Säugerzellen mutagen. Mit dem Ames-Test konnte jedoch keine Mutagenität nachgewiesen werden.

4.1.2.6 Leitungswasser

Die menschliche Gesundheit ist besonders durch Verunreinigungen im Trinkwasser gefährdet (NESTMANN *et al.*, 1979). MEIER (1988) konnte zeigen, daß im Trinkwasser organische, genotoxisch wirkende Verbindungen enthalten sind, die möglicherweise aus Abwasser, industriellem Eintrag oder Desinfektionsprozessen während der Trinkwasseraufbereitung stammten. Während der Chlorierung des Trinkwassers können sowohl organische Verunreinigungen als auch natürliche Bestandteile des Wassers, wie Aminosäuren und Huminsäuren, chloriert werden und dann genotoxisch wirken. Huminsäuren können die Genotoxizität verschiedener Substanzen über eine Adsorption inhibieren (SATO *et al.*, 1987). In verschiedenen Untersuchungen wurde gezeigt, daß Trinkwasser nach Behandlung mit Chlor oder

Ozon mutagen wirkte (GLATZ *et al.*, 1978; GRUENER, 1978; ATHANASIOU and KYRTOPOULOS, 1983, DOUGLAS *et al.*, 1986). Epidemiologische Studien zeigten eine erhöhte Krebsinzidenz, die auf das Vorhandensein organischer Verunreinigungen im Trinkwasser zurückgeführt wurden (PAGE *et al.*, 1976; KUZMA *et al.*, 1977). Diese Verunreinigungen fanden sich vor allem in zu Trinkwasser aufbereitetem Oberflächenwasser (VAN KREIJL *et al.*, 1980; ATHANASIOU and KYRTOPOULOS, 1983; GUMMLER-LUZ *et al.*, 1992). MEIER (1988) teilt die Substanzen, die für die Genotoxizität im Trinkwasser verantwortlich sind, in drei Gruppen ein. Die erste Gruppe beinhaltet die Kontamination mit organischen Verbindungen, die nicht vollständig mittels chemisch/physikalischer oder biologischer Behandlung beseitigt werden können. Es ist schwierig, Verursacher für diese Verschmutzung ausfindig zu machen. Neben industriellen Abfällen aus Produktionsprozessen und Einleitungen kommunaler Kläranlagen tragen auch landwirtschaftliche Einträge, wie mit Pestiziden verunreinigte Oberflächen- und Sickerwässer, zur Kontamination bei (ATHANASIOU and KYRTOPOULOS, 1983; GIMMLER-LUZ *et al.*, 1992; REHANA *et al.*, 1996). Zur zweiten Gruppe gehören Chemikalien, die während der Aufbereitung zugesetzt werden oder dabei entstehen. Das sind in erster Linie Halomethane, Haloacetonitrile, Haloketone und Chlorphenole, deren mutagene und karzinogene Wirkung nachgewiesen wurde (BULL, 1985). Die dritte Gruppe sind Verbindungen, die während des Trinkwassertransportes in Leitungen von der Trinkwasseraufbereitungsanlage bis zu den Haushalten entstehen (SCHWARTZ *et al.*, 1979) Zum einen können Substanzen, mit denen die Rohrleitungen behandelt oder gestrichen wurden, ins Wasser übertreten, zum anderen können Chlorrückstände mit organischen Substanzen reagieren. Infolge mikrobiellen Wachstums können dann inaktive Chemikalien zu Mutagenen transformiert werden.

Die Beseitigung organischer Substanzen kann über chemisch/physikalische oder biologische Prozesse erfolgen. Oft wird Aktivkohle als Adsorbens für diese Verbindungen eingesetzt (KOOL *et al.*, 1982; MONARCA *et al.*, 1983) oder eine Behandlung mit Schwefeldioxid durchgeführt (CHEH *et al.*, 1980). BLEVANS und BRENNAN (1990) zeigten, daß eine rein biologische Behandlung allein nicht ausreicht, Genotoxizität effizient zu beseitigen.

4.1.3 HPLC-Analyse

Die Verbrennung fossiler Brennstoffe in Heizungen, Kraftwerken und Motoren stellt die Haupteintragsquelle für PAK in die Umwelt dar (BJORSETH and RAMDAHL, 1985). Obwohl es auch natürliche Quellen für PAK, wie vulkanische Aktivität und Waldbrände, gibt, ist der anthropogene Eintrag bezüglich der Verschmutzung von Luft, Boden und Wasser bedeutender. Der Gehalt an PAK in der Atmosphäre ist von der Jahreszeit, klimatischen Bedingungen und der Dichte der lokalen Emissionsquellen abhängig. PAK im Wasser stammen aus der Deposition atmosphärischer Partikel, aus Auswaschungen kontaminierter Böden oder direkter Einleitung von Schmutzwasser aus Städten und Industrieanlagen. Über den Wasserweg können PAK weit verbreitet und über die Nahrungskette aufgenommen werden (HARVEY, 1991). Außerdem besteht eine latente Gefährdung des Menschen über kontaminiertes Trinkwasser.

Mit der Blue-Rayon-/Blue-Chitin-Technik soll weder Qualität noch Quantität der Probeninhaltsstoffe, sondern die Wirkung der meist unbekanntesten Stoffe, ermittelt werden. Eine chemische Analytik der einzelnen Inhaltsstoffe wäre deutlich aufwendiger als die hier durchgeführten Mutagenitätsstudien und würde in vielen Fällen nur vage Prognosen über das genotoxische Potential der Proben gestatten (ATHANASIOU and KYRTOPOULOS, 1984).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Wasserproben wurden mittels HPLC auf 16 verschiedenen PAK untersucht, um dennoch Anhaltspunkte über die Inhaltsstoffe zu erhalten. Die einzelnen Wasserproben enthielten qualitativ und quantitativ unterschiedliche Substanzen. Hochbelastete Wässer, die eine hohe mutagene Wirkung zeigten, wiesen in der Regel auch hohe Konzentrationen an PAK auf. Zu diesen Wässern gehörten sowohl Abflüsse von Autobahnen als auch der Zulauf einer Kläranlage. Niedrig belastete Wässer, wie Regen und Schnee, die geringere Konzentrationen an PAK aufwiesen und bei denen nicht alle untersuchten PAK gefunden wurden, wirkten auf CHO-Zellen und Bakterien aber ebenfalls mutagen. Es ist jedoch nicht möglich von der Menge und Qualität der gemessenen Substanzen auf das mutagene Potential der Wasserprobe zu schließen. Dies läßt sich mit der Komplexität der untersuchten Proben erklären. Nur aufwendige Einzeltests

würden zeigen, welche Verbindungen in ihrer Konzentration mutagen wirken. Dazu müßten jedoch alle Substanzen in der Probe bekannt sein. Doch selbst dann ließen sich aufgrund der fehlenden Kenntnisse über die Wirkmechanismen einzelner Verbindungen noch keine Aussagen zu möglichen synergistischen oder antagonistischen Wirkungen der Probeninhaltsstoffe machen (MEIER, 1988). Eine Risikoabschätzung zur Gesundheitsgefährdung für den Menschen ist nur schwer möglich. LUCAS *et al.* (1985) geben an, daß in Wässern nahezu 1100 unterschiedliche organische Verbindungen analytisch nachweisbar waren, von denen die meisten allerdings nicht genau identifiziert werden konnten. Viele Verbindungen, bei denen eine genaue Charakterisierung und Identifizierung möglich war, konnten in Konzentrationen unter 1 µg/l nachgewiesen werden.

4.1.4 Wirkung der PAK auf die DNA

Viele PAK, die in unserer Umwelt weit verbreitet sind, wirken wegen ihrer Fähigkeit DNA zu modifizieren mutagen und karzinogen. Sie sind chemisch nicht reaktiv, werden aber im Stoffwechsel von Enzymem des Cytochrom-P450-Systems in chemisch reaktive, elektrophile Zwischenprodukte, wie Epoxide überführt (LUTZ, 1984). Chemische Reaktionen dieser Epoxide mit der DNA führen unter Ausbildung kovalenter Bindungen zu DNA-Addukten. Die Verteilung auf der DNA ist dabei von der Größe und Reaktivität der Verbindung abhängig (HEMMINI, 1983). Epoxide von aromatischen Kohlenwasserstoffen reagieren vorwiegend mit Aminogruppen, die außerhalb des cyclischen Rings der Basen liegen, wie N² im Guanin, N⁶ im Adenin und N⁴ im Cytosin (VOS, 1995). Neben den Reaktionsmöglichkeiten an den Basen sind Addukte auch an der Desoxyribose und an der Phosphatgruppe bekannt (LUTZ, 1984). DNA-Addukte können in der Zelle erkannt und repariert werden, wobei Geschwindigkeit und Effizienz der Reparatur vom spezifischen Addukt und Zelltyp abhängig sind. Die Konsequenzen der Addukte für die DNA-Struktur sind vielfältig: einerseits kann bei der DNA-Replikation gegenüber dem Addukt eine falsche Base in den Tochterstrang eingebaut werden, andererseits kann das Addukt die Stabilität und Integrität der DNA direkt beeinträchtigen und Strangbrüche auslösen (GLATT and OESCH, 1986).

Die Zelle besitzt ein spezifisches enzymatisches Schutzsystem gegen Epoxide, zu denen die Epoxidhydrolasen gehören (GLATT and OESCH 1986). Der Großteil der Aktivitäten kann auf zwei Enzyme zurückgeführt werden, wovon das eine im endoplasmatischen Retikulum und das andere in der Peroxisomenmembran lokalisiert ist. Obwohl sich beide Enzyme in ihrer Substratspezifität unterscheiden, gibt es Epoxide, die von keinem dieser Enzyme detoxifiziert werden. Die Produkte, sogenannte Dihydrodiole, sind nicht reaktiv, können aber in einigen Fällen durch die weitere Biotransformation in Mutagene umgesetzt werden. So werden viele stark mutagene Epoxide von Epoxidhydrolasen inaktiviert. Allerdings können in einer zweiten Monooxygenierung stark mutagene Dihydrodiolepoxide entstehen, die gegen eine Inaktivierung von Epoxidhydrolasen resistent sind (GLATT and OESCH, 1986).

4.1.5 Anwendung der Blue-Rayon-/ Blue-Chitin-Methode mit CHO-Zellen und dem Ames-Test

Seit der Entwicklung des Ames-Test in den 70er Jahren (AMES *et al.*, 1973) wurde dieser Assay zu einem der meist verwendeten Tests für die Untersuchung von natürlichen Wässern, Trinkwasser, Abwasser und Extrakten aus Sedimenten (NESTMANN *et al.*, 1979; ATHANASIOU and KYRTOPOULOS, 1984, KUSAMRAN *et al.*, 1994; REHANA *et al.*, 1996). Seine schnelle und einfache Durchführung, gepaart mit niedrigen Kosten und einer hohen Aussagekraft bezüglich der Karzinogenität der zu testenden Substanzen, macht den *Salmonella*-Test zur bevorzugten Methode bei vielen Untersuchungen zur Mutagenität von Chemikalien. WATERS *et al.* (1989) zeigten dies anhand einer Studie, in der Wasserproben mit dem Ames-Test und mit CHO-Zellen auf ihr genotoxisches Potential untersucht wurden. Der bakterielle Mutagenitätstest stellte sich dabei als der sensitivere Indikator heraus. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Wasserproben zeigte ein Vergleich der Ergebnisse zwischen Ames-Test und Chromosomenaberrationstest, daß der Chromosomentest empfindlicher auf Mutagenität reagiert als der bakterielle Test. ATHANASIOU und KYRTOPOULOS (1983) vertreten die Auffassung, daß Zellkulturtests eine größere Relevanz in Bezug auf die Abschätzung der Gefährdung für den Menschen haben als bakterielle Tests.

Die Blue-Cotton-Methode wurde bei der Gewässeruntersuchung bisher überwiegend in Zusammenhang mit dem Ames-Test angewandt. OHE *et al.* (1993) behandelten erstmals kultivierte Säugerzellen mit Extrakten aus Flußwasser und analysierten SCE. Dabei zeigte sich, daß Extrakte aus Wasserproben, die unterhalb des Einlaufes einer Kläranlage entnommen wurden deutlich mehr SCE induzierten, als Extrakte die oberhalb der Einleitung entnommen wurden. Eine einzige Untersuchung dieser Methode in Kombination mit einem Zellkulturtest läßt noch keine Aussage über deren Effektivität im Vergleich mit Ames-Testes zu. Im Rahmen dieser Arbeit wurden mehrere Wasserproben aus dem städtischen Bereich verwendet, wobei die Extrakte in CHO-Zellen auf die Induktion von CA und SCE untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigten, daß sich diese Methode gut in Kombination mit Zellkulturtests durchführen läßt. Alle Wasserproben zeigten in Abhängigkeit von der möglichen Schadstoffbelastung ihres Ursprungortes ein deutliches genotoxisches Potential. Sowohl der SCE-Test als auch der Test auf CA lieferten ein eindeutig positives Ergebnis. Die einfache Handhabung der Rayonfasern ermöglichte es, die Fasern nach der Probennahme und Trocknung nach Japan zu verschicken. In Kooperation mit Prof Hayatsu, dem Erfinder dieser Methode, wurde dort der Ames-Test durchgeführt. Vergleicht man die Ergebnisse der bakteriellen Mutagenitätstests mit den Ergebnissen der Zellkulturtests, zeigt sich bei den letzteren eine deutlichere Sensitivität gegenüber des Ames-Tests. Insgesamt wurden 12 Proben dieser vergleichenden Untersuchung unterzogen. Im Ames-Test mit *Salmonella typhimurium* TA98 wirkte eine Probe (Autobahnabflußwasser) mit über 10.000 Revertanten sehr stark mutagen, zwei weitere (Zu- und Ablauf einer Kläranlage) mit 635 und 566 Revertanten deutlich mutagen. Fünf Proben zeigten mit einer Revertanzahl von etwa 100 eine schwache Mutagenität, vier Proben waren nicht mutagen. Von den 12 Proben zeigten alle, sowohl im SCE-Test als auch im CA-Test, ein positives Ergebnis. Am stärksten mutagen wirkte der Extrakt aus Autobahnabflußwasser, der auch im Ames-Test die höchste Mutagenität zeigte. Die im Wasser enthaltenen Stoffe induzierten 88 % aberrante Metaphasen und eine Erhöhung der SCE-Frequenz von 7,12 in der Kontrolle auf 12,38. Alle drei Wasserproben, die aus dem Abfluß von verschiedenen Autobahnen gewonnen wurden, zeigten eine sehr hohe Mutagenität. Diese ist vermutlich auf die hohe Schadstoffkonzentration infolge der Deposition von PAK aus den Abgasen der Autos

zurückzuführen. Eine Wasserprobe aus dem Abfluß einer normal befahrenen städtischen Straße induzierte deutlich weniger aberrante Zellen.

4.1.6 Einfluß des Metabolisierungssystems

Die Literatur unterscheidet direkt wirkende von indirekt wirkenden Genotoxinen. Indirekt wirkende Substanzen, wie PAK, entfalten ihre genotoxische Wirkung erst nach metabolischer Aktivierung. Der Nachweis der Genotoxizität gelingt erst unter Zuhilfenahme eines externen Metabolisierungssystems, das die Substanzen enzymatisch aktiviert. Dazu wird meist der S9-Mix (siehe 1.4) verwendet. Die Ergebnisse zeigten, daß in allen Untersuchungen die Wasserproben mit metabolischer Aktivierung deutlich geringer genotoxisch waren als ohne metabolische Aktivierung. Diese Beobachtung machten auch WATERS *et al.* (1989) bei ihren Gewässeruntersuchungen. Vermutlich geht von S9 ein protektiver Effekt aus, der mehrere Rückschlüsse zuläßt. Zum einen ist es möglich, daß bei der Reaktion mutagener Substanzen mit S9 diese zu unschädlichen Spezies umgesetzt werden. Zum anderen könnten exogene Proteine toxische Verbindungen in den Proben abfangen und diese dem System entziehen. Letztere Vermutung wird durch Beobachtungen von WATERS *et al.* (1989), die Rinderserumalbumin in gleicher Konzentration wie S9 einsetzten und damit eine Reduktion der Genotoxizität hervorrufen konnten, bekräftigt.

4.1.7 *In-vivo*-Tests im Einsatz bei Gewässeruntersuchungen

Neben den *in-vitro*-Tests mit Zellkulturen, kommen immer häufiger auch *in-vivo*-Tests zum Einsatz. Im Wasser lebende Organismen können ähnlich wie Säugetiere auf karzinogene oder genotoxische Wasserinhaltsstoffe reagieren. Nach Exposition können Genmutationen, Chromosomenschäden und/oder Neoplasien entstehen (SMITH, 1990; STAHL, 1991). Da ihre Reaktionen auf schädliche Substanzen ähnlich den *in vitro*-Systemen von Säugerzellen sind, eignen sich auch *in vivo*-Systeme von aquatischen Organismen zur Untersuchung von Gewässern (KOCAN *et al.*, 1981, 1982). Die Individuen sind permanent den Schadstoffen in ihrer Umwelt ausgesetzt

und können daher als Konzentratoren für gut fettlösliche und schwer abbaubare Schadstoffe verwendet werden. Muscheln können solche Substanzen ohne metabolischen Abbau akkumulieren. Organextrakte werden mit einem anderen System auf Mutagenität getestet (KIRA *et al.*, 1989). Mit Ausnahme des Zentralnervensystems können Fische die gleiche Art von Tumoren in den selben Organen und Zellen entwickeln wie Säugetiere. Generell können in allen Geweben aquatischer Organismen genotoxische Verbindungen nachgewiesen werden, wobei die Akkumulation dieser Substanzen dabei von der Entfernung der Individuen zum Verschmutzungsort abhängig ist. Bei diesen Untersuchungen ist zu berücksichtigen, daß verschiedene Spezies unterschiedlich sensitiv auf Toxine reagieren und gleiche Spezies in Abhängigkeit von ihrem Entwicklungsstadium unterschiedlich empfindlich reagieren können (STAHL, 1991). Eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen ist somit nur sehr schwer möglich.

4.1.8 Wasserhaushaltsgesetz

Im Wasserhaushaltsgesetz (WHG) (HOFMANN, 1999) legt der Gesetzgeber durch Rechtsverordnung Mindestanforderungen an das Einleiten von Abwasser fest. In den zahlreichen Anhängen des Gesetzes werden Abwässer nach ihrer Herkunft differenziert. Man unterscheidet beispielsweise kommunale Abwässer, industrielle Abwässer und Mischabwässer. In den Anhängen sind die rechtsverbindlichen Grenzwerte der einzelnen Parameter für die jeweiligen Branchen festgelegt und die Analysen- und Meßverfahren aufgelistet, nach denen die einzelnen Parameter zu bestimmen sind. Damit ein Verfahren in diese Anlage aufgenommen werden kann, muß es durch DIN oder vergleichbare Institutionen normiert sein. Bisher ist kein Genotoxizitätstest in der Anlage der Abwasserverordnung aufgenommen und damit auch kein Grenzwert für den Parameter der Genotoxizität festgelegt.

Im Laufe der vergangenen Jahre wurden mehrere Genotoxizitätstests, die sich für die Gewässeruntersuchung eignen, entwickelt, keiner jedoch normiert. Eine Ausnahme stellt der umu-Test, ein bakterieller Mutagenitätstest, dar, für den seit 1996 eine DIN-Norm vorliegt (HOFFMANN, 1999). Viele andere Tests können in ihrer Praktikabilität (Versuchsdauer, Material- und Personalaufwand, Schwierigkeit in der

Durchführung) nicht mit dem umu-Test konkurrieren. Ein Nachteil dieses Test ist jedoch, daß Ergebnisse aus bakteriellen Mutagenitätstests nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden können.

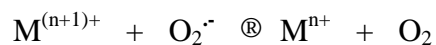
Berücksichtigt man die besondere Gefährlichkeit möglicher Wirkungen genotoxischer Stoffe, so sollten Emissionen gerade bei diesem Parameter so niedrig wie möglich gehalten werden. Der Parameter der Genotoxizität sollte in die Abwasserverordnung aufgenommen und ein Grenzwert gesetzlich verankert werden.

4.2 Metall(oid)organische Verbindungen

Metall(oid)organische Verbindungen besitzen mindestens eine kovalente Bindung zwischen einem Metall- und einem Kohlenstoffatom. Sie gelangen durch anthropogenen Eintrag und natürliche biogeochemische Prozesse infolge mikrobieller Alkylierung in die Umwelt (siehe 1.6). Die biotische Umwandlung der Metalle oder Metallionen zu organischen Derivaten, die in allen Organismen einschließlich des Menschen vorkommt, führt meist zu einer Erhöhung der Toxizität. An der Biomethylierung sind Verbindungen beteiligt, die im endogenen Stoffwechsel vorkommen, wie SAM, MeTHF und MeCoB₁₂, (THAYER und BRINCKMAN, 1982; THAYER, 1988, 1989). Im Fall von MeCoB₁₂ werden zwei allgemeine Reaktionstypen diskutiert. Bei Typ I reagiert das Metall als Elektrophil, wobei die Kobalt-Kohlenstoffbindung des MeCoB₁₂ heterolytisch gespalten und ein Carbanion (CH₃⁻) auf das Metall übertragen wird. Bei Typ II nimmt das Metallion nach der homolytischen Spaltung der Co-CH₃-Bindung im MeCoB₁₂ ein Methylradikal (CH₃[·]) auf. SAM und MeTHF können Methylgruppen als Radikale oder Carbokationen (CH₃⁺) übertragen (THAYER, 1989).

Untersuchungen zur Genotoxizität metall(oid)organischer Verbindungen sind selten und kommen in der Regel zu der Annahme, daß das genotoxische Potential von Metallen weitgehend von der Bioverfügbarkeit der jeweiligen Spezies und der Aufnahme von Metallionen von Faktoren wie Oxidationsstufe und Löslichkeit abhängt. Einige Metallspezies dringen schnell in intakte Zellen ein, andere werden nur langsam aufgenommen und benötigen dazu lange Inkubationszeiten. Es gibt

keine allgemeingültige Erklärung für das mutagene und karzinogene Potential von Metallen und Metallverbindungen (HARTWIG, 1995, 1998; KASPRZAK, 1995). Generell scheinen jedoch zwei Wirkmechanismen vorherrschend zu sein: 1. die verstärkte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und anderer Radikale, die zu oxidativen DNA-Schäden führen und 2. eine negative Beeinflussung der DNA-Reparatur und/oder DNA-Replikation (HARTWIG, 1995). Die wichtigsten Mechanismen bei der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies unter Beteiligung von Metallen sind der Fenton/Haber-Weiss-Prozeß und die Autooxidation (KASPRZAK, 1995). Sie führen zur Bildung reaktiver OH-Radikale aus H_2O_2 und dem Superoxidationion $\text{O}_2^{\cdot-}$, zwei Produkte, die auch während des Stoffwechsels gebildet werden.



Die Gesamtreaktion ergibt:



Zwei Oxidationsstufen des Metallkations (M^{n+} und $\text{M}^{(n+1)+}$) bilden ein katalytisch aktives Redoxpaar für den Elektronentransport. Übergangsmetallverbindungen produzieren nicht nur reaktive Hydroxylradikale, sondern auch andere starke Oxidationsmittel, wie Singulett-Sauerstoff $^1\text{O}_2$, und Metalloxo- und Metallperoxospezies, die in der Lage sind, DNA und Proteine zu schädigen. Aus radiobiologischen Untersuchungen ist bekannt, daß $\cdot\text{OH}$ -Radikale mit allen Komponenten des Chromatins reagieren. Sie verändern die Basen der DNA, die Desoxyribose und führen zu DNA-Protein-Crosslinks, Depurinierung sowie zu Strangbrüchen. Neben der nuklearen ist auch die mitochondriale DNA ein Angriffsziel von Metallverbindungen.

Einige Metalle besitzen eine höhere Affinität zu Aminosäuren als zu Nukleinsäuren und führen so zu einer Inaktivierung von Proteinen, die an Replikation, Transkription, Reparaturprozessen oder an der zellulären Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind. Die Nukleotidexzisionsreparatur in eukaryotischen Zellen ist eines der Hauptreparatursysteme, die an der Beseitigung

umfangreicher DNA-Schäden beteiligt ist und über komplexe DNA-Protein-Interaktionen funktioniert. Untersuchungen mit reperaturdefizienten Zelllinien zeigen, daß mindestens 15-20 Proteine und Enzyme an Prozessen der Reparatur wie Schadenserkennung, Inzision, Polymerisation und Ligation beteiligt sind. Prinzipiell führt die Inhibition von DNA-Reparaturprozessen durch karzinogen wirkende Metalle zu strukturellen Veränderungen der DNA oder Modifikationen von Reparaturproteinen.

Proteine gehören neben den Nukleinsäuren zu den wichtigsten biologischen Makromolekülen. Enzyme katalysieren chemische Reaktionen, die unter physiologischen Bedingungen sonst nicht ablaufen würden. Proteinhormone, wie Cytokine, vermitteln einen Informationsaustausch zwischen Zellen des Immunsystems. Daneben dienen Proteine als Transport- und Speichersysteme, zum Beispiel für Elektronen in der Atmungskette oder kleinen organischen Molekülen, wie der Häm-Gruppe im Hämoglobin. Auch die Expression von Genen wird über DNA-bindende Proteine kontrolliert. Die Vielfalt der Funktionen beruht vor allem auf der Ausbildung unterschiedlicher dreidimensionaler Strukturen. Die Aminosäure Cystein enthält eine hoch reaktive Sulfhydrylgruppe (-SH), die aufgrund ihrer Fähigkeit Disulfidbrücken zu bilden, wesentlich an der Ausbildung der Proteinfunktion und -struktur beteiligt ist. Diese funktionelle Gruppe ist ein Hauptangriffspunkt metall(oid)organischer Verbindungen.

Epidemiologische Studien haben Metalle, die in Bakterien keine genotoxische Veränderungen hervorrufen, als Karzinogene beim Menschen identifiziert. Die Wirkmechanismen können dabei sehr unterschiedlich sein und oft kann nicht eindeutig entschieden werden, ob die Metallverbindungen als Initiatoren oder Promotoren bei der Tumorstoffwirkung fungieren, oder sogar beides (SNOW, 1992). Die Karzinogenese kann in vier überlappende Stadien eingeteilt werden, die als Initiation, Promotion, Progression und Metastasierung bezeichnet werden. Metalle und Metallverbindungen können an allen Stadien in unterschiedlichem Maße beteiligt sein. Einige Metallverbindungen interagieren direkt mit der DNA und können zu Mutationen führen, andere wirken synergistisch als Comutagen im Zusammenhang mit weiteren DNA-schädigenden Agenzien, wie UV-Strahlung, alkylierenden Verbindungen, und Benzo[a]pyren (SNOW, 1992).

Die beobachteten cytogenetischen Effekte nach Einwirkung metall(oid)organischer Verbindungen auf CHO-Zellen lassen sich nicht allein mit den oben beschriebenen Wirkmechanismen erklären. Die chemischen Umsetzungen im Stoffwechsel befinden sich in einem Fließgleichgewicht. So ist denkbar, daß die Methylgruppe am Metall nicht fest gebunden bleibt, sondern auch wieder abgegeben und auf andere Substrate übertragen werden kann. Zumindest bei einigen Bakterienarten im Verdauungssystem von Säugetieren ist bekannt, daß sie in der Lage sind, Metall-Kohlenstoff-Bindungen zu spalten. Diese Bindungsspaltung konnte auch in Experimenten mit Leberhomogenat von Mäusen induziert werden (THAYER, 1984). Es ist bekannt, daß elektrophile Verbindungen eine hohe Affinität zu den Basen der DNA besitzen und sie infolge Methylierung modifizieren (SINGER, 1975; SINGER und GRUNDBERGER, 1983). Angriffspunkte dieser Reaktion sind N⁷ des Guanins und N³ des Adenins. Alkylierungen in diesem Bereich destabilisieren die N-glykosidische Bindung der betreffenden Basen und führen zu Depurinierung. Neben den Stickstoffatomen können auch Sauerstoffatome in den Basen methyliert werden, was zu O⁶-Methylguanin und O⁴-Methylthymin führt. Während der Replikation paart O⁶-Methylguanin mit Thymin statt mit Cytosin, woraus eine Transition von GC nach AT resultiert (MURRAY, 1987). O⁴-Methylthymin induziert Transitionen von AT zu GC (SAFFHILL *et al.*, 1985). KAINA *et al.* (1991) konnten zeigen, daß beide Verbindungen SCE und CA induzieren, was auf eine Beteiligung von N-Basenalkylierungen an der Induktion dieser Chromosomenveränderungen schließen läßt. Dies liefert eine mögliche Erklärung für die in dieser Arbeit gefundenen CA und SCE.

MASS und WANG (1997) entwickelten aufgrund ihrer Untersuchungen an menschlichen Lungenkarzinomzellen ein Modell für die Karzinogenese infolge veränderter Methylierungsmuster der DNA. Die Regulation der Expression vieler Gene wird über den Gehalt an methyliertem Cytosin kontrolliert, das vor allem in Promotorregionen zu finden ist. Die Übertragung der Methylgruppe auf Cytosin erfolgt von SAM mit Hilfe einer Methyltransferase. 5-Methylcytosin ändert die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA und modifiziert somit den Grad der Genexpression. Eine Hypermethylierung in Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen, wie zum Beispiel *p53*, führt zur Unterdrückung der

Gentranskription. Solche Zellen haben gegenüber Zellen, deren Tumorsuppression nicht beeinträchtigt ist, einen Wachstumsvorteil. Zudem besteht möglicherweise eine höhere Sensitivität für die Induktion neuer Mutationen, da 5-Methylcytosin häufiger deaminiert als Cytosin, was zu einer C → T Transition führt. Neben der Hypermethylierung führt auch eine Hypomethylierung zu einer veränderten Genexpression. Werden zelluläre Onkogene verstärkt exprimiert, kann Krebs entstehen. Eine Hypomethylierung macht die Chromosomen anfällig für Brüche, da Helix-stabilisierende Proteine nicht mehr binden können.

Im Folgenden wird die Toxikologie der in dieser Arbeit untersuchten metall(oid)organischen Verbindungen im einzelnen diskutiert.

4.2.1 Toxizität organischer Quecksilberverbindungen

Landwirtschaft, Industrie und der Verbrauch fossiler Brennstoffe sind die Hauptquellen für Quecksilbereinträge in die Umwelt. Der Eintrag kann als metallisches Quecksilber, oder als anorganische und organische Quecksilberverbindungen erfolgen. In der Umwelt unterliegen Quecksilberverbindungen verschiedenen Transformationen. Ein Beispiel ist die Biomethylierung, bei der die sehr giftigen Methylquecksilberverbindungen entstehen.

Die hohe Toxizität von Methylquecksilber beruht auf der guten Lipidlöslichkeit und der Labilität der Bindung zwischen MeHg und Ligand. Beide Faktoren bestimmen die hohe Mobilität, wodurch sich die Substanz gleichmäßig im Organismus verteilen kann.

Methylquecksilber kann die Blut-Hirn-Schranke passieren und sich im Gehirn anreichern. Man vermutet, daß die Substanz mit L-Cystein einen Komplex bildet ($-\text{CH}_2\text{-S-Hg-CH}_3$) und den selben Transportweg nutzt, auf dem auch L-Methionin ($-\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CH}_3$) ins Gehirn gelangt. Ionisches Hg^{2+} kann die Blut-Hirn-Schranke kaum überwinden. Die Anreicherung im Gehirn läßt sich unterschiedlich erklären. Zum einen könnte MeHg^+ die Blut-Hirn-Schranke schädigen und für Hg^{2+} permeabel

machen und zum anderen könnte MeHg^+ im ZNS langsam zu Hg^{2+} demethyliert werden. Der Mechanismus ist allerdings nicht näher erforscht (STASDEIT, 1998).

Die Fähigkeit des Quecksilbers, mit anderen Elementen zu reagieren und Komplexe zu bilden, läßt vermuten, daß vor allem Schwefel-, Selen- und Stickstoffatome mit dem MeHg^+ -Kation reagieren können. Hierzu liegen jedoch nur wenige gesicherte Erkenntnisse vor. So wird vermutet, daß vor allem eine Bindung an Glutathion - ein cysteinhaltiges Tripeptid - erfolgt, sowie eine Beeinflussung von Enzymen des Glutathion-Metabolismus, wie des selenhaltigen Enzyms Glutathion-Peroxidase. Eine Wechselwirkung mit Stickstoffatomen in den Nukleinsäuren ist ebenfalls möglich.

Obwohl Quecksilber zweiwertig ist, ist es im MeHg^+ -Ion monofunktional und hat eine andere Affinität zu organischen Liganden als Hg^{2+} . Die Affinität nimmt von Schwefel über Stickstoff zu Sauerstoff ab. Deshalb überrascht es auch nicht, daß Methylquecksilber mit der DNA reagiert, indem es präferentiell an die basischen N_3 - und N_1 -Atome von Thymin und Guanin bindet. Diese Reaktion verhindert die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen und führt zur Auflösung der Basenpaarung sowie zu Einzelstrangbrüchen (GRUENWEDEL *et al.*, 1981). Liegen solche Einzelstrangbrüche räumlich nahe genug beieinander, können Doppelstrangbrüche entstehen, die unrepariert zu CA führen.

MeHgCl induziert verschiedene mutagene Effekte, wie Punktmutationen in CHO-Zellen, Chromosomenaberrationen in Pflanzenzellen und Säugetierzellen und Genommutationen in Knochenmarkszellen und männlichen Keimzellen beim Hamster (BETTI *et al.*, 1993). Weiterhin wurde berichtet, daß verschiedene Quecksilberverbindungen *in vitro* Nondisjunktion von Chromosomen und C-Mitosen induzieren (RAMEL, 1969). Untersuchungen von BETTI *et al.* (1992) an menschlichen Lymphozyten, die mit MeHgCl behandelt wurden, zeigten, daß diese Substanz stärker klastogen wirkt als Dimethylquecksilber. Störungen des Spindelapparates, die zu Aneuploidien und Polyploidien führen, traten bei beiden Substanzen in ähnlichen Größenordnungen auf. Einige Untersuchungen weisen darauf hin, daß eine umweltbedingte Exposition mit Hg Chromosomenschäden beim Menschen induziert. BETTI *et al.* (1993) untersuchten die Effekte einer Hg-Behandlung an G0-Lymphozyten und die Möglichkeit der Reparatur. In ihren Experimenten stellten sie

fest, daß MeHgCl radiomimetisch wirkt und ähnliche Effekte hervorruft wie Röntgenstrahlung und Agenzien wie Bleomycin, die beide S-Phase-unabhängig Chromosomen- und Chromatidentypaberrationen induzieren. Die Schäden, die von MeHgCl hervorgerufen werden, scheinen relativ stabil zu sein, da kaum DNA-Reparatur nachgewiesen werden konnte. Es konnte lediglich eine leichte Reduktion der Chromatidentypaberrationen beobachtet werden.

Weiterhin wurden von Betti *et al.* (1993) beobachtet, daß bei geringen Konzentrationen in zweiten Nachbehandlungsmetaphasen mehr Chromosomenaberrationen auftraten als in ersten Metaphasen nach Behandlung. Es wird vermutet, daß verschiedene prämutagene Schäden während des ersten Zellzyklus persistieren können und erst im zweiten Zellzyklus zu Chromosomenaberrationen umgewandelt werden. Es besteht auch die Möglichkeit, daß die Reparatur quecksilberinduzierter DNA-Einzelstrangbrüche länger dauert als die Reparatur röntgenstrahlinduzierter Einzelstrangbrüche. Das würde erklären, warum eine kontinuierliche Exposition mit geringen Dosen von MeHgCl zu einer Zunahme an DNA-Schäden führt, wie sie beim genetischen Monitoring von Fischern beobachtet wurden, die mit Quecksilber kontaminierten Fisch zu sich nahmen (SKERFVING *et al.*, 1970).

MeHgCl induziert dauerhafte Schäden in der Zelle, die den Mitoseablauf beeinflussen. Die Substanz induziert Aneuploidien in Lymphozyten, die in der G₀-Phase behandelt wurden, obwohl in dieser Phase der mitotische Apparat noch nicht aktiv ist. BETTI *et al.* (1993) vermuteten, daß die Wirkung demnach anders sei, als sie von typischen Spindelgiften, wie Colchicin und Vinblastin, hervorgerufen werden, die keine Aneuploidien in G₀-Lymphozyten induzieren.

MeHgCl hat direkten Einfluß auf den mitotischen Spindelapparat. Nach Exposition mit dieser Substanz konnten in CHO-Zellen stark kondensierte C-Metaphasen (Abbildung 14) beobachtet werden, wie sie sonst nur nach Einwirkung von Alkaloiden wie Colchicin oder Vinblastin auftreten. Erste Untersuchungen dazu wurden 1969 von RAMEL veröffentlicht. Er behandelte Zellen von *Allium cepa* für 72 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von MeHgCl und fand schon bei Konzentrationen unter 8×10^{-7} M abnormale mitotische Zellen (RAMEL, 1969).

Experimente von SAGER *et al.* (1983) und VOGEL *et al.* (1985) haben gezeigt, daß MeHg direkt mit Mikrotubuli interagieren kann, indem es an die freien Sulfhydrylgruppen des Tubulins bindet. Die Sulfhydrylgruppen, die für die Polymerisation der Mikrotubuli verantwortlich sind, befinden sich in unmittelbarer Nähe zur GTP-Bindungsstelle einer Tubulinuntereinheit. Bindet MeHg an die mit der GTP-Bindungsstelle assoziierten Sulfhydrylgruppen, wird der Aufbau des Mikrotubulus verhindert. Die Wirkung auf die Mikrotubuli ist dosisabhängig. Zuerst erfolgt eine Hemmung der Polymerisation und bei höheren Konzentrationen kommt es zu Depolymerisation und Abbau der Untereinheiten. Vermutlich reagiert MeHg nach einem ähnlichen Mechanismus mit den Sulfhydrylgruppen der Mikrotubuli wie Colchicin und Vinblastin. VOGEL *et al.* (1985) fanden in *in vitro*-Experimenten heraus, daß bereits zwei Moleküle MeHg pro Tubulindimer den Aufbau von Mikrotubuli komplett inhibieren können. Bei einem Verhältnis von 15 MeHg-Molekülen zu einem Tubulindimer waren alle verfügbaren Sulfhydrylgruppen mit MeHg gesättigt.

SAGER *et al.* (1983) untersuchten die Wirkung von MeHg auf cytoplasmatische Mikrotubuli in Fibroblastenzellen und stellten dabei eine zeit- und konzentrationsabhängige Zerstörung dieser Strukturelemente fest. Sie untersuchten die aufgenommene Menge MeHg in der Zelle, indem sie das mit Proteinen assoziierte Quecksilber bestimmten. Nach 60-minütiger Inkubation mit 15 µM MeHg wurde $3,96 \pm 1,07$ µg Hg/mg Protein bestimmt, entsprechend etwa 1,5-2 % der eingesetzten Konzentration. Der niedrige Wert ist offenbar darauf zurückzuführen, daß die Inkubationslösung 15% FKS enthielt und die darin enthaltenen Proteine die größte Menge MeHg gebunden haben. Die simultane Applikation des Chelatbildners Dimercaptosuccininsäure (DMSA) reduzierte die aufgenommene und proteingebundene Hg-Menge in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration um über 90 %. Cystein hat die gleiche Wirkung und reduziert die zellassoziierte Hg-Menge von 1,6 µg Hg/mg Protein auf 0,17 µg Hg/mg Protein, was einer Reduktion um 89 % entspricht. MeHg führt auch zu einer Auflösung cytoplasmatischer Mikrotubuli. Bei einem Level von 0,6 µg Hg/ mg Protein konnte kein Einfluß auf die Mikrotubuli beobachtet werden. Bei Werten zwischen 0,7 und 1,12 µg Hg/mg

Protein kam es zur partiellen Zerstörung, bei 1,6 µg Hg/mg Protein oder mehr waren keine Mikrotubuli in der Zelle mehr erkennbar.

Alle Untersuchungen *in vitro* wurden fast ausschließlich in Bezug auf die Konzentration von Chemikalien im Kulturmedium gemacht. Es existieren kaum Ergebnisse zur intrazellulären Konzentration. Dabei ist es von zentraler Bedeutung die tatsächliche Menge der aufgenommenen Substanz zu kennen, um genaue Aussagen über deren Toxizität und Wirkmechanismus machen zu können. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Kooperation mit dem Institut für Umweltanalytik der Universität Essen und dem Kernforschungszentrum Jülich die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von MeHgCl untersucht (siehe 3.2.1). Dazu wurden CHO-Zellen 30 beziehungsweise 60 Minuten lang mit Konzentrationen von 1×10^{-7} M oder 1×10^{-6} M inkubiert. Zur Bestimmung der aufgenommenen Menge an MeHgCl wurden drei verschiedene Methoden benutzt und aus den Meßdaten der Mittelwert gebildet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Die Aufnahme der Substanz erfolgte rasch, nach 30-minütiger Exposition wurde in den Zellen etwa die gleiche Konzentration an MeHgCl festgestellt wie nach 60 Minuten. Dabei ist die von der Zelle aufgenommene Menge MeHgCl proportional von der eingesetzten Konzentration in der Behandlungslösung abhängig. Nach Bestimmung der Zellzahl in einer Zählkammer konnte sowohl die aufgenommene Menge als auch die intrazelluläre Konzentration berechnet werden. Während einer 60-minütigen Inkubation mit 1×10^{-7} M betragen diese Werte $6,9 \times 10^{-6}$ ng MeHgCl pro Zelle, was einer Konzentration von $2,7 \times 10^{-17}$ M entspricht. Eine Konzentrationserhöhung auf 1×10^{-6} M ergab $5,0 \times 10^{-5}$ ng. Dies entspricht einer Konzentration von $1,99 \times 10^{-16}$ M. In der cytogenetischen Untersuchung an CHO-Zellen zeigten 2,67 % der Zellen bei der letztgenannten Konzentration Chromosomenaberrationen, wie Triradiale und Chromatidenbrüche. Ein Einfluß auf die SCE-Frequenz wurde nicht festgestellt. Unter der Annahme, daß zwischen der eingesetzten Konzentration in der Behandlungslösung und der Menge der aufgenommenen Substanz eine lineare Abhängigkeit besteht, läßt sich ein hypothetischer Wert für die in den cytogenetischen Experimenten eingesetzte Konzentration von 1×10^{-5} M berechnen. Dieser ist mit einer analytischen Untersuchung in weiteren Experimenten zu verifizieren. Unter der weiteren Annahme einer Zellzahl von 1×10^7 Zellen berechnet

sich der Wert für die aufgenommene Menge MeHgCl pro Zelle auf etwa 6×10^{-4} ng und der Wert für die intrazelluläre Konzentration auf etwa $2,4 \times 10^{-15}$ M. Bei einer Konzentration von 1×10^{-5} M MeHgCl im Behandlungsmedium zeigten 35,33 % der Zellen CA, wobei einige Zellen eine Vielzahl von Aberrationen aufwiesen. Die SCE-Frequenz war mit 13,71 SCE pro Zelle doppelt so hoch wie der Kontrollwert von 6,60. Eine Konzentrationserhöhung über 1×10^{-5} M wirkte stark cytotoxisch und führte zum Absterben aller Zellen.

GRUENWEDEL *et al.* (1981) kamen zu ähnlichen Ergebnissen. Sie untersuchten die Aufnahme und intrazelluläre Verteilung von MeHgCl bei HeLa-Zellen in Suspensionskultur und den Effekt auf DNA-Replikation und Proteinsynthese. Dazu exponierten sie HeLa S3 Zellen unterschiedlich lange mit verschiedenen Dosen MeHgCl, bei dem Hg radioaktiv markiert war. Die Detektion erfolgte nach der PIXE-Methode (Particle-induced X-ray Emission). Die Ergebnisse zeigten, daß die Bindung von MeHg an die Zellmembran rasch erfolgte, wobei innerhalb der ersten 60 Minuten der Inkubation die größte Menge MeHg gebunden wurde. Die Konzentration von MeHg in einer Zelle betrug zwischen 2×10^{-16} M (bei einstündiger Inkubation mit $1 \mu\text{M}$ MeHgCl im Medium) und 4×10^{-14} M (bei 24-stündiger Inkubation mit $100 \mu\text{M}$ MeHgCl im Medium). Bei einer Konzentration von etwa 30×10^{-16} M MeHg scheint eine Schwellendosis erreicht zu sein, unterhalb der die Zellen ein normales Wachstumsmuster zeigen und Stoffwechselprozesse wie DNA-Replikation oder Proteinbiosynthese nur zu einem sehr geringen Grad beeinträchtigt sind. Oberhalb dieser Schwellendosis treten allerdings gravierende Störungen in Zellmetabolismus und Wachstum auf. Die Bindung von MeHg an die Zelle ist relativ stark. Drei Stunden nachdem die Zellen in frisches Medium überführt wurden, konnten immer noch 80% MeHg in der Zelle nachgewiesen werden.

Generell ist es schwierig von der internen Konzentration auf die Anzahl induzierter Strangbrüche oder DNA-Läsionen zu schließen. Zum einen sind sehr effiziente Reparatursysteme in der Lage, Schäden in der DNA zu reparieren und zum anderen ist die Wirkung der Substanz nicht allein auf die DNA beschränkt. Viele andere zelluläre Bestandteile (Mikrotubuli, Membranen) und Prozesse (Proteinbiosynthese, Signalübermittlung) sind betroffen. Die Menge der

persistierenden Schäden hängt auch von dem physiologischen Allgemeinzustand der Zelle ab und davon, ob noch andere schädliche Einflüsse auf die Zelle treffen.

PANDA *et al.* (1995) testeten Antioxidantien wie Cystein, Glutathion, Vitamin C, Vitamin E und Radikalfänger, wie Mannitol, Kaliumiodid und Natriumselenit auf ihre prophylaktische Wirkung gegen die genotoxische Aktivität von MeHgCl im Mikronukleustest mit *Allium cepa*. Die Substanzen wurden gleichzeitig mit oder vor der genotoxischen Exposition mit $1,26 \times 10^{-6}$ M MeHgCl verabreicht. In allen Experimenten, bei denen eine Coexposition stattfand, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Mikronukleusfrequenz in MeHgCl-behandelten Zellen. Glutathion erwies sich dabei mit 98% Reduktion am effektivsten, gefolgt von Cystein (95%), Vitamin C (95%), Natriumselenit (93%), Vitamin E (74%), Mannitol (51%) und Kaliumiodid (30%). Erfolgte eine einstündige Vorbehandlung der Wurzelmeristemzellen mit diesen Substanzen, zeigte sich ebenfalls eine signifikante Verminderung der Mikronukleusfrequenz nach Einwirkung von MeHgCl. Die Reduktion war allerdings etwas geringer, als in den Experimenten, in denen die Exposition gleichzeitig erfolgte. Glutathion erwies sich auch in diesen Experimenten mit 87% am effektivsten, gefolgt von Vitamin C (70%), Natriumselenit (68%) und Mannitol (66%). In diesen Versuchen konnte anhand von C-Metaphasen und gestörten Anaphasen beobachtet werden, daß Selenit und Substanzen mit Thiolgruppen (Cystein, Glutathion) die Frequenz an Zellen mit Spindelstörungen reduziert.

Der Schutz, den Selenit gegen die Genotoxizität von MeHg bietet, wird vermutlich über mehrere Mechanismen gewährleistet (CUVIN-ARALAR und FURNESS, 1991). MeHg könnte aufgrund der hohen Affinität zu Selenohydroxylgruppen Komplexe mit Selenit bilden, was auch den größeren Schutz bei einer Coexposition beider Substanzen erklärt. Selen ist ein intrinsischer Bestandteil der Glutathion-Peroxidase, einem antioxidativ wirkendem Enzym. Es ist bekannt, daß Quecksilber dieses Enzym in seiner Wirkung hemmt. Selen kann die hemmende Wirkung mindern.

Bei einer homolytischen Spaltung von MeHgCl können infolge Phospholipidperoxidation freie Radikale entstehen (GANTHER, 1978; SHINADA *et al.*, 1990; CUVIN-ARALAR und FURNESS, 1991). Glutathion, Vitamin C und E

beseitigen Peroxide und haben somit einen schützenden Effekt gegen Genotoxizität. Weiterhin wird vermutet, daß MeHg zur Bildung von Hydroxylradikalen führt. Mannitol und Kaliumiodid sind Radikalfänger, die eine schädliche Wirkung solcher Radikale verhindern können.

Die hohe Affinität von Quecksilber zu Sulfhydrylgruppen macht man sich nach einer Exposition zunutze. Eine Methode, toxische Schwermetallionen aus dem Körper zu entfernen, ist eine Chelat-Therapie. Bei MeHg-Vergiftungen werden heute Dithiolverbindungen, wie 2,3-Dimercapto-1-propansulfonat und *meso*-2,3-Dimercaptobernsteinsäure eingesetzt. Bei der Reaktion bindet das MeHg⁺-Kation an die SH-Gruppen dieser Verbindungen (STRASDEIT, 1998).

Neben der monomethylierten Quecksilberverbindung wurde auch Dimethylquecksilber cytogenetisch untersucht. Selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration konnte nur eine sehr geringe Anzahl geschädigter Metaphasen (2,33 %) gefunden werden und die SCE-Frequenz lag mit 8,64 SCE pro Zelle nur wenig über dem Kontrollwert von 5,94. BETTI *et al.* (1992) fanden ebenfalls in ihren Untersuchungen heraus, daß Dimethylquecksilber nur wenige CA induziert. Der Spindelapparat wird in nahezu gleichem Maße gestört wie unter Einwirkung von Monomethylquecksilberchlorid. Das Ergebnis muß nicht unbedingt mit der mangelnden Genotoxizität der Substanz zusammenhängen, sondern vielmehr mit dem gewählten Versuchsaufbau. Dimethylquecksilber ist zum einen hydrophob, so daß der Transport im wässrigen Medium zu den Zellen unterbunden wird, und zum anderen sehr leicht flüchtig, wodurch die Verbindung von dem offenen Versuchssystem leicht in die Atmosphäre entweichen kann. Dies könnte ein Grund dafür sein, daß es in der Literatur nur wenige Untersuchungen zur Genotoxizität von Dimethylquecksilber gibt. *In-vivo*-Versuche könnten hier sicherlich verlässlichere Ergebnisse liefern.

4.2.2 Toxizität organischer Zinnverbindungen

Wegen der industriellen Verwendung organischer Zinnverbindungen als Biozide, Katalysatoren, Stabilisatoren für Kunststoffe und Antifäulniszusätzen in Farben ist der Mensch in zunehmendem Maße diesen Substanzen ausgesetzt (SNOEIJ *et al.*,

1987). Sie können sich über die Nahrungskette im Körper anreichern und toxische Reaktionen hervorrufen. (BOYER, 1989; GANGULY *et al.*, 1992).

Die Giftigkeit korreliert mit der Länge und Anzahl der aliphatischen Kohlenstoffketten, die mit dem Zinnatom verbunden sind, und nimmt in Säugetieren von tri- zu monoorganischen Zinnverbindungen ab (BORENFREUND und BABICH, 1987; BOYER, 1989; GANGULY, 1994). Innerhalb einer Klasse wird die Toxizität über die Anzahl der Kohlenstoffatome in der Seitenkette bestimmt. Unter den Trialkylzinnverbindungen zeigen die niedrig substituierten Verbindungen (Trimethylzinn und Triethylzinn) die stärksten Effekte. Eine Zunahme der Kettenlänge reduziert die Toxizität bei Säugetieren.

Biotransformation ist ein wichtiger Aspekt bei der Toxizität organischer Zinnverbindungen. Der metabolische Abbau von Organozinnverbindungen erfolgt *in vivo* über Dealkylierung oder Dephenylierung mittels eines Monooxygenasesystems in der Leber (KIMMEL *et al.*, 1977; WADA *et al.*, 1982). Bei Ratten, denen Tributylzinn appliziert wurde, konnte nach wenigen Stunden in Blut und Gallenflüssigkeit Dibutylzinn nachgewiesen werden (SNOEIJ *et al.*, 1987). Dialkylzinnverbindungen besitzen eine chemische Affinität zu Thiolgruppen und greifen in die Synthese von DNA, RNA und Proteinen ein (PENNINKS und SEINEN., 1980). In diesem Zusammenhang vermuteten CARDIN und ROY (1985) eine Bindung von Zinn an RNA oder freie Nukleoside.

Im Vergleich zu anderen toxikologischen Wirkungen organischer Zinnverbindungen gibt es nur wenige Untersuchungen zur Genotoxizität (HAMASAKI *et al.*, 1992). GHOSH und Mitarbeiter wiesen eine dosisaabhängige Induktion von Mikrokernen, CA, und SCE, sowie eine verzögerte Wirkung auf den Zellzyklus von menschlichen Lymphozyten nach. (GHOSH *et al.*, 1989a, 1989b, 1990, 1991; GANGULY *et al.*, 1992, GANGULY, 1993). Die Mutagenität dieser Verbindungen wird dabei in erster Linie über eine Hemmung des DNA-Reparatursystems erklärt, die in Zusammenhang mit einer eingeschränkten ATP-Bildung stehen könnte. Organische Zinnverbindungen sind effektive Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien. Ein Schaden, der durch diese Verbindungen induziert wird, kann also nicht repariert werden, sondern persistiert. Es wird vermutet, daß diese Substanzen

mit anderen Mutagenen synergistisch wirken und zu einer Erhöhung induzierter Schäden beitragen.

Aufgrund der stark antibakteriellen Wirkung der meisten organischen Zinnverbindungen, ist es nicht möglich zur Ermittlung der Genotoxizität den Ames-Test einzusetzen. Aus diesem Grund entwickelten HAMASAKI *et al.* (1993) einen modifizierten bakteriellen Mutationstest mit *Salmonella typhimurium*, mit dem sie einige Zinnverbindungen als mutagen nachweisen konnten.

Di- und Triorganozinnverbindungen interagieren mit der mitochondrialen Respiration und hemmen die ATP-Synthese (ALDRIGE, 1976; PENNINKS und SEINEN, 1980). Dieser Vorgang kann über drei verschiedenen Mechanismen ablaufen. 1. über die Störung des existierenden Protonengradienten, da diese Verbindungen einen Austausch zwischen Halogenen und Hydroxylionen durch die Mitochondrienmembran vermitteln. Geringe Mengen dieser Substanzen können in die äußere Mitochondrienmembran eindringen und einen Austausch zwischen Cl⁻ und OH⁻ vermitteln. Dieser Mechanismus führt zur Reduktion des pH-Wertes auf der Innenseite der äußeren Mitochondrienmembran, zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung und somit zur Hemmung der ATP-Synthese (Aldridge, 1976). 2. über die Bindung an eine Komponente des ATP-Synthase-Komplexes, was direkt zu einer Hemmung der ATP-Produktion führt. 3. kommt es zu einem Anschwellen des Mitochondriums nach Exposition vor allem der lipophileren Verbindungen. Hohe Konzentrationen führen zu strukturellen Veränderungen.

PENNINKS und SEINEN (1980) untersuchten die Wirkung organischer Zinnverbindungen auf den Energiehaushalt von Zellen. Dazu behandelten sie Thymozyten aus der Ratte mit verschiedenen Organozinnverbindungen und konnten in den Zellen gleichzeitig einen hohen Verbrauch an Glukose und eine Anreicherung von Pyruvat und Laktat beobachten. Diese Ergebnisse ließen auf eine Hemmung der Pyruvatdehydrogenase schließen, wodurch verhindert wurde, daß die Endprodukte der Glykolyse in den Zitronensäurezyklus eintreten konnten. Pyruvat reichert sich somit im Cytoplasma der Zelle an und wird teilweise unter Aufwendung von cytosolischem NADH zu Laktat umgebaut. In Anpassung an die reduzierte Aktivität des Zitronensäurezyklus und dem daraus resultierenden ATP-Mangel wird die Glykolyse aktiviert, was zu einem zunehmenden Verbrauch an Glukose führt. Die

glykolytische Phosphorylierung kann allerdings nur vorübergehend den intrazellulären ATP-Gehalt aufrechterhalten. Der ATP-Pool reicht nicht aus, um einen normalen Stoffwechsel der Zelle und Proliferation zu gewährleisten.

Organozinnverbindungen wirken cytotoxisch, wofür zum einen ein verminderter Gehalt an cAMP in der Zelle und zum anderen die Interaktion der Verbindungen mit Sulfhydrylgruppen der Plasmamembran oder des Cytoskeletts verantwortlich sind. Tributylzinn interkaliert asymmetrisch zwischen die Lipidschichten der Zellmembranen und hemmt die dort membrangebundenen Enzyme. Eine veränderte Permeabilität der Plasmamembran soll mit der Entstehung von Ödemen im Zentralnervensystem zusammenhängen.

4.2.3 Toxizität organischer Arsenverbindungen

Die Aufnahme von As ist mit einem erhöhten Risiko verbunden, an Haut-, Lungen-, Leber-, Nieren- und Blasenkrebs zu erkranken. Die Exposition von As erfolgt als Arsenat (5^+) oder Arsenit (3^+). Arsenit ist *in vitro* und *in vivo* viel toxischer als Arsenat. Arsenat hat eine ähnliche Struktur wie anorganisches Phosphat und inhibiert im Stoffwechsel die oxidative Phosphorylierung in Mitochondrien (APOSHIAN, 1989; APOSHIAN und APOSHIAN, 1989), was einen ähnlichen Effekt hervorrufen dürfte, wie nach Einwirkung organischer Zinnverbindungen (siehe 1.1.2). As dringt über einen energieunabhängigen Diffusionsprozeß in die Zelle ein und wird schnell an verschiedene intrazelluläre Komponenten gebunden, wodurch es in der Zelle akkumuliert. Die biologische Inaktivierung erfolgt über die Reduktion von Arsenat zu Arsenit und anschließende Methylierung zu organischen As-Verbindungen, die über die Niere mit dem Urin ausgeschieden werden. In Säugetieren findet diese Biotransformation anorganischer Arsenverbindungen zu MMA und DMA in verschiedenen Geweben statt, wobei die Leber gegenüber anderen Organen die höchste Methylierungskapazität aufweist. Der Reaktionsmechanismus verläuft nach einer nukleophilen Reaktion, bei der SAM als Methylgruppenüberträger fungiert. Bevor in MMA eine weitere Methylgruppe zur Bildung von DMA eingefügt werden kann, ist wiederum eine Reduktion erforderlich, wobei die Elektronen vermutlich aus dem zellulären Glutathionpool stammen. Die

reduzierte Form von Glutathion reguliert den Arsenmetabolismus über verschiedene Mechanismen: Erleichterung der Diffusion in die Zelle, Stimulation der ersten Metabolisierungsreaktion und Zunahme der DMA-Exkretion aus der Zelle (GEORIS *et al.*, 1990).

In verschiedenen Untersuchungen konnte eindeutig nachgewiesen werden, daß Arsenverbindungen *in vivo* und *in vitro* genotoxisch sind. (PETRES *et al.*, 1977; YAMANAKA *et al.*, 1989; SNOW, 1992; YAMANAKA *et al.*, 1995; RUDEL *et al.*, 1996; EGUSHI *et al.*, 1997; HEALY *et al.*, 1997; MOORE *et al.*, 1997; YAMAMOTO *et al.*, 1997; YAMANAKA *et al.*, 1997; KASHIWADA, *et al.*, 1998). Anorganische As-Verbindungen wirken karzinogen, obwohl sie keine direkten DNA-Schäden induzieren (YAMANAKA *et al.*, 1997). Nach Exposition von Zellen mit anderen mutagenen Agenzien und Nachbehandlung mit Arsenit können jedoch chromosomale Veränderungen beobachtet werden, die auf eine Inhibition der DNA-Reparatur zurückgeführt werden. RUDEL *et al.* (1996) vermuten, daß As die Wirkung von Reparaturenzymen (Ligase I und II) blockiert, die Thiol- und Sulfhydrylgruppen besitzen. YAMANAKA *et al.* (1995) konnten zeigen, daß die methylierte Verbindung DMA direkt Schäden, wie Einzelstrangbrüche und Crosslinks in Lungenepithelzellen von Ratten und Mäusen und menschlichen alveolaren Epithelzellen induzieren kann.

MOORE *et al.* (1997) behandelten Mauslymphomzellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von As^{3+} , As^{5+} , MMA und DMA. Diese Zellen bilden, je nach Art der induzierten Mutation, morphologisch unterscheidbare Kolonien. Chemikalien, die Punktmutationen induzieren, führen zu großen, normal schnell wachsenden Kolonien, klastogene Chemikalien führen zu kleinen, sehr langsam wachsenden Kolonien. Die Autoren konnten zeigen, daß verschiedene As-Spezies keine Punktmutationen, wohl aber CA und SCE induzierten.

EGUSHI *et al.* (1997) und KASHIWADA *et al.* (1998) untersuchten die Auswirkungen organischer As-Verbindungen auf den Zellzyklus. MMA und DMA erhöhen signifikant den Mitoseindex bei V79 Hamsterzellen und menschlichen Lymphozyten und führen zu einer Verzögerung des Zellzyklus. Beide Substanzen induzieren einen Zellzyklusarrest im Stadium der Mitose, indem der Aufbau der Mitosespindel vorübergehend unterbunden wird. Das Auftreten tetraploider Zellen läßt vermuten, daß organische As-Verbindungen einen unvollständigen mitotischen

Arrest induzieren (ENDO *et al.*, 1992; VEGA *et al.* 1995). Die Induktion von Aneuploidien zeigt, daß DMA als Spindelgift wirkt, das eine Chromosomenfehlverteilung hervorruft, nicht aber die Zellteilung verhindert.

DMA hat eine hohe Affinität zum Zellkern und ist ein Hauptmetabolit im Stoffwechsel anorganischer Arsenverbindungen im Körper. Es induziert Schäden wie DNA-Einzelstrangbrüche, DNA-Protein-Crosslinks und Verklumpungen von Heterochromatin. YAMANAKA *et al.* (1997) vermuteten, daß die DNA-Strangbrüche nicht von DMA selbst ausgelöst wurden, sondern von Sauerstoffradikalen, die bei der Reaktion von Dimethylarsin, einem weiteren Metaboliten von DMA, und molekularem Sauerstoff entstehen. Dimethylarsin ist ein effektiver Elektronendonator und reagiert sehr stark mit molekularem Sauerstoff. Es müssen aber noch andere Radikale als aktive Sauerstoffspezies an der Entstehung der DNA-Schäden beteiligt sein. Bei der Reaktion zwischen molekularem Sauerstoff und Dimethylarsin entstehen auch das Dimethylarsinperoxyradikal $[(\text{CH}_3)_2\text{AsOO}\cdot]$ und das Superoxidationradikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$), die einen schädlichen Einfluß ausüben. Untersuchungen chemischer Karzinogene zeigen eine dominante Rolle des aktiven Sauerstoffs bei der Krebsentstehung, wobei dem Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) und dem Superoxidationradikal ($\text{O}_2^{\cdot-}$) die größte Bedeutung zukommt. Im Fall der Arsenverbindungen kommt dem Dimethylarsinperoxyradikal eine dominante Rolle bei der Genotoxizität zu. Die beobachteten Schäden fanden sich bei Mäusen nach oraler Aufnahme von DMA in erster Linie in Lungenzellen. Leber-, Nieren- und Milzzellen zeigten keine DNA-Brüche. Nach Gabe von 10 mM DMA konnten DNA-Crosslinks beobachtet werden, ebenfalls fanden sich Quervernetzungen zwischen DNA und Core-Histon-Proteinen sowie Nucleohistonproteinen. Diese Verbindungen traten zwischen Aminogruppen nuklearer Proteine wie Serin oder Threonin und Aldehydgruppen von AP-Stellen in der DNA auf (KATO *et al.*, 1994).

Arsenat kann *in vivo* mittels Reduktion zu Arsenit aktiviert werden, das seine toxischen Effekte über die Reaktion mit Thiolen und Sulfhydrylgruppen an zellulären Proteinen und enzymatischen Cofaktoren ausübt (APOSHIAN, 1989; APOSHIAN und APOSHIAN, 1989). Eine Reaktion ist dabei die Bindung an das Coenzym Liponsäure und dessen Inaktivierung. Liponsäure ist eine wichtige Komponente des Multienzymkomplexes der Pyruvatdehydrogenase und ist an der

Bildung von Acetylcoenzym A (Acetyl-CoA) und der Gluconeogenese beteiligt (STRYER, 1991). Eine weitere Reaktion ist die Hemmung der DNA-Reparatur (HARTWIG *et al.*, 1997), die von komplexen DNA-Protein-Interaktionen abhängt. Bei der DNA-Reparatur sind Proteine an der Schadenserkennung, Inzission, Polymerisation und Ligation beteiligt. Prinzipiell erfolgt die Hemmung durch karzinogene Metallionen über strukturelle Veränderungen der DNA oder Modifikationen von Reparaturproteinen. As verhindert in erster Linie die Ligation, indem vermutlich essentielle Sulfhydrylgruppen des Enzyms inaktiviert werden (RUDEL *et al.*, 1996).

Arsenverbindungen zeigen keine mutagene Wirkung in bakteriellen und Säugerzelltestsystemen. Arsenit ist jedoch ein Comutagen, das mit anderen Mutagenen synergistisch deren Wirkung verstärkt. Dieser Effekt kann über die arseninduzierte Proteininhibition verstärkt werden. In Bakterien hat Arsen einen zweifachen Effekt: es inhibiert die Produktion von Enzymen, die an der SOS-Reparatur beteiligt sind und verstärkt die Mutagenese nach Einwirkung von UV-Licht und alkylierenden Agenzien. Dieser Effekt ist vermutlich das Ergebnis einer Inhibition der O⁶-Alkylguanin-DNA-Alkyltransferase (AGT). Dieses Enzym ist primär an der Reparatur von O⁶-Methylguanin, einem der Hauptschadenstypen, die von alkylierenden Agenzien induziert werden, beteiligt. Die Alkylgruppe wird auf einen Cytosinrest des Enzyms übertragen. Das AGT-Protein wird von allen Metallen und Metallverbindungen inhibiert, die mit Thiolgruppen reagieren können.

As wird *in vivo* als Karzinogen eingestuft (PETRES *et al.*, 1977; YAMAMOTO *et al.*, 1995; YAMANAKA *et al.*, 1997). Vermutlich wirkt As, nachdem es im Stoffwechsel zu DMA methyliert wurde, über die Hemmung der DNA-Reparatur als Co-Karzinogen. YAMAMOTO *et al.* (1995) konnten an Ratten zeigen, daß DMA einen promovierenden Effekt auf Blasen-, Nieren, Leber- und Schilddrüsenkrebs ausübt, nicht als Initiator bei der Karzinogenese wirkt. Nach Exposition mit DMA allein wurden keine Tumore bei den Versuchstieren beobachtet. Erst nach Vorbehandlung mit anderen Karzinogenen traten vermehrt Tumore auf.

MASS und WANG (1997) untersuchten den Einfluß von Arsen auf das Methylierungsmuster der DNA und entwickelten ein Modell für die arseninduzierte Karzinogenese. Dazu schlugen sie zwei mögliche Wirkmechanismen vor. Im ersten

wirkt As in erster Linie als Enzyminhibitor, der partiell zelluläre SAM-abhängige Methyltransferasen hemmt. Es resultiert ein Überschuß an SAM, wodurch nicht inhibierte Methyltransferasen ihre Substrate, in diesem Falle Cytosin in der DNA, übermethylieren. Infolgedessen kommt es zu einer Unterdrückung der Expression von Tumorsuppressorgenen (wie *p53*), einem wichtigen Schritt in der Kanzerogenese. Im zweiten Weg findet verstärkt eine Methylgruppenübertragung von SAM auf As statt. Die Reduktion an verfügbarem SAM führt zu einer Hypomethylierung der DNA, die eine zunehmende Expression bestimmter Gene erlaubt. Handelt es sich dabei um zelluläre Onkogene kann Krebs entstehen. Hypomethylierung macht die Chromosomen anfällig für Brüche, denn Helix-stabilisierende Proteine können nicht mehr binden.

Obwohl methylierte Arsenverbindungen generell eine schwächere akute und chronische Toxizität zeigen, gibt es keinen Beweis dafür, daß sie ein geringeres karzinogenes Risiko als anorganische Arsenspezies darstellen (MASS and WANG, 1997).

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Detoxifikation von Arsen über die Methylierung zur Karzinogenese beiträgt und dieser Prozeß nicht als protektiver Mechanismus anzusehen ist. In diesem Zusammenhang stellt sich die interessante Frage, ob andere Metalle ebenfalls über eine Veränderung des Methylierungsmusters der DNA zur Kanzerogenese beitragen.

5. Zusammenfassung

Die Kontamination von Gewässern mit genotoxischen Substanzen ist sowohl aus human- als auch aus ökotoxikologischen Gesichtspunkten bedenklich. In epidemiologischen Studien wurden Korrelationen zwischen genotoxischen Gewässerbelastungen und kanzerogenen Effekten beim Menschen aber auch bei aquatischen Organismen hergestellt. In der vorliegenden Arbeit wurden Wässer, wie Autobahn-, Straßen- und Dachabflüsse, Abwasser aus Kläranlagen, Regen, Schnee, Teich-, Bach-, und Flußwasser, auf eine Kontamination mit mutagenen Substanzen untersucht. Mutagene Substanzen kommen in der Umwelt nur in geringen Konzentrationen vor, so daß sich die Notwendigkeit der Schadstoffkonzentration ergibt. Zu diesem Zweck wurde die in Japan entwickelte Blue-Cotton-/ Blue-Chitin-Methode verwendet. Das an ein Trägermaterial gebundene blaue Pigment (Kupferphthalocyanintrisulfonat) adsorbiert selektiv polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe mit mehr als drei Ringen. Die genotoxische Wirkung der mit diesen Methoden gewonnenen Extrakte wurde an CHO-Zellen cytogenetisch untersucht. Mit Ausnahme des Leitungswassers konnten bei allen untersuchten Wasserproben Genotoxizität nachgewiesen werden, die auf die im Wasser enthaltenen PAK zurückzuführen ist. Bei der Untersuchung zeigte sich eine saisonale Abhängigkeit der Mutagenität, die im Sommer höher war als im Winter. Die Gesamtwirkung kann sich aus der Wirkung von Einzelsubstanzen, ihren Abbauprodukten und synergistischen beziehungsweise antagonistischen Effekten zusammensetzen. PAK werden im Stoffwechsel enzymatisch aktiviert und in reaktive Zwischenprodukte überführt. Chemische Reaktionen mit der DNA führen zu DNA-Addukten.

Das am häufigsten eingesetzte Testsystem zur Bestimmung der Genotoxizität von Wasserproben ist der Ames-Test mit *Salmonella typhimurium*. Bei allen im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Wasserproben reagierte dieser Test weniger empfindlich auf Mutagenität als die Tests auf CA und SCE.

Alle in dieser Arbeit untersuchten metall(oid)organischen Verbindungen wirkten mutagen und induzierten konzentrationsabhängig chromosomale Aberrationen und SCE. Die organische Quecksilberverbindung wies die höchste geno- und

cytotoxische Aktivität auf, gefolgt von der organischen Zinn- und den Arsenverbindungen.

Das momentane Wissen über Mechanismen der Metallgenotoxizität zeigt, daß es keinen allgemeingültigen Wirkmechanismus gibt, der das karzinogene Potential diverser Metalle und ihrer Verbindungen erklären kann. Metalle reagieren mit nahezu allen zellulären Bestandteilen. Das genotoxische Potential hängt weitgehend von der Bioverfügbarkeit der aktuellen Spezies ab. Die Bindung des Metalls geht mit einer Vielzahl von Effekten auf das genetische Material einher, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtet werden kann. Dazu gehören Konformationsänderungen der DNA und nuklearer Proteine, Strangbrüche und Depurinierung des DNA-Moleküls, Crosslinks und Basenmodifikationen. Diese Effekte können nach fehlerhafter Reparatur oder Replikation des geschädigten DNA-Templates zu Mutationen führen. Enzyme, die diese Prozesse kontrollieren sind ebenfalls betroffen. Die meisten karzinogen wirkenden Metalle können unter physiologischen Bedingungen mit Sauerstoff zu reagieren. In den meisten Fällen kommt es zu einer Aktivierung von O_2 zum $O_2^{\cdot-}$ -Radikal während einer Autooxidation oder einer Aktivierung von H_2O_2 zum Hydroxylradikal ($\cdot OH$) über den Fenton/Haber-Weiss-Prozeß. Diesen beiden Radikalen kommt in Zusammenhang mit der Genotoxizität die größte Bedeutung zu. Im Fall der Arsenverbindungen spielt das Dimethylarsinperoxyradikal $[(CH_3)_2AsOO^{\cdot}]$ eine dominante Rolle. Die beobachteten cytogenetischen Effekte nach Einwirkung metall(oid)organischer Verbindungen auf CHO-Zellen, lassen sich nicht allein mit den genannten Wirkmechanismen erklären. Es ist bekannt, daß die Metall-Kohlenstoff-Bindung gespalten werden kann. Somit ist eine Abspaltung der Methylgruppen und eine Übertragung auf die DNA denkbar.

Ergebnisse von *in-vitro*-Untersuchungen beziehen sich fast ausschließlich auf die Konzentration von Chemikalien im Kulturmedium. Es gibt kaum Ergebnisse über die Betrachtung der Konzentration innerhalb von Zellen. Mit analytischen Methoden konnte die intrazelluläre Konzentration an Methylquecksilberchlorid bestimmt werden.

6. Literatur

- ALDRIDGE, W.N.** (1976): The influence of organotin compounds on mitochondrial functions. *Adv. Chem. Ser.*, 157: 186-196
- AMES, B.N., DURSTON, W.E., YAMASAKI, E. and LEE, F.D.** (1973): Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 70 (8): 2281-2285
- AMES, B.N.** (1983): Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, 221 (4617): 1256-1264
- AMES, B.N., MAGAW, R. and GOLD, L.S.** (1987): Ranking possible carcinogenic hazards. *Science*, 236 (4799): 271-280
- ANDERSON, B.E., ZEIGER, E., SHELBY, M.D., RESNICK, M.A., GULATI, D.K., IVETT, J.L. and LOVEDAY, K.S.** (1990): Chromosome aberration and sister chromatid exchange test results with 42 chemicals. *Environ. Mutagen.*, 16, Suppl. 18: 55-137
- ANDREAE, M.O.** (1986): Organoarsenic compounds in the environment. In: Craig, P.J. (Ed.) *Organometallic compounds in the environment*. Longman, Harlow.
- APOSHIAN, H.V.** (1989): Biochemical toxicology of arsenic. In: **HODGSON, R., BEND, J.R.** and **PHILPOT, R.M.** (Eds.): *Reviews in Biochemical Toxicology*, Elsevier, Amsterdam, pp. 265-299
- APOSHIAN, H.V. and APOSHIAN, M.M.** (1989): Newer developments in arsenic toxicology. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 8: 1297-1305
- ARIMOTO-KOBAYASHI, S., HARADA, N, TOKUNAGA, R., ODO, J. and HAYATSU, H.** (1997): Adsorption of mutagens to chlorophyllin-chitosan, an insoluble form of chlorophyllin. *Mutat. Res.*, 381: 243-249
- ARIMOTO,S., OHARA, Y, NAMBA, T., NEGISHI, T and HAYATSU, H.** (1980a): Inhibition of the mutagenicity of amino acid pyrolysis products by hemin and other biological pyrrole pigments. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 92 (2): 662-668
- ARIMOTO, S., NEGISHI, T. and HAYATSU, H.** (1980b): Inhibitory effect of hemin on the mutagenic activities of carcinogens. *Cancer Lett.*, 11: 29-33
- ASHBY, J.R. and CRAIG, P.J.** (1988): Environmental methylation of tin; An assessment. *Sci. Tot. Environ.*, 73: 127-133

- ATHANASIOU, K. and KYRTOPOULOS, S.A.** (1983): Mutagenic and clastogenic effects of organic extracts from the Athenian drinking water. *Sci. Tot. Environ.*, 27: 113-120
- AU, W. and HSU, T.C.** (1984): Assays for chromosome aberrations using mammalian cells in culture. In: **HSU, T.C.** (Ed.). *Cytogenetic Assays on Environmental Mutagens*. Allenheld, Osmun.
- BENEDICT, W.F., BANERJEE, A. and VENKATESAN, N.** (1978): Cyclophosphamide-induced oncogenic transformation, chromosomal breakage and sister chromatid exchange following microsomal activation. *Cancer Res.*, 38: 2922-2924
- BERANEK, D.T.** (1990): Distribution of methyl and ethyl educts following alkylation with monofunctional alkylating agents. *Mutat. Res.*, 231: 11-30
- BETTI, C., DAVINI, T. and BARALE, R.** (1992): Genotoxic activity of methylmercury chloride and dimethylmercury in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 281: 255-260
- BETTI, C., DAVINI, T., HE, J. and BARALE, R.** (1993): Liquid holding effects on methylmercury genotoxicity in human lymphocytes. *Mutat. Res.*, 301: 267-273
- BJORSETH, A. and RAMDAHL, T.** (1985): Sources and emissions of PAH. *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. 2. A., Marcel Dekker, New York
- BLEVANS, R.D. and BRENNAN, L.A.** (1990): Fate of mutagenic activity during conventional treatment of municipal wastewater sludge. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19: 657-664
- BLUNDEN, S.J. and CHAPMAN, A.H.** (1982): The environmental degradation of organotin compounds – A review. *Environ. Technol. Lett.*, 3: 267-272
- BLUNDEN, S.J. and CHAPMAN, A.H.** (1986): Organotin compounds in the environment. In: **CRAIG, P.J.** (Ed.) *Organometallic Compounds in the Environment*. Longman, Harlow
- BOFFETTA, P., MERLER, E. and VAINIO, H.** (1993): Carcinogenicity of mercury and mercury compounds. *Scand. J. Work Environ. Health*, 19: 1-7
- BOLOGNESI, C.** (1990): Carcinogenic and mutagenic effects of pollutants in marine organisms: A review. *Adv. Appl. Biotechn. Ser.*, 5: 67-84
- BORENFREUND, E. and BABICH, H.** (1987): *In vitro* cytotoxicity of heavy metals, acrylamide and organotin salts to neural cells and fibroblasts. *Cell Biol. Toxicol.*, 3: 63-73

- BOROWY-BOROWSKI, H., LIPMAN, R. and TOMASZ, M.** (1990): Recognition between mitomycin C and specific DNA sequences for cross link formation. *Biochemistry*, 29: 10455-10460
- BOYER, I.J.** (1989): Toxicity of dibutyltin, tributyltin and other organotin compounds to human and to experimental animals. *Toxicology*, 55: 253-298
- BRUCKMANN, E.; WOJCIK, A. and OBE, G.** (1999a): Sister chromatid differentiation with biotin-dUTP. *Chromosome Res.*, 7 (3): 185-189
- BRUCKMANN, E.; WOJCIK, A. and OBE, G.** (1999b): X-irradiation of G1 CHO cells induces both true and false SCE in BrdU-substituted cells but only false SCE in biotin-dUTP-substituted cells. *Chromosome Res.*, 7 (4): 277-288
- BRYANT, P.E.** (1984): Enzymatic restriction of mammalian cell DNA using *PvuII* and *BamHI*: evidence for the double-strand break origin of chromosomal aberrations. *Int. J. Radiat. Biol.*, 46: 57-65
- BRYANT, P.E.** (1984): Enzymatic restriction of mammalian cell DNA: evidence for the double-strand breaks as potentially lethal lesions. *Int. J. Radiat. Biol.*: 48: 55-60
- BULL, R.J.** (1985): Carcinogenic and mutagenic properties of chemicals in drinking water. *Sci. Total Environ.*, 47: 385-413
- CARDIN, C.J. and ROY, A.** (1985): Anticancer activity of organotin compounds. 2. Intraction of diorganotin dihalides with nucleic acid base and nucleosides: the synthesis of adenine, adenosine and 9-methyladenine adducts. *Inorg. Chem. Acta*, 107: 57-61
- CARRANO, A.V. and THOMPSON, L.H.** (1982): Sister chromatid exchange and single-gene mutation. In : **WOLFF, S.** (Ed.): *Sister Chromatid Exchange*, John Wiley and Sons, New York, 58-86
- CHALLENGER, F.** (1945): Biological methylation. *Chem. Rev.*, 36: 315-361
- CHEH, A.M., SKOCHDOPOLE, J., KOSKI, P. and COLE, L.** (1980): Nonvolatile mutagens in drinking water: production by chlorination and destruction by sulfite. *Science*, 207: 90-92
- CHOI, S.C., CHASE, T.JR. and BARTHA, R.** (1994): Metabolic pathways leading to mercury methylation in *Desulfovibrio desulfuricans LS* *Appl. Environ. Microbiol.*, 4072-4077
- CHU, G.** (1994): Cellular responses to cisplatin. *J. Biol. Chem.*, 269: 787-790

- CLAYSON, D.B.** (1977): Principles underlying testing for carcinogenicity. *Cancer Bull.*, 29: 161-166
- CLEAVER, J.E.** (1981): Correlations between sister chromatid exchange frequencies and replicon sizes. A model for the mechanism of SCE production. *Exp. Cell Res.*, 136: 27-30
- CRAIG, P.J.** (1986): Organometallic compounds in the environment. In: **CRAIG, P.J.** (Ed.) *Organometallic Compounds in the Environment*. Longman, Harlow
- CRAIG, P.J.** (1988): Biochemical cycles. Natural volatilization of tin. *Nature*, 332: 334
- COONEY, J.J.** (1988): Microbial transformation of tin and tin compounds. *J. Ind. Microbiol.*, 3: 195-204
- CUVIN-ARALAR, M.L.A.** and **FURNESS, R.W.** (1991): Mercury and selenium interaction: a review. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 21: 348-364
- DELNOMDEDIEU, M., BASTI, M.M., STYBLO, M., OTVOS, J.D.** and **THOMAS, D.J.** (1993): Transfer of arsenite from glutathione to dithiols: A model of interaction. *Chem. Res. Toxicol.*, 6: 598-603
- DIKOMEY, E.** and **FRANZKE, J.** (1986): Three classes of DNA strand breaks induced by X-irradiation and internal β -rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 50: 893-908
- DOUGLAS, G.R., NESTMANN, E.R.** and **LEBEL, G.** (1986): Contribution of chlorination to the mutagenic activity of drinking water extracts in *Salmonella* and Chinese hamster ovary cells. *Environ. Health Perspect.*, 69: 81-87
- ECKL, P.M., ANDERSON-CARNAHAN, L.** and **JIRTLE, R.L.** (1993): Aquatic genotoxicity testing with rat hepatocytes in primary culture. I. SCE induction. *Sci. Total Env.*, 136: 111-119
- ECKL, P.M.** (1995): Aquatic genotoxicity testing with rat hepatocytes in primary culture. II. Induction of micronuclei and chromosomal aberrations. *Sci. Total Env.*, 159: 81-89
- EGUSHI, N., KURODA, K.** and **ENDO, G.** (1997): Metabolites of arsenic induced tetraploids and mitotic arrest in cultured cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 32: 141-145
- ENDO G., KURODA, K., OKAMOTO, A.** and **HORIGUSHI, S.** (1992): Dimethylarsenic acid induces tetraploids in chinese hamster cells. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48: 131-137

- EVANS, H.J.** (1977a): Molecular mechanisms in the induction of chromosomal aberrations. In: **SCOTT, D., BRIDGES, B.A.** and **SOBELS, F.H.** (Eds.) Progress in Genetic Toxicology. Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 57-74
- EVANS, H.J.** (1977b): What are sister chromatid exchanges? Chromosomes Today, 6: 315-326
- FELDMANN, J.** and **HIRNER, A.V.** (1995): Occurrence of volatile metal and metalloid species in landfill and sewage gases. Intern. J. Environ. Anal. Chem., 60: 339-359
- FOLLE, G.A., JOHANNES, C., MECHOSO, B.H., MEDINA, I.I.** and **OBE, G.** (1992): The restriction endonuclease *A_{lu}I* induces sister chromatid exchange in Chinese hamster ovary cells. Mutagenesis, 7: 291-294
- FOLLE, G.A., BOCCARDO, E.** and **OBE, G.** (1997): Localization of chromosome breakpoints induced by DNase I in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Chromosoma, 106: 391-399
- FRANKENBERG-SCHWAGER, M.** (1990): Induction, repair and biological relevance of radiation-induced DNA lesions in eucaryotic cells. Radiat. Environ. Biophys., 29: 273-292
- FRANKLIN, W.A., DOETSCH, P.W.** and **HASELTINE, W.A.** (1985): Structural determination of the ultraviolet light-induced thymine-cytosine pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct. Nucleic Acids Res., 13: 5317-5325
- FRIEDBERG, E.C., WALKER, G.C., SIEDE, W.** (1995): DNA Repair and Mutagenesis. Washington, D.C.: ASM (American Society for Microbiology) Press.
- GADD, G.M.** (1993): Microbial formation and transformation of organometallic and organometalloid compounds. FEMS Microbiology Reviews, 11: 297-316
- GALLOWAY, S.M., BLOOM, A.D., RESNICK, M., MARGOLIN, B.H., NAKAMURA, F., ARCHER, P.** and **ZEIGER, E.** (1985): Development of a standard protocol for in vitro cytogenetic testing with Chinese hamster ovary cells: Comparison of results for 22 compounds in two laboratories. Environ. Mutagen., 7: 1-51
- GALLOWAY, S.M., ARMSTRONG, M.J., REUBEN, C., COLMAN, S., BROWN, B., CANNON, C., BLOOM, A.D., NAKAMURA, F., AHMED, A., DUK, S., RIMPO, J., MARGOLIN, B.H., RESNICK, M., ANDERSON, P.** and **ZEIGER, E.** (1987): Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals. Environ. Mutagen., 10, Suppl. 10: 1-175

- GANGULY, B.B., TALUKDER, G. and SHARMA, A.** (1992): Cytotoxicity of tin on peripheral lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.*, 282: 61-67
- GANGULY, B.B.** (1993): Cell division, chromosomal aberration and micronuclei formation in human peripheral blood lymphocytes: Effects of stannic chloride on donor's age. *Biol. Trace Element Res.*, 38:55-62
- GANGULY, B.B.** (1994): Bone marrow clastogenicity of trimethyltin. *Mutat. Res.*, 312: 9-15
- GANTHER, H.E.** (1978): Modification of methyl mercury toxicity and metabolism by selenium and vitamin E: possible mechanisms. *Environ. Health Perspect.*, 25: 71-76
- GEBHART, E.** (1981): Sister chromatid exchange (SCE) and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Hum. Genet.*, 58: 25-254
- GEORIS, B., CARDENAS, A., BUCHET, J.P and LAUWERYS, R.** (1990): Inorganic arsenic methylation by rat tissue slices. *Toxicology*, 63: 73-84
- GHOSH, B.B., TALUKDER, G. and SHARMA, A.** (1988) Effects of stannic chloride on human leukocytes in vitro. *Cytobios*, 56: 23-27
- GHOSH, B.B, TALUKDER, G. and SHARMA, A.** (1989a): Cytotoxic effects of trimethyltin chloride on human peripheral blood lymphocytes in vitro. *Hum. Toxicol.*, 8: 349-353
- GHOSH, B.B, TALUKDER, G. and SHARMA, A.** (1989b): Frequency of sister chromatid exchanges induced by trimethyltin chloride in human peripheral blood lymphocytes as related to age of donors. A brief report. *Mech. Ageing Dev.*, 50: 95-102
- GHOSH, B.B, TALUKDER, G. and SHARMA, A.** (1990): Frequency of micronuclei induced in peripheral blood lymphocytes by trimethyltin chloride. *Mutat. Res.*, 245: 33-39
- GHOSH, B.B, TALUKDER, G. and SHARMA, A.** (1991): Frequency of chromosome aberrations induced by trimethyltin chloride in human peripheral blood lymphocytes *in vitro*, related to age of donors. *Mech. Ageing Dev.*, 57: 125-137
- GIBSON, D.A. and PRESCOTT, D.M.** (1972): Induction of sister chromatid exchanges in chromosomes of rat kangaroo cells by tritium incorporated into DNA. *Exp. Cell Res.*, 74: 397-402
- GIMMLER-LUZ, M.C., ERDTMANN, B. and BALBUENO, R.A.** (1992): Analysis of clastogenic effect of Porto Alegre drinking water supplies on mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.*, 279: 227-231

- GLATT, H.R., and OESCH, F.** (1986): Structural and metabolic parameters governing the mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: **DE SERRES, F.J.** (Ed.), Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection, Vol. 10, Plenum Press, New York, 73-127
- GLATZ, B.A., CHRISWELL, C.D., ARGUELLO, M.D., SVEC, H.J., FRITZ, J.S., GRIMM, S.M. and THOMSON, M.A.** (1978): Examination of drinking water for mutagenic activity. J.Am. Water Works Assoc., 70: 465-468
- GONSEBATT, M.E.; VEGA, L., SALAZAR, A.M., MONTERO, R., GUZMAN, P., BLAS, J., DEL RAZO, L.M., GARCIA-VARGAS, G., ALBORES, A., CEBRIAN, M.E., KELSH, M. and OSTROKY-WEGMAN, P.** (1997): Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. Mutat. Res., 386: 219-228
- GONZALES, F.J.** (1989): The molecular biology of cytochrome P450s. Pharmacol. Rev. 40: 243-288
- GOODHEAD, D.T.** (1989) The initial damage produced by ionizing radiations. Int. Radiat. Biol., 56: 623-634
- GOTTESMAN, M.M.** (1985): Growth properties of Chinese hamster ovary (CHO) cells, in: **GOTTESMAN, M.M.** (Ed.): Molecular Cell Genetics, New York: A Wiley-Interscience Publication, 139-153
- GRIFFITH, J. and RIGGAN, W.B.** (1989): Cancer mortality in U.S. counties with hazardous waste sites and ground water pollution. Arch. Environ. Health, 44: 69-74
- GRIMMER, G.** (1983): Environmental carcinogens: polycyclic aromatic hydrocarbons. CRC Press, Boca Raton
- GRUENER, M.** (1978): Mutagenicity of ozonated, recycled water. Bull. Environ. Contam. Toxicol., 20: 522-526
- GRUENWEDEL, D.W., Glaser, J.F. and CRUIKSHANK, M.K.** (1981): Binding of methylmercury (II) by HeLa S3 suspensionculture cells: intracellular methylmercury levels and their effect on DNA replication and protein synthesis. Chem.-Biol. Interaction, 36: 259-274
- GUSTAVINO, B., JOHANNES, C. and OBE, G.** (1986): The restriction endonuclease *Bam*HI induces chromosomal aberrations in Chinese hamster ovary (CHO) cells. Mutat. Res., 175: 91-95

- HALLAS, L.E., MEANS, J.C. and COONEY, J.J.**, (1982): Methylation of tin by estuarine microorganisms. *Science*, 215: 1505-1507
- HAMASAKI, T., NAGASE, H., SATO, T., KITO, H. and OSE, Y.** (1991): Production of methyltin compounds related to possible conditions in the environment. *Appl-Organometallic Chem.*, 5: 83-90
- HAMASAKI, T., SATO, T., NAGASE, H. and KITO, H.** (1992): The genotoxicity of organotin compounds in SOS chromotest and rec-assay. *Mutat. Res.*, 280: 195-203
- HAMASAKI, T., SATO, T., NAGASE, H. and KITO, H.** (1993): The mutagenicity of organotin compounds as environmental pollutants. *Mutat. Res.*, 300: 265-271
- HARTWIG A.** (1995): Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals*, 8:3-11
- HARTWIG, A., GRÖBLINGHOFF, U.D., BEYERSMANN, D., NATARAJAN, A.T., FILON, R. and MULLENDERS, L.H.F.** (1997): Interaction of arsenic(III) with nucleotide excision repair in UV-irradiated human fibroblasts. *Carcinogenesis*, 18 (2): 399-405
- HARTWIG, A.** (1998): Carcinogenicity of metal compounds: possible role of DNA repair inhibition. *Toxicology Letters*, 102-103: 235-239
- HARVEY, R.G.** (1991): Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry and carcinogenicity. Cambridge University Press, New York
- HASHIZUME, T., UEDA, K., TOKUTSU, S. HANAWA, I. and KINAE, N.** (1992): Monitoring of mutagens in river and marine sediments by *Salmonella*/microsome assay combined with blue cotton method. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 497-503
- HAYATSU, H., ARIMOTO, S., TOGAWA, K. and MAKITA, M.** (1981a): Inhibitory effect of the ether extract of human feces on activities of mutagens: Inhibition by oleic and linoleic acids. *Mutat. Res.*, 81: 287-293
- HAYATSU, H., INOUE, K., OHTA, H., NAMBA, T., TOGAWA, K., HAYATSU, T., MAKITA, M and WATAYA, Y.** (1981b): Inhibition of the mutagenicity of cooked-beef basic fraction by its acidic fraction. *Mutat. Res.*, 91: 437-442
- HAYATSU, H., MATSUI, Y., OHARA, Y., OKA, T. and HAYATSU. T.** (1983a): Charakterization of mutagenic fractions in beef extract and in cooked ground beef. Use of blue-cotton for efficient extraction. *JPN. J.Cancer Res.*, (GANN), 74: 472-482
- HAYATSU, H., OKA, T., WAKATA, A, OHARA, Y., HAYATSU, T., KOBAYASHI H. and ARIMOTO, S.** (1983b): Adsorption of mutagens to cotton bearing covalently bound trisulfo-copper-phthalocyanine. *Mutat. Res.*, 119: 233-238

- HAYATSU, H., OHARA, Y., HAYATSU, T. and TOGAWA, K.** (1983c): Mutagenicity of chalks. A case in which the test results led to the improvement of the quality of commercial goods. *Mutat. Res.*, 124:1-7
- HAYATSU, H., HAYATSU, T. and OHARA, Y.** (1985): Mutagenicity of human urine caused by ingestion of fried ground beef. *JPN J. Cancer Res., (GANN)*, 76: 445-448
- HAYATSU H., KOBAYASHI, H., MICHU-UE, K. and SAKAMOTO, S.** (1986a): Affinity of aromatic compounds having three fused rings to copper phthalocyanine trisulfonate. *Chem. Pharm. Bull.*, 34: 944-947
- HAYATSU, H., HAYATSU, T. and WATAYA, Y.** (1986b): Use of blue cotton for detection of mutagenicity in human feces excreted after ingestion of cooked meat. *Environ. Health Perspect.*, 67: 31-34
- HAYATSU, H.** (1990): Blue cotton - broad possibility in assessing mutagens/ carcinogens in the environment. In: **G. OBE** (Ed.): *Advances in Mutagenesis Research 1*, Springer Verlag, Heidelberg, pp 1-26
- HAYATSU H.** (Ed.) (1991), *Mutagens in Food: Detection and Prevention*, CRC Press, Boca Raton FL
- HAYATSU, H.** (1992): Cellulose bearing covalently linked copper phthalocyanine trisulfonate as an selective adsorbent for polycyclic compounds and its use of environmental mutagens and carcinogens. *J. of Chromatography*, 597: 37-56
- HAYATSU, H., NEGISHI, T., ARIMOTO, S. and HYATSU, T.** (1993): Porphyrins as potential inhibitors against exposure to carcinogens and mutagens. *Mutat. Res.*, 290:71-85
- HAYATSU, H.** (1995): Complex formation of heterocyclic amines with porphyrins: its use in detection and prevention. *Proceedings of the Princess Takamasu International Symposium of the Cancer Research Fund*, 23: 172-180
- HAYATSU, H., HAYATSU, T., ARIMOTO, S. and SAKAMOTO, H.** (1996): A short-column technique for concentrating mutagens/carcinogens having polycyclic structures. *Analyt. Biochem.*, 235: 185-190
- HEALY, S.M., ZAKHARYAN, R.A. and APOSHIAN, H.V.** (1997): Enzymatic methylation of arsenic compounds: IV. In vitro and in vivo deficiency of the methylation of arsenite and monomethylarsonic acid in the guinea pig. *Mutat. Res.* 386: 229-239

- HELMA, C., KNASMÜLLER, S. and SCHULTE-HERMANN, R.** (1994): Die Belastung von Wässern mit genotoxischen Substanzen. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox., 6: 277-288
- HELMA, C. and KNASMÜLLER, S.** (1997): Genotoxische Substanzen in Wässern. II. Industrielle Abwässer. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox., 9: 41-48
- HELMA, C. and KNASMÜLLER, S.** (1997): Genotoxische Substanzen in Wässern. III. Nicht-industrielle Abwässer. UWSF – Z. Umweltchem. Ökotox., 9: 163-168
- HEMINIKI, K.** (1983): Nucleic acids adducts of chemical carcinogens and mutagens. Arch. Toxicol., 52: 249-285
- HILL, A. and WOLFF, S.,** (1982): Increased induction of sister chromatid exchanges by diethylstilbestrol in lymphocytes from pregnant and premonopausal women. Cancer Res., 42: 893-896
- HIRNER, A.V, FELDMANN, J., GOGUEL, R., RAPSOMANIKIS, S., FISCHER, R. and ANDREAE, M.O.** (1994): Volatile metal and metalloid species in gases from municipal waste deposits. Appl. Organometallic Chem., 8: 65-69
- HITTELMAN, W.N and POLLAND, M.** (1982): Induction and repair of DNA and chromosome damage by neocarcinostatine in quiescent normal human fibroblasts. Cancer Res., 42: 4584-4590
- HOFMANN, F.** (1999): Wasserhaushaltsgesetz: Textausgabe mit Erläuterungen und Ausführungsvorschriften, Erich Schmidt Verlag, Berlin
- HSU, T.C.** (Ed.) (1982): Cytogenetic Assays of Environmental Mutagens. Allanheld, New York
- HUANG, C.C.** (1967): Induction of a high incidence of damage to the X chromosomes of *Rattus (Mastomys) natalensis* by base analogs, viruses and carcinogens. Chromosoma, 23: 162-179
- HUTCHINSON, F.** (1973): The lesions produced by ultraviolet light in DNA containing 5-bromuracil. Quart. Rev. Biophys., 6: 201-246
- INAMASU, T., LUKS, H.J. and WEISBURGER, J.H.** (1988): Comparison of XAD-2 column and blue cotton batch techniques or isolation of metabolites of 2-Amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline. JPN. J. Cancer Res. (GANN), 79: 42-48

- ISHIDATE, M. JR. and ODASHIMA, S.** (1977): Chromosome test with 134 compounds on Chinese hamster cells in vitro – a screening for chemical carcinogens. *Mutat. Res.*, 48: 337-354
- ISHIMARA, T., INOUE, H. and MORIOKA, T.** (1990): Risk assessment of drinking water in a reservoir contaminated by PAH's originated from road traffic. *Sci. Total Environ.*, 93: 125-130
- IPCS** – International Program on Chemical Safety (1985), Environmental Health Criteria 46, Guidelines for the Study of Genetic Effects in Human Populations, WHO, Geneva
- JOHANNES, C. and OBE, G.** (1991): Induction of chromosomal aberrations with the restriction endonuclease *AluI* in Chinese hamster ovary cells: comparison of different treatment methods. *Int. J. Radiat. Biol.*, 59: 1379-1393
- KAINA, B., FRITZ, G., MITRA, S. and COQUERELLE, T.** (1991): Transfection and expression of human O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) cDNA in Chinese hamster cells: the role of MGMT in protection against the genotoxic effects of alkylating agents. *Carcinogenesis*, 12: 1857-1867
- KAINA, B., ZIOUTA, A., OCHS, K. and COQUERELLE, T.** (1997): Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O⁶-methylguanine in Mex⁻, Mex⁺ and methylation-tolerant mismatch compromised cells: facts and models. *Mutat. Res.*, 381: 227-241
- KASHIWADA, E., KURODA, K. and ENDO, G.** (1998): Aneuploidy induced by dimethylarsinic acid in mouse bone marrow cells. *Mutat. Res.*, 413: 33-38
- KASPRZAK, K.** (1995): Possible role of oxidative damage in metal-induced carcinogenesis. *Cancer Invest.*, 13(4): 411-430
- KATO, H.** (1977): Mechanisms for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma*, 59: 179-191
- KATO K., HAYASHI, H., HASEGAWA, A, YAMANAKA, K. and OKADA, S.** (1994): DNA damage induced in cultured human alveolar (L-132) cells by exposure to dimethylarsinic acid. *Environ. Health Perspect.*, 102 (Suppl 3): 285-288
- KEMP, L.M. and JEGGO, P.A.** (1986): Radiation induced chromosome damage in X-ray sensitive mutants (xrs) or Chinese hamster ovary cell line. *Mutat. Res.*, 166: 255-263
- KIKUGAWA, K., KATO, T. and HAYATSU, H.** (1985): Mutagenicity of smoked, dried bonito products. *Mutat Res*, 158: 35-44

- KIKUGAWA, H., KATO, T. and HAYATSU, H.** (1986): The presence of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in smoked dry bonito (katsuobushi). *JPN. J. Cancer Res. (GANN)*, 77: 99-102
- KIKUGAWA, H and KATO, T.** (1987): Formation of mutagens, 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) and 2-amino-3,4,8-trimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (4,8-DiMeIQx), in heated fish meats. *Mutat. Res.*, 179: 5-14
- KILBEY, B.J., LEGATOR, M., NICHOLS, W. and RAMEL, C.** (1984): *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Elsevier, Amsterdam, 859
- KIMMEL, E.C., FISH, R.H. and CASIDA, J.E.** (1977): Bioorganotin chemistry. Metabolism of organotin compounds in microsomal monooxygenase systems in mammals. *J. Agric. Food Chem.*, 25: 1-9
- KIRA, S., HAYATSU, H., and OGATA, M.** (1989): Detection of mutagenicity in mussels and their ambient water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 43: 583-589
- KIRA, S., ITOH, T., HAYATSU, H., TAKETA, K., ZHENG, Y., LI, R, HOLLIDAY, T.L. and GIAM, C.S.** (1994): Detection of waterborne mutagens and characterization of chemicals in selected Galveston sites after an oil spill. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 53: 285-291
- KIRA; S., TAKETA, K., NOGAMI, Y. and HAYATSU, H.** (1995): A simple technique for monitoring mutagenicity and Benzo(a)pyrene content in mussels and their ambient water. *Environ. Toxicol. Water Qual.*, 10: 167-172
- KIRA, S., NOGAMI, Y., TAKETA, K. and HAYATSU, H.** (1996): Comparison of techniques for monitoring water-borne polycyclic mutagens: efficiency of Blue Rayon, Sep-Pak C 18, and a biota, *Corbicula*, in concentrating Benzo(a)pyrene in a model water system. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 57: 278-283
- KIRA, S., HORIGUCHI, H., NOGAMI, Y., KOMATSU, T., FUJISAWA, K., ITO, T. and HAYATSU, H.** (1997): Improved blue rayon hanging technique that can measure a time-weighted average concentration of Benzo(a)pyrene in sea water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 59: 941-947
- KOCAN, R.M., LANDOLT, M.L., BOND, J. and BENDITT, E.P.** (1981): *In vitro* effect of some mutagens/carcinogens on cultured fish cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 10: 663-671

- KOCAN, R.M., LANDOLT, M.L. and SABO, K.M.** (1982): Anaphase aberrations: A measure of genotoxicity in mutagen-treated fish cells. *Environ. Mutagen.*, 4: 181-189
- KOOL, H.J., VAN KREIJL, C.F., DE GREEF, E. VAN KRANEN and VAN KRANEN H.J.** (1982): Presence, introduction and removal of mutagenic activity during the preparation of drinking water in The Netherlands. *Environ Health Perspect.*, 46: 207-214
- KRUPP, E.M., GRÜMPING, R., FURCHTBAR, U.R.R. and HIRNER, A.V.** (1996): Speciation of metals and metalloids in sediments with LTGC/ICP-MS. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354: 546-549
- KUHNLEIN, U., BERGSTROM, D. and KUHNLEIN, H.** (1981): Mutagens in feces from vegetarians and non-vegetarians. *Mutat. Res.*, 85: 1-12
- KUSAMRAN, W.R., WAKABAYASHI, K., OGURI, A., TEPSUWAN, R., NAGAO, M. and SUGIMURA, T.** (1994): Mutagenicity of Bangkok and Tokyo river waters. *Mutat. Res.*, 325: 99-104
- KUZMA, R.J., KUZMA, C.M. and BUNCHEER, C.R.** (1977): Ohio drinking water source and cancer rates. *Am. J. Public Health*, 67: 725-729
- LATT, S.A.** (1973): Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 70: 3395-3399
- LATT, S.A.** (1981): Sister chromatid exchange formation. *Ann. Rev. Genet.*, 15: 11-55
- LATT, S.A., ALLEN, J.W., BLOOM, S.E., CARRANO, A., FALKE, E., KRAM, D., SCHNEIDER, E., SCHRECK, R., TICE, R., WHITFIELD, B. and WOLFF, S.** (1981): Sister chromatid exchanges: a report of the gene-tox program. *Mutat. Res.*, 87: 17-62
- LEONHARD, A., JACQUET, P. and LAUWERYS, R.R.** (1983): Mutagenicity and teratogenicity of mercury compounds. *Mutat. Res.*, 114: 1-18
- LUCAS, S.V.** (1985): GC/MS analysis of organics in drinking water concentrates and advanced waste treatment concentrates. *J. Toxicol. Environ. Health*, 4: 919-938
- LUTZ, W.K.** (1984): Structural characteristics of compounds that can be activated to chemically reactive metabolites: use for a prediction of carcinogenic potential. *Arch. Toxicol., Suppl.* 7: 194-207
- MADLE, S. and OBE, G.** (1977): In vitro testing of an indirect mutagen (CTN) with human leukocyte cultures: activation with liver microsomes and use of dialysis bags. *Mutat. Res.*, 56: 101-103

- MALLING, H.V.** (1971): Dimethylnitrosamine: formation of mutagenic compounds by interaction with mouse liver microsomes. *Mutat. Res.*, 13: 425-429
- MANO, H., YAMAMOTO, M., ARAYA, J.C., KATO, K., TSUTSUI, M., OHATA, T., YOSHIDA, K., KINEBUCHI, H. and HAYATSU, H.** (1993): Mutagenicity of blue rayon extracts of human bile in the Ames test. *Mutat. Res.*, 290: 303-309
- MARON, D.M. and AMES, B.N.** (1984): Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. In: **KILBEY, B.J., LEGATOR, M., NICHOLS, W. and RAMEL, C.**: Handbook of mutagenicity test procedures. Elsevier, New York
- MASS, M.J. and WANG, L.** (1997): Arsenic alters cytosine methylation patterns of the promoter of the tumor suppressor gene *p53* in human lung cells: a model mechanism of carcinogenesis. *Mutat. Res.*, 386: 263-277
- MATSUOKA, A., HAJASHI, M. and ISHIDATE, M.JR.** (1979): Chromosome aberration test on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutat. Res.*, 66: 277-290
- MATILAINEN, T.** (1995): Involvement of bacteria in methylmercury formation in anaerobic lake waters. *Water, Air and Soil Pollution*, 80: 757-764
- MCCLINTOCK, B.** (1938): The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of aberrant mitotic behaviour of ring-shaped chromosomes. *Genetics*, 23: 315-376
- MEIER, J.R.** (1988): Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat. Res.*, 196: 211-245
- MILLER, K.** (1991): Clastogenic effects of bleomycin, cyclophosphamide and ethylmethansulphonate on resting and proliferating human B- and T-lymphocytes. *Mutat. Res.*, 215 (2): 241-251
- MISRA, T.K.** (1992): Bacterial resistance to inorganic mercury salts and organomercurials. *Plasmid*, 27: 4-16
- MITRA, S. and KAINA, B.** (1991): Regulation of alkylation damage repair in mammalian genome. *Progr. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.*, 44: 109-142
- MOHTASHAMIPUR E., NORPOTH, K. and LIEDER, F.** (1985): Isolation of frameshift mutagens from smokers urine: experiences with three concentration methods. *Carcinogenesis*, 6: 783-788

- MONARCA, S., MEIER, J.R., and BULL, R.J.** (1983): Removal of mutagens from drinking water by granular activated carbon: Evaluation using bacterial mutagenicity tests. *Water Res.*, 17: 1015-1026
- MOORE, M.M., HARRINGTON-BROCK, K. and DOERR, C.** (1997): Relative genotoxic potency of arsenic and its methylated metabolites. *Mutat. Res.*, 386: 279-290
- MORGAN W.F. and WOLFF, S.** (1984): Effect of 5-bromodeoxyuridine substitution on sister chromatid exchange induction by chemicals. *Chromosoma*, 89: 285-289
- MORGAN, W.F., PHILLIPS, J.W., CHUNG, H.W., AGER, D.D. and WINEGAR, R.A.** (1990): The use of restriction endonucleases to mimic the cytogenetic damage induced by ionizing radiation. In: **WALLACE, S.S. and PANTHER, R.B.** (Eds.): *Ionizing Radiation Damage to DNA: Molecular Aspects*. Wiley-Liss, New York, pp. 191-199
- MORRIS, S.M.** (1991): The genetic toxicology of 5-bromodeoxyuridine in mammalian cells. *Mutat. Res.*, 258: 161-188
- MOSER F.H. and THOMAS A.L.** (1983): *The Phthalocyanines, Vol.I, Properties; Vol.II Manufacture and Applications*, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- MÜHLMANN-DIAZ, M.C. and BEDFORD, J.S.** (1995): Comparison of gamma-ray-induced chromosome ring and inversion frequencies. *Radiat. Res.*, 143: 175-180.
- MÜLLER, D., NATARAJAN, A.T., OBE, G. and RÖHRBORN, G.** (Eds.) (1982): *Sister-Chromatid-Exchange-Test*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- MURKEN, J. und CLEVE, H.** (1988): *Humangenetik*, 4. Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- MURRAY, V.** (1987): O⁶-methylguanine specifically induces AT → GC transition mutations. *Mutat. Res.*, 190: 267-270
- NATARAJAN, A.T., TATES, A.D., VAN BUUL, P.P.W., MEIJERS, M. and DE VOGEL, N.** (1976): Cytogenetic effects of mutagens/carcinogens after activation in a microsomal system in vitro. I. Induction of chromosome aberrations and sister chromatid exchanges by diethylnitrosamine (DEN) and dimethylnitrosamine (DMN) in CHO cells in the presence of rat liver microsomes. *Mutat. Res.*, 37: 83-90
- NATARAJAN, A.T. and OBE, G.** (1978): Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations, I. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production in G2 stage of the cell cycle. *Mutat. Res.*, 52: 137-149

- NATARAJAN, A.T., OBE, G., VAN ZEELAND, A.A.; PALITTI, F., MEIJERS, M. and VERDEGAAL-IMMERZEEL, E.A.M.** (1980): Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations, II. Utilization of *Neurospora* endonuclease for the study of aberration production by X-rays in G1 and G2 stages of the cell cycle. *Mutat. Res.*, 69: 293-305
- NATARAJAN, A.T. and OBE, G.** (1984): Molecular mechanisms involved in the production of chromosomal aberrations III. Restriction endonucleases. *Chromosoma*, 90: 120-127
- NATARAJAN, A.T., MULLENDERS, L.H.F., MEIJERS, M. and MUKHERJEE, U.** (1985): Induction of sister chromatid exchange by restriction endonucleases. *Mutat. Res.*, 144: 33-39
- NESTMANN, E.R., LEBEL, G.L., WILLIAMS, D.T. and KOWBEL, D.J.** (1979): Mutagenicity of organic extracts from canadian drinking water in the Salmonella/Mammalian-microsome assay. *Environ. Mutagen.*, 1: 337-345
- NOWAK, C. and OBE, G.** (1984): On the origin of chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes in vitro. I. Experiments with *Neurospora* endonuclease and polyethylene glycol. *Hum.Genet.*, 66: 335-343
- NOWAK, C. and OBE, G.** (1985): Influence of *Neurospora* endonuclease on trenimon-induced structural chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in human peripheral lymphocytes and Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.*, 149: 468-474
- NOWAK, C., OBE, G., VAN KESTEREN-VAN LEEUWEN, A.C. and NATARAJAN, A.T.** (1984): A cytological test system to detect mutagen-induced DNA single-strand breaks: posttreatment of G₂ phase CHO cells with *Neurospora* endonuclease. *Mutat. Res.*, 140: 111-115
- OBE, G. and NATARAJAN, A.T.** (1980a): Mechanisms of the origins of structural chromosomal aberrations. In: **MÜLLER, D., NATARAJAN, A.T., OBE, G. and RÖHRBORN, G.** (Eds.): Sister-Chromatid-Exchange Test. Workshop „Gesellschaft für Umwelt-Mutationsforschung“ (GUM). Thieme, Stuttgart, New York, pp.1-5
- OBE, G. and NATARAJAN, A.T.** (1980b): Comparison between inactivated Sendai virus, polyethylene glycol and Tween-80 as permeabilizing agents for introduction of *Neurospora* endonuclease into X-irradiated cells. *Mutat. Res.*, 71: 133-138

- OBE, G., NATARAJAN, A.T. and PALITTI, F.** (1982): Role of DNA double strand breaks in the formation of radiation induced chromosomal aberrations. In: **NATARAJAN, A.T., OBE, G. and ALTMANN, H.** (Eds.): DNA Repair, Chromosome Alterations and Chromatin Structure. Elsevier Biomedical, Amsterdam, pp. 1-9
- OBE G. and WINKEL, E.-U.** (1985): The chromosomebreaking activity of the restriction endonuclease *AluI* in CHO is independent of the S-Phase of the cell cycle. *Mutat. Res.*, 152: 25-29
- OBE, G., PALITTI, F., TANZARELLA, C. DEGRASSI, F. and DASALVIA, R.** (1985): Chromosomal aberrations induced by restriction endonucleases. *Mutat. Res.*, 150: 359-368
- OBE, G.; JONAS, R. and SCHMIDT, S.** (1986): The restriction endonuclease *AluI* induces chromosomal aberrations in human peripheral lymphocytes in vitro. *Mutat. Res.*, 163: 271-275
- OBE, G. and JOHANNES, C.** (1987): Chromosomal aberrations induced by the restriction endonucleases *AluI* and *BamHI*: comparison with X-rays. *Biol. Zbl.*, 106: 175-190
- OBE, G., VASUDEV, V. and JOHANNES, C.** (1987): Chromosome aberrations induced by restriction endonucleases, in: **G.OBE and A. BASLER** (Eds.), *Cytogenetics – Basic and Applied Aspects*, Springer-Verlag, Berlin, 300-314
- OBE, G. and NATARAJAN, A.T.** (1993): Mutagenicity tests with cultured mammalian cells: cytogenetic assays. In: **M. CORN** (Ed.): *Handbook of Hazardous Materials*, Academic Press, New York, pp 453-461
- OBE, G., JOHANNES, C., WERTHMANN, I. and FOLLE, G.A.** (1993): Chromatid-type abberations induced by *AluI* in Chinese hamster ovary cells. *Mutat. Res.*, 299: 305-311
- OBE, G., SCHUNCK, C and JOHANNES, C.** (1994): Induction of sister chromatid exchanges by *AluI* , DNaseI, benzon nuclease and bleomycin in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Mutat. Res.*, 163: 51-55
- OECD** guidelines for testing of chemicals (1983), Genetic Toxicology. *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test, No. 473
- OECD** guidelines for testing of chemicals (1983), Genetic Toxicology. *In vitro* Sister Chromatid Exchange Test, No. 479

- OHE, T., ITO, H. and KAWABUTI, M.** (1993): Genotoxicity of blue rayon extracts from river waters using sister chromatid exchange in cultured mammalian cells. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 25: 293-297
- ÖNFELT, A.** (1983): Spindle disturbances in mammalian cells. I. Changes in the quantity of free sulfhydrylgroups in relation to survival and c-mitosis in V79 Chinese hamster cells after treatment with colcemid, diamide, carbaryl and methyl mercury. *Chem.-Biol. Interact.*, 46: 201-217
- ÖNFELT, A.** (1986): Mechanistic aspects on chemical induction of spindle disturbances and normal chromosome numbers. *Mutat. Res.*, 168: 249-300
- OREMLAND, R.S., CULBERTSON, C.W. and WINFREY, M.R.** (1991): Methylmercury decomposition in sediments and bacterial cultures: involvement of methanogenes and sulfate reducers in oxidative demethylation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57: 130-137
- PAGE, T., HARRIS, R.H. and EPSTEIN, S.S.** (1976): Drinking water and cancer mortality in Luisiana. *Science*, 193: 55-57
- PAINTER, R.B.** (1980): A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat. Res.*, 70: 337-341
- PANDA, B.P., SUBHADRA, A.V. and PANDA, K.K.** (1995): Prophylaxis of antioxidants against the genotoxicity of methyl mercuric chloride and maleic hydrazide in *Allium* micronucleus assay. *Mutat. Res.*, 343: 75-84
- PANTELIAS, G.E. and MAILLIE, H.D.** (1984): The use of peripheral blood mononuclear cell prematurely condensed chromosomes for biological dosimetry. *Radiat. Res.*, 99 (1): 140-150
- PENNINKS, A.H. and SEINEN, W.** (1980): Toxicity of organotin compounds. IV. Impairment of energy metabolism of rat thymocytes by various dialkyltin compounds. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 56: 221-231
- PERRY, P. and WOLFF, S.** (1974): New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature*, 251: 156-158
- PERRY, P. and EVANS, H.J.** (1975): Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature*, 258: 121-125
- PERRY P.** (1980): Chemical mutagens and sister chromatid exchange. In: **DE SERRES, F.J.** and **HOLLAENDER, A.** (Eds.): *Chemical Mutagens, Principles and Methods for Their Detection*, Vol. 6. New York: Plenum Press, pp. 1-39

- PETRES, J. BARON, D. and HAGEDORN, M.** (1977): Effects of arsenic cell metabolism and cell proliferation: cytogenetic and biochemical studies. *Environ. Health Perspect.*, 19: 223-227
- RAMEL, C.** (1969): Methylmercury as a mitosis disturbing agent. *J. Japan. Med. Assoc.*, 61: 1072-1081
- REHANA, Z., MALIK, A. and AHMAD, M.** (1996): Genotoxicity of the Ganges water at Narora (U.P.), India. *Mutat. Res.*, 367: 187-193
- REVELL, S.H.**, (1974): The breakage-and-reunion theory and the exchange theory for chromosomal aberrations induced by ionizing radiations: A short history, in: **LETT, J.T., ADLER, K. and ZELLE, M.**, (Eds.), *Advances in Radiation Biology*, Vol. 4, Academic Press, New York
- RUDEL, R., SLAYTON, T.M. and BECK, B.** (1996): Implications of arsenic genotoxicity for dose response of carcinogenic effects. *Reg. Toxicol. Pharmacol.*, 23: 87-105
- SAFFHILL, R., MARGISON, G.P. and O'CONNOR, P.J.** (1985): Mechanisms of carcinogenesis induced by alkylating agents. *Biochem. Biophys. Acta*, 823: 111-145
- SAGER, P.R., Doherty, R.A. and Olmsted, J.B.** (1983): Interaction of methylmercury with microtubules in cultured cells and in vitro. *Exp. Cell Res.*, 146: 127-137
- SAKAMOTO, H. and HAYATSU, H.** (1988): Concentration of mutagenic components in river water by use of adsorbents bearing covalently bonded copper phthalocyanine. *Abstr. 108th Annu. Meet. Pharm. Soc. JPN*: 667
- SAKAMOTO, H. and HAYATSU, H.** (1990): A simplified method for monitoring mutagenicity of river water. Mutagens in Yodo river system, Kyoto-Osaka. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 44: 521-528
- SAKAMOTO, H., OHE, T., HAYATSU, T. and HAYATSU, H.** (1996): Evaluation of blue-chitin column, blue-rayon hanging, and XAD-resin column techniques for concentrating mutagens from two Japanese rivers. *Mutat. Res.*, 371: 79-85
- SATO, T., OSE, Y., NAGASE, H. and HAYASE, K.** (1987): Adsorption of mutagens by humic acids. *Sci. Total Environ.*, 62: 305-310
- SAVAGE, J.R.K.** (1976): Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J. Med. Genet.*, 13: 103-122
- SAVAGE, J.R.K.** (1983): Some practical notes on chromosomal aberrations. *Clin. Cytogenet. Bull.*, 1: 64-76

- SAX, K.** (1940): An analysis of X-ray induced chromosomal aberrations in *Tradescantia*. *Genetics*, 25: 41-68
- SAYATO, Y., NAKAMURO, K., UENO, H. and GOTO, R.** (1990): Mutagenicity of adsorbates to a copper-phthalocyanine derivative recovered from municipal river water. *Mutat. Res.*, 242: 313-317
- SCHWARTZ, D.J., SAXENA, J. and KOPFLER, F.C.** (1979): Water distribution system, a new source of mutagens in drinking waters. *Environ. Sci. Technol.*, 13, 1138-1141
- SCHWARTZ, J.L. and WEICHSELBAUM, R.R.** (1984): The mechanism of 3-aminobenzamide-mediated increases in spontaneous and induced SCEs. In: **TICE, R.R., and HOLLAENDER, A.** (1984): *Sister Chromatid Exchanges. 25 Years of Experimental Research. Part A, The Nature of SCEs.* New York: Plenum Press, pp. 293-304
- SCHUBERT, I.** (1990): Sister chromatid exchanges and chromatid aberrations: a comparison, *Biol. Zent.bl.*, 109: 7-18
- SHAFFER, D.A.** (1977): Replication bypass model of sister chromatid exchanges and implications for Bloom's syndrome and Fanconi's anemia. *Hum Genet.*, 39: 177-190
- SHIMADA, S. and GUENGERICH, F.P.** (1991): Activation of Amino- α -carboline, 2-Amino-1-ethyl-6-phenylimidazo[4,5-*b*]pyridine and a copper phthalocyanine cellulose extract of cigarette smoke condensate by cytochrome P450 enzymes in rat and human liver microsomes. *Cancer Res.*, 51: 5284-5291
- SHINADA, M., MUTO, H., OKAMURA, Y. and TAKAZIWA, Y.** (1990): Induction of phospholipid peroxidation and its characteristics by methyl mercury chloride and mercuric chloride in rat kidney. *Chemosphere*, 21: 57-69
- SINGER, B.** (1975): The chemical effects of nucleic acid alkylation and their relation to mutagenesis and carcinogenesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 15: 219-284
- SINGER, B. and GRUNDBERGER, D.** (1983): *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens.* Plenum Press, New York
- SKERFVING, S., HANSSON, K. and LINDSTEN, J.** (1970): Chromosome breakage in humans exposed to methylmercury through fish consumption. *Arch. Environ. Health*, 21: 133-139
- SMITH, I.R.** (1990): Erythrocytic micronuclei in wild fish from Lake Superior and Ontario that have pollution-associated neoplasia. *J. Great Lakes Res.*, 16: 139-142

- SNOEIJ, N.J., PENNINKS, H. and SEINEN, W. (1987):** Biological activity of organotin compounds – An overview. *Environ. Res.*, 44: 335-353
- SNOW, E.T. (1992):** Metal carcinogenesis: mechanistic implications. *Pharmac. Ther.*, 53: 31-65
- STAHL, R.G. (1991):** The genetic toxicology of organic compounds in natural waters and wastewaters. *Ecotox. Environ. Safe.*, 22: 94-125
- STRASDEIT, H. (1998):** Methylquecksilber: eine Warnung. *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, 46: 846-848
- STRYER, L. (1991):** Biochemie. Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg
- STUMPF, M., TERNES, T.A., HABERER, K., SEEL, P. und BAUMANN, W. (1996):** Nachweis von Arzneimittelrückständen in Kläranlagen und Fließgewässern. *Vom Wasser*, 86: 291-303
- SUBRAHMANYAN, N.C., GOULD, A.R. and DOY, C.H. (1976):** Cleavage of plant chromosomes by restriction endonucleases. *Plant Sci. Let.*, 6: 203-208
- SUGIMURA, T. (1985):** Carcinogenicity of mutagenic heterocyclic amines formed during the cooking process. *Mutat. Res.*, 150: 33-41
- SUGIMURA, T. (1988):** Successful use of short-term tests for academic purposes: their use in identification of new environmental carcinogens with possible risk for humans. *Mutat. Res.*, 205 (4): 33-39
- TAKEHISA, S. (1982):** Induction of sister chromatid exchanges by agents. In: **WOLFF, S.**, Sister Chromatid Exchanges, John Wiley and Sons, New York, 87-147
- TAYLOR, J.H. (1958):** Sister chromatid exchanges in Tritium-labeled chromosomes. *Genetics*, 43: 515-529
- TAMAKI, S. and FRANKENBERGER, W.T. (1992):** Environmental biochemistry of arsenic. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 124: 79-110
- THAYER, J.S. and BRINCKMAN, F.E. (1982):** The biological methylation of metals and metalloids. *Adv. Organometallic Chem.*, 20: 313-356
- THAYER, J.S. (1984):** Organometallic Compounds and Living Organisms. Academic Press, New York.
- THAYER, J.S. (1988):** Organometallic Chemistry, An Overview. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim

- THAYER, J.S.** (1989): Methylation: its role in the environmental mobility of heavy elements. *Appl. Organometallic Chem.*, 3: 123-128
- TRAUT, W.** (1991): Chromosomen. Klassische und molekulare Cytogenetik. Springer-Verlag, Berlin
- TUCKER, J.D., AULETTE, A., CIMIO, M.C., DEARFIELD, K.L., JACOBSON-KRAM, D., TICE, R.R. and CARRANO, A.V.** (1993): Sister-chromatid exchange: second report of the gene-tox program. *Mutat. Res.*, 297: 101-180
- VAN KREIJL, C.F., KOOL, H.J., DE VRIES, M., VAN KRANEN, H.J. and DE GREEF, E.** (1980): Mutagenic activity in the rivers Rhine and Meuse in The Netherlands. *Sci. Total Environ.*, 15: 137-147
- VARTAINEN, T., LEMATAINEN, A., JÄÄSJELÄINEN, S. and KAURAINEN, P.** (1987): Comparison of solvent extractions and resin adsorption for isolation of mutagenic compounds from chlorinated drinking water with high humus content. *Water Res.*, 21: 773-778
- VEGA, L., GONSEBATT, M.E. and WEGMAN P.O.** (1995): Aneugenic effect of sodium arsenite on human lymphocytes in vitro: an individual susceptibility effect detected. *Mutat. Res.*, 334: 365-373
- VENUGOPAL, B. and LUCKEY, T.D.** (1978): Tin, in: *Metal Toxicity in Mammals: Chemical Toxicity of Metals and Metalloids*, Vol. 2, Plenum, New York, pp. 180-185
- VOGEL, D.G., MARGOLIS, R.L. and MOTTET, N.K.** (1985): The effect of methyl mercury binding to microtubules. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 80: 473-786
- VOS, J-M.H.** (1995): *DNA Repair Mechanisms: Impact on Human Diseases and Cancer*. Springer-Verlag, Heidelberg, 1995
- WADA, O., MANABE, S., IWAI, H. and ARAKAWA, Y.** (1982): Recent progress in the study of analytical methods, toxicity metabolism and health effects of organotin compounds. *Jpn. J. Ind. Health*, 24: 24-54
- WATERS, L.C., SCHENLEY, R.L., OWEN, B.A., WALSH, P.J., HSIE, A.W., JOLLEY, R.L., BUCHANAN, M.V. and CONDIE, L.W.** (1989): Biotesting of wastewater: A comparative study using the *Salmonella* and CHO assay systems. *Environ. Mol. Mutagen.*, 14: 254-263

- WEINSTEIN, D. KATZ, M.L. and KATZMER, S.** (1977): Chromosomal effects of carcinogens and non-carcinogens on WI-38 after short-term exposure with and without metabolic activation. *Mutat. Res.*, 46: 297-304
- WINEGAR, R.A. and PRESTON, R.J.,** (1988): The induction of chromosome aberrations by restriction endonucleases that produce bluntend or cohesive-end double-strand breaks. *Mutat. Res.*, 197: 141-149
- WOJCIK, A., OPALKA, B. and OBE, G.** (1999): Analysis of inversions and sister chromatid exchanges in chromosome 3 of human lymphocytes exposed to Xrays. *Mutagenesis*, 14: 633-638
- WOLFF, S., BODYCOTE, J. and PAINTER, R.B.** (1974): Sister chromatid exchanges induced in Chinese hamster ovary cells by UV irradiation of different stages of the cell cycle: The necessity for cells to pass through S. *Mutat. Res.*, 25: 73-81
- YAMAMOTO, S, KONISHI, Y., MATSUDA, T., MURAI, T, SHIBATA, M, YUASA, I, OTANI, S., KURODA, K., ENDO, G. and FUKUSHIMA, S.** (1995): Cancer induction by an organic arsenic compound, dimethylarsinic acid (cacodylic acid), in F344/DuCrj rats after pretreatment with five carcinogens. *Cancer Res.*, 55: 1271-1276
- YAMAMOTO, S., WANIBUCHI, H., HORI, TAKA-AKI, YANO, Y., MATSUI-YUASA, I., OTANI, S, CHEN, H., YOSHIDA, K., KURODA, K., ENDO, G. and FUKUSHIMA, S.** (1997): Possible carcinogenic potential of dimethylarsinic acid as assessed in rat in vivo models: a review. *Mutat. Res.*, 386: 353-361
- YAMANAKA, K., OHBA, H., HASEGAWA, A., SAWAMURA, R. and OKADA, S.** (1989): Mutagenicity of dimethylated metabolites of inorganic arsenics. *Chem. Pharm. Bull.*, 37: 2753-2756
- YAMANAKA, K. and OKADA, S.** (1994): Induction of lung-specific DNA damage by metabolically methylated arsenics via the production of free radicals. *Environ. Health Perspect.*, 102, Suppl.3: 37-40
- YAMANAKA, K., HAYASHI, H., KATO, K., HASEGAWA, A. and OKADA, S.** (1995): Involvement of preferential formation of apurinic/apyrimidinic sites in dimethylarsenic-induced alveolar epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 207: 244-249
- YAMANAKA, K., HAYASHI, H., TACHIKAWA, M., KATO, K., HASEGAWA, A., OKU, N. and OKADA, S.** (1997): Metabolic methylation is a possible genotoxicity-enhancing process of inorganic arsenics. *Mutat. Res.*, 394: 95-101

- YAMASAKI, E.** and **AMES, B.N.** (1977): Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 3555-3559
- ZAKHAROV, A.F.** and **EGOLINA, N.A.** (1972): Differential spiralization along mammalian mitotic chromosomes. I. BudR-revealed differentiation in Chinese hamster chromosomes. Chromosoma, 38: 341-365
- ZWANENBURG, T.S.B.** and **NATARAJAN, A.T.** (1984): 3-Aminobenzamide-induced sister chromatid exchanges are dependent on incorporated bromodeoxyuridine in DNA. Cytogenet. Cell Genet., 38: 278-281
- ZWANENBURG, T.S.B., VAN ZEELAND, A.A.** and **NATARAJAN, A.T.** (1985): Influence of incorporated bromodeoxyuridine on the induction of chromosomal alterations by ionizing radiation and long-wave UV in CHO cells. Mutat. Res., 150: 283-292

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Carmen Ehrenstein
Geburtsdatum und -ort: 11.09.1969, Koblenz
Familienstand: ledig, keine Kinder

Schulbildung:

1976 – 1980 Grundschole in Koblenz-Ehrenbreitstein
1980 – 1989 Gymnasium Schönstätter Marienschule in Vallendar
1989 Abschluß: Abitur

Studium:

1989 – 1995 Universität GHS Essen, Lehramt Sek II/I, Biologie und Chemie

Juni 1995 Abschluß: 1. Staatsexamen für das Lehramt Sek II/I in den Fächern Biologie und Chemie

Promotion:

Juli 1996- Juni 1999 Promotion am Institut für Genetik an der Universität GHS Essen im Rahmen eines von der DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) geförderten Graduiertenkollegs unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. G. Obe

Dezember 1999 Abgabe der Dissertation: „Kontamination von Stadtgewässern mit mutagenen Substanzen“

Berufstätigkeit:

Juli 1995 – Juni 1996 Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität GHS Essen in der Arbeitsgruppe Genetik bei Prof. Dr. G. Obe

seit Juli 1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Universität GHS Essen in der Arbeitsgruppe Genetik bei Prof. Dr. G. Obe

Stipendien:

Oktober 1991 – Februar 1994 Stipendium der Kurt-Hansen-Stiftung, Bayerwerk Leverkusen

Juli 1996 – Juli 1999 Promotionsstipendium der DFG

Danksagung

Am Gelingen dieser Arbeit waren verschiedene Personen und Institutionen beteiligt, denen ich an dieser Stelle ganz herzlich danken möchte.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Günter Obe, der es mir ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe diese Arbeit zu erstellen und mir jederzeit mit guten Ratschlägen zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. Alfred Hirner, Leiter des Institutes für Umweltanalytik an der Universität GS Essen, möchte ich für die Zusammenarbeit bei den Versuchen mit den metallorganischen Verbindungen danken, für die Bereitstellung der Substanzen und die Möglichkeit in seinem Labor zu arbeiten. Vielen Dank auch an seine Mitarbeiterinnen Frau Dr. Peng Shu für die Messungen an der ICP-MS und Frau Dipl.-Chem. Daniela Flaßbeck für die Analysen mit der HPLC.

Herrn Dipl.-Chem. Markus Dolfen vom KFZ-Jülich danke ich für die Bestimmung des Methylquecksilbers.

Herrn Prof. Dr. Hikoya Hayatsu von der Universität Okayama, Japan, danke ich für die Durchführung des Ames-Test bei den Gewässeruntersuchungen.

Weiterhin bedanke ich mich bei den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Genetik für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre, sowie bei allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dipl.-Inf. Daniel Brunner für seine Hilfe bei Computerfragen.

Vielen Dank auch an Herrn Martin Boettner für seine geleistete Hilfe und Geduld und an meine Eltern für ihre langjährige Unterstützung.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des von der DFG geförderten Graduiertenkollegs „Verbesserung des Wasserkreislaufs urbaner Gebiete zum Schutz von Boden und Grundwasser“ (GRK 153/2) angefertigt.